

## Fortschritte der physiologischen Chemie seit 1929.

## II. Enzyme\*).

## Proteasen.

Von Prof. Dr. E. WALDSCHMIDT-LEITZ,  
Deutsche Technische Hochschule, Prag.

(Eingeg. 12. Mai 1934.)

Inhalt: Proteinasen (Pepsin, Lab, Trypsin, Protaminase, Kathepsin, Papain, Thrombin), Peptidasen (Dipeptidasen, Aminopolypeptidasen, Dehydriodipeptidasen, Polypeptidasen).

Unter den am Eiweißabbau beteiligten Enzymen unterscheidet man bekanntlich die beiden großen Gruppen der Proteinasen, spezifisch für die Spaltung der eigentlichen Proteine und ihrer höhermolekularen Abbauprodukte, und der Peptidasen, deren Wirkung man nur gegenüber niedermolekularen Peptiden wahrnimmt; Untergruppen der letzteren bilden beispielsweise die Aminopolypeptidasen, Carboxy-polypeptidasen und Dipeptidasen, während man die Proteinasen je nach ihrer Wirkungsweise in Pepsinasen, Tryptasen und Papainasen unterteilt.

## Proteinasen.

Die Erforschung der Proteinasen hat durch Versuche zur Reindarstellung von Pepsin und Trypsin besondere Förderung erfahren. *Northrop*<sup>1)</sup> hat über die Darstellung von kristallisiertem, aktivem Pepsin auch aus inaktiven, denaturierten Pepsinpräparaten berichtet; sie gelingt durch Einwirkung von Säure auf die mit Alkali denaturierten Präparate. Pepsin selbst wird demnach als ein Protein beschrieben; die Zusammensetzung der Präparate des kristallisierten Pepsins ist durch einen besonders niedrigen Gehalt an basischen Aminosäuren ausgezeichnet<sup>2)</sup>. Die Einheitlichkeit dieser kristallisierten Enzympräparate ist indessen bezweifelt worden; so läßt sich kristallisiertes Pepsin durch Adsorption mit Tonerde in Fraktionen zerlegen, deren eine durch eine besondere verflüssigende, deren andere durch eine besondere hydrolysierende Wirkung gegenüber Gelatine gekennzeichnet ist<sup>3)</sup>; auch *Northrop*<sup>4)</sup> hat die Gegenwart einer gelatineverflüssigenden Komponente in rohen Pepsinpräparaten beschrieben. Die experimentell gestützten Einwände<sup>5)</sup>, daß es gelinge, aus Lösungen kristallisierten Pepsins durch Adsorption an kristallisiertes Pflanzenglobulin den aktiven Anteil des Pepsins allein aufzunehmen, unter Zurücklassung des Pepsineiweißes, sind von *Northrop*<sup>6)</sup> zurückgewiesen worden mit dem Hinweis, daß es sich hierbei um eine Adsorption des gesamten Pepsin-Eiweiß-Moleküls an das Pflanzeneiweiß

handle<sup>7)</sup>; der Anspruch, das kristallisierte Pepsineiweiß stelle das reine Enzym dar, wird somit weiterhin aufrechterhalten. Er erscheint auch gestützt durch das Verhalten bei der Denaturierung mittels  $\beta$ - und  $\gamma$ -Strahlen und mit ultraviolettem Licht, bei welcher Proteindenaturierung und Aktivitätsverlust in allen Fällen parallel gehen<sup>8)</sup>. Bemerkenswert erscheinen in diesem Zusammenhang die Beobachtungen von *Martin*<sup>9)</sup>, nach welchen aus menschlichem Magensaft sich ein enzymatisch inaktives kristallisiertes Gastro-globulin isolieren läßt, das bezüglich seiner Kristallform und der Lage des isoelektrischen Punktes große Ähnlichkeit mit dem kristallisierten Pepsin zeigt, vielleicht also die enzymfreie Komponente desselben darstellt.

Gegenüber der *Northropschen* Auffassung von der Eiweißnatur des Pepsins weisen *Willstätter* und *Rohdewald*<sup>10)</sup> auf die Tatsache hin, daß es gelingt, auf anderem Wege eiweißfreie Pepsinpräparate darzustellen; ein Teil des Pepsins findet sich allerdings in der Magenschleimhaut in unlöslicher Form, vielleicht an Eiweiß gebunden, als Desmo-pepsin. Auch wird in der Schleimhaut das Vorkommen eines unwirksamen Pro-pepsins, einer Vorstufe des Enzyms, beschrieben<sup>11)</sup>, dessen Aktivierung durch Wasserstoffionen erfolgt, bei  $pH = 5$  mit messbarer, schon bei  $pH = 3$  mit unmeßbar großer Geschwindigkeit.

Andere Untersuchungen beschäftigen sich mit den Produkten der peptischen Aufspaltung von Eiweiß. So wird die Eigenart der peptischen Verdauung von Casein, welche durch einen anfänglichen Viscositätsanstieg gekennzeichnet ist, mit der Bildung eines schwerlöslichen, phosphorreichen Zwischenproduktes erklärt<sup>12)</sup>; die mitogenetische<sup>13)</sup> wie die tyndallmetrische Analyse der Pepsinwirkung<sup>14)</sup> ergeben die Auflösung von Peptidbindungen durch das Enzym.

