

Fig. 1. Rat killed 24 h after the injection of 50 mg/kg DCVC. Renal inner cortex: tubules are dilated and lined by thin epithelium. Cellular and nuclear debris in the lumen. H. & E. $\times 70$.

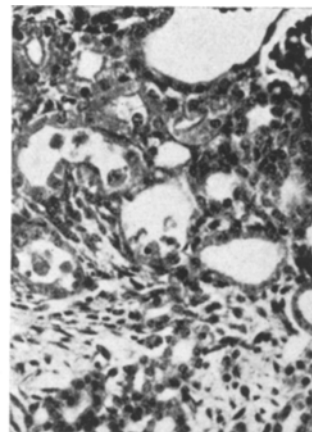


Fig. 2. Rat killed 24 h after the injection of 100 mg/kg DCVC. Border-line between inner cortex and medulla. Dilatation of cortical tubules showing no brush border and containing pycnotic cells. PAS $\times 130$.

In another experiment, 16 new-born rats from 2 litters were injected with 5 mg of DL-serine (Merck, Darmstadt) as a 5% solution in distilled water (approximately 1000 mg/kg). They were killed in groups of 5 or 6 after 1, 2, or 3 days. As expected from the findings of WACHSTEIN and ROBINSON⁵, none of these animals showed tubular changes. Also the other organs were normal. Two adult rats given the same dose per kg of DL-serine and killed 48 h later showed extensive tubular necrosis in the renal inner cortex.

The present experiments demonstrate that lethal and effective doses of DCVC are similar for new-born and mature rats and that tubular damage can be induced with this compound in the first day of life. It is obvious that the action of DCVC, the mechanism of which probably involves inhibition of mitochondrial enzymes related to respiration⁷, is not modified in spite of the biochemical and morphological immaturity of the tubular cells in the new-born rat. This finding is comparable to the previous observation that dimethylnitrosamine, which does not produce tubular damage but evokes tumour formation in the kidneys, exerts this effect in new-born at least to the same extent as in adult rats⁸.

In the case of DL-serine, a lack of nephrotoxicity in new-born rats was observed previously⁸ and is confirmed in the present work. The difference between DL-serine and DCVC recalls the observation that the development

of susceptibility to liver poisons corresponds to changes specific for each hepatotoxic agent¹. However, whether the lack of nephrotoxicity of DL-serine in new-born rats is related to renal metabolism or to absorption, distribution and excretion remains to be ascertained⁹.

Riassunto. Dei due composti DL-serina e S-diclorovinil-L-cisteina – che producono necrosi tubulare renale in ratti maturi – solo il secondo ha manifestato il medesimo effetto in ratti neonati. La differenza suggerisce che diversi gradi di maturità sono richiesti per consentire a ciascun composto di produrre danno tubulare.

B. TERRACINI and G. PALESTRO

*Istituto di Anatomia e Istologia Patologica
dell'Università, Torino (Italy),
December 6, 1965.*

⁷ V. H. PARKER, *Fd. Cosmet. Toxicol.* 3, 75 (1965).

⁸ B. TERRACINI and P. N. MAGEE, *Nature* 202, 502 (1964).

⁹ This work was supported by a grant from the Consiglio Nazionale delle Ricerche, Rome. We are grateful to Mr. V. H. PARKER, Toxicology Research Unit, Medical Research Council, Carshalton, Surrey, England, for the generous gift of DCVC. (For synthesis of DCVC see ref. 7.) We thank Miss CLARA BASSI for technical help. Microphotographs were taken by G. F. GARLANDA.

Über die farbgebende Gruppe von Crenilabrus-Blau¹

Männliche Exemplare des Mittelmeerfisches *Crenilabrus pavo* C.V. besitzen besonders in der Brunstzeit eine auffallend bunte Färbung: Der Rumpf ist gelb mit roter Zeichnung; Kopf, Rücken und Flossen sind grünlichblau bis dunkelblau. Die blaue Farbe ist in der Hauptsache durch das Vorhandensein eines Farbstoffes (Crenilabrus-Blau) bedingt, doch dürfte auch die Struktur der Haut

zur Intensität der Farbe beitragen. Während die gelben und roten Farbstoffe als Carotinoide (Astaxanthin- und Taraxanthinester) hinlänglich charakterisiert sind², ist die chemische Struktur der blauen Komponente bisher unbekannt.

