Über die Proteasenwirkungen der Gefrierschnitte der Gewebe.

I. Mitteilung. Vergleichende Beobachtungen über die Proteasenwirkungen der Gefrierschnitte mit derjenigen der Mazeration und des Trockenpräparats der verschiedenen Organe.*)

Von

Masanosuke Hino.

(日野政之助)

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Tohoku-Universität, Sendai.
Direktor: Prof. Dr. Senji Utzino.)

In den meisten Enzymversuchen wird ein Mazerationsaft oder ein Trockenpräparat benutzt, obwohl man nicht sicher irgendeine Veränderung oder eine Verminderung der Enzymaktivität bei der Mazeration oder bei der Trocknung ausschliessen kann. Als eine Methode der naturtreuen Prozedur kommen Gefrierschnitte der Gewebe in Frage:

Hier muss aber die Angabe Molowans (1932)¹⁾, dass die Gewebeschnitte des Tumorgewebes im Gegensatz zu normalen Gewebeschnitten sich als fast inaktiv gegenüber Peptiden erwiesen, erwähnt werden. Diese Beobachtung lässt eine besondere Inaktivierung der Gewebeereptase der Gefrierschnitte vermuten, da die Gewebemazeration wie auch die Tumormazeration fast immer eine Ereptaseaktivität zeigte, wie das schon nachher von Utzino und Yosioka (1936 u. 1936)²⁾ festgestellt wurde.

Nachdem ferner Utzino und Sakai (1941)³⁾ darauf aufmerksam gemacht hatten, dass sich die Gewebeproteasen, Katheptase und Ereptase, als empfindlich der Mediumsreaktion gegenüber erwiesen, muss man hier auch die Frage beantworten, ob die Aktivität des Enzympräparats bei der Mazeration oder der Trocknung nicht beeinträchtigt wird.

Deshalb hat Verf. hier unter Leitung von Prof. Dr. S. Utzino das Studium des enzymologischen Verhaltens der gefrorenen Gewebeschnitte unter vergleichender Beobachtung mit demjenigen der Mazeration und des

*) S. Utzino und Mitarbeiter: Über die Gewebeproteolyse. VI. Mitteilung.

Versuchsteil.

Die Organstückchen, die von Gefäßen und Fettgeweben befreit worden waren und in der Hauptsache die eigentlichen Gewebeteile des Schweins enthielten, wurden durch das Gefriermikrotom in Gefrierschnitten von 2 ccm Quadratmesser und 150 μ Dicke abgeschnitten und als solche möglichst schnell in Versuchen verwendet. Als Enzymansatz kamen je 4 Gefrierschnitte, in 2 ccm Wasser suspendiert, in Gebrauch. Zum Vergleichszweck wurden einerseits 2 ccm Mazeration, die 4 Stückchen gut zerriebener Gefrierschnitte in 2 ccm Glycerin-Wasser (1 : 1) enthielt, oder andererseits 2 ccm Suspension von Trockenpulvern, die aus 4 Stückchen nach der Aceton-Äther-Trockenmethode bereitet wurden, bei einem Versuch verwendet. Je 2 ccm Enzymlösung (=4 Schnitten) fügte man zu je 10 ccm 4 %iger Eiweiss (Casein Hammarsten oder Gelatine K C)- oder Pepton K-Pufferlösung hinzu. Für die Aktivierung der katheptischen Wirkung bewahrte man 2 ccm Enzymlösung mit 2 ccm 0,2 Mol-Cystein HCl-Lösung (mit Natronlauge neutralisiert) oder mit 2 ccm Wasser ohne Cystein zur Kontrolle bei 37° C 30 min lang auf. Der Gesamtansatz wurde mit Phosphatpuffer unter Einstellung bei einem bestimmten ph-Werte auf 22ccm gebracht und unter Toluol bei 37° C digeriert.

Zur Kontrolle digerierte man Enzym-Puffer ohne Substrat unter den gleichen Verhältnisbedingungen bei 37° C. Die Acidität in 4 ccm Digestat ermittelte man nach der Formoltitration und gab die korrigierten Werte in der Tabelle an, nachdem die Kontrollwerte von den bei dem Hauptversuch gewonnenen Werten abgezogen wurden.

Tabelle 1.

