

a second *X* chromosome marker has been introduced, that is the 'crossveinless' mutation which modifies the alar phenotype only. Spectrophotometric measurements (Figures 1 and 2) have been carried out on both sexes at different stages of development to compare the SE mutant with the SE HPP⁵ treated, and with the MAL/SE mutant strain. For each sex and for each of the 7 ages examined (3rd instar pupae and 1st, 3rd, 5th, 7th, 10th, 15th day from the emergence) 5 groups of 40 animals were weighed, boiled for 1 min in distilled water and beheaded. The heads were homogenized with 2.5 ml of EtOH/H₂O (30:70) brought to pH 2 with HCl, filtered through a millipore membrane (AP 200 1300) and examined by a Beckman DU 2 spectrophotometer in the range 200–500 nm. Among the absorption peaks we have chosen the one at 420 nm which is related to sepiapterin. The chromatographic analysis has been carried out with the *n*-propanol: NH₄OH 5% (2:1) system on Whatman No. 1 filter paper using a Mineral-light nm 365 as detecting lamp. Migration time was

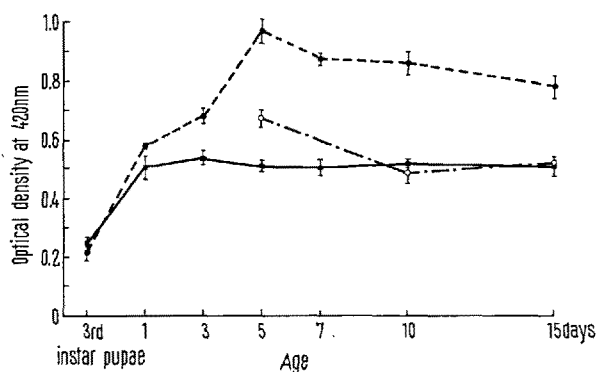


Fig. 2. Optical density at 420 nm of homogenized heads of *Drosophila melanogaster* females SE (---), MAL/SE (—) and SE treated with HPP (-.-). Means of 5 experiments for each different age. Vertical lines indicate the S.E.

about 24 h. It was possible to observe the disappearance of the isoxanthopterin in the SE males treated with HPP, an increase of 2-amino-4-hydroxypterin, and a decrease of sepiapterin that reaches the same level as in the double mutant.

These results and the previous studies on the wild type suggest that the decrease of the red and the yellow pigments (drosopterin and sepiapterin respectively) is caused by the inhibition of the XDH enzyme. Since this enzyme is known to convert 2-amino-4-hydroxypterin into isoxanthopterin in the pterin metabolism, it seems clear that the disappearance of isoxanthopterin should be related to the decrease of the red and yellow pigments. In the normal males, the isoxanthopterin is partly stored in some organs (testicles, etc.) and partly converted into the eye pigment. The females, lacking the main receptor organs, can utilize only as much isoxanthopterin as is necessary to get the maximum amount of the eye pigment, the excess being eliminated. The inhibition of XDH obviously effects only the amount of the eye pigment which is synthesized through the isoxanthopterin, while the rest, coming from the normal pterin metabolism, cannot be inhibited.

Riassunto. Il trattamento con HPP di mutanti SE di *Drosophila melanogaster* ha dato la fenocopia biochimica del doppio mutante MAL/SE (diminuzione della sepiapterina, aumento delle bipterine e, nei maschi, assenza della isoxanthopterin con accumulo del precursore 2-amino-4-idrossipterina). Si discute il ruolo dell'enzima XDH nel metabolismo in istudio.

G. PARISI, E. FIGURELLI
and M. CARFAGNA

*Istituto di Biologia generale e Genetica
dell'Università di Napoli, Via Mezzocannone 8,
I-80134 Napoli (Italy), 13 October 1970.*

⁵ We are indebted to 'Wellcome Italia S.p.A.', Rome, for a generous gift of HPP (Allopurinol®).

Mise en évidence d'une activité mannosyl-transferase dans les cellules embryonnaires de poulet et influence de la différenciation cellulaire

Dans l'étude de la biosynthèse des glycoprotéines, le problème actuel consiste à localiser, à isoler et à caractériser les systèmes enzymatiques responsables du transfert et de la fixation des molécules glucidiques sur la chaîne polysaccharidique. Parmi les systèmes cellulaires disponibles, les cellules embryonnaires de poulet, du fait de leur activité métabolique intense, sont un matériel de choix, d'autant plus qu'elles se prêtent remarquablement au fractionnement cellulaire^{1,2}.

Une étude préliminaire in vivo nous a montré que le mannose s'incorporait dans les macromolécules glycoprotéiques des cellules d'embryon de poulet. Nous avons alors essayé d'élaborer un système acellulaire, susceptible d'incorporer in vitro ce précurseur glucidique à partir de sa forme coenzymatique active: le GDP-mannose.

