

Über den Gehalt des Kaninchenserums an peptolytischen Fermenten unter verschiedenen Bedingungen.

II. Mitteilung.

Von

Emil Abderhalden und Wolfgang Weichardt.

Mit neun Kurvenzeichnungen.

(Aus dem physiologischen Institut der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 27. Juli 1909.)

Es ist kürzlich darauf hingewiesen worden,¹⁾ daß das Plasma von Hunden und auch von Kaninchen nach der parenteralen Zufuhr von Eiweißkörpern — Pferdeserum und Eiereiweiß — das Dipeptid Glycyl-l-tyrosin rascher und vollständiger spaltet als das Plasma normaler Tiere. Besonders eindeutig waren die Versuche mit Hunden. Es schien uns nun von der größten Wichtigkeit, festzustellen, ob es auch gelingt, nach Zufuhr von Eiweißabbauprodukten ähnliche Erscheinungen hervorzurufen. Wir wählten zu den Versuchen durch partielle Hydrolyse mit 70%iger Schwefelsäure in der Kälte erhaltenes Pepton aus Seide. Es wurden 500 g Seide mit 2500 ccm 70%iger Schwefelsäure übergossen und das Gemisch bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Seide war nach kurzer Zeit vollständig in Lösung gegangen. Nach dreitägigem Stehen wurde die Schwefelsäure quantitativ mit Baryt entfernt und das abfiltrierte Baryumsulfat wiederholt mit Wasser ausgelaugt. Die vereinigten Filtrate wurden nunmehr unter vermindertem Druck eingeengt und die auf etwa 5 l konzentrierte Lösung mit Phosphorwolframsäure

¹⁾ Emil Abderhalden und Ludwig Pincussohn, Über den Gehalt des Hundeplasmas an peptolytischen Fermenten unter verschiedenen Bedingungen. Diese Zeitschrift, Bd. LXI, S. 199, 1909.

gefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, scharf abgepreßt und in der üblichen Weise mit Baryt zerlegt. Schließlich wurde der Überschuß an Baryt quantitativ mit Schwefelsäure entfernt und das Filtrat vom Baryumsulfat unter vermindertem Druck auf ungefähr 50 ccm eingedampft. Die dickflüssige Masse wurde nun unter fortwährendem Umrühren langsam in absoluten Alkohol eingetropt. Die zunächst flockige, fast farblose Fällung wurde abgesaugt und mit wässrigem Methylalkohol ausgekocht. Ein großer Teil ging in Lösung und ließ sich mit Äther in Form eines farblosen Pulvers fällen. Die Ausbeute an diesem Präparat betrug 100 g.

Das so gewonnene Pepton gab starke Biuretreaktion und Millons Reaktion. Nach Zusatz einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung trat flockige Fällung auf. Gesättigte Kochsalzlösung bewirkte an und für sich keine Fällung, wohl aber trat ein Niederschlag auf, sobald verdünnte Salpetersäure zugegeben wurde. Es waren somit in ziemlich reichlicher Menge aussalzbare Peptone vorhanden. Freie Aminosäuren waren keine nachweisbar.

Mit diesem Seidenpepton wurden nun zwei Kaninchen intravenös mit steigenden Dosen (0,1—1 g) in Zeiträumen von 5—8 Tagen im ganzen 12 mal injiziert. Die Blutentnahme erfolgte aus der Carotis und zwar nach Einbindung einer Kanüle. Das Blut wurde in einem entfetteten, sterilen Zylinder aufgefangen. Der nach einigen Minuten gebildete Blutkuchen wurde mit einer Platinnadel vorsichtig gelöst. Nach 15stündigem Stehen im Eisschrank wurde jetzt das klare Serum entnommen und abzentrifugiert und das völlig blutkörperchen- und hämoglobinfreie Serum zu den unten mitgeteilten Versuchen benutzt. In genau der gleichen Weise wurde auch Serum von nicht vorbehandelten Tieren entnommen. War aus irgend einem Grunde eine Spur Blutfarbstoff in Lösung gegangen, dann wurde die Probe jedesmal verworfen. Wir verwendeten absichtlich nur ganz hämoglobinfreie Sera.

