Die proteolytischen Enzyme der Nieren.

Von

S. G. Hedin.

(Der Redaktion zugegangen am 28. Juli 1922.)

Als Material für die im folgenden beschriebenen Versuche dienten Nieren vom Pferde, da nur solche in ganz frischem Zustande und zugleich in genügender Menge mir zu Gebote standen. Die Methode der Untersuchung war die neulich von mir bei der Untersuchung der Milzenzyme gebrauchte.¹⁾

Das Organ wurde also zunächst in einer Fleischmühle zerkleinert. Dann kamen auf 100 g Niere 300 g Wasser + 2 ccm 20% ige Essigsäure; das Ganze wurde mit Chloroform und Toluol 24 Stunden bei 37° gehalten und darauf filtriert das Filtrat wurde 4 Tage gegen Leitungswasser dialysiert (Lösung A).

Der Rückstand auf dem Filter wurde mit Wasser gut gewaschen und dann mit 150 ccm Caseinlösung (20 g Casein nach Hammarsten + 400 ccm H₂O + 100 ccm 0,1-n. NaOH) 20—24 Stunden bei 37° behandelt und filtriert. Das Filtrat (Caseinextrakt B).

Der Rückstand nach der Extraktion mit Casein wurde mit Wasser gut ausgelaugt und gewaschen und nunmehr mit 5% NaCl-Lösung 24 Stunden bei 37° extrahiert. Das Filtrat nach der Extraktion wurde mit 30 g Am₂SO₄ auf 100 ccm versetzt; der dabei entstandene Niederschlag wurde mit wenig Wasser ein paar Tage dialysiert, worauf der zurückbleibende Niederschlag abfiltriert und in so wenig schwacher NaOH wie möglich aufgelöst wurde (Lösung C).

¹⁾ JI. of Biol. Chem. 1922.

Enzymwirkung der Lösung A.

Die Lösung A enthält eine ziemliche Menge an einem bei saurer Reaktion wirkenden, von mir und Rowland vorher nachgewiesenen¹⁾ und von H. D. Dakin des näheren untersuchten Enzyms.²⁾ Außerdem findet sich in derselben Lösung ein am besten bei alkalischer Reaktion ($p_H = 7,8$) auf Pepton wirkendes Enzym (Erepsin). Auf Casein wird bei alkalischer Reaktion nur eine sehr schwache Wirkung erhalten, welche möglicherweise zum Teil auf die Einwirkung des Erepsins auf in der Lösung A vorhandenes Pepton zurückzuführen sein dürfte. Die angeführten Ergebnisse sind aus den unten gegebenen Ziffern zu ersehen.

Die Proben waren folgendermaßen zusammengesetzt: 20 ccm Lösung A + 25 ccm Caseinlösung (siehe oben) + die angegebenen Mengen an 0,1-n. NaOH oder 0,2-n. HCl. Mit Wasser wurde auf dasselbe Volumen aufgefüllt. Die Proben wurden 3 Tage bei 37° gehalten, worauf ein gegebenes Volumen Gerbsäurelösung³⁾ zugesetzt wurde und der Stickstoff in gleichen Volumina der Filtrate bestimmt wurde. Die angeführten Ziffern bedeuten die Anzahl 0,1-n. H_2SO_4 , welche zum Neutralisieren des gebildeten Ammoniaks gebraucht wurden. Der in der Kontrollprobe mit erhitzter Enzymlösung erhaltene Wert ist bereits abgezogen, wird aber bei den verschiedenen Versuchsserien angeführt. In gewissen der Proben wurde p_H für 18° elektrometrisch bestimmt, und zwar vor der Enzymwirkung. Die Ergebnisse eines Versuchs mit Casein als Substrat waren folgende:

4 ccm NaOH	1,75	
3 " "	2,6	
2 " "	4,9	
1 " "	7,85	$p_H = 8,54$
0 " "	10,95	
1 " HCl	18,8	
2 " "	23,0	
3 " "	24,25	
4 " "	32,3	$p_H = 5,02$

¹⁾ Diese Zs. Bd. 32, S. 531 (1901).

²⁾ J. of Physiol. Bd. 30, S. 84 (1904).

