

## Über eine neue Carboxypeptidase (EC 3.4.2.?) aus der Milz

VON ULF STEIN, ULRICH WEBER und ECKHART BUDECKE

Aus den Instituten für Physiologische Chemie der Universitäten Tübingen und Münster\*

(Der Schriftleitung zugegangen am 14. Dezember 1967)

**Zusammenfassung:** In der Milz des Rindes wird eine saure Carboxypeptidase nachgewiesen, deren spezifische Aktivität im zellfreien Überstand des Homogenates 6,0 mU/mg Protein beträgt. Das Enzym wird durch Ammoniumsulfatfällung, Gel-filtration und Ionenaustauschchromatographie 450fach auf eine spezifische Aktivität von 2,7 U/mg Protein angereichert. Bei der Reinigung werden die im Homogenat nachweisbaren Aktivitäten der Kathepsine A, B, C und D, der Leucinamino-peptidase und der katheptischen Carboxypeptidasen abgetrennt.

Die Substratspezifität der sauren Carboxypeptidase aus Milz wurde an mehr als 60 durch chemische Synthese erhaltenen Peptiden und Peptidderivaten geprüft. Das Enzym spaltet Tripeptide vom Typ Leu-Leu-X, die Leucin, Tyrosin, Glutaminsäure, Valin, Serin, Alanin, Asparaginsäure und Glycin als C-terminale Aminosäuren enthalten und Tripeptide vom Typ X-Leu-Leu, die Serin, Glutaminsäure, Glycin, Valin und Histidin als N-terminale Aminosäure enthalten, mit in dieser Reihenfolge abnehmender Geschwindigkeit. Mit geringerer Geschwindigkeit wird eine Reihe Leucin-freier Tripeptide gespalten. Bei Tripeptiden vom Typ Leu-Leu-X, die Histidin, Arginin oder Prolin als C-terminale Aminosäure enthalten, sinkt die Spaltungsrate auf wenige Prozent gegenüber dem Standardsubstrat (Ser-Leu-Leu = 100%) ab. Di-peptide werden nicht, Tetrapeptide nur in geringem

Umfange hydrolysiert. Substituierte Peptide und alle unphysiologischen Proteasesubstrate werden nicht angegriffen.

Die saure Carboxypeptidase besitzt keine proteolytische Aktivität und ist auch gegenüber Proteinen unwirksam. Aus proteolytischen Spaltprodukten der oxydierten B-Kette des Insulins werden jedoch Leucin und Phenylalanin aus C-terminaler Position abgespalten.

Für das Substrat Ser-Leu-Leu beträgt das pH-Optimum (in Citratpuffer) pH 5,0, das Temperatur-optimum bei 2stdg. Inkubation 50°C und die Aktivierungsenergie 9800 cal/Mol. Das Enzym hat ein Molekulargewicht von  $5-8 \cdot 10^4$  (Gel-filtration), bei Trennung der subzellulären Partikeln aus Milzhomogenaten wird die höchste spezifische Aktivität in der Lysosomen-Fraktion gefunden.

Die MICHAELIS-Konstanten für die Tripeptide Ser-Leu-Leu, Leu-Leu-Leu, Leu-Leu-Val und Gly-Gly-Phe betragen 1,2, 1,6, 1,8 bzw.  $4,6 \cdot 10^{-4}$ M. Die Aktivität der sauren Carboxypeptidase wird durch Metallionen, durch Sulfhydrylgruppenreagenzien und durch Chelatbildner in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^{-4}$ M nicht beeinflusst.

Auf Grund der untersuchten Eigenschaften ist die beschriebene saure Carboxypeptidase mit keiner der bisher bekannten Carboxypeptidasen identisch. Da auch Substrate der katheptischen Carboxypeptidasen nicht angegriffen werden, wird die Bezeichnung „saure Carboxypeptidase“ vorgeschlagen.

**Summary:** An acid carboxypeptidase was demonstrated in bovine spleen. The specific activity in the cell-free supernatant of an homogenate was 6.0 mU/mg protein. The enzyme was purified

450-fold to a specific activity of 2.7 U/mg protein by ammonium sulphate precipitation, gel filtration and ion exchange chromatography. This purification removed the activities of cathepsins A, B,

\* Postanschrift: Prof. Dr. E. BUDECKE, 44 Münster/Westf., Waldeyerstraße 15.

Abkürzungen: Aminosäuren s. diese Z. 348, 245 [1967]; Z- = Benzyloxycarbonyl-, Hip- = Hippuryl-, -ONp = p-Nitro-phenoxy-, -OBzl = Benzyloxy, -ONb = p-Nitro-benzyloxy-.

C and D, leucine aminopeptidase and catheptic carboxypeptidase.

The substrate specificity of the acid carboxypeptidase from spleen was tested on more than 60 peptides and peptide derivatives, which were obtained by chemical synthesis. The enzyme hydrolysed tripeptides of the type Leu-Leu-X, in which the C-terminal amino acid was leucine, tyrosine, glutamic acid, valine, serine, alanine, aspartic acid or glycine, and tripeptides of the type X-Leu-Leu, in which the N-terminal amino acid was serine, glutamic acid, glycine, valine or histidine; the rate of hydrolysis decreased in the order of the listed amino acids. A series of non-leucine tripeptides was attacked very slowly. In tripeptides of the type Leu-Leu-X, in which the C-terminal amino acid is histidine, arginine or proline, the rate of cleavage falls to a few per cent compared with the standard substrate (Ser-Leu-Leu = 100%). Dipeptides were not attacked, tetrapeptides only to a very small extent. There was no activity with substituted peptides or any of the unphysiological protease substrates. The acid carboxypeptidase has no proteolytic activity and is inactive towards proteins. Leucine and

phenylalanine were, however, removed from their C-terminal position in proteolytic cleavage products of the oxidised B-chain of insulin.

For the substrate Ser-Leu-Leu, the optimum pH in citrate buffer was 5.0, the optimum temperature for a 2 hr incubation period was 50°C, and the activation energy was 9800 cal/mol. The molecular weight of the enzyme was  $5-8 \cdot 10^4$  (gel filtration). After separation of the subcellular particles of the spleen homogenate, the highest specific activity was found in the lysosome fraction.

MICHAELIS constants for the tripeptides Ser-Leu-Leu, Leu-Leu-Leu, Leu-Leu-Val and Gly-Gly-Phe were 1.2, 1.6, 1.8 and  $4.6 \cdot 10^{-4}M$  respectively. Metal ions, sulphhydryl reagents and chelating agents in concentrations of  $1 \cdot 10^{-4}M$  had no effect on enzyme activity.

From the above properties, the acid carboxypeptidase described here is not identical with any of the carboxypeptidases reported so far. Since even substrates of catheptic carboxypeptidases are not attacked, the name „acid carboxypeptidase“ is proposed.

Carboxypeptidasen — Enzyme, die systematisch als Peptidyl-Aminosäurehydrolasen (EC 3.4.2. ...) bezeichnet werden — sind in der Natur weit verbreitet. Neben den gut untersuchten Carboxypeptidasen A und B<sup>1</sup> aus Pankreas wurden bisher weniger gut charakterisierte Carboxypeptidasen im Serum von Säugetieren<sup>2,3</sup>, in der Hefe<sup>4</sup> und in Pflanzen<sup>5</sup> gefunden. Die sogenannten katheptischen Carboxypeptidasen<sup>6-8</sup> sind möglicherweise mit Kathepsin A<sup>1</sup> identisch.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über Proteasen<sup>9</sup>, Peptidasen und Glykosidasen in Milz und Arterien- und Gewebe fanden wir im Homogenat aus Rinderaorten<sup>10</sup> und Rindermilz eine Carboxypeptidase, die mit keiner der bisher bekannten Enzyme identisch ist. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Reinigung, Eigenschaften und Substratspezifität der neuen Carboxypeptidase aus Rindermilz, für die der Name „saure Carboxypeptidase“ vorgeschlagen wird.

<sup>1</sup> P. D. BOYER, H. LARDY u. K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. IV, Academic Press, New York 1960.

<sup>2</sup> E. G. ERDOS, E. M. SLOANE u. J. M. WOHLER, *Biochem. Pharmacol.* **13**, 893 [1964].

<sup>3</sup> S. H. FERREIRA u. M. ROCHA E SILVA, *Biochem. Pharmacol.* **11**, 1123 [1962].

<sup>4</sup> F. FELIX u. J. LABOUESSE-MERCOUROFF, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **21**, 303 [1956].

<sup>5</sup> H. ZUBER, *Nature* [London] **201**, 613 [1964].