Hervorgehoben sei, daß während des intravenösen Immunisierungsprozesses keinerlei anaphylaktische Symptome zu beobachten waren. Nur schrieten die Tiere jedesmal bei der

Injektion in auffälliger Weise. Sie beruhigten sich jedoch bald wieder. Das nach den ersten Injektionen den Tieren entnommene Immuns Serum rief in der 10%igen in 0,9%iger Kochsalzlösung gelösten, klar filtrierten Peptonlösung Trübungen hervor. Diese Eigenschaft erwies sich jedoch nicht als konstant. Nach weiteren Injektionen verschwand sie wieder aus dem Serum des injizierten Tieres. Stärker ausgesprochen war die Eigenschaft, Trübungen in der dazu gehörigen Peptonlösung hervorzurufen bei dem Serum eines mit einem Pepton aus Seide einer anderen Darstellung injizierten Kaninchens. Hier wurden die Ablesungen bei den unten mitgeteilten Versuchen durch diese Trübungen in bestimmten Stadien ganz unmöglich gemacht. Dieses Pepton gab gleichfalls Biuretprobe und Millons Reaktion. Es enthielt an Aminosäuren nur Glykokoll, d-Alanin und l-Tyrosin. Die Molekulargewichtsbestimmung ergab die Werte 520, 525, 550, 510. Sowohl mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung, als auch mit gesättigter Kochsalzlösung + Salpetersäure trat eine sehr beträchtliche Ausflockung auf. Das Filtrat der Fällung gab nur noch ganz schwache Biuretreaktion und enthielt verhältnismäßig sehr geringe Substanzmengen. Das Präparat bestand somit fast ausschließlich aus aussalzbaren Peptonen, während das oben erwähnte Pepton zum größeren Teil nicht aussalzbare Peptone aufwies.

Was nun die Ausführung der Versuche anbetrifft, so wurde folgendermaßen vorgegangen: Zu einer Lösung von 1 : 10 des Peptons wurden jeweils 0,5 ccm Serum gegeben und dann im Polarisationsrohr, dessen Mantel mit auf 37° erwärmtem Wasser gefüllt worden war, das Drehungsvermögen abgelesen. Das Rohr wurde nun in ein Wasserbad von 37° gesenkt und von Zeit zu Zeit wieder abgelesen. Wir haben folgende Versuche durchgeführt:

1. Verhalten von Serum vorbehandelter Kaninchen gegenüber dem gleichen Seidenpepton.
2. Verhalten von Serum normaler Tiere gegenüber dem Seidenpepton.

Die folgenden Kurven ergeben ohne weiteres das erhaltene Resultat (vgl. Kurve a):

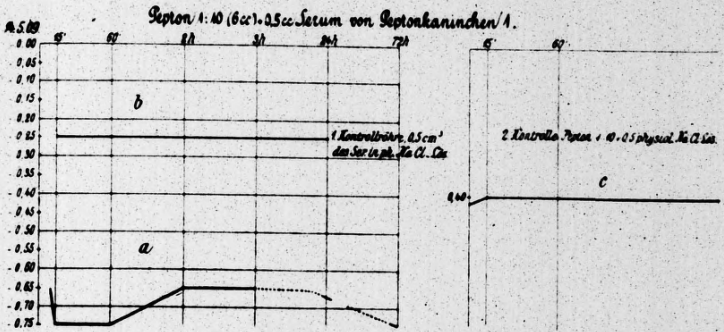


Fig. 1.

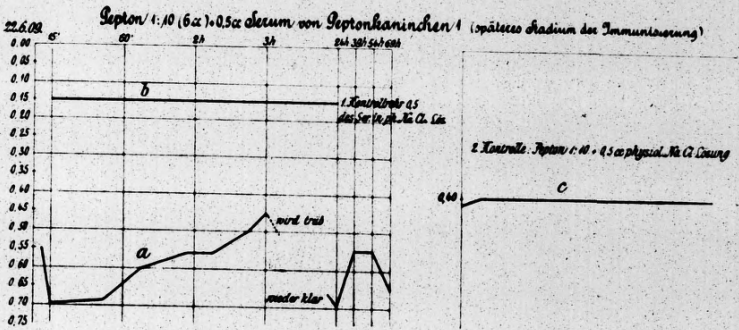


Fig. 2.

