

Die Verwendung enzymatischer Reaktionen für die Reinheitsprüfung und Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen^{1*}

Von H. ZUBER

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

Seit der grundlegenden Insularbeit von SANGER vor zehn Jahren spielen die proteolytischen Fermente eine entscheidende Rolle bei der Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen². Mit ihrer Hilfe gelingt es nämlich, die Polypeptide sehr spezifisch und schonend in definierte Peptidfragmente verschiedener Größe zu zerlegen. Dadurch ist auch eine Möglichkeit gegeben, an größere Peptide und sogar an Proteine analytisch heranzugehen. Von den Proteasen (Endopeptidasen) – verschiedene sind jetzt in ziemlich reinem Zustand zugänglich – sind hauptsächlich Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin verwendet worden. Daneben haben sich auch Subtilisin^{3,4,43}, Papain^{5,6}, Schimmelprotease (*Aspergillus oryzae*)^{5,7} bewährt. Vermutlich wird die Zahl der für analytische Zwecke verwendbaren Enzyme entsprechend ihrer Reindarstellung weiter anwachsen (z. B. die intracellulären Fermente wie die Kathepsine^{8,9}, die Pflanzenproteasen¹⁰, die Bakterienproteasen¹¹ oder auch die Schlangengifte^{12,13}). Sehr vielversprechend sind z. B.

auch solche, die eine hohe Spezifität besitzen, etwa Thrombin¹⁴, Fibrinolytin (Plasmin)^{15,9}, Renin¹⁶ und Kallikrein^{17,13}. Daneben erwiesen sich von den Peptidasen Carboxypeptidase und Leucinamino-peptidase als sehr geeignet zur Ermittlung der endständigen Aminosäuren und zur Bestimmung der optischen Konfiguration der Aminosäurereste. Auch mit D- und L-Aminosäureoxydase¹⁸ konnten die L- oder D-Formen der Aminosäuren festgelegt werden. Schließlich wurden die Proteasen sowie Cb und LAP auch bei synthetischen Peptiden zur Lösung verschiedener Probleme eingesetzt.

Anwendung der Enzyme

Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen

Die Verwendung der Proteasen und Peptidasen – ich möchte mich im Rahmen dieser Übersicht nur auf Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin, Cb und LAP beschränken – ist im Prinzip in dem Schema Abb. 1 wiedergegeben. Man geht meistens so vor, daß man nach Bestimmung der Endgruppen mit Carboxypeptidase und Leucinaminopeptidase oder auch anderer chemischer Reaktionen in parallelen Versuchen mit Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin hydrolysiert, das Peptidgemisch fraktioniert und bei genügend kleinen Peptidbruchstücken deren Sequenz bestimmt. Größere Peptide müssen durch eine zweite Partialhydrolyse weiter zerlegt werden. Aus den Bruchstücken wird dann in geeigneter Weise die Gesamtsequenz abgeleitet. Polypeptide und Proteine mit Disulfidbrücken werden meist erst nach Oxydation mit Perameisensäure (Insulin¹⁹, Ribonuclease A²⁰) abgebaut, da erst dann der hydrolyse-hemmende Einfluß

* *Verwendete Abkürzungen:* Carboxypeptidase = Cb; Leucinaminopeptidase = LAP; Dinitrophenyl- = DNP-, abgekürzte Schreibweise für die Aminosäuren siehe E. BRAND und J. T. EDSALL, *Annu. Rev. Biochem.* 16 (1947) 224.

¹ Vorgetragen am 3. Europäischen Peptid-Symposium in Basel am 8. September 1960.

² A. J. P. MARTIN und R. L. M. SYNGE, *Advances Protein Chem.* 2 (1945) 1. F. SANGER, *Advances Protein Chem.* 7 (1952) 1. P. DESNUELLE, *Advances Enzymol.* 14 (1953) 261. E. BRICAS und CL. FROMAGEOT, *Advances Protein Chem.* 8 (1953) 1. C. B. ANFINSEN und R. R. REDFIELD, *Advances Protein Chem.* 11 (1956) 1. G. BRAUNITZER, *Angew. Chem.* 69 (1957) 189. A. H. COOK und G. HARRIS, *Progr. Org. Chem.* 4 (1958) 140. H. TUPPY, *Naturwiss.* 46 (1959) 35.

³ A. V. GÜNTELBERG und M. OTTESEN, *Nature* 170 (1952) 802. H. TUPPY, *Biochim. Biophysica Acta* 11 (1953) 449. H. TUPPY und G. BODO, *Mh. Chem.* 85 (1954) 1024. K. LINDERSTRÖM-LANG, *Biochim. Biophysica Acta* 16 (1955) 297, 17 (1955) 141.

⁴ A. P. RYLE, C. B. ANFINSEN, *Biochim. Biophysica Acta* 24 (1957) 633. L. G. SINN, O. K. BEHRENS und W. W. BROMER, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 2805.

⁵ F. SANGER, E. O. P. THOMPSON und P. KITAI, *Biochem. J.* 59 (1955) 509.

⁶ H. C. LAWLER, ST. P. TAYLOR, A. M. SWAN und V. DU VIGNAUD, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 87 (1944) 550.

⁷ W. G. CRAWTHOR und F. G. LENNOX, *Nature* 165 (1950) 680.

⁸ J. S. FRUTON, G. W. IRVING und M. BERGMANN, *J. Biol. Chem.* 138 (1941) 249, 139 (1941) 569, 141 (1941) 763. H. H. TALLAN, M. E. JONES und J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.* 194 (1952) 793.

⁹ W. F. WHITE und A. M. GROSS, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 1141.

¹⁰ D. M. GREENBERG und TH. WINNICK, *Annu. Rev. Biochem.* 14 (1945) 43.

¹¹ E. MASCHMANN, *Ergebn. Enzymforsch.* 9 (1943) 155.

¹² O. B. HENRIQUES, M. FICHMAN und S. B. HENRIQUES, *Biochem. J.* 75 (1960) 551. O. B. HENRIQUES, M. FICHMAN und W. T. BERALDO, *Nature* 187 (1960) 414. P. HOLTZ, H. W. RAUDONAT und C. CONTZEN, *Arch. exper. Pathol. Pharmacol.* 239 (1960) 54. H. MICHL und G. KISS, *Mh. Chem.* 90 (1959) 604.

¹³ E. HABERMANN, *Naturwiss.* 47 (1960) 111. E. HABERMANN, *Arch. exper. Pathol. Pharmacol.* 236 (1959) 492.

¹⁴ S. SHERRY und W. TROLL, *J. Biol. Chem.* 208 (1954) 95. S. EHRENPREIS, S. J. LEACH und H. A. SCHERAGA, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 6086. J. A. GLADNER, J. E. FOLK, K. LAKI und W. R. CARROL, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 62, 67. K. LAKI, J. A. GLADNER und J. E. FOLK, *Nature* 187 (1960) 758.

¹⁵ W. TROLL, S. SHERRY und J. WACHMAN, *J. Biol. Chem.* 208 (1954) 85.

¹⁶ L. T. SKEGGS, J. R. KAHN, K. LENTZ und N. P. SHUMWAY, *J. Exper. Med.* 103 (1956) 295. L. T. SKEGGS, J. R. KAHN, K. LENTZ und N. P. SHUMWAY, *J. Exper. Med.* 106 (1957) 439.

¹⁷ E. WERLE und B. KAUFMANN-BOETSCH, *Naturwiss.* 46 (1959) 559, *Z. physiol. Chem.* 319 (1960) 52. C. CONTZEN, P. HOLTZ und H. W. RAUDONAT, *Naturwiss.* 46 (1959) 402.

¹⁸ R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* 44 (1949) 542. T. S. G. JONES, *ibid.* 42 (1948) lix. J. P. GREENSTEIN, S. M. BIRNBAUM und M. C. OTEY, *J. Biol. Chem.* 204 (1953) 307. J. R. PARKH, J. P. GREENSTEIN, M. WINITZ und S. M. BIRNBAUM, *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (1958) 953. J. P. GREENSTEIN, *Advances Protein Chem.* 9 (1954) 121.

¹⁹ F. SANGER und H. TUPPY, *Biochem. J.* 49 (1951) 463.

²⁰ C. H. W. HIRS, ST. MOORE und W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.* 219 (1956) 611.

der Sekundärstruktur (stabilisiert durch Disulfidbrücken) verlorengeht. Native Proteine werden im allgemeinen nicht durch Trypsin und Chymotrypsin angegriffen²³. Nur nach Zusatz von Harnstoff²¹, Guanidiniumchlorid²² (Denaturierung durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken) werden sie etwas gespalten. Eine Ausnahme bildet Pepsin. Dieses hydrolysiert auch nichtdenaturierte Polypeptidketten, wie am Beispiel der Ribonuclease²² gezeigt worden ist. Die Gefahr der Umlagerung der Aminosäuren durch Transpeptidierung (Modellversuche²⁴) ist zwar beim enzymatischen Abbau nicht vollständig auszuschließen. Doch hat es bei der Anwendung der Enzyme (arbeiten mit niedriger Enzymkonzentration) in dieser Hinsicht noch keine Komplikationen gegeben. Eine derartige Komplikation ist nach SANGER²⁵ auch weitgehend auszuschließen, wenn man bei der Strukturaufklärung mindestens zwei verschiedene Enzyme und die Säurepartialhydrolyse anwendet. Dabei ist es sehr unwahrscheinlich, daß in allen drei Fällen durch Umlagerung die gleiche Aminosäuresequenz entsteht. Ein sicherer Beweis ist die hohe Ausbeute (80 bis 100%) eines einzelnen Peptidfragmentes, oder auch, wenn z. B. bei einer Trypsin-Spaltung nur 1 Lysin oder 1 Arginin pro Peptidfragment vorkommt²⁶.

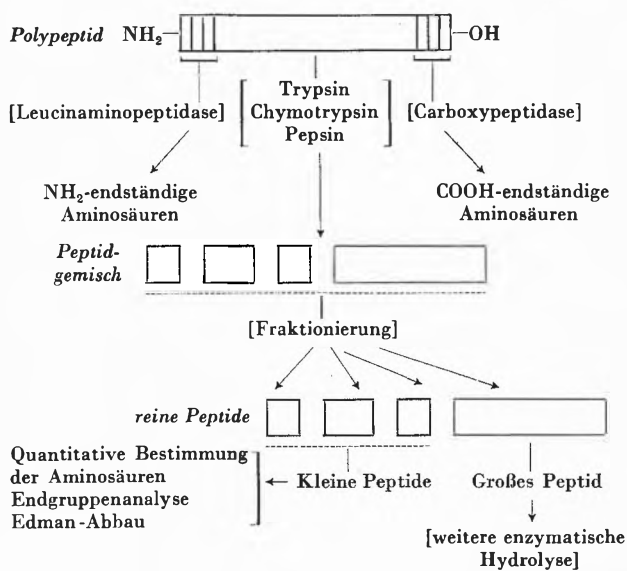


Abb. 1. Anwendung der Proteasen und Peptidasen bei der Strukturaufklärung von Polypeptiden (schematisch)

²¹ Siehe ⁷⁰.

²² D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN und ST. MOORE, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 648.

²³ Wachstumshormon: Erste Stufe bei der Hydrolyse mit Chymotrypsin ist eine Denaturierung des Proteinmoleküls. C. H. LI, H. PAPKOFF, P. FONSS-BECH, P. G. CONDLIFFE, *J. Biol. Chem.* 218 (1956) 41.

²⁴ S. G. WALEY und J. WATSON, *Nature* 167 (1951) 360; *Biochem. J.* 57 (1954) 529, 538. R. B. JOHNSTON, M. J. MYCEK und J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.* 185 (1950) 629, 187 (1950) 205. J. S. FRUTON, R. B. JOHNSTON und M. FRIED, *J. Biol. Chem.* 190 (1951) 39. J. DURELL und J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.* 207 (1954) 487.

