

sich bei der Hydrierung der Carbonylverbindungen deutlich eine größere Aktivität bemerkbar, als sie das reduzierte Kupfer besitzt. Mit diesem lassen sich Aldehyde und Ketone in der Gasphase erst oberhalb 200° langsam und infolge der dehydrierenden Wirkung des Cu nur unvollständig in Alkohole umwandeln. In flüssiger Phase soll sich Aceton gar erst bei 280—300° zu 65% in Isopropylalkohol verwandeln lassen. Mit aktivem Kupfer ergeben Aldehyde bei 125—150° Alkohole in Ausbeuten von 70—98%. Ketone lassen sich mit den gleichen guten Ausbeuten bei 95—125° reduzieren. Auf diesem Gebiet dürfte dem aktiven Kupfer eine präparative Bedeutung vor allem für die Hydrierungen empfindlicher Carbonylverbindungen zukommen, zumal bei Kupfer die spaltenden und kondensierenden Eigenschaften nicht in dem Maße ausgeprägt sind wie bei Nickel.

Da sich das reduzierte Kupfer auch für die Reduktion anderer Verbindungen wie Nitrokörper, Nitrile, Oxime, Säureamide, Carbonsäuren und deren Ester eignet, wäre eine Erweiterung der Untersuchungen von *Faucounau* mit aktivem Kupfer sehr zu begrüßen.

#### Raney-Kobalt.

Kobalt steht als Hydrierungskatalysator dem Nickel zwar schon sehr nahe, hat aber bis auf Spezialzwecke infolge seiner immer noch kleinen Aktivität kaum Verwendung gefunden. Es liegen anscheinend nur die wenigen Beobachtungen von *Sabatier* u. *Senderens* an Hydrierungen in der Gasphase vor, die dem Kobalt eine dem Nickel ähnliche aber schwächere Wirkung zuschreiben, eine Wirkung, die zudem schnell abklingt. Vergleiche zwischen diesen Ergebnissen von *Sabatier* und den mit *Raney-Kobalt* erhaltenen lassen sich nicht ziehen, da letztere ausschließlich aus Druckhydrierungen erhalten sind. *Faucounau* führt seine Versuche<sup>31)</sup> den Versuchen mit aktivem Kupfer entsprechend durch, d. h. mit einem Wasserstoffanfangsdruck von 100 at. Äthylenverbindungen gegenüber erweist sich das Kobalt als der aktivere Katalysator. Es veranlaßt die Wasserstoffanlagerung an endständige Doppelbindungen wie an solche in Ringen. Die Temperatur liegt für Allylalkohol bei 100°, für Cyclohexen bei 110° und für Pinen bei 140—150°. Limonen gibt bei 175° ein Gemisch von überwiegend Carvomenthen (Absättigung der externen Doppelbindung) und Paramenthan (beide Doppelbindungen hydriert). Bei 200° wird schließlich auch der Benzolkern hydriert. Carbonylverbindungen gegenüber zeigt *Raney-Kobalt* eine Aktivität, die der des Kupfers entspricht, d. h. sie werden bei Temperaturen wenig über 100° reduziert. So gibt Aceton bei 100—110° quantitativ Isopropylalkohol, Benzaldehyd zu 85% Benzylalkohol.

Diese Angaben von *Faucounau* bedürfen wahrscheinlich einer Korrektur, da *Dupont*<sup>32)</sup> zeigen konnte, daß das Kobalt

<sup>31)</sup> Bull. Soc. chim. France (5) 4, 63 [1937].

von *Faucounau* durch Schlacken verunreinigt war und daß nach der Reinigung Limonen schon bei 140° und 25 atü reduziert wird. Gegen *Raney-Nickel*, das Limonen schon bei Zimmertemperatur und unter normalem Druck reduziert, ist die Wirkung immer noch mäßig. Mit aktivem Kobalt Reduktionen unter normalen Bedingungen durchzuführen, hat praktisch wenig Wert.

Auf ein Gebiet, in dem dem aktiven Kobalt eine praktische Bedeutung zukommt, ist durch das Amer. Pat. 2166183 von *Du Pont* hingewiesen. *Du Pont* verwendet hier das Co zur Reduktion von Dinitrilen und erhält in ausgezeichneten Ausbeuten die di-primären Amine. Bei 75—150 at und 120° entstehen in Gegenwart von Ammoniak in Ausbeuten von etwa 97% z. B. das 1,6-Diamino-hexan, 1,7-Diamino-heptan usw. bis 1,10-Diamino-decan aus den dazugehörigen Dinitrilen. Selbst ohne NH<sub>3</sub> werden 87% Diamin erhalten. Diese letzteren Ausbeuten lassen sich mit Ni nicht erzielen, da Nickel bei der Hydrierung von Nitrilen die Bildung von sekundären und tertiären Aminen ganz allgemein begünstigt. (Eine Ausnahme machen einige rein aromatische Nitrile.) Um mit Nickel brauchbare Ausbeuten an primären Aminen zu erhalten, muß in Gegenwart von Ammoniak oder Ammonsalzen gearbeitet werden<sup>32)</sup>. *Raney-Kobalt* wird ganz allgemein bei allen Hydrierungen, bei denen primäre Aminogruppen entstehen sollen, dem Nickel vorzuziehen sein, so außer bei der Reduktion von Nitrilen bei der Reduktion von Oximen und der katalytischen Anidierung von Carbonylverbindungen. Das reduzierte Kobalt ist für diese Reduktionen nicht aktiv genug.

