

no major difference in their distribution exists among the brain parts studied with the possible exception of the hippocampus which may have a smaller 'effective' extracellular space. Hence these substances can serve as reference or 'control' substances. By comparing values for [^{14}C] glucose (Table II) with those for [^3H]OH (Table I) it becomes apparent that in all structures studied incorporation of [^{14}C] of glucose is a function of the total water content, but comparisons between [^{14}C] fructose and [^3H]OH reveal that diencephalon and hippocampus contain less [^{14}C] than would be expected from analysis of the [^3H]OH data. This may be related to different rates of fructose metabolism in different cerebral structures.

Ratios of [^{14}C]/[^3H] of simultaneously-injected radioactive glucose and water (Table III) indicate that certain brain structures (i.e., cerebellum, hippocampus and diencephalon) can be shown to differ from the others by this method. Less [^{14}C] of glucose entered these structures than was expected on the basis of [^3H]OH exchange which may indicate that energy metabolism occurs to a lesser extent (or more slowly) in these regions. The finding that [^{14}C] atoms of fructose sucrose or pyruvate with the exception of hippocampus were incorporated to similar extents into all structures with respect to [^3H] (of [^3H]OH or [^3H] inulin) indicates that incorporation of these substances is related directly to the 'spaces' of

brain or to its total water content. This method might be useful for studying changes in the metabolism of energy-yielding substrates which may be produced in awake behaving animals by pharmacological insult or environmental stimuli. However, it must be realized that the incorporation into brain of substances which can be metabolized is subject to diurnal variation^{19,20} and therefore that time of day is a critical factor in this type of study.

Résumé. Une méthode nouvelle est présentée pour étudier des corrélations qui existent entre le cerveau et le comportement des animaux.

F. V. DEFEUDIS and W. C. BLACK

Institute of Psychiatric Research and Departments of Psychiatry and Pharmacology, Indiana University School of Medicine, 1100 West Michigan Street, Indianapolis (Indiana 46202, USA), 5 October 1972.

¹⁹ A. SOLLBERGER, Suppl. Rep. 5th Int. Conf. Biol. Rhythm, Stockholm, (1960), p. 111.

²⁰ A. SOLLBERGER, *Biological Rhythm Research* (Elsevier, Amsterdam 1965), p. 461.

Untersuchungen über Ultrastruktur und Aminosäurezusammensetzung der Eischalen von *Natrix natrix*

Die Eischalen von vielen Reptilien – insbesondere der Schlangen – sind nicht eindeutig verkalkt, auch wenn bei *Natrix natrix natrix* gelegentlich aufgelagerte Kalkkristalle beobachtet werden^{1,2}. Im Gegensatz zu Vogeleischalen finden sich in nicht kalkigen Eischalen von Reptilien völlig anders aufgebaute Proteine³. Innerhalb der Reptilien zeigt sich aber auch bei nicht verkalkten Eischalen eine deutliche Gruppierung auf Grund einer unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung. Bisher konnten mindestens 4 typische Aminosäuren-Profile festgestellt werden: *Dermochelys*-Typ, *Tarentola*-Typ, *Phelsuma*-Typ und *Eublepharis*-Typ².

Die in Eischalen von Lederschildkröten (*Dermochelys coriacea*) gefundenen Aminosäuren-Relationen unterscheiden sich sehr deutlich von den 3 übrigen bei Gekkos auffallenden Aminosäuren-Verhältnissen. Das erstmalig bei *Eublepharis* festgestellte Aminosäuren-Profil ist charakteristisch für praktisch alle Squamaten². Auch lassen sich bei kalkigen Schalen von Reptilien unterschiedliche kristalline Bausteine ermitteln⁴.

Ziel dieser Arbeit war es, Eischalen von Schlangen (*Natrix natrix natrix*) in ihrer Struktur und ihrer Aminosäuren-Zusammensetzung zu untersuchen und mit bereits bekanntem Material zu vergleichen.

