

Neuere Untersuchungen an Lysozymen

VON DR. P. JOLLÈS

LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE, FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS, PARIS (FRANKREICH)

Lysozyme sind weitverbreitete Enzyme, welche die Gerüstsubstanz bakterieller Zellwände spalten. Sie lösen die glykosidischen β -(1 \rightarrow 4)-Bindungen zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin. Die Aminosäuresequenz des Lysozyms aus Hühnereiweiß ist bekannt (129 Aminosäurereste). Lysozyme anderen Ursprungs haben bei qualitativ gleicher biologischer Aktivität häufig eine andersartige Primärstruktur. Die mit Lysozymen gewonnenen Erkenntnisse gestatten Schlüsse auf die chemische Struktur des Grundgerüstes der bakteriellen Zellwand.

I. Einleitung

Der Name *Flemings* ist nicht nur mit der Entdeckung des Penicillins verknüpft, sondern auch mit der eines Enzyms, das er Lysozym nannte und das in der Lage ist, bestimmte Bakterien rasch aufzulösen, eine Fähigkeit, die zahlreichen tierischen und pflanzlichen Geweben und Sekreten zukommt, vor allem aber dem Eiweiß [1]. *Fleming* fand gleichzeitig ein Bakterium, *Micrococcus lysodeikticus*, das gegen Lysozym besonders empfindlich ist. Seine ersten Beobachtungen wurden bald von vielen Seiten bestätigt. Lysozyme ließen sich in einer großen Zahl menschlicher Organe, Gewebe und Sekrete (Milz, Niere, Tränen, Speichel u. a.) nachweisen. Ähnliche lytisch wirkende Enzyme fand man in den Organen und Sekreten vieler Wirbeltiere. Auch Wirbellose, Bakterien und sogar Pflanzen (*Papaya*-Latex) enthalten Lysozyme, die demnach weit verbreitet zu sein scheinen [2]. Die wichtigste Quelle für die Gewinnung von Lysozymen ist das Eiweiß der Eier verschiedener Vogelarten, besonders der Hühner. Hühnereiweiß-Lysozym ist daher am besten bekannt.

Im folgenden werden wir zunächst über die physikochemischen Eigenschaften, die Struktur sowie die Beziehung zwischen Struktur und biologischer Wirkung des Hühnereiweiß-Lysozyms berichten. In einem zweiten Abschnitt vergleichen wir Lysozyme verschiedener Herkunft, die kürzlich chromatographisch rein erhalten werden konnten, und beschreiben schließlich neue Arbeiten über das Substrat des Lysozyms und seine Einwirkung darauf. Vorweggenommen sei die Definition eines Lysozyms und die Beschreibung seines quantitativen Nachweises.

a) Definition eines Lysozyms [3,4]

Ein lytisches Enzym kann als Lysozym bezeichnet werden, wenn es folgende Eigenschaften hat: es muß ein basisches Protein mit geringem Molekulargewicht (etwa 15000) sein, das bei saurem pH beständig ist und bei

[1] *A. Fleming*, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B, 93, 306 (1922).
[2] Lysozyme, A Review. Herausgeber: Armour and Co., Chicago 1952.

[3] *C. Fromageot* u. *P. Jollès*, Experientia Suppl. II, 181 (1955).

pH = 4,5 eine bis zwei Minuten auf 100 °C erhitzt werden kann, ohne an Aktivität zu verlieren. Es ist bei alkalischem pH instabil und ist aktiv gegenüber einer Suspension von *Micrococcus lysodeikticus*. Läßt man es auf ein geeignetes Substrat einwirken, so werden Bruchstücke freigesetzt, die mit Reagentien für reduzierende Zucker und N-Acetylhexosamine nachweisbar sind und sich vom Glucosamin oder von der Muraminsäure ableiten. Lysozyme werden daher auch als β -Glucosaminidasen, Muraminidasen oder N-Acetylmuramid-Glycanhydrolasen bezeichnet.

b) Bestimmung der lytischen Aktivität

Gewöhnlich wird die lytische Aktivität eines lysozymhaltigen Präparates so bestimmt, daß man die Lyse einer Suspension toter *M. lysodeikticus*-Zellen spektrophotometrisch verfolgt. Die klassischen Verfahren von *Smolelis* und *Hartsell* [5] sowie von *Fraenkel-Conrat* [6] haben *Shahani* [7] und *Léonis* [8] kürzlich modifiziert.

II. Lysozym aus Hühnereiweiß

1. Reinigung

Alderton und *Fevold* [9] beschrieben die direkte Kristallisation von Lysozym aus Hühnereiweiß. *Sophianopoulos* et al. [10] haben als letzten Schritt die Fraktionierung mit Ammoniumsulfat eingeführt, um chromatographisch reines Lysozym zu erhalten. Kristalli-

- [4] *M. R. J. Salton*, Biochim. biophysica Acta 22, 495 (1956).
[5] *A. N. Smolelis* u. *S. E. Hartsell*, J. Bacteriol. 58, 731 (1949).
[6] *H. Fraenkel-Conrat*, Arch. Biochem. Biophysics 27, 109 (1950).
[7] *K. M. Shahani*, *R. C. Chandan*, *P. L. Kelly* u. *E. L. MacQuiddy* in: XVI. International Dairy Congress, Copenhagen 1962. Andelsbogtrykkeriet, Odense 1962.
[8] *P. Godfrine* u. *J. Léonis* [8a], Bd. 1, S. 115.
[8a] Atti del II° Symposium internationale sul Lisozima di Fleming, Milano 1961. Boscome, Mailand 1961.
[9] *H. L. Fevold* u. *G. Alderton* in *H. E. Carter*: Biochemical Preparations. Wiley, New York 1949, Bd. 1, S. 67.
[10] *A. J. Sophianopoulos*, *C. K. Rhodes*, *D. N. Holcomb* u. *K. E. van Holde*, J. biol. Chemistry 237, 1107 (1962).

siertes Lysozym oder Handelspräparate lassen sich durch Chromatographie an Carboxymethylcellulose oder an Amberlite CG-50 reinigen [11]. Neben der Hauptkomponente ($90 \pm 10\%$) findet man zwei weitere Fraktionen, deren Menge jedoch mit dem Herstellungsverfahren und der Aufbewahrungszeit wechselt, so daß das unterschiedliche chromatographische Verhalten möglicherweise nur auf einen unterschiedlichen Gehalt an Amidgruppen zurückzuführen ist. Quantitative Aminosäure-Analysen scheinen diese Annahme zu bestätigen. Physikalische Daten für das Lysozym sind – im Vergleich zu den Fortschritten der Sequenzanalyse – erstaunlich rar. Das liegt mit daran, daß viele physikalische Messungen ausgeführt wurden, bevor man Ionen austausch und Chromatographie an Cellulose als Reinigungsverfahren kannte. Erst deren Anwendung zeigte, wie erwähnt, daß das Enzym Nebenbestandteile in wechselnder Menge enthalten kann.