³⁾ 100 g Gerbsäure + 50 g NaCl + 50 g Natriumacetat + 50 ccm Eisessig in 1 Liter Lösung.

Die Kontrollprobe ergab 1,6. Wie ersichtlich, ist die saure Reaktion entschieden günstiger für die Einwirkung auf Casein, als die alkalische. Aus dem Versuch ist aber nicht zu ersehen, bei welchem p_H die maximale Wirkung stattfindet. Bei einem weiter unten anzuführenden Versuch wurde aber die größte Wirkung bei $p_H = 4,28$ erhalten (S. 315).

Die Einwirkung der Lösung A auf Pepton ist aus folgendem Versuch zu ersehen. Die Proben waren wie oben zusammengesetzt; nur enthielten dieselben anstatt 25 ccm Caseinlösung dasselbe Volumen an Peptonlösung.¹⁾

4 ccm NaOH	12,1	$p_H = 7,82$
3 " "	12,3	
2 " "	12,95	
1 " "	13,2	
0 " "	17,4	
1 " HCl	13,0	
2 " "	10,8	
3 " "	9,8	
4 " "	4,8	

Die Kontrollprobe ergab 14,5. Die maximale Wirkung liegt entschieden bei schwach alkalischer Reaktion.

Enzymwirkung des Caseinextraktes B.

Das Cas. extr. B, erhalten von der Pferdeniere, scheint dieselben Enzyme zu enthalten wie die oben behandelte Lösung A, obwohl das Verhältnis zwischen den Mengen der Enzyme ein anderes sein kann. Mit 20 ccm des Cas. extr. B und 25 ccm Caseinlösung als Substrat wurden folgende Ziffern erhalten. Die bereits abgezogenen Kontrollziffern waren in den beiden Reihen 22,1 bzw. 18,75.

	I.	II.
6 ccm NaOH	—	2,85
5 " "	2,05	—
4 " "	—	3,35
3 " "	—	—
2 " "	5,4	3,3
1 " "	5,5	—
0 " "	7,75	4,6

¹⁾ Die Peptonlösung wurde in der Weise bereitet, wie Diese Zs. Bd. 112, S. 254, Fußnote 2 angegeben wird.

	I.	II.
1 ccm HCl	16,1	9,15
2 " "	21,8 $p_H = 5,62$	12,25 $p_H = 5,54$
3 " "	19,95	11,05
4 " "	15,6	8,5
5 " "	14,05	—
6 " "	14	—
15 " "	1,1 $p_H = 2,76$	—

Wie ersichtlich wurde hier die optimale Wirkung bei einer Reaktion erhalten, welche etwas weniger sauer war, als mit der Lösung *A*, was wohl an einer verhältnismäßig größeren Menge an Erepsin in dem Cas. extr. *B*, als in der Lösung *A* liegen dürfte. Außerdem ist aus den Ziffern zu ersehen, daß bei $p_H = 2,76$, welche Reaktion sich der für die Pepsinwirkung günstigsten nähert, praktisch keine Wirkung erhalten wurde. Bei alkalischer Reaktion fand eine geringe Wirkung statt, welche wohl durch die Einwirkung des Erepsins auf in dem Cas. extr. vorhandenes Pepton zustande kam.

Die Einwirkung des Caseinextrakts *B* auf Wittes Pepton ist aus folgender Tabelle zu ersehen. 20 ccm Cas. extr. wirkte auf 25 ccm Peptonlösung ein. Die Kontrollprobe ergab 40,6, welche Ziffer wie überall bereits abgezogen ist:

5 ccm NaOH	8,35
4 " "	8,5
3 " "	9,2
2 " "	8,9
1 " "	9,15
0 " "	7,75
1 " HCl	8,9
2 " "	8,0
3 " "	6,3
4 " "	3,6

Eine starke Einwirkung findet also statt sowohl bei alkalischer wie bei saurer Reaktion, ohne daß ein bestimmtes Maximum angegeben werden kann. Möglicherweise sind zwei Maxima vorhanden.

Enzymwirkung der Lösung *C*.

Die Lösung *C*, in oben angegebener Weise erhalten von der Milz, enthält ein Enzym, das seine stärkste Wirkung auf Casein bei entschieden alkalischer Reaktion entfaltete ($p_H = 8,8$).

