

benen Effekten, die nach elektrischer Reizung des zentralen Endes durchschnittlicher, afferenter somatischer Nerven bei verschiedenen Tierarten auftreten. Diese Wirkungen bezeichneten WOODWORTH und SHERRINGTON<sup>19</sup> als «pseudaffektive» Reaktionen, da sie auch an decerebrierten Katzen nach nociceptiven Reizungen auszulösen sind.

Unsere Versuche deuten darauf hin, dass es in peripheren Gefäßen verschiedene Arten von Chemorezeptoren gibt, die mit der Schmerzauslösung in enger Verbindung stehen. Sie sind pharmakologisch unterschiedlich beeinflussbar und wahrscheinlich auch speziesabhängig, so dass eine Verallgemeinerung, wie LIM et al.<sup>6</sup> vorschlagen, verfrüht erscheint. Zu ähnlichen Erkenntnissen kommen auch COLLIER et al.<sup>20</sup>. Bekanntlich ist die intravasale Gabe von Phenylbutazon am Menschen sehr schmerzhaft, ein Hinweis, der die durch diese Substanz hervorgerufenen reflektorischen Reaktionen zu erklären vermag.

Zur Auslösung des Blutdruckreflexes und anderer reflektorischer Reaktionen haben sich die Kinine von allen bisher untersuchten synthetischen Substanzen als die wirksamsten erwiesen.

**Summary.** Synthetic kinins (bradykinin, kallidin and met-kallidin) administered via the femoral artery in the

isolated hindlimb of the cat elicits vasoconstriction, a reflex on the systemic blood pressure, a stimulation of respiration, and contraction of nictitating membrane. Acetylcholine elicits these reflex reactions in the body too. Atropine blocks this reflex, but not the reactions of kinins. Phenylbutazone administered via the femoral artery blocks the reflex reactions of acetylcholine and kinins as well as the vasoconstriction of histamine and the kinins in the isolated hindlimb. Phenylbutazone elicits by itself a reflex reaction. Of all the synthetic substances, the kinins are the most specific drugs inducing reflex reactions.

B. WIEGERSHAUSEN und B. KLAUSCH

*Institut für Pharmakologie der Universität Rostock (DDR), 14. Juli 1966.*

<sup>19</sup> R. S. WOODWORTH und C. S. SHERRINGTON, J. Physiol. 31, 234 (1904).

<sup>20</sup> H. O. COLLIER, A. R. HAMMOND, S. HORWOOD-BARRET und C. SCHNEIDER, Nature 204, 1316 (1964).

## Protoporphyrin und Hämin in Kulturfiltraten von *Achromobacter metalcaligenes*

Protohäm und seine unmittelbaren Präkursoren, Protoporphyrinogen und Protoporphyrin, sind in der Regel an partikuläre Systeme gebunden<sup>1</sup>; extrazelluläre Dicarboxylporphyrinderivate treten jedoch bei einigen Porphyriformen des Menschen und unter experimentellen Bedingungen bei *Chlorella*-Mutanten<sup>2</sup> sowie bei Vertretern der fakultativ heterotrophen *Athiorhodaceae*<sup>3</sup> auf. Das Leg-Hämoglobin der stickstofffixierenden Wurzelknöllchen ist wahrscheinlich ein extrazelluläres Produkt des bakteriellen Symbionten<sup>4</sup>. Zahlreiche cytochrombildende, aerobe Bakterien geben unter hypoxischen Kulturbedingungen einen makromolekularen, löslichen Faktor in das Medium ab, welcher das Wachstum protoporphyrinbedürftiger *Haemophilus*kulturen, wie zum Beispiel *Haemophilus influenzae*, ermöglicht (sogenannte X-Faktoraktivität)<sup>5-7</sup>. Die Untersuchung der Produktionsbedingungen dieses *Haemophilus*wuchsfaktors bei *Achromobacter metalcaligenes*<sup>8,9</sup> zeigte, dass es sich hierbei um ein physiologischerweise freigesetztes Produkt, nicht aber um ein Zellerfallsprodukt handelt.  $\delta$ -Aminolävulinsäure fördert die Produktion des *Haemophilus*faktors durch *A. metalcaligenes* in definierten Medien<sup>8</sup>. Mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie war es möglich, in Kulturfiltraten von *A. metalcaligenes*, welche *Haemophilus*-X-Faktoraktivität zeigten, die den Ergebnissen des biologischen Tests<sup>5</sup> entsprechenden Mengen Protoporphyrin und Hämin zu erhalten. Diese Befunde erklären einerseits die biologische Aktivität der Kulturfiltrate und gestatten andererseits die Annahme, dass die Freisetzung von Protoporphyrin bei heterotrophen Bakterien weit verbreitet ist.

