

Sind im Labmolekül mehrere functionirende Gruppen anzunehmen?

Von

Dr. S. Korschun.

(Aus dem kgl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. und dem bakteriologischen Institut der medicin. Gesellschaft in Charkow.)

(Der Redaction zugegangen am 27. December 1902.)

Die vielfach angenommene Verwandtschaft der Enzyme mit den Toxinen erhielt erst eine sichere Basis durch die erfolgreichen Versuche, mit Enzymen zu immunisiren, d. h. durch systematische Vorbehandlung von Thieren Antienzyme zu erhalten, die in ihrer Entstehung und Wirkungsweise den Antitoxinen analog sind. Nachdem schon Hildebrandt¹⁾ eine immunisirende Behandlung von Thieren mit Emulsin mit Erfolg versucht hatte, gelang es v. Dungern,²⁾ Antienzyme gegen einige proteolytische Enzyme pathogener Mikroorganismen zu erzeugen. Ein Antilab erhielten durch spezifische Immunisirung etwa gleichzeitig Morgenroth³⁾ und Briot;⁴⁾ ersterer verfolgte zuerst zahlenmässig den Verlauf der Immunisirung, den er mit Hülfe einer sehr exacten Bestimmungsmethode studirte. Zu diesen Antienzymen gesellten sich in neuerer Zeit immunisatorisch erzeugte Antikörper gegen das Lab von *Cynara cardunculus*,⁵⁾ gegen Trypsin,^{a)} gegen Tyrosinase,^{b)} gegen Pepsin,^{c)} so dass die Möglichkeit, Antienzyme zu erzeugen, generell als eine sichergestellte Regel anzusehen ist.

1) Hildebrandt, Virchow's Arch., Bd. 131.

2) v. Dungern, Münch. med. Woch., 1898.

3) Morgenroth, Centralbl. f. Bakt., Bd. 26, 1899.

4) Briot, Thèse de Paris, 1900.

5) Morgenroth, Centralbl. f. Bakt., Bd. 27, 1900.

a) Achaume, Annal. Inst. Pasteur, 1901.

b) Gessard, Compt. rend. Soc. Biol., 1902, S. 551.

c) Sachs, Fortschr. d. Med., 1902.

Die theoretischen Schlussfolgerungen, welche man auf Grund der Seitenkettentheorie Ehrlich's aus der Möglichkeit, Antienzyme auf dem Wege der Immunisirung zu erhalten, ziehen kann, sind schon von Morgenroth in seiner Studie über das Antilab wie folgt präcisirt worden:

«Diese Betrachtung leitet zu der wichtigen Frage über, wie man sich denn die Bildung des Antilabs vorzustellen habe. Nach der Seitenkettentheorie müssen wir annehmen, dass das Antilab von gewissen Organen erzeugt wird, Organen, die in ihren Zellen Seitenketten besitzen, welche das Labmolekül zu verankern im Stande sind. Unter dem Einflusse der Ausschaltung der Seitenketten werde diese nun, wie es auch bei der Bildung der Antitoxine anzunehmen ist, im Ueberschusse erzeugt, werden abgestossen und erscheinen so als Antikörper im Blute. Aus dieser Anschauung ergibt sich die Folgerung, dass auch das Lab eine spezifische haptophore Gruppe besitzt. Da sich nun bei den Toxinen herausgestellt hat, dass die toxische Wirkung nicht allein an die Existenz einer haptophoren Gruppe, die nur eine Vermittlerrolle spielt, geknüpft ist, sondern dass die Giftwirkung durch eine besondere Atomgruppierung hervorgerufen wird, ist bei der sonstigen Uebereinstimmung der Toxine und Enzyme die Annahme nahegelegt, dass auch das Fermentmolekül entsprechend gebaut ist und ausser der haptophoren Gruppe noch eine zymophore besitzt, welche die spezifische Fermentwirkung bedingt.»