²⁵ F. SANGER und H. TUPPY, *Biochem. J.* 49 (1951) 481.

²⁶ C. H. W. HIRS, ST. MOORE und W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.* 219 (1956) 633.

Enzymatischer Abbau mit Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin

a) Reaktionsbedingungen

Beim enzymatischen Abbau mit Trypsin, Chymotrypsin oder Pepsin ist es ratsam, die optimalen Hydrolysenbedingungen (Reaktionszeit, Temperatur, Enzym : Substrat-Verhältnis bzw. Enzymkonzentration) in jedem Einzelfall abzuklären. Denn infolge der sehr verschiedenen labilen Peptidbindungen hängt der Hydrolysenweg stark von den Hydrolysenbedingungen ab, bzw. durch die richtige Wahl der Bedingungen kann die Bildung von ganz bestimmten Peptiden gelenkt werden. Qualitativ läßt sich die Reaktion in einfachen Fällen schon durch Papierchromatographie oder Elektrophorese verfolgen. Vorzuziehen ist jedoch die quantitative Methode, bei der sich z. B. durch Kontrolle des NaOH-Verbrauchs (pH-Stat)^{27, 28} oder durch Umsatz mit Fluordinitrobenzol (DNP-Methode)^{29, 30} die optimale Spaltung bestimmen läßt. Der besondere Vorteil der DNP-Methode liegt darin, daß sich neben dem Grad der Spaltung auch die Hydrolysen-geschwindigkeit jeder einzelnen Bindung, die Anzahl der neugebildeten Peptide und die Art ihrer aminoendständigen Aminosäuren ermitteln läßt. Daneben wurde auch die quantitative Ninhydrinreaktion (Verhältnis NH₂-N zu Gesamt-N) verwendet^{26, 31, 32}.

Ein Beispiel für die verschieden große Hydrolysen-geschwindigkeit der einzelnen Peptidbindungen ist beim Trypsinabbau von Glucagon³³ (Abb. 2) die schnelle Spaltung der Lys-Tyr- und Arg-Arg-Bindung (quantitativ gespalten nach 2,25 Std.) und die langsame Hydrolyse von Arg-Ala (50 Std.). Oder auch bei der Spaltung des β -MSH²⁷ (Melanocyte-Stimulating-Hormon) mit Trypsin bzw. Chymotrypsin: Arg-Try wird in 2 bis 3 Min. vollständig, Tyr-Lys und Phe-Arg nach 30 Min. gespalten, während Try-Gly noch nach 16 Std. unvollständig hydrolysiert ist. Eine genaue Kenntnis über die Ursache der Unterschiede in der Hydrolysen-geschwindigkeit haben wir nicht. Doch verraten diese Beispiele etwas über den Einfluß der Stellung der labilen Bindung im Gesamtmolekül. So läßt sich etwa die langsame Spaltung von Try-Gly damit erklären, daß in der Sequenz Phe-Arg-Try-Gly nach der etwas schnelleren Hydrolyse der Phe-Arg-Bindung Try-Gly in die Nähe des Aminoendes kommt, wobei dessen hydrolysenhemmender Ein-

²⁷ J. I. HARRIS und P. ROOS, *Biochem. J.* 71 (1959) 434, *Nature* 178 (1956) 90.

²⁸ F. A. ANDERER, E. WEBER und H. UHLIG, *Z. Naturforsch.* 15b (1960) 79.

²⁹ W. W. BROMER, A. STAUB, E. R. DILLER, H. L. BIRD, L. G. SINN und O. K. BEHRENS, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 2794-2807.

³⁰ R. R. REDFIELD und C. B. ANFINSEN, *J. Biol. Chem.* 221 (1956) 385.

³¹ C. H. W. HIRS, ST. MOORE und W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.* 221 (1956) 151.

³² D. T. GISH, L. K. RAMACHANDRAN und W. M. STANLEY, *Arch. Biochem. Biophysics* 78 (1958) 433.

³³ W. W. BROMER, A. STAUB, L. G. SINN und O. K. BEHRENS, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 2801.

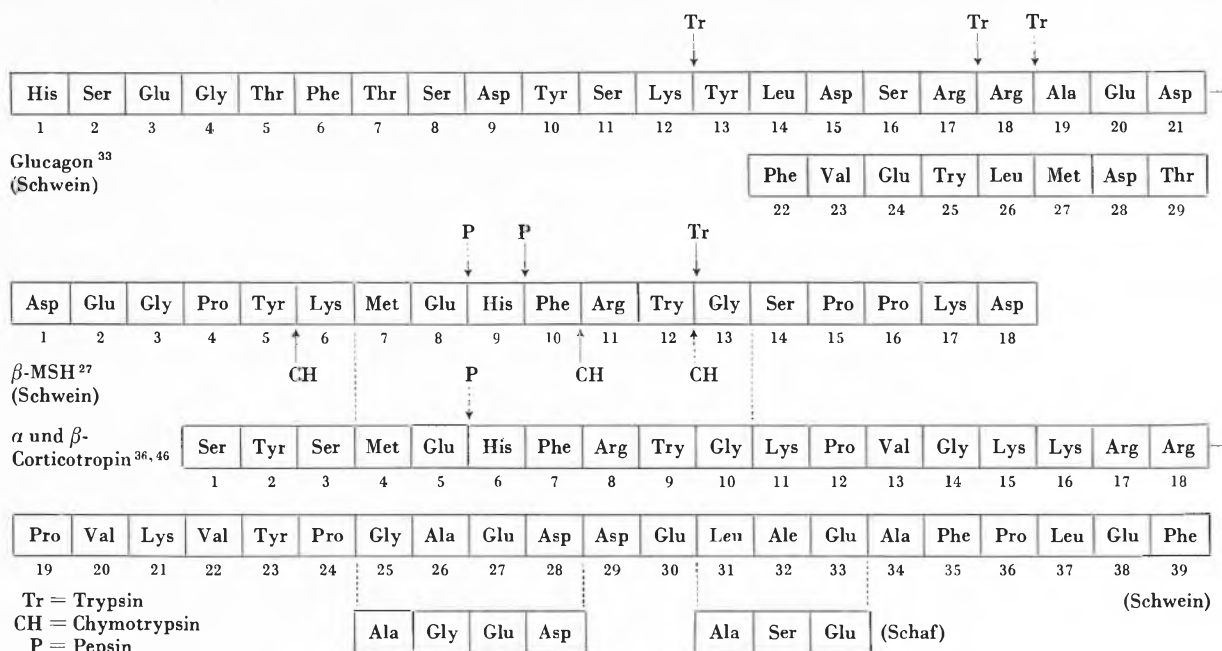


Abb. 2. Primärstrukturen von Glucagon, Melanophorenhormon und Corticotropin

fluß³⁴ bemerkbar wird. Ein ähnlicher Fall der konkurrierenden Hydrolyse benachbarter Peptidbindungen liegt wahrscheinlich auch beim Glucagon³³ (siehe oben) in der Sequenz Arg-Arg-Ala vor, und auch beim Tabakmosaik-Virus³⁵ in der Sequenz Arg-Arg-Val, in der die Arg-Val-Bindung praktisch nicht angegriffen wird. Eine andere Frage ist die optimale Enzymkonzentration bzw. das Mengenverhältnis Enzym : Substrat. Normalerweise wird in dem Bereich des Enzym : Substrat-Verhältnisses (G/G) zwischen 1 : 10 und 1 : 100 gearbeitet. Doch gibt es auch Fälle, wo man durch die Wahl von extremen Verhältnissen bessere Ergebnisse erzielen kann. So liefert der Pepsinabbau von β -Corticotropin³⁶ im Enzym : Substrat-Verhältnis 1 : 360 ein viel einfacheres Peptidgemisch als im Verhältnis 1 : 40. Andererseits werden manche Peptide erst bei relativ hohen Enzymkonzentrationen abgebaut (β -MSH hydrolysiert mit Pepsin)⁴³. Vergleicht man den Pepsinabbau von α - und β -Corticotropin^{36, 46} und β -MSH⁴³, so kann man erkennen, daß nicht nur benachbarte Aminosäuren die Labilität einer Peptidbindung beeinflussen können, sondern auch das Molekül als Ganzes. Dieser Befund ist auch entscheidend für die Frage der Enzymspezifität (siehe weiter unten). α - und β -Corticotropin und β -MSH haben die gemeinsame Heptapeptidsequenz Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly (Abb. 2). Bei relativ hoher Pepsinkonzentration wird aber nicht bei beiden die gleiche Bindung gespalten. Beim β -MSH wird die His-Phe-Bindung und

sehr wenig Glu-His gespalten, während beim α - und β -Corticotropin die His-Phe-Bindung überhaupt nicht angegriffen wird. Schließlich spielt auch noch der pH-Wert und die Temperatur zusammen mit den anderen Varianten eine Rolle. Bei pH 7,8 und 25°C (niederes Chymotrypsin : Substrat-Verhältnis) wurden beim β -Corticotropin³⁷ in hoher Ausbeute der Peptide nur fünf Peptidbindungen gespalten; beim α -Corticotropin³⁸ bzw. Corticotropin A³⁹ wurden bei niedrigerem pH-Wert und höherer Temperatur weitere ein bis zwei Bindungen freigelegt. Ähnliche durch verschiedene Reaktionsbedingungen entstandene Differenzen bezüglich der Zahl der gebildeten Peptide wurden auch beim Trypsin- und Pepsinabbau der drei Corticotropine beobachtet (Tabellen 4 und 8).

b) Fraktionierung des Peptidgemisches

Die weitere Fraktionierung des Peptidgemisches hängt weitgehend von seiner Zusammensetzung ab. Ausschlaggebend ist neben der Aminosäurezusammensetzung und der Größe des Ausgangspeptides auch die Anzahl der labilen Bindungen. Bei kleinen Molekülen (bis zum Molekulargewicht 2000, etwa dem Hypertensin oder α - und β -MSH) werden im allgemeinen nur wenige (zwei bis fünf) Spaltprodukte entstehen, die relativ leicht voneinander getrennt werden können; so lassen sich z. B. die beim Abbau von Val⁵-Hypertensin I mit Chymotrypsin entstandenen Peptide durch Papierelektro-

³⁴ Siehe ^{101, 105} und Tabelle 4 (Ribonuclease) und Tabelle 6 (Insulin, B-Kette).

³⁵ F. A. ANDERER, H. UHLIG, E. WEBER und G. SCHRAMM, *Nature* 186 (1960) 922.

³⁶ P. H. BELL, K. S. HOWARD, R. G. SHEPHERD, B. M. FINN und J. M. MEISENHOLDER, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 5059.

³⁷ R. G. SHEPHERD, S. D. WILLSON, K. S. HOWARD, P. M. BELL, D. S. DAVIES, S. B. DAVIS, E. A. EIGNER und N. E. SHAKESPEARE, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 5067.

³⁸ J. LEONIS, C. H. LI und D. CHUNG, *J. Amer. Chem. Soc.* 81 (1959) 419.