#### Raney-Nickel.

Es gibt wohl kaum eine Klasse irgendwie ungesättigter Verbindungen, zu deren Hydrierung nicht schon *Raney-Nickel* verwendet worden ist. Eine Erfassung sämtlicher Angaben über die Verwendung von *Raney-Nickel* als Hydrierungskatalysator ist schwierig, da *Raney-Nickel* als Begriff in den Inhaltsverzeichnissen der chemischen Zeitschriften nur ungenügend berücksichtigt ist, bei den Referenzzeitschriften oft sogar in den Referaten fehlt. Neben Arbeiten, die sich mit Hydrierungen speziell an *Raney-Nickel* befassen, gibt es zahlreiche Einzelangaben über die Verwendung dieses Katalysators zu präparativen Zwecken. Eine Übersicht über amerikanische Arbeiten vorwiegend aus *Adkins'* Laboratorium gewinnt man aus der 1937 erschienenen Abhandlung von *Homer Adkins*: „Reactions of Hydrogen with Organic Compounds over Copper-Chromium Oxide and Nickel-Catalysts.“

Da diese Abhandlung in Deutschland nur wenig verbreitet sein dürfte, wird, soweit im folgenden daraus Angaben entnommen sind, auf die Originalarbeit verwiesen.

<sup>32)</sup> *Mignonnac*, Brit. Pat. 282 083.

Eingeg. 16. September 1940. (Schluß folgt.) [A. 98].

## Mucinspaltende Fermente

Von Dr. KURT WALLENFELS

Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, Institut für Biologie

#### Die Substrate.

Der Name Mucin wurde ursprünglich allen Substanzen gegeben, die aus tierischen Körperteilen und -flüssigkeiten erhalten wurden und sich durch die hohe Viskosität ihrer Lösungen auszeichneten. Sie wurden gewonnen aus der Gelenkflüssigkeit<sup>1)</sup>, dem Glaskörper des Auges<sup>2)</sup>, den Schleimdrüsen im Mund<sup>3)</sup>, Magen<sup>4)</sup> und Darm<sup>5)</sup>. Als man ihren chemischen Bau näher kennenlernte, sah man, daß noch andere Substanzen in die gleiche Klasse von Verbindungen zu rechnen sind: die Kapselsubstanzen von verschiedenen Bakterien<sup>6)</sup>, die für die Blutgruppe A spezifische Substanz<sup>7)</sup>, die Mucoide aus Eiweiß<sup>8)</sup> und Serum<sup>9)</sup>, die spermaagglutinierende Substanz aus See-

igeliern<sup>10)</sup> (Fertilisin von *Lillie*), Globuline aus Serum<sup>11)</sup> und Schilddrüse<sup>12)</sup>, ferner die schwefelsauren Mucoide aus Knorpel, Auge und Nabelschnur<sup>13)</sup>. Dieser Gruppe gehört auch das Heparin an<sup>14)</sup>, das im Körper die Blutgerinnung verhindert.

Im allg. werden die Mucine als Eiweißkörper angesehen, und auch im Generalregister des Chemischen Zentralblattes erscheinen sie als Untergruppe der Proteine. Dies ist aber nur bedingt richtig. Ihr chemischer Aufbau zeigt, daß man sie genau so gut oder besser zu den Polysacchariden rechnen könnte, denn für ihre kennzeichnende Eigenschaft, hochviscose Lösungen zu bilden, ist gerade der Polysaccharidanteil verantwortlich. Es sollen als hierher gehörig alle jene hochmolekularen Substanzen betrachtet werden, die sich aus Zuckern, Zuckersäuren, Aminosackern und u. U. Aminosäuren zusammen-

<sup>1)</sup> G. v. Holst, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 43, 145 [1904].  
<sup>2)</sup> C. Th. Möner, ebenda 18, 244 [1894]. <sup>3)</sup> O. Hammarsten, ebenda 12, 163 [1888].  
<sup>4)</sup> P. A. Levene: Hexosamine and Mucoproteins, New York 1925.  
<sup>5)</sup> Wie <sup>4)</sup> und H. W. Florey u. H. E. Harding, J. Pathol. Bacteriology 39, 255 [1934].  
<sup>6)</sup> W. T. I. Morgan, Helv. chim. Acta 21, 469 [1938]; M. Heidelberger u. P. E. Kendall, J. exp. Medicine 53, 625 [1931].  
<sup>7)</sup> K. Freudenberg u. O. Westphal, Sb. Heidelberger Akad. 1938, 1. Abhandlung; F. Schiff, Die Blutgruppensubstanzen, Jena 1931.  
<sup>8)</sup> P. A. Levene u. T. Mori, J. biol. Chemistry 84, 49 [1929]; P. A. Levene u. A. Rothen, ebenda 84, 63 [1929]; E. G. Young, ebenda 120, 1 [1937]; K. Meyer, R. Thompson, I. W. Palmer u. D. Khorazo, ebenda 113, 303 [1936].  
<sup>9)</sup> L. F. Hewitt, Biochemical J. 30, 2229 [1936]; 31, 360, 1047, 1534 [1937]; 32, 26 [1938].

