

### 34. Untersuchung über Proteasen.

#### 1. Aminosäuren, Blausäure und Pyrophosphat als Effektoren des Pepsins

von O. Wiss.

(24. XII. 45.)

Nachdem es *Northrop*<sup>1)</sup> und seinem Arbeitskreis gelungen ist, eine grosse Anzahl der proteolytischen Enzyme in kristallisierter Form darzustellen, stehen die Proteasen in der Entwicklungsreihe der Reinezyme an erster Stelle. Im Falle des Pepsins ist in den letzten Jahren das Tyrosin der Enzymmolekel als entscheidender Faktor der Enzymwirkung erkannt worden<sup>2-6)</sup>. Neuerdings ist die Frage diskutiert worden, ob nicht noch weitere solche spezifische Gruppen von Bedeutung sind. *Tiselius*, *Henschen* und *Svensson*<sup>7)</sup> haben das nach *Northrop* gereinigte kristallisierte Pepsin der Elektrophorese unterworfen. Es liessen sich so weitere inaktive Proteinanteile abtrennen. Aus der Tatsache, dass die Aktivität des so gereinigten Enzyms geringer war, als die des Ausgangsmaterials, und dass sie je nach Herkunft des Pepsins grossen Schwankungen unterlag, vermutet *Linderström-Lang*<sup>8)</sup>, dass Aktivatoren an der Reaktion beteiligt sein könnten. Soweit sich die Literatur überblicken lässt, liegen bisher jedoch keine Untersuchungen vor, welche die Existenz von Aktivatoren des Pepsins nachgewiesen hätten. *Edlbacher* und *Wiss*<sup>9)</sup> haben am Beispiel der *d*-Aminosäure-oxydase nachweisen können, dass Aminosäuren und Proteine als negative und positive Effektoren wirken können. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass Aminosäuren in entsprechender Weise die Pepsinaktivität beeinflussen. Untersuchungen über die Effektorenwirkung der Blausäure und des Pyrophosphats, die an der *d*-Aminosäure-oxydase<sup>10)</sup> und am Pepsin zur Durchführung gelangten, ergaben im Prinzip das gleiche Resultat: Pyrophosphat und Blausäure können als Effektoren der *d*-Aminosäure-oxydase und des Pepsins in Erscheinung treten. Es war aus früheren, oben erwähnten Mitteilungen bekannt, dass der Aktivierungseffekt von Aminosäuren von der Enzym-

<sup>1)</sup> Zusammenfassende Darstellung: *Crystalline Enzymes* by *John Northrop* (Columbia University Press 1939).

<sup>2)</sup> *Herriot R. M.*, *J. gen. Physiol.* **19**, 283 (1936).

<sup>3)</sup> *Herriot, R. M.*, *J. gen. Physiol.* **20**, 335 (1937).

<sup>4)</sup> *Philpot, J. S. L.* and *Small, P. A.*, *Biochem. J.* **32**, 534 (1938).

<sup>5)</sup> Dieselben: *Biochem. J.* **32**, 542 (1938).

<sup>6)</sup> Dieselben: *Proc. Roy. Soc. (London) [A]* **170**, 62 (1939).

<sup>7)</sup> *Biochem. J.* **32**, 1814 (1938).

<sup>8)</sup> *Ann. Rev. of Bioch.* **8**, 38 (1939).

<sup>9)</sup> *Helv.* **28**, 797 und 1111 (1945).

<sup>10)</sup> *S. Edlbacher, O. Wiss* und *A. Walser*, *Helv.* **29**, 162 (1946).

konzentration abhängig ist, indem bei Verwendung geringer Enzymkonzentration die Aktivierung deutlich sichtbar wird. Weiterhin liess sich damals nachweisen, dass mehrere gleichzeitig zugesetzte Effektoren sich in komplexer Weise gegenseitig beeinflussen, so dass sich unter Umständen die Aktivierungseffekte gegenseitig aufheben können. Es waren deshalb im Falle des Pepsins, wo Substrat und Abbauprodukt als Eiweisskörper die Enzymaktivität beeinflussen könnten, keine Steigerungseffekte vom Ausmass der *d*-Aminosäureoxydase-Aktivierung zu erwarten. In Übereinstimmung mit den erwähnten Zusammenhängen hat sich auch gezeigt, dass nur bei kurzen Expositionszeiten sich die erwarteten Effekte nachweisen liessen.

