

Weitere Studien über den Abbau einiger Polypeptide durch die roten Blutkörperchen und die Blutplättchen des Pferdeblutes.

Von

Emil Abderhalden und H. Deetjen.

(Aus dem chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. August 1907.)

In einer früheren Abhandlung¹⁾ ist gezeigt worden, daß der vom Plasma möglichst sorgfältig befreite Blutkörperchenbrei Polypeptide spaltet. Wir haben die Frage offen gelassen, ob das bei der beobachteten Hydrolyse wirksame Ferment den roten Blutkörperchen zukommt, oder aber den wenigen dem Blutkörperchenbrei noch anhaftenden weißen Blutkörperchen und den Blutplättchen. Wir haben diese Frage weiter verfolgt und uns bemüht, einesteils rote Blutkörperchen darzustellen, denen weder weiße Blutkörperchen noch Blutplättchen beige-mischt waren, und andernteils von roten und weißen Blutkörperchen freie Blutplättchen zu gewinnen, um so das gestellte Problem einwandsfrei zu entscheiden. Nach verschiedenen Versuchen ist es uns geglückt, die roten Blutkörperchen aus Ammoniumoxalatblut nach Abtrennung des Plasmas durch Zentrifugieren rein zu gewinnen, indem wir sie durch eine Filzschicht oder noch besser durch eine längere, nicht zu fest gepreßte Watteschicht filtrierten. Leukocyten und Blutplättchen filtrieren langsamer als die roten Blutkörperchen, da sie von den Filz- resp. Waffefasern zurückgehalten werden. Das erste Filtrat enthält meist nur rote Blutkörperchen. Nötigenfalls muß die Filtration wiederholt werden. Die Blutplättchen lassen sich aus Ammoniumoxalatblut leicht in größerer Menge durch fraktioniertes Zentrifugieren (Morawitz) ganz rein gewinnen,

¹⁾ Emil Abderhalden und H. Deetjen, Über den Abbau einiger Polypeptide durch die Blutkörperchen des Pferdes. Diese Zeitschrift, Bd. LI, S. 334, 1907.

und zwar verfahren wir so, daß wir das abgehobene Plasma zunächst 15 Minuten bei 1500 Umdrehungen zentrifugierten, dann das Plasma abhoben, und es nun noch 30 Minuten bei 3000 Umdrehungen abschleuderten. Während das bei 1500 Umdrehungen erhaltene Sediment immer noch einige rote und hauptsächlich weiße Blutkörperchen enthält, ist das beim zweiten Zentrifugieren erhaltene Sediment ganz frei von diesen.

Wir haben zunächst die Frage zu entscheiden gesucht, ob die so gewonnenen roten Blutkörperchen Polypeptide und vor allem Glycyl-l-tyrosin spalten. Sie kann ohne weiteres bejaht werden, denn es gelang uns unter denselben Bedingungen stets, eine deutliche Hydrolyse des zugesetzten Polypeptids nachzuweisen. Auch rote Blutkörperchen, die aus defibriniertem Blute in gleicher Weise, wie angegeben, gewonnen worden waren, spalteten Polypeptide. Wir haben bei diesen Versuchen mehrere Beobachtungen gemacht, die darauf hindeuten, daß das in den roten Blutkörperchen enthaltene Ferment in gewisser Hinsicht recht empfindlich ist. Werden die roten Blutkörperchen nicht sofort verarbeitet, sondern ihre Lösung längere Zeit (Tage) aufbewahrt oder älteres Blut zu ihrer Darstellung verwendet, so zeigt sich eine deutliche Abschwächung der Fermentwirkung, ja sie kann ganz aufgehoben sein. Erwähnenswert ist auch die Beobachtung, daß Plasma und Serum die Fermentwirkung offenbar begünstigen, obwohl beiden das z. B. Glycyl-l-tyrosin spaltende Ferment, wie Kontrollen zeigten, fehlt. Wir können einstweilen nichts Sicheres über die Rolle des Plasmas resp. Serums bei diesen Prozessen aussagen und begnügen uns vorläufig mit der Mitteilung der gemachten Beobachtungen.