Die Peptonlösung an und für sich veränderte ihre Drehung nicht, ebensowenig das Serum allein. Das Serum normaler Tiere griff das Pepton nicht an, dagegen wurde es vom Serum vorbehandelter Tiere abgebaut. Zunächst entstanden Spaltstücke, welche stärker nach links drehen als das Ausgangsprodukt, dann stieg die Drehung wieder nach rechts an, um später wieder zu fallen.

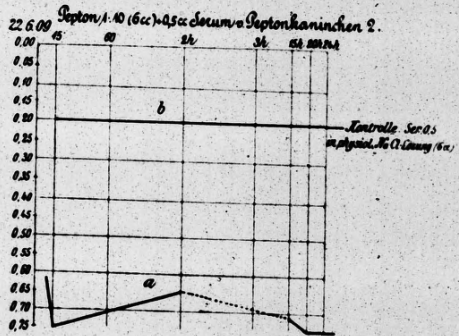


Fig. 3.

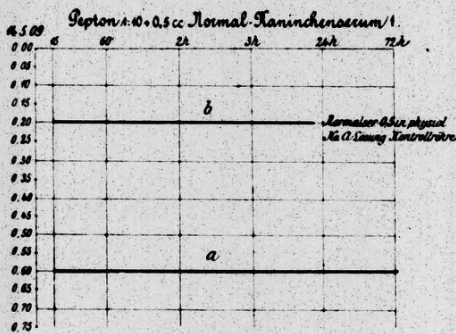


Fig. 4.

lungen erschwert. Der für den Versuch vom 11. V. benutzte Hefepressaft (Fig. 6) war ganz frisch, während für den Versuch 7 ein längere Zeit im Eisschrank aufbewahrter Pressaft zur Anwendung kam.

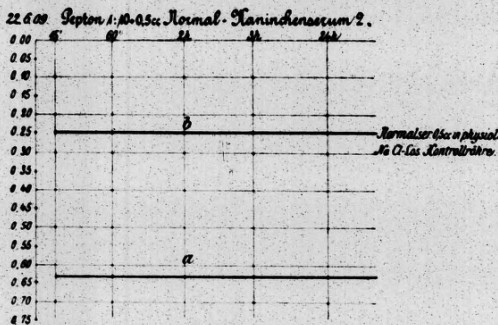


Fig. 5.

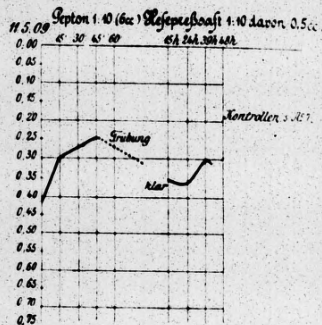


Fig. 6.

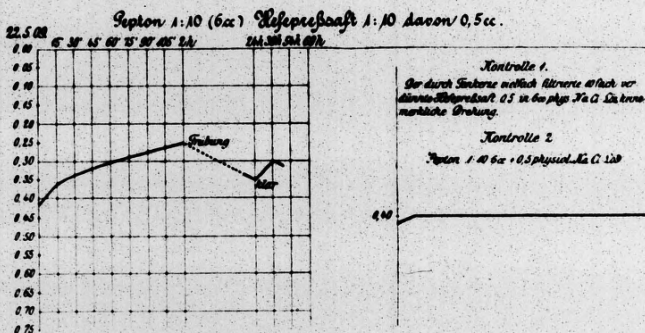


Fig. 7.

Es war nun von großem Interesse, festzustellen, wie sich das Pepton gegenüber bekannten peptolytischen Fermenten verhielt. Hefepressaft baute das Pepton in offenbar ganz analoger Weise ab. Zeitweise war die Ablesung infolge eintretender Trübungen erschwert.

Wir haben ferner Serum vorbehandelter Tiere $\frac{1}{2}$ Stunde auf 60° erwärmt und dann beobachtet, daß es inaktiv geworden war. Das Pepton wurde nicht mehr gespalten. (Vgl. Fig. 8.) Alle diese Beobachtungen sprechen dafür, daß die Einführung des Peptons die Bildung von Fermenten zur Folge hatte oder, vorsichtiger ausgedrückt, diese Fermente wurden an die Blutbahn und speziell an das Plasma abgegeben.