Die Unterscheidung des eiweißspaltenden Pepsins von dem nur Milch koagulierenden Lab hat weitere Fortschritte gemacht. *Tauber* und *Kleiner*<sup>15)</sup> berichten über

<sup>1)</sup> Vgl. *J. B. Sumner*, Proc. Soc. Exp. Biol. and Medicine 31, 204 [1933].

<sup>2)</sup> *J. H. Northrop*, Journ. gen. Physiol. 17, 359 [1933/34].

<sup>3)</sup> *L. Martin*, Journ. biol. Chemistry 102, 113, 131 [1933].

<sup>4)</sup> *R. Willstätter* u. *M. Rohdewald*, Ztschr. physiol. Chem. 208, 258 [1932].

<sup>5)</sup> *R. Ege* u. *P. Menck-Thygesen*, Biochem. Ztschr. 264, 13 [1933].

<sup>6)</sup> *H. Holter*, *K. Linderström-Lang* u. *J. B. Funder*, Ztschr. physiol. Chem. 206, 85 [1932].

<sup>7)</sup> *E. Billig*, *N. Kannegießer* u. *L. Solowjew*, ebenda 210, 220 [1932].

<sup>8)</sup> *E. Herzfeld*, Biochem. Ztschr. 251, 384 [1932].

<sup>9)</sup> *H. Tauber* u. *I. S. Kleiner*, Journ. biol. Chemistry 96, 745, 755 [1932]; Ztschr. physiol. Chem. 220, 205 [1933].

die Darstellung pepsinfreien Labs durch fraktionierte Alkoholfällung von Extrakten aus Kalbsmagen; auch das Lab kommt hier in Form einer unwirksamen Vörstufe vor, diese wird aber schon bei einer geringeren Wasserstoffionenkonzentration in wirksames Enzym übergeführt als das Pro-pepsin. Die Natur der Labwirkung ist noch nicht näher zu kennzeichnen, es liegt ihr indessen sicherlich eine chemische Veränderung des Caseins zugrunde<sup>18</sup>). Nach *Tauber* und *Kleiner*<sup>17</sup>) stellt die durch Trypsin bewirkte Milchgerinnung nur die erste Stufe des hydrolytischen Caseinabbaus dar. Echtes, vom Pepsin abtrennbares Lab findet man indessen nur im Magensaft des Kalbes; bei allen anderen Säugetieren wird gleichwie bei erwachsenen Organismen auch im Säuglingsalter keine spezifische labende Enzymkomponente beobachtet<sup>18</sup>).

Die Beschreibung von Lyo- und Desmo-formen der Enzyme, von löslichen und an unlösliche Zellbestandteile gebundenen, ist auch auf Trypsin ausgedehnt worden<sup>19</sup>). So wird in den farblosen Blutkörperchen und im Pankreas ein glycerinlösliches und ein glycerinunlösliches Trypsin unterschieden; pankreatisches Desmo-trypsin ist durch Enterokinase nicht mehr aktivierbar. Der Vergleich dieser Lyo- und Desmo-formen erscheint bedeutsam für die Frage nach der Eiweißnatur der Enzyme. Die bisherigen Erfahrungen sprechen dafür, daß die enzymatisch aktiven Gruppen an einen veränderlichen kolloiden Träger gebunden sind, der auch dem Abbau unterliegen kann, und daß man daneben lose assoziierte Begleitstoffe, „Schlepper“ des Enzyms, zu unterscheiden hat.

Ein kristallisiertes Trypsinpräparat von Eiweißnatur und von hoher und konstanter Aktivität haben *Northrop* und *Kunitz*<sup>20</sup>) beschrieben; sein Molekulargewicht wird zu 34 000 angegeben. Das Präparat wirkt blutgerinnend, aber nur in geringem Maße milchkoagulierend, durch Enterokinase ist es nicht mehr aktivierbar; das Ausmaß seiner Wirkung auf Eiweißkörper ist geringer als das der höheren Trypsinpräparate. Bei längerem Erhitzen der Enzymlösungen sowie bei der Einwirkung von Pepsin oder Alkali gehen Verlust an Aktivität und Veränderung des Proteins parallel; bemerkenswerterweise ist bei kurzem Erhitzen auf 100° und raschem Wiederabkühlen der Lösung keine Aktivitätsabnahme, auch keine Denaturierung zu beobachten. Zwischen der nativen, enzymatisch aktiven und der inaktiven, denaturierten Form des Trypsins besteht in Lösung ein Gleichgewicht, welches von der Säure- bzw. der Alkali- bzw. der Alkoholkonzentration und der Temperatur abhängig gefunden wird<sup>21</sup>). Aus diesen Erfahrungen wird geschlossen, daß die tryptische Aktivität der Präparate eine Eigenschaft des nativen Proteinmoleküls darstellt. Andere Erfahrungen deuten indessen darauf hin, daß die aktive Komponente der kristallisierten Trypsinpräparate unter gewissen Bedingungen, nämlich durch Verdauung mit Pepsin in monomolekularer Schicht und bei Gegenwart von Eiweiß als Substrat, auch von ihrem Eiweißträger abge-

<sup>16</sup>) *H. Holter*, Biochem. Ztschr. **255**, 160 [1932].

<sup>17</sup>) *H. Tauber* u. *I. S. Kleiner*, Journ. biol. Chemistry **104**, 267 [1933/34].

<sup>18</sup>) *H. Holter* u. *B. Andersen*, Biochem. Ztschr. **269**, 285 [1934].