Katheptase- und Ereptasewirkung der Gefrierschnitte von Leber, Niere und Milz des Schweins unter vergleichender Betrachtung ihrer Mazeration und Trockenpulver.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)																
Gewebe	Zeit (st)	Gelatine C (1,8%) ph 4,5						Pepton K C (1,8%) ph 4,5						Pepton K C (1,8%) ph 7,8		
		Ohne Cystein			Mit Cystein			Ohne Cystein			Mit Cystein			Schnitt	Mazerat	Pulver
		Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver			
Leber	5	0,1	0,1	0,05	0,3 (0,2)	0,3 (0,2)	0,2 (0,1)	0,1	0,05	0,05	0,25 (0,15)	0,3 (0,25)	0,2 (0,15)	0,25	0,2	0,2
	24	0,55	0,5	0,45	0,8 (0,25)	0,75 (0,25)	0,7 (0,2)	0,5	0,45	0,45	0,75 (0,25)	0,75 (0,3)	0,65 (0,2)	0,7	0,6	0,6
	72	1,1	1,0	0,9	1,15 (0,05)	1,05 (0,05)	1,05 (0,15)	0,75	0,75	0,6	1,15 (0,4)	1,1 (0,35)	0,95 (0,35)	1,0	0,95	0,9
Niere	5	0,15	0,15	0,1	0,3 (0,15)	0,25 (0,1)	0,25 (0,15)	0,1	0,1	0,05	0,25 (0,15)	0,25 (0,15)	0,2 (0,15)	0,35	0,35	0,25
	24	0,4	0,4	0,3	0,7 (0,3)	0,7 (0,3)	0,55 (0,25)	0,55	0,5	0,35	0,85 (0,3)	0,8 (0,3)	0,65 (0,3)	1,05	1,0	0,85
	72	0,7	0,65	0,55	1,15 (0,45)	0,95 (0,3)	0,8 (0,25)	0,9	0,9	0,7	1,15 (0,25)	1,1 (0,2)	0,95 (0,25)	1,4	1,35	1,2
Milz	5	0,05	0,05	0	0,2 (0,15)	0,05 (0)	0,1 (0,1)	0,05	0,05	0,05	0,15 (0,1)	0,15 (0,1)	0,1 (0,05)	0,15	0,2	0,1
	24	0,5	0,3	0,3	0,7 (0,2)	0,55 (0,25)	0,5 (0,2)	0,45	0,5	0,3	0,8 (0,35)	0,75 (0,25)	0,55 (0,25)	0,6	0,65	0,55
	72	0,8	0,5	0,5	1,2 (0,4)	1,15 (0,65)	1,25 (0,75)	0,65	0,7	0,5	1,25 (0,6)	1,25 (0,55)	1,05 (0,55)	1,05	1,1	0,95

Trockenpräparats aufgenommen. Da ausserdem Gewebeschnitte von einer bestimmten Dimension einen richtigeren Wert ergeben, hat Verf. ferner in vorliegender Arbeit grundlegende systematische Beobachtungen über Proteasenaktivität der verschiedenen Organe angestellt.

Sobald wie möglich nach dem Tode des Tiers wurde das Schweinegewebe im Gefriermikrotom in bestimmte Dimensionen (2×2 ccm Quadrat und 150μ Dicke) geschnitten und bei den Versuchen benutzt. Zum Zweck der vergleichenden Beobachtungen wurde eine Mazeration oder ein Trockenpräparat aus Schnitten in gleichem Mengenverhältnis bereitet, indem Verf. vier Stückchen desselben in 2 ccm Glycerin-Wasser (1 : 1) gut zerrieb oder nach der Aceton-Äther-Methode trocknete. Als Substrat der sauren Proteasenwirkung, der Katheptase, benutzte man hier Eiweiss und Peptonkörper bei den Versuchen, da Sakai (1943)⁴⁾ schon auf die bemerkenswerte Unterscheidung dieser beiden sauren Gewebeproteasen, Kathoproteinase und Kathopeptonase, hingewiesen hatte.

Aus den Ergebnissen ersieht man, dass die Katheptasewirkung, Kathoproteinase (Kathepsin) und Kathopeptonase, der Leber-, Niere- oder Milz-

Tabelle 2.

Katheptase- und Ereptasewirkung der Mazeration von gefrorenem Leberbrei des Schweins.

