

# Über die Struktur der einfachsten Eiweißkörper

Von

E. WALDSCHMIDT-LEITZ, PRAG

(Eingegangen am 11. 9. 1935. Vorgelegt in der Sitzung am 17. 10. 1935)

Die Aufklärung der Eiweißstruktur streben wir mit Hilfe des stufenweisen enzymatischen Abbaus an. Für den Erfolg dieses Verfahrens ist neben der Anwendung möglichst einheitlicher, gereinigter Eiweißkörper die Verwendung einheitlicher enzymatischer Katalysatoren von ausschlaggebender Bedeutung. Denn es ist die Aufgabe, den hydrolytischen Abbau an möglichst zahlreichen und definierten Zwischenstufen festzuhalten, um die Zusammensetzung der jeweiligen Reaktionsprodukte zu ermitteln. Für diese Aufgabe stehen uns heute dank den verschiedenen erfolgreich durchgeführten Reinigungsverfahren eine größere Anzahl ihrer proteolytischen Wirkung nach einheitlicher Enzyme zur Verfügung. Unter den Proteinasen, den die eigentlichen Eiweißkörper angreifenden Proteasen, sind es neben dem Pepsin<sup>1</sup> und Chymosin<sup>2</sup> das Trypsin<sup>3</sup>, das Chymotrypsin<sup>4</sup> und die Protaminase<sup>5</sup> aus Pankreas, ferner das Papain als Typus der intrazellulären Proteinase; unter den Peptidasen andererseits sind Carboxypolypeptidase<sup>6</sup>, Amino-polypeptidase<sup>7</sup> und Dipeptidase<sup>8</sup> in einheitlichem Zustande zugänglich geworden.

Einem jeden dieser Enzyme kommt, wie man erkannt hat, beim Eiweißabbau eine besondere Aufgabe zu; denn die einzelnen Enzyme unterscheiden sich durch ihre spezifische Wirkungsweise.

<sup>1</sup> J. H. NORTHPROP, J. gen. Physiol. **14** (1931) 713.

<sup>2</sup> H. TAUBER und I. S. KLEINER, J. biol. Chem. **96** (1932) 745, 755; Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **220** (1933) 205.

<sup>3</sup> J. H. NORTHPROP und M. KUNITZ, J. gen. Physiol. **16** (1932) 267; E. WALDSCHMIDT-LEITZ und S. AKABORI, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **228** (1934) 224.

<sup>4</sup> J. H. NORTHPROP und M. KUNITZ, Science **78** (1933) 558.

<sup>5</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. E. KOFRANYI, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **222** (1933) 148.

<sup>6</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. A. PURR, Ber. dtsch. chem. Ges. **62** (1929) 2217.

<sup>7</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ, A. K. BALLS und J. WALDSCHMIDT-GRASER, Ber. dtsch. chem. Ges. **62** (1929) 956.

<sup>8</sup> W. GRASSMANN und H. DYCKERHOFF, Ber. dtsch. chem. Ges. **61** (1928) 656.

Für die eigentlichen Proteinasen geht dies hervor aus der Verschiedenartigkeit der Produkte ihrer Einwirkung auf Eiweiß. Indessen läßt sich hier bisher nur für einen einzigen Vertreter, die Protaminase aus Pankreas, die Wirkung chemisch genauer definieren. Dieses Enzym ist dadurch ausgezeichnet, daß es nur stärker basische, argininreiche, aber nicht hochmolekulare Eiweißstoffe oder gewisse Abbauprodukte derselben anzugreifen vermag und daß seine Wirkung sich auf die Abspaltung endständiger Argininreste mit freiem Carboxyl beschränkt. Dagegen ist die spezifische Wirkungsweise der drei oben angeführten und am besten untersuchten Peptidasen heute ziemlich weitgehend aufgeklärt. Von den zahlreichen strukturellen Voraussetzungen für die Wirkung der einzelnen Peptidasen<sup>9</sup> sei hier nur angeführt, daß für den Angriff der Amino-polypeptidase und der Dipeptidase die Gegenwart einer freien Aminogruppe, für den der Carboxy-polypeptidase eine freie Carboxylgruppe in den Peptiden erforderlich ist; hierbei spaltet die Amino-polypeptidase den die freie Aminogruppe, die Carboxy-polypeptidase den die freie Carboxylgruppe tragenden Aminosäurerest ab. Amino-polypeptidase vermag nur Tri- und höhere Peptide, Dipeptidase nur Dipeptide zu zerlegen, während man für die Carboxy-polypeptidase sowohl die Spaltbarkeit von Polypeptiden wie von Dipeptiden beobachtet hat. Denn für die Spaltbarkeit eines Peptids durch eine der Polypeptidasen ist neben den bereits angeführten strukturellen Voraussetzungen auch die Natur und die Anordnung der Aminosäuren von Bedeutung.

