

extract was done by the Bisert two-dimensional paper chromatography method⁵ using in the first direction (ascending dimension): toluene-pyridine-ethylene chlorhydrin (2chloroethanol)-ammonia 0.8 N at the rate of 5:3:1.5:3. In the second direction for descending chromatography with a solvent system consisting of a 1.5 M phosphate buffer of pH 6: 1 M NaH₂PO₄, 0.5 M Na₂HPO₄; i.e. 138 g of NaH₂PO₄ H₂O and 71 g Na₂HPO₄ per l.

In order to obtain univocal results, the DNP amino acid derivatives were eluted with independent methanol and 1% Na₂CO₃, and also subjected to rechromatographic process using water saturated butanol (according to MELLON, KORN, HOOVER⁶). Rechromatography was carried out parallel to amino acid standards for identification purposes.

Results. By the method of two-dimensional chromatography (ascendancy and descendancy) using hydrazinolysis technique, compounds were obtained, one of which Rf

corresponded to dinitrophenyl, while the other, although twice subjected to chromatographic analysis, compared with standard amino acids turned out to be DNP leucine. The Table shows Rf DNP amino acids compared with the unidentified C-terminal amino acids. On Figure 1 are shown 2 DNP amino acid spots: dinitrophenyl and DNP leucine. Figure 2 shows the results of the division of rechromatographic standards of DNP amino acids and the analyzed DNP amino acids.

Discussion. On the basis of analysis carried out on C-terminal amino acids of aspergillopeptidase Af, a DNP-derived amino acid was obtained. This was found to be leucine. This result suggests that the isolated enzyme possesses two identical C-terminal amino acids, if we assume that the molecule has a two chain structure. It may be that the enzyme has 1 polypeptide chain of branched structure. This is indicated by the presence of two N-terminal amino acids.

Résumé. Nos observations concernent la détermination de groupes C-terminaux d'aspergillopeptidase Af extraite de la culture d'*Aspergillus fumigatus*. Nous avons utilisé la technique de l'hydrazinolysé et avec la chromatographie alternante et démontré que la leucine constitue un aminoacide C-terminal.

J. KEDZIORA and MARIA KOPFF⁷

Academy of Medicine, Department of Biochemistry,
ul. E. Plater 31/33 m5, Lodz (Poland), 18 December 1972.

⁵ G. BISERTE, J. HOLLEMAN and P. SANTIÈRE, *Chromat. Rev.* 2, 59 (1966).

⁶ E. F. MELLON, H. H. KORN and S. R. HOOVER, *J. Am. chem. Soc.* 75, 1675 (1953).

⁷ Requests for reprints should be addressed to Dr M. Kopff.

Comparison of Rf value examined and standard DNP amino acids

Amino acids	Rf
Di-DNP Tyr	0.78
DNP Leu	0.74
DNP Ile	0.73
Di-DNP-Lys	0.72
DNP-Phe	0.71
DNP-Met	0.65
DNP-Val	0.68
DNP-X	0.74
X-examined amino acid	

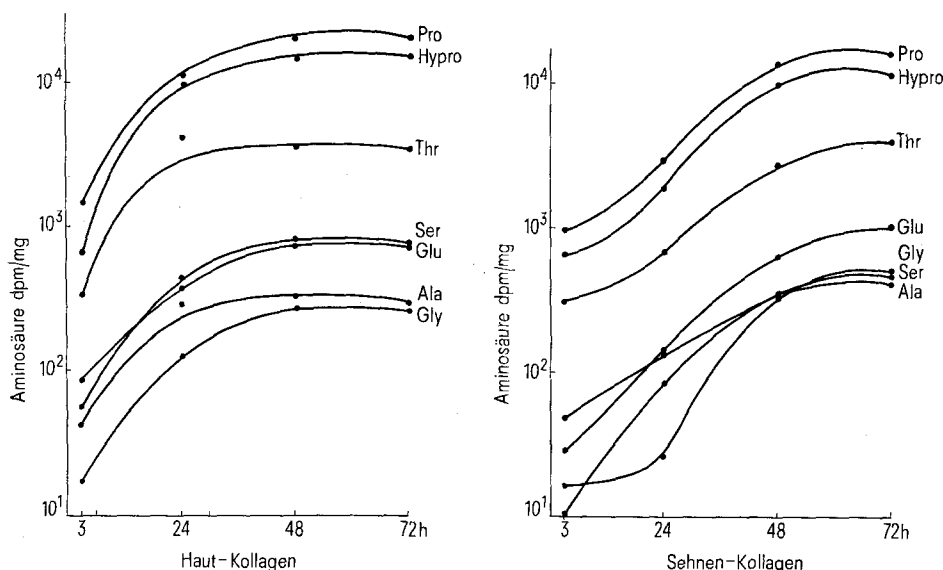
Nachweis von radioaktiven Aminosäuren im Kollagen nach Gabe von Prolin-C¹⁴

