

# Zeitschrift für angewandte Chemie

44. Jahrgang, S. 573—596

Inhaltsverzeichnis: Siehe Anzeigenteil S. 495

11. Juli 1931, Nr. 28

## Hydrolysen im Organismus.

Von ERNST WALDSCHMIDT-LEITZ, Prag.

(Vortrag auf der Tagung der Südwestdeutschen Chemiedozenten in Würzburg am 25. April 1931.)

(Eingeg. 2. Mai 1931.)

Die Hydrolysen in den Organismen sind wie die Oxydoreduktionsvorgänge katalytische Prozesse, sie werden durch Enzyme bewirkt. Allein die Kenntnis hydrolytischer Enzymwirkungen im Organismus ist älter und reicht weiter als die der oxydativen. Dies röhrt daher, daß hydrolytische Prozesse sich nicht nur wie die Oxydationsvorgänge im wesentlichen intrazellulär abspielen, sondern daß sie vor allem extrazellulär, im Verdauungstrakt, beobachtet werden. Hier findet man eine Anzahl von Enzymen mit ganz besonderen Aufgaben, die in dem andersartigen physiologischen Bedürfnis begründet sind; und es haben die neueren Erfahrungen, insbesondere am Beispiel eiweißspaltender Enzyme, gezeigt, daß die Enzyme des Verdauungstraktes hinsichtlich ihrer Wirkungsbedingungen und ihrer Wirkungsweise in der Tat eine Sonderstellung einnehmen, während dagegen die intrazellulär wirkenden Enzyme des tierischen Organismus mit denen des Pflanzenreichs weitgehende Übereinstimmung zeigen. Bei einer Besprechung der hydrolytischen Vorgänge im Organismus erscheint es daher auch innerlich gerechtfertigt, die Hydrolysen im tierischen Verdauungstrakt und die intrazellulär sich abspielenden voneinander zu scheiden. Die ersten, deren Auflösung am weitesten vorgeschritten ist, möchte ich hier vor allem behandeln.

Von den Umsetzungen der Nucleinsäuren, die noch zu wenig erforscht sind, und von den ihrer Menge nach nicht bedeutenden einiger anderer Stoffe abgesehen, beschränken sich die Hydrolysen im Verdauungstrakt im wesentlichen auf den Abbau von Stoffen aus den drei großen Gruppen der Fette, der Kohlenhydrate und der Eiweißkörper; unter den für ihre Hydrolyse verantwortlichen Katalysatoren unterscheiden wir dementsprechend Lipasen, Carbohydrasen und Proteasen. Die Hydrolyse der Fette zu Glycerin und den Fettsäuren vollzieht sich zum Teil im Magen, zum überwiegenden Teil im Darmtraktus; an ihr sind die Magen- und die Pankreaslipase, aus Magen- und Pankreassekret, beteiligt. Allein die Unterscheidung dieser beiden Enzyme, die man früher auf Grund der pH-Abhängigkeit ihrer Wirkungen vornahm, ist nach den Untersuchungen R. Willstätters und seiner Schüler<sup>1)</sup> sehr unsicher, wenn nicht hinfällig geworden; in reinem Zustande findet man für das Enzym aus den beiden Sekreten keine Unterschiede in den Wirkungsbedingungen mehr. Auch die Spezifität der fett- und esterspaltenden Enzyme scheint allgemein keine sehr ausgeprägte, nur eine relative zu sein. Es hat den Anschein, daß der Organismus für die Hydrolyse der Glyceride beispielsweise von nie-

deren und von höhermolekularen Fettsäuren keine absolut spezifischen Enzyme ausbildet, nur Enzyme von relativer Spezifität. So unterscheidet man z. B. das Magen- und Pankreasenzym, zur Spaltung von Fetten und auch von einfachen Estern gut geeignet, als eine Lipase von der Esterase der Leber, welche nur in geringem Maße befähigt ist, Fette zu spalten, sich für die Hydrolyse von Estern einwertiger Alkohole aber besonders tauglich erweist.

Die Spezifität der esterspaltenden Enzyme verdient dagegen in einer anderen Beziehung erhöhtes Interesse, man findet sie nämlich in besonderem Maße wandelbar, abhängig von Begleit- und von Zusatzstoffen. Hier röhren die Erfahrungen der neueren Zeit über willkürliche Spezifitätsbeeinflussung an die Grundvorstellungen über die Natur der Enzyme und ihre Wirkungsweise, wie sie sich nach R. Willstätter<sup>2)</sup>, auch nach H. v. Euler<sup>3)</sup>, eingebürgert<sup>4)</sup> haben. Sie besagen, daß man sich die Enzyme zusammengesetzt zu denken habe aus einem kolloiden Träger und aus spezifisch aktiven Gruppen, deren eine die Bindung des Enzyms an das Substrat vollziehe, während eine andere für den Zerfall des Substrates in der entstandenen Enzym-Substrat-Verbindung verantwortlich sei. Man war geneigt, die Spezifität der Enzyme auf Unterschiede vor allem in der Natur der aktiven Gruppen zurückzuführen<sup>5)</sup>. Der Einfluß des kolloiden Trägers auf die Erscheinungen der Reaktionsauslese ist in diesen Vorstellungen bisher weniger berücksichtigt worden. Er erscheint besonders deutlich bei den fett- und esterspaltenden Enzymen. Zu den Erfahrungen über den Einfluß von Begleit- und Zusatzstoffen auf die pH-Abhängigkeit dieser Enzymwirkungen und auf die relative Aktivität der Enzyme gegenüber höheren und niederen Estern gesellen sich die neueren Beobachtungen von E. Baman und P. Laeveren<sup>6)</sup> über die Beeinflussung der sterischen Auslese als bedeutsame Ergänzung. Es ist gelungen, die optische Auslese gegenüber sterisch-isomeren Estern durch Leberesterase durch den Zusatz optisch aktiver Stoffe wie Strychnin umzukehren. Diese Beobachtungen scheinen mir eine Deutung in dem Sinne zuzulassen, daß der wirksame Zusatzstoff mit dem kolloiden Träger des Enzyms in Reaktion tritt, daß dieser hier für die Erscheinungen der sterischen Auslese verantwortlich ist.

