

# Beiträge zum System der einfachsten Eiweißkörper.

Von

A. Kossel und H. D. Dakin.

In den früheren Publikationen von A. Kossel ist die Ansicht entwickelt worden, daß die Protamine an den Anfang der Eiweißreihe zu stellen sind und daß die planmäßige Bearbeitung dieser einfachsten Eiweißkörper die ersten Grundzüge für ein System der eiweißartigen Substanzen ergeben werden.

Wir haben bei der Fortsetzung dieser Untersuchungen zunächst das Salmin und das Clupein als die bestbekanntesten Glieder der Protamingruppe in Bezug auf denjenigen Teil des Moleküls untersucht, welcher bisher weniger bekannt war, und welcher bei der Spaltung die stickstoffärmeren Säuren liefert. Die bisher in den Protaminen aufgefundenen Körper dieser Art sind: <sup>1)</sup>

1. Aminovaleriansäure im Clupein (A. Kossel).
2. Tyrosin im Cyclopterin (Morkowin).
3. Skatolaminoessigsäure im Cyclopterin (A. Kossel).
4.  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure im Salmin (A. Kossel).
5. Serin im Clupein (A. Kossel und H. D. Dakin).

Die folgenden Untersuchungen zeigen, daß der Aminovaleriansäure und dem Serin eine weitere Verbreitung unter den Protaminen zukommt.

## I. Über einige Spaltungsprodukte des Salmins.

Als Ausgangsmaterial dienten reife Lachstestikel, welche wir im November dieses Jahres erhielten und welche nach dem Verfahren von A. Kossel auf Protaminsulfat verarbeitet wurden.

50 g des lufttrocknen Sulfats wurden durch Kochen mit Schwefelsäure zersetzt und das Arginin mit Silbersulfat und

<sup>1)</sup> Literatur s. Diese Zeitschrift, Bd. XI, S. 311.

Baryt entfernt. Die von Silber, von Schwefelsäure und von Baryt freie Lösung der nicht basischen Spaltungsprodukte wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand zur Entfernung der Pyrrolidinkarbonsäure mit absolutem Alkohol ausgekocht. Der in Äthylalkohol unlösliche Rückstand wurde jetzt ungefähr  $\frac{3}{4}$  Stunden mit Methylalkohol am Rückflußkühler im Sieden erhalten. Hierbei nimmt der Methylalkohol die Aminovaleriansäure auf, während das Serin größtenteils ungelöst bleibt.

Nach der Entfernung des Methylalkohols aus der methylalkoholischen Lösung hinterblieb ein kristallischer Rückstand, welcher nach mehrfachem Umkristallisieren aus wässrigem Äthylalkohol dünne sechsseitige Plättchen lieferte. Die Kristalle waren doppelbrechend und häufig nach einer Richtung hin entwickelt. Der Schmelzpunkt lag bei  $281-282^{\circ}$ , die Säure war in salzsaurer Lösung stark rechtsdrehend.

Die Analyse ergab folgende Zahlen:

	Gefunden	Berechnet für $C_5H_{11}NO_2$
C	51,04	51,28
H	9,29	9,40
N	12,15	11,96

Hiernach liegt eine Aminovaleriansäure vor, die wahrscheinlich mit der von E. Fischer aus Casein und Horn<sup>1)</sup> und mit der von E. Schulze und Winterberger<sup>2)</sup> aus Lupinenkeimlingen erhaltenen identisch ist.

Der in Methylalkohol unlösliche Teil wurde in wenig heißem Wasser gelöst und die heiße Lösung so lange mit heißem Äthylalkohol versetzt, bis eine starke bleibende Trübung eintrat. Es schied sich ein Öl aus, welches beim Erkalten zu Kristallen erstarrte. Nach mehrfachem Umkristallisieren wurden dünne Kristallplättchen erhalten, die sich beim Erhitzen auf  $220^{\circ}$  dunkel färbten und bei  $228^{\circ}$  unter vollständiger Zersetzung schmolzen.