**Methode.** (1) Produktion und Anreicherung des biologisch aktiven Materials: Dichte Suspensionen von *A. metal-*

*caligenes* (Nr. ST 661-K3<sup>6</sup>) wurden in einem definierten Medium (Na-D,L-Lactat 0,025 M, Na-Fumarat 0,025 M,  $\delta$ -Aminolävulinsäure<sup>9</sup> 0,002 M, Ferricitrat  $10^{-5}$  M, NaCl 0,03 M,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,02 M,  $\text{MgSO}_4$   $8,1 \cdot 10^{-4}$  M, Na-K-Phosphat nach Sörensen, 0,067 M, pH 7,2) mit mässiger Belüftung für 24 h bei 37 °C bebrütet, wie früher beschrieben<sup>8</sup>, und bei 10 000 g (+ 5 °C, 15 min) sedimentiert. Der makromolekulare Anteil des zellfreien Überstandes wurde mittels eines LKB-Ultrafilts bei + 4 °C auf etwa 1% des Ausgangsvolumens eingengt und auf Sephadex G50 oder G75 in Phosphatpuffer (0,067 M, pH 7,2) angereichert<sup>8</sup>. Daneben wurde der Überstand statischer Kulturen von *A. metalcaligenes* in einem komplexen Medium (Proteose peptone Nr. 3 Difco 2%, NaCl 0,6%, Tris(hydroxymethyl)aminomethan q.s., pH 7,2, Glucose 0,5%, separat sterilisiert)<sup>5</sup> nach den gleichen Methoden aufgetrennt.

(2) Biologischer Test: *H. influenzae* (Nr. 218/63 HIH) wurde als Indikator für Protoporphyrin, *H. aegyptius* (Nr. 15 Leidy<sup>10</sup>) zum Nachweis von Protohäm benutzt unter Bedingungen, bei denen diese Substanzen das

<sup>1</sup> S. SANO und S. GRANICK, J. biol. Chem. 236, 1173 (1961).

<sup>2</sup> L. BOGORAD und S. GRANICK, J. biol. Chem. 202, 793 (1953); S. GRANICK, L. BOGORAD und H. JAFFE, J. biol. Chem. 202, 801 (1953).

<sup>3</sup> J. LASCELLES, J. gen. Microbiol. 15, 404 (1956).

<sup>4</sup> A. I. VIRTANEN, Nature, Lond. 155, 747 (1945); F. J. BERGERSEN, Bact. Rev. 24, 246 (1960).

<sup>5</sup> W. MANNHEIM, Zbl. Bakt. I Orig. 198, 516 (1965).

<sup>6</sup> W. MANNHEIM, Pathol. Microbiol. 29, 341 (1966).

<sup>7</sup> W. MANNHEIM, Zbl. Bakt. I Orig., im Druck.

<sup>8</sup> W. MANNHEIM und H. BÜRGER, Zbl. Bakt. I Orig., im Druck.

<sup>9</sup> Fluka AG, Buchs SG, Schweiz.

<sup>10</sup> Erhalten von Herrn Dr. D. C. WHITE, Lexington, Ky., USA.

