

Die wäßrige Lösung wurde nach der Extraktion mit Äther destilliert; beim Einengen der Lösung wurden noch 4 g eines Öles abgeschieden, das bei 21 mm Druck bei 154—157° siedete und sich ebenfalls als Valerolacton erwies. Im wäßrigen sauren Destillat befand sich gleichfalls Valerolacton, das durch Neutralisation der sauren Lösung mit Alkali und darauf folgende Zersetzung der konz. Lösung mit Säure gewonnen wurde.

Analyse des γ -Valerolactons: 0.2492 g Sbst.: 0.5453 g CO₂, 0.1826 g H₂O.
C₅H₈O₂. Ber. C 60.00, H 8.00. Gef. C 59.68, H 8.19.

Die wäßrige Lösung enthielt nach der Extraktion des Lactons Ameisensäure (Reaktionen mit Silbernitrat und Sublimat); die Menge der Säure betrug zufolge der Titration etwa 2%.

α -Oxy-isobuttersaures Natrium.

Die Lösung von 0.25 Mol Salz in 100 ccn Wasser wurde zusammen mit dem aus 5 g Nickeloxyd und 3 g Aluminiumoxyd bestehenden Katalysator in den Hochdruck-Apparat gebracht. Dann wurde Wasserstoff bis auf einen Druck von 80 Atm. eingepumpt und 3 Tage bis auf 280° erwärmt. Nach dem Versuch war der Druck auf 40 Atm. zurückgegangen; die Analyse des Gases ergab 38.5% CH₄ und 63.2% CO₂.

In der Lösung war nach der Reaktion eine kleine Menge eines angenehm riechenden Öles enthalten, das mit Wasserdampf flüchtig war. Es ging in sehr weiten Grenzen, zwischen 120° und 210°, über. Nach Entfernung des Öles wurde durch Titration die Menge der unter Bildung von Carbonat zerfallenen Säure bestimmt; sie schwankte bei verschiedenen Versuchen zwischen 30 und 35%. Die Lösung wurde durch die berechnete Menge Schwefelsäure zersetzt und die abgeschiedene Isobuttersäure mit Äther extrahiert. Sie ging bei der Destillation bei 149—155° über, ihre Menge betrug 11.5—12.5 g, entspr. 50—60% der Theorie.

Analyse der bei 152—153° aufgesammelten Fraktion: 0.1696 g Sbst.: 0.3406 g CO₂, 0.1390 g H₂O. — 0.1996 g Sbst.: 0.3998 g CO₂, 0.1627 g H₂O.
C₄H₈O₂. Ber. C 54.50, H 9.16. Gef. C 54.77, 54.57, H 9.16, 9.11.

Die wäßrige Lösung wurde nach der Extraktion der Isobuttersäure durch Äther mit Ätznatron neutralisiert. Das erhaltene Salz gab die Reaktionen auf Essigsäure (Kakodyl-Reaktion und Verhalten gegen Eisenchlorid) und Ameisensäure (Reaktionen mit Silbernitrat und Sublimat).

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Hrn. Prof. W. Ipatiew meinen Dank für seine wertvollen Ratschläge abzustatten.

102. Ernst Waldschmidt-Leitz und Willibald Klein: Über Spezifität und Wirkungsweise von Erepsin, Trypsin und Trypsin-Kinase. (Dreizehnte Mitteilung zur Spezifität tierischer Proteasen.)

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München]
(Eingegangen am 10. Februar 1928.)

Die Ergebnisse der Untersuchungen über die Spezifität von Pankreas-Trypsin und Darm-Erepsin an synthetischen Peptiden und ihren Derivaten,

von denen wir vor kurzem berichtet haben¹⁾), erschienen geeignet, neue Grundlagen für unsere Kenntnis auch von der spezifischen Wirkungsweise der beiden Enzyme zu vermitteln. „Für die Ursache der Spezifitäts-Unterschiede von Trypsin und Erepsin“ gegenüber Peptiden, die auf Anzahl und Natur der vorhandenen Amino-säure-Reste zurückgeführt wurden, „ergab sich ein erster Hinweis aus dem bemerkenswerten Befund, daß die Änderung der spezifischen Spaltbarkeit einer Säure-amid-Bindung, in dem Dipeptid Glycyl-tyrosin, durch Einführung eines Acylrestes erreicht werden kann: Glycyl-tyrosin wird nur von Erepsin, β -Naphthalinsulfonyl-glycyl-tyrosin dagegen nur von Trypsin zerlegt“. Für diese Änderung der spezifischen Spaltbarkeit schien die Substitution der freien Aminogruppe einerseits, die eine Anlagerung des Erepsins verhinderte, die aciditäts-verstärkende Wirkung des Acylrestes auf die Carboxylgruppe andererseits, die die Anlagerung des Trypsins begünstigte, verantwortlich zu sein.