³⁹ W. F. WHITE, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 4194. W. F. WHITE und W. A. LANDMANN, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 771.

phorese oder Papierchromatographie trennen⁴⁰. Sehr wirkungsvoll hat sich auch bei der Auftrennung der Peptide des α - und β -MSH die Kombination Papier-elektrophorese (pH 6,5 bzw. 3,5) und Papierchromatographie erwiesen^{41, 27, 42, 43, 44, 45}. Selbst für das Peptidgemisch des komplizierteren α -Corticotropin^{46, 47, 48} war diese Methode noch ausreichend. Ebensogut hat sich bei der Strukturaufklärung des β -Corticotropins³⁶ durch die Cyanamid-Gruppe und auch beim Tabakmosaik-Virus^{32, 49} die Gegenstromverteilung in Kombination mit der Papierchromatographie bewährt. Es konnte im ersten Fall eine quantitative Trennung der Peptidspaltprodukte (Trypsin-, Chymotrypsin- und Pepsinabbau) erreicht werden. Bei größeren Polypeptidmolekülen wird aber zur Vorfraktionierung der komplexen Peptidgemische eine zusätzliche Verwendung von Ionenaustauschern notwendig sein. Schon SANGER^{19, 25, 50} verwendete neben Elektrophorese und Papierchromatographie den Ionenaustauscher IR-4B zur Abtrennung von sauren und A-Kohle zur Adsorption der aromatischen Peptide. Bei Glucagon²⁹ und Ribonuclease^{26, 31, 51, 52} hat sich der saure und schwach vernetzte Ionenaustauscher Dowex 50-X2 als geeignet erwiesen. Größere Peptide vom Pepsinabbau der Ribonuclease⁵¹ ließen sich noch besser an IRC-50 trennen. Bei der Sequenzbestimmung von Tabakmosaik-Virus^{35, 53} wurde neben Dowex 50-X2 auch Dowex 1-X2 mit Erfolg verwendet.

c) Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung und Sequenz in den Spaltprodukten

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung (DNP-Methode nach LEVY⁵⁴, Automat nach MOORE und STEIN⁵⁵), die Ermittlung der Endgruppen (chemisch: DNP-Methode⁵⁴, Hydrazinolyse⁵⁶; enzymatisch: LAP

und Cb⁵⁷ und schließlich Sequenzbestimmung durch weitere enzymatische Hydrolyse, Säurepartialhydrolyse oder Edman-Abbau^{54, 58} liefern dann die Struktur der Peptidfragmente. Gleichzeitig wird auch durch das möglichst ganzzahlige Molverhältnis und durch die Endgruppen ihre Einheitlichkeit bewiesen.

d) Ableitung der Primärstruktur des Ausgangs-peptides

Durch geeignete Kombination der Peptidfragmente läßt sich die Sequenz des Gesamtpeptides ableiten. Bei der Rekonstruktion der ursprünglichen Polypeptidkette ist aber darauf zu achten, daß gerade bei größeren Peptiden durch die nicht gleichmäßige Spaltung des Peptidmoleküls (manche Fragmente werden zum Teil weiter abgebaut) ein komplexeres Peptidgemisch entsteht, als der Anzahl der labilen Peptidbindungen entspricht. Es entstehen mehrere Peptide aus der gleichen ursprünglichen Aminosäuresequenz. Nur im Idealfall läßt sich die Reaktion so lenken, daß pro Aminosäuresequenz nur ein Peptidfragment entsteht. Auch die quantitative Fraktionierung des Peptidgemisches³⁶ läßt sich selten erreichen. Die Summe der Gewichte der Peptidfragmente muß dann mit der eingesetzten Menge an Gesamtmolekül übereinstimmen. Ist dieses der Fall, so ist dieses die einfachste Methode, um die Richtigkeit der Gesamtsequenz zu überprüfen. In den meisten Fällen werden aber nur Teilmengen der Peptide isoliert. Die Fragmente müssen aber dann nach einer hypothetischen Formel zusammengesetzt werden.

Bei kleinen Peptiden genügen meistens nur wenige Daten, um zur Sequenz zu kommen. Der Abbau des Val⁵-Hypertensin I mit Chymotrypsin⁴⁰ lieferte drei Peptide mit der Zusammensetzung: (Asp, Arg, Val, Tyr), (Val, His, Pro, Phe) und (His, Leu), mit den Aminoendgruppen Asp, Val, His (DNP-Methode) und den Carboxylendgruppen Phe bzw. Tyr (Val). Daraus resultierten die Teilsequenzen Asp-Arg-Val-Tyr, Val-His-Pro-Phe und His-Leu. Aus der Kombination mit den Endgruppen (Asp, Leu) läßt sich die Gesamtsequenz Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-His-Leu ableiten. Komplizierter wird die Situation bei größeren Peptiden. Hier kann man nur durch Kombination der Spaltprodukte, die nach verschiedenen Abbaumethoden (verschiedene Enzyme, Säurehydrolyse) gewonnen wurden, zu einer Gesamtstruktur kommen. Durch die verschiedenen Enzyme entstehen verschieden große Bruchstücke, die meistens sich überschneidende, gemeinsame Aminosäuresequenzen besitzen. Durch diese Überschneidungen wird dann die gegenseitige Zuordnung der Peptidfragmente möglich. Ein Idealfall liegt z. B. bei β -

⁴⁰ D. F. ELLIOTT, W. S. PEART, *Nature* 177 (1956) 527; *Biochem. J.* 65 (1957) 246.

⁴¹ I. I. GESCHWIND, C. H. LI und L. BARNAFI, *J. Amer. Chem. Soc.* 78 (1956) 4494. I. I. GESCHWIND, C. H. LI und L. BARNAFI, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 620.

⁴² I. I. GESCHWIND, C. H. LI und L. BARNAFI, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 6396.

⁴³ J. I. HARRIS und P. ROOS, *Biochem. J.* 71 (1959) 445.

⁴⁴ J. I. HARRIS, *Nature* 184 (1960) 167.

⁴⁵ J. I. HARRIS, *Biochem. J.* 71 (1959) 445, 451.

⁴⁶ C. H. LI, I. I. GESCHWIND, R. D. COLE, J. D. RAACKE, I. J. HARRIS und J. S. DIXON, *Nature* 176 (1955) 687.

⁴⁷ J. LEONIS, C. H. LI und D. CHUNG, *J. Amer. Chem. Soc.* 81 (1959) 419.

⁴⁸ C. H. LI, J. S. DIXON und D. CHUNG, *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (1958) 2587.

⁴⁹ D. T. GISH, *Biochem. Biophysica Acta* 35 (1959) 557. L. K. RAMACHANDRAN und D. T. GISH, *J. Amer. Chem. Soc.* 81 (1959) 884.

⁵⁰ F. SANGER und O. P. THOMPSON, *Biochem. J.* 53 (1953) 353, 366.

⁵¹ J. L. BAILEY, ST. MOORE und W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.* 221 (1956) 143.

⁵² C. H. W. HIRS, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 625.

⁵³ H. G. WITTMANN und G. BRAUNITZER, *Virology* 9 (1959) 726.

⁵⁴ H. FRAENKEL-CONRAT, J. I. HARRIS und A. L. LEVY, in D. GLICK, *Methods Biochem. Analysis* 2 (1955) 359.

⁵⁵ ST. MOORE, D. H. SPACKMAN und W. H. STEIN, *Analytic Chem.* 30 (1958) 1185, 1190.

⁵⁶ S. AKABORI, K. OHNO und K. NARITA, *Bull. Chem. Soc. (Japan)* 25 (1952) 214. C. I. NIU und H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 5882. J. H. BRADBURY, *Nature* 178 (1956) 912. J. H.

BRADBURY, *Biochem. J.* 68 (1958) 475. G. BRAUNITZER, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 88 (1955) 2025. K. HEYNS und G. LEGLER, *Z. physiol. Chem.* 306 (1957) 165.

⁵⁷ Siehe weiter unten.

⁵⁸ P. EDMAN, *Acta. Chem. Scand.* 4 (1950) 283. H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 3606. J. I. HARRIS, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 3607. H. FRAENKEL-CONRAT und J. I. HARRIS, *J. Amer. Chem. Soc.* 76 (1954) 6058.

MSH⁴¹⁻⁴⁴ vor. Hier liegen die durch Chymotrypsin und Trypsin hydrolysierten Peptidbindungen direkt nebeneinander (··· Pro-Tyr-Lys-Met ··· und ··· His-Phe-Arg-Try-Gly ···), wodurch eine einfache Zuordnung der entstandenen Peptide möglich ist. Im allgemeinen liegen aber diese Überschneidungen nicht so günstig. Doch kann man meistens die Reihenfolge der kleinen Peptidfragmente durch Vergleich mit größeren Peptiden, sogenannten Brückenpeptiden, festlegen. Hierbei ist es von Vorteil, die Brückenpeptide mit leicht nachweisbaren Aminosäuren zu markieren. Besonders gut geeignet scheint Arginin (Sakaguchi-Reaktion) zu sein³⁵. Gelingt es noch beim Trypsinabbau, nach Blockierung der ϵ -Aminogruppen des Lysins nur kleine Arginin-Peptide (Arginin carboxylendständig) zu erzeugen, so ist deren Zuordnung zu den mit Arginin markierten Brückenpeptiden (aus Chymotrypsinabbau oder Pepsinabbau) besonders einfach^{30, 59}. Neben diesem Hilfsmittel der Brückenpeptide lassen sich auch mit Hilfe von amino- oder carboxylendständigen Peptiden oder auch mit Peptiden, deren Stellung durch Aminosäuren, die nur einmal im Molekül vorkommen, festgelegt ist, gewisse Reihenfolgen bestimmen.

e) Charakterisierung der Disulfidbrücken

Ein weiteres immer wichtiger werdendes Problem bei der Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen ist die Bestimmung der Lage der Disulfidbrücken zwischen verschiedenen Polypeptidketten. Im Gegensatz zur Säurepartialhydrolyse, bei der bei hoher Säurekonzentration ein starker Disulfidaustausch stattfindet, scheint der enzymatische Abbau zum schonenden Herausspalten der Cystinbrückenpeptide besonders geeignet zu sein. SANGER⁶⁰ konnte beim intakten Insulin mit Chymotrypsin unter Zusatz von N-Äthylmaleinimid von den drei Cystinbrücken eine Brücke (A Kette 20 – B Kette 19) als Peptid herauspalten und identifizieren. Leider waren die beiden anderen Cystine aus dem unlöslichen Restpeptid («Core») infolge Fehlens von Chymotrypsinlabilen Bindungen nicht herausgelöst worden. Doch konnte dieses Peptid mit Säure zur Bestimmung der beiden restlichen Cystinbrücken ohne wesentlichen Disulfidaustausch weiter abgebaut werden. Nach der Hydrolyse wurden die Cystinbrückenpeptide mit der Elektrophorese (pH 6,5 und pH 3,7) vorfraktioniert. Die Peptide mit der freien Aminogruppe des Cystins haben nämlich infolge des ungewöhnlich niederen pK-Wertes der Aminogruppe des Cystins eine stärkere Elektrom negativität als die anderen Cystinpeptide, bei denen andere Aminosäuren aminoständig stehen. Nach der Oxydation der Cystinpeptide mit Perameisensäure kann dann nach erneuter Elektrophorese der Cysteinsäure-

peptide deren Struktur nach den üblichen Methoden bestimmt werden. In neuerer Zeit wurden bei der Festlegung der Disulfidbrücken in Ribonuclease²² noch einige Fortschritte erzielt. An Stelle von Chymotrypsin und Trypsin, die native Proteine (unter Zusatz von Guanidiniumchlorid) nur langsam abbauen, wobei gerade der relativ hohe pH-Wert (pH 7 und höher) und die hohe Guanidiniumchlorid-Konzentration den Disulfidaustausch begünstigen, erwies sich die Pepsinspaltung bei pH 2 als sehr geeignet zur Freisetzung von Cystinpeptiden ohne Disulfidaustausch. Der Abbau mit Pepsin wurde dann mit einer anschließenden Hydrolyse durch Chymotrypsin und Trypsin kombiniert, um zu kleineren Bruchstücken zu gelangen. Die Reaktion konnte jetzt bei pH 6 ohne Zusatz von Guanidiniumchlorid erfolgen, so daß auch hier kein Disulfidaustausch befürchtet werden mußte. Die weitere Fraktionierung der Cystinpeptide bzw. der oxydierten Cysteinsäurepeptide gelang mit Dowex 50-X2. Auf diese Weise konnten die vier Disulfidbrücken ermittelt werden. Auch Subtilisin⁴ scheint zur Freisetzung von Cystinpeptiden aus nativen Proteinen geeignet zu sein.

f) Bestimmen der Amidbindung

Bei der schonenden Hydrolyse der Peptidbindungen durch Enzyme werden die γ -Amidbindungen von Glutamin und Asparagin nicht hydrolysiert⁶¹. So konnten nach Spaltung des Insulins mit Schimmel-Protease⁵ in den Glutamin- bzw. Asparaginpeptiden nach Säurehydrolyse mit der Mikroammoniakbestimmung nach CONWAY⁶² die Amidgruppen quantitativ bestimmt werden. Beim Glucagon⁶³ ließen sich die Amidgruppen ähnlich nachweisen. Eine andere Methode⁶⁴, auch beim Glucagon angewendet, beruht auf dem Vergleich der molaren Mengen (Analyse von MOORE und STEIN) von Glutaminsäure und Asparaginsäure nach Hydrolyse mit LAP und mit Säure (Totalhydrolyse). In den Ribonuclease-Peptiden⁶⁵ wurde nach Abbau mit LAP oder Cb freies Glutamin bzw. Asparagin mit der automatischen Aminosäurebestimmungsapparatur (MOORE und STEIN) quantitativ bestimmt. Aus Oxytocin und Vasopressin konnten durch Behandlung mit Papain⁶ Glutamin und Asparagin freigesetzt und von ihren α -Isomeren papierelektrophoretisch differenziert werden. Auch durch Vergleich der Wanderungswege (Ladung) bei der Elektrophorese lassen sich Peptide mit und ohne γ -Amidgruppe (besonders am isoelektrischen Punkt) unterscheiden⁵.