Ein Teil Leberstück wurde in flüssigem Stickstoff gefroren, pulverisiert und mit der 3fachen Volummenge Glycerin-Wasser (1 : 1) in einem Möser gut verrührt. Andererseits mazerierte man einen anderen Teil frisches nicht gefrorenes Leberstück mit der 3fachen Volummenge Glycerin-Wasser (1 : 1) in einem Möser bei Raumtemperatur gut. Diese beiden Enzymmazerationen kamen in Betracht. 2 ccm Mazeration aktivierte man mit 2 ccm 0,2 Mol Cystein-Lösung bei pH 6 und 37°C 30 min lang.

Versuchsansatz: 2 ccm Enzymlösung mit 2 ccm Cysteinlösung oder 2 ccm Wasser ohne Cystein zur Kontrolle + 10 ccm 4 %iger Gelatine- oder 2 %iger Witte-Pepton-Lösung + 8 ccm Puffer + Toluol; digeriert bei pH 4,5 oder 7,5 und bei 37°C .

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)							
Substrate	Zeit (st)	Gefroren			Nicht gefroren		
		pH 4,5		pH 8,0	pH 4,5		pH 8,0
		Ohne Cystein	Mit Cystein		Ohne Cystein	Mit Cystein	
Gelatine (KC) 1,8%	6	0,1	0,25	—	0,1	0,25	—
	24	0,55	0,95	—	0,55	0,85	—
	72	0,95	1,1	—	0,9	1,05	—
Pepton (Witte) 0,9%	6	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,25
	24	0,4	0,85	0,8	0,4	0,8	0,75
	72	0,65	1,0	1,15	0,6	1,0	1,15

schnitte sich in deutlichem Grade entfaltete und auch deutliche Cystein-Aktivierbarkeit zeigte, die schwächer in Leberkathepsin und stärker in Milz- und Nierenkathepsin auftrat (Tabelle 1). Diese Beobachtung muss für einen beinahe vollaktiven Zustand des Leberkathepsins sprechen, da die Aciditätszunahme im 72stündigen Digestat nach der Cysteinaktivierung fast im gleichen Grad blieb. Die Kathopeptonase-Wirkung wurde in diesen Enzymarten fast gleichgradig, nur etwa stärker in Milzpräparat, durch Cysteinzusatz aktiviert und zeigte auch gleichstarke Aciditätszunahme nach der 72stündigen Digestion.

Die Ereptasewirkung der Niere war bei diesen 3 Präparaten viel stärker als diejenige der anderen beiden Organe.

Die Aktivität der trockenen Pulverpräparate, wie auch nach der Cysteinaktivierung, scheint im allgemeinen etwas schwächer zu sein, während die Aktivität der Mazeration fast in gleichem Grade wie diejenige des Schnittes auftrat.

• Tabelle 3.

Katheptase- und Ereptasewirkung von Gefrierschnitten der Lunge, des Herzmuskels und Grosshirns des Schweins unter vergleichender Betrachtung ihrer Mazeration und Trockenpulver.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)																
Gewebe	Zeit (st)	Gelatine KC (1,8%) ph 4,5						Pepton K (1,8%) ph 4,5						Pepton K (1,8%) ph 7,8		
		Ohne Cystein			Mit Cystein			Ohne Cystein			Mit Cystein					
		Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver
Lunge	5	0	0	0	0,1 (0,1)	0	0,05 (0,05)	0,05	0	0,05	0,05 (0)	0,05 (0,05)	0 (-0,05)	0,2	0,05	0,05
	24	0,1	0,05	0	0,4 (0,3)	0,25 (0,2)	0,05 (0,05)	0,25	0,2	0,2	0,5 (0,25)	0,45 (0,25)	0,15 (-0,05)	0,35	0,35	0,1
	72	0,25	0,05	0	0,8 (0,55)	0,6 (0,55)	0,2 (0,2)	0,35	0,3	0,2	0,8 (0,45)	0,8 (0,5)	0,4 (0,2)	0,6	0,5	0,2
Herzmuskel	5	0	0	0	0	0	0,05 (0,05)	0	0	0	0,05 (0,05)	0,05 (0,05)	0,05 (0,05)	0	0,05	0
	24	0	0	0	0	0	0,05 (0,05)	0,2	0,2	0,2	0,15 (0,05)	0,2 (0)	0,15 (-0,05)	0,25	0,25	0,15
	72	0	0,1	0	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	0,2 (0,2)	0,25	0,2	0,25	0,4 (0,15)	0,4 (0,2)	0,35 (0,1)	0,45	0,4	0,25
Grosshirn	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0,05 (0,05)	0,1 (0,1)	0,05 (0,05)	0,05	0,05	0	0,05 (0)	0,05 (0)	0,05 (0,05)	0,2	0,2	0,2
	72	0	0	0	0,1 (0,1)	0,1 (0,1)	0,05 (0,05)	0,15	0,1	0,05	0,2 (0,05)	0,15 (0,05)	0,15 (0,1)	0,3	0,3	0,2

