

Weitere Beiträge zur Kenntnis der proteolytischen Fermente der tierischen Organe.

Von

Emil Abderhalden

und **Andrew Hunter**, Carnegie Research Fellow, Edinburgh.

(Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Berlin.)
(Der Redaktion zugegangen am 30. Juli 1906.)

Vor kurzem hat der eine von uns in Gemeinschaft mit Dr. Teruuchi¹⁾ über die Einwirkung von wässerigen Auszügen der Leber des Rindes auf einige Peptide berichtet. Es ergab sich, daß das genannte Organ außerordentlich wirksame proteolytische Fermente enthält. Es wurden Peptide, wie das Leucyl-glycin und Glycyl-glycin, die von aktiviertem Pankreassaft nicht in nachweisbarer Menge gespalten werden, vom Leberextrakt angegriffen. Beim Leucyl-glycin ließ sich feststellen, daß die Spaltung asymmetrisch verläuft, d. h. es war offenbar l-Leucin abgespalten worden. Es war wünschenswert, diese Versuche auf weitere Organe auszudehnen, und vor allem war es von Interesse, auch andere Peptide in den Kreis dieser Untersuchungen zu ziehen; und ferner festzustellen, ob die entsprechenden Organe verschiedener Tierarten in qualitativer und quantitativer Beziehung sich ähnlich verhalten, oder aber, ob sich Unterschiede nachweisen lassen. Es ist bereits bei der ersten Mitteilung betont worden, daß eine exakte Verfolgung der proteolytischen Zellfermente einstweilen einzig und allein mit Hilfe der Peptide möglich ist, denn von ihnen kennt man genau die Struktur; ferner kann auch im Einzelfalle die Frage entschieden werden, welchen Einfluß die Konfiguration der einzelnen Verbindungen hat.

Bei der vorliegenden Untersuchung benutzten wir nicht wässrige Auszüge von Organen, sondern direkt Organpreßsaft. Auf die Bedeutung solcher Preßsäfte zu physiologischen Untersuchungen hat namentlich E. Buchner hingewiesen. Seiner

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

Freundlichkeit verdanken wir auch die genaueren Angaben ihrer Darstellung. Sie ist der Gewinnung des Hefepreßsaftes im Prinzip nachgeahmt. Auch hier wird zunächst das Organ im Mörser mit Seesand möglichst fein zerrieben, dann mit Kieselerde innig vermennt und zwar mit einer solchen Menge, daß das Ganze eine plastische Masse bildet. Diese wird dann in Segeltuch eingepackt und unter der hydraulischen Presse bis zu 300 Atmosphären Druck ausgepreßt. Der zunächst abfließende Saft, der zum großen Teil aus Wasser und Blut besteht, wurde nicht benützt, sondern erst der bei höherem Druck ausfließende. Um Störungen in der Gewinnung des Preßsaftes zu vermeiden, empfiehlt es sich, den Druck beim Auspressen ganz allmählich zu steigern. Den abfließenden Saft sammelten wir in einem in Eis eingepackten Gefäße, in dem sich etwas Toluol befand. Aus 1 kg Leber erhielten wir, je nach der Dauer des Pressens, 100—150 ccm Preßsaft. Er war ganz klar und rötlich gefärbt. Zur Entfernung von mitgerissenen Bestandteilen und des größten Teiles des Fettes zentrifugierten wir den Preßsaft. Wir verwandten ihn dann sofort. Die benutzten Organe stammten alle von frisch getöteten und entbluteten Kaninchen. Verwendet wurde Muskel-, Leber- und Nierenpreßsaft. Zur Prüfung kamen die folgenden drei Peptide: dl-Leucyl-glycin, Glycyl-dl-alanin und Glycyl-glycin.

Das Resultat dieser Untersuchung war, daß die drei verwendeten Organpreßsäfte alle drei Peptide spalteten. Die bei den einzelnen Versuchen angewandte Methodik war folgende: Das Peptid wurde in Wasser gelöst und mit einigen Kubikzentimetern des betreffenden Organpreßsaftes und mit Toluol versetzt einige Zeit im Brutraum aufbewahrt. Man hätte jetzt die mit dem Organpreßsaft zugeführten Eiweißkörper einfach durch Koagulation entfernen können. Wir unterließen diesen Eingriff, um uns vor dem Einwande zu schützen, daß das Aufkochen die Ursache der Spaltung der Peptide gewesen sei. Wir dialysierten vielmehr gegen Wasser und zwar solange, als nachweisbare Substanzmengen in das Dialysat übergangen. Dieses wurde beim jedesmaligen Wechsel der Flüssigkeit stets sofort unter vermindertem Druck und bei einer 40° des Wasserbades nicht übersteigenden Temperatur

eingedampft. Beim Dialysieren vermieden wir durch genügenden Toluolzusatz den Eintritt von Fäulnis. Bei der weiteren Untersuchung auf gebildete Aminosäuren hielten wir uns an die in der früheren Mitteilung angeführten Methode.¹⁾

Wir teilen den Gang und Verlauf der einzelnen Untersuchungen nach Peptiden geordnet mit.

