

## 87. Zur Kenntnis der Kathepsine der Schilddrüse

von I. Abelin und F. Bigler.

(6. III. 56.)

3,5,3',5'-Tetraiodthyronin (Thyroxin), 3,5,3'- und 3,5'3'-Triiodthyronin, 3,5- und 3,3'-Dijodthyronin, Mono- und Dijodtyrosin und möglicherweise noch andere jodhaltige Substanzen sind in der Thyreoidea an ein Glykoprotein gebunden. Dieses Eiweiß mit einem Molekulargewicht von etwa 700 000 wird im Inneren der Schilddrüsenbläschen abgelagert und ist als Thyreoglobulin bekannt. Sämtliche Versuche, dasselbe auch im kreisenden Blute nachzuweisen, schlugen fehl (*Lerman*<sup>1)</sup>). Es musste daher ein fermentativer Abbau des Thyreoglobulins zu niedermolekularen jodhaltigen Substanzen angenommen werden. Eine willkommene Bestätigung dieser Voraussetzung brachten die Untersuchungen von *De Robertis*<sup>2)</sup> und *De Robertis & Nowinski*<sup>3)</sup>, denen der Nachweis wirksamer proteolytischer Fermente im Schilddrüsenewebe gelungen ist. Nach den Angaben dieser Autoren haben hyperaktive Schilddrüsen auch hyperaktive proteolytische Enzyme, während bei schwach funktionierenden Schilddrüsen schwach aktive Kathepsine angetroffen werden. Diese Befunde wurden von *Dziemian*<sup>4)</sup>, *Kamner, Peranio & Bruger*<sup>5)</sup>, *Weiss*<sup>6)</sup> u. a. bestätigt.

Im Anschluss an die Untersuchungen des einen von uns<sup>7)</sup> über die Entstehung physiologisch hochaktiver diiodtyrosin- bzw. thyroxinhaltiger Produkte bei der Einwirkung von Pepsin und Trypsin auf das Thyreoglobulin unternahmen wir nun einen analogen Thyreoglobulinabbau durch die zelleigenen Fermente der Schilddrüsenepithelien. Vorerst mussten die Wirkungsbedingungen der sogen. Schilddrüsenkathepsine ermittelt werden, insbesondere die Optima des pH, der Temperatur und der Aktivierung. Diesen Aufgaben dienen die nachfolgenden Analysen.

Gewinnung eines fermenthaltigen Thyreoglobulinauszuges. Frische Rinderschilddrüsen wurden vom Fett und Bindegewebe möglichst weitgehend befreit und bei  $-10^{\circ}$  eingefroren. Die feste Masse wurde in ganz dünne Stücke geschnitten, zerhackt und mit der dreifachen Menge eisgekühlter 0,5-proz. Kochsalzlösung bei 0 bis  $2^{\circ}$  und bei pH 7 homogenisiert. Nach zweistündiger Extraktion unter zeitweiligem gutem Mischen

<sup>1)</sup> *J. Lerman*, J. clin. Invest. **19**, 555 (1940).

<sup>2)</sup> *E. De Robertis*, Anatom. Record **80**, 219 (1941); Ann. New York Acad. Sci. **50**, 317 (1948–1950).

<sup>3)</sup> *E. De Robertis & W. W. Nowinski*, J. clin. Endocrin. **6**, 235 (1946).

<sup>4)</sup> *A. J. Dziemian*, J. cellular comparat. Physiol. **21**, 339 (1943).

<sup>5)</sup> *M. E. Kamner, A. Peranio & M. Bruger*, Endocrinology **46**, 353, 359 (1950).

<sup>6)</sup> *B. Weiss*, J. biol. Chemistry **205**, 193 (1953).

<sup>7)</sup> *H. Isliker & J. Abelin*, Helv. **32**, 115 (1949).

wurde das Homogenat durch Gaze abgepresst, der abfliessende Saft bei 0° zellfrei zentrifugiert, durch Filtration vom grössten Teil des Fettes befreit und mit 2% Toluol gemischt. Bei nichtsofortigem Gebrauch wurde der Auszug in gefrorenem Zustande bei -10° aufbewahrt.

Die pflanzlichen Papaine und die ihnen verwandten tierischen Kathepsine unterscheiden sich oft von den anderen proteolytischen Fermenten durch ihr Temperatur- und pH-Optimum. Nachfolgende Versuche dienten der Feststellung der günstigsten Verdauungsbedingungen der gewonnenen Schilddrüsenauszüge.

Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der Kathepsine des Rohthyreoglobulins. *Versuchsarrordnungen*. pH 4,0; t = 40°; 50°; 60°.

a) 30 ml Thyreoglobulinlösung + 10 ml 0,1-m. Acetatpuffer pH 4,0.

b) 30 ml Thyreoglobulinlösung + 10 ml 0,1-m. Acetatpuffer pH 4,0 + 0,4 ml Cysteinlösung (Endkonzentration des Cysteins 0,08%).

c) 30 ml 10 Min. im kochenden Wasserbad erwärmte Thyreoglobulinlösung + 10 ml 0,1-m. Acetatpuffer pH 4,0.

Zu jeder Probe wurden 2 ml Toluol zugegeben. Alle 24 Std. wurde eine pH-Kontrolle mit Hilfe der Glaselektrode vorgenommen. Der pH-Wert erlitt eine Verschiebung nach der alkalischen Seite um 0,03—0,05 Einheiten, die durch Säurezusatz ausgeglichen wurde.

Die Bestimmung der freiwerdenden Aminosäuren erfolgte nach der Kupfermethode von *Pope & Stevens*<sup>8)</sup>. Vor Beginn der Autolyse schwankte der Gehalt an freiem Amino-N bei den verschiedenen Ansätzen zwischen 0,272 und 0,308 mg pro ml Thyreoglobulin-auszug.

**Tabelle 1.**

Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der Schilddrüsenkathepsine.  
Zunahme des Amino-N in  $\mu$ Mol pro ml Autolysat.

Temperatur	Versuchsarrordnung	Autolysedauer in Std.				
		6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
60°	a	8,0	9,8	11,0	12,2	12,8
	b	13,2	14,6	18,2	19,0	19,8
	c	1,0	- 0,2	0,6	0,0	1,0
50°	a	24,2	29,6	35,4	40,6	42,6
	b	30,4	40,6	49,6	56,8	61,8
	c	0,4	0,6	- 0,2	1,0	1,0
40°	a	38,2	47,4	55,8	64,0	69,0
	b	45,6	58,0	69,4	80,0	84,8
	c	- 1,0	0,2	1,4	- 0,6	0,8

Das Temperaturoptimum lag bei 40°. Der Aktivitätsabfall zwischen 40 und 50° betrug 38% und zwischen 50 und 60° 70%.

Einfluss der pH-Änderung auf die Aktivität der Schilddrüsenkathepsine. Jeder Ansatz bestand aus 30 ml Schilddrüsenauszug, 10 ml eines geeigneten Puffers, Essigsäure- bzw. Natronlaugezusatz zur genauen Einstellung des pH-Wertes, Wasser bis 42,5 ml, Toluol 2,5 ml. Als extreme Werte dienten pH 2,0 und 8,0. Zwischen pH 3,0 und 7,0 wurde eine Serie von Lösungen mit einem jeweiligen pH-Unterschied von 0,25 Einheiten analysiert. Die pH-Kontrolle erfolgte alle 24 Std. mit Hilfe einer Glaselektrode. Es wurde jeweils für eine gute Durchmischung des Verdauungsansatzes gesorgt. Wie Fig. 1 (pH-Aktivitätskurve der Schilddrüsenkathepsine) zeigt, lag das pH-Optimum

<sup>8)</sup> C. G. Pope & M. F. Stevens, *Biochem. J.* **33**, 1070 (1939).

zwischen 4,5 und 4,8, d. h. in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Thyreoglobulins, der mit einem pH-Wert von 4,5 angegeben wird. Dieses entspricht der Erfahrung, wonach das pH-Optimum der Kathepsine oft in der Nähe des isoelektrischen Punktes des fraglichen Proteinsubstrates liegt.

