

und zeigen eine immer wiederkehrende mittlere Größe, die sich auch in den kolloiddispersen Systemen dieser Substanzen als Teilchengröße hat feststellen lassen. Den wichtigsten Fortschritt könnte man hier erwarten, wenn es gelänge, die experimentellen Angaben über diese Substanzen zu ergänzen und zu vertiefen; hierzu würde man wohlkristallisierte Präparate benötigen, welche genaue goniometrische Vermessung und Justierung gestatten. Es ist also auch an dieser Stelle wieder die Experimentierkunst des präparativen Chemikers, an der es liegt, die Möglichkeit einer weiteren Erforschung der hochmolekularen Substanzen mit den Methoden der röntgenographischen Struktur-Analyse zu eröffnen.

---

#### 480. Ernst Waldschmidt-Leitz: Zur Struktur der Proteine.

(Zusammenfassender Vortrag, gehalten auf Veranlassung der Deutschen Chemischen Gesellschaft auf der 89. Versammlung der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte in Düsseldorf am 23. September 1926; eingegangen am 2. Oktober 1926.)

Bei der strukturellen Erforschung der Proteine dürfte den Methoden des enzymatischen Abbaus, wengleich sie hier noch zu wenig hervorgetreten sind, eine hervorragende Rolle zukommen. Für die Chemie der Eiweißstoffe, zu deren Abbau bis zu den Bausteinen, den Amino-säuren, im tierischen Verdauungstrakt das Zusammenwirken von drei oder vier verschiedenen und spezifischen enzymatischen Katalysatoren erforderlich ist, darf man vielleicht mehr noch als bei den Polysacchariden von der Anwendung enzymatischer Methoden entscheidende Erkenntnisse erwarten. So sind die grundlegenden Anschauungen Emil Fischers über die Beteiligung von Peptid-Bindungen an der Struktur der Proteine nicht so sehr durch die Auffindung einfacher Peptide unter den Produkten des hydrolytischen Eiweiß-Abbaus, als vielmehr durch die enzymatische Spaltbarkeit der synthetisch bereiteten Körper gestützt worden, und sie wurden ergänzt und vertieft durch die Erfahrung, daß der Angriff der proteolytischen Enzyme fast ausschließlich die aus den natürlich vorkommenden optischen Antipoden der Amino-säuren aufgebauten Peptide betraf. Allein in den Gedankengängen, die viele der neueren Wege in der Eiweiß-Forschung geleitet haben, hat man der Bedeutung der enzymatischen Kontrolle noch zu wenig Beachtung geschenkt. Am ausgesprochensten tritt die geringe Wertschätzung enzymatischer Methoden in den Untersuchungen von N. Troensegaard<sup>1)</sup> zutage, in welchen auch die Verfahren des fermentativen Abbaus als „zu gewaltsam“ angesehen werden, „um die wirklichen Bausteine“ der Proteine „zu liefern“.

Zu einer solchen Einstellung mag die Erfahrung beigetragen haben, daß es bisher nur in vereinzelten Fällen gelungen war, einigermaßen charakterisierte Zwischenprodukte der enzymatischen Proteolyse zu fassen; der enzymatische Abbau schien in seinem Verlaufe kaum spezifischer als der durch Wasserstoff- oder Hydroxyl-Ionen katalysierte. Die einzigen Zwischenprodukte, die man beschrieb, waren die Peptone der Trypsin-Verdauung, gewisse resistere Peptide, sowie die Peptone der Pepsin-Einwirkung, die

---

<sup>1)</sup> N. Troensegaard und J. Schmidt, H. **133**, 116, und zwar S. 117 [1923/24].

man gleichfalls als Peptid-Gemische ansah, aber nicht aufzulösen vermochte. Diese Erfahrungen insgesamt schienen auch der in neuerer Zeit in den Vordergrund getretenen Auffassung Recht zu geben, wonach der Vorgang der Proteolyse sich zusammensetzt aus einer primären Desaggregation polymerer Komplexe und aus einer darauffolgenden Hydrolyse der einfacheren Grundkörper; man glaubte zwischen den eigentlichen Proteasen mit überwiegend desaggregierender Funktion einerseits und den peptid-spaltenden Enzymen andererseits unterscheiden zu können<sup>2)</sup>. Allein die Unterscheidung auf dieser Grundlage, die unzureichend gestützt war, hat der experimentellen Prüfung nicht standzuhalten vermocht.