Versuchsmethodik. Frische Schalen von Eiern der Ringelnatter und der Membrana testacea des Haushuhns (HNL-Hybridhuhn) wurden in eine 1%ige Osmiumsäurelösung (0,1 M Cacodylat-Puffer mit 7,5% Sucrose, pH 7,2, Osmolarität 450) 2 h fixiert und nach Dehydrierung mit Alkohol in Epon eingebettet. Bleinitrat diente zur Nachkontrastierung der Dünnschnitte. Die Färbung mit Rutheniumrot (modifiziert nach LUFT⁵) erfolgte bei der Vorfixierung in 3% Glutaraldehyd (0,1 M Cacodylat-Puffer mit 0,5% Sucrose, pH 7,2, 2000 ppm Rutheniumrot). Die weiteren Schritte wurden entsprechend der oben

beschriebenen Methode (aber ohne Nachkontrastierung) durchgeführt.

Die Aminosäuren-Analyse erfolgte an einem entsprechenden Analysator nach Hydrolyse in 6 N HCl (24 h) bei 110°C⁶. Zur Cystin-Bestimmung haben wir die Proben nach HIRS⁷ mit Perameisensäure vorbehandelt.

Ergebnisse und Diskussion. Die Eischalen von Ringelnattern sind aus Fasern aufgebaut, die untereinander in Verbindung stehen (Figur 1). Jede Faser besteht aus einer weniger elektronendichten Hülle (mit feiner, granulärer Textur) und der homogenen Core-Substanz (Medulla-Substanz). Das Core ist von zahlreichen Hohlräumen – besonders bei den Fasern im äusseren Bereich der Schale – durchsetzt. In der Feinstruktur ähneln diese Fasern denen der Membrana testacea vom Haushuhn (Figur 2)⁸, jedoch ist die Hüllsubstanz bei der Ringelnatter (0,15 µm) schwächer ausgebildet als beim Haushuhn (0,3 µm). Die Faserhüllen lassen sich – besonders in der äusseren Zone – bei der Ringelnatter und beim Huhn mit Rutheniumrot tingieren (Figuren 1a und 2a).

Die Core-Substanz ist dagegen nicht färbbar. Die Ruthenium-Reaktion in der Faserhülle der Ringelnatter

¹ H. K. ERBEN, persönliche Mitteilung.

² G. KRAMPITZ, W. BOEHME, K. KRIESTEN und H. HARDEBECK, Z. vergl. Zool. Evolutionsforsch., im Druck.

³ G. KRAMPITZ, K. KRIESTEN und R. FAUST, Biom mineralisation, im Druck.

⁴ G. KRAMPITZ, H. K. ERBEN und K. KRIESTEN, Biom mineralisation 4, 88 (1972).

⁵ J. K. LUFT, Anat. Rec. 171, 347 (1971).

⁶ G. KRAMPITZ und J. WIENEKE, Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk. 18, 147 (1963).

⁷ C. H. W. HIRS, Meth. Enzym. 11, 197 (1967).

⁸ C. M. SIMONS, und G. WIERTZ, Z. Zellforsch. 59, 555 (1968).

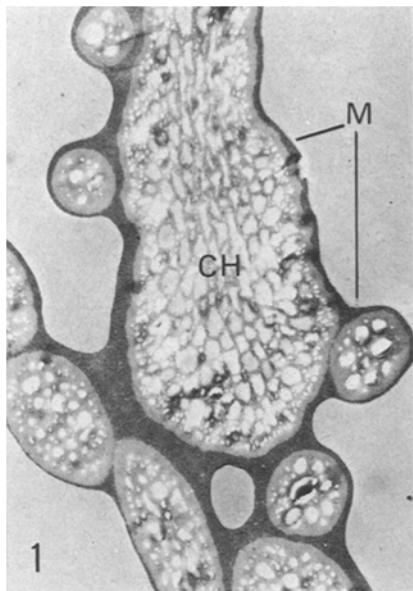


Fig. 1. Fasern äusseren Eischalenbereichs von der Ringelnatter. Core-Anteil mit Hohlräumen (CH), Mantelsubstanz (M). $\times 10,000$.