<sup>6</sup> J. S. FRUTON, G. W. IRVING u. M. BERGMANN, *J. biol. Chemistry* **138**, 249 [1941]; *J. biol. Chemistry* **141**, 763 [1941].

<sup>7</sup> L. M. GREENBAUM u. R. SHERMAN, *J. biol. Chemistry* **237**, 1082 [1962].

<sup>8</sup> H. HANSON, P. HERRMANN u. W. BLECH, *diese Z.* **315**, 201 [1954].

## Methodik

### 1. Enzymaktivitätsbestimmungen

#### Saure Carboxypeptidase

Das aus dem Substrat Ser-Leu-Leu von der sauren Carboxypeptidase abgespaltene C-terminale Leucin wurde nach der in l.c.<sup>11</sup> beschriebenen Ninhydrinreaktion bestimmt. Enzymsatz und Bestimmung der Spaltungsrate erfolgte in gleicher Weise wie bei l.c.<sup>10</sup>.

<sup>9</sup> G. REICH u. E. BUDDECKE, *diese Z.* **348**, 1616 [1967].

<sup>10</sup> E. BUDDECKE, G. REICH u. U. STEIN, *diese Z.* **347**, 192 [1966].

<sup>11</sup> A. T. MATHESON u. B. L. TATTRIE, *Canad. J. Biochem.* **42**, 95 [1964].

*Leucinaminopeptidase (EC 3.4.1.1)*

Farbtest (Fa. Boehringer & Soehne, Mannheim) mit Leucyl-*p*-nitro-anilid als Substrat.

*Kathepsin A (EC 3.4.4....)*

Die Aktivitätsbestimmung wurde mit den Substraten Z-Glu-Tyr, Z-Gly-Phe und mit denaturiertem Hämoglobin bei pH 4,5 durchgeführt. Die angegebenen Aktivitätseinheiten beziehen sich auf das Substrat Z-Glu-Tyr. Inkubation und Bestimmung der freigesetzten carboxylendständigen Aminosäuren wurden mit der Ninhydrinreaktion (l.c.<sup>10</sup>) durchgeführt. Die mit denaturiertem Hämoglobin gemessenen Aktivitäten wurden nach der bei l.c.<sup>12</sup> angegebenen Methode erhalten.

*Kathepsin B (EC 3.4.4....)*

Nachweis und Aktivitätsbestimmung erfolgte in der bei l.c.<sup>13</sup> angegebenen Methode mit dem Substrat *N*-Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitro-anilid-hydrochlorid. Dazu wurden 1,6 ml des in 0,1M Citratphosphatpuffer von pH 5,4 gelösten Substrates mit einer Konzentration von 10<sup>-3</sup>M (mit Dimethylsulfoxid als Lösungsvermittler) mit 0,2 ml einer 0,6M Cysteinhydrochloridlösung, 1,5 ml eines 0,1M Citrat-Phosphat-Puffers, pH 4,5, und 0,2 ml einer bis zu 1,2 mg Protein enthaltenden Enzymlösung je nach Aktivität bis zu 24 Std. nach Zusatz eines Tropfens Toluol bei 37°C inkubiert. Der pH-Wert des Enzymsatzes wurde auf 4,5 gehalten. Nach Zugabe von 1,0 ml 5proz. Trichloressigsäure und weiterer Inkubation bei 37°C für 20 Min. wurde das ausgefallene Protein abzentrifugiert und der Überstand bei 405 nm photometriert. Eichwerte wurden mit *p*-Nitro-anilin aufgestellt.

*Kathepsin C (EC 3.4.4.9)*

Die Aktivitätsmessung wurde nach l.c.<sup>14</sup> mit Gly-Phe-Amidacetat als Substrat durchgeführt.

*Kathepsin D (EC 3.4.4.23)*

Aktivitätsbestimmung wurde mit denaturiertem Hämoglobin als Substrat bei pH 3,1 nach l.c.<sup>12</sup> bestimmt.

*Definition der Enzymeinheiten*

Alle angegebenen Enzymeinheiten beziehen sich auf eine Reaktion bei 37°C. Für die saure Carboxypeptidase, Leucinaminopeptidase, Kathepsin B und Kathepsin A ist eine Millieinheit (mU) diejenige Enzymmenge, die in einer Minute 1 nMol des eingesetzten Substrates umgesetzt. Für Kathepsin C ist eine Enzymeinheit (Einh.) diejenige Enzymmenge, die bei dem in l.c.<sup>14</sup> beschriebenen Testansatz bei 10 Min. Inkubation eine Endextinktion von 0,100 bei 550 nm ergibt. Eine Millieinheit (mU) Kathepsin D setzt aus denaturiertem Hämoglobin in

<sup>12</sup> M. L. ANSON, J. gen. Physiol. **22**, 79 [1938].

<sup>13</sup> B. F. ERLANGER, N. KOKOWSKY u. W. COHEN, Arch. Biochem. Biophysics **95**, 271 [1961].

<sup>14</sup> G. DE LA HABA, P. S. CAMMARATA u. J. S. FRUTON, Methods in Enzymol. **2**, 64 [1955].

einer Minute ein nMol Tyrosin-Äquivalent frei. Spezifische Enzymeinheiten sind in Aktivitäten/mg Protein angegeben.

*2. Analysen*

Von der sauren Carboxypeptidase aus synthetischen Peptiden freigesetzte Aminosäuren wurden papier- bzw. dünn-schichtchromatographisch identifiziert. Zur Anfärbung der Chromatogramme wurde das Ninhydrin-sprühreagenz<sup>15</sup> bzw. die Sprühlösung nach l.c.<sup>16</sup> benutzt. Der Proteingehalt in Lösung wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm bzw., wenn noch störende Chromogene vorlagen, nach der Methode von LOWRY<sup>17</sup> bestimmt.

*3. Substrate*

Chondroitin-4-sulfatprotein wurde nach l.c.<sup>18</sup>, die B-Kette des Insulins (Sulfonatform) nach l.c.<sup>19</sup> dargestellt. Kristallisiertes Rinderserumalbumin, Z-Gly-Phe, Z-Glu-Tyr, Hip-Lys, Hip-Phe, Gly-Phe-Amidacetat, Benzoyl-DL-arginin-*p*-nitro-anilid-hydrochlorid und Chloracetyltyrosin waren Handelspräparate. Alle weiteren als Substrate der sauren Carboxypeptidase eingesetzten Peptide und Peptidderivate waren eigene Präparate (s. folg. Abschnitt).

*4. Synthese der Peptide*

Folgende Peptide wurden durch chemische Synthese erhalten:

I	II	III
Gly-Leu-Leu	Leu-Leu-Gly	Gly-Gly-Leu
Ser-Leu-Leu	Leu-Leu-Ala	Gly-Gly-Val
Glu-Leu-Leu	Leu-Leu-Ser	
His-Leu-Leu	Leu-Leu-Asp	
Val-Leu-Leu	Leu-Leu-Glu	
Gly-Gly-Leu-Leu	Leu-Leu-Tyr	Leu-His-Leu
	Leu-Leu-His	
	Leu-Leu-Arg	Gly-Leu-Leu-Leu
	Leu-Leu-Pro	Glu-Leu-Leu-Leu
	Leu-Leu-Leu	
	Leu-Leu-D-Leu	Arg-Glu-Gly <sup>20</sup>
	Leu-Leu-Val	Arg-Gly-Glu <sup>20</sup>
	Leu-Leu-Leu-Leu	Arg-Gly-Phe <sup>20</sup>

*Gruppe I* wurde mit Ausnahme von Ser-Leu-Leu und His-Leu-Leu aus den entsprechenden Z-Aminosäure-*p*-nitro-phenylestern und Leu-Leu-*p*-nitro-benzylester synthetisiert. Geschütztes His-Leu-Leu wurde aus

<sup>15</sup> E. Merck AG, Darmstadt, Chromatographie.

<sup>16</sup> D. MÜTING, Naturwissenschaften **39**, 303 [1952].

<sup>17</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry **193**, 265 [1951].

<sup>18</sup> E. BUDDECKE u. M. SCHUBERT, diese Z. **325**, 189 [1961]; E. BUDDECKE, W. KRÖZ u. E. LANKA, diese Z. **331**, 196 [1963].

<sup>19</sup> Y. C. DU, R. Q. JIANG u. C. L. TSOU, Sci. sinica **14**, 229 [1965].

<sup>20</sup> G. B. ZANKL, Dissertat. Tübingen 1962.

Z-His-azid<sup>21</sup> und Leu-Leu-*p*-nitro-benzylester, Ser-Leu-Leu aus Z-Ser und Leu-Leu-*p*-nitro-benzylester mit Dicyclohexylcarbodiimid erhalten.

