

Über ein Dipeptid- und Tripeptid-spaltendes Enzym des Speichels.

Von
A. H. Koelker.

Mit zwei Kurvenzeichnungen im Text.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Johns Hopkins-Universität.)
(Der Redaktion zugegangen am 28. August 1911.)

In den letzten Jahren erschienen verschiedene Arbeiten über die Verwendung eines Dipeptids — Glycyl-l-tryptophan — zur Diagnose des Magenkrebses. Das Prinzip der Methode beruhte augenscheinlich auf der Gegenwart eines Dipeptid spaltenden Enzyms im Magen einer an dieser Krankheit leidenden Person. Die Resultate der Diagnose waren zum Teil befriedigende, gleichzeitig erhoben sich aber auch Einwände dagegen.

Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von L. M. Warfield¹⁾ (enthält die Literatur) wirft neues Licht auf die wirkliche Unterlage, auf der das Prinzip der Diagnose beruht. Warfield zeigte, daß im Speichel selbst ein Dipeptid spaltendes Enzym vorhanden ist. Es ist möglich, daß das Enzym durch die gewöhnliche Anacidität der Krebsmagen nicht zerstört wird und deswegen im Mageninhalt bei dieser Krankheit erhalten bleibt. Daß Spuren von Salzsäure (0,04% HCl) das Dipeptid spaltende Ferment zerstören, wurde früher gezeigt.²⁾ Warfield zeigte, daß der schwach saure Speichel das Glycyl-tryptophan nicht spaltet. Da dieses Dipeptid nur für qualitative Versuche verwendbar ist, so wurden quantitative Untersuchungen in diesem Laboratorium mit der optischen Methode ausgeführt unter An-

¹⁾ L. M. Warfield, Johns Hopkins Hospital Bulletin, Bd. 22, S. 150 (1911).

²⁾ Abderhalden und Koelker, Diese Zeitschrift, Bd. 54, S. 384 (1908).

wendung von racemischem Alanyl-glycin als Substrat.¹⁾ Der eigene Speichel wurde fünfmal geprüft und der von acht anderen Personen ebenfalls untersucht. Die Sekrete selbst reagierten gegen Lackmuspapier zum Teil schwach sauer oder neutral, zum Teil schwach alkalisch. Die Hydrolyse war in allen Fällen positiv.

Ferner wurden hydrolytische Versuche ausgeführt mit d-Alanyl-d-alanin, Glycyl-l-tyrosin, racemischem Leucyl-glycin und racemischem Glycyl-alanin. Alle diese Dipeptide, mit Ausnahme des letzteren, wurden unter den angegebenen Bedingungen gespalten.

Es war ferner von besonderem Interesse, zu erfahren, wie das Tripeptid l-Leucyl-glycyl-d-alanin gespalten wird. Es hat sich herausgestellt, daß dasselbe zu l-Leucin und Glycyl-d-alanin hydrolysiert wird; somit habe ich festgestellt, daß die hydrolytische Wirkung des Speichels, in bezug auf dieses Tripeptid, identisch ist mit der des Erepsins des Hundedarms.²⁾

Ob das Enzym mit dem Speichel sezerniert wird oder aus den Bakterien der Mundhöhle stammt, wurde nicht näher untersucht. Vermutlich wird ersteres der Fall sein, denn bekanntlich findet man ein erepsinähnliches Enzym in fast allen Gewebeextrakten des tierischen Organismus.

Bis jetzt hat man ein Dipeptid spaltendes Ferment im normalen Magensaft nicht finden können. Wahrscheinlich genügt der normale Salzsäuregehalt, um das eventuell sezernierte Enzym vollkommen zu zerstören. Es ist möglich, daß man, bei Abwesenheit von Säure, wird feststellen können, daß ein

¹⁾ A. H. Koelker, Journal of Biological Chemistry, Bd. 8, S. 145 (1910).

