

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Berlin  
[Direktor: Prof. Dr. R. Rössle].)

## Untersuchungen über die proteolytischen Fermente der *Rana temporaria* in verschiedenen Stadien der Metamorphose<sup>1</sup>.

Von

Dr. phil. Vera Doljanski.

(Eingegangen am 15. September 1933.)

Die vorliegende Untersuchung verfolgte das Ziel festzustellen, ob bei dem natürlichen Abbau von Geweben gegen Eiweiß gerichtete Enzyme (Proteinasen) nachweisbar seien, wie sie auch dem fermentativen Abbau körperfremden Eiweißes im Magendarmkanal dienen. Die Voraussetzungen zu einer solchen Untersuchung waren erst gegeben, seitdem die Fermentforschung sich auch dem Nachweis der in den Geweben selbst tätigen Fermente zugewendet hatte.

Der neuesten Entwicklung der Fermentforschung verdanken wir die Kenntnis von dem Vorhandensein proteolytischer Enzyme in Geweben und Zellen außerhalb des Verdauungskanales. Der Gedanke liegt nahe, ihre Bedeutung in einer ähnlichen Wirksamkeit zu sehen, wie diejenige der altbekannten Verdauungsfermente, nämlich in der Verarbeitung verbrauchter, dem Untergang geweihter oder toter Bestandteile durch Verflüssigung.

*Dernby* (1919) will beim Studium der Autolyse in Leber, Milz und Pankreas Pepsinasen und Tryptasen, *Hedin* (1922) solche in Milz, Niere und Lymphdrüsen gefunden haben; Tryptasen wurden von *Willstätter*, *Bamann* und *Rohdewald* in Leukocyten nachgewiesen. Die Mehrzahl dieser Organe und Zellen sind schon vom morphologischen Standpunkte aus verdauende Elemente in einem allgemeineren Sinne. Die Beziehungen zu den Verdauungsproteasen des Magendarmkanals in chemischer Hinsicht sind folgende: Pepsin und Trypsin spielen unter den par-enteralen Proteinasen nach dem bisher bekannten eine untergeordnete Rolle; dies wird verständlich unter dem Gesichtspunkte, daß die Pepsinwirkung an eine verhältnismäßig stark saure ( $pH$  Optim. 1,5—2) und Trypsin an eine alkalische ( $pH$  Optim. 8—9) gebunden ist. Hingegen scheint in den Geweben und Zellen vor allem das (in der Magenschleimhaut nur nebenbei wirksame) Kathepsin (*Willstätter* und *Bamann*) vertreten zu sein, welches — wie das ihm verwandte (oder gleiche?) Papain der Pflanzen — im schwach sauren bis neutralen Gebiete ( $pH$  = 4—7) wirksam ist. Man faßt die beiden zuletzt genannten unter der Benennung

<sup>1</sup> Ausgeführt mit Mitteln der *E. Goldmann*-Stiftung.

*Papainasen* zusammen. Wir treffen, sagt *Grassmann* in der neuesten kritischen Übersicht über das Gebiet der proteolytischen Enzyme, die *Papainasen* überall da, wo es sich nicht um sezernierte Proteinase, sondern um endocelluläre Eiweißverdauung handelt. *Papain* und *Kathepsin* sind demnach die typischen Proteinase der pflanzlichen und tierischen *Zelle*. Auf feinere Einzelheiten, wie die Frage der Beimengung von *Erepsin* zu den geweblichen Proteasen (*Waldschmidt-Leitz*) wollen wir hier nicht eingehen. Lediglich weil wir bei den folgenden Untersuchungen auch auf den Gehalt der in Umbau begriffenen Gewebe auf Dipeptidase geachtet haben, sei für den diesen Fragen Fernerstehenden bemerkt, daß sie berücksichtigt wurde, weil sie (zu den *Ereptasen* gehörig) die Hydrolyse der Dipeptide bewirkt und weil bei Fragen der örtlichen tiefen Histolyse das Verhalten der gegen diese niedersten Eiweißabbauprodukte gerichteten Enzyme von großem Belang sein könnte.

