

228. Hans von Euler und Zoltán I. Kertész: Zur Kenntnis der Peptidasen.

[Aus d. Biochem. Institut d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 11. Juni 1928.)

Die Hypothese, daß der Angriff der Peptidasen vom Typus des Darm-Erepsins durch die primäre Anlagerung der Aminogruppe des Substrates an das Enzym vermittelt wird¹⁾, hat durch die Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz und seiner Mitarbeiter²⁾, sowie neuestens von Graßmann und Dyckerhoff^{2a)}, sowie von Abderhalden und Schwab^{2b)} sehr wertvolle Bestätigungen erfahren, und es kann also nunmehr wohl bei weiteren Forschungen auf diese Hypothese weiter gebaut werden.

Bei der Verfolgung des Schlusses, daß die Carbonylgruppe im Enzym-Molekül die Affinität desselben zum Dipeptid vermittelt, ist die Aufgabe in den Vordergrund getreten, die Art dieser Carbonylgruppe näher zu charakterisieren. Dabei beschreiten wir zwei Wege: Der eine, der bereits von Euler und Josephson (l. c.) benutzt wurde, geht aus von den Erfahrungen, welche in diesem Institut von Svanberg, und besonders von Myrbäck³⁾, über die Inaktivierung gemacht wurden, die an Saccharase und Amylase durch geringe Mengen typischer Gruppen-Reagenzien bewirkt wird. In den Mitteilungen von Euler und Josephson sind bereits diesbezügliche Versuche mit Phenyl-hydrazin, *p*-Toluidin, Kaliumcyanid und Sulfit beschrieben. Ausgehend von diesen, haben wir uns auf die Frage konzentriert, ob sich die den Aminorest des Peptids bindende Gruppe wie die Carbonylgruppe einer einfachen Zuckerart verhält, also wie eine lactonisierte Carbonylgruppe eines Oxy-aldehyds oder Oxy-ketons. Wir haben also an den Versuch von Josephson über *p*-Toluidin einen Inaktivierungsversuch mit Anilin angeschlossen, und zwar deswegen, weil in diesem Laboratorium die Reaktion zwischen Anilin und Glucose⁴⁾ bzw. Anilin und Fructose auch in Rücksicht auf solche zwischen Enzym und Substrat vorkommenden Bindungen schon untersucht worden war.

Wir möchten uns die Fortsetzung und quantitative Auswertung unserer Vergiftungs-Versuche für eine spätere Mitteilung vorbehalten. Der Versuch mit Ammoniak wurde ausgeführt, weil in letzter Zeit eine Untersuchung von Euler, E. Eriksson und Brunius⁵⁾ gezeigt hatte, daß die Reaktion, welche zwischen Glucose und Amino-säuren zu dem früher von Brunius⁶⁾ gemessenen Gleichgewicht führt, bei Ersatz von Amino-säuren durch Ammoniak fast ganz ausbleibt, und zwar nicht bloß, wenn die Einwirkung unmittelbar nach der Mischung gemessen wird, sondern auch nach 24 Stdn. und bei ganz entsprechenden Alkalinitäten ($p_H = 8-9.5$).

¹⁾ Euler und Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122 [1926], **166**, 294 [1927]; B. **60**, 1341 [1927]; Josephson und Euler, Ztschr. physiol. Chem. **162**, 85 [1926/27].

²⁾ Waldschmidt-Leitz, Graßmann und Schöffner, B. **60**, 359 [1927]; Waldschmidt-Leitz, Schöffner, Schlatter und W. Klein, B. **61**, 299 [1928]; Waldschmidt-Leitz und W. Klein, B. **61**, 640 [1928]; Waldschmidt-Leitz und Gertrud Rauchalles, B. **61**, 645 [1928].

^{2a)} Ztschr. physiol. Chem. **175**, 18 [1928].

^{2b)} Ferment-Forsch.

³⁾ Myrbäck, Ztschr. physiol. Chem. **158**, 1 [1926], **159**, 1 [1926].

⁴⁾ Euler und Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **153**, 1 [1926].

⁵⁾ Svensk kem. Tidskrift, Juni-Heft 1928.

⁶⁾ B. **60**, 997 [1927].

