

Über die freien Amidogruppen der Eiweißkörper.

I. Mitteilung.

Von

S. Edlbacher.

(Aus dem physiologischen Institut Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 2. Mai 1919.)

Die Methoden, die sich mit der Erforschung der Konstitution der Eiweißkörper befassen, kann man in zwei große Gruppen einteilen. Die eine der beiden sucht von vornherein das Eiweißmolekül in mehr oder weniger weit abgebaute Bruchstücke zu zerteilen und aus deren Beschaffenheit Rückschlüsse auf das ursprüngliche Molekül zu ziehen.

Die anderen Methoden trachten durch die Kennzeichen und das charakteristische Verhalten bestimmter Atomgruppierungen im Proteinmolekül zum Ziel zu gelangen.

In diesem Sinne liegen z. B. vorbildliche Untersuchungen von E. Fischer und E. Abderhalden über die Charakterisierung und Konstitution von Peptiden mit Hilfe der Naphthalinsulfoverbindungen vor¹⁾.

Albrecht Kossel²⁾ und seine Mitarbeiter haben Nitrierungsversuche an Eiweißkörpern unternommen. Sie behandelten Clupein, Salmin, Surin, Histon und Edestin mit Salpetersäure und es gelang, aus den erhaltenen Nitroproteinen Nitroarginin zu isolieren und dadurch den Beweis zu führen, daß die Guanidgruppe dieser Aminosäure als freie Seitenkette im Eiweißmolekül vorhanden ist.

Auch hat K. Hirayama³⁾ die Einwirkung von Säurechloriden auf Protamine studiert und dabei gewisse Relationen

¹⁾ E. Fischer und E. Abderhalden, Ber. Bd. 40, S. 3544 (1907).

²⁾ A. Kossel und Kennaway, Diese Zeitschr. Bd. 72, S. 486 (1911). — A. Kossel und F. Weiss, ebenda Bd. 78, S. 402 (1912).

³⁾ K. Hirayama, Diese Zeitschr. Bd. 59, S. 285 (1909).

zwischen dem Stickstoffgehalt und der Zahl der substituierbaren Wasserstoffatome gefunden.

Eine der fruchtbringendsten Entdeckungen auf diesem Gebiet war Sörensens¹⁾ bekannte Methode der Formoltitration und die dadurch ermöglichte Bestimmung der freien Amidogruppen; dieser Methode wurde dann die von D. D. van Slyke²⁾ zur Seite gestellt, welche ebenfalls die freien Amidogruppen durch ihr Verhalten gegen salpetrige Säure der Bestimmung zugänglich macht.

In ähnlicher Richtung bewegten sich die Untersuchungen Z. Skraups³⁾ über die Methylierung von Eiweißkörpern. Nachdem durch Herzig und Meyer⁴⁾ der Weg eröffnet war, das am Stickstoff gebundene Alkyl zu bestimmen, untersuchte Skraup die Einwirkung von Jodmethyl und alkoholischer Kalilauge auf Casein und Gelatine und erhielt dadurch ein allerdings auch Jod enthaltendes Methylcasein und eine Methylgelatine, welche Verbindungen von ihm ausführlich beschrieben worden sind. Es wurde auch die Hydrolyse dieser Produkte durchgeführt, doch ist es nicht gelungen, methylierte Spaltungsprodukte zu isolieren. Diese Untersuchungen, auf die ich weiter unten noch zurückkommen werde, wurden dann von Herzig und Landsteiner⁵⁾ wieder aufgenommen, doch wurde von diesen Autoren nicht Jodmethyl, sondern Diazomethan als Methylierungsmittel verwendet. Auf die Resultate dieser Untersuchungen wollen wir ebenfalls erst weiter unten eingehen.

Die ersten Versuche über die Einwirkung von Dimethylsulfat auf Eiweißkörper stammen von Rogozinski⁶⁾ der

¹⁾ Sörensen, Bioch. Zeitschr. Bd. 7, S. 59 (1907).

²⁾ D. D. van Slyke, Ber. Bd. 44, S. 1684 (1911).

³⁾ Skraup und Krause, Monatshefte Bd. 30, S. 447 (1909). — Skraup und Böttcher, Monatshefte Bd. 31, S. 1035 (1910).

⁴⁾ Herzig und Meyer, Ber. Bd. 27, S. 319 (1894). — Monatshefte Bd. 15, S. 613 (1894); Monatshefte Bd. 16, S. 599 (1894); Monatshefte Bd. 18, S. 379 (1897).

⁵⁾ Herzig und Landsteiner, Bioch. Zeitschr. Bd. 61, S. 458 (1914).

⁶⁾ Rogozinsky, Diese Zeitschr. Bd. 80, S. 371 (1912).

unter A. Kossels Leitung Clupein mit diesem Reagens behandelte.

Nachdem es mir¹⁾ gelungen war, die Schwierigkeiten des von F. Pregl²⁾ ausgearbeiteten Verfahrens der Bestimmung des Methyls am Stickstoff, das sich im Prinzip dem ursprünglich Herzig-Meyerschen Verfahren anlehnt, in den Weg stellen, zu überwinden, nahm ich die seinerzeit von Rogozinski begonnenen Untersuchungen zum Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

Es sollte die Einwirkung von Dimethylsulfat auf Eiweißkörper nach verschiedenen Richtungen hin in Angriff genommen und die dadurch gewonnenen Erkenntnisse mit den bisher bekannten Tatsachen über den Bau des Eiweißmoleküls in Vergleich gebracht werden. Wie weit es bis jetzt geglückt ist, diesem gesteckten Ziel nahe zu kommen, soll am Schluß zusammenfassend dargestellt werden.