<sup>10)</sup> R. Kuhn u. K. Wallenfels, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 458 [1939]; K. Wallenfels, Österr. Chemiker-Ztg. 43, 187, [1940].  
<sup>11)</sup> H. Bierry, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées 116, 702 [1934].  
<sup>12)</sup> Stockinger u. M. Heidelberger bei K. Meyer, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. 6, 100 [1938].  
<sup>13)</sup> C. T. Möner, Skand. Arch. Physiol. 1, 210 [1889]; P. A. Levene: Hexosamine und Mucoproteins, New York 1925; O. Fürth u. T. Bruno, Biochem. Z. 294, 153 [1937].  
<sup>14)</sup> E. Jorpes u. S. Bergström, J. biol. Chemistry 118, 447 [1937].

setzen. Man kann zwei Hauptgruppen von Verbindungen unterscheiden: die Mucopolysaccharide und Glucoproteine<sup>15)</sup>. Zur ersten Gruppe gehören die eigentlichen Mucine und Mucoide. Sie kommen in der Natur als freie Polysaccharide oder als Proteinsalze von solchen vor. Die zur zweiten Gruppe gehörenden Verbindungen sind Polypeptide, in denen Hexosaminhaltiges neutrales Polysaccharid fest verknüpft zu sein scheint. Die Mucopolysaccharide sind sauer oder neutral, die sauren enthalten Uronsäure und z. T. außerdem Schwefelsäure, die neutralen Glucosamin bzw. Acetylglucosamin und außerdem z. T. Aminosäuren. Tab. 1 zeigt das Vorkommen von Mucinen und mucinähnlichen Substanzen, angeordnet nach ihrem chemischen Aufbau.

Tabelle 1.

Mucopolysaccharide			Glycoproteine
sauer		neutral	
sulfatfrei	sulfathaltig		
Glaskörper des Auges	Chondroitinschwefelsäure	Chitin	Ovomucoid
Nabelschnur	Mucoitinschwefelsäure	Bakterienpolysaccharide	Serummucoïd
Synovialflüssigkeit	(Magen- und Corneamucin, Knorpel und Sehnen)		Globuline (Eiweiß, Serum, Schilddrüse)
Gruppe A. hämolytischer Streptokokkus	Heparin		Schweinemagen Blutgruppe A Fertilisin
Hühnersarkom			

Im nativen Mucin ist das saure Polysaccharid mittels der Carboxylgruppen der in ihm enthaltenen Uronsäuren an die basischen Aminogruppen eines Polypeptids gebunden. Diese Salze fallen bei einem  $p_H$ -Wert aus, der saurer ist als der isoelektrische Punkt des Proteins. Sie dissoziieren bei neutraler oder alkalischer Reaktion insbes. in Gegenwart von Neutralsalzen. Von diesen Eigenschaften macht man Gebrauch bei der Gewinnung von Mucinen. Die mucinhaltige Lösung wird mit Essigsäure versetzt. Das Mucin fällt als zähe, fadenförmige Masse aus, die sich um einen Glasstab wickeln läßt und so aus der Lösung entfernt werden kann. Zur weiteren Reinigung wird in verd. Ammoniak gelöst. Fügt man nun Ammonsulfat bis zur Halbsättigung zu, so fällt das Protein aus. Die aminosäurefreie Polysaccharidsäure kann man aus der Lösung nach dem Herausdialysieren des Salzes mit Alkohol fällen. Sie besteht aus äquimolaren Mengen Hexosamin, Hexuronsäure und Acetyl, offenbar aus Acetyl-d-glucosamin und Glucuronsäure. K. Meyer, E. M. Smyth und M. H. Dawson haben der Polysaccharidsäure, die sie aus Synovialflüssigkeit, Nabelschnur, Glaskörper und Gruppe A hämolytischem Streptokokkus dargestellt haben, den Namen Hyaluronsäure gegeben<sup>16)</sup>. Die gleiche Substanz wurde von Kabat<sup>17)</sup> aus Hühnersarkom dargestellt. Vielleicht ist sie identisch mit dem Hyaloidin, das von Schmiedeberg<sup>18)</sup> aus verschiedenen Mucinen isoliert wurde und das nach seinen Angaben bei der Hydrolyse Glucosamin, Hexose und Essigsäure in äquimolaren Mengen lieferte. Bei der Hydrolyse von sulfathaltigen Mucinen erhält man Glucosamin bzw. Chondrosamin, Glucuronsäure, Essigsäure und Schwefelsäure<sup>19)</sup>. Glucoproteine geben bei der Hydrolyse außer den normalen Aminosäuren Glucosamin und Mannose bzw. Galaktose. Fränkel u. Jellinek<sup>19)</sup> konnten aus kristallisiertem Eieralbumin durch vorsichtige Hydrolyse ein stickstoffhaltiges Polysaccharid isolieren, das polymere Glucosamin-Mannose war. Allen genannten Substanzen ist also der Gehalt von Glucosamin gemeinsam.

### Die Fermente.

Es ist bisher nicht sicher bekannt, in welcher Weise die einzelnen Bausteine in den Mucoiden und Mucinen verknüpft sind. Weder Emulsin noch Amylase oder Takadiastase greifen sie an. Ebenso wenig vermögen Peptidasen sie zu hydrolysieren. Es wurde jedoch gefunden, daß das autolytische Enzym von Pneumokokken Mucin aus Synovialflüssigkeit und Nabelschnur hydrolysiert (Meyer, Dubos, Smyth<sup>20)</sup>). In der Folge wurden von Meyer u. Mitarb.<sup>21)</sup> noch andere Bakterienenzyme unter-

