

Über die enzymatische Spezifität der bakteriellen Proteinase, die Ovalbumin in Plakalbumin verwandelt.

Von
H. Tuppy.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 16. Juli 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 8. Oktober 1953.)

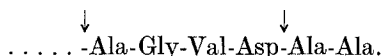
Die Spezifität des von *Bacillus subtilis* erzeugten proteolytischen Enzyms wurde mit Hilfe eines Triakontapeptids natürlicher Herkunft und bekannter Struktur, der aus oxydiertem Insulin erhältlichen „Fraktion B“, untersucht. Die bei der Verdauung des Polypeptids mit dem bakteriellen Enzym entstehenden niederen Peptide wurden chromatographisch voneinander getrennt und identifiziert. Aus ihrer Zusammensetzung ließ sich auf die Art der Peptidbindungen schließen, die vom Enzym gespalten werden. Die bakterielle Proteinase erwies sich als ein Enzym von bedeutend geringerer Selektivität als Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin.

Ovalbumin geht, wie *Linderström-Lang* und *Ottesen* gefunden haben¹, unter der Einwirkung eines aus *Bacillus subtilis* gewonnenen und kürzlich in kristallisierter Form erhaltenen proteolytischen Enzyms² in einen neuen, ebenfalls kristallisierenden Eiweißkörper, das Plakalbumin, über. Diese Umwandlung verläuft unter Abspaltung von drei niedermolekularen Peptiden; das Restprotein Plakalbumin ist gegen eine weitere Einwirkung des bakteriellen Enzyms verhältnismäßig resistent und wird nur langsam weiter abgebaut. *Ottesen* und Mitarbeiter konnten die bei der Plakalbuminbildung abgesprengten Peptide chromatographisch voneinander

¹ *K. Linderström-Lang* und *M. Ottesen*, C. r. trav. lab. Carlsberg, Sér. B, 26, Nr. 16 (1949).

² *A. V. Güntelberg* und *M. Ottesen*, Nature 170, 802 (1952).

trennen³ und durch stufenweisen Abbau chemisch aufklären⁴: ein Tetrapeptid Ala-Gly-Val-Asp, ein Dipeptid Ala-Ala und ein Hexapeptid Ala-Gly-Val-Asp-Ala-Ala. Das Di- und das Tetrapeptid entstammen einer aus sechs Aminosäureresten bestehenden Sequenz, welche im Hexapeptid geschlossen vorliegt und — nach *Steinbergs* Ergebnissen beim Abbau des Ovalbumins mit Carboxypeptidase zu schließen⁵ — vom Carboxylende der Peptidkette des Ovalbuminmoleküls herrührt. Das *Bacillus subtilis*-Enzym beschränkt sich also im wesentlichen auf die Spaltung von nur zwei Peptidbindungen im Ovalbumin:



Diese anscheinend außergewöhnlich selektive Wirkung des bakteriellen Enzyms ließ uns eine nähere Untersuchung seiner Spezifität in Angriff nehmen, zumal auch im Hinblick auf eine mögliche Verwendung der Proteinase bei der Untersuchung der Konstitution von Eiweißkörpern und Peptiden⁶, hatte sich doch die Kenntnis und der Gebrauch von proteolytischen Enzymen verschiedener Spezifität in letzter Zeit bereits bei der Aufklärung der Reihenfolge der Aminosäurereste in den Peptidketten des Insulinmoleküls hervorragend bewährt^{7, 8}.

Die Spezifität des *Bacillus subtilis*-Enzyms wurde von uns nicht wie in den klassischen und bahnbrechenden Untersuchungen mehrerer Proteinasen durch *Bergmann* und seine Mitarbeiter mit Hilfe niedermolekularer synthetischer Peptidsubstrate ermittelt, sondern unter Verwendung eines Triakontapeptids natürlicher Provenienz, der „Fraktion B“ des mit Perameisensäure oxydierten Insulins⁹. In diesem Polypeptid, bei dessen chemischer Aufklärung⁷ bereits die Enzyme Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin eingesetzt und wertvolle Befunde über die Spezifität dieser drei Proteinasen erhalten worden waren, liegen 29 Peptidbindungen mit nicht weniger als 26 verschiedenen Kombinationen von je zwei miteinander verknüpften Aminosäureresten vor. Durch papierchromatographische Trennung und Identifizierung der durch Verdauung des Polypeptidsubstrats mit der bakteriellen Proteinase entstandenen Spaltstücke ließ sich über die Wirkungsweise und Wirkungsbreite dieses Enzyms wesentlicher Aufschluß gewinnen.

³ *M. Ottesen* und *C. Villee*, C. r. trav. lab. Carlsberg, Sér. B, 27, Nr. 18 (1951).

⁴ *M. Ottesen* und *A. Wollenberger*, Nature 170, 801 (1952).

⁵ *D. Steinberg*, J. Amer. Chem. Soc. 74, 4217 (1952).

⁶ *H. Tuppy* und *H. Michl*, Mh. Chem. 84, 1011 (1953).

⁷ *F. Sanger* und *H. Tuppy*, Biochemic. J. 49, 481 (1951).

⁸ *F. Sanger* und *E. O. P. Thompson*, Biochemic. J. 53, 366 (1953).

⁹ *F. Sanger*, Biochemic. J. 44, 126 (1949).

Material und Methoden.