Der Einfluß von Begleitstoffen auf die Aktivität der Lipase im Verdauungstrakt ist vor allem an den Erscheinungen der Aktivierung und Hemmung zu erkennen, die das Enzym durch Stoffe wie Proteine,

<sup>1)</sup> R. Willstätter u. Fr. Memmen, Ztschr. physiol. Chem. 133, 247 [1923/24]; R. Willstätter, F. Haurowitz u. Fr. Memmen, ebenda 140, 203 [1924]; F. Haurowitz u. W. Petrou, ebenda 144, 68 [1925]; R. Willstätter u. E. Baman, ebenda 173, 17 [1928]; R. Willstätter, E. Baman u. J. Waldschmidt-Graser, ebenda 173, 155 [1928].

<sup>2)</sup> Vgl. R. Willstätter, J. Graser u. R. Kuhn, ebenda 123, 1, und zwar S. 45 u. 59 [1922].

<sup>3)</sup> H. v. Euler u. K. Josephson, ebenda 133, 279 [1923/24].

<sup>4)</sup> Vgl. dazu A. Fodor u. L. Frankenthal, Biochem. Ztschr. 228, 101 [1930].

<sup>5)</sup> Siehe dazu aber R. Willstätter u. A. Pollinger, Ztschr. physiol. Chem. 130, 281 [1923].

<sup>6)</sup> Ber. Dtsch. chem. Ges. 63, 394 [1929/30].

Gallensalze oder Seifen erfährt"); so wird die Pankreaslipase in ihrem natürlichen Milieu durch die begleitenden Proteine des Sekretes und durch den Zutritt der Gallensalze aktiviert. Allein nicht nur für die Fettspaltung im Darmkanal, auch für die Spaltung der Stoffe aus den Gruppen der Kohlenhydrate und Proteine bedarf es der Mitwirkung besonderer Aktivatoren. Sie sind schon lange bekannt: gewisse Anionen, z. B. Chlorionen, für die Amylase, Enterokinase für das Pankreastrypsin. Die Zahl der an der Hydrolyse jener Stoffe mitwirkenden Aktivatoren wird damit indessen noch nicht erschöpft sein. So ist bekannt, daß der Abbau der Stärke durch tierische, z. B. durch Speichel- oder Pankreasamylase nach der Bildung von etwa drei Vierteln der theoretisch möglichen Maltosemenge sein Ende findet. Die hierbei verbleibenden Grenzdextrine entstammen der Hüllsubstanz des Stärkekorns, dem Amylopectin; denn reine Amylose wird durch Pankreasamylase vollständig in Maltose übergeführt<sup>8</sup>), Amylopectin dagegen, wie wir beobachtet haben<sup>9</sup>), nur etwa zur Hälfte. Es ist aber wenig wahrscheinlich, daß die Hydrolyse der Stärke im Verdauungstrakt keine vollständige sein, daß sie zum Teil auf der Dextrinstufe stehenbleiben sollte. Aktivatoren des „Grenzabbau“ der Stärke hat man im tierischen Verdauungstrakt noch nicht beschrieben, auch nicht aufgesucht. Mit der Möglichkeit ihres Vorkommens wird man indessen rechnen müssen. In neueren Versuchen<sup>10</sup>) hat es sich ergeben, daß ein bei der Stärkehydrolyse durch pflanzliche Amylase, aus Getreide, beteiligter Aktivator organischer Natur, welcher bei der Keimung gebildet wird, auch pankreatische Amylase zu aktivieren vermag.

Bei weitem am eindringendsten sind heute unsere Kenntnisse über die hydrolytischen Umsetzungen der Proteine im Organismus. An ihnen ist eine größere Anzahl von Enzymen beteiligt, welche sich aus ihren besonderen Aufgaben beim Eiweißabbau erkennen lassen. So hat man unter den proteolytischen Enzymen oder Proteasen die beiden großen Gruppen der Proteininasen und der Peptidasen zu unterscheiden<sup>11</sup>). Die Wirkung der Proteininasen beschränkt sich nämlich, wie der Name besagt, auf die Spaltung von Proteinen, man findet sie gegenüber synthetischen Peptiden ohne Wirkung, während die Wirkung der Peptidasen nur gegenüber Peptiden, nicht gegenüber natürlichen Proteinen beobachtet wird. Die Gruppe der Proteininasen umfaßt die Untergruppen der Pepsinasen, der Tryptasen und der Papainasen, welche man nach ihrer Wirkungsweise beim Eiweißabbau zu unterscheiden hat; denn nach den Untersuchungen von J. H. Northrop<sup>12</sup>) hat man die Wirkung der Pepsinasen, beispielsweise des Pepsins, auf ihre Reaktion mit den Eiweißkationen, die der Tryptasen, unter ihnen des Pankreastrypsins, auf die Eiweißanionen zu beziehen, während die Enzyme aus der Gruppe der Papainasen nach R. Willstätter und W. Graßmann<sup>13</sup>) nur

<sup>7)</sup> R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz u. Fr. Memmen, Ztschr. physiol. Chem. 125, 93 [1922/23].

<sup>8)</sup> Vgl. R. Kuhn, LIEBIGS Ann. 443, 1 [1925].

<sup>9)</sup> Nach demnächst zu veröffentlichten Versuchen gemeinsam mit M. Samec u. Z. Čanič.

<sup>10)</sup> E. Waldschmidt-Leitz u. A. Purr, noch unveröffentlicht.

<sup>11)</sup> Bezuglich der Einteilung der Proteasen vgl. W. Graßmann in C. Oppenheimers Handbuch der Biochemie des Menschen und der Tiere, 2. Aufl., Ergänzungsband, S. 180 ff., Jena 1930.

<sup>12)</sup> Naturwiss. 11, 713 [1923].

<sup>13)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 138, 184, und zwar S. 198 [1924].

mit den isoelektrischen Eiweißteilchen zu reagieren vermögen. Auch die Einteilung der peptidspaltenden Enzyme, so wie sie sich heute vornehmen läßt, beruht auf Unterschieden in der spezifischen Angriffsweise ihrer einzelnen Vertreter. Man unterscheidet hier die Typen der Carboxy- und der Aminopolypeptidasen, der Dipeptidasen und der Iminopeptidase oder Prolinase, je nach den strukturellen Voraussetzungen, die für den Angriff der einzelnen Enzyme auf Peptide oder Peptid-derivate maßgebend sind.

