

Synthesis of the arginyl-arginine peptide IV was achieved as follows. Reduction of 3β -acetoxy-17-oximino- 5α -androstan¹¹ employing sodium in ethanol provided 3β -hydroxy- 17β -amino- 5α -androstan^e (m.p. 164–165°, $[\alpha]_D^{20} +17^\circ$) and the 17β -amino steroid (2.6 g) was allowed to react with N^{α} -carbobenzoxy- N^G -tosyl-L-arginine as noted above. The resulting arginine amide (4.3 g, m.p. 215–216°, $[\alpha]_D^{20} -17.4^\circ$ in dimethylformamide) was transformed to protected dipeptide IV, m.p. 75–80°, using the procedures developed for synthesis of dipeptide III.

Similar techniques have been utilized for synthesis of longer-chain peptides based on intermediates III and IV and related compounds. The steroid peptides were generally purified by appropriate application of column and preparative thin-layer chromatographic procedures and removal^{9b} of the tosyl groups was accomplished by sodium in liquid ammonia. Construction of steroids with peptide side-chains at other positions (e.g. C-3) is presently under investigation.

Zusammenfassung. Es wird die Möglichkeit erwogen, dass Steroide mit geeignet gebauten Peptidseitenketten am Aufbau oder Transport von Hormonen beteiligt sein könnten. Über die erstmalige Darstellung von Steroidpeptiden wird berichtet. Als Beispiele werden die Synthesen der beiden geschützten Steroidpeptide III und IV beschrieben.

G. R. PETTIT, A. K. DAS GUPTA,
H. KLINGER, and J. OCCOLowitz

Department of Chemistry, University of Maine, Orono
(Maine USA), May 19, 1964.

¹¹ J. SCHMIDT-TOMME, Chem. Ber. 88, 895 (1955).

Die Urokinase des Meerschweinchens

Bei Verwendung von Fibrinogen zur Messung des proteolytischen Potentials des Harnes finden sich weitaus höhere Aktivitäten als bei Verwendung anderer Substrate. Dies wird bedingt durch die Fibrinolysokinase des Harnes, welche das im Fibrinogen enthaltene Profibrinolysin aktiviert. Über die Herkunft der Fibrinolysokinase des Harnes, die auch als Urokinase bezeichnet wird, herrscht noch keine einheitliche Auffassung. Einige Autoren betrachten die Urokinase als eine Ausscheidungsform des im Plasma vorhandenen Profibrinolysinaktivators; andere Autoren sehen den Ursprung der Urokinase im Zelldebris der abführenden Harnwege¹.

Bei verschiedenen Säugetieren bestehen beträchtliche Unterschiede bezüglich der Eigenschaften der Urokinase². Die Urokinase einer Spezies aktiviert nur Profibrinolysin ganz bestimmter anderer Spezies. Das Profibrinolysin der ersten Spezies muss jedoch nicht unbedingt von der Urokinase der anderen Spezies aktiviert werden. Über die Urokinase des Menschen liegen ausführliche Untersuchungen vor³; ferner finden sich mehrere Arbeiten über die Urokinase von Rindern, Katzen, Hunden, Ratten, Kaninchen und Hamstern. Auffallend ist, dass sich bis auf einen kurzen Hinweis bei UNGAR und HAYASHI³ keinerlei Angaben über die Urokinase des Meerschweinchens finden.

Die proteolytische Theorie der Allergie beruht zum Teil auf dem Befund der bei allergischen Reaktionen erhöhten proteolytischen, beziehungsweise fibrinolytischen Aktivität in verschiedenen Körperflüssigkeiten⁴. Eine Erhöhung des fibrinolytischen Potentials des Meerschweinchenharnes findet sich beim anaphylaktischen Schock^{3,5}, beim Arthusschen Phänomen^{3,5} und beim allergischen Ekzem⁵. Diese Befunde beim Meerschweinchen sind von besonderem Interesse, da dieses Versuchstier bei allergischen Reaktionen die beste Vergleichbarkeit mit den Verhältnissen beim Menschen zeigt.

In eigenen Versuchsserien erfolgte die Bestimmung der proteolytischen Aktivität des Meerschweinchenharnes mit der Clot-Lyse-Methode⁶. Da die verwendete Fibrinogen-

präparation Profibrinolysin enthielt, erfolgte gleichzeitig eine Bestimmung der Urokinase. Es scheint nun von Interesse festzustellen, ob bei allergischen Reaktionen eine Erhöhung der Urokinaseausscheidung eintritt oder ob die Erhöhung des fibrinolytischen Potentials des Harnes nur auf eine Vermehrung tryptischer Fermente zurückzuführen ist; aus solchen Bestimmungen könnten auch weitere Hinweise über die Herkunft der Urokinase erlangt werden. Zu diesem Zwecke wurde versucht, die Urokinase des Meerschweinchens mit der caseinolytischen Methode nach v. KAULLA und RIGGENBACH⁶ zu bestimmen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Nachweis der caseinolytischen Wirkung des durch Urokinase aktivierten menschlichen Profibrinolysins.

