

Studien über die proteolytische Wirkung der Preßsäfte einiger tierischer Organe sowie des Darmsaftes.

Von

Emil Abderhalden und Yutaka Teruuchi. Tokio.

(Aus dem I. chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 5. August 1906.)

Die vorliegenden Untersuchungen bilden die Fortsetzung der von uns kürzlich mitgeteilten Versuche über die Wirkung des wässerigen Auszuges aus Rinderleber auf dl-Leucyl-glycin und Glycyl-glycin.¹⁾ Wir haben damals festgestellt, daß die Rinderleber sehr aktive proteolytische Fermente enthält. Beide Peptide waren gespalten worden. Im folgenden haben wir diese Versuche auf andere Peptide und andere Organe ausgedehnt. Wir verwendeten im allgemeinen auch nicht mehr wässrige Auszüge aus den Organen, sondern stellten Preßsäfte dar und zwar in der Weise, daß wir das frische Organ, das möglichst blutleer war, zunächst mit Sand fein zerrieben, um die einzelnen Zellen möglichst zu zerstören. Dann wurde die zerquetschte Masse mit ausgeglühter, reiner Kieselgur zu einer plastischen Masse geknetet und nun unter einem allmählich bis zu 300 Atmosphären ansteigenden Drucke das in Segeltuch eingeschlagene Produkt ausgepreßt. Der zuerst abfließende Saft wurde nicht verwendet, sondern erst der unter höherem Druck austretende. Die Einwirkung von Bakterien während des ganzen Prozesses suchten wir durch Zugabe von Toluol auszuschalten. Der so erhaltene klare Saft wurde zur Abscheidung fester Bestandteile noch zentrifugiert.

Die einzelnen Versuche sind nach denselben Prinzipien ausgeführt worden, wie wir sie schon früher geschildert haben,

¹⁾ Vergl. Das Verhalten einiger Peptide gegen Organextrakte. Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 466, 1906.

und wir können uns aus diesem Grunde mit der Mitteilung der wesentlichsten Resultate begnügen. Es ist klar, daß wir auch bei diesen Versuchen jede Spaltung der angewandten Peptide durch sekundäre Einflüsse auszuschalten suchten, und vor allem wurde die Methode so gewählt, daß durch sie keine Täuschungen veranlaßt werden konnten.

1. Versuche mit Leberpreßsaft vom Rinde.

1. Leucyl-leucin (racemisch). 3 g dieses Peptids wurden in 150 ccm Wasser gelöst, mit 20 ccm des frisch bereiteten Preßsaftes versetzt und die Lösung nach Zugabe von Toluol 3 Tage im Brutraum aufbewahrt. Hierauf wurde das Gemisch gegen oft erneuertes Wasser dialysiert und die gesamten Dialysate unter vermindertem Druck bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur des Wasserbades eingeeengt. Hierbei schieden sich 1,7 g Substanz krystallinisch ab. Sie zersetzte sich gegen 268–270° (unkorr.) und zeigte alle Eigenschaften des Leucyl-leucins. Sie war auch optisch völlig inaktiv. Wir konnten ferner aus der nicht dialysierten Flüssigkeit nach dem Aufkochen und Filtrieren noch 0,4 g unverändertes Leucyl-leucin gewinnen. Leucin konnte nicht nachgewiesen werden. Ein zweiter Versuch, der unter den gleichen Bedingungen angestellt wurde, hatte dasselbe Resultat. Wir müssen es dahingestellt lassen, ob das angewandte Präparat am negativen Ausfall dieses Versuches die Schuld trug, oder ob die durch die Schwerlöslichkeit des Leucyl-leucins bedingte große Verdünnung ungünstige Bedingungen bot. Da die Konfiguration des angewandten racemischen Leucins noch nicht bekannt ist, wird eine klare Entscheidung erst durch die Anwendung des aus dem natürlich vorkommenden l-Leucin zusammengesetzten Peptids möglich sein.