Die Möglichkeit der Unterscheidung dieser verschiedenen Typen proteolytischer Enzyme und ihrer Isolierung verdankt man in erster Linie der Anwendung neuer präparativer Methoden, vor allem der von R. Willstätter<sup>14)</sup> in die Enzymchemie eingeführten Verfahren der Adsorption und Elution. Denn die angeführten Enzyme finden sich in ihrem natürlichen Vorkommen fast immer in Gemischen, so daß ihre Einzelwirkungen nicht ohne weiteres zu erkennen und zu unterscheiden sind. So gibt Tabelle 1 Aufschluß über die Natur und die Anzahl der bisher beobachteten Vertreter aus den einzelnen Enzymgruppen im Magendarmkanal, in tierischen Organen und Geweben und in den farblosen Blutkörperchen.

Tabelle 1.  
Zusammensetzung proteolytischer Enzymsysteme des tierischen Organismus.

Verdauungstrakt <sup>15)</sup>	Tier. Organe und Gewebe <sup>16)</sup>	Farblose Blutzellen <sup>17)</sup>
Magen: Pepsinase	Kathepsin (Papainase-Typ)	Proteinase (Tryptase-Typ)
Pankreas u. Darm: Proteinase (Tryptase-Typ) Protaminase (Tryptase-Typ) <sup>18)</sup> Carboxy-Poly- peptidase (trypt.) Amino-Polypeptidase		Kathepsin (Papainase-Typ)
Dipeptidase Prolinase <sup>19)</sup>	Carboxy-Polypep- tidase (kathept.) Amino- Polypeptidase Dipeptidase Prolinase <sup>19)</sup>	Carboxy-Poly- peptidase Amino-Poly- peptidase Dipeptidase

Die Auflösung dieser Enzymgemische ist an einigen Beispielen durchgeführt worden, von welchen das der Trennung der pankreatischen Enzyme durch selektive Adsorption hier näher beschrieben werden soll. Eine erste Trennung des oben angeführten Enzymgemisches, wie es auch in den Auszügen der Pankreasdrüse enthalten ist, erreicht man durch Einwirkung des Tonerdegels  $C_y$ , von der Zusammensetzung  $Al(OH)_3$ , und zwar bei saurer Reaktion<sup>20)</sup>; in den Adsorptionsmutterlaugen verbleiben dabei Proteinase, Protaminase und Carboxy-

<sup>14)</sup> Untersuchungen über Enzyme, Julius Springer, Berlin, 1928.

<sup>15)</sup> Siehe dazu E. Waldschmidt-Leitz u. A. Purr, Ber. Dtsch. chem. Ges. 62, 2217 [1929].

<sup>16)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, J. J. Bek u. E. Blum, Ztschr. physiol. Chem. 188, 17 [1929/30].

<sup>17)</sup> Vgl. R. Willstätter, E. Bamann u. M. Rohde-Wald, ebenda 185, 267 [1929].

<sup>18)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, Fr. Ziegler, A. Schäffner u. L. Weil, ebenda 197, 219 [1931].

<sup>19)</sup> W. Graßmann, H. Dyckerhoff u. O. v. Schoenebeck, Ber. Dtsch. chem. Ges. 62, 1307 [1929]; vgl. O. v. Schoenebeck, Inaugural-Dissertation, München 1930.

<sup>20)</sup> Zufolge E. Waldschmidt-Leitz u. A. Harteneck, Ztschr. physiol. Chem. 147, 286 [1925]; E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner u. W. Graßmann, ebenda 156, 68, und zwar S. 82 [1926].

polypeptidase, während Aminopolypeptidase, Dipeptidase und Prolinase frei von jenen in den mit Alkali bereiteten Elutionen der Tonerde gewonnen werden. Auch die weitere Auflösung der noch verbliebenen Enzymgemische ist mit Adsorptionsmitteln erreichbar<sup>21)</sup>; dies veranschaulicht das nachstehende Schema, das den Gang der präparativen Vornahmen zur Gewinnung der einzelnen Enzyme beschreibt:

Proteinase, Protaminase, Carboxy-Polyp., Amino-Polyp., Prolinase, Dipeptidase + Tonerde C <sub>r</sub> bei pH = 4	Adsorptionsrestlösung: Proteinase, Protaminase, Carboxy-Polyp. + Tonerde C <sub>r</sub> bei pH = 7	Elution: Amino-Polyp., Prolinase, Dipeptidase + Eisenhydroxyd bei pH = 4
Adsorptionsrestlösung: Proteinase, Carboxy-Polyp. Protaminase	Elution: Amino-Polyp., Prolinase	Adsorptionsrestlösung: Dipeptidase

Die nach diesen Adsorptionsvornahmen noch verbleibenden Gemische von Proteinase und Protaminase einerseits und von Aminopolypeptidase und Prolinase andererseits sind mit Adsorptionsmitteln noch nicht weiter aufgelöst worden; es gelingt indessen leicht, in ihnen die Wirkung einer der enzymatischen Komponenten auszuschalten, die der Proteinase z. B. durch spezifische Hemmung<sup>22)</sup>, die der Prolinase durch Zerstörung<sup>23)</sup>.

Das Adsorptionsverhalten dieser proteolytischen Enzyme findet man in bemerkenswertem Maße unabhängig vom Reinheitsgrad, es scheint durch Begleitstoffe nicht wesentlich beeinflußt und eine Eigenschaft der Enzyme selbst zu sein. Man hat in diesen Fällen die Adsorption als eine elektrochemische Reaktion zwischen Enzym und Adsorbens im Sinne von L. Michaelis<sup>24)</sup> zu verstehen; auch hat es sich gezeigt<sup>25)</sup>, daß nicht die Gele mit großer Oberflächenentwicklung, sondern daß kristallisierte Oxyhydrate und Oxyde, z. B. Mineralien, die selektivsten Adsorbentien sind.

