AMYLASESYNTHESE IN EINEM LÖSLICHEN SYSTEM AUS PANKREAS

Von

Á. ULLMANN und F. B. STRAUB

CHEMISCHES INSTITUT DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST

(Eingegangen am 31. Juli 1956)

In früheren Untersuchungen haben wir nachgewiesen, dass in Homogenaten des Taubenpankreas, sowie in der »Mitochondrienfraktion« solcher Homogenate, wenn man diese Präparate in Gegenwart eines Aminosäuregemisches und einer hohen Konzentration von ATP inkubiert, eine Zunahme der Amylaseaktivität zu beobachten ist. Indirekte Beweise unterstützten die Folgerung, dass es sich hier um die Synthese des Fermentmoleküls handelt [1, 2, 3].

Ein Homogenat oder dessen isolierte Granülen besitzen noch immer Permeabilitätshindernisse, so dass sie für die Untersuchung des Mechanismus dieser Reaktion nicht den günstigsten Fall bedeuten. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir unsere Erfahrungen mit einem gelösten System, das von den genannten Strukturen frei, jedoch imstande ist, Amylase zu synthetisieren. Es werden weitere Beweise aufgeführt, die dafür sprechen, dass die Zunahme der Amylaseaktivität analog der Eiweisssynthese aus Aminosäuren ist. Über diese Ergebnisse erschien eine »Vorläufige Mitteilung« [4].

Methoden

1. *Reinigung des Azetons.* Zu 1 Liter Azeton (puriss.) werden 4 g $KMnO_4$ und 100 ml einer 6 %igen Na_2CO_3-Lösung zugesetzt. Das Gemisch wird bei Zimmertemperatur 36—48 Stunden lang stehen gelassen, von Zeit zu Zeit umgerührt. Während dieser Zeit darf nur ein kleiner Teil des $KMnO_4$ reduziert werden. (Kommt eine ausgiebige Reduktion zustande, so wird dieses Azeton nicht weiter verarbeitet). Nach der Behandlung mit $KMnO_4$ wird das Gemisch filtriert und dann destilliert. Die Fraktion zwischen 56—59° C wird mit geglühtem $CaCl_2$ (p. a.) versetzt. Nach eintägigem Stehen bei Zimmertemperatur wird das Azeton abgegossen und destilliert. In dunkler Flasche aufbewahrt, ist das Azeton für 1 Monat haltbar.

2. *Darstellung des Azetontrockenpulvers.*

a) *Aus Taubenpankreas.* Nach Dekapitieren wird das Pankreas sofort herausgeschnitten, vom Bindegewege befreit und in 15—20 ml —10° C kaltes Azeton geworfen, das sich in einem, in gesalztem Eis vorgekühlten POTTERschen Glashomogenator befindet. Die Homogenisierung wird 1—2 Minuten lang vorgenommen, das Rohr soll inzwischen aus dem Kältegemisch nicht herausgenommen werden. Das Gemisch wird durch einen (im Kälteraum vorgekühlten) Büchner-Trichter rasch abgesaugt, und der nasse Rückstand wieder in —10° C kaltes Azeton (15—20 ml) gebracht. Nun wird das Gemisch wieder 1 Minute lang homogenisiert, rasch abgesaugt und im Kälteraum in einen Exsikkator über $CaCl_2$ gelegt und in Vakuum getrocknet. Das Pulver soll innerhalb 5—10 Minuten trocken sein und innerhalb 10 Minuten zum Versuch verwendet werden.

b) *Aus Hundepankreas.* Der Hund wird durch Entblutung getötet, eventuell in Chloralose-Narkose. Nachdem wird das Pankreas herausgenommen, vom Bindegewebe befreit in einem

gekühltem Becherglas in Stücke von ungefähr 2 g geschnitten. Die einzelnen Stücke werden in ca. 20 ml —10° C kaltem Azeton, wie oben beschrieben, homogenisiert. Ein Teil des Bindegewebes bleibt dabei zurück. Das Homogenat wird in ein Becherglas gegossen (das Becherglas ist auch in Kältemischung gekühlt) und das am Boden bleibende Bindegewebe weggeworfen. Während die weiteren Portionen des Pankreas in derselben Weise homogenisiert werden, vereinigt man das Gemisch. Dann wird es in Kälte rasch abgesaugt, der nasse Rückstand mit —10° C kaltem Azeton verrührt und in ebensoviele Portionen, durch Zugabe von insgesamt desselben Azetons, wie vorher, zum zweiten Male je 1 Minute lang homogenisiert. Die (gut gekühlten) zweiten Homogenate werden vereinigt und in Kälte rasch abgesaugt. Der Rückstand wird in einem Exsikkator über $CaCl_2$ in Kälte rasch getrocknet. Bei Aufarbeitung eines grösseren Pankreas von ca. 20 g wird zum vollständigem Trocknen eine längere Zeit (½—1 Stunde) benötigt. Um das Trocknen zu beschleunigen, wird das Pulver inzwischen erneut zerrieben.

