

Über die Einwirkung von Alkalien auf Proteinstoffe.

II. Mitteilung.

Von

A. Kossel und F. Weiss.

Unsere früheren Untersuchungen über die Einwirkung von Alkalien auf Proteinstoffe¹⁾ haben uns zu folgenden Ergebnissen geführt:

Bei der Einwirkung von Natronhydrat oder von Barythydrat bei Zimmertemperatur oder im Brütöfen findet eine Umwandlung der Proteinstoffe statt, bei welcher das optische Drehungsvermögen fast völlig verschwindet.

Diese Umwandlung konnte nicht ohne weiteres als eine Racemisierung aufgefaßt werden. Denn das Drehungsvermögen eines so kompliziert gebauten Moleküls ist offenbar als Resultante verschiedenartiger, innerhalb des Moleküls vorhandener Strukturverhältnisse zu betrachten, welche die Polarisations-ebene in verschiedener Richtung beeinflussen können. Wenn das Molekül teilweise abgebaut wird, so kann ein Teil derjenigen Gruppen, welche die Linksdrehung bewirken, verschwinden, während diejenigen Gruppen, welche im Sinne einer Rechtsdrehung des Ganzen wirken, bestehen bleiben. In diesem Falle würde die Linksdrehung abnehmen und das ganze System könnte sich der Inaktivität nähern.

Wir haben in unserer früheren Mitteilung nachgewiesen, daß eine in diesem Sinne wirkende Veränderung der Konstitution, falls sie überhaupt vorhanden ist, nicht als die einzige Ursache der Inaktivierung betrachtet werden kann. Wäre die Inaktivierung in der eben bezeichneten Weise durch Konstitu-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 492.

tionsänderung hervorgerufen, so müßten die bei der vollständigen Spaltung des inaktiven Eiweißkörpers entstehenden Produkte oder «Bausteine» in derselben Weise optisch aktiv sein, wie die bei der Spaltung eines optisch aktiven Proteinostoffs entstehenden. Nun fanden wir aber in dem durch Alkalien hervorgerufenen Reaktionsgemisch dl-Arginin und dl-Ornithin. Letztere Basen sind bisher bei der Säurespaltung des betreffenden optisch aktiven Proteinostoffs nicht beobachtet worden. Sie können auch nicht durch nachträgliche Racemisierung von dem primär abgespaltenen d-Arginin oder d-Ornithin gebildet sein, denn unsere Versuchsbedingungen waren nicht derartige, daß sie diese Konfigurationsänderung der Spaltungsprodukte hätten herbeiführen können, mit anderen Worten, daß sie das d-Arginin in dl-Arginin, oder d-Ornithin in dl-Ornithin hätten verwandeln können. Somit sind wir zu dem Schluß gekommen, daß die von uns beobachtete Inaktivität der Proteinkomplexe mindestens zum Teil auf Racemisierung zurückgeführt werden muß, und daß die Arginingruppe, solange sie innerhalb des Proteinmoleküls gebunden ist, leichter racemisiert wird, als in freiem Zustand.

Die vorliegenden Untersuchungen waren dazu bestimmt, denselben Beweis noch in anderer Weise zu führen: wir haben aus dem fast völlig inaktiven Reaktionsgemisch, welches bei der Alkali-Spaltung eines einfachen Proteinostoffs (des Clupeins) entsteht, eine Fraktion isoliert, welche kein präformiertes Ornithin enthalten konnte, und welche im wesentlichen aus dem albumose- oder peptonartigen Derivat des Proteins (dem «inaktiven Clupeon») bestand. Diese Fraktion wurde der Säurehydrolyse unterworfen. Während die Säurehydrolyse bei dem optisch aktiven Proton d-Arginin bildet, führte sie bei dem «inaktiven Proton» zur Bildung von dl-Ornithin. Neben dem dl-Ornithin war kein d-Ornithin nachweisbar.

Dies Ergebnis kann nicht anders erklärt werden als durch die Annahme, daß der peptonartige Komplex aus zwei optischen Antipoden zusammengesetzt war, deren einer das d-Ornithin und deren zweiter das l-Ornithin geliefert hat.

