

9-Phenyl-fluorenol-methyläther<sup>3)</sup>) zugefügt und in festverschlossener Flasche geschüttelt. Nach etwa 6 Stdn. setzte die Reaktion ein, erkenntlich an dem Auftreten einer orangen Färbung und der Abscheidung schöner, orange gefärbter Krystallchen. Das Schütteln wurde noch etwa 36 Stdn. fortgesetzt, dann rasch die Krystallchen mit weiteren 150 ccm wasser-freiem Äther fast völlig von dem unveränderten Natritimpulver abdekantiert und zu der ätherischen Suspension der Natriumverbindung 5 g frisch im Vakuum destilliertes Benzylchlorid (berechnete Menge + 10% Überschuß) zugefügt. Fast momentan trat unter Abscheidung von Kochsalz Entfärbung ein. Aus der filtrierten ätherischen Lösung wurde der Äther abdestilliert. Dabei schied sich bereits in der Wärme das Reaktionsprodukt in derben weißen Krystallen ab. Nach dem völligen Verjagen des Äthers wurde der Rückstand mit Methylalkohol verrieben, abgesaugt und getrocknet. Ausbeute: 8 g. Schmelzpunkt des so erhaltenen Produktes 133—134°. Durch Umlustrallisieren aus *n*-Propylalkohol erhält man weiße Blättchen, die bei 135.5—136° (unkorr.) schmelzen. Aus 3 Tln. Eisessig krystallisiert die Verbindung in derben, spröden, farblosen Prismen vom Schmp. 136—136.5° (unkorr.).

Die beim Verreiben mit Methylalkohol erhaltene Mutterlauge schied auch bei längerem Stehen nichts ab.

Elberfeld, Wissenschaftl. Alizarin-Laborat. d. I.-G. Farbenindustrie  
Akt.-Ges.

**302. Ernst Waldschmidt-Leitz und  
Gustav v. Schuckmann: Zur Struktur tierischer Skelettsubstanzen (Fünfte Mitteilung über enzymatische Proteolyse).**

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akadem. d. Wissenschaften in München u. d. Institut für Biochemie d. Deutsch. Techn. Hochschule in Prag.]  
(Eingegangen am 10. Juni 1929.)

In den Untersuchungen über die Struktur tierischer Gerüstsubstanzen, insbesondere des Seiden-Fibroins, welche zur Klasse der Eiweißkörper gehören, sind in den letzten Jahren die röntgenographischen Methoden besonders hervorgetreten. Die Vorstellung, welche aus den Ergebnissen der Röntgen-Analyse abgeleitet war, es sei die Seidenfaser aus kleinen Elementarbausteinen aufgebaut, etwa von dioxo-piperazin-artiger Struktur<sup>1)</sup>, schien in dieser Form auch für die besondere physiologische Resistenz dieser Körperklasse, ihre enzymatische Unangreifbarkeit, eine anschauliche Erklärung zu bieten<sup>2)</sup>. Zwar hat man diese Anschauungen unter dem Eindruck der vor allem durch die Untersuchungen von K. H. Meyer und H. Mark<sup>3)</sup> geförderten Erkenntnis, daß die Röntgen-Analyse nur über die Symmetrie, nicht über die molekulare Struktur von Stoffen Aussagen erlaube, mehr und

<sup>3)</sup> Schlenk u. Bergmann, A. **463**, 203 [1928].

<sup>1)</sup> R. O. Herzog und W. Jancke, B. **53**, 2162 [1920]; R. O. Herzog, Naturwiss. **11**, 172 [1923]; R. Brill, A. **434**, 204 [1923].

<sup>2)</sup> E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner, B. **58**, 1356 [1925].

<sup>3)</sup> B. **61**, 593, 1932, 1936, 1939 [1928].

mehr verlassen; allein es sollte nützlich sein, in den Erörterungen über die chemische Struktur tierischer Skelettsubstanzen die physiologische Eigenart dieser Körper, die sie von den übrigen Proteinen scharf unterscheidet, mehr zu beachten. Denn die nun vorliegenden Erfahrungen über die Spezifität und über die Wirkungsweise proteolytischer Enzyme<sup>4)</sup> gestatten bestimmte Rückschlüsse auch auf die Struktur enzymatisch nicht angreifbarer Komplexe, wenn auch ausschließender Art. Sie werden ergänzt durch Beobachtungen über die enzymatische Hydrolyse von Abbauprodukten aus tierischer Gerüstsubstanz, Keratin und Seiden-Fibroin, über die wir nachstehend kurz berichten.