Die Erkenntnis der spezifischen Aufgaben der einzelnen Proteasen war erschwert durch den Umstand, daß viele derselben, beispielsweise in den tierischen Geweben und Sekreten, in Gemischen vorliegen, und daß ihre Einzelwirkungen nicht unterschieden werden konnten; dies ist auch der Grund, warum man so selten definierte Zwischenstufen des proteolytischen Abbaus beobachtet hat. So liefert die Pankreas-Drüse in ihren Auszügen und Sekreten ein Gemisch zweier proteolytischer Enzyme von ausgesprochener Spezifität, Trypsin und Erepsin, deren besondere Wirkungen man lange nicht erkannte; sie waren zudem verschleiert durch den Einfluß eines spezifischen Aktivators für das tryptische Enzym, der Enterokinase, die von der Darm-Schleimhaut in fertiger Form, von der Pankreas-Drüse selbst in Form einer Vorstufe abgedermt wird und deren besondere Aufgabe man falsch gedeutet hatte; man hielt sie nämlich nach den Untersuchungen von W. M. Bayliss und E. H. Starling<sup>3)</sup> für ein Enzym, und man verstand ihre Wirkung auf Trypsin als eine enzymatische Umwandlung dieses Katalysators aus einer unwirksamen Vorstufe in die aktive Form.

Eine befriedigende Lösung dieser Fragen ist erst durch die Anwendung neuer präparativer Methoden, der Adsorptionsmethoden, erreicht worden. In einer ersten Untersuchung<sup>4)</sup> war es gelungen zu zeigen, daß das aktivierte Trypsin, also das System Trypsin-Enterokinase, sich durch die Adsorption mit Tonerde wiederum in seine Komponenten, nicht-aktiviertes Enzym und Aktivator, zerlegen läßt; die Aktivierung des Trypsins durch Enterokinase besteht also nicht, wie man annahm, in einer enzymatischen Umwandlung von Trypsinogen in Trypsin; es bildet sich vielmehr eine dissoziabile Verbindung des Enzyms mit dem Aktivator, die die Affinitätsverhältnisse des Enzyms beeinflußt. In einer folgenden Arbeit, die Frl. Dr. A. Harteneck mit mir ausgeführt hat<sup>5)</sup>, ist es dann gelungen, auch das Gemisch von Trypsin und Erepsin, wie es sich in den Pankreas-Auszügen findet, zu fraktionieren: durch Einwirkung von Aluminiumhydroxyd, der stabilen Modifikation  $Al(OH)_3$ <sup>6)</sup>, auf die angesäuerten Enzym-Gemische erreicht man nämlich, daß das ganze Erepsin den Lösungen entzogen wird, während in den Mutterlaugen der Adsorption das erepsin-freie Trypsin zurückbleibt; das Erepsin gewinnt man dann aus den Tonerde-Adsorbaten frei von Trypsin durch Elution mit verd. Alkali.

<sup>2)</sup> siehe dazu C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, 5. Aufl., Leipzig 1925/26, 2. Bd., S. 811ff., sowie S. 1208; H. Pringsheim, Naturwiss. **13**, 1084 und zwar S. 1087 [1925].

<sup>3)</sup> Journ. of Physiol. **30**, 61 [1904], **32**, 129 [1905].

<sup>4)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, H. **132**, 181 [1923/24].

<sup>5)</sup> H. **147**, 286 [1925].

<sup>6)</sup> siehe dazu R. Willstätter, H. Kraut und O. Erbacher, B. **58**, 2448 [1925].