Wenn sich auch im Einzelversuch eine lineare Korrelation zwischen Harnmenge und aktiviertem menschlichem Profibrinolysin feststellen liess, ergab die Verfolgung der Urokinaseausscheidung bei 10 Meerschweinchen über viele Wochen so stark schwankende Werte, dass Zweifel auftauchten, ob die caseinolytische Methode für die vorliegende Fragestellung geeignet sei. Es wurden deshalb Versuche angestellt, um die Wirksamkeit von Meerschweinchenurokinase auf Profibrinolysin des Menschen, des Kaninchens und des Meerschweinchens zu prüfen. Die Befunde zeigten eine hochgradige Artspezifität der Meerschweinchenurokinase: nur bei Einwirkung auf Meerschweinchenurokinase tritt eine konstante und gut reproduzierbare Aktivierung ein. Lässt man Meerschweinchenurokinase auf menschliches Profibrinolysin einwirken, findet nur eine schwache Aktivierung statt. Die

¹ E. KAISER und W. RAAB, Z. Vitamin-Hormon-Forschung, im Druck (1964).

² S. R. MOHLER, D. R. CELANDER und M. M. GUEST, Am. J. Physiol. 192, 186 (1958).

³ G. UNGAR und H. HAYASHI, Ann. Allergy 16, 542 (1958).

⁴ W. RAAB und E. KAISER, Internist, im Druck (1964).

⁵ E. KAISER, W. RAAB und W. LEPIER, Arch. klin. exp. Dermat., im Druck (1964).

⁶ K. N. v. KAULLA und N. RIGGENBACH, Thromb. Diath. haem. 5, (162) 1960).

erhaltenen Werte betragen im Vergleich zur Wirksamkeit des Menschenharnes nur 20–35%. Andererseits bewirkt die Urokinase des Menschen eine Aktivierung des Meerschweinchenprofibrinolysins in signifikanter und gut reproduzierbarer Weise.

Bei Verwendung von Serum anstelle von Plasma ergeben sich prinzipiell die gleichen Befunde. Die auftretenden Aktivitäten sind jedoch weitaus geringer. Dies weist darauf hin, dass der grösste Teil des Plasmaprofibrinolysins bei der Gerinnung an Fibrin angelagert wird.

Eine Anreicherung der Meerschweinchenurokinase kann durch Fällung des Harnes mit gleichem Volumen Aceton erfolgen. Die Fällung wird bei –10 Grad C durchgeführt. Nach Zentrifugierung wird die Fällung in Phosphatpuffer pH 7,4 aufgelöst, wobei nur ein Zehntel des ursprünglichen Harnvolumens verwendet wird. Diese

Lösung, die nun gegen Leitungswasser dialysiert wird, enthält eine zehnmal höhere Urokinaseaktivität als der Ausgangsharn.

Summary. In contrast to the urinary fibrinolysokinase (=urokinase) of other species, the urokinase in guinea-pigs reveals a most peculiar behaviour. A significant and well reproducible activation of fibrinolysin is obtainable only when guinea-pig fibrinolysin is used. Fibrinolysin of other species is only slightly activated. This fact is most important in investigations on the increased fibrinolytic activity of guinea-pig urine.

W. RAAB

Medizinisch-chemisches Universitäts-Institut, Wien (Österreich), 19. Mai 1964.

Ribonucleaseaktivität isolierter Nebennierenmarkgranula

Die chromaffinen Granula der Nebennierenmarkzellen vom Rind enthalten neben Brenzcatechinaminen, ATP und Eiweiss auch Ribonucleinsäure (RNS) (HILLARP¹, PHILIPPU und SCHÜMANN²). In Inkubationsversuchen mit isolierten Nebennierenmarkgranula konnten wir zeigen, dass die bei 37°C auftretende spontane Freisetzung von Brenzcatechinaminen und ATP von einer RNS-Freisetzung begleitet ist und ferner, dass die Zugabe von kristalliner Ribonuclease (RN-ase) durch Depolymerisierung der granulären RNS zu einer dosisabhängigen und proportional gleich starken RNS-, Amin- und ATP-Freisetzung führt (PHILIPPU und SCHÜMANN^{2,3}). Wie die zugesetzte RN-ase eine Verminderung des RNS-, Brenzcatechinamin- und ATP-Gehaltes verursacht, so könnte auch die spontane Freisetzung dieser Substanzen bei 37°C auf der depolymerisierenden Wirkung einer granulären RN-ase beruhen. Wir haben deshalb untersucht, ob die durch Zentrifugieren über einem Dichtegradienten von Mitochondrien und anderen cytoplasmatischen Partikeln abgetrennten chromaffinen Granula eine RN-ase-Aktivität besitzen. Gleichzeitig wurde der RNS-, Eiweiss- und Brenzcatechinamingehalt bestimmt.