Un fractionnement cellulaire limité, en saccharose 0,25M, conduit à 3 fractions successives. Après broyage de l'embryon à froid en tampon Tris-HCl 5 × 10⁻²M, pH 7, 0,25M en saccharose, par 2 fois 10 passages successifs dans un homogénéiseur de type Potter-Elvehjem,

une première centrifugation pendant 15 min à 15000g permet d'éliminer les cellules non broyées, les noyaux et les mitochondries. Les 4/5 du surnageant post-mitochondrial ainsi obtenu sont centrifugés pendant 1 h à 195000g; un culot de microsomes est ainsi séparé de la phase cytoplasmique non particulaire. Chacune de ces fractions subcellulaires est incubée avec le précurseur glucidique pendant 1 h à 37°C. Les macromolécules sont précipitées par une concentration finale de 10% en acide trichloracétique sur filtre Whatman (Glass paper, type GF/B, diamètre 2,5 cm) et lavées sur filtre par un mélange méthylal-méthanol (4/1). Des témoins sont traités dans les mêmes conditions, au temps 0. La radioactivité, rapportée à la teneur en protéines dosées par la méthode

¹ R. GOT, P. LOUISOT, J. FROT-COUTAZ et L. COLOBERT, Biochim. biophys. Acta 157, 599 (1968).

² J. FROT-COUTAZ, P. LOUISOT, R. GOT et L. COLOBERT, Experientia 24, 1206 (1968).

de LOWRY, met en évidence une activité mannosyl-transférase dans le surnageant post-mitochondrial, puis localise cette activité uniquement et intégralement dans les microsomes (Tableau I).

Au cours de diverses expériences, une nette différence dans le taux d'incorporation du précurseur glucidique est apparue selon l'âge de l'embryon. Une étude de ce phénomène a donc été entreprise. Les microsomes provenant d'embryons prélevés chaque jour entre le 3^e et le 11^e jour sont incubés dans les conditions décrites dans le Tableau I. La courbe obtenue en portant la radioactivité spécifique (cpm/mg protéines) en fonction de l'âge de l'embryon passe par un maximum vers le 8^e jour (Figure).

Afin de préciser ces premières données, un fractionnement cellulaire plus élaboré a été mis en œuvre¹. Le fractionnement cellulaire en saccharose 0,88 M permet de différencier les microsomes de l'ergastoplasme (rough microsomes) des membranes du réticulum endoplasmique et des ribosomes libres (smooth microsomes)². Par une première centrifugation du broyat d'embryon en saccharose 0,88 M à 20 000 g pendant 20 min, les cellules non broyées, noyaux et mitochondries sont éliminés. Les 4/5 du surnageant post-mitochondrial, centrifugés pendant 1 h à 105 000 g, laissent sédimenter une première fraction microsomique: les microsomes de l'ergastoplasme. Le surnageant contient les membranes du réticulum endoplasmique et les ribosomes libres qui sédimenteront à leur tour par une centrifugation de 3 h à 145 000 g.

L'incubation avec le précurseur glucidique de ces deux fractions microsomiques montre que l'activité mannosyl-transférase se retrouve uniquement au niveau des microsomes de l'ergastoplasme avec une radioactivité spécifique nettement augmentée. Ce résultat suggérerait alors, que l'accroissement de l'activité spécifique de transfert dans les premiers jours, pouvait être relié à un accroissement de l'ergastoplasme actif, par rapport aux membranes du réticulum endoplasmique et aux ribosomes libres inactifs.

L'évaluation des quantités relatives de ces deux fractions microsomiques peut être effectuée en dosant les ribosomes par l'intermédiaire de leur RNA. Or le renouvellement métabolique du RNA des ribosomes liés et des ribosomes libres est le même⁴. On introduit donc, directement dans la cavité allantoïque de l'œuf embryonné, de l'uridine tritiée, qui s'incorpore facilement dans les RNA (2 µCi par œuf d'uridine ³H-5, CEA, activité spécifique 23 Ci/mM). Les deux fractions microsomiques, obtenues comme précédemment, sont alors traitées par le désoxycholate de sodium à 0,4% en saccharose 0,88 M. Dans ces conditions, les ribosomes sont détachés des membranes et recueillis après une centrifugation de 4 h à 145 000 g. La détermination de la radioactivité liée au tritium dans les ribosomes libres et liés, constitue une méthode de dosage des RNA ribosomiques extrêmement sensibles.