Diese Trennung von Trypsin und Erepsin in den Auszügen der Pankreas-Drüse hat den Weg eröffnet zu einer gesicherten Prüfung ihrer spezifischen Wirkungen sowohl wie auch der Bedeutung des spezifischen Trypsin-Aktivators, der Enterokinase, für die Aktivität dieses Enzyms. Die Auswahl der Substrate, die dem Angriff der getrennten, einheitlichen Enzyme unterworfen wurden<sup>7)</sup>, betraf einmal eine Reihe einfacher Peptide, ferner ein Pepton der Pepsin-Verdauung, sowie einfacher zusammengesetzte basische Proteine, wie Protamin und Histon, und endlich eine größere Anzahl höhermolekularer Proteine aus verschiedenen Gruppen dieser Stoffe. Es hat sich, wie Tab. 1 veranschaulicht, ergeben, daß die spezifischen Wirkungen der beiden Enzyme strenger, als man annahm, zu unterscheiden sind. Alle untersuchten Dipeptide wurden von Erepsin hydrolysiert, keines derselben dagegen von dem tryptischen Enzym, auch nicht ein Tripeptid, das man bisher zu den durch Trypsin spaltbaren zählte.

Tabelle 1.

## Spezifität von Trypsin und Erepsin.

(Angaben bedeuten: — = keine nachweisbare, + = positive, ++ = verstärkte Hydrolyse).

Substrat	Enzym			
	Erepsin aus		Trypsin	
	Darm	Pankreas	aktiviert <sup>†</sup>	nicht aktiviert
Glycyl-glycin .....	+	+	—	—
Glycyl-alanin .....	+	+	—	—
Glycyl-tyrosin .....	+	+	—	—
Alanyl-glycin .....	+	+	—	—
Leucyl-glycin .....	+	+	—	—
Leucyl-alanin .....	+	+	—	—
Leucyl-glycyl-glycin .....	+	+	—	—
Pepton (ex alb., Merck) ....	—	—	++	+
Clupein .....	—	—	++	+
Thymus-Histon .....	—	—	+	—
Casein .....	—	—	+	—
Fibrin .....	—	—	+	—
Gelatine .....	—	—	+	—
Gliadin .....	—	—	+	—
Zein .....	—	—	+	—
Eier-Albumin .....	—	—	+	—
Ricinus-Globulin .....	—	—	+	—

Weiter hat es sich gezeigt, daß die Wirkung des Erepsins auf einfache Peptide beschränkt ist: weder Pepton, noch Protamin oder Histon, noch irgend ein anderes der untersuchten Proteine war durch das reine Erepsin zerlegbar, aber alle diese Präparate wurden durch Trypsin hydrolysiert; in keinem dieser Fälle war eine Vertretbarkeit der beiden Enzyme nachzuweisen. Sodann ist an den besprochenen Beispielen der Einfluß der Aktivierung durch

<sup>7)</sup> E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, H. **149**, 203 [1925]; E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner, H. **151**, 31 [1925/26].

Enterokinase auf die Spezifität des Trypsins geprüft worden, das unter den Bedingungen seiner Darstellung in nicht-aktivierter Form erhalten wurde, und das in reinerem Zustande auch keine Selbst-aktivierung mehr erleidet; es hat sich gezeigt, daß das Trypsin für die Spaltung höhermolekularer Proteine, wie es ja bekannt ist, der Aktivierung durch Enterokinase bedarf, daß dagegen in gewissen anderen Fällen, so bei Clupein oder auch Pepton, das Enzym auch ohne den Aktivator beträchtliche proteolytische Wirkungen ausübt. Es geht daraus hervor, daß dem Aktivator lediglich die Bedeutung eines Hilfsstoffs für bestimmte enzymatische Funktionen zukommt, auf die ich später noch näher eingehen werde.

Es war bei der ausgeprägten Spezifität dieser drei Protease-Typen zu erwarten, daß es gelingen würde, den hydrolytischen Abbau von Proteinen durch fraktionierte Einwirkung einheitlicher Enzyme an bestimmten, charakteristischen Zwischenstufen festzuhalten und auf diesem Wege zu definierteren und gleichartigen Reaktionsprodukten zu gelangen, als sie bisher erhalten wurden. Wir haben daher am Beispiel zweier einfacher zusammengesetzter basischer Proteine, des Clupeins aus der Herings-Milch, eines Vertreters der Protamine, und des Histons aus der Thymus-Drüse, mit dem Versuch begonnen, durch die fraktionierte Hydrolyse mit einheitlichen Proteasen Einblick in die Anordnung ihrer Bausteine zu gewinnen.