Die Versuche, von denen wir nachstehend berichten, haben dazu geführt, die entwickelten Anschauungen zu bestätigen und zu erweitern; sie versprechen einen vertieften Einblick in den Mechanismus der ereptischen und der tryptischen Wirkung, und sie führen zu einer neuen Vorstellung von dem funktionellen Einfluß des spezifischen Trypsin-Aktivators Enterokinase auf die Affinität des Trypsins. Wir stellen unsere Resultate über die Spaltbarkeit der untersuchten Peptid-Derivate durch Darm-Erepsin und durch Trypsin-Kinase nachstehend tabellarisch zusammen.

Tabelle I.

Spezifische Spaltbarkeit substituierter Peptide.

(Angaben bedeuten: — = keine nachweisbare, + = positive Hydrolyse, o = nicht geprüft.)

Nr.	Substrat	Enzym Darm- Erepsin	Trypsin- Kinase
1	β -Naphthalinsulfonyl-glycyl-tyrosin ²⁾	—	+
2	Glycyl-glycin-carbonsäure	—	o
3	Carbäthoxyl-glycyl-leucin	—	+
4	Carbäthoxyl-pentaglycin	—	o
5	Acetyl-glycyl-glycin	—	+
6	Acetyl-[phenyl-alanyl]-alanin	—	+
7	Benzoyl-diglycin	—	+
8	Benzoyl-triglycin	—	+ ³⁾
9	Benzoyl-tetraglycin	—	o
10	Benzoyl-pentaglycin	—	—
11	Phthalyl-diglycin	o	+
12	Glycyl-leucin-amid	+	—
13	Tetraglycin-amid	+	—
14	Carbäthoxyl-tetraglycin-amid	—	—

¹⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, H. Schlatter und W. Klein, B. 61, 299 [1927/28].

²⁾ Zufolge E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, H. Schlatter und W. Klein, a. a. O. ³⁾ Spaltbarkeit gering.

Die Feststellung, die erst an einem Beispiel beschrieben war, daß mit der Acylierung eines Dipeptides eine Änderung seiner spezifischen Spaltbarkeit verbunden ist, besitzt allgemeinere Gültigkeit: Dipeptide, die spezifischen Substrate des Erepsins, bilden durch Einführung von Acyl an der freien Aminogruppe, soweit untersucht unabhängig von dessen Natur, sei es der β -Naphthalinsulfonyl-, der Phthalyl-, der Benzoyl-, der Acetyl- oder der Carbäthoxylgruppe, ihre ereptische Spaltbarkeit ein, und sie werden spaltbar durch Trypsin, wie es scheint, ohne entscheidende Abhängigkeit von der Natur der im Peptid vorliegenden Amino-säure-Reste. Es verdient Beachtung, daß der Einfluß des eingeführten Säure-Restes, der die tryptische Spaltbarkeit bedingt, wie das Beispiel der benzoxylierten Glycin-peptide erkennen läßt (Nr. 7—10), mit der Länge der Peptid-Kette abnimmt und schon bei dem benzoxylierten Pentaglycin nicht mehr nachweisbar ist; es bedarf weiterer Prüfung, ob diese Erscheinung allgemein für die höheren acylierten Peptide, nicht nur für die aus Glycin-Resten aufgebauten, gilt, oder ob sie bei Gegenwart besonderer Amino-säure-Bausteine, wie des Tyrosins, nicht mehr beobachtet wird.