In seinem verbreiteten Lehrbuch¹⁾ weist neuerdings Oppenheimer, welcher diese Anschauung eingehend bespricht, auf deren Berechtigung hin.

Es wäre nun von vornherein die Auffassung nicht von der Hand zu weisen, dass zur Charakterisirung der Enzyme eine einzige chemische Gruppe genügt, welche einerseits Trägerin der Enzymwirkung ist und die Verankerung an das fermentativ zu beeinflussende Substrat bedingt und welche andererseits auch im Organismus verankert wird und dementsprechend die Bindung des Enzyms mit dem Antienzym vermittelt.

1) Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig. 1900.

Bekanntlich hat Ehrlich¹⁾ selbst für die Toxine die Nothwendigkeit bewiesen, zwei charakteristische Gruppen anzunehmen, von denen die eine, die haptophore Gruppe, die specifischen Bindungen vermittelt, während die andere, die toxophore Gruppe, die Trägerin der Giftwirkung ist.

Durch ein äusserst sorgfältiges Studium der quantitativen Beziehungen zwischen dem Diphtheriegift und dem Diphtherieantitoxin konnte Ehrlich feststellen, dass die Giftwirkung der Toxine und deren Fähigkeit, Antikörper zu binden, zwei getrennte Functionen sind.

Bekanntlich dient zur Feststellung dieser Functionen die Bestimmung dreier Fundamentalwerthe. Der Toxicitätsgrösse liegt die Bestimmung der absoluten tödtlichen Dosis des Toxins zu Grunde, während die Neutralisationsfähigkeit der Toxine durch die Feststellung des L_0 - und L_+ -Werthes bestimmt wird. Als L_0 -Werthe des Giftes wird diejenige Toxinmenge bezeichnet, welche von einer constanten Antitoxinmenge — der Immunitäts-einheit — eben völlig unwirksam gemacht wird, während als L_+ -Werth des Giftes diejenige Toxinmenge bezeichnet wird, welche, mit der Antitoxineinheit gemischt, so neutralisirt wird, dass gerade eine tödtliche Dosis des Toxins frei bleibt. Wären nun Toxicität und Neutralisationswerthe eines Toxins einheitliche Functionen, so würden Veränderungen der absoluten Toxicität und Veränderungen der Neutralisationswerthe L_0 und L_+ stets parallel gehen. Thatsächlich besteht aber zwischen beiden Grössen eine weitgehende Unabhängigkeit.

Dies kennzeichnet sich besonders durch den Umstand, dass eine Diphtheriegiftlösung einen erheblichen Theil ihrer Giftigkeit im Laufe der Zeit verlieren kann, während ihre Fähigkeit, Antitoxine zu binden, vollständig erhalten bleibt. So beobachtete Ehrlich an einer Diphtheriebouillon, dass im Laufe von $\frac{3}{4}$ Jahren die Giftigkeit auf $\frac{1}{3}$ herabgegangen war, während die Grundwerthe L_0 und L_+ , welche die Beziehungen des Toxins zu dem Antitoxin definiren, dieselben geblieben waren.

¹⁾ Ehrlich, Werthbestimmung des Diphtherieheilserums, Klin. Jahrb., 1897. — Ueber die Constitution des Diphtheriegiftes. Deutsch. med. Wochenschr., 1898.

Es war also hier der quantitative Uebergang von $\frac{2}{3}$ des Toxins in ungiftige, aber bindungsfähige Modificationen, Toxoiden, nachzuweisen. Ganz entsprechende Vorgänge der Toxoidbildung konnte Madsen¹⁾ an dem Tetanolysin zeigen.

Derartige Beobachtungen machen natürlich die Annahme zweier Gruppen der Toxine zu einer Nothwendigkeit. Auf Beobachtungen anderer Art, welche zu demselben Schlusse führen, wie die Immunisirung mit den ungiftigen Toxoiden und das Verhalten der complexen Cytotoxine, welches eine wesentliche Stütze dieser Anschauungen bildet, können wir an dieser Stelle nicht näher eingehen.

