

100. Isolierung von Substanz P aus Pferdedarm und ihre biologische und chemische Abgrenzung gegenüber Bradykinin

Vorläufige Mitteilung

von J. Franz, R. A. Boissonnas und E. Stürmer

(25. III. 61)

Im Jahre 1931 entdeckten U. S. VON EULER & GADDUM¹⁾ in Organextrakten eine Substanz, welche glatte Muskulatur zur Kontraktion brachte, aber nicht mit Acetylcholin oder Histamin identisch war. Das aktive Prinzip – Substanz P benannt – kommt im Darm und in verschiedenen Teilen des Gehirns vor²⁾. Die physiologische Bedeutung von Substanz P ist noch weitgehend ungeklärt²⁾.

Eine weitgehende Reinigung von Substanz P mittels Ammoniumsulfat-Fällung, Adsorption an Aluminiumoxyd und Verteilungschromatographie an Cellulose gelang PERNOW³⁾. Das reinste Material zeigte am isolierten Meerschweinchen-Ileum eine Aktivität von 2500–3500 Einheiten (E) pro mg. (1 E entspricht nach U. S. VON EULER dem Subst.-P-Gehalt von 25–50 mg Pferdedünn-darm.) Im Papierchromatogramm ergab die Substanz einen einzigen, Ninhydrin-positiven Fleck in dem auch die biologische Aktivität lokalisiert war. Aus dem chemischen und physikalischen Verhalten des Produktes (Dialysierbarkeit, Verlust der Aktivität nach Zugabe von Chymotrypsin⁴⁾ wurde auf eine Peptid-Struktur geschlossen.

Wir haben die Frage nach der Struktur von Subst. P erneut aufgegriffen und zunächst versucht, ein möglichst reines, einheitliches Material zu isolieren. Im folgenden sei über die bisher erzielten Ergebnisse berichtet.

Die Isolierung von Subst. P ist insofern erschwert, als spezifische chemische bzw. physikalische Nachweismethoden bislang nicht bekannt sind und somit die Lokalisierung des aktiven Materials und dessen Aktivitätsbestimmung ständig in vergleichenden pharmakologischen Experimenten durchgeführt werden muss.

Die Auswertung erfolgte in erster Linie am isolierten Meerschweinchen-Ileum (10 ml Bad, TYRODE-Lsg., 37°, Carbogen; jeweils 5 Min. vor Zugabe der Subst. P wurden Atropin und The-nalidin in einer Endkonzentration von 10⁻⁸ g/ml zugesetzt); 0,03 E/ml lösten regelmässig eine submaximale Kontraktion aus⁵⁾.

Vergleichende Untersuchungen wurden darüberhinaus am isolierten Hühner-Caecum⁶⁾ (Methode wie beim Meerschweinchen-Ileum) sowie am Blutdruck des atropinisierten Kaninchens (Narkose: 1,6 g/kg Urethan s. c., Atropin: 3 mg/kg s. c.) durchgeführt.

Nach der Methode von PERNOW³⁾ wurde Subst. P aus Pferdedarm extrahiert und mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Nach Extraktion mit Eisessig und Fällung mit Äther und Petroläther wurde das ausgefallene wasserlösliche Produkt durch Chromatographie an Amberlite IR-45 von sauren Bestandteilen befreit. Nach einer zweiten Chromatographie an Amberlite IRC-50 (XE 64)

1) U. S. V. EULER & J. H. GADDUM, J. Physiol. 72, 74 (1931).

2) Substanz P in «Polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels». M. SCHACHTER, Oxford, London, New York, Paris 1960, Pergamon Press.

3) B. PERNOW, Acta physiol. scand. 29, Suppl. 105, 1 (1953).

4) B. PERNOW, Acta physiol. scand. 34, 295 (1955).

5) Wir danken Herrn Prof. B. PERNOW für die freundliche Überlassung von Subst.-P-Standard, die es uns ermöglichte, die Aktivität unseres Materials in den international gebräuchlichen v. EULER-GADDUM-Einheiten anzugeben.

6) B. PERNOW & M. ROCHA E SILVA, Acta physiol. scand 34, 59 (1955).

wurde die mit Essigsäure eluierte aktive Fraktion durch Chromatographie an Aluminiumoxyd weiter gereinigt. Die durch wässriges Methanol eluierte aktive Fraktion wurde erneut an CM-Cellulose chromatographiert. Das dabei gewonnene Produkt zeigte am isolierten Meerschweinchen-Ileum, am isolierten Hühner-Caecum und am Blutdruck des atropinisierten Kaninchens eine Aktivität von 30000 bis 35000 E/mg, d. h. die zehnfache Aktivität des reinsten von PERNOW beschriebenen Präparates.

In den obengenannten pharmakologischen Testen war das hochgereinigte Subst.-P-Präparat qualitativ gleich wirksam wie Subst.-P-haltige Extrakte. Es bewirkte eine Kontraktion glatter Muskulatur (isol. Meerschweinchen-Ileum, isol. Hühner-Caecum) und eine Blutdrucksenkung bei atropinisierten Kaninchen. Unter Berücksichtigung der biologischen Streuung erfolgte die Aktivitätszunahme während der Isolierung in den drei angewandten Testen gleichförmig. Die beschriebenen pharmakologischen Wirkungen sind somit spezifische Eigenschaften von Subst. P und die qualitativ gleichartigen Wirkungen Subst.-P-haltiger Extrakte mit grösster Wahrscheinlichkeit auf ihren Gehalt an Subst. P zurückzuführen.

