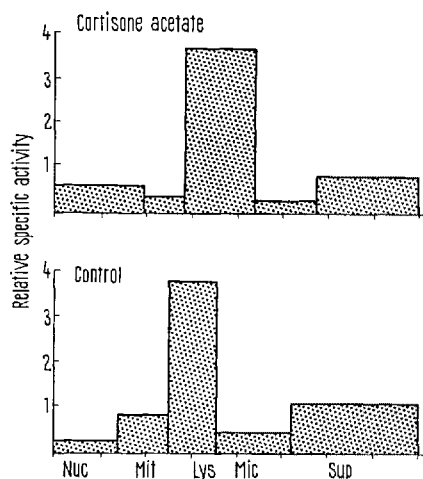


to be very weak in the liver, seems to arise from mesenchymal granulocytes<sup>18</sup>. It was reported that corticosteroid was able to induce extracellular collagenolytic activity in skin or fibroblasts<sup>14,19</sup>. Present results indicate also that cortisone administration caused an increase of the lysosomal collagenolytic activity in the liver, yet it remains obscure whether the activity originates from hepatocytes or mesenchymal cells. The induced collagenolytic activity in nuclear fraction is also interpreted as being due to the activity in mesenchymal cells, contaminated in this fraction. At present the collagenolytic activity and presum-



Intracellular distribution of collagenolytic activity towards acid soluble collagen in rat liver with or without cortisone administration; Nuc, Mit, Lys, Mic and Sup denote nuclear, mitochondrial, lysosomal, microsomal and supernatant fraction.

ably the collagenase activity induced by cortisone administration seems to be partly responsible for the reduction of hepatic collagens.

As indicated by the present investigation, insoluble collagen does not seem to be sensitive to cortisone, so that the cortisone effect may be mainly limited to the metabolism of soluble collagen, similar to the conditions of carbon tetrachloride poisoning<sup>6,11</sup>. In fact, corticosteroid in the quantity administered in the present study did not increase in vivo urinary hydroxyproline excretion in rats<sup>15</sup>, suggesting that the insoluble collagen, which occupies 90% of body collagen, is really metabolically inert. Finally the mode of action of cortisone on hepatic collagens could be explained on the basis of: 1. an inhibition of the anabolism in fibroblasts; 2. an induction of the catabolism by lysosomal collagenolytic activity, resulting in a reduced hepatic content of collagen.

**Zusammenfassung.** Nach Cortison-Behandlung wird sowohl der Gehalt als auch die spezifische Aktivität des neutralen löslichen Kollagens in der Rattenleber vermindert. Die kollagenolytische Aktivität für das lösliche Kollagen vermehrt sich hingegen und zwar trotzdem die Aktivität für unlösliches Kollagen verändert blieb.

C. HIRAYAMA, I. MOROTOMI  
and K. HIROSHIGE

Third Department of Internal Medicine,  
Faculty of Medicine,  
Kyushu University, Fukuoka (Japan), 4 February 1971.

<sup>18</sup> G. S. LAZARUS, J. R. DANIELS, R. S. BROWN, H. A. BLADEN and H. M. FULLMER, *J. clin. Invest.* 47, 2622 (1968).

<sup>19</sup> J. C. HOUCK and V. K. SHARMA, *Science* 161, 1361 (1968).

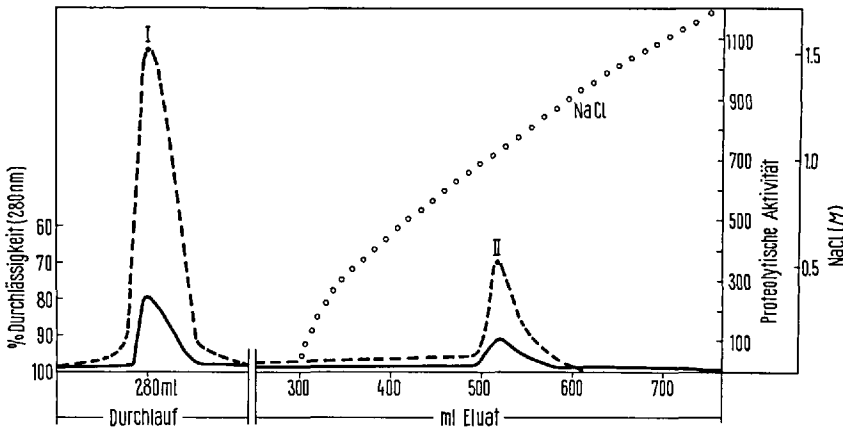
## Proteolytische Enzyme aus dem Darmtrakt der Hornisse (*Vespa orientalis* F.)

