

Das Verhalten von Leucyl-phenylalanin, Leucyl-glycyl-glycin und von Alanyl-glycyl-glycin gegen Preßsaft der Leber vom Rinde.

Von

Emil Abderhalden und Peter Rona.

(Aus dem I. chemischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 8. August 1906.)

Der Abbau der Eiweißkörper in den Geweben erfolgt nach der jetzt herrschenden Ansicht über die Aminosäuren. Einen exakten Beweis für diese Anschauung besitzen wir nur insofern, als einige einfache Spaltstücke der Proteine unter bestimmten Verhältnissen im Harn nachweisbar sind. Es sei an das Auftreten von Cystin bei der Cystinurie erinnert und an die Möglichkeit, diese Aminosäure beim Hunde durch Eingabe von Halogenbenzol abzufangen. In die gleiche Reihe gehört das Glykokoll, das durch Eingabe von Benzoesäure gekuppelt und so vor dem weiteren Abbau geschützt werden kann. Unter bestimmten Bedingungen findet man im Urin auch andere Aminosäuren, wie Tyrosin, Leucin usw. Immerhin vermögen diese einzelnen Befunde die Annahme, daß das Eiweiß in den Geweben zunächst vollständig in die einfachsten Bausteine zerlegt wird und von diesen aus die Harnstoffbildung erst eingeleitet wird, nur zu stützen, sie erbringen jedoch nach dieser Richtung keinen vollgültigen Beweis. Es ist wohl denkbar, daß die Desamidierung bereits an komplizierteren Abbauprodukten der Proteine in den einzelnen Organen einsetzt. Es ist vorläufig wenig Aussicht vorhanden, durch Experimente am lebenden Tier einen exakten Einblick in den Abbau der Eiweißkörper in den Geweben und Zellen zu erhalten, weil zu viele Prozesse ineinander eingreifen, und die einzelnen Abbaustufen in rascher Reihenfolge bis zu dem einen Endgliede, dem Harnstoff, sich folgen. Auch die Autolyse ist nicht geeignet, Licht in diese Vorgänge

zu bringen, denn auch bei ihr erfahren wir vorläufig nichts über die Einzelheiten des Abbaus und die auftretenden Zwischenstufen. Die bisherigen Untersuchungen sagen nur aus, daß Aminosäuren neben komplizierteren Produkten entstehen. Unsere Methoden sind vorläufig noch nicht soweit ausgebildet, um den Abbau des Eiweißes unter der Einwirkung der proteolytischen Fermente in irgendwie exakter Weise zu verfolgen. Die Zahl der sich bildenden Spaltprodukte ist eine derart große, daß es zur Zeit unmöglich ist, all diese Abbauprodukte in genügend genauer Weise zu identifizieren. Dazu kommt noch, daß wir bei der Verwendung von Eiweiß zu derartigen Untersuchungen uns noch keine genügend genaue Vorstellung über den Aufbau des Ausgangsmaterials machen können. Viel aussichtsreicher ist die Angriffnahme der erwähnten Probleme mit Hilfe der von Emil Fischer dargestellten Peptide, und wir zweifeln, wie der eine von uns in Gemeinschaft mit Yutaka Teruuchi¹⁾ bereits hervorgehoben hat, nicht daran, daß mit ihrer Hilfe es erst möglich sein wird, in die feineren Vorgänge des intermediären Eiweißstoffwechsels einen Einblick zu gewinnen. Je höher die verwendeten Ketten von Aminosäuren sein werden, um so mehr dürfen wir hoffen, Verhältnissen nahe zu kommen, die der Verarbeitung von Proteinen durch die Körperzellen entsprechen. Wir kennen einerseits das Ausgangsmaterial ganz genau, und andererseits vermögen wir schon aus diesem Grunde die sich bildenden Spaltprodukte viel leichter zu isolieren. Die Methoden, die uns ein weiteres Vordringen in den Fermentabbau des Eiweißes ermöglichen werden, dürften wohl ausschließlich aus den mit den synthetisch dargestellten Peptiden gewonnenen Erfahrungen hervorgehen, wie der Befund von Dipeptiden beim partiellen Abbau der Seide und des Elastins bereits bewiesen hat.²⁾

¹⁾ Emil Abderhalden und Yutaka Teruuchi, Das Verhalten einiger Peptide gegen Organextrakte, Diese Zeitschrift, Bd. XLVII, S. 466, 1906.

²⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Bildung eines Dipeptids bei der Hydrolyse des Seidenfibroins, Berichte der Deutschen chem. Gesellsch., Jg. XXXIX, S. 752, 1906, und Bildung von Dipeptiden bei der Hydrolyse der Proteine. Ebenda, Jg. XXXIX, S. 2315, 1906.

In der vorliegenden Untersuchung prüften wir das Verhalten eines Dipeptids des Leucyl-phenylalanins (racemisch) und zweier Tripeptide — dl-Alanyl-glycyl-glycin und dl-Leucyl-glycyl-glycin — gegen Leberpreßsaft vom Rinde. Der Abbau des erstgenannten Peptids erfolgte asymmetrisch. Es ließ sich l-Leucin nachweisen, ferner Phenylalanin. Das zu erwartende aktive Peptid haben wir nicht isoliert. Das dl-Alanyl-glycyl-glycin ergab d-Alanin, Glycinanhydrid und Glykokoll. Durch Pankreassaft wird dieses Tripeptid in der Art abgebaut, daß d-Alanin abgespalten wird und Glycyl-glycin zurückbleibt.¹⁾ Es ist sehr wahrscheinlich, daß der Leberpreßsaft ganz analog zunächst d-Alanin in Freiheit setzt und das gebildete Glycyl-glycin dann weiter gespalten wird. Die Verhältnisse würden natürlich einfacher liegen, wenn wir aktives Tripeptid und zwar d-Alanyl-glycyl-glycin verwendet hätten. In diesem Fall dürfen wir nach dem vorliegenden Resultate erwarten, daß schließlich nur die Aminosäuren, Alanin und Glykokoll übrig bleiben. Wir werden unsere Versuche mit aktiven Peptiden wiederholen. Die vorliegenden Untersuchungen dienten mehr zur Orientierung und zur Vergleichung mit den entsprechenden Versuchen mit Pankreassaft. Der Abbau des dl-Leucyl-glycyl-glycins erfolgte vollständig analog dem dl-Alanyl-glycyl-glycin, indem l-Leucin, Glycyl-glycin und Glykokoll aufgefunden wurden. Auch diese Versuche zeigen, daß der tierische Organismus in seinen Geweben über sehr aktive proteolytische Fermente verfügt, deren Wirkungsweise, soweit unsere Beobachtungen reichen, derjenigen des Trypsins sehr nahe steht.

Es ist klar, daß nach dem Ausbau der Methoden der Eiweißforschung durch Emil Fischer und durch den Nachweis, daß im tierischen Organismus aktive proteolytische Fermente sehr verbreitet sind, in Analogie mit entsprechenden Versuchen in der Gruppe der Kohlehydrate und Fette, auch hier der Wunsch sich geltend machte, eine Umkehrbarkeit der Reaktion der proteolytischen Fermente nachzuweisen. Die Aus-

¹⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft und Magensaft, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 65 und 66, 1905.