Die als Substrat verwendete „Fraktion B“, ein aus kristallisiertem Rinderinsulin hergestelltes Präparat⁹, wurde uns in freundlicher Weise von Doktor F. Sanger, Cambridge, zur Verfügung gestellt.

Die kristallisierte *Bacillus subtilis*-Proteinase³ war eine Gabe der Herren Prof. K. Linderstrom-Lang und Ing. M. Ottesen, Kopenhagen.

Die proteolytische Aktivität des bakteriellen Enzyms wurde viskosimetrisch mit Gelatine als Substrat als etwa halb so groß ermittelt wie die von krist. Trypsin (*Worthington Biochemicals*). Die viskosimetrische Aktivitätsbestimmung folgte im großen und ganzen den Angaben von Northrop und Kunitz¹⁰, doch wurde statt bei pH 4,0 bei einem pH von 7,3 gearbeitet. Bei diesem alkalischeren pH, in dessen Nähe auch die weiter unten beschriebene enzymatische Hydrolyse der „Fraktion B“ vorgenommen wurde, zeigen sowohl die bakterielle Proteinase als auch Trypsin eine sehr hohe Aktivität, so daß zur viskosimetrischen Bestimmung außerordentlich geringe Enzymmengen ausreichen.

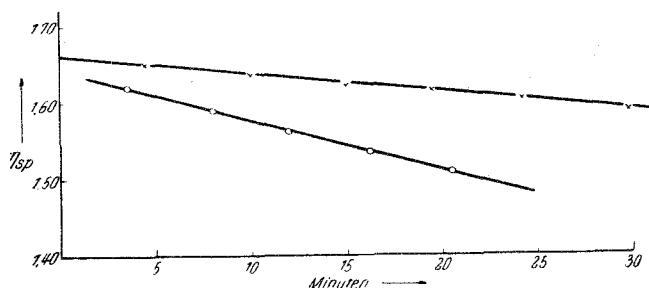


Abb. 1. Viskosimetrische Bestimmung proteolytischer Aktivität bei pH 7,3 und 35,5° C.
 —×—×—×— 5 ccm Gelatinesubstrat + 20 μl *B. subtilis*-Proteinaselösung (1: 150 000, 0,020 μg Enzym-N);
 —o—o—o— 5 ccm Gelatinesubstrat + 20 μl Trypsinlösung (1: 100 000, 0,028 μg Enzym-N).

2,5 g lufttrockene Gelatine werden in 100 ccm 0,1 m Phosphatpuffer von pH 7,3 bei zirka 40° gelöst. Die Lösung wird hierauf in einem Wasserbad von 60° 20 Min. lang erhitzt und warm durch ein gehärtetes Faltenfilter filtriert. Das beim Erkalten erstarrende Filtrat ist im Eiskasten viele Tage lang haltbar. Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität eines Enzyms werden vom Gelatinesubstrat, welches durch möglichst kurzes Erwärmen auf 45° verflüssigt worden ist, 5 ccm in ein Ostwald-Viskosimeter pipettiert, dessen Durchflußzeit für Wasser bei 35,5° 80 bis 90 Sek. beträgt. Die spezifische Viskosität der Gelatinelösung liegt bei dieser Temperatur zwischen 1,50 und 1,70; sie bleibt über längere Zeit völlig konstant oder fällt nur geringfügig ab. Zu dem im Viskosimeter befindlichen, auf 35,5° erwärmten Gelatinesubstrat werden mit einer Konstriktionspipette¹¹ 20 μl einer sehr verdünnten Enzymlösung hinzugefügt. Nach Feststellung des Zeitpunktes des Zusatzes werden Substrat und Enzym im Viskosimeter durch Hindurchperlen von Luft gemischt und hierauf in kurzen Intervallen Viskositäts-

¹⁰ J. H. Northrop und M. Kunitz, J. Gen. Physiol. 16, 313 (1932).

¹¹ K. Linderstrom-Lang und H. Holter, „Die enzymatische Histochemie“, in E. Bamann und K. Myrback, „Die Methoden der Fermentforschung“, Thieme, Leipzig, 1940.

messungen vorgenommen. Die spezifische Viskosität wird in ihrer Abhängigkeit von der verstrichenen Zeit aufgezeichnet, wobei als Zeitpunkt einer Messung jeweils jene Zeit registriert wird, zu der die Hälfte der Gelatine-lösung die Viskosimeterkapillare durchlaufen hat. Bei kleinen Enzymmengen ergibt sich während der ersten 20 bis 30 Min. ein völlig linearer, der Enzymaktivität proportionaler Abfall der spezifischen Viskosität mit der Zeit. Definieren wir in Anlehnung an *Kunitz* und *Northrop* als viskosimetrische Aktivitätseinheit jene Enzymmenge, welche in 5,02 ccm Gelatinesubstrat bei 35,5° ein 1%iges Absinken der spezifischen Viskosität in der Minute hervorruft, so ergibt sich aus dem abgebildeten Diagramm (Abb. 1), daß Trypsin bei pH 7,3 eine Aktivität von etwa 14000 viskosimetrischen Einheiten je mg Enzymstickstoff und die kristallisierte *Bacillus subtilis*-Proteinase eine solche von 7000 Einheiten je mg Stickstoff besitzt. Zum Vergleich sei erwähnt, daß Trypsin bei pH 4,0 eine Aktivität von nur 95 Einheiten zeigt¹⁰.

