

**64. Ernst Waldschmidt-Leitz, Wolfgang Graßmann und Anton Schäffner: Über die Spezifität der Peptidasen, I.: Spaltbarkeit substituierter Aminosäure-amide.**

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München.]

(Eingegangen am 13. Dezember 1926.)

Die Beschreibung der peptid-spaltenden Enzyme und ihre scharfe Unterscheidung von den anderen Proteasen auf Grund spezifischer Substrate hat erst in den Untersuchungen der letzten Jahre<sup>1)</sup> eine sichere Grundlage gefunden. Aber mit der Feststellung, daß, trotz der erwiesenen spezifischen Einstellung des Erepsins auf die Sprengung einfacher Peptid-Bindungen, auch die Wirkung des Trypsins beim Abbau von Proteinen in der Aufspaltung von Säure-amid-Bindungen besteht<sup>2)</sup>, war die Frage erneut aufgeworfen, wo man die Grenze zwischen ereptischer und tryptischer Spaltbarkeit zu suchen hat, etwa bei einer bestimmten Länge der Peptid-Ketten oder bei der Einführung besonderer Substituenten, und welche Gruppen in den spezifischen Substraten für die Affinität von Peptidase einerseits und von Protease anderseits verantwortlich sind.

Für die Beantwortung dieser Frage ist man auf die Prüfung von Substraten bekannter Konstitution angewiesen. So haben H. v. Euler und K. Josephson<sup>3)</sup> den Versuch eingeleitet, aus der verschiedenen Angreifbarkeit von Substraten und auf Grund von Hemmungs-Erscheinungen zu entscheiden, „welche Gruppen des Substrates seine Bindung an die Peptidase“ der Darm-Schleimhaut „vermitteln können“. Sie schließen aus ihren Versuchen, „daß die Bindung eines Substrates an das Erepsin aus Schweine-Darm wenigstens zum Teil durch eine freie Aminogruppe des Substrates vermittelt wird“. Diese Auffassung wird experimentell gestützt durch den Befund, daß durch die Substitution der freien Aminogruppe in Dipeptiden und Aminosäuren mit Benzoyl oder Acetyl die Affinität zur untersuchten Peptidase aufgehoben wird, während eine Veränderung an der Carboxylgruppe des Substrats, z. B. eine Veresterung, für seine enzymatische Angreifbarkeit nicht bestimmd zu sein scheint. Allein die untersuchten Beispiele sind nicht zahlreich und nicht verschieden genug gewählt, um sichere Unterlagen für die geäußerte Vorstellung zu ergeben. Wenn wir die angeschnittene Frage durch neue experimentelle Beiträge weiterführen, so ist für unsere Untersuchung auch der Gedanke leitend, charakteristische Unterschiede in der Angriffsweise zwischen Peptidasen verschiedener Herkunft aufzusuchen, wie sie schon in den Untersuchungen von E. Abderhalden<sup>4)</sup> angedeutet worden sind.

<sup>1)</sup> E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, Ztschr. physiol. Chem. **149**, 203 [1925]; E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner, Ztschr. physiol. Chem. **151**, 31 [1925/26]; R. Willstätter und W. Grassmann, Ztschr. physiol. Chem. **153**, 250 [1926].

<sup>2)</sup> siehe dazu E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner und W. Grassmann, Ztschr. physiol. Chem. **156**, 68, und zwar S. 78 und 80 [1926]; E. Waldschmidt-Leitz, B. **59**, 3000 [1926].

<sup>3)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122, und zwar S. 124 [1926]; siehe auch K. Josephson und H. v. Euler, Ztschr. physiol. Chem. **162**, 85 [1926].

<sup>4)</sup> E. Abderhalden und A. H. Koelker, Ztschr. physiol. Chem. **54**, 363 [1907], **55**, 417 [1908]; E. Abderhalden und C. Brahm, Ztschr. physiol. Chem. **57**, 342 [1908].

So standen uns durch das liebenswürdige Entgegenkommen von Hrn. Prof. Dr. J. v. Braun<sup>4)</sup>), in Frankfurt a. M. einige Proben decarboxylierter Dipeptide, sog. „Peptamine“, zur Verfügung, und es haben uns ferner die HHrn. Prof. Dr. G. Giemsa und Dr. C. Tropp in Hamburg in dankenswerter Weise Proben der von ihnen kürzlich beschriebenen Peptide der Arsanilsäure<sup>5)</sup>), sowie der *p*-Amino-benzoësäure überlassen, deren Verhalten gegenüber der Einwirkung verschiedener proteolytischer Enzyme geprüft worden ist. Es hat sich ergeben, daß diese Körper von gereinigtem Darm-Erepsin glatt und vollständig hydrolysiert werden, während bei der Einwirkung erepsin-freien, mit Enterokinase aktivierten Trypsins keine Spaltung beobachtet wird; im Falle der Beteiligung einer Aminosäure-Komponente mit asymmetrischem C-Atom verläuft die Hydrolyse durch Erepsin wie bei den zugrunde liegenden Peptiden asymmetrisch. Dagegen besteht ein spezifischer, qualitativer Unterschied in der Spaltbarkeit der untersuchten Peptamine durch tierisches und pflanzliches Erepsin, man findet die Peptidase der Hefe ohne jede Wirkung.