<sup>19</sup>) *R. Willstätter* u. *M. Rohdewald*, Ztschr. physiol. Chem. **204**, 181 [1931/32]; **218**, 77 [1933].

<sup>20</sup>) *J. H. Northrop* u. *M. Kunitz*, Journ. gen. Physiol. **16**, 267, 295, 313, 323, 339 [1932].

<sup>21</sup>) *M. L. Anson* u. *A. E. Mirsky*, ebenda **17**, 393 [1933/34].

lässt ihre Wirksamkeit beizubehalten vermag<sup>22</sup>). *Kleiner* und *Tauber*<sup>23</sup>) konnten zudem nach langdauernder Autolyse von Pankreas ein eiweißfreies Trypsinpräparat erhalten von der nämlichen Aktivität wie kristallisiertes Trypsin; danach wäre das Trypsin selbst kein Protein.

Die lange bekannte Aktivierung des Trypsins durch Enterokinase besteht nach *Dyckerhoff*<sup>24</sup>) nicht eigentlich in einer Aktivierung des Enzyms, sondern in der Ausschaltung des Enzym begleitender Hemmungskörper durch die Kinase; in gewissen Fällen erfolgt Eiweißspaltung durch Trypsin auch in Abwesenheit von Enterokinase.

In der Pankreasdrüse, wahrscheinlich auch in ihren Sekreten, ist neben dem Trypsin ein zweites zu den Proteinases zu rechnendes Enzym, die **Protaminase**, vorhanden<sup>25</sup>). Dieses Enzym zeigt mit dem Trypsin große Ähnlichkeit in der Abhängigkeit seiner Wirkung vom pH und in seinem Adsorptionsverhalten; im Gegensatz zu jenem wird es indessen durch Enterokinase nicht aktiviert, seine Wirkung wird durch Albumin nicht gehemmt. Die Wirkung der Protaminase beschränkt sich auf die Spaltung an basischen Bausteinen reicher, aber nicht hochmolekularer Proteine und Proteinabbauprodukte, beispielsweise der Protamine aus Fischsperma; sie betrifft hier die Abspaltung basischer Aminosäuren, beispielsweise von Arginin, vom Carboxylende der Substrate. Die Abtrennung des Enzyms von Trypsin gelingt durch Ausfällung des letzteren nach Zusatz von Eieralbumin mittels Aceton<sup>26</sup>).

Die Existenz einer besonderen „Keratinase“ im tierischen Verdauungstrakt, zur Spaltung der Hornsubstanz befähigt, die aus den Befunden an Kleidermotten<sup>27</sup>) und an Raubvögeln<sup>28</sup>) gefolgt war, erscheint noch fraglich<sup>29</sup>); in den Larven von *Lucilia sericata* andererseits ist ein kollagenspaltendes Enzym beschrieben worden<sup>30</sup>).

Auch bei der tierischen intrazellulären Proteinase, dem **Kathepsin**, hat man eine Desmo- neben einer Lyo-form zu unterscheiden<sup>31</sup>); daneben beschreibt *Hedin*<sup>32</sup>) in der Milz ein besonderes, Eiweiß synthetisierendes Enzym, welches daraus von der sogen.  $\alpha$ -Protease mittels fraktionierter Extraktion getrennt isoliert werden kann. Den Mechanismus des Eiweißabbaus durch **Papain**, die dem Kathepsin entsprechende pflanzliche Proteinase, haben *Svedberg* und *Eriksson*<sup>33</sup>) am Eieralbumin unter

<sup>22</sup>) *J. H. Schulman* u. *E. K. Rideal*, Biochemical Journ. **27**, 1581 [1933].

<sup>23</sup>) *I. S. Kleiner* u. *H. Tauber*, Journ. biol. Chemistry **104**, 267 [1933/34].

<sup>24</sup>) *H. Dyckerhoff*, *H. Miehler* u. *V. Tudszen*, Biochem. Ztschr. **268**, 17 [1933/34].

<sup>25</sup>) *E. Waldschmidt-Leitz*, *Fr. Ziegler*, *A. Schäffner* u. *L. Weil*, Ztschr. physiol. Chem. **197**, 219 [1931].

<sup>26</sup>) *E. Waldschmidt-Leitz* u. *E. Kofranyi*, ebenda **222**, 148 [1933].

<sup>27</sup>) *F. N. Schulz*, Biochem. Ztschr. **156**, 124 [1925].

<sup>28</sup>) *R. Stankovic*, *V. Arnovljevic* u. *P. Matavulj*, Ztschr. physiol. Chem. **181**, 291 [1929].

<sup>29</sup>) *E. Mangold* u. *J. Dubiski*, Wiss. Archiv f. Landwirtschaft **4**, 200 [1930].

<sup>30</sup>) *R. P. Hobson*, Biochemical Journ. **25**, 1458 [1931].

<sup>31</sup>) *R. Willstätter* u. *M. Rohdewald*, Ztschr. physiol. Chem. **208**, 258 [1932].

<sup>32</sup>) *S. G. Hedin*, ebenda **207**, 213 [1932].

<sup>33</sup>) *Th. Svedberg* u. *I. B. Eriksson*, Biochem. Ztschr. **258**, 1 [1932/33].

Anwendung der Ultrazentrifuge verfolgt; er scheint dann so vor sich zu gehen, daß das Eiweißmolekül unter Abspaltung niedermolekularer Bruchstücke allmählich verkleinert wird.