Während nur die Schnitte der Lunge eine schwache Aktivität des Kathepsins (Gelatine-Spaltung), nicht aber die Mazeration und das Trockenpräparat derselben und diese Lungenpräparate eine schwache Peptonaseaktivität zeigten, trat eine deutliche Hydrolyse der Gelatine und des Peptons nach der Cysteinaktivierung auf (Tabelle 3).

In Herzmuskelschnitten wie auch in Mazeration und in Trockenpräparat bemerkte man fast keine Gelatinehydrolyse trotz der Cysteinaktivierung; die Peptonspaltung jedoch trat besonders nach Cysteinzusatz zu Tag (Tabelle 3). Diese Beobachtungen stimmen gut mit den Ergebnissen Önisis (1942)⁵⁾ überein.

Die Hirnpräparate schienen katheptisch sehr minderwertig zu sein. Die Gelatinehydrolyse war negativ und die Peptonspaltung auch fraglich (Tabelle 3).

Die Ereptasewirkung der Schnitte und der Mazeration der Lunge, des Herzmuskels und des Grosshirns fiel positiv aus, die der Trockenpräparate aber in schwächerem Grade.

Die Hirnpräparate waren auch ereptisch am schwächsten (Tabelle 3). Bei den Versuchen mit einer grösseren Menge (5 Stückchen) Hirnsubstanz blieb die Katheptase-Wirkung auch sehr gering (Tabelle 4).

In der Drüsenpräparaten, wie Schilddrüse und Hoden hat Verf. eine deutliche Ereptase- und Katheptase-Aktivität nachgewiesen, welche letztere durch Cystein merklich verstärkt wurde (Tabelle 5).

Die Uteruspräparate zeigten auch eine deutliche Ereptase- und Kathopeptonasewirkung. Die letztere wurde durch Cystein stark aktiviert. Die Aktivität des Uteruskathepsins (Gelatinespaltung) kam erst nach der Aktivierung besonders in Schnitten zum Vorschein, wie dies bei dem Herzmuskelskathepsin der Fall zu sein scheint. Auf Grund dieser Aktivitätsverschiedenheit möchte Verf. einen Unterschied zwischen der Kathopeptonase und der Kathoproteinase des Muskelgewebes annehmen. Die stärkere Proteasenaktivität des Uterusgewebes dürfte nach der Meinung des Verf. wohl auf die Wirkung der Schleimhaut des Uterus zurückzuführen sein. Bei den Versuchen mit den Gefrierschnitten der Magenschleimhaut stellte man nur die Proteinasewirkung bei pH 2, also nur die Pepsinwirkung, nicht aber keine Hydrolyse bei pH 4,5 unter Cysteinzusatz und bei pH 7,8 fest (Tabelle 6).

Wie Hirooka (1942)⁶⁾ bereits berichtete, finden sich fast immer die Katheptase- und Ereptase-Wirkung in der Mazeration der Magenmucosa, wenn das Auskratzen in der gewöhnlichen Weise erfolgte. Diese Wirkungen könnten vielleicht von der unvermeidbaren Beimengung der Submucosa und des Muskelgewebes des Magens in diesem Präparate herrühren. Deshalb kann Verf. wohl diese Gefrierschnittmethode als sehr geeignet für das Studium

Tabelle 4.

Katheptase- und Ereptasewirkung der Gefrierschnitte der Leber,
Niere und des Gehirns unter besonderer Betrachtung
ihrer Mazeration und Trockenpulver.

