

Mitteilungen aus dem Gebiete der Eiweißchemie.

II.

Über Jodglobin.

Von

Eduard Strauß und Rudolf Grützner.

(Aus dem biologischen Institut zu Frankfurt a. M.)

(Der Redaktion zugegangen am 17. November 1920.)

Das Hämoglobin, als ein durch seine Kristallisierbarkeit gut isolierbarer Eiweißkörper, wurde frühzeitig in den Kreis der Bearbeitung bei der Halogenierung der Proteine einbezogen. Zuerst haben Hopkins und Pinkus¹⁾ Brom auf Hämoglobin einwirken lassen. Eine Jodierung unternahm erstmalig Kurajeff²⁾ unter Anwendung der Methode von Blum und Vaubel; als Ausgangsmaterial diente ihm das kristallisierte Oxyhämoglobin des Pferdeblutes.

Unsere im folgenden zu beschreibenden Versuche haben wir, um zu übersichtlichen und einheitlichen Resultaten zu gelangen, an dem Proteinpaarling des Hämoglobinmoleküls, dem Globin selbst, vorgenommen, wobei für unsere Zwecke der hohe Gehalt des Globins an Histidin besonders förderlich erschien. Fr. Schulz³⁾ hat zuerst eine — später von A. Gamgee und A. Hill⁴⁾ verbesserte — Darstellungsmethode des Globins angegeben und die Eigenschaften dieses Proteins eingehend beschrieben. Weitere Untersuchungen von A. Kossel⁵⁾ haben

¹⁾ Berichte Bd. 31, S. 1311 (1898).

²⁾ Diese Zeitschr. Bd. 31, S. 527 (1900).

³⁾ Diese Zeitschr. Bd. 24, S. 449 (1898).

⁴⁾ Hofmeisters Beiträge Bd. 4, S. 1 (1904).

⁵⁾ Diese Zeitschr. Bd. 49, S. 314 (1906).

gezeigt, daß das Globin trotz seines basischen Charakters (Fällbarkeit durch Ammoniak) nicht zu den Histonen gehört, da es kein Histopecton bildet. Die Totalhydrolyse des Pferdeoxyhämoglobins hat E. Abderhalden¹⁾ ausgeführt; er fand für die uns hier besonders interessierenden Aminosäuren:

Histidin . . .	10,96 %
Tyrosin . . .	1,33 %
Phenylalanin . .	4,24 %
Tryptophan	vorhanden.

1. Darstellung des Globins.

Die ursprüngliche, wie auch die später verbesserte Methode zur Gewinnung des Ausgangsmaterials war, da größere Mengen beschafft werden mußten, zu umständlich und zu kostspielig. Wir haben deshalb eine einfachere und billigere Methode der Darstellung des Globins gesucht und sind nach mannigfachen Studien mit folgendem Verfahren zum Ziele gelangt:

Kleine Portionen des als trockenes braunes Pulver aus der Technik (Merck) bezogenen Hämoglobins — jeweils 5 g — werden mit 50 ccm einer 10%igen Essigsäure zu einem gleichmäßigen Brei angerieben, sodann werden 200 ccm Eisessig (96 % Ph. G. V.) zugefügt und die Flüssigkeit in ca. 2 l dest. Wasser eingetragen. Die klare, tiefbraune Lösung wird nun mit Tierkohle von bester Aktivität (in größeren Mengen) eine Stunde lang in der Schüttelmaschine geschüttelt, danach die Flüssigkeit mit etwas feuchter Papierwolle versetzt und auf einer mit Papierwolle gestopften Nutsche abgesaugt. Nach 2- bis 3maliger Wiederholung dieser Behandlung erhält man eine nur noch schwach gefärbte Lösung, aus der durch Ammoniakzusatz das Globin fast völlig weiß ausfällt. Das Protein wird auf dem Filter mit wenig Wasser (salzfreies Globin ist wasserlöslich!) gewaschen, in Wasser durch Zusatz von sehr wenig verdünnter Essigsäure gelöst und völlig salzfrei dialysiert. Die audialysierte Lösung kann sofort zur Jodierung benutzt werden; man kann aber auch hier noch eine letzte Reinigung durch

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 37. S. 484 (1903) und Bd. 51, S. 397 (1907).

