

Das in Methanol sehr schwer lösliche Semicarbazon schmilzt bei 221—222°.
3.101 mg Subst.: 0.822 ccm N (21°, 738 mm).

$C_6H_{11}ON_3$. Ber. N 29.83. Gef. N 29.89.

Das violettrote *p*-Nitrophenyl-hydrazon schmilzt bei 161—162°.

4.491 mg Subst.: 9.90 mg CO₂, 2.45 mg H₂O. — 3.584 mg Subst.: 0.636 ccm N (24°, 723 mm).

$C_{11}H_{13}O_2N_3$. Ber. C 60.21, H 5.97, N 19.21. Gef. C 60.12, H 6.11, N 19.40.

Die Hydrierung mit Palladium-Calciumcarbonat liefert 2-Methylbutanal-(4) (Schmp. des Semicarbazons 126—127°, des *p*-Nitrophenyl-hydrazons 116°). Sie geht nach der schnellen Aufnahme eines Mols Wasserstoff langsam weiter.

4. Arnold K. Balls und Franz Köhler: Über den Mechanismus der enzymatischen Dipeptid-Spaltung. (XX. Mitteilung zur Spezifität tierischer Proteasen, in der von E. Waldschmidt-Leitz und Mitarbeitern begonnenen Untersuchungsreihe.)

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

(Eingegangen am 5. November 1930.)

Über die Aufteilung des Darm-Erepsins in zwei Komponenten, in eine Polypeptidase und eine Dipeptidase, haben Waldschmidt-Leitz, Balls und Waldschmidt-Graser¹⁾ berichtet. In Fortführung dieser Arbeit haben dann in diesem Jahre Waldschmidt-Leitz und Balls²⁾ Näheres über die Eigenschaften der Polypeptidase veröffentlicht.

Die Trennung des ereptischen Enzym-Gemisches in seine Komponenten wird bei der Einwirkung von Ferrihydroxyd oder besser noch bei der von Hämatit erreicht. Die Polypeptidase findet sich nach mehrmaliger Vornahme der Adsorption mit nahezu quantitativer Ausbeute frei von Dipeptidase in der Restlösung. Die Elution der Dipeptidase aus dem Adsorbat gelang zwar nicht quantitativ; es scheint, daß die Abtrennung schützender kolloider Begleitstoffe eine größere Instabilität des Enzyms verursacht. Die so dargestellten Dipeptidase-Präparate waren aber praktisch frei von Polypeptidase.

Der Nachweis eines selbständigen dipeptid-spaltenden Enzyms im ereptischen Enzym-Komplex war damit erbracht. Es ist deshalb auch gerechtfertigt, die Wirkungsweise der Dipeptidase in Fällen, in denen das zu untersuchende Substrat durch Polypeptidase nicht angegriffen wird, schon mit dem polypeptidase-haltigen Enzym zu bestimmen.

Das Ziel vorliegender Arbeit war nun, den Wirkungs-Mechanismus der enzymatischen Dipeptid-Spaltung näher zu kennzeichnen. Die Untersuchung einer Anzahl von sog. „Anilin-Peptiden“, d. h. Peptiden aus Amino-säure und substituiertem Anilin, auf ihre enzymatische Zerlegbarkeit hat gezeigt, daß viele von ihnen durch Dipeptidase spaltbar sind. Diese Anilin-Peptide bilden wegen der Möglichkeit, ihre Konstitution und ihre Eigenschaften durch Einführung von Substituenten verschiedener Art beliebig zu variieren, im Vergleich zu den Peptiden natürlicher Amino-säuren ein wertvolles und ergiebiges Material für das Studium des Mechanismus der Peptid-Hydrolyse.

Versuche von E. Waldschmidt-Leitz, W. Grassmann und A. Schöffner³⁾ haben gezeigt, daß das „Darm-Erepsin“ für seinen Angriff eine freie

¹⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls u. J. Waldschmidt-Graser, B. **62**, 956 [1929]. ²⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. A. K. Balls, B. **63**, 1203 [1930].

³⁾ E. Waldschmidt-Leitz, W. Grassmann u. A. Schöffner, B. **60**, 359 [1927].

Amino-⁴⁾, nicht aber eine freie Carboxylgruppe nötig hat. Dasselbe gilt auch für die dipeptid-spaltende Komponente des „Darm-Erepsins“, wie beispielsweise die Spaltbarkeit des Glycyl-*p*-nitranilins (Tabelle I) zeigt. Es konnte also scheinen, als sei die zweite, an der Säure-amid-Bindung beteiligte Komponente eines Dipeptids — die die Carboxylgruppe tragende Amino-säure — nur von untergeordnetem Einfluß auf die enzymatische Spaltbarkeit. Andere, in der Literatur beschriebene Beobachtungen⁵⁾, wie die stereochemische Spezifität der Peptidasen, führen indessen zu einer entgegengesetzten Überlegung. Danach ist die sterische Konfiguration der zweiten Komponente eines Dipeptids für seine enzymatische Zerlegbarkeit von der nämlichen Bedeutung wie die der ersten Komponente. So wird z. B. Glycyl-*d*-alanin durch Dipeptidase hydrolysiert, während sich Glycyl-*l*-alanin als unspaltbar erweist.