2. dl-Leucyl-glycin. 4 g Peptid wurden in 150 ccm Wasser gelöst und mit 20 ccm Leberpreßsaft versetzt. Dieses Gemisch verblieb nach Zusatz von Toluol 3 Tage im Brutraum. Die Verarbeitung dieser Probe erfolgte in der Art, daß das Dialysat zur Trockene verdampft, und der Rückstand zweimal verestert wurde. Die Ester wurden, wie früher beschrieben,

mit der berechneten Menge einer 3%igen Natriumäthylatlösung in Freiheit gesetzt und durch Destillation unter vermindertem Druck die Monoaminosäureester von dem Dipeptidester abgetrennt. Letzterer wurde durch die Überführung in das Anhydrid nachgewiesen. Isoliert wurden 0,5 g Glykokoll-esterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 140° (unkorr.), ferner 0,7 g reines l-Leucin. Dieses zersetzte sich beim raschen Erhitzen im Kapillarrohr gegen 290° (unkorr.) und hatte $[\alpha]_{20}^D = +15,1^{\circ}$ in 20%iger Salzsäure. 0,1692 g Substanz wurden in 5,0 ccm 20%iger Salzsäure gelöst. Die Lösung drehte im 1 dm-Rohr Natriumlicht $0,51^{\circ}$ nach rechts.

Aus dem Destillationsrückstand gewannen wir 0,7 g Leucyl-glycinanhydrid. Im Gegensatz zu dem so leicht und schön krystallisierenden racemischen Leucyl-glycinanhydrid schied sich das isolierte Produkt aus heißem Alkohol in gallertigen Massen ab, die zwar an einzelnen Stellen unter dem Mikroskop feine verbogene Nadelchen erkennen ließen, in der Gesamtmasse jedoch keine Struktur zeigten. Durch Auslaugen mit kaltem Aceton konnte dem Produkt der anhaftende Farbstoff entzogen werden. Es zersetzte sich gegen 240° (unkorr.) und zeigte $[\alpha]_{20}^D = -13,2^{\circ}$. Es war noch ziemlich unrein und enthielt offenbar noch unverändertes dl-Leucyl-glycinanhydrid, denn die spezifische Drehung des optisch reinen Leucyl-glycinanhydrids beträgt $31,7^{\circ}$.¹⁾ 0,1630 g Substanz drehten in 5,0 ccm Wasser gelöst im 1 dm-Rohr Natriumlicht $0,43^{\circ}$ nach links.

3. Glycyl-dl-Alanin: 4 g der Substanz wurden in 15 ccm Wasser gelöst und mit 10 ccm Leberpreßsaft versetzt. Nach 3tägigem Stehen der mit Toluol versetzten Mischung bei 37° wurde der Versuch abgebrochen und die gebildeten Spaltungsprodukte nach derselben Methode isoliert, wie oben geschildert. Erhalten wurden 0,5 g Glykokoll-esterchlorhydrat, 0,8 g salzsaures Alanin und 0,8 g Glycyl-alaninanhydrid. Das salzsaure Alanin drehte nur $5,6^{\circ}$ nach rechts. Es enthielt offenbar noch Glykokoll beigemischt.

¹⁾ Vergl. Emil Fischer und Emil Abderhalden, Bildung von Dipeptiden bei der Hydrolyse der Proteine, Berichte der Deutsch. chem. Gesellschaft, Jg. XXXIX, S. 2320, 1906.

0,7430 g des salzsauren Salzes wurden in 5,0 ccm Wasser gelöst. Die Lösung drehte im 1 dm-Rohr Natriumlicht $0,84^{\circ}$ nach rechts.

Das isolierte Glycyl-alaninanhydrid war optisch aktiv. Eine genaue Bestimmung wurde nicht ausgeführt.

Endlich versuchten wir Glycinanhydrid mit einem wässrigen Extrakt von Rinderleber zu spalten. 100 g Rinderleber wurden fein zerhackt, mit Wasser und Toluol mehrere Stunden geschüttelt und dann das Gemisch durch ein Koliertuch gepreßt. 500 ccm des so bereiteten Extraktes wurden mit 5 g Glycinanhydrid versetzt und die Lösung 3 Tage im Brutraum aufbewahrt. Nach dem Dialysieren konnten 3,7 g unverändertes Glycinanhydrid wiedergewonnen werden. Glykokoll ließ sich nicht nachweisen. Es scheint, daß Glycinanhydrid nicht aufgespalten worden ist.