Aus der Pferdeniere habe ich kein derartiges Enzym mit Sicherheit erhalten können. In einem Falle zeigte die Lösung ihre stärkste Wirkung, die immerhin sehr schwach war, bei saurer Reaktion. In einem anderen Falle wurden folgende Ziffern erhalten (der Kontrollwert 0,7 abgezogen).

5 ccm NaOH	2,0	
4 " "	2,8	
3 " "	3,1	$p_H = 8,46$
2 " "	2,9	
1 " "	2,45	
0 " "	2,2	
1 " HCl	2,95	$p_H = 6,09$
2 " "	2,65	
3 " "	1,3	

Hier existiert kein ausgesprochener Unterschied zwischen der Wirkung bei alkalischer und bei saurer Reaktion, und die Enzymwirkung ist überhaupt sehr schwach.

Aus den Versuchen, über welche ich oben berichtet habe, geht also hervor, daß die Pferdeniere ein Enzym enthält, das seine stärkste Wirkung auf Casein bei schwach saurer Reaktion ausübt. Ob ein Enzym vorhanden ist, das seine maximale Wirkung auf Casein bei alkalischer Reaktion hat, geht aus meinen Versuchen nicht mit Sicherheit hervor. Existiert ein solches Enzym, muß es sehr schwach sein. Außerdem ist zu verzeichnen, daß die Niere auch ein am besten bei alkalischer Reaktion wirkendes Erepsin enthält.

Einwirkung von Säurebehandlung auf die Enzymmengen.

Die Wirksamkeit der zwei nachgewiesenen Enzyme fällt entschieden größer aus, wenn das Organ zunächst mit einer schwachen Säure behandelt wird als ohne solche Behandlung, und in dieser Beziehung verhält sich die Niere folglich in der gleichen Weise wie die Milz. Der Weg, auf welchem dies gefunden wurde, war auch derselbe wie der für die Milz betretene. Zunächst wurde die ganze Nierensubstanz in folgender Weise für den Versuch benutzt.

3 Proben, enthaltend 20 g Nierensubstanz + 22 ccm H_2O + etwas MgO wurden 24 Stunden bei 37° aufbewahrt (E).

3 Proben in der gleichen Weise zusammengesetzt, aber ohne MgO, wurden in der gleichen Weise behandelt (*F*).

6 Proben mit 20 g Nierensubstanz + 20 ccm H₂O + 2 ccm 2% ige Essigsäure wurden ebenfalls 24 Stunden bei 37° gehalten (*G*).

Darauf wurden die Proben folgendermaßen kombiniert:

<i>E</i> + <i>G</i> erhitzt + 15 ccm H ₂ O + MgO	1.
<i>E</i> erhitzt + <i>G</i> + 15 „ H ₂ O + MgO	2.
(<i>E</i> + <i>G</i>) erhitzt + 15 „ H ₂ O + MgO	3.
<i>F</i> + <i>G</i> erhitzt + 15 ccm H ₂ O + 2 ccm 2% ige Essigsäure . .	4.
<i>F</i> erhitzt + <i>G</i> + 15 „ H ₂ O + 2 „ 2% ige „ . .	5.
(<i>F</i> + <i>G</i>) erhitzt + 15 „ H ₂ O + 2 „ 2% ige „ . .	6.

Die Proben 1—6 wurden 3 Tage bei 37° gehalten, dann mit je 40 ccm Gerbsäurelösung versetzt und der Stickstoff in 50 ccm Filtrat bestimmt.