Geschütztes Peptid	Erhalten durch Umsetzung von Leu-Leu- <i>p</i> -nitro-benzylester mit	Schmp. [°C]	Ausbeute [%]
Gly-Leu-Leu	Z-Gly-ONp	78—80	85
Ser-Leu-Leu	Z-Ser <sup>22</sup>	159—160	85
Glu-Leu-Leu	Z-Glu- $\gamma$ -OBzl- $\alpha$ -ONp <sup>23</sup>	112—115	90
His-Leu-Leu	Z-His-azid <sup>21</sup>	158—160	40
Val-Leu-Leu	Z-Val-ONp <sup>24</sup>	159—161	80
Gly-Gly-Leu-Leu	Z-Gly-Gly-ONp	98—100	80

Die geschützten Peptide der *Gruppe II* wurden synthetisiert aus Z-Leu-Leu und den entsprechenden Aminosäure-benzyl- oder -*p*-nitro-benzylestern mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 2 Äquivalenten *N*-Hydroxy-succinimid nach WEYGAND<sup>25</sup>.

Geschütztes Peptid	Erhalten durch Umsetzung von Z-Leu-Leu mit	Schmp. [°C]	Ausbeute [%]
Leu-Leu-Gly	Gly-ONb · HBr <sup>26</sup>	112—114	75
Leu-Leu-Ala	Ala-ONb · HBr (analog <sup>26</sup> )	145—147	65
Leu-Leu-Ser	Ser-ONb · C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SO <sub>3</sub> H <sup>27</sup>	123—125	60
Leu-Leu-Asp	Asp-di-OBzl · HCl <sup>28</sup>	130—132	55
Leu-Leu-Glu	Glu-di-OBzl · HCl <sup>28</sup>	118—120	60
Leu-Leu-Tyr	Tyr-ONb · C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SO <sub>3</sub> H <sup>27</sup>	136—138	75
Leu-Leu-His	His-ONb · 2 C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> SO <sub>3</sub> H <sup>29</sup>	124—126	75
Leu-Leu-Arg	<i>N</i> <sup><math>\omega</math></sup> -Z-Arg-OBzl <sup>30</sup>	Öl	40
Leu-Leu-Pro	Pro-OBzl · HCl <sup>31</sup>	Öl	50
Leu-Leu-Leu	Leu-ONb · HBr <sup>26</sup>	128—130	65
Leu-Leu-D-Leu	D-Leu-ONb · HBr <sup>26</sup>	Öl	70
Leu-Leu-Val	Val-ONb · HBr (analog <sup>26</sup> )	143—145	85
Leu-Leu-Leu-Leu	Leu-Leu-ONb · HBr	186—188	80

Die geschützten Peptide der *Gruppe III* wurden alle nach der *p*-Nitro-phenylester-Methode aus folgenden Teilstücken synthetisiert:

Geschütztes Peptid	Erhalten durch Umsetzung von	Schmp. [°C]	Ausbeute [%]
Gly-Gly-Leu	Z-Gly-Gly-ONp + Leu-ONb · HBr <sup>26</sup>	120—121	85
Gly-Gly-Val	Z-Gly-Gly-ONp + Val-ONb · HBr <sup>26</sup>	106—108	90
Leu-His-Leu	Z-Leu-ONp + His-Leu-ONb · 2 HBr <sup>26</sup>	103—105	70
Gly-Leu-Leu-Leu	Z-Gly-ONp + Leu-Leu-Leu-ONb · HBr <sup>26</sup>	162—164	75
Glu-Leu-Leu-Leu	Z-Glu- $\gamma$ -OBzl- $\alpha$ -ONp <sup>23</sup> + Leu-Leu-Leu-ONb · HBr	152—154	65

Von allen geschützten Peptiden, die kristallin anfielen, wurden richtige Analysen erhalten.

<sup>21</sup> R. W. HOLLEY u. E. SONDHEIMER, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1326 [1954].

<sup>22</sup> S. GUTTMANN u. R. A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta **41**, 1852 [1958].

<sup>23</sup> G. LOSSE, H. JESCHKEIT u. W. LANGENBECK, Chem. Ber. **96**, 204 [1963].

<sup>24</sup> R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL u. P. SIEBER, Helv. chim. Acta **40**, 373 [1957].

<sup>25</sup> F. WEYGAND, Z. Naturforsch. **21 b**, 426 [1966].

<sup>26</sup> H. SCHWARZ u. K. ARAKAWA, J. Amer. chem. Soc. **81**, 5691 [1959].

<sup>27</sup> E. SCHRÖDER u. E. KLIEGER, Liebigs Ann. Chem. **673**, 208 [1964].

<sup>28</sup> M. LIEFLÄNDER, Dissertat. Göttingen 1958.

<sup>29</sup> J. E. SHIELDS, W. H. MCGREGOR u. F. H. CARPENTER, J. org. Chemistry **26**, 1491 [1961].

<sup>30</sup> L. ZERVAS, M. WINITZ u. J. B. GREENSTEIN, J. org. Chemistry **22**, 1515 [1957]; L. ZERVAS, T. T. OTANI, M. WINITZ u. J. P. GREENSTEIN, J. Amer. chem. Soc. **81**, 2878 [1959].

<sup>31</sup> R. E. NEUMANN u. E. L. SMITH, J. biol. Chemistry **193**, 97 [1951].

*Allgemeine Synthese von geschützten Peptiden nach der p-Nitro-phenylestermethode*

10 mMol Aminosäureester- bzw. Peptidesterhydrochlorid oder -bromid wurden in 50 ml Dimethylformamid gelöst, mit 1,4 ml Triäthylamin und 10 mMol Z-Aminosäure- bzw. Z-Peptid-*p*-nitro-phenylester versetzt. Nach 24 Std. bei Zimmertemperatur wurde in 5proz. Kaliumhydrogencarbonat-Lösung eingegossen und das geschützte Peptid mit Essigester extrahiert. Die Essigesterphase wurde mit 0,5N NH<sub>4</sub>OH oder 1proz. Triäthylaminlösung bis zum Verschwinden der gelben Farbe, dann mit Wasser, verdünnter Salzsäure und wieder Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Bei Zugabe von Petroläther trat meistens Kristallisation ein. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther.

*Allgemeine Synthese von geschützten Peptiden mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von N-Hydroxy-succinimid*

10 mMol Aminosäureester- bzw. Peptidesterhydrochlorid oder -bromid wurden in 50 ml Dimethylformamid gelöst und auf -20°C gekühlt. Dann gab man 1,4 ml Triäthylamin, 10 mMol Z-Aminosäure oder Z-Peptid und 20 mMol N-Hydroxy-succinimid und 10 mMol Dicyclohexylcarbodiimid zu. Nach mehrstündigem Rühren wurde vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, in Wasser eingegossen und das geschützte Peptid mit Essigester extrahiert. Die Essigesterphase wurde mit verdünnter Salzsäure, Wasser, Hydrogencarbonatlösung und wieder Wasser gewaschen, getrocknet und eingengt. Zugabe von Petroläther ergab meist ein kristallines Produkt.

*Abspaltung der Schutzgruppen*

Die Z-Schutzgruppe, Benzyl- und *p*-Nitro-benzylester wurden in einem Schritt mit Wasserstoff und Palladium/Kohle abgespalten. Dazu wurde das geschützte Peptid eventuell unter Erwärmen in Methanol gelöst, mit etwas Eisessig versetzt und in einer geschlossenen Hydrierapparatur hydriert. Nach beendeter Wasserstoffaufnahme wurde vom Katalysator abfiltriert und eingengt. Aus dem Rückstand wurde das Peptid mit Äthanol gefällt. Die Peptide wurden aus wäßrigem Äthanol umkristallisiert.

Sämtliche Peptide, mit Ausnahme von Leu-Leu-Arg, das noch Spuren von Arginin enthielt, waren chromatographisch (in Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 und in Pyridin/Wasser 2:1) und optisch rein. Die optische Reinheit wurde durch Abbau mit Leucinaminopeptidase geprüft. Von allen Peptiden wurden richtige Analysen erhalten.

*Leu-Leu-p-nitro-benzylester · HBr*

*Z-Leu-Leu-p-nitro-benzylester*: 17,4 g *Leu-p-nitro-benzylester · HBr*<sup>26</sup> und 19,2 g *Z-Leu-ONp* wurden nach

der *p*-Nitro-phenylester-Methode umgesetzt und aufgearbeitet. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther. Ausbeute 80%, Schmp. 79–81°C.