Die Analyse ergab folgendes:

Gefunden	Präp. I	Präp. II	Berechnet für $C_3H_7NO_3$
C	34,66	34,14	34,29
H	6,76	6,50	6,66
N	13,15	—	13,33

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 469.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 300.

Die Substanz ist demnach Serin. Das Salmin zerfällt somit in mindestens vier verschiedenartige Atomgruppen: Arginin, Pyrrolidinkarbonsäure, Aminovaleriansäure und Serin.

## II. Bildung von Serin aus Clupein.<sup>1)</sup>

In ähnlicher Weise wurde das Serin auch aus dem Clupein dargestellt. Das Präparat zeigte dieselben Eigenschaften, wie der aus Salmin dargestellte Körper, war optisch inaktiv und ergab bei der Analyse:

	Gefunden	Berechnet für $C_3H_7NO_3$
C	34.59	34.29
H	6.94	6.66

Im Clupein sind hiernach bisher nachgewiesen: Arginin, Aminovaleriansäure und Serin. Die  $\alpha$ -Pyrrolidinkarbonsäure scheint ebenfalls vorhanden zu sein, doch ist der sichere Nachweis derselben an dieser Stelle bisher noch nicht erbracht.

## III. Über die Protamine des Karpfenspermas.

Die einzige uns bekannte Mitteilung über die chemische Natur des Karpfenspermas beschränkt sich auf eine kurze Bemerkung F. Mieschers,<sup>2)</sup> welcher angibt, daß man durch Salzsäure eine peptonartige Substanz von basischen Eigenschaften aus den Spermatozoen extrahieren könne. Protamin war niemals nachzuweisen.<sup>3)</sup>

Wir untersuchten Karpfentestikel verschiedener Herkunft und zu verschiedenen Jahreszeiten, welche wir größtenteils der Freundlichkeit des Herrn M. Rippel in Braila verdanken. Wir sprechen demselben für die Zusendung dieses wertvollen Materials unsern besten Dank aus.

Es ergab sich, daß in den Karpfentestikeln mindestens zwei verschiedenartige Protamine vorhanden sind, deren eines ( $\alpha$ -Cyprinin) einer neuen Klasse von Eiweißsubstanzen angehört und von den bisher bekannten Protaminen ebenso verschieden ist, wie von den Histonen.

<sup>1)</sup> Das Ergebnis dieses Versuchs ist bereits in dieser Zeitschrift, Bd. XL, S. 312, mitgeteilt worden.

<sup>2)</sup> Verhandlungen der Basler Naturforscher-Ges., Bd. VI, Heft 1 (1874).

<sup>3)</sup> Miescher verstand unter Protamin das Salmin.

Das eine im Frühjahr gesammelte Karpfensperma lieferte das als Cyprinin I\* bezeichnete Präparat. Die aus den Testikeln ausgeschüttelte, durch wenig Essigsäure gefällte und mit Alkohol und Äther extrahierte Spermatazoenmasse wurde mit 0,5%iger Schwefelsäure extrahiert, das Extrakt mit Alkohol gefällt, nochmals in Wasser gelöst und die Fällung wiederholt. Das so erhaltene Sulfat bildete ein weißes Pulver, welches sich in Wasser langsam zu einer schwer filtrierenden Flüssigkeit löste. Die Lösung gab Biuretreaktion, spurenweise Millonsche Reaktion, und einen Niederschlag mit pikrinsaurem Natron. Mit Ammoniak gab die Lösung nicht den für Histone charakteristischen Niederschlag, auch keine Tryptophanreaktion mit Glyoxylsäure. Das Cyprinin enthält keinen bleischwärenden Schwefel. Die Abscheidung eines Öls aus wässriger Lösung, welche bei den Sulfaten der bisher bekannten Protamine eintritt, sobald die Lösung konzentriert genug ist, haben wir beim Cyprininsulfat nicht beobachtet. Sättigt man die Lösung mit Natriumacetat oder mit gewissen andern Salzen, so kann man die Base durch Zusatz von Natronhydrat zur Abscheidung bringen.