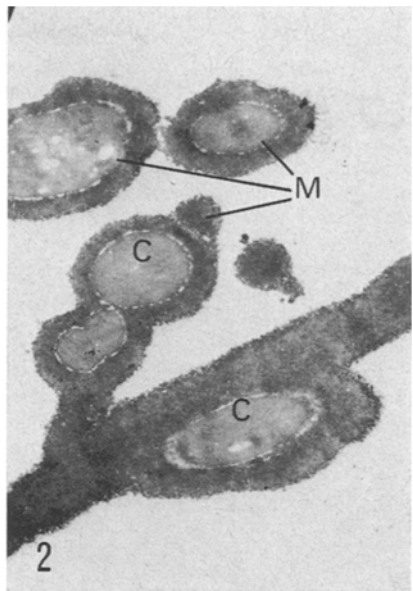


Fig. 2. Fasern der Membrana testacea vom Huhn. Core (C), Mantel (M). $\times 10,000$.

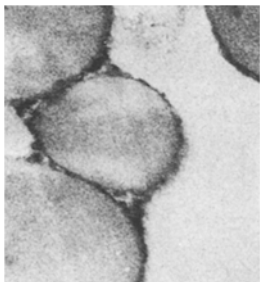


Fig. 1a und 2a. Mit Rutheniumrot tingierte Fasern. 1a) Reaktion des Fasermantels von der Ringelnatter mit Rutheniumrot. $\times 20,000$. 2a) Färbung der äusseren Zone des Fasermantels vom Huhn. $\times 15,000$.

Aminosäurezusammensetzung von Eischalen der Ringelnatter und der Membrana testacea des Haushuhns

	Eischalen (<i>Natrix</i>)	Membrana (<i>Gallus</i>)
Asp	5,20	7,24
Thre	2,32	7,52
Ser	2,40	7,98
Glu	3,95	10,60
Pro	26,82	10,30
Gly	5,05	9,35
Ala	5,45	3,30
Cys 1/2	7,97	8,60
Val	4,00	6,42
Meth	0,58	2,40
Ileu	1,34	2,64
Leu	5,23	3,52
Tyr	4,25	1,00
Phe	0,80	1,20
Lys	0,85	1,90
His	9,64	2,05
Arg	5,85	4,08

Agaben in Mol-%.

lässt auf das Vorkommen von Mucopolysacchariden und/oder Proteoglykanen schliessen. Dies ist bereits für das Huhn nachgewiesen worden⁹⁻¹¹. Im Unterschied zum Huhn fallen besonders die Hohlräume im Faser-Core der Ringelnatter auf; sie dürften für eine spezielle Funktion ausgebildet sein.

Die Proteine der Eischalen von *Natrix natrix* und der Membrana testacea von *Gallus gallus dom.* sind trotz morphologischer Verwandtschaft verschieden konstruiert. Dies geht aus dem unterschiedlichen Löslichkeitsverhalten und der Aminosäuren-Zusammensetzung (Tabelle) hervor. In den Eischalen von *Natrix natrix* kommen prolinreiche Proteine vor, die man bei praktisch allen anderen Squamaten auch findet². Wenn zu dem hohen Gehalt an Prolin noch ein vergleichbar hoher Wert für Cystein tritt, dann entspricht dies dem Eublepharis-Typ, der auch bei *Natrix natrix* vorliegt. Zusätzlich aber fallen relativ hohe Werte für Histidin und Arginin auf, die in gleichem Verhältnis zu den anderen Aminosäuren nur noch bei Skinken, Eidechsen, Waranen und den bisher untersuchten Schlangen (Pythonidae)² vorkommen. Die Ergebnisse von *Natrix natrix* entsprechen den bisherigen Befunden für Eischalen von Schlangen. Ob zwischen Skinken, Eidechsen, Waranen und Schlangen gemeinsame Beziehungen hinsichtlich der Eischalen-Proteine bestehen, sei zur Diskussion gestellt.

