

at the 0 and 10  $\mu\text{g}$  levels. There were significant differences among all the reactions at 10 and 40  $\mu\text{g}$ , except for the results with antibovine and antiporcine anti-DNase II IgG, as treatment with either of these resulted in no activity in the supernatant at the 10  $\mu\text{g}$  level. At the higher levels all the reactions (except those with saline and normal rabbit IgG aforementioned) led to significant differences. Here, too, the homologous reaction always resulted in residual DNase levels lower than the rest. The results with the porcine phosphodiesterase were similar although not as clear cut. The homologous reaction was always lowest, but significantly so only at the 0, 10 and 40  $\mu\text{g}$  levels. In general, the differences among the other reactions were not significant.

Linear regression analysis was also carried out on the data for residual activity using the levels 40, 80, 120 and

200  $\mu\text{g}$ . The linear correlation coefficients varied from 0.97 to 0.999.

It is obvious from both the precipitation and residual activity data that the strongest reactions occurred between a particular enzyme and the antibody to it. There was considerable cross reactivity between the DNases from the 2 different sources. There was some cross reaction between the hog spleen DNase and phosphodiesterase and little between the bovine spleen DNase and hog spleen phosphodiesterase.

These data bear out the close relationship between DNase II from 2 different species, a conclusion reached by CORDONNIER and BERNARDI on the basis of other types of studies<sup>7</sup>. The data also indicate that there is some slight antigenic relationship between hog spleen DNase II and phosphodiesterase, a point not obvious from our studies with antibody affinity columns<sup>8</sup>. However, the antigenic relationship between DNase II and nonspecific phosphodiesterase from one species (hog) is even less than that between the DNases II from two distinct species (hog and ox), and whether this betokens an evolutionary relationship or not remains to be seen.

**Zusammenfassung.** Immunopräcipitationsreaktionen mit Schweinemilz, Desoxyribonuklease II, unspezifische Phosphodiesterase und Rindermilz-DNase II zeigen, dass eine engere immunologische Beziehung zwischen den Nukleasen beider Spezies besteht, als zwischen den beiden Schweinephosphohydrolasen.

K. W. RYDER, jun. and M. E. HODES<sup>9</sup>

Departments of Biochemistry, Medical Genetics and Medicine, Indiana University Medical Center, 1100 West Michigan Street, Indianapolis (Indiana 46202, USA), 26 April 1973.

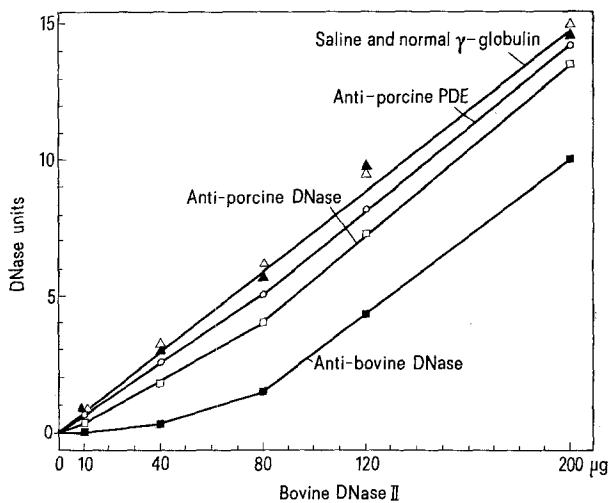


Fig. 3. Residual enzyme activity after precipitation of bovine DNase II with rabbit antibovine DNase II IgG (■), antihog DNase II IgG (□), antihog phosphodiesterase IgG (○), normal rabbit IgG (▲) or saline (Δ).

<sup>7</sup> C. CORDONNIER and G. BERNARDI, *Biochem. J.* 94, 12P (1965).

<sup>8</sup> K. W. RYDER and M. E. HODES, *J. Chromat.* 80, 128 (1973).

<sup>9</sup> We thank Dr. PAO-LO YU for the statistical analyses.

## Raster-elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Hausstaub- und Asthma-Milbe *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart, 1897) (Acarina: Astigmata)

1897 beschrieb TROUESSART<sup>1</sup> zum erstenmal die Milbe *Dermatophagoides pteronyssinus* unter dem Namen *Mealia pteronyssina*. 1953 ordnete DUBININ<sup>2</sup> diese Art der Gattung *Dermatophagoides* Bogdanov, 1864 zu.