Der Gewebsabbau, der eine bedeutende Rolle bei krankhaften Vorgängen, wie bei der Heilung von Wunden und bei der Entzündung spielt, hat, wie *Rössle* (Referat über Entzündung 1923) ausgeführt hat, sein physiologisches Vorbild in jenem geweblichen Geschehen, das zur Vernichtung und zum Ersatz von Körperteilen bei den im Tierreich, z. B. bei Manteltieren, Stachelhäutern, Insekten, Amphibien, weit verbreiteten Metamorphosen führt. Bei diesen vereinigen sich celluläre und humorale Prozesse, wie in den entzündeten Geweben höherer Tiere und des Menschen, aber doch in einer weniger verwickelten Weise und oft so, daß die Histolysen bald mehr oder ausschließlich durch Säfte, bald mehr oder überwiegend durch Tätigkeit von cellulären Fermentträgern bewirkt erscheinen.

In einer Arbeit von *H. Bredt* (erschienen im Archiv für Entwicklungsmechanik 1933 129) wurde auf Veranlassung von Prof. *Rössle* der Versuch gemacht, mit morphologischer Methode zu entscheiden, wie diese verschiedenartigen Vorgänge bei der Rückbildung des Kaulquappenschwanzes sich folgen und zusammenwirken, wenn durch Thyroxin die Metamorphose zum Frosch beschleunigt und so die physiologische Entzündung gesteigert wurde.

Meine Arbeit stellt gewissermaßen die Paralleluntersuchung zu derjenigen von *H. Bredt* dar. Die morphologische Prüfung der Frage in Paraffinschnitten läßt kein Urteil über das Vorhandensein und die Art der gewebsauflösenden Stoffe zu; aber die Anwendung der heutigen Fermentmethoden auf die verschiedenen Stadien der Kaulquappenmetamorphose ließ eine Aufklärung über die Natur der dabei wirksamen Säfte erhoffen. Ich erfreute mich dabei des Rates und der Unterstützung von Herrn Prof. *Rona*, dem ich dafür an dieser Stelle meinen besten Dank aussprechen möchte.

Da uns keine übereinstimmende Angaben über die proteolytischen Fermente bei *Rana temporaria* vorlagen, mußten wir zuerst eigene Untersuchungen anstellen. Wir beschränkten uns auf die Prüfung des Vorhandenseins von Trypsin, Pepsin, *Kathepsin* und Dipeptidase. Durch Gegenüberstellung der Werte der einzelnen Fermente bei verschiedenen Stadien der Metamorphose konnten wir unsere Vermutungen über den

Zusammenhang des Kathepsinbildes mit dem Metamorphosenzustand bestätigen, was uns von allgemeinem Interesse zu sein scheint.

### Material und Methode.

Als Untersuchungsobjekt diente uns *Rana temporaria*. Wir teilten ihre Entwicklungsstufen nach dem Stadium der Metamorphose in drei Gruppen ein:

1. Kaulquappen vor der Metamorphose (mit Schwanz, ohne Beine).
2. Kaulquappen im Stadium der Metamorphose (mit ausgebildeten, durchgebrochenen Hinterbeinen).
3. Ganz junge Frösche (Vollendung der Metamorphose).