Es lagen bereits von Novak³⁾ Versuche über das Verhalten der einzelnen Aminosäuren bei der Behandlung mit Dimethylsulfat vor. Die meisten der von ihm untersuchten Aminosäuren werden durch Schütteln mit Dimethylsulfat in alkalischer Lösung in N-Trimethyl-Derivate verwandelt. So geben z. B. Glykokoll Alanin, Leucin und Phenylalanin das entsprechende Betain, während Asparaginsäure in Fumarsäure unter Abspaltung von Trimethylamin übergeführt wird. Das gebildete Trimethylamin wird dann durch überschüssiges Dimethylsulfat teilweise bis zum quaternären Ammoniumderivat weiter methyliert.

Dieser Vorgang wurde schon seinerzeit von Körner und Menozzi⁴⁾ beobachtet.

Bei der Einwirkung auf Glutaminsäure entsteht der Dimethylester der N-Trimethyl-Glutaminsäure. Im allgemeinen also kann man sagen, daß bei den untersuchten Aminosäuren

¹⁾ Edlbacher, Diese Zeitschr. Bd. 101, S. 278 (1918).

²⁾ F. Pregl, Die quantitative organische Mikroanalyse. Berlin. J. Springer, 1917.

³⁾ Novak, Ber. Bd. 45, S. 834 (1912).

⁴⁾ Körner und Menozzi, Gazz. chim. Ital. Bd. 13, S. 351.

mit Ausnahme der Asparaginsäure der ganze Stickstoff in Trimethylderivate überführt wird und auch aus letztgenannter Säure im wesentlichen N-methylierte Verbindungen entstehen.

Wie ich weiter unten gezeigt habe, verhalten sich Arginin, Histidin und Lysin ähnlich. Arginin wird in N-Dimethylarginin, Histidin in ein N-Trimethylhistidin und Lysin in ein N-Tetramethyllysin verwandelt. Bei letztgenannter Aminosäure ist es aber auch als wahrscheinlich anzunehmen, daß an der ω -NH₂-Gruppe analog den anderen Aminosäuren eine N-Trimethylgruppe entsteht, während die α -NH₂-Gruppe monosubstituiert wird. Auch sei an dieser Stelle noch der Synthese des Herzynin gedacht, welche Engeland und Kutscher¹⁾ durch Einwirkung von Trimethylamin auf desaminiertes Histidin bewerkstelligten. Engeland²⁾ hat auch die Reaktion zwischen Phenylalanin und Glutaminsäure einerseits und Jodmethyl andererseits beschrieben, wie endlich auch von E. Fischer und W. Lipschitz³⁾ über N-Methylamidosäuren Beobachtungen vorliegen, die jedoch für diese Betrachtungen ohne Bedeutung sind.

Über das Verhalten von Peptiden bei der Methylierung haben E. Fischer und Glud⁴⁾ meines Wissens das erste Mal berichtet. Dann haben Abderhalden und Kautsch⁵⁾ verschiedene N-methylierte Peptide hergestellt. So erhielten sie z. B. durch die Einwirkung von Methyljodid auf Leucylglycin ein Peptid, dessen freie Amidogruppe in eine N-Trimethylgruppe übergegangen war. A. Kossel und S. Edlbacher haben weiterhin festgestellt⁶⁾, daß bei der Methylierung von Peptiden mit Dimethylsulfat in den bisher untersuchten

¹⁾ Engeland und Kutscher, Zentralbl. f. Physiologie Bd. 26, S. 569 (1912).

²⁾ Engeland, Ber. Bd. 43, S. 2662 (1910).

³⁾ E. Fischer und W. Lipschitz, Ber. Bd. 48, S. 360 (1915).

⁴⁾ E. Fischer und Glud, Annalen der Chemie Bd. 369, S. 247 (1909).

⁵⁾ E. Abderhalden und Kautsch, Diese Zeitschr. Bd. 72, S. 44 (1911).

⁶⁾ A. Kossel und S. Edlbacher, Diese Zeitschr. die vorhergehende Abhandlung.

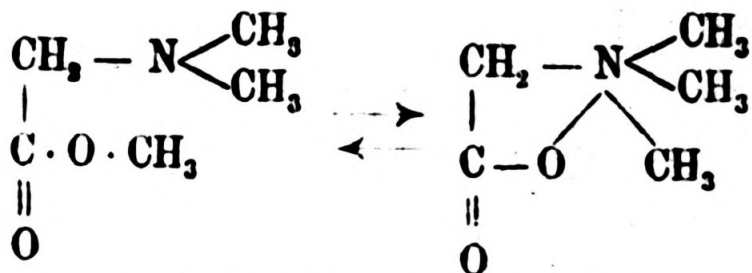
Fällen nur die freien Amidogruppen unter Bildung von betainartigen Körpern substituiert werden, während die sich in Peptidbindung befindlichen Imidogruppen nicht in Reaktion treten.

Auf Grund dieser Ergebnisse habe ich nun das Verhalten einer Reihe von Eiweißkörpern gegen Dimethylsulfat in alkalischer Lösung untersucht und durch die Bestimmung der Anzahl der am Stickstoff eingetretenen Methylgruppen Rückschlüsse auf die Zahl der ursprünglich vorhandenen freien Amidogruppen im Proteinmolekül zu ziehen versucht. Die im Arginin vorhandene Amidogruppe wird durch diese Reaktion nicht angezeigt. Der Vergleich der dadurch gewonnenen Resultate mit den Ergebnissen der Sörensenschen bzw. van Slykeschen Methode mußte dann ergeben, ob alle im Eiweiß vorhandenen freien Amidogruppen sich gleichmäßig verhalten, oder ob es gelingt, diese dadurch in verschieden reagierende Gruppen zu differenzieren. Um eine der Formol- oder Slyke-Bestimmung analoge Methode zu erhalten, war es dabei durchaus nicht nötig, die einzelnen Reaktionsprodukte zu isolieren, sondern man brauchte nur in bekannten Teilen des Reaktionsgemisches den Gesamtstickstoff nach Kjeldahl und das an Stickstoff gebundene Methyl zu bestimmen und dann die erhaltene Proportion auf den Gesamtstickstoff zu beziehen. Man gelangt so zu dem Begriff der „N-Methylzahl“, den ich folgend definieren möchte:

„Die N-Methylzahl ist diejenige Zahl, welche angibt, wieviel Methylgruppen auf je 100 Atome Stickstoff bei erschöpfender Behandlung mit Dimethylsulfat in alkalischer Lösung an Stickstoff gebunden werden.“

Das in Reaktion getretene Dimethylsulfat wird dabei in methylschwefelsaures Natrium verwandelt und gibt dann bei der Behandlung mit Jodwasserstoff größere Mengen von Methyljodid ab, welches bei einer Temperatur von 120—150° abdestilliert; daher wurde von vornherein auf die Bestimmung etwa entstandener Methoxylgruppen verzichtet, denn es wäre sonst ein umständliches Reinigungsverfahren notwendig gewesen. Durch ein solches wären aber schwerlich sekundäre

Umwandlungsprozesse zu vermeiden gewesen, wie sie R. Willstätter¹⁾ z. B. annimmt:



Ehe ich nun auf die Ergebnisse dieser Untersuchungen eingehe, sollen die experimentellen Angaben geschildert werden.

Methylierung unveränderter Proteinsubstanzen.

Die Eiweißkörper wurden in Wasser gelöst und mit der mehrfachen Menge Dimethylsulfat und Natriumhydroxyd geschüttelt, wobei unter der Wasserleitung kräftig gekühlt wurde, so daß während der ganzen Reaktionsdauer die Temperatur nie über 15° stieg.

So wurden z. B. 2,5 g Gelatine + 100 H₂O + 6 g NaOH + 15 g Dimethylsulfat geschüttelt. Schon nach 15 Minuten war alles Dimethylsulfat verschwunden. Es wurde nun noch 10 Minuten stehen gelassen und dann mit verdünnter Salzsäure neutralisiert. Von dieser Lösung wurden bekannte Teile zur Gesamtstickstoff- und Methylbestimmung verwendet. Also z. B. 10 cm³ für die Kjeldahl-Bestimmung, 20 cm³ wurden genau auf 100 cm³ aufgefüllt und nun mittels einer Capillarbürette 1 cm³ in das Quarzkölbchen des Methylimidapparates abgelassen²⁾. Dazu wurden 2 Tropfen verdünnte Goldchloridlösung gegeben und nun ein Strom Luft, die zur Reinigung vorher konz. Schwefelsäure passieren mußte, durchgesaugt, während das Kölbchen in ein siedendes Wasserbad eintauchte. Auf diese Art konnte die Flüssigkeit in etwa 10 Minuten zur Trockne gedampft werden, ohne daß irgend ein Verlust durch Verspritzen oder eine Verunreinigung bzw. Zersetzung zu befürchten war.

Es sei an dieser Stelle noch auf einige Punkte hingewiesen, die man bei der Ausführung von derartigen Bestimmungen zu beobachten hat.

¹⁾ R. Willstätter, Ber. Bd. 35, S. 585 (1902).

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 101, S. 283.

Durch die Einwirkung des Dimethylsulfates bildet sich methylschwefelsaures Natrium. Dieses Salz wird nun durch die zugesetzte Jodwasserstoffsäure teilweise bis zu Schwefelwasserstoff reduziert und es genügt dann die in den beiden Vorlagen vorgeschaltete Menge Cadmiumsulfatlösung nicht, um den ganzen Schwefelwasserstoff zurückzuhalten. Füllt man aber die beiden Waschgefäße W_1 und W_2 (l. c.) an Stelle der angegebenen 5% igen mit 10% iger Lösung von Cadmiumsulfat, so wird aller entstehende Schwefelwasserstoff zurückgehalten und der im Reagierglas entstehende Niederschlag ist rein weiß.

Im Anschluß daran sei noch darauf hingewiesen, daß die sich im Reaktionsgefäß befindlichen Tonsplitterchen zur Verhinderung eines Siedeverzuges nicht genügen. Das äußerst lästige Übersäumen der erhitzten Säure wird aber vollkommen vermieden, wenn man, wie bei der ursprünglichen Vorschrift von F. Pregl, ein kleines Stückchen von Stanniol in das Kölbchen wirft. Das entstehende Jodzinn wirkt äußerst energisch gegen den Siedeverzug und man kann in ungefähr einer Viertelstunde nach vollendeter Abspaltung des Methoxyls die ganze Jodwasserstoffsäure in die Vorlage abdestillieren.

Wie ich seinerzeit (l. c.) nachgewiesen habe, wird bei der Anwendung von AuCl_3 in längstens 30 Minuten bei Temperaturen von $300\text{--}360^\circ\text{C}$. alles Methyl am Stickstoff abgespalten. Ich habe mich durch wiederholte Versuche überzeugt, daß ein längeres Erhitzen oder gar eine nochmalige Destillation überflüssig sind.