Von größtem Interesse ist die Tatsache, daß auch den Blutplättchen peptolytische Fermente zukommen, und zwar spalten sie Glycyl-l-tyrosin außerordentlich rasch und in sehr großem Umfange. Wir haben diese Versuche so oft wiederholt, daß ein Zweifel nach dieser Richtung nicht mehr möglich ist. Dieser Befund scheint uns in Hinsicht auf die Stellung der Blutplättchen zu den anderen Blutelementen von größter Bedeutung. Ganz besonders beachtenswert ist der Umstand, daß kleine Mengen von Blutplättchen Glycyl-l-tyrosin viel inten-

siver und rascher anzugreifen scheinen als viel größere Mengen von roten Blutkörperchen. Diese Beobachtung darf wohl mit als ein Beweis für die selbständige Zellnatur der Blutplättchen angeführt werden. Das den Blutplättchen eigene Ferment wird offenbar sehr leicht durch 0,9%ige Kochsalzlösung alteriert. Wäscht man sie mit 0,9%iger Kochsalzlösung, so verlieren sie bald ihre Fähigkeit, Glycyl-l-tyrosin zu spalten. Es ist möglich, daß die Kochsalzlösung das Ferment direkt schädigt oder aber durch Ausfällung von Proteinen mechanisch behindert. Diese Beobachtung erinnert an das Verhalten des Gerinnungsfermentes. Nach dieser Hinsicht ist es von Bedeutung, daß das peptolytische Ferment auch bei Abwesenheit von Kalk wirksam ist. Plasma, auch erhitztes, scheint auch hier den Fermentprozeß zu begünstigen. Wir sind auch hier trotz mehrfacher Versuche noch zu keiner eindeutigen Erklärung der Plasmawirkung gekommen und wollen vorläufig von jeder Spekulation absehen, bis wir über weitere Versuche nach dieser Richtung verfügen.

Die Tatsache, daß den roten Blutkörperchen und den Blutplättchen ein Ferment zukommt, das der Gruppe der proteolytischen angehört, scheint uns von großem Interesse. Es ergeben sich aus diesem Resultate eine Menge neuer Fragestellungen und manche Befunde auf dem Gebiete der Blutforschung (Hämolyse usw.) erfahren vielleicht eine neue Beleuchtung. Auch auf andere Probleme der Pathologie wirft das Ergebnis dieser Untersuchung vielleicht manches neue Licht, wir erinnern an die auffallende Giftwirkung fremden, in die Blutbahn gebrachten Blutes, an die schweren Folgen ausgehnter Verbrennung, kurz und gut an alle jene Prozesse, bei denen es zur Auflösung von roten Blutkörperchen und zum Zerfall von Blutplättchen in der Blutbahn kommt.

Es bleibt noch manches Problem zu lösen. Einmal interessiert es uns, ob die roten Blutkörperchen und die Blutplättchen auch höhere Polypeptide und schließlich auch Eiweiß abbauen. Erst, wenn wir diese Fragen gelöst haben, werden wir die physiologische Bedeutung der aufgefundenen Fermente im ganzen Umfange erkennen können. Vorläufig liegt die Annahme am nächsten, daß es sich um Fermente handelt, die im

Haushalte der betreffenden Formelemente eine Rolle spielen. Unter normalen Verhältnissen scheinen sie die Zellen nicht zu verlassen, wenigstens enthält das Plasma im allgemeinen keine Glycyl-l-tyrosin spaltende Fermente. Es muß ferner unser Bestreben sein, die aufgefundenen Fermente zu isolieren, d. h. das wirksame Prinzip aus den Zellen abzutrennen. Wir haben nach dieser Richtung bereits Versuche gemacht und solche in Arbeit. Es ist uns vorläufig gelungen, durch Auslaugen von bei niedriger Temperatur eingetrockneten Blutkörperchen mit Wasser ein wirksames Extrakt zu erhalten.

Es sei noch ganz besonders hervorgehoben, daß durch diese Untersuchungen zum ersten Male der scharfe Nachweis geführt worden ist, daß bestimmte Zellen peptolytische Fermente enthalten. Alle Versuche nach dieser Richtung sind bis jetzt stets mit Organextrakten resp. Organpreßsäften ausgeführt worden, wobei natürlich keine bestimmten Zelltypen ausschließlich zur Untersuchung kamen.