Der Vergleich der Amino-säure-Bindung durch die Aminogruppe einerseits an Peptidasen, andererseits an Hexosen hat zu einem Inaktivierungsversuch mit Borsäure geführt. Die starke Inaktivierung durch diesen Zusatz (rund 100% durch 0,01-n. Borsäure) bei $p_H = 8$ wäre sonst kaum zu vermuten gewesen. Natürlich wollen wir aus diesem Versuch noch keinen Schluß ziehen, aber der kräftige Effekt regt uns dazu an, gerade mit diesem Stoff unter Variation der Konzentration weitere Messungen anzustellen.

Der Versuch mit Chinin- und Chinidin-Zusätzen hat, wie die Tab. S. 1527 zeigt, zu keinem positiven Ergebnis geführt; wegen der geringen Löslichkeit mußten sehr kleine Konzentrationen der Alkaloide gewählt werden. Es darf aber bezüglich dieser Unempfindlichkeit der Darm-Peptidase gegen diese Alkaloid-Konzentrationen darauf hingewiesen werden, daß andere Enzyme, wie z. B. Lipasen, durch ähnliche Konzentrationen dieser Stoffe bereits erheblich inaktiviert werden. Mit Glykokoll-ester als Hemmstoff haben wir noch keine deutlichen Ergebnisse erhalten, da unser Enzym-Präparat so viel Lipase enthielt, daß in der peptischen Spaltungszeit bereits eine teilweise Verseifung eintrat.

Eine Erweiterung unserer früheren Arbeiten über Hemmung durch Spaltprodukte ist durch den Versuch mit Alanyl-glycin eingeleitet worden. Dieser Versuch stellt in gewissem Sinn eine Analogie dar zu denjenigen, welche sowohl aus diesem Laboratorium als von Seiten Kuhns über die Spaltung von Disacchariden, besonders Rohrzucker, und über die Hemmung einerseits durch Glucose, andererseits durch Fructose vorliegen. Es handelt sich dabei um die Frage, ob sich bei der Spaltung der Dipeptide außer der einen Affinitätsgruppe, welche bei der Affinitätsbestimmung nach Michaelis gemessen wird, noch eine zweite nachweisen läßt, entsprechend den Vorstellungen, die der eine von uns ⁷⁾ entwickelt hat, und die unter der Bezeichnung „Zwei-Affinitäts-Theorie“ mehrfach in der Literatur besprochen worden ist. Die Unterschiede zwischen der Hemmung der Alanyl-glycin-Spaltung einerseits durch α -Alanin, andererseits durch Glykokoll sind zwar nicht groß, aber doch deutlich, und liegen sicher innerhalb der Versuchsfehler (vgl. S. 1529). Andererseits entspricht dieser geringe Unterschied in der Hemmungswirkung nicht dem großen Unterschied zwischen der Spaltungsgeschwindigkeit des Glycyl-glycins und Alanyl-glycins (Versuch S. 1527), und es ist zu vermuten, daß hier die Unterschiede in der Affinität Erepsin- α -Alanyl-glycin einerseits und Glycyl-glycin andererseits in der verschiedenen Hemmung durch α -Alanin und durch Glykokoll zum Ausdruck kommen.

Beschreibung der Versuche.

Die Konzentration des Glycyl-glycins und α -Alanyl-glycins war bei sämtlichen Versuchen 0,05-n. Das Totalvolumen der Reaktionsmischungen betrug 25 ccm. Das p_H wurde mit 0,1-n. NaOH immer auf 8,0 eingestellt und nach 10–15 Minuten unter Anwendung der Gasketten-Methode bei 20° gemessen.

Zur Darstellung unseres Enzym-Materials diente auch in diesem Falle ein Glycerin-Extrakt aus Schweine-Darm, der in ähnlicher Weise hergestellt war wie bei den früheren Versuchen. Der Glycerin-Extrakt zeigte eine ähnliche Aktivität wie bei den früheren Darstellungen. Bei der Prüfung

⁷⁾ Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 9, Nr. 13 [1924].

der Aktivität mit 2 ccm Glycerin-Extrakt in 25 ccm 0.05-n. Glycyl-glycin wurden bei $p_H = 8.0$ die Reaktionskonstanten $20 \cdot 10^{-4}$ gemessen. Die Berechnung der Fähigkeit zur Glycyl-glycin-Spaltung scheiterte auch in diesem Fall daran, daß das Trockengewicht des Glycerin-Extraktes nicht bekannt war. Eine indirekte Berechnung wurde aus den in einer früheren Mitteilung erwähnten Gründen als nicht einwandfrei angesehen.