Die Isolierung der einzelnen proteolytischen Enzyme wird ergänzt durch Untersuchungen über Eigenschaften und Wirkungsweise gewisser Hilfsstoffe der Proteolyse, gewisser spezifischer Aktivatoren. So wirkt die Enterokinase aus der Darmschleimhaut<sup>26)</sup> als spezifischer Hilfsstoff für Pankreasproteinase wie für Carboxypolypeptidase aus Pankreas. Sie bildet mit diesen dissoziable Additionsverbindungen, man findet ohne den Aktivator das Enzym gar nicht (Proteinase) oder nur unvollkommen wirksam (Polypeptidase<sup>27)</sup>). Eine Aktivierung von ähnlicher Bedeutung erfahren die Enzyme aus der Gruppe der Papainasen, beispielweise Papain<sup>28)</sup>)

<sup>21)</sup> Siehe dazu E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls u. J. Waldschmidt-Graser, Ber. Dtsch. chem. Ges. 62, 956 [1929]; E. Waldschmidt-Leitz u. A. Purr, ebenda 62, 2217 [1929]; E. Waldschmidt-Leitz, Fr. Ziegler, A. Schäffner u. L. Weil, a. a. O.

<sup>22)</sup> Vgl. E. Waldschmidt-Leitz, Fr. Ziegler, A. Schäffner u. L. Weil, a. a. O.

<sup>23)</sup> O. v. Schoenebeck, a. a. O.

<sup>24)</sup> Biochem. Ztschr. 7, 488 [1907/08]; L. Michaelis u. M. Ehrenreich, ebenda 10, 283 [1908]; 25, 359 [1910].

<sup>25)</sup> Siehe dazu E. Waldschmidt-Leitz u. A. K. Balls, Ber. Dtsch. chem. Ges. 63, 1203 [1930]; E. Waldschmidt-Leitz u. Fr. E. Zimmermann, Ztschr. physiol. Chem., im Druck.

<sup>26)</sup> Vgl. N. P. Schepowalnikow, Inaugural-Dissertation, St. Petersburg, 1899.

<sup>27)</sup> E. Waldschmidt-Leitz u. A. Purr, Ber. Dtsch. chem. Ges. 62, 2217 [1929].

<sup>28)</sup> Vgl. R. Willstätter u. W. Graßmann, Ztschr. physiol. Chem. 138, 184 [1924].

oder Kathepsin, auch Carboxypolypeptidase aus tierischen Organen und Geweben<sup>29)</sup>, durch einen natürlichen, oft mit den Enzymen vergesellschafteten Aktivator, Phytokinase<sup>30)</sup> bzw. Zookinase<sup>31)</sup>, dessen Bildung auch durch Einwirkung von Blausäure oder Schwefelwasserstoff auf die rohen Enzymlösungen bewirkt werden kann<sup>31)</sup>. Auf die chemische Natur dieser Aktivatoren, die aufgeklärt worden ist, und auf ihre besondere physiologische Bedeutung werde ich noch näher einzugehen haben.

Die allgemeine Wirkung der verschiedenen, am Eiweißabbau beteiligten Enzyme, der Proteinasen wie der Peptidasen, beschränkt sich, soweit wir wissen, auf die Auflösung von Säureamidbindungen, von Bindungen —CO—NH—, wie sie in den Peptiden vorliegen<sup>32)</sup>; die eingehendere Untersuchung ihrer Spezifität hat indessen gezeigt, daß sich die einzelnen Enzyme wesentlich in ihrer Wirkungsweise unterscheiden. Vor einer Befprechung ihrer besonderen Wirkungsweise hat man daher kurz auf die Ergebnisse der Spezifitätsprüfung an natürlichen und an synthetischen Substraten einzugehen. Zwar ist die Angreifbarkeit natürlicher Proteine durch einzelne der proteolytischen Enzyme in mancher wesentlichen Beziehung schon lange bekannt, aber durch die neueren Erfahrungen mit gereinigten Enzymen sind die älteren Ergebnisse doch beträchtlich erweitert, häufig auch richtiggestellt worden.

Es gilt heute als gesichert, daß keiner der bekannten Eiweißstoffe, wie Tabelle 2 belegt, durch Peptidasen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, angegriffen wird. Hinsichtlich der Spaltbarkeit durch Vertreter aus den drei Gruppen der Proteinasen nimmt nur eine Klasse von Proteinen eine Sonderstellung ein. Es sind dies die Protamine aus Fischsperma, Körper von verhältnismäßig einfacher Zusammensetzung und von stark basischem Charakter<sup>33)</sup>. Sie sind nämlich ausgezeichnet durch ihre Unangreifbarkeit durch Pepsinase auf der einen, durch ihre Spaltbarkeit durch die zu den Trypsasen zu rechnende Protaminase<sup>34)</sup> auf der anderen Seite. Es ist noch zweifelhaft, ob diese Sonderstellung der Protamine auf ihre geringere Molekulargröße<sup>34)</sup>, es ist auch möglich, daß sie auf ihre einfachere Zusammensetzung zurückzuführen ist. Von den Protaminen abgesehen, werden die enzymatisch zerlegbaren Proteine von Protaminase nicht angegriffen; man beobachtet ihre Spaltung hingegen sowohl mit Pepsinase wie mit Papainase oder Pankreastrypsin. Die enzymatischen Wirkungen sind indessen in diesen Fällen nicht identisch, sie unterscheiden sich vielmehr nach der Natur der gebildeten Spaltprodukte. Soviel man weiß, besteht die Wirkung von Pepsinase in der Zerlegung der Proteinmoleküle zu höheren, die der Papainase in der Spaltung zu niederen Peptiden, während bei der Einwirkung von Pankreastrypsin bedeutende Mengen freier Aminosäuren gebildet werden, die der Protaminase endlich sich auf die Abspaltung basischer Aminosäuren vom

<sup>29)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, J. J. Bek u. E. Blum, ebenda 188, 17 [1929/30].

<sup>30)</sup> Vgl. W. Graßmann u. H. Dyckerhoff, ebenda 179, 41, und zwar S. 50 [1928]; O. Ambros u. A. Harteneck, ebenda 181, 24 [1928/29].