Um nachprüfen zu können, ob während der Metamorphose in den im Abbau oder im Anbau begriffenen Teilen eine Anreicherung von Fermenten stattfindet, wurden für jede Gruppe zwei Versuchsreihen durchgeführt. In einer Reihe verarbeiteten wir die Tiere in toto, in der zweiten Reihe teilten wir den Schwanz, die Hinter- und Vorderbeine vom Körper ab und untersuchten die einzelnen Abschnitte getrennt. Die Tiere wurden, um möglichst natürliche Verhältnisse vorzufinden, frisch gefangen oder spätestens am nächsten Tage getötet und verarbeitet. Da wir das Material nicht sofort weiterverarbeiten konnten, haben wir es zwecks Konservierung teils zu Pulver, teils zu Glycerinextrakt verarbeitet. Die Tiere, aus denen Pulver bereitet werden sollte, wurden mit Aceton getötet, dann geteilt oder ungeteilt mit der Schere zerstückelt und im Mörser möglichst fein zerrieben oder, je nach der Menge, in der Latapiepresse durchgepreßt. Dann wurde nach dem Verfahren von *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz* für die Bereitung von Trockenpulver aus Pankreas eine halbe Stunde mit der sechsfachen Menge Aceton kräftig geschüttelt, eine Stunde stehen gelassen, dann filtriert, der Filtrückstand von neuem und in der gleichen Weise mit Aceton, dann mit der sechsfachen Menge Acetonäther (1:1) und dann zweimal mit der sechsfachen Menge Äther gewaschen. Das körnige und pulverige Material wurde zwischen den Fingern zerrieben und im Dunkeln in dünner Schicht zwischen Filtrierpapier ausgebreitet und an der Luft getrocknet. Da wir trotz jeweiliger Verwendung einer großen Anzahl gleichartiger Tiere selbstverständlich nur kleine Pulvermengen von 0,1—12 g bekamen, begnügten wir uns damit, das Pulver im Mörser möglichst fein zu zerreiben. Dieses Pulver wurde in braunen Stöpselflaschen im Eisschrank aufbewahrt.

Für den Glycerinauszug töteten wir die Tiere durch Einfrierenlassen mit Kohlendioxydschnee. Dazu wurde das Fangnetz mit einer kleinen Menge von Kaulquappen durch Abtropfenlassen und Betupfen mit Zellstoff möglichst vom Wasser befreit und in ein kleines Glas getan. Die einzelnen Gläschen stellten wir dann in eine Krystallisierschale mit Kohlendioxydschnee (um den Kohlendioxydschnee nicht so schnell abdunsten

zu lassen, stellten wir die Krystallisierschale in eine größere, die mit Zellstoff umlegt war und bedeckten auch das Ganze mit einer Zellstoffschicht. Der Schnee hielt sich dann gut 3—4 Stunden). Nach etwa 5 Min. trat der Tod ein. Jetzt wurden die Tiere entweder in toto in der Latapiepresse gemahlen oder aufgetaut, geteilt und die einzelnen Teile für sich in der Latapiepresse oder bei kleinen Mengen im Mörser zerrieben. Um das Zerreiben mit dem Mörser zu erleichtern, wurde der Mörser mit dem Material in Kohlensäureschnee gestellt, bis die Masse fest wurde. Die so erhaltene Masse wurde dann im *Faust-Heim*-Gerät bei Zimmertemperatur 1—2 Stunden getrocknet. Dann wurde mit Glycerin verrieben. Die Menge des Glycerins wurde jeweils so gewählt, daß auf 1 ccm Extrakt 0,01 g Trockensubstanz der Tiere kam. Das Trockengewicht der Tiere konnte bei der Bereitung von Pulver ermittelt werden. Wir verstehen also unter Trockensubstanz entwässerte und entfettete Tiere. Der Glyceringehalt des Extraktes blieb immer über 80%. Der so hergestellte Glycerinextrakt wurde mit der Hand durchgeschüttelt und für 4 Stunden im Thermostaten bei 30° bei nur zeitweisem (jede halbe Stunde), kurzem und kräftigem Schütteln aufbewahrt. Der Auszug wurde in braune Stöpselflaschen umgefüllt und im Eisschrank aufbewahrt.

Um Durchschnittsergebnisse zu erhalten, und um genügend Material, vor allem in der Versuchsreihe mit den einzelnen Teilen, zu haben, wurden sehr große Mengen verarbeitet. Zu jedem Versuch nahmen wir 500—1500 Kaulquappen oder 50—100 Frösche. Insgesamt wurden für das erste Stadium etwa 9000, für das zweite Stadium etwa 4000 Kaulquappen und für das dritte Stadium etwa 600 Frösche verarbeitet.

Mit diesem Material wurden dann die einzelnen Prüfungen auf Dipeptidase, Pepsin, Trypsin und Kathepsin durchgeführt.