Enzymatische Hydrolyse. 20 mg „Fraktion B“ wurden in 2,0 ccm Wasser unter Zusatz von 2,7 µl konz. Ammoniak oder von gerade so viel festem Natriumbikarbonat gelöst, daß das pH der entstehenden klaren Lösung einen Wert von 7,5 erreichte. Nach Hinzufügen von 1,0 ccm einer 0,1%igen wäßr. Lösung der bakteriellen Proteinase (enthaltend 0,149 mg N) wurde 20 Stdn. lang bei 37° inkubiert. Die In-

aktivierung des Enzyms wurde hierauf durch kurzes Erhitzen im siedenden Wasserbad bewerkstelligt oder auch dadurch, daß das pH der Inkubationsmischung durch Eintropfen von Eisessig auf 3 bis 4 gebracht wurde.

Ionophorese. Die Inkubationsmischung wurde je nach der Art, in der das Enzym inaktiviert worden war, mit Essigsäure bzw. Ammoniak versetzt, bis zugesetztes Methylrot seine gelbrote Umschlagsfarbe angenommen hatte, und in den „Mittelraum“ der von *Sanger* und *Tuppy*¹² verwendeten 4-räumigen Ionophoreseapparatur gebracht. Dieser „Mittelraum“ war sowohl vom „Kathodenraum“, dessen Inhalt 0,02 n NH₃ war, als auch auf der gegenüberliegenden Seite von dem mit 0,5%iger Essigsäure gefüllten Raum durch formolgehärtete Gelatinemembranen getrennt. Der Essigsäure enthaltende Raum war seinerseits vom „Anodenraum“, in dem sich 0,1 n H₂SO₄ befand, durch eine Cellophanemembran geschieden. Die in den Anoden- und Kathodenraum eingeführten Platinelektroden wurden an die 220-Volt-Gleichstromleitung unter Zwischenschaltung einer 40-Watt-Birne angeschlossen. Der anfangs niedrige Strom (30 mA) stieg innerhalb weniger Minuten auf 90 bis 100 mA, um dann langsam wieder abzusinken. Während der ganzen Ionophorese wurde das pH des Mittelraumes durch tropfenweisen Zusatz von n NH₃ so gut wie möglich innerhalb des Umschlagbereiches

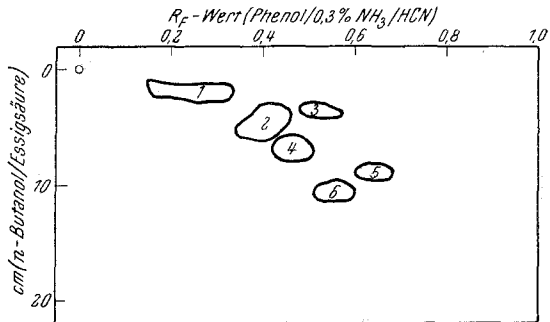


Abb. 2. Chromatogramm der sauren Fraktion A.
Vgl. Tabelle 1.

¹² F. Sanger und H. Tuppy, *Biochemic. J.* **49**, 463 (1951).

Tabelle 1. Saure Peptidfraktion*.

"Spot", No. (Abb. 2)	Farbe mit Ninhydrin	Nach Hydrolyse nachgewiesene Amino- säuren	Nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse nachgewiesene		Struktur
			DNP-Aminosäuren	Aminosäuren	
A 1	gelb → violett	CySO ₃ H (× × ×) Ser (× × × ×) Gly (× × × ×)	DNP-CySO ₃ H (× × ×)	CySO ₃ H (?) Ser (× × × ×) Gly (× × ×)	CySO ₃ H-Gly-Ser (7—8—9)
A 2	violett	CySO ₃ H (× × × ×) Val (× × × × ×)	DNP-Val (× × × ×)**	CySO ₃ H (× × × × ×) Val (×)	Val-CySO ₃ H (18—19)
A 3	violett	CySO ₃ H (× × × ×) Ser (× × × ×) Gly (× × × ×) Leu (× × × ×)	DNP-Leu (×)	CySO ₃ H (×) Ser (?) Gly (?)	Leu-CySO ₃ H-Gly-Ser (6—7—8—9)
A 4	violett	CySO ₃ H (× × ×) Leu (× × × ×)	DNP-Leu (× × ×)	CySO ₃ H (× × ×)	Leu-CySO ₃ H (6—7)
A 5	violett	CySO ₃ H (× × ×) Val (× × × ×) Leu (× × × ×)	DNP-Leu (?)	CySO ₃ H (×) Val (×)	Leu-Val-CySO ₃ H (17—18—19)
A 6	violett	Glu (× × × × ×) Val (× × × × ×)	DNP-Val (× × × ×)	Glu (× × ×) Val (?)	Val-Glu (12—13)

* Bisweilen wurden in der sauren Peptidfraktion auch geringe Mengen neutraler Peptide, vor allem M 1 und M 4, gefunden.

** Nach 5stünd. Hydrolyse des dinitrophenylierten Peptids A 2 mit 5,7 N HCl bei 105° wurde neben DNP-Val auch noch eine große Menge unveränderter DNP-Val-CySO₃H gefunden; diese Substanz ist im Gegensatz zu DNP-Val kaum ätherlöslich und wandert bei der Chromatographie auf Filterpapier mit Phenol (0,3% NH₃/HCN) als Lösungsmittel als ein kompakter gelber Fleck mit einem R_F von 0,48.

von Methylrot gehalten. Ein elektrischer Rührer sorgte für dauernde gute Durchmischung der Flüssigkeit im Mittelraum. Mittel- und Kathodenraum wurden von außen mit fließendem Wasser gekühlt. Der Inhalt des Kathodenraumes wurde während der ionophoretischen Trennung 3mal abgelassen und durch frischen 0,02 n NH_3 ersetzt. Die Trennoperation wurde beendet, als nach 75 Min. der Strom auf 30 mA abgesunken war.