1. dl-Leucyl-glycin.

Je 4 g Leucyl-glycin wurden in 180 ccm Wasser gelöst und zu der einen (A) Probe 10 ccm Nierenpreßsaft, zu der anderen (B) 20 ccm Leberpreßsaft und zur dritten (C) 40 ccm Muskelpreßsaft zugesetzt. Alle drei Proben wurden dann nach Zusatz von Toluol im Brutraum aufbewahrt. Probe A verblieb 4 Tage bei 37°, Probe B und C wurden dagegen schon am 3. Tag verarbeitet. Alle drei Proben wurden zunächst drei Tage dialysiert und die Dialysate unter vermindertem Druck eingedampft.

Der hierbei verbleibende Rückstand der Probe A (Nierenpreßsaft) wurde in Wasser gelöst, und die Lösung auf dem Wasserbade bis zur Kristallisation eingeeengt. Im ganzen wurden drei Fraktionen gewonnen:

- | | | | | |
|----|--------|------------------|------|--|
| 1. | 1,25 g | Zersetzungspunkt | 279° | (unkorr.) |
| 2. | 1,3 | » | 242° | (») |
| 3. | 1,8 | » | 230° | (»). Diese Fraktion enthielt viel Asche. |

Aus der ersten Fraktion ließen sich durch Umkrystallisieren aus heißem Wasser, unter Anwendung von Tierkohle, 0,8 g reines Leucin gewinnen. Es zersetzte sich bei 289° (unkorr.).

Eine Lösung von 0,4543 g Substanz in 20%iger Salzsäure, die das Gesamtgewicht 8,9753 g und das spezifische Gewicht 1,1 hatte, drehte Natriumlicht im 1/2-dm-Rohr bei 20° 0,44° nach rechts.

$$[\alpha]_D^{20} = + 15,8^{\circ}$$

Es hatte sich somit ziemlich reines l-Leucin gebildet.

Die 2. und 3. Krystallfraktion wurde mit der fünffachen Menge Alkohol übergossen und gasförmige Salzsäure bis zur Sättigung eingeleitet. In der üblichen Weise wurden 1,1 g Glykoll esterchlorhydrat gewonnen. Es schmolz gegen 142° (unkorr.)

¹⁾ Emil Abderhalden und Yutaka Teruuchi, l. c. S. 468.

Das Filtrat des Glykokollesterchlorhydrates wurde mit Alkohol verdünnt und in die klare Lösung trockenes Ammoniakgas eingeleitet. Das sofort ausfallende Chlorammonium wurde abfiltriert und die etwas eingeengte Flüssigkeit in der Kälte aufbewahrt. Die Flüssigkeit erstarrte bald gallertig. Diese offenbar nicht krystallinische Ausscheidung nutschten wir ab. Auf dem Filter verblieb nach scharfem Abpressen eine leicht braun gefärbte Masse, der sich der Farbstoff durch Waschen mit Aceton entziehen ließ. Die Ausbeute betrug 0,9 g. Die Substanz zersetzte sich nach dem Umlösen aus heißem Aceton gegen 237° (unkorr.).

Eine Lösung von 0,2260 g Substanz in Wasser, die das Gesamtgewicht 11,5976 g hatte, drehte im 1-dm-Rohr Natriumlicht $0,34^{\circ}$ nach links. Daraus berechnet sich

$$[\alpha]_{20}^D = - 17,5^{\circ}.$$

Alle Eigenschaften des isolierten Produktes sprechen dafür, daß Leucyl-glycinanhydrid vorlag. Nun dreht das aktive Leucyl-glycinanhydrid $31,7^{\circ}$.¹⁾ Wir müssen deshalb annehmen, daß im vorliegenden Falle neben dem aus der asymmetrischen Spaltung des d-l-Leucyl-glycins hervorgegangenen d-Leucyl-glycin noch unverändertes d-l-Leucyl-glycin vorhanden war. Es war somit ein Teil des angewandten Peptids unverändert geblieben.