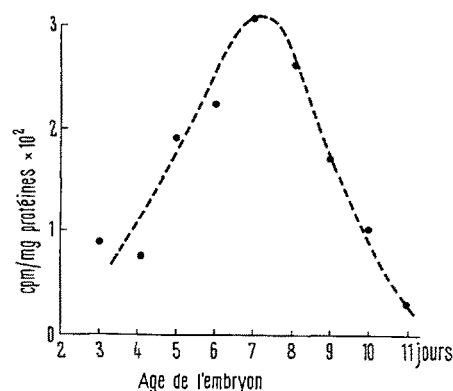
Le Tableau II met en évidence entre le 4^e et le 8^e jour une augmentation du rapport ribosomes liés/ribosomes libres, alors que, dans le même temps, la radioactivité spécifique des microsomes de l'ergastoplasme liée à l'incorporation du GDP-mannose, reste constante. Il semble donc bien que l'on puisse établir une relation entre l'augmentation de l'activité mannosyl-transférase dans les microsomes des cellules embryonnaires de poulet entre le 3^e et le 8^e jour, et l'augmentation de l'ergastoplasme actif par rapport à la fraction du réticulum endoplasmique inactif.

Cette maturation de la cellule embryonnaire qui entraîne une évolution rapide du réticulum endoplasmique agranulaire vers l'ergastoplasme, a été signalée dans un travail récent⁵ à propos de l'UDP-glucuronyl-

Tableau I. Radioactivité incorporée dans les macromolécules glycoprotéiques du surnageant post-mitochondrial (SPM), de la phase cytoplasmique non particulaire (PCS) et des microsomes (M), des cellules embryonnaires de poulet au 5^e jour d'incubation

Fractions subcellulaire	Protéines par essai (mg)	Radioactivité totale (cpm)	Radio-activité spécifique (cpm/mg protéines)
SPM	5	200	40
PCS	4	0	0
M	1	200	200

Le milieu d'incubation contient pour un volume total de 220 µl: 200 µl de la fraction subcellulaire en tampon *Tris*-HCl 5 × 10⁻² M, pH 7, 10 µg d'α-amylase, 2 × 10⁻⁵ µmole de GDP-mannose ¹⁴C [guanosine diphosphate mannose (¹⁴C (U))]; NEN, activité spécifique 150 mCi/mmole].



Influence de l'âge de l'embryon sur la radioactivité spécifique incorporée dans la fraction des microsomes totaux après incubation en présence de GDP-mannose ¹⁴C.

Tableau II. Influence de l'âge de l'embryon sur le rapport ribosomes liés/ribosomes libres

Age de l'embryon (en jours)	Rapport de la radioactivité ³ H dans les RNA des ribosomes liés/ dans les RNA des ribosomes libres	Radioactivité spécifique (cpm/mg protéines) incorporée dans les macromolécules glycoprotéiques	Membranes du réticulum endoplasmique et ribosomes libres
4	1,82	720	0
5	1,74		
6	2,15	760	0
7	2,26		
8	2,45	710	0

La quantité de ribosomes est évaluée en dosant la radioactivité ³H incorporée dans les RNA après introduction dans l'œuf de 2 µCi d'uridine ³H-5. On a rapporté dans le même tableau l'évolution de la radioactivité spécifique des 2 fractions microsomiques après incubation en présence de GDP-mannose ¹⁴C.

³ Y. MOULE, C. ROUILLER et J. CHAUVEAU, J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 547 (1960).

⁴ Y. MOULE et G. DELHUMEAU DEONGAY, Biochim. biophys. Acta 91, 113 (1964).

transférase des hépatocytes embryonnaires de poulet en culture.

Il est intéressant d'ailleurs de constater que les cultures de cellules fibroblastiques embryonnaires sont justement effectuées à partir d'embryons ayant 8 ou 9 jours. Cet âge correspond en effet à une concentration optimale en fibroblastes, qui ont une activité métabolique intense. De plus, des études d'incorporation de glucides effectuées, soit sur des cellules en culture, soit directement dans l'œuf, ont donné des résultats identiques⁶. On peut donc supposer que l'incorporation du précurseur glucidique dans les cellules embryonnaires de poulet est essentiellement réalisée par les fibroblastes. Cette hypothèse est corroborée par la partie descendante de la courbe de la Figure. En effet, à partir du 8^e jour, la différenciation cellulaire dans l'embryon devient considérable, la proportion de fibroblastes diminue alors sensiblement, ce qui pourrait expliquer la chute de l'activité spécifique de transfert.

Les connaissances actuelles sur la biosynthèse des glycoprotéines permettent de considérer les membranes de l'ergastoplasme comme étant le site principal de transglycosylation. La localisation de la mannosyl-transférase des cellules embryonnaires de poulet dans l'ergastoplasme est en accord avec cette donnée générale. Cette activité enzymatique pourrait alors servir de marqueur pour cette fraction cytoplasmique. Elle permet également

de confirmer l'évolution caractéristique des cellules embryonnaires qui voient leur réticulum endoplasmique granulaire proliférer rapidement au détriment des ribosomes libres.