Eigene Untersuchungen haben ergeben, dass im Körper der Ratte aus dem Prolin nicht nur Hydroxyprolin und Glutaminsäure, sondern auch Glykokoll, Alanin, Serin und Threonin entstehen¹. Bekannterweise handelt es sich um Aminosäuren, die im Kollagen festzustellen sind. Es ergibt sich die Frage, inwiefern sie nach Prolin-C¹⁴-Gabe im erwähnten Skleroprotein erscheinen.

Material und Methode. Männliche, ca. 120 g schwere Sprague-Dawley-Ratten bekamen je 500 µCi L-Prolin-U-C¹⁴ (spez. Aktivität 209 mCi/mMol) i.p. und wurden 3, 24, 48 und 72 h später getötet. Die frei von Haaren und Fett präparierte Haut ebenso wie die Schwanzsehne der Tiere wurden getrennt, gewaschen, in 0,5 M Natriumazetatpuffer homogenisiert, in der Kälte geschüttelt und bei 2000 upm zentrifugiert. Nach Dekantierung, nochmaliger Gabe von Natriumazetat, 36 h bei 5° Schütteln und anschliessender Zentrifugierung wurde der Rückstand mit Zitratpuffer (pH 4,3) 72 h bei 5° geschüttelt. Den filtrierten Extrakt zentrifugierten wir bei 50 000 × g. Anschliessend wurde der Überstand in 0,02 M Na₂HPO₄ Puffer bei 5°C rund 3 Tage lang dialysiert². Der während der Dialyse entstandene Niederschlag war lichtmikroskopisch als nadeliges Element zu identifizieren, das elektronenmikroskopisch die typische Struktur der ausgefällten mit entsprechenden Querstreifen versehenen kollagenen Fasern aufwies. Die gewaschenen und getrockneten Kollagenfibrillen zeigten eine für dieses

Kollagen^{3,4} charakteristische Aminosäurezusammensetzung (% µMol):

	Haut	Sehne
Alanin	10,50 ± 0,23	10,77 ± 0,37
Arginin	5,66 ± 1,36	5,14 ± 0,39
Asparaginsäure	4,98 ± 0,51	5,04 ± 0,38
Glutaminsäure	6,78 ± 0,39	7,03 ± 0,19
Glyzin	30,77 ± 1,46	31,60 ± 0,74
Histidin	0,65 ± 0,13	0,63 ± 0,23
Hydroxylysin	0,73 ± 0,19	0,72 ± 0,05
Hydroxyprolin	11,95 ± 1,40	11,41 ± 1,03
Leuzin	2,36 ± 0,27	2,40 ± 0,22
Iso-Leuzin	1,22 ± 0,13	1,28 ± 0,23
Lysin	3,28 ± 0,65	2,87 ± 0,05
Methionin	0,30 ± 0,15	0,29 ± 0,07
Phenylalanin	1,22 ± 0,14	1,20 ± 0,03
Prolin	11,30 ± 0,42	11,87 ± 0,22
Serin	3,79 ± 0,31	3,77 ± 0,23
Threonin	1,93 ± 0,29	1,95 ± 0,15
Tyrosin	0,29 ± 0,11	
Valin	2,49 ± 0,42	2,26 ± 0,29



Verlauf der spez. Aktivitäten der nach Prolin- C^{14} -Gabe ($1 \mu\text{Ci/g}$ Körpergewicht) markierten Aminosäuren im Kollagen.