c) *Aus Schweinepankreas.* Die Drüse wird vom Schlachthof angeschafft und in Eis gekühlt ins Laboratorium transportiert. Sie wird, so weit wie möglich, vom Fett befreit und weiter wie unter 2*b* verarbeitet.

3. *Aufbewahrung des Trockenpulvers.* Das Azetontrockenpulver soll immer in Kälte in einem evakuierten Exsikkator über $CaCl_2$ gehalten werden. Auch so bewahrt es seine Aktivität nicht länger als 5—10 Stunden.

4. *Wässriges Extrakt.* 1 g Azetontrockenpulver wird mit 5 ml eiskaltem glasdestilliertem Wasser 10 Minuten lang bei 0° C verrührt und dann bei 0° C 10 Minuten lang mit einer Schwerkraft von 14 000 *g* zentrifugiert. Die Wasseraufnahme des Rückstandes ist bedeutend grösser beim Trockenpulver des Taubenpankreas, als bei dem des Hundepankreas, am geringsten ist sie beim Schweinepankreas. Das wässrige Extrakt ist eine klare, gelbliche Flüssigkeit aus Taubenpankreaspulver. Das zentrifugierte Extrakt des Schweinepankreas-Trockenpulvers ist meistens eine trübe, gelbe Flüssigkeit.

5. *Azetat-Niederschlag aus Schweinepankreas-Extrakt.*

Methode A : Das Trockenpulver wird, wie unter 4. beschrieben, mit Wasser extrahiert, der Rückstand abzentrifugiert. 1,5 ml der überstehenden Flüssigkeit werden mit 0,75 ml kaltem destillierten Wasser verdünnt und mit 0,2 ml eines 0,2 *M* Azetatpuffer von pH 4,2 versetzt. Das pH sinkt dabei auf 5,0. Das Gemisch wird bei 0° C mit 8500 *g* 7 Minuten lang zentrifugiert, die überstehende Lösung weggeworfen, der Niederschlag mit 0,2 ml destilliertem Wasser aufgeschwemmt und mit dem Inkubationsgemisch (s. unten) verrührt.

Methode B : 300 mg Azetontrockenpulver werden 10 Minuten lang mit 5 ml kaltem destillierten Wasser verrührt, und mit 10 000 *g* 10 Minuten lang bei 0° C zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird mit 0,2 ml 0,2 *M* Azetatpuffer von pH 4,2 versetzt. Das weitere Verfahren ist wie in Methode A beschrieben.

6. *Entfernen der Amylase durch Adsorption an Stärke.* 4,5 ml eines wässrigen Extraktes aus Hundepankreas-Trockenpulver werden mit 3 g LINTNER-Stärke verrührt und sofort 5 Minuten lang bei 0° C mit 10 000 *g* abgeschleudert. In einigen Fällen wurde die überstehende Flüssigkeit (1,5 ml) in derselben Weise mit einer zweiten Charge von LINTNER-Stärke (1 g) behandelt.

7. *Zusammensetzung des Inkubationsgemisches für die Amylasesynthese.*

Reagenzien :

Als Adenosintriphosphat verwendeten wir das sauere Na-Salz der Firma *Richter*, Budapest. Eine 10 %ige Lösung wird mit KOH auf ungefähr pH 4 gebracht. Diese Lösung wird dann 6—8mal durch eine Kolonne von IRC—50 (Wasserstoffzyklus) getrieben (20 ml Lösung : 1,5 g Austauscher ; Kolonnehöhe 5 cm), mit KOH auf pH 7 eingestellt und in gefrorenem Zustande aufbewahrt. Haltbarkeit : etwa 2 Wochen.

Salzlösung. Die Stammlösungen der Krebs-Bikarbonat-Ringerlösung werden in der doppelten der angegebenen Konzentration bereitet, vor dem Versuch in entsprechenden Proportionen gemischt und mit CO_2 durchgespült. NaCl, KCl und $NaHCO_3$ waren pro analysi Präparate von *Chinoin*, Budapest. $MgSO_4$ und $CaCl_2$ waren pro analysi *Merck* Präparate.

