

However, after heating the RNA in  $1\times$  SC buffer (0.15 M NaCl, 0.015 M Na<sub>3</sub> citrate, pH 7.0) followed by rapid or slow recooling to 4°C, no renatured 28 S rRNA could be observed. Therefore, the conversion of the 28 S rRNA seems to be an irreversible dissociation process under the conditions employed in our experiments.

**Discussion.** For deuterostomians, a correlation between the evolutionary level reached by a species and the mol. wt of its 28 S rRNA has been shown<sup>17</sup>. If this were so in protostomians also, we should expect from the higher evolved dipterans a higher mol. wt of the 28 S rRNA than from the leaf hopper. Furthermore, the values for 28 S rRNA from different dipteran species should be close together. But in contrast to this, the mol. wt of 28 S rRNA from different dipterans differ significantly ( $1.40 \times 10^6$  dalton for *Drosophila*<sup>17</sup>, and  $1.73 \times 10^6$  dalton for *Smittia*), while the mol. wt of 28 S rRNA from leaf hopper ( $1.50 \times 10^6$  dalton) and *Drosophila* were found to be similar. We therefore think that the relation between evolutionary stage and the mol. wt of the 28 S rRNA does not hold true for protostomians.

In both insect species under investigation, a comparable similar lability of the 28 S rRNA was observed. Under the conditions employed (thermal treatment, denaturating agents), the 28 S rRNA was converted to 18 S products. The results reported here, and by several other authors<sup>5,18,19</sup>, suggest a dissociation of the 28 S rRNA. Its mol. wt seems to be large enough to generate 2 18-S molecules from 1 28-S rRNA molecule. The conclusion from this might be that both, *Smittia* and *Euscelis* 28 S rRNA, consists of 2 rRNA chains of similar mol. wt held together by hydrogen bounds which can be dissociated by denaturing conditions.

Our results are in agreement with the suggestion of Ishikawa<sup>19</sup> that thermal lability of the 28 S rRNA might be common to all protostomians. In contrast, heat treatment of

28 S rRNA from deuterostomians results only in a slight increase of the electrophoretic mobility<sup>19</sup>.

- 1 This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 46). We wish to thank Prof. K. Sander and Prof. K. Kalthoff for critical discussion, Dr C. Nüsslein-Volhard and Dr. O. Vogel for critically reading, and Mrs. M. Scherer for typing this manuscript.
- 2 Present address and reprint requests: Department of Zoology, University of Texas, Austin, Texas 78712, USA.
- 3 Present address: Yale University, New Haven, Connecticut 06520, USA.
- 4 K. Scherrer and J.E. Darnell, Biochem. biophys. Res. Commun. 7, 486 (1962).
- 5 S.W. Applebaum, R.P. Ebstein and G.R. Wyatt, J. molec. Biol. 21, 29 (1966).
- 6 N. Balazs and N. Agosin, Comp. Biochem. Physiol. 27, 227 (1968).
- 7 J.R. Greenberg, J. molec. Biol. 46, 85 (1969).
- 8 H. Ishikawa and R.W. Newburg, Biochem. biophys. Res. Commun. 40, 654 (1970).
- 9 H. Ishikawa and R.W. Newburg, Biochim. biophys. Acta 232, 661 (1971).
- 10 H. Jäckle and K. Kalthoff, Photochem. Photobiol., in press (1978).
- 11 O. Schmidt and H. Jäckle, Wilh. Roux Arch. devl. Biol., in press (1978).
- 12 H. Winter, Wilh. Roux Arch. devl. Biol. 175, 103 (1974).
- 13 J.-E. Edström and R. Tanguay, J. molec. Biol. 84, 569 (1974).
- 14 D.H.L. Bishop, J.R. Claybrook and S. Spiegelman, J. molec. Biol. 26, 373 (1967).
- 15 F.W. Studier, J. molec. Biol. 79, 237 (1973).
- 16 A.C. Peacock and C.W. Dingman, Biochemistry 6, 1818 (1967).
- 17 U.E. Loening, J. molec. Biol. 38, 355 (1968).
- 18 J. Shine and L. Dalgarno, J. molec. Biol. 75, 57 (1973).
- 19 H. Ishikawa, Comp. Biochem. Physiol. 56B, 229 (1977).