Die Annahme, daß das Enzym sich mit dem Substrat nicht durch eine, sondern durch zwei haptophore Gruppen verbindet, vermag diesen scheinbaren Widerspruch zu erklären. Euler und Josephson⁶⁾ haben in ihrer „Zwei-Affinitäts-Theorie“ die Ansicht vertreten, daß ein Enzym an zwei Stellen mit dem Substrat eine Bindung eingeht. Doch sind die aus dieser Theorie sich ergebenden Möglichkeiten selbst in der neueren Literatur noch nie eingehender diskutiert worden. Im Falle der Dipeptidase ist die Amino-gruppe als erste Haftstelle allgemein anerkannt⁷⁾. Als zweite reaktionsfähige Stelle, die auf Grund der oben mitgeteilten Beobachtung über die stereochemische Spezifität des Enzyms in der anderen Hälfte des Dipeptid-Moleküls liegen muß, kommt vor allem die Iminogruppe in Betracht, da das Fehlen einer Carboxylgruppe für die enzymatische Angreifbarkeit kein Hindernis darstellt^{7a)}.

Tabelle I.

Verhalten einiger Glycyl-anilin-Derivate gegen ereptische Peptidasen:

	„Erepsin“	Amino-Polypeptidase
Glycyl-anilin ⁸⁾	o	o
„ <i>p</i> -nitranilin	+ +	o
„ <i>p</i> -chlor-anilin	o	o
„ <i>o</i> -toluidin	o	o
„ <i>p</i> -toluidin	o	o
„ <i>o</i> -amino-benzoesäure	o	o
„ <i>m</i> -amino benzoesäure	+ +	o
„ <i>p</i> -amino-benzoesäure	+ +	±
„ <i>p</i> -nitranilin- <i>o</i> -carbonsäure	+	o

Die Zeichen bedeuten: o = nicht gespalten; ± = wenig gespalten; + = gespalten; ++ = stark gespalten.

⁴⁾ vergl. die älteren Beobachtungen von H. v. Euler u. K. Josephson; Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122 [1926].

⁵⁾ P. A. Levene, R. E. Steiger u. L. D. Bass, Journ. biol. Chem. **82**, 155 [1929].

⁶⁾ H. v. Euler u. K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **133**, 279 [1923—1924]; K. Josephson u. H. v. Euler, Ztschr. physiol. Chem. **162**, 85 [1926].

⁷⁾ E. Abderhalden, Naturwiss. **17**, 293 [1929].

^{7a)} A. K. Balls, Habilitations-Schrift, Prag 1930.

⁸⁾ Einen entgegengesetzten Befund, daß Glycyl-anilin durch ereptisches Enzym hydrolysiert wird, teilen E. Abderhalden u. H. Brockmann, Ferment-Forsch. **10**, 159 [1928], mit. Unsere wiederholten Versuche zeigen die absolute Unspaltbarkeit dieses Präparates, vergl. Experimenteller Teil S. 40.

Die Versuche dieser Abhandlung zeigen, daß die zweite Haftstelle tatsächlich die Iminogruppe des Peptids ist. Es ist nämlich möglich, die Spaltbarkeit eines Peptids, durch Einführung oder Stellungs-Änderung einer, gegenüber dem Enzym, indifferenten Gruppe, deren Nähe die Reaktions-Fähigkeit der Peptid-Bindung bewirkt, zu ändern. Die Bedeutung des Charakters der Peptid-Bindung für die Affinität zum Enzym geht hervor aus den Beispielen der Tabelle I über die Spaltbarkeit verschiedener Glycyl-aniline. Wenn, wie die Tabelle zeigt, Glycyl-*p*-nitranilin, Glycyl-*p*-amino-benzoesäure und Glycyl-*p*-nitranilin-*o*-carbonsäure spaltbar sind, während Glycyl-anilin, Glycyl-*p*-toluidin und Glycyl-*o*-amino-benzoesäure nicht spaltbar sind, so deuten wir diesen Einfluß der Substituenten (Carboxyl bzw. Nitrogruppe) als eine Änderung des sauren Charakters der Peptid-Bindung⁹⁾, und zwar der Iminogruppe; denn die Anwesenheit dieser Substituenten ist für die Spaltbarkeit an sich nicht notwendig.

Darnach also sollte die Iminogruppe selbst (bzw. ihr Wasserstoffatom) an der Reaktion mit dem Enzym beteiligt sein. Für diese Anschauung geben die Versuche von M. Bergmann, du Vigneaud und Zervas¹⁰⁾ ein anschauliches Beispiel. Erfolgt die Substitution des Imino-Wasserstoffs durch eine Acetylgruppe, statt durch ein Enzym, so macht sich eine bemerkenswerte Abnahme in der Stabilität der Peptid-Bindung bemerkbar.

Daß der saure Charakter der Iminogruppe auch durch den Abstand der sauren Substituenten von ihr bestimmt ist, wird besonders anschaulich durch die in der Tabelle gegebene Gegenüberstellung der Spaltbarkeit von Glycyl-*o*-, *m*- und *p*-amino-benzoesäure belegt. Die Aminogruppe der unspaltbaren Glycyl-*o*-amino-benzoesäure ist, wie sich durch Analyse zeigen läßt, frei und besitzt, wie Hemmungs-Versuche ergeben, die Fähigkeit, sich mit dem Enzym zu verbinden. Die Möglichkeit einer sterischen Hinderung der Vereinigung von Enzym und Aminogruppe, durch die in *o*-Stellung befindliche Carboxylgruppe, scheint also nicht in Frage zu kommen. Auch eine sterische Hinderung der Vereinigung von Enzym und Peptid-Bindung ist in Anbetracht der Spaltbarkeit von Glycyl-*p*-nitranilin-*o*-carbonsäure unwahrscheinlich. Wenn demgegenüber die *m*- und *p*-Verbindung der Glycyl-amino-benzoesäure spaltbar ist, so wird man daraus schließen müssen, daß nur die Änderung des elektrochemischen Charakters der Iminogruppe, bedingt durch den in *o*-Stellung sich befindenden Substituenten, maßgebend ist für die Unspaltbarkeit der *o*-Verbindung.