## Experimenteller Teil.

### 1. Methoden.

Pepsinum purum (*Siegfried*, Zofingen) wurde nach den Angaben von *Northrop* (l. c.) gereinigt. Als Präparat A bezeichneten wir das durch Magnesiumsulfat gefällte und ausgewaschene Fermentprotein, welches als Trockenpräparat im Eisschrank aufbewahrt wurde. Im Verlauf des weiteren Reinigungsvorganges fällt das wirksame Ferment teils krystallin, teils als amorpher Niederschlag aus. Das Trockenpräparat dieser Reinigungsstufe ist als Präparat B beschrieben.

Zur Bestimmung der Pepsinaktivität benötigten wir eine sehr empfindliche Methode, um auch sehr kleine Abbaugrössen genau ermitteln zu können. Die Titration der freien Aminogruppen oder deren volumetrische Bestimmung erwies sich für unsere Untersuchungszwecke als ungeeignet. In Anlehnung an die photometrische Bestimmungsmethode des abgebauten Substrates nach *Anson* und *Mirsky*<sup>1)</sup> haben wir nach Entweiessung im Filtrat die Imidazolwerte bestimmt. Nach Ablauf der Expositionszeit wurden die Versuchsansätze mit 10 cm<sup>3</sup> 5-proz. Trichloressigsäure enteiweisst und im Filtrat die Imidazolwerte nach der von *Edlbacher* und Mitarbeiter<sup>2)</sup> beschriebenen Methode stufenphotometrisch bestimmt. Als Mass des Substratabbaues ist in den Tabellen die im Filtrat nachgewiesene Histidinmenge angegeben. Zur Kontrolle der so ermittelten Versuchsergebnisse wurde in anderer Versuchsanordnung das nicht abgebaute Substrat nephelometrisch<sup>3)</sup> nachgewiesen. Die Methode ist sehr empfindlich, erwies sich jedoch für die vorliegende Untersuchung als nicht sehr geeignet. Da nämlich die Effektorenwirkung in erster Linie bei Verwendung von kleinen Enzymkonzentrationen und nach kurzer Expositionszeit in Erscheinung tritt, ist das Substrat nach Ablauf der Reaktion noch in grossem Überschuss vorhanden. Auch ein kleiner Fehler bei der Bestimmung des restlichen Substrates verursacht bei der Berechnung des abgebauten Anteiles grosse Ungenauigkeit. Die typischen Steigerungseffekte liessen sich jedoch auch bei Verwendung der nephelometrischen Bestimmungsmethode eindeutig nachweisen. Ein aliquoter Teil der Versuchslösung wurde mit Wasser auf 20 cm<sup>3</sup> ergänzt und mit 5 cm<sup>3</sup> 20-proz. Sulfosalicylsäure versetzt. Der Trübungswert wurde nach Ablauf von 15 Minuten mittels des *Pulfrich*-Photometers bestimmt.

Als Substrat gelangte im Falle der Imidazolbestimmungsmethode Rinderhämoglobin zur Verwendung<sup>4)</sup>. Während 48 Stunden dialysierter Erythrocytenbrei wurde im *Straub*'schen Trockenapparat getrocknet. Zur nephelometrischen Bestimmung wurde Edestin als Substrat verwendet. Der Säuregrad betrug in allen Versuchsansätzen m/30 HCl.

### 2. Versuche mit wenig gereinigtem Pepsin (Präparat A).

Es lässt sich nachweisen, dass sich Pepsin in Gegenwart unspezifischer Begleitstoffe durch Aminosäuren mässig hemmen lässt.

<sup>1)</sup> J. gen. Physiol. **16**, 59 (1932/33).

<sup>2)</sup> Z. physiol. Ch. **270**, 158 (1941).

<sup>3)</sup> *Rona* und *Kleinmann*, Bioch. Z. **174**, 18 (1926).

<sup>4)</sup> l. c. *Northrop*.

**Tabelle 1.**Gesamtflüssigkeitsvolumen = 7 cm<sup>3</sup>.

Temperatur = 25°.