## Biosynthèse in vitro d'octopamine par le système nerveux et le cœur du mollusque gastéropode *Helix pomatia* In vitro biosynthesis of octopamine by the nervous system and the heart of the mollusc gastropode *Helix pomatia*

J. Cardot

Laboratoire de Physiologie animale, Faculté des Sciences et des Techniques, Place Leclerc, F-25030 Besançon Cédex (France), 22 mars 1978

**Summary.** The tyrosine is decarboxylated in vitro by the central nervous tissue and by the intracardiac nervous tissue of *Helix pomatia* by aromatic amino-acid decarboxylase. The tyramine obtained is then partially transformed into octopamine by tyramine- $\beta$ -hydroxylase. The inhibition of monoamine oxidase favours apparition of the 2 amines. The monoamine oxidase seems able to regulate their synthese and to assure their inactivation.

L'octopamine (p-hydroxyphényléthanolamine) a été identifiée pour la première fois dans le produit de sécrétion des glandes salivaires postérieures des céphalopodes octopodes, d'où son nom<sup>1,2</sup>. Chez les mammifères elle est présente dans le système nerveux central et dans le système orthosympathique. Ses rôles physiologiques possibles ont été récemment passés en revue<sup>3</sup>. Chez les invertébrés de nombreux arguments permettent d'envisager avec certitude ses fonctions de neurotransmetteur<sup>3,4</sup>. Chez *Helix* elle existe dans le système nerveux et dans le cœur<sup>5,6</sup>. Notre étude a pour but de démontrer, chez *Helix pomatia*, la formation de tyramine par le système nerveux et son hydroxylation conduisant à l'octopamine grâce à la dopamine- $\beta$ -hydroxylase<sup>7</sup>.

**Méthodes.** Première série d'essais. Des homogénats de tissu nerveux (colliers œsophagiens et nerfs) et de coeurs correspondant à 500 mg d'organes sont incubés pendant 3 h, à 27°C, en tampon phosphate pH=7,2, en présence de 0,1 µmole de DL-3-<sup>14</sup>C-tyrosine d'activité spécifique

que=50 mCi/mM (volume final: 5 ml), selon les modalités suivantes:

Tissu nerveux + tyrosine + PLP (50 µg).

Tissu nerveux + tyrosine + parnate ( $4 \times 10^{-3}$  M) + PLP.

Tissu nerveux + tyrosine + parnate + DL- $\alpha$ -méthylDOPA ( $2,5 \times 10^{-3}$  M) + PLP.

Tissu nerveux + tyrosine + parnate + RO 4-4602 ( $2,5 \times 10^{-3}$  M) + PLP.

Tissu nerveux + tyrosine + parnate + FLA-63 ( $2 \times 10^{-3}$  M) + PLP.

Cœurs + tyrosine + parnate + PLP.

Le PLP (phosphate de pyridoxal) est la coenzyme de la décarboxylase; il est ajouté par routine aux milieux réactionnels. L' $\alpha$ -méthylDOPA et le RO 4-4602 sont des inhibiteurs de la décarboxylase. Le parnate (tranylcypromine) est un IMAO (inhibiteur de la monoamine-oxydase ou MAO) et le FLA-63 est un inhibiteur de la dopamine- $\beta$ -hydroxylase.

Après incubation et addition d'entraineurs froids les amines

Tableau 1. Formation d'amines par des homogénats d'organes incubés pendant 3 h, en présence de 3-<sup>14</sup>C-tyrosine et de divers inhibiteurs enzymatiques

	Système nerveux	Système nerveux IMAO	Système nerveux IMAO méthylDOPA	Système nerveux IMAO RO 4-4602	Système nerveux IMAO FLA-63	Cœurs IMAO
Tyramine	0,50 ± 0,11 n = 4	1,55 ± 0,40 n = 4	0,27 ± 0,06 n = 4	0,23 ± 0,05 n = 4	0,96 ± 0,08 n = 4	0,29 ± 0,07 n = 4
Inhibition			82%	85%		
Octopamine	0,68 ± 0,09 n = 4	2,20 ± 0,57 n = 4	0,20 ± 0,04 n = 4	0,38 ± 0,05 n = 4	0,34 ± 0,05 n = 4	0,64 ± 0,05 n = 4
Inhibition			90%	82%	84%	

Valeurs exprimées en nmoles ± SD; n, nombre d'essais. Les valeurs sont rapportées au gramme de système nerveux ou de cœurs.