Es ist aus dem Gesagten ersichtlich, dass es von der grössten Wichtigkeit ist, auch für die Enzyme den Toxoiden analoge Derivate nachzuweisen. Durch diesen Nachweis würde es sich mit Sicherheit ergeben, dass man auch bei den Enzymen zwei Gruppen, eine haptophore und eine zymophore Gruppe, anzunehmen hat, und dass die Annahme einer einzigen charakteristischen Gruppe den bekannten Erscheinungen durchaus nicht genügt. Es erschien deshalb im höchsten Grade wünschenswerth, Derivate des Labes nachzuweisen, welche die Fähigkeit besitzen, das Antilab zu verankern, ohne selbst eine Labwirkung auszuüben.

Versuche in dieser Richtung wurden schon früher im Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. von Myers und Bashford angestellt. Diese beiden Untersucher bemühten sich, durch zerstörende Agentien, theils thermischer, theils chemischer Art, eine Veränderung der in einer Lablösung vorhandenen Enzymmoleküle in dem angegebenen Sinne herbeizuführen. Trotz einiger Versuche, welche sich wohl in diesem Sinne verwerthen lassen, waren die Resultate so inconstant und die Ursachen dieser Unregelmässigkeiten so wenig zu ermitteln, dass eine Entscheidung durch diese Versuche nicht herbeizuführen war. Ich habe in einer Anzahl von Versuchen, bei welchen Lablösungen eine bestimmte Zeit auf verschiedene Temperaturen (zwischen 55° und 60°) erwärmt

1) Madsen, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 32, 1899.

wurden, zwar günstigere Resultate als meine Vorgänger erhalten, denen aber auch durch die mangelnde Constanz die überzeugende Kraft fehlte.

Im Folgenden beschränke ich mich darauf, eine Versuchsanordnung mitzutheilen, die mir stets unzweideutige und widerspruchslose Resultate ergeben hat. Es gelang mir, die gesuchten Labmodificationen in den Lablösungen nachzuweisen, und zwar vermittelt Filtration durch poröse Kerzen.

Das Antilab, dessen wahre Antienzynnatur ich schon in einer früheren Arbeit¹⁾ sichergestellt habe, lieferte mir das normale Pferdeserum, das, wie ich schon früher¹⁾ angegeben habe, vor dem Gebrauch durch zweitägige Dialyse von einem zweiten labhemmenden Factor befreit wurde. Die Technik meiner Versuche sei im Folgenden kurz geschildert. Die stets verwendete 1%ige Lösung von Witte'schem Labpulver (1 : 3000000) wurde mit Leitungswasser hergestellt. Die absolute Bestimmung der Verlabungskraft meiner Mischungen wurde stets nach dem von Morgenroth angegebenen Verfahren ausgeführt. In den Versuchen zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit der Lablösungen wurde nach demselben Verfahren vorgegangen, indem wechselnde Mengen Lab mit je 0,15 ccm dialysirtem Pferdeserum gemischt wurden. Lab und Antilab blieben 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen, nachdem, wie in allen Versuchen, das Gesamtvolumen der Flüssigkeit auf 2 ccm gebracht war. Erst dann wurden 10 ccm mit Chloroform conservirter Milch zugesetzt. Diejenige Labmenge, welche durch 0,15 des Pferdeserums gerade vollkommen neutralisirt wurde, so dass keine Gerinnung eintrat, stellte die Lo-Menge dar, während L+ derjenigen Labmenge entspricht, welche, mit 0,15 Pferdeserum gemischt, gerade Gerinnung hervorruft.