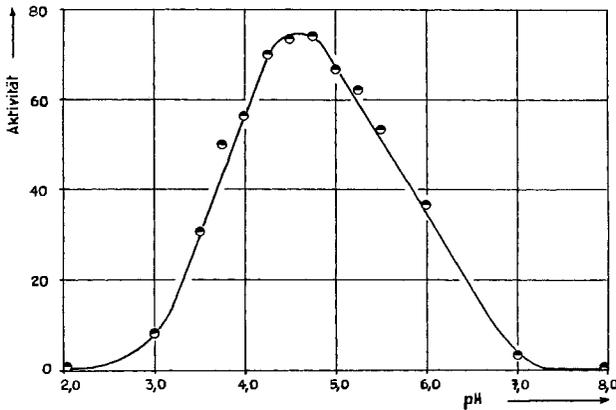


Fig. 1.

pH-Aktivitätskurve der Schilddrüsenkathepsine. Substrat: Rohthyreoglobulin. Abszisse: pH-Werte. Ordinate: Zunahme des Amino-N in  $\mu$ Mol pro ml Substrat nach 24 Std. Autolyse.

Aktivierung der Schilddrüsenkathepsine durch Cystein. Gewisse Substanzen mit einem stark ausgesprochenen negativen Redoxpotential wie Blausäure, Schwefelwasserstoff, Cystein, Glutathion, Ascorbinsäure plus Ferro-Ionen u. a. beschleunigen die Autolyse des tierischen Gewebes. Das den Kathepsinen nahestehende Papain wird auch durch Natriumhydrogensulfit ( $\text{NaHSO}_3$ ), Natriumpyrosulfit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) aktiviert<sup>9)</sup>. Wir wählten das Cystein und versuchten vorerst die optimal wirksame Menge festzustellen. Dazu wurden je 10 ml eines Thyreoglobulinauszuges bei pH 4,6 und bei 40° mit wechselnden Mengen Cysteinlösung versetzt und der freiwerdende Aminostickstoff quantitativ bestimmt.

**Tabelle 2.**

Zunahme des Amino-N in mg pro 1 ml Autolysat nach 22,5stündiger Versuchsdauer und Einwirkung wechselnder Mengen von Cystein.

Endkonzentration des Cysteins	0%	0,02%	0,04%	0,08%	0,16%	0% und erhitzt
Zunahme des Amino-N	+0,427	+0,553	+0,602	+0,658	+0,662	+0,002

Der Zusatz von 0,08% Cystein bewirkte eine Wirkungssteigerung um 42%; eine Verdoppelung der Cysteinmenge brachte keinen weiteren Erfolg.

Auf Grund der ermittelten optimalen Versuchsbedingungen ( $t = 40^\circ$ ; pH 4,5–4,8; Cysteinzusatz von 0,08%) konnten die Autolyseversuche in grösserem Maßstabe durchgeführt werden. Es musste aber noch die Frage der Haltbarkeit der gewonnenen Thyreoglobulinauszüge abgeklärt werden. Sämtliche Arbeiten, wie das Reinigen der frischen Schilddrüsen von Fett- und Bindegewebe, Homogenisieren, Extrahieren, Zentri-

<sup>9)</sup> I. Abelin & H. Pfister, Z. physiol. Chem. **295**, 323 (1953).

fügen wurden wie erwähnt bei Temperaturen um 0° durchgeführt. Trotzdem liess sich eine gewisse, wenn auch geringe Autolyse nicht vermeiden. Es wurde nun untersucht, a) ob bei längerem Aufbewahren der Rohextrakte bei pH 7,0 ein weiterer Eiweissabbau stattfindet, und b) ob die Fermentaktivität dabei erhalten bleibt.

a) Zur Prüfung der Haltbarkeit bei einer Temperatur zwischen 0 bis +1° und bei pH 7,0 wurde frischer Schilddrüsenauszug sofort und in Abständen von 3 Tagen auf seinen Gehalt an Aminostickstoff untersucht.

Tabelle 3.

Aufbewahrungsdauer in Tagen . . . . .	3	6	9	12	15
Zunahme des Amino-N in $\mu$ Mol pro ml Extrakt	+0,5	+0,2	+0,4	-0,2	+0,6

b) *Katheptische Aktivität des Schilddrüsenauszuges bei pH 4,6 während verschieden langer Aufbewahrung bei 0 bis -10° und pH 7,0.* Frischer Schilddrüsenauszug von pH 7,0 wurde bei 0° und bei -10° gelagert. Sowohl zu Beginn des Versuches wie nach 3, 6, 9, 12 und 15 Tagen wurden Proben entnommen, mit Essigsäure auf pH 4,6 gebracht und bei 40° autolytisiert. Es wurde die Zunahme des Amino-N nach 5 Std. gemessen. Jeder Ansatz bestand aus 7,5 ml Thyreoglobulinauszug von pH 4,6 und wurde mit 2,5 ml-0,1 ml. Acetatpuffer von pH 4,6 versetzt.