Der schon früher geführte Nachweis geringer Mengen einer trypsinähnlichen Proteinase von alkalischem Reaktionsoptimum in dem Sekrete der Parotisdrüse<sup>34)</sup> wurde bestätigt<sup>35)</sup>; das Enzym soll abweichend von früheren Ergebnissen frei im Parotissekret gelöst und nicht an Zellreste gebunden sein. Speichel der Sublingualis- und der Submaxillarisdrüse oder gemischter Mundspeichel weisen dagegen keine tryptische Wirkung auf, nur die Parotisdrüse erscheint der Pankreasdrüse ähnlich. Die Beschreibung einer trypsinartigen, aber durch Enterokinase nicht aktivierbaren Proteinase in Leukocyten neben einem Kathepsin<sup>36)</sup> endlich ist ebenfalls bestätigt worden<sup>37)</sup>; das Enzym scheint vorwiegend den polymorphkernigen Zellen anzugehören. Nach Kleinmann<sup>38)</sup> läßt sich eine Trennung von Trypsin und Kathepsin aus Leukocyten durchführen, während Lymphocyten nur die letztere Proteinase enthalten; die weitere Angabe, daß das Kathepsin nur bei der Spaltung von Gelatine durch Sulphydrylverbindungen aktiviert werde, ist indessen widerlegt worden<sup>39)</sup>.

Bei der Untersuchung der intrazellulär wirkenden Proteinasen des Tier- und Pflanzenreichs, die dem Kathepsintypus angehören, hat man der Frage ihrer Aktivierung besondere Beachtung geschenkt. Die Feststellung, daß diese Enzyme nicht nur durch Blausäure und Schwefelwasserstoff<sup>40)</sup>, sondern auch durch organische Sulphydrylverbindungen, Cystein oder SH-Glutathion, spezifisch aktiviert werden<sup>41)</sup>, ist ergänzt worden durch die Identifizierung des natürlichen Kathepsinaktivators mit SH-Glutathion und seine Isolierung in kristallisierter Form und in quantitativer Ausbeute aus Leber<sup>42)</sup>. Die Vorstellung, daß ein gesteigerter Gehalt an SH-Glutathion, eine gesteigerte katheptische Aktivität, für die Gewebe maligner Geschwülste charakteristisch sei<sup>43)</sup>, hat indessen eine Bestätigung bisher nicht erfahren; diese scheinen hinsichtlich der proteolytischen Aktivität eine Sonderstellung nicht einzunehmen<sup>44)</sup>. In den Tumoren, bei herabgesetzter Atmung, findet man weniger Kathepsin als in anderen Organen carcinomatöser Tiere<sup>45)</sup>,

<sup>34)</sup> R. Willstätter, E. Bamann u. M. Rohdewald, Ztschr. physiol. Chem. 186, 85 [1929].

<sup>35)</sup> O. Voß, ebenda 197, 42 [1931].

<sup>36)</sup> R. Willstätter, E. Bamann u. M. Rohdewald, ebenda 180, 127 [1928/29]; 185, 267 [1929]; 188, 107 [1930].

<sup>37)</sup> E. Husfeldt, ebenda 194, 137 [1930/31]. K. G. Stern, ebenda 199, 169 [1931].

<sup>38)</sup> H. Kleinmann u. G. Scharr, Biochem. Ztschr. 251, 275; 252, 145 [1932].

<sup>39)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, A. Scharikova u. A. Schäffner, Ztschr. physiol. Chem. 214, 75 [1932/33].

<sup>40)</sup> R. Willstätter u. W. Graßmann, ebenda 138, 184 [1924]. E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, J. J. Bek u. E. Blum, ebenda 188, 17 [1929/30].

<sup>41)</sup> W. Graßmann, O. v. Schönebeck u. H. Eibeler, ebenda 194, 124 [1930/31].

<sup>42)</sup> E. Waldschmidt-Leitz u. A. Purr, ebenda 198, 260 [1931].

<sup>43)</sup> E. Waldschmidt-Leitz u. A. Schäffner, Naturwiss. 18, 280 [1930].

<sup>44)</sup> H. A. Krebs, Biochem. Ztschr. 238, 174 [1931]. H. Kleinmann u. F. Werr, ebenda 241, 108, 140, 181 [1931]. P. Rona u. H. Kleinmann, ebenda 241, 283, 316 [1931].

<sup>45)</sup> E. Maschmann u. E. Helmert, Ztschr. physiol. Chem. 218, 142 [1933]. P. Rondoni, Biochemical Journ. 26, 1477 [1932].