Der Inhalt des Kathodenraumes, vereinigt mit der schon während des Versuches aus ihm entnommenen Flüssigkeit, wurde im Vak. zur Trockene verdampft und lieferte die im folgenden mit dem Buchstaben *K* bezeichnete basische Peptidfraktion. Im Mittelraum, dessen Inhalt ebenfalls eingedampft wurde, war die neutrale Peptidfraktion *M* enthalten, in dem mit Essigsäure beschickten Raum die saure Fraktion *A*. Da in die Fraktion *A* aus dem Anodenraum etwas Schwefelsäure hineingeraten war, wurde die saure Flüssigkeit vor dem Eindampfen mit einer Chloroformlösung von Tri-n-octyl-amin¹³ und dann noch 2mal mit Chloroform ausgeschüttelt.

Papierchromatographie. Die einzelnen Fraktionen wurden der zweidimensionalen Papierchromatographie¹⁴ unterworfen, um die in ihnen enthaltenen Peptide voneinander zu trennen. Hierbei fanden im wesentlichen die von *Sanger* und *Tuppy*^{7, 12} beschriebenen Methoden

Verwendung. Zur chromatographischen Trennung wurde von der sauren Peptidfraktion *A* die Hälfte, von den neutralen und basischen Peptidfraktionen *M* und *K* je ein Viertel der bei der Ionophorese erhaltenen Mengen auf je einen halben

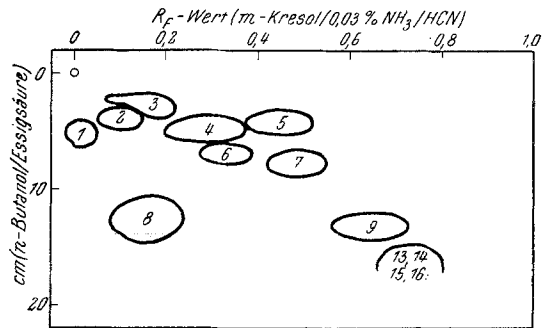


Abb. 3a. Chromatogramm der neutralen Fraktion *M*.
Vgl. Tabelle 2.

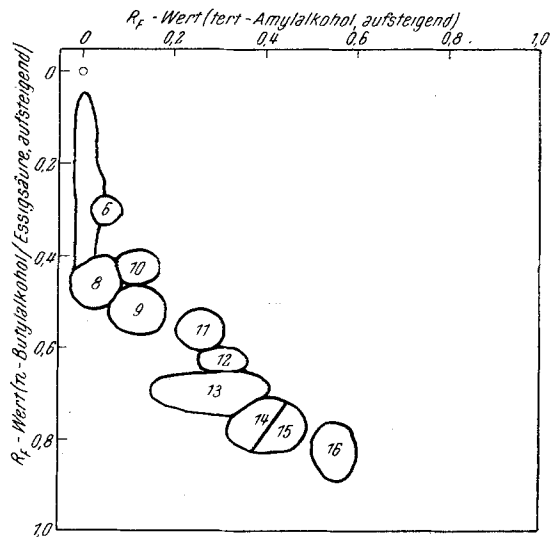


Abb. 3b. Chromatogramm der neutralen Fraktion *M*.
Vgl. Tabelle 2.

¹³ D. E. Hughes und D. H. Williamson, *Biochemic. J.* **48**, 487 (1951).

¹⁴ R. Conden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin, *Biochemic. J.* **41**, 590 (1947).

Tabelle 2. Neutrale Peptidfraktion.

"Spot"- No. (Abb. 3a und 3b)	Farbe mit Ninhydrin	Nach Hydrolyse nachgewiesene Amino- säuren	Nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse nachgewiesene		Struktur
			DNP-Aminosäuren	Aminosäuren	
M 1	violett	Glu (× ×)			Glu(NH ₂) (4)
M 2	gelb → violett	Ser (× × ×) Gly (× × ×)	DNP-Gly (× × ×)	Ser (× × ×)	Gly-Ser (8—9)
M 3	gelb → violett	Glu (× × × ×) Gly (× × × ×) Arg (× × × ×)	DNP-Gly (× ×)	Glu (× × ×) Arg (× × ×)	Gly-Glu-Arg (20—21—22)
M 4	violett	CySO ₃ H (× × ×) His (× × ×) Leu (× × ×)	di-DNP-His (× ×)	CySO ₃ H (× ×) Leu (× × ×)	His-Leu-CySO ₃ H* (5—6—7)
M 5	violett	Asp (× ×) Glu (× × ×) Val (× × ×)	DNP-Val (×)	Asp (×) Glu (× ×)	Val-Asp(NH ₂)-Glu(NH ₂) (2—3—4)
M 6	violett	Ala (× × × ×)	DNP-Ala		Ala (30)
M 7	violett	Asp (× ×) Val (× × ×)	DNP-Val (× × ×)	Asp (× ×)	Val-Asp(NH ₂) (2—3)