Dieser charakteristische Unterschied in der Spezifität der Peptidase aus Hefe und aus Darm-Schleimhaut, der mit diesen Beispielen zum ersten Male an einer chemisch wohldefinierten Körperklasse veranschaulicht wird<sup>6)</sup> und der auch gegenüber nicht-substituierten Aminosäure-amiden, dem einfachen Glycin-amid oder Leucin-amid, sowie gegenüber den Peptiden der Arsanilsäure und der *p*-Amino-benzoësäure, aber nur in quantitativem Sinne, zu bemerken ist, scheint uns sehr beachtenswert. Wollte man diese Erscheinung im Sinne der Gedankengänge von v. Euler und Josephson zu deuten versuchen, so wäre die Annahme naheliegend, daß für die Bindung des Darm-Erepsins an das Substrat vornehmlich eine freie Aminogruppe, für die des Hefe-Enzyms aber vornehmlich eine freie Carboxylgruppe gefordert werde, eine Unterscheidung, die an die Einteilung der rohrzucker-spaltenden Enzyme in Gluco- und in Fructo-saccharasen nach R. Kuhn<sup>7)</sup> erinnern würde. Allein gewichtige Erfahrungen der Literatur, die auch zu der von v. Euler und Josephson für das Darm-Erepsin entwickelten Anschauung in Widerspruch stehen, mahnen zur Vorsicht in der Deutung der vorliegenden Beobachtungen. Dazu gehören die Angaben von E. Fischer und P. Bergell<sup>8)</sup> über die Spaltbarkeit acylierter Peptide, beispielsweise des  $\beta$ -Naphthalinsulfonyl-glycyl-*l*-tyrosins oder des Carbäthoxyl-glycyl-*d,l*-leucins, durch Pankreas-Präparate und die wichtigen Beobachtungen von T. Imai<sup>9)</sup>, aus welchen hervorgeht, daß im Gegensatz zu benzoylierten Dipeptiden bereits benzoylierte Tripeptide von Darm-Erepsin gespalten werden. Aber mit der Unterscheidung der Darm- und Hefe-Peptidase allein auf der oben gegebenen Grundlage wären auch die zahlreichen und ungleichsinnigen Verschiedenheiten im Angriffspunkt bei der Einwirkung auf optisch aktive Tri- und Tetrapeptide, die E. Abderhalden

<sup>4a)</sup> vergl. dessen voranstehende Abhandlung.

<sup>5)</sup> G. Giemsa und C. Tropp, B. **59**, 1776 [1926].

<sup>6)</sup> vergl. hierzu die beim fraktionierten enzymatischen Abbau des Clupeins beobachteten Unterschiede in der Spezifität von Hefe- und Darm-Erepsin, E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner und W. Graßmann, Ztschr. physiol. Chem. **156**, 68, und zwar S. 75 [1926].

<sup>7)</sup> siehe dazu R. Kuhn und G. E. v. Grundherr, B. **59**, 1655, und zwar S. 1658 [1926]. <sup>8)</sup> B. **36**, 2592 [1903]. <sup>9)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **136**, 205 [1924].

und seine Mitarbeiter<sup>10)</sup> beschrieben haben, nur schlecht vereinbar; man sollte vielmehr die Wirkung der beiden Peptidasen in jedem Falle auf mehr als nur eine Haftstelle im Substrat zurückführen. Man wird die Spezifitäts-Prüfung der Peptidasen und ihre Unterscheidung, für die erst wenige Anhaltspunkte gegeben sind, an weiteren synthetischen Substraten zu vertiefen haben, um die Affinität der einzelnen Enzyme bestimmten chemischen Gruppen zuordnen zu können.