Der hohe Prolin-Gehalt von Eischalen-Proteinen des Eublepharis-Typs deutet auf Copoly-L-Prolin hin. Von (*trans*)-Poly-L-Prolin (II) ist bekannt, dass es kollagenähnliche Strukturen besitzt¹². Polyaminosäuren mit der Sequenz Gly-Pro-Ala bilden eine kollagenähnliche Dreifach-Helix aus^{13,14}. Es liegt die Vermutung nahe, dass in

⁹ D. A. T. BALCH und R. A. COOKE, Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys. 10, 13 (1970).
¹⁰ W. MASSHOFF und H. J. STELFMANN, Z. Zellforsch. 55, 818 (1961).
¹¹ P. C. M. SIMONS, C. agric. Publ. and Documentation, Wageningen 1971).
¹² V. MADISON und J. SCHELLMAN, Biopolymers 11, 1041 (1972).
¹³ G. N. RAMACHANDRAN und V. SASIKHARAN, Adv. Protein Chem. 23, 283 (1968).
¹⁴ W. TRAUB und A. YONATH, J. molec. Biol. 16, 404 (1966).

den Eischalen von *Natrix natrix* ebenfalls kollagenähnliche Proteine vorkommen, die die Stabilität und hohe Zugfestigkeit dieser Eischalen im Vergleich zu kalkigen Eischalen erklären könnten¹⁵. Diese Eigenschaften werden zweifellos von Quervernetzungen durch Disulfidbrücken unterstützt, wie sie für die Cuticula von *Ascaris*¹⁶ und für die Kapseln von Nematocysten der Seeanemone¹⁷ angenommen worden sind. Die Hohlräume im Faser-Core der Ringelnatter-Eischalen könnten ebenfalls helfen, die mechanischen Eigenschaften zu verbessern; gleichzeitig ist aber auch eine Beteiligung am Gas- und Flüssigkeitsaustausch zu vermuten.

Summary. The ultrastructures of eggshells of *Natrix natrix* and the membrana testacea of *Gallus gallus dom.* are very similar, with the exception of cavity systems which only exist in eggshells of snakes (ringsnake) but not in the membrana testacea of birds. In the sheath of the fibres of *Natrix natrix*, a positive ruthenium red-reaction indicates the presence of mucopolysaccharides, or proteoglycans. The eggshells of *Natrix natrix* contain a high proportion of proline, but also of cystine, histidine

and arginine. The high proline content is discussed with regard to the properties of poly-L-proline. Presumably proteins similar to collagen exist in eggshells of *Natrix natrix*.

G. KRAMPITZ¹⁸, K. KRIESTEN¹⁸ und W. BÖHME¹⁹

Forschungs- und Lehrbereich Biochemie, Institut für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere, Universität Bonn, Katzenburgweg 7-9, D-53 Bonn 1 (Deutschland); und Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander König, Adenauerallee 150-164, D-53 Bonn 1 (Deutschland), 4. Oktober 1972.

¹⁵ S. M. PARTRIDGE, *Adv. Protein Chem.* 17, 251 (1962).

¹⁶ O. W. MCBRIDE und W. F. HARRINGTON; *J. biol. Chem.* 240, 4545 (1965).

¹⁷ R. BLANGUET und H. M. LENHOFF, *Science* 154, 152 (1966).

¹⁸ Forschungs- und Lehrbereich Biochemie, Institut für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere - Universität Bonn, Katzenburgweg 7-9, D-53 Bonn 1 (Deutschland).

¹⁹ Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander König, Adenauerallee 150-164, D-53 Bonn 1 (Deutschland).