2. Versuche mit Preßsaft von Rindermuskeln.

1. Glycyl-glycin: 1,5 g Peptid in 15 ccm Wasser gelöst, wurden mit 10 ccm Muskelpreßsaft und Toluol versetzt und 3 Tage bei 37° aufbewahrt. Auch hier wurde dialysiert und das Dialysat in der gewohnten Weise verarbeitet, und zwar in der Weise, daß auf die nach der Veresterung erfolgende krystallinische Abscheidung, die sowohl aus Glykokollesterchlorhydrat, wie aus Glycyl-glycinesterchlorhydrat bestehen konnte, keine Rücksicht genommen wurde. Die Ester wurden in Freiheit gesetzt und destilliert. Aus dem Destillat gewannen wir 0,1 g Glykokollesterchlorhydrat und aus dem Rückstand 1,1 g Glycinanhydrid.

Diesen Versuch wiederholten wir unter genau gleichen Bedingungen mit demselben Resultate. Es hatte unzweifelhaft eine Spaltung des Glycyl-glycins stattgefunden. Sie war jedoch auffallend gering.

2. dl-Leucyl-glycin: Zu diesem Versuche verwendeten wir 4 g Leucyl-glycin und 20 ccm Preßsaft. Das Peptid war in 150 ccm Wasser gelöst. Die Lösung wurde drei Tage im Brutraum aufbewahrt. Nach der üblichen Methode gewannen wir 0,1 g Glykokollesterchlorhydrat, 0,4 g Leucin und 1,3 g Leucyl-glycinanhydrid.

Das isolierte Leucin war l-Leucin, wie die Bestimmung des optischen Verhaltens ergab. 0,2010 g drehten in 5 cm 20%iger Salzsäure gelöst im 1-dm-Rohr Natriumlicht $0,44^\circ$ nach rechts. $[\alpha]_{20}^D = +10,9^\circ$.

Das aus dem Destillationsrückstand gewonnene Anhydrid zersetzte sich gegen 234° (unkorr.). Es erwies sich als optisch inaktiv. Es war somit auch hier eine nur geringe Spaltung eingetreten.

3. Glycyl-dl-Alanin: 4 g Substanz wurden in 15 cm Wasser gelöst, und die Lösung mit 10 cm Preßsaft und etwas Toluol versetzt. Nach 3tägigem Stehen im Brutraum wurde der Versuch abgebrochen. Glykokoll konnte nur in geringen Mengen als Esterchlorhydrat nachgewiesen werden. Daß die Spaltung nur unerheblich war, bewies die Isolierung von 1,8 g Glycyl-alaninanhydrid, das sich optisch ganz indifferent verhielt. In der sirupösen Mutterlauge waren noch weitere Mengen von Glycyl-dl-alaninanhydrid vorhanden. Jedenfalls waren optisch aktive Spaltstücke nicht nachweisbar.

Wir dürfen aus diesem Befunde nicht schließen, daß der Muskelpreßsaft keine oder nur wenig wirksame proteolytische Fermente enthält. Der eine von uns hat mit Hunter¹⁾ nachgewiesen, daß der aus frischen Kaninchenmuskeln hergestellte Preßsaft sehr wirksam ist. Es ist möglich, daß die Rindermuskeln sich anders verhalten und diese Muskeln vielleicht auf lebhaften Eiweißab- und aufbau nicht eingerichtet sind. Selbstverständlich muß man mit derartigen Schlüssen sehr vorsichtig sein, denn die Möglichkeit liegt nahe, daß die schwache Wirkung des verwendeten Preßsäftes in den Versuchsbedingungen zu suchen ist. Vielleicht waren auch die Muskeln, die zwar frisch aus dem Schlachthaus bezogen waren, doch zu alt. Jedenfalls muß diese Beobachtung noch weiter verfolgt werden.

3. Hundemuskelpreßsaft.

1. Glycyl-glycin: 1,5 g Substanz in 15 cm Wasser gelöst und mit 10 cm Preßsaft und Toluol versetzt. Nach

¹⁾ Vergl. Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 537, 1906.

3tägigem Stehen im Brutraum ließen sich 0,5 g Glykokollesterchlorhydrat und 0,9 g Glycyl-glycinesterchlorhydrat nachweisen. Es war somit eine ganz beträchtliche Hydrolyse eingetreten.