sucht und gefunden, daß ebensolche Enzyme aus Streptococcus hämolyticus, Clostridium Welchii zu gewinnen sind. Das  $p_H$ -Optimum des Enzyms liegt bei 5,8, es wird bei 60–65° inaktiviert. Gegenüber den schwefelsauren Mucoiden, Mucoitinschwefelsäure und Chondroitinschwefelsäure sind diese Enzyme unwirksam. Eine wesentliche Vorwärtswirkung der Kenntnisse über die mucinspaltenden Fermente trat ein, als Chain u. Duthie Ende 1939<sup>22)</sup> erkannten, daß der sog. „spreading factor“, eine die Permeabilität der Capillaren steigernde Substanz aus Säugetiersperma, eine Mucinase ist. Der „spreading factor“ war in mehreren Arbeiten aus dem Lister-Institut<sup>23)</sup> genauer beschrieben worden, als Protein erkannt und bis zur Wirksamkeit in einer Verdünnung von  $10^{-8}$  angereichert. Die Wirksamkeit beruht darauf, daß er die Permeabilität der Haut erhöht, was man erkennen kann, wenn man ihn zusammen mit Farbstoffen in die Haut von Meerschweinchen injiziert. Der sich dann bildende Farbfleck wird viel schneller größer, als wenn man den Farbstoff allein einspritzt. Die Größe des nach einer bestimmten Zeit entstandenen Fleckes ist das Maß für die Wirksamkeit des Diffusionsfaktors. Die Eigenschaften des Faktors, Eiweißnatur und Hitzelabilität sprachen dafür, daß es sich um ein Ferment handelt. Als weitere Quellen für den Diffusionsfaktor wurden in der Folgezeit erkannt: Filtrate von Staphylokokkus und Streptokokkus<sup>24)</sup>, Organismen der Gasbrandgruppe und virulente Pneumokokken<sup>25)</sup>, Extrakte von malignen Geweben<sup>26)</sup>, Schnecken- und Spinnengifte<sup>27)</sup>, Blutegelextrakte<sup>28)</sup>. Bei der Suche nach dem entsprechenden Substrat fielen die normalen Proteine aus, da Trypsin keine diffusionssteigernde Wirkung besitzt. Da histologische Befunde<sup>29)</sup> für die Anwesenheit von Mucinen in der Interfibrillarsubstanz sprachen, wurde Mucin aus Synovialflüssigkeit als Substrat geprüft, und es wurden zwei Phänomene gefunden: 1. Die sehr hohe Viscosität fällt innerhalb 30 min auf den Betrag von Wasser ab. 2. Nach längerer Einwirkungszeit (18 h) wird das Mucin hydrolysiert, wobei N-Acetylglucosamin in Freiheit gesetzt wird. Der Verlauf der Hydrolyse kann colorimetrisch durch Bestimmung des in Freiheit gesetzten Glucosamins verfolgt werden<sup>30)</sup>. Ebenso kann man die Menge der gebildeten reduzierenden Substanz bestimmen. Tab. 2 zeigt den Verlauf einer enzymatischen Hydrolyse von Synovialmucin.

Tabelle 2<sup>31)</sup>.

Mengen reduzierender Substanz in  $\gamma$ , als Glucose berechnet, die in je 1 cm<sup>3</sup> enthalten waren (20 cm<sup>3</sup> Synovialflüssigkeit, 2 cm<sup>3</sup> Testikelextrakt, 37°).

0 h	34
0,5 h	32
1 h	65
2 h	105
4 h	158
6 h	192
18 h	274

Das Verhalten beim Fällen mit Essigsäure ändert sich ebenso wie die Viscosität nach kurzer Einwirkungszeit des Spermaextraktes. Das Mucin aus Synovialflüssigkeit, das anscheinend einen hohen Polymerisationsgrad besitzt, fällt beim Zusatz von Essigsäure als asbestähnliche Masse aus. Wenn man vorher 30 min Mucinase einwirken läßt, fällt es als flockiger Niederschlag. In den enzymatischen Hydrolysaten kann man außer Glucosamin noch Glucuronsäure qualitativ nachweisen.

### Die mucolytische Wirkung von Vitamin C und Azoproteinen.

Das Polysaccharid Hyaluronsäure kommt auch im Kammerwasser des Auges vor. Es ist hier jedoch nicht hochviscos, sondern offenbar depolymerisiert. Diese Depolymerisation wurde von Meyer u. Mitarb.<sup>32)</sup> auf die Wirkung eines Enzyms

<sup>22)</sup> Nature **144**, 977 [1939].

<sup>23)</sup> D. McClean, J. Pathol. Bacteriology **33**, 1045 [1930]; **34**, 459 [1931]; Madinaveitia, Biochem. J. **32**, 1806 [1938]; **33**, 347, 1470 [1939].

<sup>24)</sup> Duran-Reynals, J. exp. Medicine **58**, 161 [1933].

<sup>25)</sup> D. McClean, J. Pathol. Bacteriology **42**, 477 [1936].

<sup>26)</sup> Duran-Reynals u. Stewart, J. Amer. Cancer **15**, 2790 [1931]; E. Boyland u. D. McClean, J. Pathol. Bacteriology **41**, 553 [1935].

<sup>27)</sup> Duran-Reynals, J. exp. Medicine **69**, 69 [1939].

<sup>28)</sup> A. Claude, ebenda **66**, 353 [1937].

<sup>29)</sup> Bensley, Anatom. Rec. **60**, 95 [1934]; B. Sylén, Virchow's Arch. pathol. Anatom. Physiol. klin. Med. **303**, 280 [1939].

<sup>30)</sup> L. A. Elson u. W. T. J. Morgan, Biochem. J. **28**, 988 [1934].

<sup>31)</sup> E. Chain u. E. S. Duthie, Nature **144**, 977 [1939].

<sup>32)</sup> K. Meyer u. I. W. Palmer, Amer. J. Ophthalmol. **19**, 859 [1936].

<sup>15)</sup> K. Meyer, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. **6**, 91 [1938].

<sup>16)</sup> Science **88**, 129 [1938]; K. Meyer u. I. W. Palmer, J. biol. Chemistry **114**, 689 [1936].