Um die Frage zu entscheiden, ob es gelingt, durch die Zufuhr eines Peptons bestimmter Darstellung im Plasma Fermente zu erhalten, die nur auf dieses Pepton eingestellt sind, haben wir das oben erwähnte zweite Pepton ebenfalls injiziert und festgestellt, daß das Plasma der behandelten Tiere dieses Pepton abbaut. Vgl. Fig. 8.

Das Plasma der mit Pepton 2 vorbehandelten Tiere griff auch das Pepton 1 an und umgekehrt. Eine Spezifität in dieser Richtung scheint nicht vorhanden zu sein. Es geht dies auch aus der Beobachtung hervor, daß das Plasma von Kaninchen, denen wiederholt Eiereiweiß zugeführt worden war, das Pepton 1 spaltete. Vgl. Fig. 9.

Fassen wir alle Beobachtungen zusammen, dann kommen wir zum Schlusse, daß es gelingt, durch wiederholte Zufuhr von Eiweiß und von Eiweißabbauprodukten — Peptonen — das Serum der Versuchstiere — Kaninchen — mit Eigenschaften auszustatten, die ihm vorher nicht zukamen. Normales Serum

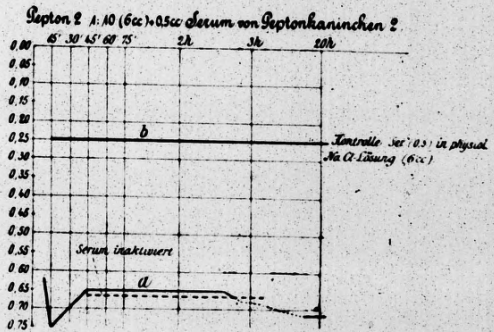


Fig. 8.

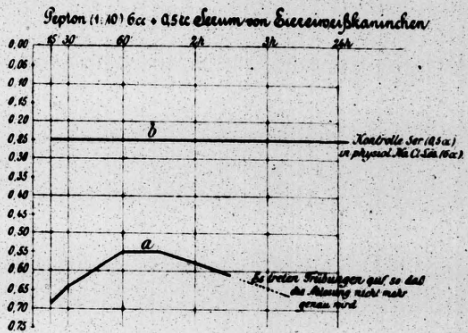


Fig. 9.

griff das verwendete Seidenpepton nicht an, wohl aber das Serum vorbehandelter Tiere. Alle Beobachtungen deuten darauf hin, daß der Abbau des Peptons auf das Vorhandensein peptolytischer Fermente zurückzuführen ist.

Die gemachten Beobachtungen zeigen den hohen Wert der optischen Methode zur Verfolgung aller derartiger Probleme, und wir zweifeln nicht daran, daß es gelingen wird, durch Wahl anderer Versuchsbedingungen und durch Anwendung einheitlicherer Peptone und speziell von komplizierter gebauten Polypeptiden all diese Vorgänge noch viel feiner zu analysieren. Wir enthalten uns absichtlich jeder weiteren Deutung unserer Beobachtungen, um nicht durch voreilige Theorien der weiteren Forschung eine Barriere zu errichten. Hervorgehoben sei nur noch, daß die Beobachtung des Verhaltens der optischen Aktivität bestimmter Lösungen unzweifelhaft auch noch für andere Probleme mit Erfolg verwertbar ist. Wir denken z. B. an die Präcipitinbildung. Es ließ sich in vorläufigen Versuchen zeigen, daß in manchen Fällen mit dem Eintritt der Präcipitinbildung eine starke Drehungsänderung eintritt, die nach erfolgtem Absitzen des Präcipitats ganz deutlich wird.¹⁾ Diese Erscheinung ist nicht auffallend, denn es fallen unzweifelhaft Körper aus, die vorher einen Einfluß auf das Drehungsvermögen der Lösung hatten. Es ist denkbar, daß diese Methode sich zu einer Messung des Präcipitierungsvermögens ausarbeiten läßt. Endlich ist es auch denkbar, daß beim Zusatz zweier Lösungen, z. B. zweier Sera, zwar kein Präcipitat sichtbar wird und doch eine Veränderung — eine Bindung oder Spaltung usw. — eintritt. Auch derartige Prozesse wird man in vielen Fällen mit Hilfe des Polarisationsapparates genauer verfolgen können. Sehr feine Trübungen wird man im Polarisationsapparat sehr gut beobachten können. Die optische Methode hat natürlich ihre Grenzen. Trübungen, sowie stark gefärbte Lösungen können manchen Versuch vereiteln.

