

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“<sup>1)</sup>. 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 scheint<sup>2)</sup>, 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-

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

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

Komponente, beispielsweise der die freie Amino- oder Carboxylgruppe tragenden, bestimmt<sup>3)</sup>: so erfolgt die Hydrolyse des Tripeptids *d,l*-Leucyl-glycyl-*l*-tyrosin nur durch Amino-Polypeptidase asymmetrisch, unter Beschränkung auf die den *l*-Leucin-Rest enthaltende Komponente, durch Carboxy-Polypeptidase dagegen symmetrisch, mit der Bildung von *d,l*-Leucyl-glycin neben *l*-Tyrosin<sup>4)</sup>. Die beobachtete Beschränkung des spezifischen Einflusses der sterischen Konfiguration auf die haptophoren Gruppen in den Substraten vertieft die Bedeutung der Fischerschen Vorstellungen über die sterische Anpassung der Enzyme; denn sie erlaubt eine Kennzeichnung der an der primären Verankerung beteiligten Komponente im Substrat auf Grund der enzymatischen Auslese.

Als Ursache der sterischen Spezifität gegenüber der enzym-bindenden Gruppe im Substrate erscheint danach die konfigurative Anpassung des Enzyms im Sinne Emil Fischers. Eine enzymatische Spaltbarkeit von Peptiden, deren enzym-verankernder Amino-säure-Rest eine Anordnung der Substituenten am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom aufweist, welche von der in den natürlich vorkommenden Amino-säuren abweicht, hat man noch nicht beobachtet<sup>5)</sup>; nur diese scheint dem sterischen Bau der substrat-bindenden Gruppe in den Peptidasen zu entsprechen. Sie läßt sich indessen auch mit „unnatürlichen“ Modellen nachahmen. So geht aus den Versuchen dieser Abhandlung hervor, daß von den drei isomeren [Chloracetyl-amino]-benzoesäuren, dem *o*-, dem *m*- und dem *p*-Derivat, nur die *meta*-Verbindung durch Carboxy-Polypeptidase aus Pankreas gespalten wird. Die Tatsache, daß hier ein nur aus naturfremden Bausteinen aufgebautes Substrat durch eine Peptidase zerlegt wird, scheint uns besonders bemerkenswert. Wir deuten sie mit der Vorstellung, daß nur in der *meta*-substituierten Säure die räumliche Anordnung der Substituenten die Reaktion der Carboxy-Polypeptidase mit dem Carboxyl gestattet.

Mit der Bildung von Enzym-Substrat-Verbindungen ist der Vorgang der enzymatischen Katalyse indessen nicht erschöpft; als seine zweite Phase wird der Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes in freies Enzym und in die Spaltprodukte angenommen<sup>6)</sup>. Für den Mechanismus dieses Zerfalles liegen verschiedene Erklärungen vor. So wird in neueren Untersuchungen von E. Abderhalden<sup>7)</sup> für das Beispiel der Peptidasen die Zerfalls-Tendenz der Peptidase-Peptid-Verbindung auf eine durch die Verankerung des Enzyms herabgesetzte Stabilität der Peptid-Bindung bei der für die Spaltung optimalen Wasserstoff-Zahl, also auf eine Wirkung der Wasserstoff-Ionen, zurückgeführt. Diese Erklärung, die aus dem Verhalten acylierter Peptide, z. B. gegenüber Lauge, abgeleitet ist, erscheint uns unzureichend. Sie wird gerade für das Beispiel enzymatischer Peptid-Spaltung nicht zutreffen; denn durch Affinitäts-Messungen bei verschiedener Wasserstoff-Zahl ist gezeigt worden,

<sup>3)</sup> vergl. dazu z. B. E. Abderhalden u. E. Schwab, Ferment-Forsch. **10**, 179, 305 [1928] (z. B. Spaltbarkeit von *d*-Leucyl-glycyl-*l*-leucin durch Carboxy-Polypeptidase); E. Abderhalden u. H. Mayer, ebenda **11**, 143 [1929/30] (z. B. Spaltbarkeit von Glycyl-*l*-leucyl-glycyl-*d*-leucin durch Amino-Polypeptidase).

<sup>4)</sup> E. Waldschmidt-Leitz u. H. Schlatter, Naturwiss. **16**, 1026 [1928].

<sup>5)</sup> siehe dazu E. Abderhalden u. F. Reich, Ferment-Forsch. **10**, 173, 319 [1928]; E. Abderhalden u. R. Fleischmann, ebenda **10**, 195 [1928].

<sup>6)</sup> L. Michaelis u. M. L. Menten, Biochem. Ztschr. **49**, 333 [1913].

