

Über den Abbau einiger Polypeptide durch die Blutkörperchen des Pferdes.

Von

Emil Abderhalden und H. Deetjen.

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

(Der Redaktion zugegangen am 17. März 1907.)

Eine Reihe von Untersuchungen aus dem hiesigen Institut haben gezeigt, daß in den Geweben des tierischen Organismus Fermente vorhanden sind, welche Polypeptide abbauen.¹⁾ Wir verwandten zu diesen Untersuchungen meistens racemische Polypeptide, und es ließ sich nachweisen, daß diese stets asymmetrisch gespalten werden. Als Produkte der Hydrolyse er-

¹⁾ Emil Abderhalden und Yutaka Teruuchi, Das Verhalten einiger Peptide gegen Organextrakte, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 466, 1906. — Emil Abderhalden und Andrew Hunter, Weitere Beiträge zur Kenntnis der proteolytischen Fermente der tierischen Organe, Ebenda, Bd. XLVIII, S. 537, 1906. — Emil Abderhalden und Yutaka Teruuchi, Studien über die proteolytische Wirkung der Pflanzsäfte einiger tierischer Organe sowie des Darmsaftes, Ebenda, Bd. XLIX, S. 1, 1906. — Emil Abderhalden und Peter Rona, Das Verhalten von Leucyl-phenylalanin, Leucyl-glycyl-glycin und von Alanyl-glycyl-glycin gegen Pflanzsaft der Leber vom Rinde, Ebenda, Bd. XLIX, S. 31, 1906.

Anmerkung. Mit dem Ausdruck «Peptide» sind in den oben zitierten Arbeiten im Gegensatz zu den aus mehreren Aminosäuren bestehenden Aminosäureketten die aus zwei Aminosäuren zusammengesetzten Di-peptide bezeichnet worden. Es empfiehlt sich, diesen Usus fallen zu lassen und ganz allgemein alle Produkte, die durch amidartige Verkettung von Aminosäuren entstehen, nach Emil Fischers Vorgang als Polypeptide zu bezeichnen und die einzelnen Ketten je nach ihrem Bestande aus 2, 3 und mehr Aminosäuren in Analogie mit den Bezeichnungen in der Zuckergruppe mit den Namen Di-, Tri-, Tetrapeptide usw. zu belegen. Der Name «Peptid» bezeichnet nach dieser Auffassung eine einzelne Aminosäure. Die von uns angewandte Verwendungsweise des Wortes «Peptid» könnte somit leicht zu Mißverständnissen führen. Emil Abderhalden.

hielten wir stets die in der Natur vorkommenden optisch-aktiven Aminosäuren und das entsprechende optisch-aktive Polypeptid. Diese Art der Fermenthydrolyse steht in völliger Analogie mit der durch Pankreassaft bewirkten. Ein Unterschied ist nur insofern vorhanden, als die Gewebsfermente manche Polypeptide angreifen, die den Fermenten des Pankreassaftes unzugänglich sind. Es ist nach dieser Richtung nicht ohne Interesse, daß der Darmsaft mit seinen Fermenten (Erepsin) sich in seiner Wirkung derjenigen der Gewebsfermente nähert, indem er ebenfalls auf manche Polypeptide einwirkt, auf die der Pankreassaft ohne nachweisbaren Einfluß ist. Wir haben verschiedentlich diese Fermentwirkung ganz allgemein als proteolytische bezeichnet und verstanden darunter die fermentative Spaltung von Produkten, welche der Gruppe der Eiweißkörper angehören. Manche Erfahrungen machen es nicht unwahrscheinlich, daß wir nicht von einem einheitlichen proteolytischen Fermente sprechen dürfen. Es weist manche Beobachtung darauf hin, daß für die verschiedenen Abbaustufen der Proteine verschiedene Fermente vorhanden sind. Für eine solche Annahme spricht vor allem der Umstand, daß die Gewebe Fermente enthalten, welche ganz spezifisch auf bestimmt aufgebaute Eiweißkörper eingestellt sind. Wir erinnern nach dieser Richtung an die Wirkungsweise der sogenannten autolytischen Fermente. Bei den tieferen Abbauprodukten, zu denen sicher die von uns untersuchten Polypeptide zu rechnen sind, findet offenbar eine spezifische Auswahl nicht mehr statt. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, nachzuweisen, für welche Abbaustufen der Proteine bestimmte Fermente in Aktion treten. Um Mißverständnissen vorzubeugen, dürfte es angebracht sein, den Namen *proteolytisches Ferment* nach dem alten Usus für den ersten Abbau der Proteine selbst zu reservieren und für die tieferen Abbaustufen, die höchstwahrscheinlich durch besondere Fermente völlig abgebaut wurden, einstweilen eine besondere Fermentgruppe, die etwa als *peptolytische* zu bezeichnen wäre, anzunehmen.