Selbstverständlich interessierte uns auch das Verhalten der Leukocyten zu Polypeptiden lebhaft. Es ist uns bis jetzt nicht geglückt, aus Blut absolut reine weiße Blutkörperchen zu gewinnen, dagegen besitzen wir einige Erfahrung über das Verhalten von Lymphe und von sterilem Eiter. Die Lymphe stammte von einem Hunde, der eine Fistel am Ductus thoracicus besaß. Die Lymphe war während etwa 6 Stunden nach Fleischfütterung aufgefangen worden. Wir verdanken ihre Gewinnung der Güte des Herrn Prof. London, St. Petersburg. Die Lymphe war vor ihrem Gebrauch durch eine Chamberlandkerze filtriert worden. Wir haben zwei Versuchsreihen ausgeführt, einmal eine mit Lymphe und Wasser ohne weiteren Zusatz und eine mit Lymphe und Plasma resp. Serum. Es erfolgte erst nach längerer Zeit (4 Tagen) Abscheidung von Tyrosin. Seine Menge war auch nach 6 Tagen noch gering. Da die Möglichkeit vorliegt, daß auf dem etwa 8 Tage dauernden Transport der Lymphe eine Schädigung der Fermente eingetreten war, so können wir ein bestimmtes Urteil nicht abgeben. Wir hatten auch ein Präparat zur Verfügung, das durch Eintrocknen der Lymphe unter vermindertem Druck gewonnen war. Es erwies sich als ganz

inaktiv, d. h. eine Spaltung von Glycyl-l-tyrosin trat mit dem wässerigen Auszug der fein gepulverten Lymphe nicht ein. Auch die Versuche mit sterilem, durch subkutane Injektion von 1 ccm Terpentin bei einem Hunde erzeugtem Eiter führten noch zu keinem eindeutigen Resultate. Eine Spaltung von Glycyl-l-tyrosin trat auch nach Zusatz von Serum nicht ein. Da jedoch der Eiter erst 6 Tage nach der Injektion des Terpentins entnommen war und die Leukocyten eine Bewegung unter dem Mikroskop nicht mehr erkennen ließen, so liegt auch hier die Möglichkeit vor, daß bereits eine Schädigung der Fermente eingetreten war. Dieser Einwurf ist um so naheliegender, als wir ja auch bei den roten Blutkörperchen und den Blutplättchen die Beobachtung gemacht haben, daß langes Stehen und auch längeres Waschen mit 0,9%iger Kochsalzlösung ein deutliches Zurückgehen der Fermentwirkung verursacht, ja es kann schließlich jede Spaltung ausbleiben.

Endlich sei noch kurz erwähnt, daß wir auch über einige Versuche mit roten Blutkörperchen von Hunden verfügen und gefunden haben, daß auch diese Glycyl-l-tyrosin spalten. Auch Hammel- und Kaninchenblutkörperchen greifen dieses Dipeptid energisch an. Es wird verlockend sein, diese Untersuchungen auf eine größere Zahl verschiedenartiger Tierspezies auszudehnen, um festzustellen, ob wir es, was ja sehr wahrscheinlich ist, mit einer den roten Blutkörperchen und den Blutplättchen ganz allgemein zukommenden Eigenschaft zu tun haben.

Was die zu den unten mitgeteilten Versuchen angewandte Methode anbetrifft, so können wir uns auf die früheren Untersuchungen berufen. Da die Isolierung des gesamten Tyrosins, des Glykokolls und des unangegriffen gebliebenen Glycyl-l-tyrosins viel Mühe verursacht, haben wir uns schließlich meist damit begnügt, das ausgefallene Tyrosin durch Zentrifugieren abzutrennen, und es dann aus heißem Wasser umzukristallisieren. Fand keine Abscheidung von Tyrosin statt, so wurde in der üblichen Weise nach Entfernung des Eiweißes durch Einengen des Filtrates auf Tyrosin gefahndet, um etwa in Lösung gebliebenes Tyrosin nachzuweisen.

1. Serie.

Versuche mit roten Blutkörperchen aus Pferdeblut.

Zur Gewinnung von roten Blutkörperchen, denen weder Blutplättchen noch Leukocyten beigemischt waren, wurde Pferdeblut mit 0,15% Ammonoxalat ungerinnbar gemacht und zentrifugiert. Das Plasma wurde abgegossen und die oberste an Leukocyten reiche Schicht abgehoben. Das übrige Sediment vermischten wir mit einer Lösung von 0,9% Kochsalz und 0,1% Ammonoxalat. Das Gemisch zentrifugierten wir und filtrierten nun nach dem Abheben der Flüssigkeitsschicht das Gemisch der roten Blutkörperchen, Blutplättchen und noch vorhandenen Leukocyten durch eine mehrfache Lage von Filz auf einer Nutsche. Die Filzschicht war vorher mit Plasma, das durch Zusatz einiger Tropfen CaCl_2 -Lösung zur Gerinnung gebracht war, durchtränkt worden. Blutplättchen und weiße Blutkörperchen wurden vollständig zurückgehalten. Das Filtrat bestand nur aus roten Blutkörperchen, wie die eingehende mikroskopische Untersuchung ergab. Sie wurden noch dreimal mit 0,9%iger Kochsalzlösung verrührt und zentrifugiert.

