

Über die freien Amidogruppen der einfachsten Proteine.

Von

A. Kossel und A. T. Cameron.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Heidelberg.)

Die in Gemeinschaft mit Herrn E. L. Kennaway angestellten Versuche des einen von uns¹⁾ haben erwiesen, daß man in das Molekül des Clupeins eine Nitrogruppe einführen kann und daß das so erhaltene Nitroclupein bei der Säurehydrolyse Nitroarginin liefert. Wir mußten aus äußeren Gründen unsere gemeinsamen Arbeiten abbrechen, ehe die Stellung der Nitrogruppe bestimmt war, obgleich gerade die Entscheidung dieser Frage für die Auffassung der Konstitution des Clupeins von Bedeutung war. Die folgenden Untersuchungen sind zunächst zur Ergänzung dieser früheren Befunde bestimmt gewesen.

Für unsere unten beschriebenen Versuche sind folgende Gesichtspunkte maßgebend gewesen. In dem Nitroclupein, der Muttersubstanz des Nitroarginins, ist offenbar ebenso wie in den übrigen Proteinen die typische Peptidverkettung anzunehmen. Die Verkettung des Arginins kann entweder durch die α -Amidogruppe des Ornithinrestes oder durch die Amidogruppe des Guanidinrestes vermittelt sein. Im ersten Falle würde die Guanidingruppe im Clupeinmolekül frei und reaktionsfähig bleiben und es wäre zu erwarten, daß die Nitrierung des Clupeins ebenso verläuft, wie die des Guanidins selbst, daß somit das entstehende Nitroprodukt ein Derivat des von Thiele beschriebenen Nitroguanidins²⁾ ist. Wenn in diesem Falle die Peptidverkettung durch die Hydrolyse gelöst wird, so müßte die

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 486 (1911).

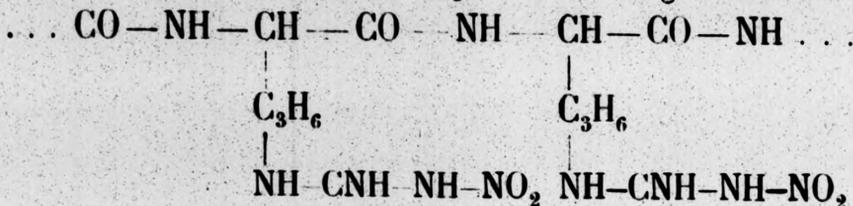
²⁾ Liebigs Annalen der Chemie, Bd. 270, S. 1.

am Ornithinrest befindliche Amidogruppe frei werden. Es müßte also ein Derivat von folgender Konstitution entstehen:



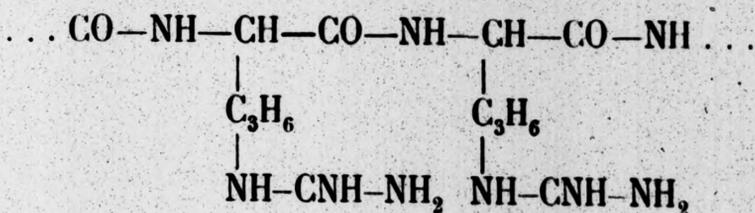
A. Kossel und E. L. Kennaway haben diesen Fall als den wahrscheinlichsten angesehen. Um zu entscheiden, ob wirklich dieser Formel entsprechend am Ornithinrest des Nitroarginins eine freie Amidogruppe vorhanden ist, haben wir einige Versuche mit Hilfe des von van Slyke angegebenen¹⁾ Verfahrens zur Bestimmung des freien Amidostickstoffs angestellt. Dieses Verfahren beruht auf der Anwendung der salpetrigen Säure und ermöglicht die Unterscheidung der freien Amidogruppe des Ornithins von einer Amidogruppe des Guanidins. Denn van Slyke hat nachgewiesen, daß die Amidogruppe des Guanidins unter den von ihm angewandten Versuchsbedingungen nicht von salpetriger Säure angegriffen wird, während die der Amidosäuren ihren Stickstoff vollständig abgibt. Nach unseren Versuchen verhält sich auch die Amidogruppe des asymmetrischen Nitroguanidins hierbei ebenso wie die Amidogruppen des Guanidins selbst, d. h. sie wird nicht zersetzt (Versuch 2).

Als wir nun das aus Nitroclupein gewonnene Nitroarginin dem Versuch unterwarfen, entwickelte sich soviel Stickstoff, wie der Zersetzung einer Amidogruppe in einem Molekül Nitroarginin entsprach (Versuch 4). Diese Amidogruppe konnte nur die des Ornithinrestes sein. Somit ist der Ornithinrest des Arginins mit seiner Amidogruppe an das benachbarte Carboxyl gebunden und diese Verbindung wird bei der Hydrolyse des Nitroclupeins oder des Clupeins gelöst. Die Verbindung zweier Nitroarginine im Nitroclupein entspricht also folgender Formel:



Somit ergibt sich für die Verbindung der Arginingruppen im Clupein das folgende Schema:

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. 43, S. 3170 (1910). Journ. of biolog. chemistry, Bd. 9, S. 185 (1911).