Die folgenden Untersuchungen sind in Fortsetzung der eben angeführten Versuche unternommen worden, und zwar

gliedern sie sich speziell an die Beobachtung des einen von uns mit Y. Teruuchi¹⁾ an, nämlich, daß Serum Glycyl-l-Tyrosin spaltet. Allerdings war dies nicht stets der Fall. Bei diesen Versuchen war auf die Gewinnung des Serums keine besondere Sorgfalt gelegt worden. Bald handelte es sich um Serum, das durch künstliches Defibrinieren des Blutes gewonnen worden war, bald um solches, das durch die natürliche Gerinnung zur Abscheidung kam. Es war die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß außer dem Serum noch andere Elemente des Blutes in Betracht kamen, und zwar rote und weiße Blutkörperchen.

Zu den vorliegenden Versuchen verwendeten wir ausschließlich Pferdeblut, und zwar wurde dieses stets durch Zusatz von Ammoniumoxalat ungerinnbar gemacht. Das ganz frische Blut zentrifugierten wir dann, um möglichst alles Plasma zu entfernen. Die Blutkörperchen wurden außerdem noch mit physiologischer Kochsalzlösung verrührt und mehrmals zentrifugiert. Wir erhielten so ein Gemenge von roten und weißen Blutkörperchen und von Blutplättchen. Es gelingt durch Zentrifugieren nicht, eine völlige Trennung der roten und weißen Blutkörperchen herbeizuführen. Wir suchten die Hauptmasse der weißen Blutkörperchen und der Blutplättchen durch Abheben der oberen Schichten der zentrifugierten Masse herbeizuführen. Die unteren Schichten zeigten unter dem Mikroskop einen verhältnismäßig sehr kleinen Anteil an weißen Blutkörperchen. Für unsere Versuche diente diese untere Schicht. Zu gleicher Zeit wurde auch das Plasma auf sein Verhalten gegen Polypeptide geprüft und zwar unter Anwendung der gleichartigen Dipeptide. Diese Versuche sind von Herrn Dr. Oppler ausgeführt worden. Wir gehen hier auf die Resultate dieser Untersuchungen nur insoweit ein, als sie für die Beurteilung der hier mitgeteilten Versuche ausschlaggebend sind.²⁾

¹⁾ Emil Abderhalden und Yutaka Teruuchi. l. c., Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 1, 1906.

²⁾ Die ausführliche Mitteilung erfolgt in nächster Zeit an dieser Stelle.

Experimenteller Teil.

Versuch I.

Frisches Pferdeblut, das mit 0,1% Ammonoxalat ungerinnbar gemacht war, wurde bei 3000 Umdrehungen in der Minute 15 Minuten lang zentrifugiert. Das Plasma und die oberste Schicht des Blutkörperchenbreies wurde abgehoben und die untere, feste Blutkörperchenschicht mit 0,9%iger Kochsalzlösung verrührt. Nach wiedererfolgtem, 15 Minuten dauern dem Zentrifugieren wurde die abgeschiedene Kochsalzlösung abgehoben und der ganze Prozeß noch zweimal wiederholt. In den folgenden Versuchen wurde die so möglichst von Plasma und von weißen Blutkörperchen plus Blutplättchen befreite Masse der roten Blutkörperchen verwendet.

1. dl-Alanyl-glycin.

2 g des Dipeptids wurden in 25 ccm Wasser gelöst und nach Zusatz von 10 ccm Blutkörperchenbrei und einer ausreichenden Menge Toluol 3 Tage bei 37° aufbewahrt. Durch Eingießen in siedendes Wasser wurde die Lösung nun enteiweißt und filtriert. Das Eiweißkoagulum kochten wir noch dreimal mit Wasser aus und vereinigten alle Filtrate. Die gesamte, leicht gelb gefärbte Lösung entfärbten wir durch Kochen mit Tierkohle und dampften die filtrierte Lösung unter vermindertem Druck und einer 40° nicht übersteigenden Temperatur des Wasserbades zur Trockene ein. Der Rückstand wurde in der wiederholt beschriebenen Weise mit Alkohol und Salzsäure verestert und die Ester mit Natriumalkoholat in Freiheit gesetzt. Die freien Ester wurden bis 100° des Wasserbades bei einem Druck von 10—12 mm destilliert und das Destillat in einer sehr sorgfältig gekühlten Vorlage aufgefangen.

Das Destillat wurde nach Zusatz von verdünnter Salzsäure zur Trockene verdampft und der Rückstand verestert, um Glykokoll nachzuweisen. Nach Abscheidung des Glykokollesterchlorhydrates wurde dessen Mutterlauge mit verdünnter Salzsäure eingedampft und das erhaltene salzsaure Salz zur Bestimmung des optischen Verhaltens benützt.