Die Hemmung der Dipeptidase-Wirkung durch Substanzen wie Chloracetyl-tyrosin und Acetursäure¹¹⁾, die infolge der Abwesenheit einer enzymverankernden Aminogruppe als reaktionsfähige Gruppe nur die in der Peptid-Bindung selbst gelegene aufweisen und daher selbst nicht spaltbar sind, stützt gleichfalls die Anschauung, wonach die Iminogruppe die zweite Haft-

⁹⁾ vergl. die Ansicht von P. A. Levene u. H. S. Simms, Journ. biol. Chem. **62**, 711 [1929], wonach die Spaltbarkeit eines Peptids zum Teil eine Funktion der Dissoziationskonstanten der einzelnen Komponenten ist.

¹⁰⁾ M. Bergmann, V. du Vigneaud u. L. Zervas, B. **62**, 1909 [1929].

¹¹⁾ Früher haben H. v. Euler und K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122 [1926], eine Hemmung der Erepsin-Wirkung mit Acetursäure nicht gefunden. Die von ihnen angewandte Konzentration der Hemmungs-Substanz war im allgemeinen geringer und die Hemmung gegen die Verdauung von Diglycin gemessen.

stelle für das Enzym sei. Die Hemmungs-Erscheinung ist der Verankerung des Enzyms an der zweiten Haftstelle, der Iminogruppe, zuzuschreiben.

Beschreibung der Versuche.

A. Enzym-Lösungen und Substrate.

I. Darstellung der Enzym-Lösungen.

„Erepsin“ wurde nach den Angaben von E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner¹²⁾ aus dem Glycerin-Extrakt von Darm-Schleimhaut dargestellt. Nach der Elution mit $n/_{25}$ -Ammoniak wird durch Kieselgur filtriert und dann neutralisiert. Das Präparat ist frei von Carboxy-Polypeptidase und Proteinase.

Amino-Polypeptidase wurde nach den Angaben von E. Waldschmidt-Leitz und A. K. Balls¹³⁾ dargestellt.

Die Darstellung der Dipeptidase wurde wie folgendes Beispiel zeigt ausgeführt: 20 ccm einer Erepsin-Lösung werden mit $n/_{1}$ -Essigsäure auf $p_H = 5.0$ gebracht und 1-mal mit 5 ccm einer wäßrigen Suspension von 200 mg feingepulvertem Hämatit adsorbiert. Das Adsorbat wird 2-mal mit 20-proz. Glycerin, das Acetat-Puffer vom $p_H = 4.7$ enthält, gewaschen; dann wird mit einer 20% Glycerin enthaltenden $n/_{10}$ -sek.-Phosphat-Lösung eluiert, nach 30 Min. durch Kieselgur abfiltriert und neutralisiert. Alle Operationen werden bei einer Temperatur von 0° bis $+5^{\circ}$ ausgeführt. Die Elution enthält 0.00010 Dipeptidase-Einheiten und 0.00003 Polypeptidase-Einheiten¹⁴⁾.

II. Darstellung von Substraten.

Glycyl-anilin: Die Darstellung wurde nach der von W. Majert¹⁵⁾ angegebenen Methode durchgeführt, nur mit der Modifikation, daß das Peptid als Chlorhydrat isoliert wurde. Der Überschuß an Anilin wurde durch Wasserdampf-Destillation entfernt, die wäßrige Lösung filtriert, bei niedriger Temperatur wieder zur Trockne eingedampft, der Rückstand in absol. Alkohol gelöst und Salzsäure-Gas eingeleitet, bis die Krystalle des Chlorhydrats ausfielen. Nach dem Abkühlen wurde filtriert. Für 10 g Glykokoll-ester-Chlorhydrat wurden 100 ccm Alkohol benötigt, woraus 2 g des weißen, krystallinen, etwas hygroskopischen Hydrochlorids erhalten wurden; Schmp. 170° (unkorr.). Das Präparat enthielt noch geringe Mengen Ammoniumchlorid.

14.51 mg Sbst.: 2.27 mg N (Pregl). — $C_8H_{11}ON_2Cl$. Ber. N 15.1. Gef. N 15.7.

112 mg Sbst. verbraucht. bei der alkohol. Titration 6.3 ccm $n/_{10}$ -KOH; ber. 6.0 ccm $n/_{10}$ -KOH.

Glycyl-*o*-toluidin: Die Darstellung als Hydrochlorid ist analog der des Glycyl-anilins. Aus 10 g Glykokoll-ester-Chlorhydrat wurden 4 g Glycyl-*o*-toluidin als weißes, krystallines Pulver erhalten; Schmp. 256° (unkorr.).

7.15 mg Sbst.: 0.99 mg N (Pregl). — $C_9H_{13}ON_2Cl$. Ber. N 14.00. Gef. N 13.82. — 99.0 mg Sbst. (titriert in Alkohol): 4.90 ccm $n/_{10}$ -KOH; ber. 4.95 ccm $n/_{10}$ -KOH.

¹²⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. A. Schäffner, Ztschr. physiol. Chem. **151**, 31 [1926].

¹³⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. A. K. Balls, B. **63**, 1209 [1930].

¹⁴⁾ Eine Dipeptidase-Einheit entspricht ungefähr (unter den hier angegebenen Versuchs-Bedingungen) der 10-fachen Spaltung der Polypeptidase.

¹⁵⁾ W. Majert, Dtsch. Reichs-Pat. 59 121; Friedl, Fortschr. Teerfarben-Fabrikat. **3**, 1918.