2. Glycyl-L-Tyrosin: 1,0 g dieses Peptides wurde in 5 ccm Wasser gelöst und 5 ccm Preßsaft nebst Toluol zur Lösung zugegeben. Nach 3tägigem Stehen im Brutraum wurde die Flüssigkeit vom ausgeschiedenen Tyrosin abfiltriert. Das Filtrat bewahrten wir weitere 5 Tage bei 37° auf. Es erfolgten neue Abscheidungen von Tyrosin. Die vereinigten Tyrosinkristalle wurden aus heißem Wasser unter Anwendung von wenig Tierkohle umkristallisiert. Im ganzen gewannen wir 0,15 g reines Tyrosin. Das Filtrat vom ausgeschiedenen Tyrosin wurde kurz aufgeköcht, filtriert, dann eingedampft, und der Rückstand verestert. Durch Destillation der in der gewohnten Weise in Freiheit gesetzten Ester gewannen wir aus dem Destillat 0,07 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 140° (unkorr.). Im Destillationskolben verblieb ein braun gefärbter Rückstand, der offenbar den Ester des unveränderten Peptids und noch Tyrosinester enthielt. Ein Unfall verhinderte die weitere Untersuchung dieses Rückstandes.

4. Versuche mit Preßsaft aus Nieren vom Hunde.

Auch dieser Preßsaft erwies sich als recht aktiv, wie ein Versuch mit Glycyl-glycin ergab. 1,5 g dieses Peptids wurden in 10 ccm Wasser gelöst und mit 5 ccm Preßsaft und etwas Toluol 3 Tage bei 37° aufbewahrt. Aus dem Dialysat gewannen wir mit Hilfe der Estermethode 1,5 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 140° (unkorr.). Glycinanhydrid wurde nicht nachgewiesen.

Um zu ergründen, ob die Organpreßsäfte auch den Peptiden ähnliche Verbindungen spalten, fügten wir zu 10 ccm Preßsaft aus Hundennieren 4 g Hippursäure, die in 400 ccm Wasser suspendiert waren. Nach 3tägigem Stehen der Probe im Brutraum filtrierten wir von der ungelöst gebliebenen Hippursäure ab und dampften die aufgeköchte und filtrierte Lösung unter vermindertem Druck zur Trockene ein. Der Rückstand löste sich vollständig in Alkohol. Nach dem Eindampfen der alkoho-

lischen Lösung konnte der Rückstand als vollständig unveränderte Hippursäure vom Schmelzpunkt 188° (unkorr.) festgestellt werden. Glykokoll war nicht nachweisbar.

In einem zweiten Versuche verwendeten wir Preßsaft aus dem Dünndarm eines Hundes. Es wurden 5 g Hippursäure in 500 cem Wasser suspendiert und mit 10 cem Preßsaft und etwas Toluol versetzt. Unter öfterem Umschütteln verblieb diese Probe 3 Tage im Brutraum. Auch hier ließ sich der Nachweis führen, daß eine Spaltung der Hippursäure nicht eingetreten war.

Es scheint somit, daß die Hippursäure von den angewandten Organpreßsäften nicht in nachweisbarer Menge gespalten wird. Es ist die Möglichkeit zuzugeben, daß die gewählten Bedingungen — vor allem die schwere Löslichkeit der Hippursäure in den verwendbaren Lösungsmitteln — die Ursache des erhaltenen Resultates bilden.

5. Hundeleberpreßsaft.

1. Glycyl-glycin: 1,5 g Glycyl-glycin wurden in 15 cem Wasser gelöst, mit 10 cem Preßsaft versetzt und nach Zusatz von Toluol 3 Tage bei 37° aufbewahrt. Gewonnen wurden 0,4 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 140° (unkorr.) und 0,8 g Glycyl-glycinesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 176° (unkorr.).