Die Zusammensetzung der Protamine, die in den bahnbrechenden Untersuchungen von A. Kossel und seinen Schülern weitgehend aufgeklärt worden ist, ist verhältnismäßig einfach und gleichartig; dies ergibt sich einmal aus dem übereinstimmenden Verhältnis ihres Gehaltes an Diamino-säuren und Monoamino-säuren wie 2 : 1, entsprechend ihrem überwiegend basischen Charakter, sodann aus dem besonderen Verhalten dieser Körper gegenüber enzymatischem Angriff, das in ihrer Unangreifbarkeit durch Pepsin auf der einen Seite, zum anderen in einer Spaltbarkeit schon durch das nicht-aktivierte Trypsin zum Ausdruck kommt. Für das Clupein ergibt die Analyse der Spaltprodukte nach A. Kossel und H. D. Dakin<sup>8)</sup> eine Zusammensetzung von 16 Mol. Arginin : 4 Mol. Prolin : 2 Mol. Valin : 1 Mol. Serin : 1 Mol. Alanin, wenn auch die relative Beteiligung der Monoamino-säuren, die für die Beurteilung der geringsten möglichen Molekulargröße maßgebend ist, nicht mit Sicherheit ermittelt zu sein scheint. Die Versuche der Literatur zur partiellen Hydrolyse der Protamine sind unbefriedigend geblieben. Die Aufspaltung des Moleküls durch Einwirkung verd. Säure, die zur Bildung der sogen. Protone führt, zu Körpern, die man mit den Peptonen verglich, hat noch in keinem Falle eine sichere Kennzeichnung der Reaktionsprodukte erlaubt. Bei der enzymatischen Hydrolyse andererseits sind keine Zwischenstufen des Abbaus beobachtet worden<sup>9)</sup>, die angewandten Enzym-Präparate waren nicht enzymatisch einheitlich.

Die fraktionierte Hydrolyse des Clupeins durch die drei einheitlichen Proteasen, Trypsin, Trypsin-Kinase und Erepsin, die die HHrn. A. Schäffner und Dr. W. Graßmann<sup>10)</sup> mit mir vorgenommen haben, und die mit Kombinationen der drei Enzyme von wechselnder Reihenfolge ausgeführt wurde, vermittelt nun ein ganz anderes, neuartiges Bild von der

<sup>8)</sup> H. 41, 407, und zwar S. 414 [1904].

<sup>9)</sup> vergl. M. Takemura, H. 63, 201 [1909]; F. Rogozinski, H. 79, 398 [1912].

<sup>10)</sup> H. 156, 68 [1926].

Struktur des Moleküls. Man verfolgte den Verlauf der Hydrolyse, deren Ergebnisse Tab. 2 veranschaulicht, einerseits durch Bestimmung der freigelegten Carboxyle in alkohol. Lösung, andererseits der freien  $\alpha$ -Amino-gruppen nach van Slyke. Die gemeinsame Bedeutung dieser Versuche beruht auf der Tatsache, daß die Wirkung der einzelnen Enzyme nach einer jeweils bestimmten Leistung zum Stillstand kommt, und daß diese einzelnen enzymatischen Leistungen, durch die Bildung chemisch faßbarer Gruppen gekennzeichnet, in einfachen, ganzzahligen Verhältnissen zueinander stehen.

Tabelle 2.

Clupein-Hydrolyse durch Trypsin, Trypsin-Kinase, Erepsin; Reihenfolge und Leistung.

(Hydrolyse von 0.20 g Clupein-Sulfat = 0.142 g wasser- und asche-freies Clupein; Leistungseinheit angenommen entspr. 0.90 ccm 0.2-n. COOH).

Vers.-Nr.	Reihenfolge der Enzyme	Zuwachs (ccm 0.2-n.)		Leistung	Leistungs-Verhältnis
		COOH	NH <sub>2</sub>		
1	Trypsin .....	0.90	0.90	1.0 ± 0.03	1
	Trypsin-Kinase .....	2.67	2.36	3.0 ± 0.04	3
	Darm-Erepsin .....	0.94	0.96	1.0 ± 0.05	1
	Summe .....	4.51	4.22	5.0	
2	Trypsin .....	0.92	0.92	1.0 ± 0.03	1
	Darm-Erepsin .....	0.93	0.98	1.0 ± 0.03	1
	Trypsin-Kinase .....	0.89	0.83	1.0 ± 0.04	1
	Darm-Erepsin .....	1.70	1.58	1.9 ± 0.07	2
	Summe .....	4.44	4.31	4.9	
3	Trypsin-Kinase .....	3.13	3.15	3.5 ± 0.03	2
	Darm-Erepsin .....	1.53	1.72	1.7 ± 0.04	1
	Summe .....	4.66	4.87	5.2	

