

**324. Ernst Waldschmidt-Leitz, Willibald Klein und Anton Schöffner: Über die strukturellen Voraussetzungen der spezifischen Spaltbarkeit proteolytischer Substrate: Zur Spezifität von Trypsin, Trypsin-Kinase und Darm-Erepsin (XIV. Mitteilung zur Spezifität tierischer Proteasen).**

[Aus d. Institut für Biochemie d. Deutsch. Techn. Hochschule in Prag.]

(Eingegangen am 17. August 1928.)

Die Untersuchungen über die Spezifität von Trypsin und Erepsin, die durch die Auffindung spezifischer synthetischer Substrate auch für das Pankreas-Trypsin<sup>1)</sup> in besonderem Maße gefördert wurden, versprechen einen vertieften Einblick in den Mechanismus proteolytischer Reaktionen und eine Erkenntnis der strukturellen Voraussetzungen, die für die spezifische Spaltbarkeit eines Substrates, sei es durch Trypsin, sei es durch Erepsin, maßgebend sind. Ein erster Hinweis hierfür ergab sich aus dem Befunde, daß eine Änderung der spezifischen Spaltbarkeit der Säure-amid-Bindung in den Dipeptiden durch Einführung von Acyl an der freien Aminogruppe bewirkt werden kann: „Dipeptide, die spezifischen Substrate des Erepsins, büßen durch Einführung von Acyl. . . ihre ereptische Spaltbarkeit ein, und sie werden spaltbar durch Trypsin.“ „Die Substitution der freien Aminogruppe einerseits, die eine Anlagerung des Erepsins verhinderte, die aciditäts-verstärkende Wirkung des Acylrestes auf die Carboxylgruppe andererseits, die die Anlagerung des Trypsins begünstigte, schien dafür verantwortlich zu sein“<sup>2)</sup>.

Aus den bis jetzt vorliegenden Erfahrungen ist zu folgern, daß für die Spaltbarkeit einer Peptid-Bindung durch Trypsin ein gewisser elektro-negativer Charakter des Substrates, und daß für die Anlagerung des Trypsins an dieses die Gegenwart einer freien Carboxylgruppe im Substrat erforderlich ist<sup>3)</sup>. Daher werden, wie auch aus der nachfolgenden Tabelle 1 ersichtlich ist (Nr. 1 und 2), im Gegensatz zu den acylierten Dipeptiden ein decarboxyliertes Acyl-dipeptid gleichwie amidierte Acyl-dipeptide<sup>4)</sup> durch Trypsin nicht zerlegt. Für den Einfluß einer Verstärkung des elektronegativen Charakters andererseits, die wir als eine zweite Voraussetzung für eine tryptische Spaltbarkeit betrachten, bieten die acylierten Dipeptide anschauliche Modelle. Aber auch die spezifische Wirkung bestimmter Amino-säuren, beispielsweise in höheren Peptiden, so die des Tyrosins<sup>5)</sup>, des Tryptophans<sup>6)</sup> oder des Cystins und anderer<sup>7)</sup>, die eine tryptische

<sup>1)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann und H. Schlatter, B. **60**, 1906 [1927]; E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner, H. Schlatter und W. Klein, B. **61**, 299 [1928]; E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein, B. **61**, 640 [1928]; vergl. E. Abderhalden, Naturwiss. **16**, 396 [1928].

<sup>2)</sup> E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein, B. **61**, 640, u. zw. S. 642 und 641 [1928]. <sup>3)</sup> E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein, a. a. O.

<sup>4)</sup> E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein, a. a. O., u. zw. S. 641.

<sup>5)</sup> Zufolge E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner, H. Schlatter und W. Klein, B. **61**, 299 u. zw. S. 302 [1928].

<sup>6)</sup> Nach einer Privatmitteilung von Hrn. Geh.-Rat Prof. Dr. E. Abderhalden, Halle a. S.

<sup>7)</sup> Zufolge E. Abderhalden und Mitarbeitern, Ferment-Forschung **9**, 446, 462, 494, 501, 516, 524 [1928].

Spaltbarkeit bedingen, wird man in diesem Sinne verstehen können. Sie wird besonders anschaulich belegt durch Beispiele über die Spaltbarkeit von Halogenacyl-Verbindungen der Amino-säuren und Peptide, die als die Zwischenprodukte bei der wichtigsten der von Emil Fischer ausgearbeiteten Methoden der Peptid-Synthese bekannt sind, und unter denen wir nun einige auf ihre enzymatische Spaltbarkeit geprüft haben.

