

zellulären Partikeln⁶ in mannigfacher Weise genutzt. Die Unbeeinflussbarkeit des Einbaues von FFS in die Glycerinphosphatide bei Zugabe von Laurylsulfat lässt sich nur schwer erklären und weist auf die Komplexität der Vorgänge hin.

Durchführung der Experimente. Jeweils 2 Rattenpankreas (ausgewachsene Ratten vom Sprague Dawley Stamm), frisch entnommen nach Dekapitierung, wurden in einer mit 0,9% Kochsalzlösung gefüllten Petrischale ausgebreitet und das anhaftende Fettgewebe sorgfältig entfernt. Innerhalb von Minuten nach Tötung der Tiere wurde mit der Inkubation begonnen. Sämtliche Ansätze wurden 30 min bei 37°C unter leichtem Schütteln aerobisch inkubiert. Das Inkubationsmedium des Leerwertes bestand aus 4 ml 2,5% Rinderalbumin-M/10 Na-Phosphatpuffer (pH 7,4), zu dem 10⁶ dpm 9,10 H³-Palmitinsäure⁷ als K-Salz zugegeben wurden. Die Ansätze mit den oberflächenaktiven Substanzen wurden hergestellt durch Mischen von 2 ml 5,0% Albumin-M/10 Na-Phosphatpuffer mit 2 ml Na-Phosphatpuffer-0,5% oberflächenaktiver Substanz. Die Endkonzentrationen der oberflächenaktiven Substanzen entsprachen 0,25%. Folgende Substanzen wurden getestet: (1) Tergitol⁸, (2) Vitamin A in wasserlöslicher Form (50 mg/Ansatz), (3) Adogen 401⁹, (4) Colamin-Kephalin(Rinderleber)-5% Cholesterin, (5) Cerebrosid (Rindergehirn), (6) Saccharosemonopalmitat¹⁰, (7) Laurylsulfat und (8) Heparin (5 mg/Ansatz). Die Adogenlösungen wurden wegen ihrer Unbeständigkeit nur frisch verwendet. Die mizellären Lösungen der Cerebroside und des Colamin-Kephalins wurden durch 15 h Schütteln der Substanzen in Phosphatpuffer über Stickstoff bei 37°C erhalten.

Nach der Inkubation wurden die Pankreasstücke sorgfältig mehrfach in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschliessend die Lipide in Chloroform-Methanol (2:1, v/v) extrahiert. Die Gesamtlipide wurden säulenchromatographisch nach HIRSCH und AHRENS¹¹ in

Neutralfette + FFS und Phosphatide aufgetrennt. Die FFS wurden an MgO-Celite nach BORGSTROEM¹² adsorbiert und deren Radioaktivität nach dem Differenzverfahren ermittelt. Die quantitative Bestimmung der Neutralfette, die im wesentlichen aus Triglyceriden bestanden, erfolgte gravimetrisch und die der Phosphatide nach STEWART und HENDRY¹³. Die Radioaktivitäten wurden nach dem Standardverfahren in Toluol mit dem 'Tricarb-Scintillation counter Model E'¹⁴ gemessen¹⁵.

Summary. Non-ionic surfactants showed minor effects on the uptake of H³-palmitic acid into the lipids of rat pancreas *in vitro*. In the presence of the cationic and anionic surfactants tested, the fraction of free H³-palmitic acid bound by the tissue increased. Only the anionic laurylsulfate, however, stimulated the uptake of H³-palmitic acid into neutral lipids without stimulating its uptake into phospholipids.

K.OETTE

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Köln (Deutschland), 26. November 1964.

⁶ D. J. HANAHAN, F. R. N. GURD und I. ZABIN, *Lipid Chemistry* (John Wiley & Sons Inc., New York-London 1960).

⁷ New England Nuclear Corporation, Boston (Mass.).

⁸ Union Carbide Chemicals Co., New York 17 (USA).

⁹ Archer Daniels Midland Co., New York 7 (USA).

¹⁰ Sucro-Chemical Division, Colonial Sugars Co., Gramercy (La. USA).