In ganz analoger Weise wurden die mit Leber- und Muskelsaft versetzten Proben B und C verarbeitet. Aus der Probe B wurden folgende Krystallfraktionen gewonnen:

1. 1,89 g	Zersetzungspunkt	272° (unkorr.)
2. 0,82 >	>	230° (>)
3. 0,88 >	>	226° (<)

Aus der ersten Fraktion erhielten wir 0,7 g reines Leucin. Es zersetzte sich gegen 293° (unkorr.).

Eine Lösung von 0,5112 g in 20%iger Salzsäure, welche das Gesamtgewicht 10,2958 g und das spezifische Gewicht 1,1 hatte, drehte im $\frac{1}{2}$ -dm-Rohr $+ 0,39^{\circ}$. Somit

$$[\alpha]_{20}^D = + 14,5^{\circ}.$$

¹⁾ Vgl. Emil Fischer und Emil Abderhalden, Bildung von Diptiden bei der Hydrolyse der Proteine, Berichte d. Deutsch. chem. Ges., Jg. XXXIX, S. 2315, 1906.

Aus Fraktion 2 und 3 erhielten wir 1,0 g Glykokollesterchlorhydrat und 1,2 g Leucyl-glycinanhydrid. Ersteres schmolz bei 142° (unkorr.) und letzteres zersetzte sich gegen 242° (unkorr.).

Eine Lösung von 0,1448 g in Wasser, welche das Gesamtgewicht 11,4788 g hatte, drehte im 1-dm-Rohr — 0,30° =

$$[\alpha]_{20}^D = - 23,8^{\circ}$$

In diesem Falle war unzweifelhaft der bei weitem größte Teil des Leucyl-glycins gespalten worden.

Bei der Probe mit Muskelpreßsaft erhielten wir 0,72 g reines Leucin vom Zersetzungspunkt 293° (unkorr.).

Eine Lösung von 0,5058 g Substanz in 20%iger Salzsäure, die das Gesamtgewicht 10,1476 g und das spezifische Gewicht 1,1 hatte, drehte im 1-dm-Rohr 0,83° nach rechts.

$$[\alpha]_{20}^D = + 15,2^{\circ}$$

Aus der Mutterlauge des Leucins isolierten wir 1,5 g Glykokollesterchlorhydrat und 1,0 g Leucyl-glycinanhydrid. Ersteres schmolz bei 141° (unkorr.), letzteres gegen 242° (unkorr.). Ein Teil des Präparates krystallisierte in flachen Prismen, der Rest schied sich in gallertigen Klumpen aus. Wie der Befund der optischen Untersuchung zeigt, entspricht das krystallinische Produkt offenbar dem unveränderten d-l-Leucyl-glycin.

0,1862 g Substanz im Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung = 5,7501 g. Drehung im 1-dm-Rohr — 0,43°.

$$[\alpha]_{20}^D = - 13,3^{\circ}$$

2. Glycyl-dl-Alanin.

Von diesem Peptid wurden je 4 g verwandt und in 20 ccm Wasser gelöst. Auch hier prüften wir die Wirkung von Nieren-, Leber- und Muskelpreßsaft. Von ersterem setzten wir 5 ccm, vom Leberpreßsaft 10 und vom Muskelpreßsaft 20 ccm zu. Die erstere Probe wurde 4, die zweite 3 und die letzte ebenfalls 3 Tage unter Toluolzusatz im Brutraum aufbewahrt. Nach dieser Zeit wurden die einzelnen Proben so lange der Dialyse unterworfen, als eine Probe des Dialysats beim Verdampfen

einen erheblichen Rückstand hinterließ. Die Dialysate verdampften wir bei 35° unter vermindertem Druck zur Trockene. Da die weitere Verarbeitung bei allen drei Proben dieselbe war, so sei sie in ihren Grundzügen hier kurz im Zusammenhang erwähnt.