Ausschütteln der (sauren) Lösung mit Alkoholäther, Ausfällen durch Ammoniak und Dialysieren einschalten. Bei unseren Versuchen wurde diese letzte Reinigung nicht notwendig; denn das durch die Essigsäure abgespaltene und mit Tierkohle mehrfach gereinigte Globin, das bei der Analyse für Stickstoff den Wert 16,5 % (Schulz 16,89 %) ergab, erwies sich spektroskopisch frei von Hämatin. Die Reaktion auf Tryptophan nach Ehrlich-Rhode, sowie die Diazoreaktion (in der Modifikation von Pauly) waren stark positiv. Wesentlich für das Gelingen unserer Darstellungsmethode — reines Material in guter Ausbeute — ist, daß man mit kleinen Portionen des Hämoglobins arbeitet, diese sehr gleichmäßig mit Essigsäure verreibt und beim Ausschütteln eine nicht zu kleine Menge Tierkohle von erprobter Entfärbekraft anwendet. Sollten übrigens Spuren von Hämatin noch beigemischt sein, so würden diese später, nach erfolgter Jodierung durch die Auskochung mit absolutem Alkohol bzw. Aceton, sicher beseitigt.

2. Jodierung des Globins.

Die Darstellung des Jodglobins A, d. h. des maximal sowohl am Kohlenstoffkern wie am Stickstoff jodierten Proteins, erfolgte nach der in der Mitteilung von F. Blum und E. Strauß¹⁾ angegebenen Weise, jedoch — mit Rücksicht auf die Tatsache, daß das Globin auf Zusatz von Bikarbonat aus der Lösung ausgeschieden wird — unter Hinzufügung von wenigen Kubikzentimeter verdünnter Natronlauge. Wir fügten zu 500 ccm einer 2 %igen Globinlösung 2 ccm n/10-Natronlauge, sodann 3—4 g Natriumbikarbonat (das Bikarbonat wurde stets vorher in Wasser gelöst und die Lösung mit CO₂ gesättigt). Die völlig klare, schwach gelbe Lösung wurde auf 38° erwärmt und eine 2n/Jodjodkalilösung portionenweise eingetragen. Der notwendig gewordene Zusatz von Natronlauge bedingt hier einen etwas größeren Verbrauch an Jod, als dies sonst der Fall ist. Das Jodierungsgemisch wurde zweimal 24 Stunden bei 38° gehalten und während dieser Zeit häufig durchgeschüttelt. Die Entfernung des Jodüberschusses durch

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 112, S. 111.

Thiosulfatlösung, die Ausfällung mit Essigsäure unter Na_2SO_4 -Zusatz, die Umfällung aus Natronlauge durch Essigsäure, sowie Auswaschen, Reinigen durch Auskochen mit Aceton (oder absolutem Alkohol) und Trocknen geschah in derselben Weise, wie dies für die anderen Jodproteine beschrieben ist. Das Jodglobin A ist ein hellgraues, staubfeines Pulver; es zeigt einen vollkommen negativen Ausfall der Reaktion nach Ehrlich-Rhode und negative Schwefelbleireaktion; die Diazoreaktion dagegen bleibt positiv, besitzt aber einen helleren Farbton als diejenige des genuinen Proteins. Zur Analyse wurde die Substanz bei 80° getrocknet. Sie war völlig aschefrei und ergab folgende Werte für die Elementarzusammensetzung:

a) CH-Bestimmung:

$$\begin{aligned} \text{Angew. } 0,1475 \text{ g} &= 0,2609 \text{ g CO}_2 = 48,24 \% \text{ C} \\ &0,0780 \text{ g H}_2\text{O} = 5,92 \% \text{ H} \end{aligned}$$

b) N-Bestimmungen (Kjeldahl):

1.	Angew. 0,1511 g n/10-Säure :	16,0 ccm	= 14,8 % N
"	0,1525 " " "	16,1 " "	= 14,7 % N
2.	" 0,1216 " " "	12,8 " "	= 14,7 % N
3.	" 0,1736 " " "	18,5 " "	= 14,93 % N
Durchschnitt:			14,78 % N.

c) S-Bestimmung (Carius):

$$\text{Angew. } 0,1770 \text{ g BaSO}_4 = 0,0040 = 0,31 \% \text{ S}$$

d) Jodbestimmungen (Blum-Grützner):