¹¹ J. HIRSCH und E. H. AHRENS JR., *J. biol. Chem.* **233**, 311 (1958).

¹² B. BORGSTROEM, *Acta physiol. scand.* **25**, 11 (1952).

¹³ C. P. STEWART und E. B. HENDRY, *Biochem. J.* **29**, 1683 (1935).

¹⁴ Packard Instrument Co., Inc., La Grange (Ill. USA).

¹⁵ Die Experimente wurden durchgeführt am Rockefeller Institute, A Graduate University and Research Center, New York 21.

Etude comparée de la composition en oses et en amino-acides de la transferrine et de la lactotransferrine humaines¹

La *lactotransferrine* (ou lactosidérophiline) humaine est un ferro-glycoprotéide du lait de Femme dont l'existence fut pressentie par SCHÄFER et al.²⁻⁶ et par JOHANSSON^{6,7}. Il fut isolé simultanément par MONTREUIL et al.^{8,9} et par JOHANSSON¹⁰. Ultérieurement, d'autres méthodes de préparation furent proposées par GRÜTTNER, SCHÄFER et SCHRÖTER¹¹, puis par BLANC et ISLIKER¹². Ses propriétés physico-chimiques ont été décrites par MONTREUIL et al.^{8,9}, puis par BLANC et ISLIKER¹². Sa composition détaillée en oses et en acides aminés, ainsi que la nature de l'acide aminé N-terminal, ont été précisées pour la première fois par MONTREUIL et al.¹³. Récemment, BLANC, BUJARD et MAURON¹⁴ ont étudié comparativement la composition en acides aminés de la lactotransferrine du lait de Femme et de la «protéine rouge» du lait de Vache (GROVES et al.¹⁵).

Nous avons repris nos travaux sur des échantillons de lactotransferrine isolée selon notre procédé original^{8,9} et purifiée sur DEAE-cellulose ou préparée par une nouvelle méthode¹⁶ (précipitation de la majeure partie des pro-

¹ Ce travail a été réalisé grâce à une subvention de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Contrat 61-FR-170) à laquelle nous adressons nos plus vifs remerciements.

² K. H. SCHÄFER, *Mschr. Kinderheilk.* **99**, 69 (1951).

³ K. H. SCHÄFER, M. A. BREYER et H. KARTE, *Z. Kinderheilk.* **76**, 501 (1955).

⁴ K. H. SCHÄFER, A. M. BREYER, W. HORST, H. KARTE et W. LENZ, *Klin. Wschr.* **34**, 300 (1956).

⁵ K. H. SCHÄFER, V. Kongress der europäischen Gesellschaft für Hämatologie, Freiburg (1956), p. 154.

⁶ B. JOHANSSON, *Acta chem. scand.* **8**, 1103 (1954).

⁷ B. JOHANSSON, *Nature* **187**, 996 (1958).

⁸ J. MONTREUIL et S. MULLET, *C.R. Acad. Sci.* **250**, 1736 (1960).

⁹ J. MONTREUIL, J. TONNELAT et S. MULLET, *Biochim. biophys. Acta* **45**, 413 (1960).

¹⁰ B. JOHANSSON, *Acta chem. scand.* **14**, 510 (1960).

¹¹ R. GRÜTTNER, K. H. SCHÄFER et W. SCHRÖTER, *Klin. Wschr.* **38**, 1162 (1960).

¹² B. BLANC et H. ISLIKER, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **19**, C13 (1961); *Bull. Soc. Chim. biol.* **43**, 929 (1961).

¹³ J. MONTREUIL, G. BISERTE, S. MULLET, G. SPIK et N. LEROY, *C.R. Acad. Sci.* **252**, 4065 (1961).

¹⁴ B. BLANC, E. BUJARD et J. MAURON, *Exper.* **19**, 299 (1963).

¹⁵ M. L. GROVES, *J. Am. chem. Soc.* **82**, 3345 (1960).