Glyzerin-Salzlösung. 100 ml destilliertes Glyzerin werden mit 7,2 ml einer 4,6 *M* NaCl Lösung gemischt, und von den (doppelt konzentrierten) KCl-, $MgSO_4$-, und $CaCl_2$-Lösungen die entsprechende Menge hinzugefügt.

In der späteren Phase unserer Untersuchungen haben wir KH_2PO_4 und $NaHCO_3$ der Salzlösung nicht mehr zugesetzt. Die hohe Konzentration des Adenosintriphosphats versichert eine sehr starke Pufferung, so dass die genannten Komponenten überflüssig, sogar störend waren.

Eiweisshydrolysat. Wir gebrauchten ein lyophilisiertes Pulver »Protolysate« von *Mead and Johnson.*

Aminosäuregemisch. Die Gesamtkonzentration im Reaktionsgemisch war 0,02 *M*. Die verwendeten Aminosäuren waren: L-Tryptophan, L-Arginin.HCl, D,L-Threonin, D,L-Valin, L-Tyrosin, D,L-Lysin, D,L-Leucin, D,L-Isoleucin, D,L-Histidin.HCl, D,L-Phenylalanin.

Askorbinsäure. Schwermetallfreie Askorbinsäure wird in 0,33 *M* Lösung mit $KHCO_3$ neutralisiert. Die Lösung wird vor jedem Versuch frisch bereitet.

Inkubationsgemisch. 1 ml der ATP-Lösung, 0,24 ml Askorbinsäurelösung, 34 mg Eiweisshydrolysat (oder 0,2 ml einer Lösung von Aminosäuregemisch) werden mit 3,2 ml der doppelt konzentrierten Krebs-Salzlösung oder der Glyzerin-Salzlösung gemischt.

p-Fluor-D,L-Phenylalanin. Das Präparat wurde in unserem Institut von L. POLGÁR nach der Methode von BERGMAN [5] dargestellt. Schmelzpunkt: 240° C.

Ribonuklease. Das Ferment wurde in unserem Institut von G. ZACHARIEV aus Rindepankreas nach der modifizierten KUNITZ-Methode [6] kristallisiert.

8. *Inkubation.*

A. *Wasserextrakt:* man versetzt 0,4 ml mit 0,6 ml des gekühlten Inkubationsgemisches.

B. *Azetat-Niederschlag:* der Niederschlag aus 1,5 ml Wasserextrakt (s. 5. A) oder der Niederschlag aus dem Extrakt von 300 mg Trockenpulver (s. 5. B) wird mit 0,2 ml kaltem destillierten Wasser aufgeschwemmt und mit 0,7 ml Inkubationsgemisch gelöst.

Wenn die Wirkung irgendwelcher Substanz auf die Amylasesynthese untersucht wird, so wird sie in einem Volumen von nicht mehr als 0,05 ml gelöst zugesetzt. Das Gesamtvolumen in einem Versuch ist 0,8—1,2 ml. Das Reaktionsgemisch wird in kleinen Reagenzröhren in einem Wasserbad von 38° C geschüttelt.

9. *Amylasebestimmung.* Zu bestimmten Zeiten während der Inkubation, werden 0,100 ml des Reaktionsgemisches in 20 ml eiskaltes Wasser pipettiert. Die verschiedenen verdünnten Proben sammelt man in einem Eisbad bis zu Beginn der Amylasebestimmung. Die Bestimmung geschieht nach der Methode von SMITH und ROE [7], die wir einigermassen modifizierten. Vor jeder Serienbestimmung versuchen wir in einer Probe das Volumen (meistens 0,5—2 ml) und die Zeit (5—15 Min.) festzustellen, die bei der gegebenen Amylaseverdünnung eben zureicht, um eine Stärke-Spaltung zwischen 40—60% des Ausgangwertes zu verursachen. Die Jodfarbe wird mit Stufenphotometer, oder mit einem objektiven Photokolorimeter bestimmt.