auch der Aktivierungsgrad des Enzyms ist dort geringer, desgleichen der Gehalt an reduziertem Glutathion<sup>46)</sup>; ein einfacher Zusammenhang zwischen Atmung und Eiweißumsatz in tierischen Organen und in Tumoren sollte danach nicht bestehen. Die Annahme, daß die hemmende Wirkung von Jodessigsäure auf die Organproteolyse lediglich auf eine oxydative Ausschaltung der Sulphydrylverbindungen zurückzuführen sei<sup>47)</sup>, ist berichtet worden<sup>48)</sup>; es handelt sich hierbei um eine Hemmung der Enzymwirkung, also der Wirkung des aktivierten Enzyms an sich, durch Jodessigsäureion. Nach Bersin und Logemann<sup>49)</sup> ist die Aktivierung des Papains durch Sulphydrylverbindungen als eine Reduktion des in oxydierter Form vorliegenden, Disulfidgruppen enthaltenden Enzyms selbst zu verstehen; sie erfolgt auch bei Einwirkung anderer Reduktionsmittel. Auch Ascorbinsäure (Vitamin C) wirkt als Aktivator der Proteolyse durch Kathepsin, auffallenderweise dagegen nicht gegenüber Papain<sup>50)</sup>. Für die Aktivierung durch Ascorbinsäure ist nach Maschmann<sup>51)</sup> die Beteiligung von Eisen erforderlich; sie betrifft vor allem die späteren Stadien der Eiweißspaltung. Während man nach Krebs<sup>52)</sup> die Ursache der Aktivierung des Kathepsins durch Sulphydrylverbindungen in der Aufhebung einer Hemmung der Proteolyse durch vorhandene Schwermetallionen, mittels Komplexbildung, zu sehen hat, nicht in einer Aktivierung des Enzyms selbst durch Sulphydryl, erlauben die Beobachtungen über den Einfluß des Eisens die zwischen diesen Anschauungen vermittelnde Annahme, daß nicht Sulphydryl allein, sondern die Bildung eines Sulphydryl-Schwermetall-Komplexes für die Aktivierung verantwortlich zu machen ist<sup>53)</sup>.

Bemerkenswert erscheint ferner der antagonistische Einfluß oxydierender und reduzierender Mittel auf den Eiweißumsatz: Oxydation scheint die Eiweißsynthese, Reduktion die Hydrolyse zu begünstigen; dies wird vom Eiweißumsatz in tierischen<sup>54)</sup> und besonders eindrucksvoll von dem in pflanzlichem Material berichtet<sup>55)</sup>. Eine von der Aktivierung durch Sulphydryl zu unterscheidende, auf unspezifischer Adsorptionswirkung beruhende Aktivierung des Kathepsins durch Phosphatide (Lecithin, Kephalin), welche sich gegenüber dem mit Sulphydryl bereits maximal aktivierten Enzym geltend macht, hat Rondoni<sup>56)</sup> beschrieben und ihre mögliche physiologische Bedeutung erörtert.

<sup>46)</sup> H. Heinlein, Ztschr. f. Krebsforsch. 35, 161 [1932].

<sup>47)</sup> D. Michlin u. W. Rubel, Biochem. Ztschr. 260, 121 [1933].

<sup>48)</sup> E. Maschmann u. E. Helmert, Ztschr. physiol. Chem. 220, 199 [1933].

<sup>49)</sup> Th. Bersin u. W. Logemann, ebenda 220, 209 [1933].

<sup>50)</sup> P. Karrer u. F. Zehender, Helv. chim. Acta 16, 701 [1933]. A. Purr, Biochemical Journ. 27, 1703 [1933].

<sup>51)</sup> E. Maschmann u. E. Helmert, Ztschr. physiol. Chem. 223, 127; 224, 56 [1934].

<sup>52)</sup> H. A. Krebs, Biochem. Ztschr. 220, 269 [1930]; Naturwiss. 18, 736 [1930].

<sup>53)</sup> Vgl. E. Waldschmidt-Leitz u. W. Kocholaty, Naturwiss. 21, 848 [1933]. R. Bierich u. A. Rosenbohm, Ztschr. physiol. Chem. 223, 136 [1934].

<sup>54)</sup> P. Rondoni u. L. Pozzi, Ztschr. physiol. Chem. 219, 22 [1933]. C. Voegelin, M. E. Maver u. J. M. Johnson, Journ. Pharmacol. exp. Therapeutics 48, 241 [1933]; Chem. Ztschr. 1934, I, 1076.

<sup>55)</sup> K. Mothes, Naturwiss. 20, 102 [1932]; 21, 883 [1933].

<sup>56)</sup> P. Rondoni, Ztschr. physiol. Chem. 207, 103 [1932].

In Bakterien wie auch in insektivoren Pflanzen werden, soweit sie untersucht worden sind, häufig Proteinasen beobachtet, welche keinem einheitlichen Typus, sondern eher *Mischtypen* angehören. Die Bakterien der sauren Labgerinnung, die Acidoproteolyten, enthalten eine Proteinase, zwischen Papainase und Tryptase stehend, mit einem Reaktionsoptimum in annähernd neutralem Milieu, durch Sulfhydryl nicht aktivierbar<sup>57)</sup>; interessant ist die Erscheinung, daß die Proteinase des *B. fluorescens liquefaciens*, wenn auf Gelatine kultiviert, quantitativ in das Nährmedium sezerniert wird, während die vorhandenen Peptidasen in der Zelle verbleiben<sup>58)</sup>. Im Sekrete des Drüsengewebes der Fangorgane zweier *Nepenthes*-Arten ist das Vorkommen je zweier echter Proteinasen beobachtet worden, dem Reaktionsoptimum nach dem Trypsin- und Kathepsintypus zugehörig, aber ohne die entsprechenden Aktivierungserscheinungen<sup>59)</sup>; nur das katheptische Enzym soll indessen von der Pflanze selbst abgeschieden werden, die Gegenwart des tryptischen auf bakterielle Verunreinigungen zurückzuführen sein<sup>60)</sup>. Das Sekret von *Drosophila rotundifolia* andererseits enthält eine den Eigenschaften nach zwischen Pepsin und Papain stehende Proteinase<sup>61)</sup>.