sichten für das Gelingen derartiger Versuche sind aus verschiedenen Gründen einstweilen nicht sehr groß. Das Problem der synthetisierenden Fermente, das noch vor kurzem in rascher Reihenfolge ausgebaut zu werden schien, hat sich in neuester Zeit als viel komplizierter erwiesen, als man annahm, und in Wirklichkeit besitzen wir keinen einwandfreien Beweis für die Annahme, daß die Fermentreaktion praktisch im reinen Sinne des Wortes umkehrbar ist. Armstrong¹⁾ hat gezeigt, daß wenigstens bei der Synthese von Maltose resp. Isomaltose, ausgehend von Glukose, die betreffenden Fermente — Emulsin, Maltase — stets dasjenige Produkt aufbauen, das sie nicht zu spalten vermögen. Emulsin synthetisiert Glukose- α -Glukosid = Maltose und die Maltase β -Glukose zu Glukose- β -Glukosid = Isomaltose. Letztere wird nur durch Emulsin gespalten und die Maltose nur durch Maltase, nicht aber durch Emulsin. Durch diese Beobachtung ist die Deutung von Synthesen durch Fermente eine kompliziertere geworden. Es ist natürlich nicht gesagt, daß nicht trotzdem unter den im Organismus herrschenden Bedingungen eine reine Umkehrbarkeit der Fermentreaktion vorkommt. Beweise besitzen wir nicht. So viel Wahrscheinlichkeit es für sich hat, daß bei den zahlreichen Synthesen im Pflanzen- und Tierorganismus Fermente mitwirken, so muß doch betont werden, daß wir einstweilen einer Spekulation gegenüberstehen.

Das Problem der Synthese von Eiweiß resp. von Produkten eiweißartigen Charakters durch Fermente ist schon deshalb ein unendlich kompliziertes, weil wir noch einen viel zu geringen Einblick in den Aufbau des Eiweißes selbst haben. Es kommen all die zahlreichen Bausteine des Eiweißes in Betracht. Wir wissen nicht, in welcher Reihenfolge die einzelnen Aminosäuren zusammengefügt werden, von welchen Bedingungen ein derartiger Aufbau abhängt usw. Wir haben trotz all der vorauszusehenden Schwierigkeit das Problem dennoch in Angriff ge-

¹⁾ Edward Frankland Armstrong, Studien über Enzymwirkung. Die synthetische Wirkung von Säuren, verglichen mit derjenigen der Enzyme. Synthese von Maltose und Isomaltose. Proceed. of the Royal Society. Bd. LXXVI. S. 592, 1905.

nommen und bereits umfangreiche Versuche ausgeführt. Wir heben gleich hervor, daß es uns in keinem einzigen Falle gelungen ist, eine Synthese nachzuweisen. Allerdings begnügten wir uns nie, den Nachweis indirekt zu führen, d. h. aus der Menge der wiedergewonnenen Aminosäuren Schlüsse auf den fehlenden Rest im Sinne einer Synthese zu ziehen. Der Beweis einer stattgehabten Synthese ist natürlich nur dann als gesichert zu betrachten, wenn das entstandene Produkt nach allen Richtungen identifiziert ist. Wir besitzen auch einzelne Resultate, die vielleicht für eine Synthese sprechen, jedoch vermochten wir der geringen Menge des erhaltenen Produktes wegen den Beweis nie in korrekter Weise zu führen. Wir geben deshalb ausdrücklich alle unsere Versuche als negativ verlaufen an.

Wir verwendeten zu diesen Versuchen natürlich nur diejenigen Aminosäuren, welche den in der Natur vorkommenden entsprechen, und zwar haben wir vorläufig geprüft: Glykokoll + Glykokoll, Glykokoll + d-Alanin, Glykokoll + l-Leucin, d-Alanin + l-Leucin und Glykokoll + l-Tyrosin. Zu diesen Gemischen von je zwei Aminosäuren, die wir in möglichst konzentrierten Lösungen anwandten, setzten wir in einem Teil der Versuche aktivierten Pankreassaft, ferner Darmsaft und schließlich Preßsäfte aus dem Darm vom Hunde, Leberpreßsaft, Muskelpreßsaft und Nierenpreßsaft. Diese Proben bewahrten wir verschieden lange Zeit, eine Woche bis 4 Wochen bei 37° auf unter Zusatz von etwas Toluol. Nach dieser Zeit filtrierten wir die Proben von etwa ungelösten Produkten ab, verdampften dann die Lösung unter vermindertem Druck bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur zur Trockene und veresterten dann den Rückstand in gewohnter Weise unter Vermeidung einer zu lange dauernden Erwärmung. Die Ester wurden mit der genau berechneten Menge Natriumäthylat in Freiheit gesetzt. Nach dem Abfiltrieren des ausgefallenen Kochsalzes wurde die alkoholische Lösung der Ester unter vermindertem Druck bis 100° des Wasserbades destilliert. Der verbleibende, durchwegs geringe Rückstand wurde mit Äther von anhaftenden Aminosäureestern befreit und dann in Alkohol gelöst. Durch Einleiten von Ammoniak und Kochen versuchten wir etwa vorhandenen Di-

