

and the deposited material was air-dried, after which its weight could easily be determined. The filter disc with the cells on it was subsequently submerged in the incubation medium for measurement of enzymic activity. Dipeptidase activity was determined by the method of HOLTER and LINDERSTRÖM-LANG³ as applied by SYLVÉN and MALMGREN⁴.

Table I shows the dipeptidase activity of material aspirated from 3 cases of mammary carcinoma and from 3 cases of mammary fibroadenoma. Measurable dipeptidase activity in the washed cells was of the same order of magnitude in carcinoma as in fibroadenoma. In both groups the dipeptidase activity in the extracellular fluid was much higher than that in the washed cells. Very recently SYLVÉN and BOIS⁵ reported high dipeptidase activity in cell-free interstitial fluid from unicentric tumor transplants. On a per volume basis this fluid was up to 100 times more active than other body fluids (peritoneal, etc.).

In Table II the dipeptidase activity in extracellular fluid aspirated from 3 cases of mammary fibroadenoma, 3 of mammary carcinoma and 3 of lymphatic metastases of

Tab. I. Dipeptidase activity in cells and in extracellular fluid expressed on D.W. basis.

	Cases: No. 1	No. 2	No. 3
Mammary fibroadenoma:			
Cells	5.0	1.1	2.2
Extracellular fluid	17.0	19.0	8.0
Mammary carcinoma:			
Cells	2.6	0.4	4.9
Extracellular fluid	11.0	24.0	37.0

Dipeptidase activity is expressed in μl 0.1 M NaOH solution per 100 μg air dried material. Substrate 0.1 M alanylglycine. The incubation time 1 h at 37° (pH 7.8).

Tab. II. Dipeptidase activity in body fluids expressed on volume basis

	Cases: No. 1	No. 2	No. 3
Extracellular fluid from:			
Mammary fibroadenoma	10.8	7.4	14.8
Mammary carcinoma	18.8	11.2	21.8
Carcinomatous lymph nodes	18.8	19.9	17.4
Serum	0.40	0.22	0.24
Mammary cyst fluid	0.23	0.42	0.36
Lymphedema fluid	<0.05	<0.05	<0.05

Dipeptidase activity is expressed in μl M NaOH per 1 h per μl body fluid. Substrate 0.1 M alanylglycine. The incubation time 1 h at 37° (pH 7.8).

mammary carcinoma and expressed on volume basis may be compared with the activity in serum, in cystic fluid from 3 cases of mastopathia cystica, and in fluid from lymphoedema of the arm following radical mastectomy (3 cases). It is seen that extracellular fluid from benign and malignant mammary tumors contained about 50 times more dipeptidase activity than did serum, cyst or oedema fluid.

These observations do not indicate the origin of the dipeptidase activity found in the extracellular fluid of primary and metastatic mammary tumors (Table II). Histochemical studies have shown high aminopeptidase activity in the stromal elements⁶⁻⁸ as a reaction to tumor growth⁹. It is possible that the high dipeptidase activity in extracellular fluid of mammary tumors is due to release of the enzymes from the tumor cells as well as from the cells of the stroma compartment to the surrounding medium, after which the enzymes, together with the extracellular fluid and with cancer cells, may be conveyed through lymphatic channels into regional lymph glands. There is some evidence that the successful growth of neoplastic cells can in part be explained by superior ability of such cells to capture from the environment, and to concentrate intracellularly, the free amino-acids necessary for protein synthesis⁹. High concentration of proteolytic enzymes, including dipeptidases, in the extracellular fluid and possibly also in the lymphatic channels, presumably constitutes a factor enhancing the neoplastic growth.

A more detailed account of the method we have used will be published later, together with a discussion of the results hitherto obtained.

Zusammenfassung: Es wird eine Punktionsmethode zur quantitativen Bestimmung der Enzymaktivität in Zellen und interstitzieller Flüssigkeit menschlicher Tumoren beschrieben. Die in den Zellen und der interstitziellen Flüssigkeit von Mammacarcinomen und -fibroadenomen gemessene Dipeptidaseaktivität wurde mit derjenigen verschiedener Körperflüssigkeiten verglichen.

M. VOZELJ and J. ZAJICEK

Department of Cytology, Institute of Radiopathology, Radiumhemmet, Stockholm (Sweden), August 28, 1961.

³ K. LINDERSTRÖM-LANG and H. HOLTER, Z. physiol. Chem. 204, 15 (1932).