The Molecular Basis for Scent Discrimination: Response to Nitrobenzene-*d*₅ of Honey Bees (*Apis mellifera* L.) Conditioned with Nitrobenzene

The substitution of an isotopic atom such as deuterium for protium in a molecule containing hydrogen should leave essentially unchanged those molecular properties that are associated with electronic structure and force fields. In contrast, molecular properties dependent upon mass are changed¹. If the chemoreceptor system for odor detection involves an electric field that fits a receptor site², the replacement of hydrogen with deuterium should not change the aroma of a molecule. If it involves molecular motions or dipole moments³, the isotopic effects should cause changes.

When 4-(*p*-hydroxyphenyl)-2-butanone acetate was systematically deuterated, substitutions of part of the hydrogen atoms did not affect the potent attractiveness of the compound to males of the melon fly⁴. When the activity of 7 partially deuterated ketones was tested with the harvester ant⁵, the deuteration of active hydrogen atoms adjacent to the carbonyl group did not affect the ant's alarm-releasing activity. In both experiments, part of the IR- and far-IR-absorption peaks related to hydrogen were shifted to lower frequencies with the heavier isotope, shifts that were related to the site of deuteration. No completely deuterated compound has been tested.

The absorption spectra of nitrobenzene was used to support a hypothesis³ that odor determination was

related to out-of-plane deformation of the benzene ring at 397 and 176 cm⁻¹. Other peaks supported speculation that it was not the vibrational energy alone that influenced odor perception. Instead, the effects of matching frequencies³ on the shape of the molecular boundary seemed to influence VAN DER WAAL'S interactions with the receptor surface to cause fine discrimination between odors.

Materials and methods. Nitrobenzene-*d*₅ (mol. wt. 123, b.p. 208° m.p. 6°, [α]_D²⁰ 1.5498, purity 99%) should be even more stable than nitrobenzene to free radical or ionization reactions. Both liquids, as purchased⁶, contained normal traces of impurities that colored the faint yellow. Chromatography on a charcoal column and distillation did not remove all the color.

When nitrobenzene was coated between salt or polyethylene plates and IR-absorption measured with Beckman IR-8 and IR-11 spectrophotometers, the expected peaks were found. Nitrobenzene-*d*₅ had different peaks: m1588, s1514, s1362, s1340, w1298, w1073, w870, m843, w812, w715, and m651. In addition, the peaks at 3080, 701, and 395 cm⁻¹ were missing, and even those

Table I. Responses of honey bees to 1% nitrobenzene vs. 1% benzaldehyde when conditioned to 1% benzaldehyde

Time test began (h)	Time for 50 bees to land (min)	Bees responding to nitrobenzene (%)	Bees responding to benzaldehyde (%)
09.10	3	26	74
10.07	3	26	74
10.45	2.5	28	72
11.30	3	26	74
Mean		26.5	73.5

¹ K. B. WIBERG, *Chem. Revs.* 55, 713 (1955).

² R. W. MONCRIEFF, *The Chemical Senses*, 2nd edn. (Leonard Hill Ltd., London, 1951). - J. E. AMOORE, *Nature, Lond.* 198, 271 (1963); 233, 270 (1971). - Anonymous, *Chem. Eng. News* 23, 30 (1968).

³ G. M. DYSON, *Perfum. essent. Oil Rec. yb.* 28, 13 (1937). - L. H. NARODY, *Perfum. essent. Oil Rec. yb.* 47, 23 (1956) - R. H. WRIGHT, *J. appl. Chem.* 4, 611 (1954); *Nature, Lond.* 198, 455 (1963); *Nature, Lond.* 209, 571 (1966). - R. H. WRIGHT and A. ROBSON, *Nature, Lond.* 222, 290 (1969).

⁴ R. E. DOOLITTLE, M. BEROZA, I. KEISER, E. L. SCHNEIDER, *J. Insect Physiol.* 14, 1697 (1968).

⁵ M. S. BLUM, R. E. DOOLITTLE, M. BEROZA, *J. Insect Physiol.* 17, 2351 (1971).

⁶ Nitrobenzene and nitrobenzene-*d*₅ were purchased from Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisc. The use of trade names and the listing of suppliers does not constitute recommendation of a particular product by the U.S. Dept. of Agriculture.