1964 fanden VOORHORST und das Biologen-Ehepaar SPIEKSMAS<sup>3</sup>, dass der grösste Teil der Milbenfauna im Staub der Häuser aus *Dermatophagoides pteronyssinus* besteht. Später ist es ihnen gelungen, diese Art zu züchten und mit den Extrakten Hautteste durchzuführen. Da die meisten Patienten auf Extrakte von *Dermatophagoides pteronyssinus* und von Hausstaub gleich reagierten, schlossen sie daraus, dass diese Milbe mit dem Hausstauballergen identisch und somit für Asthma bronchiale, Rhinitis u.a. verantwortlich sei.

1966 wurde die Morphologie der Tiere erstmals gründlich von FAIN<sup>4</sup> beschrieben. 1967 wurde die Milbe wegen ihres häufigen Vorkommens in Häusern von SPIEKSMAS<sup>5</sup> als «Hausstaubmilbe» benannt. 1970 publizierte WHARTON<sup>6</sup> die erste REM-Aufnahme einer Tritonymphe. 1971 konnten GRIFFITHS et al.<sup>7</sup> *Dermatophagoides farinae*

von *Dermatophagoides microceras* mit Hilfe des REM trennen. 1971 beschrieb GRIFFITHS<sup>8</sup> die Gefrier-trocknung als eine geeignete Fixationsmethode für verschiedene weichhäutige Acarina.

**Material und Technik.** Die Tiere stammen aus den Zuchten eines der Autoren<sup>9</sup>. Unsere Untersuchungen begannen

<sup>1</sup> E. TROUESSART, in *Hucusque in Italia Reperta. Patavii 1. Cryptostigmata* (Ed. A. BERLESE; 1897), p. 104.

<sup>2</sup> W. B. DUBININ, *Fauna SSSR*, 6, 77 (1953).

<sup>3</sup> R. VOORHORST, M. I. A. SPIEKSMAS-BOEZEMAN and F. TH. M. SPIEKSMAS, *Allergie Astham* 10, 329 (1964).

<sup>4</sup> A. FAIN, *Acarologia* 8, 302 (1966).

<sup>5</sup> F. TH. M. SPIEKSMAS, Thesis, Leiden (1967).

<sup>6</sup> G. E. WHARTON, *Science* 167, 1382 (1970).

<sup>7</sup> D. A. GRIFFITHS and A. M. CUNNINGTON, *J. stored Prod. Res.* 7, 1 (1971).

<sup>8</sup> D. A. GRIFFITHS, *Proceedings of the 3rd. International Congress of Acarology*, Prague (1971).

<sup>9</sup> Y. MUMCUOGLU, Dissertation, in Vorbereitung.