Eine enzymatische Zerlegbarkeit von Abbauprodukten des Keratins, nämlich nach der Einwirkung von Hydroperoxyd oder von Brom-Eisessig auf das Protein, hat vor einigen Jahren Z. Stary<sup>5)</sup>, aber noch nicht mit einheitlichem und definiertem Enzymmaterial, beschrieben. Die Analyse mit definierten Enzymen, die wir vorgenommen haben, hat nun zu dem Ergebnis geführt, daß die in Anlehnung an Stary gewonnenen Abbauprodukte aus Keratin, welche schon von verd. Alkali leicht gelöst werden, nur durch tryptisches und gar nicht durch ereptisches Enzym gespalten werden. Man hat daraus zu schließen, daß bei der Einwirkung von Brom-Eisessig, wie von Hydroperoxyd auf Keratin keine Dipeptide, sondern nur Polypeptide freigelegt werden, welche nicht wohl der Aufspaltung von Dioxo-piperazin-Ringen entstammen können. Es ist auch bemerkenswert, daß nach der Anwendung der angeführten Abbauprozesse auf das Seiden-Fibroin nur geringe Mengen löslicher und keine enzymatisch spaltbare Produkte erhalten werden. Die Aufspaltung der Ringsysteme, die nach unserer Vorstellung für diese Gerüstsubstanzen kennzeichnend sein werden, dürfte im Falle des Keratins unter dem Einfluß der schwefel-haltigen Reste, welche in Sulfogruppen übergeführt zu werden scheinen, besonders leicht sich vollziehen.

Zur enzymatischen Analyse des Seiden-Fibroins haben wir daher das Produkt seiner unvollständigen Hydrolyse durch Säure, das sogen. „Seiden-Pepton“<sup>6)</sup>, auf seine enzymatische Zerlegbarkeit geprüft, wobei der Grad seines Abbaus als nicht einheitlich und als willkürlich anzusehen ist. Auch hier beobachtet man eine weitgehende Spaltbarkeit durch tryptisches Enzym, während die Produkte der tryptischen Einwirkung ihrerseits noch einer weitergehenden ereptischen Hydrolyse zugänglich sind. Die Schlußfolgerung, die wir aus diesen Befunden ableiten, daß auch im Seiden-Pepton Polypeptide von höherer Gliederzahl vorliegen, wird gestützt durch die alten und zu wenig beachteten Beispiele der Isolierung von Tetrapeptiden und Tripeptiden aus dem Seiden-Pepton zufolge E. Fischer und E. Abderhalden<sup>7)</sup>; auch entspricht sie den Beobachtungen von P. Brigl und E. Klenk<sup>8)</sup> über die Aufspaltung eines anderen Skleroproteins, des Elastins, mittels Phthalsäure-anhydrids, die zur Bildung von Phthalyl-polypeptiden führt.

Durch die angeführten Befunde erscheint die Gegenwart längerer Polypeptid-Ketten auch in den Proteinen der Gerüstsubstanz sichergestellt, so

<sup>4)</sup> vergl. E. Waldschmidt-Leitz, Collegium **1928**, 543.

<sup>5)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **144**, 147 [1925].

<sup>6)</sup> E. Fischer und E. Abderhalden, B. **39**, 754 [1906].

<sup>7)</sup> B. **40**, 3544 [1907].

<sup>8)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **131**, 66 [1923].

wie sie auch aus röntgenographischen Beobachtungen von K. H. Meyer und H. Mark<sup>9)</sup> für das Fibroin der Seide abgeleitet wird. Wenn hierin die Skleroproteine mit der großen Zahl der löslichen und enzymatisch zerlegbaren Eiweißstoffe Übereinstimmung zeigen, so fragt man nach der Ursache des besonderen chemischen und physiologischen Verhaltens der Gerüstsubstanzen, für das sich in einer abweichenden Zusammensetzung keine Erklärung bietet, und das auch nicht durch einen verschiedenen Grad der micellaren Aggregation allein bedingt sein könnte; man wird es auf strukturelle Unterschiede zurückzuführen haben. Der Gedanke erscheint naheliegend und diskutierbar, daß die in den Proteinen der Gerüstsubstanz vorliegenden längeren Peptid-Ketten durch eine säureamid-artige Verknüpfung ihrer endständigen Gruppen zu längeren, gestreckten Ringsystemen zusammengeschlossen werden, wie sie nach neueren röntgenographischen Messungen von J. R. Katz<sup>10)</sup> auch bei anderen hochmolekularen Substanzen angetroffen werden. Mit der aus der Röntgen-Analyse hervorgehenden Symmetrie, etwa für das Beispiel des Seiden-Fibroins, erscheint diese Vorstellung sehr wohl vereinbar, falls die jeweils reagierenden Peptide von gleicher Gliederzahl sind. Auch scheint uns die besondere Annahme eines micellaren Zusammenschlusses ungleich langer Hauptvalenz-Ketten, wie sie von K. H. Meyer<sup>11)</sup> zur Deutung unvollkommener oder fehlender gittermäßiger Anordnungen herangezogen wird, kaum nötig, wenn man bedenkt, daß die meisten der bekannten Eiweißstoffe, auch in den einfacheren Fällen, noch Gemische einander im chemischen Charakter ähnlicher und schwer trennbarer Komponenten<sup>12)</sup> darstellen werden. So geht aus einer demnächst zu veröffentlichten Untersuchung aus unserem Laboratorium „Über Protamine“ hervor, daß auch diese einfach zusammengesetzten Proteine, die man nach ihrer Darstellung und nach ihrem physiologischen Verhalten für einheitlich zu halten geneigt sein könnte, aus Komponenten ganz verschiedenartiger Zusammensetzung bestehen, in welche sie sich auflösen lassen. Die Aufgabe, den strukturellen Aufbau der Einzelkomponenten zu ermitteln und nach einer formelmäßigen Wiedergabe dafür zu suchen, erscheint mit ihrer Aufteilung nur der Lösung näher gerückt, aber kaum weniger bedeutungsvoll.