¹⁶ J. MONTREUIL, N. ANTONY, J. DESCAMPS et N. DUQUESNE, *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.* **3**, n° h. s., 129 (1963).

téides du lait par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et à pH 3,6; précipitation du filtrat par le sulfate d'ammonium à saturation et à pH 7; chromatographie sur DEAE-cellulose du précipité obtenu). La composition

Tableau I. Composition en glucides de la lactotransferrine et de la transferrine humaines

		Lacto- transferrine	Transferrine	
			Résultats personnels	Résultats de SCHULTZE et al. ²⁷
<i>Composition centésimale</i>				
Oses neutres	p. 100	3,9	2,35	2,40
Osamines	p. 100	2,4	2	2
Acides sialiques	p. 100	0,87	1,37	1,40
Fucose	p. 100		Traces	0,07
<i>Composition molaire^{a, b}</i>				
Galactose		10	6	8
Mannose		7	6	4
Fucose		5	Traces	1
N-acétylglucosamine		13	10	8
Acide N-acétyl- neuraminique		3	4	4

^a En moles par mole de lactotransferrine (P.M.: 95.000)^{8,9} et de transferrine (P.M.: 90.000)²⁷. ^b Les premières analyses révélèrent la présence de xylose (1 résidu). Nous avons vérifié, depuis, que cet ose provenait des membranes de cellophane utilisées pour la dialyse.

en oses a été déterminée par la méthode de chromatographie quantitative sur papier des oses constituant les glycoprotéides de MONTREUIL et SCHEPPLER¹⁷. L'acide sialique a été identifié selon les modes opératoires décrits par ZILLIKEN et al.¹⁸ et par SVENNERHOLM et SVENNERHOLM¹⁹. La nature de l'osamine a été précisée en appliquant la méthode de désamination oxydative par la ninhydrine de GARDELL et al.²⁰ et par la technique de chromatographie sur échangeurs de cations de GARDELL²¹. Les acides aminés de l'apoprotéide²² ont été dosés à l'Autoanalyseur Technicon selon le procédé de MOORE et STEIN²³, modifié par PIEZ et MORRIS²⁴. La détermination des acides aminés N-terminaux a été réalisée par la méthode des DNP-aminoacides de BISERTE et OSTEUX²⁵.

Une étude identique a été effectuée sur des échantillons de transferrine humaine²⁶.

¹⁷ J. MONTREUIL et N. SCHEPPLER, Bull. Soc. Chim. biol. **41**, 13 (1959).

¹⁸ F. ZILLIKEN, G. A. BRAUN et P. GYÖRGY, Arch. Biochem. Biophys. **54**, 564 (1955); **63**, 394 (1956).

¹⁹ E. SVENNERHOLM et L. SVENNERHOLM, Nature **181**, 1154 (1958).

²⁰ S. GARDELL, F. HEIJKENSJÖLD et A. ROCHNORLUND, Acta chem. scand. **4**, 970 (1950).

²¹ S. GARDELL, Acta chem. scand. **7**, 207 (1953).

²² Il est indispensable de débarrasser la lactotransferrine de toute trace de fer qui catalyserait la dégradation de certains acides aminés, en particulier la sérine et la thréonine, par l'acide chlorhydrique, au cours de l'hydrolyse.

²³ S. MOORE et W. H. STEIN, J. biol. Chem. **211**, 893 (1954).

²⁴ K. A. PIEZ et L. MORRIS, Anal. Biochem. **1**, 187 (1960). - M. DAUTREVAUX, Bull. Soc. Chim. biol. **44**, 1105 (1962).

²⁵ G. BISERTE et R. OSTEUX, Bull. Soc. Chim. biol. **44**, 50 (1951).

²⁶ Behring-Werke, Marburg/Lahn.