20 g des lufttrockenen Sulfats wurden mit Schwefelsäure gespalten und in bekannter Weise auf die basischen Spaltungsprodukte untersucht. Es zeigte sich, daß das Histidin fehlte und daß von 100 Teilen Stickstoff des Cyprinins I 8,7 Teile im Arginin, 30,3 Teile im Lysin vorhanden waren. Das Arginin wurde als saures Nitrat, das Lysin als Pikrat in kristallisiertem Zustand rein dargestellt.

Die vom Phosphorwolframsäureniederschlag abfiltrierte Flüssigkeit wurde nach Entfernung der Phosphorwolframsäure zur Trockne eingedampft und nach Habermann und Ehrenfeld mit einer Mischung gleicher Volumina Eisessig und Alkohol gekocht.<sup>1)</sup> Hierbei bleibt das Tyrosin ungelöst, während die übrigen Aminosäuren in Lösung gehen. Der geringe unlösliche Rückstand bestand unzweifelhaft aus Tyrosin, denn er gab mit Millons Reagens eine Rotfärbung, mit Russula-Tyrosinase die von G. Bertrand beschriebene für Tyrosin charakteristische

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift. Bd. XXXVII. S. 18.

Färbung<sup>1)</sup> und lieferte nach dem Umkristallisieren die bekannten büschelförmig angeordneten Nadeln.

Die vom Tyrosin abfiltrierte Flüssigkeit wurde zur Trockne verdunstet, nach dem Verjagen der Essigsäure mit Alkohol extrahiert und der in Alkohol unlösliche Teil aus Wasser umkristallisiert. Die so gewonnene Kristallmasse schmolz bei 263°. Da sich aus dem «Cyprinin II» (s. u.) eine bei derselben Temperatur schmelzende und offenbar mit ihr identische Kristallmasse isolieren ließ, so wurden beide Substanzen vereinigt und die Mischung analysiert. Hierbei erhielten wir folgende Zahlen:

	Gefunden	Berechnet für $C_5H_{11}NO_2$
C	51,02	51,28
H	9,51	9,40
N	12,05	11,96

Die Substanz hatte somit die Zusammensetzung einer Aminovaleriansäure. Bei der Untersuchung im polarisierten Licht erwies sie sich als inaktiv.

Auch aus der alkohollöslichen Fraktion von Cyprinin I ließ sich eine Aminovaleriansäure isolieren, deren Schmelzpunkt aber einige Grade höher lag und die in salzsaurer Lösung eine Drehung von ungefähr  $(\alpha)_D = +11,4$  zeigte. Wir halten es für wahrscheinlich, daß diese Kristallfraktion aus einer Mischung von racemischer und aktiver Aminovaleriansäure bestand. Eine Stickstoffbestimmung gab folgendes Resultat.

	Gefunden	Berechnet für $C_5H_{11}NO_2$
N	11,92	11,96

Zur Darstellung des zweiten und dritten Cyprininpräparates dienten Testikel, die zu verschiedenen Jahreszeiten gesammelt und in bekannter Weise vorbereitet waren. Die Spermamasse wurde mit verdünnter Salzsäure zu wiederholten Malen ausgeschüttelt. Die Hauptmenge ging in die erste Lösung über und diente zur Darstellung von «Cyprinin II», die zweite und dritte Ausschüttelung lieferte «Cyprinin III».

Das zweite Präparat (Cyprinin II) wurde durch Alkohol-

<sup>1)</sup> Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences, vol. 122, p. 1215 et vol. 123, p. 463; Bulletin de la Société chim. 1896, p. 793.

äther aus der salzsauren Lösung gefällt und als Chlorid der Spaltung unterworfen. Das dritte (Cyprinin III) wurde einer weitergehenden Reinigung unterzogen, die im Aussalzen mit Kochsalz, Lösung des ausgefallenen Niederschlages in Wasser und Fällung der Lösung mit Alkohol und Schwefelsäure bestand.

