

(Staatliche Landesstelle für öffentliche Gesundheitspflege, Dresden.)

## Einfluß einer künstlichen $\alpha$ -Naphtholoxydase auf lytische Systeme.

Von

Dr. W. Loele.

Mit 1 Abbildung im Text.

(Eingegangen am 30. Mai 1931.)

Nach *Traube* sind Fermente kolloidale Gebilde, deren Wirksamkeit von Oberflächenkräften abhängt. „Dieselbe chemische Materie kann die verschiedensten Fermente erzeugen, und die verschiedensten Materien können gleiche Fermente hervorbringen.“ Auch nach *Fodor* sind Fermente Protoplasmateile von bestimmter Dispersität. Dagegen sind nach *Willstätter* Fermente unterscheidbare chemische Individuen, bestehend aus einem kolloiden Träger und einer spezifischen aktiven Gruppe<sup>1</sup>.

Für die Ansicht von *Willstätter* spricht die scheinbar zweckmäßige Anordnung der Verdauungsdrüsen, die die Fermente in der Reihenfolge liefern, wie sie gebraucht werden.

Die neueren Fermentforschungen haben aber gezeigt, daß weder die Bildung der Fermente auf spezifische Drüsen beschränkt ist, noch daß die Fermente einheitliche Stoffe darstellen. Selbst in der Tränendrüse, die nichts mit der Verdauung zu tun hat, kommt ein amyloytisches Ferment vor (*Forti*). Die Speicheldrüsen enthalten außer der Amylase Lipase und Tryptase. Die Lipase des Magens, die zweckmäßig bei saurer Reaktion ihr Optimum hat, ist nach *Willstätter* gereinigt, von der Pankreaslipase nicht wesentlich verschieden. Auch der Magen bildet ein tryptisches Ferment, die Bauchspeicheldrüse nicht das Proferment, sondern Trypsin, daneben auch Enterokinase und Erepsin (*Willstätter*). Demnach scheint bei den Drüsen des Endoderm die Fähigkeit, Verdauungsfermente zu bilden, eine allgemeine Protoplasmaeigenschaft zu sein im Sinne von *Traube* und *Fodor*.

Sämtlichen Verdauungsfermenten begegnet man wieder in den lymphatischen und myeloischen Zellen des Blutes mit Ausnahme des Pepsins. Auch bei den mesodermalen Zellen scheint das Protoplasma fähig zu sein, verschiedene, wenn nicht alle Verdauungsfermente zu bilden.

<sup>1</sup> *Waldschmidt, E.-Leitz:* Die Enzyme. Braunschweig: F. Vieweg & Sohn 1926.

Wie steht es nun mit dem Ektoderm?

Daß auch hier in den Zellen Lösungsvorgänge sich abspielen, die auf die intermediäre Einwirkung sämtlicher Verdauungsfermente hinweisen, dafür spricht die Entstehung der Hornschicht der Epidermis unter Auflösung des Kernes.

Es gibt aber noch einen Indizienbeweis, der für die Ähnlichkeit der Spaltungsvorgänge spricht, das ist der positive Ausfall der Naphtholperoxydasereaktion in den Oberflächenepithelien des Amphioxus, des niederen Wirbeltieres, das an Stelle von Hornzellen noch Zylinderepithel besitzt.

Naphtholoxone sind bei Wirbeltieren selten, trifft man sie, so sind gewöhnlich auch Verdauungsfermente in den Zellen nachweisbar, wie die folgende Zusammenstellung zeigt.

Organ oder Zelle	Verdauungsferment	Naphtholoxon (Beispiele)
Tränendrüse	Amylase	Naphtholperoxydase Rind, Kalb, auch in den Ausführungsgängen
Parotis und Speicheldrüse	Amylase Lipase Tryptase Pepsin Lipase Tryptase	Naphtholperoxydase Rind, Kalb, auch in den Ausführungsgängen Naphtholoxydase Parotis (Mensch) Submaxillaris (Schwein) Naphtholoxydase (Fische)
Magen		
Brönchus (Schaf)	Amylase (in einem untersuchten Falle)	Naphtholoxydase
Neutrophiler Leukocyt	Tryptase Amylase	Naphtholoxydase (Mensch)

Der Gehalt der Milch an Naphtholperoxydasen und Amylasen dürfte mit der Leukocytensekretion zusammenhängen.