Methoden. Die Granula wurden nach der von SCHÜMANN und WEIGMANN⁴ angegebenen Methode durch Differentialzentrifugieren (0°C, Spinco Ultrazentrifuge) aus Nebennierenmarkhomogenaten vom Rind gewonnen und in 0,3 M Saccharoselösung suspendiert, so dass 1 ml der Suspension Granula aus 200 mg Markgewebe enthielt. Diese Suspension enthält neben chromaffinen Granula auch Mitochondrien und andere cytoplasmatische Partikel. Zur Gewinnung reiner chromaffiner Granula wurde die Suspension nach dem Verfahren von HAGEN und BARNETT⁵ über einem Dichtegradienten (Figur 1) nochmals zentrifugiert (60 min, 100 000 g, Rotor SW 39). Es wurden ein partikelfreier Überstand (Fraktion 1) und 4 partikelhaltige Fraktionen erhalten. Die Fraktionen 2–4 wurden mit der doppelten Menge 0,3 M Saccharoselösung verdünnt, 60 min lang bei 100 000 g abzentrifugiert, die niedergeschlagenen Partikel der Fraktionen 2–4 und das Sediment (Fraktion 5) mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen, erneut zentrifugiert und die Sedimente bei –20°C aufbewahrt. Für jeden Versuch wurden die einzel-

nen Fraktionen aus 18 Röhrchen verwendet. Für die Bestimmungen wurden die Rückstände der Fraktionen 2–5 in 4 ml Aqua dest. aufgenommen, die Fraktion 1 (Überstand) unverdünnt verwendet. In einem aliquoten Teil (0,1–0,2 ml) der einzelnen Fraktionen wurde die RN-ase-Aktivität nach der Methode von DE DUVE, PRESSMAN, GIANETTO, WATTIAUX und APPELMANS⁶ bei pH 5,0 bestimmt, nachdem sich in Vorversuchen ergeben hatte, dass die RN-ase-Aktivität der Fraktionen bei pH 8,0 nur 15–20% der Aktivität bei pH 5,0 betrug. Ein anderer Teil (2 ml) wurde mit 10%iger Trichloressigsäurelösung extrahiert; im Überstand wurden die Brenzcatechinamine nach v.EULER und HAMBERG⁷, im Rückstand das Eiweiss

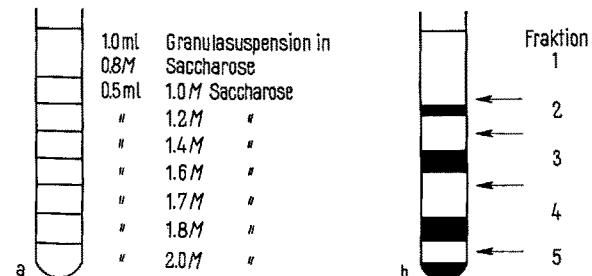


Fig. 1. Trennung der chromaffinen Granula von anderen cytoplasmatischen Partikeln. a, Herstellung des Dichtegradienten; b, Verteilung der Zellpartikel nach dem Zentrifugieren. Die Pfeile weisen auf die Stellen hin, an denen die Röhrchen zur Gewinnung der Fraktionen durchgeschnitten wurden.

¹ N. A. HILLARP, Acta physiol. scand. 43, 292 (1958).

² A. PHILIPPU und H. J. SCHÜMANN, Nature 198, 795 (1963).

³ A. PHILIPPU und H. J. SCHÜMANN, Exper. 19, 17 (1963).

⁴ H. J. SCHÜMANN und E. WEIGMANN, Arch. exp. Path. Pharmak. 240, 275 (1960).

⁵ P. HAGEN und R. J. BARNETT, *Adrenergic Mechanisms* (J. & A. Churchill Ltd., London 1960), p. 83.

⁶ C. DE DUVE, B. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX und F. APPELMANS, Biochem. J. 60, 604 (1955).

⁷ U. S. v. EULER und U. HAMBERG, Acta physiol. scand. 19, 74 (1949).