So ergibt die Analyse der Tabelle für den Aufbau des Clupeins, daß unter den enzymatisch lösbaren Bindungen seines Moleküls Gruppen zu unterscheiden sind, die sich mit Bruchteilen von Fünfteln und Dritteln des hydrolytischen Gesamtvorgangs beteiligen; der Vergleich der enzymatischen Leistungen in den Versuchen 1 und 2 veranschaulicht die Teilung der spaltbaren Bindungen nach fünf, Versuch 3 ihre Teilung nach drei Untergruppen, aus deren Kombination sich Schlußfolgerungen auf die Gliederung des Moleküls ergeben. Ähnlich verläuft die Aufteilung des Moleküls nach der Einschaltung einer pflanzlichen Protease, des Papains in Form seiner Blausäure-Verbindung, in den Gang der Hydrolyse; auch dieses Enzym beteiligt sich, ebenso wie Trypsin, mit einem Fünftel am gesamten enzymatischen Abbau,

sowohl bei seiner Einwirkung auf das ursprüngliche Protamin wie auch nach vorausgegangener Hydrolyse durch Trypsin.

Es ist mir leider nicht möglich, auf die zahlreichen Aussagen, die die Versuche über die spezifischen Funktionen der einzelnen Enzyme erlauben, näher einzugehen, ich muß mich auf die wesentlichsten Feststellungen beschränken. So ergibt der Vergleich der Versuche 1 und 2 der Tabelle, daß es gelingt, den Wirkungsbereich des Systems Trypsin-Kinase, nämlich seine Leistung an zweiter Stelle nach derjenigen des Trypsins (Vers. 1), mit drei Fünfteln des hydrolytischen Gesamtvorgangs, durch eine Veränderung in der Reihenfolge der angewandten Enzyme weiter zu zerlegen; durch die vorausgehende Einwirkung von Darm-Erepsin (Vers. 2) wird nämlich erreicht, daß die gesamte, für Trypsin-Kinase noch gemessene Leistung sich nunmehr auf ein Fünftel beschränkt, während ihre restlichen Anteile, zwei Fünftel der Gesamt-Hydrolyse, sich der ereptischen Wirkung hinzugesellen.

Diese Beziehungen, die sich ähnlich auch durch andere Beispiele belegen lassen, geben zu erkennen, daß die untersuchten Enzyme sich in ihren Wirkungen, soweit diese sich auf die Auflösung bestimmter chemischer Bindungen beziehen, gegenseitig in gewissem Umfange vertreten können, wenngleich man den Wirkungsbereich eines jeden von ihnen jeweils scharf abgegrenzt findet. Es ist daraus zu folgern, daß sich die spezifische Einstellung der einzelnen Proteasen nicht auf die Aufspaltung verschiedener chemischer Bindungen allein beziehen kann; für die spezifische Angreifbarkeit einer bestimmten Bindung im Molekül durch eine der Proteasen scheint vielmehr außerdem die Natur oder die Anzahl der benachbarten Amino-säure- oder Peptid-Komplexe maßgebend zu sein.

Es könnte nach diesen Beobachtungen scheinen, daß die besonderen Aufgaben der einzelnen Proteasen bei der Hydrolyse der Proteine nicht deutlich genug zu unterscheiden wären; andere Erfahrungen erlauben indessen eine genauere Kennzeichnung der besonderen enzymatischen Funktionen. Wie die spezielle Analyse der Spaltprodukte am Beispiel des Clupeins ergeben hat, besteht die Wirkung des nicht-aktivierten Trypsins wie die von Papain-Blausäure in allen untersuchten Fällen ausschließlich in der Freilegung von Peptiden, also in der Zerlegung des Moleküls in größere Bruchstücke, so wie auch die Wirkung des Pepsins auf genuine Proteine beschrieben wird; sie ist scharf unterschieden von der Wirkungsweise der beiden anderen Proteasen, Trypsin-Kinase und Erepsin, die überwiegend in der Bildung freier Amino-säuren zum Ausdruck kommt. Dieser Unterschied in der Wirkungsweise von Trypsin einerseits und seiner Enterokinase-Verbindung andererseits vermittelt eine Anschauung von dem spezifischen funktionellen Einfluß der Enterokinase.