### Bestimmung der Dipeptidase.

Die Dipeptidase wurde nach *Waldschmidt-Leitz* geprüft. 0,1320 g Glycylglycin oder 0,1882 g Leucylglycin (0,001 Mol.), hergestellt nach *E. Fischer*, werden in 5,00 ccm 0,2 Mol. Phosphatpuffer von  $p_H$  7,8 aufgelöst. Die Lösung wird durch Zugabe von 1,80 ccm (diese Menge wurde durch einen Vorversuch nach Zugabe des Fermentes ermittelt) 0,2 n Natriumhydroxyd auf  $p_H$  7,8 gebracht. (Die Wasserstoffionenkonzentrationen wurden in dieser Arbeit nach der elektrometrischen Methode mit dem Ionometer *Lautenschläger* gemessen.) Nun wurde 1 ccm des Glycerinextraktes oder 0,1 g des Trockenpulvers hinzugefügt, mit destilliertem Wasser auf 10,0 ccm aufgefüllt und für die Versuchsdauer im Ostwaldbad bei 30° stehen gelassen. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde die Fermentwirkung durch Eintragen in 130 ccm Methylalkohol unterbrochen und 20 ccm Wasser hinzugefügt, um den Gehalt an Methylalkohol auf 85% zu bringen. Die Lösung wurde mit 1,0 ccm 0,5%iger alkoholischer Thymolphthaleinlösung versetzt, und mit 0,2 n 90%igem

Kaliumhydroxyd (100 ccm 2 n-Kaliumhydroxyd mit absolutem Alkohol auf 1 l gebracht) titriert. Zu jeder Bestimmung wurde eine Leeraanalyse ausgeführt, deren Alkaliverbrauch von dem Hauptversuch abzuziehen ist. Diese Kontrollbestimmung wurde genau wie die Hauptanalyse ausgeführt, nur daß hier das Ferment erst vor dem Titrieren nach dem Eintragen des Methylalkohols zugefügt wurde.

Um Zahlen möglichst weit außerhalb der Fehlergrenzen zu erhalten, haben wir in einer großen Versuchsreihe verschiedene Reaktionszeiten von 20 Min. bis zu 72 Stunden (auch bei längerer Reaktionszeit übersteigt die Spaltung des Dipeptids nie die Grenze von 60%) ausprobiert. Die Reaktionsdauer von 24 Stunden wurde am geeignetsten gefunden. Hier liegt der Aciditätswert gegenüber der Kontrolle außerhalb jeder Fehlergrenze.

Die Versuchsreihe mit Glycerinextrakt ergab Zahlen derselben Größenordnung wie die Versuchsreihe mit Trockenpulver. Da aber bei dem Glycerinextrakt die einzelnen Bestimmungen in demselben Versuch besser übereinstimmten, geben wir nur die Versuche mit Glycerinextrakt an.

*Einige Beispiele.* Aciditätszuwachs gegenüber der Leeraanalyse in Kubikzentimeter 0,2 n-NaOH ausgedrückt. Versuchsdauer 24 Stunden.

Gruppe I. (vor der Metamorphose).	Gruppe II. (während der Metamorphose).	Gruppe III. (nach der Metamorphose).
	<i>Tiere in toto.</i>	
Versuch 4 0,7 ccm	Versuch 7 0,93 ccm	Versuch 30 1,6 ccm
	<i>Geteilte Tiere.</i>	
	<i>Leiber.</i>	
Versuch 3 2,03 ccm	Versuch 16 1,62 ccm	Versuch 29 2,27 ccm
Versuch 17 1,47 ccm		
	<i>Schwänze.</i>	
Versuch 3 1,51 ccm	Versuch 16 1,09 ccm	
Versuch 17 0,5 ccm		
	<i>Hinterbeine.</i>	
	Versuch 16 1,19 ccm	Versuch 29 0,87 ccm
	<i>Vorderbeine.</i>	
		Versuch 29 1,04 ccm

Wie man aus den oben angegebenen Zahlen sehen kann, zeigte sich überall eine deutliche Dipeptidasewirkung. Diese Wirkung ist verschieden groß. Es läßt sich aber kein bestimmter Zusammenhang der Fermentwirkung mit dem Stadium der Metamorphose feststellen. Die Schwankungen zwischen den Versuchen aus demselben Stadium der Metamorphose sind so groß, daß sie die Unterschiede bei verschiedenen Stadien der Metamorphose decken.