Ergebnisse

I. *Amylasesynthese im Wasserextrakt des Trockenpulvers*

Ebenso wie im Homogenat [2], ist auch in diesem System zur Steigerung der Amylaseaktivität eine hohe Konzentration von ATP und die Gegenwart von Aminosäuren unentbehrlich. Der Zusatz von Askorbinsäure verursacht eine regelmässige Zunahme der Amylasesynthese, für die Reaktion ist sie aber scheinbar nicht unentbehrlich. Tabelle I zeigt die gefundene Amylasesynthese in Versuchen, wo die Wirkung von ATP und Aminosäuren geprüft wurde. Man sieht ferner, dass dieselben 10 Aminosäuren, die nach HOKIN [8] für die Amylasesynthese in Pankreasschnitten nötig sind, das Eiweisshydrolysat ersetzen können.

Die Anwendung von Glyzerin als Lösungsmittel hat bestimmte Vorteile. Die Extrakte aus dem Azetontrockenpulver von Pankreas besitzen immer eine proteolytische Aktivität, die von einem Präparat zum anderen variiert. Diese proteolytische Aktivität kann durch Bestimmung der freien Aminosäuren verfolgt werden. Je höher die Glyzerinkonzentration, umso kleiner ist die Proteolyse, währenddessen die Amylasesynthese bis zu 60 Volumen % Glyzerin nicht beeinflusst wird.

Abb. 1—3 zeigen die Statistik der Versuche, die wir mit Extrakten durchgeführt haben. Man sieht, dass die Synthese in 30 Minuten etwa 10—15%

Tabelle I

Einfluss der zugesetzten Substanzen auf die Amylasesynthese

Inkubationsgemisch: Glyzerin-Salzlösung mit Askorbinsäure

No.	Wasserextrakt des Trockenpulvers aus	Zusätze			Amylaseaktivität zur Zeit 0	Synthese E/ml in 45 Min.
		ATP	EH	10 AS		
1.	Schwein	+	+	—	9100	2200
		+	—	—	10100	0
		—	+	—	10100	400
2.	Taube	+	+	—	2150	390
		+	—	—	2500	60
3.	Hund	+	+	—	3920	580*
		—	+	—	4250	—200*
4.	Taube	+	+	—	2360	370
		+	—	+	2480	430
5.	Taube	+	+	—	2380	310
		+	—	+	2180	320

* Synthese E/ml in 60 Min.

EH: Eiweisshydrolysat.
10 AS: Aminosäuregemisch von 10 Aminosäuren (s. methodischen Teil).

erreicht. Die grosse Labilität des Amylase synthetisierenden Systems erklärt, warum die Synthese im Schweinepankreasextrakt die geringste ist, manchmal

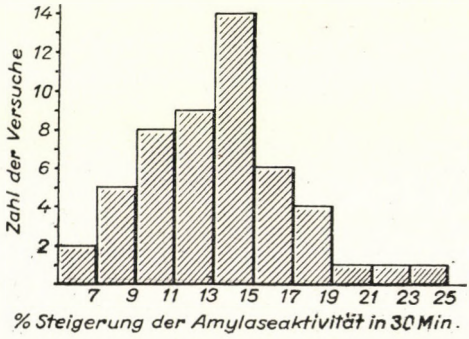

Abb. 1. Amylasesynthese im Wasserextrakt des Trockenpulvers aus Taubenpankreas. Statistische Verteilung der Ergebnisse: Amylasesynthese in Prozenten der Ausgangsaktivität

sogar fehlt. Offensichtlich beansprucht die Verarbeitung des Gewebes immer längere Zeit in der Reihenfolge: Taube, Hund, Schwein.

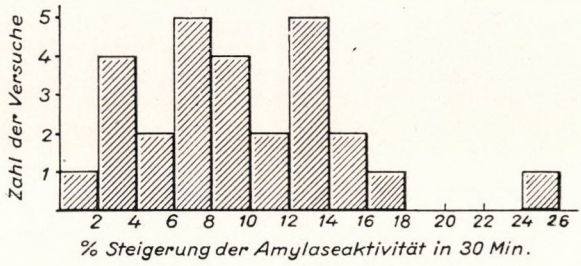

Abb. 2. Amylasesynthese im Wasserextrakt des Trockenpulvers aus Hundepankreas. Statistische Verteilung der Ergebnisse, wie in Abb. 1

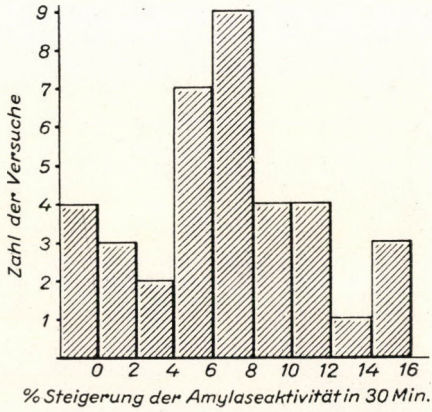

Abb. 3. Amylasesynthese im Wasserextrakt des Trockenpulvers aus Schweinepankreas. Statistische Verteilung der Ergebnisse, wie in Abb. 1