Hierdurch ist von neuem der Beweis geliefert, daß unter den von uns gewählten Bedingungen eine

Racemisierung von Proteinkomplexen vor sich gegangen ist.¹⁾

Unsere Versuchsergebnisse erscheinen uns aber noch in einer anderen Richtung bemerkenswert. A. Kossel und H. D. Dakin²⁾ haben im Jahre 1904 festgestellt, daß durch gewisse Einwirkungen die Arginingruppe innerhalb des Proteinmoleküls in der Weise verändert werden kann, daß bei der nachträglichen Säurespaltung des Proteinkomplexes nicht Arginin, sondern Ornithin entsteht. Diese Veränderung muß also die Guanidin-Gruppe betreffen und kann am leichtesten durch die Annahme der «intraproteinen» Abspaltung von Harnstoff aus dieser Gruppe erklärt werden. Diese Annahme ist in physiologischer Hinsicht sehr bemerkenswert, denn sie führt zu dem Gedanken, daß der tierische Organismus bei der Bildung von Harnstoff aus Eiweiß dieses letztere nicht völlig zu zersetzen braucht, sondern daß er aus dem Gefüge eines Proteinstoffs die Elemente des Harnstoffs entnehmen kann, ohne im übrigen die Peptidbindungen zu lösen.

Die Bedingungen, unter denen A. Kossel und H. D. Dakin diese Umwandlung zuerst beobachteten, waren zunächst noch wenig präzisierte und ließen die Möglichkeit einer Enzymwirkung vermuten. A. Kossel hat später festgestellt,³⁾ daß salpetrige Säure in ähnlicher Weise auf gewisse Proteinstoffe einwirkt. Unsere jetzigen Versuche ergeben, daß dieselbe Veränderung des Proteinmoleküls auch durch Alkali hervorgerufen werden kann.

Experimenteller Teil.

Die ersten Versuche sollten eine Orientierung über den Verlauf der durch Natronhydrat bewirkten Hydrolyse des Clupeins geben und wurden in folgender Weise ausgeführt.

Versuch I. Wir lösten 10 g Clupeinsulfat in 200 ccm $\frac{n}{2}$ -Natronlauge und ließen es bei Zimmertemperatur stehen. Die Drehung war nach 4 Wochen von $-2,3^\circ$ auf $-0,6^\circ$ (im

¹⁾ Zugleich ist der in unserer ersten Mitteilung S. 494 (Fußnote) erwähnte Einwand beseitigt.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 185.

³⁾ Biochem. Zentralbl., Bd. V.

dm-Rohr) zurückgegangen. Nach 6 Wochen wurde die Flüssigkeit mit Salpetersäure neutralisiert, sodann mit Überschuß von Baryumcarbonat versetzt und durch hindurchgeleiteten Wasserdampf von Ammoniak befreit, angesäuert und nach dem mehrfach beschriebenen Verfahren mit Silbernitrat und Baryt gefällt. Auf diese Weise wird das Clupeon und das Arginin niedergeschlagen, während etwa vorhandenes Ornithin sowie Monoamidosäuren gelöst bleiben würden. Da die vom Silberniederschlag abfiltrierte Flüssigkeit nach Entfernung des Silbers in saurer Lösung keine erhebliche Fällung mit Phosphorwolframsäure ergab, war bei diesem Versuch die Anwesenheit von freiem Ornithin überhaupt ausgeschlossen.

Der Silberniederschlag wurde vom Silber befreit und das Clupeon, welches auch freies Arginin enthalten konnte, durch 6stündiges Kochen am Rückflußkühler mit einer Mischung von 27 g Schwefelsäure und 54 ccm Wasser vollständig hydrolysiert. Das Reaktionsprodukt wurde nun bezüglich der Verteilung des Stickstoffs auf Arginin, Diamidosäure (Ornithin), Monoamidosäure und zum Teil Ammoniak quantitativ untersucht.

Versuch II. Wie beim vorhergehenden Versuch wurden 10 g Clupeinsulfat in $n/2$ -Natronlauge gelöst und bei 40° digeriert. Nach 6 Tagen war die Drehung der alkalischen Flüssigkeit im dm-Rohr von $-2,3^{\circ}$ auf $-0,20^{\circ}$ zurückgegangen. Die Lösung wurde jetzt ebenso wie in Versuch I verarbeitet. Die Resultate von Versuch I und II sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich. Zum Vergleich sind diejenigen Zahlen mit angeführt, welche bei der analogen Verarbeitung aus dem durch Säurewirkung gebildeten Clupeon erhalten worden sind.

