

293. Emil Abderhalden und Jolan Heumann: Studien über das physikalisch-chemische Verhalten von aus Glykokoll aufgebauten Polypeptiden.

[Aus dem Physiol. Institut der Universität Halle a. S.]

[Ausgeführt mit Mitteln der Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften.]

(Eingegangen am 19. Juni 1930.)

Es sind im hiesigen Institut Untersuchungen im Gange, die zum Ziele haben, festzustellen, wann und unter welchen Umständen bei Polypeptiden sich Eigenschaften zeigen, die dem kolloiden Zustand eigen sind. Als erster Beitrag zu diesem Problem sei über Untersuchungen an Polypeptiden berichtet, an deren Aufbau ausschließlich der Baustein Glykokoll beteiligt ist. Bei ihrer Gewinnung folgten wir der bekannten Methode von Emil Fischer, d. h. es wurde die Verlängerung der Glycin-Kette durch deren Kupplung mit Chlor-acetylchlorid und nachfolgender Aminierung des gewonnenen Halogenacylkörpers dargestellt. Wir verzichteten absichtlich auf den Versuch, durch Kondensation von Polypeptid-estern rasch zu höhermolekularen Produkten zu gelangen, weil es uns darauf ankam, über die Konstitution jeder einzelnen Verbindung eindeutig unterrichtet zu sein. Wir untersuchten, vom Dipeptid Glycyl-glycin ausgehend, alle einzelnen Glycin-Ketten bis zum Dekapeptid hinauf¹⁾.

Wir wählten als erstes Beispiel Polypeptide, an deren Aufbau ausschließlich Glykokoll beteiligt ist, weil schon vor Jahren im hiesigen Institut beobachtet worden ist, daß Glykokoll und seine Derivate besonders stark zu Assoziationen neigen. Es steht diese Beobachtung im besten Einklang mit den kürzlich von Frankel²⁾ mitgeteilten Befunden. Es war zu erwarten, daß mit Verlängerung der Glycin-Kette die vorhandenen Restvalenzen sich in immer größerem Ausmaße auswirken werden, und zwar in Gestalt der Vereinigung von Molekülen zu größeren Aggregaten (Micellen). Mit der Länge der Glycin-Kette nimmt deren Schwerlöslichkeit in Wasser zu. Es wird dadurch der kolloide Zustand begünstigt. Schon das Heptapeptid war in Wasser in einer außerordentlich feinen Suspension vorhanden, deren Teilchen sich erst nach einigen Stunden absetzten. Es war noch möglich, die Suspension abzufiltrieren. Okta-, Nona- und Dekapeptid bildeten mit dem Dispersionsmittel Wasser beständige Hydrosole, deren Teilchen durch gewöhnliches Filtrierpapier hindurchgingen. Bei der Dialyse durch eine Pergament-Membran gegen Wasser gingen nur sehr geringe Mengen an Substanz durch jene hindurch. Sie waren so gering, daß es einer sehr starken Konzentration der Außenflüssigkeit bedurfte, um sie mittels der Ninhydrin-Reaktion zu erkennen.

Die Länge der Dekapeptid-Kette berechnet sich nach der Theorie³⁾ durch die Summierung der Durchmesser ihrer Kohlenstoff- und Wasserstoffatome etwa zu 44 Ångström, d. h. zu 4.4 $\mu\mu$. Es müßten somit die einzelnen Molekülteilchen des Nonaglycyl-glycins in einem Hydrosol als Amikro-

¹⁾ Vergl. die Darstellung und die Eigenschaften der einzelnen Verbindungen bei Emil Abderhalden u. J. Heumann, *Fermentforschung* **12** [1930].

²⁾ *Biochem. Ztschr.* **217**, 378 [1930].

