

Zur Kenntnis des Vorkommens der peptolytischen Fermente.

Von

Emil Abderhalden.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Halle a. S.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. April 1912.)

In zahlreichen Versuchen ist gezeigt worden, daß sich in den Zellen des Tier- und Pflanzenorganismus Fermente finden, die imstande sind, bestimmte Polypeptide in ganz charakteristischer Weise abzubauen. Der Nachweis der Fermente ist in verschiedener Weise geführt worden. Einesteils wurde aus den Organen Preßsaft nach der Methode von E. Buchner hergestellt und dann diesem nach erfolgter Filtration durch eine Chamberland-Kerze ein bestimmtes Polypeptid zugefügt. Meist wurde ein Polypeptid gewählt, an dessen Aufbau ein in Wasser sehr schwer löslicher Baustein beteiligt ist, und das Auftreten dieser Aminosäure verfolgt. Oder aber es wurde die eintretende Spaltung mittels der Polarisierung festgestellt. Entweder wurden hierzu racemische Polypeptide verwendet und die asymmetrische Spaltung als Beweis einer stattgehabten Fermentspaltung angesehen oder aber, es wurde ein optisch aktives Polypeptid als Substrat angewandt. Ferner wurden Polypeptide und dann auch Peptonlösungen direkt auf Gewebe aufgetragen und die Abscheidung schwer löslicher Aminosäuren beobachtet. Selbstverständlich wurde bei all diesen Versuchen die Mitwirkung von Bakterien möglichst ausgeschaltet. Schon die Tatsache, daß z. B. Pankreassaft manche Polypeptide nicht spaltet, während Darmsaft auch diese angreift, und ferner der Umstand, daß das Erwärmen einer aktiven Fermentlösung auf 60—70° diese sofort inaktiviert und dann auch nach Tagen eine Spaltung nicht eintritt, macht es sehr unwahrscheinlich, daß die erhaltenen Resultate auf Bakterienwirkung zurückzuführen sind. Bei Anwendung der optischen Methode ist das Auftreten einer Infektion sehr leicht feststellbar, indem sofort Trübungen auftreten. Endlich haben wir im Laufe der Zeit eine große Erfahrung über das Verhalten von Bakterien gegenüber Polypeptiden gesammelt. Wir hatten gehofft, aus der Art des Abbaus bestimmter Poly-

peptide eine Grundlage zur Erkennung bestimmter Bakterienarten zu erhalten. Wir hofften, daß bestimmte Bakterienarten gewisse Polypeptide abbauen und andere unangegriffen lassen. Ferner waren unsere Bestrebungen darauf gerichtet, aus bestimmten Substraten bestimmte charakteristische Abbauprodukte zu erhalten. Bis jetzt sind unsere Bemühungen nach dieser Richtung wenig erfolgreich gewesen. Für sehr viele Bakterienarten sind die Polypeptide kein geeignetes Nährmateriel und wurden solche angegriffen, dann ergaben sich bald Abbaustufen, die einer weitgehenden Zersetzung des Substrates entsprachen. Schließlich haben wir auch Stichproben ausgeführt und festgestellt, daß Spaltung von Polypeptiden erfolgt war, ohne daß Bakterien anwesend waren. Die Platten blieben steril.

Neuerdings hat Biedermann¹⁾ wieder auf den Einwand aufmerksam gemacht, den man allen über längere Zeit sich erstreckenden Versuchen mit Organpreßsäften und Verdauungssäften machen kann, nämlich, daß Mikroorganismen mitwirken. Wir haben aus diesem Grunde nochmals eine Reihe ganz besonders sorgfältig vorbereiteter Versuche durchgeführt. Es sei gleich bemerkt, daß die erhaltenen Resultate bestätigen, daß die beobachtete Spaltung auf Fermente der untersuchten Organe und sicher nicht auf Bakterienwirkung zurückzuführen ist.