Glycyl-amino-benzoesäuren: Die Darstellung erfolgte nach der Methode, die C. Tropp¹⁶⁾ zur Darstellung der Glycyl-*p*-amino-benzoesäure angegeben hat. Die Eigenschaften der *p*-Säure stimmen überein mit den von ihm angegebenen.

Glycyl-*o*-amino-benzoesäure, Schmp. 236°. 8.056 mg Sbst.: 1.14 mg N (Pregl). — $C_9H_{10}O_3N_2$. Ber. N 14.4. Gef. N 14.2. — 50 mg Sbst. (Titration in Alkohol): 5.25 ccm n_{20} -KOH; ber. 5.16 ccm.

Glycyl-*m*-amino-benzoesäure, Schmp. 245°. 8.000 mg Sbst.: 1.15 mg N (Pregl). — $C_9H_{10}O_3N_2$. Ber. N 14.4. Gef. N 14.4. — 50 mg Sbst.: 5.21 ccm n_{20} -KOH; ber. 5.16 ccm.

Nitrierung der Glycyl-*o*-amino-benzoesäure: Mehrere Versuche, nitrierte Glycyl-*o*-amino-benzoesäure durch Kuppelung und Aminierung der Nitro-amino-benzoesäure darzustellen, waren erfolglos. Endlich gelang es, das Peptid selbst, ohne Zersetzung, zu nitrieren, allerdings in schlechter Ausbeute. 2.9 g Glycyl-*o*-amino-benzoesäure wurden allmählich zu einem Gemisch von 50 g Schwefelsäure-Monohydrat und 1.51 g Kaliumnitrat bei -5° bis -10° gegeben, 16 Stdn. stehen gelassen und darnach auf Eis gegossen. Die Säure wurde zuerst mit festem Natriumcarbonat, dann mit Natronlauge neutralisiert. Die Lösung wurde bei $40-50^{\circ}$ fast zur Trockne eingedampft und der Rückstand 3-mal mit je 50 ccm heißem Methylalkohol extrahiert. Der Extrakt wurde bei niedriger Temperatur wieder zur Trockne gebracht und in möglichst wenig heißem Wasser gelöst. Die nach 12-stdg. Stehen ausgeschiedenen Krystalle wurden nochmals aus Wasser umgelöst. Hellgelbe Blättchen, Schmp. (von der Geschwindigkeit des Erhitzens abhängig) zwischen 245° und 260° . Die Substanz ist in Wasser und warmem Alkohol ziemlich, in kaltem Alkohol schwer löslich. Ausbeute an gereinigtem Produkt: 0.6 g; allerdings ging mehr als die Hälfte beim Umkrystallisieren verloren.

Bei der Titration in Alkohol verbrauchten 81.4 mg Sbst. 3.5 ccm n_{10} -KOH (Phenolphthalein); für $C_9H_9O_3N_3$ ber. 3.42 ccm n_{10} -KOH.

N-[Chlor-acetyl]-*p*-toluidin: 21.4 g *p*-Toluidin wurden in 50 ccm Benzol gelöst, in einer Kältemischung gekühlt und mit 28.25 g Chlor-acetylchlorid (in 50 ccm Benzol) gekuppelt. Durch abwechselndes Zugabe von $n/1$ -NaOH wurde die freiwerdende HCl neutralisiert. Das Kuppelungsprodukt wurde nach beendeter Reaktion abfiltriert und aus heißem Alkohol umkrystallisiert. Schmp. $168-169^{\circ}$ (unkorr.). Ausbeute 35.0 g.

Glycyl-*p*-toluidin: 10 g gepulvertes [Chlor-acetyl]-*p*-toluidin wurden mit der 10-fachen Menge wässrigem Ammoniak (25-proz.) 60 Stdn. bei 40° stehen gelassen, das Reaktionsgemisch mit kochendem Wasser erhitzt und rasch abfiltriert. Nach Absaugen des überschüssigen Ammoniaks schied sich der Körper in schönen Krystallen aus, die dann vorsichtig aus wenig heißem Wasser umkrystallisiert wurden. Aus dem ungelösten Rückstand konnten 3 g Ausgangsprodukt, neben 2.3 g Iminokörper, isoliert werden. Ausbeute 2.9 g; sintert bei 95° und schmilzt bei 137° zu einer klaren Flüssigkeit.

5.27 mg Sbst.: 0.895 mg N (Pregl). — $C_9H_{11}ON_2$. Ber. N 17.08. Gef. N 16.95.

N-[Chlor-acetyl]-*p*-chlor-anilin: 13 g *p*-Chlor-anilin wurden in 200 ccm Äther gelöst, gut abgekühlt mit 17 g Chlor-acetylchlorid (in

¹⁶⁾ C. Tropp, B. 61, 1431 [1928].

50 ccm Äther) gekuppelt und durch abwechselndes Zugeben von $n/1$ -NaOH immer alkalisch gehalten. Nach beendeter Reaktion wurde abfiltriert, die ätherische Schicht im Vakuum eingengt, der ausfallende Niederschlag mit dem ersten vereinigt und über P_2O_5 getrocknet. Ausbeute: 20.5 g; Schmp. 173° (unkorr.). Löslich in Benzol, Essigsäure-anhydrid, Alkohol, unlöslich in Petroläther. Krystallisiert aus heißem Wasser in feinen Nadeln.

Glycyl-*p*-chlor-anilin: Die Darstellung ist analog der oben beschriebenen Gewinnung von Glycyl-*p*-toluidin. Aus 10 g [Chlor-acetyl]-*p*-chlor-anilin wurden, neben 4 g Ausgangsprodukt, 4 g Glycyl-*p*-chlor-anilin erhalten. Es wurde aus heißem Wasser umkrystallisiert. Schmp. 85° (unkorr.).

