

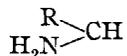
Eine 1.93-proz. Lösung in Wasser, von der Dichte 1.0053 zeigte im 1-dm-Rohr eine Rechtsdrehung von 0.46° , woraus sich $[\alpha]_D^{20}$ zu $+23.74^\circ$ berechnet.

Ganz das gleiche Produkt resultierte beim erschöpfenden Methylieren des Dihydro-camphylamins in der auf S. 1305 beschriebenen Weise. Das Präparat (gef. 39.25 J) schmolz bei 278° und drehte in 2.08-proz. wäßriger Lösung von der Dichte 1.0056 im 1-dm-Rohr 0.5° nach rechts, woraus sich $[\alpha]_D^{20}$ zu $+23.92^\circ$ ergibt.

199. W. Grassmann, H. Dyckerhoff und O. v. Schoenebeck: Über die enzymatische Spaltbarkeit der Prolin-Peptide. (Vorläuf. Mitteil.)

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akadem. d. Wissenschaften in München.]
(Eingegangen am 3. April 1929.)

Die in den letzten Jahren durch H. v. Euler und K. Josephson¹⁾, F. Waldschmidt-Leitz²⁾, sowie von unserer Seite³⁾ durchgeführten Untersuchungen haben Übereinstimmung hergestellt in der Auffassung, daß bei einer bestimmten Gruppe von Peptidasen, nämlich bei der Dipeptidase und der Polypeptidase der Hefe, sowie beim Darm-Erepsin — das nach den letzten Befunden von Waldschmidt-Leitz und Mitarbeitern⁴⁾ gleichfalls als ein Gemisch aus Dipeptidase und Polypeptidase zu gelten hat — die Reaktion zwischen Enzym und Substrat wenigstens teilweise durch die freie α -Aminogruppe des letzteren vermittelt wird. Amino-säuren und Peptide büßen nämlich durch die Acylierung am Amino-Stickstoff — nicht aber durch Substitution an der Carboxylgruppe — die Fähigkeit ein, mit einer dieser Peptidasen in Reaktion zu treten. Auch erfolgt die Hydrolyse von Tripeptiden und höheren Polypeptiden durch die Hefe- und wohl auch die Darm-Polypeptidase nach den bisherigen Erfahrungen stets in der Weise, daß zunächst die am Amino-Ende der Peptid-Kette stehende Amino-säure abgespalten wird⁵⁾. Die Auffassung, wonach die Gruppierung



\times
.CO.NH..... des Substrates für die Angreifbarkeit der Amid-Bindung (\times) Voraussetzung sei, ist weiter entwickelt worden zu der Hypothese, daß die Affinitätsgruppe des Enzyms, die mit der Aminogruppe des Substrates in Reaktion treten soll, Aldehyd-Eigenschaften besitze (H. v. Euler und K. Josephson a. a. O.; siehe auch E. Waldschmidt-Leitz und G. Rauchalles⁶⁾).

¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122 [1926], **162**, 85 [1926]; B. **60**, 1351 [1927] u. a. and. O.

²⁾ E. Waldschmidt-Leitz und Mitarbeiter, B. **60**, 359 [1927], **61**, 299, 640, 645 [1928].

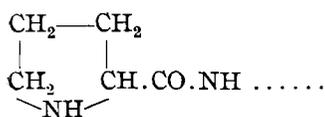
³⁾ W. Grassmann und H. Dyckerhoff, Ztschr. physiol. Chem. **175**, 18 [1928]; B. **61**, 656 [1928]. ⁴⁾ B. **62**, 956 [1929].

⁵⁾ W. Grassmann und H. Dyckerhoff, Ztschr. physiol. Chem. **175**, 18 [1928]. Siehe dazu auch E. Abderhalden und Mitarbeiter, Ztschr. physiol. Chem. **51**, 363 [1907/08], **55**, 416, **57**, 342 [1908], **62**, 145 [1909], **66**, 277 [1910], **81**, 1 [1912].

⁶⁾ B. **61**, 645 [1928].

Während die Acyl-Derivate der Amino-säuren und Peptide in ihrem Verhalten gegenüber den genannten Peptidasen ausgiebig untersucht worden sind, gilt dies nicht in gleicher Weise von den Alkyl-Verbindungen, obwohl diese als Verbindungen von amphoterem Charakter den Stammsubstanzen noch erheblich näher stehen als die acylierten Abkömmlinge. Nach den Versuchen von P. A. Levene und H. S. Simms⁷⁾, die leider mit ungenügend definiertem Enzymmaterial durchgeführt worden sind, scheint das Sarkosyl-glycin im Gegensatz zum Hippuryl-glycin vom Darm-Erepsin zerlegt zu werden. Eine sekundäre Aminogruppe findet sich aber außer in den Monoalkyl-peptiden auch in den Peptiden des Prolins mit enständigem Prolin-Stickstoff, von denen bisher nur zwei, Prolyl-phenyl-alanin und Prolyl-alanin, beschrieben⁸⁾, aber hinsichtlich ihrer enzymatischen Spaltbarkeit neuerdings nicht mehr untersucht worden sind.