Zum Vergleichszweck gebrauchte man hier 5 Gefrierschnitte (2 ccm × 2 ccm, 150 μ Dicke (= 0,3 g) als Suspension in 2 ccm Wasser, während man bei den anderen Versuchen 2 ccm Mazeration aus 5 Stückchen (0,3 g) oder 2 ccm Suspension des Trockenpulvers benutzte, welches aus 5 Gefrierschnitten nach der Aceton-Äther-Methode bereitet wurde. Man aktivierte 2 ccm Enzymlösung (= 5 Schnitte) mit 2 ccm 0,2 Mol Cysteinlösung bei pH 6 und 37° C 30 min. Der Ansatz bestand in den bekannten Verhältnissen.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)																	
Gewebe	Zeit (st)	Gelatine KC (1,8%) ph 4,5						Pepton K (1,8%) ph 4,5						Pepton K (1,8%) ph 7,8			
		Ohne Cystein			Mit Cystein			Ohne Cystein			Mit Cystein			Schnitt	Mazerat	Pulver	
		Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver				
Leber	5	0,1	0,1	0	0,2	0,15	0,1	0,05	0,05	0,05	0,15	0,15	0,1	0,2	0,15	0,15	
	24	0,45	0,35	0,35	0,75	0,6	0,55	0,4	0,45	0,35	0,9	0,9	0,85	0,65	0,65	0,5	
	72	0,9	0,85	0,7	1,2	1,1	1,05	0,6	0,5	0,5	1,1	1,1	1,0	1,25	1,25	1,1	
Niere	5	0,05	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,25	0,05	0,2	0,2	0,15	
	24	0,3	0,35	0,25	0,65	0,5	0,45	0,25	0,45	0,3	0,7	0,65	0,55	0,95	1,0	0,7	
	72	0,55	0,6	0,5	0,9	0,9	0,9	0,5	0,5	0,5	0,9	0,9	0,85	1,3	1,2	1,15	
Grosshirn	5	0	0	—	0,05	0	—	0	0	—	0	0	—	0,05	0,05	—	
	24	0	0,05	—	0,05	0,05	—	0	0	—	0	0	—	0,2	0,2	—	
	72	0,05	0,1	—	0,05	0,1	—	0	0	—	0,05	0,15	—	0,45	0,4	—	

Tabelle 5.

Katheptase- und Ereptasewirkung der Gefrierschnitte der Schilddrüse,
des Hodens und Uterus unter vergleichender Betrachtung
ihrer Mazeration und Trockenpulver.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)																	
Gewebe	Zeit (st)	Gelatine KC (1,8%) ph 4,5						Pepton K (1,8%)ph 4,5						Pepton K (1,8%) ph 7,8			
		Ohne Cystein			Mit Cystein			Ohne Cystein			Mit Cystein			Schnitt	Mazerat	Pulver	
		Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver				
Schilddrüse	5	0	0	0	0,1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,05	0,05	0,05	0	
	24	0,35	0,3	0,2	0,55	0,5	0,4	0,3	0,3	0,2	0,65	0,65	0,6	0,55	0,6	0,5	
	72	0,45	0,4	0,35	0,85	0,8	0,65	0,5	0,5	0,4	0,9	0,95	0,75	0,85	0,85	0,7	
Hoden	5	0	0	0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05	
	24	0,25	0,3	0,2	0,4	0,45	0,35	0,3	0,3	0,25	0,65	0,65	0,55	0,6	0,65	0,5	
	72	0,5	0,5	0,4	0,8	0,75	0,65	0,5	0,5	0,45	1,0	1,05	0,85	1,05	1,0	0,85	
Uterus	5	0	0	0	0	0	0,05	0,05	0	0	0,05	0,05	0	0	0	0	
	24	0,05	0,05	0,05	0,1	0,05	0,05	0,1	0,1	0,05	0,3	0,25	0,05	0,2	0,2	0,1	
	72	0,15	0,1	0,1	0,45	0,2	0,2	0,35	0,35	0,3	0,8	0,7	0,65	0,6	0,6	0,6	

Tabelle 6.

Proteinase- und Peptonasewirkung der Gefrierschnitte der Magenschleimhaut des Schweins unter besonderer Betrachtung ihrer Mazeration und Trockenpulver.

Enzym und Versuchsansatz: Die obere Fläche der Mucosaschicht wurde vorsichtig abgeschnitten und man vermied sorgfältigst die Submucosaschicht mitabzuschneiden.

