

wurden katalytisch hydriert und zur Abspaltung der tert.-Butyloxycarbonylgruppe mit Trifluoressigsäure behandelt, bzw. direkt mit Trifluoressigsäure in die freien Peptide überführt. Die rohen Polypeptidtrifluoracetate wurden anschliessend durch präparative trägerfreie Elektrophorese^{6,7} in Pyridiniumacetatpuffer pH 5 gereinigt und durch Gefriertrocknung als Acetathydrate isoliert. Gegenüber Leucinaminopeptidase, Carboxypeptidase A und B, Trypsin und Chymotrypsin verhielten sich die einzelnen Peptide wie entsprechend ihrer Struktur zu erwarten ist.

Met-Lys-Bradykinin liess sich durch 3 h Behandlung mit 1 molarem H_2O_2 in 50%iger Essigsäure in Met-Lys-Bradykinin-sulfoxid und mit Perameisensäure⁸ in Met-Lys-Bradykinin-sulfon überführen. Nach Abbau mit Leucinaminopeptidase konnte im Fall des Sulfoxids kein Methionin und im Fall des Sulfons kein Methionin und Methionin-sulfoxid nachgewiesen werden.

In der Tabelle sind die Verbindungen mit ihren biologischen Daten zusammengestellt. Alle sind hochaktiv, wie ein Vergleich der an glattmuskulären Organen (Rattenuterus und Meerschweinchenileum) gefundenen Schwellendosen zeigt. Die Aktivität ist, abhängig vom Testorgan, nur geringfügig höher oder niedriger als die des Methionyl-lysyl-bradykinins. Am Kaninchenblutdruck sind die Verbindungen V, VIII und IX gleich, die Verbindungen VII und XI ein wenig geringer aktiv als Methionyl-lysyl-bradykinin. Lysyl-lysyl- und Lysyl-lysyl-lysyl-bradykinin (VI und X) sind ca. 8-10mal so wirksam wie Bradykinin. Oxydation des Methionylrestes im Methionyl-lysyl-bradykinin zum Methionin-sulfoxid mindert die Aktivität am Kaninchenblutdruck bis zum

Niveau des Bradykinins herab. Weitere Oxydation zum Methionin-sulfon bewirkt einen zusätzlichen Wirkungsabfall (1/3 der Bradykininaktivität).

Summary. Several undeca-, dodeca- and tridecapeptides, analogues of the naturally occurring methionyl-lysyl-bradykinin, have been synthesized. The biological activities of the new compounds on the isolated rat uterus, guinea-pig ileum and rabbit blood pressure are presented.

E. SCHRÖDER

Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin-West (Deutschland), 29. Dezember 1964.

⁶ J. BARROILLIER, E. WATZKE und H. GIBIAN, *Z. Naturforsch.* 13b, 754 (1958).

⁷ E. SCHRÖDER und S. MATTHES, *J. Chromat.*, in press.

⁸ C. H. W. HIRS, *J. biol. Chem.* 219, 611 (1956).

⁹ A. CERLETTI, E. STÖRMER und H. KONZETT, *Dtsch. med. Wschr.* 86, 678 (1961).

¹⁰ E. D. NICOLAIDES und H. A. DEWALD, *J. org. Chem.* 26, 3872 (1961).

¹¹ M. BODANSZKY, M. A. ONDETTI, B. RUBIN, J. J. PIALA, J. FRIED, J. T. SHEEHAN und C. A. BIRKHIMER, *Nature* 194, 485 (1962).

¹² Die präparativen Arbeiten wurden mit grosser Sorgfalt von Herrn M. LEHMANN und Frl. D. THIELICKE, die enzymatischen Abbauversuche und die quantitativen Aminosäurebestimmungen von Herrn G. KLOSS durchgeführt. Herrn Dr. R. HEMPEL aus unserer pharmakologischen Abteilung danke ich für die biologische Auswertung der Präparate.

Sur l'origine de l'hypoblaste chez les oiseaux^{1,2}

Dans la littérature embryologique moderne, l'origine du feuillet interne chez les oiseaux reste encore un problème très controversé. Les auteurs, qui se sont penchés sur cette question, ont employé des techniques parfois assez différentes, ce qui complique singulièrement la comparaison de leurs résultats. Pour cette raison, nous croyons utile d'aborder le problème, d'une part en recourant à une technique déjà utilisée, à savoir le marquage au charbon, et d'autre part en faisant appel à une technique plus moderne, qui, selon nous, pourrait apporter une solution définitive. Cette dernière méthode consiste à marquer le nœud de Hensen par la thymidine tritiée.