²⁾ In Gemeinschaft mit Herrn B. M. Bernheim und H. B. Stone, von der hiesigen Universität, wurde die hydrolytische Wirkung des Hundetrypsins und -Erepsins (aus Fisteltieren) auf l-Leucyl-glycyl-d-alanin geprüft. Ersteres löst, wie auch schon früher gezeigt wurde, den Zusammenhang zwischen dem zweiten und dritten Glied der Kette (Diese Zeitschrift, Bd. 54, S. 374, 1908). Erepsin aber bewirkt eine Trennung zwischen dem ersten und zweiten Glied. Die Resultate erscheinen demnächst in The Journal of Biological Chemistry, 1911.

Dipeptid spaltendes Ferment direkt von der Schleimhaut sezerniert wird.

Experimentelles.

Bereitung des Speichels. Der Speichel wurde direkt durch Ausspeien in mit Toluol beschickte Gefäße aufgefangen. Für Versuch I und II wurde er sofort filtriert und direkt verwendet. Für Versuch III und IV wurde der frisch aufgefangene Saft erst 40 Stunden lang der Selbstverdauung bei 38° überlassen, dann filtriert und sofort verwendet.

Versuch I. Die Reaktion des Sekretes war schwach sauer. 5 ccm wurden mit 5 ccm einer normalen Lösung von racemischem Alanyl-glycin ($1/800$ mol. der d-Verbindung) gemischt und die Hydrolyse bei 38° verfolgt. Toluol wurde in allen Versuchen benutzt, um die Wirkung der Mikroorganismen auszuschalten. Die Größe der Spaltung des Dipeptids in Prozenten wurde aus der Größe der optischen Drehung der Ebene des polarisierten Lichts im 1 dm-Rohr berechnet.

Tabelle I.

Zeit in Tagen	Drehung im 1 dm-Rohr bei 20° mit weißem Licht	Spaltung in %
0	0°	0 (+ 2)
2	-0,23°	16
5	-0,55°	34
20	-1,31°	81

Versuch II. Die Speichel von acht Personen wurden nun geprüft. Die Reaktion der Säfte selbst gegen Lackmuspapier wird in der Tabelle angegeben. In den Versuchen wurde eine Menge von je 5 ccm wasserklarer Speichel mit 1,9 ccm einer normalen Lösung von racemischem Alanyl-glycin (0,139 g der d-Verbindung) gemischt und die Größe der Spaltung in Prozenten nach den angegebenen Zeiten aus der im 1 dm-Rohr beobachteten Drehung bestimmt. Kontrollversuche, mit den Säften allein, wurden selbstverständlich ausgeführt und die nötigen Korrekturen in Rechnung gezogen.

Tabelle II.

Lau- fende Num- mer	Reaktion des klaren Safts gegen Lackmus- papier	Sofort	Nach 21 Stunden		Nach 3 Tagen		Nach 4 Tagen		Nach 18 Tagen	
		Drehung ¹⁾	Drehung	%	Drehung	%	Drehung	%	Drehung	%
1	merklich sauer	0,00° (+ 0,02°)	—	—	-0,62°	65	-0,72°	75	-0,95°	100
2	merkl. sauer	0,00°	—	—	-0,65°	68	-0,79°	83	-0,94°	99
3	sehr schwach sauer	0,00°	-0,14°	15	-0,45°	47	-0,50°	52	-0,92°	97
4	s. schw. sauer	0,00°	—	—	-0,51°	53	-0,62°	65	-0,94°	99
5	neutral	0,00°	—	—	-0,71°	74	-0,81°	84	-0,95°	100
6	»	0,00°	—	—	-0,59°	62	-0,70°	73	-0,95°	100
7	sehr schwach alkalisch	0,00°	-0,16°	17	-0,53°	55	-0,65°	68	-0,95°	100
8	s. schw. alkal.	0,00°	-0,16°	17	-0,51°	53	-0,64°	67	-0,89°	95

Die Reaktionsgeschwindigkeit der verschiedenen Säfte hängt anscheinend wenig ab von der geringen Acidität oder Alkaleszenz des Speichels selbst. Fünf andere Speichel wurden mit racemischem Alanyl-glycin geprüft. In keinem Versuch blieb die asymmetrisch hydrolytische Wirkung auf Alanyl-glycin aus. Warfield fand bei Glycyl-tryptophan einen Unterschied. Er benutzte allerdings eine viel kleinere Menge des Dipeptids.

