

Weitere Untersuchungen über die freien Amidogruppen der Proteinstoffe.

Von

A. Kossel und N. Gawrilow.¹⁾

1

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Heidelberg.)

Durch eine Reihe von Untersuchungen aus dem hiesigen Laboratorium ist die Auffassung begründet worden, daß in den natürlich vorkommenden Proteinen zwei verschiedenartige freie Amidogruppen vorhanden sind, die eine gehört dem Guanidin, die zweite dem Lysin an. Die Beobachtungen, welche diese Anschauung begründen, sind in früheren Mitteilungen ausführlich dargelegt worden. Es sei an folgende Tatsachen erinnert. Das Säurebindungsvermögen der Protamine steht in einem leicht erkennbaren Zusammenhange mit der Menge der im Molekül enthaltenen Guanidin- und Lysingruppen.²⁾ Die salpetrige Säure greift, wenn sie unter bestimmten Bedingungen auf Proteine einwirkt, nur am Lysinstickstoff an, während die übrigen freien Amidogruppen, welche die starke Alkaleszenz der Protamine bedingen, sich wie die Amidogruppen des Guanidins verhalten, d. h. nicht reagieren.³⁾ Auch die Art des Eintritts der Nitrogruppe ist dieser Annahme sehr günstig.⁴⁾

Unsere in dieser Mitteilung enthaltenen Untersuchungen sind imstande, diese Anschauung mit Hilfe einer anderen Beweisführung zu stützen. Die Möglichkeit hierzu bot sich auf Grund der bekannten Methode von Sörensen, welche auf der Einwirkung des Formaldehyds beruht. Nach Sörensen⁵⁾ unterscheiden sich die Amidogruppen des Guanidins in ihrem Verhalten zu Formol von denen der freien Amidosäuren; während

¹⁾ Mitgeteilt von A. Kossel am 9. September 1912 in der Versammlung der British association for the advancement of science (Physiologische Sektion) in Dundee.

²⁾ cf. M. Goto, Diese Zeitschr., Bd. 37, S. 94 (1902).

³⁾ A. Kossel und A. T. Cameron, Diese Zeitschr., Bd. 76, S. 457 (1912); A. Kossel und F. Weiß, Sitzungsber. d. Heidelberger Akademie d. Wiss., Math.-physik. Klasse, Abt. B, 30. März 1912; A. Kossel und F. Weiß, Diese Zeitschr., Bd. 78, S. 402 (1912).

⁴⁾ A. Kossel und E. L. Kennaway, Diese Zeitschr., Bd. 72, S. 486 (1911); A. Kossel und F. Weiß, l. c.

⁵⁾ S. P. L. Sörensen, Biochem. Zeitschr., Bd. 7, S. 45 (1907).

letztere mit Formaldehyd die bekannte Verbindung eingehen, ist dies bei den ersteren nicht der Fall. Wenn somit unsere oben erwähnte Auffassung richtig ist, dürfen diejenigen Proteine, welche kein Lysin enthalten, selbst wenn sie starke Alkaleszenz besitzen und reich an freien Amidogruppen sind, keinen «formol-titrierbaren» Stickstoff enthalten, die lysinhaltigen Proteine hingegen müßten unter der Einwirkung des Formols einen sauren Charakter annehmen. Dieser Voraussetzung entsprechen die folgenden Versuchsergebnisse.

Wir stellten fest, daß bei den lysinfreien Proteinen, und zwar bei verschiedenen Protaminen der Salmingruppe — den Salminen aus den Testikeln verschiedener Salmoniden, ferner dem Clupein, dem Esocin, dem Scombrin, außerdem bei höheren lysinfreien Proteinen: dem Zein und Hordein, der formol-titrierbare Stickstoff völlig fehlt oder in sehr geringer, nur durch Verunreinigung oder geringe Zersetzung der Präparate zu erklärender Menge beobachtet wird. Letzteres scheint beim Esocin der Fall zu sein. Sobald jedoch in der Reihe der Proteine das Lysin als Baustein erscheint, ist auch formol-titrierbarer Stickstoff vorhanden. Dies letztere Ergebnis fanden wir beim Sturin, beim Cyprinin und beim Crenilabrin. Daß die meisten höheren Proteine, welche ja bekanntlich Lysin enthalten, mit Formaldehyd Verbindungen eingehen und formol-titrierbar sind, ist eine längst bekannte und viel untersuchte Erscheinung.