Diese Betrachtungen, welche wohl die einfachste Erklärung der bei der Nitrierung des Clupeins beobachteten Erscheinungen darbieten, erhalten dadurch eine Stütze, daß sie mit anderen von uns beobachteten Tatsachen in vollkommener Übereinstimmung stehen.

Die Erfahrungen, welche uns veranlassen, eine endständige Stellung des Guanidinrestes — obiger Formel entsprechend — in dem Molekül der zur Salmingruppe gehörigen Protamine anzunehmen, sind folgende:

1. Die Nitrierung verläuft ebenso wie beim Guanidin selbst (s. oben).

2. Das Säurebindungsvermögen des ganzen Salminmoleküls ist ebenso groß wie das Säurebindungsvermögen der in ihm enthaltenen Guanidindgruppen (frühere Beobachtungen im hiesigen Laboratorium).¹⁾

3. Untersucht man das ganze unzersetzte Clupeinmolekül mit Hilfe des van Slykeschen Verfahrens, so erhält man keine Entwicklung von Stickstoff. Die freien Amidogruppen des Clupeins, welche die stark basischen Eigenschaften des Ganzen bedingen, verhalten sich also wie freie Amidogruppen des Guanidins (Versuch 6). Dasselbe ist beim Salmin der Fall (Versuch 7).

Wenn man die Protamine durch Säurehydrolyse in Protone umwandelt, so werden Amidogruppen frei. Unterwirft man daher ein teilweise hydrolysiertes Clupein der Einwirkung der salpetrigen Säure, so stellt sich eine Gasentwicklung ein (Versuch 8). Den analogen Fall hat D. D. van Slyke schon bei den höheren Proteinen festgestellt. —

Im Clupein und Salmin liegen sehr einfache Verhältnisse vor, weil neben der α -Amidogruppe des Ornithins und der Monoamidosäuren nur die Amidogruppe des Guanidinrestes für diese Erörterungen in Betracht zu ziehen ist. Komplizierter wird

¹⁾ Siehe besonders: Diese Zeitschrift, Bd 37, S. 112f. (1902).

jedoch die Beantwortung der Frage nach den reaktionsfähigen Gruppen des Proteinmoleküls bei denjenigen Proteinen, welche Lysin enthalten. Auch für die Untersuchung solcher Fälle bietet sich eine Möglichkeit bei gewissen Protaminen.

Im Karpfensperma findet sich, wie die Untersuchungen von A. Kossel und H. D. Dakin¹⁾ nachgewiesen haben, ein Protamin, welches bei der Hydrolyse nur 4,9% Arginin, hingegen mindestens 28,8% Lysin lieferte: also mindestens 30,3% des gesamten Stickstoffs sind in Form des Lysins enthalten. Da dies Protamin (Präparat «Cyprinin I») stark basische Eigenschaften besitzt, so war es schon von vornherein sehr wahrscheinlich, daß in demselben freie, dem Lysin zugehörige Amidogruppen anzunehmen sind. Für unsere Versuche stand uns leider keine genügende Menge des schwer zu beschaffenden Cyprinins zur Verfügung, um in dem gleichen Präparat eine Bestimmung des Lysins und des reaktionsfähigen Stickstoffs auszuführen. Das von uns analysierte Cyprinin war sehr reich an Lysin und entsprach ungefähr dem von A. Kossel und H. D. Dakin untersuchten «Cyprinin I». Der Versuch zeigte, daß 23,6% des gesamten Stickstoffs durch salpetrige Säure in Freiheit gesetzt wurden (Versuch 9).

Zu den lysinhaltigen Protaminen gehört nach den Untersuchungen des einen von uns auch das Sturin. Wir unterwarfen auch dieses der Einwirkung der salpetrigen Säure, und hierbei entwickelte sich soviel Stickstoff, daß der aus dem Sturin stammende Teil desselben 6,9% des gesamten im Sturin enthaltenen Stickstoffs entsprach. Diese Zahl entspricht annähernd der ganzen Menge des im Lysin vorhandenen Stickstoffs. Wir verschieben die Diskussion der quantitativen Verhältnisse, sowohl beim Sturin wie beim Cyprinin, bis wir durch eine größere Zahl von Analysen weiteres Material gewonnen haben; nur sei schon jetzt bemerkt, daß die Menge des Lysins bei weitem nicht ausreicht, um das Säurebindungsvermögen des Sturins zu erklären. Es müssen also im Sturin neben den Amidogruppen des Lysins noch andere in freiem Zustande vorhanden sein.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 40, S. 567.

Daß mindestens eine der Amidogruppen des Lysins in den komplizierteren Proteinen sich in reaktionsfähigem Zustande befinden muß, ist schon früher festgestellt worden. Skraup¹⁾ stellte durch die Einwirkung von salpetriger Säure auf Casein und Glutin «Desamidocasein» und «Desamidoglutin» dar und wies durch die Hydrolyse dieser Derivate nach, daß das Lysin in ihnen fehlte — es war durch die salpetrige Säure zerstört. Er zog aus diesem Befunde den Schluß, daß im Casein und Glutin «der Lysinrest mit anderen Resten derart kombiniert ist, daß zum wenigsten eine Aminogruppe frei beweglich ist».