2. Physikochemische Untersuchungen

Der isoelektrische Punkt liegt zwischen 10,5 und 11. Die Molgewichte, die mit verschiedenen physikalischen Methoden ermittelt wurden, hat *Jollès* [12] kürzlich kritisch gesichtet. Den auf analytischen Daten beruhenden Werten kommt das physikalisch bestimmte Molgewicht von 14500 ± 200 am nächsten. *Sophianopoulos* et al. [10] fanden für chromatographisch reines Lysozym bei $\text{pH} = 5,4$ das Molgewicht 14400 ± 100 . Die gleichen Autoren überprüften frühere Angaben für die Sedimentationskonstante ($1,8 \cdot 10^{-13}$; $1,87 \cdot 10^{-13}$; $1,9 \cdot 10^{-13}$; $2,11 \cdot 10^{-13}$) und erhielten nach der Extrapolation auf unendliche Verdünnung $S_{20w} = 1,91 \cdot 10^{-13}$ sec. Sie nannten außerdem einen neuen Durchschnittswert für das partielle spezifische Volumen, der mit $0,703 \text{ ml/g}$ bei 20°C teils niedriger als früher angegebene Werte ($0,714$ bei 15°C [13] und $0,722$ bei 20°C [14]), teils höher ($0,688$ bei 25°C [15]) liegt.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse neuerer Messungen der optischen Drehung und der Rotationsdispersion zu-

Tabelle 1. Optische Drehung $[\alpha]_D$ und Dispersionskonstante λ_c von Hühnereiweiß-Lysozym

Lösungsmittel	$[\alpha]_D$	λ_c [$\text{m} \mu$]	Lit.
2 N NaCl	-47,1	254	[19]
H_2O	-44		[16]
8 M Harnstoff	-85		[16]
0,25 M NaBr ($\text{pH} = 5,6$)	-47	254	[17]
4 M Guanidinthiocyanat	-83	215	[20]
0,1 M NaCl ($\text{pH} = 3,1$)	-51,3		[21]
H_2O (1,9-proz. Lösung, $\text{pH} = 5,5$)		251	[18]

- [11] *H. H. Tallan u. W. H. Stein*, *J. biol. Chemistry* **200**, 507 (1953).
- [12] *P. Jollès* in *P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The Enzymes*, 2. Aufl., Academic Press, New York 1960, Bd. IV, Kap. 25.
- [13] *P. A. Charlwood*, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 776 (1957).
- [14] *T. L. McMeekin u. K. Marshall*, *Science (Washington)* **116**, 142 (1952).
- [15] *J. R. Colvin*, *Canad. J. Chem.* **30**, 831 (1960).

sammengestellt [16–18]. Diesen Zahlen kommt insfern Bedeutung zu, als der Helixgehalt des Lysozys aus der Rotationsdispersion und das Maß der Faltung im Molekül aus der Änderung der optischen Drehung bei der Denaturierung berechnet worden sind [22]. Diese Berechnungen zeigen, daß die Peptidkette des Lysozys zu etwa 35 % Helix-Konformation hat [16, 23]. *Blout* [24] nutzte den Wasserstoff-Deuterium-Austausch als Indikator für den Helixgehalt nativen Lysozys. Er fand, daß sich nur 45 % des Amid-Wasserstoffs leicht austauschen lassen. Nach *Kanarek* et al. [25] hängt der Austausch vom pH ab und ist in saurer Lösung groß. Als minimalen Helixgehalt berechnet man auch hier wieder 35 %.

Die Grundviskosität und die Sedimentationskonstante sind entweder mit einem nahezu kugelförmigen Molekül mit 0,6 g Hydratwasser pro Gramm Protein vereinbar oder mit einem abgeflachten, weniger stark hydratisierten Ellipsoid [10]. *Donovan* et al. [18] versuchten aus Titrationskurven und UV-Differenzspektren zu ergründen, welche Wechselwirkungen dafür verantwortlich sind, daß sich einige Carboxylgruppen des Lysozys anomal verhalten.

Alderton [26], *Corey* [27], *Steinrauf* [28] und *King* [29] haben das Enzym kristallographisch untersucht. Salze des Lysozys mit Mineralsäuren lassen sich in mehreren Formen kristallisieren. Bei $\text{pH} = 4,7$ gezüchtete Kristalle von Lysozymchlorid [26] sind tetragonal; jede Einheit enthält acht Lysozymmolekülen [28] sowie (eingeschlossen) 1 M NaCl-Lösung (der Puffer enthält Na^+ -Ionen), die etwa 33,5 % des Kristallgewichts ausmacht.

Kürzlich haben *Blake* et al. [30] mit einer ins einzelne gehenden Röntgenanalyse begonnen, die eine Kenntnis der molekularen Konfiguration vermitteln soll. Erstes Ergebnis ist eine dreidimensionale Karte der Elektronendichte für die tetragonale Kristallform des Lysozymchlorids bei einer Auflösung von 6 Å. Drei Derivate des Lysozys mit schweren Atomen wurden untersucht. Sie enthielten Quecksilber(II)-jodid, Hexachloropalladat(IV) oder o-Hydroxyquecksilber(II)-toluol-p-sulfosäure. Ähnliche Untersuchungen stammen von *Stanford* et al. [31], die tetragonale Kristalle von Lysozymchlorid mit komplexen Ionen des Niobs und Tantals verwendeten, sowie von *Dickerson* et al. [32] an triklinem Lysozymnitrat.

- [16] *P. Doty*, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **22**, 5 (1957).
- [17] *B. Jirgensons*, *Arch. Biochem. Biophysics* **93**, 172 (1961).
- [18] *J. W. Donovan, M. Laskowski u. H. A. Scheraga*, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 2154 (1960).
- [19] *J. T. Young u. P. Doty*, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 761 (1957).
- [20] *B. Jirgensons*, *Tetrahedron* **13**, 166 (1961).
- [21] *L. Josefsson* in: *First Symposium on Lysozyme*, Mailand 1959. Istituto italiano d'Arti grafiche, Bergamo 1959, S. 131.
- [22] *C. Schellmann u. J. A. Schellman*, *C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim.* **30**, 463 (1958).
- [23] *P. Urnes u. P. Doty*, *Advances Protein Chem.* **16**, 401 (1961).
- [24] *E. R. Blout, C. de Lozé u. A. Asadourian*, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 1895 (1961).
- [25] *L. Kanarek, A. Hvidt, J. Léonis u. M. Ottesen* [8a], *Bd. 1*, S. 111.
- [26] *G. Alderton u. J. Fevold*, *J. biol. Chemistry* **164**, 1 (1946).
- [27] *R. B. Corey, J. Donohue, K. N. Trueblood u. K. J. Palmer*, *Acta crystallogr.* **5**, 701 (1952).
- [28] *L. K. Steinrauf*, *Acta crystallogr.* **12**, 77 (1959).
- [29] *G. S. D. King*, *Acta crystallogr.* **12**, 216 (1959).
- [30] *C. C. F. Blake, R. H. Fenn, A. C. T. North, D. C. Phillips u. R. J. Poljak*, *Nature (London)* **196**, 1173 (1962).
- [31] *R. H. Stanford, R. E. Marsh u. R. B. Corey*, *Nature (London)* **196**, 1176 (1962).
- [32] *R. E. Dickerson, J. M. Reddy, M. Pinkerton u. L. K. Steinrauf*, *Nature (London)* **196**, 1178 (1962).

3. Chemische Struktur

a) Analyse

Lysozym aus Hühnereiweiß enthält 129 Aminosäure-Reste (Molgewicht: 14388): Gly₁₂, Ala₁₂, Ser₁₀, (Cys)₈, Met₂, Thr₇, Pro₂, Val₆, Leu₈, Ileu₆, Phe₃, Tyr₃, Try₆, Asp₂₁, Glu₅, Lys₆ Arg₁₁, His₁, (NH₂)₁₈. Es ist das erste Protein mit allen normalen Aminosäuren, besonders mit Met, Try und Cys im gleichen Molekül, dessen Primärstruktur aufgeklärt werden konnte [12].

b) Primärstruktur

Jollès und Jollès [33] konnten 1961 die chemische Struktur des Lysozyms aus Hühnereiweiß bestimmen. Das Protein besteht aus einer einzigen Polypeptidkette, deren Faltungen durch die vier S-S-Brücken der acht Cy-

sin nicht angegriffen). Die Spaltstücke ließen sich chromatographisch an einer Dowex-50X2- oder Dowex-1X2-Säule trennen. Tabelle 2 zeigt, welche Unterschiede dabei auftraten [34]. Die tryptischen Spaltprodukte konnten in der richtigen Reihenfolge aneinander gereiht werden, nachdem die chymotryptische Spaltung Bruchstücke mit basischen Aminosäuren geliefert hatte, die über die Sequenz der tryptischen Spaltprodukte Auskunft gaben. Abbildung 1 zeigt die Primärstruktur des Lysozyms [33-35].