Nur das Pankreas, das dauernd Tryptase ausscheidet, enthält, so weit bisher untersucht, kein Naphtholoxon, sondern nur labile Indophenoloxidasen, die *Langerhansschen* Inseln sind sogar frei von Oxonen (*Katsunuma*). Aber diese Ausnahme hängt vielleicht damit zusammen, daß die Oxone bei der Bildung des Trypsins verbraucht werden. Zur Stützung dieser Auffassung kann eine Beobachtung von *Ch. Hirsch* herbeigezogen werden, wonach die Peroxydasewerte einer Verdauungsdrüse (*Astacus*) ihren Höchstwert vor dem der Verdauungsfermente besaßen.

Die Naphtholoxydase läßt sich nun im Reagensglase nachahmen, und diese künstliche Oxydase zeigt viele Erscheinungen, die auch in Zellen vorkommen und durch den Vergleich mit der künstlichen Oxydase verständlich werden.

Das System  $\text{OH} + \alpha\text{-Naphthol} + \text{COH} + \text{NH}_2\text{COOH} + \text{Fe}_{(3)}$  entspricht in seiner Zusammensetzung einem Ferment, dessen Leistung

die Bildung eines Farbstoffes durch Oxydation ist. Es setzt sich zusammen aus einem kolloiden Anteil und einer aktiven Gruppe, die 3 Faktoren besitzt, die jeder für sich wirkungslos sind und nur in bestimmten Mischungen wirken.

Gibt man Eisenchlorid (1:1000) zu folgender Mischung:

$\alpha$ -Naphthol (0,5 g: 100,0 ccm 1%ige KOH) = 0,75 ccm

Formaldehydlösung 2% + Glykokollösung (2%)  $\text{aa} = 0,25$  ccm,  
so tritt keine Farbreaktion ein.

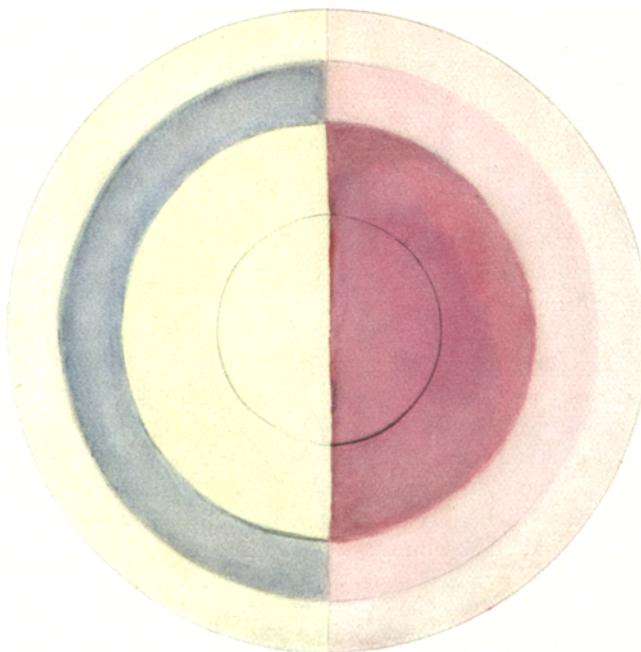


Abb. 1. Links  $\alpha$ -Naphtholoxydineinwirkung; rechts Aldehydreaktion auf der Endoplatte. Der kleinste Kreis entspricht dem Rand des Aufsatzzylinders.

Setzt man nun die 3 Faktoren nachträglich einzeln zu, so haben Formollösung und Eisen keinen Einfluß, wohl aber setzt die Farbstoffbildung noch bei Glykokollzusatz ein (Glykokoll wirkt hier wie ein Coferment). Hat die Mischung längere Zeit gestanden, so ist die nachträgliche Reaktion mit Glykokoll schwach, kann aber durch einige Tropfen  $1/10$  N. Salzsäurelösung verstärkt werden (Lösung von Eisenoxyd). Der an sich zerstörende Faktor Salzsäure erscheint hier als Aktivator. Man kann noch auf einem anderen Wege zeigen, daß das anscheinend negative System eine Oxydase enthält, demnach ein Partial der Oxydase darstellt. Läßt man von dem Gemisch 5 ccm capillarisieren, trocknet und drückt das Capillarisationsfeld auf eine Lösung von Eisenchlorid (1:1000), so tritt nicht selten eine deutliche ringförmige Farb-

stoffzone in einiger Entfernung von der Mitte auf. Diese Zone enthält vermutlich mehr Glykokoll infolge Zurückbleibens des durch die Lauge zum Teil veränderten Formols. Diese Abnahme der Aldehydkonzentration lässt sich zeigen, wenn man das Filtrat auf eine Endoplatte legt (s. Abb. 1). Derartige Ringzonen erhält man auch bei der Capillarisierung natürlicher Peroxydasen von Pflanzen.