Nr. 1	36,0; Kontrollwert abgezogen: 2,5
„ 2	36,9 „ „ 3,4
„ 3	33,5
„ 4	43,7 „ „ 8,2
„ 5	56,5 „ „ 21,0
„ 6	35,5

Die Enzymwirkung in Nr. 1 und 2 fand bei $p_H = 8,8$ (ungefähr) statt, da die Proben von dem aufgelösten MgO alkalisch waren. Wie ersichtlich, war in Nr. 1 die Enzymmenge wirksam, welche in 20 g Nierensubstanz vorhanden war, nachdem dieselbe 24 Stunden bei 37° mit MgO (p_H etwa = 8,8) behandelt worden war. In Nr. 2 war die Enzymmenge wirksam, welche nach Behandlung mit Essigsäure (p_H etwa = 5,6) vorhanden war. Die Enzymwirkung war in beiden Fällen unbedeutend, aber dennoch ein wenig kräftiger in Nr. 2 als in Nr. 1, was wahrscheinlich in der Weise zu deuten ist, daß die Erepsinmenge in Nr. 2 (mit *G* wirksam) größer war als in Nr. 1 (mit *E* wirksam), und daß etwas Albumosen und Pepton vorhanden war, auf die die vorhandenen Erepsinmengen einwirken konnten.

Der Unterschied zwischen den Analysenwerten in Nr. 5 und 4 ist sehr bedeutend, was offenbar in der Weise zu deuten ist, daß die Nierensubstanz nach Behandlung mit schwacher Säure (*G*) mehr bei saurer Reaktion wirkendes Enzym enthält als nach Behandlung mit Wasser (*F*).

In einem anderen, ähnlichen Versuche wurde die Niere zunächst mit physiologischer NaCl-Lösung durch das Gefäßsystem so lange ausgespült, bis die Flüssigkeit farblos ausfloß und dann in der Fleischmühle zerkleinert. Dann wurden 3 Proben, enthaltend 10 g Nierensubstanz + 20 ccm H_2O , 20 Stunden bei 37° gehalten (*F*), und 3 Proben, enthaltend 10 g Nierensubstanz + 20 ccm H_2O + 2 ccm 2% ige Essigsäure wurden ebenfalls 20 Stunden bei 37° gehalten (*G*). Dann wurden folgende Mischungen hergestellt, 3 Tage bei 37° aufbewahrt und wie oben analysiert.

<i>F</i> + <i>G</i> erhitzt + 15 ccm H_2O + 2 ccm 2% ige Essigsäure	. .	1.
<i>F</i> erhitzt + <i>G</i> + 15 " " + 2 " 2% ige "	. .	2.
(<i>F</i> + <i>G</i>) erhitzt + 15 " " + 2 " 2% ige "	. .	3.

Die Analysenresultate waren:

Nr. 1	47,4	; Kontrollwert abgezogen:	12,6
" 2	70,35	" "	35,55
" 3	34,8	" "	35,55

Auch hier enthielt also die säurebehandelte Probe bedeutend mehr bei saurer Reaktion wirkendes Enzym als die einfach mit Wasser behandelte.

Wie oben hervorgehoben, wurde bei den eben beschriebenen Versuchen die ganze Nierensubstanz mitgenommen. Bei den folgenden Versuchen, welche dieselbe Frage behandeln, wurde für die Bestimmung der Enzymmengen nur die in Lösung gegangenen Enzymmengen studiert. Außerdem wurde auch in bezug auf die Säurebehandlung in anderer Weise verfahren, indem die zu vergleichenden Proben beide mit Säure behandelt wurden, die eine sofort und die andere erst nach vorangegangener Behandlung mit Wasser allein. 2 Proben, enthaltend 100 g Nierensubstanz + 300 ccm H_2O wurden 24 Stunden bei 37° gehalten. Dann wurde die eine filtriert; p_H wurde im Filtrat = 6,8 gefunden. 20 ccm Filtrat wurde mit 10 ccm Gerbsäure gefällt. Der Stickstoff in 20 ccm Gerbsäurefiltrat entsprach 9,1 ccm 0,1-n. Säure.

Die andere der zwei Proben wurde nach dem 24 stündigen Aufbewahren bei 37° mit 2 ccm 20% Essigsäure versetzt, abermals 24 Stunden bei 37° gehalten und dann filtriert. Das

Filtrat ergab $p_H = 5,14$ und $N = 12,7$. Ein gegebenes Volumen des Filtrates wurde 3 Tage gegen Leitungswasser dialysiert. (*L*).

100 g Nierensubstanz + 300 ccm H_2O wurde sofort mit 2 ccm 20% iger Essigsäure versetzt, 24 Stunden bei 37° gehalten und filtriert. Das Filtrat ergab $p_H = 5,20$; $N = 12,7$. Dialyse wie im vorigen Falle (*M*).