³⁾ K. H. Meyer, *Biochem. Ztschr.* **208**, 1 [1929].

nen vorhanden sein. Die ultramikroskopische Untersuchung der kolloiden Lösungen des Okta-, Nona- und Dekapeptides erbrachten den Beweis für die Assoziationstendenz der Glycin-Ketten: die Teilchen waren als Submikronen vorhanden⁴⁾. Ihre Größe wurde durch die ultramikroskopische Teilchenzählung ermittelt. Ein Hydrosol des Oktaglycyl-glycins (0.0002%) hatte in dem ultramikroskopischen Auszählungsraum von $4232 \mu^3$ 1.8 Teilchen. Das spezifische Gewicht des Polypeptids wurde nach der Schwebemethode zu 1.5 ermittelt. Die Teilchengröße berechnet sich zu $146 \mu\mu$.

Die ultramikroskopische Sichtbarkeit der Teilchen des Hydrosols des Oktaglycyl-glycins ermöglichte auch eine direkte Beobachtung der Bewegung der Teilchen im elektrischen Feld. Die Überführungsversuche mittels analytischer Bestimmung der Zu- bzw. Abnahme an Polypeptid-Gehalt im Elektroderraum stießen wegen der sehr geringen spezifischen Leitfähigkeit des Hydrosols auf Schwierigkeiten. Sie lag im Gebiet $9 \times 10^{-6} - 10^{-5}$ (in reziproken Ohm gemessen). Zur Überführung wäre infolgedessen eine längere Stromdurchleitung erforderlich gewesen. Die sich dabei bildenden Produkte der Elektrolyse hätten höchstwahrscheinlich zu Störungen geführt. Es ließ sich die Wanderungsrichtung der Polypeptid-Teilchen im elektrischen Feld mittels einer einfachen Versuchsanordnung ultramikroskopisch beobachten. Die Teilchen zeigten eine kathodische Wanderung. Durch Umpolung der Elektroden wurde die Wanderungsrichtung der Teilchen entsprechend verändert. Es sind somit die Polypeptid-Teilchen als positiv geladen anzusehen. Der geringe Aschengehalt des Polypeptids (1.4%) kann die erwähnte Ladung nicht vorgetäuscht haben, weil die in so geringer Konzentration anwesenden Mineralstoffe noch keine Umladung bewirken können⁵⁾. Für die den Polypeptid-Teilchen zukommende positive Ladung spricht auch die schwach saure Reaktion des Hydrosols. Das p_H wurde zu 6.6 ermittelt. Die mitgeteilten Befunde zeigen, daß Verbindungen mit relativ kleinen Molekulargewichten — 474, 531 und 588 — unter Bedingungen im kolloiden Zustand auftreten können, unter denen Polypeptide, die andere Bausteine enthalten, diesen noch nicht aufweisen.

Es erschien uns von ganz besonderem Interesse, an Hand von Molekulargewichts-Bestimmungen zu prüfen, ob die festgestellte Assoziationstendenz der höhermolekularen Polypeptide feststellbar ist. Es ist immer noch nicht eindeutig entschieden, wie die für Eiweißstoffe ermittelten Molekulargewichte zu bewerten sind. Stellt man sich auf den Standpunkt, daß Proteine aus Polypeptid-Ketten bestehen, die mittels Nebervalenzen zu größeren Komplexen (Micellen) vereinigt sind, dann wird man die in der Literatur mitgeteilten Molekulargewichte anders auffassen, als wenn man der Ansicht zuneigt, daß einheitliche, für sich bestehende Moleküle vorliegen. Es wäre von allergrößtem Interesse, bei den Glycin-Ketten, bei denen die Assoziationstendenz so klar zu Tage liegt, nach dem Verfahren von Svedberg die Molekulargröße festzustellen. Wir mußten uns aus Mangel an entsprechenden Einrichtungen mit Versuchen begnügen, die Größe der

⁴⁾ Es sei auch an dieser Stelle Hrn. Dr. Schneck herzlich für die Erlaubnis gedankt, das im Molkerei-Laboratorium des Landwirtschaftlichen Instituts befindliche Ultramikroskop verwenden zu dürfen. ⁵⁾ Pauli, Biochem. Ztschr. **213**, 95 [1929].