Der Ansatz bei pH 2 wurde mit Salzsäure bei diesem pH-Wert eingestellt.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)																			
Gewebe	Zeit (st)	ph 4,5																	
		Casein Hammarsten (1,8%)						Gelatine KC (1,8%)						Pepton K (1,8%)					
		Ohne Cystein			Mit Cystein			Ohne Cystein			Mit Cystein			Ohne Cystein			Mit Cystein		
		Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver
Katheptase	5	0	0	0	0	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	24	0,05	0	0	0,1	0,1	0,05	0	0	0	0	0,1	0	0	0,05	0	0,05	0	0
	72	0,1	0,1	0,05	0,1	0,25	0,05	0,1	0,1	0	0	0,1	0,05	0	0,05	0,05	0,05	0,1	0,05
Gewebe	Zeit (st)	ph 2,0									ph 7,8								
		marsten(1,8%)			Gelatine KC (1,8%)			Pepton K (1,8%)			Casein Hammarsten(1,8%)			Gelatine KC (1,8%)			Pepton K (1,8%)		
		Casein Ham-																	
		Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver
Ereptase und Pepsin	5	0,05	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05	0
	24	0,35	0,3	0,2	0,05	0	0	0	0	0	0,05	0,05	0	0	0	0	0	0,05	0
	72	0,4	0,35	0,25	0,15	0,1	0,1	0,05	0	0	0,05	0,1	0,05	0,05	0,05	0	0,05	0,05	0,05

des eigentlichen Mucosaenzym des Magens empfehlen. Die Schnittmazeration erwies sich als fast gleichaktiv wie der Schnitt selbst, bei dem Trockenpräparat aus demselben dagegen war die Wirkung etwas schwächer. Die Gefrierschnitte der Pankreasdrüse des Schweins entfalteten eine deutliche und fast gleichgradige Trypsinaktivität bei pH 7,8, wie die Mazeration aus denselben (Tabelle 7). Diese Beobachtung lässt an eine Selbstaktivierung des Trypsinogens bei Schneiden des gefrorenen Pankreasstücks denken, obwohl hier starke Zermahlung oder Mazeration der Drüsenzellen vermieden wurde. Da die Trypsinaktivität nur sehr schwach in 5stündiger und sehr deutlich erst nach 24stündiger Digestion erschien, wurde die Aktivierung vielleicht gleichmäßig autokatalytisch in der Digestion bei 37° C erlangt. Auch in Digestion bei pH 4,5 wurde Proteinaseaktivität beobachtet, die erst nach längerer Digestion etwa 24 Stunden zu tage trat und durch Cysteinzusatz kaum mehr ver-

stärkt wurde (Tabelle 7). Unter dieser Proteolyse kann man eine bei ph 4,5 abgeschwächte Trypsinaktivität annehmen, die vielleicht durch Säurereaktion bei ph 4,5 erworben wurde, wie Kawaharada (1943)⁷⁾ im hiesigen Institut festgestellt hat, und die sich allmählich in abgeschwächtem Grad bei ph 4,5 entfalten konnte. Über das Proteolysensystem der Pankreasschnitte wird an anderer Stelle eingehend berichtet.

Tabelle 7.

Proteinase- und Peptonasewirkung der Gefrierschnitte der Pankreasdrüse des Schweins unter besonderer Betrachtung ihrer Mazeration und Trockenpulver.

Enzym und Versuchsansatz: Ebenso wie in der vorangegangenen Tabelle.

Aciditätszunahme in 4 ccm Digestat (ccm 0,1 n-NaOH)																		
Zeit (st)	Gelatine KC (1,8%) ph 4,5						Pepton K (1,8) 4,5						Gelatine KC (1,8%) ph 7,8			Pepton K (1,8%) ph 7,8		
	Ohne Cystein			Mit Cystein			Ohne Cystein			Mit Cystein			Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver
	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver	Schnitt	Mazerat	Pulver						
5	0	0,05	0	0,05 (0,05)	0,05 (0)	0	0,05	0	0	0,05 (0)	0,05 (0,05)	0,05 (0,05)	0,25	0,25	0,2	0,3	0,3	0,25
24	0,25	0,3	0,2	0,3 (0,05)	0,3 (0)	0,25 (0,05)	0,3	0,4	0,3	0,25 (-0,05)	0,35 (-0,05)	0,3 (0)	0,65	0,6	0,6	0,95	0,7	0,7
72	0,65	0,65	0,6	0,65 (0)	0,7 (0,05)	0,65 (0,05)	0,75	0,8	0,65	0,75 (0)	0,75 (0,05)	0,65 (0)	1,25	1,25	1,1	1,35	1,15	1,1

Zusammenfassung.

