

Über die Aufnahme von Trypsin durch verschiedene Substanzen.

Von
S. G. Hedin.

(Der Redaktion zugegangen am 11. Januar 1907.)

In der letzten Zeit habe ich in verschiedenen Abhandlungen über Untersuchungen berichtet, die sich alle auf eine Art von Verbindung zwischen Trypsin und anderen Substanzen beziehen. Die untersuchten Substanzen waren: der tryptische Antikörper im Serum, Knochenkohle und Casein. Da die Untersuchungen jetzt so weit fortgeschritten sind, daß sich die Resultate einigermaßen überblicken lassen, und da die in den drei Fällen erhaltenen Resultate vieles Gemeinsames darbieten, so habe ich eine kurze Zusammenstellung der Ergebnisse und der Schlußfolgerungen sowie die Darlegung einiger Bemerkungen, die sich erst nach einer vergleichenden Darstellung machen lassen, für angemessen gehalten.

Für alle Versuche wurde Trypsin gebraucht, das aus der Pankreasdrüse des Rindes durch Selbstverdauung, Filtrieren, Verdauung des Filtrates, bis praktisch alles Eiweiß zerstört war, und Dialysieren erhalten worden war. Besonders sei schon hier hervorgehoben, daß die annähernde Abwesenheit von Eiweiß in gewissen Fällen eine notwendige Bedingung ist für die von mir erzielten Resultate, was übrigens an geeigneter Stelle des näheren erklärt werden wird. Die Menge des in aktiver Form anwesenden Trypsins wurde durch Verdauung von Casein bestimmt. Die stattgehabte Verdauung wurde durch Fällung mit Gerbsäure in Überschuß und Bestimmung des Stickstoffs im Filtrate ermittelt. Besonders darauf gerichtete Versuche haben gezeigt, daß, wenn ein Überschuß von Casein vorhanden ist, die erhaltene Stickstoffmenge der gebrauchten Trypsinmenge

einfach proportional ist, was eine quantitative Schätzung des anwesenden aktiven Trypsins ermöglicht.¹⁾

Trypsin und Antitrypsin.²⁾

Als Antitrypsin wurde einfach das mit Ammonsulfat dargestellte Serumalbumin benutzt. Die von dem Antikörper neutralisierte Enzymmenge ist von der Reihenfolge abhängig, in welcher Antikörper, Trypsin und Casein gemischt werden. Die geringste antitryptische Wirkung wird erhalten, wenn das Trypsin und das Casein gemischt werden, bevor der Antikörper zugegeben wird, also wenn die Reihenfolge des Mischens Casein—Trypsin—Antikörper ist. Wenn die Substanzen in der Reihenfolge Trypsin—Antikörper—Casein gemischt werden, wird das neutralisierende Vermögen des Antikörpers größer, und zwar wird umsomehr Trypsin neutralisiert, je länger die Mischung Trypsin—Antikörper aufbewahrt wird, bevor das Casein zugesetzt wird. Früher oder später wird jedoch ein Zustand erreicht, in welchem kein Trypsin mehr neutralisiert wird. Einer gewissen Menge Antitrypsin entspricht deshalb für gegebene Bedingungen ein gewisses Maximum der Wirkung. Diese maximale Wirkung wird mit geringen Mengen von Antikörper früher erreicht (in gewissen Fällen in 5 Minuten), als mit größeren Mengen. Die erforderliche Zeit scheint auch für verschiedene Trypsinpräparate etwas verschieden zu sein. Ähnliche Beobachtungen sind für gewisse Toxine und Antitoxine von Fraser³⁾ und von Martin und Cherry⁴⁾ gemacht worden. Außerdem ist die Temperatur, in welcher die Mischung Trypsin—Antikörper aufbewahrt wird, von entscheidendem Einfluß auf die Menge des neutralisierten Trypsins, indem die maximale Wirkung des Antikörpers um so größer auffällt, je höher die Temperatur ist.

Der Einfluß der Reihenfolge des Mischens sowie der

¹⁾ Journ. of Physiol., Bd. XXXII, S. 468, 1905.

²⁾ Hedin, On the antitryptic action of serum-albumin, Journ. of Physiol., Bd. XXXII, S. 390, 1905, und Trypsin and Antitrypsin, Bio-Chem. Journ., Bd. I, S. 474, 1906.