peptidester durch dessen Überführung in Anhydrid nachzuweisen. Es gelang dies jedoch in keinem Falle. Es konnten somit im günstigsten Falle nur Spuren höherer Peptide entstanden sein. Dies ist jedoch deshalb wenig wahrscheinlich, weil wir in den Fällen, in denen ein erheblicherer Rückstand bei der Destillation verblieben war, in diesem unverestert gebliebene einfache Aminosäuren nachweisen konnten. Schließlich untersuchten wir in jedem Einzelfalle das Destillat auf die Monoaminosäuren. Im Durchschnitt gewannen wir 80—95% des angewandten Materials wieder. Verluste waren bei der angewandten Methode unvermeidlich. Glykokoll isolierten wir als Esterchlorhydrat. Das zugesetzte Tyrosin konnten wir direkt durch Krystallisation ohne Anwendung der Veresterung quantitativ wiedergewinnen und ebenso das Leucin.

Wir geben diese Versuche trotz des bisherigen Mißerfolges nicht auf. Wir haben die Bedingungen bis jetzt ganz einseitig gewählt. Wir werden sie modifizieren. Eine sehr wichtige Frage ist die, mit welchen Fermenten man die meisten Aussichten auf Erfolg haben wird. Die Organfermente sind vielleicht deshalb ungeeignet, weil die einzelne Zelle unter den gewöhnlichen Verhältnissen wohl kaum in den Fall kommen dürfte, ihr Eiweiß von Grund aus aufzubauen. Die Körperzellen beziehen ihr Eiweiß aus dem Blutplasma. Sie erhalten fortwährend eine ganz gleichmäßig zusammengesetzte Nahrung.¹⁾ Jedenfalls besitzen die verschiedenartig funktionierenden Organzellen unter sich ein verschiedenes Baumaterial und gewiß auch verschieden aufgebaute Proteine. Es ist jedoch kaum wahrscheinlich, daß zu diesem Umbau beständig eine völlige Aufspaltung der Serumeiweißkörper erfolgt. Es entstehen wahrscheinlich vielmehr einige größere Bruchstücke neben kleineren. Es ist ja auch fraglich, ob bei der Synthese des Eiweißes aus den Verdauungsprodukten unter normalen Umständen ein ausschließlich aus Aminosäuren hervorgehender Aufbau stattfindet. Es ist wohl möglich, daß höhere Aminosäureketten, Polypeptide, eine große Rolle spielen, und daß sie vielleicht im Mittelpunkt der

¹⁾ Vergl. Emil Abderhalden, Lehrbuch der physiol. Chemie, S. 243ff. — Urban und Schwarzenberg, Berlin und Wien, 1906.

ganzen Synthese stehen. Daß sie jedoch in nur geringer Menge vorhanden zu sein brauchen, und trotzdem offenbar eine Synthese zu körpereigenem Eiweiß erfolgt, beweist unser Stoffwechselversuch, in dem es uns gelang, einen Hund mit sehr weit abgebautem Eiweiß im Stickstoffgleichgewicht zu erhalten.¹⁾ Jedenfalls dürfen wir erwarten, mit den Fermenten des Darmes selbst am ehesten zum Ziele zu gelangen, und wir beabsichtigen, unsere Versuche hauptsächlich mit den Preßsäften und dem Darmsaft verschiedener Darmabschnitte fortzuführen.

Experimenteller Teil.