Mit den so gewonnenen roten Blutkörperchen sind folgende Versuche ausgeführt worden:

a) 2 g dl-Alanyl-glycin in 10 ccm Wasser gelöst + 10 ccm Blutkörperchenbrei + Toluol. Dauer des Versuches 8 Tage. Isoliert 0,3 g Glykokollesterchlorhydrat (F. 144°), 0,53 g salzsaures d-Alanin ($[\alpha]_{20}^D = + 7,9^\circ$). An Anhydrid wurden zwei Fraktionen gewonnen, von denen die erste $[\alpha]_{20}^D = + 5,4^\circ$ zeigte und 0,4 g wog. Das Produkt schmolz gegen 239°. Eine zweite unreinere Fraktion wog 0,6 g.

b) 1 g Glycyl-l-tyrosin + 10 ccm Blutkörperchenbrei + Toluol. Dauer des Versuches 8 Tage. Nach 4 Tagen war beträchtliche Tyrosinabscheidung bemerkbar. Isoliert worden sind 0,15 g Tyrosin (F. 296°), 0,08 g Glycyl-tyrosinanhydrid (F. 280°). Glykokoll wurde nicht mit Sicherheit nachgewiesen. Bei diesem Versuche sind Verluste bei der Enteiweißung eingetreten und die Ausbeuten aus diesem Grunde ungenau.

2. Serie.

1. Versuche mit roten Blutkörperchen aus Pferdeblut.

Auch hier wurde das Blut mit Ammoniumoxalat (0,15%) ungerinnbar gemacht, dann eine Stunde sedimentiert, das Plasma abgehoben und das Sediment durch eine etwa 30 ccm lange Schicht mäßig fest in einen Trichter gestopfter Watte filtriert. Der völlig von Blutplättchen und Leukocyten freie Brei von roten Blutkörperchen wurde noch dreimal mit 0,9%iger Kochsalzlösung zentrifugiert.

1. 1 g Glycyl-l-tyrosin + 10 ccm Blutkörperchenbrei in 20 ccm Wasser gelöst und Toluol zugesetzt. Nach 24 Stunden war schon Abscheidung von Tyrosin erfolgt. Der Versuch wurde nach 3 Tagen abgebrochen. Das Tyrosin wurde zunächst abzentrifugiert, und das Sediment aus heißem Wasser umkrystallisiert. Erhalten wurden 0,24 g Tyrosin (F. 296°). Es ist dies natürlich nicht die gesamte Menge des abgespaltenen Tyrosins, denn in der Lösung der roten Blutkörperchen war sicher noch Tyrosin aufgelöst. Wir haben nur das ausgeschiedene Tyrosin bestimmt und auch auf die Isolierung des Glykokolls verzichtet, weil es uns nur darauf ankam, den Beweis zu führen, daß das verwendete Dipeptid gespalten sei. Nach unseren reichen Erfahrungen durften wir uns mit dem Nachweis des Tyrosins begnügen.

2. Hier war der Blutkörperchenbrei nicht durch Watte filtriert worden. Er wurde zweimal mit 0,9%iger Kochsalzlösung zentrifugiert, blieb dann 3 Stunden mit der Kochsalzlösung stehen und wurde dann noch einmal mit Kochsalzlösung verrührt und zentrifugiert. Mit diesem Präparat setzten wir 1 g Glycyl-l-tyrosin an. Erst nach 48 Stunden bemerkten wir Abscheidung von Tyrosin. Nach 3 Tagen gewannen wir 0,15 g Tyrosin (F. 297°).

2. Versuche mit Blutplättchen.

Zur Gewinnung der Blutplättchen verwendeten wir dasselbe Blut, das zu obigen Versuchen gedient hatte. Abgehebertes Plasma wurde bei 1500 Umdrehungen 15 Minuten lang

zentrifugiert. Das Plasma wurde nun vorsichtig abgehoben und wieder zentrifugiert und zwar 30 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen. Das Sediment bestand nun aus vollständig reinen Blutplättchen. Dieses Sediment wurde zu den folgenden Versuchen verwendet.

