

Table II. Excretion of porphyrins and heme from the cells

Organism	Addition of ALA	Heme	Total porphyrins	Porphyrins according to the biosynthetic chain						
				8 COOH	7 COOH	6 COOH	5 COOH	4 COOH	3 COOH	2 COOH
				Percentage found in the culture fluid.						
<i>E. coli</i>	—	15.4	17.8	—	—	—	—	73.2	—	—
	+	29.1	71.2	91.7	76.4	77.9	76.4	86.8	49.3	24.3
<i>Ps. aeruginosa</i>	—	16.4	58.4	66.4	38.5	—	75.4	88.2	43.2	—
	+	27.5	89.3	96.4	86.4	87.8	85.3	89.7	53.5	16.7
<i>A. metalcaligenes</i>	—	18.5	16.3	—	—	—	—	70.7	—	—
	+	26.7	69.8	91.6	73.8	78.5	76.9	84.3	50.7	24.5

mainly of saturated alcohols and fatty acids with chain lengths of C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, and C<sub>18</sub><sup>8</sup>.

**Discussion.** The excretion of coproporphyrin-III under conditions of iron deficiency was observed in various bacteria, especially in *Corynebacterium diphtheriae*<sup>9</sup>. The medium for *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, and *A. metalcaligenes* in the experiments under discussion here likewise contained iron concentrations of less than 0.1  $\mu$ M. Supplemental iron (10  $\mu$ M) enhances the production of heme by 50–100%, and reduces porphyrin synthesis by about 40%<sup>5</sup>. However, it has no influence on the relative distributions of the individual porphyrins between the cells and the medium.

The elimination of coproporphyrin in controlled porphyrin synthesis is of general biological interest: Microorganisms, mammals, and man excrete predominantly coproporphyrin, along with smaller amounts of the porphyrins bearing 8 to 3 carboxyl groups, all of which remain in their reduced forms during heme biosynthesis. Microorganisms and animal cells show analogous behavior when porphyrin synthesis can proceed without limitation, i.e., in the presence of added ALA, or of increased activity of ALA synthetase. The greater portion of the porphyrins with 8 to 4 carboxyl groups, and over 90% of the uroporphyrin, are eliminated from the cells (congenital porphyria<sup>10</sup> and porphyria cutanea tarda<sup>3</sup>). Even protoporphyrin is excreted (erythropoietic protoporphyria and porphyria variegata<sup>10</sup>), if, as is the case with microorganisms to which ALA is added, more protoporphyrin is produced than can be utilized in heme synthesis. The pattern of distribution of porphyrins with 8 to 5 carboxyl groups following synthesis from added ALA is strikingly similar to that found in chronic hepatic porphyria<sup>3</sup>, which suggests the existence of a similar enzymatic mechanism of stepwise decarboxylation of uroporphyrinogen in both types of cells.

The elimination of 70–90% of the total porphyrins formed from exogenous ALA in *E. coli*, *Ps. aeruginosa*,

and *A. metalcaligenes* must probably be regarded as a mechanism for the protection of the cell, whose normal processes would most likely be disrupted if extremely large amounts of photoactive porphyrin carboxylic acids were to accumulate. These experiments illustrate once again the suitability of microorganisms as model systems, especially for the study of the principles underlying the excretion of porphyrins, which apparently are of general validity.

**Zusammenfassung.** *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Achromobacter metalcaligenes* bilden sämtliche, der Biosynthesekette zum Häm entsprechenden Porphyrine aus endogener  $\delta$ -Aminolävulinäure (ALS) und scheiden Koproporphyrin und Häm aus. Porphyrinsynthesestimulation mit exogener ALS führt hingegen zur Elimination auch der übrigen Porphyrine aus den Organismen, wobei die höher carboxylierten zu 78–99% in die Kulturflüssigkeit übergehen und Protoporphyrin noch zu über 75% in den Zellen verbleibt.

M. DOSS<sup>11</sup> and W. K. PHILIPP-DORMSTON

*Division of Clinical Biochemistry and Biochemical Microbiology, Hygiene-Institute of the University Marburg, Pilgrimstein 2, D-3550 Marburg a. d. Lahn (Germany), 27 August 1970.*

<sup>8</sup> M. DOSS and K. OETTE, unpublished.

<sup>9</sup> A. M. PAPPENHEIMER, J. biol. Chem. 167, 251 (1947).

<sup>10</sup> C. H. GRAY, in *Biochemical Disorders of Human Disease* (Eds. R. H. S. THOMPSON and I. D. P. WOORTON; J. and A. Churchill, London 1970), p. 215.