### Beschreibung der Versuche.

#### I. Spaltbarkeit decarboxylierter Dipeptide.

Für die liebenswürdige Überlassung von decarboxylierten Dipeptiden, sowie eines Benzoyl-dipeptamins, deren enzymatische Hydrolyse wir im Folgenden beschreiben, sind wir Hrn. Prof. Dr. J. v. Braun in Frankfurt a. M. zu aufrichtigem Dank verpflichtet. Die zur Prüfung angewandten Enzym-Lösungen waren enzymatisch einheitlich; so verfuhren wir zur Gewinnung von erepsin-freiem Trypsin nach E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck<sup>11)</sup>, während protease-freies Erepsin nach dem Verfahren von E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner<sup>12)</sup> aus Schweine-Darm, nach den Angaben von R. Willstätter und W. Graßmann<sup>13)</sup> aus Hefe bereitet wurde. Den Verlauf der enzymatischen Einwirkung verfolgte man durch Ermittlung des Aciditäts-Zuwachses in 90-proz. alkohol. Lösung mittels Thymol-phthalein.

Tabelle I.

Einwirkung von Darm-Erepsin auf Dipeptamine und Amino-säure-amide.

(Substrate mit *n*-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> neutralisiert; p<sub>H</sub> = 7.8; 30°; Volumen des Bestimmungs-Ansatzes 10.0 ccm.)

Substrat	g	Angew. Er.-Einh.	Zeit Stdn.	Acid.-Zuw. (0.2-n. KOH) ccm	Spal- tung %
Glycyl-decarboxy-alanin .....	0.1559	0.00155	24	1.95	26
Alanyl-decarboxy-leucin <sup>14)</sup> .....	0.1382	0.00176	3	0.26	5
,,	0.1382	0.00176	24	1.66	29
,,	0.1382	0.00176	96	2.44	49
Leucyl-decarboxy-glycin .....	0.1352	0.00160	18	1.08	23
Leucyl-decarboxy-alanin .....	0.1331	0.00155	6	0.22	5
,,	0.1331	0.00155	24	0.57	13
Glycin-amid (salzsaur.) <sup>15)</sup> .....	0.1105	0.0050	24	0.28	6
,,	0.1105	0.0029	24	0.23	5
Leucin-amid (bromwasserstoffsaur.) <sup>15)</sup> .	0.1280	0.0019	20	1.45	48

<sup>10)</sup> E. Abderhalden und A. H. Koelker, Ztschr. physiol. Chem. **54**, 363 [1907], **55**, 417 [1908]; E. Abderhalden und C. Brälik, Ztschr. physiol. Chem. **57**, 342 [1908].

<sup>11)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **147**, 286, und zwar S. 301, **149**, 203, und zwar S. 214 [1925].

<sup>12)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **151**, 31, und zwar S. 51 [1925/26].

<sup>13)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **153**, 250, und zwar S. 280 [1926].

<sup>14)</sup> Es sei hier bemerkt, daß dieses Präparat, wie in besonderen Versuchen festgestellt wurde, auch durch das Erepsin der Milz, wenn auch mit geringerer Geschwindigkeit, gespalten wird.

<sup>15)</sup> vergl. die Beobachtungen von P. Bergell und H. v. Wülfing, Ztschr. physiol. Chem. **64**, 348 [1910].

Wie aus nachstehendem Versuch 1 hervorgeht, wird die Spaltbarkeit auch der decarboxylierten Dipeptide durch Darm-Erepsin wie bei den Peptiden selbst durch Einführung von Benzoyl aufgehoben; es wäre zu prüfen, ob der Einfluß des Benzoyl-Restes in Analogie zu den Beobachtungen von T. Imai<sup>16)</sup> auch in diesem Falle mit der Länge der Kette abnimmt.

Versuch 1: Verhalten von Benzoyl-alanyl-decarboxy-leucin gegen Darm-Erepsin. 0.1138 g Sbst. wurden in Wasser suspendiert und die Suspension durch Zusatz von *n*-NaOH auf  $p_H = 7.8$  eingestellt; dann setzte man 2.0 ccm trypsin-freier Darm-Erepsin-Lösung (enth. 0.00194 Er.-Einh.) zu und füllte den Versuchsansatz mit Wasser auf 10.0 ccm auf. Der Aciditäts-Zuwachs belief sich nach 24 Stdn. und bei  $30^0$  auf 0.05 ccm 0.2-*n*. KOH; es war also keine meßbare Hydrolyse eingetreten.

Tabelle 2.

### Einwirkung von Hefe-Erepsin auf Dipeptamine und Amino-säure-amide.

(Substrate mit *n*-HCl neutralisiert;  $p_H = 7.8 - 8.0$  (eingestellt durch 1.00 ccm 0.5-*n*. Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer);  $40^0$ ; Volumen des Bestimmungs-Ansatzes 10.0 ccm).