2. Glycyl-l-tyrosin: Zur Verwendung kamen 1 g Substanz, die in 5 cem Wasser gelöst wurde. Zur Lösung fügten wir 5 cem Preßsaft und etwas Toluol. Sehr bald — nach wenigen Stunden — ließ sich an den Wänden die Abscheidung von Krystallen erkennen. Sie nahm fortwährend zu. Unter dem Mikroskop erwiesen sie sich als feine Nadelchen. Es handelte sich offenbar um Tyrosin, denn das angewandte Peptid kristallisiert nicht und ist in Wasser im Gegensatz zum Tyrosin spielend löslich. Nach 5 Tagen wurde der Versuch abgebrochen und durch Verdünnen mit Wasser und Erwärmen das ausgeschiedene Tyrosin in Lösung gebracht. Die ziemlich klare Lösung wurde filtriert und dann eingeeengt. Es schied sich 0,4 g Tyrosin ab. Nach dem Umkrystallisieren verblieben 0,3 g. Aus

der Mutterlauge des Tyrosins gewannen wir 0,1 g Glykokoll-esterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 140° (unkorr.). Das Glykokoll war als Ester destilliert und erst aus dem Destillat das Esterchlorhydrat abgeschieden worden. Hierbei sind kleine Verluste unvermeidlich, indem beim Destillieren, wenn die Kühlung der Vorlage nicht eine ganz vorzügliche ist, leicht etwas Ester wegdestilliert. Offenbar war mehr Glykokoll vorhanden gewesen, wenigstens gelang es uns nicht, aus dem Destillationsrückstand, der sehr gering war, Glycyl-tyrosinanhydrid zu gewinnen. Die Spaltung des Dipeptids muß somit eine recht vollständige gewesen sein.

6. Hundedarmsaft.

Es schien uns von Interesse, die proteolytische Wirkung ganz reinen Darmsaftes auch mit Hilfe der Peptide zu verfolgen. Bekanntlich hat O. Cohnheim¹⁾ im Darmsaft ein Ferment nachgewiesen, das im wesentlichen auf die Abbauprodukte des Eiweißes eingestellt ist. Diese Beobachtung Cohnheims ist unzweifelhaft von größter Bedeutung. Sie zeigt, daß der Darm auch eine rein sekretorische Funktion im weiteren Sinne hat, und läßt uns verstehen, weshalb unter Umständen auch dann, wenn die Pankreasdrüse in der Sekretion ihres Saftes zurücksteht, die Ausnutzung des Eiweißes eine ganz erhebliche sein kann. Jedenfalls sind alle älteren Versuche über die Aufnahme von Eiweiß und Peptonen durch die Darmwand mit Vorsicht aufzunehmen. Es liegt stets der Einwand vor, daß das Erepsin den weiteren Abbau besorgt hat. Unsere Versuche zeigen, daß das Erepsin ein sehr wirksames proteolytisches Ferment ist, und wir können uns wohl denken, daß seine Rolle bei der Verdauung und der Resorption der Proteine resp. deren Spaltstücken keine untergeordnete ist. Weitere Untersuchungen müssen darüber aufklären, ob wir weiterhin berechtigt sind, die Eiweißverdauung in nur zwei großen Phasen — Magen- und Pankreassaftverdauung — zu betrachten, oder ob nicht vielmehr

¹⁾ O. Cohnheim, Die Umwandlung des Eiweiß durch die Darmwand. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 451, 1901. — Weitere Mitteilungen über das Erepsin. Ebenda, Bd. XXXV, S. 134, 1902, und Notiz über das Erepsin. Ebenda, Bd. XLVII, S. 286, 1906.

als ebenso wesentliches Glied die Darmsaftverdauung die gesamte Kette des Eiweißabbaues abschließt. Jedenfalls geht aus den nachstehenden Versuchen hervor, daß der reine Darmsaft Verbindungen zwischen Aminosäuren lösen kann, auf die der Pankreassaft ohne nachweisbaren Einfluß ist. Andererseits scheint es uns, als ob der Darmsaft auf bestimmte Peptide, die der Pankreassaft rasch spaltet, eine geringere Wirkung hat. Vielleicht besteht hier ein ganz bestimmtes Verhältnis und eine weitgehende Arbeitsteilung zwischen den proteolytischen Fermenten des Pankreassaftes und des Darmsaftes. Jedenfalls lohnt es sich der Mühe, diese Versuche nach allen Richtungen auszubauen.