<sup>11</sup> This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

## Regionale Inkorporation der optischen Isomeren der Aminosäure Prolin-H<sup>3</sup> im Autoradiogramm des Mäusegehirns<sup>1</sup>

D,L-Prolin wird im Gegensatz zu anderen Aminosäuren in verschiedenen Hirnregionen der Maus sehr unterschiedlich eingebaut<sup>2–4</sup>. Das Enzym D-Aminosäure-Oxydase weist im Gehirn der Maus<sup>5</sup> und anderer Säugerspecies<sup>6</sup> ebenfalls beträchtliche regionale Aktivitätsunterschiede

auf. Daher erscheint ein Vergleich der topographischen Verteilung dieses Enzyms mit dem Einbauverhalten der optischen Isomeren des Prolins im Gehirn von Interesse.

Männliche Mäuse des Stammes NMRI/Han. erhielten im Alter von 12 Wochen je 20  $\mu$ Ci/g Körpergewicht D,L-

Prolin-G-H<sup>3</sup> (spez. Akt. 304 mCi/mM) bzw. L-Prolin-G-H<sup>3</sup> (550 mCi/mM) in wässriger Lösung ( $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) i.p. injiziert. Die Vermessung der optischen Drehung (Perkin-Elmer-Polarimeter 141) ergab für D,L-Prolin einen Anteil von 11,4% D-Prolin. Die papierchromatographische Prüfung aller Prolin-Chargen (*n*-Butanol:Pyridin:Wasser 1:1:1) ergab gleiche RF-Werte, welche dem reinen Prolin entsprachen<sup>7</sup>.

Die Tiere wurden 1 h nach der Tracer-Injektion durch Perfusion von 20 ml 10%igem Formalin in Nembutalnarkose getötet und die Gehirne nach 3tägiger Nachfixation in gleicher Fixierlösung zur Herstellung von Dipping-Autoradiogrammen (Ilford-Emulsion G5) 10  $\mu\text{m}$  dicker Gewebeschnitte in Paraplast eingebettet. Zur Entfernung nicht-proteingebundener Aminosäuren wurden Hirnschnitte vor der autoradiographischen Exposition in 5%iger Trichloressigsäure bei 0°C gewaschen.

Figur 1a zeigt das Einbauverhalten von D,L-Prolin am Autoradiogramm eines sagittalen Hirnschnittes der Maus. Während über der Grosshirnrinde eine intensive Silberkorndunkelung vorliegt, erscheint das Kleinhirn nahezu ausgespart. Zwischenhirn, Mittelhirn und Nachhirn sind markiert, weisen aber eine wesentlich geringere Schwärzung als die Hirnrinde auf. Bei der photometrischen Bestimmung<sup>8</sup> der mittleren Silberkorndichten über den genannten Hirnabschnitten im Autoradiogramm der Figur 1a ergibt sich, dass sich Grosshirnrinde, Stammhirn und Kleinhirn etwa wie 10:5:2 verhalten. In der Grosshirnrinde und in der Hippocampus-Formation sind vor allem die Nervenzellen stark markiert. Im Stammhirn treten markierte Nervenzellen autoradiographisch nicht in Erscheinung. Hier lässt sich eine Beziehung des Einbaues von D,L-Prolin zur Lage einzelner Hirnkerne nicht

erkennen; vielmehr ist die Radioaktivität über dem ganzen Stammhirn gleichförmig verteilt.

Mit reinem L-Prolin konnte die für D,L-Prolin beschriebene Einbauverteilung nicht beobachtet werden. Weder im Grosshirn und Stammhirn noch im Kleinhirn ist eine Markierung zu sehen (Figur 1b). Gleichartig dagegen verhalten sich D,L-Prolin und L-Prolin bei der Markierung der Pia mater, des Ependyms, des Plexus chorioideus und der zirkumventrikulären Organe. Hier findet sich eine bevorzugte Aktivitätsaufnahme im Bereich des Recessus praeropticus, im Subfornikalorgan, im Bereich des Recessus infundibularis und in der Area postrema.

Aus dem unterschiedlichen Einbauverhalten von D,L-Prolin und L-Prolin ergibt sich, dass die optische Isomerie des Prolins für die Aufnahme und die regionale Verteilung dieser Aminosäure im Gehirn der Maus entscheidend ist: D-Prolin wird im Gross- und Stammhirn, nicht aber im Kleinhirn zur Proteinsynthese verwertet. L-Prolin wird weder im Grosshirn und Stammhirn noch im Kleinhirn in Proteine eingebaut. Bei der Inkorporation von D-Prolin kommt es in der Grosshirnrinde zu einem bevorzugten Einbau in Nervenzellen, die Verteilung der Radioaktivität im Stammhirn spricht für eine überwiegende Markierung von Gliazellen.