<sup>17)</sup> Ebenda **130**, 143 [1939].

<sup>18)</sup> Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **87**, 1 [1920].

<sup>19)</sup> Biochem. Z. **185**, 392 [1927].

<sup>20)</sup> J. biol. Chemistry **118**, 71 [1937].

<sup>21)</sup> K. Meyer, G. L. Hobby, I. Chaffee u. M. H. Dawson, J. exp. Medicine **71**, 137 [1940].

zurückgeführt, das sie im Ciliarkörper und der Iris des Auges nachwiesen. Im Gegensatz zu allen anderen Mucinen verliert das Mucin aus Glaskörper nach mehrstündigem Stehen spontan seine Viscosität. Robertson, Ropes u. Bauer<sup>33)</sup> führen diesen Viscositätsverlust von Glaskörpermucin auf die Wirkung von Dehydro-ascorbinsäure zurück, die sie im Auge nachweisen konnten. Sie zeigten, daß das durch 1 Mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxydierte Vitamin C die Fähigkeit besitzt, die Viscosität von Mucinen spontan zu senken. Auch McClean u. Hale<sup>34)</sup> können diesen Befund bestätigen: Vitamin C hat die gleiche Wirkung auf die Viscosität und das Fällungsverhalten von Mucinlösungen verschiedenen Ursprungs wie Mucine aus Sperma oder Bakterien. Auch als „spreading factor“ ist Ascorbinsäure wirksam, wenn auch die Ausbreitung des Farbstoffes in etwas anderer Art vor sich geht als bei Injektion von Spermaextrakt. In dieser Beziehung gleicht die mucolytische Wirkung — wenn man so sagen darf — derjenigen von Azoproteinen, die von Claude<sup>35)</sup> entdeckt worden ist. Auch diese bewirken spontanen Verlust der Viscosität. Während bei den Azoproteinen die Feststellung, ob sie auch wie Testesmucine N-Acetyl-glucosamin in Freiheit setzen, nicht möglich war, da die Farbstoffnatur der Azoproteine den colorimetrischen Nachweis unmöglich machte<sup>36)</sup>, konnte bei der Ascorbinsäure diese Frage geprüft werden. McClean u. Hale berichten<sup>34)</sup>, daß durch Ascorbinsäure wohl die Viscosität gesenkt, aber kein Glucosamin in Freiheit gesetzt wird. Hier besteht also anscheinend ein prinzipieller Unterschied zwischen den „künstlichen“ und natürlichen Mucinasen bzw. Diffusionsfaktoren.

#### Gibt es verschiedene Mucinasen?

Bei dem enzymatischen Abbau der Stärke lassen sich ebenfalls zwei Vorgänge zeitlich trennen: 1. der rasche Verlust der Viscosität, 2. die langsame Hydrolyse. Für jede Reaktion ist ein Ferment verantwortlich. Die beiden Fermente konnten voneinander getrennt werden (Waldschmidt-Leitz u. Mayer<sup>37)</sup>). Ob bei den natürlichen Mucinasen ebenfalls verschiedene Fermente im Spiel sind, ist nicht bekannt. Die Versuche mit Ascorbinsäure und Azoproteinen lassen es jedoch als durchaus möglich erscheinen, daß in den bisher angewendeten Mucinasenpräparaten mehrere Fermente vorhanden sind, von denen eines die Mucine verflüssigt, ein anderes sie in die einzelnen Bausteine hydrolysiert. Bei der Anreicherung der Fermente aus den verschiedenen Quellen sind aber bisher die beiden Wirkungen immer zusammen gegangen.

Große Unterschiede entstehen jedoch, wie vor kurzem Madinaveitia, Todd, Bacharach u. Chance<sup>38)</sup> berichteten, bei der Anreicherung zwischen der mucolytischen Wirkung und der Diffusionsaktivität von verschiedenen Fraktionen aus dem gleichen Ausgangsmaterial: Tab. 3.

Tabelle 3<sup>38)</sup>.

Präparat	Diffusions- wirkung (% Standard)	Mucolytische Aktivität (% Standard)
Standard-Testikel aus dem Glaxo Labor. ....	100	100
Standard-Testikel nach Madinaveitia .....	68	24,6
Dialysierter Testikelextrakt .....	48	80
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> gereinigter Testikelextrakt .....	58	149
Rohes Crotalus-atrox-Gift .....	5,35	18,4
Gereinigte Crotalus-atrox-Mucine .....	4,9	61,1

Die im Diffusionstest am stärksten wirksamen Präparate zeigten keineswegs die stärkste viscositätssenkende Wirkung. Bei der Reinigung ergab sich starkes Anwachsen der Mucineaktivität bei nur geringer Zu- oder gar Abnahme der Diffusionswirkung. Ähnliche Erscheinungen sind uns wiederum vom fermentativen Abbau der Stärke her bekannt. Hier konnte

Tabelle 4.

Schnecken-, Schlangen- und Krötengifte	Bakterienfiltrate	Blutgeleextrakt Testesextrakt Tumorextrakt
Vipera aspis	Streptococcus hämolyticus	
Bothrops jararaca	Clostridium perfringens	
Lachesis alternatus	Clostridium Welchii	
Echis carinatus	Staphylococcus	
Crotalus terrificus	Pneumococcus Typ I	
Crotalus atrox		

<sup>33)</sup> J. biol. Chemistry **133**, 261 [1940].

<sup>34)</sup> Nature **145**, 867 [1940].

<sup>35)</sup> J. exp. Medicine **62**, 229 [1935].

<sup>36)</sup> G. Favilli, Nature **145**, 866 [1940].