Ich gebe im folgenden die Resultate der Bestimmungen von den verschiedenen Eiweißsubstanzen, soweit sie bei der gegenwärtigen Lage zu beschaffen waren:

1. Gelatine.

2½ g Gelatine	} 100 cm³ Wasser
6 g NaOH	
15 g Dimethylsulfat	

10 cm³ verbrauchten $23.6\text{ cm}^3 \frac{\text{N}}{10}$ Säure

= 0.03304 g N

20 cm auf 100 aufgefällt, davon 1 cm

gab: 1.66 mg AgJ = 0.1062 mg CH_3

N-Methylzahl = 15.0

Die ursprüngliche Gelatine liefert weder Methoxyl noch Methylimid. Es sei auf dieses Faktum ausdrücklich hingewiesen, denn Skraup und Böttcher¹⁾ geben an, daß käufliche Gelatine 0·35% Methoxyl und 1·1% Methyl am Stickstoff geben soll, ebenso wie Herzig und Landsteiner²⁾ für Gelatine den Wert von 0·18% Methoxyl und 1·17% Methyl am Stickstoff angeben. Es mag möglich sein, daß diese Werte, die die genannten Autoren finden, sowie die Werte für Casein, die gleich in der Folge besprochen werden sollen, durch sekundäre Reaktionen bedingt sind, welche durch die lange Erhitzungsdauer des ursprünglichen Herzig-Mayerschen Verfahrens hervorgerufen werden.

2. Casein.

Zur Verwendung gelangte ein Originalpräparat von Hammarsten:

1·5 g Casein	}	100 g H ₂ O
3 g NaOH		
8 g Dimethylsulfat		

davon 20 cm³ verbrauchten 27·8 cm³ $\frac{N}{10}$ Säure

= 0·03892 g N

30 cm³ auf 100 aufgefüllt, davon 1 cm³ 1·76 mg AgJ = 0·1126 mg CH₃
N-Methylzahl = 17·59

Das nichtmethylierte Präparat lieferte bei wiederholten Versuchen kein Methoxyl und nur höchstens 0·4% CH₃ am N, welcher Wert innerhalb der Fehlergrenzen der Methode liegt. Die Werte, die Skraup und Krause³⁾ finden: 0·8% OCH₃ und 1·13% CH₃ am N können also nur in der anderen Methodik, oder an der mangelnden Reinheit des von den genannten Autoren analysierten Präparates ihre Begründung finden. Dasselbe ist auch über die von Herzig und Landsteiner (l. c.) gemachte Beobachtung zu bemerken, denn auch diese Autoren finden für Casein Werte von 0·64% OCH₃ und 1·78% CH₃ am Stickstoff.

3. Globin aus Pferdeblutkörperchen.

0·7 g Globin	}	50 cm ³ Wasser
1·5 g NaOH		
4 g Dimethylsulfat		

10 cm³ dieser Lösung verbrauchten 12·5 cm³ $\frac{N}{10}$ Säure

gefunden: 0·0175 g N

10 cm³ wurden auf 50 cm verdünnt, davon lieferte

1 cm³ = 1·16 mg AgJ = 0·07422 mg CH₃,

N-Methylzahl = 19·7

¹⁾ Monatshefte Bd. 31, S. 1035 (1910).

²⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 61, S. 458 (1914).

³⁾ Monatsb. d. Chemie Bd. 30. S. 447 (1909).

4. Bence-Jonesscher Eiweißkörper.

Das Präparat wurde von Herrn Geheimerat R. Kober in Rostock dem hiesigen Institut zur Verfügung gestellt.

0.7 g Bence-Jones-Eiw.	}	50 cm ³ Wasser
1.5 g NaOH		
4 g Dimethylsulfat		

10 cm³ dieser Lösung verbrauchten 9.7 cm³ $\frac{N}{10}$ Säure
 gefunden: 0.0135 g N

10 cm³ wurden auf 50 cm³ aufgefüllt,

davon lieferte 1 cm³ = 0.580 mg AgJ = 0.0371 mg CH₃
 N-Methylzahl = 13.0

5. Edestin aus Hanfsamen.

1 g Edestin	}	50 cm ³ Wasser
3 g NaOH		
5 g Dimethylsulfat		

10 cm³ dieser Lösung verbrauchten 11.8 cm³ $\frac{N}{10}$ Säure
 gefunden: 0.01652 g N

10 cm³ wurden auf 50 cm³ aufgefüllt,

davon lieferte 1 cm³ = 1.60 mg AgJ = 0.1040 mg CH₃
 N-Methylzahl = 15.0

Da sich das methylierte Edestin als besonders geeignet zur Isolierung erwies, wurde es auf folgende Art dargestellt:

5 g Edestin werden mit 100 cm³ Wasser kräftig durchgeschüttelt, bis eine gleichmäßige Emulsion entsteht und nun in kleinen Portionen unter fortgesetztem Schütteln mit einer Lösung von 12 g NaOH in 100 Teilen Wasser versetzt. Dadurch wurde ein Zusammenballen des Proteins, wie es sonst beim Zusatz von Natronlauge leicht eintritt, hintangehalten und es resultiert eine klare, nur schwach gelblich gefärbte Lösung, die nun in der üblichen Weise mit 30 g Dimethylsulfat behandelt wird. Durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure scheidet sich das methylierte Protein aus dem Reaktionsgemisch in gut filtrierbarer Form ab. Es wurde durch mehrmaliges Umfällen gereinigt und zur Analyse im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet:

0.2768 g verbrauchten 24.1 cm³ $\frac{N}{10}$ Säure

= 12.19% N

7.440 mg gaben = 2.28 mg AgJ = 1.96% CH₃

N-Methylzahl = 15.02

Unverändertes Edestin ergab keinen Gehalt von CH₃ am Stickstoff.

6. Globulin aus Kürbissen.

1.5 g Globulin	}	100 cm ³ Wasser
3 g NaOH		
8 g Dimethylsulfat		

20 cm³ verbrauchten 22.8 cm³ $\frac{N}{10}$ Säure = 0.03192 g N

30 cm³ auf 100 verdünnt, davon 1 cm³ 1.33 mg AgJ = 0.0851 mg CH₃
N-Methylzahl = 16.5

7. Clupeinsulfat.

1.5 g Clupeinsulfat	}	125 cm ³ Wasser
3 g NaOH		
8 g Dimethylsulfat		

(bei weniger Wasser fällt ein Teil des Clupeins beim Neutralisieren wieder aus).

