

Fig. 1. Electron micrograph of rat tail tendon collagen (RTTC) from the experimental animal treated with gold sodium thiosulfate (Sanocrysin) *in vivo*.

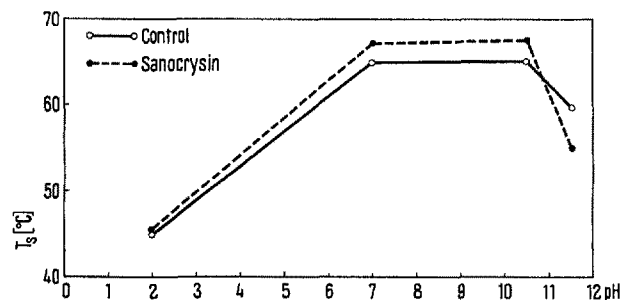


Fig. 2. Temperature of shrinkage of RTTC after 4 weeks of treatment with gold sodium thiosulfate.

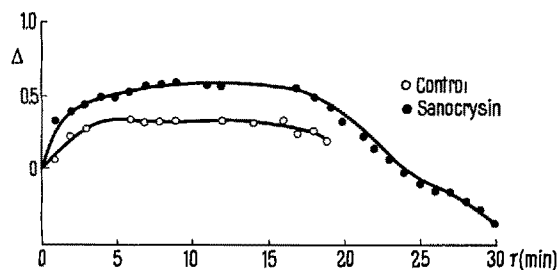


Fig. 3. Contraction-relaxation of the same specimen.

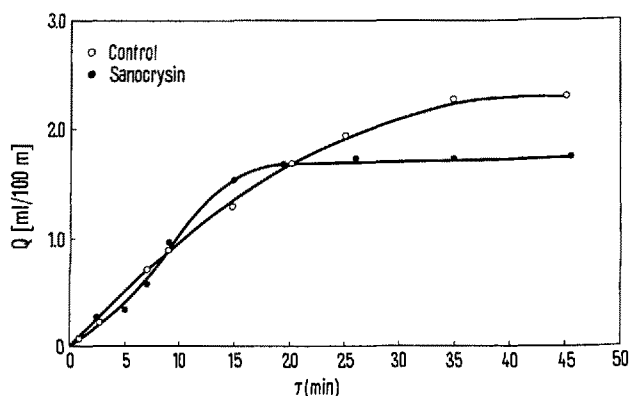


Fig. 4. Swelling of RTTC after 4 weeks of treatment.

tanning of collagen with some heavy metals (Zr, Cr) *in vitro*.

From the biological point of view, most interesting seems to be the fact that gold reacts with collagen *in vivo* when compounds of gold are administered to the experimental animal. The application of gold results in an increase of the number of cross linkages leading to higher structural stability or, according to the biological terminology, to a specific type of the ageing of collagenous structures. It may be assumed that an increased structural stability and decreased swelling ability favourably influence the course of some inflammatory processes of connective tissue.

Zusammenfassung. Männliche Ratten wurden wöchentlich mit Natriumaurothiosulfat «Sanocrysin» 2 mg/100 g Körpergewicht i.m. behandelt. Es wird eine elektronenmikroskopische «Anfärbung» und erhöhte hydrothermale Stabilität des Rattenschwanzkollagens beschrieben, was zur Erklärung der Wirkungsweise der Goldbehandlung bei Polyarthritiden beitragen könnte.

M. ADAM, P. BARTL,
Z. DEYL and J. ROSMUS

Research Institute for Rheumatic Diseases, Prague,
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry,
Czechoslovak Academy of Sciences, Prague and
Central Research Institute of Food Industry, Prague
(Czechoslovakia), December 5, 1963.

Sur l'identification des résidus C-terminaux d'une protéine après hydrazinolyse

En voulant aborder l'étude des résidus C-terminaux de l'hirudine¹ au moyen d'une hydrazinolyse², nous nous sommes aperçus que les méthodes existantes ne permettaient pas d'identifier certains résidus susceptibles de se trouver en position C-terminale. Si, en effet, le traitement par des aldéhydes²⁻⁴ permet de séparer les hydrazides des acides aminés C-terminaux libérés par hydrazinolyse, les résidus de glutamine et d'asparagine qui se trouvent en position C-terminale échappent à ce procédé. Il se produit, à partir de ces deux derniers acides aminés, des hydrazides qui réagissent également avec les groupes carbonyles.