1.	Angew. 0,1236 g titr. Thios. (f = 1,88)	= 7,5 ccm = 14,1 mg J
		= 11,4 % J
2.	" 0,1616 " " " (f = 1,88)	= 9,8 ccm = 18,424 mg J
		= 11,4 % J.

$$\text{A-Zahl} = 11,4.$$

Rechnet man unsere Analysenwerte auf jodfrei um, so ergibt sich für

$$\begin{aligned} \text{C} &= 54,4 \% \text{ (genuin } 54,97 \% \text{)} \\ \text{N} &= 16,6 \% \text{ (" } 16,89 \% \text{)} \\ \text{S} &= 0,35 \% \text{ (" } 0,42 \% \text{)}. \end{aligned}$$

Kurajeff hat zwar nach der Methode von Blum und Vaubel jodiert, daneben aber auch Jodjodkali mit einem Zusatz von jodsaurem Kali zwecks Zerstörung der gebildeten Jodwasserstoffsäure angewandt. Seine Jodwerte — im Mittel 12,37 — 11,18 — 11,02 — sind mit den unsrigen gut ver-

gleichbar. Im Gegensatz zu seinem Befund ist unser Jodglobin A in verdünntem Alkali leicht löslich.

Ein Vergleich der Resultate ist durchführbar, weil Kurajeff nicht Jodierungsprodukte des ganzen Oxyhämoglobinkomplexes, sondern auf Grund seiner Reinigungsmethode nur solche des Globins erhalten hat. Seine Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffwerte liegen von den unsrigen nicht sehr weit ab; er findet im Durchschnitt für sein (nicht mit Alkali behandeltes) Präparat 3:

C = 48,48 %	
H = 6,04 %	
N = 14,81 %	
S = 0,49 %	
J = 11,02 %	Fe = 0,31 %.

Es ist Kurajeff mit Recht aufgefallen, daß das C : N-Verhältnis seiner Präparate (3,819 — 3,813 — 3,833) demjenigen für reines Globin (Schulz) = 3,797 bedeutend näher steht als dem für Oxyhämoglobin = 3,673. Für unser Jodglobin A errechnet sich dieses Verhältnis zu 3,829 bzw. (für unseren höchsten N-Wert = 14,93) zu 3,757, welches letzteres sehr gut mit dem genuinen Werte übereinstimmt. Wir halten die Annahme für berechtigt, daß Kurajeffs Jodhämoglobin ein (wegen seines Fe-Gehaltes) noch nicht völlig einheitliches Jodglobin A darstellt.

3. Die Reduktion des Jodglobins A.

Die Gewinnung eines von N-Jod befreiten Jodglobins B erfolgte in der Weise, wie sie von Blum und Strauß beschrieben ist. An dieser Substanz wurde zuerst die Methodik der SO₂-Einwirkung studiert und die Bildung einer B-Substanz beobachtet. Das Jodglobin B wurde in der gleichen Qualität sowohl durch Umfällen aus Natronlauge, wie aus Ammoniak mittels schwefliger Säure in verdünnter Lösung, wie auch mit Natriumbisulfitlauge und Schwefelsäure (1 : 4) erhalten. Reinigung nach mehrfacher Umfällung aus Lauge mit verdünnter Essigsäure und Trocknung erfolgten ebenso wie beim Jodglobin A. Die beiden Substanzen gleichen sich äußerlich vollkommen; die Diazoreaktion der B-Substanz fällt intensiver

rot aus als die der A-Substanz. Die Analysen des Jodglobins B ergaben:

a) N-Bestimmungen:

- | | | |
|----|-------------|--|
| 1. | (Kjeldahl): | Angew. 0,3015 g = 34,1 ccm n/10-Säure = 15,8 % N |
| | | 0,3073 g = 34,3 ccm " = 15,7 % N |
| 2. | " " | 0,1945 g = 21,7 ccm " = 15,62% N |
| | | 0,1877 g = 21,2 ccm " = 15,8 % N |
| 3. | " " | 0,2365 g = 26,7 ccm " = 15,8 % N |
| | | 0,2842 g = 31,6 ccm " = 15,5 % N |
| 4. | (Dumas): | Angew. 0,1494 g = 20,65 ccm N (b = 750 mm, t = 18,5) |
| | | = 15,64% |

Durchschnitt: 15,69% N.

b) S-Bestimmung (Carius):

Angew. 0,1992 g = BaSO₄ 0,0089 g = 0,61% S.