Härtet man Würfel von Nährgelatine in der folgenden Mischung:

Formol 10%	10,0 ccm
Glykokollösung 2%	10,0 ccm
Eisenchlorid 1: 1000,0	2,0 ccm

und bringt Scheiben davon in eine alkalische Naphthollösung, so tritt eine dunkle Violettfärbung nur in der Gelatine auf, die sich wie eine lokalisierte, etwa adsorbierte Oxydase verhält. Nach mehreren Monaten färbte sich die Gelatine in der Fixierungsflüssigkeit rosaviolett, Oxydasereaktion trat nicht mehr ein, aber in der alkalischen Naphthollösung wurde der Würfel vom Rand her entfärbt und es bildete sich in einer bestimmten Zone ein smaragdgrüner Ring um das rötliche Zentrum. Die Wirkung des Eisens war ausgeschaltet. Auch dieser Vorgang hat seine Vergleichspunkte mit der Zelle.

Wird in einer oxydasehaltigen Zelle ein Pigment gebildet, so geht meist die Oxydase zugrunde.

Da in dem System  $\text{COH} + \text{NH}_2 \text{COOH} + \text{Fe}$  der Eintritt der Naphtholoxidasereaktion abhängt von den Mengenverhältnissen der Faktoren, lässt sich das System auch zum Nachweis der Mengen eines bestimmten Faktors verwenden. Ein praktisches Beispiel ist der Nachweis von Formalin in der Milch.

Mit der folgenden Mischung:

Alkalische Naphthollösung	0,75 ccm
Konzentrierte wässrige Glykokollösung	1,0 ccm
Milch	0,5 ccm
Eisenchloridlösung (1: 100)	0,3 ccm

lässt sich Aldehyd noch in einer Verdünnung von 1 ccm Formaldehydlösung auf 32 Liter Milch nachweisen. Nimmt man andere Mengen, so wird entsprechend die Empfindlichkeit der Reaktion herabgesetzt.

Die drei Faktoren des oxydativen Systems sind jeder für sich imstande, katalytisch einen Oxydationsvorgang zu beschleunigen. Eisen z. B. oxydiert eine wässrige Naphthollösung, Formol mit Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine Benzidinlösung, Glykokoll die Farbstoffbildung aus  $\alpha$ -Naphthol und Aldehyd. Es macht daher den Eindruck, als ob das System verschiedene oxydierende Fermente enthalte. Weiter können im System durch Auswechslung der Faktoren und durch Mischungen verschiedener Faktoren eine ganze Menge neuer oxydierender Systeme (Fermente) geschaffen werden. Auf die Zelle übertragen heißt das: die verschiedenen Oxydäsen der Zellen können trotz chemischer Verschiedenheit grundsätzlich die gleichen Dinge sein.

Es liegt nun nahe, diesen Gedankengang in die Praxis zu übertragen und zu versuchen, eine Naphtholperoxydase in eine Oxydase zu verwandeln, ausgehend von der Tatsache, daß auch im Reagensglas beide Systeme aus den gleichen Faktoren bestehen können, daß somit die Naphtholperoxydase ein Teil der Oxydase sein kann.

Für diesen Versuch eignete sich eine pflanzliche Peroxydase aus Rettich, die in dem Präparat „Cholosan nach Dr. Naumann, Dresden“ vorlag.

Cholosan gab capillarisiert eine sehr deutliche Naphtholperoxydasereaktion mit einem zentralen und einem peripheren violetten Ring. Die Oxydasereaktion mit alkalischer Naphthollösung war negativ. Wenn hier die gleichen Faktoren vorlagen, so mußte der Rettichauszug mit Mengen von Aldehyd und Glykokoll bei Eisenzusatz eine Reaktion geben, wo in den Vergleichen ohne Rettichauszug keine Reaktion eintrat.

In der Tat gab die Mischung

Rettichauszug . . . . .	0,5 ccm
Formol (2%) + Glykokoll (2%) ää . . . . .	0,1 ccm
Alkalische Naphthollösung . . . . .	0,5 ccm
Eisenchlorid 1: 100 . . . . .	0,1 ccm

starke schwarzviolette Naphtholreaktion, während bei Ersatz des Rettichextraktes durch Kochsalzlösung keine Verfärbung zu sehen war.

Wurde Formol allein dem Rettichauszug zugesetzt, so trat ebenfalls nach Eisenzusatz eine langsamer eintretende Farbreaktion ein, und zwar stärker bei Zusatz von 0,1 ccm als bei 0,5 ccm Formol. Der Auszug verhält sich demnach so, wie wenn er bereits Amidosäuren enthält.