Das von den anderen Proteinasen besonders unterschiedene Enzym der Blutgerinnung, *Thrombin*, hat eine nähere Kennzeichnung erfahren. Nach *Mellanby*<sup>62)</sup> ist es ein proteolytisches Enzym, dessen Wirkung in der Aufspaltung des Fibrinogens zu Fibrin und Serumglobulin bestehen soll; nach anderen Beobachtungen<sup>63)</sup> ist seine Wirkung dagegen nur eine denaturierende, keine hydrolytische. *Fischer*<sup>64)</sup> hat das Thrombin aus Muskelextrakt unter der Kontrolle einer quantitativen Bestimmungsmethode einer Reinigung unterzogen. Das Enzym selbst wird als ein calciumhaltiges Lipoproteid aufgefaßt, aus einer Eiweiskomponente und einer prosthetischen Gruppe, wahrscheinlich Kephalin, bestehend.

### Peptidasen.

Von den Untersuchungen über peptidspaltende Enzyme betreffen die meisten Fragen des Vorkommens oder der Spezifität. *Le Breton* und *Mocorou*<sup>65)</sup> haben festgestellt, daß reiner Pankreassatz inaktives Trypsin neben aktiver Carboxy-polypeptidase, aber keine anderen Peptidasen enthält; in reinem Darmsaft finden sich dagegen nur die ereptischen Peptidasen neben Enterokinase.

Die Frage nach der Existenz mehrerer Dipeptidasen ist viel untersucht worden. Während man nach *Linderström-Lang*<sup>66)</sup> in der Darmschleimhaut, nach *Sato*<sup>67)</sup> auch

<sup>57)</sup> C. Gorini, W. Graßmann u. H. Schleich, ebenda 205, 133 [1931/32].

<sup>58)</sup> A. I. Virtanen u. J. Tarnanen, ebenda 204, 247 [1931/32].

<sup>59)</sup> K. G. Stern u. E. Stern, Biochem. Ztschr. 252, 81 [1932].

<sup>60)</sup> J. de Zeeuw, ebenda 269, 187 [1934].

<sup>61)</sup> H. Holter u. K. Linderström-Lang, Ztschr. physiol. Chem. 214, 223 [1932/33].

<sup>62)</sup> J. Mellanby, Proceed. Roy. Soc., London (B) 113, 93 [1933].

<sup>63)</sup> H. Strughold u. E. Wöhlsch, Ztschr. physiol. Chem. 223, 267 [1934].

<sup>64)</sup> A. Fischer, Biochem. Ztschr. 264, 169 [1933].

<sup>65)</sup> E. le Breton u. F. Mocorou, Ann. Physiol. Physicochim. biol. 7, 215 [1933].

<sup>66)</sup> K. Linderström-Lang, Ztschr. physiol. Chem. 188, 48 [1930].

<sup>67)</sup> M. Sato, Compt. rend. Lab. Carlsberg 19, Nr. 2, S. 1 [1931].

im Malz, mindestens zwei Dipeptidasen zu unterscheiden hat, von denen eine für die Hydrolyse von Leucylpeptiden spezifisch, auch zur Spaltung höherer Leucylpeptide befähigt, also keine echte Dipeptidase sein soll, sind die dieser Auffassung zugrunde liegenden Beobachtungen über ein wechselndes Verhältnis der Zerlegbarkeit z. B. von Alanyl-glycin und von Leucyl-glycin durch verschiedene Enzymlösungen nach *Graßmann*<sup>68)</sup> nur durch Begleitstoffe bedingt; diese beeinflussen die Affinität der als einheitlich anzusehenden Dipeptidase gegenüber verschiedenen Substraten in verschiedenem Maße. Die Frage nach dem Vorkommen mehrerer spezifischer Dipeptidasen nebeneinander ist noch nicht endgültig zu entscheiden.

Zur Messung der enzymatischen Peptidspaltung haben *Linderström-Lang* und *Holter*<sup>69)</sup> ein Mikroverfahren beschrieben, das die Bestimmung der Enzymmengen in einer einzigen oder doch in nur wenigen Zellen vorbereiten soll. Mit dieser Methodik ist die Peptidasenverteilung in Wurzel und Blattkeim des Malzkornes gemessen worden<sup>70)</sup>; Enzymanhäufungen in gewissen Wurzelteilen scheinen hier mit bestimmten Wachstumsvergängen in Zusammenhang zu stehen.

Auf Grund ihrer Erfahrungen bei der Reinigung von **Amino-polypeptidase** aus Darmschleimhaut kommen *Balls* und *Köhler*<sup>71)</sup> zu der Feststellung, daß das Enzym selbst Phosphor enthalte, welcher bei der Dialyse unter Inaktivierung in Form von Phosphation abgespalten wird; die relative Aktivität des Enzyms gegenüber einer Anzahl von Tetrapeptiden fand man im Verlaufe der Reinigung, auch bei teilweiser Inaktivierung, konstant, es ergab sich also kein Anzeichen für die Existenz mehrerer Amino-polypeptidasen.