Was die Fermentwirkung in den verschiedenen Teilen des Körpers anbetrifft, so zeigt sich in beinahe allen Versuchen, der Erwartung entsprechend, daß die Fermentwirkung der Extrakte aus den Leibern diejenige der Glieder stark übertrifft.

### Bestimmung des Pepsins.

Als Substrat wurde 6%ige Caseinlösung verwendet (6 g Casein *Hammerstein* in 64 ccm Wasser aufgeschwemmt und unter Zutropfen von 36 ccm 0,1 n-NaOH gelöst). Zu 5 ccm dieser Lösung wurden 1 ccm des Glycerinextraktes oder 0,1 g des Trockenpulvers zugefügt und mit 5 ccm  $\frac{1}{3}$  n-Salzsäure versetzt. Dann wurde das Reaktionsgemisch im Ostwaldbad bei 30° für die Versuchsdauer stehen gelassen.

Die Bestimmung des Reaktionsverlaufes wurde nach *Lindenström-Lang* verfolgt. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde die Reaktion mit 20 ccm Aceton unterbrochen. Nach Zugabe von weiteren 15 ccm Aceton und 10 Tropfen Naphthylrotlösung (0,1 %ige alkoholische Lösung) wurde mit 0,2 n 90%igem alkoholischem Kaliumhydroxyd bis zur Farbe der Kontrolllösung I titriert, dann 65 ccm Aceton im dicken Strahl und unter kräftigem Umrühren zugesetzt und bis zur Farbe der Kontrolllösung II zu Ende titriert.

Kontrolllösung I. 10 ccm Wasser + 35 ccm Aceton + 10 Tropfen Naphthylrot + 0,5 ccm 0,1 n 90%iger alkoholischer Salzsäure.

Kontrolllösung II = Kontrolllösung I + 65 ccm Aceton.

Zu jedem Versuch wurde eine Leeranalyse ausgeführt (Zugabe des Fermentes erst nach der Zugabe von 20 ccm Aceton bei sonst genau gleicher Versuchsanordnung).

Da die ersten Versuche negative Resultate ergaben, wurde die Versuchsdauer bis auf 5 Tage, die Extraktmenge bis auf 5 ccm erhöht. *Es konnte auch jetzt kein Pepsin nachgewiesen werden.*

*Einige Beispiele.* Die Zahlen geben Kubikzentimeter 0,2 n-KOH an.

Gruppe I.	Gruppe II.	Gruppe III.
	<i>Tiere in toto.</i>	
Versuch 4	Versuch 7	Versuch 30
(48 Std. 1 ccm) 0,10 ccm	(19 Std. 1 ccm) 0,05 ccm	(120 Std. 1 ccm) 0,02 ccm
(48 Std. 3 ccm) 0,05 ccm		( 48 Std. 5 ccm) 0,07 ccm
	<i>Tierleiber.</i>	
Versuch 3	Versuch 16	Versuch 29
( 48 Std. 1 ccm) 0,04 ccm	(22 Std. 3 ccm) 0,06 ccm	(48 Std. 1 ccm) 0,07 ccm
(120 Std. 1 ccm) 0,02 ccm		

Wie wir sehen, liegen die Werte ausnahmslos innerhalb der Fehlergrenze.

### Bestimmung des Trypsins.

Zur Prüfung auf Trypsin wurde die Methode von *Willstätter*, *Waldschmidt-Leitz*, *Dinauturria* und *Künstner* gewählt. Die für die Aktivierung

des Trypsins notwendige Enterokinase wurde nach *Waldschmidt-Leitz* nachgeprüft und die Wirksamkeit mit Pankreastrocknenpulver (hergestellt nach *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz*). Aktivitätszuwachs bei Zugabe von 0,3 ccm Enterokinase auf 0,1 g Pankreastrocknenpulver etwa 2 ccm 0,2 n-NaOH.

