Über Proteolyse in der Thymus des Kalbes.

Von

Nils J. Rhodin.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institute in Upsala.)

(Der Redaktion zugegangen am 21. August 1911.)

Proteolytische Wirkungen in der Thymus sind früher von Kutscher¹⁾ und Jones²⁾ beobachtet worden, welche nach längerer Autolyse die Spaltungsprodukte analysierten. Hedin³⁾ fand, daß die Thymus in saurer Flüssigkeit eine weitaus stärkere Autolyse erfährt als in alkalischer. Bei Versuchen mit anderen Organen vom Rind hat sich dieses Verhältnis als vorherrschend erwiesen (Biondi⁴⁾ an der Leber, Hedin u. Rowland⁵⁾ an der Milz u. a. Organen). Ferner hat es sich gezeigt, daß mit Säure vorbehandelte Organe mit Alkali eine kräftigere Proteolyse bewirken als mit Alkali vorbehandelte (Hedin).⁵⁾ Dies gilt auch für Milz, Thymus, Leber, Nieren, Testis, Muskeln und wahrscheinlich für alle Organe. Was die Milz anbelangt, so beruht dies auf dem Vorhandensein einer Substanz, welche in alkalischer Flüssigkeit die Proteolyse hemmt und die bei der Behandlung mit Säure zerstört wird. Auch das Blutserum des Rindes enthält eine solche hemmende Substanz, welche bei der Behandlung mit Säure ebenfalls ihre Wirkung einbüßt, und es ist möglich, daß die im Blute und die in der Milz vorkommenden Substanzen identisch sind, was indessen nicht bewiesen ist.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 34, S. 114—118.

²⁾ Americ. Journal of Physiology Bd. 10, S. XXIV—XXV.

³⁾ Festschrift für Olof Hammarsten, VI, S. 4 u. 5.

⁴⁾ Virchows Archiv, Bd. 144, S. 373, 1896.

⁵⁾ Festschrift für Olof Hammarsten, VI.

Proteolyse in saurer, mit CaCO_3 versetzter und alkalischer Flüssigkeit.

A. 5 g gemahlene Thymus wurden teils mit 20 ccm Wasser und etwas Calciumcarbonat teils mit 20 ccm 0,2 %iger Essigsäure versetzt; beide Proben machten dann Autolyse von 24 Stunden durch. Toluol und Chloroform wurden als Antiseptica angewendet. Die Größe der Digestion wurde durch Ausfällen mit 25 ccm 10 %iger Gerbsäure bestimmt, worauf die Stickstoffbestimmung an 25 ccm des Filtrates (nach Kjeldahls Methode) gemacht wurde. Untenstehende Zahlen geben die Anzahl ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure an, welche für die Bindung des gebildeten Ammoniaks gebraucht wurden.

	Digestion in mit CaCO_3 versetzter Flüssigkeit	Digestion in saurer Flüssigkeit
Versuch I	11,5	44,5
Versuch II	9,8	57,6
Versuch III	9,3	45,2

B. Der Versuch wurde mit säureextrahiertem Enzym (auf weiter unten beschriebene Weise zubereitet) wiederholt. Als Substrat wurde in einem Falle 200 ccm alkalische (0,25 % Na_2CO_3) 2,5 %ige Caseinlösung angewandt. Im anderen Falle war das Substrat 200 ccm 2,5 %ige Caseinlösung mit Essigsäure auf 0,1 % versetzt. In beiden Versuchen wurde 10 ccm Enzymlösung genommen. Bei der Analyse wurde mit 100 ccm 10 %iger Gerbsäure ausgefällt und mit 100 ccm des Filtrates die Stickstoffbestimmung gemacht. Die Digestion dauerte 24 Stunden bei 37° C.

	In alkalischer Casein- lösung	In saurer Caseinlösung
	38,3	62

Aus den Resultaten der Versuche A und B geht hervor, daß die Proteolyse in saurer Flüssigkeit bedeutend stärker ist, als in neutraler oder alkalischer — in voller Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen an der Thymus und anderen Organen.

Vorbehandlung in saurer und neutraler Flüssigkeit und darauf folgende Proteolyse mit Casein in alkalischer Lösung.

15 g gemahlene Thymus wurden 24 Stunden teils mit 30 ccm 0,2% iger Essigsäure teils mit 30 ccm Wasser, versetzt mit etwas CaCO_3 , behandelt. Darauf wurde die mit Essigsäure behandelte Probe mit CaCO_3 neutralisiert, und zu beiden 100 ccm alkalische (0,25% Na_2CO_3) 2,5% ige Caseinlösung zugesetzt, wonach 24 Stunden digeriert wurde. 50 ccm Gerbsäure wurden zum Ausfällen angewendet und zur Analyse wurden 100 ccm des Filtrates benutzt. Die Ziffern unten geben die Anzahl ccm $\frac{1}{10}$ -n-Schwefelsäure an, welche, um das gebildete Ammoniak zu binden, gebraucht werden, nachdem die Ammoniakmenge abgezogen worden war, die der während der Vorbehandlung stattgefundenen Proteolyse entsprach.