Zur Filtration verwendete ich eine 1%ige Lablösung, die durch kleine Berkefeldkerzen und in einem Falle durch eine Chamberlandkerze geschickt wurde. Von 100 ccm der 1%igen Lablösung wurden stets 20 ccm zu Controllversuchen verwendet und der Rest von 80 ccm Lab so filtrirt, dass je 3 Portionen

1) Korschun, Diese Zeitschr., 1902.

von 20 ccm gesondert aufgefangen wurden. Der Verlauf der Versuche ist aus folgenden Tabellen zu ersehen (Tab. I—V, S. 252—255).

Versuch I.¹⁾

Absolute Bestimmung des Labs 1%ige Lablösung		Lo-Bestimmung 0.15 ccm Pferdeserum + 1%ige Lablösung	
nicht filtrirt	durch Berkefeldkerze filtrirt	nicht filtrirt	durch Berkefeldkerze filtrirt
1. 0,0005 ccm ○	1. 0,03 ccm ○	1. 0,06 ccm ○	1. 0,2 ccm ○
2. 0,0006 „ ○	2. 0,035 „ ○	2. 0,065 „ ○	2. 0,3 „ ○
3. 0,0007 „ +	3. 0,04 „ +	3. 0,070 „ ○	3. 0,4 „ ○
4. 0,0008 „ +	4. 0,045 „ +	4. 0,075 „ +	4. 0,5 „ +
5. 0,0009 „ +	5. 0,05 „ +	5. 0,08 „ +	5. 0,6 „ +
		6. 0,09 „ +	6. 0,7 „ +

Abschwächung:

1. der tödtlichen Dosis $0,04 : 0,0007 = 57,1$ Mal.
2. der Lo-Dosis $0,4 : 0,07 = 5,71$ Mal.

Versuch II.

Absolute Bestimmung des Labs 1%ige Lablösung		
nicht filtrirt.	durch Berkefeldkerze filtrirt.	
	die erste Portion	die letzte Portion
1. 0,0009 ccm ○	1. 0,02 ccm ○	1. 0,006 ccm ○
2. 0,0010 „ ○	2. 0,025 „ ○	2. 0,007 „ ○
3. 0,0011 „ +	3. 0,03 „ +	3. 0,008 „ +
4. 0,0012 „ +	4. 0,035 „ +	4. 0,009 „ +
5. 0,0013 „ +	5. 0,04 „ +	5. 0,010 „ +

¹⁾ + bedeutet Verlabung. ○ Ausbleiben derselben.

Lo-Bestimmung

0,15 ccm Pferdeserum + 1% ige Lablösung

nicht filtriert	durch Berkefeldkerze filtriert	
	die erste Portion	die letzte Portion
1. 0,035 ccm ○	1. 0,12 ccm ○	○
2. 0,04 „ ○	2. 0,15 „ ○	○ (0,15 ccm)
3. 0,045 „ +	3. 0,2 „ ○	+
4. 0,05 „ +	4. 0,25 „ ○	+
5. 0,055 „ +	5. 0,30 „ ○	+
	6. 0,35 „ +	+
	7. 0,40 „ +	+
	8. 0,45 „ +	+

Die Abschwächung:

1. der tödlichen Dosis:

a) erste Portion (0,3 : 0,0011) = 27 Mal,

b) letzte Portion (0,008 : 0,0011) = 6,7 Mal:

2. der Lo-Dosis:

a) erste Portion (0,3 : 0,04) = 7,5 Mal,

b) letzte Portion (0,15 : 0,04) = 3,75 Mal.

Versuch III.