6.00 mg Sbst.: 0.900 mg N (Pregl). — $C_7H_6ON_2Cl$. Ber. N 15.22. Gef. N 15.00.

N-[Chlor-acetyl]-*p*-nitranilin: Eine Lösung von 7 g *p*-Nitranilin in ca. 250 ccm Äther wurde mit ca. 100 ccm Wasser unterschichtet. Nach dem Abkühlen auf $3-5^\circ$ wurde mit 9 ccm Chlor-acetylchlorid (in 50 ccm Äther gelöst) und 150 ccm $n/1$ -NaOH gekuppelt. Die Substanz ist in Wasser unlöslich, in Alkohol, Äther und Methylalkohol wenig löslich. Aus viel heißem Alkohol umkrystallisiert: Schmp. 185° (unkorr.). Ausbeute 7.5 g.

0.2200 g Sbst.: 0.1475 g AgCl. — $C_8H_7O_2N_2Cl$. Ber. Cl 16.7. Gef. Cl 16.6.

Glycyl-*p*-nitranilin: Das fein gepulverte [Chlor-acetyl]-*p*-nitranilin wurde in der 10-fachen Menge wäßrigen Ammoniaks (25-proz.) suspendiert und 2 Tage bei 40° gehalten. Die Substanz löst sich nicht, sondern ballt sich zu einer harten Masse zusammen, welche in einer Reibschale zerkleinert und mit frischem Ammoniak angesetzt wurde. Dieses Verfahren wurde 2-mal wiederholt, das letztmal wurde der Niederschlag mit Wasser gewaschen und mit einem Überschuß (25 ccm) von 20-proz. Essigsäure in der Kälte behandelt. Der ungelöste Rückstand wurde abfiltriert, das Peptid aus der Lösung mit $n/1$ -NaOH gefällt und mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Aus 4.5 g [Chlor-acetyl]-*p*-nitranilin wurden 2.3 g Peptid gewonnen. Hellgelbes Pulver; Schmp. 165° (unkorr.). In Säuren löslich, in anderen Lösungsmitteln fast unlöslich.

8.86 mg Sbst.: 1.912 mg N — $C_8H_7O_2N_2$. Ber. N 21.55. Gef. N 21.60. — 50 mg Sbst. in $n/10$ -HCl gelöst, verbrauchten bei der alkohol. Rücktitration (Thymolblau) 2.60 ccm $n/10$ -KOH; ber. 2.60 ccm $n/10$ -KOH.

B. Spaltungsversuche.

Spaltung gewöhnlicher Di- und Polypeptide durch „Darm-Erepsin“, Amino-Polypeptidase und Dipeptidase.

Das $2^{1/2}$ -fache der aus Tabelle I zu ersiehenden Substrat-Mengen wurde in 5 ccm einer Lösung, die 1 ccm $m/1$ -Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer enthielt, gelöst und mit $m/1$ -Ammoniak auf $p_H = 8.0$ gebracht. Bei Versuchen mit „Erepsin“ enthielt der Ansatz 0.00036 Dipeptidase-Einheiten und 0.0027 Polypeptidase-Einheiten; die Verdauungszeit betrug 3 Stdn. Bei Dipeptidase-Versuchen enthielt der Ansatz 0.00002 Dipeptidase-Einheiten und 0.00006 Polypeptidase-Einheiten; die Verdauungszeit betrug 26 Stdn. Bei Polypeptidase-Versuchen enthielt der Ansatz 0.000016 Dipeptidase-Einheiten und 0.008 Polypeptidase-Einheiten; die Verdauungszeit betrug 3.5 Stdn. Die Spaltung wurde durch Titration von 2 ccm des Ansatzes in 50 ccm 95-proz. Alkohol gemessen.

Ta-

Substrat	„Erepsin“		
	Mol Substrat pro Titration	Aciditäts- Zuwachs ccm $n/_{10}$ -Lauge	% Spal- tung von einer Bindung
Dipeptide			
Glycyl-glycin	0.00025	0.70	28
<i>d,l</i> -Leucyl-glycin	0.00050	0.95	19
<i>d,l</i> -Alanyl-glycin	0.00025	1.03	41
Glycyl- <i>l</i> -tyrosin	0.00025	0.75	30
Glycyl- <i>d,l</i> -leucin	0.00050	1.50	30
Glycyl- <i>d,l</i> -alanin	0.00050	1.55	31
Polypeptide			
<i>d,l</i> -Leucyl-diglycin	0.00025	0.80	32
<i>d,l</i> -Alanyl-diglycin	0.00025	0.55	22
Triglycin	0.00025	0.22	8
<i>d,l</i> -Leucyl-glycyl- <i>l</i> -tyrosin	—	—	—
Tetraglycin	0.00025	0.15	6
<i>d,l</i> -Alanyl-triglycin	0.00025	0.10	4
<i>d,l</i> -Leucyl-triglycin	0.00012	0.10	8
Pentaglycin ¹⁷⁾	0.00012	0.15	12

Linderström-Lang berichtete neulich über die Schwierigkeit einer Spaltung von Leucyl-triglycin mit Polypeptidase, die wie hier beschrieben dargestellt war. Die oben mitgeteilten Resultate bestätigen diese Beobachtung. Auch das „Erepsin“, also das Enzym-Gemisch, spaltet Leucyl-triglycin sehr schwer, ebenso Alanyl-triglycin, obgleich die Alanyl-peptide für gewöhnlich leicht spaltbar sind. In der Tat zeigt sich, daß alle höheren Glycin-peptide nur sehr schwer gespalten werden. Es scheint, daß die Gegenwart von mehreren Glycin-Resten zusammen eine für die Polypeptidase ungünstige Konfiguration bildet.

