

Mitteilung aus dem Chemischen Institut der Deutschen Karls-Universität
in Prag

Chromatographische Zerlegung der Abbau- stufen von Clupein

Von **Ernst Waldschmidt-Leitz, Johann Ratzer**
und **Fritz Turba**

(Eingegangen am 13. Februar 1941)

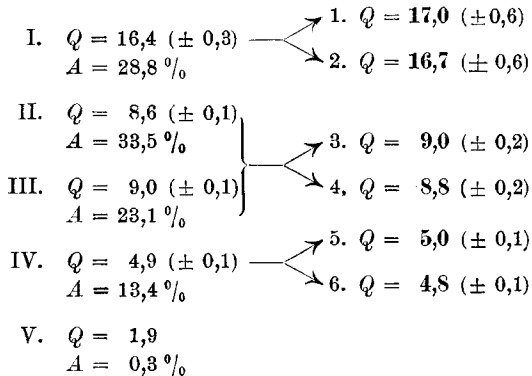
Eine Trennung von Peptidgemischen mittels chromatographischer Adsorption an Bleicherde haben wir in einer früheren Mitteilung¹⁾ an einem ersten Beispiel beschrieben; es betraf die Aufteilung der tryptischen Spaltprodukte eines basischen Protaminabkömmlings, des Clupeans. Es gelang hier die Isolierung von vier verschiedenen, chromatographisch einheitlichen Fraktionen von konstantem und charakteristischem Gehalt an freiem Aminostickstoff in nahezu quantitativer Ausbeute.

Dieses Verfahren haben wir inzwischen auf ein weiteres Beispiel angewandt, das Gemisch der Spaltprodukte, welches bei erschöpfender Einwirkung von Pankreasproteinase auf das Clupein selbst erhalten wird. Es hat auch hier zu einer sauberen und quantitativen Trennung geführt. Wie es das nachstehende Trennungsschema veranschaulicht, erhält man hier schon mit einer einzigen Adsorptionsvornahme drei durch Adsorption nicht mehr weiter zerlegbare Fraktionen von unterschiedlichem und gleichbleibendem Aminostickstoffgehalt; sie sind durch die Quotienten $N:NH_2 =$ etwa 17, bzw. = etwa 9, bzw. = etwa 5 gekennzeichnet. In dieser Reihenfolge nimmt die Adsorbierbarkeit der Fraktionen ab. Insgesamt finden wir in den Fraktionen über 99% der Ausgangssubstanz wieder.

¹⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. Fr. Turba, J. prakt. Chem. [2] 156, 55 (1940).

Trennungsschema

(Angaben bedeuten: Q = Quotient $N:NH_2$, A = Ausbeute an Gesamtstickstoff, bezogen auf die im ursprünglichen Peptidgemisch vorhandene Menge)



Die chromatographische Fraktionierung der tryptischen Spaltprodukte des Clupeins verläuft glatter, aber grundsätzlich ähnlich wie die früher beschriebene der tryptischen Spaltprodukte von Clupean; auch in jenem ersten Beispiel ordnen sich die Fraktionen nach fallender Adsorbierbarkeit mit abnehmendem Aminostickstoffgehalt. Wie die nachstehende Gegenüberstellung zeigt, läßt sich das Abbaugemisch des Clupeans in vier, das des Clupeins in drei nach ihrem Quotienten $N:NH_2$ verschiedene Fraktionen zerlegen; die 3 Fraktionen aus Clupein finden wir, wenn auch in veränderter Ausbeute, auch im Abbaugemisch des Clupeans, das letztere unterscheidet sich aber durch eine weitere Fraktion vom Quotienten $N:NH_2 =$ etwa 13.