### Beschreibung der Versuche.

#### I. Spaltbarkeit der Einwirkungsprodukte von Brom-Eisessig auf Keratin und Fibroin.

##### 1. Einwirkung von Brom-Eisessig auf Keratin.

24 g mit Sodalösung gewaschene und mit Äther erschöpfend extrahierte Haarabfälle (aus menschlichem Haar) behandelte man, den Angaben von Z. Stary<sup>13)</sup> folgend, 4 Wochen unter tunlichstem Ausschluß von Licht

<sup>9)</sup> B. 61, 1932 [1928]; K. H. Meyer, Biochem. Ztschr. 208, 1, u. zw. S. 9 [1929].

<sup>10)</sup> Vortrag, gehalten auf der Tagung der Südwestdeutschen Chemie-Dozenten in Freiburg i. Br. im April 1929 (Ztschr. angew. Chem., im Druck).

<sup>11)</sup> vergl. Biochem. Ztschr. 208, 1, u. zw. S. 11 [1929].

<sup>12)</sup> vergl. die Beobachtungen über die komplexe Natur des Caseins von K. Linderström-Lang, Ztschr. physiol. Chem. 176, 76 [1928].

<sup>13)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 144, 147, u. zw. S. 151 [1925].

mit 24 g Brom in 200 ccm Eisessig und trennte in der Zentrifuge vom Ungelösten. Aus der Lösung isolierte man durch Ausfällen mit Wasser und wiederholtes Umfällen des Niederschlags aus verd. Sodalösung mittels Essigsäure einen großen Teil der gelösten Substanz (Präp. A), während der Rückstand von der Bromierung gleichfalls durch 3-maliges Umfällen mit Essigsäure aus Sodalösung, in welcher er sich vollständig löslich erwies, gereinigt wurde (Präp. B). Die mit Wasser nicht fällbare Fraktion der Brom-Eisessig-Lösung enthielt noch beträchtliche Mengen Substanz, welche man durch Eindampfen zur Trockne vom Lösungsmittel und von überschüssigem Brom nach Möglichkeit befreite (Präp. C); sie war dann löslich in Wasser, aber infolge der vorgenommenen Operationen wohl weitgehend verändert; wir prüften daher nur ihr Verhalten gegenüber ereptischem Enzym.

Die Prüfung auf enzymatische Spaltbarkeit nahm man an den in Wasser gelösten bzw. darin suspendierten Präparaten unter vergleichbaren Bedingungen vor und verfolgte ihre Hydrolyse durch Messung des Aciditäts-Zuwachses in alkoholischer Lösung.

Tabelle I.

Enzymatische Spaltbarkeit der Reaktionsprodukte von Brom-Eisessig und Keratin.

(Substratmenge entspr. einem Gehalt von 28 mg Stickstoff; 0.9 T.-(e.), mit Enterokinase aktiviert, bzw. 0.0014 Er.-E.<sup>14)</sup>; pH = 8.2 für die tryptische, bzw. 7.8 für die ereptische Wirkung; 30°; Gesamtvolumen 15.0 ccm; Angaben bedeuten den Aciditäts-Zuwachs in ccm 0.2-n. KOH).