c) Sekundäre und tertiäre Struktur;
Verteilung der S-S-Brücken

Über die sekundäre und tertiäre Struktur ist im Abschnitt über die physikochemischen Eigenschaften des Lysozyms schon einiges gesagt worden. *Léonis* [36] untersuchte die Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidgruppen, indem er das Enzym in einer Harnstofflösung löste und sowohl das

Tabelle 2. Trennung der tryptischen Spaltprodukte von Hühnereiweiß-Lysozym durch Ionenaustausch-Chromatographie. Verhalten der Aminosäuren, Tryptophan (Try), Cystin (Cys) und Methionin (Met) [34]

Austauscher	Behandlung vor der trypt. Spaltung	Try	Cys erscheint im Eluat als	Met	Bemerkungen
Dowex 50X2	nativ	Try	Cys	Met	Enzym wird durch Trypsin nur wenig angegriffen
	Hitze-Denaturierung	Try	Cys	Met	Cys enthaltende Peptide bleiben adsorbiert
	Oxydation	Kynurenin	Cysteinsäure	Methioninsulfon	Try enthaltende Peptide bleiben adsorbiert
	Reduktion, dann Behandlung m. $\text{JCH}_2-\text{CO}_2\text{H}$	Try	S-Carboxy-methyl-cystein	Homoserin	Peptide mit einem hohen Gehalt an aromatischen Aminosäuren bleiben adsorbiert
Dowex 1X2	Reduktion, dann Behandlung m. $\text{JCH}_2-\text{CO}_2\text{H}$	Try	S-Carboxy-methyl-cystein	Homoserin	Trennung aller tryptischen Spaltstücke

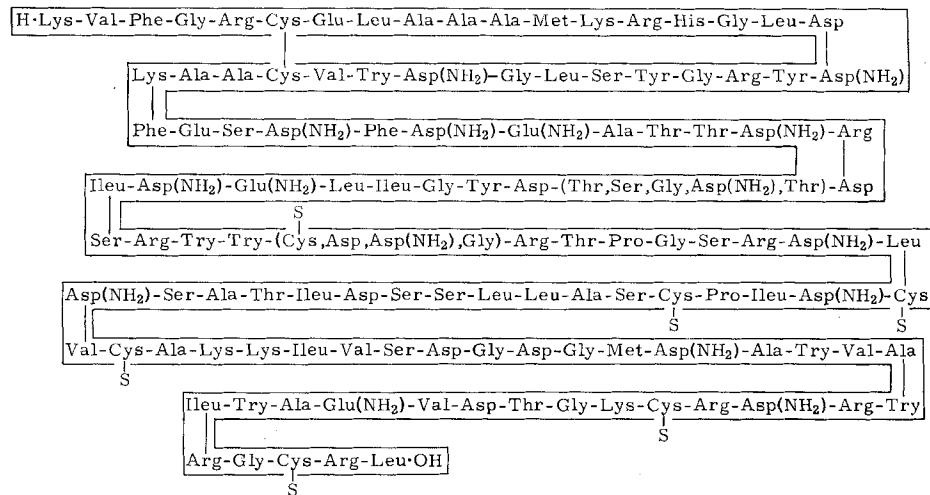


Abb. 1. Chemische Struktur des Lysozyms aus Hühnereiweiß.

stein-Reste gehalten werden. Öffnet man diese Brücken, so zerfällt das Moleköl nicht in Bruchstücke.

Um die primäre Struktur zu klären, wurde das Lysozym denaturiert (Hitze, Oxydation, Reduktion) und mittels Trypsin behandelt (das native Enzym wird durch Tryp-

[33] *J. Jollès* u. *P. Jollès*, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 253, 2773 (1961).

Absorptionsspektrum im fernen Ultraviolet als auch die Änderungen der Rotationsdispersion bestimmte.

Auch die tertiäre Struktur (Anordnung der Seitenketten usw.) hat *Léonis* [36] studiert. Seine Ergebnisse sprechen

[34] J. Jollès, J. Jauregui-Adell, I. Bernier u. P. Jollès, Biochim. biophysica Acta, im Druck.

[35] *J. Jollès* u. *P. Jollès*, *Biochim. biophysica Acta* 45, 407 (1960).
 [36] *J. Léonis* [8a], Bd. 1, S. 125.

dafür, daß Bindungen zwischen hydrophoben Gruppen für die Stabilität der molekularen Konfiguration des Lysozyms von Bedeutung sind.

Das native Enzym hat nicht notwendig die am stärksten geordnete Konfiguration. Nach der Einwirkung von Harnstoff auf Lysozym ließen sich durch Chromatographie an Amberlite CG-50 zahlreiche eng verwandte Formen des Enzyms isolieren, die sich hauptsächlich in ihrer tertiären Struktur unterschieden [8]. *Jauregui* und *Jollès* [37] erhielten nach der Behandlung von Lysozym mit Jodacetat bei pH = 5,5 ähnliche Ergebnisse.

Um die Lage der Disulfid-Brücken zu klären, isolierten *Jollès* et al. [38] nach peptischer und chymotryptischer Spaltung des nativen Enzyms die Cystin enthaltenden Peptide durch Chromatographie an Dowex-50X2 (Abb. 2). Jede dieser Fraktionen wurde mit Perameisensäure

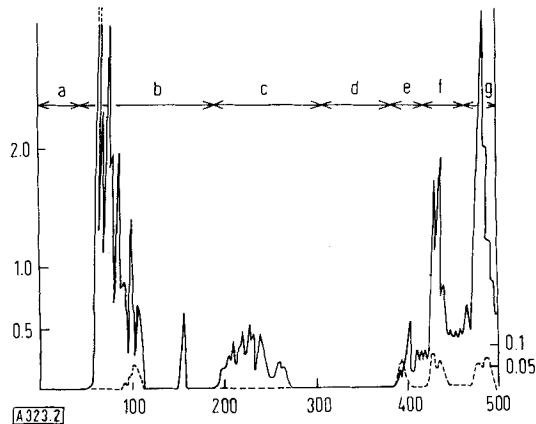


Abb. 2. Chromatogramm der bei der Hydrolyse von Hühnereiweiß-Lysozym mit Pepsin und Chymotrypsin entstehenden Peptide an Dowex 50 X2 (Länge der Säule: 1 m, Durchmesser: 2 cm) [38]. Elutionsmittel:

- (a) 0,2 M Na-Citrat, pH = 3,1
- (b) 0,2 M Na-Citrat, pH = 3,1 → 1,0 M Na-Citrat, pH = 5,1
- (c) 1,0 M Na-Citrat, pH = 5,1 → 2,0 Na-Citrat, pH = 5,1
- (d) 2,0 M Na-Acetat, pH = 6,4
- (e) 0,5 M Na-Phosphat, pH = 7,2
- (f) 0,75 M Na-Borat, pH = 9,5
- (g) 0,5 M Na-Borat, pH = 12,3

Volumen der Mischkammer für (b) und (c): 500 ml.
Größe der Fraktionen: 10 ml.

Linke Ordinate und ausgezogene Kurve: Intensität der Ninhydrinreaktion nach alkalischer Hydrolyse, Leucin-Äquivalente [mMol/l]. Rechte Ordinate und gestrichelte Kurve: Cystin-haltige Peptide, Intensität der Reaktion mit Phosphowolframat [Intensität der Absorption bei 700 mμ].

Abszisse: Fraktionsnummer.

oxydiert, und an Hand der Bruchstücke wurde zu bestimmen versucht, welche Cystein-Reste im nativen Lysozym durch S-S-Brücken miteinander verknüpft sind. In Abbildung 1 ist die erste so charakterisierte Disulfidbrücke eingezeichnet.