1. 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + ca. 0,2 ccm Blutplättchen-Sediment + 10 ccm Wasser und 5 ccm blutplättchenfreies Plasma. Nach 12 Stunden war bereits Abscheidung von Tyrosin erfolgt. Nach 48 Stunden isolierten wir 0,26 g Tyrosin (F. 300°).

2. Die zu diesen Versuchen verwendeten Blutplättchen waren dreimal mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen worden und zwar in der Art, daß diese während je 5 Minuten mit dem Sediment stehen blieb und dann abgegossen wurde. Von diesem Sediment wurden ca. 0,2 ccm mit 10 ccm Wasser übergossen und zu dem Gemisch 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + 5 ccm 0,9%iger Kochsalzlösung und Toluol zugesetzt. Auch nach 6 Tagen war noch kein Tyrosin zur Abscheidung gelangt, auch ließ sich kein solches isolieren. Eine Spaltung war offenbar nicht erfolgt.

3. Zur Kontrolle setzten wir blutplättchenfreies Plasma mit 0,5 g Glycyl-l-tyrosin an. Zu diesem Gemisch fügten wir 10 ccm Wasser und Toluol. Nach drei Tagen war die Lösung noch ganz klar, auch ließ sich kein Tyrosin nachweisen.

4. Wir stellten ferner einen Versuch mit dem aus wenig roten und weißen Blutkörperchen und Blutplättchen bestehenden Sedimente an, das man erhält, wenn abgehabenes Plasma bei 1500 Umdrehungen 15 Minuten zentrifugiert wird. Ca. 0,5 ccm dieses Gemisches wurden mit 10 ccm Wasser übergossen und 0,5 g Glycyl-l-tyrosin, 5 ccm Plasma und ferner Toluol zugegeben. Nach 12 Stunden war schon starke Abscheidung von Tyrosin erfolgt. Nach 48 Stunden isolierten wir 0,27 g Tyrosin (F. 296°).

5. Dasselbe Sediment, wie das zum Versuch 4 verwendete, verrührten wir dreimal mit 0,9%iger Kochsalzlösung und ließen es dann 5 Minuten lang stehen. Die Kochsalzlösung wurde jedesmal abgegossen. Der Rückstand bestand fast nur aus weißen Blutkörperchen und Blutplättchen. Rote Blutkörperchen waren nur wenige vorhanden. 0,5 g Glycyl-l-tyrosin wurden mit

diesem Gemenge + 10 ccm Wasser + 5 ccm 0,9%iger Kochsalzlösung, angesetzt. Nach 7 Tagen ließ sich noch keine Tyrosinabscheidung nachweisen.

3. Serie.

Versuche mit roten Blutkörperchen aus Pferdeblut.

Der Blutkörperchenbrei war, wie zuvor geschildert, von Plasma befreit und durch Watte filtriert und nachher zur Entfernung von etwa aus anderen Elementen des Blutes herausgelösten und beigemischten Fermenten mit 0,9%iger Kochsalzlösung zentrifugiert worden.

1. Angewandt 1 g Glycyl-l-tyrosin, 10 ccm Wasser, Toluol und 10 ccm dreimal durch Watte filtrierte rote Blutkörperchen aus Ammoniumoxalatblut + 5 ccm Plasma. Unter dem Mikroskop waren keine weißen Blutkörperchen sichtbar. Nach 24stündigem Stehen bei 37° zeigte sich bereits Abscheidung von Krystallen. Der Versuch wurde nach 3 Tagen abgebrochen. Erhalten wurden 0,35 g Tyrosin und 0,15 g Glykokoll als Glykokollesterchlorhydrat (F. = 144°). Glycyl-l-tyrosinanhydrid gewannen wir 0,20 g.

2. Angewandt 1 g Glycyl-l-tyrosin, 10 ccm Wasser, Toluol und 10 ccm dreimal durch Watte filtrierte rote Blutkörperchen aus Ammoniumoxalatblut + 5 ccm Serum. Unter dem Mikroskop waren keine weißen Blutkörperchen zu sehen. Der Versuch wurde nach 3 Tagen abgebrochen. Isoliert wurden 0,40 g Tyrosin, 0,38 g Glykokollesterchlorhydrat (F. = 144°) und 0,18 g Glycyl-l-tyrosinanhydrid.