Tabelle 4.

Lagerungsdauer in Tagen	0	3	6	9	12	15
Zunahme des Amino-N in mg bei 0° bis +1° . . .	0,277	0,278	0,252	+0,249	0,253	0,245
Zunahme des Amino-N in mg bei -10° . . . . .	0,274	0,272	-	0,272	-	0,266

Die proteolytische Aktivität des Thyreoglobulinauszuges wurde durch die 15tägige Lagerung bei pH 7,0 und 0—1° um etwa 10% herabgesetzt. Bei -10° betrug der Aktivitätsabfall etwa 2%. Dieser Wert liegt innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode.

Verlauf des Abbaues des Thyreoglobulins durch die Kathepsine. Zur näheren Charakterisierung der entstandenen Spaltprodukte des Thyreoglobulins reichte die hier geübte Bestimmung des Amino-N nicht aus. Dieselbe gibt bloss Auskunft über das Ausmass, nicht aber über die Art des Eiweissabbaues. Wir beurteilten dieselbe auf Grund der allmählich in Lösung gehenden jod- und stickstoffhaltigen Produkte. Natives Thyreoglobulin enthält praktisch das gesamte Jod der Schilddrüse. Dieses jodierte Protein ist in 5-proz. Trichloressigsäure unlöslich, während die Abbauprodukte darin löslich sind. Es kann somit zwischen einem „säureunlöslichen Gesamt-N und Gesamt-J“ und den „säurelöslichen N- und J-haltigen Substanzen“ unterschieden werden. Wie Tab. 5 zeigt, gehen beim pH-Optimum und in der Nähe desselben etwa 90% des Eiweiss-N und etwa  $\frac{2}{3}$  des Jods in säurelösliche Form über.

Die Autolyse setzt zuerst sehr kräftig ein, so dass nach 9 Std. 50% des vorher unlöslichen Eiweisses in Lösung gehen. Dann verlangsamt sich der Abbau, und der Höhepunkt ist nach 72—96 Std. erreicht (vgl. Fig. 2). Doch schreitet die autolytische Zerlegung des Schilddrüsen-eiweisses nicht bis zu denjenigen tiefen Stufen fort, wie sie durch die Pankreatinverdauung erzielt werden. Die physiologische Aktivität der Autolyseprodukte ist geringer als diejenige der Produkte der Pankreatinverdauung. Darüber wurde an anderer Stelle berichtet<sup>10)</sup>.

<sup>10)</sup> I. Abelin & F. Bigler, Z. physiol. Chem. **303**, 196 (1956).

**Tabelle 5.**

Verteilung des Jods und des N auf die in 5-proz. Trichloressigsäure löslichen bzw. unlöslichen Fraktionen im Laufe einer 144 Std. dauernden Einwirkung der Schilddrüsenkathepsine. Temperatur 40°. Die absoluten Werte der Jod- und N-Analysen beziehen sich auf 3 ml Autolysat.

	pH des Autolysats		
	4,25	4,50	4,75
a) Totaljod in mg . . . . .	0,124	0,124	0,124
Jodgehalt der säurelöslichen Fraktion („J-säurelöslich“) mg . . . . .	0,073	0,077	0,078
Quotient: J-säurelöslich/Totaljod . . . . .	0,586	0,625	0,633
b) N-total in mg . . . . .	9,165	9,165	9,165
N-säurelöslich in mg . . . . .	8,250	8,355	8,370
Quotient N-säurelöslich/Total-N . . . . .	0,901	0,910	0,913
c) Total-N mol/Totaljod mol . . . . .	671	671	671
N-säurelöslich mol/J-säurelöslich mol . . . . .	1030	977	968

Das Thyreoglobulin ist zugleich eine Hormonreserve und eine unmittelbare Hormonquelle. Diesen beiden, zum Teil entgegengesetzten Aufgaben kommt das Thyreoglobulin dank seiner besonderen chemischen Beschaffenheit nach. Als hochmolekulares Glykoproteinid ist es nicht so leicht zerlegbar und bedarf dazu der Mithilfe der Hyaluronidase. Auf der anderen Seite wird das Thyreoglobulin von aktiven

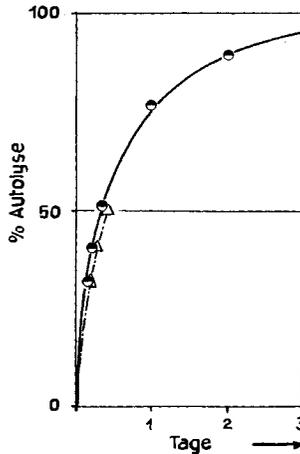


Fig. 2.