4. Beziehungen zwischen Struktur und biologischer Aktivität

Die biologische Aktivität des Lysozyms hängt selbstverständlich nicht nur von einer Aminosäure ab; vielmehr müssen mehrere Aminosäuren zusammenwirken, zu denen die folgenden gehören:

[37] *J. Jauregui-Adell* u. *P. Jollès*, unveröffentlicht.

[38] *J. Jollès*, *J. Jauregui-Adell* u. *P. Jollès*, *Biochim. biophysica Acta* 71, 488 (1963).

a) Die Tryptophan-Reste: die Aktivität des Enzyms geht verloren, sobald diese Reste durch die Einwirkung von N-Bromsuccinimid verändert werden [39].

b) Die Cystin-Reste: nach Versuchen von *Jollès* et al. [34] zur partiellen Reduktion des Enzyms sind mindestens zwei Disulfidbrücken für die enzymatische Aktivität notwendig. Nach *Churchich* [40] gewinnt man bei der Oxydation des teilweise reduzierten Lysozyms mit Luft 80 % des Proteins zurück. Das Produkt ist wasserlöslich und hat 60 % der spezifischen Aktivität des nativen Lysozyms. Mit Perameisensäure oxydiertes Lysozym ist inaktiv.

c) Der Histidin-Rest: er wird bei pH = 5,5 durch Jodacetat nicht angegriffen. Läßt man die Jodessigsäure aber 20 min auf das Enzym einwirken, so lassen sich säulenchromatographisch mehrere aktive Formen des Enzyms isolieren, die nahe verwandt zu sein scheinen (Abb. 3) [37]. Alle enthalten Histidin und unterscheiden sich wahrscheinlich geringfügig in der Tertiärstruktur. Das C-terminale Dipeptid Arg-Leu kann ohne Aktivitätsverlust abgespalten werden, aber es war bisher nicht möglich, ein kurzes Teilstück zu gewinnen, das noch Lysozym-Aktivität besitzt.

Tabelle 3 zeigt, wie sich die enzymatische Aktivität bei der Behandlung des Lysozyms mit verschiedenen Agentien ändert. Auf folgende Beobachtungen sei besonders hingewiesen:

a) Radioaktives Lysozym bleibt bis zu einer spezifischen Aktivität von 0,20 mC/mMol enzymatisch wirksam [41].

b) Harnstoff hat zwei Wirkungen: eine rasche, die zum Verlust der enzymatischen Eigenschaften führt aber

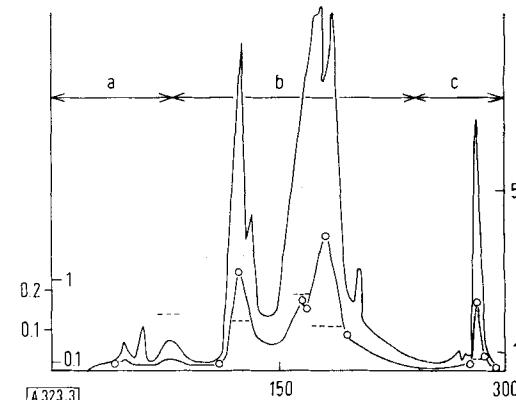


Abb. 3. Produkte, die bei der Einwirkung von Jodessigsäure (20 min) bei pH = 5,5 auf Hühnereiweiß-Lysozym entstehen [37]. Chromatographie an Amberlite CG-50. Elutionsmittel:

- (a) 0,15 M Na-Phosphat, pH = 7,18
- (b) 0,2 M Na-Phosphat, pH = 7,18
- (c) 0,8 M Na-Phosphat, pH = 7,18

Fraktionsgröße: 3 ml.

Ordinate links außen und Kurve o---o: Intensität der Reaktion mit Folin's Reagens [μMol Lysozym/l].

Ordinate links innen und gestrichelte Linien: Relative spezifische Aktivität gegenüber *M. lysodeikticus* (Hühnereiweiß-Lysozym = 1).

Ordinate rechts und Kurve ---: Intensität der Ninhydrinreaktion nach alkalischer Hydrolyse [μMol Amino-Stickstoff/l].

Abszisse: Fraktionsnummer.

[39] *I. Bernier* u. *P. Jollès*, *C. R. hebd. Séances Acad. Sci.* 253, 745 (1961).

[40] *J. E. Churchich*, *Biochim. biophysica Acta* 65, 349 (1962).

[41] *A. G. Schnek*, *L. Ledoux* u. *J. Léonis* [8a], Bd. 1, S. 103.

Tabelle 3. Enzymatische Aktivität von Hühnereiweiß-Lysozym nach unterschiedlicher Vorbehandlung

Vorbehandlung	durch die Vorbehandlung veränderte Aminosäuren oder Gruppen	Aktivität	Lit.
Oxydation	Cys [*], Met, Try	inaktiv	[6]
Photooxydation	His, aromat. Aminosäuren	Aktivitätsminderung	[44]
Reduktion	Cys	reversible Inaktivierung	[40, 44a]
wasserfreie Amicinsäure	N-O-Acylwander. Hydroxyaminosäuren	reversible Inaktivierung	[45]
Veresterung	freie CO_2H -Gruppen	hängt vom Reagens ab	[6]
Acetylierung	freie NH_2 -Gruppen	zunehmende Inaktivierung	[6, 42]
Guanidierung	Lys	aktiv	[42]
Xanthogenierung	Try	inaktiv	[43]
Jodierung	His, aromatische Aminosäuren	inaktiv, Reaktivierung möglich	[6]
Jodessigsäure bei $\text{pH} = 5,5$	teilweise Met, Lys	Bildung aktiver, nah verwandter Formen	[37]
N-Bromsuccinimid	vor allem Try	zunehmende Inaktivierung	[39]
Harnstoff		Bildung aktiver, nah verwandter Formen	[8]
Einbau radioaktiver Isotope		aktiv bis 0,20 mC/mMol	[41]

[*] Cys = Cystin.

vollkommen reversibel ist, und eine langsam eintretende, irreversible, die natives Lysozym in nahe miteinander verwandte, aktive Substanzen umwandelt [8].

c) Jede Behandlung des Enzyms, die den (relativen) Gehalt an sauren Gruppen steigert (Acetylierung), inaktiviert [42], wogegen Reagentien, welche die Basizität erhöhen (Guanidierung), die Aktivität erhalten [42].

Die strukturelle Basis der bakteriolytischen Aktivität ist möglicherweise in der tertiären Struktur zu suchen, besonders in der stabilisierenden Wirkung der hydrophoben Bindungen, denn man kann inaktive Fraktionen erhalten, ohne die sekundäre Struktur zu ändern [36].

III. Lysozym anderen Ursprungs

Im Laboratorium des Autors sind Lysozyme verschiedenen Ursprungs gereinigt und analysiert worden, um sie zu vergleichen und um zu prüfen, ob die qualitativ gleiche biologische Aktivität auf chemischen Gemeinsamkeiten beruht.

[42] I. I. Gerschwind u. C. H. Li, *Biochim. biophysica Acta* 25, 171 (1957).

[43] S. R. Dickman, R. B. Kropf u. C. M. Proctor, *J. biol. Chemistry* 210, 491 (1954).

[44] L. Weil, A. R. Buchert u. J. Maher, *Arch. Biochem. Biophysics* 40, 245 (1952).

[44a] K. Imai, T. Takagi, and T. Isemura, *J. Biochemistry (Tokyo)* 53, 1 (1963).

[45] L. Josefsson, *Biochim. biophysica Acta* 59, 128 (1962).

