

**249. Ernst Waldschmidt-Leitz und Anton Schöffner:
Über die Bedeutung der Diketo-piperazine für den Aufbau der Proteine.
(Erste Mitteilung zur Spezifität tierischer Proteasen.)**

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München.]

(Eingegangen am 13. Mai 1925.)

Die Frage nach dem Vorkommen von 2.5-Diketo-piperazinen im Protein-Molekül ist in der Literatur der letzten Jahre vielfach erörtert und experimentell bearbeitet worden¹⁾. Die Auffindung solcher Aminosäureanhydride unter den Produkten der partiellen Protein-Hydrolyse insbesondere hat die Auffassung bestärkt, daß diesen Ring-Komplexen eine mehr oder weniger große Bedeutung für den strukturellen Aufbau der verschiedenen Proteine zukommen müsse. Man hat indessen bei der Erörterung dieser Frage dem Umstände zu wenig Rechnung getragen, daß es bisher nicht gelungen ist, eine Aufspaltung solcher Diketo-piperazine durch die spezifischen proteolytischen Enzyme zu beobachten. Den Nachweis der enzymatischen Zerlegbarkeit, der schon für die Sicherung der strukturellen Anschauungen Emil Fischers über die säureamid-artige Verknüpfung der Aminosäuren von entscheidender Bedeutung gewesen ist, wird man auch in diesem Falle zu fordern haben; denn die Forschung hat sich mit der Tatsache auseinanderzusetzen, daß die meisten genuinen Proteine unter der Wirkung beispielsweise der tierischen Verdauungs-Säfte glatt zu ihren einfachen Bausteinen, den Aminosäuren, abgebaut werden, daß also alle vorkommenden stabilen Bindungen durch die bekannten Enzyme des Verdauungs-Trakts angreifbar sind, sofern sie nicht schon unter dem Einfluß der sauren oder alkalischen Reaktion der Sekrete spontan zerfallen.

Die bisher vorliegenden Beobachtungen der Literatur über die Spaltung von Diketo-piperazinen durch proteolytische Enzyme sind nicht eindeutig. So berichtet E. Abderhalden²⁾ über negative, F. Wessely³⁾ über unsichere Ergebnisse bei der Einwirkung von tryptischem und peptischem Enzym sowie von Organ-Extrakten auf einfache Anhydride; auch die von E. Abderhalden und Y. Teruuchi⁴⁾ mitgeteilten Beobachtungen an lebenden Organismen erlauben keine einfache Stellungnahme zur Frage der enzymatischen Spaltbarkeit. Daher hat E. Abderhalden⁵⁾, der der Mitwirkung anhydrid-haltiger Komplexe am Aufbau der Proteine besondere Bedeutung zuschreibt, die Auffassung vertreten und experimentell behandelt, daß „weder Trypsin noch Pepsin an der Aufspaltung von anhydrid-artigen Ringsystemen beteiligt sind, diese vielmehr durch die Säure bzw. das Alkali der Verdauungs-Säfte erfolgt“⁶⁾.

Die Versuche dieser Abhandlung haben zu dem Ergebnis geführt, daß eine Aufspaltung einfacher Diketo-piperazine unter physio-

¹⁾ Siehe dazu E. Abderhalden „Das Eiweiß als eine Zusammenfassung assoziierter, Anhydride enthaltender Elementar-Komplexe“, *Naturwissenschaften* **12**, 716 [1924].

²⁾ E. Abderhalden, *H.* **55**, 384 [1908]; E. Abderhalden und K. Goto, *Ferment-Forschung* **7**, 169 [1923].

³⁾ *H.* **135**, 117, und zwar S. 121 [1924].

⁴⁾ E. Abderhalden und Y. Teruuchi, *H.* **47**, 162 [1906]; E. Abderhalden, *H.* **55**, 384 [1908]; E. Abderhalden und L. Wacker, *H.* **57**, 325 [1908].

⁵⁾ E. Abderhalden, *Pflügers Archiv* **201**, 1 [1923]; E. Abderhalden und K. Goto, *Ferment-Forschung* **7**, 169 [1923].

