

theseweg in Testesgewebe wohl durchweg von untergeordneter Bedeutung. Dass die Umsetzungen in der  $\Delta^6$ -Reihe *in vitro* mit Testesgewebe (Rind) trotzdem besser verlaufen, stellt abgesehen von möglichen Spezies-Unterschieden nur einen scheinbaren Widerspruch dar, da nur in Nebennieren, nicht aber in Testes mit starken Konkurrenzreaktionen in Form der 11 $\beta$ - und 21-Hydroxylierungen zu rechnen ist.

**Summary.** The transformation of  $\Delta^5$ -pregnenolone into 17 $\alpha$ -hydroxy- $\Delta^5$ -pregnenolone, and of the latter into DHA, is shown to occur in homogenates and fractions thereof, both of bovine adrenal and testicular tissue. The relative significance of these reactions for the biogenesis of androgens in normal and neoplastic tissue is discussed.

F. W. KAHNT, R. NEHER, K. SCHMID  
und A. WETTSTEIN

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel,  
17. Oktober 1960.

### Zur Frage des pH-Optimums des Pepsins

Es steht fest, dass die synthetisch hergestellten sogenannten Peptidsubstrate pH-Optima der Pepsinwirkung aufweisen, die im schwach sauren Gebiet um pH 4 liegen. Im Gegensatz hierzu herrscht noch weiterhin die Meinung vor, dass natürliche Proteine *durchweg* am besten zwischen pH 1,5–2 angegriffen werden. CHRISTENSEN<sup>1</sup> findet, dass sich bei denaturierten Proteinen das Optimum in das Gebiet von pH 2–4 verschiebt, was er für  $\beta$ -Lactoglobulin, Hämoglobin und Casein nachweist.

Wir haben zur Prüfung des Wirkungsbereiches des Pepsins 11 verschiedene zum Teil kristalline, zum Teil native Proteine untersucht, indem wir den Substratschwund bei verschiedenem pH im Zeitablauf verfolgten. Um den katheptischen Effekt, der in wenig gereinigten Präparaten von Pepsin zu beobachten ist, auszuschliessen, haben wir unser Enzym mehrfach umkristallisiert.

#### Methodik

**Enzym.** 5mal umkristallisiertes Pepsin nach Northrop.

**Methode.** Analog der Edestinmethode von BUCHS<sup>2</sup> Trübungsmessung auch für andere Proteine. Diese müssen löslich sein, und ihre isoelektrische Zone darf nicht in den Messbereich fallen, noch dürfen andere Flockungen vor sich gehen. Aus diesem Grunde kann Casein nicht untersucht werden, dessen Flockung durch Pepsin bis gegen pH 2,7 vor sich geht.

**Herkunft des Materials.** Pepsin kristallisiert von Worthington (Freehold, N. J.). Avenin nach Osborne selbst dargestellt. Gliadin, Edestin, Zein, kristallisiertes Ovalbumin, kristallisiertes Hämoglobin (Rind) von Nutrit. Biochem. C. (Cleveland, Ohio). Fibrinogen, Thrombin von Hoffmann-La Roche (Basel). Paracaseine siehe Text.

**Messinstrument.** Photometer Eppendorf. Da die Eichkurven der Substrate als gekrümmte Kurven verlaufen, verzichteten wir auf Wiedergabe der Substratkonzentrationen und drücken die Messungen in Skalenteilen aus (Ablesungswert zum angegebenen Zeitpunkt abzüglich Anfangsablesung). Die Verläufe, besonders die Optima, sind auch so gut erkennbar.

**Ansätze.** Stets 1 mg Enzym gegenüber 20–30 mg Substrat in einem Volumen von 6 ml, Pufferung durchweg mit Glykokoll-Salzsäure 0.1 M. Prolamine wurden mittels der Alkoholmethode in Lösung gebracht<sup>3</sup>.