³⁾ Nature 1896, S. 569.

⁴⁾ Proc. roy. soc. 1898, S. 420.

der Zeit und Temperatur deuten darauf hin, daß eine Art von Verbindung zwischen dem Trypsin und dem Antikörper zustande kommt, welche Verbindung eine gewisse Zeit für ihre Bildung braucht und von welcher bei einer hohen Temperatur mehr gebildet wird als bei einer niedrigen. Daß das Neutralisieren des Trypsins nicht auf einer etwaigen Zerstörung von Trypsin beruht, scheint dadurch bewiesen zu werden, daß in allen Fällen bald ein Zustand erreicht wird, in welchem kein Trypsin mehr neutralisiert wird. Wenn das Enzym schlechthin abgetötet wäre, dann würde der Prozeß nicht aufhören, bis alles Trypsin zerstört worden wäre.

Die Menge des anwesenden Wassers ist ohne wesentlichen Einfluß auf die Menge des schließlich neutralisierten Trypsins. Hiermit soll nicht gesagt werden, daß nicht die Geschwindigkeit des Neutralisierens durch die Konzentration beeinflusst werden könne.

Durch quantitative Bestimmungen des neutralisierten Trypsins wurde festgestellt, daß der Antikörper durch einen Überschuß von Trypsin gesättigt werden kann. Sogar mehr als drei Viertel der anwesenden Trypsinmenge kann neutralisiert werden, ohne daß eine nachweisbare Menge von Antikörper frei bleibt. Wenn größere Mengen Antikörper zugegeben werden, findet sich am Ende der Reaktion sowohl aktives Trypsin wie aktiver Antikörper in der Lösung, und es hat sich als unmöglich erwiesen, alles Trypsin durch einen Überschuß von Antikörper zu neutralisieren. Dies könnte vielleicht durch das Vorhandensein von verschiedenen Trypsinen mit verschiedenen Affinitäten zum Antikörper erklärt werden. Daß das gebrauchte Trypsin verschiedene Enzyme enthalten haben mag, soll nicht geleugnet werden; wenn aber dies zur Erklärung der fraglichen Beobachtung herangezogen werden könnte, dann müßte die frei bleibende Menge von Trypsin bei Überschuß von Antikörper der zugesetzten Trypsinmenge proportional sein. Dies ist aber entschieden nicht der Fall: von einer großen Trypsinmenge bleibt bei Überschuß von Antikörper verhältnismäßig weniger frei als von einer geringeren.¹⁾

¹⁾ Bio-Chem. Journ., Bd. I, S. 479.

Da das freie Trypsin durch Digestion von zugefügtem Casein bestimmt wurde, so neige ich zu der Ansicht, daß alles Trypsin sehr wohl am Antikörper gebunden gewesen sein mag, bevor das Casein zugegeben wurde, daß aber das Casein etwas von dem am Antikörper gebundenen Trypsin an sich gerissen habe, worauf eine entsprechende Verdauung von dem Casein habe folgen müssen. Von einem derartigen Verlauf wird ausführlicher die Rede sein, wenn die Einwirkung von Kohle auf Trypsin abgehandelt werden wird.

Die von dem Antikörper neutralisierte Trypsinmenge ist nur in der Weise eine konstante, daß, wenn a Teile Trypsin mit b Teilen Antikörper in oben angegebener Weise behandelt, die tryptische Wirkung c geben, so werden $n \cdot a$ Teile Trypsin, mit $n \cdot b$ Teilen Antikörper behandelt, die Wirkung $n \cdot c$ geben. Dies ist in der Tat nur eine Folge der oben erwähnten Beobachtung, daß die Menge des anwesenden Wassers ohne wesentlichen Einfluß auf die Menge des neutralisierten Trypsins ist. In dem Falle, daß die Wirkung $c = 0$ wäre, was nach dem Gesagten von mir nie beobachtet wurde, würde diese Regel mit dem von Ehrlich für Toxine und Antitoxine aufgestellten Gesetz der konstanten Proportionen zusammenfallen.¹⁾

Wenn aber verschiedene Mengen Antikörper auf die gleiche Menge Trypsin einwirken, wird durch eine geringe Menge Antikörper verhältnismäßig mehr Trypsin neutralisiert als durch eine größere. Diese Regel ist auch für den Fall gültig, daß der Antikörper durch Trypsin völlig gesättigt wird. Eine gewisse Menge Antikörper verbindet sich demnach, je nach der Menge des anwesenden Trypsins, mit verschiedenen Mengen von demselben. Bekanntlich sind ähnliche Beobachtungen auch für verschiedene Toxine und Antitoxine gemacht worden.