Wachstum limitieren; Aktivitätsmass war das turbidimetrisch bestimmte Gesamtwachstum, verglichen mit dem Gesamtwachstum in Gegenwart von Hämin<sup>5-8</sup>.

(3) Darstellung der Porphyrine und des Hämins: Das lyophilisierte Material wurde mit Methanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 Vol.%) versetzt und für 48 h bei + 4 °C gehalten. Unter diesen Bedingungen werden die rotfluoreszierenden Porphyrine praktisch vollständig in die Methylester (ME) überführt. Die Porphyrin-ME wurden in Chloroform ausgeschüttelt und dünnsschichtchromatographisch analysiert und präpariert. Die Auftrennung wurde an Kieselgel-H<sup>11</sup>-Platten von 0,5 mm Schichtdicke in einem Lösungsmittelsystem Benzol/Äthylacetat/Methanol/Butanol 82:14:3:1 (V/V) vorgenommen (Figur 1). Die R<sub>f</sub>-Werte der im UV-Licht (355 nm) rotfluoreszierenden Porphyrin-ME wurden nach 10 cm Laufstrecke (12 min) mit denen der Testsubstanzen (Protoporphyrin-IX-di-ME<sup>12</sup>, Coproporphyrin-I-tetra-ME<sup>12</sup>, Uroporphyrin-I-okta-ME<sup>12</sup>) verglichen. Die markierten Kieselgelzonen wurden mit einem Schichtabsaug- und Elutionsgerät<sup>13</sup> abgenommen, die Porphyrin-ME mit Chloroform eluiert und spektrophotometrisch bestimmt.

Die mit Methanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ebenfalls entstehenden Hämin-di-ME, welche eine Peroxydasereaktion mit *o*-Tolidinreagens<sup>14</sup> geben, wurden aus dem Kieselgel mit

Chloroform-Methanol 1:1 (V/V) eluiert. Als Vergleichssubstanz diente ein aus Protohämin<sup>9</sup> hergestellter Methylester. Dieser liegt in dem obengenannten Lösungsmittelsystem nahe am Startpunkt (Figur 1), wandert aber in Benzol/Methanol 4:1 (V/V) und kann so auch von Spuren unveresterten Uroporphyrins getrennt werden. Auf der

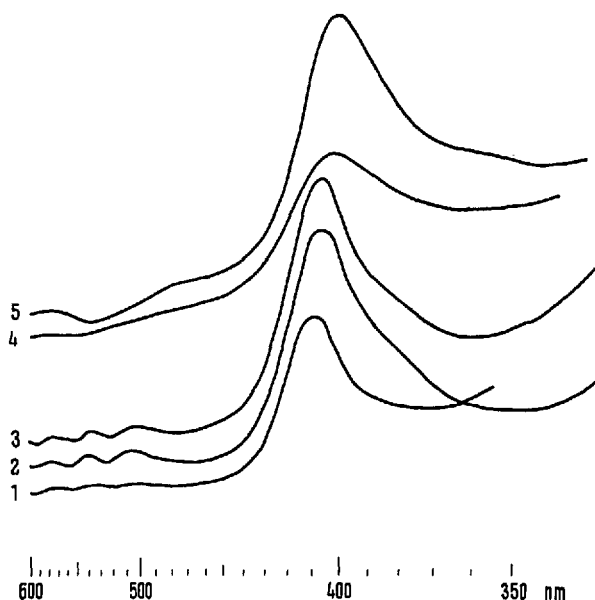


Fig. 2. Absorptionsspektren von Protoporphyrin-IX-di-ME(P) und Eisenprotoporphyrin-di-ME(E). Messgerät: Zeiss registrierendes Spektralphotometer RPQ 20 AV<sup>16</sup>. (1) P aus E der aktiven Fraktion; (2) Test P; (3) P aus der aktiven Fraktion; (4) E aus der aktiven Fraktion; (5) Test E. (2) und (3) sind identisch und weisen die bekannten Maxima bei 407, 505, 541 und 575 nm auf<sup>17</sup>. Das Absorptionsmaximum von (4) und (5) liegt bei 401–403 nm. Lösungsmittel: Chloroform.