Absolute Bestimmung des Labs

1% ige Lablösung

nicht filtriert	durch Berkefeldkerze filtriert		durch Chamberlandkerze filtriert
	erste Kerze	zweite Kerze	
1. 0,0008 ccm ○	1. 0,15 ccm ○	○	○
2. 0,0009 „ ○	2. 0,02 „ ○	○	○
3. 0,0010 „ +	3. 0,025 „ +	+ (0,025 ccm)	○
4. 0,0011 „ +	4. 0,03 „ +	+	+ (0,03 ccm)
5. 0,0012 „ +	5. 0,035 „ +	+	+

Die Abschwächung der tödlichen Dosis:

1. erste Berkefeldkerze 0,025 : 0,001 = 25 Mal,

2. zweite Berkefeldkerze 0,025 : 0,001 = 25 Mal,

3. Chamberlandkerze 0,03 : 0,001 = 30 Mal.

Lo - Bestimmung

0,15 ccm Pferdeserum + 1% ige Lablösung

nicht filtrirt	durch Berkefeldkerze filtrirt		durch Chamberlandkerze filtrirt
	erste Kerze	zweite Kerze	
1. 0,02 ccm ○	1. 0,18 ccm ○	○	○
2. 0,025 » ○	2. 0,2 » ○	○ (0,2 ccm)	○ (0,2 ccm)
3. 0,03 » +	3. 0,025 » +	+	+
4. 0,035 » +	4. 0,3 » +	+	+
5. 0,04 » +	5. 0,35 » +	+	+

Die Abschwächung der Lo-Dosis:

1. erste Berkefeldkerze $0,2 : 0,03 = 6,6$ Mal.
2. zweite Berkefeldkerze $0,2 : 0,03 = 6,6$ Mal.
3. Chamberlandkerze $0,2 : 0,03 = 6,6$ Mal.

Versuch IV.

Absolute Bestimmung des Labs
1% ige Lablösung

nicht filtrirt	durch Berkefeldkerze filtrirt	
	erste Portion	letzte Portion
1. 0,001 ccm ○	1. 0,009 ccm ○	○
2. 0,0012 » ○	2. 0,01 » ○	○
3. 0,0014 » +	3. 0,02 » ○	+ (0,02)
4. 0,0016 » +	4. 0,03 » ○	+
5. 0,0018 » +	5. 0,04 » ○	+
6. 0,002 » +	6. 0,05 » ○	+
	7. 0,06 » +	+
	8. 0,07 » +	+

Abschwächung der absoluten Wirkung:

1. erste Portion $0,06 : 0,0014 = 42,9$ Mal.
2. letzte Portion $0,02 : 0,0014 = 14,3$ Mal.

Lo-Bestimmung

1%ige Lablösung

nicht filtriert	durch Berkefeldkerze filtriert	
	erste Portion	letzte Portion
1. 0,07 ccm ○	1. 0,065 ccm ○	1. 0,18 ccm ○
2. 0,08 » ○	2. 0,07 » ○	2. 0,2 » ○
3. 0,09 » +	3. 0,075 » ○	3. 0,25 » ○
4. 0,1 » +	4. 0,08 » +	4. 0,3 » +
5. 0,11 » +	5. 0,09 » +	5. 0,35 » +
6. 0,12 » +	6. 0,1 » +	6. 0,4 » +
7. 0,14 » +		

Abschwächung der Lo-Dosis:

1. erste Portion $0,7 : 0,08 = 8,75$ Mal,
2. letzte Portion $0,25 : 0,08 = 3,13$ Mal.

Versuch V (neues Labpulver).

Absolute Bestimmung des Labs 1%ige Lablösung		Lo-Bestimmung 0,15 ccm Pferdeserum + 1%ige Lablösung	
nicht filtriert	durch Berkefeld- kerze filtriert	nicht filtriert	durch Berkefeld- kerze filtriert
1. 0,0012 ccm ○	1. 0,01 ccm ○	1. 0,1 ccm ○	1. 0,4 ccm ○
2. 0,0014 » ○	2. 0,02 » ○	2. 0,11 » ○	2. 0,45 » ○
3. 0,0016 » +	3. 0,03 » +	3. 0,12 » +	3. 0,5 » ○
4. 0,0018 » +	4. 0,04 » +	4. 0,13 » +	4. 0,55 » +
		5. 0,14 » +	5. 0,6 » +

Die Abschwächung:

1. der tödtlichen Dosis $0,03 : 0,0016 = 18,75$ Mal,
2. der Lo-Dosis $0,5 : 0,11 = 4,54$ Mal.