Der beim Verdampfen der Dialysate verbleibende Rückstand wurde in der gewohnten Weise mit Alkohol und gasförmiger Salzsäure zweimal verestert. Nun wurde versucht, Glykokollesterchlorhydrat durch Einimpfen eines Kryställchens dieser Verbindung und längeres Stehenlassen auf Eis zur Abscheidung zu bringen. Bei dem Versuche mit Nierenpreßsaft gelang dies, während bei den beiden anderen Proben die Abscheidung zu gering war, als daß sich eine direkte Gewinnung des Glykokolls gelohnt hätte. Beim ersten Versuch wurde die Mutterlauge des Glykokollesterchlorhydrates — gewonnen wurden 1,56 g — völlig eingedampft. In gleicher Weise wurde die alkoholische Lösung der Esterchlorhydrate der übrigen beiden Versuche behandelt. Nun lösten wir den Rückstand in einer bestimmten Menge Alkohol, stellten in einem aliquoten Teile den Salzsäuregehalt genau fest, setzten mit der genau berechneten Menge einer $2\frac{1}{2}\%$ igen Natriumäthylatlösung die Ester in Freiheit, filtrierten vom ausgeschiedenen Kochsalz ab und destillierten das Filtrat unter vermindertem Druck. Hierbei gehen die Monoaminosäureester über, während die Peptidester zurückbleiben. Im Destillat wiesen wir die Monoaminosäuren durch dessen Eindampfen nach Zugabe von wässriger Salzsäure nach. Den Destillationsrückstand befreiten wir durch nochmaliges Ausschütteln mit Äther von den letzten Spuren von Monoaminosäureestern. Diese ätherische Lösung verdampften wir und gaben den Rückstand zum oben erwähnten Destillat. Aus dem Destillationsrückstand endlich wurde etwa vorhandenes Peptid durch Überführung des Peptidesters in das Anhydrid nachgewiesen.

Das Resultat war in den einzelnen Versuchen folgendes:

1. Nierenpreßsaft: Isoliert wurden 1,56 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 142° (unkorr.). Bei der Verseifung der destillierten Ester mit Salzsäure verblieb beim

Verdampfen ein Rückstand von 0,4 g. Er wurde in Wasser gelöst und das optische Verhalten geprüft. Es war keine Drehung des polarisierten Lichtes nachweisbar. Offenbar lag Glykokoll vor. Der Nachweis von Alanin gelang nicht. Aus dem Destillationsrückstand gewannen wir, nachdem er in Alkohol gelöst und in die alkoholische Lösung Ammoniak eingeleitet worden war, nach dem Aufkochen 0,5 g Glycyl-alaninanhydrid.

Es zersetzte sich gegen 231° (unkorr.).

0,1724 g Substanz in Wasser gelöst. Gewicht der Lösung 5,4590 g. Sie drehte im 1-dm-Rohr Natriumlicht $0,14^{\circ}$ nach rechts.

$$[\alpha]_{20}^D = + 4,4^{\circ}$$

Reines Glycyl-d-Alaninanhydrid dreht nur unbedeutend mehr.¹⁾ Es lag somit ein ziemlich einheitliches Produkt vor und auch hier war somit der Abbau asymmetrisch erfolgt.

2. Leberpreßsaft: Gewonnen wurden 1,51 g Glykokoll-esterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 142° (unkorr.) und 1,3 g salzsaures Alanin. 0,4226 g des salzsauren Salzes wurden in Wasser gelöst. Gewicht der Lösung 6,9308 g. Drehung im 1 dm-Rohr $+ 0,47^{\circ}$.

$$[\alpha]_{20}^D = + 7,6^{\circ}$$

Es handelte sich somit um wahrscheinlich mit etwas Glykokoll verunreinigtes d-Alanin. Aus dem Destillationsrückstand wurden 0,4 g Glycyl-alaninanhydrid erhalten. Es zersetzte sich gegen 228° (unkorr.).

0,2225 g Substanz in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 3,9657 g. Sie drehte im 1-dm-Rohr $0,23^{\circ}$ nach rechts.

$$[\alpha]_{20}^D = + 4,1^{\circ}$$

3. Muskelpreßsaft: Glykokollesterchlorhydrat 1,3 g vom Schmelzpunkt 142° (unkorr.), 1,0 g salzsaures Alanin und 0,6 g Glycyl-alaninanhydrid.

¹⁾ Emil Fischer und Emil Abderhalden, Bildung eines Di-peptids bei der Hydrolyse des Seidenfibroins, Berichte der Deutch. chem. Gesellschaft, Jg. XXXIX, S. 752, 1906.

Das gewonnene Alanin war d-Alanin, jedoch ziemlich unreines, wie die Bestimmung des optischen Verhaltens ergab.