Zu den einfachsten Eiweißkörpern, die wir kennen, zählt die Gruppe der *Protamine* aus den Spermatozoen der Fische; ihre Zusammensetzung hat in den bahnbrechenden Arbeiten von A. KOSSEL<sup>10</sup> und seinen Schülern eine weitgehende Aufklärung erfahren. Die Protamine erscheinen für eine enzymatische Fraktionierung in besonderem Maße geeignet; denn sie weisen eine einfache und gleichartige Zusammensetzung auf, die durch eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Bausteinen, den überwiegenden Arginingehalt einerseits, die Beteiligung nur weniger Monoaminosäuren andererseits gekennzeichnet ist. Die Vorstellung

---

<sup>9</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ, Z. angew. Ch. **43** (1930) 377; Physiol. Reviews, **11** (1931) 358; M. BERGMANN und Mitarbeiter, Kollegium **1932**, 751; Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **224** (1934) 11, 45.

<sup>10</sup> Vgl. A. KOSSEL, Protamine und Histone, Fr. Deuticke, Leipzig und Wien 1929.

eines einfacheren strukturellen Aufbaus der Protamine, auf die diese Tatsachen hinzuweisen scheinen, hat die bemerkenswerte, von A. KOSSEL<sup>11</sup> ausgesprochene Ansicht gestützt, derzufolge ein protaminartiger Kern als wesentlicher Bestandteil aller übrigen Proteine angenommen wurde. Der einfache und gleichartige Bau der Protamine ergibt sich nach KOSSEL aus dem übereinstimmenden Verhältnis ihres Gehaltes an Diaminosäuren und Monoamino-säuren wie 2:1, entsprechend ihrem überwiegend basischen Charakter. So ergibt die Bausteinanalyse des Clupeins ein Verhältnis von 10 Arginin:2 Serin:1 Alanin:1 Valin:1 Prolin.

Die Versuche der älteren Literatur zur partiellen Hydrolyse der Protamine sind unbefriedigend geblieben. So hat die Aufspaltung des Moleküls durch Einwirkung verdünnter Säure, die zur Bildung der sogenannten Protone führt, bisher in keinem Falle eine sichere Kennzeichnung der Reaktionsprodukte erlaubt. Auch bei den Versuchen zur enzymatischen Hydrolyse der Protamine von M. TAKEMURA<sup>12</sup> und F. ROGOZINSKI<sup>13</sup> sind keine Zwischenstufen des hydrolytischen Abbaus beobachtet worden; die angewandten Enzympräparate waren jedenfalls nicht enzymatisch einheitlich. Die Beobachtung von A. KOSSEL und A. MATTHEWS<sup>14</sup> über die Bildung eines Tripeptids bei der Hydrolyse des Störprotamins Sturin durch Trypsin ist vereinzelt geblieben.

Am Beispiel des *Clupeins* aus der Heringsmilch, des leichtest zugänglichen Protamins, haben wir vor Jahren mit dem Versuch begonnen, durch fraktionierte Hydrolyse mit einheitlichen Enzymen Einblick in die Anordnung seiner Bausteine zu gewinnen<sup>15</sup>. Eine erste Untersuchung über den fraktionierten enzymatischen Abbau des Clupeins hatte die allgemeine Feststellung einer ausschließlich peptidartigen Verknüpfung der Aminosäuren im Molekül erbracht; denn auf jeder einzelnen Stufe des Abbaus beobachtete man die Bildung äquivalenter Mengen von Amino- und Carboxylgruppen. Sie hatte ferner die Möglichkeit ergeben, gewisse Gruppen unter den Peptidbindungen im Protamin auf Grund der enzymatischen Spaltbarkeit zu unterscheiden, ihre Gliederung nach Bruchteilen von Dritteln und Fünfteln der insgesamt spaltbaren. Hierbei hat

---

<sup>11</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. **34** (1901) 3215, und zwar S. 3235.