Spaltung von Anilin-Peptiden durch „Erepsin“ und Amino-Polypeptidase.

Da viele dieser Substrate schwer angreifbar sind, werden die Werte der alkohol. Titration durch eine Farbenreaktion ergänzt. Diese beruht auf der Fähigkeit der Anilin-Derivate mit salpetriger Säure zu reagieren und dann mit Phenol einen Farbstoff zu bilden. Von der Lösung der unten angegebenen Substrate (s. Tabelle III) wurden 2 ccm zur Bestimmung mit 0.05 ccm $n/_{1}$ -Essigsäure gemischt, in Eis gekühlt und dann 0.05 ccm 30-proz. Natriumnitrit-Lösung zugegeben. Dieser Lösung setzt man nach 30 Sek. 1 ccm $n/_{1}$ -Alkali und darauf 0.5 ccm einer 1-proz. Phenol-Lösung zu. Nach 5–10 Min. läßt sich dann die entstehende Farbe beobachten. Es kann hier nicht im einzelnen ein allgemeines Verfahren angegeben werden, da die Bedingungen für die Diazotierung und Kuppelung der Anilin-Derivate bei den einzelnen Beispielen variieren. Ehe man diese Farbreaktion anwendet, ist es notwendig, die Reaktion mit einem Gemisch von Substrat,

¹⁷⁾ Teilweise in Suspension.

belle II.

Dipeptidase			Polypeptidase		
Mol Substrat pro Titration	Aciditäts-Zuwachs ccm n_{10} -Lauge	% Spaltung von einer Bindung	Mol Substrat pro Titration	Aciditäts-Zuwachs ccm n_{10} -Lauge	% Spaltung von einer Bindung
0.00025	0.26	10	0.00025	0.01	0.4
0.00025	0.20	8	0.00025	0.00	0
0.00025	0.75	30	0.00025	0.04	2
0.00025	0.20	8	0.00025	0.03	1
0.00025	0.55	22	0.00025	0.04	2
0.00025	0.35	14	0.00025	0.01	0
0.00025	0.04	2	0.00025	0.90	36
0.00025	0.00	0	0.00025	0.68	27
0.00025	0.08	3	0.00025	0.73	29
0.00007	0.04	6	0.00007	0.28	40
0.00025	0.05	2	0.00025	0.40	16
0.00025	0.10	4	0.00025	0.15	6
—	—	—	0.00012	0.10	8
0.00012	0.05	4	0.00012	0.45	38

Enzym und Puffer, zu dem eine Spur des als Endprodukt zu erwartenden Anilin-Derivates gegeben ist, auszuprobieren. Nur so ist es möglich zu erfahren, unter welchen Bedingungen die Diazotierung verläuft, ob in der Kälte oder bei Zimmer-Temperatur, ob das Alkali vor dem Phenol zugegeben werden muß, oder ob es besser ist, eine alkalische Phenol-Lösung zu verwenden. Manche Enzym-Lösungen sind ungeeignet, da es vorkommt, daß sie selbst eine gelbe Farbe geben. Auch ist es wichtig, die Puffer-Mengen sorgfältig festzustellen. Wenn die nötigen Vorsichtsmaßregeln getroffen sind, ist die Methode genau und wegen ihrer großen Empfindlichkeit wichtig.

Bei den in Tabelle III angegebenen Versuchen wurden die Titrationsen mit 5 ccm Lösung in 100 ccm 95-proz. Alkohol durchgeführt; zu den Diazotierungs-Proben wurden jeweils 2.00 ccm genommen. Die Substrat-Konzentration ist in Milligrammen pro 5.00 ccm für die Titrationsen und pro 2.00 ccm für die Diazotierungs-Versuche angegeben. An Puffer wurde entweder im Falle von Ammoniak-Ammoniumchlorid die Hälfte, oder im Falle von Phosphat ein Fünftel der angewandten Äquivalente Substrat zugegeben. Das p_H war 8.0.

Hemmung der Spaltung von Glycyl-*m*-amino- und Glycyl-*p*-amino-benzoesäure in Gegenwart von Glycyl-*o*-amino-benzoesäure.

Versuche mit Glycyl-*p*-amino-benzoesäure: 150 mg Glycyl-*o*-amino-benzoesäure wurden in 25 ccm Wasser, das m_{10} -Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer (1:1) enthielt, aufgelöst, mit 0.004 Dipeptidase-Einheiten (als „Erepsin“) versetzt, und das Gemisch 15 Min. im Thermostaten bei 30° behalten und dann mit einer Lösung von 75 mg Glycyl-*p*-amino-benzoesäure in 25 ccm Wasser, die 0.5 ccm m_{10} -Ammoniak-Puffer enthielt, auf 50 ccm aufgefüllt. Das p_H der Mischung war 8.0; mit 5.00 ccm dieser

Ta-

Substrat	Angewandte Menge pro Bestimmung mg	Angewandte Enzym-Einheiten pro Bestimmung	
		Di-peptidase	Amino-Poly-peptidase
Glycyl-anilin	8	0.00015	0.0017
Glycyl- <i>p</i> -nitranilin ¹⁷⁾	20	0.0010	0.015
	20	0.0010	0.015
	3	0.0003	0.008
	3	0	0.006
Glycyl- <i>p</i> -chlor-anilin	110	0.00047	0.0052
	4	0.00009	0.0010
	4	0	0.0016
Glycyl- <i>o</i> -toluidin	8	0.00015	0.0017
Glycyl- <i>p</i> -toluidin	100	0.00047	0.0052
	4	0.00009	0.0010
	4	0	0.0016
Glycyl- <i>o</i> -amino-benzoesäure	16	0.003	0.030
	16	0.003	0.030
Glycyl- <i>m</i> -amino-benzoesäure	60	0.0014	0.015
	60	0.0042	0.045
	30	0.0001	0.001
	30	0	0.001
Glycyl- <i>p</i> -amino-benzoesäure	40	0.0014	0.015
	40	0.0042	0.045
	15	0.00008	0.0006
	15	0	0.0006
Glycyl- <i>p</i> -nitro- <i>o</i> -amino-benzoesäure	1	0.00016	0.0018
	1	0	0.0013