Der Destillationsrückstand enthielt neben etwas unverändertem Dipeptidester den durch die asymmetrische Hydrolyse erzeugten optisch-aktiven Dipeptidester. Ihre Anwesenheit wurde durch ihre Überführung in das Anhydrid festgestellt.

Erhalten wurden:

0,33 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 144° .

0,5 salzsaures Alanin. $[\alpha]_D^{20} = + 8,2^{\circ}$.

0,83 Alanyl-glycinanhydrid.

Das letztere wurde in zwei Fraktionen isoliert. Die erste, 0,33 g, zersetzte sich gegen $230-235^{\circ}$ (unkorr.), die zweite (0,5 g) gegen 212° (unkorr.). Die erste Fraktion ergab

$$[\alpha]_D^{20} = + 3,9^{\circ}.$$

2. dl-Alanyl-glycin.

2 g Dipeptid, 25 ccm Wasser, 10 ccm Blutkörperchenbrei und Toluol. In die Lösung der Blutkörperchen war vorher Kohlenoxyd eingeleitet worden. Nach dreitägigem Stehen bei 37° wurde der Versuch abgebrochen. Die ganze Masse hatte sich verflüssigt. Die Verarbeitung war dieselbe, wie beim vorhergehenden Versuche.

Isoliert wurden:

0,43 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 144° .

0,32 salzsaures Alanin. $[\alpha]_D^{20} = + 9,7^{\circ}$.

0,86 Anhydrid in 3 Fraktionen. Die letzte Fraktion (0,46 g) war ziemlich unrein. Die erste zersetzte sich gegen 239° , die zweite gegen 224° .

Versuch II.

Pferdeblut, das mit Ammoniumoxalat (0,1%) ungerinnbar gemacht war, wurde zentrifugiert und das Plasma abgehoben. Der Blutkörperchenbrei wurde nun mit 0,9%iger Kochsalzlösung vermischt und die ganze Masse wieder zentrifugiert. Der ganze Prozeß wurde fünfmal ausgeführt. Die Tourenzahl betrug beim ersten und zweiten Zentrifugieren 3000 und sonst 1500. Es wurde jedesmal 1—2 Minuten lang zentrifugiert. Wie die mikroskopische Untersuchung ergab, bestand der weitaus

größte Teil des Blutkörperchenbreies aus roten Blutkörperchen, nur ab und zu sah man Gruppen von weißen Blutkörperchen in die Masse der roten eingelagert.

1. Glycyl-l-tyrosin.

Angewandt 1 g Dipeptid, 10 ccm Wasser, Toluol und 10 ccm Blutkörperchenbrei. Schon nach 2 tägigem Stehen im Brutraum beobachtete man die Abscheidung von kleinen Kry-
stalldrüsen. Am dritten Tag wurde der Versuch abgebrochen. Die Verarbeitung erfolgte hier, wie auch bei den übrigen Ver-
suchen, in der gewohnten Weise.

Isoliert wurden 0,33 g reines Tyrosin.

Vom Glykokoll konnten wir nur Spuren nachweisen (0,03 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 145°). Glycyl-l-tyrosin-anhydrid erhielten wir 0,08 g.

2. dl-Alanyl-glycyl-glycin.

3 g des Tripeptids gelöst in 10 ccm Wasser, nach Zusatz von 10 ccm Blutkörperchenbrei und Toluol 4 Tage im Brut-
raum aufbewahrt.

Isoliert:

0,22 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 142°.

0,38 g salzsaures Alanin. $[\alpha]_{20}^D = + 7,5^\circ$.

0,44 g Anhydrid vom Zersetzungspunkt 234—238°.

0,8 g Rückstand, wahrscheinlich den Ester des unveränderten
Tripeptids enthaltend.

Das isolierte Anhydrid konnte enthalten Glycinanhydrid und Alanyl-glycinanhydrid. Die optische Bestimmung ergab, daß letzteres sicher vorhanden war. $[\alpha]_{20}^D = + 2,5^\circ$. Wahr-
scheinlich waren beide Anhydride anwesend.

3. Glycyl-dl-Leucin.

2 g Dipeptid gelöst in 25 ccm Wasser. Nach Zusatz von Toluol und 10 ccm Blutkörperchenbrei wurde die Lösung 4 Tage im Brutraum aufbewahrt.

Isoliert: 0,15 g Leucin. $[\alpha]_{20}^D = + 6,4^\circ$ in 20%iger Salz-
säure. Offenbar war noch Glykokoll beigemischt. Von diesem

gewannen wir nur 0,04 g als Esterchlorhydrat. An Anhydrid erhielten wir 0,43 g vom Zersetzungspunkt 239° und 0,53 g vom Zersetzungspunkt $220-235^{\circ}$. Die erste Fraktion ergab $[\alpha]_{20}^D = -10,9^{\circ}$.