<sup>12</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **63** (1909) 201.

<sup>13</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **79** (1912) 398.

<sup>14</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **25** (1898) 190.

<sup>15</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ, A. SCHÄFFNER und W. GRASSMANN, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **156** (1926) 68.

es sich als notwendig erwiesen, die Protamine, so wie sie bei der Isolierung über die Pikrate als Sulfate erhalten werden, noch einer besonderen Reinigung zu unterwerfen; denn die zunächst gewonnenen Präparate sind noch nicht einheitlich, sie bestehen aus Komponenten von sehr ähnlicher Zusammensetzung und von ähnlicher enzymatischer Spaltbarkeit. Für die Auflösung dieser Gemische hat sich ein schonendes Verfahren bewährt, das auf eine Beobachtung von A. KOSSEL zurückgreift<sup>16</sup>; es beruht auf der Eigenschaft der Protamine, aus konzentrierter wässriger Lösung unter Ölbildung sich abzuscheiden. Der Erfolg der Fraktionierung wird bestimmt durch den Gehalt der Fraktionen an reaktionsfähigen Aminogruppen, durch den Quotienten  $N:NH_2$ , die Umscheidung bis zur Konstanz dieses Quotienten durchgeführt. Die Menge der ölbildenden Komponente ist bei den bisher untersuchten Rohprotaminen Clupein und Salmin (aus Rheinsalm) die weitaus überwiegende. Diese sind durch einen sehr hohen Quotienten, die leichter löslichen Anteile durch einen viel niedrigeren gekennzeichnet ( $N:NH_2 =$  etwa 100, bzw. = etwa 30 für Rohelupein).

Für die Strukturaufklärung der Protamine, insbesondere für die des Clupeins, war entscheidend die Auffindung und Anwendung eines besonderen, Protamine spaltenden Enzyms im Pankreas, der *Protaminase*, deren Angriff sich am Carboxylende des Moleküls vollzieht<sup>17</sup>. Die Einwirkung der Protaminase auf gereinigtes Clupein und Salmin führt in beiden Fällen ausschließlich zur *Abspaltung von freiem Arginin*; sie kommt nach einem  $NH_2$ -Zuwachs entsprechend  $0.65\text{ cm}^3$  (Clupein) bzw.  $0.50\text{ cm}^3$   $0.2\text{ n}$  (Salmin) für  $0.20\text{ g}$  der Substrate zum Stillstand. Dem beobachteten Zuwachs freier Aminogruppen entspricht die isolierbare Menge freien Arginins; seine Abtrennung von dem zugleich gebildeten höhermolekularen Spaltprodukte, welches wir als *Clupean* bzw. *Salman* bezeichnet haben, gelingt leicht durch Behandlung mit verdünntem Methylalkohol, von welchem nur das Arginin aufgenommen wird. Die Menge des abgespaltenen Arginins beträgt *ein Fünftel* vom Gesamtarginingehalt des *Clupeins*, ein Siebentel von dem des *Salmins*.

Über die Kettenlänge und damit die Molekulargröße erlaubt neben der relativen Beteiligung der einzelnen Aminosäurebau-

<sup>16</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **25** (1898) 165.

<sup>17</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ, FT. ZIEGLER, A. SCHÄFFNER u. L. WEIL, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **197** (1931) 219.

steine der beobachtete Bruchteil des durch Protaminase abspaltbaren Arginins eine erste Aussage. Unter den Bausteinen trifft auf je 2 Moleküle Arginin jeweils 1 Molekül Monoaminosäure; ihre Analyse ergibt für das Clupein ein Verhältnis von 10 Arginin:2 Serin:1 Alanin:1 Valin:1 Prolin, also mindestens 15 Aminosäurereste im Molekül, entsprechend 14 spaltbaren Peptidbindungen. Der bei der vollständigen Hydrolyse mit Säure gemessene Gesamtzuwachs freier Aminogruppen entspricht  $450\text{ cm}^3$   $0.2\text{ n}$  für  $0.20\text{ g}$  Clupeinsulfat; der bei der Protaminasewirkung freigelegte Anteil mit  $0.65\text{ cm}^3$   $0.2\text{ n}$  beläuft sich danach auf ein Siebentel, er betrifft also 2 von 14 Peptidbindungen im Clupein.