Über die spezifischen Wirkungen der einzelnen Peptidasen hat *Abderhalden*<sup>72)</sup> eine große Anzahl von Untersuchungen ausgeführt; unter vielen beschriebenen Einzeltatsachen sei die Feststellung hervorgehoben, daß die Spaltbarkeit von optisch aktiven Peptiden durch Carboxy-polypeptidase durch die Konfiguration der am Carboxylende stehenden Aminosäure, die Spaltbarkeit durch Amino-polypeptidase dagegen durch die Konfiguration der Aminosäure am Aminoende des Peptids bestimmt wird.

Sehr bemerkenswert erscheinen Versuche über die enzymatische Spaltbarkeit von Dioxopiperazin-carbonsäuren<sup>73)</sup>. Dioxopiperazin-carbonsäure, ferner Körper wie Glycyl-asparaginsäureanhydrid, Glycyl-glutaminsäureanhydrid und ähnliche erweisen sich im Gegensatz zu den nicht carboxylierten Dioxopiperazinen als enzymatisch, nämlich durch Carboxy-polypeptidase spaltbar, solange sie eine freie Carboxylgruppe aufweisen; ereptische Enzyme und Pepsin sind darauf ohne Wirkung. Die Möglichkeit des Vorkommens von Dioxopiperazinringen im Eiweiß wird durch diese Befunde erneut zur Diskussion gestellt.

<sup>68)</sup> W. Graßmann u. L. Klenk, Ztschr. physiol. Chem. 186, 26 [1930].

<sup>69)</sup> K. Linderström-Lang u. H. Holter, ebenda 201, 9 [1931].

<sup>70)</sup> K. Linderström-Lang u. H. Holter, ebenda 204, 15 [1931/32].

<sup>71)</sup> A. K. Balls u. Fr. Köhler, ebenda 205, 157 [1931/32].

<sup>72)</sup> E. Abderhalden u. Mitarb., Fermentforsch. 13, 303, 310, 330, 363, 396, 408, 443 [1932].

<sup>73)</sup> J. Matsui, Journ. Biochemistry 17, 253 [1933]. T. Ishiyama, ebenda 17, 285 [1933].

Peptide des Lysins, in welchen die  $\epsilon$ -Aminogruppe desselben an der Peptidbindung beteiligt ist, werden durch Peptidasen nicht gespalten<sup>74)</sup>; solche Bindungen scheinen danach in den Proteinen nicht vorzukommen. Die Existenz eines besonderen, Prolinpeptide spaltenden Enzyms z. B. in der Darmschleimhaut, einer Prolinase<sup>75)</sup>, ist mehrfach bestätigt worden<sup>76)</sup>. Prolin ist außerdem in gewissen Proteinen wie Gelatine auch an den Peptidbindungen beteiligt, wie aus dem bei der enzymatischen Hydrolyse auftretenden Fehlbetrag an freien Aminogruppen geschlossen wird<sup>77)</sup>; solche Bindungen, mit tertiärem Stickstoff, scheinen durch Amino-polypeptidase zerlegt zu werden.

Über die Auffindung eines neuen, dehydrierte Dipeptide spaltenden Enzyms in der Niere, einer **Dehydro-dipeptidase**, haben *Bergmann* und *Schleicht*<sup>78)</sup> berichtet; es findet sich auch in gealterten Pankreasdrüsen. Das Enzym greift wie eine echte Peptidase an der Peptidbindung selbst an, es zerlegt beispielsweise Glycyl-dehydro-phenylalanin in Glycin und Phenyl-brenztraubensäure; das Vorkommen dieses spezifischen Enzyms macht das intermediäre Auftreten von dehydrierten Peptiden im Stoffwechsel wahrscheinlich.

Unter den **Polypeptidasen** hat man Amino- und Carboxy-polypeptidase zu unterscheiden; sie finden sich gewöhnlich zusammen in den rohen Enzymlösungen aus tierischen oder pflanzlichen Zellen und können z. B. mit Adsorptionsmitteln voneinander getrennt werden<sup>79)</sup>. Auf Grund der Beobachtung, daß Polypeptidaselösungen aus Hefe, welche man von Dipeptidase befreite, nach dem Zusatz dipeptidasefreier Ultrafiltrate wiederum die Fähigkeit zur Spaltung von Dipeptiden erlangten, wird die Spezifität gegenüber Poly- und Dipeptiden von *Fodor*<sup>80)</sup> lediglich der Gegenwart besonderer Träger, nicht der Existenz spezifischer Enzyme zugeschrieben; die bisherigen Beobachtungen dürften allerdings zur sicheren Begründung einer so weitgehenden Vorstellung noch nicht ausreichend sein. Auch *Abderhalden*<sup>81)</sup> hat über Erfahrungen berichtet, nach denen dipeptidasefreie Enzymlösungen bei längerer Aufbewahrung die Fähigkeit zur Dipeptidspaltung wieder erlangten. Es scheint, daß die Ausschaltung die Dipeptidasewirkung hemmender Begleitstoffe, z. B. durch enzymatischen Abbau, für diese Erscheinung verantwortlich ist.

Nach Untersuchungen von *Abderhalden* und *Schwab*<sup>82)</sup> hat man in der Pankreasdrüse neben der Carboxy-polypeptidase, deren Wirkung sich auf die Hydrolyse von

<sup>74)</sup> E. Abderhalden u. Fr. Schweizer, Fermentforsch. 12, 350 [1930/31].

<sup>75)</sup> W. Graßmann, H. Dyckerhoff u. O. v. Schönebeck, Ber. Dtsch. chem. Ges. 62, 1307 [1929].