Weitere Beispiele, die die Tabelle verzeichnet, betreffen die Spaltbarkeit einiger amidierter Peptide durch tryptisches und ereptisches Enzym. Man erkennt, daß eine Amidierung der Carboxylgruppe in den Peptiden, ebenso wie eine Veresterung⁴⁾, keine Änderung in der Angreifbarkeit durch Erepsin zur Folge hat (Nr. 12 und 13), während eine gleichzeitige Acylierung wiederum den Verlust der ereptischen Spaltbarkeit bedingt (Nr. 14); keines der untersuchten Amide wird indessen durch Trypsin zerlegt.

Diese Erfahrungen insgesamt entsprechen der zuerst von H. v. Euler und K. Josephson⁵⁾ vertretenen Vorstellung, wonach es zur Wirkung des Darm-Erepsins auf ein Peptid, zu seiner Anlagerung, der Gegenwart einer freien Aminogruppe bedarf⁶⁾; eine Zerlegung acylierter Peptide durch proteolytisch einheitliches Erepsin ist noch nicht beobachtet worden⁷⁾. Für die Wirkung des tryptischen Enzyms dagegen findet man die Gegenwart freier Aminogruppen entbehrlich, seine Reaktion mit den Substraten scheint durch das Carboxyl vermittelt zu werden; allein die vorliegenden Beobachtungen sind noch nicht ausreichend, um diese Vorstellung, die auch den

⁴⁾ Zufolge H. v. Euler und K. Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122, u. zw. S. 124 und 137 [1926], sowie K. Josephson und H. v. Euler, ebenda **162**, 85 [1926/27].
⁵⁾ a. a. O.

⁶⁾ Nach Versuchen, die wir gemeinsam mit Hrn. Dr. W. Grassmann ausgeführt haben, scheint auch für die Wirkung des Erepsins aus Hefe, der Hefe-Dipeptidase, die Gegenwart einer freien Aminogruppe erforderlich zu sein; acylierte Peptide werden auch von dem Hefe-Enzym nicht angegriffen.

⁷⁾ Die früher mitgeteilte Beobachtung (E. Waldschmidt-Leitz, W. Grassmann und A. Schäffner, B. **60**, 359, u. zw. S. 364 [1927]) über eine geringfügige Spaltbarkeit von Acetyl-[phenyl-alanyl]-alanin durch Darm-Erepsin ist, wie wir feststellen konnten, auf einen geringen, damals vernachlässigten Gehalt des angewandten Enzym-Präparates an Trypsin zurückzuführen. Die Befunde von T. Imai andererseits (Ztschr. physiol. Chem. **136**, 205 [1924]), die über eine Spaltung benzoxylierter Peptide durch Darm-Erepsin berichten, beziehen sich auf die ungereinigten, trypsin-haltigen Auszüge der Darm-Schleimhaut, sie erlauben keine eindeutigen Aussagen über die Wirkungen der ereptischen Komponente.

Erfahrungen über die tryptische Hydrolyse tyrosin-haltiger Polypeptide⁸⁾, sowie amidierter Peptide entsprechen würde, eindeutig zu sichern.

Die Anschauung, die wir diskutieren, daß die Anlagerung des Trypsins an Peptide und ihre Acylderivate an der Carboxylgruppe erfolgt, gewinnt indessen an Sicherheit durch den Vergleich der Spezifität von Trypsin, dem nicht-aktivierten Enzym, mit der seiner Aktivator-Verbindung Trypsin-Kinase. Es ist sehr bemerkenswert, daß, wie Tabelle 2 belegt und wie aus dem experimentellen Teil zu ersehen ist, die tryptische Hydrolyse der beiden acylierten Peptide Carbäthoxyl-glycyl-leucin und Acetyl-[phenyl-alanyl]-alanin nach der Aktivierung mit Enterokinase keine Beschleunigung erfährt, daß dagegen die Spaltung des Tyrosin-Derivates β -Naphthalinsulfonyl-glycyl-tyrosin, wie schon früher belegt wurde⁹⁾, durch Trypsin-Kinase mit bedeutend gesteigerter Geschwindigkeit verläuft.

Tabelle 2.

Spezifität von Trypsin und Trypsin-Kinase gegenüber acylierten Peptiden.

(Angaben bedeuten: + = positive, ++ = verstärkte Hydrolyse.)