Aus der Zusammensetzung des Clupeins und dem Anteile der Protaminasewirkung an seiner Hydrolyse ergibt sich danach ein *Mindestmolekulargewicht* von 2021. Für die Frage, ob dieser Wert die wahre Molekülgröße des Protamins darstellt oder ob man ein ganzes Vielfaches desselben dafür anzunehmen hat, ergibt sich schon aus den Beobachtungen von A. KOSSEL<sup>18</sup> und seiner Schule über die partielle Hydrolyse mit Säure zu den sogenannten Protonen ein gewisser Anhalt; denn diese Protone stellen Gemische von Tripeptiden dar aus je 1 Monoaminosäure- und 2 Diaminosäureresten. Die Aufeinanderfolge von mehr als 2 Argininresten, beispielsweise am Carboxylende der Peptidkette, wie sie bei der Annahme eines Vielfachen des errechneten Molekulargewichts vorliegen sollte, ist danach sehr unwahrscheinlich. Die einfache Molekülgröße erscheint des weiteren gestützt durch die Molekulargewichtsbestimmung mit der Ultrazentrifuge, welche nach SVEDBERG und SJÖGREN für die Molekulargewichte von Clupein und Salmin zu kleinen Werten, zwischen 1700 und 3000, führt.

Das nach der Argininabspaltung aus Clupein durch Protaminase verbleibende einheitliche Bruchstück *Clupean* haben wir<sup>19</sup> dem weiteren enzymatischen Abbau unterworfen, nämlich der Hydrolyse durch aktiviertes *Trypsin*, die einheitliche, von Peptidasen, Protaminase und von Chymotrypsin<sup>20</sup> befreite Proteinase aus Pankreas, und zwar bis zum Stillstand der enzymatischen Einwirkung. Hierbei erfolgt die Auflösung von vier Peptid-

---

<sup>18</sup> Vgl. dazu A. KOSSEL, Protamine und Histone, Leipzig und Wien 1929, S. 41 ff.

<sup>19</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. E. KOFRANYI, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch., im Druck.

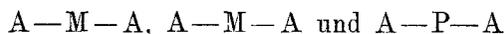
<sup>20</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. S. AKABORI, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 228 (1934) 224.

bindungen im Molekül, es sei denn einem Vielfachen davon, doppelt soviel als zuvor durch Protaminase. Unter den gebildeten Spaltprodukten findet sich kein freies oder durch Arginase spaltbares Arginin. Die Zerlegung des Gemisches der Spaltprodukte gelingt durch öftere Umscheidung aus verdünntem Alkohol in der Kälte, kontrolliert durch die Bestimmung des Quotienten  $N:NH_2$  in den einzelnen Fraktionen. Nach der Abtrennung einer geringen Menge noch unangegriffenen Clupeans ergibt die Fraktionierung als Endstufen zwei nicht weiter zerlegbare Fraktionen, vom konstanten Quotienten = etwa 5 für die leichter lösliche, = etwa 9 für die schwerer lösliche, in einer Ausbeute von insgesamt 27 Prozent des Gesamtstickstoffs in der ersteren, 73 Prozent in der letzteren.