Molekulargewichte in der üblichen Weise zu bestimmen. Wir stießen dabei auf große Schwierigkeiten, weil die in Frage kommenden Produkte in Wasser so gut wie unlöslich sind. Es mußte deshalb zunächst ein geeignetes Lösungsmittel ausfindig gemacht werden. Es hat nun Herzog⁶⁾ Resorcin bei der Feststellung des Molekulargewichts des Seidenfibroins angewandt, nachdem er für Glykokoll und Glycyl-glycin unter den gleichen Bedingungen gute Resultate erhalten hatte. Wir benützten ebenfalls Resorcin. Es zeigte sich jedoch, daß bei Gefrierpunkts-Bestimmungen im luftgefüllten Gefriergefäß keine Konstanz bei Anwendung von Resorcin allein erhalten werden konnte. Wir beobachteten vielmehr ein dauerndes Sinken des Erstarrungspunktes. Es ist diese Erscheinung höchstwahrscheinlich auf die oxydierende Einwirkung der Luft auf das Resorcin zurückzuführen. Wir schlossen deshalb Sauerstoff aus und verwandten zu diesem Zwecke Stickstoff. Es gelang jetzt ohne weiteres, bei Anwendung eines trockenen Stickstoff-Stromes den Erstarrungspunkt des Resorcins allein konstant zu erhalten. Das gleiche war mit Lösungen von Polypeptiden und Resorcin der Fall. Nun waren jedoch die von uns verwendeten Glycin-Ketten in der Nähe des Schmelzpunktes des Resorcins nicht löslich. Es verging nahezu $\frac{1}{2}$ Stde., bis sie bei höheren Temperaturen (120—130°) in Lösung gingen. Dabei traten Veränderungen in der Struktur der Polypeptide ein (Anhydridbildung und zum Teil Aufspaltung). Die Molekulargewichts-Bestimmungen ergaben für Glycin und die untersuchten Glycin-Ketten die folgende Werte:

Glykokoll: 0.1085 g Sbst., 9.1680 g Resorcin; Depression: 0.97°.

Mol.-Gew. ber. 75.05, gef. 79.3.

Diglycyl-glycin. 0.1511 g Sbst., 9.31 g Resorcin; Depression: 0.857°.

Mol.-Gew. ber. 189, gef. 120.

Pentaglycyl-glycin. 0.0297 g Sbst., 8.5890 g Resorcin; Depression: 0.059°.

Mol.-Gew. ber. 360, gef. 236.

Oktaglycyl-glycin.

a) 0.04374 g Sbst., 7.248 g Resorcin; Depression: 0.085°, b) 0.02109 g Sbst., 9.939 g Resorcin; Depression: 0.03°, c) 0.02109 g Sbst., 9.939 g Resorcin; Depression bei längerem Erhitzen, etwa $\frac{3}{4}$ Stde.: 0.045°.

Mol.-Gew. ber. 531, gef. a) 461, b) 459, c) 306.5.

Aus diesen Befunden ergibt sich, daß Molekulargewichts-Bestimmungen unter Anwendung von Resorcin bei Polypeptiden, die ausschließlich aus Glykokoll bestehen, zu viel zu niedrigen Werten führen.

Wir haben weiterhin Molekulargewichts-Bestimmungen unter Verwendung von Resorcin und der kryoskopischen Methode mit einer Reihe von Polypeptiden durchgeführt, in denen zum Teil Glykokoll als einzelner Baustein zugegen war, zum Teil benützten wir Verbindungen, in denen die genannte Aminosäure ganz fehlte. Wie die unten mitgeteilten Ergebnisse zeigen, erhielten wir bei Verwendung von solchen Polypeptiden, die in Resorcin leicht in Lösung gingen, gute Werte. War jedoch die Löslichkeit gering, dann erfolgte mit der Dauer des Erwärmens mit Resorcin eine mehr oder weniger weitgehende Veränderung des Substrates. So ergab z. B. das schwerlösliche *d, l*-Norvalyl-glycyl-*d, l*-norvalin einen zu kleinen Wert für dessen Molekulargewicht, während wir beim leichtlöslichen Glycyl-*d, l*-norvalyl-*d, l*-norvalin zum richtigen Wert gelangten. Aber auch bei

⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. 134, 296 [1924].

solchen Polypeptiden, die sich in Resorcin relativ gut lösten, und an deren Aufbau Glycin beteiligt war, erhielten wir zum Teil zu geringe Werte für das Molekulargewicht.

Wir haben schließlich noch das Molekulargewicht von Seidenfibroin unter Anwendung von Resorcin zu ermitteln versucht. Obwohl wir einen Wert erhielten, der weit über dem von R. O. Herzog festgestellten liegt — 811.4, während R. O. Herzog das Molekulargewicht des Seidenfibroins zu 200 bzw. 350—370 feststellte — zweifeln wir nicht daran, daß er viel zu klein ausgefallen ist. Es hatte ohne jeden Zweifel eine tiefgehende Veränderung des Proteinoides bei seiner Auflösung in Resorcin stattgefunden. Es kommt nach den vorliegenden Erfahrungen kryoskopischen Molekulargewichts-Bestimmungen unter Anwendung von Resorcin selbst dann, wenn Oxydationsvorgänge ausgeschaltet werden, keine Bedeutung zu, soweit es sich um Substrate handelt, die leicht veränderbar sind, und deren Lösungsvermögen im genannten Lösungsmittel gering ist.

d, l-Alanyl-*d, l*-alanin. 0.05423 g Stbst., 4.3996 g Resorcin; Depression: 0.455°. Mol.-Gew. ber. 160, gef. 176.1.

d, l-Norvalyl-*d, l*-alanin. 0.1035 g Stbst., 9.2880 g Resorcin; Depression: 0.39°. Mol.-Gew. ber. 188, gef. 185.7.

Glycyl-*d, l*-norvalin. 0.0720 g Stbst., 7.2884 g Resorcin; Depression: 0.315°. Mol.-Gew. ber. 174, gef. 203.8.

d, l-Norvalyl-glycyl-*d, l*-norvalin. 0.0917 g Stbst., 7.0673 g Resorcin; Depression: 0.42°. Mol.-Gew. ber. 273, gef. 200.8.

Glycyl-*d, l*-norvalyl-*d, l*-norvalin. 0.1039 g Stbst., 6.8117 g Resorcin; Depression: 0.365°. Mol.-Gew. ber. 273, gef. 271.7.

d-Alanyl-*l*-leucyl-*d*-valin. 0.0644 g Stbst., 7.9623 g Resorcin; Depression: 0.19°; bei weiterem Erwärmen Depression: 0.24°. Mol.-Gew. ber. 301, gef. 276.7, bzw. 219.1.

d, l-Alanyl-*d, l*-alanyl-*d, l*-valin. 0.0457 g Stbst., 9.1735 g Resorcin; Depression: 0.178°. Mol.-Gew. ber. 259, gef. 181.9.

Seidenfibroin⁷⁾. Etwa 45 Min. bei 150° erwärmt, in Lösung gebracht. 0.1156 g Stbst., 7.7174 g Resorcin; Depression: 0.120°. Mol.-Gew. gef. 811.4.

