

Über den spezifischen Mechanismus enzymatischer Proteolysen.

Von Prof. Dr. E. WALDSCHMIDT-LEITZ, Prag.

(Vortrag anlässlich der Übergabe des Paul-Ehrlich-Preises in Frankfurt a. M. am 14. März 1930*).

(Eingeg. 28. März 1930.)

Im Jahre 1897 ist Paul Ehrlich¹⁾, dessen Geburtstag wir heute begehen, zuerst mit seiner bekannten „Seitenkettentheorie“ hervorgetreten, der Anschauung, daß hochmolekulare, physiologisch aktive Stoffe wie die Antigene oder auch die Fermente ihre besondere Aktivität der Ausbildung spezifischer Seitenketten verdanken, mittels welcher ihre Verankerung an den Substraten ihrer Reaktion erfolge. Mit dieser einfachen Vorstellung gewann man erstmals eine klare Einsicht in die chemischen Grundlagen vieler physiologisch wichtiger Vorgänge, vor allem auf den Gebieten der Immunchemie und der Chemotherapie; ihre Gültigkeit für serologische Reaktionen ist heute durch zahllose experimentelle Belege und Befunde gesichert. Auf dem Gebiete der enzymatischen Reaktionen hat man die Bestätigung der Ehrlich'schen Anschauung bisher vornehmlich durch Untersuchungen über das Schicksal von Enzymen nach ihrer Einführung in den lebenden Organismus gesucht, welche ebenfalls zur Bildung spezifischer Abwehrstoffe, von „Antienzymen“, zu führen scheint. Wie fruchtbar die Ehrlich'sche Seitenkettentheorie aber auch für das Verständnis der normalen enzymatischen Reaktionen, der Reaktionen zwischen Enzym und Substrat, sich erwiesen hat, das zu zeigen, soll der Inhalt meiner heutigen Ausführungen sein. Hier hat ja schon Emil Fischer zur Erklärung der enzymatischen Spezifität den anschaulichen und chemisch durchdachten Vergleich von Schloß und Schlüssel gebraucht.

Die Enzymforschung ist diesen einfachen und klaren Vorstellungen nicht immer gefolgt, sie hat manchen Irrweg beschritten. Unter dem Einfluß der sich entwickelnden Kolloidchemie hat W. M. Bayliss²⁾ versucht, das Wesen der Enzymwirkung in erster Linie auf eine durch Adsorption bedingte Konzentrationserhöhung des Substrates an der Grenzfläche der Enzymteilchen, also auf eine Oberflächenwirkung des Enzyms, nicht auf bestimmte chemische Affinitäten zurückzuführen: der Adsorptionsvorgang sollte die Voraussetzung bilden für die nachfolgende chemische Reaktion, für deren Ausmaß nur der jeweils adsorbierte Anteil der Reaktionspartner als maßgebend angesehen wurde. Für die Erklärung der fein auswählenden enzymatischen Spezifität beließ diese Anschauung nur geringen Spielraum; sie ist experimentell nie bewiesen worden, und man hat sie heute verlassen.

Eine der wichtigsten Grundlagen für die moderne, mehr chemische Analyse enzymatischer Reaktionen boten die Untersuchungen von L. Michaelis³⁾ am Beispiel der enzymatischen Rohrzuckerhydrolyse, aus welchen hervorging, daß diese Reaktion der Gültigkeit