1. Wahl der Lysozyme

Zwei Gruppen von Lysozymen wurden untersucht: 1. Lysozyme aus dem gleichen Organ verschiedener Tierarten (Hühner- und Enteneiweiß [46], Kaninchen- [47] und Hundemilz [48]). 2. Lysozyme aus verschiedenen Organen oder Körperflüssigkeiten des gleichen Tieres (Eiweiß und Lunge des Huhnes [49], Milz [48] und Niere des Hundes; Milch [50], Placenta [51], Speichel [51a], Leukocyten [52] und Milz des Menschen). Alle diese Lysozyme sind nach dem im folgenden Abschnitt beschriebenen Verfahren in chromatographisch reiner Form erhalten worden.

2. Reinigungsverfahren

Das von Jollès et al. [53] entwickelte Verfahren zur Reinigung von Lysozymen besteht im wesentlichen aus fünf Schritten

1. Erhitzen des zerriebenen Organs oder der Flüssigkeit bei $\text{pH} = 4$ bis 4,5 auf 100 °C für eine bis zwei Minuten.
2. Adsorption an Amberlite CG-50 und Eluierung basischer Substanzen.
3. Chromatographie an Carboxymethylcellulose.
4. Entsalzen an Sephadex G-25 oder G-50.
5. Ionenaustausch - Chromatographie an Amberlite CG-50 bei konstanter Temperatur, konstantem pH-Wert und konstanter Molarität des Puffers.

Das Enzym ist nach dieser Behandlung chromatographisch rein. Tabelle 4 zeigt, bei welchen pH-Werten die Lysozyme chromatographiert wurden. Alle untersuchten lytischen Enzyme mit Ausnahme der aus mensch-

Tabelle 4. Optimale Bedingungen für die quantitative Eluierung von Lysozymen verschiedener Herkunft (jeweils 1 mg) aus einer Amberlite-CG-50-Säule (Länge 20 cm, Durchmesser 1 cm). Temperatur: 20 °C. Elutionsmittel: Phosphat-Puffer [12, 46–52].

Lysozym	pH ($\pm 0,02$)	Molarität des Puffers	Eluierungs-volumen [ml]
Hühnerweiß	7,18	0,2	90
Hühnerlunge I	6,40	0,325	70
Hühnerlunge II	6,40	0,412	70
Enteneiweiß I	7,58	0,2	20
Hundemilz	6,50	0,2	120
Hundeniere	6,40	0,2	20
Kaninchenmilz I	6,55	0,2	20
Kaninchenmilz II	6,55	0,2	60
Menschenmilch I	6,82	0,2	40
Menschenmilch II	6,98	0,2	70
Menschenpeichel	6,98	0,2	30
Menschenleukocyten	6,98	0,2	40
Menschenplacenta	6,98	0,2	30
<i>Nephthys hombergi</i>	6,60	0,2	1000

[46] P. Jollès, G. Spotorno u. J. Jollès, unveröffentlicht.

[47] G. Jollès u. C. Fromageot, *Biochim. biophysica Acta* 11, 95 (1953); 14, 219 (1954).

[48] P. Jollès u. C. Fromageot, *Biochim. biophysica Acta* 19, 91 (1956).

[49] P. Jollès u. S. Zuili, *Biochim. biophysica Acta* 39, 212 (1960).

[50] P. Jollès u. J. Jollès, *Nature (London)* 192, 1187 (1961).

[51] J. F. Petit, M. Panigel u. P. Jollès, *Bull. Soc. Chim. biol.* 45, 211 (1963).

[51a] J. F. Petit u. P. Jollès, unveröffentlicht.

[52] P. Jollès u. D. Charlemagne, unveröffentlicht.

[53] P. Jollès, H. Zowall, J. Jauregui-Adell u. J. Jollès, *J. Chromatogr.* 8, 363 (1962).

lichem Speichel und menschlicher Placenta isolierten Substanzen verhielten sich chromatographisch verschieden.

3. Zusammensetzung und Molekulargewicht

Die in Tabelle 4 zusammengestellten Lysozyme sind analysiert worden. Mit Ausnahme der zwei aus Kaninchen-Milz [47] gewonnenen Enzyme, die sich nur in der Zahl der Amidgruppen unterscheiden [12], und der Lysozyme aus menschlichem Speichel und menschlicher Placenta haben alle untersuchten Lysozyme eine andere Aminosäure-Zusammensetzung [12]. Unterschiede treten vor allem im Gehalt an Glutaminsäure, Prolin, Arginin und aromatischen Aminosäuren auf (Tabelle 5). Das Molekulargewicht aller Enzyme (gemessen mit geiecteten Cellophan-Membranen) ist etwa 15000.

Tabelle 5. Wichtigste Unterschiede in der Aminosäure-Zusammensetzung einiger Lysozyme [12, 46–49, 51, 54, 56]

Lysozym	Cys [a]	Glu	Pro	Tyr	Phe	Try	His	Arg
	[Reste/Molekül]							
Hühnereiweiß	4	5	2	3	3	6	1	11
Hühnerlunge I		9–10	8	3	3		3	6
Hundemilz	4	10 ± 1	8	3	3	6	1	8
Hundeniere I		6 ± 1	7 ± 1	3	3		1	11 ± 1
Kaninchenmilz I [b]	4–5	11	5	3	3	2	1	6
Kaninchenmilz II [b]	4–5	11	5	3	3	2	1	6
Menschenplacenta [c]	3	9 ± 1	3	5	2	3 ± 1	1	11 ± 1
Menschenplacenta [c]	3	9 ± 1	3	5	2	3 ± 1	1	11 ± 1
Menschenmilch I			5–6	3	3			11 ± 1
Menschenmilch II				3	5	2		11 ± 1
<i>Nephthys hombergi</i>		8–9	12	3	3	1–2		7
Papaya-Latex	8	11	18	13	12	7	3	13

[a] Cys = Cystin.

[b] Unterscheiden sich im Gehalt an Amidgruppen.

[c] Unterscheiden sich auch im Gehalt an anderen Aminosäuren nicht.

4. Biologische Aktivität

Die in Tabelle 4 aufgezählten Lysozyme haben gegenüber gleichen Bakterien qualitativ die gleiche biologische Aktivität. Unter gleichen Testbedingungen und bei optimalem pH ist das Lysozym aus Hühnereiweiß ebenso wirksam wie das aus Kaninchenmilz [47] oder Hühnerlunge [49]. Dagegen sind die Enzyme aus Hundemilz [48], menschlicher Placenta [51] und *Nephthys hombergi* (einem Ringelwurm) [49] zwei- bis dreimal so aktiv, und die Lysozyme aus Papaya-Latex [54] und *Bacillus subtilis* [55] weisen nur ein Fünftel der Aktivität des Hühnereiweiß-Lysozyms auf.

5. Vergleich von Struktur und Aktivität verschiedener Lysozyme (Heteroenzyme)

Lysozyme aus verschiedenen Tierarten (selbst aus gleichen Organen) unterscheiden sich im chromatographischen Verhalten und in der Aminosäure-Zusammensetzung. Die tryptischen Spaltprodukte von oxydiertem

[54] E. L. Smith, J. R. Kimmel, D. M. Brown u. E. O. P. Thompson, J. biol. Chemistry 215, 67 (1955).

[55] Y. Satomura, S. Okada u. J. Fukumoto, J. agric. chem. Soc. Japan 31, 281 (1957).

Lysozym aus Hundemilz sind isoliert, analysiert und mit den Bruchstücken des Enzyms aus Hühnereiweiß verglichen worden [57]. Es war nicht möglich, Aminosäure-Sequenzen zu finden, die in beiden Enzymen vorkommen, d. h. bereits die Primärstrukturen beider Lysozyme müssen verschieden sein. Gleches gilt für die Enzyme aus menschlicher Milch und Hühnereiweiß [56]. Bei teilweiser Reduktion verliert das Lysozym aus Hundemilz seine Aktivität, läßt sich aber reaktivieren.