Die Ergebnisse der quantitativen Spaltung der drei Präparate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

	Prozente des Stickstoffs.		
	Cyprinin		
	I	II	III
Gesamtstickstoff	100	100	100
im Arginin	8.7	16.0	28.0
im Lysin	30.3	19.2	6.6
im Tyrosin	Spuren	0.5	1.5

Cyprinin I. Gewichtsprozente.<sup>1)</sup>

Arginin 4.9

Lysin 28.8

Histidin wurde in keinem Falle gefunden. Das Cyprinin III lieferte bei der Spaltung eine kristallisierte Substanz, welche in ihren Eigenschaften völlig mit der Aminovaleriansäure, deren Analyse oben mitgeteilt ist, übereinstimmte.

Die drei Präparate des Cyprinins weichen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung erheblich von einander ab. Das Molekülverhältnis des Arginins zum Lysin beträgt beim Cyprinin I ungefähr 1 : 7, beim zweiten Präparat 1 : 2,4, beim dritten 2 : 1. Das Cyprinin I übertrifft alle bisher bekannten eiweißartigen Substanzen in dem hohen Gehalt an Lysin und zeichnet sich außerdem dadurch aus, daß es viel weniger Arginin liefert als die bisher bekannten Protamine. Das lysinreichste Protamin, das Sturin, enthält 8,4% des gesamten Stickstoffs in Form von Lysin, das Cyprinin I 30,3%. Das argininärmste, bisher untersuchte Protamin — ebenfalls das Sturin — enthält 63,5% des ganzen Stickstoffs in Form von Arginin, das Cyprinin I nur 8,7%.

Wir haben also in dem Cyprinin I einen ganz eigenartigen Eiweißkörper vor uns, dessen Basizität nicht wie bei

<sup>1)</sup> Auf Grundlage des Stickstoffgehaltes der reinen aschefreien Base 18,2% N berechnet.

den Protaminen durch einen hohen Gehalt an Arginin, sondern durch das Vorwiegen der Lysingruppen bedingt ist. Entsprechend dieser andersartigen Zusammensetzung weichen auch die Eigenschaften des Cyprinins I in mancher Hinsicht von denen der bekannten Protamine ab.

Die zwischen den drei Präparaten gefundenen Differenzen machen die Annahme von mindestens zwei Cyprinen notwendig. Man wird annehmen können, daß Cyprinin I ganz oder vorwiegend aus dem einen: « $\alpha$ -Cyprinin», Cyprinin III ganz oder vorwiegend aus dem andern Körper: « $\beta$ -Cyprinin» besteht, daß ferner Cyprinin II eine Mischung beider darstellt.<sup>1)</sup> Da das Cyprinin I Spuren von Tyrosin enthält, Cyprinin III hingegen ziemlich reich an Tyrosin ist, so halten wir es für wahrscheinlich, daß das  $\alpha$ -Cyprinin frei von Tyrosin ist und daß der geringe Tyrosingehalt des Cyprinins I von einer Beimischung des tyrosinhaltigen  $\beta$ -Cyprins herrührt. Hiernach könnte das reine  $\alpha$ -Cyprinin noch lysinreicher sein, als die Analysen des Cyprinins I angeben. Es ist freilich nicht ausgeschlossen, daß die Verhältnisse noch komplizierter sind.

Bei weiteren Untersuchungen über diese eigenartigen Produkte wird man in Erwägung ziehen müssen, ob das Auftreten dieser verschiedenen Cyprine nicht etwa mit den Reifezuständen des Organs in Zusammenhang steht.

Diese Untersuchungen werden im hiesigen Institute fortgesetzt.

---

<sup>1)</sup> Diese Mischung müßte zu  $\frac{2}{3}$  aus Cyprinin I und zu  $\frac{1}{3}$  aus Cyprinin III bestehen.