

Gesamtausbeute an reiner 2.3.4.6-Tetramethyl-glykose 1.27 g. Schmp. 81–82°.

$$[\alpha]_D^{24} = (100 \times 0.85) : (1 \times 1.032) = + 82.3^{\circ} \text{ (Endwert in Wasser).}$$

Die wäßrige Lösung wurde mit Bariumcarbonat neutralisiert, im Vakuum eingedampft und der Rückstand mehrfach mit Äther ausgekocht. Aus der ätherischen Lösung wurde ein Sirup gewonnen, aus dem durch öfteres Umkrystallisieren aus Schwefelkohlenstoff, zuletzt aus Äther-Petroläther, insgesamt 0.08 g reine 2.3.6-Trimethyl-glykose gewonnen wurden. Schmp. 100–103°.

$[\alpha]_D^{22} = (100 \times 0.67) : (1 \times 0.9570) = + 70.01^{\circ}$ (Mikro-Drehung, Endwert in Wasser).
3.086 mg Sbst.: 12.424 mg AgJ (Mikro-Zeisel). — Ber. OCH₃ 41.9. Gef. OCH₃ 41.2.

Aus den Mutterlaugen wurden noch weitere Mengen Sirup gewonnen, die langsam krystallin erstarrten.

336. Ernst Waldschmidt-Leitz, Wolfgang Graßmann und Hans Schlatter: Zur Spezifität proteolytischer Enzyme. (Vorläufige Mitteilung).

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

(Eingegangen am 6. August 1927.)

Der Abbau von Eiweißkörpern mit einheitlichen Enzymen, beispielsweise mit Pepsin, Trypsin-Kinase, Trypsin oder Erepsin, verläuft in allen untersuchten Fällen¹⁾ unter Sprengung von Säure-amid-Bindungen, von Gruppen —CO.NH—; wie es sich gezeigt hat²⁾, bestehen bei stufenweiser Hydrolyse eines Proteins zwischen den Leistungen der einzelnen Enzyme, die in der Bildung von Carboxyl- und Aminogruppen zum Ausdruck kommen, in den bis jetzt untersuchten Beispielen einfache ganzzahlige Verhältnisse. Es hat sich ferner ergeben, daß der spezifische Wirkungsbereich eines einzelnen Enzyms, sein Anteil an der Gesamt-Hydrolyse eines Proteins, ein veränderlicher ist, daß er nach der Vorschaltung anderer proteolytischer Enzyme, mit der Reihenfolge ihrer Kombination wechselt. Die Annahme war ausgesprochen³⁾, daß „die spezifische Einstellung der einzelnen Proteasen sich nicht auf die Aufspaltung verschiedener chemischer Bindungen allein bezieht“, und daß „für die spezifische Angreifbarkeit der einzelnen chemischen Bindung im Molekül durch eine der Proteasen . . . die Natur oder die Anzahl der benachbarten Amino-säure- oder Peptid-Komplexe ausschlaggebend sei“.

¹⁾ vergl. E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner und W. Graßmann, Ztschr. physiol. Chem. **156**, 68, u. zw. S. 78 [1926]; E. Waldschmidt-Leitz und E. Simons, Ztschr. physiol. Chem. **156**, 114 [1926]; E. Waldschmidt-Leitz und G. Künstner, ebenda, im Druck.

²⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner und W. Graßmann, a. a. O., sowie noch unveröffentlichte Versuche mit G. Künstner (Thymus-Histon), Fr. Ziegler (Scombrin), J. Kahn (Salmin).

³⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner und W. Graßmann, a. a. O., u. zw. S. 75.

Einfache Peptide, z. B. Dipeptide, haben als spezifische Substrate des Erepsins zu gelten⁴⁾. Allein auf Grund der Feststellung, die sich beim stufenweisen Abbau natürlicher Proteine ergab, daß auch die Wirkung der eigentlichen Proteasen, beispielsweise des Trypsins, in der Aufspaltung von Säureamid-Bindungen besteht, war zu prüfen, ob es gelingt, durch die Verlängerung von Peptid-Ketten oder durch die Einführung besonderer Amino-säure-Reste spezifische Substrate des Trypsins zu gewinnen.