Nach Isolierung einzelner Aminosäuren aus der hydrolysierten Präparation mittels Elution an der Austauscherharzsäule der Unichromapparatur (Beckman) ermittelten wir deren Aktivitätsgehalt. Jeder Aktivitätspeak wurde zur sicheren Reinheitsprüfung mit dem Unichrom analysiert, unter Umständen auch dünnenschichtchromatografisch zweidimensional (Methanol-Chloroform-17% NH_3 ; 4:4:2; Butanol-Eisessig H_2O ; 4:1:1) identifiziert. Die in dpm angegebene Radioaktivität ist unter Berücksichtigung einer Tierdosis von $1 \mu\text{Ci } C^{14}$ -Prolin/g Körpergewicht korrigiert worden.

Resultate und Diskussion. Wie die Figur zeigt, ist bereits 3 h nach Gabe von Prolin- C^{14} im Kollagen der Haut und Sehne nicht nur Radioaktivität beim Hydroxyprolin, sondern auch beim Threonin, bei der Glutaminsäure, beim Alanin, Serin und Glykokoll nachzuweisen. Die zeitabhängigen Kurvenverläufe der jeweiligen spezifischen Aktivitäten dieser Nachfolgeprodukte sind nahezu gleich und unterscheiden sich nicht wesentlich von der entsprechenden Kurve des Prolins. Gegenüber der Haut scheint das Radioaktivitätsmaximum bei der Sehne ca. 24 h verspätet aufzutreten. Dann unterscheiden sich die spezifischen Aktivitäten bei der Sehne und Haut auch nicht wesentlich voneinander. Es ist daher anzunehmen, dass die Ursache nicht eine unterschiedliche, organge-

bundene Zelleistung, sondern eine verzögerte Prolin- C^{14} Aufnahme durch schlechtere Durchblutung ist.

Wie bereits aus der Figur zu erwarten, lässt die prozentuale Aktivitätsverteilung (Tabelle) eine Konstanz erkennen, die von der Organherkunft und von der Zeit unabhängig erscheint. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit bereits vorliegenden in-vitro Untersuchungen über die Hydroxyprolinbildung von Knorpelzellen⁵, die ergeben haben, dass die Relation der Radioaktivität des Hydroxyprolin zu der des Prolins konstant bleibt.

Die Kurvenverläufe der Figur sind bei den jeweiligen Organen weitgehend identisch. Sie scheinen den Weg des radioaktiven Prolins vom Zeitpunkt seiner Einschleusung in die kollagenproduzierende Zelle bis zu seinem Erscheinen in den Fasern synchron darzustellen und sprechen daher für die Annahme, dass die Umwandlung von Prolin in die erwähnten Aminosäuren in der Fibroblastenzelle selbst erfolgt. Hinsichtlich des Überganges von Prolin in Hydroxyprolin darf bemerkt werden, dass sich dieser Vorgang zeitlich nicht von dem der anderen Aminosäuren unterscheidet. Dieses spricht weiterhin für die Annahme, dass die intrazelluläre Hydroxyprolinentstehung in einer Frühphase der Kollagenbildung stattfindet⁶.

Prozentuale Verteilung der Radioaktivität in den Aminosäuren der Kollagenfibrillen nach Gabe von Prolin- C^{14} ^a

	Haut	Sehne
Prolin	$53,40 \pm 2,25$	$52,65 \pm 0,81$
Hydroxyprolin	$38,39 \pm 4,31$	$39,34 \pm 1,83$
Threonin	$2,22 \pm 0,59$	$2,21 \pm 0,21$
Glutaminsäure	$1,67 \pm 0,45$	$1,95 \pm 0,05$
Glyzin	$1,16 \pm 0,10$	$1,78 \pm 0,78$
Serin	$0,62 \pm 0,06$	$0,54 \pm 0,12$
Alanin	$0,80 \pm 0,31$	$0,86 \pm 0,33$

^a Von der 3. bis zur 72. h nach Gabe.