Für unsere Versuche dienten Prolyl-glycin und Prolyl-glycyl-glycin, die nach bekannten Methoden über die entsprechenden α, δ -Dibrom-valerylverbindungen erhalten wurden. In ihrem Verhalten gegenüber rohen Peptidase-Lösungen scheinen sich die beiden Peptide nicht wesentlich von den Peptiden anderer Amino-säuren zu unterscheiden. Sie werden durch Glycerin-Extrakte aus Darm-Schleimhaut kräftig, weniger gut durch Pankreas-Auszug und rohes Hefe-Autolysat gespalten. Auch die durch Tonerde-Adsorption nach E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck⁹⁾ von beigemengtem Trypsin befreiten Lösungen des Darm-Erepsins zerlegten die beiden Peptide rasch, zum Teil mit höherer Geschwindigkeit als die entsprechenden Leucyl-peptide. Überraschenderweise zeigen sich aber die gereinigten Trockenpräparate der Dipeptidase und der Polypeptidase aus Hefe und Darm, ebenso die Präparate des Pankreas-Trypsins und der Hefe-Proteinase, sowie das aktivierte Papain völlig oder so gut wie vollständig wirkungslos gegenüber beiden Peptiden. Das für die Hydrolyse der Prolyl-peptide verantwortliche Enzym ist demnach mit keiner der bisher beschriebenen Peptidasen der Hefe und des Darmes zu identifizieren; es folgt keiner von ihnen bei allen Reinigungs-Operationen, mindestens nicht in die gereinigten Trockenpräparate. Es wird zu prüfen sein, ob das Enzym spezifisch auf die Gruppierung:



eingestellt ist, oder ob ihm auch die in der Literatur beschriebene Hydrolyse der Peptid-Derivate mit sekundärem, nicht cyclisch gebundenem Amino-Stickstoff zuzuschreiben ist.

Wir sind damit beschäftigt, die Peptidase der Prolyl-peptide von den begleitenden peptid-spaltenden Fermenten abzutrennen und hinsichtlich ihrer Spezifität und Wirkungsweise zu kennzeichnen.

Über die Darstellung der in den Versuchen der Tabellen 1 und 2 verwendeten Enzym-Trockenpräparate und Peptide wird später im Zusammenhang berichtet werden.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ergebenst für die Förderung unserer Arbeit.

⁷⁾ Journ. biol. Chem. **62**, 711 [1924/25].

⁸⁾ E. Fischer und A. Luniak, B. **42**, 4752 [1909]; E. Fischer und U. Suzuki, B. **37**, 2842 [1904].

⁹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **147**, 286 [1925].

Tabelle I.
Spaltungsversuche mit Prolyl-glycin.

(Im Versuchs-Ansatz von 1 ccm sind enthalten 17 mg *d,l*-Prolyl-glycin (= $\frac{1}{20}$ Millimol *l*-Peptid). Mikro-titration von 0.2-ccm-Proben nach W. Grassmann und W. Heyde¹⁰). Der vollständigen Zerlegung des *l*-Peptids entspricht ein Aciditäts-Zuwachs von 1.0 ccm n_{100} -KOH. 40°.)

Enzym-Präparat	Enzym-Menge ¹¹⁾	pH	Spaltungszeit (Std.)	Spaltung (ccm n_{100} -KOH)
Neutral-Autolysat aus Hefe .	0.2 ccm mit 0.8 Di.-E. und 0.6 Po.-E.	7.4	1	0.23
Lösung der Hefe-Dipeptidase ¹²⁾	0.03 ccm mit 0.10 Di.-E.	7.8	2	0.21
			16	0.43
Glycerin-Auszug aus Pankreas	0.2 ccm mit 0.16 T.-(e) ¹⁶⁾	6.9	1	0.07
			4	0.18
Darm-Erepsin, trypsin-freie Lösung ¹³⁾	0.4 ccm mit 0.03 Di.-E. und 0.3 Po.-E.	7.6	1	0.20
			16	1.03
Trockenpräparat der Hefe-Dipeptidase ¹⁴⁾	1 mg mit 0.13 Di.-E.	7.0	1	—0.04
Trockenpräparat der Hefe-Polypeptidase ¹⁵⁾	1 mg mit 0.20 Po.-E.	7.2	1	—0.02
			24	—0.02
Trockenpräparat der Hefe-Proteinase ¹⁴⁾	2 mg mit 0.03 Pr.-E.	7.0	3	—0.02
			24	—0.02
Trockenpräparat I des Darm-Erepsins, trypsin-frei ¹⁴⁾ . . .	0.8 mg mit 0.10 Di.-E. und 0.002 Po.-E.	7.0	3	0.01
			26	0.00
Trockenpräparat II des Darm-Erepsins, trypsin-frei ¹⁴⁾ . . .	2 mg mit 0.14 Di.-E. und 0.10 Po.-E.	7.6	1	—0.01
Trockenpräparat des Pankreas-Trypsins ¹⁴⁾ + Kinase	0.5 mg mit 0.16 T.-(e) ¹⁶⁾	7.0	3	0.00
Papain + HCN	1.5 mg mit 1.0 Papain-Einheiten	7.0	24	0.09
		5.0	24	0.00

¹⁰⁾ Ztschr. physiol. Chem., im Erscheinen.