Versuchsdauer = 10 Minuten.

| Pepsin<br>Präparat A<br>mg | Hämoglo-<br>bin<br>Endkonz. | Zusatz                        | mg Histidin<br>im Filtrat<br>nachgewiesen | Hem-<br>mung |
|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---|--------------|
| 5                          |                             |                               | 0,61                                      |              |
| 5                          | 1,4%                        |                               | 2,89                                      |              |
| 5                          | 1,4%                        | Glykokoll m/50                | 2,24                                      | - 29%        |
| 5                          | 1,4%                        | <i>l</i> -Alanin m/50         | 2,45                                      | - 19%        |
| 5                          | 1,4%                        | <i>l</i> -Asparaginsäure m/50 | 2,29                                      | - 26%        |

**Tabelle 2.**Gesamtflüssigkeitsvolumen = 7 cm<sup>3</sup>.

Temperatur = 25°.

Versuchsdauer = 10 Minuten.

| Pepsin<br>Präparat A<br>mg | Hämoglobin<br>Endkonz. | <i>l</i> -Aspara-<br>ginsäure<br>Zusatz | mg Histidin<br>im Filtrat<br>nachgewiesen | Hem-<br>mung |
|----------------------------|------------------------|---|---|--------------|
| 0,25                       | 1,4%                   |   | 0,587                                     |              |
| 0,25                       | 1,4%                   | m/50                                    | 0,476                                     | - 19%        |
| 0,125                      | 1,4%                   |   | 0,34                                      |              |
| 0,125                      | 1,4%                   | m/50                                    | 0,281                                     | - 17%        |

## 3. Versuche mit weitgehend gereinigtem Pepsin (Präparat B).

## a) Hemmung und Aktivierung durch Aminosäuren.

Bei Verwendung fallender Enzymkonzentrationen geht die hemmende Wirkung der Aminosäuren allmählich in eine Aktivierung über. Alle untersuchten Aminosäuren zeigten die typische Effektorenwirkung.

**Tabelle 3.**Gesamtflüssigkeitsvolumen = 7 cm<sup>3</sup>.

Temperatur = 38°.

Versuchsdauer = 1 Stunde.

| Pepsin<br>Präparat B<br>mg | Hämoglobin<br>Endkonz. | <i>d</i> -Alanin<br>Zusatz | mg Histidin<br>im Filtrat<br>nachgewiesen |                  |
|----------------------------|------------------------|----------------------------|---|------------------|
| 1                          | 1,4%                   |                            | 3,94                                      |                  |
| 1                          | 1,4%                   | m/60                       | 3,54                                      | Hemmung 10%      |
| 0,25                       | 1,4%                   |                            | 3,34                                      |                  |
| 0,25                       | 1,4%                   | m/60                       | 2,72                                      | Hemmung 19%      |
| 0,06                       | 1,4%                   |                            | 1,24                                      |                  |
| 0,06                       | 1,4%                   | m/60                       | 1,46                                      | Aktivierung 18%  |
| 0,015                      | 1,4%                   |                            | 0,31                                      |                  |
| 0,015                      | 1,4%                   | m/60                       | 0,68                                      | Aktivierung 120% |

Tabelle 4.

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 7 cm<sup>3</sup>.

Temperatur = 38°.

Versuchsdauer = 1 Stunde.

| Pepsin<br>Präpa-<br>rat B<br>mg | Hämoglobin<br>Endkonz. | <i>l</i> -Histidin<br>Zusatz | <i>l</i> -Asparagin-<br>säure Zusatz | mg Histidin<br>im Filtrat<br>nachgewiesen | Effekt |
|---------------------------------|------------------------|------------------------------|--------------------------------------|---|--------|
| —                               | 1,4%                   | m/10000                      |                                      | 0   |        |
| 0,05                            | 1,4%                   |                              |                                      | 1,12                                      |        |
| 0,05                            | 1,4%                   | m/10000                      |                                      | 1,34                                      | + 20%  |
| 0,05                            | 1,4%                   |                              | m/50                                 | 1,16                                      | + 5%   |
| 0,0125                          | 1,4%                   |                              |                                      | 0,357                                     |        |
| 0,0125                          | 1,4%                   | m/10000                      |                                      | 0,615                                     | + 72%  |
| 0,0125                          | 1,4%                   |                              | m/50                                 | 0,442                                     | + 24%  |
| 0,006                           | 1,4%                   |                              |                                      | 0,205                                     |        |
| 0,006                           | 1,4%                   | m/10000                      |                                      | 0,325                                     | + 59%  |
| 0,006                           | 1,4%                   |                              | m/50                                 | 0,27                                      | + 30%  |

Tabelle 5.