des Massenwirkungsgesetzes unterliegt, wie wenn sie in homogener Lösung erfolgte. Nicht ein adsorbierter Bruchteil, sondern die gesamte vorhandene Menge des Substrates erwies sich als maßgebend für die Reaktionsgeschwindigkeit; die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrate ließ sich zahlenmäßig festlegen. In anderen Fällen wieder, insbesondere bei enzymatischen Fettsäurespaltungen, lehren uns die Erfahrungen der Enzymchemie doch eine gewisse Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität vom Adsorptionszustande, der Dispersität⁴⁾. Den Gegensatz zwischen den Anschauungen von Bayliss und von Michaelis in gewissem Sinne überbrückend, ist so die von R. Willstätter⁵⁾ vertretene Vorstellung gereift, daß die Enzyme sich zusammensetzen aus einem kolloiden Träger und aus einer oder mehreren spezifisch aktiven Gruppen, welche ihre Reaktion mit dem Substrate vermitteln und deren Aufladung zugleich die Kolloidnatur des Enzymkomplexes bedingt. Die enzymatische Reaktion führt danach über eine intermediär entstehende Enzym-Substrat-Verbindung, deren Bildung aus Enzym und Substrat und deren Zerfall in freies Enzym und in die Spaltprodukte des Substrates man auch analytisch zu unterscheiden vermag, wenn die beiden Stufen der Reaktion, Bildung und Zerfall der Enzym-Substrat-Verbindung beispielsweise durch hemmende Stoffe in verschiedenem Maße beeinflusst werden. Nach einer zuerst von H. v. Euler⁶⁾ vertretenen Vorstellung, welche man kurz als die „Zwei-Affinitätstheorie“ bezeichnet, werden für diese beiden Teilvorgänge einer enzymatischen Reaktion zwei verschiedene aktive Gruppen des Enzymmoleküls verantwortlich gemacht, eine substratbindende neben einer substratspaltenden. So gleicht die moderne Theorie vom Mechanismus der Enzymwirkung weitgehend den Gedankengängen der Ehrlich'schen Seitenkettentheorie mit ihrer Unterscheidung von haptophoren und von funktionellen Gruppen, z. B. in den Fermenten; diesen entsprechen zwei verschiedene, an der enzymatischen Reaktion beteiligte Gruppen in den Substraten, eine enzymbindende und eine funktionelle. Inwieweit es gelungen ist, an einigen einfacheren Beispielen proteolytischer Reaktionen die Natur der an der Reaktion teilnehmenden Gruppen in Enzym und Substrat zu ermitteln, darüber darf ich im folgenden berichten.

Von den proteolytischen Enzymen sind die bekanntesten und bestuntersuchten die des tierischen Verdauungstraktes. Hier unterscheidet man im Sekrete der

*) Vgl. den Bericht über die Feier S. 335 d. Ztschr.

*) Vgl. R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz u. Fr. Memmen, Ztschr. physiol. Chem. **125**, 93 [1922/23] (Pankreaslipase). R. Willstätter u. E. Waldschmidt-Leitz, ebenda **134**, 161 [1923/24] (Ricinustlipase).*) Vgl. R. Willstätter, J. Graser u. R. Kuhn, Ztschr. physiol. Chem. **123**, 1, und zwar S. 45 u. 59 [1922].*) H. v. Euler u. K. Josephson, ebenda **133**, 279 [1923/24].1) Klin. Jahrbuch **6**, 299 [1897].

2) The nature of enzyme action, 3. Aufl., London 1914, S. 107 ff.

3) L. Michaelis u. M. L. Menten, Biochem. Ztschr. **49**, 333 [1913].

Magenschleimhaut das Pepsin, ausgezeichnet durch ein Wirkungsoptimum bei stark saurer Reaktion, und im Sekrete der Bauchspeicheldrüse vier verschiedene am Eiweißabbau beteiligte Enzyme, das Pankreastrypsin neben drei Peptide spaltenden Enzymen, einer Carboxy-Polypeptidase, einer Amino-Polypeptidase und einer Dipeptidase⁷⁾; ihr optimaler Wirkungsbereich entspricht schwach alkalischem bis neutralem Milieu. Die Isolierung der einzelnen proteolytischen Enzyme aus dem pankreatischen Enzymgemische ist durchgeführt; sie beruht auf der Anwendung spezifischer Adsorptionsverfahren, wie sie R. Willstätter⁸⁾ in die Enzymchemie eingeführt hat. Es ist dabei bemerkenswert, daß nach neueren Erfahrungen nicht Gele von ausgezeichneter Oberflächenentwicklung, wie sie bisher angewandt wurden, sondern daß kristallisierte Stoffe, z. B. Tonerde oder Eisenminerale, sich als die auswählendsten Adsorbentien erweisen, Bauxit für die Isolierung der Carboxy-Polypeptidase, Hämatit für die Abtrennung der Dipeptidase aus den Enzymgemischen⁹⁾. Die Adsorption dieser Enzyme ist danach keine reine Oberflächenerscheinung, sie scheint vielmehr zwischen spezifischen chemisch aktiven Gruppen in Adsorbens und Enzym zu erfolgen.