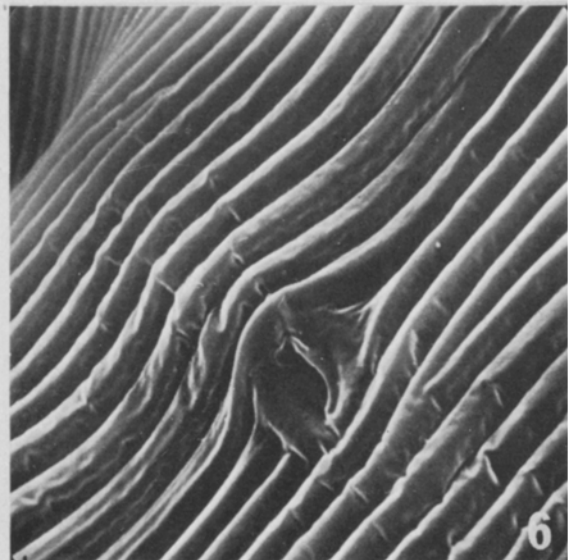
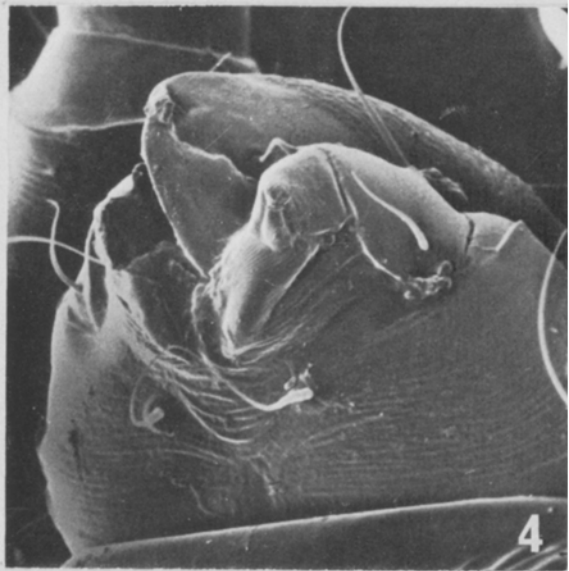
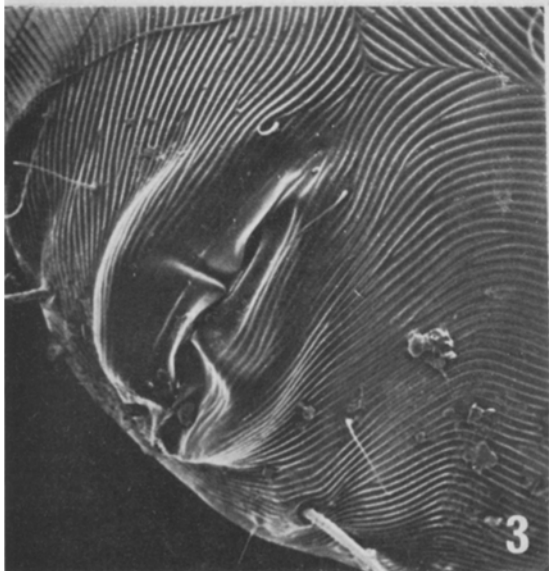
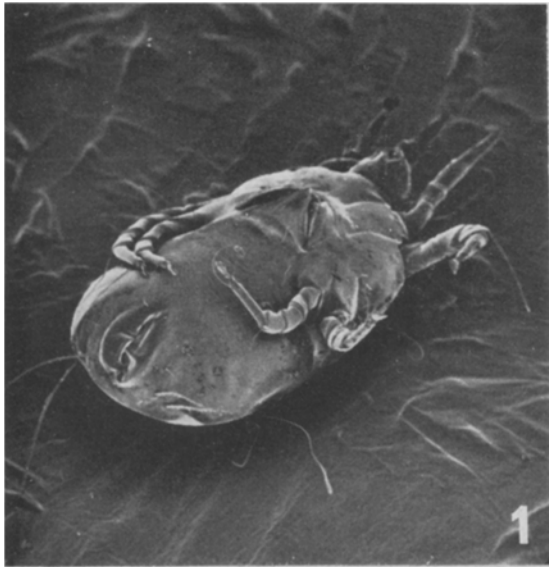


Fig. 1-6. 1. Weibchen. Übersichtsaufnahme; kV 5,  $\angle$  45°,  $\times$  210. 2. Weibchen. Genitalregion; kV 5,  $\angle$  25°,  $\times$  750. 3. Weibchen. Analregion, kV 5;  $\angle$  25°,  $\times$  750. 4. Weibchen. Mundgliedmassen; kV 20,  $\angle$  25°,  $\times$  1500. 5. Weibchen. Supracoxalhaar; kV 5,  $\angle$  65°,  $\times$  1500. 6. Weibchen. Öldrüse; kV 20,  $\angle$  1°;  $\times$  3975.