Des jeunes blastoderms de White Leghorn sont cultivés in vitro selon la technique de NEW³, légèrement modifiée par GALLERA et CASTRO-CORREIA⁴. Des opérations microchirurgicales ont été pratiquées chez des embryons aux stades de la ligne primitive courte, moyenne ou encore achevée. Pour ce genre d'opération, nous employons des aiguilles en irido-platine d'une épaisseur de 0,02 mm.

Dans les expériences que nous avons relatées dans un travail précédent (MODAK⁵), nous avons constaté que l'enlèvement de l'hypoblaste dans toute l'aire pellucide était suivi d'une régénération presque complète du feuillet interne, si l'opération avait été effectuée sur des blastoderms avant le stade de la ligne primitive achevée. L'endoblaste néo-formé était constitué par l'endoblaste

vitellin reformé aux dépens du bord interne du rempart et, sous la région antérieure de la ligne primitive, par de l'endoblaste de caractère endothéloïde. La continuité entre ces deux régions de l'endoblaste existait dans tous les cas que nous avons observés, sauf généralement dans la région antérieure de l'aire pellucide. Aussi subsistait-il une équivoque quant à la signification de cet endoblaste de caractère endothéloïde: provenait-il de cellules invaginées par la ligne primitive ou bien d'une simple transformation des cellules de l'endoblaste vitellin qui auraient migré jusqu'à ce niveau? Pour résoudre ce problème, nous avons décidé de recourir à diverses techniques de marquage.

Chez 41 blastoderms, nous avons appliqué de fines marques de charbon sur la région ventrale du nœud de Hensen après avoir excisé l'hypoblaste dans toute l'aire pellucide. Ces blastoderms ont été fixés à des stades successifs du développement. Sur les coupes, nous retrouvons les particules de charbon incorporées dans les

¹ Travail subventionné par le Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

² L'auteur a bénéficié d'une bourse fédérale suisse pour les étudiants étrangers.

³ D. A. T. NEW, *J. Embryol. exp. Morph.* 3, 326 (1955).

⁴ J. GALLERA et J. CASTRO-CORREIA, *C. r. Soc. Biol.* 154, 2014 (1960).

⁵ S. P. MODAK, 2^e Réun. Eur. d'Anat., Bruxelles (1963).

cellules de l'endoblaste de caractère endothélioïde (qui formeront plus tard l'intestin céphalique), de la chorde, et du mésenchyme, mais aucune ne fut retrouvée dans l'endoblaste vitellin régénéré. En outre, dans quelques cas, nous avons placé des marques de charbon sur le mésoblaste extra-embryonnaire. Ces marques restent attachées au mésoblaste extra-embryonnaire et ne sont jamais phagocytées par l'endoblaste vitellin en régénération qui le recouvre progressivement.

Finalement, nous avons employé le marquage par la thymidine tritiée pour vérifier les résultats obtenus avec les marques de charbon. La thymidine tritiée (TRA 61-Thymidine-6T fournie par The Radiochemical Centre, Angleterre) s'incorpore spécifiquement dans l'acide désoxyribonucléique et par conséquent ne passe que dans la descendance des cellules marquées. Des blastodermes très jeunes (stade avant la formation de la ligne primitive) sont transplantés sur un milieu composé de parts égales d'albumen et de Tyrode, d'un volume total de 0,1 ml contenant 5 μ C de thymidine tritiée pour une durée de 8 h à 38°C. Après 8 h d'incorporation, nous savons que toutes les cellules sont bien marquées et ces blastodermes peuvent alors servir de donneur. Sur les blastodermes marqués, nous prélevons la région antérieure de la ligne primitive et nous la transplantons à la même place sur un blastoderme-hôte de même âge, auquel on a préalablement excisé la même région. Après la cicatrisation de la blessure, nous enlevons l'hypoblaste de toute l'aire pellucide. Ces blastodermes porteurs du greffon marqué par la thymidine tritiée sont fixés au Carnoy à des stades successifs du développement. Notons que la morphogénèse de ces blastodermes soumis à cette double opération est aussi normale que celle que nous obtenons après simple enlèvement de l'hypoblaste de toute l'aire pellucide. Nous étalons sur les coupes une émulsion photographique (Emulsion in gel form, 'K2', Ilford). Après 15 jours d'exposition, nous développons les autoradiogrammes. L'examen de ces coupes montre que le marquage se trouve dans les cellules de l'endoblaste d'aspect endothélioïde (ou à des stades plus avancés dans les cellules de l'intestin

céphalique), de la chorde, du mésenchyme et aussi dans les cellules du plancher de l'ébauche neurale. Ces résultats concordent donc parfaitement avec ceux acquis à l'aide de la technique des marques de charbon.