Der Antikörper wird durch 0,2%ige Essigsäure während 8 Stunden bei 37° zerstört. Da das Trypsin unter solcher Behandlung nur sehr wenig leidet, wurde versucht, aus Mischungen von Trypsin und Antikörper, die bei 37° aufbewahrt worden

¹⁾ Michaëlis, Die Bindungsgesetze von Toxin und Antitoxin, Berlin 1905.

waren, bis der Antikörper seine maximale Wirkung erreicht hatte, durch Zugabe von Essigsäure das Trypsin in aktiver Form wieder zu gewinnen. Dies ist mir aber in keinem Falle gelungen.

Trypsin und Knochenkohle.¹⁾

Wenn dem Trypsin Knochenkohle zugegeben wird, entwickelt die Kohle eine sehr starke, antitryptische Wirksamkeit, und wie Digestionsversuche mit Casein in Gegenwart der für das Neutralisieren angewandten Kohle zeigen, besteht eine weitgehende Analogie zwischen der Art und Weise, in welcher diese Wirkung zustande gebracht wird, einerseits durch die Kohle und andererseits durch den tryptischen Antikörper. Der Einfluß der Reihenfolge des Mischens, der Zeit, der Temperatur und der Konzentration war in beiden Fällen der gleiche. Außerdem konnte die Kohle wie der Antikörper mit Trypsin gesättigt werden. In keinem der Fälle konnte das Trypsin völlig neutralisiert werden. Ein quantitativ verschiedenes Verhalten zeigte jedenfalls die Reaktionszeit, indem das Ende des Neutralisierens mit Kohle nicht immer in 24 Stunden erreicht wurde, während der Antikörper in vielen Fällen weniger als $\frac{1}{2}$ Stunde dafür brauchte. Infolge der langen Zeit, die für das Neutralisieren durch Kohle gebraucht wurde, möchte ich es besonders für hohe Temperaturen nicht als ausgeschlossen ansehen, daß etwas Trypsin, unabhängig von der Einwirkung der Kohle, zugrunde gehen könnte. Deshalb könnte es auch fraglich erscheinen, ob die kräftigere, antitryptische Wirkung, welche beim Aufbewahren der Kohle-Trypsin-Mischung bei einer hohen Temperatur erhalten wurde, nicht dadurch zustande kommt, daß eine ausgiebigere Zerstörung von Enzym stattfindet bei einer hohen Temperatur, als bei einer niedrigen. Daß bei einer hohen Temperatur tatsächlich mehr Trypsin neutralisiert wird, als bei einer niedrigen, geht jedoch aus zwei Versuchen hervor, in welchen die Reaktionsgeschwindigkeit und die Reaktionszeit für

¹⁾ Hedin, An antitryptic effect of charcoal and a comparison between the action of charcoal and that of the tryptic antibody in the serum. *Bio-Chem. Journ.*, Bd. I, S. 484, 1906.

verschiedene Temperaturen verglichen wurden.¹⁾ Durch den einen Versuch wurde bewiesen, daß zwei gleiche Trypsinproben, welche ohne Kohle 3 Stunden aufbewahrt worden waren, die eine bei 17° und die andere bei 37°, dieselbe aktive Trypsinmenge enthielten. Während 3 Stunden war deshalb nicht mehr Trypsin zerstört worden bei 37° als bei 17°. In anderen Proben, welche mit Kohle behandelt wurden, wurde während derselben Zeit bedeutend mehr Trypsin neutralisiert bei 37° als bei 17°. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist also größer bei 37° als bei 17°. Durch den anderen Versuch wurde bewiesen, daß das Ende des Neutralisierens früher erreicht wird bei 20° als bei 37°, oder mindestens, daß keine längere Zeit in Anspruch genommen wird bei einer niedrigen Temperatur, als bei einer hohen. Wenn aber die Reaktionsgeschwindigkeit größer ist bei hoher Temperatur und die Reaktion eben so lange oder länger dauert, wie bei einer niedrigen Temperatur, so muß die neutralisierte Trypsinmenge größer sein bei hoher Temperatur.