Wie schön die Spaltung von optisch-aktiven Polypeptiden durch Serum von normalen und vorbehandelten Tieren zu ver-

¹⁾ Typhusdiagnostikum (Ficker) 0,5 ccm in 6 ccm physiolog. Kochsalzlösung + 0,5 Kaninchenagglutininserum, Titre 1 : 1200.

folgen ist, möge ein Beispiel zeigen. Glycyl-l-tyrosin wird vom Serum von Kaninchen abgebaut. Löst man in Kaninchenserum Glycyl-l-tyrosin auf, so beobachtet man nach kurzer Zeit Abspaltung von Tyrosin. Den Gang der Hydrolyse verfolgt man am besten mit Hilfe der optischen Methode.

Serum von normalen Kaninchen.

Das Serum wurde unter ganz den gleichen Kautelen gewonnen, wie das Serum der mit Peptoneinspritzungen behandelten Tiere.

6 ccm Glycyl-l-tyrosinlösung ($1/2000$ -Mol.)

0,5 » Normalserum.

Zeit	Abgelesener Winkel
0 Minuten	0,57°
20 »	desgl.
60 »	»
2 Stunden	»
3 »	»
15 »	0,45°
39 »	0,39°
50 »	0,38° (trüb).

Das Normalserum verliert durch $1/2$ stündiges Erhitzen auf 60° die Fähigkeit, Glycyl-l-tyrosin zu spalten.

Anhangsweise sei noch der folgende Versuch mit dem Seidenpepton erwähnt.

0,15 g Pepton töten eine 15 g schwere Maus in ca. 3 Stunden: Atemverlangsamung, Temperaturerniedrigung, Sopor, keine Krämpfe. Serum der Peptonkaninchen (0,01 g am Tage vorher einverleibt) schützt gegen die einfach tödliche Dosis.

Inwieweit eine Gewöhnung an die weniger hochmolekularen Komponenten des Peptons möglich ist, konnte vor der Hand noch nicht untersucht werden.

Endlich sei noch erwähnt, daß wir, angeregt durch die Versuche von Arthus,¹⁾ geprüft haben, ob es gelingt, durch Zufuhr von Glykokoll, d-Alanin, l-Alanin und Seidenpepton Anaphylaxie zu erzeugen. Das Resultat war negativ. Jedenfalls bedürfen die Versuche von Arthus einer Nachprüfung.

¹⁾ Compt. rend. de l'Acad. des sciences, Nr. 15, 1909.

Anaphylaxieversuch.

Am 25. VI. je 1 Kaninchen und je 1 Meerschweinchen

Sensibilisierung { mit d-Alanin (0,1 g) } subcutan
 { „ l-Alanin (0,1 g) } injiziert
 { „ Pepton aus Seide (0,1 g) }
 { Glykokoll (0,1 g). Die Glykokolltiere
erhielten nochmals 0,1 g Glykokoll am 2. VII.

Toxinversuch.

Am 20. VII. erhielten alle Tiere intravenös 2 ccm Pferdeserum. Sie zeigten keine Symptome von Anaphylaxie und waren am nächsten Tage alle munter.

Ein mit Eiereiweiß öfter immunisiertes Kaninchen (vgl. oben) erhielt 15 Tage nach der letzten Injektion 2 ccm Eiereiweiß intravenös. Es zeigt nach der Injektion heftige Anaphylaxiesymptome. Am nächsten Tage wird es tot aufgefunden.

Ein mit Eiereiweiß in gleicher Weise vorbehandeltes zweites Kaninchen erhielt im Toxinversuch 2 ccm Pferdeserum intravenös. Es bleibt munter und zeigt keinerlei Anaphylaxiesymptome.