⁶¹ J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.* 165 (1946) 333.

⁶² K. BAILEY, *Biochem. J.* 31 (1937) 1406. E. J. CONWAY, *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, Lockwood, London 1950.

⁶³ W. W. BROMER, L. G. SINN und O. K. BEHRENS, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 2807.

⁶⁴ R. L. HILL und E. L. SMITH, *Biochem. Biophysica Acta* 31 (1959) 257.

⁶⁵ Verwendung von Chymotrypsin durch Säulenchromatographie gereinigt und Trypsin aus Trypsinogen. C. H. W. HIRS, ST. MOORE und W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 633.

⁵⁹ C. B. ANFINSEN, M. SELA und H. TRITSCH, *Arch. Biochem. Biophys.* 65 (1956) 156. C. H. LI und L. BERTSCH, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 2638.

⁶⁰ A. P. RYLE, F. SANGER, L. F. SMITH und R. KITAI, *Biochem. J.* 60 (1955) 541.

g) *Enzymatische Spaltung von zyklischen Peptiden*

Die enzymatische Hydrolyse (mit Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin) von homodet-zyklischen Peptiden ist, soweit aus der Literatur zu entnehmen, noch nicht versucht worden. Obwohl manchmal behauptet wird, diese Peptide zeigen gegen Enzyme die gleiche Stabilität wie gegen Säure, steht der Beweis dazu aus. Der Abbau der heterodeten Peptide mit S—S-Brücken (siehe Abschnitt e) wie Oxytocin und Vasopressin mit Papain⁶ (f) und die wenn auch sehr langsame Spaltung von Oxytocin mit LAP⁶⁶ zeigen doch eine ähnliche Labilität der Peptidbindungen wie bei offenkettigen Peptiden.

Endgruppenbestimmung mit Cb und LAP

Der Abbau mit Cb ist die am häufigsten verwendete Methode⁵⁴ zur Bestimmung der carboxylendständigen Aminosäuren. Das Freisetzen der Aminosäuren kann entweder qualitativ durch Papierchromatographie⁶⁷ oder quantitativ durch Bestimmung der freien Aminosäuren nach der DNP-Methode (LEVY)^{68, 69} oder der Analyse von MOORE und STEIN⁶⁵ verfolgt werden. Wenn die

Tabelle 1: Bestimmung der carboxylendständigen Aminosäuren mit Carboxypeptidase A (oder Gemisch Carboxypeptidase A + B)

Ileu ⁵ -Hypertensin I ⁶⁷	... (Pro)*-Phe-His-Leu-OH
Ileu ⁵ -Hypertensin II ⁶⁷	... (Pro)-Phe-OH
Val ⁵ -Hypertensin I ⁴⁰	... (Pro)-Phe-His-Leu-OH
β-MSH (Rind ⁴² , Schwein ^{27, 41})	... (Pro-Lys)-Asp-OH
Insulin, A (Gly)-Kette ⁷¹	... Glu-Asp-Tyr-[CySO ₃ H]-Asp-(NH ₂)
Insulin, B (Phe)-Kette ⁷¹	... (Pro)-Lys-Ala-OH
Glucagon ²⁹	... Ala-Glu-(NH ₂)-Asp-Phe-Val-Glu-(NH ₂)-Try-Leu-Met-Asp-(NH ₂)-Thr-OH
α-Corticotropin ^{48, 68} (Schaf, Rind)	... (Pro)-Leu-Glu-Phe-OH
β-Corticotropin ³⁶ (Schwein)	... (Pro)-Leu-Glu-Phe-OH
Ribonuclease A ⁷²	... Val-OH
Tabakmosaik-Virus ⁷³	... (Pro-Ala)-Thr-OH

(Pro)* = Die Hydrolyse bleibt am Carboxylende von Pro stehen (siehe auch Tabelle 9).

⁶⁶ R. L. HILL und E. L. SMITH, *J. Biol. Chem.* 228 (1957) 577.

⁶⁷ K. E. LENTZ, L. T. SKEGGS, K. R. WOODS, J. R. KAHN und N. P. SHUMWAY, *J. Exper. Med.* 104 (1956) 183.

⁶⁸ J. I. HARRIS und C. H. LI, *J. Biol. Chem.* 213 (1955) 499.

⁶⁹ W. W. BROMER, A. STAUB, E. R. DILLER, H. L. BIRD, L. G. SINN und O. K. BEHRENS, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 2794.

⁷⁰ Y. D. HALSEY und H. NEURATH, *J. Biol. Chem.* 217 (1955) 247.

⁷¹ F. SANGER und O. P. THOMPSON, *Biochem. J.* 53 (1953) 366. J. I. HARRIS, *J. Amer. Chem. Soc.* 74 (1952) 2944.

⁷² C. B. ANFINSEN, M. FLAVIN und J. FARNSWORTH, *Biochim. Biophysica Acta* 9 (1952) 468. G. KALNITZKY und E. E. ANDERSON, *Biochim. Biophysica Acta* 16 (1955) 302.

⁷³ J. I. HARRIS und C. A. KNIGHT, *J. Biol. Chem.* 214 (1955) 215.

Reihenfolge einiger carboxylendständiger Aminosäuren bestimmt werden soll, ist es notwendig, zu verschiedenen Zeiten die freien Aminosäuren quantitativ zu bestimmen⁶⁹. Bei manchen Proteinsubstraten sind die Endgruppen erst nach Denaturierung (6 M Harnstoff) zugänglich⁷⁰. Einige Beispiele über die Anwendung sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Mit dem Enzym können auch DNP-Peptide hydrolysiert werden, wobei gleichzeitig die aminoendständige Aminosäure bestimmt werden kann⁷⁴. Mit LAP⁶⁶ werden die aminoendständigen Aminosäuren freigesetzt, die in analoger Weise wie bei der Carboxypeptidase analytisch bestimmt werden können^{75, 42, 64} (Beispiele: Tabelle 2). Proteine sind auch für die LAP erst nach Denaturierung oder Oxydation mit Perameisensäure zugänglich⁶⁶. Die dreidimensionale Struktur schützt die Endgruppen dieser Moleküle.

Tabelle 2: Bestimmung der aminoendständigen Aminosäuren mit Leucinaminopeptidase

Val ⁵ -Hypertensin I ⁴⁰	NH ₂ -Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-(?)-Phe-OH (vollständige Hydrolyse)
β-MSH (Schwein) ⁴¹	NH ₂ -Asp-Glu-(Gly-Pro)* ...
β-MSH (Rind) ⁴²	NH ₂ -Asp-Ser-(Gly-Pro) ...
Insulin, A (Gly)-Kette ⁶⁸	NH ₂ -Gly-Ileu-Val ... vollständige Hydrolyse ...
Insulin, B (Phe)-Kette ^{66, 76}	NH ₂ -Phe-Val-Asp-(NH ₂)-Glu-(NH ₂)-His-Leu ...
Glucagon ⁶⁴	NH ₂ -His-Ser-Glu-Gly ... vollständige Hydrolyse ...
Corticotropin A ⁷⁵	NH ₂ -Ser-Tyr-Ser-Met-Glu ...
Ribonuclease A ⁶⁶	NH ₂ -Lys-Glu-Thr-Ala ₃ ...
Oxytocin ⁶⁶	NH ₂ -Lys-Tyr-Ileu-Glu-(NH ₂)-Asp-(NH ₂)-Pro-(?)-Leu-Gly-(NH ₂) (sehr langsame Hydrolyse)

* Die Hydrolyse bleibt normalerweise am Aminoende von Pro stehen (siehe auch Tabelle 10). Bei hohem LAP: Substratverhältnis [1 : 5] (reines LAP-Präparat?) scheint aber die Hydrolyse über Pro hinwegzugehen. (E. L. SMITH und R. L. HILL, *Biochim. Biophysica Acta* 19 [1956] 376; *J. Biol. Chem.* 231 [1958] 117.)

Reinheitsprüfung von synthetischen Peptiden

Bei der Anwendung der proteolytischen Fermente bei synthetischen Peptiden (und Peptidderivaten) handelt es sich hauptsächlich um die Bestimmung der optischen Reinheit, weniger um die Ermittlung der Aminosäuresequenz, die ja meistens durch den Syntheseweg festliegt. Methodisch wird ganz analog vorgegangen wie bei isolierten Peptiden. HOFMANN und Mitarbeiter⁷⁷ konn-

⁷⁴ E. WALDSCHMIDT-LEITZ und K. GAUSS, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 85 (1952) 352.

⁷⁵ W. F. WHITE, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 4691.

⁷⁶ E. L. SMITH, R. L. HILL und A. BORMANN, *Biochim. Biophysica Acta* 29 (1958) 207.

⁷⁷ K. HOFMANN und A. JÖHL, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 2914. K. HOFMANN, A. JÖHL, A. E. FURLENMEYER und H. KAPPELER, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 1636. K. HOFMANN, H. KAPPELER, A. E.

ten bei einer Reihe von α -MSH-Peptiden deren optische Reinheit durch Abbau mit LAP, Cb und Trypsin nachweisen. Beim Pentapeptid His-Phe-Arg-Try-Gly, das nach der Dicyclohexylcarbodiimid-Methode hergestellt worden war, konnte eine 60prozentige Racemisierung festgestellt werden⁷⁸. SCHWARZ *et al.*⁷⁹, die auch vorschlagen, daß bei der Peptidsynthese jedes Zwischenprodukt auf optische Reinheit geprüft werden sollte, differenzierten die D- und L-Formen der Aminosäuren durch Hydrolyse der Peptide mit LAP, Cb, Trypsin und Chymotrypsin. BOISSONNAS *et al.*⁸⁰ konnten die «all-L-Form» des Oktapeptides His-Phe-Arg-Try-Gly-(ϵ -Z)-Lys-Pro-Val-amid durch LAP-Spaltung bestimmen (ϵ -Z-Lys abgespalten). Schließlich konnte beim Val⁵-Hypertensin II dessen optische Reinheit (bis auf His) durch analogen Abbau (wie beim natürlichen Peptid) mit Chymotrypsin, Trypsin, Cb, LAP bewiesen werden⁸¹.

Bei der Anwendung der proteolytischen Enzyme sind aber noch drei wesentliche Punkte zu beachten: 1. die Reinheit des Enzyms, 2. die Reinheit des Substrats und 3. die Spezifität des Enzyms.