Wir möchten uns noch eine besondere Bemerkung zum Wesen des Erepsins erlauben. In allen Organen des tierischen Körpers finden sich ganz offenbar proteolytische Fermente. Man könnte deshalb daran denken, daß das Erepsin diesen Organfermenten ganz entspricht, ja daß es sogar beim Zerfall von Darmepithelien frei würde. Einstweilen können wir letztere Entstehungsart nicht ausschließen. Sie ist jedoch wenig wahrscheinlich. Es wird im übrigen kaum ein prinzipieller Unterschied zwischen dem Erepsin und den proteolytischen Fermenten der Organe bestehen. Wir halten es trotzdem für einwandfrei, wenn vorläufig der Name Erepsin, so wie es Cohnheim vorgeschlagen hat, für die proteolytischen Fermente des Darmsaftes reserviert wird und nicht auch die entsprechenden Fermente der Organe so bezeichnet werden.¹⁾ Hier sind weitgehende vergleichende Untersuchungen abzuwarten.

Der Darmsaft, den wir benutzten, stammte aus der Fistel einer isolierten Schlinge des Jejunums eines Hundes und war absolut frei von Pankreassaft. Wir verdanken ihn der großen Güte des Herrn Prof. London in St. Petersburg. Der Saft war durch eine Chamberland-Kerze filtriert und stellte eine vollkommen wasserklare, farblose Flüssigkeit dar.

¹⁾ Vergl. hierzu: H. M. Vernon, Allgemeine Verbreitung des Erepsins im tierischen Organismus, *Journal of Physiol.*, Bd. XXXII, S. 33, 1904. — Der fraktionelle Zustand der Gewebe, gemessen durch ihren Gehalt an aktivem Erepsin. Ebenda, Bd. XXXIII, S. 81, 1905.

Wir haben bis jetzt drei Versuche beendet und zwar einen mit Glycyl-glycin und zwei mit Glycyl-l-tyrosin.

1. Glycyl-glycin: 1,5 g des Peptides wurden in 10 ccm Wasser gelöst und mit 6 ccm Darmsaft versetzt. Wir gewannen nach dreitägigem Stehen der Probe im Brutraum 0,5 g reines Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 141° (unkorr.) und 0,8 g Glycyl-glycinesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 176° (unkorr.).

2. Glycyl-l-tyrosin: Wir setzten in zwei Proben je 1 g Glycyl-l-tyrosin mit 5 ccm Darmsaft und Toluol an. Schon nach wenigen Stunden schieden sich an der Wand des Gefäßes Krystalle von Tyrosin aus. Aus jeder Probe erhielten wir 0,15 g reines Tyrosin. Die Tyrosinabscheidung war damit noch nicht beendet. Bei noch längerem Stehen der Proben bei 37° fiel immer noch Tyrosin aus. Zum Nachweis des gebildeten Glykokolls vereinigten wir beide Proben. Unter Anwendung der Estermethode isolierten wir 0,7 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 238° (unkorr.). Aus dem geringen Destillationsrückstand gelang es uns nicht, unverändertes Peptid als Anhydrid festzustellen. Die Spaltung des Glycyl-l-tyrosins war sicher eine nahezu vollständige gewesen.

Einen weiteren Versuch stellten wir mit einem wässerigen Extrakt aus der Darmschleimhaut des Rindes dar. 120 g Dünndarmschleimhaut wurden mechanisch gereinigt, dann zerhackt und der Brei mit 50 ccm Wasser und Toluol geschüttelt. Nach einer Stunde wurde die Mischung im Koliertuch scharf abgepreßt. Zu 100 ccm Preßsaft setzten wir 5 g Glycyl-glycin und ließen unter Toluolzusatz die Lösung drei Tage im Brutraum stehen. Die Flüssigkeit wurde dann dialysiert und das Dialysat nach dem Eindampfen verestert. Gewonnen wurden 4,5 g Glykokollesterchlorhydrat, das bei 142° (unkorr.) schmolz. Es war somit das Glycyl-glycin sehr energisch gespalten worden.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß der tierische Organismus in seinen Organen über sehr energische proteolytische Fermente verfügt, die in ganz analoger Weise wie die entsprechenden Fermente des Pankreassaftes wirken. Der Umstand, daß die verwendeten racemischen Peptide — mit Ausnahme des

Leucyl-leucins — meist asymmetrisch gespalten wurden, beweist, daß eine Fermentwirkung vorlag, und daß nicht die angewandte Methodik die Ursache der festgestellten Hydrolyse sein konnte. Natürlich haben wir uns auch durch Kontrollversuche überzeugt, daß letzterer Einwand hinfällig ist.