<sup>37)</sup> Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **236**, 168 [1935].

<sup>38)</sup> Nature **146**, 197 [1940].

das Wirken von hemmenden und aktivierenden Faktoren nachgewiesen werden. Es ist damit zu rechnen, daß solche Faktoren auch bei dem enzymatischen Abbau der Mucine eine Rolle spielen.

Tab. 4 unterrichtet über das Vorkommen von Mucinasen in der Natur.

#### Substratspezifität.

Prüft man die Mucineaktivität gegenüber anderen Substraten als den zur Gruppe der sulfatfreien, sauren Mucopolysaccharide der Tab. 1 gehörenden Mucinen, so erweist sich das Ferment all diesen Substraten gegenüber als unwirksam. Weder Chondroitinschwefelsäure noch Mucoitinschwefelsäure oder Heparin werden angegriffen, ebensowenig Chitin, Blutgruppe-A-Substanz oder Bakterienpolysaccharid. Meyer, Hobby, Chaffee u. Dawson<sup>39)</sup>, denen wir diese Erkenntnisse verdanken, haben die Aktivität von Mucine aus Streptococcus hämolyticus und Clostridium Welchii gegenüber verschiedensten Mucoiden untersucht. Das Ergebnis zeigt Tab. 5.

Tabelle 5<sup>39)</sup>.

Substrat	Kohlenhydratkomponenten	Enzym aus Pneumo- kokkus und Strepto- kokkus	Enzym aus Clostridium Welchii
Hyaluronsäure aus Glaskörper, Nabelschnur, Synovialflüssigkeit, Gruppe A Streptokokkus .....	Glucuronsäure, Acetylglucosamin	+	+
Pregnaudiol-β-glucuronid .....	Glucuronsäure	0	0
Stärke, Glykogen .....	Glucose	0	+
Chitin .....	Acetyl-glucosamin	0	0
Ovomucoid, Serummucoide .....	Glucosamin, Mannose	0	0
Lösliche Substanzen spez. für Typ I, II, III, XIV, Pneumokokkus .....		0	0
Neutrales Polysaccharid aus Schweinemagen-mucin (Blutgruppe A) .....	Acetyl-glucosamin, Galaktose	0	+
Chondroitinschwefelsäure .....	Acetyl-chondrosamin, bzw. -glucosamin	0	+
Mucoitinschwefelsäure .....	Glucuronsäure	0	+
Heparin .....	Glucuronsäure, Schwefelsäure	0	0
Hyaluronsäure-trischwefelsäureester (synthetisch) .....		?	?
Acetyl-glucosamin, Glucuronsäure .....		unverändert	unverändert

Hyaluronsäure war gegenüber anderen Fermenten, wie Diastase, Ptyalin, Takadiastase, Emulsin, Eiweißlysozym, Enzymen aus verschiedenen Staphylokokken und Bacterium coli vollkommen stabil.

Zwei bemerkenswerte Unterschiede bestehen zwischen den beiden Fermentpräparaten aus Clostridium Welchii und Pneumokokken. Im ersten Falle ist die Kulturbouillon eine ergiebige Quelle für das Enzym, während aus den Bakterienzellen selbst nichts gewonnen werden kann. Bei Pneumokokkus findet man das Enzym in den Bakterien selbst. Ein zweiter Unterschied besteht in dem größeren Aktivitätsbereich der Präparate aus Clostridium Welchii. Hier wird eine Reihe von Kohlenhydrat spaltenden Fermenten gefunden, die bei Pneumokokken und Streptokokken nicht anwesend sind.

#### Immunreaktion (Antimucine).

Die mucolytische Aktivität von Bakterienenzymen wird durch geeignetes Antiserum vollständig gehemmt. Ebenso vermag solches Serum die Diffusionsaktivität zu neutralisieren<sup>40)</sup>. Gegen Mucine immunisierte Tiere sind gegen die Wirkung von Diffusionsfaktoren resistent. Antiserum hebt die Wirkung des Enzyms auf die Viscosität des Substrats und seine Hydrolyse vollkommen auf. Von besonderer Wichtigkeit ist, daß bestimmte Diffusionsfaktoren, wie z. B. solche aus Clostridium Welchii und vibrio septicus, streng spezifische Antisera erzeugen, die die Wirkung des homologen Enzyms auf Viscosität und Hydrolyse des Substrats aufheben; aber es gibt keine Kreuzneutralisation, d. h. Serum gegen das eine Bakterienenzym hemmt das andere nicht und umgekehrt. Dadurch wird gezeigt, daß in chemisch gleicher Weise wirkende Mucinasen serologisch verschieden sind. Das lytische Ferment von Dubos<sup>41)</sup>, das hitzegetötete Pneumokokken zu lösen vermag, steht in keiner Beziehung zu den Mucinasen. Die Gram-Reaktion von Pneumokokken, deren Verschwinden der erste Ausdruck für Lyse ist, wird durch Mucine aus Streptokokken nicht beeinflusst.

<sup>39)</sup> J. exp. Medicine **71**, 137 [1940].