Das hochgereinigte Subst.-P-Präparat lässt sich pharmakologisch ohne Schwierigkeiten von Bradykinin⁷⁾ abgrenzen. Es löst im Gegensatz zu Bradykinin dosenabhängige Kontraktionen am isolierten Hühner-Caecum aus. Am isol. Meerschweinchen-Ileum ist die Latenzzeit bis zum Einsetzen der Kontraktion kürzer und die Kontraktionsgeschwindigkeit grösser als nach äquivalenten Bradykinin-Dosen.

Im Papierchromatogramm und in der Papierelektrophorese wandert das hochgereinigte Subst.-P-Präparat als einheitlicher, gut mit Bromphenolblau anfärbarer Fleck, der nur sehr schwach mit Ninhydrin reagiert. Der Rf-Wert beträgt im aufsteigenden Chromatogramm (n-Butanol/Essigsäure/Wasser 40:20:60 auf gewaschenem SCHLEICHER & SCHÜLL-Papier 2040b) 0,7. In der Hochspannungselektrophorese auf Papier⁸⁾ wandert das Produkt bei pH 1,9 (Ameisensäure/Essigsäure/Wasser 15:10:75) ebensoweit wie Glutaminsäure ($E_{1,9} = 1,0$ Glu) und bei pH 5,8 (Pyridin/Essigsäure/Wasser 9:1:90) 8/10 der Distanz des Histidins ($E_{5,8} = 0,8$ His) in kathodischer Richtung. Damit zeigt das Produkt in der Papierelektrophorese das gleiche Verhalten wie Bradykinin⁹⁾. Nach der Totalhydrolyse lassen sich ebenso wie bei Bradykinin grössere Mengen von Arginin und Prolin, darüberhinaus aber auch von Leucin/Isoleucin und Alanin nachweisen.

Durch Einwirkung von Chymotrypsin (0,05 mg Produkt und 0,002 mg Chymotrypsin in 0,012 ml bei pH 9,5, drei Std. bei 25°) wird die Substanz in einen Ninhydrin-positiven, aber nicht mit Bromphenolblau anfärbbaren Fleck von $E_{1,9} = 0,7$ Glu und einen zweiten, Ninhydrin-negativen, aber mit Bromphenolblau reagierenden Fleck von $E_{1,9} = 1,2$ Glu zerlegt und verliert gleichzeitig ihre biologische Aktivität am Meerschweinchen-Ileum. Es wird kein Arginin abgespalten. Danach müsste es sich vermutlich um ein lineares Peptid handeln, das im Gegensatz zu Bradykinin nicht die C-terminale Gruppierung Phe-Arg-OH besitzt.

Durch Einwirkung von Trypsin unter den gleichen Bedingungen entsteht kein zweiter Ninhydrin-positiver Fleck, die Lage des ursprünglichen, Bromphenolblau-

⁷⁾ R. A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD, H. KONZETT & E. STÜRMER, *Experientia* 16, 326 (1960); H. KONZETT & E. STÜRMER, *Brit. J. Pharmacol.* 15, 544 (1960).

⁸⁾ Th. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* 67, 257 (1955).

⁹⁾ R. A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN & P.-A. JAQUENOUD, *Helv.* 43, 1349 (1960).

positiven Flecks ($E_{1,9} = 1,0$ Glu) ändert sich nicht und die biologische Aktivität bleibt teilweise erhalten.

Durch Einwirkung von Carboxypeptidase (A + B) wird im Unterschied zu Bradykinin kein Arginin abgespalten und die biologische Aktivität bleibt praktisch voll erhalten.

Die angeführten chemischen und biologischen Daten für unser anscheinend reines Subst.-P-Präparat lassen den Schluss zu, dass sich die Substanz P trotz gewisser gemeinsamer Eigenschaften eindeutig von Bradykinin unterscheidet.

SUMMARY

Substance P has been isolated in an apparently pure state and shown to be biologically and chemically distinct from Bradykinin though the two substances have some properties in common.

Pharmazeutisch-chemisches und Pharmakologisches
Laboratorium der SANDOZ AG., Basel

101. Contribution à l'étude de la mésomérie V. Approximations dans le calcul de l'énergie de liaison II

par O. Klement, B. Felder et O. Mäder

(1^{er} IV 61)

On sait que, dans la méthode de mésomérie, lorsque l'énergie est calculée à l'aide d'un système d'atomes à un électron de valence chacun, on utilise une approximation axée sur le groupement des figures de la série indépendante en dispositions inexcitées, monoexcitées, etc. Ainsi qu'il a été montré précédemment¹⁾ pour le propane, cette même approximation peut s'appliquer à la molécule entière avec tous les électrons de valence, si l'on tient compte encore d'une deuxième classification fondée sur la présence ou l'absence de triangles dans les dispositions de la série indépendante. Presque tous les calculs approchés de cette nature ont été faits, dans le cas des systèmes d'atomes à un électron, en passant par l'équation séculaire. Il en a été de même dans IV pour le propane avec tous les électrons de valence.

Dans la présente note, nous voulons considérer l'approximation de l'énergie avec *tous les électrons de valence*, en utilisant l'équation de liaison. Celle-ci présente, dans le calcul rigoureux de l'énergie, des avantages appréciables par rapport à l'équation séculaire. En effet, dans l'équation de liaison, la détermination des produits scalaires, indispensable pour l'équation séculaire, tombe complètement et le calcul du déterminant se simplifie sensiblement, un grand nombre d'éléments étant nuls. Or, ces avantages se retrouvent dans les calculs approchés de l'énergie. Dès lors, on comprend l'intérêt que peut présenter une approximation passant par l'équation de liaison.

¹⁾ O. KLEMENT, O. MÄDER & S. HUWYLER, *Helv.* 43, 2172 (1960) (désignée dans la suite par IV, la communication précédente, O. KLEMENS, O. MÄDER & B. FELDER, *Helv.* 43, 1766 (1960) étant désignée par III).