⁴ B. SYLVÉN and H. MALMGREN, Acta radiol., Suppl. 154 (1957).

⁵ B. SYLVÉN and I. BOIS, Cancer Res. 20, 831 (1960).

⁶ R. HESS, Cancer Res. 20, 940 (1960).

⁷ G. GLENNER, M. BURSTONE, and D. MEYER, J. Nat. Cancer Inst. 23, 857 (1959).

⁸ N. K. MOTTE, Amer. J. Path. 39, 17 (1961).

⁹ G. WISEMAN and F. GHADIALLY, Brit. Med. J. 2, 18 (1958).

Tryptophan im aktiven Zentrum von Trypsin und Chymotrypsin

Eine Reihe von Hydrolasen wird durch Diisopropylfluorophosphat (DFP) blockiert. Nach salzsaurer Hydrolyse ist der DIP-Rest an ein Seryl gebunden, das in einer Aminosäuresequenz liegt, die für neun Esterasen in verschiedener Ausdehnung identisch ist. OOSTERBAAN et al.¹ ziehen eine enzymatische Spaltung der Säurehydrolyse vor, da sie weniger Gefahren von Transaminierungen bzw. Transacylierungen bietet, fanden aber den Phosphor

am gleichen Serin. Allen auf diesem Gebiete bisher eingesetzten Analysenmethoden ist jedoch gemeinsam, dass sie zum Verlust des Tryptophans führen. HARTLEY gab nun in Moskau² einen grossen Teil der Aminosäuresequenz des Chymotrypsins bekannt, der zwar kein Histidin, wohl aber zwei der sieben Tryptophane enthält,

¹ R. A. OOSTERBAAN et al., Biochim. biophys. Acta 27, 549 (1958), und V. Int. Congr. Biochem. Moskau 4, 130 (1961).

² B. S. HARTLEY, V. Internationaler Kongress für Biochemie in Moskau, August (1961).

wovon eines durch nur 21 Peptidbindungen vom «aktiven» Serin getrennt ist. SCHAFER³ fand während der Einwirkung von DFP auf Chymotrypsin eine Sofortreaktion mit Tryptophan, der eine sehr langsame mit Tyrosin folgte, die auch bei nicht-enzymatischen Proteinen auftritt. Dadurch wurde Histidin als erste Hälfte des aktiven Zentrums sehr unwahrscheinlich, zumal dessen Stellung bereits durch die Befunde von STEIN et al.⁴, BRUCE und SCHMIR⁵, ERLANGER⁶ und ANFENSEN² stark erschüttert war.

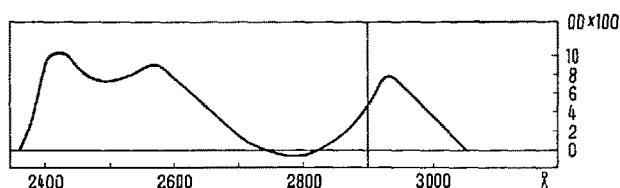


Fig. 1. Differenzspektrum des DIP-Derivates von Chymotrypsin, gegen unbehandeltes Chymotrypsin (33×10^{-6} molar in 8-molarer Harnstofflösung, pH 3,5).

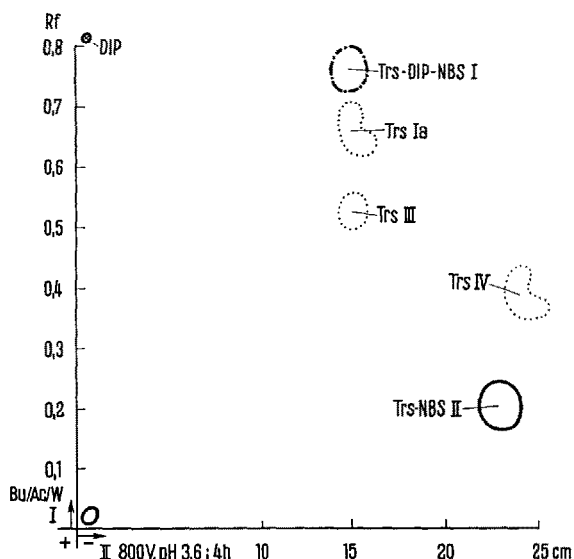


Fig. 2. Elektrochromatogramm von Trypsin: I mit, Ia ohne DIP-Vorbehandlung, I und II ergeben beim DIP-Derivat ausserdem Reaktion auf Phosphor. Ia, III und IV fehlen nach partieller Oxydation des Trypsins mit NBS (Anfärbung mit *p*-Dimethylaminozimtaldehyd).