Von besonderem Interesse ist es, daß der reine Darmsaft des Hundes gleichfalls sehr aktive proteolytische Fermente aufweist, die sogar Peptide spalten, die dem Pankreassaft ganz zu widerstehen scheinen.

Wir setzen diese Versuche im hiesigen Institute fort. Vor allem wird es auch von Interesse sein, festzustellen, ob die Organpreßsäfte auch auf Peptide einwirken, welche aus Aminosäuren aufgebaut sind, welche den natürlich vorkommenden entgegengesetzt sind, wie z. B. l-Alanyl-l-alanin oder l-Alanyl-d-alanin und d-Alanyl-l-alanin. Die beobachtete asymmetrische Hydrolyse weist darauf hin, daß dies kaum der Fall sein wird.

Man kann gegen unsere Untersuchungen den Einwand erheben, daß wir nicht die Organfermente in Händen hatten, sondern unter Umständen Fermente, welche dem Blute zugehören. Mit voller Schärfe läßt sich dieser Einwurf nicht aus den Versuchen selbst widerlegen, dagegen scheinen uns unsere Vorsichtsmaßregeln doch ausreichend zu sein, um einstweilen daran festzuhalten, daß wir es mit den spezifischen Organfermenten zu tun hatten. Einmal verwandten wir die Organe möglichst blutleer, und dann benutzten wir, wie schon betont, stets nur den Preßsaft, der bei höherem Druck (150—300 Atmosphären) ausgepreßt wurde. Wir dürfen erwarten, daß das Blut in seiner allergrößten Menge bereits bei geringerem Druck ausgepreßt worden war und nur Spuren von Blut den von uns verwendeten Säften beigemischt waren. Immerhin war es durchaus notwendig, das Blut resp. dessen Serum auf seine etwaige Einwirkung auf Peptide zu untersuchen. Die ersten Versuche, die wir mit Serum vom Rinderblut anstellten, ergaben ein negatives Resultat. Zugesehtes Glycyl-l-tyrosin wurde nicht in nachweisbarer Menge gespalten, wenigstens ließ sich das zugesehte Glycyl-l-tyrosin nach der Estermethode fast quantitativ als Esterchlorhydrat wieder gewinnen. Neue Ver-

suche zeigten nun, daß die Ursache des Ausfalles der ersten Untersuchungen nach dieser Richtung auf das verwendete Material zurückzuführen ist. Das verwendete Blut hatte offenbar schon zu lange gestanden. Zu den neuen Versuchen wurde das Blut resp. dessen Serum sofort nach der Entnahme aus dem Körper verwendet. Wir setzten zu 10 ccm ganz frischen Serums, das durch Koagulation des aus der Carotis eines männlichen Kaninchens entnommenen Blutes gewonnen war, 1,0 g Glycyl-l-tyrosin. Zunächst blieb die mit etwas Toluol überschichtete Lösung bei einigem Stehen im Brutraum ganz klar. Nach zwei Stunden jedoch fanden wir bereits an den Wänden des Gefäßes einen feinen Belag. Am Boden des Reagenzglases hatte sich gleichfalls ein geringer Niederschlag abgesetzt. Nach weiteren 4 Stunden hatte die Ausfällung beträchtlich zugenommen, und nach 24 Stunden war die Abscheidung so beträchtlich, daß wir ihre Untersuchung vornehmen konnten. Das Serum wurde zu diesem Zwecke zentrifugiert und der beträchtliche Rückstand, der in Wasser im Gegensatz zu dem angewandten Peptid schwer löslich war, auf Tyrosin untersucht. Er gab intensive Millonsche Probe und erwies sich beim Umkrystallisieren aus relativ viel heißem Wasser als Tyrosin. Seine Menge betrug 0,2 g. Beim Auskochen der beim Zentrifugieren abgeschleuderten Masse blieb ein Teil ungelöst. Er gab sehr intensive Millonsche Probe und verhielt sich ganz ähnlich wie koaguliertes Eiweiß. Wir vermochten nicht zu entscheiden, ob diesem Produkt das Tyrosin nur beigemischt war, oder ob eine Verbindung des Tyrosins vorlag. Jedenfalls war in relativ kurzer Zeit Tyrosin aus dem Glycyl-l-tyrosin abgeschieden worden. Die Mutterlauge vom Tyrosin gossen wir in feinem Strahl in siedendes Wasser und filtrierten dann das ausgeschiedene Eiweiß ab. Es gelang so nicht alles Eiweiß zu entfernen. Das Filtrat gab schwache Biuretreaktion. Wir wagten es, um eine sekundäre Spaltung des etwa noch vorhandenen Peptids zu vermeiden, nicht, das Eiweiß durch schwaches Ansäuern mit Essigsäure zu entfernen. Natürlich wäre hier die Dialyse von großem Vorteil gewesen. Aus äußeren Gründen unterblieb sie. Beim Einengen des Filtrates vom koagulierten Eiweiß erhielten wir weitere