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 7 cm<sup>3</sup>.

Temperatur = 38°.

Versuchsdauer = 4 Stunden.

| Pepsin<br>Präpa-<br>rat B<br>mg | Hämoglobin<br>Endkonz. | Zusatz                  | Mol     | mg Histidin<br>im Filtrat<br>nachgewiesen | Effekt |
|---------------------------------|------------------------|-------------------------|---------|---|--------|
| 0,01                            | 1,4%                   |                         |         | 0,75                                      |        |
| 0,01                            | 1,4%                   | <i>d</i> -Alanin        | m/100   | 0,7                                       | - 7%   |
| 0,01                            | 1,4%                   | <i>l</i> -Alanin        | m/100   | 0,71                                      | - 5%   |
| 0,01                            | 1,4%                   | <i>l</i> -Glutaminsäure | m/100   | 0,71                                      | - 5%   |
| 0,01                            | 1,4%                   | <i>l</i> -Histidin      | m/10000 | 0,76                                      | + 1%   |
| —                               | 1,4%                   | <i>l</i> -Histidin      | m/10000 | 0,068                                     |        |
| 0,005                           | 1,4%                   |                         |         | 0,315                                     |        |
| 0,005                           | 1,4%                   | <i>d</i> -Alanin        | m/100   | 0,353                                     | + 12%  |
| 0,005                           | 1,4%                   | <i>l</i> -Alanin        | m/100   | 0,357                                     | + 13%  |
| 0,005                           | 1,4%                   | <i>l</i> -Glutaminsäure | m/100   | 0,442                                     | + 40%  |
| 0,005                           | 1,4%                   | <i>l</i> -Histidin      | m/10000 | 0,459                                     | + 46%  |

## b) Hemmung durch Blausäure.

Bei Verwendung hoher Enzymkonzentration kann Blausäure als Hemmkörper des gereinigten Pepsins wirken. Bei dem relativ hohen Säuregrad ist trotz der sehr kurzen Versuchszeiten anzunehmen, dass sich das zugesetzte Kaliumcyanid teilweise als Cyanwasserstoff verflüchtigt. Das beeinträchtigt jedoch keineswegs die Tatsache, dass Cyanion als Effektor wirkt.

**Tabelle 6.**

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 7 cm<sup>3</sup>.  
 Temperatur = 38°.   
 Versuchsdauer = ½ Stunde.

| Pepsin<br>Präparat B<br>mg | Hämoglobin<br>Endkonz. | KCN   | mg Histidin<br>im Filtrat<br>nachgewiesen | Hemmung |
|----------------------------|------------------------|-------|---|---------|
| 0,5                        | 1,4%                   |       | 5,03                                      |         |
| 0,5                        | 1,4%                   | m/100 | 4,18                                      | -17%    |

**Tabelle 7.**

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 7 cm<sup>3</sup>, Temperatur = 38°.

| Pepsin<br>Präpa-<br>rat B<br>mg | Hämoglobin<br>Endkonz. | KCN  | mg Histidin<br>im Filtrat<br>nachgewiesen | Hem-<br>mung |                          |
|---------------------------------|------------------------|------|---|--------------|--------------------------|
| 2                               | 1,4%                   |      | 2,47                                      |              | } Versuchsdauer<br>6'30" |
| 2                               | 1,4%                   | m/50 | 1,62                                      | -34%         |                          |
| 1                               | 1,4%                   |      | 2,18                                      |              | } Versuchsdauer<br>10'   |
| 1                               | 1,4%                   | m/50 | 1,72                                      | -21%         |                          |

c) Aktivierung durch Blausäure.

Analog zum Verhalten des Pepsins gegenüber von Aminosäuren, lässt sich der Hemmungseffekt der Blausäure durch Verkleinerung der Enzymkonzentration in eine Aktivierung umkehren.