⟨Nach dem Behandeln von Trypsin mit Kohle kann durch Abfiltrieren der Kohle und Prüfen des Filtrats mit Casein bewiesen werden, daß eine genügende Menge Kohle leicht jede Spur von Trypsin aus der Lösung aufnimmt. Wenn dagegen die Verdauung von Casein in Gegenwart von der Kohle ausgeführt wird, wird immer mehr oder weniger von der tryptischen Wirkung erhalten. Dies kann nur so gedeutet werden, daß Casein imstande ist, etwas von dem schon durch die Kohle aufgenommenen Trypsin an sich zu nehmen. Die Menge der durch eine gewisse Caseinmenge aus der Kohle ausgezogenen Trypsinmenge ist um so geringer, je mehr Kohle gebraucht wurde, ist aber auch, wie schon angegeben wurde, davon abhängig, wie lange und bei welcher Temperatur die Kohle-Trypsin-Mischung aufbewahrt wurde, bevor das Casein zugegeben wurde.)

Nach dem Zugeben des Caseins kann der Prozeß des Ausziehens zu jeder Zeit durch Filtrieren abgebrochen werden. Es hat sich gezeigt, daß die von dem Casein ausgezogene Trypsinmenge von der Zeit der Einwirkung des Caseins, von der

¹⁾ Bio-Chem. Journ., Bd. I, S. 492.

Temperatur und von der Caseinmenge abhängig ist.¹⁾ Das Ende der Reaktion, wenn Trypsin nicht mehr ausgezogen wird, wird bei 20° in weniger als 1/2 Stunde erreicht, während bei höherer Temperatur eine etwas längere Zeit in Anspruch genommen wird. Dafür wird aber bei höherer Temperatur entschieden mehr Trypsin ausgezogen, als bei niedriger. Die ausgezogene Trypsinmenge wächst mit der Caseinmenge, aber langsamer, wie diese; deshalb ist dieselbe für große Caseinmengen konstant, unabhängig von Schwankungen in der gebrauchten Menge von Casein. Schließlich ist die anwesende Menge von Wasser ohne Einfluß auf die ausgezogene Menge des Trypsins.

Nach dem Gesagten ist das Neutralisieren des Trypsins durch Kohle durch zwei auf einander folgende Prozesse bedingt: Aufnehmen des Trypsins durch die Kohle und Fixieren desselben. Das schlechthin aufgenommene Trypsin kann der Kohle durch Casein entrissen werden, während dies nach dem Fixieren nicht mehr geschehen kann. Die Grenze zwischen den beiden Zuständen ist jedoch keine scharfe. Wie wir gesehen haben, hängt es von der Stärke der Einwirkung des Caseins ab, wie viel Trypsin ausgezogen wird. In meinen Versuchen konnte nur 1–15% der ganzen aufgenommenen Trypsinmenge wiedergewonnen werden; der größte Teil war fixiert. Hieraus ist leicht zu ersehen, wie wichtig es ist für das möglichst vollständige Neutralisieren des Trypsins, daß dasselbe, wenn möglich, frei von Eiweißstoffen ist.

Man könnte sich wohl vorstellen, daß das «Fixieren» des Trypsins durch sekundäre, destruktive Prozesse bedingt sei, welche dadurch erleichtert werden könnten, daß die Konzentration des Trypsins auf der Kohle eine sehr starke sein muß.

Solche Prozesse lassen sich schwerlich ausschließen; nur spricht gegen eine Abtötung des Trypsins der Umstand, daß ein unzweifelhaftes Ende des Neutralisierens erreicht wird. Läßt sich doch die Kohle derart mit Trypsin sättigen, daß sie

¹⁾ Hedin, On extraction by Casein of Trypsin adsorbed by charcoal. Bio-Chem. Journ., Bd. II.

auf neu zugesetztes Trypsin keinen Einfluß ausübt. Auch läßt sich der Umstand, daß keine scharfe Grenze zwischen einfach aufgenommenem und fixiertem Trypsin existiert, nur schlecht mit einer Zerstörung von Trypsin in Einklang bringen.