Für den in der Hauptfraktion gemessenen Quotienten 9 ergibt sich als einfachste Erklärung das Vorliegen eines Gemisches von Tripeptiden, bestehend aus je 2 Arginin- und 1 Monoaminosäurereste, analog den KOSSELSCHEN Protonen. Der Quotient 5 andererseits in der kleineren Fraktion entspricht dem Werte für ein Dipeptid aus 1 Arginin- und 1 Monoaminosäurereste bzw. für ein Gemisch aus mehreren solchen. Diese einfachste Annahme wird durch die Analyse bestätigt. In der „Tripeptid-Fraktion“ findet man 88 Prozent, in der „Dipeptid-Fraktion“ 79·5 Prozent des Gesamtstickstoffs nach der Säurehydrolyse als Argininstickstoff statt zu erwartender 88·8 bzw. 80·0 Prozent. Der Quotient  $N:NH_2$  der „Tripeptid-Fraktion“ fällt nach der Hydrolyse mit Säure auf 3·45 (für ein Gemisch aus 6 Arginin + 3 Monoaminosäuren, darunter 1 Prolin ber. 3·38), der der „Dipeptid-Fraktion“ auf 2·6 (für ein Gemisch aus 1 Arginin + 1 Monoaminosäure ber. 2·5); die „Tripeptid-Fraktion“ enthält ein Drittel des Monoaminosäurestickstoffs als Prolin, die „Dipeptid-Fraktion“ dagegen kein Prolin.

Die Bausteinanalyse ergibt also für die „Tripeptid-Fraktion“ das Vorliegen von mindestens 6 Arginin neben 3 Monoaminosäuren, darunter 1 Prolin, für die „Dipeptid-Fraktion“ 1 Arginin auf 1 Monoaminosäure, aber kein Prolin. Da bei der Hydrolyse des Clupeans durch Trypsin 4 Peptidbindungen, wenn nicht ein Vielfaches davon, aufgespalten werden, so hat man unter den Spaltprodukten mindestens 5 Bruchstücke zu erwarten. Die einfachste Annahme, die das Ergebnis der Bausteinanalyse in den beiden Fraktionen vermittelt, wäre also die eines Zerfalls des Clu-

peans in 3 Tripeptide und 2 Dipeptide. Diese Annahme wird durch die enzymatische Analyse der Fraktionen voll bestätigt. Da die „Tripeptid-Fraktion“ durch Amino-polypeptidase nicht angegriffen wird, kann sie nach allen Erfahrungen über die Spezifität dieses Enzyms keinen amino-endständigen Monoaminosäurerest enthalten; die Aminogruppe wird also in diesen Tripeptiden Argininresten angehören. Aber auch am Carboxylende dieser Peptide findet sich ein Argininrest; dieser wird durch Carboxy-polypeptidase abgespalten. Man findet nämlich in der „Tripeptid-Fraktion“ die Hälfte der vorhandenen Peptidbindungen durch Carboxy-polypeptidase spaltbar und nach der Einwirkung dieses Enzyms eine genau entsprechende Menge freien, durch Arginase spaltbaren Arginins, nämlich die Hälfte des insgesamt vorhandenen. Nach der Einwirkung der Carboxy-polypeptidase sind andererseits nur zwei Drittel der noch vorhandenen Peptidbindungen, also zwei, durch Dipeptidase zerlegbar; dieses Verhalten wird dadurch erklärt, daß eine derselben tertiär gebundenen Prolinstickstoff enthält, also durch Dipeptidase nicht gespalten wird. Die „Tripeptid-Fraktion“ besteht nach allem aus einem Gemische dreier Tripeptide mit amino- und carboxyl-endständigem Arginin, von welchen eines Prolin enthält, also aus den Bruchstücken:

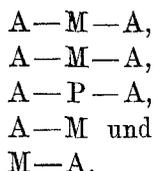


(A = Arginin-, P = Prolin-, M = aliphatischer Monoaminosäurerest).

Auch in der „Dipeptid-Fraktion“ ist die Reihenfolge der Bausteine durch enzymatische Analyse bestimmbar. Durch Dipeptidase werden hier sämtliche vorhandenen Peptidbindungen gelöst, die Fraktion enthält also nur Dipeptide. Zufolge der Bausteinanalyse entfällt in der Fraktion 1 Arginin auf 1 Monoaminosäure, sie enthält kein Prolin. Es ergeben sich also für die Zusammensetzung der darin enthaltenen Dipeptide nur die folgenden Möglichkeiten der Verknüpfung: A—A, A—M, M—A und M—M, das Aminoende jeweils links, das Carboxylende rechts gedacht. Das Ergebnis der Spaltbarkeit durch Carboxy-polypeptidase erlaubt, zwischen diesen Möglichkeiten zu entscheiden. Dieses Enzym zerlegt nur die Hälfte der in der Fraktion vorhandenen Peptidbindungen und nach seiner Einwirkung wird eine entsprechende Menge, nämlich die Hälfte des insgesamt vorhandenen Arginins durch Arginase spaltbar, liegt also als freies Arginin vor. Dies entscheidet zu Gunsten der Zusammensetzung des Gemisches aus gleichen Teilen A—M und M—A, von welchen nur die letztere