	Nach Vorbehandlung mit CaCO_3	Nach Vorbehandlung mit Essigsäure
	35,5	71,2

Das Resultat zeigt eine bedeutend stärkere Enzymwirkung nach der Vorbehandlung mit Säure als mit CaCO_3 , analog mit früheren Beobachtungen an anderen Organen.

Im folgenden Versuche wurde Proteolyse einerseits sofort (ohne Vorbehandlung), andererseits nach Vorbehandlung mit CaCO_3 bzw. Essigsäure vorgenommen.

5 g gemahlene Thymus wurden mit 200 ccm alkalischer Caseinlösung versetzt und 24 Stunden bei 37°C . gehalten.

5 g wurden in einem Falle mit 10 ccm mit CaCO_3 versetztem Wasser, im anderen Falle mit 10 ccm 0,2% iger Essigsäure bei 37°C . vorbehandelt. Nachdem die letztere Probe mit CaCO_3 neutralisiert worden, wurde zu beiden 200 ccm alkalische Caseinlösung zugesetzt und 24 Stunden digeriert. Zur Analyse wurden 100 ccm 10% ige Gerbsäure angewendet (ebenso bei allen folgenden Versuchen, wo 200 ccm Caseinlösung verwendet wurde). Bei allen drei Digestionsversuchen wurde genau darauf geachtet, daß vor dem Ausfällen mit Gerbsäure das Volu-

men der sämtlichen Proben das gleiche war. Von den erhaltenen Zahlen wurde für den während der Vorbehandlung gebildeten Stickstoff ein Abzug gemacht.

	Ohne Vorbehandlung	Nach CaCO_3 - Vorbehandlung	Nach Essigsäure- Vorbehandlung
Versuch I	46,3	44,8	50,7
Versuch II	57,7	47,8	59,4

Aus dem Vergleich zwischen der gleich (ohne Vorbehandlung) vorgenommenen Proteolyse und der nach Vorbehandlung mit CaCO_3 bzw. Essigsäure scheint hervorzugehen, daß CaCO_3 die Enzymwirkung etwas abschwächt, während die Essigsäure dieselbe begünstigt.

Vorbehandlung in saurer und alkalischer Lösung, darauffolgende Proteolyse mit Casein bei alkalischer Reaktion.

Dieselben Versuche wurden daraufhin so wiederholt, daß das CaCO_3 -Wasser durch 0,1 % ige Na_2CO_3 -Lösung ersetzt wurde.

	Ohne Vorbehandlung	Nach Vorbehandlung mit 0,1 % Na_2CO_3	Nach Vorbehandlung mit 0,2 % Essigsäure
	32,2	24,7	49,6

Vergleicht man die Größe der Proteolyse, gleich vorgenommen und nach Alkalibehandlung, so zeigt sich, daß das Alkali bedeutend mehr als das CaCO_3 hemmt. Aber die Differenz zwischen der Digestion gleich und nach Alkalibehandlung ist nicht so groß, wie man nach analogen Versuchen Hedins¹⁾ mit der Milz erwarten könnte.

Säure- bzw. Alkalibehandlung von säureextrahierter Enzymlösung und darauffolgende Digestion mit Casein in alkalischer Flüssigkeit.

Das Enzymextrakt des Organes wurde auf die Weise dargestellt, daß ein Teil gemahlene Thymus mit zwei Teilen saures Wasser (0,2 % Essigsäure) versetzt wurde. Das Gemisch wurde einer 24 stündigen Autolyse bei 37° C. unterworfen. Darauf

¹⁾ Festschrift für Olof Hammarsten, VI, S. 7.

wurde filtriert und neutralisiert, und das Filtrat zur Entfernung der Spaltungsprodukte dialysiert.

Die vorhergehenden Versuche wurden dann wiederholt. 5 g gemahlene Thymus wurden mit 10 ccm Enzymlösung versetzt.

	Ohne Vorbehandlung	Nach Vorbehandlung mit 0,1 % Alkali	Nach Vorbehandlung mit 0,2 % Säure
	48,5	35,9	53,4

Aus unten angeführten Gründen (siehe Zusammenfassung 2) ist die hemmende Wirkung des Alkalis in diesen wie in den vorhergegangenen Versuchen möglicherweise so zu erklären, daß Enzym bei der Vorbehandlung mit Alkali zum Teil zerstört wurde.

Versuche mit Enzymlösungen bereitet bei saurer bzw. neutraler Reaktion.