Man kann somit die Rettichperoxydase in eine Oxydase verwandeln durch Zusatz sgeringer Mengen von Glykokoll, Eisen und Formol, auf 100 ccm Extrakt berechnet:

Formoldehyd (33%) . . . . .	0,2 ccm
Glykokoll . . . . .	0,2 g
Eisenchlorid . . . . .	0,2 ccm

Indessen ist diese Oxydase nur kurze Zeit haltbar.

Wenn die Oxone der Zelle nur in bestimmten Mischungsverhältnissen ihrer Faktoren wirksam sind, so sind die Widersprüche, die darin bestehen, daß sich nahe verwandte Zellen in bezug auf die Oxonreaktionen ganz verschieden verhalten, erklärlich. Die Spezifität der Oxonzelle besteht demnach nicht in der spezifischen Ausscheidung der Faktoren, sondern in der Herstellung des richtigen Mischungsverhältnisses, das am leichtesten und am regelmäßigsten an der Oberfläche von Granula zu erreichen ist. Bei den Verdauungsfermenten dürfte es sich ähnlich verhalten.

Man trifft nun in den Zellen mit  $\alpha$ -Naphtholoxonen oft Verdauungsfermente an, es liegt daher die Frage nahe, ob die Faktoren der oxydativen Systeme die lytischen Vorgänge der Zelle beeinflussen.

*Einfluß von Aminosäuren.*

Wenn nach *Enderlein* zur Bestimmung von Bakterien nicht nur die bakterielle chemische Leistung, sondern auch die Wachstumsform auf verschiedenen Nährböden bestimmt sein soll, so stellt ein Nährboden mit Glykokollzusatz in der Tat ein wichtiges Unterscheidungsmittel dar. Denn die Bakterien wachsen auf diesem Nährboden

1. unverändert,
2. als lange unregelmäßig gequollene Bänder und Fäden,
3. als runde Scheiben.

In die letzte Gruppe gehören die Vibrionen. Das Wachstum wird bei mäßigem Glykokollzusatz nicht gefährdet, wie daraus hervorgeht, daß man in Brühe mit Glykokollzusatz zahlreiche lebhaft bewegliche Kugeln sehen kann.

Derartige Kugeln findet man vereinzelt zwar auf jedem Nährboden. Hier handelt es sich aber um eine gleichmäßig, alle Bakterien treffende Änderung als Folge der Einwirkung des Glykokolls. Ursache der Kugelbildung ist eine Art Verschleimung der Zellen. Die Verschleimung ist aber ein lytischer Vorgang. Somit erscheint die Amidosäure als Faktor eines lytischen Systems, und zwar als hemmender Faktor (Verhinderung der völligen Lösung).

Aus früheren Versuchen ging hervor, daß Trypsin in seiner Wirkung durch Glykokoll nicht unmittelbar beeinflußt wird, wohl aber ein peptisches System. Betrachtet man die Verschleimung der Bakterien als einen teilweise peptischen Vorgang, so ist eine Beeinflussung durch Glykokoll auch theoretisch möglich.

Der Vorgang erinnert dann in gewisser Hinsicht an die Bildung der kleinen Lymphocyten und ähnlicher Zellen. Denkt man sich in Körperzellen den Kern, wie bei den Bakterien mit dem Protoplasma gemischt, so würde auch hier einerseits ein pyknotisches kleineres Gebilde, im anderen Falle eine große Kugel entstehen. (Hier liegt der Vergleich mit den sog. *Rindfleischschen* Typhuszellen nahe, die eine Art phagocytierender Schleimkugeln darstellen.) Ebensowenig, wie man bei der Bildung der Lymphzellen den intermediären Auflösungsvorgang des Protoplasmas sieht, ist dieser bei der Bildung der normalen Wuchsform der Vibrionen zu beobachten, sondern kommt erst bei der Stoffwechselstörung zum Ausdruck.

Bacterium *Metschnikoff* enthält nun 3 Fermente, eine Gelatinase, eine Amylase und eine Oxydase für P. Phenylendiamin.

Um die Stärke der drei Fermentreaktionen festzustellen nach Beeinflussung der Bakterien durch Glykokoll, wurden die Keime auf glykokollhaltigem Agar gezüchtet, abgeschwemmt und ihre Einwirkung auf Stärke, Gelatine und Paraphenylendiaminlösung beobachtet. Auch durch Betropfen der Kulturplatten mit Kleister und P. Phenylösung ist ein Vergleich möglich.

