

Influence of Metyrapone on the hydroxylation of acetanilide by liver microsomes from guinea-pigs of different ascorbic acid status (μg of product formed)

Metyrapone concentration	0	$10^{-6} M$	$10^{-4} M$	$10^{-3} M$	$10^{-2} M$
Scorbutic group	17.8	22.0	25.5	29.0	24.5
		(+21%)	(+36%)	(+51%)	(+32%)
Controls (5 mg ascorbic acid/100 g body-weight daily)	23.5	30.5	26.5	18.0	16.0
		(+31%)	(+13%)	(-23%)	(-32%)

Figures in brackets are the percentage deviations from the non-Metyrapone value.

acetanilide hydroxylation system is summarized in the Table. Scurvy induced a 40% reduction in the hydroxylation system a finding in keeping with earlier observations³. No decrease in microsomal protein was found and the addition of ascorbic acid or isomers of ascorbic acid to liver microsomes did not influence the rate of hydroxylation. The 'biphasic' effect of Metyrapone, described by Leibman¹⁰ for 'normal' rat liver microsomal fractions was present. However, scorbutic microsomal hydroxylation was stimulated by Metyrapone at all

concentrations used; there was no inhibition at the higher concentration as in the case of microsomes from control animals.

This stimulation by Metyrapone of microsomal acetanilide hydroxylation in scorbutic animals could well indicate a scurvy-induced change in the lipoprotein environment of the membrane-based P-450 enabling a faster transfer of reducing equivalents. A change in liver microsomal membrane conformation in scurvy has also been indicated by a 100-fold increase in the fluorescence emission of the probe 1-anilino-8-naphthalenesulphonate⁴.

Summary. Microsomes from livers of scorbutic guinea-pigs showed a reduced rate of acetanilide hydroxylation. The response of 'scorbutic' liver microsomes to the inhibitor Metyrapone (2-methyl-1, 2 di (3-pyridyl)propan-1-one) was different from that of liver microsomes from non-scorbutic guinea-pigs.

A. M. FIELDING and R. E. HUGHES

Department of Applied Biology,
University of Wales
Institute of Science and Technology,
Cardiff (Wales, G.B.), 25 June 1975.

¹⁰ K. C. LEIBMAN, Molec. Pharmac. 5, 1 (1969).

Stabilität verschiedener Bradykininanaloge gegen Kininase II¹

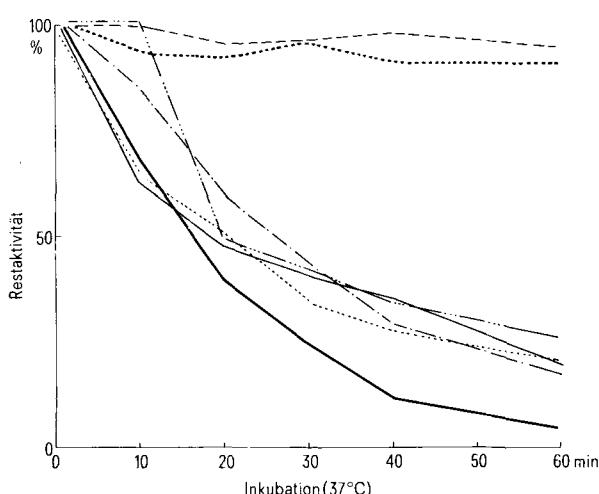
Stability of some Bradykinin Analogues Against Kininase II¹

Für Hormon-Rezeptor-Bindungsstudien mit dem Nonapeptid Bradykinin an Membranfraktionen aus Rattenuterus bzw. Rattenduodenum ist es erforderlich, den raschen enzymatischen Abbau dieses Peptidhormons zu verhindern. Das kann mit Enzyminhibitoren oder durch den Einsatz abbaustabiler Bradykininanaloge erreicht

werden. So unterdrückt z.B. der Einsatz von *ortho*-Phenanthrolin die enzymatische Inaktivierung des Hormons durch die Mikrosomen- und Membranfraktionen². Es muss jedoch damit gerechnet werden, dass die Anwesenheit von *ortho*-Phenanthrolin die Hormon-Rezeptor-Bindungsuntersuchungen verfälscht. Wir waren deshalb bemüht, kininasestabile Bradykininanaloge mit hoher biologischer Aktivität aufzufinden.