**Tabelle 8.**

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 7 cm<sup>3</sup>.  
 Temperatur = 38°.   
 Versuchsdauer = ½ Stunde.

| Pepsin<br>Präparat B<br>mg | Hämoglobin<br>Endkonz. | KCN   | mg Histidin<br>im Filtrat<br>nachgewiesen | Effekt |
|----------------------------|------------------------|-------|---|--------|
| 0,2                        | 1,4%                   |       | 1,73                                      |        |
| 0,2                        | 1,4%                   | m/100 | 1,67                                      | - 3,5% |
| 0,05                       | 1,4%                   |       | 0,578                                     |        |
| 0,05                       | 1,4%                   | m/100 | 0,595                                     | + 3%   |
| 0,0125                     | 1,4%                   |       | 0,119                                     |        |
| 0,0125                     | 1,4%                   | m/100 | 0,238                                     | + 100% |
| 0,006                      | 1,4%                   |       | 0,077                                     |        |
| 0,006                      | 1,4%                   | m/100 | 0,221                                     | + 187% |

## d) Hemmung durch Pyrophosphat.

Pyrophosphat in hohen Enzymkonzentrationen wirkt als schwacher Inhibitor.

Tabelle 9.

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 7 cm<sup>3</sup>. Temperatur = 38°. Versuchsdauer = ½ Stunde.

| Pepsin<br>Präparat B<br>mg | Hämoglobin<br>Endkonz. | Pyro-<br>phosphat | mg Histidin<br>im Filtrat<br>nachgewiesen | Hemmung |
|----------------------------|------------------------|-------------------|---|---------|
| 0,5                        | 1,4%                   |                   | 5,03                                      |         |
| 0,5                        | 1,4%                   | m/100             | 4,52                                      | - 10%   |

## e) Aktivierung durch Pyrophosphat.

Pyrophosphat aktiviert in kleinen Enzymkonzentrationen das gereinigte Enzym.

Tabelle 10.

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 7 cm<sup>3</sup>. Temperatur = 38°. Versuchsdauer = ½ Stunde.

| Pepsin<br>Präparat B<br>mg | Hämoglobin<br>Endkonz. | Pyro-<br>phosphat | mg Histidin<br>im Filtrat<br>nachgewiesen | Aktivierung |
|----------------------------|------------------------|-------------------|---|-------------|
| 0,2                        | 1,4%                   |                   | 1,73                                      |             |
| 0,2                        | 1,4%                   | m/100             | 1,90                                      | + 13%       |
| 0,05                       | 1,4%                   |                   | 0,578                                     |             |
| 0,05                       | 1,4%                   | m/100             | 0,697                                     | + 21%       |
| 0,0125                     | 1,4%                   |                   | 0,119                                     |             |
| 0,0125                     | 1,4%                   | m/100             | 0,166                                     | + 40%       |
| 0,006                      | 1,4%                   |                   | 0,077                                     |             |
| 0,006                      | 1,4%                   | m/100             | 0,119                                     | + 55%       |

## 4. Nephelometrischer Nachweis der Steigerung der Pepsinaktivität durch Aminosäuren.

Bei Verwendung von gereinigtem Pepsin lässt sich auch der Edestinabbau durch Aminosäuren aktivieren.

Tabelle 11.

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 10 cm<sup>3</sup>. Temperatur = 38°. Versuchsdauer = 25 Min.

| Pepsin<br>Präparat B<br>γ | Edestin<br>Endkonz. | L-Histidin-<br>Zusatz | Abgebautes Substrat<br>abzüglich Leerwert<br>mg % | Aktivierung |
|---------------------------|---------------------|-----------------------|---|-------------|
| 10                        | 40 mg %             |                       | 10,1  |             |
| 10                        | 40 mg %             | m/100                 | 10,6  | + 4%        |
| 5                         | 40 mg %             |                       | 5,8   |             |
| 5                         | 40 mg %             | m/100                 | 6,5   | + 12%       |
| 2,5                       | 40 mg %             |                       | 1,8   |             |
| 2,5                       | 40 mg %             | m/100                 | 3,8   | + 111%      |
| 1,25                      | 40 mg %             |                       | 0,9   |             |
| 1,25                      | 40 mg %             | m/100                 | 3,5   | + 289%      |

Tabelle 12.