Nr.	Substrat	Trypsin	Trypsin-Kinase
1	Carbäthoxyl-glycyl-leucin	+	+
2	Acetyl-[phenyl-alanyl]-alanin	+	+
3	β -Naphthalinsulfonyl-glycyl-tyrosin	+	++

Wir schließen daraus, daß die spezifische funktionelle Aufgabe der Enterokinase in dem angeführten Beispiel in der Vermittlung oder in der Verstärkung der Bindung des Trypsins mittels der OH-Gruppe des Tyrosins besteht, während die Anlagerung des aktivator-freien Trypsins am Carboxyl allein erfolgt. Es wird unsere Aufgabe sein, diese Vorstellung, die vorerst nur als Arbeits-Hypothese zu bewerten ist, an einem umfangreicheren synthetischen Material zu prüfen; sie sollte zu bestimmteren Anhaltspunkten führen für die strukturelle Unterscheidung der schon durch Trypsin allein und der nur durch Trypsin-Kinase spaltbaren natürlichen Proteine.

Beschreibung der Versuche.

Das zu den Versuchen verwandte trypsin-freie Erepsin bereiteten wir nach E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner¹⁰⁾ aus Schweine-Darm, erepsin-freies Pankreas-Trypsin nach E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck¹¹⁾ aus dem Glycerin-Auszug von Schweine-Drüsen. Zur Aktivierung diente erepsin-freie Enterokinase, nach den Angaben von E. Waldschmidt-Leitz und G. Künstner¹²⁾ aus Darm-Schleimhaut

⁸⁾ Siehe dazu E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, H. Schlatter und W. Klein, a. a. O.

⁹⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, H. Schlatter und W. Klein, a. O., u. zw. S. 305.

¹⁰⁾ Ztschr. physiol. Chem. **151**, 31, u. zw. S. 51 [1925/26].

¹¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **147**, 286, u. zw. S. 301, **149**, 203, u. zw. S. 214 [1925].

¹²⁾ Ztschr. physiol. Chem. **171**, 290, u. zw. S. 209 [1927].

von Schweinen gewonnen; zur Darstellung enterokinase-freien Trypsins verfuhr man nach E. Waldschmidt-Leitz und K. Linderström-Lang¹³⁾. Den Verlauf der Hydrolysen ermittelte man auf Grund des Aciditäts-Zuwachses in 90-proz. Alkohol und mit Thymol-phthalein als Indicator.

Tabelle 3.
Einwirkung von Darm-Erepsin.

(Substrat-Lösungen mit *n*-NH₃ auf pH = 8.0 eingestellt; 30°; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommene Probe von 4.0 ccm.)

Nr.	Substrat	Angew. mg	Angew. Er.-E. 10 ³	Zeit Stdn.	Aciditäts- Zuwachs ccm 0.05-n.	Spaltung (%) bezug. auf 1 CO.NH
1	Glycyl-glycin-carbonsäure ¹⁴⁾	22.0	50	22	0.04	0
2	Carbäthoxyl-glycyl- <i>d</i> , <i>l</i> -leucin	39.0	70	12	0.02	0
3	Carbäthoxyl-pentaglycin ¹⁴⁾	46.9	50	22	0.07	0
4	Acetyl-glycyl-glycin	14.6	70	12	0.06	0
5	Acetyl- <i>d</i> , <i>l</i> -[phenyl-alanyl]- <i>d</i> , <i>l</i> -alanin	47.5	70	12	0.13	3
6	Benzoyl-triglycin	33.9	70	12	0.04	0
7	Benzoyl-tetraglycin ¹⁴⁾	43.8	50	22	0.02	0
8	Benzoyl-pentaglycin	46.5	70	12	0.01	0
9	Glycyl- <i>d</i> , <i>l</i> -leucin-amid	34.2	70	12	1.69	43
10	Tetraglycin-amid ¹⁴⁾	21.4	50	22	2.95	54
11	Carbäthoxyl-tetraglycin-amid ¹⁴⁾	39.6	50	22	0.01	0

Tabelle 4.
Einwirkung von Trypsin-Kinase.

(Substrat-Lösungen mit *n*-NH₃ auf pH = 8.4 eingestellt; 0.56, Nr. 4 und 7 0.96 T.-e., aktiviert mit Enterokinase; 12, Nr. 4 und 7 17 Std., 30°; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommene Probe von 4.0 ccm.)