Wir⁷ fanden unter Benutzung des Difference-Spectrophotometers nach CARY an Trypsin und Chymotrypsin nach DFP-Hemmung lediglich eine Verstärkung des für Tryptophan typischen 2. Absorptionsmaximums bei 2910 Å (Figur 1), das nach Inkubation in 8M Harnstoff oder 4M Guanidin noch deutlicher hervortrat und auch nach peptischer Hydrolyse nicht verschwand. Die Oxydation von zwei Tryptophanresten mit N-Bromosuccinimid (NBS) nach PATCHORNIK⁸ ergab, dass (1) die spektrale Abweichung erhalten bleibt und (2) nach peptischem Abbau aus dem «Fingerprint» (Elektro-Chromatogramm) hervorgeht, dass NBS beim DIP-Enzym das gleiche Tryptophanylpeptid verschont, das sich um einen kleinen Betrag im Rf-Wert vom korrespondierenden Peptid des nativen Peptides unterscheidet (Figur 2). Die Tryptophanylpeptide wurden auf dem Papier durch Besprühen mit *p*-Dimethylaminozimtaldehyd spezifisch nachgewiesen, mit verdünnter Essigsäure eluiert und auf Phosphor nach FISKE und SUWAROFF geprüft. Ausser in dem durch den Rf-Wert charakterisierten Peptid fand sich eine Spur Phosphat auch bei einem zweiten Tryptophanylpeptid. Phosphatnachweis auf dem ganzen Papier verlief für alle übrigen Peptide negativ. Nach salzsaurer Hydrolyse und unter Berücksichtigung des positiven Try-Nachweises ergab sich folgende Aminosäurezusammensetzung in stöchiometrischem Verhältnis: Try, Leu, Val, Ser.

Summary. Acid hydrolysis of trypsin and chymotrypsin inhibited by DIP yields seryl-phosphate within a sequence representing one part of the 'active center'. Now it is demonstrated by UV-spectrophotometry that DIP is bound primarily to tryptophane and remains there after peptic degradation. A tetrapeptide containing both tryptophane and phosphate was isolated and analyzed.

K. SIMON

Köln-Riehl (Deutschland), Am botanischen Garten 54, 11. Dezember 1961.

- ³ N. K. SCHAFER et al., *J. biol. Chem.* **214**, 799 (1955).
- ⁴ W. H. STEIN et al., *J. biol. Chem.* **234**, 1754 (1959), und V. Int. Congr. Biochem. Moskau **4**, 76 (1961).
- ⁵ T. C. BRUCE und G. L. SCHMIR, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 4552 (1959).
- ⁶ B. F. ERLANGER, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **46**, 1430 (1960).
- ⁷ Die beschriebenen Versuche des Verfassers wurden an der Cornell-University, Ithaca (N.Y. USA) durchgeführt und durch ein Stipendium unter US Navy Research Fund, University Acct. Nr. 7260, ermöglicht.
- ⁸ K. W. B. PATCHORNIK et al., *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 4747 (1958).

Anomalous Uptake of Bromsulphthalein by Incubated Liver Slices

Although the hepatic removal of bromsulphthalein (BSP) from the plasma is used clinically as a measure of liver function, the physiological mechanisms involved in this transfer are little understood. Investigation of the isolated uptake phase has been made using incubated liver slices and the results obtained lead BRAUER and PESSOTTI¹ to suggest that in this type of preparation the uptake mechanism was related to binding by intracellular protein. However the measured uptake of about 70% from dilute BSP solutions found with all tissue/solution ratios greater than 5% did not seem in agreement with

this conclusion, since it might be expected that tissue/solution ratio would cease to play a significant part only when uptake was close to either 0 or 100%. The experiments described here were carried out to investigate this apparent anomaly, using cat liver slices.

Provided uptake follows a simple adsorption isotherm, it can be shown² that at low BSP concentrations the ratio Bound BSP/Total BSP (designated β) is only dependent on the dissociation constant and the concentration of receptor sites, since

- ¹ R. W. BRAUER und R. L. PESSOTTI, *J. Pharmacol.* **97**, 358 (1949).
- ² A. GOLDSTEIN, *Pharmacol. Rev.* **1**, 102 (1949).