C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (513,6) Ber. N 8,18 Gef. N 8,2

*Leu-Leu-p-nitro-benzylester · HBr*: 10,3 g (20 mMol) *Z-Leu-Leu-p-nitro-benzylester* wurden in 50 ml 2N HBr/Eisessig gelöst. Nach 30 Min. bei Zimmertemperatur wurde der Eisessig im Vak. abdestilliert und der braune Rückstand in 50 ml Essigester gelöst. Bei Zugabe von Äther kristallisierte das Hydrobromid in feinen Nadeln aus. Ausbeute 85%, Schmp. 142–144°C.

C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Br (460,3) Ber. N 9,13 Gef. N 9,3

*Leu-Leu-Leu-p-nitro-benzylester · HBr*

*Z-Leu-Leu-Leu-p-nitro-benzylester*: 7,6 g (20 mMol) *Z-Leu-ONp* wurden mit 9,2 g *Leu-Leu-p-nitro-benzylester · HBr* umgesetzt. Die übliche Aufarbeitung ergab ein Öl, das über Petroläther allmählich erstarrte. Es wurde mehrmals aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute 70%, Schmp. 128–130°C.

C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> (626,7) Ber. N 8,93 Gef. N 9,0

*Leu-Leu-Leu-p-nitro-benzylester · HBr*: 9,4 g (15 mMol) *Z-Leu-Leu-Leu-p-nitro-benzylester* wurden 30 Min. mit 50 ml 2N HBr/Eisessig behandelt, anschließend der Eisessig im Vak. abdestilliert und der Rückstand mit absol. Äther versetzt. Das Hydrobromid fiel als amorphes gelbliches Pulver aus. Es wurde aus Essigester/Äther umgefällt. Ausbeute 80%, kein def. Schmp.

C<sub>25</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (573,5) Ber. N 9,77 Gef. N 9,7

*Z-Leu-Leu*

*Z-Leu-Leu-methylester*: 26,5 g *Z-Leu*<sup>32</sup> (0,1 Mol) gelöst in 150 ml Chloroform wurden mit 14 ml Triäthylamin (0,1 Mol) versetzt und auf -20°C gekühlt. Man tropfte innerhalb von 5 Min. 10 ml (0,1 Mol) Chlorameisensäureäthylester zu und ließ 20 Min. bei -20°C rühren. Dann fügte man eine vorgekühlte Lösung von 0,1 Mol *Leucin-methylester* in 150 ml Chloroform zu, die man aus 18,6 g (0,1 Mol) *Leucin-methylester · HCl*<sup>33</sup> und 14 ml Triäthylamin in 150 ml Chloroform bereitete. Man erwärmte nun allmählich auf Zimmertemperatur, extrahierte dann die Chloroformlösung mit 1N HCl, Wasser, Hydrogencarbonatlösung und wieder Wasser, trocknete über Natriumsulfat und destillierte das Chloroform ab. Das zurückbleibende farblose Öl wurde in wenig Essigester gelöst und mit viel Petroläther versetzt. Im Kühlschrank kristallisierte rasch der Ester aus. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther. Ausbeute 60–65%, Schmp. 97–98°C.

C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (392,5) Ber. N 7,15 Gef. N 7,3

<sup>32</sup> S. M. FOX u. M. FLING, J. Amer. chem. Soc. **72**, 1862 [1950].

<sup>33</sup> M. BRENNER u. W. HUBER, Helv. chim. Acta **36**, 1109 [1953].

*Z-Leu-Leu*: 39,2 g (0,1 Mol) *Z-Leu-Leu-methylester* wurden in 150 ml Dioxan gelöst und mit 110 ml (0,11 Mol) 1N NaOH versetzt. Die Suspension wurde solange geschüttelt, bis sich eine klare Lösung gebildet hatte (ungefähr 10 Min.). Man ließ noch 30 Min. stehen, destillierte dann das Dioxan im Vak. ab und extrahierte die wäßrige Phase zweimal mit Essigester. Dann wurde die wäßrige Phase mit 115 ml 1N HCl angesäuert und das sich abscheidende Öl mit Essigester extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Abdestillieren des Essigesters erhielt man ein farbloses Öl. Es wurde in 100 ml Essigester gelöst. In der Hitze wurde bis zur Trübung Petroläther zugegeben. Das *Z-Leu-Leu* kristallisierte rasch aus. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther. Ausbeute 85–90%, Schmp. 101–103°C.

$C_{20}H_{30}N_2O_5$  (378,4) Ber. N 7,4 Gef. N 7,3

5. *Reinigung der sauren Carboxypeptidase aus Rindermilz*  
Alle Arbeiten wurden bei +4°C bzw. unter Kühlung im Eisbad vorgenommen.

#### a) *Extraktion und Fällung*

Schlachtfrisch entnommene, auf Eis gekühlte Rindermilzen wurden vom anhängenden Bindegewebe befreit und nach zweimaliger Passage durch den vorgekühlten Fleischwolf in Portionen zu je 800 g mit dem 7fachen Volumen destillierten Wassers mit Hilfe des Ultraturax (Fa. Jahnke & Kunkel KG, Staufen/Breisgau) 1 Std. lang homogenisiert und weitere 12 Std. gerührt. Nach Abzentrifugieren (3000 × g) wurde der Homogenatüberstand (4,2 mg Protein/ml) nach 2 × 24stdg. Dialyse gegen dest. Wasser auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 25 Gewichtsprozent eingestellt, der Niederschlag in 500–600 ml dest. Wasser aufgenommen, erneut dialysiert und auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 15 Gewichtsprozent gebracht. Das Präzipitat wurde verworfen, der Überstand 24 Std. gegen 0,05M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 4,5, und 24 Std. gegen dest. Wasser dialysiert. Nach Abtrennen des bei der Dialyse aufgetretenen Niederschlages wurde der Überstand lyophilisiert (0,8–1,0 g Protein).

#### b) *Chromatographie*

Auf Chromatographiesäulen (230 × 3 cm, Volumen: 1630 ml), die mit Sephadex G-75 beschickt und mit 0,2M NaCl-Lösung äquilibriert waren, wurden 0,8–1,0 g des nach a) erhaltenen Proteins, gelöst in 8 ml 0,2M NaCl, aufgetragen und nach Elution mit dem gleichen Lösungsmittel in Einzelfractionen zu 5 ml aufgefangen. Die Carboxypeptidaseaktivität enthaltenden Fractionen wurden vereinigt, dialysiert, lyophilisiert und in Portionen von 0,1–0,15 g auf Chromatographiesäulen an Sephadex G-150 (Elutionsmittel 0,2M NaCl) rechromatographiert. 65 mg der dabei erhaltenen aktiven Enzymfraction wurden nach Dialyse und Lyophilisieren in 2 ml 0,01M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 4,5, gelöst, auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte CM-Cellulosesäule (15 × 1,5 cm = 26,5 ml) aufgetragen und

eluiert. Die im Durchbruch erhaltene Enzymfraction (20 mg) wurde über eine mit 0,01M Citrat-Phosphat-Puffer äquilibrierte, DEAE-Cellulose enthaltende Säule (7,5 × 1,5 cm = 13,3 ml) mit einem linearen Natriumchloridgradienten von 0,01–0,4M getrennt.

#### c) *Trennung subzellulärer Partikeln durch fraktionierte Zentrifugation*

6 g Rattenmilz bzw. 2 mm dicke, in eiskalter 0,2M Sucroslösung bis zur Verarbeitung aufbewahrte Schnitte von Rindermilz werden in 140 ml 0,2M Sucrose im Glashomogenisator mit Teflon-Pistill (nach POTTER-ELVEHJEM) disintegriert (je 2 g in 45 ml) und einer fraktionierten Zentrifugation (s. Tab. 5) unterworfen. Die nach den angegebenen Zentrifugationsgängen erhaltenen Sedimente werden in 3 ml kaltem dest. Wasser aufgenommen und nach 1stdg. Stehenlassen bei 0°C bei 3000 × g zentrifugiert. 0,1–0,3 ml des Überstandes werden für die Bestimmung des Proteingehaltes und der enzymatischen Aktivität verwendet.

