

Über die Einwirkung von Alkalien auf Proteinstoffe.

III. Mitteilung.

Von

A. Kossel und F. Weiss.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)

Aus unseren früheren Untersuchungen geht hervor, daß die Protamine unter der Einwirkung der Alkalien eine Veränderung erfahren können, welche die in ihrem Molekül enthaltene Guanidingruppe betrifft und welche bewirkt, daß bei nachfolgender Säurehydrolyse aus ihnen statt des Arginins Ornithin entsteht. Diese Umwandlung ist höchstwahrscheinlich so zu erklären, daß schon bei gelinder Alkaliwirkung Harnstoff abgespalten wird, während die den Proteinstoffen eigenen Peptidbindungen zunächst noch erhalten bleiben.

Dieses Verhalten stellt einen besonderen Fall der Desamidierung von Proteinstoffen dar, welcher auch für die Beurteilung des physiologischen Eiweißabbaues ein erhebliches Interesse gewinnen kann.

Ehe man jedoch an diesen Befund weitere physiologische Betrachtungen knüpft, hat man die Frage zu entscheiden, ob dieselbe Form der Desamidierung auch bei anderen Proteinen zu beobachten ist oder ob sie eine Eigentümlichkeit der Protamine darstellt. Im ersteren Falle würde sie für die Beurteilung der physiologischen Harnstoffbildung von Bedeutung werden, im letzteren würde sie einen Unterschied in der Konstitution der Protamine und anderer Proteinstoffe dartun.

Als Beispiel für einen höheren Proteinstoff haben wir zunächst den Leim gewählt und das Verhalten desselben gegenüber Barytwasser und Natronhydrat mit dem des Clupeins verglichen. Dabei zeigte sich bei der von uns angewandten Art der Alkaliwirkung, daß der Leim die erwähnte Veränderung der Guanidingruppe nicht erkennen läßt, daß diese Gruppe somit im Leim mehr geschützt ist wie im Protamin.

Unser Untersuchungsverfahren bestand darin, daß wir zu entscheiden versuchten, ob durch die Einwirkung von Alkalien aus dem Leim peptonartige Spaltungsprodukte gebildet werden, welche das Ornithin ohne die zugehörige Cyanamidgruppe

in peptidartiger Bindung enthalten. Wir versuchten also aus dem durch Alkaliwirkung erhaltenen Reaktionsgemisch peptonartige Stoffe zu isolieren, unterwarfen diese der Säurehydrolyse und prüften die hierbei erhaltenen Spaltungsprodukte auf Ornithin.

Hierbei zeigte sich, daß schon durch die Alkaliwirkung allein neben den Leimpeptonen Ornithin gebildet wurde. Dies Ornithin konnte durch die Alkalihydrolyse aus primär abgespaltenem Arginin gebildet sein, kam also für unsere Fragestellung nicht in Betracht. Unsere Aufmerksamkeit mußte dahin gerichtet sein, die zu untersuchenden peptonartigen Körper völlig von diesem durch Alkaliwirkung unmittelbar gebildeten Ornithin zu befreien, um das peptidartig gebundene Ornithin von dem freien Ornithin zu unterscheiden. Wir erreichten dies durch Fällungsmittel, welche unter den von uns gewählten Bedingungen wohl peptonartige Stoffe, aber kein Ornithin niederschlagen. Als solche verwendeten wir

1. Gerbsäure mit wenig Kochsalz,
2. Gerbsäure in einer mit Kochsalz gesättigten Lösung,
3. das Silberbarytverfahren,
4. Jodwismutjodwasserstoff.

Untersuchungsmethoden.