Zunächst prüften wir Organpreßsäfte. Diese wurden in der gewohnten Weise dargestellt und dann durch einen sorgfältig steril gemachten Uhlenhut-Weidanzschen Abfüllapparat filtriert. Als Substrat wählten wir entweder Polypeptide oder Seidenpepton. Die Lösung des Substrates wurde durch 2 stündiges Kochen sterilisiert. Das Polarisationsrohr wurde gründlich desinfiziert und zwar mit 5%iger Carbolsäurelösung, Alkohol und Äther. Schließlich wurde das Rohr noch 2 Stunden in einem Trockenschrank bei 120° aufbewahrt. Nachdem sich das Rohr auf 40° abgekühlt hatte, wurde die Substratlösung, deren Temperatur 38° betrug, eingefüllt, und ferner auch die eben filtrierte Fermentlösung. Eine Toluolschicht schloß die Flüssigkeit nach

¹⁾ W. Biedermann, Die Aufnahme, Verarbeitung und Assimilation der Nahrung, im Handbuch der vergleichenden Physiologie, herausgegeben von Hans Winterstein, 1911.

außen ab. Ferner war der Tubus des Rohres mit sterilisierter, abgebrannter Watte verschlossen. Stets wurde zur Kontrolle ein ebenso gefülltes Rohr 10 Minuten auf 60° erwärmt und ferner eine dritte Probe angesetzt, bei der das Rohr nicht sterilisiert war und ferner kein Toluol zugesetzt wurde. Die auf 60° erhitzte Probe ergab nie Spaltung. Die mit größter Sorgfalt steril gehaltene Probe zeigte das gleiche Verhalten, wie diejenige, bei der die Fernhaltung von Mikroorganismen nicht so streng durchgeführt war. Die Spaltung trat in allen Fällen fast unmittelbar nach dem Zusatz der Fermentlösung ein. Ein Beispiel aus der großen Zahl gleichsinnig verlaufener Versuche möge das belegen.

6 ccm $\frac{3}{34}$ -Mol. Glycyl-l-tyrosinlösung.

1 » Leberpreßsaft.

Zeit	Winkel
ca. 1 Minute nach dem Mischen von Substrat und Fermentlösung	+ 0,76°
nach 5 Minuten	+ 0,72°
» 10 »	+ 0,67°
» 15 »	+ 0,60°
» 20 »	+ 0,55°
» 25 »	+ 0,50°
» 30 »	+ 0,47°
» 35 »	+ 0,43°
» 40	+ 0,38°.

Hier wurde der Versuch abgebrochen und das Gemisch auf Bakterien untersucht. Es erwies sich als steril.

Wir haben ferner folgenden Versuch ausgeführt und sehr oft wiederholt. Wir entnahmen einem Tiere, einem Frosch oder einem Meerschweinchen resp. Kaninchen sofort nach der Tötung unter Anwendung aller Maßregeln zur Vermeidung einer Infektion — aseptische und antiseptische Maßnahmen — noch lebenswarm ein bestimmtes Organ, z. B. die Niere. Dann wurde dieses mit glühenden Messern an der Oberfläche vollständig abgebrannt und nun rasch in das Gewebe mit einer sorgfältig sterilisierten Pravazspritze eine durch langes Kochen sterilisierte Lösung von Seidenpepton eingespritzt. Das Organ wurde dann

in einer sterilisierten Schale 6—8 Stunden im Brutschrank aufbewahrt, dann in der Schale auf 0° abgekühlt und nun nachgesehen, ob Tyrosin ausgefallen war. Es war dies regelmäßig der Fall.

Wir glauben, daß durch diese Versuche einwandfrei bewiesen ist, daß die von uns beobachteten, auf Zusatz von Organpreßsäften resp. Verdauungssäften erfolgten Spaltungen von Polypeptiden durch die in diesen Lösungen enthaltenen peptolytischen Fermente bewirkt worden sind und nicht durch Fermente von Mikroorganismen herbeigeführt wurden.