Kombination durch Carboxy-polypeptidase zerlegt wird; denn beim Vorliegen eines Gemisches aus gleichen Teilen A—A und M—M sollte man nach der Auflösung einer Peptidbindung durch Carboxy-polypeptidase entweder gar kein oder aber das gesamte vorhandene Arginin durch Arginase spaltbar finden.

Das Gemisch der Spaltprodukte, in welches das Clupean bei der Einwirkung des Trypsins zerfällt, besteht danach aus 3 Tripeptiden und 2 Dipeptiden der folgenden Zusammensetzung:



Ihre Verknüpfung zum Molekül des Clupeans erfolgt offenbar in folgender Weise: M—A + A—M—A + A—M—A + A—P—A + A—M, wobei nur die Stellung des prolinhaltigen Tripeptidrestes im Molekül willkürlich gewählt ist. Denn dies ist die einzige Art der Verknüpfung, welche für die Angriffsweise des Trypsins ein einheitliches Prinzip erkennen läßt: Trypsin spaltet danach die Peptidbindungen zwischen zwei Argininresten im Innern der Peptidkette. Diese Ansicht über die Wirkungsweise des aktivierten Trypsins beim Protaminabbau hat bemerkenswerterweise bereits früher K. LINDERSTRÖM-LANG<sup>21</sup> aus theoretischen Betrachtungen über das Leistungsverhältnis der einzelnen proteolytischen Enzyme abgeleitet.

Diese Feststellung über die Wirkungsweise des Pankreas-trypsins ist besonders zu beachten; denn es zeigt sich hier, daß auch die Spezifität einer echten Proteinase ebenso wie die der Peptidasen allein durch Natur und Anordnung der Bausteine in einem Peptid bestimmt wird, daß auch das Trypsin Peptidbindungen in offenen Peptidketten zerlegt<sup>22</sup>. Die öfter diskutierte Annahme, der Angriff des Trypsins beziehe sich auf besondere ringförmige Strukturen im Eiweiß, wird dadurch überflüssig. Die Wirkungen der eigentlichen eiweißspaltenden Enzyme, der Proteinasen, bestehen in allen bisher untersuchten Fällen in der Spaltung

<sup>21</sup> *Ergebn. d. Physiologie* 35 (1933) 455.

<sup>22</sup> Vgl. damit die Beobachtung von M. BERGMANN, L. ZERVAS u. J. S. FRUTON [*Science* 81 (1935) 180] über die Spaltbarkeit des Carbobenzoxy-glycyl-glutamyl-glycinesters durch Trypsin.

von Peptidbindungen, die des Pepsins<sup>23</sup>, des Trypsins, des Chymotrypsins<sup>24</sup> und des Papains. Auch zeigt die stufenweise Hydrolyse hochmolekularer Proteine, so die des Caseins<sup>25</sup> und des Histons<sup>26</sup>, durch diese Enzyme das nämliche Bild wie die der niedermolekularen Protamine, die Leistungen der einzelnen Enzyme beim Abbau stehen in einfachen, ganzzahligen Verhältnissen zueinander, ähnlich wie sie auch beim stufenweisen enzymatischen Abbau von Polypeptiden auftreten und zu erwarten sind. Die aus den Erfahrungen beim Protaminabbau abgeleiteten Schlußfolgerungen über die Peptidkettenstruktur dieser Körper hat man also prinzipiell auch auf die enzymatisch spaltbaren höhermolekularen Eiweißstoffe zu übertragen; für das Vorkommen besonderer ringförmiger Strukturen in diesen kennen wir bis heute keinen triftigen Anhaltspunkt.