sont extraites par l'acide perchlorique 0,4 N et les extraits sont traités par l'alumine pour les débarrasser des catécholamines éventuellement formées. Les amines contenues dans l'effluent de l'alumine sont séparées suivant Boulton et Wu<sup>8</sup>, au moyen de Dowex 50X2. Les éluats de la résine sont déposés sur papier chromatographique suivant une ligne de départ de 10 cm, puis chromatographiés en même temps que des témoins latéraux d'amines. La répartition de la radioactivité sur les chromatogrammes est établie sur une bande longitudinale (2 cm de large) découpée en fragments de 1 × 1 cm et mesurés directement dans l'ESLO (toluène-PPO-POPOP). Les zones correspondant aux amines sont soumises à une élution et les éluats sont désséchés puis repris par 0,5 ml d'eau. Les comptages de radioactivité sont effectués avec le mélange dioxane-naphtalène-PPO-PO-POP.

Deuxième série d'essais. Des colliers nerveux ou des cœurs entiers sont incubés pendant 6 h, à 27°C, dans 4 ml d'hémolymphe, avec 0,1 µmole de tyrosine marquée, pour 500 mg d'organe, avec ou sans parnate ( $4 \times 10^{-3}$  M). Après incubation les organes sont lavés rapidement avec du liquide physiologique et les amines sont séparées comme cela a été décrit précédemment. Les produits d'élution des zones chromatographiques correspondant aux amines sont lyophilisés et soumis à une dansylation<sup>8</sup>. Les dérivés dansylés sont purifiés par 2 chromatographies sur silica gel par des mélanges appropriés<sup>8</sup>. La radioactivité des dérivés dansylés est mesurée dans l'ESLO.

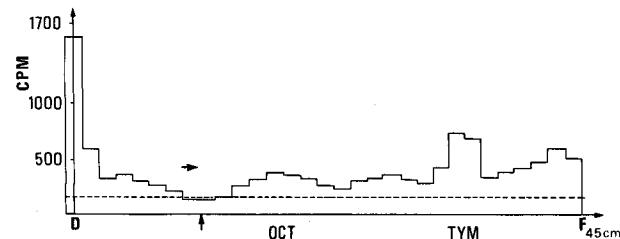
Résultats. La répartition de la radioactivité sur un chromatogramme (figure) montre la présence d'une zone radioactive au niveau de la tyramine et au niveau de l'octopamine. D'autre part les résultats exprimés dans le tableau 1 indiquent que les inhibiteurs de la décarboxylase inhibent l'apparition de la tyramine présumée et, en conséquence, celle de l'octopamine. Le Fla-63 inhibe fortement l'apparition de l'octopamine. Enfin les 2 amines sont synthétisées par les homogénats de cœurs.

Avec des organes entiers nous n'avons pu réaliser que 4 séries d'essais: 2 en mars et 2 en avril, avec des animaux remis en activité début mars. Les résultats diffèrent cependant nettement du point de vue quantitatif: les synthèses sont plus actives en avril (tableau 2). L'octopamine et la tyramine existent dans le cœur et le système nerveux des escargots<sup>4-9</sup>, mais des variations saisonnières métaboliques<sup>4-10</sup> sont certainement la cause de l'absence d'octopamine dans le cœur en novembre<sup>4</sup>. Nos résultats sont en accord avec ce point de vue. Si on considère que le procédé utilisé pour l'analyse des amines n'en permet qu'une récupération partielle<sup>8</sup>, les valeurs que nous donnons sont très inférieures aux valeurs réelles. Elles ne tiennent pas compte, non plus, de la présence de gaines conjonctives entourant les ganglions. Néanmoins l'affinité de la décarboxylase des Mollusques est faible pour la tyrosine<sup>11,12</sup>. En raison de ses variations d'activité en fonction du substrat, l'enzyme d'*Helix* ressemble à celle des mammifères. Pour

Tableau 2. Formation d'amines par des organes entiers incubés pendant 6 h, avec de la 3-<sup>14</sup>C-tyrosine en présence ou non d'un IMAO

		Systèmes nerveux	Systèmes nerveux IMAO	Cœurs	Cœurs IMAO
Tyramine	Mars	0,31	0,55	0,04	0,64
	Avril	0,65	1,20	0,12	2
Octopamine	Mars	0,14	0,27	0,05	0,26
	Avril	0,26	0,38	0,07	0,32

Les valeurs sont exprimées en ng/1 g d'organe. Chaque valeur représente la moyenne de 2 essais.