Im allgemeinen scheinen die lysinreicheren Protamine auch reicher an formol-titrierbarem Stickstoff zu sein, doch sind die bisher vorliegenden Analysen noch nicht zahlreich genug, um hierüber zu entscheiden. Ein durchgehend proportionales Verhältnis zwischen beiden Größen ist kaum zu erwarten. Ganz abgesehen davon, daß bei Ausdehnung dieser Untersuchungen auf andere Proteine neben der Amidogruppe des Lysins noch andere formol-titrierbare Gruppen gefunden werden können, muß man auch mit der Möglichkeit verschiedenartiger Bindungen des Lysins rechnen. Auch könnten äußere, nicht mit Zersetzung verbundene Einwirkungen das Proteinmolekül so verändern, daß eine ursprünglich reaktionsfähige Amidogruppe ihre Reaktionsfähigkeit gegen Formol verliert.

Man wird mit der Verallgemeinerung der hier gefundenen Resultate auf die formenreiche Klasse der Proteine vorsichtig sein müssen. Jedenfalls bieten aber die bisherigen Beobachtungen einen neuen Beweis für die Richtigkeit der oben ausgesprochenen Anschauungen über die freien Amidogruppen der Proteine. Durch die Feststellung des Zusammenhangs mit dem Lysingehalt der Proteine hat die formoltitrimetrische Untersuchung eine erhöhte Bedeutung für die Konstitutionsforschung in der Eiweißchemie gewonnen.

Aus unseren Versuchen über das Verhalten der zur Salmingruppe gehörigen Protamine ist noch eine weitere bemerkenswerte Schlußfolgerung zu ziehen. Das freie Prolin ist, wie Sörensen feststellte (l. c.), durch Formol titrierbar, obwohl es keine Amido-, sondern eine Imidogruppe enthält. Da nun die Protamine der Salmingruppe, welche unter der Einwirkung des Formols keine saure Reaktion annehmen, erhebliche Mengen Prolin enthalten, so ergibt sich, daß das intraprotein gebundene Prolin keine Formolbindung eingeht. Sofern man daher überhaupt die Präexistenz des Prolins im Molekül der Proteine annimmt — und diese Annahme ist sehr wahrscheinlich —, so muß man schließen, daß der Stickstoff des Prolins an der Peptidbindung in diesen Proteinen teilnimmt. Dies führt aber wiederum zu der Schlußfolgerung, daß der Prolinstickstoff dieser Proteine tertiärer Stickstoff ist.

Experimenteller Teil.

Bei der Ausführung der Titrierung verfahren wir genau nach den Angaben von Sörensen. Als Indicator verwendeten wir ausschließlich Phenolphthalein. Die zu untersuchenden Stoffe konnten meist leicht in neutraler wässriger Lösung erhalten werden, unter Umständen wurden die Substanzen auch in $n/5$ -Salzsäure gelöst und dann mit Natronlauge bis zur Neutralität versetzt.¹⁾ In einzelnen Fällen (s. die Tabellen) war es

¹⁾ Zur Neutralisation der sauren Lösung setzten wir Natronlauge bis zur deutlich roten Farbe (zweites Stadium nach Sörensen) hinzu. Das Verhalten der Indicatoren bei Gegenwart von Protaminen scheint uns noch näherer Untersuchung zu bedürfen.

erforderlich, zu 10 ccm der Lösung 5 ccm $n/5$ -Salzsäure hinzuzufügen und sodann ohne vorherige Neutralisation 10 ccm der Formollösung hinzuzusetzen. Im Laufe der Titrierung bis zum starken Rot trat dann gewöhnlich Lösung ein, deren Zustandekommen wir nur in wenigen Fällen durch Zuhilfenahme eines Lösungsmittels oder durch Verdünnung begünstigen mußten. Um die Zulässigkeit dieser Änderung zu prüfen, haben wir das so geänderte Verfahren bei einzelnen Präparaten gleichzeitig mit der ursprünglichen Vorschrift angewandt. Es ergab sich — wie aus den unten mitgeteilten Tabellen ersichtlich ist — kein Unterschied der Resultate.

Die Titrierung der mit Formol versetzten Lösung wurde stets bis zum starken Rot fortgesetzt. Die Kontrollösung wurde immer so bereitet, daß ihre Menge gleich derjenigen der zu untersuchenden Lösung war. War die zu prüfende Lösung stark gefärbt, so gaben wir der Kontrollösung einen Zusatz von Bismarckbraun oder Orange S.