<sup>31)</sup> Vgl. W. Graßmann, Ztschr. angew. Chem., im Druck.

<sup>32)</sup> Vgl. E. Waldschmidt-Leitz, Ber. Dtsch. chem. Ges. 59, 3000 [1926].

<sup>33)</sup> Vgl. A. Kossel, Protamine und Histone, Leipzig und Wien, 1929.

<sup>34)</sup> Vgl. E. Waldschmidt-Leitz, Fr. Ziegler, A. Schäffner u. L. Weil, Ztschr. physiol. Chem. 197, 219 [1931].

Carboxylen der Proteine beschränkt. Aus der Tabelle ist auch zu ersehen, daß eine enzymatische Spaltbarkeit tierischer Gerüstsubstanzen, unter ihnen von Seidenfibroin oder von Keratinen, noch nicht beobachtet worden ist. Man hat daraus zu folgern, daß die Eiweißstoffe dieser Gruppe, ihrer besonderen physiologischen Aufgabe entsprechend, auch strukturell eine Sonderstellung einnehmen.

Tabelle 2.  
Spezifische Spaltbarkeit von Proteinen.  
(Angaben bedeuten: — = keine, + = positive Hydrolyse)

Protein	Pepsin- ase	Papain- asen (akt.v.)	Trypsin (aktiv.)	Tryptasen Prot- aminase	Peptid- asen
Kasein, Histon, Fibrin, Gelatine, Gliadin, Zein, Al- bumine, Globuline	+	+	+	—	—
Protamine (Clupein, Salmin, Scombrin)	—	+	+	+	—
Skleroproteine (Sei- denfibroin, Kera- tine) . . . . .	—	—	—	—	—

Bedeutsamer und weitgehender sind die Fortschritte, welche die Spezifitätsprüfung der Enzyme aus der Gruppe der Peptidasen, an synthetischen Peptiden und Peptidderivaten, zu verzeichnen hat, denn sie haben für die Erkenntnis des Mechanismus proteolytischer und enzymatischer Reaktionen überhaupt besondere Bedeutung erlangt. So hat sich ergeben, daß die spezifische Angreifbarkeit eines Peptids durch Dipeptidase einerseits und durch Aminopolypeptidase andererseits durch die Länge der Peptidkette bestimmt wird<sup>35</sup>), während für die Spaltbarkeit durch Carboxypolypeptidase außerdem die Natur der Aminosäurebausteine entscheidend ist; diese bedingt neben dem Einfluß der Kettenlänge den Spezifitätsunterschied zwischen Amino- und Carboxypolypeptidase<sup>36</sup>). Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, stellen die Dipeptide in den meisten Fällen spezifische Substrate der Dipeptidase dar; von Aminopolypeptidase werden Dipeptide überhaupt nicht, von Carboxypolypeptidase nur in Fällen besonderer Zusammensetzung zerlegt. So ist die Spaltbarkeit der in der Tabelle angeführten beiden Dipeptide Phenylalanyl-arginin<sup>37</sup>) und Glutamyl-tyrosin<sup>38</sup>) durch Carboxypolypeptidase auf die Gegenwart besonderer Aminosäurereste, Arginin bzw. Tyrosin, zurückzuführen. Der besondere Einfluß bestimmter Aminosäurereste wird für das Beispiel des Tyrosins aus dem Vergleich der Angreifbarkeit tyrosinfreier und tyrosinhaltiger Polypeptide erkennbar. Eine Verlängerung der Peptidkette in Dipeptiden wie Glycyl-glycin oder Leucyl-glycin allein durch Einführung von Glycinresten bedingt noch keine Spaltbarkeit durch

<sup>35</sup>) Vgl. W. Graßmann, Ztschr. physiol. Chem. 167, 202 [1927]; W. Graßmann u. H. Dyckerhoff, ebenda 175, 18 [1928]; Ber. Dtsch. chem. Ges. 61, 656 [1928] (Hefe-Enzyme); E. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balli u. J. Waldschmidt-Graser, ebenda 62, 956 [1929] (Darm-Enzyme).

<sup>36</sup>) Vgl. E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann u. H. Schlatter, Ber. Dtsch. chem. Ges. 60, 1906 [1927]; E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, H. Schlatter u. W. Klein, ebenda 61, 299 [1927/28].

<sup>37</sup>) E. Waldschmidt-Leitz, W. Klein u. A. Schäffner, ebenda 61, 2092 [1928].

<sup>38</sup>) E. Abderhalden u. E. Schwab, Fermentforsch. 9, 501 [1928].

Carboxypolypeptidase, wohl hingegen die Einführung eines Tyrosinrestes. Wie die Tabelle zeigt, wird nämlich schon das tyrosinhaltige Tripeptid Leucyl-glycyl-tyrosin und ebenso das Tetrapeptid Leucyl-diglycyl-tyrosin oder das Pentapeptid Leucyl-triglycyl-tyrosin durch Carboxypolypeptidase gespalten. Unter diesen Peptiden stellt das tyrosinhaltige Pentapeptid bereits ein spezifisches Substrat der Carboxypolypeptidase dar, es wird von Aminopolypeptidase nicht mehr zerlegt, während Tri- und Tetrapeptid auch durch dieses Enzym gespalten werden. Ihre Spaltbarkeit durch Carboxy- und Aminopolypeptidase zugleich beruht indessen nicht auf einer Übereinstimmung der beiden Enzymwirkungen. Es hat sich vielmehr gezeigt, daß die Hydrolyse durch Carboxypolypeptidase von der Carboxylgruppe der Peptide her einsetzt und nach der Abspaltung des endständigen Tyrosins zum Stillstande kommt, während die Spaltung durch Aminopolypeptidase von der Seite der freien Aminogruppe her erfolgt. Von ähnlichem Einfluß auf die Spaltbarkeit von Polypeptiden durch Carboxypolypeptidase findet man nach E. Abderhalden<sup>39</sup>) außer dem Tyrosin noch eine Reihe anderer Aminosäurereste, beispielsweise Cystin und Tryptophan.