Aus diesen Zahlen ist zu ersehen, daß unter der Einwirkung der Alkalien auf Clupein ein clupeonartiger, durch das Silbersulfat-Baryt-Verfahren fällbarer Stoff entsteht, welcher eine andere Zusammensetzung besitzt, wie das durch gelinde Säurewirkung entstehende Clupeon. Die Unterschiede sind folgende:

1. Das «Alkaliclupeon» liefert weniger Arginin. Die in der Tabelle enthaltenen Werte der Argininfraktion sind höchstwahrscheinlich noch zu hoch, da anzunehmen ist, daß dieser

| | Prozente des Gesamtstickstoffs | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| | Clupeon durch Säurewirkung gebildet ¹⁾ | Clupeon durch Natronhydrat gebildet | |
| | | Versuch I bei Zimmertemperatur | Versuch II bei 40° |
| Durch das Silbersulfat-Baryt-Verfahren fällbar («Argininfraktion») | 87,6 | 70,9 | 55,9 ²⁾ |
| Durch das Silbersulfat-Baryt-Verfahren nicht fällbar, durch Phosphorwolframsäure fällbar («Ornithinfraktion») | 0 | 8,4 | 13,9 |
| Weder durch Silbersulfat-Baryt, noch durch Phosphorwolframsäure fällbar | 12,4 | 16,0 | 19,4 |
| Ammoniak | 0 | nicht bestimmt | 2,3 |

Fraktion noch von vornherein eine gewisse Menge freies Arginin beigemischt war.

2. Aus dem Alkaliclupeon geht bei der völligen Aufspaltung durch Säure ein Körper hervor, welcher nicht durch das Silber-Barytverfahren, wohl aber durch Phosphorwolframsäure fällbar ist. Diese Fraktion fehlt unter den Säurespaltungsprodukten des Säureclupeons.

3. Die «Monoamidosäurefraktion» ist bei Alkaliclupeon größer als beim Säureclupeon.

4. Die Veränderungen sind in Versuch II (Einwirkung des Natronhydrats bei 40°) weitergehende als in Versuch I (Einwirkung bei Zimmertemperatur).

Eine Beimischung von Ornithin zu dem untersuchten Alkaliclupeon war ausgeschlossen, da das betreffende Clupeon durch das Silber-Barytverfahren niedergeschlagen und gut ausgewaschen war. Hierbei wird kein freies Ornithin gefällt. Es war somit

¹⁾ Mittel aus 4 Präparaten. Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 313.

²⁾ Aus dieser Fraktion wurde inaktives Arginin dargestellt.

wahrscheinlich, daß bei der Säurehydrolyse des Alkaliclupeons Ornithin entstanden war. Dies wurde durch die folgende Untersuchung sichergestellt.

Wir benutzten hierzu das Clupeon, welches bei der Einwirkung einer $n/2$ -Barytlösung bei 40° auf 100 g Clupeinsulfat gewonnen war.¹⁾ Das Clupeon wurde durch das Silbersulfat-Baryt-Verfahren niedergeschlagen und auf diese Weise vom Ornithin abgetrennt.

Die Menge des fällbaren Teils betrug ungefähr 8 g. Diese Fraktion wurde nun durch sechsständiges Kochen mit Schwefelsäure vollständig hydrolysiert.

Bei der Verarbeitung der Spaltungsprodukte erhielten wir eine Argininfraktion, aus welcher ein Pikrolonat isoliert werden konnte, welches sich durch den Schmelzpunkt 238° und das Fehlen des Krystallwassers als dl-Argininpikrolonat charakterisierte.

Wir müssen es dahingestellt bleiben lassen, ob das hier gefundene dl-Arginin bereits durch die Einwirkung des Barythydrats entstanden und dem hydrolysierten Clupeon beigemischt oder ob es durch die Säurewirkung gebildet war.

Die vom Argininsilber abfiltrierte Flüssigkeit wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt. Nach Entfernung des Fällungsmittels erhielten wir einen stark alkalisch reagierenden Sirup, der auch nach Zusatz überschüssiger Salzsäure völlig inaktiv befunden wurde. Auf Zusatz von Platinchlorid wurde etwas mehr als 3 g eines gut krystallisierten Platinsalzes gewonnen, welches bei der Analyse folgende Zahlen lieferte:

| Gefunden: | Berechnet für $C_5H_{12}N_2O_5 \cdot H_2PtCl_6$: |
|------------|---------------------------------------------------|
| Pt = 35,6% | 35,92% |
| N = 5,38% | 5,2% |

Das nach Entfernung des Platins erhaltene Chlorhydrat erwies sich auch jetzt als optisch inaktiv; es wurde in die Ornithursäure übergeführt, die als krystallisierte Substanz vom Schmelzpunkt 184° (unkorr.) gewonnen wurde.

Heidelberg, den 4. Mai 1909.

¹⁾ cf. unsere frühere Mitteilung. Diese Zeitschrift, Bd. LIX, S. 497.