Versuch III. Spaltungsversuche mit racemischem Alanyl-glycin, d-Alanyl-d-alanin, Glycyl-l-tyrosin, racemischem Leucyl-glycin und racemischem Glycyl-alanin in mol. Mengen, bezogen auf die biologisch wichtige Komponente. Diese fünf Experimente und auch der Versuch IV wurden zu gleicher Zeit ausgeführt mit der gleichen Speichelprobe Nr. 10.

¹⁾ Diese Drehungen wurden im 1 dm-Rohr bei 20° mit weißem Licht bestimmt.

Tabelle III.

Zeit in Stunden	Nr. 1 Rac. Alanyl-glycin 2,50 ccm norm. Lösung ($\frac{1}{800}$ mol. d-Alanyl- glycin = 0,183 g) 2,50 ccm Speichel Nr. 10		Nr. 2 d-Alanyl-d-alanin 0,200 g Dipeptid ($\frac{1}{800}$ mol.) 2,40 ccm physiolog. Kochsalzlösung 2,50 ccm Speichel Nr. 10		Nr. 3 Glycyl-l-tyrosin 0,296 g wasserfreies Dipeptid ($\frac{1}{800}$ mol.) 17,50 ccm physiolog. Kochsalzlösung 2,50 ccm Speichel Nr. 10		Nr. 4 Rac. Leucyl-glycin 12,5 ccm einer $\frac{1}{8}$ -nor- mal. Lösung ($\frac{1}{800}$ mol. l-Leucyl-glycin) 10,00 ccm physiolog. Kochsalzlösung 2,50 ccm Speichel Nr. 10		Nr. 5 Rac. Glycyl-alanin 0,365 g Dipeptid (0,183 g Glycyl- d-alanin = $\frac{1}{800}$ mol.) 2,50 ccm physiolog. Kochsalzlösung 2,50 ccm Speichel Nr. 10	
	korr. Winkel im 1 dm-Rohr 37°	Spaltung in %	korr. Winkel im 1 dm-Rohr 37°	Spaltung in %	korr. Winkel im 2 dm-Rohr 37°	Spaltung in %	korr. Winkel im 1 dm-Rohr 20°	Spaltung in %	korr. Winkel im 1 dm-Rohr 37°	Spaltung in %
$\frac{1}{4}$	0,00°	0 ($\pm 1,5$)	-0,78°	0 (± 3)	+1,02°	0	0,00°	0,00°	0 (± 1)	
7	-0,04°	3	-0,75°	3	+1,01°	—	—	—	—	
22	-0,15°	9	-0,69°	10	—	—	—	—	—	
49	-0,23°	14	-0,65°	14	+0,98°	ca. 4	—	—	—	
72	-0,28°	18	-0,64°	16	—	—	—	—	—	
190	-0,55°	34	-0,53°	28	—	—	—	—	—	
212	-0,59°	37	-0,46°	36	—	—	—	—	—	
284	-0,73°	45	-0,47°	34	+0,93°	ca. 9	-0,20°	0,00°	0	

In den folgenden Schemen werden die Werte angegeben für $\frac{1}{100}$ der molekularen Drehungsvermögen der Dipeptide und deren Spaltungsprodukte, der Aminosäuren. Diese Werte wurden berechnet aus den von E. Fischer und seinen Mitarbeitern gefundenen Werten für die spezifischen Drehungsvermögen. Diese letzteren wurden fast durchweg bei 20° mit Natriumlicht bestimmt. Die Konzentrationen der wässrigen Lösungen bei diesen Bestimmungen variierten zwischen 2 und 10%. Um nun die gefundenen Drehungen in Versuch III mit den berechneten Drehungen zu vergleichen, habe ich letztere auf 1 dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht umgerechnet, und zwar für jedes der untersuchten Peptide dieses Versuchs bei 0% und 100% Hydrolyse. Diese berechneten Werte werden rechts angegeben.

Tabelle IV.