Katheptischer Abbau des Rohthyreoglobulins in % des Ausgangsmaterials. Gestrichelte Kurve: innerhalb von 9 Std. Ausgezogene Kurve: innerhalb von 3 Tagen.

eiweißspaltenden Fermenten begleitet. Doch reicht dieser fermentative Eigenabbau nicht aus, um innerhalb kurzer Zeit genügende Mengen der aktiven jodhaltigen Aminosäuren zur Verfügung zu stellen. *In vivo* wird er aber durch das sogen. thyreotrope Hormon des Hypophysen-

vorderlappens unterstützt. Dasselbe wird je nach Bedarf vom Hypophysenvorderlappen geliefert. Es dringt in die Schilddrüsenbläschen ein und aktiviert hier die Zellfermente soweit, dass eine genügende Versorgung des Körpers mit Schilddrüsenhormon ermöglicht wird. Eine solche Verteilung der Regulation auf zwei verschiedene Organe (Schilddrüse und Hypophysenvorderlappen) ermöglicht einerseits eine Ablagerung, anderseits einen geregelten Verbrauch des gespeicherten Hormons.

#### Zusammenfassung.

Als günstigste Versuchsbedingungen beim Studium der Wirksamkeit der Schilddrüsenkathepsine erwiesen sich eine Temperatur von 40°, ein pH-Wert von 4,5 bis 4,8, d. h. ganz in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Thyreoglobulins, und ein Zusatz von 0,08% Cystein. Der in so zubereiteten Schilddrüsenauszügen ablaufende Eiweissabbau wurde durch Bestimmung des Gesamtjod- und Gesamt-N-Gehaltes der einzelnen Eiweissfraktionen näher untersucht. Der Proteinabbau durch die Eigenfermente der Schilddrüsenbläschen ist bei *in vitro*-Versuchen zwar kräftig, jedoch schwächer als beim Abbau durch die Pankreasfermente.

Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern.

### 88. Gewinnung von 1;4-Bisdehydro-3-oxo-steroiden.

Über Steroide, 139. Mitteilung<sup>1)</sup>

von Ch. Meystre, H. Frey, W. Voser und A. Wettstein.

(9. II. 56.)

In vier früheren Mitteilungen<sup>2-5)</sup> haben wir über die Herstellung von 1;4-Bisdehydro-3-oxo-steroiden aus  $\Delta^4$ -3-Oxo-steroiden auf mikrobiologischem Wege berichtet. Solche Umwandlungen, die u. a. zu hochaktiven Corticosteroiden<sup>6)</sup> führen, sind auch von anderer Seite beschrieben worden<sup>7)8)8a)</sup>.

1) 138. Mittl., s. R. Neher & A. Wettstein, J. clin. Investig. **35** (1956), im Druck.

2) E. Vischer & A. Wettstein, Experientia **9**, 371 (1953).

3) E. Vischer, Ch. Meystre & A. Wettstein, Helv. **38**, 835 (1955).

4) E. Vischer, Ch. Meystre & A. Wettstein, Helv. **38**, 1502 (1955).

5) E. Vischer, J. Schmidlin & A. Wettstein, Experientia **12**, 50 (1956).

6) H. L. Herzog, A. Nobile, S. Tolksdorf, W. Charney, E. B. Hershberg, P. L. Perlman & M. M. Pechet, Sci. **121**, 176 (1955).

7) J. Fried, R. W. Thoma & A. Klingsberg, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5764 (1953).

8) A. Nobile, W. Charney, P. L. Perlman, H. L. Herzog, C. C. Payne, M. E. Tully, M. A. Jevnik & E. B. Hershberg, J. Amer. chem. Soc. **77**, 4184 (1955).

8a) T. H. Stoudt, W. J. McAleer, J. M. Chemerda, M. A. Kozlowski, R. F. Hirschmann, V. Marlatt & R. Miller, Arch. Biochemistry **59**, 304 (1955).