Stellt man die in den einzelnen, von einander unabhängigen Versuchen erhaltenen Abschwächungen der absolut

verlabenden Wirkung und der Neutralisationsflüssigkeit zusammen, so erhält man folgende Werthe:

absoluten Wirkung.	Abschwächung der neutralisirten Wirkung.	Verhältniss der Abschwächungen.
57.1	5.7	10 : 1
42.9	8.75	4.9 : 1
30	6.6	4.6 : 1
27	7.5	3.6 : 1
25	6.6	3.8 : 1
18.75	4.54	4.1 : 1
14.3	3.13	4.6 : 1
6.7	3.75	1.8 : 1
5	2.7	1.9 : 1

Die Abschwächung der neutralisirenden Wirkung ist also in allen Fällen geringer, als die der absoluten Labwirkung, und zwar in den verschiedenen Fällen um das 10- bis 1,8fache.

Was den Vorgang betrifft, der sich bei der Filtration der Lablösungen abspielt, so ist nicht anzunehmen, dass die Labmodifikationen erst bei der Filtration entstehen. Als die nächstliegende Vorstellung erscheint die, dass schon in dem käuflichen Labpulver ein Theil des Labs modificirt ist. Nimmt man nun an, dass die Poren der Filter durch Adsorption in viel höherem Maasse die intacten Labmoleküle zurückhalten, als die des modificirten Labs, so erklärt sich ungezwungen das Zustandekommen der hier beschriebenen Versuchsergebnisse. Die Eigenschaften der Adsorption besitzen, wie bekannt, die einzelnen Filter in verschiedenem Maasse, worauf die Ursache der verschiedenen, wenn auch gleichsinnigen Werthe der einzelnen Versuche beruht.

Eine derartige selective Adsorptionswirkung der Filter ist nichts Ungewöhnliches, wie die Versuche von Ehrlich und Morgenroth¹⁾ lehren, in denen von zwei im Uebrigen sich äusserst ähnlich verhaltenden Complementen eines Serums bei der Filtration durch Pukallfilter das eine zurückgehalten wurde, während das andere das Filter passirte. Hierher gehört auch die Angabe von Effront,²⁾ dass das Invertin aus Hefe die

1) Ehrlich und Morgenroth, Berlin. klin. Wochenschr., 1900. Nr. 31.

2) Effront, Les Enzymes et leurs applications. Paris, 1899.

Chamberlandkerze passiert, während das Invertin von *Aspergillus niger* von derselben zurückgehalten wird.

Es sprechen unsere Versuche dafür, dass die Annahme einer einzigen wirksamen Gruppe im Lab, der gleichzeitig die Funktion der haptophoren und der toxophoren Gruppe zukommt, ausgeschlossen ist. Das Labmolekül muss also eine complexe Zusammensetzung besitzen; ob es nach Art eines Toxins oder nach Art der aus zwei Theilstücken bestehenden Cytotoxine wirkt, ist erst durch weitere Versuche, die auch im Institut für experimentelle Therapie fortgeführt werden, zu entscheiden. Immerhin erscheint diese Feststellung als ein weiterer Fortschritt in dem so schwierigen Gebiet der Fermente, die ja an und für sich durch ihre Wirksamkeit, sowie durch ihre Analogien zu gewissen Bacterienproducten von besonderer Bedeutung sind. Es dürfte sich das hier erzielte weitere Eindringen in die Constitution der Fermente, das zu der Feststellung bindungsfähiger, aber unwirksamer Modificationen führte, den Fortschritten auf diesem Gebiete anschliessen, die wir E. Fischer's stereochemischer Betrachtung der Enzyme und der in letzter Zeit erworbenen Kenntniss der Antienzyme verdanken.