3. Angewandt 1 g Glycyl-l-tyrosin, 10 ccm Wasser, Toluol und 5 ccm dreimal durch Watte filtrierte rote Blutkörperchen aus defibriniertem Blut. Leukocyten waren nicht vorhanden. Nach 3tägigem Stehen bei 37° wurde der Versuch unterbrochen. Isoliert 0,25 g Tyrosin und 0,19 g Glykokollesterchlorhydrat (F. = 144°), ferner 0,35 g Glycyl-l-tyrosinanhydrid.

4. Angewandt 1 g Glycyl-l-tyrosin, 10 ccm Wasser, Toluol und 10 ccm dreimal durch Watte filtrierte rote Blutkörperchen aus defibriniertem Blut. Leukocyten waren nicht vor-

handen. Nach 3 tägiger Aufbewahrung im Brutraume ließen sich 0,26 g Tyrosin und 0,22 g Glykokollesterchlorhydrat ($F. = 144^{\circ}$) nachweisen und ferner 0,40 g Glycyl-l-tyrosinanhydrid.

5. Angewandt 2 g dl-Alanyl-glycin, 25 ccm Wasser und 10 ccm Blutkörperchenbrei aus Ammoniumoxalatblut + 5 ccm Plasma. Die vom Plasma sorgfältig befreiten Blutkörperchen waren durch Watte filtriert worden und zwar dreimal. Das Gemisch blieb drei Tage im Brutraum. Isoliert wurden 0,56 g Glykokollesterchlorhydrat ($F. = 144^{\circ}$), 0,42 g d-Alanin als salzsaures Salz, $[\alpha]_{20^{\circ}}^D = + 9,2^{\circ}$, ferner 0,95 g Alanyl-glycinanhydrid vom Zersetzungspunkt 235° (unkorr.). Die erste Fraktion (0,25 g) zeigte $[\alpha]_{20^{\circ}}^D = + 4,2^{\circ}$, die zweite (0,11 g) $+ 1,2^{\circ}$, die dritte (0,39 g) $+ 0,08^{\circ}$ und die vierte (0,20 g) war ganz inaktiv.

6. Angewandt 2 g dl-Alanyl-glycin, 25 ccm Wasser und 10 ccm dreimal durch Watte filtrierter Blutkörperchenbrei aus defibriniertem Blut + 5 ccm Serum. Nach dreitägigem Stehen im Brutraum ließen sich 0,38 g Glykokollesterchlorhydrat ($F. = 144^{\circ}$), 0,32 g salzsaures d-Alanin ($[\alpha]_{20^{\circ}}^D = + 8,9^{\circ}$) und 1,2 g Alanyl-glycinanhydrid isolieren. Letzteres zersetzte sich gegen 235° und erwies sich zum größeren Teil als inaktiv. Nur die beiden ersten Fraktionen (0,28 g und 0,21 g) zeigten $[\alpha]_{20^{\circ}}^D = + 3,5^{\circ}$ und $+ 3,2^{\circ}$.

7. 2 g Diglycyl-glycin in 10 ccm Wasser gelöst, nach Zusatz von Toluol und 10 ccm Blutkörperchenbrei aus Ammoniumoxalatblut, der dreimal durch Watte filtriert und auf die Abwesenheit von Leukocyten geprüft war, drei Tage im Brutraum aufbewahrt. Erhalten wurden 1,2 g Glykokollesterchlorhydrat ($F. = 144^{\circ}$) und 0,60 g Glycinanhydrid.

8. 2 g dl-Alanyl-glycyl-glycin in 10 ccm Wasser gelöst, nach Zusatz von 10 ccm dreimal durch Watte filtrierter roten Blutkörperchen aus Ammoniumoxalatblut und von Toluol drei Tage bei 37° aufbewahrt. Isoliert 0,55 g Glykokollesterchlorhydrat ($F. = 144^{\circ}$), 0,45 g salzsaures Alanin ($[\alpha]_{20^{\circ}}^D = + 9,7^{\circ}$) und ferner 0,25 g Glycylalaninanhydrid ($F. = 236^{\circ}$). Es hinter-

blieb außerdem ein Sirup, der offenbar noch etwas Anhydrid und unverändertes Tripeptid enthielt.