¹ Herrn Professor Dr. RICHARD KUHN zum 65. Geburtstag gewidmet.

² L. ABOLINŠ and A. ABOLINŠ-KROGIS, *Pubbl. Staz. zool. Napoli* 29, 389 (1957).

Vergleich der Absorptionsmaxima

	Farbgebende Gruppe aus Crenilabrus-Blau			Biliverdin ⁸		
	λ_{\max_1} (nm)	λ_{\max_2} (nm)	E ₁ /E ₂	λ_{\max_1} (nm)	λ_{\max_2} (nm)	E ₁ /E ₂
Methanol	377	650	3,23	375–380	640–650	3,13
Chloroform	380	645	3,16	378–380	640–650	3,12
Methanol/5% HCl	376	675	2,00	377,5	665–680	2,05
Äthanol/ZnCl ₂	375–380	700	2,20	385	695	1,91

VON ZEYNEK³ stellte als erster fest, dass der blaue Farbstoff aus den Flossen ein Chromoprotein ist. Auf Grund seiner Untersuchungen wurde die Vermutung geäußert⁴, dass die prosthetische Gruppe ein Carotinoid sei. LEMBERG⁵ und später FONTAINE⁶ hielten demgegenüber das Crenilabrus-Blau für nahe verwandt mit Phycocyanin, einem Chromoprotein von Rot- und Blaualgen. Im folgenden berichten wir über die Abspaltung der farbgebenden Gruppe von Crenilabrus-Blau und deren Charakterisierung.

Als Ausgangsmaterial dient das aus den Flossen von *Crenilabrus pavo* durch Extraktion mit Wasser und fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat isolierbare Chromoprotein⁷. Seine wässrigen Lösungen zeigen in allen Fraktionen Absorptionsbänder bei 277–280, 379–381 und 639–644 nm. Durch Harnstoff, Methanol oder Aceton lässt sich die prosthetische Gruppe nicht vom Protein abspalten. Auch Hydrolyse mittels Salzsäure führt, selbst unter vielfach abgewandelten Bedingungen, zu keinem in Chloroform löslichen Farbstoff. Erst nach 5 min Hydrolyse des reinen Chromoproteids (5,5 mg in 5 ml Wasser; $E_{640}^{1\text{cm}} = 0,470$ bzw. $E_{380}^{1\text{cm}} = 1,050$) mit siedendem Methanol. KOH (5%, 10 ml) ist der proteinfreie Farbstoff aus der wässrigen Lösung mit Chloroform extrahierbar. Diese optimale Hydrolysedauer ist unbedingt einzuhalten, da der Farbstoff durch längere Alkalieinwirkung zunehmend zerstört wird. Der mit Eisessig (4 ml) versetzten Lösung wird die abgespaltene farbgebende Gruppe mit Chloroform (insgesamt 20 ml) entzogen.

Der erhaltene blaugrüne Farbstoff zeigt eine positive Gmelin-Reaktion. Sein Spektrum gleicht demjenigen von Biliverdin (Tabelle). Zur weiteren Charakterisierung eignet sich die Dünnschichtchromatographie des mittels Methanol Salzsäure erhaltenen Dimethylesters. Dieser verhält sich in dem für die Trennung der Dimethylester von Gallenfarbstoffen geeigneten Fließmittel (Benzol-Benzin-Methanol = 9:5:1)⁸ einheitlich. Er wandert wie Biliverdindimethylester ($R_f = 0,22$, Mischchromatogramm) und trennt sich von allen anderen geprüften Gallenfarbstoffen, auch von Mesobiliverdindimethylester ($R_f = 0,19$) ab. Es besteht danach kein Zweifel, dass die aus dem Crenilabrus-Blau alkalisch abspaltbare, farbgebende Gruppe *Biliverdin* ist.