⁶⁾ *Ferment-Forschung* **7**, 169, und zwar S. 170 [1923].

logischen Bedingungen nicht zu beobachten ist. Die bekannten proteolytischen Enzyme des tierischen Verdauungs-Trakts, Pepsin, Trypsin und Erepsin, bewirken keine nachweisbare Zerlegung, ebensowenig pflanzliche Enzyme wie das Papain oder die Proteasen des Hefe-Pilzes. Sodann hat es sich gezeigt, daß entgegen der von E. Abderhalden⁷⁾ entwickelten Anschauung der Diketo-piperazin-Ring bei der Reaktion der tierischen Verdauungs-Sekrete weitgehende Beständigkeit aufweist, sei es bei der normalen Acidität des Magensaftes, sei es bei der Konzentration der Hydroxyl-Ionen im Darm. Für eine durchgreifende Aufspaltung von Anhydrid-Ringen unter den Bedingungen der tierischen Verdauung ergeben unsere Befunde keinen Anhalt.

Diese Tatsachen zwingen zu einer vorsichtigeren Stellungnahme zu der Frage nach dem Vorkommen anhydrid-artiger Komplexe im Eiweiß. Unterzieht man die Ergebnisse der Forschung nach der Isolierung anhydrid-haltiger Spaltprodukte aus Proteinen einer kritischen Durchsicht⁸⁾, so gelangt man zu der Feststellung, daß eine wesentliche Beteiligung solcher Komplexe am Aufbau des Moleküls nur für einige wenige Vertreter dieser Körperklasse wahrscheinlich gemacht wurde; dahin gehört zufolge den wichtigen Untersuchungen von R. O. Herzog⁹⁾, von R. Brill¹⁰⁾, sowie von E. Abderhalden¹¹⁾ das Fibroin der Seide und, wenn auch nicht so sicher, die Horn-Substanz, das Keratin¹²⁾. Wenn daneben in anderen Fällen von der Isolierung kleiner Mengen von Diketo-piperazinen auch aus anderen Proteinen berichtet wurde¹³⁾, so halten wir diese Befunde für wenig belangreich, zumal die Untersuchungen von P. Brigl¹⁴⁾ und von E. Abderhalden und E. Komm¹⁵⁾ auf die überaus leichte sekundäre Entstehung von Anhydriden aus Dipeptiden aufmerksam gemacht haben.

Diese Sonderstellung der Seiden-Faser und gewisser anderer tierischer Skelett-Substanzen scheint uns in diesem Zusammenhange auch in anderer Hinsicht gestützt zu sein. Wie man schon lange weiß¹⁶⁾, zeichnen sich diese Stoffe aus durch eine ungewöhnliche Resistenz gegenüber dem Angriff proteolytischer Enzyme; sie ließe sich erklären mit der Annahme einer besonderen, anhydrid-artigen Struktur. Vielleicht wird die Entwicklung unserer Erkenntnis vom Aufbau der Proteine dahin führen, daß man unter ihnen verschiedene strukturelle Typen anzunehmen und zu unterscheiden hat

⁷⁾ l. c., Anm. 5.

⁸⁾ siehe dazu E. Abderhalden und E. Komm, H. **134**, 121, 122 [1923/24], und **139**, 147, 150 [1924].

⁹⁾ R. O. Herzog und W. Jancke, B. **53**, 2162 [1920]; R. O. Herzog, Naturwissenschaften **11**, 172 [1923].

¹⁰⁾ A. **434**, 204 [1923].

¹¹⁾ E. Abderhalden und W. Stix, H. **129**, 143 [1923]; E. Abderhalden, H. **131**, 284, und zwar S. 290 [1923]; E. Abderhalden und E. Schwab, H. **139**, 169 [1924].

¹²⁾ E. Abderhalden und E. Komm, H. **132**, 1 [1923/24].

¹³⁾ vergl. P. A. Levene und G. B. Wallace, H. **47**, 143 [1906]; E. Abderhalden, H. **128**, 119, und zwar S. 123 und 124 [1923].

¹⁴⁾ B. **56**, 1887 [1923]. ¹⁵⁾ H. **134**, 121 [1923/24], **139**, 147 [1924].

¹⁶⁾ vergl. Th. Weyl, B. **21**, 1409 [1888], (Seiden-Fibroin); W. Kühne, Unters. a. d. Physiol. Institut Heidelberg **1**, 219 [1877]; W. Kühne und R. H. Chittenden, Zeitschr. für Biol. **26**, 291 [1890], (Keratin).

beispielsweise zwischen einer großen Gruppe enzymatisch leicht zerlegbarer, anhydrid-armer Vertreter einerseits und einer solchen von enzymatisch schwer spaltbaren Proteinen andererseits, für deren Konstitution eine wesentliche Beteiligung von Diketo-piperazinen charakteristisch wäre.