0,4830 g des salzsauren Salzes in Wasser gelöst. Gewicht der Lösung 6,6952 g. Sie drehte im 1-dm-Rohr $+ 0,42^{\circ}$.

$$[\alpha]_{20^{\circ}}^D = + 5,82^{\circ}$$

Die optische Bestimmung des Glycyl-alaninanhydrids ergab folgendes Resultat:

0,3252 g Substanz in Wasser gelöst. Gewicht der Lösung 7,5431 g. Spezifisches Gewicht 1,07. Sie drehte im 1 dm-Rohr $0,20^{\circ}$ nach rechts.

$$[\alpha]_{20^{\circ}}^D = + 4,34^{\circ}$$

Das Resultat aller drei Versuche ist somit einheitlich. In allen drei Fällen konnten Glykokoll, d-Alanin und aktives Peptid nachgewiesen werden.

3. Glycyl-glycin.

Mit diesem Peptid sind folgende Versuche ausgeführt worden:

1. 3 g Glycyl-glycin in 20 ccm Wasser gelöst $+ 5$ ccm Nierenpreßsaft.
2. 3 „ „ „ 20 „ „ „ $+ 5$ „ Leberpreßsaft.
3. 3 „ „ „ 20 „ „ „ $+ 10$ „ Muskelpreßsaft.

Alle drei Proben verblieben nach Zugabe von Toluol drei Tage im Brutraum. Die Verarbeitung war hier genau dieselbe, wie im vorigen Versuche. Wir isolierten Glykokoll als Esterchlorhydrat und das unveränderte Glycylglycin als Glycinanhydrid.

1. Nierenpreßsaft: Es wurden 1,2 g Glykokollesterchlorhydrat vom Schmelzpunkt 142° (unkorr.) und 0,63 g Glycinanhydrid gewonnen.

2. Leberpreßsaft: Erhalten wurden 1,5 g Glykokoll-esterchlorhydrat und 0,9 g Glycinanhydrid.

3. Muskelpreßsaft: Isoliert wurden 0,6 g Glykokoll-esterchlorhydrat und 1,2 g Glycinanhydrid.

Die Preßsäfte aller drei Organe hatten somit Glycyl-glycin zerlegt. Ein erheblicher Teil dieses Peptids entging der Spaltung.

Diese Versuche ergeben, daß die untersuchten Organe des Kaninchens sehr wirksame proteolytische Fermente enthalten.

Der durch sie bewirkte Abbau der untersuchten Peptide gleicht in den einzelnen Phasen vollständig der durch das proteolytische Pankreasferment bedingten Hydrolyse, denn auch hier erfolgte die Spaltung asymmetrisch und zwar in der Art, daß die den natürlich vorkommenden Aminosäuren entsprechenden optischen Komponenten zur Abspaltung kamen. Eine Sonderstellung nimmt das Glycyl-glycin ein, das ja, wie seine Komponenten, kein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthält.

Wir wollen noch erwähnen, daß die Ausbeuten an den isolierten Produkten im allgemeinen keine sehr guten waren. Verluste waren unvermeidlich. Schon bei der Dialyse entsteht die Gefahr, daß ein Teil der entstandenen Produkte im Schlauche zurückgehalten wird. Ferner beziehen sich die obigen Zahlenangaben stets auf die völlig gereinigten Verbindungen. An Rohprodukten erhielten wir natürlich viel mehr. Es blieb natürlich auch die Möglichkeit offen, daß ein Teil der Abbauprodukte weiter gespalten worden ist. Wir werden auf diese Annahme noch zurückkommen. Schließlich wollen wir noch hervorheben, daß wir nach dem Erscheinen unserer ersten Abhandlung über die Einwirkung von Organextrakten auf Peptide auf eine uns damals unbekannte Arbeit von Peter Bergell und Liepmann¹⁾ aufmerksam geworden sind, in der diese Autoren über proteolytische Fermente in der Placenta berichten. Wir erwähnen diese Versuche der Vollständigkeit wegen. Sie berühren unser spezielles Arbeitsgebiet und unsere Fragestellung nicht. Wir möchten hier der Hoffnung Ausdruck geben, daß uns dieses Gebiet, das wegen der Schwierigkeit der Beschaffung der Peptide, den keineswegs einfachen Verhältnissen und den notwendigen umfassenden Untersuchungen naturgemäß nur ganz allmählich ausgebaut werden kann, für einige Zeit überlassen bleibt. Wie schon früher betont, ist der eine von uns in Gemeinschaft mit Dozent Dr. Schittenhelm mit dem Verhalten der proteolytischen Fermente unter pathologischen Verhältnissen beschäftigt.

¹⁾ Peter Bergell und W. Liepmann, Über die in der Placenta enthaltenen Fermente, Münchener Mediz. Wochenschr., Nr. 46, 1905.