Vergleich des tryptischen Abbaugemisches von Clupein und Clupean

Fraktion	Clupein		Clupean	
	Quotient $N:NH_2$	Ausbeute (%)	Quotient $N:NH_2$	Ausbeute (%)
I	etwa 17	28,8	etwa 18	31,4
II	„ 9	56,6	„ 13	10,1
III	„ 5	13,4	„ 9	34,4
IV	—	—	„ 5	14,7

Der Vergleich der Ausbeuten an den einzelnen Fraktionen lehrt, daß die Abbaugemische von Clupein und Clupean sich

vornehmlich in den Anteilen der Peptide von mittlerem Aminostickstoffgehalt unterscheiden. Wie wir wissen¹⁾, erfolgt die Umwandlung von Clupein zu Clupean durch Protaminase unter Abspaltung von freiem Arginin vom Carboxylende des Clupeins. Man kann daher mit einiger Wahrscheinlichkeit folgern, daß die Spaltstücke von mittlerem Aminostickstoffgehalt im Clupein selbst ganz oder doch teilweise dem das Carboxyl tragenden Molekülteile angehören.

Aus der bekannten Zusammensetzung des Clupeins, bei welchem acht Neuntel des Stickstoffs auf Argininreste und nur ein Neuntel auf Monoaminsäure-reste entfallen, ergibt sich nun zwingend der Schluß, daß für die Höhe des Quotienten $N:NH_2$ in den einzelnen Fraktionen ihr Arginingehalt ausschlaggebend ist; denn das Vorhandensein von Peptiden, welche nur oder überwiegend aus Monoaminosäuren aufgebaut wären, in einer Fraktion ist angesichts der gemessenen Ausbeuten nicht denkbar. Die Fraktionen vom Quotienten 18 und 17 müssen also Peptide mit vier, die Fraktion vom Quotienten 13 solche mit drei, die vom Quotienten 9 solche mit zwei und die Fraktionen vom Quotienten 5 Peptide mit einem Argininrest enthalten. Die Aufteilung mittels der chromatographischen Adsorption erfolgt also nach dem Arginingehalt der Peptide, und dieser vor allem muß für das Adsorptionsverhalten maßgebend sein; mit steigender Anzahl der Argininreste in einem Peptid steigt seine Adsorbierbarkeit durch die Bleicherde.

Diese Folgerung wird durch Modellversuche des einen von uns (Fr. T.), die wir hier nicht wiedergeben, eindeutig gestützt. Danach findet man die Adsorbierbarkeit von Arginin allein an die Bleicherde weit größer als etwa die des Dipeptids Leucyl-glycin oder des Tripeptids Leucyl-glycyl-glycin; andererseits ist die Adsorbierbarkeit von Arginin und von Glycyl-arginin gleich groß. Der Einfluß von Monoaminosäuren in einem Peptid ist also neben dem der Argininreste für die Adsorbierbarkeit von untergeordneter Bedeutung. Die erhaltenen Peptidfraktionen, auch wenn sie sich chromatographisch einheitlich verhalten, könnten also sehr wohl noch neben-

¹⁾ E. Waldschmidt-Leitz, Fr. Ziegler, A. Schöffner u. L. Weil, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 197, 219 und zwar S. 222 (1931).

einander Gemische von Peptiden mit einer gleichen Anzahl von Argininresten, aber mit verschiedenem Monoaminosäuregehalt, also von verschiedener Kettenlänge enthalten; denn diese würde man mit dem angewandten Verfahren nicht trennen können. Für die Adsorbierbarkeit ist offenbar die Häufung basischer Reste maßgebend; für die drei basischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin findet man nämlich entsprechend der Abnahme ihres basischen Charakters in dieser Reihenfolge Abnahme der Adsorbierbarkeit, sie lassen sich aus ihrem Gemisch durch chromatographische Adsorption an Bleicherde leicht voneinander trennen.

Das Verfahren der chromatographischen Adsorption von Peptidgemischen, für welches nun zwei Beispiele vorliegen, dient der Strukturermittlung der Protamine als der einfachsten Eiweißkörper, deren Abbau wir mit einheitlichen Enzymen an eindeutig gekennzeichneten Abbaustufen festhalten. Wir haben es nunmehr unternommen, die getrennten Peptidfraktionen auf ihren Gehalt an den einzelnen Aminosäurebausteinen und auf ihre Einheitlichkeit zu prüfen und die Reihenfolge der Bausteine in ihnen zu ermitteln. Eine der wesentlichsten Voraussetzungen für die Lösung dieser Aufgabe gerade bei den argininreichen Protaminen ist mit der Auffindung einer Methode erfüllt, die es erlaubt, Peptidgemische nur nach Maßgabe des Gehaltes an Argininresten zu zerlegen.