Nr.	Substrat	Angew. mg	Aciditäts- Zuwachs ccm 0.05-n.	Spaltung (%) bezug. auf 1 CO.NH
1	Carbäthoxyl-glycyl- <i>d</i> , <i>l</i> -leucin	36.0	0.60	22
2	Acetyl-glycyl-glycin	14.6	0.23	14
3	Acetyl- <i>d</i> , <i>l</i> -[phenyl-alanyl]- <i>d</i> , <i>l</i> -alanin	43.8	0.76	24
4	Benzoyl-diglycin	36.8	0.63	18
5	Benzoyl-triglycin	27.4	0.16	9
6	Benzoyl-pentaglycin	57.8	0.00	0
7	Phthalyl-diglycin	61.8	2.45	46
8	Glycyl- <i>d</i> , <i>l</i> -leucin-amid	24.2	0.02	0
9	Carbäthoxyl-tetraglycin-amid ¹⁴⁾	32.1	0.01	0

¹³⁾ Ztschr. physiol. Chem. 166, 241 [1927].

¹⁴⁾ Man verdankte das Präparat der Freundlichkeit von Hrn. Dr. Herm. O. L. Fischer aus der Sammlung Emil Fischers.

Tabelle 5.

Hydrolyse-Geschwindigkeit acylierter Peptide mit Trypsin und Trypsin-Kinase.

(Substrat-Lösungen mit $n\text{-NH}_3$ auf $\text{pH}=8.4$ eingestellt; 0.72 T.-e., enterokinase-frei, a) ohne Aktivierung, b) nach Aktivierung mit Enterokinase angewandt; 9 Stdn., 30° ; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommene Probe von 4.0 ccm.)

Enzym	Angew. mg	Carbäthoxyl-glycyl- <i>d,l-leucin</i>		Acetyl- <i>d,l-[phenyl-alanyl]-d,l-alanin</i>		
		Aciditäts- Zuwachs ccm 0.05-n.	Spaltung (%)	Angew. mg	Aciditäts- Zuwachs ccm 0.05-n.	Spaltung (%)
Trypsin	51.2	1.48	38	40.1	0.78	27
Trypsin-Kinase ...	48.8	1.51	40	51.3	0.90	24

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

**103. Ernst Waldschmidt-Leitz und Gertrud Rauchalles:
Zur Spezifität der Peptidasen, II.: Vergleich der Peptid-Zucker-
Kondensation mit der Wirkungsweise des Erepsins.**

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München.]
(Eingegangen am 10. Februar 1928.)

Für die spezifische Wirkungsweise einiger der am Eiweiß-Abbau beteiligten Enzyme hat man in neuerer Zeit bestimmtere Anhaltspunkte gewonnen. So haben für das einfachste Beispiel, die Hydrolyse von Dipeptiden durch tierisches Erepsin, H. v. Euler und K. Josephson¹⁾ aus der verschiedenen Angreifbarkeit von Peptid-Derivaten und aus Hemmungs-Erscheinungen die Vorstellung abgeleitet, „daß die Bindung eines Substrates an das Erepsin aus Schweine-Darm wenigstens zum Teil durch eine freie Aminogruppe des Substrates vermittelt wird“; dieser Anschauung entsprechen die Erfahrungen über die enzymatische Spaltbarkeit einer größeren Anzahl von Peptid-Derivaten, von denen wir inzwischen berichtet haben²⁾, und die zu dem Ergebnis führen, daß die Substitution der freien Aminogruppe in den Peptiden beispielsweise durch Acyl ihre Angreifbarkeit durch Erepsin verhindert, eine Veränderung an der Carboxylgruppe dagegen sie unbeeinflußt läßt. Auch über die Natur der spezifischen substrat-bindenden Gruppe des Erepsins, die seine Anlagerung an die Aminogruppe vermittele, haben v. Euler und Josephson Betrachtungen angestellt; aus Versuchen über die Hemmung der Erepsin-Wirkung durch einige Aldehyd-Reagenzien,

¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **157**, 122 [1926]; K. Josephson und H. v. Euler, ebenda **162**, 85 [1926/27].

²⁾ siehe dazu E. Waldschmidt-Leitz, W. Grassmann und A. Schäffner, B. **60**, 359 [1927]; E. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner, H. Schlatter und W. Klein, B. **61**, 299 [1928]; E. Waldschmidt-Leitz und W. Klein, voranstehende Abhandlung.