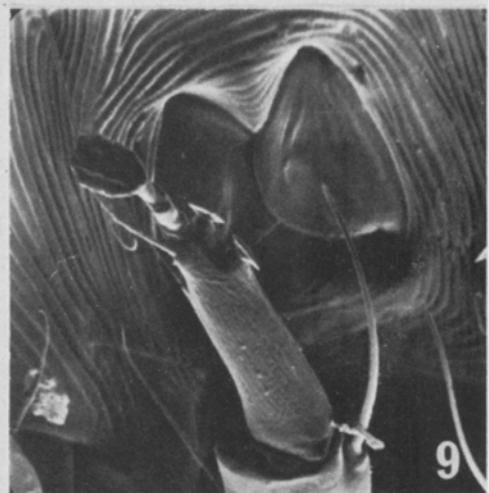
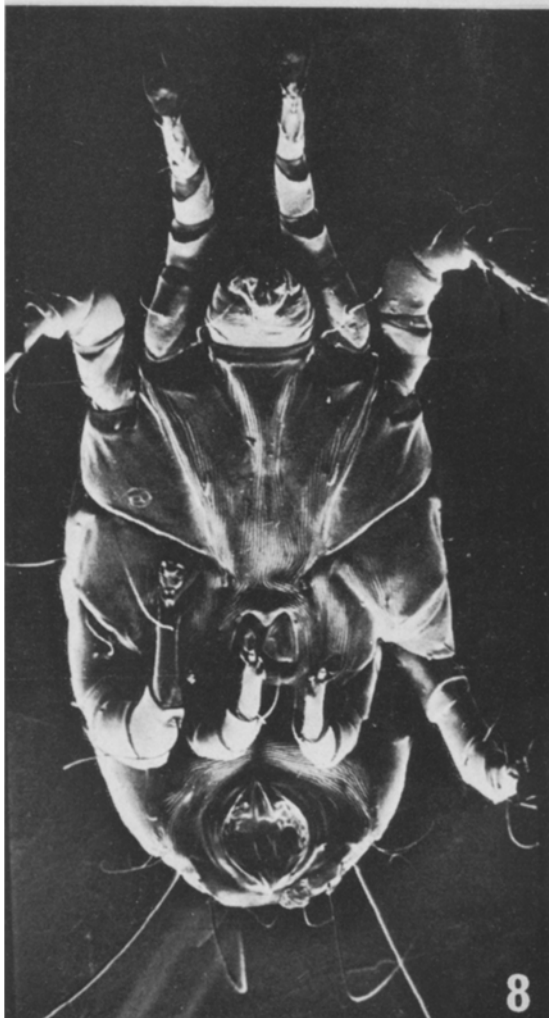
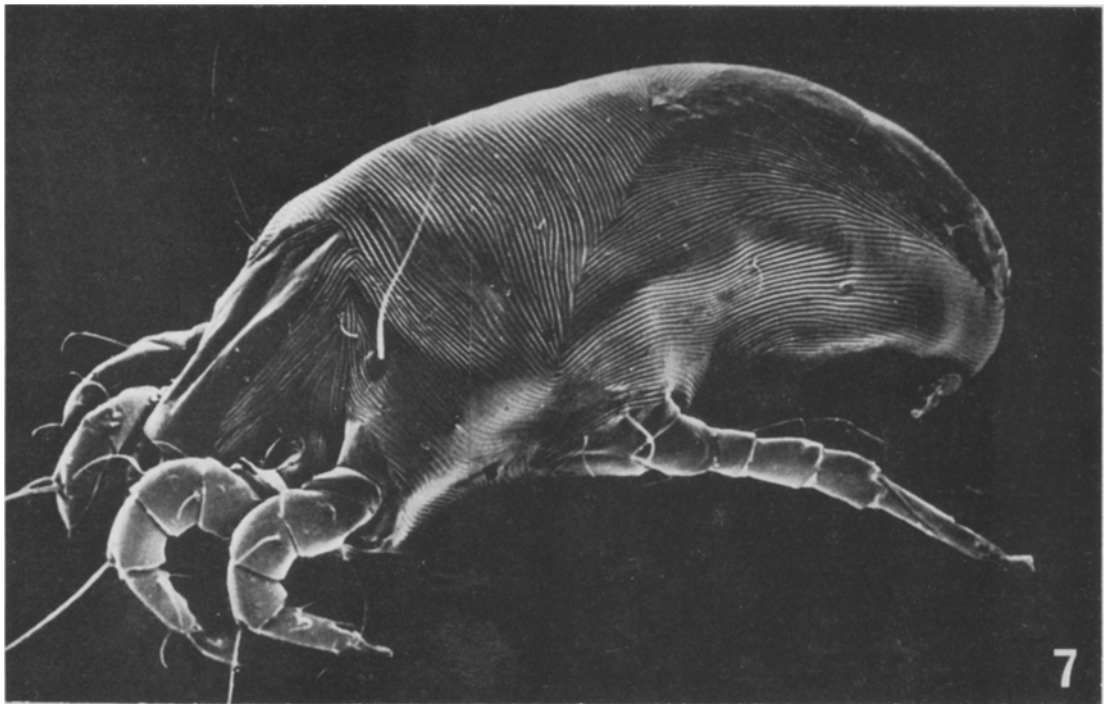