Der Amylasegehalt im Reaktionsgemisch, zu Beginn der Versuche, zeigte folgende Verteilung :

Azetontrockenpulver aus	Zahl der Versuche	Amylaseaktivität (E/ml) im Reaktionsgemisch zur Zeit 0		Synthese, % (Durchschnitt)
		Durchschnitt	Extremwerte	
Taube	51	3410	1040— 7600	13,6
Hund.....	27	3650	1370— 7000	9,9
Schwein.....	39	7600	980—18400	6,4

II. *Versuche zur Anreicherung des aktiven Systems*

Der hohe Amylasegehalt der wässrigen Extrakte aus dem Azetontrockenpulver bietet grosse technische Schwierigkeiten für die Bestimmung der zusätzlichen Synthese. Wir haben deshalb in zwei Richtungen versucht das präformierte Ferment zu entfernen.

1. *Adsorption an Stärke.* Wie bekannt [9, 10] wird Malzamylase und die Amylase von *Clostridium acetobutylicum* aus einer wässrigen Azetonlösung an Stärke spezifisch adsorbiert. Die Adsorption der Pankreasamylase aus unseren wässrigen Extrakten ist nicht so günstig, gelingt jedoch teilweise bei Anwendung von grossen Stärkemengen und mit bedeutendem Verlust an Volumen des Extraktes. Eine tiefgreifende Entfernung der Amylase ist aber unmöglich,

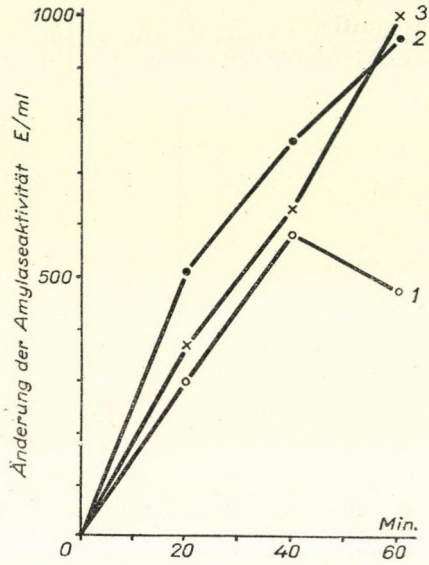

Abb. 4. Amylasesynthese im löslichen System (Hundepankreas). Entfernung der Amylase durch Stärkeadsorption. *1:* Extrakt von 5920 E/ml 8,1 %; *2:* nach einer Stärkebehandlung, von 4690 E/ml 21 %; *3:* nach zwei Stärkebehandlungen, von 3720 E/ml, 27 % Synthese in einer Stunde

da die Stärke offensichtlich auch einige Komponenten des synthetisierenden Systems adsorbiert. Es gelingt jedoch in mehreren Fällen einen Teil der Amylase zu entfernen. Abb. 4 zeigt einen solchen Versuch. Die Ausführung der Stärkeadsorption wurde im methodischen Teil beschrieben. Man sieht, dass die *Menge* der synthetisierten Amylase nach zwei Stärkeadsorptionen unverändert blieb, d. h. in Prozenten des ursprünglichen Amylasegehaltes ausgedrückt, die Synthese immer höher wurde. Diese Methode wurde jedoch des grossen Volumverlustes und der Gefahr des Aktivitätsverlustes wegen nicht weiter verwendet. Der Versuch in Abb. 4 ist jedoch lehrreich, da diese Ergebnisse die Unabhängigkeit der Amylasesynthese von der Menge des präformierten Fermentes beweisen.

2. *Azetatniederschlag.* Schweinepankreas-Trockenpulver ist ein billiges Ausgangsmaterial, hat aber den Nachteil, dass es zu viel Amylase enthält. Wir haben gefunden, dass man aus dem wässrigen Extrakt dieses Pulvers bei pH 5 einen Niederschlag bekommt, in dem das Verhältnis Amylasegehalt :

Amylasesynthesefähigkeit viel günstiger ist, als im ursprünglichen Wasserextrakt. Die Darstellung dieses Azetatniederschlages ist im methodischen Teil beschrieben, Methode A gab bessere Ergebnisse. Es stellte sich aber heraus, dass der Azetatniederschlag gegen Verunreinigungen viel empfindlicher ist, als der Wasserextrakt. Da wir die Natur dieser Verunreinigungen nicht kennen, ist das Präparat des Azetatniederschlages zur Zeit noch nicht als befriedigend zu bezeichnen, oft bekommt man inaktive Präparate. Wir haben trotzdem in mehreren Fällen solche Präparate gebraucht; weiter unten werden wir Beispiele für ihre Aktivität aufführen.