Aus den mitgeteilten Versuchen ergeben sich ferner einige wichtige Feststellungen über den Aufbau des Clupeins. So findet man den Betrag der freigelegten Carboxyle und Aminogruppen, wie die Tabelle zeigt, auf jeder einzelnen Stufe des Abbaus äquivalent, die Summe der gebildeten sauren Gruppen entspricht einem durchschnittlichen Werte von 4.53, die der Aminogruppen einem solchen von 4.58 ccm 0.2-n. für die Hydrolyse von 0.20 g Clupein-Sulfat. Aus dieser Feststellung der Äquivalenz von COOH und NH<sub>2</sub> ergeben sich zwei wichtige Schlußfolgerungen: Es geht nämlich einmal daraus hervor, daß die Guanidin-Gruppe des Arginins, die nach dem Verfahren von van Slyke nicht bestimmt wird, entsprechend den Anschauungen

Kossels an den Peptid-Bindungen des Moleküls nicht beteiligt ist. Und weiter geht daraus hervor, daß auch die NH-Gruppe des Prolins, die mit salpetriger Säure gleichfalls nicht bestimmbar ist, bei der enzymatischen Hydrolyse nicht freigelegt wird. Aber sie liegt auch im Clupein selbst nicht frei. Das haben schon A. Kossel und N. Gawrilow<sup>11)</sup> aus der Tatsache geschlossen, daß das Clupein keine formol-titrierbaren Gruppen enthält, und es stehen unsere Beobachtungen damit in Einklang, die für das Clupein auch bei der alkohol. Titration nur eine geringfügige Acidität ergeben. Wir folgern daraus, daß die enzymatische Hydrolyse, die wir beschreiben und die in allen Fällen zu demselben Endzustande führt, unvollständig ist, und daß bei diesem Abbau Prolin-Peptide zurückbleiben mit tertiär an Carboxyl gebundenem Stickstoff. Diese Folgerung ergibt sich auch aus der Feststellung, daß der Gesamtbetrag der freigelegten Aminogruppen den Angaben der Literatur sowohl wie auch dem berechneten Werte für eine vollständige Hydrolyse entspricht, daß dagegen die Menge der freigelegten Carboxyle gegenüber der theoretisch berechneten einen Fehlbetrag aufweist, welcher etwa dem Prolin-Gehalte des Moleküls gleichkommt.

Es ist von Interesse, mit diesen Feststellungen die Beobachtungen zu vergleichen, die Hr. G. Künstner<sup>12)</sup> mit mir bei der fraktionierten Hydrolyse eines anderen basischen, aber komplizierter zusammengesetzten Proteins, des Histons aus der Thymus-Drüse, gewonnen hat. Unterwirft man dieses Protein dem fraktionierten Abbau mit Trypsin-Kinase und dann mit Erepsin, so ergibt die Messung der gebildeten Carboxyle, wie aus Tab. 3 hervorgeht, ein Verhältnis der beiden enzymatischen Leistungen wie 1 : 1. Dagegen bleibt die Menge der bestimmaren Aminogruppen, die während des ganzen Verlaufs der tryptischen und in den ersten Abschnitten der ereptischen Wirkung äquivalent gefunden wird, in der zweiten Hälfte der Erepsin-Wirkung beträchtlich hinter der Menge der Carboxyle zurück.

Tabelle 3.

Hydrolyse des Histons durch Trypsin-Kinase und Erepsin.

(Die Angaben beziehen sich auf 0.20 g Histon-Sulfat; Leistungs-Einheit angenommen entspr. 4.25 ccm 0.2-n. COOH.)