0,3 ccm dieser Enterokinase wurden in ein Zylinder Glas von 25 ccm hineinpipettiert, dann 1 ccm Glycerinauszug oder 0,1 g Trockenpulver zugegeben, und mit destilliertem Wasser auf 3 ccm aufgefüllt. Nach 20 Min. Aktivierung bei 30° im Ostwaldbad wurde mit 2 ccm Ammoniak-Ammoniumchloridpuffer (Normallösungen 1:1) auf einen  $p_H$  von 9,5 gebracht und 5 ccm 6%iger Caseinlösung (hergestellt wie bei den Pepsinversuchen angegeben) zugefügt, und dann für die Versuchsdauer wieder im Ostwaldbad bei 30 stehen gelassen. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde der Inhalt des Zylinders mittels 5 ccm destilliertem Wasser quantitativ in einen 300 ccm *Erlenmeyer*-Kolben hinübergespült und mit 15 ccm Alkohol die Reaktion abgebrochen. Darauf wurden 2 ccm 0,5%ige alkoholische Thymolphthaleinlösung zugegeben, und mit 0,2 n alkoholischer NaOH bis zu schwach grünlicher Färbung titriert. Nach der Zugabe von weiteren 120 ccm siedenden Alkohols wurde die Titration zu Ende geführt. Für jeden Versuch wurde gleichzeitig eine Leerbestimmung mit Fermentzugabe nach dem Eintragen von Alkohol bei sonst denselben Bedingungen ausgeführt.

*Einige Beispiele.* Die Zahlen geben Kubikzentimeter 0,2 n-KOH an.

Gruppe I.	Gruppe II.	Gruppe III.
	<i>Tiere in toto.</i>	
Versuch 4	Versuch 7	Versuch 30
(48 Std. 1 ccm) 0,70 ccm	(48 Std. 1 ccm) 0,66 ccm	(48 Std. 1 ccm) 0,06 ccm
	(72 Std. 1 ccm) 0,90 ccm	(72 Std. 1 ccm) 0,12 ccm
		(48 Std. 2 ccm) 0,06 ccm
		(48 Std. 3 ccm) 0,15 ccm
		(48 Std. 4 ccm) 0,10 ccm
		(72 Std. 4 ccm) 0,07 ccm
	<i>Leiber.</i>	
Versuch 3	Versuch 7	Versuch 29
(48 Std. 1 ccm) 1,23 ccm	(18 Std. 1 ccm) 0,75 ccm	(18 Std. 1 ccm) 0,37 ccm
	(48 Std. 1 ccm) 0,95 ccm	(48 Std. 1 ccm) 0,57 ccm
		(72 Std. 1 ccm) 0,68 ccm
		(72 Std. 2 ccm) 0,85 ccm
	<i>Schwänze.</i>	
Versuch 3	Versuch 16	
(48 Std. 1 ccm) 0,02 ccm	(18 Std. 1 ccm) 0 08 ccm	
(72 Std. 1 ccm) 0,05 ccm	(48 Std. 1 ccm) 0,05 ccm	
	<i>Hinterbeine.</i>	
	(18 Std. 1 ccm) 0,19 ccm	(18 Std. 1 ccm) 0,08 ccm
	(48 Std. 1 ccm) 0,25 ccm	(48 Std. 1 ccm) 0,04 ccm
		(72 Std. 1 ccm) 0,12 ccm

*Vorderbeine.*

Versuch 29
(18 Std. 1 ccm) 0,08 ccm
(48 Std. 1 ccm) 0,08 ccm
(72 Std. 1 ccm) 0,02 ccm

In den ersten zwei Gruppen konnte, wie wir sehen, eine deutliche und ziemlich gleichmäßige Trypsinwirkung nachgewiesen werden. In der dritten Gruppe, bei den jungen Fröschen, fanden wir, trotz zahlreichen Versuchen auch mit der vierfachen Extraktmenge und 72stündigen Versuchsdauer nur sehr kleine Mengen von Trypsin in den Leibern. Die Beine und der Schwanz aller drei Gruppen enthielten kein Trypsin.