### Die enzymatische Spaltung der sulfathaltigen und neutralen Muco-polysaccharide.

Die bisher beschriebene Mucinae richtet sich spezifisch auf die in Gruppe 1 der Tab. 1 genannten sulfatfreien, sauren Substrate; für die in den anderen Gruppen angeführten Stoffe wurden z. T. ebenfalls Fermente gefunden, die sie hydrolysieren. *Neuberg* u. *Cahill*<sup>12)</sup> beschreiben ein Ferment, das sie aus Bakterienkulturen von *Bacterium fluorescens non-liquefaciens* gewonnen haben. Dieses spaltet die sulfathaltigen Mucoide aus Magenschleim und Darm. Das Enzympräparat verursacht eine totale Hydrolyse der Chondroitin- und Mucoitinschwefelsäure. Die Sulfatbspaltung ist nahezu vollständig. Auch für die übrigen Komponenten Glucuronsäure und Acetylglucosamin ist der Abbau sehr weitgehend. Es ist nicht bekannt, ob für die Hydrolyse des Zuckersäure- und Aminosuckeranteils das gleiche Ferment — die Sulfatase — verantwortlich ist, die die Schwefelsäure abspaltet oder ob in den Bakterien neben der Sulfatase normale Mucinae vorkommt. Ob das Ferment gegenüber Heparin wirksam ist, wurde nicht geprüft.

Von den anderen in Tab. 1 aufgeführten Substanzen gibt es noch mehrere, die spezifisch von Fermenten abgebaut werden. Das lediglich aus Hexosamin und Essigsäure aufgebaute Chitin, das gegenüber allen Proteasen und Carbohydrasen stabil ist, wird von einem Ferment hydrolysiert, das im Verdauungsstrakt von Schnecken aufgefunden worden ist<sup>13)</sup>. Zur gleichen Gruppe von Verbindungen gehören viele Bakterienpolysaccharide. *Morgan*<sup>14)</sup> hat aus Shiga-Krise-Bacillus einen Acetylglucosamin-Galaktose-Rhamnose-Komplex isoliert, *Heidelberger* u. *Kendall*<sup>15)</sup> beschreiben einen solchen aus Pneumokokkus IV, der aus Acetylglucosamin und Glucose besteht. Von den hierher gehörigen Fermenten ist am besten das oben erwähnte, die Kapseln von Pneumokokken auflösende Ferment von *Dubos* bekannt. Hierdurch werden die virulenten, gekapselten Organismen ihrer Kapsel entkleidet, und die nackten Bazillen verfallen im Organismus der Phagocytose. Die Auffindung dieser sehr spezifischen Fermente ist äußerst schwierig; meistens gelingt es erst durch langsame Gewöhnung von Bakterienstämmen, indem man ihnen als einzige Kohlenhydratquelle das bestimmte, zu spaltende Polysaccharid zum Kulturmedium zufügt, die Produktion des Enzyms so zu steigern, daß man nennenswerte Mengen davon gewinnen kann. Eine Anzahl nicht pathogener Bakterien wird von einem Enzym gelöst, das *Fleming*<sup>16)</sup> im Eiklar, in Tränen und Nasensekret gefunden und Lysozym genannt hat. *Meyer, Thompson, Palmer* u. *Khorazo*<sup>17)</sup> zeigten, daß die Substanz wahrscheinlich die Mucoide der Bakterienzellen angreift. Das Enzym wurde von *Robinson* u. *Abraham*<sup>18)</sup> kristallisiert. Es ist ein Protein vom Molekulargewicht 18000. Zur gleichen Gruppe von Verbindungen gehört die Substanz, die für die Blutgruppe A spezifisch ist. Sie ist im Schweinemagenmucin reichlich vorhanden und kann aus Pepsin vom Schwein dargestellt werden. Im Speichel, Schneckenferment und Filtrat von *Clostridium Welchii* finden sich Fermente, die die Substanz hydrolysieren. Es werden daraus Acetylglucosamin und Galaktose in Freiheit gesetzt<sup>19)</sup>.

### Biologische Bedeutung.

Das weitverbreitete Vorkommen von Mucinasen berechtigt zu der Frage nach der biologischen Bedeutung dieser Fermente. Die beiden am häufigsten studierten Erscheinungen, nämlich Diffusionssteigerung und Viscositätssenkung, geben noch keinen Hinweis, aber es ist vielleicht von Wichtigkeit, daß gerade aus Bakterien, die besonders zu Entzündungen von mucinreichen Geweben, wie Augen und Gelenken, führen, Mucinae dargestellt worden ist. Es ist auch auffällig, daß bei Streptokokkeninfektionen, bei denen Gelenke befallen sind, häufig Metastasen in den Augen beschrieben werden. Man hat daher die Frage diskutiert<sup>20)</sup>, ob Erkrankungen wie Polyarthrit nicht auf dem

Wirken eines Fermentes beruhen, das die Gelenkflüssigkeit hydrolysiert. Entnimmt man diese solchen entzündeten Gelenken und prüft sie auf Mucinasewirkung mit normaler Gelenkflüssigkeit als Substrat, so zeigt sich, daß sie keinerlei Wirkung besitzt. Dies ist jedoch noch kein schlüssiger Beweis, daß in der pathologischen Flüssigkeit nicht doch Mucinae enthalten war. Es ist denkbar, daß sich im Laufe der Erkrankung Antimucinae bildet, die die Mucinasewirkung neutralisiert. In diesem Fall wäre es wichtig, bei Gelenkrheumatismus in verschiedenen Stadien der Erkrankung die Gelenkflüssigkeit zu untersuchen. Bisher wird in der Literatur nur von der genannten einmaligen Prüfung berichtet. Bei dem Gasbrandbaciillus *Fränkel-Welch* konnte *Maschmann*<sup>21)</sup> die Identität des bakteriellen Toxins mit einem extracellulären Ferment nachweisen. Das hochgereinigte Ferment Kollagenase besitzt selbst antigene Wirkung. Beim Pferd kann man Kollagenase-antisera erzeugen, welches die toxische Wirkung des Gasbrand-erregers neutralisiert.