Tableau II. Composition en acides aminés de la lactotransferrine et de la transferrine humaines

	Lactotransferrine				Transferrine			
	Résultats personnels		Résultats de BLANC et al. ¹⁴		Résultats personnels		Résultats de SCHULTZE et al. ²⁷	
	en g de résidus d'acides aminés pour 100 g de lactotransferrine	en moles par mole de lactotransferrine ^a	en g de résidus d'acides aminés pour 100 g de lactotransferrine	en moles par mole de lactotransferrine	en g de résidus d'acides aminés pour 100 g de transferrine	en moles par mole de transferrine ^a	en g de résidus d'acides aminés pour 100 g de transferrine	en moles par mole de transferrine ^a
Aspartique	9,94	82	8,50	81	10,70	83	11,40	89
Glutamique	11,34	84	10,23	88	8,85	62	10,22	71
Arginine	8,74	53	7,52	53	4,97	29	5,15	30
Histidine	2,08	14	1,50	12	2,94	19	3,33	22
Lysine	7,24	54	6,49	56	11,40	81	9,65	68
Alanine	5,60	75	4,64	72	5,36	69	5,00	63
Cystine/2	3,34	31	3,27	32	4,14	37	5,07	44
Glycocolle	3,69	61	3,38	66	3,79	59	3,44	54
Isoleucine	2,07	18	2,07	20	2,17	17	2,10	17
Leucine	7,75	65	6,81	66	8,28	66	8,21	66
Méthionine	0,57	4	0,76	6	1,46	10	1,31	9
Phénylalanine	5,73	37	4,91	37	4,45	27	5,07	31
Proline	4,38	42	3,67	42	5,65	53	3,82	35
Sérine	5,80	63	4,09	52	4,67	46	4,38	44
Thréonine	4,36	41	3,18	35	3,62	32	3,71	32
Tryptophanne	-	-	<0,20	1 ou 0	-	-	2,10	10
Tyrosine	4,03	24	4,19	28	5,08	28	4,61	25
Valine	5,25	50	4,49	50	4,96	45	5,40	48
Total	91,91		79,90		92,49		93,97	
Acide aminé N-terminal	Néant				Valine		Valine	

^a Pour un poids moléculaire de 95.000 pour la lactotransferrine^{8,9} et de 90.000 pour la transferrine²⁷.

Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans les Tableaux I et II dans lesquels nous avons fait figurer, à titre de comparaison, les valeurs obtenues par BLANC et al.¹⁴ sur la lactotransferrine et par SCHULTZE et al.²⁷ sur la transferrine. Ils peuvent être résumés de la manière suivante:

(1) La composition en glucides et en acides aminés de la lactotransferrine et de la transferrine humaines présente des différences significatives. En outre, la transferrine possède la valine en position N-terminale comme l'avaient déjà démontré PUTNAM²⁸, ERIKSSON et al.²⁹ et SCHULTZE et al.³⁰, tandis que nous n'avons pas mis en évidence d'acide aminé N-terminal dans la lactotransferrine.

Ces résultats expliquent la spécificité immunologique de la lactotransferrine^{8,9,12,14}. Il est intéressant, à cet égard, de souligner que GORDON, GROVES et BASCH³¹ parviennent à la même conclusion à propos de la lactotransferrine et de la transferrine bovines.

(2) Dans un premier travail¹³, nous avons déterminé la composition en acides aminés de la lactotransferrine par la méthode des DNP-aminoacides de LEVY³² et les résultats que nous avons obtenus étaient les suivants (en moles d'acides aminés par mole de lactotransferrine): acide aspartique 92, acide glutamique 76, arginine 53, histidine 16, lysine 51, alanine 95, 1/2 cystine 30, glycolle 72, leucine et isoleucine 96, phénylalanine 36, proline 43, sérine 60, thréonine 37, tyrosine 9, valine 61. On voit que, pour la plupart des amino-acides, les résultats fournis par les méthodes de LEVY, d'une part, et de MOORE et STEIN, d'autre part, sont très voisins, mais qu'il existe cependant d'importantes différences pour certains d'entre eux, comme l'acide aspartique, l'alanine, le glycolle, la valine et, principalement, la tyrosine. Ces anomalies peuvent s'expliquer par l'imperfection de la méthode de LEVY.

D'autre part, les résultats que nous a fournis l'application de la méthode de MOORE et STEIN à la détermination

de la composition en amino-acides de la lactotransferrine et de la transferrine sont pratiquement identiques à ceux, respectivement, de BLANC et al.¹⁴ et de SCHULTZE et al.²⁷.