Zwei chromatographisch verschiedene Lysozyme aus dem gleichen Organ eines Tieres können sich im Gehalt an Amidgruppen unterscheiden (Lysozym I und II aus Kaninchenmilz), aber auch in vielen Aminosäureresten (Lysozym I und II aus menschlicher Milch).

Lysozyme aus verschiedenen Organen oder Körperflüssigkeiten des gleichen Tieres können sich sowohl im

chromatographischen Verhalten als auch in der Aminosäure-Zusammensetzung gleichen (Enzyme aus menschlicher Placenta und menschlichem Speichel) [51]. Man darf annehmen, daß sie die gleiche Struktur haben. Solche Lysozyme können aber auch beträchtlich differieren (chromatographisch und analytisch). Ein Beispiel dafür ist das Lysozym I aus menschlicher Milch [56], das dem Enzym aus menschlicher Placenta, menschlichem Speichel [51] und dem Lysozym II aus menschlicher Milch nicht gleicht. Ein erster Vergleich der tryptischen Spaltprodukte (nach Papierchromatographie oder -elektrophorese) ließ erkennen, daß sie sich wahrscheinlich auch strukturell unterscheiden. Die Lysozyme aus Milz und Niere des Hundes gaben das erste Beispiel für das Auftreten von Heteroenzymen [*] in verschiedenen Organen des gleichen Tieres [3, 48].

Möglicherweise ist die gleiche biologische Aktivität der Lysozyme auf ihre Basizität und auf einige Gleichartigkeiten ihrer Tertiärstruktur zurückzuführen (Wasserstoffbrücken und hydrophobe Bindungen, mindestens zwei Disulfidbrücken). Auch der Histidin-Rest, der in vielen dieser Enzyme enthalten ist, sowie einige aromatische Aminosäuren mögen von Bedeutung sein. Bei Lysozymen, die sich im Aminosäuregehalt unterscheiden

[56] P. Jollès u. J. Jollès, unveröffentlicht.

[*] Heteroenzyme sind Proteine verschiedener Ursprungs, die sich in ihren physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften unterscheiden, aber die gleiche biologische Wirkung haben [58].

den, sind gleiche Aminosäuresequenzen bisher nicht nachgewiesen worden. In einem Fall konnte ihr Vorliegen ausgeschlossen werden [57].

6. Lysozym aus Pflanzen und Bakterien

Außer den oben beschriebenen Lysozymen sind nur wenige andere in ausreichender Reinheit gewonnen worden. Das einzige reine Pflanzen-Lysozym stammt aus *Papaya*-Latex [54]. Sein Molekulargewicht beträgt 25000.

Unter den bakteriellen Lysozymen sind die von *Richmond* [59] und *Satomura* [55] untersuchten Enzyme aus *B. subtilis*-Stämmen zu erwähnen. Ein von *Ghysen* [60] isoliertes Lysozym aus *Streptomyces* ist im wesentlichen eine Acetylhexosaminidase und damit dem Lysozym aus Eiweiß ähnlich.

Koch und *Dreyer* konnten ein Enzym des Phagen T₂ als Lysozym charakterisieren [61]. Mit T₂-Phagen infizierte Zellen von *Escherichia coli* B synthetisieren ein Enzym, das die Zellen schließlich von innen her löst. Es ist gleichfalls ein Lysozym (Molekulargewicht 15000) und ist von *Weidel* et al. [62] untersucht worden. Die gleichen Autoren konnten ein partikelgebundenes T₂-Phagen-Lysozym isolieren, das ein höheres Molekulargewicht (21000) zu haben scheint [63].

IV. Substrat und enzymatische Wirkung der Lysozyme

Es wurde bereits erwähnt, daß *Fleming* zusammen mit dem Lysozym einen grampositiven Mikroorganismus entdeckte, den er *Micrococcus lysodeikticus* nannte, da er vom Enzym sehr leicht angegriffen wird. Das erste Substrat, das man zur Untersuchung des Lysozysms benutzte, waren Suspensionen von *Micrococcus lysodeikticus*. Nach mehreren Versuchen, das Substrat aus den Zellen direkt zu isolieren, berichtete *Salton* [64], daß es ausschließlich in der Zellwand enthalten ist. Dank seiner Bemühungen wurden dann gereinigte Zellwand-Präparate zugänglich [65]. *Salton* und *Pavlik* [66] fanden, daß isolierte Zellwände von 23 grampositiven Bakterienarten in unterschiedlichem Maße von Lysozym angegriffen werden: die Trübung einer Suspension vermindert sich unter dem Einfluß des Enzyms um 9 % bei

[57] *P. Jollès* u. *M. Ledieu*, *Biochim. biophysica Acta* 36, 284 (1959).

[58] *T. Wieland* u. *G. Pfeiderer*, *Angew. Chem.* 74, 261 (1962); *Angew. Chem. internat. Edit.* 1, 169 (1962).

[59] *M. H. Richmond*, *Biochim. biophysica Acta* 33, 78 (1959).

[60] *J. M. Ghysen*, *Arch. internat. Physiol. Biochim.* 65, 173 (1957).

[61] *G. Koch* u. *W. J. Dreyer*, *Virology* 6, 291 (1958).

[62] *W. Weidel* u. *W. Katz*, *Z. Naturforsch.* 16b, 156 (1961).

[63] *W. Katz* u. *W. Weidel*, *Z. Naturforsch.* 16b, 363 (1961).

[64] *M. R. J. Salton*, *Nature (London)* 170, 746 (1952).

[65] *M. R. J. Salton* u. *R. W. Horne*, *Biochim. biophysica Acta* 7, 177 (1951).

[66] *M. R. J. Salton* u. *J. G. Pavlik*, *Biochim. biophysica Acta* 39, 398 (1960).

Zellwänden von *Staphylococcus aureus* und um 98 % bei Präparaten von *M. lysodeikticus*. Obwohl alle Zellwände Muraminsäure und Glucosamin enthalten, besteht keine Beziehung zwischen dem Aminozucker-Gehalt und der Empfindlichkeit gegenüber Lysozym.

In den letzten Jahren haben dann *Schütte* und *Krisch* [67] versucht, das Substrat aus *M. lysodeikticus* zu isolieren. Ihr Präparat war zwar hochgereinigt und vollkommen wasserlöslich, aber nicht homogen. *Colobert* et al. [68] reinigten ein ähnliches Produkt durch Chromatographie an DEAE-Cellulose; offenbar handelte es sich um ein Mucopeptid. *Jollès* [69] konnte zeigen, daß man bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose zwei lösliche Substrate erhalten kann, die gleiche Mengen Glucosamin und Muraminsäure sowie Glucose und ein aus Glycin, Alanin, Glutaminsäure und Lysin bestehendes Peptid enthalten. Lysozyme aus Hühnereiweiß (Lysozym I) sowie aus menschlicher Milch (Lysozym II) hydrolysierten diese Substrate, was zu bestätigen scheint, daß diese drei analogen (doch nicht identischen) Lysozyme β -Glucosaminidasen sind. Kinetisch sind die von ihnen katalysierten Reaktionen jedoch verschieden. Bei pH = 5,8 ist das Lysozym aus Enteneiweiß das aktivste (Abb. 4). Es ist zugleich das am stärksten basische.

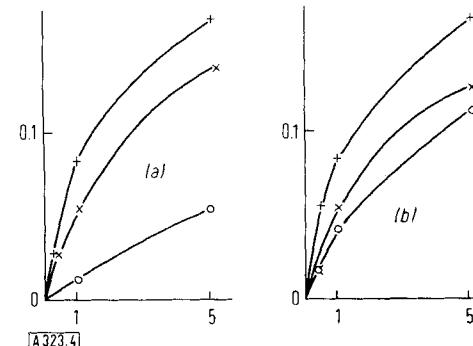


Abb. 4. Kinetik der Hydrolyse zweier Substrate durch drei Lysozyme bei pH = 5,8 [69].

