

- 3 A.E. Pohland and P. Mislivic, in: *Mycotoxins and other Fungal related Food Problems*, p. 110. Ed. J.V. Rodricks. *Advances in Chemistry Series*, American Chemical Society, Washington, D.C. 1976.
- 4 S. Shibata, in: *Chemistry of Natural Products*, vol. 8, p. 109. 8th International Symposium on the Chemistry of Natural Products, New Delhi, India, Butterworth and Co., London 1973.
- 5 R.T. Cole, J.W. Kirksey, H.G. Cutler, D.M. Wilson and G. Morgan-Jones, *Can. J. Microbiol.* 22, 741 (1976).
- 6 P.B. Mislivic and V.R. Bruce, *J. Food Prot.* 40, 309 (1977).
- 7 T. Tatsuno, M. Tsukioka, Y. Sakai, Y. Suzuki and Y. Asami, *Chem. pharm. Bull.* 3, 476 (1955).
- 8 T. Tatsuno, H. Wakamatsu, Y. Kanazanea, T. Sato and H. Tsunoda, *J. pharm. Soc. Japan* 77, 689 (1957).
- 9 S. Marumo, K. Miyao and A. Matsuyama, *Bull. agric. chem. Soc. Japan* 29, 262 (1955).
- 10 S. Marumo, *Bull. agric. chem. Soc. Japan* 23, 428 (1959).
- 11 K. Ishii and Y. Ueno, *Appl. Microbiol.* 26, 359 (1973).
- 12 K. Uraguchi, T. Tatsuno, F. Sakai, M. Tsukioka, Y. Sakai, O. Yonemitsu, H. Ito, M. Miyake, M. Saito, M. Enomoto, T. Shikata and T. Ishiko, *Japan J. exp. Med.* 31, 19 (1961).
- 13 K. Uraguchi, M. Saito, Y. Noguchi, K. Takahashi, M. Enomoto and T. Tatsuno, *Food Cosmet. Toxic.* 10, 193 (1972).
- 14 I. Ishikawa, Y. Ueno and H. Tsunoda, *J. Biochem.* 67, 753 (1970).
- 15 G. Pataki, *J. Chromat.* 12, 541 (1963).
- 16 F. Reindel and W. Hoppe, *Chem. Ber.* 87, 1103 (1945).
- 17 A.C. Ghosh, A. Manmade, J.M. Townsend, A. Bousquet, J.F. Howes and A.L. Demain, *Appl. envir. Microbiol.*, submitted.
- 18 K. Biemann, R.A. Anderegg, A. Manmade and A.C. Ghosh, unpublished results.

Préparation des sous-unités de la dopamine β hydroxylase humaine et des anticorps anti-sous-unités Preparation of human dopamine β hydroxylase subunits and antibodies against these subunits

F. Guerinot^{1,2} et C. Bohuon

Laboratoire de Biologie Clinique et Expérimentale Institut Gustave-Roussy, F-94800 Villejuif (France), 29 septembre 1977

Summary. The present study deals with the dissociation of human dopamine β hydroxylase (DBH) in subunits with a mol. wt of 79,500, and the preparation of specific antibodies in rabbits. No cross-reactivity was observed between human DBH and antibodies against human DBH subunits.

La dopamine β hydroxylase (EC 1.14.17.1) est libérée pendant la stimulation du système nerveux sympathique, simultanément avec l'adrenaline et la noradrenaline³⁻⁵ et la mesure du taux sanguin de cette enzyme est un bon index du fonctionnement de ce système nerveux⁶. La détermination de l'activité enzymatique plasmatique peut être une aide dans le diagnostic et le pronostic de certaines maladies, en particulier dans les tumeurs de la crête neurale où on a observé des variations importantes de cette activité^{7,8}. Wallace⁹ rapporte que la dopamine β hydroxylase est une glycoprotéine tétramérique. Des méthodes de dissociation de la DBH bovine et la structure des sous-unités ont été décrites^{10,11}; les auteurs ont noté que les anticorps contre la DBH native ne précipitent pas les sous-unités.

Nous avons pensé que, dans certaines conditions pathologiques, des sous-unités de l'enzyme peuvent être libérées dans le sang. Les sous-unités n'ayant pas d'activité enzymatique, il convenait de mettre au point une méthode de dosage radioimmuno-chimique, nécessitant l'utilisation d'anticorps spécifiques. Nous décrivons ici la méthode de dissociation de la dopamine β hydroxylase d'origine humaine et l'induction d'anticorps spécifiques chez le lapin. **Matériels et méthodes.** L'absence de réaction croisée entre la dopamine β hydroxylase d'origine humaine et la DBH bovine nous obligeant à utiliser des anticorps homologues, nous avons préparé l'enzyme à partir d'un pheochromocytome humain, selon la méthode décrite par Aunis¹². L'enzyme est dissociée en 4 sous-unités identiques par traitement de la protéine native par la dithiothreitol (50 mM) et chauffage à 60 °C pendant 30 min.