**Bestimmung des Kathepsins.**

Zur Prüfung auf Kathepsin wurden 5 ccm des Glycerinextraktes mit 5 ccm Wasser verdünnt, etwa eine halbe Stunde Schwefelwasserstoff durchgeleitet, dann mit 5 ccm Essigsäure-Natriumacetatpuffer (1:1) auf pH 4,7 gebracht und 5 ccm 8%ige Gelatinelösung bei 30° unter Toluol aufbewahrt zugegeben, alles gut durchgeschüttelt, zugestöpselt und für die Versuchsdauer bei 30° im Ostwaldbad stehen gelassen. Nach einer großen Versuchsreihe wurde die Versuchszeit von 72 Stunden als die günstigste gewählt. Bei jeder Messung wurde 1 ccm des Reaktionsgemisches = 0,25 des Glycerinauszuges verwendet (0,25 ccm des Glycerinauszuges entspricht 0,0025 mg Trockensubstanz). Der Druck des entstandenen Stickstoffs wurde bei einem Volumen von 2 ccm gemessen. Zu jeder Bestimmung wurde ein Kontrollversuch bei genau denselben Bedingungen ausgeführt, nur wurde hier das Ferment durch 5 Min. langes Erwärmen im kochenden Wasser unwirksam gemacht.

*Einige Beispiele.* Fermentwirkung von 0,25 ccm Glycerinextrakt in Milligramm Stickstoff. Die totale Hydrolyse von 0,25 ccm 8%iger Gelatine mit HCl ergibt 3,0 mg N.

Gruppe I.	Gruppe II.	Gruppe III.
	<i>Tiere in toto.</i>	
Versuch 4 0,406 mg	Versuch 7 1,995 mg	Versuch 30 1,127 mg
	<i>Leiber.</i>	
Versuch 3 1,449 mg	Versuch 16 2,585 mg	Versuch 29 2,219 mg
	<i>Schwänze.</i>	
Versuch 30 0,267 mg	Versuch 16 0,406 mg	
	<i>Hinterbeine.</i>	
	Versuch 16 0,736 mg	Versuch 29 0,206 mg
	<i>Vorderbeine.</i>	
		Versuch 29 0,407 mg

Die Resultate sind ganz eindeutig. Die Kathepsinwirkung ist in allen drei Stadien der Metamorphose überaus stark. Sie erreicht ihren Höhepunkt in der zweiten Gruppe, in der dritten Gruppe nimmt sie eine



Mittelstellung ein, am schwächsten ist sie in der ersten Gruppe, doch auch hier noch sehr stark. Wir fanden auch eine deutliche Kathepsinwirkung in den Beinen und Schwänzen. Hier tritt aber die Kathepsinwirkung gegenüber den Leibern stark zurück.

### Zusammenfassung.

Die Gewebe der Kaulquappen wurden in verschiedenen Stadien der Metamorphose auf ihren Gehalt an eiweißspaltenden Fermenten untersucht.

Es ergab sich das Vorhandensein von Dipeptidase, Trypsin und Kathepsin. Die Versuche zum Nachweis einer Pepsinwirkung fielen negativ aus.

Die Trypsinwirkung war deutlich und ziemlich gleichmäßig in den Stadien der Prometamorphose und der Metamorphose. In dem Stadium der Vollendung der Metamorphose (bei jungen Fröschen) wurde nur eine sehr schwache Trypsinwirkung festgestellt. Beine und Schwanz aller drei Gruppen enthielten kein Trypsin.

Am ausgeprägtesten war die Kathepsinwirkung. Sie war in allen drei Stadien der Metamorphose und in allen einzelnen Teilen (Leiber, Beine und Schwänze) überaus stark. Die relativ kleinsten Werte zeigte die Kathepsinwirkung in dem Stadium vor der Metamorphose. Sie erreichten während der Metamorphose ihren Höhepunkt und sanken nach Vollendung der Metamorphose, so daß hier die Werte eine Mittelstellung gegenüber den Werten bei den ersten zwei Stadien einnehmen.

Es ergab sich ferner in allen drei Stadien der Metamorphose und in allen einzelnen Körperteilen eine deutliche Dipeptidasewirkung.

Daß die Fermentwirkung sich in den Leibern als höher herausstellte wie in den Gliedmaßen war von vornherein zu erwarten, da die Leiber die Verdauungsorgane enthielten. Es ist aber wohl möglich, daß, wenn wir die Fermentwirkung der Verdauungsorgane ausschalten, die Bestimmung der Fermentwirkung der Gliedmaßen relativ größere Werte ergeben würde.

---