M 8	violett	Glu (× × × × ×) Val (× × × × ×)	DNP-Val (× × × × ×)	Glu (× × × × ×)	Val-Glu (12—13)
M 9	gelb → violett	Gly (× × × × ×) Phe (× × × × ×)	DNP-Gly (× × ×)	Gly (?) Phe (× × × ×)	Gly-Phe (23—24)
M 10	violett	Tyr (?)			Tyr
M 11	violett	Phe (×)			Phe
M 12	violett	Leu (×)			Leu
M 13	violett	Ala (× × × × ×) Leu (× × × × ×)	DNP-Ala (× × ×)	Ala (?) Leu (× × × × ×)	Ala-Leu (14—15)
M 14	violett	Tyr (× × ×) Phe (× × ×)			Phe-Tyr (25—26)
M 15		Tyr (× × ×) Leu (× × ×)	di-DNP-Tyr (?)	Leu (× × ×)	Tyr-Leu (16—17)
M 16	violett	Leu (× × ×) Phe (× × ×)			?

* Im Hydrolysat von M 4 wurde bisweilen eine beträchtliche, jedoch von Versuch zu Versuch schwankende Menge Glutaminsäure gefunden; diese dürfte von einem das Tripeptid begleitenden Tetrapeptid Glu(NH₂)-His-Leu-CySO₃H herrühren.

Tabelle 3. Basische Peptidfraktion.

„Spot“- Nr. (Abb. 4)	Farbe mit Ninhydrin	Nach Hydrolyse nachgewiesene Aminosäuren	Nach Dinitrophenylierung und Hydrolyse nachgewiesene		Struktur
			DNP-Aminosäuren	Aminosäuren	
K 1	gelb → violett	Thr (× × × ×) Ala (× × × × ×) Lys (× × × × × ×) Pro (× × × ×)	DNP-Thr (× × × × ×) ε-DNP-Lys	Ala (× × × × ×) Pro	Thr-Pro-Lys-Ala (27—28—29—30)
K 2	violett	Thr (× × ×) Ala (?)* Tyr (× × ×) Lys (× × × ×) Pro (× × ×)	ε-DNP-Lys (×)	Thr (?) Pro (?)	Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala (26—27—28—29—30) + Tyr-Thr-Pro-Lys* (26—27—28—29)
K 3	violett	His (× × ×) Leu (× × × ×)	di-DNP-His (× ×)	Leu (× ×)	His-Leu (5—6 und 10—11)
K 4	violett	Glu (×) His (×)			Glu(NH ₂)-His (4—5)

* In K 2 wurde Alanin in verhältnismäßig geringer und von Versuch zu Versuch schwankender Menge gefunden; in einem Fall war Alanin nicht einmal spurenweise vorhanden. Es ist zu vermuten, daß K 2 aus einem Gemisch von Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala mit dem aus ihm durch Abspaltung von Alanin (M 6) hervorgehenden Tetrapeptid Tyr-Thr-Pro-Lys besteht.

Bogen Whatman Nr. 4-Filtrierpapier gebracht. Die Chromatogramme wurden gewöhnlich zuerst in der Richtung der längeren Seite des Papierbogens mit wassergesättigtem, gereinigtem¹⁵ Phenol oder m-Kresol entwickelt; in beiden Fällen befand sich am Boden des Chromatographiekastens ein Gefäß mit NaCN und eine Schale mit 0,3%igem bzw. 0,03%igem NH₃. In der zweiten Richtung wurde vor allem eine aus 4 Teilen n-Butylalkohol, 1 Teil Eisessig und 5 Teilen Wasser bereitete Mischung verwendet¹⁶; bei deren Gebrauch ist es oft nicht ratsam, die chromatographische Entwicklung sogleich zu beenden, wenn die Front des Lösungsmittelgemisches den unteren Rand des Papierbogens erreicht hat, vielmehr ist eine Fortsetzung der Entwicklung unter Abtropfenlassen des Lösungsmittels vom Papierrand für eine gute Trennung vieler langsam wandernder Peptide vorteilhaft. Die Lage der Peptide auf den Bögen wurde durch ihre Fluoreszenz im ultravioletten Licht nach schärferem Erhitzen im Trockenschrank¹⁷ oder durch schwache Farbentwicklung nach Besprengen mit einer 0,025%igen alkohol. Ninydrinlösung ermittelt.

Jedes Peptid wurde hierauf einzeln aus dem Papier eluiert¹² und das Eluat (etwa 0,1 ccm) auf Polythenstreifen im evakuierten Exsikkator zur Trockene eingedampft.

Untersuchung der Peptide. Zur Feststellung der in den eluierten Peptiden enthaltenen Aminosäuren wurden sie mit 5,7 n HCl in Glaskapillaren eingeschlossen über Nacht bei 105° hydrolysiert. Die entstandenen Aminosäuren wurden unter Verwendung eindimensionaler Papierchromatographie mit Phenol/NH₃/HCN und verschiedenen anderen Solventien als Entwicklungsmittel identifiziert.