La pureté de la protéine native est vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon la méthode de Davis¹³. Les sous-unités sont soumises à une électrophorèse sur gel selon Weber-Osborn¹⁴, en même temps que plusieurs protéines marqueurs de poids moléculaires connus: inhibiteur de trypsine, la serum albumine bovine et la RNA polymérase d'*E. coli* (Combithek Boehringer).

Pour les immunisations initiales, les lapins reçoivent à 15 jours d'intervalle 3 injections de 1 mg de DBH humaine en

émulsion dans 1 ml d'adjuvant complet de Freund. Les injections sont pratiquées dans les coussinets des pattes de l'animal. Les injections ultérieures contenant 0,3 mg de protéines sont faites par voie s.c. multiple, 1 fois par mois. Les injections de la DBH dissociée (0,3 mg) sont effectuées selon le même protocole. Le sang des lapins est prélevé 1 semaine après la 3ème injection ou 1 injection de rappel, par ponction cardiaque. Le sérum est recueilli et conservé à -20 °C.

Des dilutions d'antisérum sont analysées en présence des antigènes, par immunodiffusion sur gel d'agar à 1,5% (Outcherlony) pendant 3 jours à +4 °C.

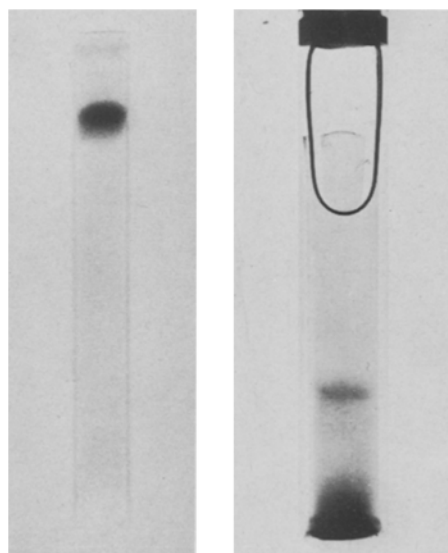


Fig. 1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de la dopamine β hydroxylase humaine purifiée à gauche et de la dopamine β hydroxylase dissociée (à droite). Environ 40 μ g de protéines dans un volume de 100 μ l sont soumis à l'électrophorèse.

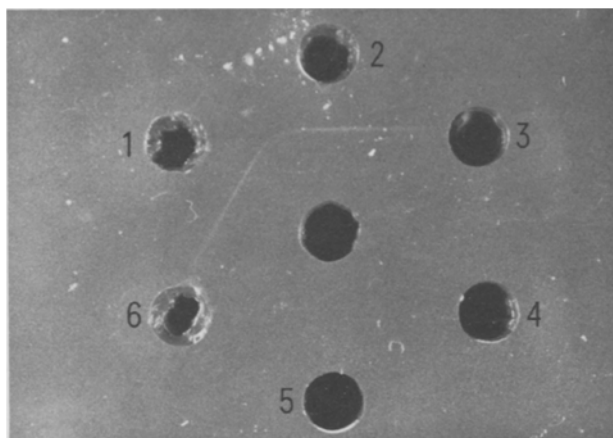


Fig. 2. Immunodiffusion sur plaque d'Ouchterlony. Le puits central contient 5 µl d'antisérum contre la DBH humaine. En 1 et 2: DBH humaine, en 3: DBH bovine, en 4: DBH bovine dissociée, en 5 et 6: DBH humaine dissociée.

Résultats. La figure 1 montre que les protéines injectées aux lapins sont pures et que la DBH dissociée ne contient plus de protéines natives. Son poids moléculaire, calculé à partir des poids moléculaires des protéines de référence traitées dans les mêmes conditions, est de 79 500.

Sur plaque d'immunodiffusion, chaque antigène en présence de l'antisérum correspondant donne une seule ligne de précipitation, montrant une monospécificité. Aucune réaction croisée n'a été mise en évidence entre les DBH humaine et bovine. Par ailleurs, aucune ligne de précipitation n'est visible entre l'antisérum contre la DBH

native et la DBH dissociée, d'une part, ni entre l'antisérum contre la DBH dissociée et la DBH native d'autre part (figure 2).