Die Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt. 500 g Leim wurden mit 5 l $1\frac{1}{2}$ -Normal-Natronlauge 7—19 Tage im Brutofen digeriert, mit Salzsäure neutralisiert, mit Essigsäure angesäuert und mit Gerbsäuremischung¹⁾ völlig ausgefällt (Niederschlag I). Das Filtrat dieses Niederschlags wurde mit Kochsalz gesättigt; es entstand ein neuer Niederschlag, welcher ebenfalls abfiltriert wurde (Niederschlag II). Das Filtrat wurde zur Entfernung des Kochsalzes mit Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag nach kurzem Stehen abfiltriert, gut ausgewaschen und durch Baryt zerlegt. Nach Entfernung des überschüssigen Baryts erhielten wir eine Flüssigkeit, welche reich an peptonartigen Stoffen war und starke Biuretreaktion zeigte. Dieselbe wurde zunächst mit dem von A. Kossel ange-

¹⁾ 70 g Gerbsäure, 100 g Kochsalz, 50 ccm Eisessig in Wasser gelöst, mit Wasser bis zum Liter aufgefüllt (Hedin).

gebenen¹⁾ Silbernitratbarytverfahren ausgefällt (Niederschlag III). Das Filtrat dieses Niederschlages wurde nach Entfernung des Silbers einer nochmaligen Fällung mit Phosphorwolframsäure unterworfen, die gefällte von Phosphorwolframsäure befreite Substanz mit Jodwasserstoff neutralisiert und bei Gegenwart von 0,25% Jodwasserstoff mit Jodwismut-Jodnatrium²⁾ gefällt (Niederschlag IV).

In den Niederschlägen mußten verschiedene Fraktionen von Peptonen und Peptiden frei von bereits gebildetem Ornithin vorhanden sein.

Bevor diese Niederschläge der Hydrolyse unterworfen wurden, mußten sie von dem mit ihnen in Verbindung befindlichen Fällungsmittel befreit werden. Es wurde dies dadurch ermöglicht, daß sowohl Gerbsäure- wie Phosphorwolframsäureverbindungen von peptonartigen Spaltungsprodukten der Proteinstoffe in wässrigem Aceton löslich sind.³⁾ Der Gerbsäureniederschlag (I) erlangte unter Eiskühlung eine pulverige Konsistenz, sodaß er in der Reibschale verrieben und gut mit Wasser ausgewaschen werden konnte. Er wurde sodann in einer Mischung von 800 ccm Aceton und 650 ccm Wasser gelöst. Die Lösung ging bei gewöhnlicher Temperatur bei 24stündigem Stehen vollkommen vor sich. Aus der Lösung wurde die Gerbsäure mit einer Lösung von 200 g Bleiacetat in etwa 600 ccm Wasser ausgefällt, der Niederschlag mit

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 177.

²⁾ Das Reagens wird bereitet aus 50 g Jodnatrium, 100 g Jodwismut und 100 ccm 0,5%ige Jodwasserstoffsäure in Wasser.

³⁾ Die Löslichkeit der Phosphorwolframsäureniederschläge in Acetonwasser bietet ein sehr bequemes Hilfsmittel bei der Umsetzung derselben mit Baryt, welches sich seit mehreren Jahren im hiesigen Laboratorium gut bewährt hat. In manchen Fällen genügt der Zusatz von Aceton zu dem in Wasser aufgeschwemmten Niederschlag, um eine vollständige Lösung zu erzielen, aus welcher — nötigenfalls nach vorhergehender Filtration — die Phosphorwolframsäure mit gesättigtem Barytwasser ausgefällt wird. In anderen Fällen, z. B. bei Gegenwart von pepton- oder albumoseartigen Substanzen, ist es erforderlich, das Phosphorwolframat in einer großen Reibschale mit einer Mischung von 3 Vol. Aceton und 1 Vol. Wasser zu verreiben und die Lösung dann mit gepulvertem Ätzbaryt in der Reibschale zu mischen.

heißem Wasser möglichst vollständig ausgewaschen und die unter Zusatz von Tierkohle eingedampften Filtrate und Waschwässer durch Schwefelwasserstoff vom Blei befreit.

Die Umsetzung des Niederschlages II mit Bleiacetat gelang ohne Anwendung von Aceton, da der Niederschlag sich beim Erwärmen in Wasser leicht auflöste. Die gefällte Substanz wurde vor der Hydrolyse durch nochmalige Fällung mit Phosphorwolframsäure gereinigt.