Wie wir in früheren Arbeiten durch Einsatz von verschiedenen Kininasehemmstoffen zeigen konnten, enthalten Mikrosomen- und Membranfraktion aus Rattenuterus Kininase II². Dieses strukturgebundene proteolytische Enzym spaltet von dem Nonapeptid Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg das C-terminale Dipeptid ab³. Wir haben deshalb eine Reihe von Bradykininanalogen mit Variationen in den Positionen 8 und 9 auf ihren Abbau durch die Membranfraktion aus Rattenuterus und die Mikrosomenfraktion aus Rattenduodenum untersucht.

Methode. Die Synthesen und die biologischen Aktivitäten der als Substrat eingesetzten Bradykininanaloge



Abbau von Bradykinin und verschiedenen Bradykininanalogen durch die Membranfraktion aus Rattenuterus (75 µg Protein Uterusmembranen pro Inkubationsansatz). — Bradykinin; ······ [8-erythro-Phenylserin]-Bradykinin; ······ [8-threo-Phenylserin]-Bradykinin; - - - [8-erythro-α-Amino-β-phenylbuttersäure]-Bradykinin; ······ [8-Cyclohexylalanin]-Bradykinin; - - - - [6-Glycin, 8-Tyrosin]-Bradykinin; - - - - - [9-Homoarginin]-Bradykinin.

¹ 2. Mitteilung: Untersuchungen an bradykininbindenden Zellfraktionen.

² T. JANKOVA, I. PAEGELOW, S. REISSMANN and H. AROLD, Acta biol. med. germ. 34, 9 (1975).

³ H. Y. T. YANG und E. G. ERDÖS, Nature, Lond. 215, 1402 (1967).

Abbau von Bradykinin und verschiedener Bradykininanaloge durch die Mikrosomenfraktion aus Rattenduodenum (2 µg Protein pro Inkubationsansatz)

Substrat	Konzentration an Substrat (µg)	Restaktivität an Substrat nach Inkubation bei 37°C		Biologische Aktivität	
		40 Min.	60 Min.	Ratten-Uterus	Meerschw.-Ileum
Bradykinin	1,25	4,5	4,5	100	100
Bradykinin + <i>o</i> -Phenanthrolin	1,25	91	87		
[8-erythro-Phenylserin]-Bradykinin ^{4,5}	2,5	98	98	13	6
[8-threo-Phenylserin]-Bradykinin ^{4,6}	1,25	30	22	8	3
[8-erythro- α -Amino- β -phenylbuttersäure]-Bradykinin ^{4,7}	1,25	77	78	52	21
[6-Glycin, 8-Tyrosin]-Bradykinin ⁸	5,0	32	24	0,4	0,6
[8- β -Cyclohexylalanin]-Bradykinin ⁹	1,25	12	2	14	11
[9-Homoarginin]-Bradykinin ^{4,10}	1,25	73	59	10	24

sind von uns in früheren Arbeiten beschrieben worden⁴⁻¹⁰. Mikrosomen- und Membranfraktion aus Uterus und Duodenum von Wistar-Ratten isolierten wir nach einer von uns ausgearbeiteten Methode^{2,11}.

Die kininabbauende Aktivität der Membran- und Mikrosomenfraktion (75 µg Protein Uterusmembranen; 2 µg Protein Duodenummikrosomen) wurde durch Inkubation mit Bradykinin und Bradykininanaloge (1,25 bis 5 µg in 0,4 ml 0,1 M Tris-Puffer, pH 7,5) bei 37°C bestimmt. Die Restaktivität des Bradykinins ermittelten wir nach 10, 20, 30, 40 und 60 Min. am isolierten Meerschweinchenileum (Tyrode-Lösung, Carbogenbegasung). Darüber hinaus bestimmten wir die Abbaugeschwindigkeit von $\text{Na-}^3\text{Tritiumacetyl-Bradykinin}$ (1,1 Ci/mMol) und einigen Analoga mittels papierelektrophoretischer Trennung (feuchte Kammer, Schleicher und Schüll-Papier 2040A, 6% Essigsäure als Elektrolyt, 23V/cm) von Ausgangs- und Spaltprodukt und anschließender Sintillationszählung. Die nach beiden Methoden erhaltenen Werte stimmen überein.