Nach der Dialyse wurden *L* und *M* auf dasselbe Volumen aufgefüllt. Für beide wurde $p_H = 8,57$ gefunden. Dann wurden Proben bereitet, welche alle 20 ccm *L* oder *M* + 25 ccm Caseinlösung und die unten angegebenen Mengen 0,1-n. NaOH oder 0,2-n. HCl enthielten und mit Wasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt waren. Nach 3 Tagen bei 37° wurde mit Gerbsäurelösung gefällt und wie oben analysiert. Die Kontrollziffern waren für *L* 1,5 und für *M* 1,6.

	<i>L</i>	<i>M</i>
2 ccm NaOH	4,6; $p_H = 8,54$	4,9
1 "	5,5	7,85
0 "	6,4	10,95
1 ccm HCl	9,3	18,8
2 "	10,7	23,0
3 "	10,7	24,25
4 "	23,5	32,3

In diesem Falle war also Casein das Substrat für die in *L* und *M* vorhandenen Enzymmengen. In folgender Tabelle sind die Ziffern angegeben, welche mit 25 ccm Peptonlösung als Substrat und 20 ccm *L* oder *M* erhalten wurden. Die Kontrollziffern waren für die Reihe mit *L* 13,7 und für die mit *M* 14,5.

	<i>L</i>	<i>M</i>
4 ccm NaOH	9,5	12,1
3 "	9,8	12,3
2 "	10,5	12,95
1 "	10,7	13,2
0 "	10,8; $p_H = 7,82$	17,4; $p_H 7,82$
1 HCl	9,15	13,0
2 "	5,6	10,8
3 "	5,7	9,8
4 "	3,4	4,8

Dieser Versuch über die Einwirkung der Säurebehandlung wurde wiederholt, wobei die Behandlung der Proben *L* und *M*

mit Säure ganz in derselben Weise geschah wie im oben beschriebenen Versuche.

Nach der Behandlung mit Säure wurde p_H für $L = 5,08$ und für $M = 5,10$ gefunden. Nach der Dialyse war p_H für $L 8,72$ und für $M = 8,77$.

Die Proben, in welchen die Einwirkung der Enzyme auf Casein oder Pepton stattfand, wurden aber in anderer Weise bereitet als oben, indem diese Proben beide Enzymlösungen L und M enthielten, obwohl die Enzyme in einer durch Erhitzen zerstört war. Die Reihe, in welcher L wirksam war, enthielt 20 ccm $L + 20$ ccm M erhitzt + 25 ccm Casein- oder Peptonlösung usw. Hierdurch wurde offenbar das Substrat in den zu vergleichenden Reihen genau dasselbe. Mit Casein als zugesetztes Substrat wurden folgende Ziffern erhalten:

	L wirksam	M wirksam	
2 ccm NaOH	0,35	2,55	
4 HCl	6,65	17,35	
5 „	12,95	23,3	$p_H = 4,28$
6 „	12,7	20,5	
7 „	12,4	19,45	

Der Kontrollwert 2,2 war offenbar derselbe in beiden Reihen.

Die Einwirkung auf Pepton wurde nur bei der für die Enzymwirkung günstigsten Reaktion ($p_H = 8$) studiert. Es ergab sich

L wirksam	M wirksam
2,6	12,5

Die Kontrollprobe ergab 15,0, welcher Wert bereits abgezogen ist.

Die zwei letzten Versuche zeigen also übereinstimmend, daß die Lösung M , erhalten durch direkte Behandlung der Nierensubstanz mit schwacher Säure mehr von den beiden in der Niere nachgewiesenen Enzymen enthält als die Lösung L , welche in der Weise erhalten wurde, daß die Säurebehandlung erst nach vorhergehender 24-stündiger Behandlung mit Wasser stattfand. Diese Ergebnisse stehen offenbar in völliger Übereinstimmung mit meinen oben beschriebenen Versuchen mit der ganzen Nierensubstanz und sie können, so viel ich sehen kann,