4. Serie.

Versuche mit Blutplättchen aus Pferdeblut.

Pferdeblut wurde in Ammoniumoxalat (0,15%) aufgefangen, einige Zeit stehen gelassen und das Plasma abgehoben. Dieses wurde zunächst 15 Minuten bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert, das Plasma abgehoben und nun weiter bei 3000 Umdrehungen 30 Minuten lang zentrifugiert. Das nunmehr erhaltene Sediment bestand ausschließlich aus Blutplättchen. Von ihm wurden ca. 0,3 ccm dreimal je 1 Minute mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen und dann das Sediment mit 20 ccm Wasser übergossen.

1. Zu 4 ccm dieser Blutplättchenemulsion setzten wir 4 ccm 0,9%ige Kochsalzlösung + 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + 2 ccm Wasser und Toluol. Nach 12 Stunden begann schon die Abscheidung von Tyrosin. Nach 3 Tagen isolierten wir 0,12 g Tyrosin (F. 296°).

2. 4 ccm Blutplättchenemulsion + 4 ccm Plasma + 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + 2 ccm Wasser + Toluol. Nach 12 Stunden war schon Tyrosinabscheidung bemerkbar. Nach 3 Tagen isolierten wir 0,17 g Tyrosin (F. 296°).

3. 4 ccm Blutplättchenemulsion wurden mit 4 ccm Plasma, das eine Stunde auf 50° erwärmt worden war, versetzt und das Gemisch nach Zusatz von 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + 2 ccm Wasser und Toluol 3 Tage im Brutraum aufbewahrt. Nach drei Tagen 0,18 g Tyrosin (F. 296°) isoliert.

4. 3 ccm Blutplättchenemulsion mit 4 ccm Plasma, das 6 Minuten auf 70° erhitzt worden war, versetzt und zu dem Gemisch 0,5 g Glycyl-l-tyrosin, 2 ccm Wasser und Toluol zugegeben. Nach drei Tagen 0,15 g Tyrosin (F. 298°) isoliert.

5. Zur Kontrolle wurden zu einer Probe des zu den angeführten Versuchen dieser Serie verwendeten Plasmas 0,5 g Glycyl-l-tyrosin zugesetzt. Auch nach 14 Tagen war noch kein Tyrosin abgeschieden. Es war auch nicht nachweisbar.

5. Serie.

Versuche mit Blutplättchen aus Pferdeblut.

Die Blutplättchen waren in derselben Weise gewonnen worden, wie es bei Serie 4 geschildert worden ist. Das nur aus Blutplättchen bestehende Sediment wurde dreimal 5 Minuten mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen. Von dem so vorbereiteten Sediment wurden ca. 0,4 ccm in 30 ccm Wasser gelöst. Alle Versuche, die mit dieser Emulsion angestellt wurden, sei es mit Zusatz von Plasma oder ohne solchen, erwiesen sich bei Verwendung von je 0,5 g Glycyl-l-tyrosin als negativ. Eine Spaltung fand nicht statt.

6. Serie.

1. Versuch mit Blutplättchen aus Pferdeblut.

Sie wurden in gleicher Weise wie bisher dargestellt. Ca. 0,4 ccm Blutplättchenbrei, der nicht mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen war, wurden mit 20 ccm Wasser übergossen. Mit dieser Emulsion haben wir die folgenden Versuche ausgeführt:

1. 4 ccm der Emulsion + 4 ccm 0,9%ige Kochsalzlösung + 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + 2 ccm Wasser + Toluol. Nach 8 Tagen war noch keine Abscheidung von Tyrosin erfolgt.

2. 3 ccm derselben Emulsion + 5 ccm Plasma + 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + 2 ccm Wasser + Toluol. Schon nach 4 Stunden reichliche Abscheidung von Tyrosin. Nach 24 Stunden wurde der Versuch abgebrochen, das ausgeschiedene Tyrosin abzentrifugiert und aus Wasser umkrystallisiert. Seine Menge betrug 0,22 g (F. 300°).

3. $1\frac{1}{2}$ ccm Blutplättchenemulsion + 5 ccm Plasma + 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + $4\frac{1}{2}$ ccm Wasser + Toluol. Nach 36 Stunden begann Abscheidung von Tyrosin. Nach 6 Tagen isolierten wir 0,04 g Tyrosin (F. 297°).