Beschreibung der Versuche.

1. Einwirkung proteolytischer Enzyme auf Glycin-anhydrid.

Die enzymatische Spaltbarkeit des Diketo-piperazins prüfte man unter den für die Enzymwirkung geeignetsten Bedingungen mit der Bestimmung des Aciditäts-Zuwachses in alkohol. Lösung nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz¹⁷⁾. Wenn zur Einstellung des Reaktions-Optimums Phosphat-Lösungen dienten, nämlich bei der Einwirkung von Trypsin und von Erepsin, führten wir die Titrationsen in 80-proz. Methylalkohol aus, der für die alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden gleichfalls anwendbar ist; über die Einzelheiten dieser abgeänderten Bestimmungsweise werden wir demnächst an anderer Stelle berichten. Das angewandte Glycin-anhydrid war frei von Peptid, das Präparat gab keine Reaktion mit Ninhydrin und zeigte in alkoholisch-wässriger Lösung keine Acidität.

Einwirkung von Pepsin: 10.0 ccm einer 1-proz. Lösung von Glycin-anhydrid überließ man mit 0.10 g Pepsin (Merck, 1:4000) unter Zusatz von 2.00 ccm $\frac{1}{5}$ -mol. Citrat-Salzsäure-Puffer von $p_H = 1.6$ a) 24, b) 48 Stdn. bei 30°; danach entsprach der Zuwachs an Acidität a) 0.00, b) 0.08 ccm 0.2-n. KOH und in den gleichzeitig ohne Enzym-Zusatz ausgeführten Kontrollen a) 0.00 und b) 0.10 ccm der Lauge; eine enzymatische Spaltung des Anhydrids war also nicht zu erkennen.

Einwirkung von Trypsin: Auf 10.0 ccm 1-proz. Glycin-anhydrid-Lösung ließen wir bei Gegenwart von 5.00 ccm $\frac{1}{5}$ -mol. Phosphat-Puffer von $p_H = 7.8$ und 30° 5.0 ccm einer durch Enterokinase aktivierten, gut wirksamen Enzym-Lösung aus getrockneter Pankreas-Drüse vom Schwein einwirken, die man zuvor einer weitgehenden Selbstverdauung überlassen hatte. Die gemessene Aciditäts-Zunahme betrug nach a) 1, b) 2 Tagen a) 0.00 und b) 0.05 ccm und in den Kontrollen ohne Enzym a) 0.00 und b) 0.03 ccm 0.2-n. KOH.

Einwirkung von Darm-Erepsin: Das angewandte Enzym-Material war ein Glycerin-Auszug aus der Schleimhaut von Schweine-Dünndärmen und erwies sich als gut wirksam für die Hydrolyse von Dipeptiden (4.0 ccm der Lösung spalteten bei $p_H = 7.8$ und 30° in 1 Stde. 52.4 % von 0.132 g Glycyl-glycin). 4.0 ccm der Enzym-Lösung wirkten bei 30° und $p_H = 7.8$ (eingestellt durch Zusatz von 5.00 ccm $\frac{1}{5}$ -mol. Phosphat-Puffer von $p_H = 7.8 + 0.20$ ccm 0.2-n. NaOH) a) 1, b) 2 Tage lang auf 10.0 ccm 1-proz. Glycin-anhydrid ein; die gemessene Aciditäts-Zunahme betrug a) 0.00, b) 0.04 und in den Kontrollen ohne Enzym a) 0.00 und b) 0.03 ccm 0.2-n. KOH.

Einwirkung von Papain¹⁸⁾: Auf die Lösung von 60 mg Glycin-anhydrid in 10.0 ccm H₂O ließ man 10.0 mg des Papain-Präparates (Merck) bei 40° und $p_H = 5.0$ (eingestellt durch 1.00 ccm $\frac{1}{5}$ -mol. Dinatriumcitrat) einwirken a) ohne Vorbehandlung, b) nach 2-stdg. Aktivierung durch 5 mg HCN bei 40° und $p_H = 5.0$. Die gemessene Aciditäts-Zunahme entsprach nach 14 Stdn. a) 0.03, b) 0.00 ccm 0.2-n. KOH.