## Ergebnisse

### 1. *Reinigung der sauren Carboxypeptidase*

Rindermilzhomogenate spalten nicht nur die synthetischen Substrate der Kathepsine A, B und C und der Carboxypeptidasen A und B, sondern enthalten weiterhin eine Hämoglobin spaltende Protease sowie verschiedene Di- und Tripeptidasen und die bekannte Leucinaminopeptidase. Wie die Werte der Tab. 1 ausweisen, ist die Aktivität der verschiedenen proteolytischen und peptidhydrolytischen Aktivitätenen pH-abhängig. Während die unphysiologischen Substrate der Kathepsine A und B lediglich bei pH 4,5, diejenigen der Aminopeptidasen, Di- und Tripeptidasen dagegen nur bei neutralem pH gespalten werden, wird das hier als Standardsubstrat verwendete Tripeptid Ser-Leu-Leu in einen pH-Bereich von 4,5 und 7,2 umgesetzt, wobei am Neutralpunkt eine vollständige enzymatische Hydrolyse in Serin und Leucin stattfindet, bei pH 4,5 jedoch ausschließlich die C-terminale Aminosäure abgespalten wird. Die Frage, ob das Ser-Leu-Leu (und das als zweites Standardsubstrat mitgeprüfte Leu-Leu-Leu) von den in Tab. 1 aufgeführten, schon bekannten Enzymen oder durch ein Enzym bisher unbekannter Spezifität angegriffen wird, war nur durch Reinigung der Ser-Leu-Leu spaltenden Enzymaktivität zu entscheiden.

Verfolgt man im Laufe einer mehrere Reinigungsschritte umfassenden Anreicherung einerseits die Ser-Leu-Leu spaltende, andererseits die Z-Glu-Tyr spaltende Enzymaktivität, so wird deutlich, daß es

Tab. 1. Enzymatische Spaltung von Peptiden und synthetischen Peptidase- und Protease-Substraten durch zellfreien Überstand eines Rindermilzhomogenates bei pH 4,5 und 7,2 (*p*-NA = *p*-Nitro-anilid).

Geprüfte Enzymaktivität	Substrat	Spaltprodukte bei pH	
		4,5	7,2
Kathepsin A	Z-Glu-Tyr	Z-Glu, Tyr	keine Spaltung
Kathepsin B	N-Bz-DL-Arg- <i>p</i> -NA	N-Bz-DL-Arg, Nitroanilin	keine Spaltung
Kathepsin C	Gly-Phe-NH <sub>2</sub> -Ac	Dipeptide	Polymerisation Transaminierung
Kathepsin D	Denat. Hb	Peptide	Peptide
Carboxypeptidase A	Z-Gly-Phe	Z-Gly, Phe	—
Carboxypeptidase B	Hip-Lys	—	Hip, Lys
Aminopeptidasen, Di- und Tripeptidasen	Leu- <i>p</i> -NA	keine Spaltung	Leu, Nitroanilin
	Leu-Leu, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly	keine Spaltung	Leu, Gly
	Ser-Leu-Leu	Ser-Leu, Leu	Ser, Leu
	Leu-Leu-Leu	Leu-Leu, Leu	Leu

sich hier um zwei verschiedene Enzymaktivitäten handeln muß, obgleich beide Enzyme selektiv die C-terminale Aminosäure ihres Substrates abspalten. Während die Ser-Leu-Leu spaltende Carboxypeptidase 450fach angereichert wird, bleibt die Z-Glu-Tyr spaltende Carboxypeptidase bis zur Reinigung durch Gelfiltration an Sephadex G-150 auf der Aktivitätsstufe des Homogenates stehen. Entsprechend ändert sich der Quotient beider Enzyme (Ser-Leu-Leu-Aktivität/Z-Glu-Tyr-Aktivität) von 2,4 im Homogenat auf 207 bei der Gelfiltration.

Eindeutige Beweise für die Annahme, daß es sich bei der Ser-Leu-Leu spaltenden Carboxypeptidase um ein besonderes Enzym handelt, liefert das Elutionsdiagramm, das bei der Reinigung des Enzympräparates an Sephadex G-150 erhalten wurde. Abb. 1 zeigt die saure Carboxypeptidase neben den anderen Proteasen bzw. Peptidasen, die nicht nur in geringerer Aktivität vorhanden, sondern in ihren Aktivitätsgipfeln auch deutlich von der sauren Carboxypeptidase abgesetzt sind. Die „katheptischen“ Carboxypeptidasen sind auf dieser Anreicherungsstufe nicht mehr nachweisbar, oder aber sie befinden sich im gleichen Aktivitätsgipfel wie das Kathepsin A, das Ser-Leu-Leu jedoch in nicht meßbarem Umfange spaltet. Umgekehrt werden im Bereich der Aktivität der sauren Carboxypeptidase weder Z-Glu-Tyr noch Z-Gly-Phe angegriffen. Kathepsin B und C, die im Homogenat in einer spez. Akt. von 0,1 bzw. 0,4 mU/mg Prot. nachzuweisen sind, werden schon durch Gelfiltration an Sepha-

dex G-75, Kathepsin D beim darauffolgenden Reinigungsschritt (Chromatographie an CM-Cellulose) von der sauren Carboxypeptidase abgetrennt. Die Leucinaminopeptidase ist zwar nach der durch Gelfiltration 100fachen Anreicherung der sauren Carboxypeptidase noch in geringer Aktivität meßbar, ist aber bei dem für den Inkubationsansatz der sauren Carboxypeptidase gewählten pH-Wert von 4,5 inaktiv. Außerdem spaltet die Leucinaminopeptidase bei pH-Werten oberhalb von pH 5 Ser-Leu-Leu in Serin und Leu-Leu (bzw. Serin und Leucin).

Tab. 2 gibt eine Übersicht über Art und Erfolge der Reinigung der sauren Carboxypeptidase und die parallel verlaufende Aktivitätsänderung der übrigen proteolytischen bzw. peptidhydrolytischen Enzymaktivitäten der Milz. Bei einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung des Milzhomogenates ist die gesamte Aktivität der sauren Carboxypeptidase in der mit Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 30 Gewichtsprozent fällbaren Fraktion vorhanden und kann bei Umfällung in der zwischen 15 und 25 Gewichtsprozent Ammoniumsulfat auftretenden Fällung in einer Ausbeute von 35% der Gesamtaktivität erhalten werden. Die 450fache Anreicherung der sauren Carboxypeptidase einer Ausgangsaktivität von 6 mU/mg Protein (Mittelwert, der je nach Aktivität des Ausgangsmaterials um 3 mU schwankt) auf eine spezifische Enzymaktivität von 2,7 U/mg Protein führt zu einem Enzympräparat, in dem Fremdaktivitäten proteolytischer oder peptidspaltender Enzyme nicht mehr nach-

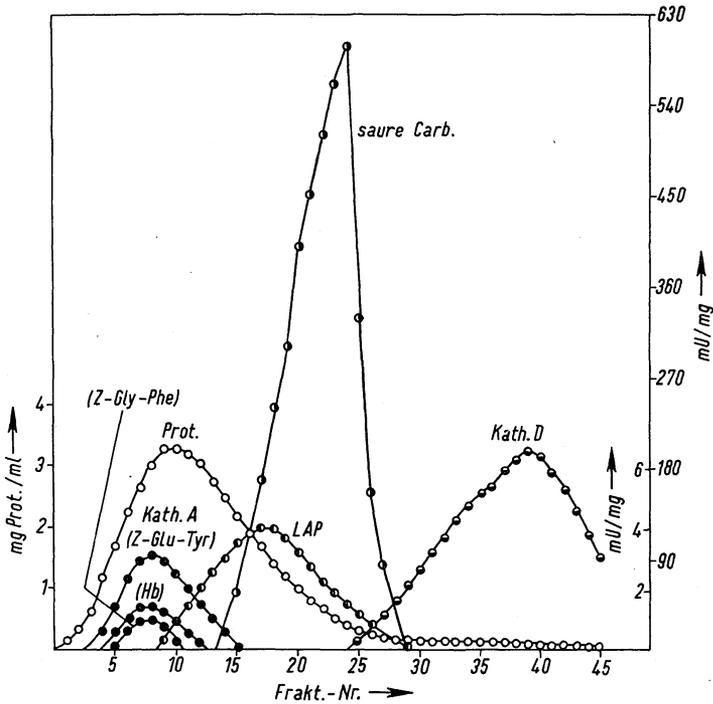


Abb. 1. Elutionsdiagramm nach Gelfiltration an Sephadex G-150 eines durch Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltration (s. Tab. 2) vorgereinigten Enzympräparates aus Rindermilz. Nicht nachweisbare Enzymaktivitäten (Werte auf der Abszisse liegend) sind nicht eingezeichnet.  $\circ-\circ$  und linke Ordinate: Proteinkonzentration;  $\bullet-\bullet$ : Kathepsin A (in Klammern das jeweils verwendete Substrat); Kath. D: Kathepsin D; LAP: Leucinaminopeptidase; saure Carb.: saure Carboxypeptidase; Ordinate rechts innen: spezifische Aktivitäten der Leucinaminopeptidase, von Kathepsin A und D in mU/mg Protein; Ordinate rechts außen: dito für saure Carboxypeptidase.

weisbar sind, obgleich in den ersten Reinigungsschritten Kathepsin D und Leucinaminopeptidase zunächst mit angereichert und erst nach der Ionenaustauschchromatographie abgetrennt werden. Die aktiven Fraktionen der sauren Carboxypeptidase, die nach Gelfiltration an Sephadex G-150 oder späteren Reinigungsschritten erhalten wurden, wurden bei den im folgenden Abschnitt beschriebenen Untersuchungen über Substratspezifität und für die kinetischen Messungen eingesetzt.