1. Leucyl-phenylalanin (racemisch).²⁾ 2 g Leucyl-phenylalanin (racemisch) wurden in 70 cem 1%iger Natriumcarbonatlösung aufgelöst und nach Zusatz von 8 cem Leberpreßsaft und etwas Toluol 3 Tage im Brutraum aufbewahrt. Wir dialysierten nun nach dem Neutralisieren des Alkalis mit Salzsäure 3 Tage gegen Wasser und dampften das Dialysat unter vermindertem Druck zur Trockene ein. Den Rückstand veresterten wir und setzten die Ester mit der berechneten Menge Natriumäthylat in Freiheit. Die alkoholische Lösung der Ester wurde nun bei 0,2 mm Druck bis 100° des Wasserbades destilliert. Das Destillat enthielt Leucinester, wie die Verdampfung mit wässriger Salzsäure ergab. Es hinterblieben 0,25 g salzsaures Salz, das in Wasser gelöst $[\alpha]_{20}^D = + 14,0^\circ$ zeigte. Den Destillationsrückstand ätherten wir aus, um den etwa vorhandenen Phenylalaninester zu gewinnen. Die ätherische Lösung wurde mit wässriger Salzsäure durchgeschüttelt, der Äther abdestilliert und die salzsaure Lösung zur Trockene verdampft. Es verblieben 0,20 g salzsaures Salz. Es wurde mit Ammoniak abgedampft und das gebildete Chlorammon mit kaltem Wasser

¹⁾ Emil Abderhalden und Peter Rona, Über die Verwertung der Abbauprodukte des Caseins im tierischen Organismus, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 108, 1905.

²⁾ Wir verwandten das Gemisch der beiden vorhandenen und von Hermann Leuchs und Umetsuro Suzuki (Synthese von Polypeptiden. IV. Derivate des Phenylalanins. Berichte der Deutschen chem. Gesellschaft, Jg. XXXVII, S. 384, 1904) getrennten stereoisomeren Verbindungen. Es schmolz gegen 242° (korr.).

und schließlich der Rest durch Auskochen mit Alkohol entfernt. Es hinterblieb schließlich eine kleine Menge eines in Blättchen krystallisierenden Produktes, das sehr scharf die Phenylacetaldehydprobe gab. Im Destillationsrückstand befand sich höchstwahrscheinlich aktives und unverändertes Dipeptid. Es gelang nicht, diese Produkte genügend rein zu erhalten.

2. dl-Alanyl-glycyl-glycin. 2 g dieses Tripeptides wurden in 5 ccm Wasser gelöst und mit 8 ccm Leberpreßsaff versetzt. Nach dreitägigem Stehen im Brutraum unter Zusatz von Toluol wurde der Versuch abgebrochen. Auch hier wurde die Verdauungsflüssigkeit dialysiert, die Dialysate eingedampft, der Rückstand verestert und die Ester mit der berechneten Menge Natriumäthylat in Freiheit gesetzt. Beim Destillieren gingen mit dem Alkohol Aminosäureester über, wie schon der Geruch zeigte. Das Destillat wurde mit wässriger Salzsäure versetzt und dann zur Trockene verdampft. Den Destillationsrückstand ätherten wir zur Entfernung noch vorhandener Aminosäureester aus, schüttelten den Äther mit verdünnter Salzsäure durch und gaben die salzsaure Lösung zum Rückstand des Destillates und verdampften wieder zur Trockene. Es hinterblieb ein ganz beträchtlicher Rückstand von salzsauren Aminosäuren. Er wurde mit wenig Alkohol übergossen und gasförmige Salzsäure eingeleitet. Nach dem Impfen mit einem Kryställchen von Glykokollesterchlorhydrat erfolgte bald Abscheidung von Glykokollesterchlorhydrat. Seine Menge betrug 0,15 g. Es schmolz bei 144° (korr.). Die Mutterlauge vom Glykokollesterchlorhydrat dampften wir mit wässriger Salzsäure zur Trockene ein. Es hinterblieben beim Trocknen über Schwefelsäure und Kalk 0,4 g salzsaures Salz.