Répartition de la radioactivité sur un cinquième de chromatogramme. Incubation d'un homogénat de tissu nerveux (500 mg), sans IMAO, avec 0,1 µmole de DL-3-<sup>14</sup>C-tyrosine, pendant 6 h. Chromatographie descendante, papier Whatman n° 4, alcool amylique tertiaire-ammoniaque à 28% (4:1, v/v). La flèche verticale indique une zone retenue comme indiquant la valeur de fond de la radioactivité (trait discontinu). Mesuré après élution, la radioactivité de cette zone a permis de calculer la valeur de fond et d'en tenir compte dans les mesures concernant les régions de la tyramine et de l'octopamine.

le cœur, les valeurs trouvées doivent être rapportées au tissu nerveux intracardiaque et sont à mettre en relation avec l'accumulation des enzymes de synthèse dans les terminaisons nerveuses<sup>13</sup>. La tyrosine, présente dans le tissu nerveux, le cœur et l'hémolymphe des escargots<sup>14-16</sup>, est le précurseur immédiat de la tyramine. Si, chez *Helix*<sup>17</sup>, la décarboxylase des acides aminés est plus sélectivement localisée dans certains neurones que chez *Aplysia*, par contre, on ne connaît pas les localisations de la tyramine-β-hydroxylase, chez *Helix*. On peut envisager plusieurs possibilités: - la tyramine-β-hydroxylase (dopamine-β-hydroxylase) est répartie dans tous les neurones catécholaminergiques; - ou bien elle est localisée dans certains neurones noradrénergiques; - ou bien il existe des neurones spécialisés dans la synthèse de l'octopamine et ne possédant pas de tyrosine-hydroxylase. Ils ne seraient donc pas catécholaminergiques. Ils posséderaient la décarboxylase des acides aminés et la tyramine-β-hydroxylase. C'est le cas pour certains neurones d'*Aplysia*<sup>18</sup>.

Cependant la noradrénaline n'a pu être localisée par la méthode histochimique chez *Helix*<sup>20</sup>, et le contenu en noradrénaline et en octopamine est pratiquement le même pour les différents ganglions<sup>6</sup>. Ces observations sont en faveur de la première possibilité.

Nos résultats montrent que les taux d'amines sont augmentés en présence d'un IMAO. Or la tyramine est un excellent substrat pour la MAO d'*Helix*<sup>21</sup>. Par contre, l'octopamine est un mauvais substrat. L'identification des acides correspondant à ces 2 amines a été réalisée, mais sera exposée ultérieurement. Il apparaît donc que, malgré sa faible représentation dans le système nerveux et le cœur, la MAO peut intervenir soit en régulant la synthèse des amines, soit en les inactivant au cours des phénomènes de libération.

- 1 V. Erspamer et G. Boretti, Archs. int. Pharmacodyn. 87, 296 (1951).
- 2 V. Erspamer, Nature 169, 375 (1952).
- 3 T.P. Hicks, Can. J. Physiol. Pharmac. 55, 137 (1977).
- 4 H.A. Robertson et A.V. Juorio, Int. Rev. Neurobiol. 19, 173 (1976).
- 5 R.J. Walker, A.G. Ramage et G.N. Woodruff, Experientia 28, 1173 (1972).

- 6 P.B. Guthrie, V. Neuhoff et N.N. Osborne, Comp. Biochem. Physiol. 52C, 109 (1973).
- 7 J. Cardot, C.r. Acad. Sci. Paris 277, 1529 (1973).
- 8 A.A. Boulton et P.H. Wu, Can. J. Biochem. 50, 261 (1972).
- 9 H. Dolezalova, E. Giacobini et M. Steptita-Klaucova, Int. J. Neurosci. 5, 53 (1973).
- 10 J. Cardot, C.r. Soc. Biol., Paris 165, 338 (1971).
- 11 J. Cardot, C.r. Acad. Sci. Paris 259, 902 (1964).
- 12 D. Weinreich, S.A. Dewhurst et R.E. McCaman, J. Neurochem. 19, 1125 (1972).
- 13 J. Cardot, Thèse Doctorat Sci. Nat., no 116, Besançon (France) 1977.
- 14 A. Jullien, J. Cardot et J. Ripplinger, C.r. Soc. Biol. Paris 155, 819 (1961).
- 15 J. Cardot et J. Ripplinger, C.r. Soc. Biol. Paris 155, 1961 (1961).
- 16 N.N. Osborne, Comp. gen. Pharmac. 3, 171 (1972).
- 17 P.C. Emson et F. Fonnum, J. Neurochem. 22, 1079 (1974).
- 18 M. Eisenstadt, J.E. Goldman, E.R. Mandel, H. Koike, J. Koester et J.H. Schwartz, Proc. natl Acad. Sci., USA 70, 3371 (1973).
- 19 J.M. Saavedra, M.J. Brownstein, D.O. Carpenter et J. Axelrod, Science 185, 364 (1974).
- 20 F. Bardessono, E. Giacobini et M. Steptita-Klaucova, Brain Res. 47, 427 (1972).
- 21 J. Cardot, C.r. Soc. Biol. Paris 160, 1264 (1974).