<sup>7)</sup> siehe z. B. Naturwiss. **17**, 293, u. zw. S. 294 [1929], **18**, 429 [1930].

daß der Einfluß der Wasserstoff-Ionen auf die enzymatische Spaltung von Dipeptiden nicht etwa die Zerfalls-Geschwindigkeit der Enzym-Substrat-Verbindung, sondern daß er deren Bildungs-Tendenz, das Gleichgewicht zwischen Enzym und Substrat, betrifft<sup>8)</sup>.

Für das Verständnis enzymatischer Reaktionen scheint uns die Annahme von mehr als nur einer Kupplung zwischen Enzym und Substrat den Vorzug zu verdienen, wie sie in der sog. „Zwei-Affinitäts-Theorie“ von H. v. Euler und K. Josephson<sup>9)</sup> Ausdruck gefunden hat, die Unterscheidung zwischen funktionellen neben den haptophoren Gruppen in Enzym und Substrat<sup>10)</sup>. So lehren uns die Erfahrungen über die spezifische Spaltbarkeit von Dipeptiden durch Dipeptidase, daß nicht nur die Konfiguration an der freien Aminogruppe der Peptide, an welcher die primäre Verankerung des Enzyms erfolgt<sup>11)</sup>, sondern auch die der zweiten Amino-säure-Komponente die Spezifität bestimmt: in dem Racemate Glycyl-*d, l*-alanin wird nur die das *d*-Alanin enthaltende Komponente enzymatisch zerlegt. Die Frage erscheint naheliegend, ob auch diese Reaktions-Auslese, welche nicht die Bildungs-, sondern die Zerfalls-Reaktion der Enzym-Substrat-Verbindung betrifft, auf eine konfigurative Eigenart der funktionellen Gruppe des Enzyms, oder aber, ob sie auf eine verschiedene chemische Reaktions-Fähigkeit der funktionellen Gruppe im Substrate zurückzuführen ist.

Aus den Beobachtungen von A. K. Balls und F. Köhler<sup>12)</sup> wird gefolgert, daß als die zweite Haftstelle der Dipeptidase in den Substraten die NH-Gruppe der Peptid-Bindung anzusehen ist, deren saurer Charakter auf die Affinität zum Enzym von Einfluß sei; die Spaltbarkeit von Glycyl-*p*-amino-benzoessäure oder von Glycyl-*p*-nitranilin einerseits, die Unspaltbarkeit des Glycyl-anilins andererseits wird so gedeutet. Die Frage scheint uns der Diskussion zugänglich, ob die nämliche Ursache auch für die Spezifität gegenüber sterisch isomeren Peptiden, z. B. Glycyl-*d*-alanin einerseits, Glycyl-*l*-alanin andererseits, verantwortlich ist, die Frage also, ob die chemische Affinität der Iminogruppe zum Enzym durch die Stellung und die Natur der Substituenten am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom beeinflußt wird. In diesem Zusammenhange verdienen die Beobachtungen von P. A. Levene, R. E. Steiger und L. W. Bass<sup>13)</sup> erhöhtes Interesse, wonach Dipeptide, deren freies Carboxyl und deren Iminogruppe an ein tertiäres Kohlenstoffatom gebunden sind, von Dipeptidase nicht angegriffen werden, beispielsweise die [Glycyl-amino]-phenyl-methyl-essigsäure,  $H_2N \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot C(CH_3)(C_6H_5) \cdot COOH$ . Mit der schrittweisen Substitution der  $CH_3$ -Gruppe im Glycyl-glycin zum Glycyl-*d, l*-alanin und weiter zum Glycyl-*d, l*-*C*-phenyl-alanin sinkt also die enzymatische Spaltbarkeit von 100 über 50% auf Null. Die Vorstellung, daß für die sterische Auslese durch Dipeptidase an ihrer ersten und ihrer zweiten Haftstelle im Substrate verschiedenartige Ursachen verantwortlich seien,

<sup>8)</sup> E. Waldschmidt-Leitz u. G. J. Schuckmann, Ztschr. physiol. Chem. **184**, 56, u. zw. S. 58 [1929].      <sup>9)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **183**, 279 [1923/24].

<sup>10)</sup> vergl. E. Waldschmidt-Leitz, Ztschr. angew. Chem. **43**, 377 [1930].

<sup>11)</sup> vergl. z. B. H. v. Euler u. K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122, u. zw. S. 124 u. 137 [1926]; K. Josephson u. H. v. Euler, ebenda **162**, 85 [1926/27].