$\left. \begin{array}{l} +2,4^\circ \quad 0^\circ \\ \overbrace{\text{d-Alanyl-glycin}} \\ \overbrace{\text{l-Alanyl-glycin}} \\ -75,4^\circ \end{array} \right\} 0^\circ$	Versuch III. Nr. 1. Rac. Alanyl-glycin Berechnete Drehung im 1 dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht bei 0% Hydrolyse 100% Hydrolyse <hr/> 0° $-1,83^\circ$	
$\left. \begin{array}{l} +2,4^\circ \quad +2,4^\circ \\ \overbrace{\text{d-Alanyl-d-alanin}} \\ -34,6^\circ \end{array} \right\} -34,6^\circ$	Versuch III. Nr. 2. d-Alanyl-d-alanin Berechnete Drehung im 1 dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht bei 0% Hydrolyse 100% Hydrolyse <hr/> $-0,87^\circ$ $+0,12^\circ$	
$\left. \begin{array}{l} 0^\circ \quad -50^\circ \\ \overbrace{\text{Glycyl-l-tyrosin}} \\ +121^\circ \end{array} \right\}$	Versuch III. Nr. 3. Glycyl-l-tyrosin Berechnete Drehung im 2 dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht bei 0% Hydrolyse 100% Hydrolyse <hr/> $+1,52^\circ$ $-0,62^\circ$	

¹⁾ Das spezifische Drehungsvermögen des l-Tyrosins in Wasser wurde bestimmt: 0,181 g, gelöst in 100 ccm Wasser, drehten im 2 dm-Rohr bei 20° mit Natriumlicht $-0,10^\circ$. Mithin $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ (\pm 5,0)$.

$\left. \begin{array}{r} -13,6^\circ \quad 0^\circ \\ \overbrace{\text{l-Leucyl-glycin}} \\ \overbrace{\text{d-Leucyl-glycin}} \\ -161,8^\circ \end{array} \right\} 0^\circ$	Versuch III. Nr. 4. Rac. Leucyl-glycin Berechnete Drehung im 1 dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht bei	
	0% Hydrolyse	100% Hydrolyse
	0°	-0,88°
$\left. \begin{array}{r} 0^\circ \quad +2,4^\circ \\ \overbrace{\text{Glycyl-d-alanin}} \\ \overbrace{\text{Glycyl-l-alanin}} \\ +73,0^\circ \end{array} \right\} 0^\circ$	Versuch III. Nr. 5. Rac. Glycyl-alanin Berechnete Drehung im 1 dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht bei	
	0% Hydrolyse	100% Hydrolyse
	0°	+1,89°

Bei den Fermenthydrolysen wurden aber die Ablesungen stets bei 37° im 1 dm-Rohr ausgeführt unter Anwendung von Auerlicht und von gewöhnlichem Bichromatfilter. Kleine Unterschiede in der Größe der berechneten und gefundenen Drehungen können aus diesen Gründen entstehen. Theoretisch sollen die letzteren etwas geringer sein, was auch der Fall ist.

Um nun den Grad der Spaltung in Prozenten bei der Wirkung der Fermente zu berechnen, habe ich die Drehung bei 100% Spaltung für die einzelnen Peptide festgestellt, unter Benutzung von sehr aktivem Hefesferment.

Versuch IV. Spaltung von l-Leucyl-glycyl-d-alanin. Dieser Versuch, welcher mit der vorhergehenden Serie ausgeführt wurde, wird der besseren Übersicht halber hier angegeben.

0,324 g Tripeptid ($\frac{1}{500}$ mol.)
 7,45 ccm physiologische Kochsalzlösung
 2,50 „ Speichel Nr. 10
 (also $\frac{1}{8}$ mol. Lösung).