La dinitrophénylation du mélange réactionnel, obtenu après une hydrazinolyse⁵, ne résout pas plus ce problème. Cette méthode permet certes de récupérer les dérivés correspondant aux résidus C-terminaux d'asparagine et de glutamine, mais ils sont accompagnés le plus souvent

¹ P. DE LA LLOSA, C. TERTRIN et M. JUTISZ, sous presse.

² S. AKABORI, K. OHNO et K. NARITA, Bull. chem. Soc. Japan 25, 214 (1952).

³ C. I. NIU et H. FRAENKEL-CONRAT, J. Amer. chem. Soc. 77, 5882 (1955).

⁴ T. KAUFFMANN et F. P. BOETTCHER, Liebigs Ann. 625, 123 (1959).

⁵ G. BRAUNITZER, Chem. Ber. 88, 2025 (1955).

de ceux correspondant aux acides aspartique et glutamique intramoléculaires. La séparation de tous ces isomères pose des problèmes qui n'ont pas encore été résolus.

Nous avons recherché un procédé général permettant d'identifier, après une hydrazinolyse, tous les produits correspondant aux résidus C-terminaux d'une protéine, y compris ceux d'asparagine et de glutamine. Le mélange réactionnel (1 à 10 mg de protéine) est chromatographié sur une colonne d'Amberlite IRC-50 forme H⁺ suivant le procédé de LAY et POLGLASE⁶. En lavant la colonne à l'eau (environ 50 ml), on récupère les acides aminés libres acides et neutres. Nous avons constaté que les hydrazides, provenant des résidus C-terminaux d'asparagine et de glutamine (asparthydrazide-4 et glutamhydrazide-5), étaient également élués dans ces conditions. Par contre, l'asparthydrazide-1 et le glutamhydrazide-1 restent sur la colonne. Le lavage par une solution d'acétate d'ammonium 0,1M, pH 7 (15 ml) permet d'éluer les acides aminés basiques. L'asparthydrazide-1 et le glutamhydrazide-1, s'ils sont présents dans le milieu, sont également élués par l'acétate d'ammonium, mais ils ne gênent pas pour l'identification des acides aminés basiques par chromatographie sur papier (voir ci-dessous).

La résine peut être régénérée par lavage à la soude 0,2N, à l'eau et à l'acide chlorhydrique 0,2N.

Pour identifier les aminoacides et les hydrazides provenant de l'extrémité C-terminale d'une protéine nous avons utilisé la chromatographie soit sur papier, soit en couche mince. Sur papier, deux systèmes de solvants peuvent être employés avantageusement, l'un dû à MIZELL et SIMPSON⁷ et l'autre à AMBE et TAPPEL⁸. Le premier consiste en un mélange de *n*-butanol-acide acétique-eau (25:6:25 v/v) pour la première direction (l'asparthydrazide-4 et le glutamhydrazide-5 migrent entre l'histidine et la sérine), et en *n*-butanol-méthyléthylcétone (MEC)-eau (2:2:1 v/v), en présence de vapeurs de cyclohexylamine, pour la seconde direction (les Rf des hydrazides en question sont légèrement inférieurs à celui de la valine). Un résultat sensiblement analogue est obtenu dans le deuxième système⁸. Révélés à la ninhydrine, l'asparthydrazide-4 donne une tache rose brun, et le glutamhydrazide-5, une tache pourpre.

En chromatographie en couche mince de cellulose⁹, un bon résultat est obtenu en utilisant le système¹⁰ MEC-pyridine-acide acétique-eau (70:15:2:15 v/v) pour la première direction (Rf: Val 0,27, Glu (NH-NH₂)-5 0,24, Asp (NH-NH₂)-4 0,20, Pro 0,16) et le solvant méthanol-eau-pyridine (80:20:4 v/v) pour la seconde direction (Rf: Gly 0,39, Glu (NH-NH₂)-5 0,24, Asp (NH-NH₂)-4 0,18).