Angew. Präparat	Trypt. Hydrolyse nach Std.		Erept. Hydrolyse nach Std.	
	20	40	20	40
A	1.10	1.10	0.00	0.02
B	1.50	2.20	0.02	0.03
C	—	—	0.20	0.20

2. Einwirkung von Brom-Eisessig auf Seiden-Fibroin.

10 g getrocknetes Seiden-Fibroin, nach den Angaben von E. Fischer und A. Skita<sup>15)</sup> von Seiden-Leim befreit, wurden 3 Wochen bei Zimmer-Temperatur der Einwirkung von 10 g Brom in 85 ccm Eisessig unterworfen. Das durch Waschen mit Eisessig von Brom befreite und im Exsiccator getrocknete Fibroin war danach makroskopisch verändert und leicht pulverisierbar, aber in Wasser und in verd. Sodalösung noch unlöslich; auch nach noch 2-mal wiederholter Einwirkung der Brom-Eisessig-Lösung, die wir mit einer Probe der Substanz vornahmen, war ihr Löslichkeitsverhalten nicht verändert. Die vom Unlöslichen in der Zentrifuge abgetrennte Brom-Eisessig-Lösung enthielt im Gegensatz zu der entsprechenden Lösung aus Keratin nur eine geringe Menge gelöster stickstoff-haltiger Substanz; sie gab beim Verdünnen mit Wasser nur wenig flockige Abscheidung, anscheinend einer Verunreinigung des Fibroins entstammend; ihre Prüfung auf enzymatische Spaltbarkeit wie die des ungelösten Fibroins nahm man, wie oben beschrieben, vor.

<sup>14)</sup> Die Enzym-Lösung bestand aus einem Gemisch von Dipeptidase und Poly-peptidase aus Darm-Schleimhaut. <sup>15)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 33, 177 [1901].

Tabelle 2. Enzymatische Spaltbarkeit der Reaktionsprodukte von Brom-Eisessig und Seiden-Fibroin.

(Substratmenge entspr. einem Gehalt von 28 mg Stickstoff (als Suspension angewandt); 0.9 T.-e., mit Enterokinase aktiviert, bzw. 0.0014 Er.-E.;  $p_H = 8.2$  für die tryptische, bzw. 7.8 für die creptische Wirkung;  $30^\circ$ ; Gesamtvolumen 15.0 ccm; Angaben bedeuten den Aciditäts-Zuwachs in ccm 0.2-n. KOH).

Angew. Präparat	Trypt. Hydrolyse nach Stdn.		Crept. Hydrolyse nach Stdn.	
	20	40	20	40
Ungelöstes Fibroin ....	0.01	0.01	0.00	0.00
Wasser-Fäll. d. Brom-Eisessig-Lösung .....	0.01	0.01	0.00	0.01

## II. Spaltbarkeit der Einwirkungsprodukte von Hydroperoxyd auf Keratin und Fibroin.

Einwirkung auf Keratin: 20 g Keratin (aus Menschenhaar) behandelte man nach Z. Stary<sup>16)</sup> 4 Wochen lang mit der Lösung von 24 ccm Perhydrol in 160 ccm 4-n.  $H_2SO_4$ . Den durch Waschen in der Zentrifuge mit Wasser von Schwefelsäure und überschüssigem Hydroperoxyd befreiten Rückstand reinigte man durch mehrmaliges Auflösen in verd. Sodalösung und Ausfällen mittels Essigsäure (Präp. A); er betrug etwa 50% von der angewandten Keratin-Menge und erwies sich als leicht pulverisierbar. Aus dem in der Zentrifuge abgetrennten, Hydroperoxyd und Schwefelsäure enthaltenden Extrakt entfernte man die Schwefelsäure mit Baryt und gewann aus dem Filtrat vom Bariumsulfat durch Eindampfen zur Trockne die gelöste Substanz (Präp. B); sie war leicht löslich in Wasser.

Einwirkung auf Fibroin: 12 g Fibroin wurden während 4 Wochen mit der Lösung von 15 ccm Perhydrol in 100 ccm 4-n.  $H_2SO_4$  behandelt. Nach dieser Einwirkung war das Fibroin schwach rötlich gefärbt, seine Menge war um etwa 15% vermindert. Die durch Waschen mit Wasser von Hydroperoxyd und Schwefelsäure befreite Substanz war in verd. Sodalösung nicht löslich; wir verwandten daher zur Prüfung auf enzymatische Spaltbarkeit ihre wässrige Suspension<sup>17)</sup>. Aus der Hydroperoxyd-Schwefelsäure-Lösung gewannen wir nach Entfernen der Schwefelsäure, wie oben, und Eindampfen zur Trockne eine geringe Menge wasser-löslicher Substanz (Präp. B).