Über Adsorption.

Es dürfte wohl keinem Zweifel unterliegen, daß die Aufnahme von Trypsin durch Kohle in naher Beziehung zu den Adsorptionsphänomenen stehen muß, nur handelt es sich hier um Adsorption von einem kolloidalen Stoff, für welchen die für krystalloide Stoffe gefundenen Gesetzmäßigkeiten vielleicht nicht mehr in vollem Umfange gelten. Die Adsorption von gelösten Krystalloiden durch Kohle ist neulich eingehend von Freundlich studiert worden.¹⁾ Er fand, daß es sich um gut definierbare Gleichgewichte handelt, die von beiden Seiten sehr rasch erreicht werden. Die adsorbierten Stoffe werden also leicht wieder von der Kohle abgegeben, d. h. es handelt sich um reversible Reaktionen. Dies ist für das Trypsin nicht der Fall, da das Trypsin zum größten Teil an der Kohle fixiert wird. Die Regel, daß die Konzentration der adsorbierten Menge, geteilt durch die Konzentration der in Lösung bleibenden $\left(\frac{C_{\text{adsorb.}}}{C_{\text{gelöst}}}\right)$, bei zunehmender Totalmenge des ursprünglich gelösten Stoffes abnimmt, hat sich für die meisten Adsorptionserscheinungen bestätigt. Dieselbe gilt auch für das Trypsin, wenn man anstatt von der Konzentration des Trypsins von der Menge desselben spricht. Geringe Mengen von Trypsin werden nämlich vollständig adsorbiert $\left(\frac{C_{\text{adsorb.}}}{C_{\text{gelöst}}} = \infty\right)$ und durch größere Mengen wird die Kohle allmählich derart gesättigt, daß nichts mehr aufgenommen wird. Die Konzentration des Trypsins scheint nur einen sehr geringen Einfluß auf die adsorbierte Menge auszuüben.

In bezug auf Krystalloide werden Veränderungen der Oberflächenspannung an der Grenze des adsorbierenden Körpers

¹⁾ Über die Adsorption in Lösungen, Leipzig 1906.

als Ursache der Adsorption angegeben. Danach muß die Reihenfolge, in der verschiedene Stoffe absorbiert werden, von der Natur des festen, adsorbierenden Stoffes unabhängig sein, was auch nach Freundlich der Fall ist.

Bei der Adsorption von Enzymen scheint allerdings die Sache anders zu liegen, da in dem Falle eine ausgesprochene Spezifität vorkommen kann. So wird von zwei von mir gefundenen proteolytischen Enzymen in der Milz, wenn dieselben in derselben Flüssigkeit vorkommen, das eine durch Kieselgur adsorbiert, das andere nicht oder nur in beschränktem Grade, während Kohle beide in dem gleichen Verhältnis aufnimmt.¹⁾

Wie schon hervorgehoben wurde, besteht eine weitgehende Ähnlichkeit zwischen den neutralisierenden Wirkungen, welche Kohle und der Antikörper im Serum auf das Trypsin ausüben. Deshalb scheint es auch sehr wahrscheinlich, daß die Wirkung des Antikörpers sowie die der Kohle durch Adsorption zustande kommt. Der Unterschied, daß Kohle mit Wasser eine Suspension und der Antikörper eine Lösung bildet, ist nur ein scheinbarer, da die Lösungen von Kolloiden in Wasser keine echten Lösungen sind, sondern Flüssigkeiten, welche sich den typischen Suspensionen mehr oder weniger nähern. Wie ich schon hervorgehoben habe, läßt sich der Umstand, daß es mir nicht gelungen ist, alles Trypsin durch einen Überschuß von Antikörper zu neutralisieren, leicht durch die Annahme erklären, daß der Antikörper (wie die Kohle) zunächst alles Trypsin adsorbiert und daß das darauf zugesetzte Casein einen geringen Teil davon an sich nimmt, worauf eine entsprechende Verdauung folgen muß.