Tabelle 3.  
Spezifische Spaltbarkeit von Peptiden.  
(Angaben bedeuten: — = keine, + = positive Hydrolyse)

Peptid	Dipeptid- ase	Amino- poly- peptid- ase	Carboxy- poly- peptid- ase
Dipeptide:			
Glycyl-glycin . . . . .	+	—	—
Leucyl-glycin . . . . .	+	—	—
Glycyl-tyrosin . . . . .	+	—	—
Histidyl-glycin . . . . .	+	—	—
Phenylalanyl-arginin . . . . .	+	—	+
Glutamyl-tyrosin . . . . .	+	—	+
Polypeptide:			
Leucyl-triglycin . . . . .	—	+	—
Leucyl-triglycyl-leucyl-triglycyl-leucyl-triglycyl-leucyl-pentaglycin . . . . .	—	+	—
Leucyl-glycyl-tyrosin . . . . .	—	+	+
Leucyl-diglycyl-tyrosin . . . . .	—	+	+
Leucyl-triglycyl-tyrosin . . . . .	—	—	+

Die Frage, die durch die angeführten Befunde aufgeworfen wird, auf welche tieferen Ursachen nämlich die Spezifitätsunterschiede der einzelnen proteolytischen Enzyme zurückzuführen sind, ist heute der Beantwortung zugänglich. Man verdankt ihre Lösung den Untersuchungen über die spezifische Spaltbarkeit von Peptidderivaten. Hier hat sich die zuerst von L. Michaelis<sup>40</sup>) vertretene und durch H. v. Euler<sup>41</sup>) zur sogenannten „Zwei-Affinitätstheorie“ ausgestaltete Vorstellung als Arbeitshypothese bewährt, wonach man bei jeder enzymatischen Reaktion zwei Phasen, die Bildung und den Zerfall einer intermediären Enzym-Substrat-Verbindung, zu unterscheiden habe. Für diese beiden Teilvergänge werden zwei verschiedene aktive Gruppen des Enzymmoleküls verantwortlich gemacht; an zwei verschiedenen Stellen soll sich also die Reaktion zwischen Enzym und Substrat vollziehen, damit dessen Spaltung erfolgt. Man könnte danach, den Gedankengängen der Ehrlich-

<sup>39</sup>) Naturwiss. 16, 396 [1928].

<sup>40</sup>) L. Michaelis u. M. L. Menten, Biochem. Ztschr. 49, 333 [1913].

<sup>41</sup>) H. v. Euler u. K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. 133, 279 [1923/24].

schen Seitenkettentheorie folgend<sup>42)</sup>), zwischen haptophoren und zwischen funktionellen Gruppen im Enzym und im Substrat unterscheiden. In der Tat hat sich ergeben, daß die Spaltbarkeit eines Peptids durch eine der Peptidasen an bestimmte strukturelle Voraussetzungen gebunden ist. Am Beispiel dieser Enzyme ist die Frage nach der Natur der enzymbindenden Gruppen in den Substraten zuerst gelöst worden. So hat sich ergeben, daß die Bindung der Dipeptidase und ebenso die der Aminopolypeptidase an der freien Aminogruppe der Peptide erfolgt. Für die Anlagerung dieser Enzyme ist nämlich die Gegenwart einer freien NH<sub>2</sub>-Gruppe in den Substraten unbedingt erforderlich, nach ihrer Substitution, z. B. durch Säurereste, unterbleibt die enzymatische Einwirkung; eine freie Carboxylgruppe findet man dagegen entbehrlich für die enzymatische Hydrolyse<sup>43)</sup>. Die Wirkung von Dipeptidase und von Aminopolypeptidase äußert sich daher in der Abspaltung des die freie Aminogruppe tragenden Aminosäurerestes. Der Spezifitätsunterschied der beiden Enzyme untereinander, für welchen die Länge der Peptidkette maßgebend ist, scheint auf der Verschiedenheit im sauren Charakter von Dipeptiden einerseits und Polypeptiden andererseits zu beruhen, welcher auf die Bildung der Enzym-Peptid-Verbindung von Einfluß ist<sup>44)</sup>.

Die Bindung der Carboxypolypeptidase an ihre Substrate findet man von anderer Art: sie erfolgt an der freien Carboxylgruppe<sup>45)</sup>. Die Wirkung dieses Enzyms 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 Aminopolypeptidase nur die sterische Konfiguration der die freie Aminogruppe tragenden Aminosäure, für die der Carboxypolypeptidase dagegen nur die räumliche Anordnung der Atome an der Carboxylgruppe maßgebend ist<sup>46)</sup>. So erfolgt die Hydrolyse beispielsweise des racemischen Tripeptids d,l-Leucyl-glycyl-l-tyrosin nur durch Aminopolypeptidase asymmetrisch, unter Beschränkung auf die den l-Leucinrest enthaltende Komponente, durch Carboxypolypeptidase dagegen symmetrisch, 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 Aminopolypeptidase die NH<sub>2</sub>-Gruppe, für die der Carboxypolypeptidase das Carboxyl. Zur Frage nach der Natur der an der Verankerung der Enzyme beteiligten Gruppen in den Enzymen selbst hat man bis heute nur für den Fall der Dipeptidase Anhaltspunkte gewonnen. In Überein-

<sup>42)</sup> P. Ehrlich, Klin. Jahrbuch 6, 299 [1897]; siehe dazu E. Waldschmidt-Leitz, Ztschr. angew. Chem. 43, 377 [1930].

<sup>43)</sup> 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. Schäffner, Ber. Dtsch. chem. Ges. 60, 359 [1926/27]; E. Waldschmidt-Leitz u. W. Klein, ebenda 61, 640 [1928].

<sup>44)</sup> Vgl. A. K. Balls u. Fr. Köhler, ebenda 64, 294, und zwar S. 297 [1930/31].

<sup>45)</sup> E. Waldschmidt-Leitz u. W. Klein, a. a. O.; E. Waldschmidt-Leitz, W. Klein u. A. Schäffner, a. a. O.