Tabelle 3. Enzymatische Spaltbarkeit der Reaktionsprodukte von Hydroperoxyd mit Keratin und Fibroin.

(Substratmenge entspr. einem Gehalt von 28 mg Stickstoff; 0.9 T.-e., mit Enterokinase aktiviert, bzw. 0.0008 Er.-E.<sup>18)</sup>;  $p_H = 8.2$  für die tryptische, bzw. 7.8 für die creptische Wirkung;  $30^\circ$ ; Gesamtvolumen 15.0 ccm; Angaben bedeuten den Aciditäts-Zuwachs in ccm 0.2-n. KOH).

Angew. Präp.	Trypt. Wirkung beim Präp. aus				Crept. Wirkung beim Präp. aus				n.	20	40	n.	20	40	20	40	Stdn.
	Keratin	Fibroin	Keratin	Fibroin													
A	1.75	2.10	0.01	0.01	0.05	—	0.01	0.01									
B	0.80	0.80	0.01	0.01	0.25	0.55	0.01	0.02									

<sup>16)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **144**, 147, u. zw. S. 166 [1925].

<sup>17)</sup> Auch nach wiederholter Einwirkung von Hydroperoxyd und Schwefelsäure unter den angeführten Bedingungen, bei welcher eine weitere Gewichtsabnahme des Fibroins zu verzeichnen war, trat eine Änderung der Löslichkeit oder der enzymatischen Angreifbarkeit nicht ein.

<sup>18)</sup> Gemisch von Dipeptidase und Polypeptidase aus Darm-Schleimhaut.

### III. Spaltbarkeit von „Pepton“ aus Fibroin und hydroperoxyd-behandeltem Fibroin.

Aus dem Seiden-Fibroin und aus dem mit Hydroperoxyd behandelten Fibroin stellten wir nach dem Vorbilde von E. Fischer und E. Abderhalden<sup>19)</sup> durch 5-tägige Einwirkung von 70-proz. Schwefelsäure im Eis-Schrank die Pepton-Lösungen dar, welche dann mittels Baryts unter Kühlung von der Schwefelsäure befreit wurden. Die Einwirkung der proteolytischen Enzyme prüften wir unter vergleichbaren Bedingungen und jeweils bis zum Stillstand der enzymatischen Reaktion und verfolgten sie durch alkalimetrische Bestimmung des Aciditäts-Zuwachses in alkoholischer Lösung. Zur Beurteilung der Vollständigkeit der enzymatischen Hydrolyse diente der Vergleich mit der Hydrolyse durch verd. (25-proz.) Schwefelsäure bei 140°, deren Ausmaß durch Bestimmung der freien Aminogruppen nach van Slyke ermittelt war.

Tabelle 4.

#### Enzymatische Hydrolyse von „Pepton“ aus Fibroin und hydroperoxyd-behandeltem Fibroin.

(Pepton-Lösung entspr. einem Gehalt von 28 mg Stickstoff; Trypsin mit Enterokinase aktiviert; Erepsin-Lösung (Dipeptidase + Polypeptidase) aus Darm-Schleimhaut; pH = 8.2 für die tryptische, bzw. 7.8 für die ereptische Wirkung; 30°; Gesamtvolument 15.0 ccm; Angaben bedeuten den Zuwachs an ccm 0.2-n. COOH, bzw. NH<sub>2</sub>).

Angew. Reagens	Angew. Enzym-Einh.	Hydrolyse von					
		Pepton aus Fibroin			Pepton aus mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> behandl. Fibroin		
Tryps.-Kin.,	1. Einw. 0.5	1.10	1.10	—	0.70	0.70	—
	2. „ 1.0	0.55	0.55	—	0.70	0.71	—
	3. „ 1.0	0.00	0.00	—	0.00	0.01	—
Ereps. n. Tr.-K.,	1. Einw. 0.0010	0.70	1.10	1.10	0.50	0.50	—
„ „ „	2. „ 0.0010	0.50	0.90	0.90	0.35	0.35	—
„ „ „	3. „ 0.0010	0.60	0.60	—	0.30	0.30	—
„ „ „	4. „ 0.0010	0.30	0.30	—	0.10	0.10	—
Summe:		4.55			2.67		
Erepsin,	1. Einw. 0.0010	0.50	0.80	0.80	0.80	1.00	1.00
„	2. „ 0.0010	0.50	0.80	0.80	—	—	—
„	3. „ 0.0010	0.30	0.30	—	—	—	—
„	4. „ 0.0010	0.02	0.03	—	—	—	—
Summe:		1.93			7.50		
25-proz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 48 Stdn.							

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

<sup>19)</sup> B. 39, 754 [1906].