Summary. A comparative study of human lactotransferrin and transferrin has been made with respect to sugar and amino acid composition. The authors conclude that there are significant differences between both types of glycoproteids, which confirm the specificity of lactotransferrin previously demonstrated by physico-chemical and immunological analysis.

J. MONTREUIL, G. SPIK,
M. MONSIGNY, J. DESCAMPS*,³³
G. BISERTE et M. DAUTREVAUX**,³⁴

Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille et Laboratoires de Biochimie et de Biochimie Pathologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille** (France), le 9 décembre 1964.*

²⁷ N. HEIMBURGER, K. HEIDE, H. HAUPT et H. E. SCHULTZE, *Clin. chim. Acta* 10, 293 (1964).

²⁸ F. W. PUTNAM, *Science* 122, 275 (1955).

²⁹ S. ERIKSSON et J. SJÖQUIST, *Biochim. biophys. Acta* 45, 290 (1960).

³⁰ H. E. SCHULTZE, K. HEIDE et M. MÜLLER, *Behringwerke-Mitteil.* 32, 1 (1957).

³¹ W. G. GORDON, M. L. GROVES et J. J. BASCH, *Biochemistry* 2, 817 (1963).

³² A. L. LEVY, *Nature* 174, 126 (1954). Voir aussi: G. BISERTE, J. W. HOLLEMAN, J. HOLLEMAN-DEHOVE et P. SAUTIERE, *J. Chromat.* 2, 225 (1959).

³³ Avec la collaboration technique de MM. F. DECAMPS et G. DECROIX.

³⁴ Avec la collaboration technique de Madame M. P. LOUCHEZ et de Mesdemoiselles R. CARPENTIER et M. T. PICQUE.

Evidence for a Direct Action of Monamines on the Chick Central Nervous System

The presence of the blood-brain barrier prevents the entry of significant amounts of systematically injected biogenic amines (norepinephrine and serotonin) into the brain of most adult vertebrates^{1,2}; therefore the elucidation of the central nervous system (CNS) functions of these amines is difficult. Present concepts of the functions of the monamines are based primarily upon indirect evidence obtained by alteration of the normal indole- and catechole-amine metabolic pathways, rather than by observation of direct effects of these amines on the CNS. The young chick appears to be a preparation in which the direct effects of the monamines on the CNS can be observed since systemically administered catechole- and indole-amines of pharmacological importance appear to traverse the blood-brain barrier^{3,4}. In spite of this immature barrier, the CNS of the chick possesses adult characteristics and responds to neuropharmacological agents in a manner similar to most mammals⁴.

In the present experiments, the electrical activity of the brain and gross behavior were examined prior to, and after the administration of, the various biogenic amines in order

to provide direct evidence of the pharmacological effects of these monamines. These experiments were performed on over one hundred unrestrained, unanesthetized chicks (5–14 days old). Electroencephalographic (EEG) recording electrodes⁵ were implanted in the corpus striatum of the chick anesthetized with nitrous oxide. Following recovery from the anesthesia, the animals were placed in a sound attenuated, behavioral observation box. Blood pressure was monitored in some of the preparations⁶. The EEG and behavioral effects of the indole- and catechole-amines and their precursors were examined.

The indoles studied were 5-hydroxytryptamine (5-HT) administered subcutaneously as the creatinine sulfate

¹ H. WEIL-MALHERBE, J. AXELROD, and R. TOMCHICK, *Science* 129, 1226 (1959).

² E. COSTA and M. H. APRISON, *Am. J. Physiol.* 192, 95 (1958).

³ B. J. KEY and E. MARLEY, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 14, 90 (1962).

⁴ C. E. SPOONER, *Observations on the Use of the Chick in the Pharmacological Investigation of the Central Nervous System*. Ph. D. Dissertation, UCLA (University Microfilms Inc., Ann Arbor 1964).

⁵ C. E. SPOONER, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.*, 18, 419 (1965).

⁶ C. E. SPOONER and W. D. WINTERS, *Pharmacologist* 6, 171 (1964).