Cette absence de réaction croisée entre la DBH native et la DBH dissociée nous permet de mettre au point un radioimmunodosage de cette dernière, à l'aide des anticorps spécifiques, ce qui nous donnera les moyens de déterminer de façon sélective les taux sanguins de l'enzyme et de ses sous-unités.

- 1 Nous remercions Madame M. Le Maout pour son excellente aide technique.
- 2 Ce travail a bénéficié de l'aide de l'INSERM (contrat no 75.4.161.2).
- 3 O.H. Viveros, L. Arqueros et N. Kirshner, *Life Sci.* 7, 609 (1968).
- 4 W.P. de Potter, A.F. de Schaepdryver, E.J. Moerman et A.D. Smith, *J. Physiol.* 210, 49 P (1969).
- 5 G.P. Gewirtz et I.J. Kopin, *Nature* 227, 406 (1970).
- 6 L. Geffen, *Life Sci.* 14, 1593 (1974).
- 7 M. Goldstein, L.S. Freedman, C. Bohuon et F. Guerinot, *New Engl. J. Med.* 286, 1123 (1972).
- 8 C. Bohuon, F. Guerinot, Ph. Tcherdakoff et M. Bonnay, *Biochem. Soc. Trans.* 531st Meeting, Lancaster 1973.
- 9 E.F. Wallace, M.J. Krantz et W. Lovenberg, *Proc. natl Acad. Sci. USA* 70, 2253 (1973).
- 10 J.E. Craine, G.H. Daniels et S. Kaufman, *J. biol. Chem.* 248, 7838 (1973).
- 11 D. Aunis, M.T. Miras-Portugal et P. Mandel, *Biochim. biophys. Acta* 365, 259 (1974).
- 12 D. Aunis, M.T. Miras-Portugal et P. Mandel, *J. Neurochem.* 24, 425 (1975).
- 13 B.J. Davis, *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA* 121, 404 (1964).
- 14 K. Weber et M. Osborn, *J. biol. Chem.* 244, 4406 (1969).

Neuromuscular junction blocking agents: An initial screening bioassay¹

A. Sajdak² and N. Shaath^{3,4}

Division of Natural Sciences, State University of New York, Purchase (N.Y. 10511, USA), 10 October 1977

Summary. A simple, rapid and sensitive *in vivo* bioassay for the initial screening of neuromuscular junction (NMJ) blocking agents has been accomplished. The *i.v.* retro-orbital plexus (IVROP) mode of injection was utilized, for the first time, in conjunction with the mouse inclined screen bioassay.

An ongoing project at this laboratory is the synthesis of 'rigid' bicyclic and tricyclic compounds with potential NMJ blocking activity. A pharmacological test was required to screen and evaluate these compounds for their curarimimetic effect. Such an effect is characterized by a non-depolarization or a blockage of nerve impulse at the skeletal neuromuscular junction which causes paralysis. Experimentally, a positive curarimimetic effect, utilizing the inclined screen method⁵, was observed when mice were injected with standard solutions of d-tubocurarine chloride (d-tubo) via the IVROP³ mode of injection.

Method. Healthy albino mice were injected (IVROP) with solutions of d-tubo and placed facing downward upon a finely wired screen inclined at 60° from the horizontal. The effective dosage (ED₅₀ 0.050 mg/kg) was established by manipulating molar concentrations of solutions of d-tubo with respect to the animals b.wt. A positive result was recorded when a mouse fell repeatedly from the screen within 2 min of an injection with d-tubo. The average duration of effect was 175 sec. The experiment was concluded when the animal ceased to fall and was able to cling to the screen continuously for 5 min. The data obtained by

alternating injections of saline placebo's and testor compounds in a minimum of 20 animals, were statistically analyzed to determine the effective dosages. This test is rapid and easily reproducible as compared with alternate methods (Vanne⁶, Hoppe⁷, Mallagen⁸, Cheymol⁹, Soine¹⁰⁻¹²). We feel that the bioassay demonstrated here can serve to eliminate any inactive NMJ blocking agents at an early preclinical stage, obviating the need to perform elaborate and tedious experimentation⁶⁻¹². It also allows for the pharmacological evaluation of synthesized drugs at undergraduate institutions, chemical laboratories and smaller facilities not equipped to do extensive biological testing. This bioassay is possibly the most effective rapid initial screening test for NMJ blocking agents available in the literature to date.

- 1 Taken in part from the Senior thesis of A.S., SUNY at Purchase, Purchase, N.Y. 10577.
- 2 To whom inquiries should be directed.
- 3 A detailed description of the experimental procedure is available upon request.