III. *Spezifische Hemmungen der Amylasesynthese*

Die unten zu beschreibenden Versuche über die Wirkung von spezifischen Hemmstoffen haben wir in allen vier verschiedenen Systemen ausgeführt (Tauben-, Hund- und Schweinepankreas Trockenpulverextrakt, sowie Azetat-

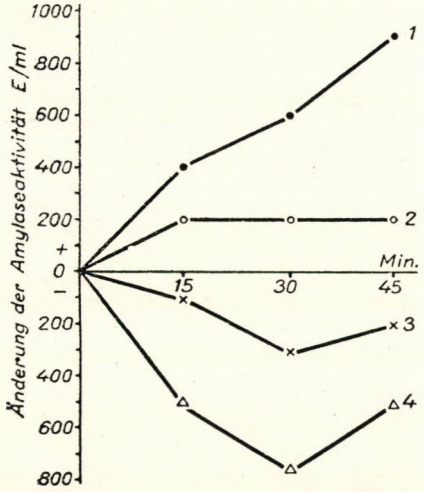

Abb. 5. Wirkung von Chloramphenicol auf die Amylasesynthese. Azetatniederschlag aus Schweinepankreasextrakt nach Methode 5. B. Ausgangsaktivität: 5200 E/ml. *1:* Kontrolle, *2*, *3* und *4:* mit 0,5 μg, 1,5 μg bzw. 4,5 μg D(—)Threo-Chloramphenicol/ml Reaktionsgemisch

niederschlag des Extraktes aus Schweinepankreaspulver) und in allen dieselbe Wirkung gefunden. Deshalb sprechen wir im folgenden von diesen Systemen im allgemeinen, und fassen sie alle unter dem Namen »lösliches System« zusammen.

In unseren früheren Mitteilungen haben wir beschrieben, dass die Steigerung der Amylaseaktivität im Saccharose-Homogenat oder in der »Mitochondrienfraktion« des Taubenpankreas durch Chloramphenicol gehemmt wird.

Die Wirkung von Chloramphenicol in dem löslichen System sieht man am Beispiel der Abb. 5 und 6. Es ist hervorzuheben, dass eine viel kleinere Chloramphenicolkonzentration hemmend wirkt, als im Falle der »Mitochondrien-

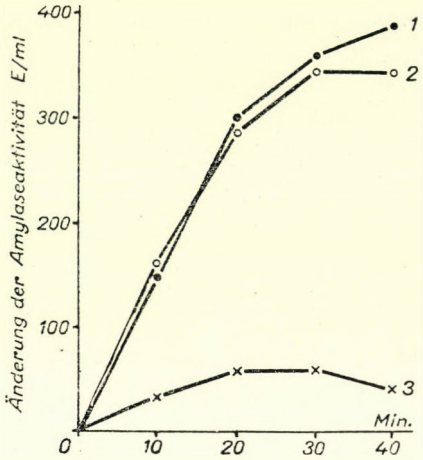

Abb. 6. Spezifität der Chloramphenicolhemmung. Amylasesynthese im löslichen System aus Taubenpankreas. Ausgangsaktivität: 1970 E/ml. *1:* Kontrolle, *2:* mit 1 μg/ml L(+)-Erythro-Chloramphenicol, *3:* mit 1 μg/ml D(−)-Threo-Chloramphenicol

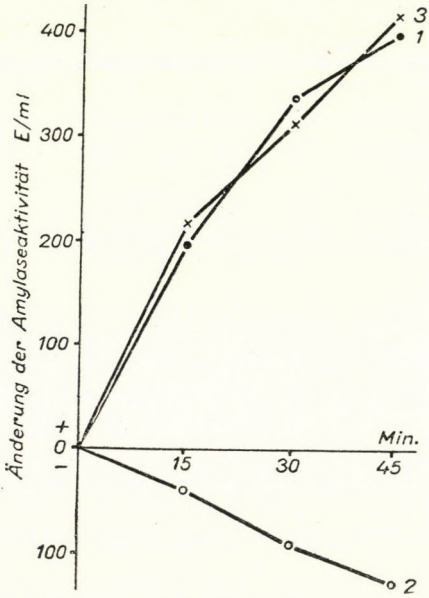

Abb. 7. Wirkung von p-Fluor-D,L-Phenylalanin (p-FPhe) und D,L-Phenylalanin auf die Amylasesynthese im löslichen System. Azetatniederschlag aus Schweinepankreasextrakt (Methode 5. A). Ausgangsaktivität: 980 E/ml. *1:* Kontrolle, *2:* mit 100 μg p-FPhe, *3:* mit 100 μg p-FPhe und 1 mg Phenylalanin