<sup>46)</sup> E. Waldschmidt-Leitz u. H. Schlatter, Naturwiss. 16, 1026 [1928]; E. Abderhalden, ebenda 17, 293, und zwar S. 294 [1929].

stimmung mit einer zuerst von H. v. Euler und K. Josephson<sup>47)</sup> aus Hemmungsversuchen abgeleiteten Vorstellung scheint die haptophore Gruppe der Dipeptidase eine Aldehyd- oder Ketogruppe zu sein<sup>48)</sup>, ihre Vereinigung mit Dipeptid vollzöge sich also unter Bildung einer Schiffschen Base.

Für die Verankerung der Carboxypolypeptidase an das Carboxyl der Peptide andererseits hat man einen bestimmten Ionisationsgrad der Carboxylgruppe verantwortlich gemacht, den bereits besprochenen Einfluß besonderer Aminosäurereste auf die Spaltbarkeit von Peptiden durch dieses Enzym so gedeutet<sup>49)</sup>. Für diese Auffassung spricht die Beobachtung, daß man unabhängig von der Natur der Peptidbausteine die Anlagerung der Carboxypolypeptidase durch eine Acylierung der freien Aminogruppe in den Peptiden bewirken kann<sup>50)</sup>: so wird z. B. Benzoyl-glycyl-glycin durch Carboxypolypeptidase zerlegt, das freie Dipeptid Glycyl-glycin dagegen nicht. Die mit der Acylierung verbundene Verstärkung der elektronegativen Natur des Carboxyls ermöglicht in diesem Falle erst die Bindung des Enzyms. Die Reaktion der Carboxypolypeptidase mit ihren Substraten scheint eine Ionenreaktion<sup>51)</sup>, die haptophore Gruppe dieses Enzyms von basischem Charakter zu sein.

Mit der Verankerung des Enzyms an sein Substrat, mit der Bildung einer Enzym-Substrat-Verbindung, 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>52)</sup>. Für den Mechanismus dieses Zerfalls liegen verschiedene Erklärungen vor. So wird in neueren Untersuchungen von E. Abderhalden<sup>53)</sup> für das Beispiel der Dipeptidase die Zerfallstendenz der Peptidase-Peptid-Verbindung auf eine infolge der Verankerung des Enzyms herabgesetzte Stabilität der Peptidbindung bei der optimalen Wasserstoffzahl, also auf eine Wirkung der Wasserstoffionen zurückgeführt. Diese Erklärung, die aus dem Verhalten acylierter Peptide z. B. gegenüber Lauge abgeleitet ist, erscheint indessen unzureichend; der Einfluß der Wasserstoffionen auf die Dipeptidasewirkung betrifft nur das Gleichgewicht zwischen freiem und an Substrat gebundenem Enzym, nicht die Zerfallsneigung der Enzym-Substrat-Verbindung<sup>54)</sup>.

Dem Wesen der Peptidasewirkung scheint die Annahme von mehr als nur einer Kupplungsreaktion zwischen Enzym und Substrat näherzukommen, wie sie der Eulerischen sogenannten „Zwei-Affinitäts-Theorie“ entspricht. So lehren die Erfahrungen über die spezifische Spaltbarkeit von Dipeptiden durch Dipeptidase, daß nicht nur die Konfiguration an der freien Amino-

<sup>47)</sup> A. a. O.

<sup>48)</sup> E. Waldschmidt-Leitz u. G. Rauchalles, Ber. Dtsch. chem. Ges. 61, 645 [1928]; E. Waldschmidt-Leitz u. G. v. Schuckmann, Ztschr. physiol. Chem. 184, 56 [1929]; vgl. dazu H. v. Euler u. E. Brunius, LIEBIGS Ann. 467, 201, und zwar S. 209 [1928].

<sup>49)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, W. Klein u. A. Schäffner, Ber. Dtsch. chem. Ges. 61, 2092 [1928].

<sup>50)</sup> Nach noch unveröffentlichten Versuchen von E. Waldschmidt-Leitz u. E. Blum.

<sup>51)</sup> L. Michaelis u. M. L. Menten, Biochem. Ztschr. 49, 333 [1913].

<sup>52)</sup> Siehe z. B. Naturwiss. 17, 293, und zwar S. 294 [1929]; 18, 429 [1930].

<sup>53)</sup> E. Waldschmidt-Leitz u. G. v. Schuckmann, a. a. O.

gruppe der Peptide, an welcher die primäre Verankerung des Enzyms erfolgt, sondern auch die der zweiten Aminosäurekomponente die Spezifität bestimmt: in dem Racemate Glycyl-d,L-alanin beispielsweise wird nur die das natürlich vorkommende d-Alanin enthaltende Komponente enzymatisch zerlegt. Die Aufklärung der Frage nach der zweiten, der an der Zerfallsreaktion der Peptidase-Peptid-Verbindung beteiligten Atomgruppe in den Peptiden ist durch Untersuchungen von A. K. Balls und Fr. Köhler<sup>64)</sup> wesentlich gefördert worden. Aus diesen geht hervor, daß als die zweite Haftstelle nicht nur der Dipeptidase, auch der Aminopolypeptidase und der Carboxypolypeptidase die NH-Gruppe der zu spaltenden Peptidbindung selbst anzusehen ist. Diese Feststellung wird durch Versuche über die enzymatische Spaltbarkeit einer Reihe substituierter Glycyl-aniline, sogenannte Anilinpeptide, sowie durch Hemmungsversuche belegt. Als gemeinsames Prinzip der Wirkungsweise aller Peptidasen ergibt sich danach ihre Affinität zur Iminogruppe der Peptidbindung, als ihr unterscheidendes Merkmal dagegen die Verschiedenheit der haptophoren Atomgruppe im Substrat, an welcher die primäre Verankerung des Enzyms eintritt. Für das Beispiel der Dipeptidase speziell erscheint sichergestellt, daß für den Zerfall der Dipeptidase-Dipeptid-Verbindung ein gewisser elektronegativer Charakter der Iminogruppe erforderlich ist. Diese Erfahrungen finden eine wertvolle Bestätigung durch Beobachtungen für die außerordentlich gesteigerte Zerfallstendenz der Peptidbindung nach Substitution ihrer NH-Gruppe durch Säurereste<sup>65)</sup>; an der Iminogruppe acetyliertes Dipeptid zerfällt danach schon in schwach alkalischem, wässrigem Milieu unter Aufsprengung der Peptidbindung in seine Bausteine.