Die Evolution der Organismen, die bisher weitgehend aus anatomisch-morphologischer Sicht erklärt worden ist, beruht letztlich auf Mutationen, wobei morphologische Erscheinungsformen nur der sichtbare Ausdruck einer Evolution im molekularen Bereich sind. Für vergleichende Untersuchungen dieser Art sind Proteine sehr günstig, wie die Untersuchungen über das Hämoglobin und das Cytochrom C zeigen<sup>1,2</sup>. In letzter Zeit wurden ebenfalls Proteasen in diese Fragestellung einbezogen, weil sie wegen ihrer notwendigen Einstellung auf verschiedene physiologische Situationen für den evolutionären Gedanken geeignet erscheinen<sup>3,4</sup>.

Lyophilisierte Mitteldärme von orientalischen Hornissen-Larven wurden in 0,01 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 aufgenommen und durch Zentrifugation von größeren Partikeln befreit. Im so erhaltenen Rohextrakt liess sich mit Casein als Substrat eine proteolytische Aktivität nachweisen, die durch die Hydrolyse von spezifischen Estern bereits auf zwei Endopeptidasen hindeutete. Im weiteren Verlauf der Reinigung über einen Anionenaustauscher (DEAE Sephadex A-50) mit 0,01 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 und anschließender Gelfiltration (Sephadex G 75 mit NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Puffer, 0,1 M, pH 8,0) konnten dann zwei Fraktionen isoliert werden, wovon eine das chymotrypsin-spezifische Substrat N-Acetyltyrosinäthylester (ATEE) und die andere das trypsin-spezifische Substrat N-Benzoylarginin-äthylester (BAEE) spaltete. Die Anreicherung in bezug auf die spezifische Aktivität betrug für

die BAEE-Fraktion 9fach, für die ATEE-Fraktion 14fach. Bei der anschliessenden elektrophoretischen Prüfung auf CA-Membranfolien (Veronal-Acetat-Puffer-0,036 M, pH 8,6) zeigte sich ein unterschiedliches Verhalten dieser Fraktionen untereinander als auch im Vergleich mit Trypsin und Chymotrypsin. Die ATEE-spaltende Fraktion wandert wie das Chymotrypsin in kathodischer Richtung, nur läuft sie nicht so weit, während die BAEE-spaltende Fraktion in umgekehrte, anodische Richtung wandert. Diese Wanderungsunterschiede stimmen auch mit dem Befund überein, dass sich das ATEE-spaltende Enzym nach Auftragen auf die Anionen-Austauscher-Säule im Durchlauf befindet, während das BAEE-spaltende Enzym daran festgebunden wird und sich erst mit Hilfe eines NaCl-Gradienten abtrennen lässt. Diese teilweise deutlichen Ladungsunterschiede lassen auf eine Differenz in der Aminosäurezusammensetzung schliessen, die zwischen der ATEE-spaltenden Protease und dem Chymotrypsin weniger deutlich ist als zwischen der BAEE-spaltenden Protease und dem Trypsin. Dass die einzelnen Banden, die mit Coomassie-Blau als Proteine identifiziert werden konnten, wirklich die aktiven Enzyme waren, wurde in einem Agarose-Sandwichverfahren mit Acetylphenylalanin-naphthylester (APNE) und Benzoylarginin-naphthylamid (BANA) in Verbindung mit Diazoblau nachgewiesen<sup>5</sup>.

Interessanterweise lässt sich in einem weiteren Versuch mit Königinnen-Larven keine BAEE-hydrolysierende



Reinigung lyophilisierter Mitteldärme von *Vespa orientalis* durch Anionen-Austauscher-Chromatographie über DEAE-Sephadex A-50. Säule:  $3 \times 53$  cm, Puffer: Tris/HCl 0,01, pH 8,0, Gradient: 2 M NaCl kontinuierlich ansteigend, Mischgefäß: 500 ml. Die proteolytische Aktivität wurde in optischer Dichte mit Casein als Substrat ermittelt. I, ATEE-spaltende Fraktion; II, BAEE-spaltende Fraktion.

Protease nachweisen. Ob ihr Nichtvorhandensein im Zusammenhang mit der besonderen Ernährungsweise steht – Futtersaft («gelée royale») im Gegensatz zur Pollenernährung der Arbeiterinnen und Drohnen –, kann nur vermutet werden. Möglicherweise ist das Nichtvorhandensein einer BAEE-spaltenden Protease bei der Königin auf das Vorkommen von freiem Arginin und Lysin im Futtersaft zurückzuführen, während das Polleneiweiß diese Aminosäuren gebunden enthält<sup>6</sup>. Vergleichbare Ergebnisse sind jetzt auch von den Bienen bekanntgeworden<sup>7</sup>. Auch hier kann für die Königin keine BAEE- und BANA spaltende Protease nachgewiesen werden, während die Arbeiterinnen und Drohnen ein solches Enzym besitzen.