20 cm³ der Lösung verbrauchten 31.3 cm³ $\frac{N}{10}$ Säure
= 0.04382 g N

30 cm³ auf 100 aufgefüllt, davon 1 cm³ lieferte
2.68 mg AgJ = 0.172 mg CH₃
N-Methylzahl = 24.4

8. Sturinsulfat.

1.5 g Sturinsulfat	}	100 cm ³ Wasser
3 g NaOH		
8 g Dimethylsulfat		

20 cm³ verbrauchten 37.5 cm³ Säure = 0.0525 g N

30 cm³ auf 100 aufgefüllt, davon 1 cm³ lieferte
= 3.15 mg AgJ = 0.2016 mg CH₃
N-Methylzahl = 23.9

9. Salmisulfat vom Rheinlachs.

0.75 g Salmisulfat	}	50 cm ³ Wasser
1.5 g NaOH		
4 g Dimethylsulfat		

10 cm³ verbrauchten 21.7 cm³ $\frac{N}{10}$ Säure = 0.0038 g N

15 cm³ auf 50 aufgefüllt, davon 1 cm³ lieferte = 1.49 mg AgJ
= 0.09534 mg CH₃
N-Methylzahl = 9.76

10. Salminsulfat von *Oncorhynchus*.

1.5 g Salminsulfat	} 100 cm ³ Wasser
3 g NaOH	
8 g Dimethylsulfat	

20 cm³ verbrauchten 37.6 cm³ $\frac{N}{10}$ Säure = 0.05264 g N

30 cm³ auf 100 aufgefüllt, davon 1 cm³ lieferte:

1.18 mg AgJ = 0.0755 mg CH₃

N-Methylzahl = 8.9

In diesem Falle wurde auch versucht, ob eine Methylierung unter Eiskühlung das Ergebnis beeinflusst. Der Versuch wurde unter sonst gleichen Bedingungen ausgeführt und ergab die N-Methylzahl 10.6, also abgesehen von der zulässigen Fehlergrenze den gleichen Wert.

11. Esocinsulfat und 12. Scombrinsulfat erwiesen sich als nicht methylierbar.

In der folgenden Tabelle sind die gewonnenen Tatsachen übersichtlich zusammengestellt:

Eiweißkörper	N : CH ₃ = 100 : x
1. Gelatine	x = 15.0
2. Casein	„ = 17.5
3. Globin	„ = 19.7
4. Bence-Jonesscher Eiweißkörper	„ = 13.0
5. Edestin	„ = 15.0
6. Globulin aus Kürbissen	„ = 16.5
7. Clupeinsulfat	„ = 24.4
8. Sturinsulfat	„ = 23.9
9. Salminsulfat vom Rheinlachs	„ = 9.7
10. Salminsulfat von <i>Oncorhynchus</i>	„ = 8.9
11. Esocinsulfat	„ = 0
12. Scombrinsulfat	„ = 0

Es ergeben sich hier überraschende Verhältnisse. Zunächst ist die auffallende Übereinstimmung der N-Methylzahlen von Eiweißkörpern verschiedensten Ursprungs und verschiedenster Zusammensetzung zu bemerken.

Gelatine, Casein, Globin, Bence-Jonessche Eiweißkörper, Edestin und Kürbisglobulin ergeben annähernd die gleichen Zahlen.

Ganz anders verhalten sich hingegen die Protamine.

Während nach unseren bisherigen Anschauungen die lysin-freien Vertreter dieser Klasse ähnliche Werte geben sollten, ergibt sich hier eine auffallende Differenzierung, die mit unseren bisherigen Anschauungen direkt in Widerspruch zu stehen scheint. So sehen wir z. B. Clupein und Sturin, wovon das erstere nach dem Typus $a_2m^1)$, das letztere nach dem Typus $(a h l)_2m$ gebaut ist, mit der gleichen Methylzahl (24) auftauchen, während die beiden Salmine, die ebenfalls dem Typus a_2m angehören, die Methylzahl 9 ergeben. Noch überraschender ist der Befund beim Esocin und Scombrin, denen auch die allgemeine Formel a_2m entspricht, und die gegen die Einwirkung von Dimethylsulfat vollkommen resistent erscheinen.

Es scheinen sich hier neue gesetzmäßige Zusammenhänge auszudrücken, auf deren Bedeutung ich hier nur kurz hinweisen möchte, da sie weiter unten noch besprochen werden sollen.

Die nächste Frage, die durch diese Tatsachen aufgerollt wird, ist die, wie sich die einzelnen Bausteine des Eiweißmoleküls gegenüber der Einwirkung von Dimethylsulfat verhalten.

Novák²⁾ hat seinerzeit die Einwirkung von Dialkylsulfaten auf Amidosäuren studiert und untersuchte Glykokoll, Alanin, Leucin, Phenylalanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Er erhielt bei allen genannten Substanzen Verbindungen, die drei Methylgruppen am Stickstoff gebunden haben, mit Ausnahme der Asparaginsäure, welche Trimethylamin und Fumarsäure liefert, wie schon seinerzeit Körner und Menozzi³⁾ nachgewiesen haben.

Ehe man den Versuch einer Deutung der Methylierung des ganzen Eiweißmoleküls unternimmt, lag es nun nahe, das Verhalten der übrigen Bausteine, namentlich der Diaminosäuren festzustellen.

¹⁾ Vgl. A. Kossel, Diese Zeitschr. Bd. 88, S. 184 (1913).

²⁾ Bd. 45, S. 834 (1912).

³⁾ Gazz. chim. Ital., Bd. 13, S. 351.

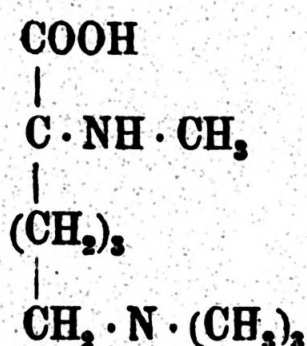
Es wurden zu diesem Zweck untersucht: Arginin, Lysin und Histidin.