Fig. 7-10. 7. Weibchen. Übersichtsaufnahme; kV 5,  $\angle$  67°,  $\times$  450. 8. Männchen. Übersichtsaufnahme, kV 5,  $\angle$  0°,  $\times$  355. 9. Männchen, Genitalregion und Tarsus des 4. Beinpaars; kV 5,  $\angle$  0°,  $\times$  1300. 10. Männchen. Analregion mit den zwei Saugnapfen; kV 10,  $\angle$  40°,  $\times$  1300.

mit unbehandelten, mit Äther getöteten Milben. Das Resultat war nicht befriedigend, da die Tiere bei stärkeren Vergrößerungen Risse in der Hautstruktur («finger prints») aufwiesen (siehe Figur 10) und sich dazu noch relativ stark aufluden, was das Fotografieren erschwerte.

Später wurden die folgenden Fixierungsmethoden ausprobiert: 1. Die Tiere wurden in 70% Alkohol während 12 h fixiert. Resultat: die Milben waren stark geschrumpft und somit unbrauchbar.

2. Die Tiere wurden während 20 h mit 2% Glutaraldehyd in 0,1 mol Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4) fixiert, danach mit 0,1 mol Natriumphosphat-Puffer gewaschen, für weitere 20 min in 4%  $\text{OsO}_4$ -Lösung nachfixiert, wiederum mit Natriumphosphat-Puffer gewaschen und anschliessend in einer aufsteigenden Alkoholreihe jeweils 5 min entwässert. Resultat: die Exemplare waren wiederum mehr oder weniger geschrumpft und wiesen bei stärkeren Vergrößerungen Risse zwischen den «finger prints» auf.

3. Die Tiere wurden während 2 h mit 4%  $\text{OsO}_4$ -Lösung bei 5°C bedampft, nachher mit Aqua dest. abgespült und in 50% Alkohol entwässert. Resultat: die Tiere waren auch hier stark geschrumpft und somit nicht brauchbar.

4. Die Tiere wurden in 4% Formaldehydlösung während 4 h bei 5°C fixiert, danach mit 0,1 mol Natriumphosphat-Puffer abgespült und anschliessend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Resultat: die Milben waren z.T. geschrumpft und zeigten Aufladungserscheinungen, doch konnte man einige brauchbare Exemplare finden.

5. Die Tiere wurden während 12 h mit 4%  $\text{OsO}_4$ -Lösung bei 5°C bedampft. Resultat: mit dieser Methode wurden die besten Resultate erzielt; die meisten der abgebildeten Fotos stammen aus dieser Reihe.

Versuche mit der «critical-point-Trocknung» sind im Gange. Bei allen obenerwähnten Methoden wurden die Milben, die in Zuchtgläsern aufbewahrt waren, für 3–5 min bei –20°C gehalten. Solange die Tiere noch in der Kältestarre waren, wurden sie in eine Petrischale resp. in ein Tuch gebracht. Bei den Methoden 1–4 wurden die Tiere in ein feines Baumwolltuch eingeschlagen, um

den Transport von einer Flüssigkeit zur andern zu erleichtern.

Alle Tiere wurden nach der jeweiligen Fixation luftgetrocknet und auf doppelklebende Fotoecken aufgeklebt. Bedampft wurde mit Kohle und Gold. Die Aufnahmen wurden auf dem «Stereoscan» Mark II A der Firma Cambridge hergestellt.