Zeit in Stunden	Korr. Winkel im 1 dm-Rohr bei 37°
¼	+ 0,63°
7	+ 0,52°
22	+ 0,25°
49	- 0,21°
72	- 0,55°
190	- 0,90°
212	- 0,88°
284	- 0,83°

Das optische Drehungsvermögen des Tripeptids l-Leucyl-glycyl-d-alanin und seiner hydrolytischen Spaltprodukte in Wasser ist folgendes:

	C %	$[\alpha]_D^{20}$ in Wasser	Berechnet für $\frac{1}{100}$ des molekularen Drehungs- vermögens	Berechnete Drehung in einer $\frac{1}{8}$ mol. Lösung im 1 dm-Rohr bei 20° und Natriumlicht
l-Leucyl-glycyl-d-alanin	10	+ 20,3° ($\pm 0,2^\circ$)	+ 52,6°	+ 0,66°
l-Leucin	2	- 10,3° ($\pm 0,5^\circ$)	- 13,6°	- 0,17°
Glycyl-d-alanin	8,7	- 50,0° ($\pm 0,3^\circ$)	- 73,0°	- 0,91°
l-Leucyl-glycin	10	+ 86,0° ($\pm 0,2^\circ$)	+ 161,8°	+ 2,02°
d-Alanin	10	+ 2,7° ($\pm 0,1^\circ$)	+ 2,4°	+ 0,03°

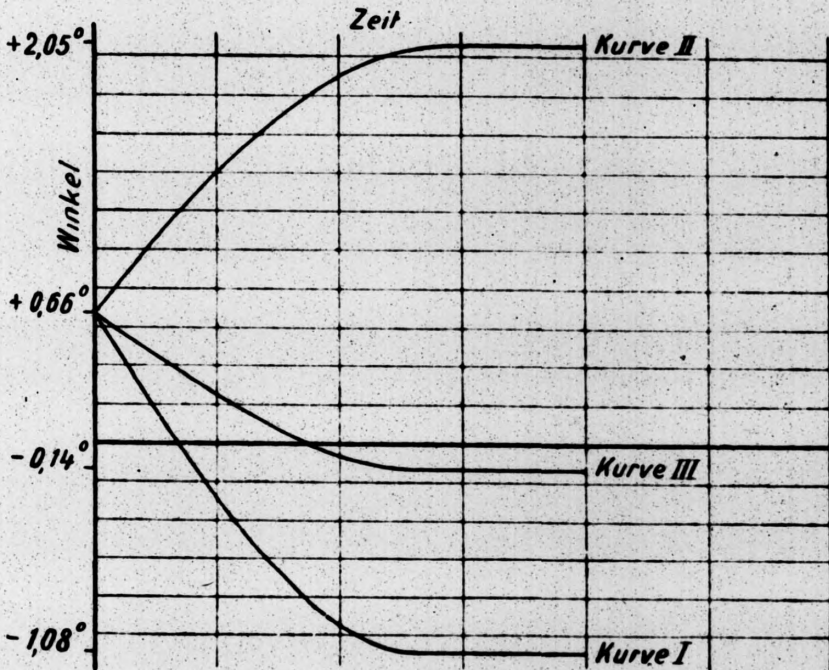
Aus den Zahlen in der letzten Reihe rechts läßt sich leicht berechnen, wie groß die Drehung im 1 dm-Rohr sein soll, wenn das Tripeptid, in $\frac{1}{8}$ mol. Lösung, quantitativ zwischen dem ersten und zweiten Glied der Kette durch Fermente gespalten wird. Bei 0% der Hydrolyse beträgt sie + 0,66°, bei 100% - 1,08°. Kurve I gibt die graphische Darstellung bei dieser Spaltung wieder. Die berechneten Drehungen bei quantitativer Spaltung des Tripeptids in derselben Konzentration zwischen dem zweiten und dritten Glied der Kette sind bei 0% Hydrolyse + 0,66°, bei 100% + 2,05°. Kurve II gibt die graphische Darstellung bei einer solchen Hydrolyse wieder. Wenn das Tripeptid gleichzeitig in demselben Maße zwischen dem ersten und zweiten Glied und zwischen dem zweiten und dritten Glied gespalten wird, läßt sich die Drehung berechnen zu + 0,66° bei 0% Hydrolyse und zu - 0,14° bei 100% Hydrolyse. Siehe Kurve III. Wenn nun die Spaltungen nicht in gleichen Verhältnissen an den beiden Angriffspunkten vor sich gehen, kann man natürlich Kurven berechnen und zeichnen, welche Resultanten der Kurve I und III und der Kurve II und III sind.