### Versuchsergebnisse

#### 1. Edestin

pH-Werte	1.79	2.60	3.08	3.30	3.53	4.00
Nach 2 min	14.3	11.7	45.0	5.5	5.0	0.5
5 min	51.0	84.5	91.7	8.2	7.9	3.2
10 min	84.2	93.0	94.5	15.8	10.6	4.0
20 min	90.0	94.5	94.5	46.2	26.0	9.5

Ergebnis: Optimum bei 3.08.

#### 2. Gliadin

pH-Werte	1.94	2.04	2.41	3.34	3.85
Nach 2 min	50.1	59.9	54.7	18.5	17.6
5 min	73.2	67.0	65.1	53.0	26.5
10 min	78.3	63.1	77.9	63.0	44.5
20 min	78.9	71.9	70.9	66.0	63.0

Ergebnis: Optimum bei 1.94.

#### 3. Avenin

pH-Werte	1.87	2.36	2.58	3.46	3.55	3.85
Nach 2 min	26.2	11.1	8.6	5.5	11.4	10.5
5 min	59.6	37.7	20.3	7.8	16.9	17.3
10 min	71.4	57.1	44.1	16.8	18.0	22.6
20 min	71.3	60.2	60.3	32.0	32.2	27.7

Ergebnis: Optimum bei 1.87. Wirkungsabnahme nach rechts schneller als bei Gliadin.

#### 4. Zein

pH-Werte	1.91	2.12	2.58	3.06	3.25	3.53
Nach 2 min	16.1	13.0	18.1	flockt	flockt	flockt
5 min	33.9	31.1	29.4	flockt	flockt	flockt
10 min	47.2	56.8	46.1	flockt	flockt	flockt
20 min	63.2	69.9	53.0	flockt	flockt	flockt

Ergebnis: Optimum bei 1.91–2.12.

#### 5. Ovalbumin, nicht kristallisiert

pH-Wert	1.90	2.46	2.54	2.95	3.28	3.79	3.92
Nach 2 min	16.9	16.8	14.0	10.5	9.0	30.2	9.0
5 min	33.4	22.0	14.0	16.7	18.2	32.9	18.2
10 min	37.3	24.5	16.2	24.7	20.3	31.8	20.3
20 min	41.9	28.4	16.1	26.9	21.0	41.6	21.0

Ergebnis: Zwei Optima, bei 1.90 und bei 3.79!! Die Papierelektrophorese ergibt, dass Albumin im chemischen Sinne nur 45.4% des Präparates ausmacht; es sind zwei Gipfel der Conalbumine vorhanden und das Plateau des Ovomucoides.

#### 6. Ovalbumin, kristallisiert

pH-Werte	1.78	2.06	2.46	3.09	3.22	3.76
Nach 2 min	7.3	19.8	8.0	9.0	9.7	8.9
5 min	14.8	32.9	13.2	8.5	16.2	9.0
10 min	55.5	34.6	13.5	14.0	17.1	10.1
20 min	58.0	36.8	14.2	15.9	16.7	15.2

Ergebnis: Optimum bei 1.78–2.06. Das zweite Optimum des vorigen Versuches entfällt. Die Papierelektrophorese ergibt, dass 85.1% des Substrates Albumin sind.

#### 7. Fibrinogen

pH-Werte	1.64	2.28	2.93	3.25	3.73
Nach 2 min	13.9	18.3	24.4	13.5	8.9
5 min	42.2	48.5	48.1	28.0	19.4
10 min	48.0	55.0	58.9	44.2	20.0
20 min	50.6	56.6	60.1	52.9	34.9

Ergebnis: Optimum bei 2.93.

<sup>1</sup> L. K. CHRISTENSEN, Arch. Biochem. Biophys. 57, 163 (1955).

<sup>2</sup> S. BUCHS, Die Biologie des Magenkathepsins (Karger, Basel 1947).

<sup>3</sup> E. BERGER und E. FREUDENBERG, Med. exp. 3, im Druck (1961).