Reinheit des Enzyms

Es ist von großer Wichtigkeit, nur solche Proteasen zu verwenden, die genügend rein sind, damit bei der Hydrolyse nur ihre eigene Spezifität zur Wirkung kommt. Die käuflichen kristallinen Chymotrypsinpräparate sind im allgemeinen genügend rein, besonders nach mehrmaligem Umkristallisieren. Doch ist gerade beim Chymotrypsin wegen der noch nicht eindeutig definierten Spezifität bei höheren Peptiden dessen Reinheit schwer zu beweisen⁶⁵. Das käufliche kristalline Trypsin ist, auch wenn es dreimal umkristallisiert wurde, außerordentlich schwer von chymotryptischer Aktivität zu befreien (meist etwa 0,2%). Es empfiehlt sich, in jedem Fall den Gehalt an Chymotrypsin zu bestimmen. Beim Glucagon^{33, 82} wurde der Titer durch Umsatz mit N-Benzoyl-DL-Phenylalanin- β -naphthylester und bei der Ribonuclease durch Umsatz mit Gly-Phe-Amid bestimmt²⁶. Um die Spuren Chymotrypsin zu entfernen, kann man mit verdünnter Säure behandeln^{30, 83} (24 h, 37°C, N/16 HCl). Reines Trypsin läßt sich vielleicht auch aus Trypsinogen gewinnen⁶⁵. Die Reinheit von Pepsin, Papain und Subtilisin kann bis

heute wegen ihrer wenig definierten Spezifität nicht nachgewiesen werden (Einheitlichkeit nur im physikalisch-chemischen Sinne beweisbar). Die im Handel erhältliche Cb, hergestellt nach der Methode von ANSON^{84, 85}, dürfte hauptsächlich Carboxypeptidase A sein. Doch sind auch schon Gemische von Carboxypeptidase A und B verwendet worden^{35, 65}. Wie von FOLK und GLADNER u. a.⁸⁶ beschrieben, läßt sich auch Carboxypeptidase B in ziemlich reiner Form herstellen. Störungen durch Proteasenverunreinigungen lassen sich durch großen Überschuß an Diisopropylfluorophosphat (50fach) ausschalten. LAP ist nach der Methode von SMITH⁸⁸ in reiner Form zugänglich. Für viele Zwecke genügt auch ein LAP-Präparat, das nicht durch Elektrophorese (8. Stufe) gereinigt wurde⁶⁵.

Auch die Einheitlichkeit des Substrats ist eine der Voraussetzungen für klare Resultate. Meistens läßt sich die Einheitlichkeit der isolierten Peptide oder Proteine durch quantitative Aminosäurebestimmung (ganzzahliges Molverhältnis) und durch Endgruppenanalyse beweisen. Auch wenn ein Peptid nicht ganz rein ist, läßt sich unter Berücksichtigung des molaren Verhältnisses der Aminosäuren (geringe Mengen und Spuren anderer Aminosäuren werden vernachlässigt) seine Sequenz noch bestimmen⁴⁵.

Spezifität der Enzyme

Ein ungelöstes Problem ist bis heute die Spezifität der Proteasen geblieben. Gerade heute scheint es, nachdem auch Untersuchungen an großen Peptiden vorliegen, notwendig zu sein, diesen Begriff neu zu definieren. Es scheint auch, daß der schon von E. FISCHER⁸⁹ aufgestellte Satz: «Die Spaltbarkeit einer Peptidbindung ist eine Funktion der Zahl, Konstitution, Konfiguration und Reihenfolge der Aminosäure», erst heute seine volle Gültigkeit erlangen wird. Historisch gesehen machte der Begriff der Spezifität eine seltsame Wandlung durch, je nachdem, welche von den obigen Bedingungen gerade im Vordergrund des Interesses standen. Nur die richtige Konfiguration (L-Form) war immer eine eindeutige For-

FURLENMEYER, M. E. WOOLNER, E. T. SCHWARTZ und TH. A. THOMPSON, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 1641. K. HOFMANN, TH. A. THOMPSON und E. SCHWARTZ, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 6087. K. HOFMANN, M. E. WOOLNER, HARUAKI YAJIMA, G. SPÜHLER, TH. A. THOMPSON und E. T. SCHWARTZ, *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (1958) 6458.

⁷⁸ K. HOFMANN, M. E. WOOLNER, G. SPÜHLER und E. T. SCHWARTZ, *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (1958) 1486.

⁷⁹ H. SCHWARZ und F. M. BUMPUS, *J. Amer. Chem. Soc.* 81 (1959) 890.

⁸⁰ R. A. BOISSONNAS, ST. GUTTMANN, R. C. HUGUENIN, P. A. JAQUENOU und E. SANDRIN, *Helv. Chim. Acta* 41 (1958) 1867.

⁸¹ B. RINIKER, unveröffentlicht.

⁸² H. A. RAVIN, P. BERNSTEIN und A. M. SELIGMAN, *J. Biol. Chem.* 208 (1954) 1.

⁸³ F. A. ANDERER, E. WEBER und H. UHLIG, *Z. Naturforsch.* 15b (1960) 79.

⁸⁴ M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.* 20 (1937) 663.

⁸⁵ R. W. PUTNAM und H. NEURATH, *J. Biol. Chem.* 166 (1946) 603. H. NEURATH, E. ELKINS und S. KAUFMANN, *J. Biol. Chem.* 170 (1947) 221.

⁸⁶ J. E. FOLK und J. A. GLADNER, *J. Biol. Chem.* 231 (1957) 379. J. A. GLADNER und J. E. FOLK, *J. Biol. Chem.* 231 (1957) 393. J. E. FOLK, K. A. PIEZ, W. R. CARROL und J. A. GLADNER, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 2272. P. J. KELLER, E. COHEN und H. NEURATH, *J. Biol. Chem.* 233 (1958) 344. J. F. PECHÈRE, G. H. DIXON, R. H. MAYBURY und H. NEURATH, *J. Biol. Chem.* 233 (1958) 1364.

⁸⁷ E. F. JANSEN, M. D. F. NUTTING, R. JANG und A. K. BALLS, *J. Biol. Chem.* 179 (1949) 189. E. F. JANSEN, M. D. F. NUTTING, R. JANG und A. K. BALLS, *J. Biol. Chem.* 179 (1949) 201.

⁸⁸ D. H. SPACKMAN, E. L. SMITH und D. M. BROWN, *J. Biol. Chem.* 212 (1955) 255.

⁸⁹ E. FISCHER und P. BERGELL, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 36 (1903) 2592, 37 (1904) 3103. E. FISCHER und E. ABDERHALDEN, *Z. physiol. Chem.* 46 (1905) 62, 51 (1907) 264. E. FISCHER und A. LUNIAK, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 42 (1909) 4752.

derung geblieben. Anfang der dreißiger Jahre⁹⁰ war man der Ansicht, daß die Anzahl der Aminosäuren ausschlaggebend sei für die Spaltbarkeit einer Peptidbindung, und dieses führte zu der Unterscheidung von Proteinase und Peptidasen. Es lag aber kein chemischer Beweis vor (außer einer erfolglosen Spaltung von Gly-Ala-Leu durch Pepsin), daß die sogenannten Proteinase nicht auch kleine Peptide spalten können. Erst als BERGMANN⁹¹ in seinen grundlegenden Arbeiten zeigen konnte, daß Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin auch kleine synthetische Peptide hydrolysieren können, trat der Begriff der Konstitution, als Seitenkettenspezifität definiert, mehr in den Vordergrund (neue Bezeichnung: Endopeptidasen und Exopeptidasen). Die Empfindlichkeit einer Peptidbindung war also durch die Konstitution der an ihr beteiligten Aminosäuren bestimmt. Die Verwendung von kleinen synthetischen Substraten war eigentlich eine Notlösung, da es damals nicht möglich war, anhand von Proteinspaltprodukten etwas über die Spezifität der spaltenden Enzyme auszusagen. Heute, wo es uns durch neue analytische Methoden möglich geworden ist, auch bei großen Polypeptiden und Proteinen die Art der labilen Bindungen festzulegen, scheint der Begriff der Seitenkettenspezifität (mit einer Ausnahme: Trypsin) nicht mehr allein zu genügen*. Die Anzahl und Reihenfolge der Aminosäuren als Grundlage für die Größe, Ladung und Sekundärstruktur des Substratmoleküls dürften ebenso wichtig für die Labilität der einzelnen Peptidbindung sein. Die drei am besten bekannten Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin, deren Spezifität nun genauer betrachtet werden soll, bilden auch gleichzeitig ein Beispiel für prinzipielle Unterschiede bei der Spezifität.

Spezifität von Trypsin

Trypsin scheint ganz unabhängig von der Kettenlänge eine ausgesprochene Seitenkettenspezifität zu besitzen. Es spaltet die Peptidbindungen ausschließlich an

* Es ist überhaupt gewagt, die Spezifität aus Versuchen mit synthetischen Substraten abzuleiten, da die Enzyme letzten Endes Katalysatoren im physiologischen Sinne darstellen, deren Spezifität auf ganz bestimmte Stoffwechselprodukte und auch Stoffwechselfvorgänge ausgerichtet sein muß.

⁹⁰ E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. HARTENECK, *Z. physiol. Chem.* 149 (1925) 203. W. GRASSMANN und F. SCHNEIDER, *Ergebn. Enzymforsch.* 1936, 79.

⁹¹ M. BERGMANN, *Naturwiss.* 20 (1932) 420; *Science* 79 (1934) 439; *Advances Enzymol.* 1 (1941) 63, 2 (1942) 49.

⁹² M. BERGMANN, J. S. FRUTON und H. POLLOCK, *Science* 85 (1937) 410. K. M. HARMON und C. NIEMANN, *J. Biol. Chem.* 178 (1949) 743.

⁹³ K. HOFMANN und M. BERGMANN, *J. Biol. Chem.* 138 (1941) 243.

⁹⁴ G. W. SCHWERT, H. NEURATH, S. KAUFMANN und J. E. SNOKE, *J. Biol. Chem.* 172 (1948) 221.

⁹⁵ G. W. SCHWERT und M. EISENBERG, *J. Biol. Chem.* 179 (1949) 665. N. M. GREEN, J. A. GLADNER, L. W. CUNNINGHAUS und H. NEURATH, *J. Amer. Chem. Soc.* 74 (1952) 2122. N. M. GREEN, J. A. GLADNER, L. W. CUNNINGHAUS und H. NEURATH, *J. Biol. Chem.* 204 (1953) 379.

⁹⁶ K. HOFMANN und M. BERGMANN, *J. Biol. Chem.* 130 (1939) 81.

⁹⁷ H. WERBIN und A. PALM, *J. Amer. Chem. Soc.* 73 (1951) 1382.

⁹⁸ H. GOLDENBERG und V. GOLDENBERG, *Arch. Biochem. Biophysics* 29 (1950) 154.

⁹⁹ J. H. NORTHPROP und M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.* 16 (1932) 267.