Einwirkung von Hefe-Autolysat¹⁸⁾: Die angewandte Enzym-Lösung, ein 6 Monate altes Neutral-Autolysat, war noch gut wirksam: 1.0 ccm bewirkte in 24 Stdn.

¹⁷⁾ B. 54, 2988 [1921].

¹⁸⁾ Dieser Versuch wurde von Hrn. Dr. W. Graßmann im hiesigen Institut ausgeführt, dem wir für die Überlassung des Zahlenmaterials zu großem Dank verpflichtet sind.

bei 40° und $pH = 6.5$ (eingestellt durch 0.50 ccm $\frac{1}{3}$ -mol. Phosphat-Puffer), mit 0.20 g Pepton (ex albumine, Merck) + 8.50 ccm H_2O angesetzt, eine Aciditäts-Zunahme, entspr. 1.99 ccm 0.2-n. KOH.

Man löste 0.235 g Glycin-anhydrid in 40 ccm H_2O + 5.00 ccm $\frac{1}{3}$ -mol. Phosphat-Puffer von $pH = 6.5$ auf und fügte 5.0 ccm neutralisierter Enzym-Lösung hinzu; die Spaltung entsprach nach a) 1, b) 24 Stdn., c) 8 Tagen einer Aciditäts-Zunahme von a) 0.00, b) 0.00, c) 0.06 ccm 0.2-n. KOH.

Die mitgeteilten Beobachtungen bestätigen die Angaben von E. Abderhalden und K. Goto¹⁹⁾ über die Wirkung von Pepsin und Trypsin, und sie erweitern sie mit der Untersuchung des Darm-Erepsins sowie der pflanzlichen Proteasen; eine Zerlegung des Substrates durch die angewandten Enzyme ließ sich in keinem Falle nachweisen. So ist es nicht auf die Wirkung des Darm-Erepsins zurückzuführen, wenn wir in einem besonderen Falle, bei Verwendung eines gealterten Glycerin-Auszugs der Darm-Schleimhaut von Schweinen, eine sehr langsame Aufspaltung des Anhydrid-Rings beobachteten, deren Ursache noch nicht erkannt ist; es gelang nicht, diese Erscheinung durch Anwendung anderer gealterter Extrakte zu reproduzieren. Aus einer größeren Anzahl gleichlaufender Versuche, die wir mit diesem Auszug anstellten, geben wir nachstehend ein charakteristisches Beispiel.

4.0 ccm eines 3 Monate alten Glycerin-Auszugs aus der Darm-Schleimhaut von Schweifen wirkten auf 10.0 ccm einer 1-proz. Lösung von a) Glycin-anhydrid, b) Glycyl-alanin-anhydrid ein, und zwar bei 30° und $pH = 7.8$ (eingestellt durch 5.00 ccm $\frac{1}{3}$ -mol. Phosphat-Puffer + 0.20 ccm 0.2-n. NaOH); die gemessene Aciditäts-Zunahme belief sich, abzüglich des auf die geringe Selbstverdauung des Auszugs entfallenden Anteils, nach 24 Stdn. auf a) 0.63, b) 0.10 ccm und nach 48 Stdn. auf a) 0.67, b) 0.10 ccm 0.2-n. KOH, entspr. einer Spaltung von a) 3.8, b) 1.3 % des Anhydrids nach 2 Tagen. Die zum Stillstand gekommene Spaltung ließ sich durch erneute Enzym-Zugabe weiterführen, man erreichte so nach 2-maligem Zusatz von je 4.0 ccm frischer Enzym-Lösung im Verlauf von 3 Tagen eine Hydrolyse von 8.2 % des Glycin-anhydrids.