Aus den in der Tabelle 1 zusammengestellten Versuchen ersieht man, daß auch bei den Halogenacyl-Verbindungen der Dipeptide, die durch Erepsin in keinem Falle angegriffen werden, wie bei den Peptiden selbst der Eintritt bestimmter Amino-säure-Reste, im vorliegenden Beispiel des Tyrosins (Nr. 3 und 4 der Tabelle), eine Spaltbarkeit durch Trypsin zur Folge hat; und es erscheint besonders bemerkenswert, daß der nämliche Einfluß dieser Amino-säuren schon bei den Vorstufen der Dipeptide, den Halogenacyl-Verbindungen der Amino-säuren selbst, zur Geltung kommt: Chloracetyl-phenyl-alanin und Chloracetyl-tyrosin sind spezifische Substrate des Pankreas-Trypsins (Nr. 5 und 6 der Tabelle), die entsprechenden Amino-Verbindungen dagegen, wie bekannt<sup>11)</sup>, spezifische Substrate des Erepsins. Es scheint, daß für die tryptische Spaltbarkeit dieser Verbindungen der Einfluß des elektronegativen Phenylrestes bestimmend ist; denn nach den vorliegenden Erfahrungen (vergl. Nr. 3 und 4 der Tabelle)

Tabelle 1.

Spaltbarkeit von Peptiden und Peptid-Derivaten durch Trypsin, Trypsin-Kinase und Darm-Erepsin.

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

Nr.	Substrat	Trypsin	Enzym Trypsin- Kinase	Darm- Erepsin
1	Benzoyl-glycyl-glycin <sup>8)</sup> .....	o	+	—
2	Benzoyl-alanyl-decarboxy-leucin .....	—	—	o
3	Bromisocapronyl-diglycin .....	—	—	—
4	Bromisocapronyl-glycyl-tyrosin .....	+	+ +	—
5	Chloracetyl-phenyl-alanin .....	+	+ +	—
6	Chloracetyl-tyrosin .....	+	+ +	—
7	Carbäthoxyl-glycyl-tyrosin .....	+	+ +	o
8	Benzoyl-glycyl-tyrosin .....	+	+ +	o
9	$\beta$ -Naphthalinsulfonyl-glycyl-tyrosin <sup>9)</sup> ..	+	+ +	—
10	$\beta$ -Naphthalinsulfonyl-tyrosyl-glycin ...	+	+ +	o
11	$\beta$ -Naphthalinsulfonyl-tyrosin .....	—	—	o
12	Phenylalanyl-arginin <sup>10)</sup> .....	+	+ +	+
13	Histidyl-glycin <sup>10)</sup> .....	o	—	+

<sup>8)</sup> Zufolge E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein, B. **61**, 640 u. zw. S. 641 [1928].

<sup>9)</sup> Nach E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, H. Schlatter und W. Klein, B. **61**, 299 u. zw. S. 301 [1928].

<sup>10)</sup> Für die Überlassung dieses Präparates sind wir Hrn. Prof. Dr. M. Bergmann, Dresden, zu großem Danke verpflichtet.

<sup>11)</sup> E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, Ztschr. Physiol. Chem. **149**, 203, u. zw. S. 208 [1925].

dürfte das einfache Alanin-Derivat, das noch nicht geprüft worden ist, kaum spaltbar sein. Man darf wohl erwarten, daß die Prüfung der leicht zugänglichen Halogenacyl-Verbindungen der Amino-säuren selbst geeignet ist, die Ermittlung der eine tryptische Spaltbarkeit bedingenden Amino-säurereste zu erleichtern und die Untersuchung höherer Peptide dieser Aminosäuren<sup>12)</sup> zu ergänzen oder zu ersetzen. Wir werden dieser Frage in der Fortführung unserer Untersuchung besondere Aufmerksamkeit widmen.

Die Auffassung, die nach den früheren Befunden berechtigt schien, daß unter den proteolytisch spaltbaren Substraten „die Dipeptide eine gewisse Sonderstellung einnehmen“, und daß sie „unabhängig von der Natur der an ihrem Aufbau beteiligten Amino-säuren... als spezifische Substrate des Erepsins zu gelten“ haben<sup>13)</sup>, entspricht in dieser strengen Fassung den neueren Erkenntnissen nicht mehr. Man begegnet Fällen besonderer Zusammensetzung, so bei den Dipeptiden Glutaminyl-tyrosin<sup>14)</sup> und dem in der Tabelle angeführten Phenylalanyl-arginin (Nr. 12), in denen neben der Spaltbarkeit durch Erepsin eine erhebliche Angreifbarkeit auch durch Pankreas-Trypsin zu bemerken ist; es wird zu prüfen sein, inwieweit solche Präparate der für eine tryptische Spaltbarkeit angenommenen Voraussetzung eines elektronegativen Charakters genügen oder inwieweit in solchen Fällen die Anlagerung des Enzyms durch besondere chemische Gruppen vermittelt wird.