<sup>12)</sup> Voranstehende Abhandlung; vergl. dazu E. Waldschmidt-Leitz, Ztschr. angew. Chem. **43**, 377 [1930].

<sup>13)</sup> Journ. biol. Chem. **82**, 155, u. zw. S. 157 [1929].

wird weiter gestützt durch den Befund<sup>14)</sup>, daß *o*- und *m*-Aminobenzoyl-glycin sich als unspaltbar (analog z. B. dem *l*-Alanyl-glycin), Glycyl-*o*- und -*m*-amino-benzoesäure aber sich als zerlegbar erweisen (nicht analog z. B. dem Glycyl-*l*-alanin). Mit der Prüfung dieser Frage an weiterem synthetischem Material wird der eine von uns (A. K. Balls) sich beschäftigen.

### Beschreibung der Versuche.

#### *N*-[Chlor-acetyl]-amino-benzoesäuren.

Das *p*-Derivat wurde bereits von C. Tropp<sup>15)</sup> beschrieben; zur Darstellung der *o*- und *m*-Säure verfuhr man ähnlich: Die Lösung von 14 g Anthranilsäure bzw. *m*-Amino-benzoesäure in 100 ccm *n*-NaOH wird in einer Flasche mit Steigrohr mit einer 2 cm hohen Äther-Schicht bedeckt; nun werden bei einer Temperatur von 3–5° unter dauerndem Schütteln 14 g Chlor-acetylchlorid, in 50 ccm Äther gelöst, in kleinen Anteilen, jeweils bis zum Verschwinden des Geruches, eingetragen, wobei die Reaktion durch Zugabe von *n*-NaOH schwach alkalisch gehalten wird. Nach dem Abtrennen der ätherischen Schicht wird mit HCl schwach angesäuert, die ausgefallene Säure nach dem Waschen mit Eiswasser in wenig heißem Alkohol gelöst und durch Verdünnen der alkohol. Lösung mit dem gleichen Volumen Wasser in krystallinischer Form gewonnen. Die Ausbeute ist annähernd die theoretische. Das Löslichkeits-Verhalten des *o*- und *m*-Derivates unterscheidet sich kaum von dem für die *p*-Säure beschriebenen. Schmp. (unkorr.) 190° (*ortho*-), 232° (*meta*-), 257° (*para*-).

Zur Titration in Alkohol gelöst, mit überschüssiger 0.1-*n*. NaOH versetzt und mit 0.1-*n*. HCl zurücktitriert. 0.2000 g Sbst.: 9.43 ccm (*o*-) bzw. 9.30 ccm (*m*-) bzw. 9.30 ccm (*p*-). Ber. 9.38 ccm.

*o*-Säure. 15.2 mg Sbst.: 0.96 mg N (Pregl). — *m*-Säure. 30.4 mg Sbst.: 1.92 mg N. — *p*-Säure. 16.0 mg Sbst.: 1.07 mg N.

$C_9H_9O_3NCl$ . Ber. N 6.6. Gef. N 6.3 (*o*-), 6.3 (*m*-), 6.7 (*p*-).

Spaltbarkeit durch Carboxy-Polypeptidase aus Schweine-Pankreas: Darstellung des von Dipeptidase, Amino-Polypeptidase und Proteinase befreiten Enzyms nach E. Waldschmidt-Leitz und A. Purr<sup>16)</sup>; angew. Puffer: 0.30 ccm *n*-NH<sub>4</sub>Cl + 1.00 ccm 0.2-mol. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Substrat in *n*-NaOH zu neutraler Reaktion gelöst, p<sub>H</sub> = 7.6; Hydrolyse bestimmt nach Zusatz von überschüssiger 0.1-*n*. Lauge durch Rücktitration mit 0.1-*n*. Säure in alkohol. Lösung; Angaben beziehen sich auf die Analysenprobe von 10.0 ccm.

Substrat	Angew. mg	Angew. C.-Pol.-E.	Zeit Std.	Acid.-Zuwachs ccm 0.1- <i>n</i> .	Spaltg. %
Chloracetyl- <i>o</i> -aminobenzoesäure ...	60	0.0018	18	0.00	0
	60	0.0018	42	0.00	0
Chloracetyl- <i>m</i> -aminobenzoesäure ...	50	0.0013	18	0.45	19
Chloracetyl- <i>p</i> -aminobenzoesäure ...	60	0.0026	17	0.00	0
	60	0.0026	65	0.02	0

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

<sup>14)</sup> Nach unveröffentlichten Versuchen.

<sup>15)</sup> B. 61, 1431, u. zw. S. 1433 [1928].

<sup>16)</sup> B. 62, 2217, u. zw. S. 2223, 1929.