¹ A. RUIZ-TORRES und I. KUERTEN, Z. Gerontol. in Druck.

² P. M. GALLOP, Archs. Biochem. 54, 487 (1955).

³ A. NORDWIG, E. ROGALL und U. HAYDUK, in *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix* (Ed. E. A. BALAZS; Academic Press, London/New York 1970), p. 27.

⁴ Ch. MITOMA, T. S. SMITH, F. FRIEDBERG und C. R. RAYFORD, J. biol. Chem. 234, 78 (1959).

⁵ K. JUVA und D. J. PROCKOP, J. biol. Chem. 241, 4419 (1966).

⁶ D. J. PROCKOP, in *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix* (Ed. E. A. BALAZS; Academic Press, London/New York 1970), p. 335.

Die hohen spezifischen Aktivitäten des Threonin sind bemerkenswert. Umgerechnet ergibt sich, dass rund 20% des Threoningehaltes in Kollagen vom Prolin stammen. Weitere Untersuchungen sollen Auskunft über diesen – unseres Wissens bisher unbekannten – Weg im Intermediärstoffwechsel des Prolins geben.

Summary. Beside hydroxyproline collagen contains quantities of glutamine, threonine, serine, alanine and glycine, derived from proline. Remarkably large quanti-

ties of threonine have this origine, which suggests that conversions occur in the fibroblast.

A. RUIZ-TORRES und I. KÜRTEN

Stoffwechselabteilung an der Medizinischen Klinik und Poliklinik der FU Berlin im Klinikum Westend, Spandauer Damm 130, D-1 Berlin 19 (Deutschland), 28. Februar 1973.

Hepatic Drug Metabolizing Activity in Lead-Poisoned Rats¹

Lead poisoning of young children in slum areas of major cities²⁻⁴ has produced a reawakened interest in the study of lead-induced biochemical effects. An extensive literature⁵ reports alterations of a series of metabolic processes observed after acute or chronic exposure to inorganic lead.

In particular, the mixed function oxidase system of liver endoplasmic reticulum is impaired in acute lead poisoning⁶. The activity of this enzyme system, responsible for the metabolism of a large number of xenobiotics, is closely related to the availability of the microsomal hemoprotein cytochrome P-450⁷. Lead-induced inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydrase⁸⁻¹⁰ may result in inhibition of heme synthesis and therefore in reduced levels of cytochrome P-450 with consequent impairment of the mixed function oxidase system.

The purpose of the present investigation was to provide further evidence for lead-induced modifications of hepatic drug metabolism and to demonstrate a relationship between impairment of the mixed function oxidase system and inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydrase activity.

Materials and methods. Male albino rats (Sprague-Dawley derived, CD strain), with an average body weight of 160 g, were used. The animals were allowed at least 4 days to acclimatize to our animal quarters and were treated i.v. with lead nitrate. Control groups received isotonic sodium chloride. The rats were killed by decapitation between 09.00 and 10.00 h; the livers were quickly removed, chilled in ice-cold 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, perfused with the same buffer to remove blood, and weighed. All remaining procedures were carried out at 0–4°C unless otherwise indicated. The livers were minced with scissors in 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 and 25% (w/v) homogenates prepared with a Potter-Elvehjem homogenizer having a plastic pestle. Homogenates were centrifuged at 12,000 *g*_{av} for 20 min. The pellet was discarded and the post-mitochondrial supernatant used for enzymic and chemical assays. Cytochrome P-450 and enzyme activities were measured within 4 h after the animals had been killed.