Anschließend sei noch über Versuche berichtet, die der eine von uns (A.) gemeinsam mit Hans Brockmann über kryoskopische Molekular-Gewichts-Bestimmungen von Polypeptiden unter Verwendung von Benzoesäure

⁷⁾ Das Seidenfibroin, das durch Entleimung der Rohseide nach der Methode von E. Fischer hergestellt war, wurde in Lithiumbromid-Lösung dispergiert und dialysiert, bis im Außenwasser kein Brom-Ion mehr nachzuweisen war. Dann wurde zur Trockne verdampft und der Trockenrückstand nach Pulverisieren 2 Tage im Vakuum bei 120° über P₂O₅ getrocknet. Vergl. hierzu Emil Abderhalden u. H. Brockmann, Biochem. Ztschr. 211, 402 [1929].

ausgeführt hat. Zunächst sei die Löslichkeit der geprüften Polypeptide in Benzoesäure bei 130—135° mitgeteilt. Als löslich sind solche Substrate bezeichnet, die sich beim Eintragen in die Benzoesäure sofort lösten, als schwer löslich solche, die erst nach längerem Erhitzen unter Braunfärbung in Lösung gingen.

Löslich:

d, l-Leucyl-*d, l*-aminoheptylsäure
d, l-Norleucyl-*d, l*-leucin-glycin
d, l-Leucyl-*d, l*-isoserin
d, l-Leucyl-*d, l*-serin
l-Leucyl-glycyl-*d*-alanin
 Glycyl-*l*-tyrosin
d, l-Leucyl-*d, l*-norleucin
l-Leucyl-glycyl-*d*-alanin
d-Alanyl-*l*-leucyl-glycyl-*d*-alanin
 Glycyl-*d*-alanyl-*l*-leucyl-glycyl-*d*-alanin

Schwerlöslich:

Glycyl-glycin
 Diglycyl-glycin
 Triglycyl-glycin
d, l-Leucyl-glycin
 Glycyl-*d, l*-alanin
d, l-Aminobutyryl-glycin
 Glycyl-*d, l*-leucyl-glycin

Molekulargewichts-Bestimmungen in Benzoesäure. $K = 78.5$.

d, l-Leucyl-*d, l*-aminoheptylsäure. 93.5 mg Sbst. in 10 g Benzoesäure gelöst; Gefrierpunkts-Erniedrigung: 0.306°.

Mol.-Gew. ber. 260.21, gef. 240.

Di-*d, l*-alanyl-cystin. 179.8 mg Sbst. in 10 g Benzoesäure gelöst; Gefrierpunkts-Erniedrigung: 0.475°.

Mol.-Gew. ber. 382.33, gef. 310.

d, l-Leucyl-*d, l*-norleucin. 124.9, 154.6 mg Sbst. in 10 g Benzoesäure gelöst; Gefrierpunkts-Erniedrigung: 0.425°, 0.520°.

Mol.-Gew. ber. 244.20, gef. 230, 234.

Bei den untersuchten Polypeptiden wurde der Gefrierpunkt der Lösung erst nach mehrfachem Schmelzen und Erstarren konstant. Er stieg zunächst an und wurde schließlich konstant. Die Differenz zwischen dem Schmelzpunkt der reinen Benzoesäure und dem konstanten Schmelzpunkt der Lösung wurde als Depression in Rechnung gesetzt. Bei der *d, l*-Leucyl-*d, l*-amino-heptylsäure blieb der Schmelzpunkt der Lösung auch nach 1-stdg. Erwärmen auf 140° konstant, so daß hier also keine Aufspaltung durch Benzoesäure stattfand.

Glycyl-*d, l*-aminobutyryl-*d, l*-aminobuttersäure. 122.8 mg Sbst. in 10 g Benzoesäure gelöst; Depression: 0.633°.

Der Gefrierpunkt der Lösung sank bei wiederholtem Schmelzen und Erstarren zu einem konstanten Wert, aus dem die Depression berechnet wurde.

Mol.-Gew. ber. 245.19, gef. 152.

Wurde die Konstanz des Gefrierpunkts nicht abgewartet, sondern der erste Wert nach der Auflösung in Rechnung gesetzt, so ergaben sich bessere Werte. Längeres Erhitzen mit Benzoesäure bewirkt zweifellos eine Aufspaltung glycin-haltiger Polypeptide.

126 mg Sbst. in 10 g Benzoesäure gelöst; Depression: 0.510°.