## 2. Eigenschaften der sauren Carboxypeptidase

Das pH-Optimum der sauren Carboxypeptidase beträgt 5,0 (Abb. 2), das Temperaturoptimum bei 2stdg. Inkubation 50°C. Bei 71° bzw. 33°C fällt die Aktivität auf 50% ab. Die Aktivität des Enzyms nimmt bei 37°C über einen Zeitraum von 24 Std. nicht meßbar ab.

Die MICHAELIS-Konstanten für Ser-Leu-Leu und Leu-Leu-Leu, Leu-Leu-Val und Gly-Gly-Phe be-

tragen 1,2, 1,6, 1,8 und  $4,6 \cdot 10^{-4}$ M (graphische Auswertung nach LINEWEAVER und BURK). Die Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und eingesetzter Enzymmenge ist linear. Für das Substrat Ser-Leu-Leu (Konzentration im Ansatz 1,14mM) verläuft die Spaltung bei der Einwirkung von 95 mU Carboxypeptidase bis zu einer Spaltung von über 60% des eingesetzten Substrates nach einer Reaktion nullter Ordnung (Abb. 3).

Die Aktivierungsenergie für Ser-Leu-Leu beträgt 9800 cal/Mol, ihre Ableitung und Berechnung wurde nach l. c.<sup>34</sup> vorgenommen. Dieser Wert liegt in der Größenordnung der Pankreascarboxypeptidase A, der mit 8700 angegeben wurde<sup>35</sup>. Bestimmungen des Mol.-Gew. der sauren Carboxy-

<sup>34</sup> A. R. PATTON, *Biochemical Energetics and Kinetics*, W. B. Saunders Comp., Philadelphia—London 1965.

<sup>35</sup> J. LABOUESSE, *Biochim. biophysica Acta* **28**, 341 [1958].

Tab. 2. Reinigung der sauren Carboxypeptidase aus Rindermilz. Definition der Enzymeinheiten und Meßbedingungen s. Methodik. Die Aktivitätsangaben für die Leucinaminopeptidase beziehen sich auf die bei pH 7,2 gewonnenen Werte; bei den säulenchromatographischen Reinigungsschritten ist für jedes Enzym die in dessen Aktivitätsgipfel gemessene Aktivität angegeben. *p*-NA=*p*-Nitro-anilid.

Reinigungsschritt	Saure Carboxypeptidase			Spezifische Aktivitäten der Enzyme [mU/mg Protein]				
	Aktivitätsausbeute [%]	mU/mg Protein (Ser-Leu-Leu)	Anreicherungsgrad	Kathepsin A** (Z-Glu-Tyr)	Kathepsin B (N-Bz-DL-Arg-p-NA)	Kathepsin C (Gly-Phe-Amidacetat)	Kathepsin D (denat. Hämoglobin)	Leucinaminopeptidase (L-Leu-p-NA)
Homogenat-überstand	100	6,0	1	2,5	0,1	0,4	20***	8,6
1. Ammoniumsulfatfällung (0–25 Gew.%)	60	26	4,5	4,4	—*	—*	20***	15,3
2. Ammoniumsulfatfällung (15–25 Gew.%) und Citratfällung (pH 4,5)	35	62	10	3,1	—*	—*	50***	13,4
Gelfiltration Sephadex G-75	11,5	202	33	8,0	—*	—*	141	1,0
Gelfiltration Sephadex G-150	1,1	600	100	2,9	0	0	6,6	4,0
Chromatographie an CM-Cellulose	0,45	1240	206	0			0	—*
Chromatographie an DEAE-Cellulose	0,25	2700	450					

\* Nicht gemessen. \*\* Aktivitätsmessung bei pH 4.5. \*\*\* Hämoglobin spaltende Aktivitäten bei pH 3,1.

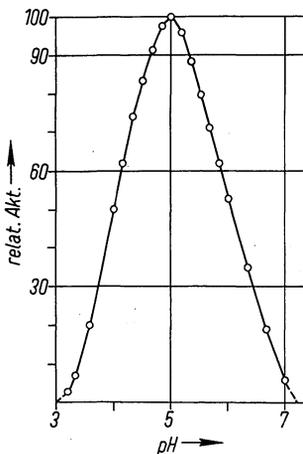


Abb. 2. pH-Abhängigkeit der Spaltung von Ser-Leu-Leu durch die saure Carboxypeptidase aus Rindermilz in 0,05M Citrat-Phosphat-Puffer. Enzympräparat nach Gelfiltration an Sephadex G-150 einer spezifischen Aktivität von 600 mU/mg Protein.

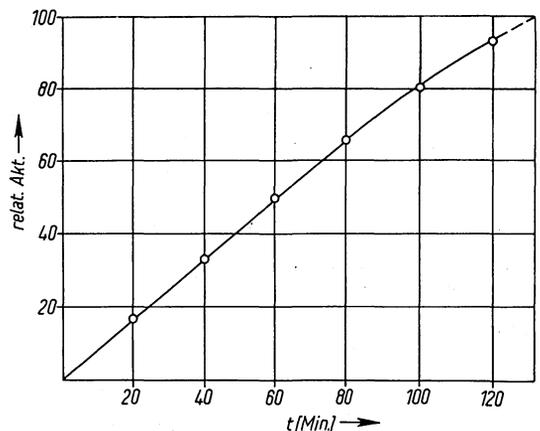


Abb. 3. Enzymatische Hydrolyse von Ser-Leu-Leu durch saure Carboxypeptidase in Abhängigkeit von der Zeit. Ansatz: 1,14  $\mu$ Mol Ser-Leu-Leu und 95 mU Enzym/ml.

Tab. 3. Substrate der sauren Carboxypeptidase aus Rindermilz und relative Spaltungsraten (Leu-Leu-Leu = 100).

Leu-Leu-X	Spaltungsrate	X-Leu-Leu	Spaltungsrate	verschiedene Peptide	Spaltungsrate
Leu-Leu-Leu	100	Ser-Leu-Leu	100	Gly-Gly-Leu	35
Leu-Leu-Tyr	80	Glu-Leu-Leu	90	Arg-Gly-Glu	25
Leu-Leu-Glu	60	Gly-Leu-Leu	60	Gly-Gly-Val	20
Leu-Leu-Val	55	Val-Leu-Leu	60	Gly-Gly-Phe	20
Leu-Leu-Ser	50	His-Leu-Leu	55	Arg-Gly-Phe	10
Leu-Leu-Ala	50	Z-Leu-Leu	<3	Gly-Gly-Leu-Leu	<3
Leu-Leu-Asp	40			Leu-Leu-Leu-Leu	<3
Leu-Leu-Gly	35			Glu-Leu-Leu-Leu	<3
Leu-Leu-His	<3			Leu-His-Leu	<3
Leu-Leu-Arg	<3			Arg-Glu-Gly	<3
Leu-Leu-Pro	<3			Leu-Leu-D-Leu	<3

peptidase durch Gelfiltration ergaben Werte zwischen 50000 und 70000.

Bei Untersuchungen über die Hemmbarkeit der sauren Carboxypeptidase durch Enzyminhibitoren waren folgende Substanzen in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^{-4}M$  ohne Einfluß auf die Aktivität der sauren Carboxypeptidase bei der Spaltung von Ser-Leu-Leu:  $Hg^{2\oplus}$ ,  $Cu^{2\oplus}$ ,  $Co^{2\oplus}$ ,  $Zn^{2\oplus}$ ,  $Fe^{2\oplus}$ ,  $Fe^{3\oplus}$ ,  $Mn^{2\oplus}$ ,  $Mg^{2\oplus}$ ,  $Al^{3\oplus}$ , KCN, Cystein, Glutathion, Histidin, His-His-Leu, *p*-Chlormercuri-benzoat, EDTA, 1.10-Phenanthrolin, Jodacetamid, *N*-Äthylmaleinimid, Indolessigsäure,  $\epsilon$ -Amino-capronsäure und krist. Rinderserumalbumin.