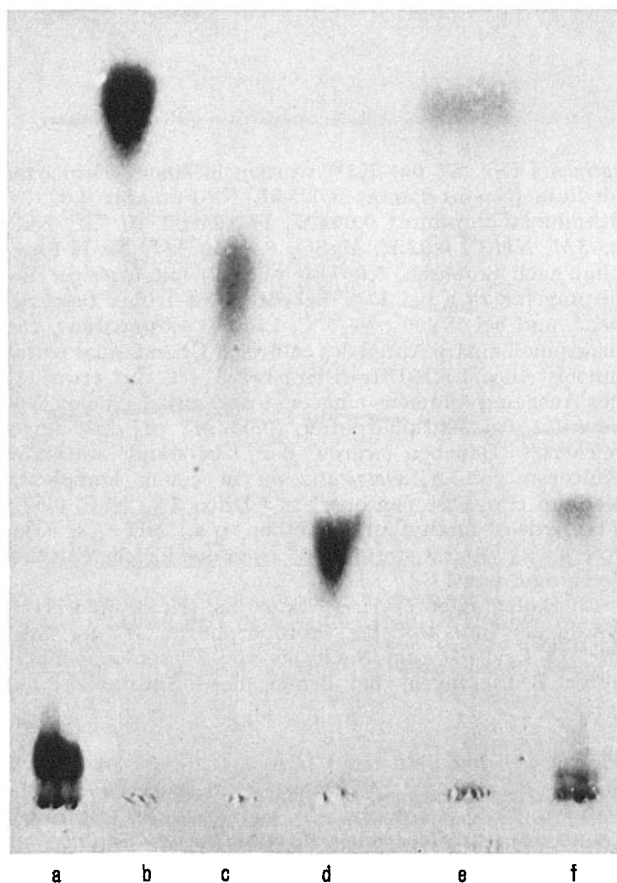


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramm der Porphyrin- und Eisenprotoporphyrin-Methylester (ME): (a) Test Eisenprotoporphyrin-di-ME; (b) Test Protoporphyrin-IX-di-ME; (c) Test Coproporphyrin-I-tetra-ME; (d) Test Uroporphyrin-I-okta-ME; (e) Protoporphyrin-IX-ME aus der biologisch aktiven Fraktion; (f) Uroporphyrin-ME aus der inaktiven Fraktion, am Start Eisenprotoporphyrin-ME. Lösungsmittel: Benzol/Äthylacetat/Methanol/Butanol 82:14:3:1. Aufnahme unter UV-Licht (355 nm).

Hämophilus-X-Faktoraktivität, Protoporphyrin- und Eisenprotoporphyrin-gehalt der biologisch aktiven Fraktion eines Kulturüberstands (definiertes Medium) von *Achromobacter metalcaligenes*

Häminäquivalentwerte im biologischen Test	<i>H. influenzae</i> (Indikator für Protoporphyrin und Eisenprotoporphyrin)	0,54 nM/ml
	<i>H. aegyptius</i> (Indikator für Eisenprotoporphyrin)	0,14 nM/ml
Präparativ ermittelte Werte*	Protoporphyrin	0,14 nM/ml
	Eisenprotoporphyrin	0,24 nM/ml

\* Messung am Spektrophotometer Zeiss PMQ II: Protoporphyrin-Methylester bei 407 nm, Eisenprotoporphyrin-Methylester bei 403 nm; Lösungsmittel: Chloroform. Berechnung über den molaren Extinktionskoeffizienten (Protoporphyrin<sup>17</sup>) und im Vergleich zu Einwaagen (Hämindimethylester).

<sup>11</sup> E. Merck AG, Darmstadt.

<sup>12</sup> Koch-Light-Laboratories, Colnbrook, England.