¹¹⁾ Die Angaben beziehen sich auf den Versuchs-Ansatz von 1 ccm. Zum Zwecke des Vergleichs wurde auch bei den Präparaten des Darm-Erepsins der Gehalt an Dipeptidase und Polypeptidase unter den zur Bestimmung der beiden Hefe-Peptidasen festgelegten Bedingungen ermittelt; vergl. R. Willstätter und W. Grassmann, Ztschr. physiol. Chem. **153**, 250 [1926], u. zw. S. 264; W. Grassmann und H. Dyckerhoff, Ztschr. physiol. Chem. **179**, 41 [1928], u. zw. S. 64.

¹²⁾ Nach W. Grassmann und W. Haag, Ztschr. physiol. Chem. **167**, 188 [1927], u. zw. S. 198.

¹³⁾ Nach E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, Ztschr. physiol. Chem. **147**, 286 [1925]. ¹⁴⁾ Über die Gewinnung dieser Präparate wird später berichtet werden.

¹⁵⁾ Nach W. Grassmann und H. Dyckerhoff, Ztschr. physiol. Chem. **175**, 18 [1928], u. zw. S. 25.

¹⁶⁾ vergl. R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz, S. Dunaiturria und G. Künstner, Ztschr. physiol. Chem. **161**, 191 [1926], u. zw. S. 207.

Tabelle 2.

Spaltungsversuche mit Prolyl-glycyl-glycin.

(Im Versuchs-Ansatz von 1 ccm sind enthalten 22.9 mg *d,l*-Prolyl-glycyl-glycin (= $\frac{1}{20}$ Millimol *l*-Peptid). Mikro-titration von 0.2-ccm-Proben. Der Aufspaltung einer Peptid-Bindung im *l*-Peptid entspricht ein Aciditäts-Zuwachs von 1.00 ccm n_{100} -KOH.)

Enzym-Präparat	angew. Enzym-Menge	pH	Spaltungszeit (Std.)	Spaltung (ccm n_{100} -KOH)
Neutral-Autolysat aus Hefe . .	0.2 ccm mit 0.8 Di.-E. und 0.6 Po.-E.	7.3	1	0.15
			47	2.11
Darm-Erepsin, Lösung I, trypsin-frei ¹³⁾	0.4 ccm mit 0.03 Di.-E. und 0.3 Po.-E.	7.6	0.5	0.97
			1	1.10
Dasselbe	0.08 mit 0.006 Di.-E. und 0.06 Po.-E.	7.5	0.5	0.46
			2	0.99
Darm-Erepsin, Lösung II, trypsin-frei ¹³⁾	0.4 ccm mit 0.05 Di.-E. und 0.48 Po.-E.	7.3	1	1.06
			20	1.66
Trockenpräparat der Hefe- Dipeptidase ¹⁴⁾	0.3 mg mit 0.09 Di.-E. und 0.00 Po.-E.	7.6	1	0.05
			24	0.16
Trockenpräparat der Hefe- Polypeptidase ¹⁶⁾	1 mg mit 0.15 Po.-E.	7.0	18	—0.05
Trockenpräparat der Hefe- Proteinase ¹⁴⁾	2 mg mit 0.03 Pr.-E.	7.1	3	—0.02
			26	0.00
Trockenpräparat I des Darm- Erepsins, trypsin-frei ¹⁴⁾ . . .	0.8 mg mit 0.10 Di.-E. und 0.002 Po.-E.	7.3	6	0.00
			23	0.01
Trockenpräparat II des Darm- Erepsins, trypsin-frei ¹⁴⁾ . . .	2 mg mit 0.14 Di.-E. und 0.10 Po.-E.	7.4	1	0.00
			2	—0.01
Trockenpräparat des Pan- kreas-Trypsins ¹⁴⁾	0.5 mg mit 0.15 T.-(e) ¹⁶⁾	7.3	1	0.02
			3	0.00
			22	—0.02
Papain + HCN	1.5 mg mit 1.0 Papain- Einheiten	6.7	1	—0.04
			24	0.00

200. J. Böeseken und B. B. C. Felix: Über die Konfiguration des Pentaerythrits (III.¹⁾ Mitteil.).

[Aus d. Organ.-chem. Laborat. d. Techn. Hochschule Delft.]

(Eingegangen am 28. März 1929.)

Wir haben in unserer ersten Mitteilung darauf hingewiesen, daß bei der pyramidalen Konfiguration des Pentaerythrits die cyclischen Acetale mit ungleichen Radikalen in zwei *cis-trans*-isomeren Formen möglich sein sollten, während die tetraedrische Anordnung der $\text{CH}_2(\text{OH})$ -Gruppen optische Isomerie notwendig machte.

¹⁾ B. 61, 787, 1855 [1928].