Die saure Carboxypeptidase besitzt keine Acylase-wirkung, wie das negative Ergebnis bei der Inkubation mit Chloracetyltyrosin zeigt. *p*-Nitro-phenylacetat wird zwar in geringem Maße hydrolysiert, doch entspricht diese unspezifische Esterasewirkung dem Proteingehalt der sauren Carboxypeptidase und weist den gleichen Wert auf, wie das in gleicher Proteinkonzentration eingesetzte Rinderserumalbumin.

3. Substratspezifität

Die Substratspezifität der sauren Carboxypeptidase wurde an mehr als 60 Di-, Tri- bzw. Tetrapeptiden untersucht. Die Daten in Tab. 3 und 4, in denen verschiedene Substrate der sauren Carboxypeptidase und ihre relativen Spaltungsraten sowie die durch Carboxypeptidase nicht angreifbaren Peptide zusammengestellt sind, zeigen, daß ein Substrat ganz bestimmte Spezifitätsanforderungen

Tab. 4. Durch die saure Carboxypeptidase aus Rindermilz nicht angreifbare Peptide bzw. Peptidase-Substrate.

Substituierte Peptide und Aminosäuren	Tri- und Tetrapeptide	Dipeptide
Z-Glu-Tyr	Leu-Gly-Gly	Leu-Leu
Z-Gly-Phe	Gly-Leu-Gly	Ser-Leu
Z-Gly-Gly	Gly-Gly-Gly	Gly-Gly
Z-Leu-Gly-Gly	Gly-His-Gly	Ser-Gly
Hip-Lys	His-His-Leu	Gly-Leu
Hip-Phe	Leu-Leu- $\beta$ -Ala	Leu-Gly
Gly-Phe-NH <sub>2</sub> -Ac	Gly-Gly-Glu-Arg	Gly-Tyr
Chloracetyl-Tyrosin	Gly-His-Leu-Glu	His-Leu
<i>N</i> -Bz-DL-Arg- <i>p</i> -naphthylamid	Gly-His-Leu-Gly	His-His
	Gly-Gly-His-Leu	Leu-His
		Glu-Gly
		└─ Gly
		Glu
		└─ Leu
		Glu
		Leu-Asp
		Cys-Gly

erfüllen muß, um von der Carboxypeptidase umgesetzt zu werden. Das Enzym spaltet Tripeptide vom Typ Leu-Leu-X, die Leucin, Tyrosin, Glutaminsäure, Valin, Serin, Alanin, Asparaginsäure und Glycin als C-terminale Aminosäuren enthalten und Tripeptide vom Typ X-Leu-Leu, die Serin, Glutaminsäure, Glycin, Valin und Histidin als N-

terminale Aminosäure enthalten, mit in dieser Reihenfolge abnehmender Geschwindigkeit. Mit geringerer Geschwindigkeit wird eine Reihe Leucin-freier Tripeptide gespalten. Dipeptide werden überhaupt nicht, Tetrapeptide mit sehr viel geringerer spezif. Spaltungsrate umgesetzt, die bei den letzteren nicht über 3% lag. Bei einer zusammenfassenden Beurteilung der Spezifität läßt sich sagen, daß aus Tripeptiden, die Leucin als *N*-terminale und präterminale Aminosäure (Typ Leu-Leu-X) enthalten (Tab. 3, Kolonne 1), alle geprüften C-terminalen Aminosäuren abgespalten werden können, daß die Spaltungsrate jedoch bei den basischen Aminosäuren und beim Prolin gerade noch an der Grenze der Nachweisbarkeit liegt. Bei Tripeptiden vom Typ X-Leu-Leu (Tab. 3, Kolonne 2) wurden alle geprüften Verbindungen mit guter, jedoch auch vom Typ der *N*-terminalen Aminosäure (X) abhängigen Geschwindigkeit gespalten. Das Vorhandensein von Glycin und von Histidin in *N*-terminaler, aber auch in nicht *N*-terminaler Position verschlechtert die Spaltungsrate in jedem Falle. So hat Gly-Leu-Leu eine Spaltungsrate von 60%, Gly-Gly-Leu nur noch eine von 35% und Gly-Gly-Gly wird überhaupt nicht mehr hydrolysiert.

Die saure Carboxypeptidase weist strenge Stereospezifität auf. Bei Ersatz des C-terminalen L-Leucins in Leu-Leu-Leu durch D-Leucin sinkt die relative Spaltungsrate von 100 auf unter 3 ab. Die große Zahl der auf Tab. 4 dargestellten, durch die saure Carboxypeptidase nicht angreifbaren Substrate erlaubt eine eindeutige Abgrenzung der Carboxypeptidase gegen die Kathepsine A, B und C, gegen die katheptischen Carboxypeptidasen, die Pankreas-Carboxypeptidase und auch die Carboxypeptidase aus Hefe und Citrusfrüchten. Es ist ferner ersichtlich, daß bis auf eine an der Nachweisbarkeitsgrenze liegende Leucinabspaltung aus Z-Leu-Leu *N*- und C-substituierte Peptide nicht angegriffen werden.

Proteine werden durch die saure Carboxypeptidase nicht angegriffen. Nach Inkubation des Enzyms mit Rinderserumalbumin, denaturiertem Hämoglobin, Chondroitinsulfat-Protein und der B-Kette des Insulins über 24 Std. waren freie Aminosäuren nicht nachweisbar. Dagegen konnten proteolytische Spaltprodukte dieser Proteine von der Carboxypeptidase angegriffen werden. Aus den durch gereinigtes Kathepsin D freigesetzten Spaltprodukten der oxydierten B-Kette des Insulins spaltet die Milz-Carboxypeptidase Leucin und Phenylalanin ab.

#### 4. Zelluläre Lokalisation der sauren Carboxypeptidase

Das pH-Optimum der Carboxypeptidase im schwach sauren Bereich ließ vermuten, daß sie topochemisch zur Gruppe der lysosomalen sauren Hydrolasen gehört. Diese Vermutung wurde durch Untersuchung der nach Homogenisierung von Ratten- bzw. Rindermilz und fraktionierter Zentrifugation erhaltenen subzellulären Partikeln bestätigt. Tab. 5 gibt die Werte eines Trennungsganges eines Rattenmilz-homogenates wieder und zeigt, daß das Maximum der enzymatischen Aktivität in den bei 3000  $\times g$  sedimentierenden Partikeln gefunden wird. Der Gang der Aufarbeitung wurde durch Leitenzyme kontrolliert, von denen die  $\beta$ -D-Glucuronidase die höchste spezifische Aktivität ebenfalls in der Fraktion S<sub>3</sub>, die Glutamat-Dehydrogenase dagegen in der Fraktion S<sub>2</sub> (Mitochondrienfraktion) aufwies.

Tab. 5. Aktivität der sauren Carboxypeptidase in subzellulären Partikeln der Rattenmilz nach Trennung durch fraktionierte Ultrazentrifugation. S<sub>1</sub> = Rückstand des Homogenates, S<sub>2</sub> = Mitochondrienfraktion, S<sub>3</sub> = Lysosomenfraktion, S<sub>4</sub> = Mikrosomenfraktion, Ü<sub>4</sub> = Überstand nach Zentrifugation bei 105000  $\times g$ . Weitere Angaben s. Methodik. Abschn. 5c.

Fraktion	Zentrifugation Min.	1000 $\times g$	mg Prot./ml	Enzymaktivität mU/mg Protein
S <sub>1</sub>	10	0,8	3,26	3,8
S <sub>2</sub>	10	6	5,48	2,6
S <sub>3</sub>	20	25	5,53	6,5
S <sub>4</sub>	20	105	5,77	1,1
Ü <sub>4</sub>	20	105	4,50	3,6

Die bei den angegebenen *g*-Zahlen erhaltenen Sedimente wurden in dest. Wasser suspendiert und nach Zentrifugation zur Aktivitäts- und Proteinbestimmung eingesetzt. Da die Einzelfractionen nicht durch Rezentrifugation oder Gradientenzentrifugation weiter getrennt wurden, sind Aktivitäten der sauren Carboxypeptidase neben der Fraktion S<sub>3</sub> auch in den übrigen Fraktionen nachweisbar. Bei der Aktivität in S<sub>1</sub> handelt es sich jedoch um nicht aufgeschlossene Zellen, die Aktivität in Ü<sub>4</sub> weist darauf hin, daß die Carboxypeptidase ein gut lösliches Enzym ist, das nach Zerstörung der Lysosomen, die durch den Homogenisierungsvorgang notwendigerweise z. T. eintritt, im 105000  $\times g$ -Überstand gefunden wird.

Tab. 6. Bekannte Carboxypeptidasen (Peptidylaminosäurehydrolasen).