Substrat	g	Angew. Enz.- Einh.	Acid.-Zuw. (ccm 0.2- <i>n</i> . KOH)			Spal- tung %
			nach 2	5	24 Stdn.	
Glycyl-decarboxy-alanin .....	0.204	1.60	0.01	0.00	—0.01	0
Alanyl-decarboxy-leucin .....	0.315	1.60	—0.01	—0.02	—0.01	0
Leucyl-decarboxy-glycin .....	0.183	1.60	0.00	0.00	0.06	1
Leucyl-decarboxy-alanin .....	0.129	1.60	—0.02	0.01	0.03	0
Glycin-amid (salzsaur.) .....	0.111	1.0	—0.03	—0.01	0.02	0
Leucin-amid (bromwasserstoffsaur.) ...	0.212	1.0	—	—	0.67 <sup>17)</sup>	15 <sup>17)</sup>

Tabelle 3.

### Einwirkung von Trypsin-Kinase auf Dipeptamine.

(Substrate mit *n*-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> neutralisiert;  $p_H = 8.0$ ;  $30^0$ ; 4.0 T.-(e.),  $\frac{1}{2}$  Stde. mit Enterokinase-Lösung aktiviert; Volumen des Bestimmungs-Ansatzes 10.0 ccm).

Substrat	g	Zeit in Stdn.	Acid.-Zuw. ccm 0.2- <i>n</i> . KOH
Alanyl-decarboxy-leucin	0.1809	24	0.02
Leucyl-decarboxy-glycin	0.1892	24	0.03
Leucyl-decarboxy-alanin	0.1370	24	—0.02

### 2. Spaltbarkeit von Peptiden der Arsanilsäure und der *p*-Aminobenzoësäure.

Die Präparate verdankten wir der Freundlichkeit der HHrn. Prof. Dr. G. Giemsa und Dr. C. Tropp vom Institut für Schiffs- und Tropen-Krankheiten in Hamburg, denen wir auch an dieser Stelle unseren Dank aussprechen. Zur Prüfung auf enzymatische Spaltbarkeit löste man die Substrate in der äquivalenten Menge *n*-Lauge und stellte dann durch Zusatz von *n*-Mineralsäure auf  $p_H = 8.0$  ein.

<sup>16)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 136, 205 [1924].

<sup>17)</sup> Nach 14 Stdn. gemessen.

Tabelle 4.  
Einwirkung von Darm-Erepsin.  
( $30^{\circ}$ ; Volumen des Bestimmungs-Ansatzes 10.0 ccm.)

Substrat	g	Angew. Er.-Einh.	Zeit Stdn.	Acid.-Zuw. (0.2-n. KOH) ccm	Spaltung, volst. Hydrolyse (%)
Glycyl-arsanilsäure .....	0.1364	0.00192	24	1.55	62 <sup>18)</sup>
Di-glycyl-arsanilsäure .....	0.1062	0.00155	24	2.02	91 <sup>18)</sup>
Tri-glycyl-arsanilsäure .....	0.1161	0.00155	24	3.90	90 <sup>18)</sup>
Glycyl-p-aminobenzoësäure .....	0.1962	0.00192	24	2.85	59 <sup>18)</sup>
Di-glycyl-p-aminobenzoësäure .....	0.1287	0.00155	24	2.50	98 <sup>18)</sup>

Tabelle 5.  
Einwirkung von Hefe-Erepsin.  
( $40^{\circ}$ ; 1.0 Hefe-Erepsin-Einheit; Volumen des Bestimmungs-Ansatzes 10.0 ccm.)

Substrat	g	Zeit i. Stdн.	Acid.-Zuw. (0.2-n. KOH) ccm	Spaltung %
Glycyl-arsanilsäure .....	0.137	22	-0.06	0 <sup>19)</sup>
Di-glycyl-arsanilsäure .....	0.166	22	0.00	0 <sup>19)</sup>
Tri-glycyl-arsanilsäure .....	0.171	22	0.29	5 <sup>19)</sup>
Glycyl-p-aminobenzoësäure ..	0.097	24	-0.04	0 <sup>19)</sup>
Di-glycyl-p-aminobenzoësäure.	0.126	24	0.64	13 <sup>19)</sup>

Tabelle 6.  
Einwirkung von Trypsin-Kinase.  
( $30^{\circ}$ ; 3.6 T.-(e.),  $\frac{1}{2}$  Stde. mit Enterokinase-Lösung aktiviert; Volumen des Bestimmungs-Ansatzes 10.0 ccm.)