Afin d'éprouver l'efficacité de la méthode décrite, nous l'avons appliquée successivement à l'insuline de boeuf cristallisée (Insuline Organon à 24,6 U/mg)¹¹, au lyso-

zyme (Armour, 3 fois cristallisé) et aux peptides provenant de l'hydrolyse trypsique de l'insuline. Dans ce dernier cas, connaissant la spécificité de cet enzyme, nous espérons trouver, après une hydrazinolyse, à côté des acides aminés C-terminaux de l'insuline, les résidus d'arginine (dégradée en ornithine) et de lysine.

Dans l'hydrazinolysat de l'insuline, nous avons identifié, conformément aux prévisions¹²⁻¹⁴, l'alanine, l'asparthydrazide-4 et l'acide aspartique. Ce dernier provient, ainsi que nous l'avons constaté, de la décomposition partielle de l'asparthydrazide-4 en solution. Cette décomposition en solution atteint également, mais à un degré moindre, le glutamhydrazide-5.

Dans le cas du lysozyme, un seul acide aminé libre a été identifié, la leucine (voir ^{14,15}).

L'hydrazinolyse du protéolysat de l'insuline (la trypsine exempte de MgSO₄ a été utilisée afin d'éviter la présence de sel dans le milieu) a donné naissance d'une part à l'alanine, à l'asparthydrazide-4 et à l'acide aspartique, identifiés dans l'éluat à l'eau de la colonne d'Amberlite, et d'autre part à la lysine et un peu d'ornithine, mises en évidence dans l'éluat à l'acétate d'ammonium 0,1M.

Summary. Description of a general procedure for identification of C-terminal residues liberated by protein hydrazinolysis. All free amino acids (C-terminal), and the hydrazides corresponding to the C-terminal residues of asparagine and glutamine, can be identified by chromatography of a hydrazinolysate on a column of Amberlite IRC-50 followed by paper or thin layer chromatography.

P. DE LA LLOSA,
COLETTE TERTRIN et MARIAN JUTISZ

Laboratoire de Morphologie Expérimentale et Endocrinologie, Collège de France, Paris (France), le 6 décembre 1963.

⁶ W. P. LAY et W. J. POLGLASE, Can. J. Biochem.-Physiol. **35**, 39 (1957).

⁷ M. MIZELL et S. B. SIMPSON JR, J. Chromatogr. **5**, 157 (1961).

⁸ K. S. AMBE et A. L. TAPPEL, J. Chromatogr. **5**, 546 (1961).

⁹ P. WOLLENWEBER, J. Chromatogr. **9**, 369 (1962).

¹⁰ M. JUTISZ et P. DE LA LLOSA, Bull. Soc. chim. France **1963**, 2913.

¹¹ Nous remercions le Dr. J. LENS, directeur de N.V. Organon, de nous avoir fourni gracieusement l'insuline cristallisée.

¹² J. LENS, Biochim. biophys. Acta **3**, 367 (1949).

¹³ F. SANGER et E. O. P. THOMPSON, Biochem. J. **52**, iii (1952).

¹⁴ J. I. HARRIS, J. Amer. chem. Soc. **74**, 2944 (1952).

¹⁵ A. R. THOMPSON, Nature **169**, 495 (1952).

Histidine Decarboxylase in the Bone Marrow of the Rat

From the investigations of KAHLSON et al., it has appeared that some growing tissues - notably the foetal rat liver - have a high histidine decarboxylase activity¹⁻⁴. The time course of the activity of this enzyme in the foetal liver coincides approximately with that of the hepatosplenic hematopoiesis⁵. The possibility of a connection between hematopoiesis and the formation of histamine was

further supported by the observation that the bone marrow of the adult rat contains high histidine decarboxylase activity⁶.

Histidine decarboxylase in the foetal rat has been found to be of a different kind compared to the histamine-forming enzyme present in the kidney cortex of the rabbit and the guinea-pig^{7,8}. While the foetal enzyme seems fairly specific, the kidney enzyme is non-specific, capable of decarboxylating all aromatic amino acids^{9,10}. Some data on the properties of the foetal enzyme have been given elsewhere¹¹.