Enzym	Vorkommen	EC	Substrat	pH-Optimum	Lit. l. c.
Carboxypeptidase A	Pankreas	3.4.2.1	Z-Gly-Phe, Z-Gly-Trp	7–8	1
Carboxypeptidase B	Pankreas	3.4.2.2	Hip-Lys, Hip-Arg	7–8	1
Carboxypeptidase N	Serum	3.4.2...	Hip-Lys, Hip-Arg	7–8	2
Carboxypeptidase	Hefe	3.4.2.3	Hip-Phe, Z-Gly-Gly	6	3
Carboxypeptidase	Citrusfrüchte	3.4.2...	Z-Gly-Leu, Z-Leu-Phe	5,3	5
„Katheptische“ Carboxypeptidasen	Milz u. a.	3.4.2...	Z-Glu-Tyr, Z-Gly-Phe	3–5,1	6–8

## Diskussion

Die in der von der International Union of Biochemistry herausgegebenen Liste<sup>36</sup> unter den Klassifikationsnummern EC 3.4.2.1 bis EC 3.4.2.3 aufgeführten Peptidylaminosäurehydrolasen unterscheiden sich von der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Carboxypeptidase durch ihre Substratspezifität und ihr pH-Optimum. Weitere in Serum<sup>2</sup>, Hefe (EC 3.4.2.3)<sup>4</sup> und Pflanzen<sup>5</sup> gefundene Carboxypeptidasen ähneln zwar den bekannten Enzymen bezüglich Substratspezifität bzw. pH-Optimum, lassen sich jedoch auf Grund anderer Eigenschaften (Aktivierbarkeit, Hemmbarkeit) zum Teil voneinander abgrenzen, ohne jedoch Beziehungen zur Milz-Carboxypeptidase zu besitzen. Die Existenz der sog. katheptischen Carboxypeptidasen<sup>6–8</sup> ist wegen der bisher nicht gelungenen Abtrennung vom Kathepsin A und wegen der Spaltung der typischen Kathepsin-A-Substrate fraglich.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene saure Carboxypeptidase ist mit keiner der bekannten Carboxypeptidasen identisch. Dies läßt sich schon aus der Tatsache ableiten, daß keines der für die bekannten Carboxypeptidasen benutzten Standardsubstrate, die in Tab. 6 zusammengestellt sind, von der sauren Carboxypeptidase der Milz meßbar umgesetzt wird. Bemerkenswerterweise wird umgekehrt das Standardsubstrat der sauren Carboxypeptidase Ser-Leu-Leu *nicht* von Kathepsin A bzw. den Z-Glu-Tyr und Z-Gly-Phe spaltenden Enzymaktivitäten umgesetzt (Abb. 1). Ferner erlaubt die fehlende Aktivierbarkeit durch Metalle oder Thiolverbindungen eine eindeutige Abgrenzung gegen die Pankreas-Carboxypeptidase A und die sog. katheptischen Carboxypeptidasen. Da der Terminus „katheptisch“ denjenigen Enzymen vorbehalten

bleiben soll, die an Proteinen und synthetischen Proteasesubstraten wirksam sind, wird für das beschriebene Enzym die Bezeichnung „saure Carboxypeptidase“ vorgeschlagen.

Die saure Carboxypeptidase läßt sich in zahlreichen Organen von Rind und Ratte<sup>37</sup> nachweisen. Das aus Milz erhaltene Enzym unterscheidet sich jedoch von dem früher beschriebenen, im Arterien Gewebe nachgewiesenen und teilweise gereinigtem Enzym<sup>10</sup> durch ein anderes pH-Optimum und die MICHAELIS-Konstanten der geprüften Substrate, die für das Milzenzym z. T. niedriger (Ser-Leu-Leu, Leu-Leu-Val), z. T. jedoch höher (Leu-Leu-Leu, Gly-Gly-Phe) liegen.

Die Untersuchungen über die Substratspezifität der sauren Carboxypeptidase haben erwiesen, daß der lipophile (hydrophobe) Charakter des Substratmoleküls für dessen Angreifbarkeit entscheidend ist, da die Existenz saurer Gruppen (Asp, Glu) die Umsatzgeschwindigkeit erheblich und die Existenz basischer Gruppen (His, Arg) auf minimale Werte absinken läßt. Es hat sich ferner gezeigt, daß die Kettenlänge die Substrateigenschaften wesentlich mitbestimmt. Die Mindestkettenlänge beträgt 3 Aminosäuren, stellt aber gleichzeitig auch das Optimum der enzymatischen Angreifbarkeit dar. Zwar war bei den geprüften Tetrapeptiden eine Spaltbarkeit kaum noch nachweisbar, doch haben die Abbauprobe an proteolytischen Spaltprodukten der oxydierten B-Kette des Insulins gezeigt, daß auch noch länger-kettige Peptide geeigneter Aminosäuresequenz Substrate der Carboxypeptidase sein können<sup>9</sup>.

In Verbindung mit unseren Untersuchungen<sup>38</sup> über die Substratspezifität des Kathepsins D aus der Rinderaorta, für das an der oxydierten B-Kette des

<sup>37</sup> E. BUDDECKE u. B. SITTNER, Z. klin. Chem. 4, 157 [1966].

<sup>38</sup> G. REICH u. E. BUDDECKE, diese Z., 348, 1616 [1967], s. auch l. c.<sup>9</sup>.

<sup>36</sup> Enzyme Nomenclature, Recommendations 1964 of the International Union of Biochemistry, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1965.

Insulins die Spaltorte Leu-15/Tyr-16, Tyr-16/Leu-17, Phe-24/Phe-25 und Phe-25/Tyr-26 ermittelt werden konnten, läßt sich nachweisen, daß aus den unter Einwirkung des Kathepsins D entstandenen Peptidspaltprodukten durch die saure Carboxypeptidase die C-terminalen Aminosäuren Leu-15 und Phe-24 abgespalten werden.

Bei der Beurteilung der Aktivität der sauren Carboxypeptidase ist auch der Einfluß der Ionenstärke des Lösungsmittels in Betracht zu ziehen, da von der Pankreascarboxypeptidase A bekannt ist, daß maximale Aktivität erst bei einer Ionenstärke von 0,3 (einschließlich des Anteils des Substrates an der Ionenstärke) erreicht wird<sup>39</sup>. Derartige Messungen waren bei der Milz-Carboxypeptidase nicht möglich, da aus methodischen Gründen (Abhängigkeit der Ninhydrinreaktion von der Ionenstärke) eine Pufferkonzentration von 0,05 Mol/l nicht überschritten werden durfte.

Kinetische Messungen ergaben, daß über einen Zeitraum von mehr als 80 Min. je Zeiteinheit eine konstante Substratmenge unabhängig von der jeweiligen (abnehmenden) Substratkonzentration umgesetzt wurde ( $-dc/dt = K$ ) und somit der Reaktionsverlauf einer Reaktion nullter Ordnung entspricht. Derartige Verhältnisse lassen sich auch bei der Pankreascarboxypeptidase A, jedoch nur bei hohen Substratkonzentrationen und gleichzeitigem

<sup>39</sup> H. NEURATH u. G. DEMARIA, J. biol. Chemistry **186**, 653 [1950].

Vorliegen einer Substrathemmung beobachten<sup>37</sup>. Für eine Substrathemmung ergaben sich bei unseren Untersuchungen jedoch ebensowenig Anhaltspunkte wie für eine Hemmung durch die enzymatischen Spaltprodukte. Allerdings ist im Hinblick auf die Nichtangreifbarkeit des Tripeptides Leu-Leu-D-Leu eine Hemmwirkung der stereoisomeren Form nicht ausgeschlossen. Ein analoges Verhalten ist bezüglich des L- und D-Phenylalanins für die Pankreascarboxypeptidase bekannt<sup>39</sup>. Die Berechnung weiterer kinetischer Konstanten ( $k_{+2}$ ,  $c_1$ ) würde eine genaue Kenntnis des Molekulargewichtes zur Voraussetzung haben, für das nach den Gelfiltrationsversuchen nur ein ungefährer Wert von  $5-8 \cdot 10^4$  angegeben werden kann.

Über die physiologische Bedeutung des Enzyms sind Aussagen noch nicht möglich, doch machen die Untersuchungen an den subzellulären Partikeln wahrscheinlich, daß es sich um ein lysosomales Enzym handelt. Weitere Untersuchungen müssen klären, welche Aufgaben die lysosomalen Enzyme und damit auch die saure Carboxypeptidase im Zellstoffwechsel wahrnehmen.

Die Arbeit wurde in dankenswerter Weise durch Sachbeihilfen der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT und des FONDS DER CHEMISCHEN INDUSTRIE unterstützt. Einer der Autoren (U. St.) dankt der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT für ein Forschungsstipendium.