Der mit Jodwismutjodwasserstoff gefällte Niederschlag (IV) wurde mit Schwefelsäure verrieben, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, zur Entfernung des Jodwasserstoffs mit Phosphorwolframsäure niedergeschlagen und das letztere Fällungsmittel vor der Hydrolyse entfernt.

Hydrolyse der vier Fraktionen.

Die vier Fraktionen gaben die Biuretreaktion und zeigten peptonartigen Charakter, zum Teil auch etwas Linksdrehung. Sie wurden durch 14stündiges Kochen mit der zehnfachen Menge ihres Gewichts 33gewichtsprozentiger Schwefelsäure hydrolysiert und jede für sich nach dem Verfahren, welches in der vorhergehenden Abhandlung¹⁾ beschrieben ist, auf Ornithin verarbeitet. Wie bereits erwähnt, war kein Ornithin nachweisbar.

Gelegentlich dieser Untersuchungen erhielten wir einige bereits bekannte Spaltungsprodukte des Leims, über welche folgendes zu bemerken ist:

1. In freiem Zustande waren unter den Spaltungsprodukten nachweisbar: Glykokoll, inaktives Ornithin und l-Valin.

a) Das Ornithin wurde aus der Phosphorwolframsäurenachfällung als Dipikronat isoliert und gab bei der Analyse die in der vorigen Abhandlung mitgeteilten Werte. Es konnte ferner als Platinchlorhydrat, Ornithursäure ($F = 183-184^{\circ}$) und Pikrat nachgewiesen werden.

b) Das l-Valin wurde aus dem Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlags gewonnen. Dasselbe gab bei der Stickstoffbestimmung folgenden Wert:

Berechnet für $C_5H_{11}NO_2$:
N = 11,9%

Gefunden:
11,7%

¹⁾ cf. vorhergehende Mitteilung.

2. Unter den Produkten der Säurehydrolyse der durch Alkaliwirkung erhaltenen Peptone waren nachweisbar:

Inaktives Histidin (Menge gering), inaktives Arginin, Rechts-Lysin, inaktives Lysin und Prolin (Drehung nicht geprüft).

Von diesen Produkten wurde Lysin nachgewiesen unter den Spaltungsprodukten des Niederschlags I, II und IV und zwar wurde aus I und II Rechts-Lysin, neben geringeren Mengen inaktiven Lysins, aus den Spaltungsprodukten des Niederschlags IV nur inaktives Lysin erhalten.

Das Histidin wurde an der Diazoreaktion, dem Pikronat und dem krystallisierenden Dichlorid, das Arginin an dem charakteristischen Nitrat und dem Pikrat erkannt.

Das Lysin wurde als Monopikrat isoliert; dieses lieferte bei der Pikrinsäurebestimmung folgende Werte:

Berechnet für $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot C_6H_3N_3O_7$:	Gefunden:
Pikrinsäure 61,07%	61,16%

Das Prolin wurde aus dem Alkoholextrakt der Phosphorwolframsäurenachfällung in krystallisiertem Zustand gewonnen und in das Phenylhydantoin übergeführt. Letzteres schmolz bei 112° (unkorr.)¹⁾ und lieferte bei der Analyse folgende Zahlen:

Berechnet für $C_{12}H_{13}N_2O_2$:	Gefunden:
C 66,7%	67,00%
H 5,6%	5,75%

Somit zeigten sich bei der Einwirkung der Alkalien auf Gelatine ähnliche Erscheinungen, wie wir sie bereits früher beim Clupein beschrieben haben. Einzelne Bausteine der Proteinstoffe sind der Racemisierung leichter zugänglich, solange sie noch «intraprotein» gebunden sind. Unterwirft man die durch Alkali teilweise racemisierte Gelatine der nachträglichen Säurehydrolyse, so werden einzelne Bausteine des Proteinmoleküls in racemisiertem, andere in aktivem Zustande erhalten. Besonders schnell tritt die Racemisierung bei der Ornithingruppe ein.

¹⁾ Der Schmelzpunkt des i-Prolinphenylhydantoin liegt bei 118° .