Auf die Möglichkeit, daß das Neutralisieren von Toxinen durch ihre Antikörper ein Adsorptionsprozeß sei, ist schon von verschiedenen Seiten die Aufmerksamkeit hingelenkt worden (Biltz,²⁾ Nernst,³⁾ Craw,⁴⁾ Freundlich).⁵⁾

¹⁾ A case of specific adsorption. Bio-Chem. Journ., Bd. II.

²⁾ Zeitschr. physik. Chem., Bd. XLVIII, S. 615, 1904.

³⁾ Zeitschr. f. Elektroch., Bd. X, S. 377, 1904.

⁴⁾ Zeitschr. physik. Chem., Bd. LII, S. 569, 1905.

⁵⁾ l. c.

Die Tatsache, daß Casein imstande ist, durch Kohle adsorbiertes Trypsin auszuziehen, bildet ohne Zweifel eine gute Stütze für die Ansicht, daß die Enzyme von denjenigen Körpern aufgenommen werden, auf die sie einwirken können, und es scheint nicht unwahrscheinlich zu sein, daß auch dies ein Adsorptionsprozeß ist. In der Tat war der Einfluß der Zeit und der Temperatur sowie der der Konzentration derselbe wie der für die Kohle und den Antikörper gefundene. Daß kleine Trypsinmengen durch Casein vollständig aufgenommen werden, wird durch die Tatsache bewiesen, daß durch Kohle adsorbiertes Trypsin in meinen Versuchen nur durch Ausziehen mit Casein von der Kohle getrennt werden konnte. Nur das vom Casein ausgezogene Trypsin ging beim folgenden Filtrieren ins Filtrat, und folglich war alles im Filtrat vorhandene Trypsin am Casein gebunden. (Wenn man Casein auf freies Trypsin einwirken läßt, wird dieses wahrscheinlich sogleich aufgenommen.) Daß das Casein (und Serumalbumin) durch einen Überschuß von freiem Trypsin mit diesem vollkommen gesättigt werden kann, habe ich in einer früheren Arbeit nachgewiesen.¹⁾ Die Übereinstimmung ist demnach eine sehr große zwischen dem Aufnehmen von Trypsin durch Kohle und durch Casein.

Wenn also Trypsin einerseits durch Kohle und den Antikörper, andererseits durch Casein adsorbiert werden kann, wie kommt es dann, daß die Wirkung der Adsorption in beiden Fällen schließlich so verschieden ausfällt: In jenem Falle wird das Trypsin in seiner Arbeit gehemmt, in diesem scheint die Adsorption des Enzyms eine Bedingung für seine Arbeit zu sein? Die Verschiedenheit könnte wohl dadurch bedingt werden, daß das Trypsin am Antikörper und an der Kohle fixiert wird und fixiert werden kann, da die zwei Substanzen nicht durch Trypsin digeriert werden können, während das Casein nicht imstande ist, das Trypsin zu fixieren, da es durch das Trypsin zerstört wird.

Schließlich möchte ich auf die wichtige Rolle hinweisen, welche Adsorptionsreaktionen im Organismus zwischen kolloidalen Stoffen ausüben können. Für die meisten Adsorptions-

¹⁾ Hedin, Observations on the action of trypsin, Journ. of Physiol., Bd. XXXII, S. 468, 1905.

erscheinungen scheint die Regel gültig zu sein, daß der adsorbierende Stoff verhältnismäßig um so mehr aufnimmt, je weniger von dem zu adsorbierenden Stoffe vorhanden ist. Wurden doch in meinen Versuchen durch Kohle und durch Casein kleine Mengen von Trypsin vollständig aufgenommen. Für den Fall, daß der adsorbierte Stoff auf den adsorbierenden irgend eine Wirkung ausübt, werden also geringe Mengen eine verhältnismäßig kräftigere Wirkung ausüben als große. In dem Falle, daß mehrere adsorbierende Stoffe vorhanden sind, werden diejenigen am meisten adsorbieren, welche imstande sind, den adsorbierten Stoff dauernd außer Wirkung zu setzen. Ein geringer zeitlicher Unterschied in der Einwirkung der verschiedenen adsorbierenden Stoffe kann deshalb von entscheidendem Einfluß auf die Verteilung der zu adsorbierenden Substanz sein.