Es verdient Beachtung, daß wir in allen hier angeführten Beispielen, bei der Prüfung einer Anzahl acylierter tyrosin-haltiger Dipeptide (Nr. 7—10 der Tabelle) wie bei den spaltbaren phenylalanin- und tyrosin-haltigen Halogenacyl-Verbindungen und endlich auch bei dem Dipeptide Phenylalanyl-arginin, eine verstärkte tryptische Hydrolyse nach der Aktivierung des Enzyms durch Enterokinase beobachten. Die Ursache dieser Erscheinung, die nicht auf einer einfachen Geschwindigkeits-Steigerung an sich, sondern auf einem abweichenden Reaktions-Mechanismus, auf der Bildung verschiedener Reaktions-Zwischenprodukte beruhen dürfte, harret noch der Untersuchung; wir erwarten, daß die exakte Bestimmung der Affinitäts-Verhältnisse in den einzelnen Fällen, mit der wir beginnen, zu ihrer Aufklärung wesentlich beitragen wird.

Die Anschauung, die wir diskutieren, daß die Anlagerung des Trypsins an ein Substrat durch dessen elektrochemischen Charakter bedingt, daß sie durch eine gewisse elektronegative Natur desselben begünstigt oder sogar erst ermöglicht wird, entspricht auch dem sonstigen elektrochemischen Verhalten des Trypsins, z. B. seinem Adsorptionsverhalten; von den untersuchten Pankreas-Enzymen hat das „Trypsin die stärksten basischen Eigenschaften“<sup>15)</sup>; auch war hervorgehoben, „daß das Adsorptionsverhalten ... von Pankreas-Trypsin ... unabhängig von der Natur der begleitenden Stoffe ... zur Geltung kommt“<sup>16)</sup>. Hier berührt sich unsere Vorstellung über die Voraussetzungen für die spezifische Affinität des Trypsins mit

<sup>12)</sup> vergl. die Untersuchungen von E. Abderhalden und Mitarbeitern, a. a. O.

<sup>13)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner, H. Schlatter und W. Klein, B. **61**, 299 u. zw. S. 301 [1928].

<sup>14)</sup> E. Abderhalden und E. Schwab, Ferment-Forschung **9**, 501 [1928].

<sup>15)</sup> R. Willstätter, B. **55**, 3601 u. zw. S. 3617 [1922].

<sup>16)</sup> E. Waldschmidt-Leitz und A. Schöffner, Ztschr. physiol. Chem. **151**, 31 u. zw. S. 51 [1925/26].

der von J. H. Northrop<sup>17)</sup> aus der  $p_H$ -Abhängigkeit der Trypsin-Wirkung abgeleiteten Anschauung, nach welcher das Trypsin bei der Proteolyse nur mit den Protein-Anionen reagiere, da die elektrochemische Natur der Trypsin-Substrat-Verbindung vor allem durch die elektrochemische Natur des Substrates bedingt sei.

Aus der Beobachtung, daß die Halogenacyl-Verbindungen gewisser Amino-Säuren durch Trypsin zerlegt werden, ergeben sich bemerkenswerte Unterlagen für den Vergleich der Reaktionsweise dreier verschiedener tierischer Enzyme, des Erepsins, des Trypsins und des Histozyms aus Niere oder Leber, deren gemeinsame Funktion in der Auflösung von -CO-NH-Bindungen besteht. Wenn man findet, daß die Säure-amid-Bindung in den Benzoyl- und, wie es scheint, auch in den Acetyl-Derivaten<sup>18)</sup> einer Amino-säure spezifisch vom Histozym, in den Halogenacyl-, z. B. den Chloracetyl-Derivaten aber spezifisch vom Trypsin und in den Aminoacetyl-Derivaten endlich spezifisch vom Erepsin gespalten wird, so ist die Annahme naheliegend, daß für diese Spezifitäts-Unterschiede weniger die einzelnen Substituenten an sich, als vielmehr der mit ihrer Veränderung bedingte Wechsel im elektrochemischen Charakter der Verbindung verantwortlich ist. Es wird unsere Aufgabe sein, diese Frage, die uns für das Verständnis proteolytischer Reaktions-Systeme allgemein bedeutungsvoll erscheint, durch Prüfung des Einflusses einer größeren Auswahl von Substituenten und durch Affinitätsmessungen zu entscheiden und die Grenzen des Spezifitätsbereiches jedes einzelnen der drei Enzyme an diesen einfachsten Beispielen zu ermitteln.

Tabelle 2.  
Einwirkung von Trypsin.

(Substrat-Lösungen mit  $n$ -NaOH auf  $p_H = 8.4$  eingestellt; 30°; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommene Probe von 4.0 ccm).