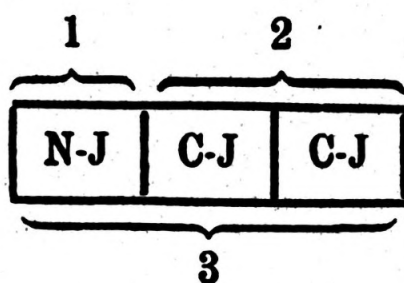
c) Jodbestimmungen:

- | | | |
|----|------------------------------|------------------------------------|
| 1. | Angew. 0,1660 g titr. Thios. | (f = 2,01) = 6,1 ccm = 12,26 mg J |
| | | = 7,3% J. |
| 2. | " 0,2965 g " " | (f = 2,01) = 11,6 ccm = 23,31 mg J |
| | | = 7,7% J. |
| | 0,2618 g " " | (f = 2,01) = 10,2 ccm = 20,49 mg J |
| | | = 7,8% J. |
| 3. | " 0,1818 g " " | (f = 2,05) = 6,7 ccm = 13,73 mg J |
| | | = 7,5% J. |
| | 0,2056 g " " | (f = 2,05) = 7,7 ccm = 15,78 mg J |
| | | = 7,6% J. |
| 4. | " 0,3950 g " " | (f = 1,65) = 18,3 ccm = 30,19 mg J |
| | | = 7,64% J. |
| | 0,3344 g " " | (f = 1,65) = 15,9 ccm = 26,23 mg J |
| | | = 7,7% J. |
| 5. | " 0,1779 g " " | (f = 2,06) = 6,6 ccm = 13,59 mg J |
| | | = 7,6% J. |
| | 0,2786 g " " | (f = 2,06) = 10,2 ccm = 20,9 mg J |
| | | = 7,5% J. |
| 6. | " 0,2678 g " " | (f = 2,08) = 9,8 ccm = 20,38 mg J |
| | | = 7,61% J. |
| | 0,2195 g " " | (f = 2,08) = 8,1 ccm = 16,848 mg J |
| | | = 7,7% J. |

Durchschnitt: 7,6% Jod (B-Zahl).

Rechnet man unsern N-Wert für B auf jodfrei um, so ergibt sich N = 16,98% (genuin 16,89%). Das Verhältnis der beiden Jodzahlen A und B ist genau gleich 3:2, d. h. es befinden sich 2 Atome Jod am Kohlenstoffkern und 1 Atom

am Stickstoff. Das schematische Strukturbild stellt sich (vgl. dazu die Mitteilung von Blum und Strauß) wie folgt dar:



Die Mindestmolekulargröße des Jodglobins berechnet sich unter der Annahme, daß einem Jodatome ein Prozentgehalt von 3,8 entspricht, auf 3340, woraus sich für das genuine Globin 3214 ergibt.

4. Die Restitution von Jodglobin A aus Jodglobin B.

Es lag uns daran zu zeigen, daß mit der Reduktion durch SO_2 eine tiefgreifende Veränderung des Proteinmoleküls nicht verbunden ist. Ist dem in der Tat so, dann muß es möglich sein, durch einfache erneute Jodierung der B-Substanz in bikarbonatalkalischer Lösung die A-Substanz mit ihrer charakteristischen Jodzahl (N-Jod!) wieder zu erhalten, während jede Spaltung durch eine Veränderung dieser Zahl angezeigt werden müßte. Zwei dahingehende Versuche ergaben folgende Werte für Jod:

1.	Angew. 0,0951 g titr. Thios.	(f = 2,01) = 5,4 ccm = 10,85 mg J
		= 11,4% J.
	0,1588 g „ „	(f = 2,01) = 9,1 ccm = 18,29 mg J
		= 11,5% J.
2.	0,1815 g „ „	(f = 2,08) = 9,8 ccm = 20,38 mg J
		= 11,23% J.
	0,1701 g „ „	(f = 2,08) = 9,3 ccm = 19,34 mg J
		= 11,3% J.

Der Durchschnitt dieser Zahlen = 11,36% Jod entspricht weitgehend genau dem ursprünglichen Werte für Jodglobin A (11,4%).