<sup>13</sup> B. GOLDRICK und J. HIRSCH, J. Lipid Res. 4, 482 (1963); Herstellung: Glastechnische Werkstätten E. Zimmermann, 5 Köln-Lindenthal, Joseph-Steltzmann-Str. 52.

<sup>14</sup> J. A. OWEN, H. J. SILBERMAN und C. GOT, Nature, Lond. 182, 1373 (1958).

Dünnschichtplatte sind unter UV-Licht 0,05 µg Protoporphyrin-ME und mit *o*-Tolidinreagens 0,001 µg Hämin-ME noch gut erkennbar.

(4) Überführung von Eisenprotoporphyrin-di-ME in Protoporphyrin-di-ME: Die Eisensulfatmethode<sup>15</sup> ist auch auf die Hämin-ME anwendbar, wobei die Lösung der Hämin-ME und die Extraktion der Protoporphyrin-ME in Chloroform erfolgt. Die Methylesterbindung wird während der kurzen Säureeinwirkung (10 min) nicht oder nur in geringem Umfang angegriffen.

**Resultate.** Die gesamte X-Faktoraktivität des Kulturüberstandes von *A. metalcaligenes* wird durch LKB-Ultrafiltration in der makromolekularen Fraktion (Molekulargewicht > 30 000) konzentriert. Die auf Sephadex-Säulen raschlaufenden, biologisch aktiven Fraktionen des Überstandes von Kulturen im synthetischen Medium weisen eine schwache, die später eluierten, biologisch inaktiven Fraktionen zum Teil starke Rotfluoreszenz auf.

Die dünnsschichtchromatographische Trennung der aus dem lyophilisierten Rückstand hergestellten Porphyrin-Methylester zeigte, dass nur die biologisch aktive Fraktion ein Dicarboxylporphyrin sowie wechselnde Mengen einer peroxydase-positiven Substanz enthält, die biologisch inaktiven Fraktionen dagegen relativ grosse Mengen von Uroporphyrin führen. Die Porphyrine und die peroxydase-positiven Substanz können auch durch Ausschütteln mit Äthylacetat-Essigsäure 4:1 (V/V) leicht aus ihrer Assoziation mit dem makromolekularen Anteil gelöst werden. Der Porphyrin-Methylester aus der aktiven Fraktion konnte aufgrund des chromatographischen Verhaltens (Figur 1) und der Absorptionsmaxima (Figur 2)<sup>17</sup> mit Protoporphyrin-IX-dimethylester identifiziert werden. Die peroxydase-positiven Substanz verhielt sich im Chromatogramm und spektrophotometrisch wie Eisenprotoporphyrinmethylester; das daraus gewonnene metallfreie Produkt erwies sich ebenfalls als Protoporphyrin-dimethylester.

Die Darstellung der Protoporphyrindimethylester (Veresterung, Extraktion, Chromatographie, Elution) wurde quantitativ überprüft; es ergab sich eine Ausbeute von 89%. Die im biologischen Test ermittelten Werte für Protoporphyrin und Protohämin korrelieren mit den aus

dem aktiven Material durchgeführten Analysen (Tabelle). Daraus ist die Folgerung berechtigt, dass der Protoporphyrin- und Eisenprotoporphyrin-Gehalt des Präparats für die gesamte biologische Aktivität aufkommt.

Die entsprechende Aufarbeitung eines Peptonkulturfiltrats von *A. metalcaligenes* ergab eine biologisch aktive, makromolekulare Fraktion, die Protoporphyrin, neben Spuren von Uroporphyrin und Hämin, enthielt. Da der Hämin-Gehalt des aus dem komplexen Medium gewonnenen Präparats vernachlässigt werden kann, ist Protoporphyrin – oder seine reduzierte, nichtfluoreszierende Vorstufe, Protoporphyrinogen (cf. <sup>5,7,8</sup>) – als die physiologische Ausscheidungsform des aktiven Prinzips zu betrachten.