Nr.	Substrat	Angew. mg	Angew. T.-(e.)	Zeit Min.	Zuwachs ccm 0.05-n.	Spaltung (%)
1	Benzoyl- <i>d, l</i> -alanyl-decarboxy-leucin	24.0	0.48	480	0.01	0
2	<i>d, l</i> -Bromisocapronyl-diglycin . . . .	30.4	0.48	420	0.03	0
3	<i>d, l</i> -Bromisocapronyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin	23.3	0.66	240	0.74	65
4	Chloracetyl- <i>d, l</i> -phenylalanin <sup>19)</sup> . . .	45.6	0.46	420	1.13	31
5	Chloracetyl- <i>l</i> -tyrosin . . . . .	40.9	0.46	240	0.57	18
6	Carbäthoxyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin . . . .	38.1	0.24	400	0.79	32
7	Benzoyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin . . . . .	19.6	0.46	120	0.78	77
8	$\beta$ -Naphthalinsulfonyl- <i>l</i> -tyrosyl-glycin	57.8	0.46	180	0.44	16
9	$\beta$ -Naphthalinsulfonyl- <i>l</i> -tyrosin . . .	31.3	0.46	330	0.06	0
10	<i>d</i> -Phenylalanyl- <i>d</i> -arginin . . . . .	19.2	0.52	480	0.30	25

<sup>17)</sup> Naturwiss. **11**, 713 [1923].

<sup>18)</sup> vergl. die Beobachtungen über die Spaltbarkeit des Acetyl-glycins durch Histozym von A. W. Dox und R. E. Neidig, Ztschr. physiol. Chem. **85**, 68 [1913], sowie von A. W. Dox und W. E. Ruth, Biochem. Bull. **3**, 23 [1913].

<sup>19)</sup> In einem gleichlaufenden Kontrollversuch ohne Enzym-Zusatz war keine Hydrolyse zu bemerken.

### Beschreibung der Versuche.

Die angewandten Enzym-Lösungen waren enzymatisch einheitlich; man gewann sie, wie früher beschrieben<sup>20)</sup>. Den Verlauf der Hydrolysen ermittelte man durch den Aciditäts-Zuwachs in 90-proz. Älcohol und mit Thymol-phthalein als Indicator, bei einem Teil der Versuche, bei welchem eine Abscheidung von Tyrosin eintrat oder zu befürchten war, nach dem gasometrischen Verfahren von van Slyke.

Tabelle 3.

#### Einwirkung von Trypsin-Kinase.

(Substrat-Lösungen mit *n*-NaOH auf  $p_H = 8.4$  eingestellt; 30°; Angaben beziehen sich auf die Analysenprobe von 4.0 ccm).

Nr.	Substrat	Angew. mg	Angew. T.-(e.)	Zeit Min.	Zuwachs ccm 0.05- <i>n</i> .	Spal- tung (%)
1	Benzoyl- <i>d, l</i> -alanyl-decarboxy-leucin	24.0	0.48	480	0.03	0
2	<i>d, l</i> -Bromisocapronyl-diglycin . . . .	36.1	0.48	420	0.04	0
3	<i>d, l</i> -Bromisocapronyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin	23.3	0.66	240	0.84	75
4	Chloracetyl- <i>d, l</i> -phenylalanin . . . . .	55.6	0.46	420	2.06	45
5	Chloracetyl- <i>l</i> -tyrosin . . . . .	40.1	0.46	240	1.20	38
6	Carbäthoxyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin . . . . .	38.1	0.24	400	1.62	66
7	Benzoyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin . . . . .	17.2	0.46	120	0.89	88
8	$\beta$ -Naphthalinsulfonyl- <i>l</i> -tyrosyl-glycin	54.4	0.46	180	0.63	27
9	$\beta$ -Naphthalinsulfonyl- <i>l</i> -tyrosin . . . .	31.5	0.46	330	0.03	0
10	<i>d</i> -Phenylalanyl- <i>d</i> -arginin . . . . .	19.1	0.52	480	0.66	69
11	<i>d, l</i> -Histidyl-glycin . . . . .	19.8	0.52	480	0.02	0

Spaltbarkeit von *d, l*-Histidyl-glycin und *d*-Phenylalanyl-*d*-arginin durch Darm-Erepsin.

22.1 mg *d, l*-Histidyl-glycin, bzw. 19.4 mg *d*-Phenylalanyl-*d*-arginin, mit verd. NaOH auf  $p_H = 8.0$  eingestellt, überließ man in 4.0 ccm Lösung 9 Stdn. bei 30° der Einwirkung von 0.00026 E<sub>r</sub>-E.; der gemessene Aciditäts-Zuwachs belief sich auf 0.32 bzw. 0.28 ccm 0.05-*n*. Lauge, entsprechend einer Spaltung von 15 bzw. 30% des Peptids.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ergebenst für die zur Verfügung gestellten Mittel.

<sup>20)</sup> vergl. dazu E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein, B. 61, 640, u. zw. S. 643 [1928].