Tabelle 3: Spezifität von Trypsin*
(synthetische Substrate)

A. Substrat hydrolysiert	
R-Arg-NH ₂ **	(R = Bz ⁹² , = Hip ⁹³ , = Tosyl ⁹⁴)
R-Lys-NH ₂	(R = Bz ⁹⁶ , = Hip ⁹⁶ , = Bz-Gly ⁹⁶)
R-Arg-OCH ₃	(R = Tosyl ⁹⁴)
R-Arg-OR'	(R = Bz, R' = Methyl, Äthyl, Isopropyl, Cyclohexyl, Benzyl, α-Glyceryl ⁹⁵)
H-Lys-OC ₂ H ₅	(pH 5,8) ⁹⁷
H-Arg-OCH ₃	(pH 5,8) ⁹⁸
Poly-Lys	103
Polymeres von S-(β-aminoäthyl)CySH	104
α-Hydroxy-δ-guanido-valeriansäuremethylester	102
B. Substrat langsam hydrolysiert	
H-Arg-Phe-OH	100
H-Arg-Leu-OH	
H-Arg-Glu-OH	
H-Arg-Gly-OH	
H-Tyr-Lys-Glu-Tyr-OH	105
C. Substrat nicht hydrolysiert	
H-Tyr-Lys-Glu-OH	105
H-Arg-Arg-OH	101
α-Bz-ε-Z-Lys-NH ₂	96
Z-Nitro-Arg-Leu-OH	100
Z-Nitro-Arg-phe-OH	
Z-Nitro-Arg-NH ₂	
Poly-D-Lys	103
α-Bz-His-NH ₂	92
α-Hip-His-NH ₂	
Bz-Gly-NH ₂	
α-Bz-Tyr-NH ₂	
Z-Iso-Glu-NH ₂	
α-Bz-Tyr-Gly-NH ₂	
H-DL-Leu-Tyr-OH	99
H-Leu-Gly-Gly-OH	
AcC-Leu-OH	
H-Gly-Ala-OH	
H-Gly-Asp-OH	
AcC-Tyr-OH	

* Berücksichtigt nur Aminosäurederivate.

** Wenn nicht anders angegeben, immer L-Form der Aminosäurereste.

Abkürzungen: Bz = Benzoyl- Z = Carbobenzyloxy-
AcC = Chloracetyl- Hip = Hippuryl-
Tosyl = p-Toluolsulfonyl-

¹⁰⁰ H. O. VAN ORDEN und E. L. SMITH, *J. Biol. Chem.* 208 (1954) 751.

¹⁰¹ K. FELIX und H. SCHUBERTH, *Z. physiol. Chem.* 273 (1942) 97.

¹⁰² E. J. SNOKE und H. NEURATH, *Arch. Biochem. Biophysics* 21 (1949) 351.

¹⁰³ E. KATCHALSKI, I. GROSSFELD und M. FRANKEL, *J. Amer. Chem. Soc.* 69 (1947) 2564. E. KATCHALSKI, *Advances Protein Chem.* 6 (1951) 123. M. SELA und E. KATCHALSKI, *Advances Protein Chem.* 14 (1959) 391. S. G. WALEY und J. WATSON, *Biochem. J.* 55 (1953) 328. E. TSUYUKI, H. TSUYUKI und M. A. STARHMANN, *Biochem. J.* 222 (1956) 479.

¹⁰⁴ H. LINDLEY, *Nature* 178 (1956) 647.

¹⁰⁵ A. A. PLENTL und J. H. PAGE, *J. Biol. Chem.* 163 (1946) 49.

Tabelle 4: Spezifität von Trypsin (natürliche Substrate)

	***	«Normale» Spezifität *		«Anormale» Spezifität
		Peptidbindungen hydrolysiert	Peptidbindungen nicht hydrolysiert	
Val ⁵ -Hypertensin I ⁴⁰ (Pferd)	(8)	Arg-Val	—	—
Arg-Vasopressin ¹⁰⁶ (Rind, Pferd)	(8)	Arg-Gly-NH ₂	—	—
Lys-Vasopressin ¹⁰⁶ (Schwein)	(8)	Lys-Gly-NH ₂	—	—
α-MSH ⁴⁵ (Schwein)	(13)	Arg-Try	Lys-Pro	—
β-MSH ^{41, 27} (Schwein)	(18)	Arg-Try Lys-Met (Tyr-Lys)	Lys-Asp-OH	—
Insulin, B(Phe)-Kette ²⁵	(30)	Arg-Gly Lys-Ala	—	—
Glucagon ³³ (Schwein)	(29)	Arg-Arg Arg-Ala (l) Lys-Tyr	—	Phe-Thr (l)** Try-Leu (l)
α-Corticotropin (Schaf ⁴⁶ , Rind ⁴⁸ , Mensch ¹⁰⁷)	(39)	Arg-Try Arg-Arg Lys-Lys Lys-Val	Lys-Pro Lys-Arg	—
β-Corticotropin ³⁷ (Schwein)	(39)	Arg-Try Arg-Arg Lys-Lys Lys-Val Lys-Arg	Lys-Pro	—
Corticotropin A ¹⁰⁸ (Schwein)	(39)	Arg-Try Lys-Lys Lys-Val	Lys-Pro Lys-Arg Arg-Arg	—
Ribonuclease (A) ^{26, 65} (Rind)	(124)	Arg-Ser Lys-Phe Arg-Asp(NH ₂) Lys-Ser Arg-Glu Lys-Asp Arg-CySO ₃ H Lys-Asp (NH ₂)(2 ×) Lys-Tyr Lys-Thr	Lys-Pro H-Lys-Glu	—
DNP-Ribonuclease ²⁰		Arg-Glu Arg-Asp(NH ₂) Arg-CySO ₃ H	Lys-Pro	—
Tabakmosaik-Virus ³⁵	(157)	Arg-Thr Lys-Val Arg-Glu(NH ₂) Arg-Phe Arg-Tyr Arg-Asp(NH ₂) Arg-Ileu Arg-Arg Arg-Ser(2 ×) Arg-Gly	Lys-Pro Arg-Val	—

* Hydrolyse am Carboxylende von Lys und Arg. ** (l) = langsam hydrolysiert. *** Aminosäurereste/Mol.

der Carboxylgruppe von Lysin und Arginin, wie Versuche mit synthetischen Peptiden (Tabelle 3) und isolierten Peptiden (Proteinen) verschiedener Kettenlänge (Tabelle 4) gezeigt haben. Bei den synthetischen Peptiden fällt einmal die hohe Stabilität der Peptidbindungen auf, wenn Lys oder Arg aminoendständig oder auch an zweiter Stelle stehen^{105, 101}. Dieser hemmende Ein-

fluß der freien α-Aminogruppe wurde auch bei der Hydrolyse des Poly-L-Lys, das nur zu Di- und Tripep-

¹⁰⁶ V. DU VIGNAUD, H. C. LAWLER und E. A. POPONOE, *J. Amer. Chem. Soc.* 75 (1953) 4880. R. ACHER und J. CHAUVET, *Biochim. Biophysica Acta* 12 (1953) 487, 14 (1959) 421.

¹⁰⁷ T. H. LEE und A. B. LERNER, *J. Amer. Chem. Soc.* 81 (1959) 6084.

¹⁰⁸ W. F. WHITE und W. A. LANDMANN, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 1711.

tiden abgebaut wird¹⁰³, beobachtet. Verbindungen, bei denen die ϵ -Aminogruppe des Lysins blockiert wurde (ϵ -Z-Verbindung)⁹⁶, und auch die Nitroargininpeptide¹⁰⁰ werden nicht hydrolysiert. Interessant ist auch die Labilität des dem Poly-L-Lysin ähnlichen S-(β -aminoäthyl)L-Cystein-Polymeren¹⁰⁴. Bei den untersuchten isolierten Peptiden sind neben der Stabilität der Lys-Pro-Bindung und der Peptidbindung mit aminoendständigem Lysin die Unterschiede in der Spaltung der Lys- und Arg-Bindungen bei α -, β -Corticotropin und Corticotropin A bemerkenswert. Diese hängen wahrscheinlich mit den unterschiedlichen Hydrolysenbedingungen zusammen, die bei den drei Corticotropinen angewendet wurden^{37, 46, 108} (siehe auch oben).

Spezifität von Chymotrypsin

Wesentlich anders liegen die Verhältnisse beim Chymotrypsin. Hier scheint die Seitenkettenspezifität (Hydrolyse an der Carboxylgruppe von Phe und Tyr), die durch Versuche mit synthetischen Substraten (Tabelle 5) festgelegt worden war, für höhere Peptide nicht mehr gültig zu sein. Wie aus Tabelle 6 ersichtlich, werden in Peptiden mit mehr als 30 Aminosäureresten bei steigender Kettenlänge immer mehr «anormale» Bindungen gespalten. Dieses läßt sich nicht einfach dadurch erklären, daß mit steigender Kettenlänge statistisch die Wahrscheinlichkeit für «anormale» Bindungen zunimmt. So werden im α -Corticotropin, in der Ribonuclease A und im Tabakmosaik-Virus sechs Peptidbindungen gespalten, die auch im Insulin vorkommen, aber dort vollkommen stabil sind. Man muß also annehmen, daß bei größeren Peptiden durch den Einfluß des Gesamtmoleküls die Hydrolyse «anormalen Bindungen» größer wird. An den «anormalen» Bindungen scheinen besonders Leu, Glu, Ala und Val beteiligt zu sein. Wie bei der Trypsinspaltung sind die Bindungen mit Pro (Phe-Pro, Tyr-Pro) und auch aminoendständiges Phe-Val (analog Lys-Glu) stabil.

¹⁰⁹ S. KAUFMAN, G. W. SCHWERT und H. NEURATH, *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 793. S. KAUFMAN, G. W. SCHWERT und H. NEURATH, *Arch. Biochem. Biophysics* 17 (1948) 203.

¹¹⁰ S. KAUFMAN und H. NEURATH, *J. Biol. Chem.* 180 (1949) 181. D. W. THOMAS, R. V. MCALISTER und C. NIEMANN, *J. Amer. Chem. Soc.* 73 (1951) 1548.

¹¹¹ H. T. HUANG, R. V. MCALISTER, D. W. THOMAS und H. C. NIEMANN, *J. Amer. Chem. Soc.* 73 (1951) 3231. B. M. ISELIN, H. T. HUANG, R. V. MCALISTER und C. NIEMANN, *J. Amer. Chem. Soc.* 72 (1950) 1729.

¹¹² J. S. FRUTON und M. BERGMANN, *J. Biol. Chem.* 145 (1942) 253.

¹¹³ R. V. MCALISTER und C. NIEMANN, *J. Amer. Chem. Soc.* 71 (1949) 3854.

¹¹⁴ M. BERGMANN und J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.* 124 (1938) 321.

¹¹⁵ R. V. MCALISTER, K. M. HARMON und C. NIEMANN, *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 767.

¹¹⁶ M. BERGMANN und J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.* 118 (1937) 405.

¹¹⁷ M. BERGMANN und J. S. FRUTON, *Advances Enzymol.* 1 (1941) 63.

¹¹⁸ B. M. ISELIN, H. T. HUANG und C. NIEMANN, *J. Biol. Chem.* 183 (1950) 403.

¹¹⁹ G. W. SCHWERT, H. NEURATH, S. KAUFMAN und J. E. SNOKE, *J. Biol. Chem.* 172 (1948) 221.

¹²⁰ S. KAUFMAN und H. NEURATH, *Arch. Biochem. Biophysics* 21 (1949) 437.