Die Methylzahlen waren:

	N-Methylzahl
1. Arginincarbonat	55·2
2. Lysinchlorhydrat	200·—
3. Histidinchlorhydrat	104·—

Das heißt, es entstanden:

Aus Arginin N-Dimethylarginin, aus Histidin ein N-Tri-methylhistidin und aus Lysin ein N-Tetramethyllysin, was wahrscheinlich einer Formel



entspricht.

Albumosen und Peptone.

Es wurde das Verhalten einiger Albumosen und Peptone untersucht. Ein orientierender Versuch mit Gelatine, die in alkalischer Lösung eine halbe Stunde am Wasserbade erhitzt worden war, zeigte eine bedeutende Steigerung der Methylierbarkeit an:

2·5 g Gelatine }
6 g NaOH } wurden in 100 Teilen Wasser gelöst,

eine halbe Stunde am Wasserbade digeriert, dann abgekühlt und mit 15 g Dimethylsulfat geschüttelt.

N-Methylzahl = 89·7.

Die Methylzahl der unveränderten Gelatine = 15·0.

N-Methylzahlen.

Heteroalbumose	16·7
Protoalbumose	19·9
Deuteroalbumose	30·7
Seidenpepton	52·8

Es zeigen diese Versuche ganz deutlich, daß bei fortschreitender hydrolytischer Spaltung Produkte entstehen, deren Methylierbarkeit immer mehr zunimmt, was ganz im Einklang

mit der Vorstellung der allmählichen Lösung von Peptidbindungen steht, wodurch die methylierbaren freien Amidogruppen gebildet werden. Auch Herzig und Landsteiner¹⁾ fanden bei der Behandlung von Wittepepton mit Diazomethan eine Steigerung des Stickstoffmethyls gegenüber den ursprünglichen Eiweißkörpern.

Säurehydrolyse der Gelatine.

Um die fortschreitende Spaltung und das damit verbundene Freiwerden von Aminogruppen feststellen zu können, wurde die Gelatine einer Hydrolyse mit Normal-Salzsäure unterworfen und die einzelnen Stadien immer durch Formoltitrierung nach Sörensen und die Bestimmung der N-Methylzahl fixiert. Die geringe Konzentration der zur Hydrolyse benutzten Säure bringt einesteils den Vorteil mit sich, daß man immer eine kaum gefärbte Lösung erhält, was ja für die Sorensensche Bestimmung von großer Wichtigkeit ist, andernteils werden dadurch die Zeiträume beträchtlich in die Länge gezogen, was ebenfalls von Vorteil für die Gleichmäßigkeit der Resultate zu sein scheint.

Zur Bestimmung des Formolstickstoffs nach Sörensen wurden 3 g Gelatine in 150 Teilen Wasser gelöst und diese Lösung genau neutralisiert:²⁾

$$10 \text{ cm}^3 \text{ verbrauchten} = 20 \cdot 3 \text{ cm}^3 \frac{\text{N}}{10} \text{ Säure} = 28 \cdot 43 \text{ mg N}$$

$$20 \text{ cm}^3 \text{ verbrauchten} = 0 \cdot 8 \text{ cm}^3 \frac{\text{N}}{5} \text{ NaOH} = 2 \cdot 24 \text{ mg Formol N}$$

Die N-Methylzahl war, wie früher schon bestimmt wurde, = 15·0.

Das Verhältnis des Formolstickstoffs zum Gesamtstickstoff war 4·01 : 100, somit 100 N : Formol-N = 4·01.

Für jeden der angegebenen Versuche war die Anordnung wie folgt: 2 g Gelatine wurden auf dem Wasserbade in 100 Teilen Wasser gelöst und zu dieser Lösung 100 cm³ doppelt

¹⁾ Bioch. Zeitschr. Bd. 61, S. 458 (1914).

²⁾ Als Indikator diente Phenolphthalein und es wurde immer auf das Stadium „deutlich rot“ titriert.

normale Salzsäure gefügt; nun wurde die angegebene Zeit am Rückflußkühler gekocht, dann mit einer Lösung von 8 g NaOH in 50 g Wasser genau gegen Azolithmin neutralisiert.

Davon wurden je 20 cm³ für die Stickstoffbestimmung und die Formoltitrierung entnommen. Ebenso wurden 20 cm³ entsprechend ungefähr 0.2 g Gelatine in ein 50 cm³ Meßkölbchen gemessen und mit 0.5 g Dimethylsulfat + 5 cm³ 10% Natronlauge methyliert. Nach 20 Minuten wurde mit etwa 5 cm³ 10% HCl ganz schwach angesäuert zur Marke aufgefüllt, gemischt und 1 cm³ der Methylbestimmung zugeführt.

Säurehydrolyse der Gelatine.

Zeit in Stunden	% Formolstickstoff vom Gesamtstickstoff	CH ₃ -Gruppen auf je 100 Atome Gesamtstickstoff	$\frac{\text{N-Methylzahl}}{\text{Formolzahl}}$
0	4	15	3.7
1/2	21	37	1.8
1	36	61	1.7
2	45	75	1.7
4	55	106	1.9
8	68	119	1.8
16	75	132	1.8

Es ergibt sich aus dieser Zusammenstellung zunächst das Folgende:

1. Die Methylzahl steigt bei fortschreitender Hydrolyse an, wie dies von der Formolzahl bekannt ist.

2. Das Verhältnis von N-Methylzahl zu Formolzahl ist im nicht gespaltenen Proteinmolekül gleich 3.7. Dieses Verhältnis verschiebt sich schon nach 1/2 Stunde zugunsten des Formolstickstoffes und bleibt dann annähernd konstant.