(a) Substrat: bei pH = 7,2 von DEAE-Cellulose eluiert [69].

(b) Substrat: bei pH = 2,8 von DEAE-Cellulose eluiert [69].

(+ - + - +) = Lysozym I aus Enteneiweiß

(x - x - x) = Lysozym aus Hühnereiweiß

(o - o - o) = Lysozym II aus menschlicher Milch

Ordinate: freigesetzte Zucker (als Galactose [μ Mol]).

Abszisse: Zeit [min].

Das Substrat von Hühnereiweiß-Lysozym tritt nicht nur in grampositiven, sondern auch in graminnegativen Bakterien auf. Diese Entdeckung verdankt man Arbeiten von *Weidel* et al. [70, 71] über das Vorkommen von Diaminopimelinsäure und Muraminsäure in der Zellwand von *Escherichia coli* sowie Untersuchungen von *Salton* [72, 73] an mehreren graminnegativen Bakterien.

[67] *E. Schütte* u. *K. Krisch*, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 311, 121 (1958).

[68] *L. Colobert* u. *G. Dirheimer*, *C. R. hebdo. Séances Acad. Sci.* 250, 423 (1960).

[69] *P. Jollès*, *Biochim. biophysica Acta* 69, 505 (1963).

[70] *W. Weidel* u. *J. Primosigh*, *Z. Naturforsch.* 12b, 421 (1957).

[71] *W. Weidel* u. *J. Primosigh*, *J. gen. Microbiol.* 18, 513 (1958).

[72] *M. R. J. Salton*, *Biochim. biophysica Acta* 10, 512 (1953).

[73] *M. R. J. Salton*, *Nature (London)* 180, 338 (1957).

Auch *Mandelstam* [74] fand in der Zellwand des gram-negativen *E. coli* gegen Lysozym empfindliche Mucopeptide, die aus Muraminsäure, Glucosamin, Glycin, Glutaminsäure, Alanin, Diaminopimelinsäure und Lysin bestehen. *Martin* und *Franck* [75] konnten kürzlich in der Zellwand von *E. coli* B eine Mucopolymere enthaltende stabile Schicht charakterisieren, die von Lysozym angegriffen wird. *Colobert* et al. [76] gelang die Isolierung eines weiteren hochgereinigten Substrates aus dem gramnegativen Bakterium *Salmonella typhosa*. Interessanterweise findet man in den Zellwänden blau-grüner Algen eine Mucopolymer-Komponente, die der aus bakteriellen Zellwänden stark ähnelt [77].

Obwohl man wußte, daß Lysozym glykosidische Bindungen spalten und dabei N-Acetylaminozucker freisetzen, wurden direkte Beweise für die Natur der angegriffenen Bindungen erst möglich, als man mit isolierten Zellwänden als Substraten arbeiten konnte. *Salton* hat dieses Thema kürzlich diskutiert [78]. Er beobachtete, daß die enzymatische Lyse der Zellwände von *M. lysodeikticus*, *Bacillus megatherium* und *Sarcina lutea* mit der Bildung dialysierbarer und nichtdialysierbarer Produkte einhergeht. Unter den dialysierbaren

Einwirkung von Eiweiß-Lysozym auf Zellwände von *M. lysodeikticus*, sondern auch nach der Behandlung dieser Präparate mit Lysozymen aus Hundemilz und *Nephthys hombergi*. Nach *Ghuyzen* hat ein von *Streptomyces* ausgeschiedenes Enzym die gleiche Wirkung [60].

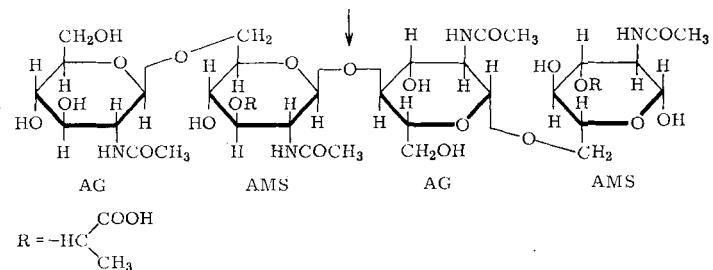


Abb. 5. Tetrasaccharid, das durch Lysozym aus Zellwänden von *M. lysodeikticus* freigesetzt wird und als Lysozym-Substrat dient [80].

AG = N-Acetylglucosamin

AMS = N-Acetylmuraminsäure

Der Pfeil weist auf die vom Lysozym gespaltene Bindung.

Alle diese Ergebnisse führten zu einer Vorstellung von der Struktur des Mucopeptids der Zellwand. Wahrscheinlich hat die Zellwand ein Grundgerüst [84], das aus N-Acetylmuraminsäure (AMS) und N-Acetylglu-

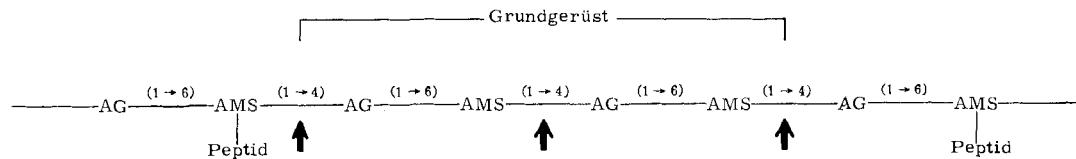


Abb. 6. Schema der für das Grundgerüst von *M. lysodeikticus*-Zellwänden vorgeschlagenen Struktur [80].

AG = N-Acetylglucosamin.

AMS = N-Acetylmuraminsäure

Die mit Pfeilen markierten Bindungen werden vom Lysozym gespalten.

cosamin (AG) besteht. Beide Gruppen folgen abwechselnd aufeinander und sind abwechselnd durch ($\beta(1 \rightarrow 4)$ - und $\beta(1 \rightarrow 6)$ -Bindungen miteinander verknüpft. Einige Muraminsäure-Reste tragen außerdem Peptide als Substituenten: AMS-Ala-(Glu₁, Gly₁, Lys₁, Ala₁) [85]. In Abbildung 6 ist die von *Salton* vorgeschlagene Struktur des Grundgerüstes der Zellwand von *Micrococcus lysodeikticus* wiedergegeben.

Wie die Lysozyme bakterielle Zellwände abbauen, läßt sich heute also verstehen. Aber viele mit der Empfindlichkeit gegenüber Lysozym verbundene Fragen bleiben noch zu klären. Auch eine von Natur aus resistente Zellwand kann von Lysozym angegriffen werden, wenn sie dessen Substrat enthält, und wenn dieses durch die synergistische Einwirkung weiterer Agentien (Trypsin [86], Antibiotika, Lösungsmittel, Metallkomplexbildner [87]) bloßgelegt wird. *Brumfitt* [88, 89] beobachtete

Produkten ist ein Disaccharid aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, wogegen das Molekulargewicht der nichtdialysierbaren Produkte zwischen 10^4 und $2 \cdot 10^4$ liegt [79]. *Salton* und *Ghuyzen* [80] konnten die Struktur des Disaccharids klären: es ist eine N-Acetylglucosaminyl- $\beta(1 \rightarrow 6)$ -N-acetylmuraminsäure. Vor kurzem schlug *Jeanloz* [80a] eine andere Struktur mit $\beta(1 \rightarrow 4)$ - anstatt $\beta(1 \rightarrow 6)$ -Bindung vor. Neben dem Disaccharid kommt ein Tetrasaccharid vor [80], das aus zwei durch eine $\beta(1 \rightarrow 4)$ -Bindung verknüpften Disaccharid-Molekülen besteht. Lysozym aus Eiweiß wirkt als $\beta(1 \rightarrow 4)$ -N-Acetylglucosaminidase oder $\beta(1 \rightarrow 4)$ -Muraminidase und spaltet das Tetrasaccharid (Abb. 5), das demnach als charakteristisches Substrat des Lysozyms gelten kann.