2. Beständigkeit von Glycin-anhydrid bei physiologischem pH .

Die Einwirkung von Säure und Alkali auf ein Diketo-piperazin, das Glycyl-alanin-anhydrid, ist zuerst von E. Abderhalden und K. Goto²⁰⁾ eingehender untersucht worden; sie beobachteten dabei eine Aufspaltung des Ringes, rascher unter der Wirkung von Alkali, langsamer bei saurer Reaktion. In neuerer Zeit hat M. Lüdtkke²¹⁾ über ähnliche Ergebnisse bei mehreren anderen Anhydriden berichtet. Es ist gegen diese Befunde der Einwand zu erheben, daß sie die Einhaltung physiologischer Säure- bzw. Alkali-Konzentrationen nicht genügend berücksichtigen; dies gilt insbesondere von der von Abderhalden und Goto veröffentlichten Untersuchung, deren Ergebnisse zu weitgehenden physiologischen Schlußfolgerungen Veranlassung gegeben haben. Prüft man das Verhalten eines Diketo-piperazins, beispielsweise des Glycin-anhydrids, bei der normalen Reaktion tierischer Verdauungs-Säfte, also entweder bei der bekannten Acidität des Magensaftes oder bei dem pH von Pankreas- und Darm-Sekret, so ergibt sich eine viel größere Beständigkeit; zwar beobachtet man eine allmähliche Hydrolyse zum Peptide, insbesondere unter der Wirkung von Alkali, allein ihr Ausmaß bleibt auch bei sehr langer Einwirkung unter der Grenze physiologischer Bedeutung.

¹⁹⁾ Ferment-Forschung 7, 169 [1923].

²⁰⁾ Ferment-Forschung 7, 169 [1923].

²¹⁾ H. 141, 100 [1924].

Die nachfolgende Tabelle veranschaulicht die erhaltenen Resultate; man ermittelte den Verseifungsgrad durch Titration in alkoholischer Lösung.

Tabelle 1.

Beständigkeit von Glycin-anhydrid.

(10.0 ccm 1-proz. Glycin-anhydrid; Nr. 1—4: 2.00 ccm $\frac{1}{8}$ -mol. Citrat-Salzsäure-Puffer; Nr. 5—7: 5.00 ccm $\frac{1}{8}$ -mol. Phosphat-Puffer; Nr. 8—10: 5.00 ccm *n.*-Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer.)

Nr.	Einwirkung Std.	PH	Temperatur °	Aciditäts-Zunahme ccm 0.2-n. KOH	Gebildetes Peptid %
1	4	1.4	37	0.06	1.3
2	8	1.4	37	0.10	2.3
3	24	1.4	37	0.21	4.7
4	48	1.4	37	0.26	5.8
5	24	7.8	30	0.00	0
6	48	7.8	30	0.03	0.7
7	96	7.8	30	0.08	1.8
8	4	8.4	37	0.03	0.7
9	22	8.4	37	0.45	10.2
10	48	8.4	37	0.93	21.1

Dem Japan-Ausschuß der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft sind wir für die zur Verfügung gestellten Mittel zu großem Danke verpflichtet.

250. K. v. Auwers und W. Pfuhl:

Über die Haftfestigkeit organischer Radikale am Stickstoff.

(Eingegangen am 16. Mai 1925.)

Über das in der Überschrift genannte Problem hat v. Braun umfangreiche systematische Untersuchungen angestellt. Aus den übereinstimmenden Ergebnissen der „Bromcyan-“ und der „Chlorphosphor-Methode“ zog er den Schluß, daß die Haftfestigkeit gesättigter aliphatischer Kohlenwasserstoffreste mit steigendem Gewicht wächst, daß Aryle fester gebunden sind als Alkyle, umgekehrt aber Radikale vom Typus des Allyls und seiner Homologen, sowie des Benzyls durch besonders geringe Haftenergie ausgezeichnet sind. Diese Feststellungen stimmten zum großen Teil mit den Erfahrungen überein, die bei Forschungen über Haftfestigkeit von Radikalen an anderen Elementen gesammelt worden waren, doch fehlte es im einzelnen nicht an Widersprüchen. Da eine möglichst sichere Bestimmung des Haftvermögens von Elementen und Radikalen aus verschiedenen Gründen von besonderem theoretischen Interesse ist, haben wir die oben genannte Frage in einer Weise, die von den Braunschen Verfahren etwas abweicht, untersucht.

Die Braunschen Methoden laufen darauf hinaus, daß von 3 Radikalen, die an das gleiche Stickstoffatom gebunden sind, eins als Bromid oder Chlorid abgespaltet wird. Wir haben dagegen die Spaltung quartärer Indazoliumsalze von der Form $\left[\text{C}_6\text{H}_4 \begin{array}{c} \text{CH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N} \end{array} \text{N.R} \right] \text{X}$ (X = Halogen) bei höherer Temperatur untersucht. Dieses Verfahren ist insofern komplizierter, als die