## The density and chemical composition of fish muscle<sup>1</sup>

K. Dabrowski<sup>2</sup>

*Limnology Laboratory, New University of Ulster, Traad Point, Drumenagh, Magherafelt, Co. Derry (N. Ireland), 30 January 1978*

**Summary.** The relationship between the density of muscle from *Coregonus pollan* Thompson and its chemical composition has a parabolic nature which makes prediction of fat or dry matter content from density impossible.

The correlation between body density and chemical composition for higher vertebrates<sup>3</sup> is well known. It seemed both scientifically valuable<sup>4</sup> and possibly of considerable practical use to explore any similar relationships for fish muscle and fish body. Recent reports<sup>5-8</sup> have emphasized a strong correlation among compounds such as fat, water, ash and sometimes even protein for many fish species, both for

whole fish and for fish muscle. It was logical to extend this approach to see if there is any mathematical valuable relation between density and any one of these compounds.

**Materials and methods.** The study was carried out on 120 pollan (*Coregonus pollan* Thompson) from Lough Neagh, N. Ireland, caught from January to August 1977. They were adult fish, 2-5 years old, 100-250 g individual weight.

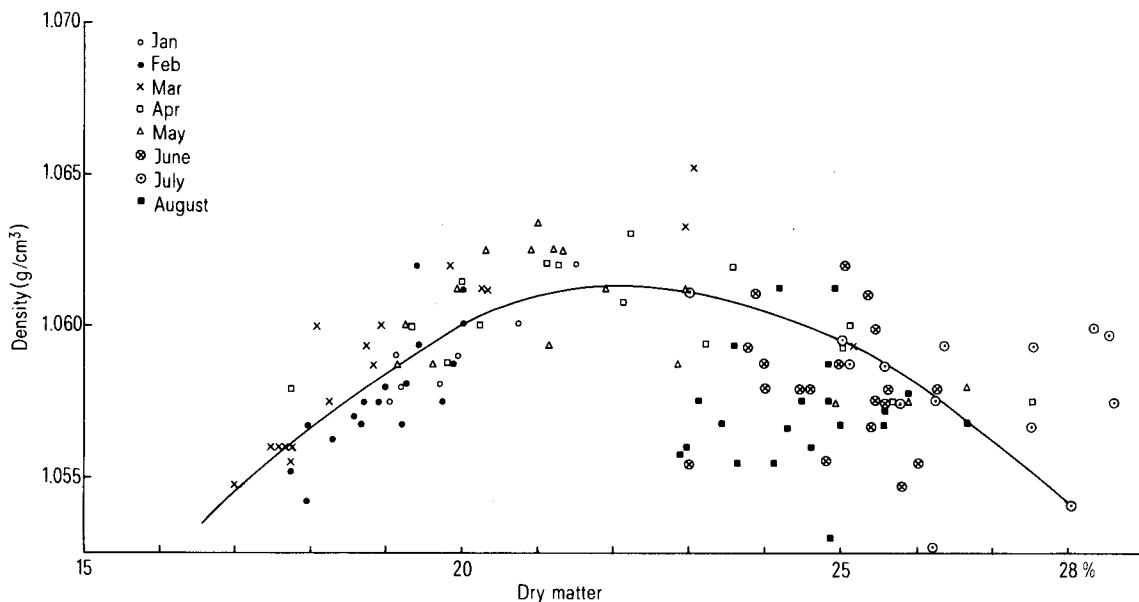


Fig. 1. The changes in dry matter content in pollan muscle in relation to their density.