Tyrosinmengen. Das isolierte Tyrosin war jedoch nicht rein, sondern enthielt offenbar Reste von nachträglich ausgefallenem Eiweiß. Von den abgeschiedenen Massen wurde abfiltriert und schließlich der Trockenrückstand verestert, die Ester in Freiheit gesetzt und destilliert. Aus dem Destillat isolierten wir 0,15 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 144° (korr.). Aus dem Destillationsrückstand konnten wir ferner 0,1 g Glycyl-l-tyrosinanhydrid isolieren.

Einen ganz gleichen Ausfall hatte ein Versuch mit 5 ccm ganz frischem Hundeserum. Auch hier erfolgte beim Zusatz von 1,4 g Glycyl-l-tyrosin schon nach zweistündigem Stehen im Brutraum Abscheidung weiß gefärbter Massen, die sich als Tyrosin erwiesen. Auch hier fielen eiweißartige Substanzen mit aus.

Wir wollen uns jeder Schlußfolgerung aus diesen Befunden enthalten, weil wir sie noch nicht für gesichert genug halten. Es wäre immerhin möglich, daß diese zwei Beobachtungen ganz bestimmten Bedingungen entsprechen. Es wäre denkbar, daß die beiden Versuchstiere, die beide kurz vor der Blutentnahme noch Futter aufgenommen hatten, resorbiertes Trypsin in ihrem Blute enthielten. Die auffallend starke Wirksamkeit der untersuchten Sera macht es allerdings nicht sehr wahrscheinlich, daß es sich um zufällig vorhandene Spuren von Trypsin handelt. Wir behalten uns ganz ausdrücklich vor, den erhobenen Befund nach allen Richtungen weiterzuverfolgen. In erster Linie gilt, es festzustellen, ob die Eigenschaft, Glycyl-l-tyrosin zuspalten, gleichmäßig dem Serum verschiedener Tiere unter verschiedenen Bedingungen zukommt, und ob vor allem auch andere Peptide gespalten werden. Wir hoffen von diesem Versuchsplane aus, unter Umständen, interessante Ausblicke auf das Wesen der biologischen Reaktion und speziell der Präzipitinbildung und vielleicht auch der Toxinlehre zu erhalten. Es wäre z. B. denkbar, daß ein bestimmtes Peptid nicht angegriffen wird. In diesem Falle wäre es von Interesse, zu verfolgen, ob es nach längerer Einführung des betreffenden Peptids gelingt, ein dieses spaltendes Ferment zu erzeugen. Andererseits wird es möglich sein, auch die Frage der proteolytischen Antifermente in bestimmter Weise in Angriff zu nehmen. Der Umstand, daß die

Polypeptide Emil Fischers wohl definierte Verbindungen darstellen, ermöglicht nach allen Richtungen klare Fragestellungen. Wir geben deshalb unserem Wunsche, dieses ausschließlich aus dem hiesigen Institute herausentwickelte Arbeitsgebiet uns zu überlassen, Ausdruck, weil die Einzelversuche sehr zeitraubend sind, und jede Überstürzung einer gesunden Entwicklung dieser Untersuchungen schaden würde.