Enzym wurde einerseits wie vorher mit Säure bereitet (ein Teil Thymus + zwei Teile 0,2 % ige Essigsäure). Andererseits wurde eine neutrale Infusion so bereitet, daß zu einem Teile gemahlene Drüse zwei Teile mit CaCO_3 versetztes Wasser zugesetzt wurden, worauf das Gemisch 24 Stunden bei 37° gehalten wurde. Dann wurde ebenso wie bei der Bereitung von saurer Infusion filtriert und dialysiert.

Die Digestionsversuche wurden so angestellt, daß 10 ccm Enzymlösung 24 Stunden bei 37°C. mit 100 ccm alkalischer Caseinlösung hingestellt wurde.

	Saure Infusion	Neutrale Infusion
Versuch I	27,6	22,1
Versuch II (neue Enzymbereitung)	28,2	23,9

Der Versuch zeigt, daß durch Extraktion mit Säure eine stärker wirkende Enzymlösung als mit CaCO_3 erhalten wird, was ja nach den vorhergegangenen Versuchen, wo die Vorbehandlung mit Säure die Enzymlösung verstärkt und CaCO_3 dieselbe abschwächt, zu erwarten war.

Hemmungsversuche mit Serum und Serumalbumin an säureextrahiertem Enzym.

Folgende Versuche zeigen, wie sich das Serum als Hemmungskörper bei der Proteolyse verhält. Zu jedem Versuche sind 10 ccm Enzymlösung, 10 ccm Serum bzw. Serumalbumin und 100 ccm alkalische 2,5%ige Caseinlösung (50 ccm 10%ige Gerbsäure) verwendet worden. In den Versuchen ohne Serum wurde anstatt dessen das gleiche Volumen Wasser zugesetzt. Das Serum war neutralisiertes Ochsen Serum. Das Serumalbumin wurde in der Weise dargestellt, daß die Globuline aus dem Ochsen Serum durch halbe Sättigung mit Am_2SO_4 entfernt wurden, worauf das Serumalbumin durch völlige Sättigung mit demselben Salze ausgefällt und das Salz wegdialysiert wurde. Um festzustellen, ob die Reihenfolge, in welcher die reagierenden Substanzen — Enzym, Hemmungskörper, Substrat — mit einander vermischt wurden, irgend welche Rolle spielt, ist in einem Teile der Versuche Serum bzw. Serumalbumin vor dem Zugabe des Caseins dem Enzym zugesetzt und bei 37° C. eine Stunde gehalten worden.

	Ohne Serum	Serum eine Stunde vor Beginn der Digestion dem Enzym zugesetzt	Serum gleichzeitig mit Enzymlösung dem Casein zugesetzt
Versuch I	26,2	20,9	20,9
Versuch II	21	16,8	17,7

	Ohne Serumalbumin	Serumalbumin eine Stunde vor Beginn der Digestion dem Enzym zugesetzt	Serumalbumin gleichzeitig mit Enzymlösung dem Casein zugesetzt
Versuch I	26,9	15,6	17,2
Versuch II	27,1	22,1	22,3
Versuch III	21,3	17,5	18,1

Die Versuche zeigen, daß im Serum ein Körper vorhanden ist, welcher die Proteolyse hemmt, und daß dieser vom Serum

zusammen mit dem Serumalbumin geschieden werden kann. Die Reihenfolge des Zusetzens von Serum bzw. Serumalbumin ist offenbar ohne Bedeutung.

Behandlung des Hemmungskörpers mit Säure.

Der Hemmungskörper wird, wie aus folgenden Versuchen hervorgeht, durch Behandlung mit 0,2%iger Essigsäure während 24 Stunden nicht zerstört.

	Ohne Serum	Mit Säure behandeltes Serumalbumin	Mit Säure + Alkali behandeltes Serumalbumin
Versuch I	25,1	21,7	19,9
Versuch II	27,6	20,4	21,1

Das Verhalten, daß sowohl natives als auch mit 0,2%iger Essigsäure denaturiertes Serumalbumin die Proteolyse hemmt, und daß die Reihenfolge des Mischens ohne Belang ist, deutet darauf hin, daß keinerlei irreversible Verbindung zwischen dem Enzym und dem Hemmungskörper gebildet wird, sondern nur eine reversible. Es würde also eine «Ablenkung» des Enzymes im Sinne Hedins sein.¹⁾

Hemmungsversuche mit Serum bzw. Serumalbumin auf Enzym, welches in neutraler Flüssigkeit extrahiert worden war.

Die Versuche wurden auf die gleiche Weise wie die mit säureextrahiertem Enzym angestellt.

	Ohne Serum	Serum eine Stunde vor dem Substrate dem Enzym zu- gesetzt	Serum gleichzeitig mit Enzymlösung dem Substrate zu- gesetzt
Versuch I	29,6	32,8	30,7
Versuch II	30,2	32,1	31,4

¹⁾ Hedín, Über verschiedenartige Hemmung der tryptischen Verdauung. Diese Zeitschrift, Bd. 52, S. 412.