4. 3 ccm Blutplättchenemulsion + 5 ccm 0,9%ige Kochsalzlösung + 0,5 g Glycyl-l-tyrosin in 2 ccm Wasser + 10 Tropfen einer 5%igen Natriumbicarbonatlösung + Toluol. Nach

24 Stunden war Tyrosin ausgefallen. Seine Menge betrug 0,07 g (F. 298°). Die vom ausgeschiedenen Tyrosin durch Zentrifugieren befreite Flüssigkeit wurde wieder in den Brutraum gebracht. Bald begann wieder die Abscheidung von Tyrosin. Nach 24 Stunden isolierten wir wieder 0,04 g Tyrosin. Bei weiterem Stehen des Gemisches trat immer wieder Abscheidung von Tyrosin ein.

Eine Reihe weiterer Versuche wurden mit Blutplättchen angestellt, die mit 0,9%iger Kochsalzlösung überschichtet und 30 Minuten stehen gelassen worden waren. Die Kochsalzlösung wurde dann abgegossen und das Sediment noch zweimal kurz mit Kochsalzlösung gewaschen. Es wurde dann mit 10 ccm Wasser übergossen und diese Emulsion zu den folgenden Versuchen verwendet.

1. 4 ccm der Emulsion wurden mit 4 ccm 0,9%iger Kochsalzlösung + 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + 2 ccm Wasser und Toluol versetzt. Nach 8 Tagen ließ sich noch keine Tyrosinabscheidung feststellen.

2. 10 ccm der zum Waschen der Blutplättchen verwendeten Kochsalzlösung mit 0,5 ccm Glycyl-l-tyrosin + 2 ccm Wasser und Toluol versetzt. Nach 8 Tagen war noch keine Spaltung eingetreten.

3. 2½ ccm der Blutplättchenemulsion + 5 ccm Plasma + 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + 2,5 ccm Wasser + Toluol. Nach 8 Tagen war noch keine Hydrolyse nachweisbar.

Zur Kontrolle setzten wir auch hier 5 ccm Plasma von demselben Blut, aus dem die Blutplättchen gewonnen waren, mit 0,5 g Glycyl-l-tyrosin an, unter Zusatz von 5 ccm Wasser und Toluol. Nach 8 Tagen ließ sich noch kein Tyrosin nachweisen.

Zu einem weiteren Versuche verwendeten wir Plasma, das wir durch Zentrifugieren von den weißen und roten Blutkörperchen befreit hatten, das jedoch noch Blutplättchen enthielt. 5 ccm dieses Plasmas + 10 ccm Wasser + 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + Toluol. Nach 48 Stunden war Tyrosin abgeschieden. Nach 6 Tagen wurde der Versuch unterbrochen. Isoliert 0,09 g Tyrosin (F. 300°).

2. Versuch mit roten Blutkörperchen aus Oxalatplasma.

Sie wurden zweimal mit Plasma zentrifugiert und durch Watte filtriert.

5 ccm des Blutkörperchenbreis + 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + 10 ccm Wasser + Toluol. Nach 3 Tagen gewannen wir durch Zentrifugieren und Umkrystallisieren des Sedimentes aus Wasser 0,17 g Tyrosin (F. 297°). Die vom abgeschiedenen Tyrosin getrennte Flüssigkeit brachten wir wieder in den Brutraum. Nach 3 Tagen isolierten wir noch 0,06 g Tyrosin.

3. Versuch mit roten Blutkörperchen aus defibriniertem Blut.

Der Blutkörperchenbrei wurde durch Watte filtriert und dann zweimal mit reinem Plasma und einmal mit 0,9%iger Kochsalzlösung zentrifugiert.

5 ccm des so gewonnenen Blutkörperchenbreis + 0,5 g Glycyl-l-tyrosin + 10 ccm Wasser und Toluol. Nach 3 Tagen isolierten wir 0,18 g Tyrosin (F. 300°) und nach weiteren 3 Tagen noch 0,07 g (F. 300°).

Anmerkung: Diese Versuche sind zum Teil mit Hilfe der Mittel der Gräfin Bose-Stiftung ausgeführt worden. Der h. Mediz. Fakultät der Friedrich-Wilhelms-Universität sei für deren Gewährung auch hier herzlich gedankt. Zu besonderem Danke sind wir Herrn Prof. Ostertag, Berlin, verpflichtet, dessen großer Freundlichkeit wir das ganz frische Blut verdanken.