In den Untersuchungen über den Mechanismus der Peptidasewirkung hat sich somit die „Zwei-Affinitäts-Theorie“ als wertvolle Arbeitshypothese bewährt. Sie gestattet eine Erklärung der Enzymwirkungen als einfacher chemischer Reaktionen zwischen bestimmten chemisch aktiven Gruppen in Enzym und Substrat, deren mit der Natur der Enzyme und der Substratbausteine wechselnde chemische, z. B. elektrochemische Affinitäten für die ausgeprägte Spezifität der Enzyme verantwortlich sind. Die Vorstellungen über das Wesen der Enzymwirkung erscheinen damit für das vorliegende Beispiel gegenüber der älteren Annahme vom Wirken reiner Oberflächenkräfte wesentlich vertieft, die enzymatischen Reaktionen, ähnlich wie das Adsorptionsverhalten der Enzyme, auf die Wirkung spezifischer chemischer Valenzen zurückgeführt.

Die vorstehenden Ausführungen über Hydrolysen im Organismus erheben keinerlei Anspruch auf Vollständigkeit. Ich habe mir vielmehr erlaubt, einige Fragen, die die Forschung über das Wesen enzymatischer Hydrolysen und über die Zusammensetzung enzymatischer Reaktionssysteme heute stellt, besonders herauszugreifen und sie an Beispielen zu behandeln, die meinem eigenen Arbeitsgebiete entstammen. Zu diesen Fragen gehört als eine der wichtigsten auch die nach der Bedeutung und nach der Wirkungsweise natürlicher enzymatischer Aktivatoren. Hier hält man heute am weitesten in der Untersuchung der Aktivierung der intrazellulären Proteolyse. Der intrazelluläre Eiweiß-

abbau z. B. in den tierischen Organen und Geweben wird eingeleitet durch das Kathepsin nach seiner Aktivierung durch einen natürlichen Aktivator aus den Zellen, Zookinase<sup>66)</sup>; seiner Funktion nach ist dieser Aktivator mit einem in pflanzlichen Zellen aufgefundenen, der Phytokinase<sup>67)</sup>, vergleichbar. Die chemische Natur dieser Aktivatoren ist aufgeklärt worden; Zookinase wie Phytokinase sind identisch mit Glutathion, dem Tripeptid Glutamyl-cysteinyl-glycin<sup>68)</sup>.

Glutathion aktiviert die Proteolyse nach den Untersuchungen von W. Graßmann<sup>69)</sup> nur in seiner reduzierten Form, in der oxydierten, der Disulfidform, findet man es indifferent. Hieraus ergibt sich seine besondere physiologische Bedeutung, welche in der Kopplung von Atmung und von intrazellulärer Proteolyse zum Ausdruck kommt; es besteht also ein enger Zusammenhang zwischen dem Oxydo-Reduktions-Potential in den Zellen und ihrem Eiweißumsatz<sup>60)</sup>. Diese Feststellungen sind für die Frage nach der Ursache der Autolyse in absterbenden Zellen, auch in den bösartigen Geschwülsten<sup>61)</sup>, von besonderer Bedeutung. Denn die Unterbindung der Sauerstoffzufuhr in den absterbenden Geweben hat die Anhäufung von Glutathion in seiner reduzierten Form, eine Verschiebung des natürlichen Gleichgewichtes zwischen der Disulfid- und der Sulfhydrylform des Peptids zugunsten der letzteren zur Folge. Diese Anhäufung aber bedingt automatisch das Einsetzen der Autolyse mit der Aktivierung des Kathepsins.

So sind zwischen oxydativen und zwischen hydrolytischen Vorgängen im Organismus kausale Beziehungen ermittelt. Darüber hinaus wird man die Möglichkeit einer Steuerung des intrazellulären Eiweißumsatzes durch das Oxydo-Reduktions-Potential einerseits in der Richtung der Hydrolyse, andererseits in der der Synthese in Betracht ziehen müssen. Es ist nicht sicher und noch nicht geprüft, ob Sulfhydrylverbindungen, wie das Glutathion, den Eiweißumsatz durch Kathepsin in beiden Richtungen, auch in der synthetischen, zu aktivieren vermögen. Der Gedanke, daß die Richtung enzymatischer Prozesse nicht nur durch Konzentrationsänderungen der beteiligten Stoffe, sondern auch durch besondere Aktivatoren verändert werden könnte, erscheint mir nicht nur für die Frage der intrazellulären Proteolyse Beachtung zu verdienen. Man sollte prüfen, ob nicht in Fällen wie dem physiologischen Umsatz der Zucker-Phosphorsäureester, in welchem man zu der Annahme eines hydrolyzierenden neben einem besonderen synthetisierenden Enzyme geführt wird, das Überwiegen der hydrolytischen oder der synthetischen Reaktion durch die Mitwirkung reaktionslenkender Hilfsstoffe erklärt werden kann.

<sup>64)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, J. J. Bek u. E. Blum, Ztschr. physiol. Chem. 188, 17, und zwar S. 20 [1929/30].

<sup>65)</sup> O. Ambros u. A. Harteneck, ebenda 181, 24 [1928/29].

<sup>66)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, A. Purr u. A. K. Balls, Naturwiss. 18, 644 [1930]; W. Graßmann, O. v. Schoenebeck u. H. Eibeler, Ztschr. physiol. Chem. 194, 124 [1930/31].

<sup>67)</sup> Vgl. W. Graßmann, H. Dyckerhoff u. O. v. Schoenebeck, ebenda 186, 183 [1929/30].

<sup>68)</sup> Vgl. dazu E. Waldschmidt-Leitz, J. J. Bek u. J. Kahn, Naturwiss. 17, 85 [1928/29].

<sup>69)</sup> Vgl. dazu E. Waldschmidt-Leitz u. A. Schäffner, ebenda 18, 280 [1930].

<sup>64)</sup> Ber. Dtsch. chem. Ges. 64, 34 u. 294 [1930/31].

<sup>65)</sup> Zufolge M. Bergmann, V. du Vigneaud u. L. Zervas, ebenda 62, 1909 [1929].