Summary. The microsomal fractions from chick embryo cells were shown to carry out transfer of mannose from GDP-mannose to endogenous protein acceptors. Data also are presented which support that among the sub-cellular fractions only the rough microsomes are active in the mannose transfer. The maximum mannosyltransferase activity is obtained with 8-day-old embryos. This observation may be related to the proliferation of rough endoplasmic reticulum with regard to smooth microsomes.

M. B. PRADAL, P. LOUISOT et R. GOT

*Equipe de Recherche CNRS N° 66,
V.E.R de Médecine, Lyon-Sud,
B.P. 12, F-69 Oullins (France), 10 juillet 1970.*

⁵ E. R. SKEA et A. M. NEMETH, Proc. natn. Acad. Sci., USA 64, 795 (1969).

⁶ M. B. PRADAL, D. LEBRE, P. LOUISOT et R. GOT, Comp. Biochem. Physiol., 35, 31 (1970).

Solid-Phase Synthesis and Bioassay by Tibia Test of Monotetracontapeptide 81-121 and of Ditracontapeptide 122-153 of Human Growth Hormone¹

In his excellent paper presented at the First International Symposium on growth hormone, LI² stated that 'there are increasing strong evidences that the whole human growth hormone (HGH) molecule is not necessarily required for biological activities. It remains to be demonstrated that peptide fragment or fragments can be obtained in highly purified state from partial enzymic digests of HGH and that these pure fragments possess growth promoting or lactogenic activities or both'. Recently YAMASAKI et al.³ reported that one of the peptides derived from tryptic digestion of bovine growth hormone possesses remarkable biological activity on 'tibia test' and on weight gain test in rats.

To our knowledge, no data have been published concerning attempts to synthesize peptides with amino acid sequences corresponding to fragments of human growth hormone molecule, the primary structure of which was completely defined by LI⁴. In this communication we shall present essential data on the synthesis and preliminary results on the biological activity as measured by 'tibia test' of newly synthesized polypeptides corresponding to the sequence of human growth hormone from 81 to 121 (monotetracontapeptide) and from 122 to 153 (ditracontapeptide).

Material and methods. The 2 peptides were synthesized according to the general procedure of solid-phase peptide synthesis of MERRIFIELD^{5,6}. The protection of α -amino groups of amino acids was performed using t-butyloxycarbonyl (Boc); functional groups of lateral chains were protected as follows: Asp (β -OBzl), Glu (γ -OBzl), Ser (Bzl), Thr (Bzl), Tyr (Bzl), Lys (ϵ -Z), Arg (NO_2), His (Dnp)⁷, Met(O).

The synthesis was carried out in a stepwise manner starting in both cases from 0.55 g (0.50 mmole) of Boc-Leu-resin. Coupling was usually mediated by N,N'-

dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) (threefold excess, 3 h), only for Asn and Gln the method of *p*-nitrophenyl ester was employed. The Boc groups were removed by 1N HCl in HOAc for 30 min at room temperature with the exception of Boc of Gln which was removed by trifluoroacetic acid (15 min at room temperature) according to TAKASHIMA et al.⁸. The final peptides were removed from the solid support by SAKAKIBARA method⁹: 1 g of Boc-peptidyl resin was treated with 10 ml of HF in the presence of 1 ml of anisole.

Details for peptide 81-121. From 0.55 g (0.50 mmole) of Boc-Leu-resin the yield was 2.50 g of the protected monotetracontapeptide-resin. After acidolysis by HF 1.32 g of free monotetracontapeptide were isolated. This was dissolved in Na₂CO₃ (pH 8) and the solution stirred for 1 h at room temperature. The product was purified by countercurrent distribution (130 transfers in the system 2-butanol 0.1% aqueous dichloroacetic acid 1:1, K = 15, and 130 transfers in the system chloroform,

¹ Supported in part by Grant No. 69 00386 from Consiglio Nazionale delle Ricerche, Italy.

² C. H. LI, in *Growth Hormone* (Eds. A. PECILE and E. E. MÜLLER; Excerpta Medica, Amsterdam 1968), p. 1.

³ N. YAMASAKI, M. KIKUTANI and M. SONNENBERG, Biochemistry 9, 1107 (1970).

⁴ C. H. LI, J. S. DIXON and W. K. LIU, Arch. Biochem. Biophys. 133, 70 (1969).

⁵ R. B. MERRIFIELD, J. Am. chem. Soc. 85, 2149 (1963).

⁶ R. B. MERRIFIELD, Adv. Enzymol. 32, 221 (1969).

⁷ F. CHILLEMI and R. B. MERRIFIELD, Biochemistry 8, 4344 (1969).

⁸ H. TAKASHIMA, V. DU VIGNEAUD and R. B. MERRIFIELD, J. Am. chem. Soc. 90, 1323 (1968).

⁹ S. SAKAKIBARA, Bull. chem. Soc. Jap. 40, 2164 (1967).