Kurve IV gibt nun die graphische Darstellung der Hydrolyse des Tripeptids durch Speichelferment wieder. Diese Kurve

ist fast identisch mit der Kurve I. Die Spaltung des Tripeptids ist also quantitativ zwischen dem ersten und zweiten Glied der Kette vor sich gegangen. Diese Kurve ist identisch mit derjenigen, welche für Hunderepsin gefunden wurde,¹⁾ und somit ist es sicher, daß die hydrolytische Wirkung des Speichels auf das Tripeptid dieselbe ist wie die des Erepsins.

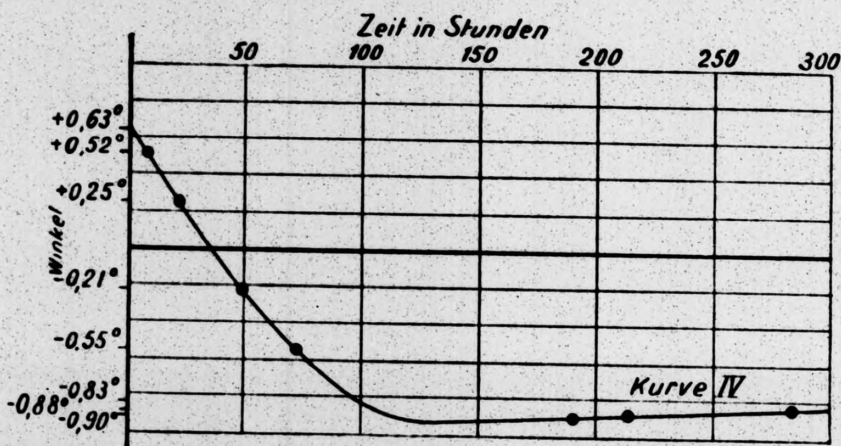
In der Kurve IV bemerkt man, daß die maximale Drehung von $-0,90^\circ$ langsam, bei längerer Wirkung des Ferments, zurückgeht. Das gebildete Glycyl-d-alanin wird langsam zu den beiden Aminosäuren abgebaut; diese Möglichkeit war auch vorauszusehen! Dieselbe langsame Abnahme der Maximaldrehung war auch bei der Wirkung des Erepsins zu bemerken.

Die drei theoretischen Kurven für die Hydrolyse von l-Leucyl-glycyl-d-alanin:



Die gefundene Kurve für die Hydrolyse von l-Leucyl-glycyl-d-alanin durch das Speichelferment:

¹⁾ Siehe Fußnote S. 28.



Schlußfolgerungen.

I. Die Hydrolyse des Tripeptids l-Leucyl-glycyl-d-alanin durch Speichelferment verläuft quantitativ zwischen dem ersten und zweiten Glied der Kette, unter Bildung von l-Leucin und Glycyl-d-alanin.

II. Die Hydrolyse des Tripeptids erfolgt rascher als die des racemischen Alanyl-glycins.

III. Das bei der Spaltung des Tripeptids gebildete Glycyl-d-alanin wird sehr langsam weiter zu den zwei Aminosäuren abgebaut.

IV. Die Kurve, welche das graphische Bild der Spaltung darstellt, ist mit derjenigen, welche bei der Wirkung des Erepsins auf das Tripeptid erhalten wurde, identisch. Die hydrolytische Wirkung des Speichels ist also identisch mit der des Erepsins, soweit sie das Tripeptid betrifft.

V. d-Alanyl-d-alanin, racemisches Alanyl-glycin, racemisches Leucyl-glycin und Glycyl-l-tyrosin werden von dem Speichel hydrolysiert.

VI. Racemisches Glycyl-alanin wurde nicht von dem untersuchten Speichel gespalten, während das bei der Hydrolyse des Tripeptids gebildete Glycyl-d-alanin weiter gespalten wird in Glycin und d-Alanin.

VII. Der schwach saure oder alkalische Charakter des aufgefundenen Speichels scheint die Hydrolyse des racemischen Alanyl-glycins, in qualitativer Hinsicht, nicht zu beeinflussen.