Die Frage, wo man die Grenze zwischen tryptischer und ereptischer Spaltbarkeit zu suchen hat, ist jetzt der Beantwortung näher gerückt. In einer Untersuchung von W. Grassmann⁵⁾ über Hefe-Proteasen ist vor kurzem gezeigt worden, daß die spezifische Reichweite von Hefe-Erepsin (Dipeptidase) und von Hefe-Trypsin (Polypeptidase) bei der Hydrolyse von Peptiden aus aliphatischen Monoamino-monocarbonsäuren bedingt ist durch die Länge der Peptid-Kette; ihre Grenze liegt nämlich zwischen Di- und Tripeptid: Dipeptide werden nur vom Erepsin, Tripeptide und höhere nur vom Trypsin der Hefe zerlegt, und hier bleibt der tryptische Abbau bei der Dipeptid-Stufe stehen. Bei aufeinanderfolgender Einwirkung der beiden Hefe-Enzyme auf Tripeptide oder höhere Peptide ergeben sich also für den Vergleich der durch die Einzel-Enzyme freigelegten sauren oder basischen Gruppen, analog den Erfahrungen beim stufenweisen Abbau natürlicher Eiweißstoffe, einfache ganzzahlige Verhältnisse.

Es ist nunmehr gelungen, auch den spezifischen Wirkungsbereich von tierischem Trypsin und Erepsin an einem einfachen synthetischen Modell zu veranschaulichen. Bei der Prüfung der enzymatischen Spaltbarkeit einer Auswahl höherer Peptide hat es sich, wie aus Tabelle 1 hervorgeht, ergeben, daß für die Spezifität von Pankreas-Trypsin und Darm-Erepsin neben der Länge der vorliegenden Peptid-Kette die Natur der Amino-säure-Bausteine selbst ausschlaggebend ist. Wie man ersieht, ist eine Verlängerung der Peptid-Kette, beispielsweise im Glycyl-glycin oder Leucyl-glycin, durch Einführung allein von Glycin-Resten bis zum Oktapeptid für den Spezifitäts-Unterschied der beiden Enzyme bedeutungslos; aber mit der Einführung von Tyrosin in das Tetrapeptid Leucyl-triglycin zum Pentapeptid Leucyl-triglycyl-tyrosin ist eine qualitative Spezifitäts-Änderung verbunden; nun wird das Peptid vom Trypsin und nicht mehr vom Erepsin angespalten. Daß für diese Spezifitäts-Änderung auch die Länge der Peptid-Kette von Bedeutung ist, zeigt der Vergleich der enzymatischen Spaltbarkeit von Leucyl-triglycyl-tyrosin einerseits und vom einfachen Glycyl-tyrosin andererseits.

Es bedarf der Prüfung eines umfangreichen synthetischen Peptid-Materials, mit dessen Bereitung wir begonnen haben, um die Kenntnis der spezifischen Trypsin-Substrate zu erweitern, und um zu beurteilen, welche speziellen Amino-säure-Bausteine und von welcher Länge der Peptid-Ketten an sie die spezifische enzymatische Spaltbarkeit bestimmen. Man wird dabei auch den Einfluß des Trypsin-Aktivators Enterokinase zu beachten haben, der an dem vorliegenden Beispiel noch nicht geprüft worden ist. Auch die

⁴⁾ E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, *Ztschr. physiol. Chem.* **149**, 203, u. zw. S. 206 ff. [1925]; E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner, *Ztschr. physiol. Chem.* **151**, 31, u. zw. S. 33 [1925/26].

⁵⁾ *Ztschr. physiol. Chem.* **167**, 202, u. zw. S. 206 ff. [1927].

Tabelle I.

Spezifität von Pankreas-Trypsin und Darm-Erepsin.

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

Peptid	Trypsin (aktiviert)	Erepsin
Dipeptide, z. B. Glycyl-glycin ..	—	+
„ Leucyl-glycin ..	—	+
„ Glycyl-tyrosin .	—	+
Triglycin	—	+
Tetraglycin	—	+
Leucyl-triglycin	—	+
Pentaglycin	—	+
Hexaglycin	—	+
Leucyl-heptaglycin ⁶⁾	—	+
Leucyl-triglycyl-tyrosin ⁶⁾	+	—

Meinung, die nach den Erfahrungen von E. Fischer und E. Abderhalden⁷⁾ als gesichert galt, aber nicht mehr ausreichend gestützt erscheint, daß das Pepsin synthetische Peptide nicht zu spalten vermöge, wird man nun vorsichtiger beurteilen müssen; es ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß höhere Peptide, die noch nicht geprüft wurden, sich als pepsin-spaltbar erweisen.