Aus der Aufteilung der Clupeanspaltprodukte in die beiden Fraktionen in dem angeführten Mengenverhältnis und aus ihrer Kennzeichnung ergab sich die oben wiedergegebene Reihenfolge der Bausteine im Clupean, entsprechend dem einfachen, niedrigstmöglichen Molekulargewicht. Ergänzt man sie durch Anreihung der durch Protaminase aus Clupein abgespaltenen beiden Argininreste am Carboxylende, so gelangt man zu der folgenden *Formel für das Clupein*:

$$M-A-A-\overset{\times}{M}-A-A-\overset{\times}{M}-A-A-P-A-A-M-A-A,$$

in welcher gleichfalls die Stellung des Prolinrestes noch unsicher ist, das Prolin auch eine der beiden anderen, bezeichneten Plätze einnehmen kann.

Ein Vielfaches des der obigen Formel entsprechenden Molekulargewichts wäre unvereinbar mit dem festgestellten Verhältnis von Tripeptid und Dipeptid unter den tryptischen Spaltprodukten des Clupeans und mit der verhältnismäßigen Leistung des

<sup>23</sup> Vgl. z. B. E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. E. SIMONS, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **156** (1926) 114.

<sup>24</sup> Nach noch unveröffentlichten Beobachtungen mit E. GLASER spaltet Chymotrypsin bei der Einwirkung auf Clupean 2 von den 4 Arginyl-argininbindungen, die auch durch Trypsin zerlegt werden; die restlichen 2 Bindungen bleiben auch nach der Einwirkung des Chymotrypsins spaltbar durch Trypsin.

<sup>25</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. E. SIMONS, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **156** (1926) 99.

<sup>26</sup> E. WALDSCHMIDT-LEITZ u. G. KÜNSTNER, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. **171** (1927) 290.

Trypsins beim Abbau<sup>27</sup>. Dies gilt z. B. für die Annahme der doppelten Kettenlänge und der abwechselnden Aufeinanderfolge von je 2 Monoaminosäure- und je 4 Argininresten im Molekül; die Hydrolyse von 8 Peptidbindungen in dem einer solchen Formel entsprechenden Clupean würde in jedem Fall einen beträchtlichen Anteil an höherem Peptid, wenigstens einem Tetrapeptid, ergeben. So ist auch eine von K. FELIX, R. HIROHATA und K. DIRR<sup>28</sup> erörterte Formel, nach welcher im Clupein Protone der Zusammensetzung M—A—A mit solchen der Zusammensetzung A—A—M abwechseln sollten, mit unseren Ergebnissen über die enzymatische Spaltbarkeit der isolierten Tri- und Dipeptidfraktionen nicht vereinbar.

Für die vollständige Aufklärung der Struktur des Clupeins ist noch die Angabe der Reihenfolge für die einzelnen Monoaminosäurereste im Molekül erforderlich. Die chemische Kennzeichnung der einzelnen, oben angeführten Spaltprodukte und die Einschaltung weiterer proteolytischer Enzyme, so des Chymotrypsins, in den Gang der Hydrolyse wird hierfür förderlich sein; denn die Zuhilfenahme der enzymatischen Analyse hat sich an diesem Beispiel bisher vor allem als nützlich erwiesen. Dann ergibt sich für die Forschung die größere Aufgabe eines Vergleichs mit der Struktur anderer, sich daraus ableitender, höhermolekularer Eiweißkörper<sup>29</sup>, die Aufgabe der Entwicklung einer Genealogie verwandter Eiweißstoffe auf chemischer Grundlage.

---

<sup>27</sup> Die von K. E. RASMUSSEN und K. LINDERSTRÖM-LANG [Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 227 (1934) 181] auf Grund der elektrometrischen Titration der freien Carboxyle im Clupein ermittelten Werte, die das doppelte Molekulargewicht, etwa 4000, ergeben, sind möglicherweise ebenso wie ein von uns beobachteter Schwund freier Aminogruppen im Clupein auf eine verminderte Reaktionsfähigkeit der endständigen Gruppen zurückzuführen.

<sup>28</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 218 (1933) 269.

<sup>29</sup> Vgl. A. KOSSEL u. E. G. SCHENCK, Hoppe-Seylers Z. physiol. Ch. 173 (1927) 278; E. G. SCHENCK, Naturwiss. 18 (1930) 824.