0,2133 g Substanz wurden in 5 ccm Wasser gelöst. Diese Lösung drehte Natriumlicht 0,30° nach rechts.

$$[\alpha]_{20}^D = + 7,0^\circ.$$

Es lag aller Wahrscheinlichkeit mit etwas Glykokoll verunreinigtes d-Alanin vor.

¹⁾ Vergl. Emil Fischer, Synthese von Polypeptiden I. Berichte der Deutsch. chem. Gesellsch., Jg. XXXVI, S. 2982, 1903.

Den Destillationsrückstand lösten wir in Alkohol und leiteten gasförmiges, trockenes Ammoniak ein. Vom sofort ausgefallenen Chlorammon filtrierten wir ab. Nach einigem stehen schieden sich feine Krystalle aus. Es handelte sich um Glycinanhydrid, wie die Darstellung des salzsauren Esters durch Kochen mit alkoholischer Salzsäure ergab. Das so erhaltene Produkt zersetzte sich gegen 180° (korr.). In der Mutterlauge des Glycinanhydrids befand sich offenbar noch unverändertes Tripeptid, und höchstwahrscheinlich waren auch noch andere Spaltstücke vorhanden. Eine Isolierung dieser Produkte gelang nicht.

3. dl-Leucyl-glycyl-glycin:¹ 3 g dieses Tripeptides wurden in 10 ccm Wasser gelöst, und nach Zusatz von 8 ccm Leberpreßsaft und etwas Toluol wurde die Lösung 3 Tage bei 37° aufbewahrt. Schon nach 24 Stunden beobachtete man an den Wänden des Gefäßes die Abscheidung feiner Krystallkrusen. Die Verarbeitung war dieselbe wie beim dl-Alanyl-glycyl-glycin. Gewonnen wurden 0,1 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 143° (korr.), 0,3 g l-Leucin und 0,4 g Glycinanhydrid.

0,1900 g Leucin drehten in 5 ccm 20° iger Salzsäure gelöst $0,55^{\circ}$ nach rechts.

$$\alpha_{20}^D = -14,5^{\circ}$$

Aus der großen Reihe von Versuchen, durch Fermente eine Synthese von Peptiden zu bewirken, seien einige angeführt, um die Versuchsbedingungen wiederzugeben. Was die Methode der Verarbeitung dieser Proben anbetrifft, sei auf die Einleitung verwiesen.

1. 5 g fein gepulvertes Glykokoll wurden mit 10 ccm Pankreassaft und etwas Toluol versetzt. Ein Teil des Glykokolls blieb ungelöst. Nach 14 Tagen ließen sich 4,2 g Glykokoll als Esterchlorhydrat wiedergewinnen.

2. 5 g Glykokoll wurden mit soviel Wasser versetzt, bis deren vollständige Lösung eingetreten war. Nun setzten wir 5 resp. 3 resp. 2 ccm Pankreassaft zu und ließen diese Proben 2, 3 und 4 Wochen bei 37° stehen. In allen Fällen konnten

¹ Emil Fischer, l. c.

80—90% des zugesetzten Glykokolls wiedergewonnen werden. Glycinanhydrid ließ sich nie nachweisen.

3. Denselben Versuch, wie Versuch 2, wiederholten wir mit Preßsaft aus der Leber vom Rind, vom Hunde, mit Nierenpreßsaft vom Hund, mit Darmpreßsaft vom Hund und Rind.

4. Mit d-Alanin und Glykokoll (je 5 g) wurde in ganz gleicher Weise verfahren. Das eine Mal wurden die Aminosäuren direkt im Pankreassaft oder im Organpreßsaft gelöst, bis die Lösung eine gesättigte war, oder aber es wurde zu einer gesättigten wässrigen Lösung die entsprechende Fermentlösung zugefügt.

In ganz derselben Weise sind die übrigen Versuche mit l-Tyrosin, l-Leucin usw. ausgeführt worden.