Gesamtflüssigkeitsvolumen = 10 cm<sup>3</sup>.  
 Temperatur = 38°.   
 Versuchsdauer = 30 Minuten.

| Pepsin<br>Präpa-<br>rat B<br>$\gamma$ | Edestin<br>Endkonz. | Effektor         | Mol   | Abgebautes<br>Substrat<br>abzüglich Leerwert<br>mg % | Aktivierung |
|---------------------------------------|---------------------|------------------|-------|--|-------------|
| 2                                     | 40 mg %             |                  |       | 0,6  |             |
| 2                                     | 40 mg %             | <i>d</i> -Alanin | m/50  | 2,7  | + 350%      |
| 2                                     | 40 mg %             | <i>d</i> -Alanin | m/200 | 1,9  | + 217%      |
| 2                                     | 40 mg %             | <i>l</i> -Alanin | m/50  | 1,9  | + 217%      |
| 2                                     | 40 mg %             | <i>l</i> -Alanin | m/200 | 1,3  | + 117%      |

### Besprechung der Ergebnisse.

Wenn trotz der schon seit relativ langer Zeit erfolgten Reindarstellung einer ganzen Reihe proteolytischer Fermente noch grosse Unklarheit über deren Wirkungsart, die zur Lösung der Peptidbindungen führt, besteht, so ist dies zum Teil dem Umstand zuzuschreiben, dass es bis heute nicht gelungen ist, die Enzymaktivität mit einer prosthetischen Gruppe in Beziehung zu setzen. Die Kenntnis eines chemisch einwandfrei definierbaren Cofermentes gestattet in vielen Fällen über die Wirkungsweise eines Fermentes genauere Aussagen zu machen. Als typische Beispiele seien hier die Hämin-, Flavin- und Pyridinfermente erwähnt. Es wäre jedoch sicher eine einseitige Betrachtungsweise, die Wirkungen der Enzyme nur auf die chemische Konstitution des Cofermentes zu beziehen; denn es ist bekannt, dass dieselbe prosthetische Gruppe von Fermenten durch Verbindung mit verschiedenen Apofermenten zu spezifischen Einzelleistungen fähig wird. Die gereinigte *d*-Aminosäure-oxydase, ein typisches Beispiel eines Enzyms von spezifischer Wirkungsweise, grossem Reinheitsgrad und bekannter Konstitution des Cofermentes, ist damit als Einzelenzym keineswegs erschöpfend charakterisiert. *Edlbacher* und *Wiss*<sup>1)</sup> konnten zeigen, dass alle untersuchten Aminosäuren und Proteine in spezifischer Weise dessen Wirkungsart modifizieren können. Die hier mitgeteilten Versuchsergebnisse beweisen, dass das Pepsin, ein typischer Vertreter eines sogenannten Proteinenzymes, sich durch Aminosäuren analog der *d*-Aminosäure-oxydase beeinflussen lässt.

Wie aus neueren Untersuchungen hervorgeht, ist die Krystallisation eines Enzymproteins keine Garantie dafür, dass es in reiner Form vorliegt. So haben, wie oben erwähnt, *Tiselius* und Mitarbeiter

<sup>1)</sup> Helv. **28**, 797, 1111 (1945).

(l. c.) nachweisen können, dass von krystallisiertem Pepsineiweiss auf elektrophoretischem Wege weitere inaktive Proteine abgetrennt werden können. Alle diese Tatsachen berechtigen zur Annahme, dass auch im Falle des Pepsins ein Enzymsystem von komplexer Natur vorliegt.

Neben der Charakterisierung von Einzelenzymen durch präparative Trennung nimmt die Abgrenzung einzelner Enzymindividuen durch Hemmkörper und durch die Verschiedenheit der  $p_H$ -Optima in der Enzymchemie breiten Raum ein. Bisher wurden z. B. die Enzyme Pepsin und Kathepsin durch das verschiedene Verhalten in den folgenden Punkten differenziert:

1. Das  $p_H$ -Optimum liegt beim Pepsin zwischen  $p_H$  1—2, beim Kathepsin zwischen  $p_H$  4—5.

2. Pepsin wird durch Cyanwasserstoff und durch Schwefelwasserstoff nicht aktiviert. Kathepsin ist durch die beiden Stoffe deutlich aktivierbar<sup>1)</sup> 2).