nur in der Weise erklärt werden, daß während der Wasserbehandlung von *I* bei annähernd neutraler Reaktion ($p_H = 6,8$) ein Teil der vorhandenen Enzyme dauernd außer Wirkung gesetzt werden. Dieser Prozeß wird durch sofortige Behandlung mit Säure verhindert. Die Säurebehandlung hat offenbar eine verschiedene Wirkung je nachdem sie sofort oder nach vorangehender Behandlung mit Wasser stattfindet. Daß die Enzymmengen unter dem Einfluß der Säure in irgendwelcher Weise zunehmen würden, geht aus meinen Versuchen nicht hervor. Ganz dieselben Verhältnisse habe ich bei der Milz gefunden; nur findet sich da auch ein auf die Organsubstanz und auf Casein bei alkalischer Reaktion wirkendes Enzym, das in der gleichen Weise wie die anderen durch Säuren beeinflußt wird.

Zusammenfassung.

Die proteolytischen Enzyme, welche in der Pferdeniere angetroffen wurden, sind

1. ein Erepsin, das auf Pepton am besten bei alkalischer Reaktion ($p_H = 7,8$) einwirkt.

2. Ein Enzym, das auf die Eiweißkörper des Organs und auf Casein am besten bei schwach saurer Reaktion ($p_H = 4,3-5,6$) einwirkt.

3. Bei der Wasserstoffionenkonzentration, welche eben die günstigste für die Pepsinwirkung ist, findet kein Umsatz statt.

4. Ein Enzym nachzuweisen, das am besten bei alkalischer Reaktion auf das Eiweiß des Organs oder auf Casein einwirkt, ist mir nicht gelungen. Wenn ein solches Enzym vorhanden ist, muß es sehr schwach sein.

5. Wenn die ganz frische Niere bei schwach alkalischer oder sehr schwach saurer Reaktion aufbewahrt wird, verlieren die Enzyme zum großen Teil dauernd ihr Wirkungsvermögen. Dieser Prozeß wird durch sofortige Zugabe von etwas Säure verhindert.

Da nun die Milz und die Niere von mir mit denselben Methoden in bezug auf die proteolytischen Enzyme untersucht worden sind, ist es von erheblichem Interesse nachzusehen, inwieweit die Ergebnisse in den beiden Fällen übereinstimmen.

Es ergibt sich dabei, daß die oben unter 1, 2, 3 und 5 angegebenen Resultate ebensogut für die Milz wie für die Niere gültig sind. Nach 4 fehlt in der Niere ein Enzym, das auf das Organ oder Casein am besten bei alkalischer Reaktion wirkt. In der Milz ist ein solches Enzym entschieden vorhanden und läßt sich besonders nach Einwirkung von Säure auf das ganz frische Organ nachweisen. Aus der erwähnten Übereinstimmung zwischen den mit der Milz und mit der Niere erhaltenen Ergebnissen ist offenbar nicht ohne weiteres zu folgern, daß die unter den gleichen Bedingungen wirkenden Enzyme in beiden Fällen identisch sind.

Seitdem obiges bereits geschrieben war, ist eine Arbeit von Bradley erschienen, welche sich mit den proteolytischen Enzymen der Rinderniere befaßt.¹⁾ Seine Angaben über die in der Rinderniere vorhandenen proteolytischen Enzyme decken sich in erfreulicher Weise mit den von mir mit Pferdeniere gefundenen und oben unter 1, 2, 3 und 4 zusammengefaßten Tatsachen.

Bradleys Untersuchungen waren aber nicht auf die Frage eingerichtet, ob die Säurebehandlung irgendwelchen Einfluß auf die Menge an wirksamen Enzymen ausübt, und er hat sich deshalb nicht über die von mir unter 5 berührte Beobachtung geäußert. In Übereinstimmung mit Dernby²⁾ hat er aber gefunden, daß die bei der Säurebehandlung stattgefundene Veränderung des Niereneiweißes, wobei Albumosen und Peptone entstehen, ermöglicht, daß nachher das Erepsin bei alkalischer Reaktion wirken kann.

¹⁾ Jl. of Biol. Chem. Bd. 52, S. 466 (1922).

²⁾ Jl. of Biol. Chem. Bd. 35, S. 179 (1918).