3. Unter der Annahme, daß die meisten der methylierten Aminogruppen in Trimethylaminogruppen übergehen, verhält sich die Anzahl der formoltitrierbaren Stickstoffatome im ursprünglichen Gelatinemolekül zur Anzahl der methylierbaren

Stickstoffatome annähernd wie 1 : 1. Dieses Verhältnis verschiebt sich aber schon nach dem ersten Angriff auf das Molekül in der Art, daß annähernd auf je 2 formoltitrierbare Stickstoffatome 1 trimethyliertes entfällt. Es sei hier auf das nachdrücklichste darauf hingewiesen, daß diese Proportion nur approximative Werte anzeigt, denn es ist von vornherein anzunehmen, daß in einem so komplizierten Komplex, wie ihn das Eiweißmolekül darstellt, derartige grob eingreifende Reaktionen nicht ohne die Bildung von Nebenprodukten verlaufen werden.

Versuch über die tryptische Spaltung von Eiweißkörpern.

Zeigten schon die eben beschriebenen Versuche eine neue Möglichkeit, die Stickstoffatome des Eiweißmoleküls in verschiedenen reagierende Gruppen zu differenzieren, so drängt sich nun die Frage auf, ob bei der fermentativen Spaltung ähnliche Verhältnisse obwalten würden. Wird bei der tryptischen Verdauung die Lösung der Stickstoffverbindungen ebenfalls in dem Sinne erfolgen, daß sich das ursprüngliche Verhältnis von Formolstickstoff zu Methylstickstoff ändert und in welchem Sinne wird sich diese Proportion verschieben?

Für die nun zu bestimmenden Versuche diene ein Trypsinpräparat von Grübler-Leipzig.

1 g des betreffenden Eiweißkörpers wurde mit 0.5 g Natriumcarbonat und 0.1 g des Trypsinpulvers in 100 cm³ Wasser gelöst, mit einigen Tropfen Toluol versetzt und im Brutschrank bei 37° während der angegebenen Zeiten verdaut. Danach wurde das Gemisch genau neutralisiert und darin in je 20 cm³ der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl, der Formolstickstoff nach Sörensen bestimmt. Zu 10 cm³ wurden 5 cm³ 10% ige Natronlauge und 0.5 g Dimethylsulfat gegeben. Nach der Zersetzung desselben wurde mit 5 cm³ 10% iger Salzsäure neutralisiert bzw. schwach angesäuert, bis auf 50 cm³ aufgefüllt und in 1 cm³ dieser Lösung das Methyl am Stickstoff bestimmt.

Trypsinverdauung der Gelatine.

Zeit in Stunden	% Formol-Stickstoff vom Gesamtstickstoff	CH ₃ -Gruppen auf je 100 Atome Gesamtstickstoff	$\frac{\text{N-Methylzahl}}{\text{Formolzahl}}$
0	4	15	3.7
2	13	23	1.8
4	22	29	1.3
6	22	30	1.4

Diese Tabelle zeigt, daß also die Verhältnisse bei der Trypsinverdauung der Gelatine zu denselben Zuständen führen, wie die Säurehydrolyse.

Trypsinverdauung des Caseins.

Zeit in Stunden	% Formol-Stickstoff vom Gesamtstickstoff	CH ₃ -Gruppen auf je 100 Atome Gesamtstickstoff	$\frac{\text{N-Methylzahl}}{\text{Formolzahl}}$
0	5	17	3.4
1/2	35.4	31.8	0.9
1	41.6	37.5	0.9
8	54.4	45.7	0.84
16	59.9	51.8	0.86
72	66.0	54.6	0.83

Wieder verschiebt sich das Verhältnis in der ersten Etappe der Zersetzung zugunsten des Formolstickstoffes, um dann im Verlaufe der Reaktion konstant zu bleiben.

Trypsinverdauung von Clupeinsulfat.

Zeit in Stunden	% Formol-Stickstoff vom Gesamtstickstoff	CH ₃ -Gruppen auf je 100 Atome Gesamtstickstoff	$\frac{\text{N-Methylzahl}}{\text{Formolzahl}}$
0	0	24	∞
1/2	33	39	1.1
2	37	43	1.4

Die Proportion stimmt auffallend genau und zeigt ein um so mehr überraschendes Resultat, als sie nach unseren gegenwärtigen Anschauungen nicht zu deuten ist.

Im Anschluß daran sei noch auf die früher genannte Erscheinung verwiesen, daß das Esocin und Scombrin, welche nur ganz geringe Mengen von Formolstickstoff enthalten, keinen methylierbaren Stickstoff aufweisen.

Vergleicht man die experimentell erhärteten Tatsachen, so ergibt sich zunächst daraus, daß das Dimethylsulfat sich wesentlich anders verhält, als die von Skraup und Herzig und Landsteiner (l. c.) angewandten Methylierungsmittel und daß die Verhältnisse doch viel komplizierter liegen müssen, als bisher angenommen wurde. Wie ich schon weiter oben bemerkt habe, ergeben sich hier überraschende Übereinstimmungen bei den verschiedenartigsten Proteinen und auffallende Unterschiede bei ganz ähnlichen Eiweißkörpern.

Während die Methoden von Sørensen und van Slyke so ziemlich überall die gleiche Zahl von freien Amidogruppen ergeben, scheint hier zunächst gar keine Übereinstimmung mit diesen beiden Methoden zu bestehen.

Ich stelle in der folgenden Tabelle die N-Methylzahlen den Formolzahlen bzw. van Slyke-Zahlen einiger Proteine gegenüber¹⁾.