5. Das Verhalten der beiden Jodglobine gegen Pepsinsalzsäure.

Wir haben die beiden Jodglobine auf ihr Verhalten gegen Pepsinsalzsäure in der Weise geprüft, wie dies für die anderen von uns untersuchten Jodproteine in der vorangehenden Mit-

teilung von Blum und Strauß angegeben ist. Beim Jodglobin A wurde weitgehende Hemmung, beim Jodglobin B Sperrung nach Erhitzen in wäßriger Suspension beobachtet, wie im einzelnen aus den mitzuteilenden Versuchsprotokollen hervorgeht.

I.

Nr.	Substanz (A)	Dauer in Stunden	Resultat	Bemerkungen
1	11,4% J	5	ungelöst	Substanz feucht
2	10,7% J	36	teilw. gelöst	Jodabspaltung Substanz feucht
3	11,5% J	5	ungelöst	Substanz trocken
4	11,0% J	7	"	" "
5	11,4% J	24	"	" "
6	11,4% J	5	"	" "

Dieser Versuch wurde mehrfach mit reinsten Substanzen wiederholt und ergab stets das gleiche Resultat.

II.

Nr.	Substanz (B) nicht erhitzt	Dauer in Stunden	Resultat	Bemerkungen
1	7,1% J	5	gelöst	Substanz trocken
2	7,0% J	5	"	+ 1 ccm physiol. Na Cl-Lösung
3	7,6% J	5	"	+ 1 ccm physiol. Na Cl-Lösung
4	7,6% J	5	"	+ 1 ccm physiol. Na Cl-Lösung

III.

Nr.	Substanz (B) erhitzt	Dauer in Stunden	Resultat	In Wasser erhitzt
1	7,08% J	4	ungelöst	5 Std. 70°
2	7,0% J	5	"	1 Tag 60°
3	7,1% J	7	"	7 Std. 65°
4	7,6% J	12	"	6 " 70°
5	7,6% J	23	"	6 " 70°
6	7,6% J	5	"	7 " 70°
7	7,6% J	5	"	5 " 70°

Wir beobachteten beim Erhitzen eine, wenn auch sehr geringfügige, Abnahme des Jodgehalts unserer Substanzen. Die Zahl 7,5% ging bis auf 7,1% zurück. Die durch Erhitzen gegen Pepsinsalzsäure gesperrten Substanzen zeigten nach Umfällung aus Sodalösung wieder ihre ursprüngliche Peptonisierbarkeit. Wir geben ferner einen Versuch wieder, der zeigt, daß die Hemmung auch bei solchen Substanzen eintritt, die aus der B-Substanz durch Wiederhochjodieren (Restitution) gewonnen worden sind.

a) Jodglobin B (7,7%) rejodiert auf A (11,4%).

Mit Pepsinsalzsäure nach 2 $\frac{1}{2}$ Stunden: ungelöst.

"	3 $\frac{1}{2}$	"	:	"
"	6	"	:	"
"	16	"	:	"
"	19	"	:	geringe Lösung.

b) Jodglobin B (7,6%) rejodiert auf A (11,5%).

Substanz feucht mit Pepsinsalzsäure nach 10 Stunden ungelöst.

"	14	"	"
"	40	"	teilweise gelöst unter Jodabspaltung.

Digerierten wir Jodglobin B (7,6%) 14 Stunden lang bei 38° mit 0,3% iger Salzsäure allein, so trat eine emulsionsartige Lösung der (basischen) Substanz auf, die jedoch auf Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung sofort total ausflockte; die Lösung durch Pepsinsalzsäure wurde durch Kochsalzzusatz in keiner Weise gehemmt. Kontrollversuche zeigten, daß das Kochen mit Alkohol oder Aceton allein die Hitze-sperrung nicht hervorzubringen vermag. Zur weiteren Kontrolle wurde reinstes Globin in ausdialysierter Lösung 7 Stunden auf 70° erhitzt, wobei leichte Trübung auftrat, sodann durch Eingießen in absoluten Alkohol gefällt, mit absolutem Alkohol $\frac{1}{2}$ Stunde gekocht und nach Waschen mit Äther getrocknet. Diese Substanz war nach 1stündiger Digestion mit Pepsinsalzsäure glatt gelöst; die Lösung gab auf Ammoniakzusatz keine Fällung.