Der Biliverdin-Gehalt ergibt sich, unter der Annahme vollständiger Abspaltung, aus der spezifischen Extinktion des reinen, gefriergetrockneten Chromoproteids zu 1,6%, wobei die von GRAY⁸ angegebenen molaren Extinktionskoeffizienten für Biliverdin zugrundegelegt sind. Da 1 Mol Crenilabrus-Blau mindestens 1 Mol Biliverdin enthalten muss, errechnet sich aus dem Biliverdin-Gehalt ein Mindestmolekulargewicht von $37\,000 \pm 2400$ für das Chromoprotein. Es liegt nahe anzunehmen, dass Oligomere dieser Proteineinheit vorkommen, da die verschiedenen erhaltenen Chromoprotein-Fractionen stets den gleichen Biliverdin-Gehalt je Gewichtseinheit Protein aufweisen¹⁰.

Die leichte Abspaltung des Biliverdins durch Methylat spricht für eine Ester-Bindung an das Protein¹¹. Ein-

wirkung von Salzsäure, die eine solche Bindung ebenfalls spalten sollte, führt offenbar zu einer Sekundärreaktion, zum Beispiel von Vinylgruppen des Biliverdins mit SH-Gruppen von gleichzeitig entstandenen Proteinbruchstücken.

Das Crenilabrus-Blau ist nicht mit Phycocyanin verwandt, da dieses bei der Hydrolyse mit Methylat Mesobiliverdin (Glaukobilin) liefert, welches nach LEMBERG¹² aus Mesobiliviolin, der eigentlichen prosthetischen Gruppe von Phycocyanin, entsteht¹³.

Summary. The blue chromoprotein isolated from the fins of *Crenilabrus pavo* C.V. is split by alkali hydrolysis into a protein and a pigment soluble in chloroform. The pigment is identified as biliverdin by its positive Gmelin-reaction, the UV and visible absorption spectrum, and the chromatographic behaviour of its dimethyl ester. The lowest molecular weight of the chromoprotein has been evaluated from its biliverdin content to be $37,000 \pm 2400$; different chromatographic fractions are presumably oligomeres of this unit.

L. ABOLINŠ und W. RÜDIGER

Zoophysiologisches Institut der Universität Uppsala
(Schweden) und Institut für Biochemie der Universität
des Saarlandes, Saarbrücken (Deutschland),
30. November 1965.

³ R. VON ZEYNEK, Z. physiol. Chem. 34, 148 (1901); 36, 568 (1902); Mh. Chem. 34, 535 (1913).

⁴ J. VERNE, Les pigments dans l'organisme animal (1926), zitiert nach Literatur⁶.

⁵ R. LEMBERG, Justus Liebigs Annln Chem. 461, 46 (1928); 477, 195 (1930).

⁶ M. FONTAINE, Bull. Inst. océanogr. Monaco 1941, Nr. 792.

⁷ L. ABOLINŠ, in Vorbereitung.

⁸ C. H. GRAY, A. LICHTAROWICZ-KULCZYCKA, D. C. NICHOLSON und Z. PETRYKA, J. chem. Soc., London 1961, 2264, 2268.

⁹ W. RÜDIGER, unveröffentlichte Versuche.

¹⁰ Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung von Crenilabrus-Blau in den einzelnen Chromoprotein-Fractionen werden noch mitgeteilt⁷.

¹¹ D. E. HULTQUIST und M. MORRISON, J. biol. Chem. 238, 2843 (1963).

¹² R. LEMBERG und G. BADER, Justus Liebigs Annln Chem. 505, 151 (1933).

¹³ Die Versuche wurden an der Zoologischen Station in Neapel ausgeführt, der wir für die grosszügige Unterstützung herzlich danken. Herrn Prof. Dr. H.-J. BIELIG danken wir für wertvolle Diskussionen. – W. RÜDIGER ist der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, für die Gewährung eines Reisestipendiums und eines Arbeitsplatzes an der Zoologischen Station in Neapel zu Dank verpflichtet. – Für die Unterstützung dieser Untersuchung bedankt sich L. ABOLINŠ bei dem Schwedischen Naturwissenschaftlichen Forschungsrat.