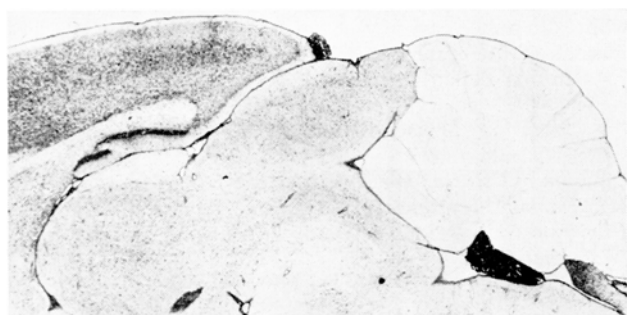
Es ist bekannt, dass das Enzym D-Aminosäure-Oxydase im Grosshirn der Maus eine minimale, im Kleinhirn dagegen eine maximale Aktivität aufweist. Die Enzymaktivität des Stammhirns liegt zwischen denen des Gross- und Kleinhirns<sup>6</sup>. Die Verteilung dieses Enzyms korrespondiert in auffälliger Weise mit der Verteilung von D-Prolin im Paraffinschnitt-Autoradiogramm: In Hirnabschnitten mit niedriger Aktivität der D-Aminosäure-Oxydase kommt es offenbar zu einem starken Einbau von D-Prolin, in Regionen mit hoher Enzymaktivität ist die Aufnahme von D-Prolin gering.

Diese Befunde weisen daraufhin, dass dem unterschiedlichen Einbauverhalten von D,L-Prolin in den einzelnen Hirnabschnitten der Maus Stoffwechselfaktoren der Nervenzellen und nicht regionale Unterschiede in der Durchlässigkeit der Bluthirnschranke zugrunde liegen.

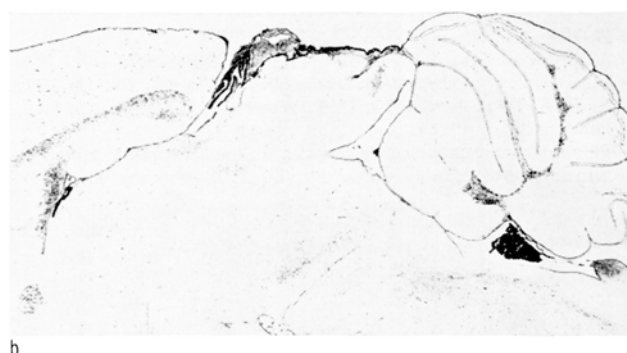
**Summary.** Comparative labelling of the mouse brain with tritiated D,L-proline and L-proline reveals a dissimilarity of incorporation between the optical isomers of this amino acid. The differential regional distribution pattern of D-proline can be correlated to the cerebral distribution of the enzyme activity of D-aminoacid-oxidase in the mouse brain.

G. GARWEG und E. J. SCHNEIDER

Anatomisches Institut der Universität, Nussallee 10,  
D-53 Bonn (Deutschland), 22. Oktober 1970.



a



b

Fig. 1a–b. Ungefärbte Autoradiogramme paramedianer Sagittalschnitte durch die Gehirne von zwei Mäusen. a) 1 h nach i.p. Injektion von D,L-Prolin-G-H<sup>3</sup>. b) 1 h nach i.p. Injektion von L-Prolin-G-H<sup>3</sup>. Die Schwärzung entspricht der Silberkorndichte über radioaktiv markierten Strukturen. In b) beruht die Schwärzung im Bereich des Kleinhirnmarkes und quergetroffener Kommissuren auf Doppelbrechung. Negativ-Vergrößerung:  $\times 2,3$ .

<sup>1</sup> Die Arbeit wurde mit Mitteln des Bundesministers für wissenschaftliche Forschung gefördert.

<sup>2</sup> G. GARWEG, *Naturwissenschaften* 56, 463 (1969).

<sup>3</sup> G. GARWEG und I. KINSKY, *Naturwissenschaften* 57, 253 (1970).

<sup>4</sup> G. GARWEG, *Experientia* 26, 1348 (1970).

<sup>5</sup> D. B. GOLDSTEIN, *J. Neurochem.* 13, 1011 (1966).

<sup>6</sup> W. J. DE MARCHI und G. A. R. JOHNSTON, *J. Neurochem.* 16, 355 (1969).

<sup>7</sup> Herrn Prof. Dr. F. ZILLIKEN und Herrn Dr. D. RENGGER, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Bonn, sei für die Unterstützung bei der Polarimetrie und der Chromatographie gedankt.

<sup>8</sup> Photometer MPV-Leitz, Auflicht-Reflexionsmessung mit Rechteckblende 47  $\mu\text{m} \times 4,7 \mu\text{m}$  bei 547 nm.