Zur näheren Charakterisierung der Peptide diente Sangers bewährte Dinitrophenylierungsmethode, im besonderen die vor kurzem beschriebene, ein flüchtiges tertiäres Amin an Stelle von Natriumbikarbonat verwendende Modifikation¹⁸. Die dinitrophenylierten Peptide wurden 5 bis 7 Stdn. lang bei 105° mit 5,7 n HCl hydrolysiert. Die ätherlöslichen Dinitrophenyl-(DNP)-Aminosäuren wurden aus dem Hydrolysat ausgeschüttelt und durch Chromatographie auf mit Puffer vorbehandeltem Filtrierpapier identifiziert¹⁹. Die nicht N-terminalen und darum unsubstituiert gebliebenen Aminosäuren sowie die mit Äther nicht extrahierbaren DNP-Derivate wurden ebenfalls chromatographisch, jedoch auf nicht gepuffertem Filtrierpapier, untersucht.

Da die Struktur des als Substrat verwendeten Polypeptids, der „Fraktion B“ des oxydierten Insulins, bekannt ist⁷, war es im allgemeinen aus-

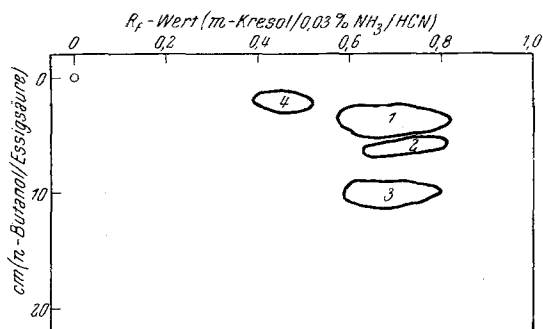


Abb. 4. Chromatogramm der basischen Fraktion K.
Vgl. Tabelle 3.

¹⁵ O. J. Draper und A. L. Pollard, Science 109, 448 (1949).

¹⁶ S. M. Partridge, Biochemic. J. 42, 238 (1948).

¹⁷ D. M. P. Phillips, Nature 161, 53 (1948).

¹⁸ F. Sanger und E. O. P. Thompson, Biochemic. J. 53, 353 (1953).

¹⁹ S. Blackburn und A. G. Lowther, Biochemic. J. 48, 126 (1951).

Tafel I. Übersicht über die bei der Verdauung der „Fraktion B“ des oxydierten Insulins mit der *Bacillus subtilis*-Proteinase gespaltenen Bindungen und entstandenen Peptide.

↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓																									
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓																									
Phe-Val-Asp(NH ₂)-Glu(NH ₂)-His-Leu(NH ₂)-His-Leu-CySO ₃ H-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-CySO ₃ H-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala																																						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30									
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	

Gespaltene Peptidbindungen

Reihenfolge der Aminosäurereste in der „Fraktion B“ des oxydierten Insulins

Bei der Verdauung entstandene Peptide

Val-Asp(NH₂) (M 7) His-Leu (K 3) Gly-Ser (M 2) Tyr-Leu (M 15) Gly-Phe (M 9)
 His-Leu (K 3) Val-Glu (A 6)
 Glu(NH₂)-His (K 4) Leu-CySO₃H (A 4) His-Leu (K 3) Ala-Leu (M 13) Phe-Tyr (M 14)
 Val-Asp(NH₂)-Glu(NH₂) (M 5) CySO₃H-Gly-Ser (A 1) Leu-Val-CySO₃H (A 5) Tyr-Thr-Pro-Lys (K 2)
 His-Leu-CySO₃H (M 4) Thr-Pro-Lys-Ala (K 1)
 Leu-CySO₃H-Gly-Ser (A 3) Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala (K 2)

reichend, die Aminosäure-zusammensetzung und die N-terminalen Reste der beim proteolytischen Abbau entstehenden niedermolekularen Peptide zu bestimmen, um mit Sicherheit deren gesamte Struktur angeben zu können.

Ergebnisse.

Die Abb. 2 bis 4 stellen zweidimensionale Papierchromatogramme der sauren (A), neutralen (M) und basischen Peptidfraktion (K) dar. Die bei der Untersuchung der einzelnen von den Chromatogrammen eluierten Peptide erhaltenen Resultate wurden in den Tabellen I bis 3 zusammengefaßt. Die Charakterisierung der Peptide war Ergebnis wiederholter Versuche und chromatographischer Untersuchungen; um der größeren Übersichtlichkeit willen wurden jedoch nur die klarsten und eindeutigen Resultate zusammengefaßt wiedergegeben. Die Zahl der Kreuze (×) neben den identifizierten freien oder DNP-Aminosäuren ist ein Maß für die Quantität, in der sie chromatographisch gefunden worden sind. Geringe Mengen sind durch ein Fragezeichen (?) gekennzeichnet. Die in der letzten Spalte der Tabellen angegebene Struktur der im enzymatischen Hydrolysat gefundenen Peptide ist aus den Ergebnissen ihrer Hydrolyse und Dinitrophenylierung unter Berücksichtigung der beschränkten Möglichkeiten, welche die bekannte Zusammensetzung der Fraktion B für ihre Zusammensetzung bietet, abgeleitet.

Die im enzymatischen Hydrolysat der Fraktion B identifizierten Peptide (12 Dipeptide, 5 Tripeptide, 3 Tetrapeptide und

1 Pentapeptid) sind in Tafel I mit der intakten Folge der Aminosäurereste im Substrat, aus der sie bei der Proteolyse hervorgehen, übersichtlich zusammengestellt. Die oberhalb des Substratpeptids gezeichneten Pfeile deuten auf jene Bindungen hin, die, aus der Natur der gefundenen Spaltprodukte zu schließen, von der bakteriellen Proteinase hydrolysiert werden. Zur Erleichterung der nachfolgenden Besprechung der Versuchsergebnisse sind die Aminosäurereste der „Fraktion B“ der Reihe nach beziffert worden, beginnend mit dem endständigen, eine freie α -Aminogruppe tragenden Phenylalanylrest⁷. Zur Bezeichnung der Aminosäurereste dienen die von *Brand* und *Edsall* vorgeschlagenen Abkürzungen²⁰.