In dieser Arbeit wurden die Proteasewirkungen der Gefrierschnitte verschiedener Organe des Schweins unter vergleichender Betrachtung mit Mazerationen oder Trockenpräparaten der Gefrierschnitte studiert.

1) Die Katheptasewirkungen, Kathoproteinase (Gelatinespaltung bei ph 4,5) und Kathopeptonase (Peptonspaltung bei ph 4,5) der Gefrierschnitte der Leber, Milz und Niere des Schweins kamen deutlich zum Vorschein und erfuhren durch Cystein aktiviert. Nur die Kathoproteinase der Leberschnitte schien fast in vollaktivem Zustande aufzutreten. Eine deutliche Ereptasewirkung (Peptonspaltung bei ph 7,8) wurde auch in Schnitten festgestellt, besonders am stärksten in Nierenschnitten. Die Mazeration dieser Gefrierschnitte zeigten fast gleiche Aktivität wie Gefrierschnitte selbst, während die Aktivität der Trockenpräparate derselben mehr oder weniger beeinträchtigt zu sein schien.

2) Die Lungenschnitte, die eine schwache Aktivität der Kathoproteinase

zeigten, und die Mazeration wie Trockenpräparate, die nicht mehr aktiv waren, griffen Gelatine nach Cysteinzusatz im deutlichen Grad an, während die Peptonhydrolyse in drei Präparaten ohne Aktivator auftrat. Die Lungenereptase fiel auch in ihnen positiv aus:

3) Herzmuskelschnitte wie Mazeration oder Trockenpräparat sind nicht imstande, Gelatine trotz der Cysteinaktivierung zu hydrolysieren, das Pepton jedoch besonders nach der Aktivierung. Herzmuskelereptase war auch in drei Enzympräparaten positiv.

4) Hirnpräparate erwiesen sich als katheptisch minderwertig und als ereptisch nur schwach positiv.

5) Die Präparate der Schilddrüse und des Hodens zeigen deutliche Ereptase- wie Katheptase-Aktivität, welche letztere durch Cystein aktivierbar ist, die des Uterusgewebes aber eine schwächere. Im Gegensatz zu aktiver Kathopeptonase wurde die Uteruskathoproteinase, die sich fast in inaktivem Zustand befand, erst durch Cysteinzusatz in schwachem Masse aktiviert.

6) Die Magenmucosa-Gefrierschnitte wie Mazeration und Trockenpräparat derselben entfalteten nur Pepsinwirkung, während die Mazeration der gewöhnlich ausgekratzten Magenmucosa fast immer katheptisch wie ereptisch aktiv ist.

7) In Gefrierschnitten wie Mazeration und Trockenpräparate der Schweinepankreasdrüse stellte Verf. bei 5stündiger Digestion eine schwache Aktivität der Tryptasewirkung fest, die aber nach 24stündiger Digestion sich auffallend verstärkte. Diese Aktivierung ist vielleicht einer Selbstaktivierung zuzuschreiben. Im Digestat bei pH 4,5 trat nach 24stündiger Digestion eine positive aber sehr schwache Gelatine- oder Peptonhydrolyse auf, die vielleicht von der abgeschwächten Trypsinwirkung bei pH 4,5 herrühren kann, da die Hydrolyse sich nicht als durch Cystein aktivierbar erwies.

8) Die Mazeration, die aus Gefrierschnitten bereitet wurde, verhält sich fast in gleicher Aktivität wie die Gefrierschnitte selbst, die Trockenpräparate aber im allgemeinen mehr oder weniger in abgeschwächter Aktivität.

Dem Unterrichtsministerium sei an dieser Stelle bestens gedankt für die Gewährung einer Unterstützung zur Anregung wissenschaftlicher Forschung.

Prof. Dr. S. Utzino.

Literatur.

- (1) Molown, S. L., Krebsforsch., 1932, 37, 277.
- (2) Utzino, S. u. Yosioka, M., Kagaku-Kenkyū-Sho Kōen-Shū, 1936, 7, 139; 1939, 10, 148 u. 153.
- (3) Utzino, S. u. Sakai, T., Journ. Biochem., 1941, 33, 457.

- (4) Sakai, T., Journ. Biochem., 1943, **36**, 383, 427 u. 443.
 - (5) Onisi, T., Dieses Journ., 1942, **43**, 13.
 - (6) Hirooka, T., Dieses Journ., 1942, **42**, 178.
 - (7) Kawaharada, M., Journ. Biochem., 1943, **36**, 457.
-