	% Formol N	N-Methylzahl
Gelatine	3·4	15
Casein	5·5	16
Edestin	3·3	15
Clupein	0·0	24
Salmin	0·0	9
Sturin	8·6	24
Esocin	0·0	0
Scombrin	0·0	0

¹⁾ Vgl. A. Kossel und N. Gawrilow, H.-S. Bd. 81, S. 278 (1912) und v. Slyke und Birchard, Journ. of Biol. Chem., 14. Bd., S. 538 (1914).

Es scheinen hier Beziehungen zu bestehen, auf deren Deutung ich aber noch nicht an dieser Stelle eingehen kann, da sie mit der Frage des Lysingehaltes zusammenhängen. Wie Skraup¹⁾, A. Kossel²⁾ und v. Slyke und Birchard³⁾ annehmen, scheinen lysinreiche Proteine auch eine größere Zahl freier Amidogruppen zu besitzen. Und es würde das bis zu einem gewissen Grade aus der vorstehenden Tabelle hervorgehen. Doch sind in dieser Richtung am hiesigen Institut Untersuchungen im Gange, deren Ergebnisse erst abgewartet werden müssen, um diese Erscheinungen aufzuklären.

Bei der Behandlung von Clupein mit Dimethylsulfat fand Rogozinski⁴⁾ eine Abnahme der absoluten Menge an Arginin. Diese Tatsache ist nach unseren Versuchen darauf zurückzuführen, daß das Silbersalz des methylierten Arginins bedeutend leichter löslich ist, als das der unveränderten Amidosäure.

Nach der bisherigen Anschauung galten Clupein, Salmin, Esocin und Scombrin, die alle, wie schon erwähnt wurde, dem Typus a_2m angehören, als nahe verwandt. Die Formoltitrierung ergibt unter diesen Proteinen keine oder nur ganz geringe Unterschiede; die N-Methylzahlen jedoch lassen bedeutende Verschiedenheiten hervortreten. Es können Clupein mit 24, Salmin mit 9 und Esocin und Scombrin mit je 0 einander gegenübergestellt werden. Und noch mehr: Während die lysinfreien Proteine der Clupeinreihe untereinander Verschiedenheiten erkennen lassen, verhalten sich Clupein und das lysinhaltige Sturin analog.

Es wäre verfrüht, aus dem bis jetzt vorliegenden Tatsachenmaterial weitgehende Schlüsse zu ziehen. Mit Sicherheit läßt sich jedoch aber sagen, daß es einerseits mit Hilfe der N-Methylzahl und ihrem Vergleiche mit allen anderen bis jetzt bekannten Ergebnissen

¹⁾ Monatshefte d. Chem. 27, 631, 653 (1906).

²⁾ A. Kossel und Gawrilow, Diese Zeitschr. Bd. 81, S. 274 (1912).

³⁾ v. Slyke und Birchard, l. c.

⁴⁾ Rogozinski: H. S. Bd. 80, S. 371 (1912).

ermöglicht wird, scheinbar ganz gleichartige Eiweißsubstanzen in exakter Weise voneinander zu unterscheiden; andererseits deutet die Methylsubstituierung des Stickstoffes auf eine Reihe von bevorzugten N-Atomen im Proteinmolekül hin, die sich den bisherigen Methoden entzogen haben.

Soweit nun die Versuche über Salzsäurehydrolyse und Fermentspaltung durchgeführt wurden, ist darüber das Folgende zu sagen:

Säurehydrolyse und Trypsinverdauung gehen scheinbar in analoger Weise vor sich. Das ursprüngliche Verhältnis von Formol- und N-Methylzahl wird schon in den ersten Stadien der Spaltung verändert, um dann für den ganzen weiteren Verlauf der Reaktion konstant zu bleiben. Alle drei der untersuchten Eiweißkörper, Gelatine, Casein und Clupein, verhielten sich darin gleichmäßig. Möglicherweise wird der hohe Gehalt an Glykokoll das Verhältnis bei der Gelatine (2 : 1) gegenüber dem Casein und Clupein (3 : 1) bewirken. Doch sehen wir auch in diesem Falle wieder Unterschiede hervortreten, die bei einer einfachen Bestimmung der Formolzahl nicht erkenntlich sind.

Die vorhin erwähnte Erscheinung der Veränderung des Verhältnisses von Formolzahl zur N-Methylzahl läßt einige Vermutungen zu, auf die ich zum Schluß noch hinweisen möchte.

Es scheinen im Eiweißmolekül bestimmte Bindungsverhältnisse zu existieren, die, wenn sie einmal gestört sind, zu einem sekundären Zustande führen, der während der ganzen Dauer der folgenden Aufspaltung konstant bleibt.

Es widerstrebt unseren gesamten Anschauungen, sich das Eiweißmolekül als eine lange peptidartige Kette vorzustellen. Denkt man sich dasselbe aber als ein System paralleler Komplexe, etwa nach Art der Struktur der Polynukleotide, so könnten vielleicht die oben genannten Erscheinungen dadurch einer zwanglosen Erklärung zugeführt werden.

Der erste Angriff wird vielleicht in einer Aufspaltung in Albumosen und Peptone bestehen und wäre der Wirkung der Nucleinacidasen gleich zu setzen, während die folgende Phase mit der Wirkung der Nucleotidase bzw. der Nucleosidase analog wäre.

Die Existenz von bestimmten Komplexen im Eiweißmolekül wie z. B. der von A. Kossel beschriebenen Protone, die bei niederem Molekulargewicht das gleiche Verhältnis der Bausteine besitzen, wie das ursprüngliche Molekül, kommt dieser Hypothese auch bis zu einem gewissen Grade entgegen.

Herrn Professor A. Kossel sage ich an dieser Stelle für die Überlassung verschiedener Präparate meinen besten Dank.

Diese Untersuchung wurde mit Unterstützung der Heidelberger Akademie der Wissenschaften ausgeführt und am 10. April eingereicht. Die Arbeiten werden fortgesetzt.