Wie aus Tafel I hervorgeht, werden von der bakteriellen Proteinase mindestens 18 von den 29 Peptidbindungen des Substrats angegriffen. Di- und Tripeptide stellen den Hauptanteil der bei der proteolytischen Spaltung entstehenden Abbauprodukte. Es ist bemerkenswert, daß freie Aminosäuren in nur geringerer Menge auftreten, obgleich in mehreren Fällen benachbarte Peptidbindungen im Substratmolekül Angriffspunkte des Enzyms sind; so führt der Abbau der Sequenz Asp(NH₂)-Glu(NH₂)-His-Leu-CySO₃H-Gly (Aminosäurereste 3 bis 8), in der jede einzelne Peptidbindung durch das Enzym gespalten werden kann, vorwiegend zur Bildung von Dipeptiden und Tripeptiden und nur kaum zu der freier Aminosäuren. Offensichtlich ist ein und dieselbe Peptidbindung im Dipeptid oder Tripeptid beträchtlich resistenter als im Verbands eines größeren Peptides. Es ist naheliegend, diese Resistenz gegenüber der proteolytischen Wirkung des *Bacillus subtilis*-Enzyms auf einen hemmenden Einfluß zurückzuführen, den die in Nachbarschaft der Peptidbindung befindlichen freien α -Amino- bzw. α -Carboxylgruppen der Peptide auf das Enzym ausüben könnten. Gegen diese Annahme spricht allerdings die Tatsache, daß das in größerer Menge in freier Form auffindbare Alanin (*M* 6) vom Carboxylende des Substratpeptids (Aminosäurerest 30) herzurühren scheint und freies Phenylalanin (*M* 11) vom Aminoende der Kette abgetrennt wird (Aminosäurerest 1).

Die große Zahl und Verschiedenheit der Peptidbindungen, die von der bakteriellen Proteinase bei der Inkubation mit der „Fraktion B“ hydrolysiert werden, bildet einen Kontrast zum früher erwähnten Befund, daß das Enzym bei der Umwandlung des Ovalbumins in Plakalbumin in spezifischer Weise nur 2 Peptidbindungen spaltet. Es ist anzunehmen, daß die scheinbar außerordentliche Selektivität des Enzyms bei seiner Einwirkung auf Ovalbumin dadurch zustande kommt, daß die zwei rasch gespaltenen Peptidbindungen nicht nur der Spezifität des Enzyms genüge tun, sondern auch sterisch der Einwirkung der Proteinase besonders ausgesetzt sind, während zahlreiche andere Peptidbindungen dem Enzym unzugänglich bleiben. Im Falle der „Fraktion B“ hingegen, deren Molekül einer dem nativen Ovalbumin vergleichbaren kompakten räumlichen

²⁰ *E. Brand* und *J. T. Edsall*, *Ann. Rev. Biochem.* **16**, 224 (1947).

Struktur ermangelt, dürfte das Enzym zu allen Peptidbindungen Zutritt haben.

Ein Vergleich der Verdauung der „Fraktion B“ durch die bakterielle Proteinase mit dem durch die Enzyme Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin erzielten⁷ Abbau führt zu folgendem Resultat: Das Ferment aus *Bacillus subtilis* spaltet

1. die beiden auch von Trypsin angegriffenen Peptidbindungen (21—22 und 29—30), an denen die stark basischen Aminosäurereste des Arginins (Rest 22) und des Lysins (Rest 29) mit ihren Carboxylgruppen beteiligt sind;

2. alle jene Bindungen, welche die „aromatischen Aminosäuren“ Phenylalanin (Reste 1, 24 und 25) und Tyrosin (Reste 16 und 26) mittels ihrer Carboxylgruppen eingegangen sind und die zum Teil auch Chymotrypsin angreift;

3. die zahlreichen Bindungen, deren Hydrolyse von dem weniger selektiv wirkenden Pepsin katalysiert wird, mit Ausnahme der Verknüpfungen zwischen Glykokoll und Phenylalanin (Bindung 23—24) und zwischen Alanin und Leucin (Bindung 14—15);

4. eine Anzahl von Peptidbindungen, die von keinem der genannten drei Enzyme gespalten werden und die es verdienen, einzeln Erwähnung zu finden:

Zu dieser letzten Gruppe gehört die Bindung zwischen Asparagin und Glutamin (Bindung 3—4). Die besondere Spezifität des *Bacillus subtilis*-Enzyms für Bindungen dieser Art hat sich von uns bereits erfolgreich bei der Untersuchung der Reihenfolge der Aminosäurereste im Peptidhormon Oxytocin verwerten lassen⁶; in diesem kommt ebenfalls eine Bindung vor, die Asparagin und Glutamin miteinander verknüpft, allerdings in der umgekehrten Anordnung -Glu(NH₂)-Asp(NH₂)-, und die durch das bakterielle Enzym gespalten wird.