A l'aide de ces deux techniques, nous avons ainsi pu démontrer que l'endoblaste de caractère endothélioïde provient de cellules invaginées par la ligne primitive et que c'est lui qui plus tard fournira l'intestin céphalique.

Nous confirmons donc la thèse de HUNT⁶, reprise depuis lors par VAKAET⁷ et VAKAET et MAREEL⁸. Comme dans nos premières observations (MODAK⁵), nous constatons qu'une régénération active de l'endoblaste vitellin a lieu à partir du rempart vitellin et qu'une continuité s'établit entre celui-ci et l'endoblaste de caractère endothélioïde, c'est-à-dire l'endoblaste définitif. La continuité existant entre ces deux régions de l'hypoblaste, qui ont pourtant une origine toute différente, nous avait fait d'abord douter de la validité des résultats de VAKAET⁷, parce que cet auteur n'avait pas observé de contact entre ces deux régions. Nous avons l'intention de publier ces résultats en détail dans un autre travail.

Summary. In the hypoblast-deprived chick embryos, with the help of carbon particle marking and tritiated thymidine labelling, it was found that the regenerated hypoblast consists of the cells invaginated through the primitive streak and those derived from the germ wall.

S. P. MODAK

*Laboratoire d'Embryologie expérimentale, Institut d'Anatomie, Université de Genève (Suisse),
le 25 novembre 1964.*

⁶ T. E. HUNT, *Anat. Rec.* 68, 449 (1937).

⁷ L. VAKAET, *J. Embryol. exp. Morph.* 10, 38 (1962).

⁸ L. VAKAET et M. MAREEL, *C. r. Soc. Biol.* 158, 902 (1964).

Electron Microscopic Observations on the Olfactory Mucosa of the Cat

In spite of the interest aroused from problems concerning the sense of smell, our knowledge regarding the fine structure of the olfactory epithelium as seen with the electron microscope (EM) remains unsatisfactory. A more complete review of the literature concerned will be given elsewhere, but the most recent reports are those of ALLISON¹ and LE GROS CLARK² concerning the light-microscopic structure, and those of BLOOM³, GASSER⁴, DE LORENZO^{5,6} and PORTER and BONNEVILLE⁷ using the EM. The present observations were undertaken in order to elucidate with the EM numerous morphological problems of the fine structure of the olfactory epithelium in mammals.

Fixation was carried out by perfusing the whole animal through the heart with glutaraldehyde, under general anaesthesia with nembutal. The dissected mucosa was subsequently fixed in a buffered solution of OsO₄ at pH 7.4, dehydrated in ethanol and stained in alcoholic

PTA before embedding in Araldite for sectioning (see GRAY⁸).

Sagittal sections of the epithelium show the presence of the olfactory receptors, supporting and basal cells. The olfactory receptors show at their distal pole the olfactory rod (Figure 1) bearing numerous cilia showing 9 + 2 filamentous apparatus and basal body embedded in the cytoplasm. As many as 7 or 8 cilia could be observed in one section. The dendritic portion of the olfactory cell shows the presence of longitudinally oriented tubules

¹ A. C. ALLISON, *Biol. Rev.* 28, 195 (1953).

² W. E. LE GROS CLARK, *Proc. Roy. Soc. B* 146, 299 (1957).

³ G. BLOOM, *Z. Zell.* 41, 89 (1954).

⁴ H. S. GASSER, *J. gen. Physiol.* 39, 473 (1956).

⁵ A. J. DE LORENZO, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3, 839 (1957).

⁶ A. J. DE LORENZO, *Olfaction and Taste*. Proc. First Intern. Symp. Stockholm (1962).

⁷ K. R. PORTER and M. A. BONNEVILLE, *An Introduction to the Fine Structure of Cells and Tissues* (Lea & Febiger, 1964).

⁸ E. G. GRAY, *J. Anat.* 93, 420 (1959).