Bei der zeitlichen Verfolgung der Glycyl-glycin- und Alanyl-glycin-Spaltung wurde die Methode von Willstätter⁸⁾ bzw. Willstätter und Waldschmidt-Leitz⁹⁾ angewandt. Bestimmungen immer in 5 ccm Reaktionsmischung. Versuchs-Temperatur 37.0°.

Reaktionsmischung: 5.0 ccm 0.25-n. Glycyl-glycin- oder Alanyl-glycin-Lösung,
2.0 ccm Glycerin-Extrakt,
x ccm 0.1-n. NaOH,
y ccm Hemmungsstoff-Zusatz,
18 (x + y) ccm dest. Wasser,
25 ccm Totalvolumen.

Die Berechnung der Konstante geschah nach der monomolekularen Formel. Es wurden anstatt der natürlichen die Briggschen Logarithmen angewandt.

Beispiel: Beim Titrieren wurden in 90 Min. mit 0.34 ccm 0.24-n. NaOH, in 180 Min. mit 0.45 ccm 0.24-n. NaOH mehr verbraucht als zur Null-Titration. Da in 5 ccm der Reaktionsmischung die maximale NaOH-Verbrauchs-Zunahme 1.02 ccm (= 0.033 g Glycyl-glycin) war, wurden die Reaktionskonstanten:

$$\frac{1}{90} \log \frac{102}{102-34} = 0.001956 \text{ und } \frac{1}{180} \log \frac{102}{102-45} = 0.00140 \text{ berechnet.}$$

I. Versuche mit Glycyl-glycin.

1. Versuche mit Chinin- und Chinidin-Sulfat: Da die beiden Salze in Wasser nur schwer löslich sind, wurden Versuche angestellt, um die Einwirkung von Alkohol auf die Reaktion festzustellen.

20 % Alkohol in der Reaktionsmischung.

Minuten	Ohne Alkohol	Mit Alkohol
90	20.3	1.9
180	14.5	2.2

Da Alkohol die Spaltungs-Geschwindigkeit stark herabsetzte, wurden nur 0.001-n. Wasser-Lösungen der obengenannten Salze angewandt.

2. Einwirkung von Chinin- und Chinidin-Sulfat:

	k · 10 ⁴		
90	20.3	19.8	19.6
180	14.5	14.0	13.9

In dieser Konzentration übten die beiden Salze nur eine unbedeutende Wirkung aus.

⁸⁾ Handb. biolog. Arbeitsmeth., Abt. I, Teil 7, S. 289.

⁹⁾ B. 54, 2988 [1921].

3. Versuche mit Anilin: Eine Versuchsreihe wurde mit Anilin ausgeführt, um die Hemmung der Peptidase-Wirkung durch diese Base festzustellen.

Einfluß von Anilin auf die Peptidase-Wirkung.

Min.	Ohne Anilin	k. 10 ⁴		
		0.005-n.	0.0125-n.	0.125-n.
90	20.3	19.6	12.9	4.4
180	14.5	13.2	9.8	4.1

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß Anilin stark hemmt.

4. Versuche mit Glykokoll: Um die reaktions-hemmende Wirkung von Glykokoll auch bei diesem Glycerin-Extrakt festzustellen, wurden Versuche mit 0.1- und 0.01-n. Glykokoll ausgeführt.

Einfluß von Glykokoll.

Min.	Ohne Glykokoll	k. 10 ⁴	
		0.01-n.	0.1-n.
90	20.3	14.2	6.6
180	14.5	12.5	4.4

Wie bereits in einer früheren Mitteilung berichtet wurde, hemmt Glykokoll stark.

5. Versuche mit Glykokoll-äthylester: Die Versuche gaben keine deutbaren Ergebnisse, weil, wie nachgewiesen wurde, unser Glycerin-Extrakt beträchtliche Mengen Lipase enthielt.

6. Einfluß von Ammoniak: Das p_H wurde anstatt mit 0.1-n. NaOH mit $H_4N.OH$ eingestellt. Die Konzentration des Ammoniaks in der Reaktionsmischung war 0.05-n.