Tabelle 5: Spezifität von α -Chymotrypsin*
(synthetische Substrate)

A. Substrat hydrolysiert	
R-Tyr-NH ₂ **	(R = Bz ¹⁰⁹ , = Ac ¹¹⁰ , = Nic ¹¹¹ , = Z-Gly ¹¹²) (= AcC ¹²⁷ , = AcF ₃ ¹²⁷) (= Bz ¹¹³) (= Ac ¹²⁴)
R-Tyr-NHNH ₂ R-Tyr-NHNOH R-Tyr-Gly-NH ₂	(R = Bz ¹¹⁴ , = Ac ¹¹⁵ , = Gly ¹¹⁶ , = Z ¹¹⁶ , = Z-Gly ¹¹⁶ , = Z-Glu ¹¹⁷) 112, 109
H-Tyr-NH ₂ R-Phe-NH ₂	(R = Bz ¹¹¹ , = Ac ^{111, 126} , = Nic ^{111, 126} , = Gly ¹¹² , = Z-Gly ¹¹²) (R = Bz ¹¹⁸ , = Ac ¹¹⁸) (R = Z ¹¹² , = Z-Gly ¹¹⁶)
R-Phe-NHOH R-Phe-Gly-NH ₂ R-Try-NH ₂ R-Tyr-OC ₂ H ₅	(R = Ac ¹²² , = Nic ^{111, 122}) (R = Bz ¹⁰⁹ , = Ac ^{109, 125, 123} , = Z-Gly ¹¹⁹)
R-Phe-OC ₂ H ₅ R-Phe-OCH ₃ R-Try-OC ₂ H ₅ R-Met-OC ₂ H ₅ R-Arg-OCH ₃	(R = Bz ¹²⁰ , = Z-Gly ¹¹⁹) (R = Bz ¹²¹) (R = Bz ¹²⁰ , = Ac ¹²³) (R = Bz ¹²⁰) (R = Bz ¹¹⁹)
B. Substrat langsam hydrolysiert	
R-Met-NH ₂ H-Phe-NH ₂ H-Gly-Phe-NH ₂ H-Gly-Gly-NH ₂ H-Gly-Tyr-Gly-NH ₂ Z-Tyr-Gly-Gly-NH ₂ γ -Glu-Phe-NH ₂ γ -Glu-Leu-NH ₂ Bz-norLeu-OC ₂ H ₅ Bz-norVal-OC ₂ H ₅ H-Leu-OC ₂ H ₅	(R = Nic ¹¹¹) 112 117 116 132 128 129
C. Substrat nicht hydrolysiert	
H-D-Leu-Gly-OH, H-D-Leu-Gly-Gly-OH, H-Gly-Asp-OH, H-AcC-Leu-OH, Tetra-Ala, Penta-Ala, H-Gly-Gly-OH, Hepta-Gly, H-Gly-Try-OH, H-Gly-Ala-OH, H-Gly-Tyr-OH, AcC-Tyr-OH, Bz-Leu-Leu-Gly-OH ¹¹⁶	
Z-Gly-Leu-Gly-NH ₂ Z-Gly-Glu-Gly-NH ₂ Bz-DL-Ser-OC ₂ H ₅ Bz-DL-Thr-OC ₂ H ₅ Ac-DL-Thr-OC ₂ H ₅ Nic-DL-His-NH ₂ Bz-Ala-NH ₂ Ac-CySO ₃ H-NH ₂	116 116 120 111 130 131

* Berücksichtigt nur Aminosäurederivate.

** Wenn nicht anders angegeben, immer L-Form der Aminosäurereste.

Abkürzungen: Bz = Benzoyl- Nic = Nicotinyll-
Ac = Acetyl- AcC = Chloracetyl-
Z = Carbobenzyloxy- AcF₃ = Trifluoracetyl-

Tabelle 6: Spezifität von α -Chymotrypsin (natürliche Substrate)

	***	«Normale» Spezifität *		«Anormale» Spezifität		
		Peptidbindungen hydrolysiert		Peptidbindungen nicht hydrolysiert		
Ileu ⁵ -Hypertensin II ¹³³ (Pferd)	(8)	Tyr-Ileu		-	-	-
Val ⁵ -Hypertensin I ⁴⁰ (Rind)	(10)	Tyr-Val	Phe-His	-	-	-
α -MSH ⁴⁵ (Schwein)	(13)	Tyr-Ser Try-Gly (l)**	Phe-Arg	-	-	-
β -MSH (Schwein ^{41,27} , Rind ⁴² Mensch ⁴⁴)	(18)	Tyr-Lys Try-Gly (l)	Phe-Arg	-	-	-
Insulin, A (Gly)-Kette ⁵⁰	(21)	Tyr-Glu Tyr-CySO ₃ H (l)		-		CySO ₃ H-Ser(l)
Insulin, B (Phe)-Kette ²⁵	(30)	Tyr-Leu Tyr-Thr	Phe-Tyr	Phe-Phe H-Phe-Val	Leu-Tyr (l)	-
Glucagon (Schwein) ¹³⁴	(29)	Tyr-Ser Tyr-Leu	Phe-Thr Phe-Val	-	-	-
α -Corticotropin (Schaf ⁴⁷ , Rind ⁴⁸)	(39)	Tyr-Ser (l) Try-Gly	Phe-Arg Phe-Pro (l)	Tyr-Pro	Leu-Glu (I) Glu(NH ₂)-Ala(I) Val-Lys	Gly-Lys Lys-Lys
β -Corticotropin ³⁷ (Schwein)	(39)	Tyr-Ser (l) Try-Gly	Phe-Arg	Tyr-Pro	Leu-Glu (I)	Lys-Lys
Corticotropin A ³⁹ (Schwein)	(39)	Tyr-Ser (l)	Phe-Arg	-	Leu-Glu (I) Val-Lys	-
Ribonuclease (A) ^{31,65} (Rind)	(124)	Tyr-Glu Tyr-Ser Tyr-Lys Tyr-CySO ₃ H Tyr-Val	Phe-Glu Phe-Val Phe-Asp	Tyr-Pro	Leu-Thr Glu-Ala (I) Glu(NH ₂)-Lys Asp(NH ₂)-Val	His-Ileu Met(SO ₂)-Ser
Tabakmosaik-Virus ³⁵	(157)	Tyr-Ser Tyr-Arg Tyr-Asp Tyr-Asp(NH ₂) Try-Ala Try-Lys Try-Thr	Phe-Val Phe-Leu Phe-Glu(2×) Phe-Ser Phe-Lys Phe-Asp	Phe-Pro	Leu-Ser Leu-Ileu (3×) Leu-Gly (2×) Leu-Ala Leu-Leu Leu-Leu (l) Leu-Val (I) (2×) Glu-Glu (NH ₂) (I) Thr-Glu (I) Glu(NH ₂)-Ala (l) (I)	Thr-Val (2×) Glu(NH ₂)-Val Thr-Ala Val-Arg Ileu-Asp(NH ₂)

* Hydrolyse am Carboxylende der aromatischen Aminosäuren und von Try.

** (l) = langsam hydrolysiert.

*** Aminosäurereste/Mol.

**** (I) = Peptidbindung bei Insulin nicht hydrolysiert.

Spezifität von Pepsin

Beim Pepsin (ähnlich auch beim Papain und Subtilisin) ist der Begriff der Seitenkettenspezifität vollkommen in Frage gestellt. Aus den Untersuchungen mit wenigen synthetischen Peptiden (Tabelle 7) läßt sich

¹²¹ E. J. SNOKE und H. NEURATH, *Arch. Biochem. Biophysics* 21 (1949) 351.

¹²² H. T. HUANG und C. NIEMANN, *J. Amer. Chem. Soc.* 73 (1951) 1541.

¹²³ G. W. SCHWERT und S. KAUFMAN, *J. Biol. Chem.* 180 (1949) 517.
¹²⁴ D. S. HOGNESS und C. NIEMANN, *J. Amer. Chem. Soc.* 75 (1953) 884.

¹²⁵ L. W. CUNNINGHAM, *J. Biol. Chem.* 207 (1954) 443.

¹²⁶ H. T. HUANG, R. J. FOSTER und C. NIEMANN, *J. Amer. Chem. Soc.* 74 (1952) 105.

¹²⁷ H. J. SHINE und C. NIEMANN, *J. Amer. Chem. Soc.* 74 (1952) 97.

¹²⁸ E. J. SNOKE, unveröffentlicht.

¹²⁹ H. GOLDENBERG, V. GOLDENBERG und A. McLAREN, *Biochim. Biophysica Acta* 7 (1951) 110.

¹³⁰ M. BERGMANN und J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.* 124 (1938) 321.

¹³¹ H. F. MOWER und C. NIEMANN, *Biochim. Biophysica Acta* 25 (1957) 420.

¹³² J. W. CLARK-LEWIS und J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.* 207 (1954) 477.

¹³³ L. T. SKEGGS, K. E. LENTZ, J. E. KAHN, N. P. SHUMWAY und K. R. WOODS, *J. Exper. Med.* 104 (1956) 193.

¹³⁴ W. W. BROMER, L. G. SINN und O. K. BEHRENS, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 2798.

Tabelle 7: Spezifität von Pepsin (synthetische Substrate)

A. Substrat hydrolysiert		
Ac-Phe-Phe-OH *	135 [pH 1,8 bis 2,0] 3h/68% hydrolysiert	
Ac-Tyr-Tyr-OH		
Ac-Phe-Tyr-OH		
Z-Tyr-Phe-OH		
Z-Glu-Tyr-OH	136 [pH 4,0] 6h/18% hydrolysiert	
Z-Glu-Phe-OH		24h/64% »
Z-Glu-Tyr-Gly-OH		24h/26% »
Z-Phe-Glu-OH		48h/51% »
H-Gly-Glu-Tyr-OH	96h/93% »	
Z-Tyr-CysH-OH	137 [pH 4,0]	
Z-Tyr-Cys-OH		
Z-CysH-Tyr-OH		
Z-Cys-Tyr-OH		
Z-BS-CysH-Tyr-OH		
H-Tyr-CysH-OH		
H-Tyr-Cys-OH		
H-CysH-Tyr-OH		
H-Cys-Tyr-OH		
Z-Met-Tyr-OH		138
H-Met-Tyr-OH		
B. Substrat langsam hydrolysiert		
Z-Glu-Dijod-Tyr-OH	136 [pH 4,0]	
Z-Glu-Glu-OH		
Z-Glu-Gly-OH		
Z-Tyr-Tyr-OH		
Z-Gly-Tyr-OH		
C. Substrat nicht hydrolysiert		
H-Glu-Tyr-OH	136	
Bz-Lys-NH ₂		
Bz-Gly-Lys-NH ₂		
Bz-His-NH ₂		
Bz-Arg-NH ₂		

* Wenn nicht anders angegeben, immer L-Form der Aminosäurereste.

Abkürzungen:

Bz = Benzoyl-, Ac = Acetyl-, Z = Carbobenzyloxy-, B = Benzyl-

kaum eine bestimmte Spezifität ableiten. Sieht man davon ab, daß die Einheitlichkeit des Pepsins überhaupt angezweifelt wird (möglicherweise Gehalt an Kathepsin A)¹³⁹, so fällt bei den synthetischen Substraten einmal die sehr geringe Hydrolysegeschwindigkeit auf, zum anderen entspricht das außergewöhnliche pH-Optimum (4,0) nicht dem normalerweise üblichen (1,8 bis 2,0) bei der viel schnelleren Hydrolyse der Proteine¹⁴⁰. Der Schluß liegt nahe, daß es sich bei diesen

¹³⁵ L. BAKER, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 809.

¹³⁶ J. S. FRUTON und M. BERGMANN, *J. Biol. Chem.* 127 (1939) 627.

¹³⁷ C. R. HARRINGTON und R. V. PITT-RIVERS, *Biochem. J.* 38 (1944) 417.

¹³⁸ C. A. DEKKER, ST. P. TAYLOR und J. S. FRUTON, *J. Biol. Chem.* 180 (1949) 155.

¹³⁹ N. M. GREEN und H. NEURATH, in *The Proteins*, Vol. II B, Academic Press, New York 1954, S. 1127.

¹⁴⁰ pH-Optimum der Hydrolyse von denaturiertem Serumalbumin (Rind) und Hämoglobin (Rind) liegt bei pH 3,5, bei den nativen Proteinen bei pH 1,7 bis 2,0. M. SCHLAMOWITZ und L. V. PETERSON, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 3137.

synthetischen Peptiden gar nicht um echte Substrate für Pepsin handelt. Nur bei Acetyl-Phe-Phe, Acetyl-Tyr-Tyr u. a. läßt sich eine gewisse Spezifität feststellen. Wie wenig durch die synthetischen Substrate die Spezifität des Pepsins definiert ist, zeigt Tabelle 8. Nur ein kleiner Teil der hydrolysierten Bindungen entspricht etwa den Bindungen, wie sie in dem synthetischen Substrat vorliegen («normale» Spezifität). Viel größer ist die Zahl der anormalen Bindungen, die gespalten wurden, bzw. die «normalen» Peptidbindungen, die nicht angegriffen wurden. Zum Unterschied von Chymotrypsin zeigt sich die Anormalität schon bei kleinen Peptiden. Aus den Daten der wenigen untersuchten Peptide läßt sich aber die wirkliche Spezifität nicht ableiten. Diese scheint auch hier, wie schon mehrfach erwähnt, in unbekannter Weise von der Struktur des Gesamtmoleküls abzuhängen. Außer in der Nachbarschaft der aromatischen Aminosäuren zeigt sich auch eine gewisse Labilität der Peptidbindungen von Leu, Glu, Ala, Val (ähnlich wie beim Chymotrypsin).