8. *Thrombin*

pH-Werte	1.98	2.78	3.17	3.58	4.04
Nach 2 min	42.5	54.7	30.9	20.2	flockt
5 min	48.6	62.1	42.0	29.3	flockt
10 min	51.3	62.1	44.1	29.5	flockt
20 min	51.8	62.1	44.5	33.5	flockt

Ergebnis: Optimum bei 2.78.

9. *Kristallines Rinderhäoglobin*

pH-Werte	1.55	1.95	2.58	3.19	3.48	4.00
Nach 2 min	38.2	38.2	41.0	45.5	35.7	25.7
5 min	39.3	40.2	42.3	49.9	44.3	32.4
10 min	41.7	42.5	45.1	51.0	47.4	36.8
20 min	44.7	42.8	45.8	54.4	47.4	38.6

Ergebnis: Optimum bei 3.19.

10. *Parakasein aus Frauenmilch*

Durch Labung aus Frauenmilchproben gewonnen und gepoolt. Trockenpulver in 0.9% NaCl aufgenommen und geschüttelt, zentrifugiert. Die Prozedur wird mehrmals wiederholt, um anhaftende Proteine der Molke zu entfernen. Zuletzt wird das Sediment in Wasser aufgeschwemmt, mittels  $n/1$  HCl pH 1.45 eingestellt und mehrere Stunden mechanisch gerührt. Es geht nicht alles in Lösung! Daher wird filtriert und der gelöste Anteil verwendet. Kjeldahl-Bestimmung ergibt 0.616% Protein.

pH-Werte	1.71	2.28	2.71	3.13	3.73
Nach 2 min	26.3	18.8	15.6	19.8	20.8
5 min	39.1	39.5	32.1	29.9	35.8
10 min	46.2	42.7	38.9	38.9	39.7
20 min	49.5	50.0	43.2	44.0	42.7

Ergebnis: Optimum bei 1.71, beträchtliche Wirkung noch bis 3.73.

11. *Parakasein aus Kuhmilch*

Aus Kaseinpulver gewonnen, das zu 2% in soviel HCl aufgeschwemmt wird, dass pH 3.4 entsteht (das heisst unterhalb der isoelektrischen Zone!). Nun wird mit Kälberlab bei 37°C 1 h gelabt. Gerinnung tritt nicht ein, weil das System kalkfrei ist. Anschliessend 15 min bei 65°C inaktiviert.

pH-Werte	1.58	2.00	2.57	3.04	3.28	3.60
Nach 2 min	44.3	24.9	24.8	20.3	25.7	Flockung
5 min	53.5	51.7	52.4	51.9	45.8	Flockung
10 min	57.0	55.8	56.2	55.5	51.0	Flockung
20 min	59.4	57.7	57.9	55.9	52.6	Flockung

Ergebnis: Optimum bei 1.58, beträchtliche Wirkung bis pH 3.28. Ein weiterer Versuch, bei welchem oberhalb der isoelektrischen Zone bei pH 5.9 gelabt wurde, hatte sinngemäss das gleiche Ergebnis.

In diesem zweiten Parakasein-Versuch ergab sich bei pH 3.16 nochmals eine Wirkungssteigerung, die aber in drei weiteren gleich angesetzten Versuchen nicht reproduziert werden konnte.

**Diskussion.** Wir finden die Optima der Umsätze in einer Gruppe von Proteinen zwischen pH 1.5 und 2.0. Hierzu gehören die Prolamine Gliadin, Avenin, Zein sowie kristallisiertes Eialbumin und der Albuminanteil von natürlichem Eiereiweiss.

Oberhalb dieser Zone finden sich folgende Optima:

krist. Hämoglobin	pH 3.19	Thrombin	pH 2.78
Conalbumine	pH 3.79	Edestin	pH 3.08
Fibrinogen	pH 2.93		

Nur beim natürlichen Eiereiweiss finden sich 2 gut getrennte Optima, die man folgerichtig auf die verschiedenen Komponenten beziehen muss. Da Ovomucoid nicht angreifbar ist, kommen die Conalbumine in Betracht.