Im Anschluß an diese Versuche sei noch über Versuchsreihen berichtet, die die Frage verfolgten, ob im Speichel und Sputum sich Fermente vorfinden, die Polypeptide spalten. Wir hatten seinerzeit diese Versuche gemeinsam mit A. H. Kölker begonnen. Es zeigte sich, daß Speichel unter gewöhnlichen Verhältnissen weder Glycyl-l-tyrosin noch dl-Leucyl-glycin spaltet. Es wäre ja denkbar gewesen, daß im Speichel sich Zelltrümmer finden und damit auch die Zellfermente. Wir haben diese Versuche fortgesetzt und bei Anwendung der genannten Dipeptide eine Spaltung nie beobachten können. Der Speichel war stets durch eine Chamberland-Kerze filtriert worden.¹⁾ Unterdessen hat Kölker²⁾ mitgeteilt, daß der Speichel dl-Alanyl-glycin und ferner l-Leucyl-glycyl-d-alanin spaltet. Schon vorher hat Warfield³⁾ beobachtet, daß Speichel Glycyl-l-tryptophan zerlegt. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob hier ein regelmäßiger Befund vorliegt.

Wir haben gemeinsam mit Herrn Dr. Straßner Versuche unternommen, um die Frage zu entscheiden, ob der Gehalt des Sputums an peptolytischen Fermenten bei verschiedenen Erkrankungen, wie Tuberkulose, Asthma usw. ein verschiedener ist. Vor allem interessierte uns das Verhalten des Auswurfes

¹⁾ Die Kerzen müssen stets von Fall zu Fall auf ihre Fähigkeit, Bakterien zurückzuhalten, geprüft werden.

²⁾ A. H. Koelker. Über ein Dipeptid- und Tripeptid-spaltendes Enzym des Speichels, Diese Zeitschrift, Bd. 76, S. 27. 1911.

³⁾ L. M. Warfield, Johns Hopkins Hospital Bulletin, Bd. 22, S. 150, 1911 (zitiert nach Koelker, l. c.).

in verschiedenen Stadien der Pneumonie. Bekanntlich hat Friedrich Müller nachgewiesen, daß die Lösung mit einer richtigen Verdauung des ausgeschiedenen Fibrins in den Bronchiolen einhergeht. Wir wollen gleich das erhaltene Resultat vorwegnehmen. Es ergab sich, daß der Auswurf bei der Pneumonie vor der Krise entweder garnicht spaltete oder doch nur ein sehr geringfügiges Spaltvermögen zeigte. Mit der Krise setzte ein sehr erhebliches Spaltvermögen ein. dl-Leucyl-glycin wurde in seine Komponenten zerlegt. Die Versuche wurden in der folgenden Weise ausgeführt. Das frisch gesammelte Sputum wurde durch eine Chamberland-Kerze durchgesaugt und das Filtrat auf eine sterilisierte Lösung von dl-Leucyl-glycin einwirken gelassen. Es wurde dann sofort das Drehungsvermögen des Gemisches abgelesen und dieses dann von Zeit zu Zeit wieder festgestellt. In der Zwischenzeit wurde das Polarisationsrohr nebst Inhalt im Brutschrank aufbewahrt. In einzelnen Fällen war das Sputum so zäh, daß wir es mit der doppelten Menge physiologischer Kochsalzlösung in einer Reibschale vermischen mußten, um ein Filtrat zu erhalten. Sehr gute Resultate gab auch hier der Uhlenhut-Weidanzsche Abfüllapparat. Vom dl-Leucyl-glycin verwendeten wir 1,88 g und lösten dieses in 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Wir gaben dann zu 3,1 ccm der Sputumflüssigkeit 3,1 ccm der dl-Leucyl-glycinlösung und 3,1 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Erwähnt sei, daß wir selbstverständlich bei jedem einzelnen Versuche eine Kontrollprobe beobachteten, bei der an Stelle der Dipeptidlösung physiologische Kochsalzlösung zugesetzt war. Wir konnten so feststellen, ob das Sputum seine Anfangsdrehung beibehält. Es war das fast ausnahmslos der Fall. Wir verfügen bis jetzt über 10 Fälle von Pneumonie. Das Resultat war stets dasselbe. Sobald das Material ein größeres ist, sollen die einzelnen Fälle unter Berücksichtigung des klinischen Verlaufes an anderer Stelle mitgeteilt werden. Wir zweifeln nicht daran, daß die Untersuchung des Sputums bei verschiedenen Krankheiten auf den Gehalt an einzelnen Fermenten mancherlei interessante Resultate ergeben wird.