An Versuchen, zwei dieser Enzyme, Pepsin und Trypsin, von deren Existenz man schon lange weiß, auf Grund ihrer spezifischen Wirkungsweise bei der Eiweißspaltung zu unterscheiden, hat es nicht gefehlt. Am bemerkenswertesten ist die von J. H. Northrop¹⁰⁾ vorgenommene und experimentell begründete Unterscheidung auf Grund elektrochemischer Affinitäten, wonach das Trypsin nur mit den Eiweißanionen, das Pepsin nur mit den Eiweißkationen in Reaktion zu treten vermöge; die Vereinigung von Enzym und Substrat wird also in diesen Fällen als eine Ionenreaktion verstanden, doch ohne nähere Kennzeichnung der reagierenden Gruppen.

Viel weiter gehen die Aufschlüsse, welche man über den Reaktionsmechanismus der drei peptidspaltenden Enzyme, Carboxy-Polypeptidase, Amino-Polypeptidase und Dipeptidase, gewonnen hat, man verdankt sie der Untersuchung ihrer Spezifität gegenüber Peptiden und Peptidderivaten. Die Frage nach der Natur der enzymbindenden Gruppe in den Substraten ist am Beispiel dieser Enzyme zuerst gelöst worden. So hat sich ergeben, daß die Bindung der Dipeptidase und die der Amino-Polypeptidase an der freien Aminogruppe der Peptide erfolgt; für die Anlagerung dieser Enzyme ist nämlich die Gegenwart einer freien NH_2 -Gruppe in den Substraten unbedingt erforderlich, nach ihrer Substitution, z. B. durch Säurereste, unterbleibt die enzymatische Einwirkung; eine freie Carboxylgruppe findet man dagegen entbehrlich¹¹⁾. Die Wirkung von Amino-Polypeptidase

und Dipeptidase besteht daher in der Abspaltung des die freie Aminogruppe tragenden Aminosäurerestes. Für den Spezifitätsunterschied der beiden Enzyme untereinander andererseits ist maßgebend die Länge der Peptidkette: die Wirkung der Dipeptidase ist auf die Hydrolyse von Dipeptiden, die der Amino-Polypeptidase auf die Spaltung von Tri- und höheren Peptiden beschränkt¹²⁾.

Die Bindung der Carboxy-Polypeptidase an ihre Substrate findet man von anderer Art: sie erfolgt an der freien Carboxylgruppe¹³⁾. Die Wirkung dieses Enzyms auf Peptide besteht daher in der Abspaltung der Aminosäuren vom freien Carboxylende her. Die Verschiedenheit in der Bindungsweise der beiden Polypeptidasen wird besonders anschaulich belegt durch die Tatsache, daß für die Verankerung der Amino-Polypeptidase nur die sterische Konfiguration der die freie Aminogruppe tragenden Aminosäure, für die der Carboxy-Polypeptidase dagegen nur die räumliche Anordnung der Atome an der Carboxylgruppe maßgebend ist¹⁴⁾. So erfolgt die Hydrolyse beispielsweise des racemischen Tripeptids *d,l*-Leucyl-glycyl-l-tyrosin nur durch Amino-Polypeptidase asymmetrisch, unter Beschränkung auf die den l-Leucinrest enthaltende Komponente, die durch Carboxy-Polypeptidase dagegen symmetrisch, sie betrifft die beiden optischen Antipoden unter Bildung von *d,l*-Leucyl-glycin neben l-Tyrosin.