Betrachtet man die Hornissen-Proteasen in Abhängigkeit vom pH-Wert, so ergibt sich für beide ein Optimum im alkalischen Bereich, doch sollte man aus diesem Umstand keinen Anspruch auf Homologie mit den entsprechenden Säugerproteasen ableiten, wie es früher oft geschehen ist. Wahrscheinlich handelt es sich hier lediglich um einen notwendigen Milieufaktor, der aber für eine scharfe Kennzeichnung zu wenig aussagestark ist. Die Molekulargewichte weichen mit 12 500 für die ATEE-spaltende Protease und mit 26 000 für die BAEE-spaltende Protease mehr oder weniger erheblich von den entsprechenden Säuger-Proteasen ab. Hemmversuche mit Phenyl-methyl-sulphonyl-fluorid (PMSF) und Aminosäure-Chlormethan-Verbindungen (TLCK und TPCK) zeigen eine Ähnlichkeit der Hornissen-Proteasen im Hemmverhalten mit anderen Endopeptidasen, die zu ihrer katalytischen Wirkung ebenfalls einen Serin- und Histidinrest im aktiven Zentrum benötigen.

Im Hinblick auf eine mögliche Verwandtschaft zwischen den Proteasen erscheint die Spaltungsspezifität an der B-Kette des oxydierten Insulins am aussagestärksten. Die noch nicht endgültig abgeschlossenen Versuche zeigen durch die Zahl der gewonnenen Einzelpeptide und deren elektrophoretische Beweglichkeit, dass neben identischen Spaltstellen zwischen den Hornissen-Proteasen und dem Chymotrypsin, nicht dem Trypsin der Säuger,

auch neue Spaltstellen auftreten, die für eine etwas erweiterte Spaltungsspezifität gegenüber den Säugerproteasen sprechen. Die genaue Spezifität sowie die Bestimmung der Mol.-Gewichte mittels Ultrazentrifuge bedürfen noch der Auswertung.

Bei den Hornissen-Proteasen lassen sich neben der Hemmbarkeit auch in den katalytischen Eigenschaften Ähnlichkeiten feststellen, die Rückschlüsse auf den Bau des aktiven Zentrums zulassen. Dennoch kann die Frage, ob diese Ähnlichkeiten auf einer homologen oder einer konvergenten Entwicklung beruhen, heute noch nicht entschieden werden.

**Summary.** Two proteinases from the digestive tract of the oriental hornet larva *Vespa orientalis* were investigated. One hydrolyzes the chymotrypsin substrates ATEE and APNE, the other one the trypsin substrates BAEE and BANA. They belong to the 'serine proteases', and split B-chain of oxidized insulin in a way similar to that of vertebrates.

H. E. HAGENMAIER<sup>8</sup>

Zoologisches Institut I der Universität Münster,  
Hindenburgplatz 55, D-44 Münster (Deutschland),  
5. März 1971.

- 1 G. BRAUNITZER, J. Cell. Physiol. 67, 1 (1966).
- 2 E. MARGOLASH, Proc. natn. Acad. Sci. 50, 672 (1963).
- 3 H. NEURATH, K. WALSH und W. WINTER, Science 158, 1638 (1967).
- 4 G. PFLEIDERER, R. ZWILLING und H.-H. SONNEBORN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1319 (1967).
- 5 R. ZWILLING, G. PFLEIDERER, H.-H. SONNEBORN, V. KRAFT und I. STUCKY, Comp. Biochem. Physiol. 28, 1275 (1969).
- 6 A. P. DE GROOT, Physiologia comp. Oecol. 3, 2 (1953).
- 7 W. GIEBEL, R. ZWILLING und G. PFLEIDERER, Comp. Biochem. Physiol. 38, 197 (1971).
- 8 Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für finanzielle Unterstützung gedankt.

## Glycopeptides from Normal and Ulcerated Gastric Mucosae of Pig

Some anti-inflammatory drugs, such as phenylbutazone, salicylate, cortisone and hydrocortisone, are known to induce gastric ulcers. For such drugs, besides such action, an inhibition of  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  incorporation has been observed for the tissues of the stomach of hypophysectomized rats<sup>1</sup>, for the gastric mucous of rats<sup>2</sup>, for the mucopoly-

saccharides of cartilage and cornea<sup>3</sup> and for a mucoprotein fraction of sheep colonic mucosa<sup>4</sup>. Such inhibition has also been reported for rat stomach after fasting<sup>2</sup>. In the present paper the isolation and the chemical characterization of glycopeptides have been carried out, after papain digestion of gastric mucosae of pigs 'Göttinger Zwerg-