Experimenteller Teil.

Die folgende Zusammenstellung gibt eine Übersicht über die von uns erhaltenen Resultate.

Die bei der Untersuchung des Protons, Cyprinins und Sturins erhaltenen Prozentzahlen beziehen sich nicht auf die getrocknete Substanz. Nach früheren Erfahrungen haben wir es bei diesen Substanzen für zweckmäßiger gehalten, die Bestimmung des Stickstoffs in dem lufttrockenen Präparat zugrunde zu legen (vgl. Tafel II).

Zur Untersuchung des Protons diente ein Präparat des Salmisulfats, welches 22,54% N enthielt. Eine Lösung von 0,5155 g dieses Salmisulfats in 50 ccm Wasser wurde unter Zusatz von 5 ccm 20%iger Schwefelsäure eine halbe Stunde am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt, um es in Proton überzuführen, sodann mit Natronlauge neutralisiert und die Lösung der Einwirkung der salpetrigen Säure unterworfen.

¹⁾ Monatshefte der Chemie, Bd. 27, S. 631, 653 (1906).

Tabelle I.

Ver- suchs- num- mer	Substanz	Ange- wandte Ge- wichts- menge g	Er- halte- nes Gas- volu- men ccm	Ver- suchs- dauer Min. ¹⁾	Tem- pera- tur	Baro- meter- stand	Gefundene Ge- wichtsprocente des aus der an- gewandten Sub- stanz stammenden Stickstoffs	Berechnete Gewichts- procente für eine rea- gierende Amidogruppe
1	Nitro- harnstoff	0,1000	2,2	5	23,2	763,7	1,2	13,34
			3,2	15			1,8	
			8,8	50			4,9	
2	Nitro- guanidin	0,0837	0	5	24,0	763,7	0	13,46
			0,40	15			0,27	
			0,83	40			0,56	
3	Nitro- guanidin	0,0660	0,65	5	24,0	763,7	0,55	13,46
			0,90	40			0,76	
4	Nitroarginin aus Nitro- clupein	0,1499	18,55	6	24,0	765,0	6,95	6,39
			19,45	15			7,28	
			19,63	30			7,35	
5	Arginin- nitrat	0,1509	16,05	6	24,8	762,0	5,95	5,91
			16,65	15			6,17	
			16,85	30			6,25	
6	Clupein- sulfat	0,2062	0,07	6	26,0	759,0	0,02	—
			0,09	15			0,02	
7	Salmin- sulfat	0,2935	0,03	6	26,0	756,0	0,01	—
			0,07	15			0,01	
8	Proton- sulfat aus Salmin	0,5155	9,60	6	28,2	759	1,015	—
			9,67	15			1,022	
			10,02	30			1,063	

¹⁾ Nach den Angaben von van Slyke sollte bei Amidosäuren die Reaktion in 5 Minuten beendet sein, bei den in obiger Tabelle angeführten Versuchen erforderte sie jedoch stets eine längere Zeit. Eine Prüfung unseres Präparats von Natriumnitrit ergab, daß bei Blindversuchen stets nach 10 Minuten Volumkonstanz eingetreten war.

Tabelle I.

Fortsetzung.

Ver- suchs- num- mer	Substanz	Ange- wandte Ge- wichts- menge g	Er- halte- nes Gas- volu- men ccm	Ver- suchs- dauer Min.	Tem- pera- tur	Baro- meter- stand	Gefundene Ge- wichtsprozent- e des aus der an- gewandten Sub- stanz stamm- enden Stickstoffs	Berechnete Gewichts- prozent- e für eine rea- gierende Amidogruppe
9	Cyprinin- sulfat ¹⁾ (I)	0,3032	13,8	15	27,5	760,0	2,50	
			13,83	30				
			14,01	45				
10	Sturin- sulfat	0,2800	5,83	15 ²⁾	27,0	759,0	1,14	—
			6,88	30			1,35	
			7,06	45			1,38	
11	Sturin- sulfat	0,6481	14,96	25 ²⁾	26,2	756,0	1,27	—
			16,52	50			1,40	
			17,15	65			1,45	

Tabelle II.

Versuchs- nummer	Bezeichnung des Präparates	Prozentgehalt an reagierendem Stickstoff (cf. Tabelle I)	Stickstoffgehalt des Präparates %	Verhältnis des Gesamtstickstoffs zum reagierenden Stickstoff
9	Cyprininsulfat	2,50	10,62	100 : 23,6
10	Sturinsulfat	1,35	20,25	100 : 6,6
11	,	1,40	20,25	100 : 6,9

¹⁾ Annähernde Bestimmung.

²⁾ Die Zeit, welche zur Erreichung des konstanten Volumens erforderlich war, war bei den Sturinversuchen länger als gewöhnlich. Es entspricht dies den Angaben von van Slyke bezüglich des Lysins.