Min.	Ohne Ammoniak	k. 10 ⁴	
		Mit 0.05-n. Ammoniak	
90	19.5		19.3
180	14.0		14.0

Es wurde keine Hemmung beobachtet.

7. Einfluß von Borsäure: Es wurden 2.5 bzw. 0.25 ccm einer mit NaOH neutralisierten $n-H_3BO_3$ -Lösung in der Reaktionsmischung auf 25 g verdünnt.

Min.	Ohne Borsäure	k. 10 ⁴	
		Mit 0.01-n. Borsäure	0.1-n. Borsäure
90	19.6	11.9	3.0
180	14.0	7.7	2.1

Borsäure hemmt also sehr stark.

II. Versuche mit Alanyl-glycin.

8. Es wurden Versuche unter denselben Versuchsbedingungen mit 0.05-n. Alanyl-glycin ausgeführt. p_H = immer 8.0. Bestimmung und Enzym-Präparat wie bei den Glycyl-glycin-Versuchen.

Relative Spaltungsgeschwindigkeit von Glycyl-glycin und Alanyl-glycin durch dasselbe Enzym-Material:

Min.	k. 10 ⁴	
	Glycyl-glycin	Alanyl-glycin
90	19.5	9.3
180	14.0	6.7

Einfluß von Glykokoll und α -Alanin.

Es war wahrscheinlich, daß die Spaltprodukte die Spaltung von Alanyl-glycin hemmen würden; die Versuche bestätigten diese Annahme.

Min.	k. 10 ⁴		
	Ohne Zusatz	Mit 0.01-n. Glykokoll	Mit 0.01-n. α -Alanin
90	9.3	8.3	7.9
180	6.7	5.4	4.9

229. Hans Lindemann und Hans Thiele: Die Konstitution der Stickstoffwasserstoffsäure und ihrer Ester.

[Aus d. Chem. Institut d. Techn. Hochschule Braunschweig.]

(Eingegangen am 9. Juni 1928.)

In den letzten Jahren haben Lindemann und seine Mitarbeiter wiederholt das chemische Verhalten von Aziden studiert¹⁾. Die Eigenschaften dieser Stoffe gaben Veranlassung, uns mit der Frage nach der Struktur der Stickstoffwasserstoffsäure und ihrer Ester zu befassen. Denn das Konstitutionsproblem dieser Verbindungen erscheint noch keineswegs geklärt. Die ursprünglich von Curtius²⁾ angenommene Formel mit einem Stickstoffdreiring (I) hat Thiele³⁾ abgelehnt und sie durch die Formel II mit offener Stickstoffkette ersetzt.

Für diese Formel sprechen nach Thiele vor allem die Anlagerungsreaktionen der Azide, insbesondere die Bildung von Diazoaminokörpern bei der Einwirkung magnesium-organischer Verbindungen⁴⁾ und die Entstehung von Osotriazolen bei der Behandlung mit Acetylen-Derivaten⁵⁾. Denn „mit der Ringformel müßte man die sehr unwahrscheinliche Annahme machen, daß bei der Anlagerung die Doppelbindung intakt bleibt, während die einfache gesprengt wird“⁶⁾. Für den cyclischen Bau der Stickstoffwasserstoffsäure andererseits spricht hauptsächlich die Entstehung der Azide aus den Nitroso-hydrazinen durch Wasser-Abspaltung⁷⁾:



Diesem Umstande mißt jedoch Thiele deswegen keine Beweiskraft bei, weil der Zerfall mancher Nitroso-hydrazine mit einer Wanderung der

¹⁾ vergl. z. B. Lindemann und Mühlhaus, Oxy-benzalazide und Indoxazene, A. **446**, 1 [1925]; Lindemann und Schultheis, A. **451**, 241 [1927], A. **464** (im Druck) [1928].

²⁾ B. **23**, 3023 [1890].

³⁾ B. **44**, 2524 [1911].

⁴⁾ Dimroth, B. **38**, 670 [1905], **39**, 3905 [1906].

⁵⁾ Dimroth und Fester, B. **43**, 2219 [1910].

⁶⁾ Thiele, a. a. O., S. 2525.

⁷⁾ Curtius, B. **33**, 2562 [1900].