Die enzymbindende Gruppe in den Peptiden ist also für die Verankerung der Dipeptidase und der Amino-Polypeptidase die NH_2 -Gruppe, für die der Carboxy-Polypeptidase das Carboxyl. Welches ist nun die Natur der an der Verankerung beteiligten chemisch aktiven Gruppen in den Enzymen selbst, ihrer haptophoren Gruppen? Über diese Frage hat uns die nähere Untersuchung der pH -Abhängigkeit der einzelnen Enzymwirkungen, ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffzahl, belehrt. So hat sich für den Fall der Dipeptidase gezeigt, daß die pH -Abhängigkeit ihrer Wirkung auf Dipeptide mit der pH -Abhängigkeit einer einfachen chemischen Reaktion der Peptide, der Geschwindigkeit ihrer Kondensation mit Aldehydzucker, Glucose, vollkommen übereinstimmt¹⁵⁾; die Gestalt der pH -Kurve ist für die Reaktion von Dipeptid und Glucose und von Dipeptid und Dipeptidase identisch. Auch hat die nähere analytische Prüfung ergeben, daß der Einfluß der Wasserstoffionen auf die enzymatische Dipeptidspaltung die Lage des Gleichgewichtes zwischen Enzym und Peptid oder die Bildungsgeschwindigkeit der Enzym-Peptid-Verbindung, nicht ihre Zerfallsgeschwindigkeit betrifft¹⁶⁾. Die Schlußfolgerung ist berechtigt, daß an der Reaktion zwischen dem Peptide einerseits und zwischen Dipeptidase und Glucose andererseits ähnliche chemisch aktive

⁷⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls u. J. Waldschmidt-Graser, Ber. Dtsch. chem. Ges. 62, 956 [1929]. E. Waldschmidt-Leitz u. A. Purrr, ebenda 62, 2217 [1929].

⁸⁾ Untersuchungen über Enzyme, Jul. Springer, Berlin 1928.

⁹⁾ Nach demnächst zu veröffentlichenden Versuchen mit Fr. E. Zimmermann u. G. F. Hüttig.

¹⁰⁾ Naturwiss. 11, 713 [1923].

¹¹⁾ H. v. Euler u. K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. 157, 122, und zwar S. 124 u. 137 [1926]. K. Josephson u. H. v. Euler, ebenda 162, 85 [1926/27]. E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann u. A. Schöffner, Ber. Dtsch. chem. Ges. 60, 359 [1926/27]. E. Waldschmidt-Leitz u. W. Klein, ebenda 61, 640 [1928].

¹²⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls u. J. Waldschmidt-Graser, a. a. O. Vgl. W. Graßmann u. H. Dyckerhoff, ebenda 175, 18 [1928]. Ber. Dtsch. chem. Ges. 61, 656 [1928].

¹³⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. W. Klein, Ber. Dtsch. chem. Ges. 61, 640 [1928]. E. Waldschmidt-Leitz, W. Klein u. A. Schöffner, ebenda 61, 2092 [1928].

¹⁴⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. H. Schlatter, Naturwiss. 16, 1026 [1928]. E. Abderhalden, ebenda 17, 293, und zwar S. 294 [1929].

¹⁵⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. G. Rauchalles, Ber. Dtsch. chem. Ges. 61, 645 [1928]. Vgl. dazu H. v. Euler u. E. Brunius, Liebigs Ann. 467, 201, und zwar S. 209 [1928].

¹⁶⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. G. v. Schuckmann, Ztschr. physiol. Chem. 184, 56 [1929].