Für die Beurteilung der Eiweiß-Struktur scheint uns die Auffindung eines Peptids als spezifisches Substrat für Pankreas-Trypsin von besonderer Bedeutung. Wenn es sich zeigt, daß die Spaltung ein und derselben Säureamid-Bindung in einer Peptid-Kette, im vorliegenden Falle die Bindung zwischen dem Glycin- und den Tyrosin-Rest, je nach der Anzahl der benachbarten Amino-säure-Reste einmal durch Erepsin, im anderen Falle durch Trypsin erfolgt, wenn die Spezifität der beiden Enzyme durch für diese Bindung so geringfügig erscheinende Veränderungen im Molekül bestimmt wird, so darf es als sehr unwahrscheinlich gelten, daß das Trypsin daneben noch Bindungen ganz anderer Art, etwa in cyclischen Komplexen, zu lösen vermöchte. Für den Abbau sehr vieler natürlicher Proteine aber genügt die kombinierte Einwirkung von tryptischem und ereptischem Enzym.

Auch für die Nomenklatur der proteolytischen Enzyme ergeben sich aus unseren Befunden neue Gesichtspunkte. Mit der Erfahrung, daß auch das Pankreas-Trypsin Peptide hydrolysiert, wird die formale Unterscheidung zwischen den eigentlichen Proteasen, darunter Trypsin, einerseits und den Peptidasen andererseits hinfällig. Aber das Ziel, die Spezifität jedes einzelnen der am Eiweiß-Abbau beteiligten Enzyme an chemisch definierten Substraten zu umreißen und ihre Wirkungsbereiche gegeneinander abzugrenzen, erscheint nun erreichbar.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ergebenst für die gewährten Mittel.

⁶⁾ Man verdankte dieses Präparat der großen Freundlichkeit von Hrn. Dr. Herm. O. L. Fischer aus der Sammlung Emil Fischers.

⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. **46**, 52 [1905].

Tabelle 2.
Peptid-Hydrolyse durch Darm-Erepsin.

($p_{\text{H}} = 8.0$, 30° ; Angaben beziehen sich auf die Analysenprobe von 5.0 ccm.)

Peptid	Angew. mg	Zeit in Stdn.	Aciditäts- Zuwachs 0.05-n. KOH ccm	Spaltung (%), bezogen auf vollständige Hydrolyse
Triglycin	23.6	3.25	2.37	47
	23.6	19	3.18	64
<i>d,l</i> -Alanyl-diglycin	25.0	3.25	1.30	53
	25.0	19	1.90	77
Tetraglycin	29.8	3.25	0.74	10
	29.8	17.5	3.07	42
	29.8	41	5.36	74
<i>d,l</i> -Leucyl-triglycin	28.8	17.5	2.41	84
Pentaglycin	37.1	3.25	0.27	3
	37.1	17.5	1.35	14
	37.1	41	3.70	38
<i>l</i> -Leucyl-triglycyl- <i>l</i> -tyrosin ...	14.9	5	0.03	0
Hexaglycin	43.0	3.25	0.45	4
	43.0	17.5	1.25	10
	43.0	41	2.42	20
-Leucyl-heptaglycin	26.5	5	0.66	9

Tabelle 3.

Peptid-Hydrolyse durch Pankreas-Trypsin.

($p_{\text{H}} = 8.4$, 30° ; 2.0 T.—(e.), mit Enterokinase aktiviert; Angaben beziehen sich auf die Analysenprobe von 5.0 ccm.)

Peptid	Angew. mg	Zeit in Stdn.	Aciditäts- Zuwachs 0.05-n. KOH ccm	Spaltung (%), bezogen auf vollständige Hydrolyse
Triglycin	23.4	3	0.05	0
	23.4	18	0.05	0
<i>d,l</i> -Alanyl-diglycin	27.2	3	0.01	0
	27.2	18	0.05	0
Tetraglycin	30.6	3	0.00	0
	30.6	16	0.05	0
<i>d,l</i> -Leucyl-triglycin	29.0	16	0.05	0
Pentaglycin	36.8	3	0.02	0
	36.8	16	0.03	0
<i>l</i> -Leucyl-triglycyl- <i>l</i> -tyrosin ...	16.8	5	0.35	12
Hexaglycin	42.4	3	0.01	0
	42.4	16	0.05	0
<i>l</i> -Leucyl-heptaglycin	31.7	5	0.01	0