Mol.-Gew. ber. 245.19, gef. 194.

Schließlich sei noch erwähnt, daß wir mit dem Nonaglycyl-glycin Anaphylaxie-Versuche durchgeführt haben. Diese Versuche gestalteten sich insofern schwierig, als das Polypeptid nur in Gestalt einer sehr feinen Suspension verabreicht werden konnte. Seine Lösung in Lithiumbromid-Lösung wirkte giftig. Wir spritzten 20 mg intraperitoneal Meerschweinchen

ein und wiederholten die parenterale Zufuhr nach 21 Tagen. Die zuerst gespritzten, ca. 200 g schweren Tiere gingen nach 14–18 Tagen unter eigenartigen Erscheinungen ein. Das Fell wurde struppig¹⁾. Die Tiere waren sehr unruhig. Die zweite Reihe von Tieren (250–300 g schwer) vertrugen die peritoneale Zufuhr des Dekapeptids besser. Bei der Reinjektion zeigten sich keine Erscheinungen des anaphylaktischen Schockes.

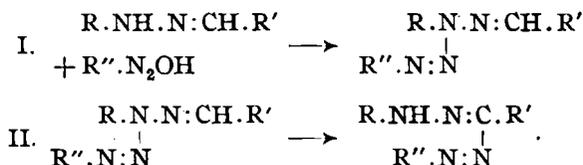
Im hiesigen Institut sind weitere Versuche mit langen Polypeptid-Ketten im Gang, an deren Bau teils gleiche, teils verschiedene Aminosäuren beteiligt sind.

294. M. Busch und Richard Schmidt: Über den Reaktionsmechanismus der Formazyl-Bildung (II.).

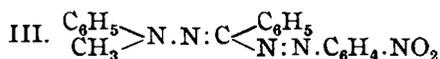
[Aus d. Institut für angew. Chemie d. Univers. Erlangen.]

(Eingegangen am 30. Juni 1930.)

H. v. Pechmann¹⁾ hat bereits die Beobachtung gemacht, daß Aldehydhydrazone von sekundären Hydrazinen mit Diazoniumsalzen keine Formazyl-Verbindungen liefern, ohne eine Erklärung für dieses anomale Verhalten der genannten Hydrazone geben zu können. Busch und Pfeiffer²⁾ haben dann gezeigt, daß bei der fraglichen Formazyl-Synthese die Diazoniumverbindung primär an der Iminogruppe des Hydrazons angreift und die hierbei entstehenden Diazohydrazide sich in die beständige Formazyl-Form umlagern, der Prozeß sich also in den beiden folgenden Phasen abspielt:



In einer Abhandlung „über die Zusammensetzung der Isodiazohydroxyde“³⁾ berichtet nun Bamberger, wie wir nachträglich fanden, daß freies *p*-Nitroisodiazobenzolhydroxyd sich mit Benzal-methyl-phenyl-hydrason zur entsprechenden Formazyl-Verbindung



vereinige. Die Reaktion vollziehe sich mit auffallender Langsamkeit und vielleicht aus diesem Grund nur in untergeordnetem Betrage; denn das schnell veränderliche Nitro-isodiazobenzol werde bereits größtenteils der Zersetzung erlegen sein, bevor die Wirkung des Hydrazons beendigt.

Da diese Beobachtung in direktem Widerspruch zu unserer Auffassung von dem Verlauf der Formazyl-Synthese stand, sahen wir uns veranlaßt,

¹⁾ vergl. hierzu Emil Abderhalden u. A. Weil, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis **129**, 1 [1921]. Hier wird über eigenartige Veränderungen der Epidermis berichtet, die sich im Anschluß an die intraperitoneale Zufuhr von Hexaglycyl-glycin einstellen.

²⁾ B. **27**, 1679 [1894].

³⁾ B. **59**, 1162 [1926].

⁴⁾ Eug. Bamberger, B. **29**, 1387 [1896].