Gruppen beteiligt sind. Die haptophore Gruppe der Dipeptidase, vielleicht auch die der Amino-Polypeptidase, wäre danach in Übereinstimmung mit einer zuerst von H. v. Euler und K. Josephson¹⁷⁾ aus Hemmungsversuchen abgeleiteten Vorstellung, eine Aldehyd- oder eine Ketogruppe, die Verankerung der Peptidase an der Aminogruppe des Peptids vollzöge sich also unter Bildung einer Schiff'schen Base.

Weniger bestimmt sind die Aussagen über die chemische Natur der substratbindenden, der haptophoren Gruppe der Carboxy-Polypeptidase. Zur Verankerung dieses Enzyms an das Carboxyl der Peptide scheint ein bestimmter Ionisationsgrad der Carboxylgruppe erforderlich zu sein¹⁸⁾; ein Angriff dieses Enzyms auf Polypeptide erfolgt nämlich nur dann, wenn ihre freie Carboxylgruppe besonderen Aminosäureresten, beispielsweise einem Tyrosin¹⁹⁾ oder einem Tryptophanreste²⁰⁾ angehört. Der Einfluß solcher endständiger Aminosäurereste auf die Anlagerung der Carboxy-Polypeptidase scheint die elektrochemische Natur der Carboxylgruppe zu betreffen; denn es hat sich gezeigt, daß man unabhängig von der Natur des endständigen Aminosäurerestes die Anlagerung der Carboxy-Polypeptidase durch eine Acylierung der freien Aminogruppe in den Peptiden bewirken kann²¹⁾; so wird z. B. Benzoyl-glycyl-glycin durch Carboxy-Polypeptidase zerlegt, das freie Dipeptid Glycyl-glycin dagegen nicht. Die mit der Acylierung verbundene Verstärkung der elektronegativen Natur des Carboxyls ermöglicht also in diesem Falle erst die Bindung des Enzyms. Die Reaktion der Carboxy-Polypeptidase mit ihren Substraten scheint eine Ionenreaktion, die haptophore Gruppe dieses Enzyms eine basische Gruppe zu sein.

Wir wenden uns nun zu der Frage nach der Natur der funktionellen Gruppen in Enzym und Substrat. Wie sind die Atomgruppen beschaffen, durch deren Reaktion nach erfolgter Verankerung des Enzyms an das Substrat der Zerfall der Enzym-Substrat-Verbindung eingeleitet wird? Diese Frage erscheint heute erst für eine der behandelten proteolytischen Reaktionen, für die enzymatische Spaltung von Dipeptiden, der Beantwortung zugänglich. Die primäre Verankerung der Dipeptidase an den Dipeptiden vollzieht sich, wie schon angeführt, mittels deren freier Aminogruppe. An der Reaktion mit dem Enzym ist indessen auch der zweite Aminosäurerest des Dipeptids, der die freie Carboxylgruppe tragende, beteiligt. Dies hat man aus der Tatsache zu schließen, daß für den Angriff des Enzyms die sterische Konfiguration auch dieser Hälfte des Peptids entscheidend gefunden wird: das Dipeptid Glycyl-d-leucin z. B., das den in der Natur nicht vorkommenden Antipoden des Leucins enthält, wird enzymatisch nicht zerlegt. Aus Versuchen über die enzymatische Spaltbarkeit der Glycyl-aminobenzoesäuren, welche Herr Dr. A. K. Balls²²⁾ in