Lösung wurde die Spaltung mit Hilfe der Diazotierungs-Proben verfolgt, und mit einer Lösung von 75 mg der *p*-Säure, 1.5 ccm Puffer und 0.004 Di-peptidase-Einheiten in 50 ccm Gesamtvolumen ($p_H = 8.0$) verglichen.

Stunden	<i>para</i> + <i>ortho</i>	<i>para</i> allein
0	0	0
1	0	0
17	±	+
22	±	+ +

Die Zeichen bedeuten: 0 = keine Spaltung; ± = wenig Spaltung; + = Spaltung; + + = gute Spaltung.

Versuche mit Glycyl-*m*-amino-benzoesäure: Zu wechselnden Mengen einer Lösung der *ortho*-Säure, die in 50 ccm 300 mg enthielt, wurden 2 ccm Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer und 0.25 ccm „Erepsin“ (= 0.004 Dipeptidase-Einheiten) zugegeben. Dieser Ansatz kam dann 30 Min. in den Thermostaten von 30°. Dann wurden 2 ccm einer auf gleiche Weise bereiteten Lösung der *meta*-Säure zugegeben und die Lösungen in allen Fällen mit Wasser auf 10 ccm aufgefüllt. Die Farbenreaktion wurde dann nach

¹⁷⁾ in Suspension.

belle III.

Zeit Stunden	Aciditäts- Zuwachs ccm $n/_{10}$ -Lauge	% Spaltung von einer CO.NH- Bindung	Diazotier.- Probe ¹⁸⁾	Puffer
17	—	—	o	Phosphat
18	0.30	30	—	
46	0.47	47	—	Phosphat
4	—	—	+ +	
6	—	—	o	
5	0.10	0	—	
15	—	—	o	Phosphat
15	—	—	o	
16	—	—	o	Phosphat
5	0.07	0	—	
15	—	—	o	Phosphat
15	—	—	o	
19	—	—	o	Ammoniak-Ammoniumchlorid
43	—	—	o	
17	1.40	50	—	Ammoniak-Ammoniumchlorid
41	2.00	70	—	
22	—	—	+ +	
22	—	—	o	
18	0.95	47	—	Ammoniak-Ammoniumchlorid
42	1.25	67	—	
22	—	—	+ +	
22	—	—	±	
22	—	—	+	Phosphat
22	—	—	o	

verschieden langen Verdauungszeiten mit 2 ccm der Lösung durchgeführt. Die Farbenintensität wurde mit einer Reihe von Standard-Lösungen verglichen. Diese hatte man erhalten durch Diazotierung von bekannten Mengen von *m*-Amino-benzoesäure unter den gleichen Bedingungen. Die Resultate zeigen die geschätzte Menge der durch das Enzym in Freiheit gesetzten *m*-Amino-benzoesäure.

Tabelle IV.

Spaltung von Glycyl-*m*-amino-benzoesäure durch „Erepsin“, in Gegenwart von Glycyl-*o*-amino-benzoesäure.

Zusammensetzung der Verdauungs-Lösung.

Versuch Nr.	1	2	3	4
ccm Stammlösung von Glycyl- <i>o</i> -amino-benzoesäure .	0	2	4	8
ccm Stammlösung von Glycyl- <i>m</i> -amino-benzoesäure .	2	2	2	2
ccm „Erepsin“-Lösung.....	0.25	0.25	0.25	0.25
Gesamtvolumen.....	10.0	10.0	10.0	10.3

¹⁸⁾ Zeichen bedeuten: o = nicht gespalten; ± = wenig gespalten; + = gespalten; + + = sehr stark gespalten.

Nach der Verdauung enthielten 2 ccm der obigen Lösungen folgende Mengen *m*-Amino-benzoesäure (mg):

Versuch Nr.	1	2	3	4
Nach 0 Stdn.	0	0	0	0
„ 3 „	0.5	0.25	0.15	0.15
„ 7 „	0.5	0.5	0.25	0.25

Identifizierung der Spaltungs-Endprodukte.

Glycyl-*p*-nitranilin: 220 g Glycyl-*p*-nitranilin wurden mit 4 ccm $m/5$ -Phosphat-Puffer vom $p_H = 8.0$ zusammen im Mörser verrieben und dann mit 75 ccm Wasser, das 2 ccm Erepsin-Lösung (= 0.0020 Dipeptidase-Einheiten) enthielt, versetzt. Nach einer Verdauungszeit von 20 Stdn. bei 30° und gelegentlichem Umschütteln wurde 1 ccm $n/1$ -Sodalösung zugegeben. Dann wurde 3-mal mit einem gleichen Volumen Äther extrahiert. Der Rückstand nach Verdampfen des Äthers wurde in 75 ccm heißem Wasser unter Zugabe von 0.5 ccm $n/1$ -Essigsäure gelöst. Diese Lösung wurde abermals 3-mal mit Äther wie vorhin extrahiert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde einmal aus sehr verdünnter Essigsäure umkrystallisiert. Beim Einengen auf 4 ccm erscheinen orangegelbe Krystalle. Schmp. 146° und 147° (unkorr.). Misch-Schmp. mit *p*-Nitranilin 147°; Ausbeute 25 mg = 16%.