Ferner löst die Proteinase die Bindung von Cysteinsäure an Glykokoll, die sich im Substrat zweimal vorfindet (7—8 und 19—20); es ist schwer zu sagen, ob für die Spaltung dieser Bindungen die Tatsache maßgebend ist, daß an ihnen Cysteinsäure mit ihrer Carboxylgruppe oder eher, daß an ihnen Glykokoll mit seiner Aminogruppe Anteil hat. Für die letztere Alternative spricht der Befund, daß auch eine dritte Peptidbindung, an der ein Glykokollrest mit seiner Aminogruppe beteiligt ist (Bindung 22 bis 23), einen Angriffspunkt des Enzyms darstellt. Im übrigen wird von der bakteriellen Proteinase auch in Oxytocin eine ähnliche Peptidbindung (zwischen Leucin und Glykokoll) gespalten⁶. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß in der Fraktion B auch stets dort Hydrolyse eintritt, wo das nächsthöhere Homologe des Glykokolls, Alanin, mit seiner Aminogruppe in Peptidbindungen eingetreten ist (Bindungen 13—14 und 29—30). Diese Tatsache ist von

besonderem Interesse im Hinblick auf die enzymatische Umwandlung des Ovalbumins in Plakalbumin, bei der ebenfalls zwei Peptidbindungen gespalten werden, die Alaninresten benachbart sind.

Drei weitere Bruchstellen liegen in Nachbarschaft von Histidinresten; die gespaltenen Bindungen verknüpfen im intakten Substrat Glutamin bzw. Serin mit Histidin (4—5 bzw. 9—10) und Histidin mit Leucin (5—6).

Schließlich werden vom *Bacillus subtilis*-Enzym alle Bindungen gelöst, an denen Leucin mit seiner Carboxylgruppe beteiligt ist, und zwar nicht nur die eine Leu-Val-Bindung (11—12), welche auch von Pepsin, und jene zwischen Leucin und Tyrosin (15—16), die sowohl von Pepsin als auch von Chymotrypsin gespalten wird, sondern außerdem auch noch die Bindungen zwischen Leucin und Cysteinsäure (6—7) und zwischen Leucin und Valin (17—18).

Unter den zahlreichen Peptiden, die im Verlauf der vorliegenden Arbeit papierchromatographisch untersucht worden sind, um aus ihrer Struktur auf die proteolytische Spezifität der bakteriellen Proteinase rückzuschließen, durch deren Wirkung sie entstanden sind, befinden sich einige, die weder, durch Hydrolyse mit Mineralsäure¹² noch durch enzymatische Spaltung⁷ der „Fraktion B“ früher erhalten worden sind; diese stellen daher zusätzliches Beweismaterial für die Formel dar, die für die „Fraktion B“ aufgestellt worden ist⁷. Im besonderen sei hier auf die Peptide Gly-Ser (*M* 2), CySO_3H -[Gly, Ser] (*A* 1) und Leu-[CySO_3H , Gly, Ser] (*A* 3) hingewiesen, die alle für die Verknüpfung von Serin mit Glykokoll (Bindung 8 bis 9) Zeugnis ablegen; diese Peptidbindung ist äußerst empfindlich gegen saure Hydrolyse und war nach deren Verwendung in keinem einzigen der erhaltenen Peptide mehr vorhanden gewesen¹² und ihre Existenz konnte bislang nur aus der Zusammensetzung komplizierterer Bruchstücke im peptischen Hydrolysat der „Fraktion B“ erschlossen werden. Auch die übrigen bei dieser Untersuchung erhaltenen Peptide sind in Übereinstimmung mit der für das Triakontapeptid vorgeschlagenen Struktur. Bloß unter den bei der Papierchromatographie in allen verwendeten Lösungsmitteln schnelllaufenden Bestandteilen der neutralen Peptidfraktion, deren Trennung nur schwer und unvollkommen gelingt, scheint sich ein aus Phenylalanin und Leucin zusammengesetztes Peptid (*M* 16) vorzufinden, für dessen Herkunft und Entstehung derzeit keine befriedigende Erklärung gegeben werden kann.

Im Vergleich zu anderen Proteinasen, zu Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin, ist das bakterielle Enzym mit einer sehr breiten Spezifität begabt. Sein Wirkungsspektrum, welches Peptidbindungen umfaßt, an denen basische (Arg, Lys, His) und saure (CySO_3H , Glu) Aminosäurereste, solche, die keine oder kleine Seitenketten tragen (Gly, Ala)

und solche, die große Seitenketten oder aromatische Strukturen besitzen (Leu, Phe, Tyr), beteiligt sind, scheint in der Tat weiter zu sein als das irgendeiner anderen wohldefinierten Proteinase. Es ist freilich noch zu klären, ob es sich bei dem kristallisierten und als elektrophoretisch homogen befundenen² bakteriellen Enzym wirklich um einen völlig einheitlichen Eiweißstoff handelt und ob ein einziges enzymatisch aktives „Zentrum“ eines Eiweißkörpers für so vielfältige Wirkung verantwortlich gemacht werden kann.

Dieser Arbeit kam eine Zuwendung zugute, welche die *Rockefeller Foundation* dem Vorstand des II. Chemischen Laboratoriums der Universität Wien, Herrn Prof. *F. Wessely*, zur Unterstützung der unter seiner Leitung ausgeführten Arbeiten gewährt hat. Der Autor dankt hierfür sowie für die Hilfe, die er von der Österreichischen Akademie der Wissenschaften aus den Mitteln der *Seegen-Stiftung* erhalten hat.