Die zur Untersuchung verwendeten Protamine waren nach dem Verfahren von A. Kossel dargestellt worden. Einige von ihnen sind bisher noch nicht beschrieben worden. Näheres über ihre Darstellung und Zusammensetzung soll in einer demnächst erscheinenden Abhandlung mitgeteilt werden. Es sind dies folgende Protamine: Coregonin aus *Coregonus albus*, Salvelin aus *Salvelinus Namaycush*, Esocin aus *Esox Lucius*. Wir verdanken das Material zu den beiden ersteren Präparaten dem Bureau of Fisheries in Washington D. C., die Testikel von *Esox Lucius* wurden uns von Herrn Professor Dr. H. Pauly in Würzburg, die Spermapräparate von *Oncorhynchus* zum Teil von dem Bureau of Fisheries in Washington, zum Teil von Herrn Professor Dr. Alonzo Englebert Taylor in Philadelphia, Pa. zugesandt. Wir stellen auch an dieser Stelle unsern Dank für das wertvolle Material ab.

Die Analysen des Coregonins, Salvelins und Esocins sollen in dieser Zeitschrift später mitgeteilt werden; sie ergaben, daß diese Protamine dem Salmintypus angehören, also sehr reich an Arginin sind und kein Lysin enthalten. Das-

selbe ist, wie A. E. Taylor zuerst nachgewiesen hat,¹⁾ bei dem aus *Oncorhynchus Tshawytsha* dargestellten Salmin der Fall. Das *Oncorhynchus*-Protamin hat nach den bisher vorliegenden Untersuchungen keine Abweichung vom Salmin des Rheinlachs gezeigt.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle A.
Lysinfreie Proteine.

1	2	3	4	5	6
Untersuchte Substanz	Prozentgehalt an Stickstoff ²⁾	Ange wandte Substanzmenge g	Reaktion der Lösung bei Beginn der Formolwirkung	Formol-titrierbarer Stickstoff g	Formol-titrierbarer Stickstoff in % des Gesamtstickstoffs
Clupeinsulfat	22,01	0,1274	neutral	0,0	0,0
„	22,01	0,0637	sauer	0,0	0,0
„	22,01	0,5956	neutral	0,0	0,0
Salminsulfat (aus Rheinlachs)	21,77	0,3054	„	0,0	0,0
„	21,77	0,3113	„	0,0	0,0
Salminsulfat (aus <i>Oncorhynchus</i>)	21,70	0,2304	„	0,0	0,0
„	21,70	0,2312	„	0,0	0,0
Coregoninsulfat (aus <i>Coregonus albus</i>)	nicht bestimmt	0,3275	„	0,0	0,0
Salvelinsulfat (aus <i>Salvelinus Namaycush</i>)	20,97	0,2934	„	0,0	0,0
Scombrinsulfat	nicht bestimmt	0,2312	„	0,0	0,0
Esocinsulfat (aus <i>Esox Lucius</i>)	21,06	0,3094	„	0,0013	1,9
„	21,06	0,3465	„	0,0013	1,9
Hordein	17,21 ³⁾	0,400	„	0,00056	0,8
„	17,21 ³⁾	0,400	„	0,00028	0,4
Zein) nicht bestimmt	20) ccm gesättigte	„	0,0	0,0
„		20) Lösung	„	0,0	0,0

¹⁾ Journ of biological chemistry, Bd. 5, S. 389 (1908).

²⁾ In dem lufttrockenen Präparat.

³⁾ Nach Osborne.

Tabelle B.
Lysinhaltige Proteine.

Untersuchte Substanz	Prozent- gehalt an Stick- stoff ¹⁾	Ange- wandte Sub- stanz- menge	Gesamt- Stick- stoff g	Re- aktion der Lösung	Formol- titrier- barer Stickstoff g	Formol- titrierbarer Stickstoff in Prozenten des Gesamt- stickstoffs
Sturinsulfat	19,91	0,6758	0,1345	neutral	0,0094	6,9
»	19,91	0,5839	0,1162	sauer	0,0073	6,3
»	19,91	0,2899	0,0573	neutral	0,0036	6,4
»	19,91	0,2033	0,0405	»	0,0028	6,4
»	19,91	0,2899	0,0573	sauer	0,0036	6,4
»	19,91	0,2033	0,0405	»	0,0028	6,4
Cyprininsulfat ²⁾ Erstes Präparat	13,58	0,3150	0,0428	»	0,0054	12,8
Desgl.	13,58	0,3299	0,0448	»	0,0058	13,0
Cyprininsulfat ²⁾ Zweites Präparat	18,22	0,3402	0,0620	»	0,0080	13,2
Crenilabrinsulfat	15,72	0,3538	0,0556	»	0,0042	7,5

¹⁾ In der lufttrockenen Substanz.

²⁾ Die Präparate des Cyprininsulfats bestanden aus einer Mischung von α - und β -Cyprinin.