fraktion«. Diese Erscheinung kann wahrscheinlich durch die Abwesenheit von Permeabilitätshindernissen erklärt werden, da im Gewebschnitt 100 μg Chloramphenicol noch wirkungslos sind [11].

p-Fluorphenylalanin wirkt hemmend in Bakterien und hat eine hemmende Wirkung auf die adaptive Fermentsynthese, es hemmt die Inkorporation von radioaktiven Aminosäuren. Diese Hemmung wird durch Phenylalanin kompetitiv aufgehoben [12]. Es wird allgemein angenommen, dass p-Fluor-

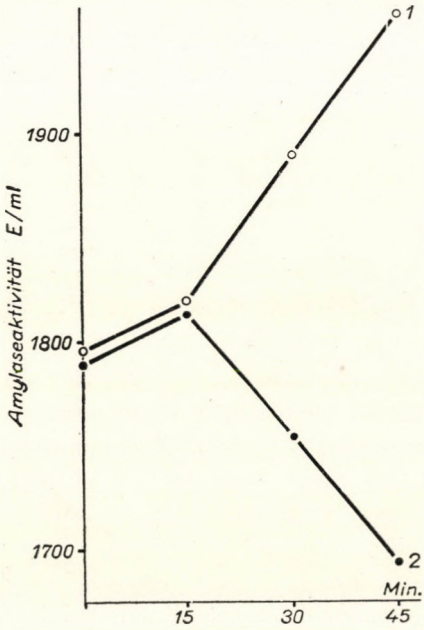

Abb. 8. Wirkung von Ribonuklease auf die Amylasesynthese im löslichen System. Wasserextrakt aus Hundepankreas. Ausgangswert: 1800 E/ml. *1:* Kontrolle, *2:* mit 16 μg kristallisierter Ribonuklease

phenylalanin als Aminosäureanalog die Eiweisssynthese hemmt. Wie aus Abb. 7 ersichtlich, hemmt p-Fluorphenylalanin in kleiner Konzentration die Steigerung der Amylaseaktivität in dem löslichen System. Die Hemmung ist durch Zugabe der zehnfachen Konzentration von D,L-Phenylalanin vollständig aufgehoben.

Ribonuklease (aus Rindepankreas) hemmt die Steigerung der Amylaseaktivität, wie aus Abb. 8 ersichtlich. Das kristallisierte Ferment war frei von proteolytischer Aktivität, die Vernichtung der Amylasesynthese kann also nicht den proteolytischen Beimengungen der Ribonuklease zugeschrieben werden, umso weniger, da ja unser gelöstes System selbst eine hohe proteolytische Aktivität besitzt.

Besprechung

Wir verzichten auf eine eingehende Besprechung der in dieser Arbeit beschriebenen Befunde, da weitere Versuche, die gleichzeitig veröffentlicht werden [12] einen tieferen Einblick in den Mechanismus der Amylasesynthese erlauben. An dieser Stelle möchten wir darauf hinweisen, dass es gelungen ist, in einem löslichen System *in vitro* die Synthese eines Fermentes hervorzurufen, eine Synthese, die Energetisierung (ATP) und Aminosäuren braucht. Die Ergebnisse der spezifischen Hemmungen dieser Synthese durch Ribonuklease, Chloramphenicol und p-Fluorphenylalanin laufen parallel mit den Ergebnissen, die man bei der adaptiven Fermentsynthese in den bekannten mikrobiologischen Systemen, und mit jenen Ergebnissen, die man an verschiedenen Objekten mit Hilfe der Inkorporation rakioaktiver Aminosäuren über den Mechanismus der Eiwesssynthese gewonnen hat. Der Mechanismus der Amylasesynthese in diesem löslichen System scheint also mit der Eiweisssynthese aus Aminosäuren identisch oder nahe verwandt zu sein.