4. dl-Alanyl-glycin.

2 g Substanz, 10 ccm Wasser, 10 ccm Blutkörperchenbrei, Toluol. Dauer des Versuches 4 Tage.

Isoliert wurden: 0,3 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 144° . Das d-Alanin ging durch einen Unglücksfall verloren. An Anhydrid gewannen wir 0,66 g. $[\alpha]_{D}^{20} = +3,9^{\circ}$.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß der Blutkörperchenbrei Fermente enthielt, welche die angewandten Polypeptide abbauten. Es fragt sich nun, wie wir diese Resultate zu deuten haben, d. h. ob die Fermente dem Plasma, den weißen Blutkörperchen, den Blutplättchen oder den roten Blutkörperchen angehören. Das Plasma glauben wir vollständig entfernt zu haben. Daß es in der Tat ganz außer Betracht fällt, beweisen die Untersuchungen von Dr. Oppler, dem es nicht gelang, mit dem zugehörigen Plasma und den entsprechenden Polypeptiden eine Spaltung nachzuweisen. Es sei erwähnt, daß das Plasma auch Glycyl-l-tyrosin nicht angriff und auch das von demselben Blut stammende Serum keine Einwirkung auf dieses Dipeptid hatte. Bis jetzt ist es uns bei diesen Versuchen in keinem Falle geglückt, eine deutliche Spaltung von Dipeptiden durch Plasma oder Serum herbeizuführen, dagegen ist das Tripeptid dl-Leucyl-glycyl-glycin abgebaut worden. Gerade dieser Versuch läßt hoffen, daß es uns gelingt, den Nachweis zu führen, daß die «proteolytischen», vielleicht auch die peptolytischen Fermente keineswegs einheitlich sind, sondern, daß für die verschiedenen Abbaustufen verschiedenartige Fermente zur Wirkung kommen.¹⁾

¹⁾ Wir hoffen auch, auf Grund dieser Beobachtungen dem Wesen des sogenannten «heterolytischen» Fermentes, welches nach F. Blumenthal (vgl. Ferdinand Blumenthal, Die chemischen Vorgänge bei der Krebskrankheit, Ergebnisse der experiment. Pathol. und Therapie einschließlich Pharmakologie, Bd. I, S. 65, 1907) bei der Carcinom-Kachexie eine Rolle spielt, näher zu kommen. Vergleichende Untersuchungen über

In Frage kommen somit neben den roten Blutkörperchen nur noch die weißen Blutkörperchen und die Blutplättchen. Wir können die Wirkung der letzteren beiden Formelemente nicht mit voller Sicherheit ausschließen, obwohl wir bestrebt waren, sie möglichst auszuschalten. Wir setzen selbstverständlich unsere Versuche nach allen Richtungen fort und werden uns bestreben, den Beweis, daß die roten Blutkörperchen selbst Fermente besitzen, welche Polypeptide spalten, zwingender zu gestalten. Sollte sich diese Annahme bestätigen, dann würden sich für die Funktion der roten Blutkörperchen im Haushalte des tierischen Organismus neue Gesichtspunkte ergeben, und es würde ihre Zellnatur noch mehr zum Ausdruck kommen.

Beachtenswert erscheint uns auch der Umstand, daß die mit Kohlenoxyd vergifteten Blutkörperchen dieselbe Wirkung hatten, wie die unveränderten Formelemente.

Schließlich müssen wir noch die Frage beantworten, ob nicht vielleicht bei den früher beobachteten Hydrolysen von Polypeptiden durch Organpreßsäfte die Blutkörperchen beteiligt waren oder gar allein in Wirksamkeit traten. Ihre Mitwirkung läßt sich nicht ganz ausschließen. Wir haben jedoch die Organe möglichst blutleer gemacht, und außerdem die Hauptmenge des Preßsaftes, die bei 150 Atmosphären Druck sich auspressen ließ, nicht verwendet, sondern erst den von 150—300 Atmosphären Druck erhaltenen. Es können sicher nur Spuren von Blutkörperchenpreßsaft dem angewandten Organpreßsaft beigemischt gewesen sein. Sehr beachtenswert ist es auch, daß der Organpreßsaft in vielen Fällen bedeutend wirksamer war als der Blutkörperchenbrei. Es kann somit kein Zweifel bestehen, daß die fixen Körperzellen eigene Fermente besitzen, welche Polypeptide spalten.

das Verhalten des menschlichen Plasmas unter normalen und pathologischen Verhältnissen gegen Polypeptide sind bereits im Gange und wir ersuchen die Fachgenossen, uns vorläufig dieses Arbeitsgebiet zu überlassen.

Emil Abderhalden.