Reihenfolge der Enzyme	Zuwachs (ccm 0.2-n.)		Leistung
	COOH	NH <sub>2</sub>	
Trypsin-Kinase .....	4.25	4.30	1.0
Darm-Erepsin a) .....	2.01	2.01	0.5
„ b) .....	2.34	1.19	0.5

Es ist für die Erklärung dieser Erscheinung von Bedeutung, daß die Alkalität der Versuchslösung, die in den anderen Abschnitten der Proteolyse infolge der gebildeten amphoteren Reaktionsprodukte stark zurückgeht, auf dieser letzten Stufe der Hydrolyse eine beträchtliche Zunahme erfährt, z. B. von  $p_H = 7.8$  auf  $p_H = 8.4$ . Es geht daraus hervor, daß in diesem Abschnitte nicht etwa, wie man der Tabelle entnehmen möchte, mehr saure als basische, sondern vielmehr stärker basische, nur nicht erfaßbare Gruppen freigelegt werden, vermutlich Guanidingruppen oder die  $\epsilon$ -Aminogruppen des

<sup>11)</sup> H. 81, 274 [1912].    <sup>12)</sup> Noch unveröffentlicht.

Lysins. Daraus ergäbe sich ein prinzipieller Unterschied in der Konstitution der Protamine und des Histons: Die Guanidgruppe des Arginins oder die entsprechenden Gruppen der anderen Diamino-säuren, die in den Protaminen freiliegen, scheinen in den Histonen an den Peptid-Bindungen des Moleküls beteiligt zu sein, und es ist sehr bemerkenswert, daß bei der Hydrolyse des Histons gerade das auf einfache Peptide eingestellte Enzym, das Erepsin, die Aufspaltung dieser Bindungen vollzieht. Es wäre nahelegend, auch die bei der Wirkung des Pepsins in anderen Fällen beobachtete<sup>13)</sup>, scheinbar stärkere Zunahme saurer Gruppen auf einen solchen Vorgang und nicht, wie man auch diskutiert hat, auf die Auflösung ester-artiger Bindungen zurückzuführen.

Es ist besonders hervorzuheben, daß der gesamte Prozeß der hydrolytischen Aufspaltung des Clupeins, dessen einzelne Stufen einfache quantitative Beziehungen zueinander aufweisen, in der Lösung von Peptid-Bindungen besteht. Die Annahme von N. Troensegaard<sup>14)</sup>, es finde bei der Proteolyse eine sekundäre Bildung von  $\alpha$ -Amino-säuren aus labilen Oxy-pyrrolen statt, die Peptid-Bindungen seien also nicht im Molekül vorgebildet, ist für den Fall der Protamine auszuschließen. Auch die Vorstellung, als sei der Abbau der Proteine in wesentlichen Teilen ein Vorgang der Desaggregation, zu deren Auslösung es spezifischer Enzyme bedürfe, wird sich nicht aufrechterhalten lassen. Wenn Desaggregationsvorgänge an der Hydrolyse der Proteine teilhaben, so sind dies nur Nebenerscheinungen der Auflösung von Säureamid-Bindungen; besondere desaggregierende Funktionen lassen sich für keines der von uns angewandten Enzyme erkennen. Die Anschauungen endlich, die einen Aufbau der Proteine aus einfachen<sup>15)</sup> oder polymeren<sup>16)</sup> Diketo-piperazinen diskutieren, finden in der beobachteten Gliederung des Moleküls, in welchem Untergruppen zu Fünfteln und zu Dritteln unterschieden werden, und in der spezifischen Einstellung der einzelnen Enzyme auf diese keine Stütze, wenn man die Zusammensetzung des Proteins berücksichtigt. Man darf wohl erwarten, daß die Beschreibung der spezifischen Reaktionsprodukte auf den einzelnen Zwischenstufen der Aufspaltung, in der wir Fortschritte gemacht haben, zur weiteren Klärung dieser Fragen beitragen wird.

---

<sup>13)</sup> vergl. H. Steudel, J. Ellinghaus und A. Gottschalk, H. **154**, 21, 198 [1926].

<sup>14)</sup> Z. Ang. **38**, 623 [1925].

<sup>15)</sup> vergl. E. Abderhalden, Naturwiss. **12**, 716 [1924].

<sup>16)</sup> vergl. M. Bergmann, A. Miekeley und E. Kann, A. **445**, 17 [1925].