In Homogenaten und »Mitochondrienpräparaten« aus Taubenpankreas haben wir eine höhere prozentuale Zunahme der Amylaseaktivität gefunden, als in dem löslichen System. Trotzdem besitzen die Versuche mit dem letzteren eine bessere Beweiskraft. Im Homogenat und im »Mitochondrienpräparat« ist ein Teil der Amylase in gebundener Form zugegen. Im löslichen System gibt es keine Zellstrukturen mehr und durch Behandlung mit Butanol konnten wir nie gebundenes Ferment nachweisen. Obwohl in dem von uns beschriebenen Reaktionssystem auch im Homogenat und im »Mitochondrienpräparat« die Zunahme der Amylaseaktivität nicht durch eine Demaskierung gebundenen Fermentes erklärbar war, bringen diese Versuche mit dem gelösten System weitere Beweise dafür, dass die Steigerung der Amylaseaktivität *in vitro* eine wirkliche synthetische Reaktion bedeutet.

Zu Beginn unserer Arbeit über Amylasesynthese im Homogenat fanden wir, dass diese Erscheinung nur in Gegenwart einer recht hohen ATP-Konzentration zu beobachten ist. Wir fanden damals, dass Pankreashomogenate und die daraus erhaltene »Mitochondrienfraktion« ATP sehr rasch abbauen können. Das gelöste System hat eine sehr schwache Adenosintriphosphatase-Aktivität. Trotzdem braucht man dieselbe hohe Konzentration. Diese Konzentration ist etwa zweimal so hoch, wie die auf die ganze Zelle berechnete Konzentration der ATP-reichen Zellen. Es ist jedoch leicht möglich, dass die ATP-Konzentration an Ort und Stelle der synthetischen Reaktionen auch in den Zellstrukturen die von uns benutzte Konzentration erreicht.

Über die Natur der aktiven Stoffe, die die Amylasesynthese in diesem löslichen System hervorrufen, wäre noch verfrüht etwas zu sagen. Wenn wir von einem löslichen System sprechen, so soll diese Nomenklatur betonen, dass im Extrakt des Azetontrockenpulvers diejenige Strukturen, in denen das aktive

System in der Zelle vorkommt, nicht mehr vorhanden sind. Aus einem Saccharosehomogenat wird die Amylase synthetisierende Aktivität fast vollständig durch Zentrifugieren mit 14000 *g* enfernt, währenddessen wird aus dem Extrakt des Azetontrockenpulvers (ohne Saccharose) keine Aktivität bei dieser Schwerkraft abgesetzt. Trotzdem ist es leicht möglich, dass das lösliche System solche Strukturen enthält, deren Partikelgrösse diejenige der Eiweisskörper weit überschreitet.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein Wasserextrakt aus speziell dargestelltem Azetontrockenpulver von Pankreasgewebe synthetisiert Amylase, wenn ein Aminosäuregemisch und eine hohe Konzentration von Adenosintriphosphat zugesetzt werden. Dieses lösliche System ist sehr labil. Die Amylasesynthese wird durch kleine Konzentrationen von Chloramphenicol (1 μg/ml), p-Fluorphenylalanin (0,1 mg/ml), und Ribonuklease gehemmt. Diese spezifischen Wirkungen zeigen, dass der Mechanismus der Amylasesynthese mit der Eiweisssynthese aus Aminosäuren identisch, oder sehr nahe verwandt ist.

LITERATUR

1. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Acta Physiol. Hung. **6**, 377 (1954).
2. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Ibid. **8**, 279 (1955).
3. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Ibid. **10**, 137 (1956).
4. Straub, F. B., Ullmann, Á., Ács, G.: Biochim. Biophys. Acta **18**, 439 (1955).
5. Bergmann, E. D.: J. Am. Chem. Soc. **74**, 4948 (1952).
6. Biochemical Preparations (ed. by E. E. Snell), Wiley, New York, (1953). Vol. **3**, p. 9.
7. Smith, B. W., Roe, J. H.: J. Biol. Chem. **179**, 53 (1949).
8. Hokin, L. E.: Biochem. J. **48**, 320; **50**, 216 (1951).
9. Starkenstein, E.: Biochem. Z. **24**, 210 (1910).
10. Hockenhull, D. J. D., Herbert, D.: Biochem. J. **39**, 102 (1945).
11. Rychlik, K.: persönliche Mitteilung.
12. Ullmann, Á., Straub, F. B.: Acta Physiol. Hung. **11**, 31 (1956).