*K. Meyer* u. Mitarb.<sup>22)</sup> konnten bei Streptokokken einen Zusammenhang zwischen Mucinaeproduktion und Virulenz feststellen. Die hochvirulenten Streptokokken in der sog. mucoiden Phase — d. h. zu der Zeit starker Mucinproduktion — enthalten keine Mucinae. Die wirksamsten Fermentpräparate wurden aus einem Stamm gewonnen, der keine mucoiden Kolonien produziert und verhältnismäßig avirulent für Mäuse war. Der Zusammenhang zwischen Fermentaktivität und Virulenz soll noch genauer studiert werden.

Schon 1928 haben die amerikanischen Gynäkologen *Kurzrok* u. *Miller*<sup>23)</sup> berichtet, daß im menschlichen Sperma ein Enzym enthalten sei, das den Schleimpfropf im Cervicalkanal des Uterus auflöst. Man kann in vitro Sperma auf Cervicalschleim einwirken lassen und beobachtet, daß innerhalb einiger Stunden der zähe Schleim ganz verflüssigt wird. Das  $p_H$ -Optimum des Enzyms liegt bei  $p_H$  5,2—5,9, also im gleichen Bereich wie das der oben beschriebenen Mucinasen. Die lytisch wirksame Substanz ist thermolabil, nicht dialysabel und durch Phosphormolybdänsäure fällbar. Das Enzym ist nicht an die Gegenwart von Spermatozoen gebunden. Bei Mucin aus Uterus, der von eitrigten Entzündungen befallen war, war keine lytische Wirkung festzustellen. Bestimmte Sterilitäten werden daher darauf zurückgeführt, daß die Spermatozoen den Cervicalkanal nicht passieren können und daher nicht in den Eileiter gelangen. Dies entspricht ganz den oben angestellten Überlegungen: Durch die bakterielle Infektion, wie sie bei eitrigten Entzündungen gegeben ist, wird eine Antimucinae gebildet, die die Wirkung der Mucinae aus Sperma aufhebt.

*W. Henle, G. Henle* u. *L. A. Chambers*<sup>24)</sup> haben durch Einspritzung von Suspensionen von zerkleinertem Sperma in Kaninchen spezifisches Antiserum erzeugt, das intaktes Sperma agglutinierte. Bei Einspritzung von Spermaköpfen gab es Kopfagglutination, bei Spermachwänzen Schwanzagglutination. Der südamerikanische Arzt *C. J. Escuder*<sup>25)</sup> konnte Frauen mit Spermaextrakten immunisieren und so eine biologische Sterilisation durchführen. Im einzelnen wurde so vorgegangen, daß die Patientinnen Spermaextrakt intergluteal injiziert bekamen. Auf diese Weise wurde in etwa 50% der Fälle eine spermatotoxische Wirkung des Cervicalsekretes erzielt, die 9—15 Monate anhielt. Vielleicht ist die Bildung von Antimucinae auch in diesem Falle die Erklärung für die Sterilität.

Die mucinspaltenden Fermente gehören zu der großen Gruppe von Faktoren, welche die Durchlässigkeit von Capillaren vergrößern und bei allen Entzündungen und Infektionen eine Rolle spielen. Es ist daher zu vermuten, daß sie in gewissen Fällen mit *V. Menkins* Leukotoxin<sup>26)</sup> und den capillarerweiternden Peptonen zusammenwirken.

Für den Chemiker versprechen die Mucinasen ein Mittel der Konstitutionsforschung zu werden als Fermente, die nur bestimmte Bindungen in Mucopolysacchariden zu hydrolysieren vermögen.

Eingeg. 27. März 1941. [A. 19.]

<sup>10)</sup> *D. McClean* u. *C. W. Hale*, ebenda **145**, 867 [1940]; *D. McClean*, *J. Pathol. Bacteriology* **42**, 477 [1936].

<sup>11)</sup> *Erg. Enzymforsch.* **8**, 136 [1939] (Übersichtsbericht).

<sup>12)</sup> *Biochem. Z.* **275**, 328 [1935]; *Enzymologia* [Den Haag] **1**, 22 [1936].

<sup>13)</sup> *P. Karrer*, *Helv. chim. Acta* **12**, 616, 986 [1929].

<sup>14)</sup> Ebenda **21**, 469 [1938].

<sup>15)</sup> *J. exp. Medicine* **53**, 625 [1931].

<sup>16)</sup> *Proc. Roy. Soc. [London]*, Ser. B **93**, 306 [1922].

<sup>17)</sup> *J. biol. Chemistry* **113**, 303 [1936].

<sup>18)</sup> *Nature* **140**, 24 [1937].

<sup>19)</sup> *F. Schiff*, *Klin. Wschr.* **14**, 750 [1935]; *E. Witebsky* u. *E. Neter*, *J. exp. Medicine* **62**, 589 [1935], s. a. unter 7).

<sup>20)</sup> *Mudd*, Diskussionsbemerkung zu *K. Meyer*, Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. **6**, 102 [1938].

<sup>21)</sup> *Biochem. Z.* **295**, 351 [1937]; **297**, 284 [1938]; **300**, 91 [1939].

<sup>22)</sup> *Amer. J. Obstetr. Gynecol.* **15**, 56 [1928]; **24**, 19 [1932].

<sup>23)</sup> *J. exp. Medicine* **68**, 335 [1938].

<sup>24)</sup> *An. Fac. Med.* **21**, 889 [1936]; *Ronas Ber.* **103**, 114 [1937].

<sup>25)</sup> *J. exp. Medicine* **67**, 145, 153 [1938]; *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **40**, 103 [1939]; *Physiologic. Rev.* **18**, 366 [1938] (Übersichtsreferat).