Substrat	g	Zeit in Stdн.	Acid.-Zuw. ccm o.2-n. KOH
Tri-glycyl-arsanilsäure .....	0.0724	24	0.02
Di-glycyl-p-aminobenzoësäure .....	0.0802	24	-0.01

### 3. Zur enzymatischen Spaltbarkeit acylierter Peptide.

Aus den vorliegenden Beobachtungen der Literatur lässt sich eine Gesetzmäßigkeit über das Verhalten acylierter Peptide gegenüber peptid-spaltenden Enzymen noch nicht ableiten. Die wechselnden Befunde, von denen E. Fischer und P. Bergell<sup>20)</sup> bei der Prüfung von  $\beta$ -Naphthalinsulfonyl-

<sup>18)</sup> Arsanilsäure, bzw. p-Amino-benzoësäure durch Kupplung mit R-Salz nachweisbar.

<sup>19)</sup> Die Prüfung auf Kupplungsvermögen mit R-Salz nach Diazotierung war in allen Fällen nach der Enzym-Einwirkung schwach positiv.

<sup>20)</sup> B. 36, 2592 [1903].

und von Carbäthoxyl-Derivaten berichtet haben, erlauben kein sicheres Urteil über den Einfluß des eingeführten Acyl-Restes, so wenig, wie die Angaben von T. Imai<sup>21)</sup> genügen, den Einfluß der Länge der zugrundeliegenden Peptid-Kette mit Sicherheit zu deuten. Es scheint uns noch nicht angängig, solange diese Beobachtungen nicht bestätigt oder richtiggestellt worden sind, die spärlichen Erfahrungen, die vorliegen, mit bestimmten Schlußfolgerungen über die Bindungsweise zwischen Peptidase und Substrat, wie sie H. v. Euler und K. Josephson<sup>22)</sup> ausgesprochen haben, oder mit der Annahme einer verschiedenen Bindungsweise der einzelnen Peptidasen zu vereinigen. Man wird diese Frage an Hand einer größeren Anzahl acylierter Substrate zu prüfen haben. Der experimentelle Beitrag, den wir nachstehend mitteilen und der die Spaltbarkeit eines Acetyl-peptides durch Darm- und Hefe-Erepsin vergleicht, spricht für einen großen quantitativen Unterschied in der Affinität der beiden Enzyme. Inwieweit diese Erfahrung einer Anschauung entspricht, die die Bindungsstelle von Darm- und Hefe-Erepsin an die freie Aminogruppe, bzw. an das Carboxyl-Ende der Peptide verlegt, läßt sich noch nicht beurteilen; aber es ist zu bedenken, daß die Unterschiede in der Affinität der beiden Enzyme in vielen Fällen mehr quantitativer als qualitativer Natur sein mögen.

**Versuch 2:** Verhalten von Acetyl-*d,l*-phenylalanyl-*d,l*-alanin gegen Darm-Erepsin. 0.137 g Sbst. wurden in der äquivalenten Menge *n*-NaOII gelöst und die Lösung darauf durch Zusatz von *n*-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH = 7.8 eingestellt; nun fügte man 2.0 ccm trypsin-freie Erepsin-Lösung aus Schweine-Darm (enth. 0.00192 Er.-Einh.) hinzu und bestimmte die Acidität des auf 10.0 ccm mit Wasser aufgefüllten Ansatzes in alkoholischer Lösung sofort und nach 24 Stdn.; sie entsprach 1.05, bzw. 1.20 ccm 0.2-*n*. KOH, der Aciditäts-Zuwachs betrug also 0.15 ccm der Lauge, entspr. einer Hydrolyse von 6 %.

**Versuch 3:** Verhalten von Acetyl-*d,l*-phenylalanyl-*d,l*-alanin gegen Hefe-Erepsin. 0.137 g Sbst. wurden unter Zusatz der äquivalenten Menge *n*-NH<sub>3</sub> gelöst und mit *n*-HCl bis zu pH = 7.8 versetzt; dann fügte man 1.0 ccm 0.5-*n*. Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer von pH = 7.8 (bei 30°) und 1.7 ccm trypsin-freie Lösung von Hefe-Erepsin (enth. 1.3 Einheiten) hinzu und titrierte das auf 10.0 ccm mit Wasser aufgefüllte Reaktionsgemisch sofort und nach 24 Stdn.; der Aciditäts-Zuwachs belief sich dann auf 0.57 ccm 0.2-*n*. KOH, entspr. einer Hydrolyse von 23 %.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ergebenst für die zur Verfügung gestellten Mittel.

<sup>21)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **136**, 205 [1924].

<sup>22)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122, und zwar S. 124 [1926]; K. Josephson und H. v. Euler, Ztschr. physiol. Chem. **162**, 85 [1926].