<sup>76)</sup> E. Abderhalden u. O. Zumstein, Fermentforsch. 12, 341 [1930/31]. A. Fodor, M. Frankel u. S. Kuk, Biochem. Ztschr. 229, 28 [1930]. W. Graßmann, O. v. Schönebeck u. G. Auerbach, Ztschr. physiol. Chem. 210, 1 [1932].

<sup>77)</sup> M. Bergmann, L. Zervas u. H. Schleicht, Ber. Dtsch. chem. Ges. 65, 1747 [1932].

<sup>78)</sup> M. Bergmann u. H. Schleicht, Ztschr. physiol. Chem. 205, 65 [1931/32]; 207, 235 [1932].

<sup>79)</sup> E. Waldschmidt-Leitz, diese Ztschr. 44, 573 [1931]; Physiol. Rev. 11, 358 [1931].

<sup>80)</sup> A. Fodor u. L. Frankenhal, Biochem. Ztschr. 233, 283 [1931].

<sup>81)</sup> E. Abderhalden u. E. v. Ehrenwall, Fermentforsch. 12, 411 [1930/31].

<sup>82)</sup> E. Abderhalden u. E. Schwab, ebenda 12, 432 [1930/31].

Peptiden besonderer Zusammensetzung bezieht, z. B. von Polypeptiden mit endständigem Tyrosin wie dem Leucyl-glycyl-tyrosin, eine besondere „Acylase“ anzunehmen, welcher die beobachtete Spaltung von Halogenacyl-amino-säuren zugeschrieben wird; man findet nämlich diese beiden enzymatischen Wirkungen, gegenüber Polypeptiden und gegenüber Halogenacyl-amino-säuren, die man beide der Carboxy-polypeptidase zugeschrieben hatte, in verschiedenen Enzymlösungen von wechselndem Ausmaß und unabhängig voneinander.

Mit dem **Mechanismus** der enzymatischen Dipeptidspaltung befassen sich Untersuchungen von *Balls* und *Köhler*<sup>83)</sup>. Während die Verankerung des Enzyms an der freien Aminogruppe der Dipeptide erfolgt, ist danach für das Eintreten der hydrolytischen Spaltung eine zweite Bindung zwischen Enzym und Dipeptid erforderlich, an welcher die Iminogruppe der Peptidbindung selbst als sogen. „zweite Haftstelle“ beteiligt zu sein scheint; für den Eintritt dieser Reaktion erscheint ein gewisser saurer Charakter der Iminogruppe bestimmend, wie aus der Spezifität gegenüber verschiedenen „Anilin-peptiden“, im aromatischen Kern substituierten Glycyl-anilinen, sowie aus Hemmungsversuchen geschlossen wird. Die Reaktion mit der Iminogruppe als der zweiten Haftstelle scheint eine gemeinsame Funktion aller Peptidasen, auch der Polypeptidasen zu sein, während sich die einzelnen Peptidasen hinsichtlich der Natur der ersten Verankerungsstelle im Substrat unterscheiden lassen; diese ist entweder die Aminogruppe (Amino-peptidasen) oder die Carboxylgruppe (Carboxy-peptidasen). Diese Erfahrungen haben in neueren Untersuchungen von *Bergmann*<sup>84)</sup> eine Bestätigung und Erweiterung erhalten mit dem Nachweis, daß für die Wirkung der Dipeptidase außer der Gegenwart einer freien Aminogruppe auch die einer freien Carboxylgruppe erforderlich ist. Aus der Tatsache, daß alle Peptidasen die Gegenwart von Imidwasserstoff in der Peptidbindung erfordern, ist nach *Bergmann* zu folgern, daß die Peptide in der Imidform  $\text{—C}=\text{N}—$  mit den Peptidasen reagieren;

OH  
ren; aus der hieraus sich ergebenden räumlichen Anordnung der Substituenten lassen sich bestimmte Vorstellungen über die Ursache der spezifischen Reaktionsweise der einzelnen Peptidasen, auch die der sterischen Auslese, ableiten.

In Auszügen aus Darmschleimhaut wird ferner eine Peptidase besonderer Art beschrieben, welche zu ihrer Anlagerung an die Substrate weder freie Carboxyl- noch Aminogruppen benötigt, beispielsweise Chloracetyl-o-nitranilin zu zerlegen vermag<sup>85)</sup>; ihre Abtrennung von den begleitenden Peptidasen ist durchgeführt. Auf die Gegenwart eines solchen Enzyms hat man vielleicht die Beobachtungen über die Spaltung gewisser Halogenacyl-amino-säuren wie des Chloracetyl-alanins zurückzuführen<sup>86)</sup>, welche gegenüber den bisher bekannten Peptidasen resistent gefunden werden. [A. 65.]

<sup>83)</sup> A. K. Balls u. Fr. Köhler, Ber. Dtsch. chem. Ges. 64, 34, 294 [1930/31].

<sup>84)</sup> M. Bergmann, L. Zervas u. Mitarb., Ztschr. physiol. Chem. 224, 11, 17, 26, 33, 40, 45 [1934].

<sup>85)</sup> A. K. Balls u. Fr. Köhler, Ber. Dtsch. chem. Ges. 64, 383 [1930/31].

<sup>86)</sup> E. Abderhalden u. E. v. Ehrenwall, Fermentforsch. 12, 223 [1930]; 12, 376 [1930/31].