Wenn Unterschiede in den Agar- und Glykokollagarkulturen auftraten, so bestanden sie stets in einer Vermehrung der Oxydasen und einer Verminderung oder einem Schwund der Diastasen und Tryptasen. Dieser Verlust der Keime an lytischen Fermenten, der da, wo keine Wachstumshemmung eintrat, als Mitigation im Sinne von *Flügge* anzusehen ist, entsteht nicht durch unmittelbaren Einfluß des Glykokolls, sondern wahrscheinlich erst mittelbar. Vielleicht ist die Vermehrung der Oxydasen Ursache dafür, daß die Fermente, adsorbiert unwirksam werden.

#### *Einfluß des Aldehydes.*

Es ist bekannt, daß die Vergiftung der Hefesacharase durch organische Basen wie Anilinöl und Toluidin durch Formaldehyd wieder aufgehoben wird. In der gleichen Weise kann umgekehrt in einem lytischen System die schädigende Wirkung des Aldehydes durch Glykokoll beseitigt werden und die schädigende Wirkung des Glykokolles durch Aldehyd. Das erstere war festzustellen in Verdauungsversuchen mit Trypsin<sup>1</sup>.

Das letztere ist zu beobachten, wenn einem glykokollhaltigen Nährboden gleichzeitig Formol zugesetzt wird. Es wächst dann der *Vibrio* nicht als Kugel, sondern in seiner Normalform. Züchtet man die Vibrionen auf glykokollhaltigen Nährböden weiter, so nehmen sie mit der Zeit ihre alte Gestalt wieder an. Man könnte denken, daß durch Anpassung der Membran Glykokoll zurückgehalten wird, doch spricht hiergegen, daß bei Steigerung der Glykokollzugabe wieder die großen runden Formen auftreten. Wenn demnach die Keime das Glykokoll entgiften, so kann das dadurch geschehen, daß sie den Faktor Aldehyd vermehren.

#### *Einwirkung des Eisens.*

Bei den Fermentversuchen war die Einwirkung des Eisens nicht besonders deutlich, doch fand sich in einigen Versuchen ebenfalls eine Abschwächung der Amylase und Gelatinase bei Verstärkung der Oxydase.

Deutlicher war die Wirkung mit der Verbindung Eisenglykokoll, hier waren in einigen Fällen die Fermente unwirksam, besonders bei *Bacterium fluorescens* und *pyocyaneum* (Tryptase). Ähnlich ist die Wirkung des oxydativen Systems auf Rettichextrakt. Cholosan hat auf Stärke eine schwach lösende Wirkung, die bei Zusatz des Systems fortfällt.

Wenn die Faktoren der künstlichen Oxydase einen, wenn auch nur unmittelbaren Einfluß auf lytische Systeme besitzen, so muß sich dieser bemerkbar machen in Zellen, in denen beide Fermente nebeneinander vorhanden sind, z. B. bei der Bildung von Blutzellen. Unveränderliche Zellstrukturen gibt es nicht. Immer sind Lösungs- und Fällungsvorgänge an der Strukturbildung beteiligt. Es ist aber ein Unterschied, ob die Struktur der Hauptsache nach unverändert bleibt, indem nur an die

<sup>1</sup> Loele, W.: *Virchows Arch.* **279** (1930).

vorhandene Struktur sich Teile neu anlagern oder lösen, oder ob die ganze Struktur sich löst. Nur im letzteren Falle kommt es zu kolloidalen Fällungen, die etwas wesentlich Neues bringen, mindestens andere Mischungsverhältnisse. Ein Beispiel aus der anorganischen Chemie zeigt die Verschiedenheit beider Vorgänge. Gibt man in eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung etwas Eisenchlorid und läßt die Lösung verdunsten, so bilden sich außerordentlich zierliche Krystallbäumchen. Diese Strukturbildung ist eine Funktion des Mischungsverhältnisses, löst man die Krystalle und läßt wieder verdunsten, so bilden sich die Bäumchen nicht wieder. Nur durch Anlagerung an die ersten aus der Mischung sich bildende Strukturen wird der ganze Vorgang in gleicher Weise beeinflußt. Faßt man einen biologischen Vorgang als ein System auf, so kann irgendein Faktor auf das System in verschiedener Weise einwirken, in verschiedenen Systemen kann der gleiche Faktor ganz verschieden und vollkommen entgegengesetzt wirken.

Folgende Möglichkeiten sind vorhanden:

1. der Faktor hat keinen Einfluß,
2. der Faktor fördert die Systemleistung,
3. er hemmt die Systemleistung,
4. er zerstört die Leistung.

Die Hemmung der Leistung kann oft durch nachträglichen Zusatz eines neuen Faktors beseitigt werden. Dagegen kann die Zerstörung der Systemleistung nur durch einen *gleichzeitig* wirkenden Gegenfaktor aufgehoben werden.

---