	Ohne Serumalbumin	Serumalbumin eine Stunde vor dem Substrate dem Enzym zugesetzt	Serumalbumin gleichzeitig mit Enzymlösung dem Substrate zugesetzt
Versuch I	24,3	25,1	24,7
Versuch II	28,9	30,7	30,2

Der Versuch zeigt, daß die Enzymlösung, welche durch Extraktion in neutraler Flüssigkeit gewonnen wird, nicht die Eigenschaft besitzt, durch Serum bzw. Serumalbumin in seiner Wirkung gehemmt zu werden. Die Ziffern deuten eher auf eine Begünstigung der Enzymwirkung hin unter dem Einfluß von Serum bzw. Serumalbumin. Die Reihenfolge des Zusatzes ist auch hier bedeutungslos.

Kaolinbehandlung der Enzymlösungen.

Versuche sind dann darüber angestellt worden, die Enzymlösungen so weit als möglich von Eiweiß zu befreien. Ich habe mir dabei die Fähigkeit des Kaolins, Eiweiß den Lösungen zu entziehen, zunutze gemacht. Mit einer Sorte Kaolin (unbekannten Ursprungs) gelang es mir, praktisch genommen, eine durch neutrale Infusion bereitete Enzymlösung von Eiweiß zu befreien. Zu 100 ccm Enzymlösung wurden 60 g Kaolin gesetzt und das Ganze genau umgeschüttelt. Das Kaolin wurde nach 2—3 Stunden durch Zentrifugieren und Filtrieren ausgeschieden. Das Filtrat, welches vollkommen klar und farblos war, gab mit 10% iger Gerbsäure keine sofortige Fällung, aber nach 24 Stunden entstand eine schwache Opaleszenz. Digestionsversuche wurden sogleich gemacht.

	Neutral bereitetes Enzym	Kaolinbehandeltes neutral bereitetes Enzym
	10,4	8,7

Da dieses Kaolin bald zu Ende war und ich kein gleichartiges beschaffen konnte, mißlang mir der Versuch verschied-

dene Male mit anderen Kaolinsorten. Schließlich erhielt ich ein Kaolin (Kahlbaum, Berlin), welches gleich wie das erstgenannte im Verhältnis 60 Kaolin zu 100 Enzymlösung mit größter Leichtigkeit das Eiweiß aus der Lösung abtrennte. Doch ging dies bei mit Säure hergestelltem Enzym leichter als bei mit CaCO_3 bereitetem, was zu erwarten war, da bei der neutralen oder schwach alkalischen Infusion mehr Eiweiß in Lösung geht als bei der sauren.

	Säurebereitetes Enzym	Säurebereitetes, kaolin- behandeltes Enzym
	12,2	8,8

Aus den Digestionsversuchen geht hervor, daß das Kaolin gleichzeitig mit dem Eiweiß nur einen Teil des Enzymes mit adsorbiert.

Zusammenfassung.

Aus meinen Versuchen geht folgendes hervor:

I. Direkte Proteolyse in saurer Flüssigkeit ist bedeutend stärker als in alkalischer und neutraler in voller Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen. Dasselbe gilt auch für aus Infusion des Organs dargestellte Enzymlösungen.

II. Nach Vorbehandlung mit Alkalien oder CaCO_3 wird eine schwächere Proteolyse in alkalischer Lösung erhalten als nach Vorbehandlung mit Säure. Ob das auf Zerstörung von Enzym bei der Vorbehandlung mit Alkalien oder CaCO_3 beruht oder ob es wie bei Versuchen mit Milz (Hedin) dadurch erklärt werden kann, daß eine hemmende Substanz bei der Vorbehandlung mit Säure zerstört wird, muß dahingestellt bleiben. Irgend welche hemmende Substanz ist nicht in der Thymusdrüse nachgewiesen worden, und in diesem Falle enthält das Blut auch keine durch Säure zerlegbare hemmende Substanz, wie es bei der Milz der Fall war. Überhaupt scheinen die proteolytischen Enzyme in der Milz und die in der Thymus von verschiedener Art zu sein — was bereits

auf Grund der Verschiedenartigkeit zwischen deren gewebebildenden Elementen zu erwarten war.

III. Durch Infusion des Organes mit 0,2%iger Essigsäure dargestelltes Enzym wird durch Ochsen Serum schwach gehemmt (Ablenkung). Durch neutrale Infusion (CaCO_3) erhaltenes Enzym wird nicht gehemmt.

IV. Kaolin in Mengen, die das Eiweiß vollständig niederreißen, nimmt neutral bzw. säurebereitetes Enzym entweder nicht oder nur zum Teile auf.