Breite Wirkungsspektren mit wenig scharf abgegrenztem Optimum haben die Parakaseine aus Frauen- und aus Kuhmilch, während die Optima des Hämoglobins, Thrombins, Fibrinogens und Edestins besser hervortreten. Gliadin und Avenin gehören wieder zu den Substanzen, die in einem weiteren pH-Bereich angegriffen werden. Über Zein kann keine Aussage gemacht werden, weil die isoelektrische Flockung interferiert. Bei natürlichen Proteinen liegt also das Wirkungsoptimum des Pepsins keineswegs immer zwischen pH 1.5 und 2.0.

Da unsere Ergebnisse mit einer Substratschwundmethode gewonnen wurden, bleibt die Frage offen, ob eine Methode der Messung der Endprodukte gleiche Ergebnisse zeitigt. Die Methoden der ersten Art haben dadurch für Pepsin Berechtigung, dass sie sowohl die Beseitigung der biologischen Spezifität wie die Vorbereitung für die tiefer gehende Spaltung anzeigen, die die Darmverdauung bewirkt.

**Summary.** Natural and purified proteins were split by crystallized pepsin. The break down of substrates was followed by a turbidimetric method. pH optima were found from 1.5 to 3.8. Only unpurified egg albumin had two optima, crystallin had one in the acid range. Ovomucoid not being split by pepsin, the second peak at pH 3.79 is referred to conalbumin. While the disintegration of caseinogen becomes slow with decreasing acidity, this is not true for casein (paracasein) which is well split up to pH 3.28 (cows casein) or 3.73 (womens casein). Nevertheless, the optimum is in the range of 1.5–2.0, like most proteins. Above this limit, the following optima were found: fibrinogen 2.93, thrombin 2.78, edestin 3.08, crystallized hemoglobin 3.19, conalbumin 3.79.

S. BUCHS und E. FREUDENBERG

Basel, Feierabendstrasse 57.

### Die Beeinflussung der Resorption von Radiocer aus einem intramuskulären Depot durch Diäthylentriaminpentaessigsäure

Die Kontamination von Verletzungen mit radioaktiven Substanzen stellt einen in der Praxis relativ häufigen Inkorporationsmodus dar<sup>1</sup>. Handelt es sich hierbei um grössere Mengen eines schlecht resorbierbaren Radionuklids, so ist mit einer lokalen Strahlenschädigung des betroffenen Gewebes zu rechnen. Ist die chirurgische Entfernung des radioaktiven Depots nicht durchführbar, sollte eine Intensivierung der Resorption und Ausscheidung des Radionuklids durch Verabfolgung geeigneter Chelatbildner angestrebt werden. Bisher liegen nur wenige und bezüglich ihrer Ergebnisse nicht überzeugende experimentelle Untersuchungen<sup>2,3</sup> zu dieser Frage vor. Allerdings wird der in diesem Zusammenhang untersuchte Chelatbildner, die Äthylendiamintetraessigsäure, im Rahmen einer Dekorporationstherapie neuerdings durch die erheblich wirksamere Diäthylentriamin-N,N',N'',N'''-pentaessigsäure (DTPA) verdrängt<sup>4</sup>, und zur Klärung der Frage,

<sup>1</sup> M. W. ROSENTHAL (edit.), *Therapy of Radioelement Poisoning*, ANL-5584 (1956).

<sup>2</sup> H. FOREMAN, T. T. TRUJILLO, O. JOHNSON und C. FINNEGAN, *Proc. Soc. exp. Biol.*, N. Y. **89**, 339 (1955).

<sup>3</sup> J. G. HAMILTON und K. G. SCOTT, *Proc. Soc. exp. Biol.*, N. Y. **83**, 301 (1953).

<sup>4</sup> A. CATSCH, *Fed. Proc.*, im Druck; hier weitere Literatur.