unserem Institute kürzlich ausgeführt hat, ist nun zu entnehmen, daß als die zweite Haftstelle des Enzyms in den Dipeptiden, als deren funktionelle Gruppe, die NH-Gruppe der Peptidbindung selbst anzusehen ist. Von den untersuchten Glycylderivaten der Ortho-, der Meta- und der Para-Aminobenzoesäure findet man bemerkenswerterweise das o-Derivat gar nicht, die m- und p-Verbindung dagegen leicht zerlegbar; aus Hemmungsversuchen ergibt sich andererseits, daß auch das o-substituierte Benzoessäurederivat das Enzym zu verankern vermag. Die Affinität der Iminogruppe, deren Funktion für den Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes notwendig erscheint, ist in der o-substituierten Säure infolge der Neigung zur Anhydridbildung so abgeschwächt, daß sie zur Reaktion mit dem Enzym nicht mehr hinreicht. Diese Erfahrungen finden in Hinblick auf die Kennzeichnung auch der funktionellen Gruppe in der Dipeptidase selbst eine wertvolle Ergänzung durch neuere Beobachtungen von M. Bergmann, V. du Vigneaud und L. Zervas²³⁾ über die außerordentlich große Zerfallstendenz der Peptidbindung nach Substitution ihrer NH-Gruppe durch Säurereste; an der Iminogruppe acetyliertes Dipeptid zerfällt danach schon in schwach alkalischem, wässrigem Milieu unter Aufspaltung der Peptidbindung in seine Bausteine. Dieser Versuch ist ein bemerkenswertes Modell zum Verständnis der Wirkungsweise von Dipeptidase, deren funktioneller Gruppe man danach den Charakter eines Säurerestes zuzuordnen hätte.

So rundet sich die Vorstellung vom Mechanismus der enzymatischen Peptidspaltung, wie wir sie heute entwerfen können, zum Bilde einer Reaktion mittels Seitenketten im Sinne der Ehrlich'schen Theorie. Diese Theorie gibt uns auch Antwort auf die Frage nach der Ursache der besonderen physiologischen Aktivität der Seitenketten in den Enzymen, diese ist nämlich bedingt durch die Verknüpfung der chemisch-aktiven Gruppen mit dem großen Molekül des kolloiden Trägers. Für die ausgeprägte Spezifität andererseits, der wir bei den Enzymen gleichfalls begegnen, wird man entweder eine spezifische Struktur der Seitenketten selbst oder aber eine besondere Konfiguration des kolloiden Trägers verantwortlich zu machen haben. In diesem letzteren Sinne könnte man nämlich die Erfahrungen verwerten, welche kürzlich E. Bamann und P. Laeverenz²⁴⁾ aus dem Münchener Laboratorium über eine willkürliche Änderung, ja Umkehr der optischen Auslese fettspaltender Enzyme durch zugesetzte, optisch-aktive Stoffe mitgeteilt haben. Wenn die chemisch-aktive Gruppe eines Enzyms an verschiedenen, sterisch-isomeren, kolloiden Trägern verankert ist, so mag dies schon zur Auflösung einer funktionellen Spezifität hinreichend sein. So weitgehend erfüllen sich die Voraussetzungen der Ehrlich'schen Theorie für das Beispiel der Enzyme.

Es gibt zwei Arten, naturwissenschaftlich zu arbeiten. Die eine ist, ein großes experimentelles Tatsachenmaterial zu sammeln und aus ihm Gesetzmäßigkeiten abzuleiten. Die wirklich produktive Arbeitsweise eines Naturforschers aber scheint mir die Paul Ehrlich's zu sein, der die Wahrheit intuitiv erkannte, und für den das Experiment nur ihre Bestätigung bedeutete.

[A. 44.]

¹⁷⁾ A. a. O.

¹⁸⁾ E. Waldschmidt-Leitz, W. Klein u. A. Schöffner, Ber. Dtsch. chem. Ges. 61, 2092 [1928].

¹⁹⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner, H. Schlatter u. W. Klein, Ber. Dtsch. chem. Ges. 61, 299 [1927/28].

²⁰⁾ E. Abderhalden u. E. Schwab, Fermentforsch. 9, 501 [1928].

²¹⁾ E. Waldschmidt-Leitz, W. Klein u. A. Schöffner, a. a. O.

²²⁾ Noch unveröffentlicht.

²³⁾ Ber. Dtsch. chem. Ges. 62, 1909 [1929].

²⁴⁾ Ebenda 63, 394 [1929/30].