**Morphologie von Weibchen und Männchen.** a) Das Weibchen (Figuren 1–7). Die Übersichtsaufnahmen (Figuren 1 und 7) zeigen die Ventral- resp. Dorsalansicht. Auf der Ventralseite befinden sich Genital- und Analregion (Figuren 2 und 3). Die Cheliceren sind von dieser Seite besser sichtbar (Figur 4). Dorsal liegen das Supracoxalhaar (Figur 5), welches vermutlich als Sinnesorgan fungiert, und die «Öldrüsen» (Figur 6), die eventuell für die Imprägnierung des Milbenkörpers verantwortlich sind.

b) Das Männchen (Figuren 8–10). Die Genitalien sind durch zwei Klappen überdeckt (Figur 9). Die Analregion ist mit zwei Saugnäpfen versehen (Figur 10), die zusammen mit dem stark entwickelten 3. Beinpaar, als Klammerorgane bei der Kopulation dienen. In allen Abbildungen wird die eigenartige Hautstruktur eindrucklich sichtbar.

**Summary.** Various methods of fixation of *Dermatophagoides pteronyssinus* for the REM were tested.  $\text{OsO}_4$  vapor yielded the best results. The morphology of male and female mites is described, based on REM exposures.

Y. MUMCUOGLU<sup>10</sup>, L. HENNING<sup>11</sup> and R. GUGGENHEIM<sup>11</sup>

Naturhistorisches Museum Basel, Augustinergasse 2, CH-4000 Basel (Schweiz); und Geologisch-paläontologisches Institut der Universität, Labor für Raster-Elektronenmikroskopie, Bernoullistrasse 32, CH-4000 Basel (Schweiz), 4. Juli 1973.

<sup>10</sup> Naturhistorisches Museum Basel.

<sup>11</sup> Geol. Paläontol. Inst. Universität Basel, Labor für Raster-Elektronenmikroskopie.

## High Levels of Free Fatty Acids in Lymphoid Cells, with Special Reference to their Cytotoxicity

Immune and non-immune lymphoid cells have recently been shown to be of prime importance in certain tissue-damaging immune reactions, in the various allograft phenomena, and in some forms of tumor rejection<sup>1,2</sup>. However, the mechanisms involved in the lymphocyte-mediated tissue injury are still incompletely understood except that close contact between lymphoid cells and target cells is believed to be a principal requirement for killing the latter. We have examined the levels and composition of lipid extracts of the lymphoid cells from spleens and lymph nodes of guinea-pigs, in relation to their cytotoxicity against Ehrlich ascites tumor cells in mice. This paper reports the occurrence of markedly high quantities of cytotoxic free fatty acids in the lymphoid cells.

Outbred guinea-pigs of Hartley strain, weighing 500–700 g, were used in the experiments. The guinea-pigs were killed by exsanguination. To obtain sufficient amounts of lymph node cells, sensitization of the animals was induced by footpad injection of Ehrlich ascites tumor cells (about  $10^6$  cells) in Freund's complete adjuvant. The inguinal lymph nodes were removed 1–2 weeks after sensitization. The spleens were obtained from both

normal and sensitized animals. Suspensions of lymphoid cells from spleens and lymph nodes were prepared by cutting the tissues into small pieces, pressing them through a stainless steel sieve into approx. 30-fold volumes (v/w) of Eagle's minimum essential medium under sterile techniques, and dispersing the cells by shaking. The resulting suspension was filtered through 3 layers of gauze, and centrifuged for 2 min at  $70 \times g$ . The supernatant fluids were transferred to fresh tubes and centrifuged for 10 min at  $200 \times g$ . The cells sedimented were washed thrice with saline and the final pellets used for lipid extraction. Red cells contaminating in splenic cells were lysed by treatment of the sediment with 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ <sup>3</sup>. Approx. 3–5 g (wet weight) of splenic lymphoid cells and 2 g of lymph node cells from 60 guinea-pigs were used for each lipid extraction. Lipids were also obtained from other tissues, i.e., liver, heart, lung, and kidney. The

<sup>1</sup> P. PERLMANN and G. HOLM, Adv. Immun. 11, 117 (1969).

<sup>2</sup> K. E. HELLSTRÖM and I. HELLSTRÖM, Adv. Cancer Res. 12, 167 (1969).

<sup>3</sup> J. C. DANIELS and W. O. WEIGLE, J. Immun. 101, 1223 (1968).