N-Demethylation of aminopyrine was determined by measuring the formation of the intermediate metabolite 4-aminoantipyrine¹¹ and that of formaldehyde¹². O-Demethylation of *p*-nitroanisole was assayed by the method of NETTER and SEIDEL¹³, as modified by SCHOENE et al.¹² for kinetic determinations. Aromatic ring hydroxylation was tested, measuring the formation of *p*-acetaminophenol from acetanilide¹⁴ and that of *p*-aminophenol from aniline¹⁴. Incubations were carried out in a Dubnoff shaking water bath (125 oscillations/min) at 37°C under air. A glass marble was added to each incubation vessel to facilitate mixing of the contents¹⁵.

δ -Aminolevulinic acid dehydrase activity was measured with the method of BONSIGNORE et al.¹⁶. Cytochrome P-450 was determined according to the procedure recently described for human liver homogenates¹². Difference spectra were recorded with a Perkin-Elmer 350 double beam spectrophotometer equipped with an external device for scale expansion. A Gilford 2400 spectrophotometer with wavelength programmer and reference compensator was routinely used for alternate measurements at 450 and 490 nm. Protein content was estimated by the method of LOWRY et al.¹⁷; crystalline bovine serum albumin served as the reference standard. Lead in liver homogenates and post-mitochondrial supernatants was determined with the dithizone method after digestion with nitric-perchloric acid¹⁸ or by γ -spectrometry in some experiments carried out with lead nitrate labelled with ²⁰³Pb (kindly provided by the Institute of Physics, University of Milan). Pentobarbital sleeping time was determined after i.v. injection of 40 mg/kg body wt. by measuring the duration of loss of the righting reflex. Statistical analysis was performed with the Student *t*-test, using a top-desk computer Olivetti 101.

Results and discussion. A dose dependent increase in liver weight was observed in lead-poisoned rats. On the

¹ Publication No. 883 of Directorate for Biology (D.G. III) – European Communities Commission.

² V. F. GUINEE, *Am. J. ind. Med.* 52, 283 (1972).

³ J. S. LIN-FU, *New Engl. J. Med.* 286, 702 (1972).

⁴ R. CHALLOP, E. McCABE and R. REECE, *Am. J. publ. Hlth* 62, 655 (1972).

⁵ A. DE BRUIN, *Archs envir. Hlth* 23, 249 (1971).

⁶ A. P. ALVARES, S. LEIGH, J. COHN and A. KAPPAS, *J. exp. Med.* 135, 1406 (1972).

⁷ T. OMURA, R. SATO, D. Y. COOPER, O. ROSENTHAL and R. W. ESTABROOK, *Fedn Proc.* 24, 1181 (1965).

⁸ D. BONSIGNORE, P. CALISSANO and C. CARTASEGNA, *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 41, 443 (1965).

⁹ A. DE BRUIN and G. T. DE JONG-HEISTERKAMP, *Annls. Biol. clin.* 26, 717 (1968).

¹⁰ B. HAEGER-ARONSEN, M. ABDULLA and B. I. FRISTEDT, *Archs envir. Hlth* 23, 440 (1971).

¹¹ G. FEUER, J. C. SOSA-LUCERO, G. LUMB and G. MODDEL, *Toxic. appl. Pharmac.* 19, 579 (1971).

¹² B. SCHOENE, R. A. FLEISCHMANN, H. REMMER and H. F. OLDERSHAUSEN, *Eur. J. clin. Pharmac.* 4, 65 (1972).

¹³ K. J. NETTER and G. SEIDEL, *J. Pharmac. exp. Ther.* 146, 61 (1964).

¹⁴ T. SHIMAZU, *Biochim. biophys. Acta* 105, 377 (1965).

¹⁵ J. R. FOUTS, *Toxic. appl. Pharmac.* 16, 48 (1970).

¹⁶ D. BONSIGNORE, P. CALISSANO and C. CARTASEGNA, *Medna Lav.* 56, 199 (1965).

¹⁷ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).

¹⁸ R. G. SMITH, J. SZAJNAR and L. HECKER, *Envir. Sci. Techn.* 4, 333 (1970).