3. Bisher hielt man das Kathepsin für ein typisches Endoenzym, während das Pepsin ein Ektoenzym ist.

Die Mehrzahl dieser Unterscheidungsmerkmale wird jedoch unter speziellen Bedingungen hinfällig:

1. *Bergmann* und *Fruton*<sup>3)</sup> konnten zeigen, dass reines Pepsin Peptide von bestimmter Bauart bei  $p_H$  4,5 optimal spaltet. In dieser Hinsicht sei auch auf das Verhalten der Lipasen hingewiesen. *Willstätter* und *Haurowitz*<sup>4)</sup> konnten nämlich nachweisen, dass mit fortschreitender Reinigung eine Verschiebung des  $p_H$ -Optimums stattfindet. Das  $p_H$ -Optimum ist also auch in diesem Falle nicht geeignet, als alleiniges Kriterium für die Abgrenzung eines Einzelenzym zu gelten, denn es wird durch die Coadsorbentien entscheidend beeinflusst.

2. *E. Freudenberg*<sup>5)</sup> erbrachte neuerdings den eindeutigen Beweis, dass Kathepsin genau so wie Pepsin sezerniert werden kann. Demnach ist die Unterscheidung zwischen Endo- und Ektoenzym ebenfalls zur Identifizierung von Einzelenzymen ungeeignet.

3. In den hier mitgeteilten Versuchen konnte der Beweis geführt werden, dass reines Pepsin durch Cyanwasserstoff aktiviert werden kann. Dadurch fällt auch in bezug auf die Aktivierungsmöglichkeiten die grundsätzliche Unterscheidung von Pepsin und Kathepsin dahin.

<sup>1)</sup> *Willstätter* und *Bamann*, Z. physiol. Ch. **180**, 127 (1928).

<sup>2)</sup> *Waldschmidt-Leitz* und Mit., Z. physiol. Ch. **188**, 17 (1929).

<sup>3)</sup> J. Biol. Chem. **127**, 627 (1939).

<sup>4)</sup> *Willstätter*, Z. physiol. Ch. **140**, 203 (1927); *Willstätter* und *Haurowitz*, Z. physiol. Ch. **144**, 68 (1925).

<sup>5)</sup> *Enzymologia* **8**, 385 (1940); *Schweiz. med. Wsch.* **75**, 735 (1945).



Weitere Untersuchungen werden mit grosser Wahrscheinlichkeit ergeben, dass reines Pepsin sich unter speziellen Bedingungen durch Schwefelwasserstoff aktivieren lassen wird. Die Klärung dieser Fragen ist experimentell schon in Angriff genommen. In unseren Mitteilungen über die *d*-Aminosäure-oxydase (l. c.) wurde gezeigt, dass dieses Enzym sich je nach seinem Reinheitsgrad gegenüber Effektoren wie Blausäure, Pyrophosphat usw. verschieden verhalten kann.

Als einen weiteren Unterschied zwischen Kathepsin und Pepsin lässt sich die verschiedene Temperaturempfindlichkeit der Rohfermente anführen. *Bergmann* konnte nun aber zeigen, dass reines Trypsin sogar durch Kochen nicht inaktiviert wird, während das Rohferment seine Aktivität durch Erhitzen auf 70° vollständig verliert. Verschiedene Temperaturempfindlichkeit im Zustand des Rohfermentes kann deshalb nicht als essentielle Eigenschaft eines Enzyms bezeichnet werden.

Auf Grund aller dieser Tatsachen lässt sich demnach sagen, dass eine grosse Anzahl der bisher als wesentlich bezeichneten Unterschiede zwischen Pepsin und Kathepsin nur unter ganz bestimmten experimentellen Bedingungen Gültigkeit haben. Es darf deshalb wohl die Vermutung ausgesprochen werden, dass möglicherweise kein essentieller Unterschied zwischen Pepsin und Kathepsin besteht, sondern dass es nur die Vergesellschaftung mit verschiedenen Begleitstoffen ist, die diese Differenzierung in Erscheinung treten lässt. In Analogie zu der von *Edlbacher* und *Wiss* (l. c.) entwickelten Vorstellung über die Komplexenzyme der *d*-Aminosäure-oxydase erscheint es möglich, dass Kathepsin und Pepsin von der gleichen Grundproteinase abstammen, dass aber die beiden Enzyme in vivo sich durch Bildung von Komplexenzymen differenziert haben<sup>1)</sup>.