Ergebnisse und Diskussion. Der Abbau der Bradykininanaloge durch die Membranfraktion aus Rattenuterus ist graphisch dargestellt. Die Tabelle gibt den Abbau durch die Mikrosomenfraktion aus Rattenduodenum wieder. Als stabil gegen den enzymatischen Abbau durch die Uterus-Membranfraktion erwiesen sich die beiden Bradykininanaloge [8-erythro- α -Amino- β -phenylbuttersäure]-Bradykinin und [8-erythro- β -Phenylserin]-Bradykinin. Da das letztere nur eine biologische Aktivität von 13 %, bezogen auf Bradykinin, am Uterus besitzt, ist das [8-erythro- α -Amino- β -phenylbuttersäure]-Bradykinin mit einer Aktivität von 52 % für Hormon-Rezeptor-Bindungsstudien geeigneter. Auch bei der enzymatischen Inaktivierung durch die Mikrosomenfraktion aus Rattenduodenum zeigt sich, dass die beiden Analoga nicht oder nur langsam abgebaut werden. Das [8-erythro- α -Amino- β -phenylbuttersäure]-Bradykinin ist gegen diese Mikrosomenfraktion nicht so stabil wie gegen die Membranfraktion aus Rattenuterus. Das ist wahrscheinlich auf die Anwesenheit noch anderer bradykininabbauender Enzyme zurückzuführen.

Die Substitution des β -C-Atoms des Phenylalaninrestes in Position 8 der Bradykininsequenz verhindert bei Vorliegen der erythro-Konfiguration die enzymatische Abspaltung des C-terminalen Dipeptides 8-9 durch die Kininase II der untersuchten Membran- bzw. Mikrosomenfraktion.

Die Kininase II der beiden Präparationen spaltet sehr stereospezifisch. Während [8-erythro- β -Phenylserin]-Bradykinin stabil ist, wird [8-threo- β -Phenylserin]-Brady-

kinin mit annähernd gleicher Geschwindigkeit wie Bradykinin selbst abgebaut.

Summary. Some analogues of bradykinin, especially with replacements by other amino acids of phenylalanine in position 8, have been investigated for enzymatic stability against kininase II from rat duodenum microsomes and rat uterus plasma membranes, respectively. As compared with bradykinin, two of the analogues, [8-erythro- β -phenylserine]- and [8-erythro- α -Amino- β -phenylbutyric acid]-Bradykinin were stable to enzymatic degradation. Therefore, the latter may be used for studies in hormone-receptor interaction.

S. REISSMANN, I. PAEGELOW, H. LEISNER und H. AROLD¹²

*Sektion Biologie, Wissenschaftsbereich
Allgemeine Biochemie der Friedrich-Schiller-Universität,
August-Bebel-Strasse 6-8,
DDR-69 Jena (Deutsche Demokratische Republik, DDR),
und Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Rostock, Leninallee 70, DDR-25 Rostock
(Deutsche Demokratische Republik, DDR), 28. Mai 1975.*

⁴ S. REISSMANN, I. PAEGELOW und H. AROLD, *Acta biol. med. germ.* 33, 77 (1974).

⁵ H. AROLD und H. FEIST, *J. prakt. Chem.* 312, 1145 (1970).

⁶ H. AROLD und S. REISSMANN, *J. prakt. Chem.* 312, 1130 (1970).

⁷ H. AROLD, S. REISSMANN und M. EULE, *J. prakt. Chem.* 316, 93 (1974).

⁸ S. REISSMANN, M. P. FILATOVA, H. AROLD und V. T. IVANOV, *J. prakt. Chem.*, im Druck.

⁹ Das [8-Cyclohexylalanin]-Bradykinin wurde uns freundlicherweise von dem Shemyakin-Institut für Biorganische Chemie der Akademie der Wissenschaften der UdSSR, Moskau, zur Verfügung gestellt.

¹⁰ H. AROLD und D. STIBENZ, *J. prakt. Chem.* 312, 1161 (1970).

¹¹ T. JANKOVA, C. LIEBMANN, R. REISSMANN, H. STEINMETZGER, S. REISSMANN und H. AROLD, *Expl. Path.*, in Vorbereitung.

¹² Frau Dr. M. P. FILATOVA aus dem Shemyakin-Institut für Biorganische Chemie der Akademie der Wissenschaften der UdSSR, Moskau, danken wir für ihre Mitarbeit bei der Erstellung der Arbeitskonzeption. Für die Präparation der Membranen sei Frau T. JANKOVA, Herrn C. LIEBMANN und Herrn H. STEINMETZGER herzlich gedankt. Wir danken Fr. R. RASPE, Fr. B. SCHILLING und Frau I. AGRICOLA für die gute technische Mitarbeit bei der biologischen Wertbestimmung und der Präparation der Membran - bzw. Mikrosomenfraktion.