**Summary.** A macromolecular fraction from the culture fluid of *Achromobacter metalcaligenes* showing the activity of the Haemophilus-X factor was investigated for its content of porphyrin derivatives. Porphyrin methylesters were directly prepared from the lyophilized material and then separated by thin layer chromatography. Protoporphyrin and iron protoporphyrin could be isolated in amounts which correlated with the growth-promoting activity for *Haemophilus influenzae*.

M. DOSS und W. MANNHEIM<sup>18,19</sup>

Hygiene-Institut der Philipps-Universität,  
355 Marburg/Lahn (Deutschland),  
12. Juli 1966.

<sup>15</sup> J. E. FALK, *Porphyrins and Metalloporphyrins* (Elsevier, Amsterdam-London-New York 1964), p. 130.

<sup>16</sup> Messungen freundlicherweise von Herrn Dr. F. H. KREUTZ, Medizinische Klinik der Universität Marburg, durchgeführt.

<sup>17</sup> J. E. FALK, *Porphyrins and Metalloporphyrins* (Elsevier, Amsterdam-London-New York 1964), p. 232.

<sup>18</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

<sup>19</sup> Dem Direktor des Hygiene-Instituts, Herrn Prof. Dr. RUDOLF SIEGERT, sind die Verfasser für die Förderung der Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

## Autoradiographic Study on Incorporation of Leucine-H<sup>3</sup> in Peripheral Nerves During Regeneration

The proximal stumps of regenerating nerves show various characteristic changes. Apart from swelling, the axons show an increased activity of oxidative and hydrolytic enzymes<sup>1-6</sup>. The morphological substrate of these histochemical changes, on the electron microscopic level, is an impressive accumulation of mitochondria, lysosomes, vesicles and tubular structures<sup>8-11</sup>. The massive occurrence of these organelles and structures raises the question as to whether they are transported by axoplasmic flow mechanisms or arise from local processes<sup>9,12,13</sup>. A local build up of these structures, if it is possible, would be only by a high local protein synthesis. Such an hypothesis can be tested by fine resolution autoradiography using leucine-H<sup>3</sup> as a precursor of protein synthesis, and allowing very short survival time after injection of the radiochemical in order to eliminate the possibility of axo-

plasmic flow. The purpose of this investigation was to localize the site of protein synthesis in regenerating nerves and to evaluate differentially such a protein metabolism.

<sup>1</sup> R. L. FRIEDE, *Expl. Neurol.* 1, 441 (1959).

<sup>2</sup> G. KREUTZBERG and W. WECHSLER, *Acta Neuropath.* 2, 349 (1963).

<sup>3</sup> C. O. HEBB and A. SILVER, *Nature* 189, 123 (1961).

<sup>4</sup> J. ZELENÁ and L. LUBINSKA, *Physiologia bohemoslov.* 17, 261 (1962).

<sup>5</sup> F. HANEFELD, *Dt. Z. NervHeilk.* 188, 357 (1966).

<sup>6</sup> P. WEISS, A. C. TAYLOR, and P. A. PILLAI, *Science* 136, 330 (1962).

<sup>7</sup> W. WECHSLER and H. HAGER, *Acta Neuropath.* 7, 489 (1962).

<sup>8</sup> R. WETTSTEIN and J. R. SOTELLO, *Z. Zellforsch.* 59, 708 (1963).

<sup>9</sup> W. SCHLOTE, *Acta Neuropath.* 4, 138 (1964).

<sup>10</sup> E. HOLTZMAN and A. B. NOVIKOFF, *J. Cell Biol.* 27, 651 (1965).

<sup>11</sup> S. BLÜMCKE and H. R. NIEDORF, *Beitr. path. Anat.* 130, 133 (1964).

<sup>12</sup> H. HAGER, *Die feinere Cytologie und Cytopathologie des Nervensystems* (G. Fischer, Stuttgart 1964).

<sup>13</sup> L. LUBINSKA, *Progr. Brain Res.* 13, 1-71 (1964).