Glycyl-*m*-amino-benzoesäure: 400 mg der Substanz wurden in 100 ccm Wasser, das 3 ccm $n/1$ -Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer (1 : 1) enthielt gelöst, auf $p_H = 8.0$ gebracht und 18 Stdn. bei 39° mit 0.0047 Dipeptidase-Einheiten (als „Erepsin“) verdaut. Dann wurde die Lösung mit Salzsäure auf $p_H = 6.0$ gebracht und 2-mal mit einem gleichen Volumen Äther extrahiert. Nach dem dieser verdampft worden war, wurde der Rückstand in 50 ccm Wasser gelöst und noch 2-mal mit Äther extrahiert. Nach dem Verdampfen des Äthers wurde ein Rückstand von 11 mg erhalten. Schmp. 174° (unkorr.); Misch-Schmp. mit *m*-Amino-benzoesäure (1 : 1) = 175°.

Glycyl-*p*-amino-benzoesäure: 300 mg dieser Substanz wurden in 75 ccm wäßriger Lösung, die 3 ccm Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer enthielt, 18 Stdn. mit 0.0047 Dipeptidase-Einheiten verdaut. Temp. 39°. Die Lösung wurde dann, wie im vorigen Versuch bei der *m*-Verbindung beschrieben ist, behandelt. Die Ausbeute betrug 16 mg eines schönen, kristallinen Rückstandes; Schmp. 185° (unkorr.). Der Misch-Schmp. mit *p*-Amino-benzoesäure war 185°.

Hemmung der Dipeptidase durch [Chlor-acetyl]-tyrosin und Acetursäure.

Zu einer Lösung von Leucyl-glycin, die Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer (1 : 1) enthielt, wurde [Chlor-acetyl]-tyrosin bzw. Acetursäure gegeben und diese Lösung dann mit $n/1$ -Ammoniak auf $p_H = 8.0$ eingestellt. Dieser Lösung wurde nunmehr gereinigtes „Erepsin“ zugegeben, das aus dem gewöhnlichen Tonerde-Adsorbat durch Elution mit einer 40% Glycerin enthaltenden Lösung von $n/10$ -*sek.*-Phosphat dargestellt war. Von diesem Ansatz wurden vor und nach der Verdauung bei 30° aliquote Teile alkoholisch titriert. Die in der Tabelle V angegebenen Werte gelten für 5 ccm Lösung pro Titration.

Tabelle V.

Angew. Enzym Di.-e.	Angew. Hemmungs- substanz Mol	Angew. Leucyl- glycin Mol	Angew. Puffer Mol	Zeit Min.	Aciditäts Zuwachs ccm n/10-Lauge
[Chlor-acety]-tyrosin:					
0.0003	0	0.0005	0.001	217	0.80
0.0003	0.00025	0.0005	0.001	217	0.05
0.0003	0	0.0002	0.0004	53	0.35
0.0003	0.00010	0.0002	0.0004	53	0.22
0.0003	0	0.0005	0.001	160	0.55
0.0003	0.00025	0.0005	0.001	160	0.05
Acetursäure:					
0.0002	0	0.0005	0.001	160	0.55
0.0002	0.0005	0.0005	0.001	160	0.40
0.0002	0.0010	0.0005	0.001	160	0.15

Der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft danken wir ergebenst für die zur Verfügung gestellten Mittel.

5. Ernst Waldschmidt-Leitz und Arnold K. Balls: Zur Frage nach den Ursachen sterischer Auslese durch Enzyme. (XXI. Mitteilung zur Spezifität tierischer Proteasen.)

[Aus d. Institut für Biochemie d. Deutsch. Techn. Hochschule in Prag.]
(Eingegangen am 5. November 1930.)

Die Erscheinung der sterischen Auslese bei enzymatischen Reaktionen ist zuerst durch Emil Fischer in dem Sinne gedeutet worden, „daß zwischen den Enzymen und ihrem Angriffs-Objekt eine Ähnlichkeit der molekularen Konfiguration bestehen muß, wenn Reaktion erfolgen soll“¹⁾. Das bekannte Gleichnis von Schloß und Schlüssel veranschaulichte diesen Gedanken. Für das Verständnis enzymatischer Reaktionen überhaupt hat es sich als sehr fruchtbar erwiesen; für die Annahme der Bildung intermediärer Enzym-Substrat-Verbindungen bei enzymatischen Katalysen bilden die Erscheinungen der sterischen Spezifität eine der wichtigsten Stützen.

Auf Grund seiner Beobachtungen über die spezifische Spaltbarkeit sterisch isomerer Glucoside und Peptide gelangte Emil Fischer bekanntlich zu der Schlußfolgerung, daß nur die aus den natürlich vorkommenden Antipoden zusammengesetzten Substrate, z. B. Peptide, enzymatisch zerlegbar seien. Diese Aussage hat durch neuere Erfahrungen an peptid-spaltenden Enzymen eine Einschränkung erfahren. Während sie für die Hydrolyse von Dipeptiden, durch Dipeptidase, durchwegs zu gelten scheint²⁾, wird die sterische Auslese bei der Wirkung polypeptid-spaltender Enzyme, z. B. Amino-Polypeptidase oder Carboxy-Polypeptidase, oft nur durch die Konfiguration der an der Vereinigung mit dem Enzym beteiligten Amino-säure-

¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **26**, 60, u. zw. S. 82 [1898].

²⁾ vergl. die zahlreichen Arbeiten von E. Abderhalden und Mitarbeitern, Ferment-Forsch., sowie neuerdings P. Rona u. Th. Marsson, Biochem. Ztschr. **224**, 384 [1930].