In diesem Sinne stehen diese Anschauungen durchaus in Übereinstimmung mit der von *E. Freudenberg* (l. c.) ausgesprochenen Meinung, dass das Kathepsin die phylogenetisch primitivere Stufe der beiden Einzelenzyme ist. Gerade dieser Autor hat auf die physiologische Notwendigkeit der Kathepsinwirkung bei der Eiweissverdauung hingewiesen. Unter der Annahme, dass also Pepsin und Kathepsin phylogenetische Differenzierungen einer zunächst hypothetischen Grundprotease darstellen, erscheint das von *E. Freudenberg* nachgewiesene Auftreten des Komplexenzym Kathepsin im menschlichen Verdauungstractus vom physiologischen Standpunkt aus äusserst sinnvoll.

Herrn Prof. *Edlbacher*, der die Anregung zu diesen Untersuchungen gegeben hat, sei auch an dieser Stelle für seine Ratschläge bestens gedankt.

<sup>1)</sup> Vgl. *Edlbacher*, Exper. 1946, im Druck.

## Zusammenfassung.

1. Die Aktivität von gereinigtem Pepsin lässt sich durch Aminosäuren in negativem oder positivem Sinne beeinflussen.

2. Der Aktivierungseffekt tritt vorwiegend in kleinen Enzymkonzentrationen und bei kurzer Versuchsdauer in Erscheinung.

3. Kaliumcyanid und Pyrosphosphat können in analoger Weise als Effektoren des Pepsins wirken.

Ich danke Fr. *Frieda Nebiker* für ihre wertvolle und sorgfältige Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

Basel, im Dezember 1945

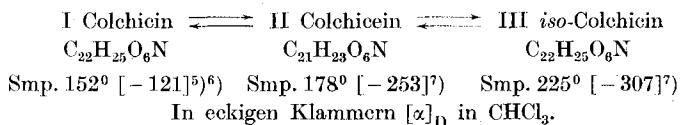
Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

35. *iso*-Colchicin

von **M. Sorkin**.

(25. XII. 45.)

Colchicin (I) lässt sich durch relativ milde saure Hydrolyse leicht in Colchicein (II) und Methanol spalten<sup>1)2)</sup>. *Johanny* und *Zeisel*<sup>3)</sup> gelang auch eine Rücksynthese. Beim Erhitzen von Colchicin mit Natriummethylat und Methyljodid in Methanol erhielten sie ca. 13% (I) neben unverändertem (II) und einem amorphen Methylcolchicin C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>O<sub>6</sub>. *Lettré* und *Fernholz*<sup>4)</sup> methylierten Colchicein (II) mit Diazomethan, wobei ein amorphes Produkt entstand, aus dem sie kein kryst. Colchicin (I) gewinnen konnten. *Meyer* und *Reichstein*<sup>5)</sup> haben dieselbe Reaktion ausgeführt und gezeigt, dass Colchicein (II) bei der Methylierung mit Diazomethan ein Gemisch liefert, aus dem sich zwar nicht mit Chloroform, wohl aber mit Essigester<sup>6)</sup> etwa 2% kryst. Colchicin (I) abscheiden lässt. Die Hauptmenge des Reaktionsproduktes blieb amorph und zeigte in CHCl<sub>3</sub> eine erheblich stärkere Linksdrehung als Colchicin, besass aber dieselbe analytische Zusammensetzung wie dieses.



<sup>1)</sup> *S. Zeisel*, M. **7**, 557 (1886).

<sup>2)</sup> *E. Boyland, E. H. Mawson*, Biochem. J. **32**, 1204 (1938).

<sup>3)</sup> *G. Johanny, S. Zeisel*, M. **9**, 865 (1888).

<sup>4)</sup> *H. Lettré, H. Fernholz*, Z. physiol. Ch. **278**, 175 (1943).

<sup>5)</sup> *K. Meyer, T. Reichstein*, Pharm. acta Helv. **19**, 127 (1944).

<sup>6)</sup> *H. W. B. Clever, S. J. Green, F. Tutin*, Soc. **107**, 839 (1915).

<sup>7)</sup> Exp. Teil dieser Arbeit.