Spezifität von Cb

Bei den Peptidasen spaltet Cb A^{141, 84, 85} (Tabelle 9) vom Carboxylende her besonders leicht Aminosäuren mit großen Seitenketten, z. B. die aromatischen Aminosäuren, Leucin usw., ab, während Gly außerordentlich schwer freigesetzt wird¹⁴². Auch die zweitletzte Aminosäure hat einen gewissen Einfluß auf die Spaltungsgeschwindigkeit (z. B. Glu hemmend). Voraussetzung für die Abspaltung der endständigen Aminosäure ist neben der L-Form der letzten und vorletzten Aminosäure (Ausnahme: Dipeptide z. B. NH₂-D-Leu-Tyr-OH gespalten¹⁴⁴) die freie Carboxylgruppe (Amide nicht hydrolysiert). Eine freie α -Aminogruppe wirkt sich ungünstig aus (NH₂-Gly-Tyr-OH langsam hydrolysiert). Durch Cb A werden die basischen Aminosäuren nicht freigesetzt, im Gegensatz zu Cb B¹⁴³, die spezifisch nur Lys und Arg abspaltet (Tabelle 9).

Spezifität von LAP

Bei LAP¹⁴⁵ besteht eine ähnliche Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit (Spaltung vom Aminoende her) von der Größe der Seitenketten (Leu schnell, Gly sehr langsam hydrolysiert) wie bei Cb^{146, 147} (Tabelle 10). Auch die zweite Aminosäure und das Gesamtmolekül (größere Peptide besser hydrolysiert) beeinflussen die Hydrolyse. Eine endständige D-Aminosäure wird nicht abgespalten. Pro wird, wenn es aminoendständig steht,

¹⁴¹ E. WALDSCHMIDT-LEITZ und A. PURR, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 62 (1929) 956.

¹⁴² E. L. SMITH, *Advances Enzymol.* 12 (1951) 233.

¹⁴³ J. E. FOLK und J. A. GLADNER, *J. Biol. Chem.* 231 (1957) 379.

¹⁴⁴ S. YANARI und M. A. MITZ, *J. Amer. Chem. Soc.* 79 (1957) 1150.

¹⁴⁵ E. L. SMITH, *Advances Enzymol.* 12 (1951) 196.

¹⁴⁶ E. L. SMITH und D. H. SPACKMAN, *J. Biol. Chem.* 212 (1955) 271.

¹⁴⁷ R. L. HILL und E. L. SMITH, *J. Biol. Chem.* 224 (1957) 209.

Tabelle 3: Spezifität von Pepsin (natürliche Substrate)

	***	« Normale » Spezifität *		« Anormale Spezifität »
		Peptidbindungen hydrolysiert	Peptidbindungen nicht hydrolysiert	
β -MSH ⁴³ (Schwein)	(18)	His-Phe Phe-Arg (l) **	Pro-Tyr Tyr-Lys	Glu-His (l)
Insulin, A (Gly)-Kette ⁵⁰	(21)	Leu-Tyr Tyr-Glu (l)	Asp-Tyr Tyr-CySO ₃ H	Leu-Glu Glu-Asp Glu-Glu (l) Val-CySO ₃ H (l) Glu-Leu (l)
Insulin, B (Phe)-Kette ²⁵	(30)	Tyr-Leu Phe-Phe Phe-Tyr Phe-Val (l) Leu-Tyr (l) Gly-Phe (l)	Tyr-Thr	Glu-His (l) Glu-Ala (l) Leu-Val Ala-Leu (l)
α -Corticotropin ⁴⁶	(39)	Ala-Phe Phe-Pro Glu-Phe	Ser-Tyr Tyr-Ser His-Phe Phe-Arg Val-Tyr Tyr-Pro	Asp-Asp Glu-Ala (2 ×) Ala-Ser Ser-Glu Asp-Glu Ala-Ser Glu-His (l)
β -Corticotropin ³⁶	(39)	Glu-Phe (Phe-Pro)	Ser-Tyr Tyr-Ser His-Phe Phe-Arg Val-Tyr Tyr-Pro	Glu-Asp Glu-Leu Asp-Glu Leu-Ala
Corticotropin A ³⁹	(39)	Phe-Pro Glu-Phe	Ser-Tyr Tyr-Ser His-Phe Phe-Arg Val-Tyr Tyr-Pro	Glu-His Leu-Ala Asp-Asp
Ribonuclease ^{51, 65, 150}	(124)	Phe-Glu Thr-Phe Phe-Val Tyr-Val Phe-Asp	Asp(NH ₂)-Tyr Lys-Tyr Tyr-CySO ₃ H CySO ₃ H-Tyr CySO ₃ H-Tyr Tyr-Lys Tyr-Glu(NH ₂) Pro-Tyr Tyr-Ser Tyr-Pro	Ala-Ala Leu-Ala Glu (NH ₂)-Ala Val-Ala
Tabakmosaik-Virus ³⁵	(157)	Tyr-Ser Phe-Val Phe-Leu Glu (NH ₂) Phe Phe-Glu Glu (NH ₂) Phe Phe-Lys Asp-Phe Tyr-Asp Ser-Tyr Tyr-Asp Phe-Glu	Glu(NH ₂)-Phe Val-Phe Phe-Ser Arg-Phe Phe-Pro Val-Tyr Arg-Tyr Ser-Phe	Leu-Ser Leu-Ileu (3 ×) Leu-Ala Leu-Gly (2 ×) Leu-Leu (2 ×) Leu-Val Ala-Arg Ala-Val Ala-Ileu Val-Try Val-Asp Asp-Pro (2 ×) (l) Glu-Leu (2 ×) Glu(NH ₂)-Ala Glu-Val Thr-Ala Glu(NH ₂)-Val Ala-Try Ala-Leu

* Spezifität abgeleitet aus Versuchen mit synthetischem Substrat (Spaltung hauptsächlich am Amino- und Carboxylende der aromatischen Aminosäuren).

** (l) = langsam hydrolysiert.

*** Aminosäurereste/Mol.

langsam freigesetzt; es verhindert aber die Abspaltung der endständig stehenden Aminosäure, wenn es an zwei-

ter Stelle steht (Peptidbindung mit der Imino-Gruppe ohne freies H-Atom).

Mit den oben erwähnten Beispielen, die in keiner Weise ein vollständiges Bild geben, ist der Anwendungsbereich der proteolytischen Fermente noch nicht er-

Tabelle 9: Spezifität von Carboxypeptidase A¹⁴² und B¹⁴³ (synthetische Substrate)

Carboxypeptidase A (oder Gemisch Carboxypeptidase A + B)		Carboxypeptidase B	
Z-Gly-Phe-OH	12-14*	Hip-Lys-OH	(100)**
Z-Gly-Tyr-OH	6,2, 7,0	Hip-Arg-OH	(72)
Z-Gly-Try-OH	4,7	Hip-Orn-OH	(30)
Z-Gly-Leu-OH	2,6	Hip-Pro-Lys-OH	(0,4)
Z-Gly-Met-OH	1,2	ϵ -N-(Z-Gly)-Lys-OH	(0)
Z-Gly-Ileu-OH	0,54	Hip-D-Lys-OH	(0)
Z-Gly-Ala-OH	0,038	Hip-Lys-NH ₂	(0)
Z-Gly-Gly-OH	0,0024	Bz-Lys-Gly-OH	(0)
Z-Ala-Phe-OH	11,0		
Z-Ala-Tyr-OH	6,3		
Z-Glu-Phe-OH	0,8		
Z-Glu-Tyr-OH	0,5		
Z-Glu-Met-OH	0,073		
Z-Try-Ala-OH	0,12		
Z-Try-Gly-OH	0,0068		
Z-Try-Pro-OH	0,0025		
Z-Gly-Pro-OH	0		
H-Gly-Tyr-OH	(sehr langsam)		

* Proteolytischer Koeffizient (C') (Reaktion erster Ordnung).

** Hip-Lys-OH = 100 (Vergleichswerte).

Abkürzungen:

Z = Carbobenzoxy-, Bz = Benzoyl-, Hip = Hippuryl-

schöpft. Bei der Strukturaufklärung weiterer Peptide und Proteine, besonders bei Verwendung neuer bis heute unbekannter Enzyme, werden in Zukunft viele Anwendungsmöglichkeiten gegeben sein. Ebenso werden sie eine noch breitere Verwendung bei der Reinheitsprüfung von synthetischen Peptiden finden. Auch die wichtige Frage der Spezifität bedarf intensiver grundlegender Untersuchungen. Hier können besonders in Verbindung mit den synthetischen Peptiden Fortschritte erzielt werden. Durch systematischen Vergleich des Verhaltens von synthetischen großen und kleinen (in der Aminosäuresequenz gleichen) Peptiden gegenüber Enzymen ist es möglich, bisher verborgene Einflüsse auf die Spezifität zu erkennen. Bis heute liegen hier nur zwei Arbeiten bezüglich der «anormalen» Spe-

Tabelle 10: Spezifität von Leucinaminopeptidase¹⁴⁶ (synthetische Substrate)

H-Leu-Leu-OH	100*
H-Leu-Ileu-OH	64
H-Leu-Val-OH	53
H-Leu-Ala-OH	64
H-Leu-Gly-OH	86
H-Leu-Phe-OH	26
H-Leu-Tyr-OH	20
H-Ala-Leu-OH	93
H-Ala-Gly-OH	9,4
H-His-Gly-OH	40
H-Gly-Leu-OH	10
H-Gly-Tyr-OH	3,6
H-Gly-Gly-OH	1,1
H-Gly-Pro-OH	0
H-Pro-Gly-OH	2,4
H-Leu-D-Leu-OH	0,7
H-D-Leu-Gly-OH	0
H-D-Leu-Tyr-OH	0

* Vergleichswerte, H-Leu-Leu-OH = 100.

zifität von Chymotrypsin vor. So konnte ZAHN¹⁴⁸ zeigen, daß bei dem Insulinpeptid Gly-Phe-Phe-Tyr entsprechend dem Insulin die Phe-Phe-Bindung nicht hydrolysiert wird und im Peptid Ala-Leu-Tyr-Leu-Val die Leu-Tyr-Bindung (langsam) «anormal» gespalten wird. Die andere von Chymotrypsin «anormal» hydrolysierte CySO₃H-Ser-Bindung des Insulins war von NIEMANN¹⁴⁹ untersucht worden. Er fand, daß beim analogen N-Acetyl-Cysteinsäure-carbonsäureamid im Gegensatz dazu die Amidgruppe nicht abgespalten wird. Diese Stabilität schrieb er dem zu kleinen Substratmolekül zu, mit dem sich das Enzym mit seinem sogenannten Kombinationszentrum und seinem katalytischen Zentrum, die einen gewissen Abstand voneinander haben, nicht gleichzeitig verbinden kann. Diese Hypothese würde den oben für die Spezifität wiederholt als wichtig angesehenen Einfluß des Gesamtmoleküls auch von seiten des Enzyms in interessanter Weise ergänzen.

¹⁴⁸ H. ZAHN und N. H. LA FRANCE, *Liebigs Ann. Chem.* 630 (1960) 37.¹⁴⁹ H. F. MOVER und C. NIEMANN, *Biochim. Biophysica Acta* 25 (1957) 420.¹⁵⁰ C. B. ANFINSEN, *J. Biol. Chem.* 196 (1952) 201, 221 (1956) 405.