Alle diese Untersuchungen bestätigten und erweiterten die Beobachtungen von *Berger* und *Weiser* [81] sowie von *Perkins* [82]. *Jollès* [83] fand das Disaccharid nicht nur nach der

[74] J. Mandelstam, Nature (London) 189, 855 (1961).

[75] H. H. Martin u. H. Frank, Z. Naturforsch. 17b, 190 (1962).

[76] L. Colobert u. O. Creach, Biochim. biophysica Acta 40, 167 (1960).

[77] H. Frank, M. Lefort u. H. H. Martin, Z. Naturforsch. 17b, 262 (1962).

[78] M. R. J. Salton: *Microbial Cell Walls*. Wiley, New York 1960, S. 59.

[79] M. R. J. Salton, Biochim. biophysica Acta 22, 495 (1956).

[80] M. R. J. Salton u. J. M. Ghuyzen, Biochim. biophysica Acta 36, 552 (1959); 45, 355 (1960).

[80a] R. W. Jeanloz, N. Sharon, and H. M. Flowers, Biochem. biophys. Res. Commun. 13, 20 (1963).

[81] L. R. Berger u. R. S. Weiser, Biochim. biophysica Acta 26, 517 (1957).

[82] H. R. Perkins, Biochem. J. 74, 182, 186 (1960).

[83] S. Zuili u. P. Jollès, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. 250, 3521 (1960).

[84] J. M. Ghuyzen, Biochim. biophysica Acta 40, 473 (1960).

[85] J. M. Ghuyzen, Biochim. biophysica Acta 47, 561 (1961).

[86] M. E. Becker u. S. E. Hartsell, Arch. Biochem. Biophysics 55, 257 (1955).

[87] R. Repaske, Biochim. biophysica Acta 30, 225 (1958).

[88] W. Brumfitt, A. C. Wardlaw u. J. T. Park, Nature (London) 181, 1783 (1958).

[89] W. Brumfitt, Brit. J. exp. Pathol. 40, 441 (1959).

in *M. lysodeikticus* die Entwicklung einer Lysozym-Resistenz und erklärte dieses Phänomen mit dem erhöhten Gehalt der Zellwand an O-Acetylgruppen. *Litwack* [90–92] fand, daß resistente Zellen weiß aussehen und arm an Carotinoiden sind. Nach *Salton* und *Pavlik* [66] läßt sich nur bei Zellwänden von *M. lysodeikticus* und *Lactobacillus arabinosus* die Empfindlichkeit gegenüber Lysozym durch die Spaltung von O-Estergruppen oder durch die Entfernung von Teichonsäure erhöhen. Möglicherweise beruhen Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Lysozym auch auf Unterschieden in den Bindungen zwischen den Aminozuckern, im Mengenverhältnis der Aminozucker, in der Zahl der Disaccharid-Einheiten und Verzweigungspunkte, in einzelnen Aminosäureresten, die an die Muraminsäure-Einheiten gebunden sind, und in der Zahl vernetzender Peptide zwischen den Muraminsäure-Resten.

Schließlich sei erwähnt, daß Lysozyme auch transglykosidierend wirken können. So berichtet *Salton* [93], daß bei der Inkubation des Disaccharids Acetylglucosaminyl-acetylmuraminsäure (AG-AMS) mit Lysozym aus *Papaya*-Latex das Tetrasaccharid entsteht.

- [90] *G. Litwack*, *Nature (London)* **181**, 1348 (1958).
- [91] *A. L. N. Prasad* u. *G. Litwack*, *Biochim. biophysica Acta* **46**, 452 (1961).
- [92] *G. Litwack* u. *A. L. N. Prasad*, *Nature (London)* **196**, 543 (1962).
- [93] *M. R. J. Salton* in [8a], Bd. 12, S. 1.
- [94] *C. Runti* [8a], Bd. 1, S. 35.

V. Schluß

Dank ihrer Stabilität eignen sich die Lysozyme hervorragend für vergleichende Untersuchungen über Struktur, enzymatische Wirkung, Geschwindigkeit der Reaktion und Spezifität. Zugleich führt die Isolierung dieser Enzyme zu einer Erweiterung unserer Kenntnis von den Zellwänden grampositiver und grammnegativer Bakterien. Der Befund, daß viele Arten beider Gruppen ein Lysozym-Substrat enthalten, weckt das Interesse an *Flemings* ursprünglicher Hypothese, daß Lysozyme bei der Infektionsabwehr eine Rolle spielen. Mit Sicherheit gehört die antibiotische Wirkung zu den Funktionen dieser Enzyme und wird praktische Anwendung finden. Lysozym aus Hühnereiweiß wird bereits zusammen mit anderen Antibiotika genutzt. Man muß jedoch zwischen enzymatischen und nichtenzymatischen Wirkungen der Lysozyme unterscheiden. Beispielsweise beruht die Koagulation des Blutes unter dem Einfluß von Lysozym auf dessen Basizität. Fügt man es der Kuhmilch zu, bevor man sie Säuglingen gibt, so macht man damit wahrscheinlich von seiner enzymatischen Wirkung Gebrauch. Eine neuere Zusammenfassung über die pharmakologischen Anwendungen der Lysozyme stammt von *Runti* [94]. Schließlich sei darauf hingewiesen, daß die Produktion lysozym-artiger Stoffe in so vielen verschiedenen Organismen für eine fundamentale Rolle dieser Enzyme im Stoffwechsel spricht.

Eingegangen am 7. Februar 1963 [A 323]
Übersetzt von Dr. *H. Grünwald*, Heidelberg

Koordinations-Chemie und Katalyse

Untersuchungen über die Cyclooctatetraen-Synthese nach W. Reppe

VON PRIV.-DOZ. DR. G. N. SCHRAUZER.

MITBEARBEITET VON P. GLOCKNER UND S. EICHLER

INSTITUT FÜR ANORGANISCHE CHEMIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Es wird über Zusammenhänge zwischen Struktur und katalytischer Aktivität von Nickel(II)-Komplexen bei der Cyclooctatetraen-Synthese nach W. Reppe berichtet. Die Cyclotetramerisierung des Acetylens vollzieht sich innerhalb labiler Ni(II)-Acetylen- π -Komplexe. Hemmversuche machen wahrscheinlich, daß im Übergangszustand vier Moleküle Acetylen in einer zur Bildung des Achtrings günstigen geometrischen Anordnung um das Nickel-Ion gruppiert sind.

Einleitung

Die 1940 von *W. Reppe* [1] entdeckte Synthese des Cyclooctatetraens zählt zu den faszinierendsten Reaktionen der modernen Chemie. Aus dem einfachen Grundstoff Acetylen bildet sich an bestimmten Nickel(II)-Komplexen Cyclooctatetraen, jener ungesättigte Koh-

lenwasserstoff, den *R. Willstätter* [2] zu Anfang des Jahrhunderts in einer außerordentlich langwierigen und mühevollen Abbaureaktion in geringer Menge aus dem Pseudopelletierin gewinnen konnte. Die *Reppesche* Synthese gestattet, die gleiche Verbindung im technischen Maßstab herzustellen. Da bei der unkatalysierten thermischen Polymerisation des Acetylens als Hauptprodukt Benzol entsteht, überrascht es besonders, daß in

[1] *W. Reppe*, *O. Schlichting*, *K. Klager* u. *T. Toepel*, *Liebigs Ann. Chem.* **560**, 1 (1948).

[2] *R. Willstätter* et al., *Ber. dtsch. chem. Ges.* **44**, 3428 (1911), und spätere Veröffentlichungen.