Versuche

Abbau des Clupeins durch Pankreasproteinase. 20,0 g Clupeinsulfat (lufttrocken, enthaltend 20,8% Stickstoff) wurden in Wasser gelöst, mit 100 ccm peptidasen- und protaminase-freier Proteinaselösung aus Pankreas [enth. 25 T.-(e.)] versetzt, mit n-NaOH auf $p_H = 8,0$ gebracht und mit Wasser auf 1000 ccm aufgefüllt. Der Abbau war nach 4 Stunden bei 30° beendet, ein Zusatz weiterer Proteinase blieb wirkungslos; man maß in 5,0 ccm des Ansatzes nach van Slyke einen Zuwachs entsprechend 2,32 mg Aminostickstoff. Nach einstündigem Erhitzen der Verdauungslösung auf dem Wasserbad wurde von ausgefallenen Flocken durch Filtration getrennt und im Vakuum bei 20° bis zur Sirupkonsistenz eingeeengt,

die Verdauungsprodukte wurden sodann mit Alkohol gefällt und mit Äther getrocknet.

Chromatographische Trennung der Spaltprodukte. 3,50 g der getrockneten Spaltprodukte wurden in 93 ccm Wasser gelöst; 0,10 ccm der Lösung verbrauchten nach Kjeldahl 3,66 ccm n/70-Säure entspr. 0,732 mg Stickstoff, 1,00 ccm ergaben nach van Slyke 1,53 ccm N_2 (24°, 742 mm), der Quotient $N:NH_2$ der Lösung betrug also 8,5.

91,7 ccm der Lösung (enth. 671,6 mg Stickstoff) wurden an eine Säule von Filtrol-Neutrol¹⁾ (Säulenhöhe = 73 mm, Durchmesser der Säule = 24 mm) adsorbiert, das Adsorbat wurde mehrmals mit wenig Wasser nachgespült (Adsorptionsrestlösung und Waschwasser vereint = Fraktion V). Daraufhin saugte man durch die Säule 200 ccm m/15-Phosphatpuffer von $p_H = 5,6$ (ergebend Fraktion IV), sodann noch 350 ccm m/3-Phosphatpuffer von $p_H = 5,6$ (ergebend Fraktion III) hindurch. Die Säule wurde nunmehr nach beendeter Entwicklung aus der Adsorptionsröhre herausgestoßen und an der scharf ausgeprägten Grenzschicht in einen oberen (= Fraktion I) und in einen unteren Teil (= Fraktion II) zerschnitten. Die Elution der im Adsorbat verbliebenen Anteile (Fraktion I, bzw. II) bewirkte man mit einer Lösung von 3 Teilen Pyridin und 7 Teilen 2n-H₂SO₄ ($p_H =$ etwa 4).

Fraktion I. Quotient $N:NH_2$, im Adsorbat (= 10,7878 g) bestimmt, = 16,4; Gesamtstickstoff: 193,2 mg = 28,8% (zu den Bestimmungen verbraucht insgesamt 8,3 mg Stickstoff).

0,0464 g nach Kjeldahl: 4,15 ccm n/70-Säure: 0,831 mg Stickstoff.

0,3712 g nach van Slyke: 0,72 ccm N_2 (24°, 744 mm): 0,405 mg Aminostickstoff.

Eluiert mit 300 ccm Elutionslösung, die Elution bei 20° i. V. zur Trockne eingengt und der Rückstand in 100 ccm Wasser aufgenommen, Operation noch 2-mal wiederholt bis zur Entfernung des Pyridins; Gesamtstickstoff in 100 ccm der Lösung: 176,8 mg.

0,50 ccm nach Kjeldahl: 4,42 ccm n/70-Säure: 0,884 mg Stickstoff.

10 ccm der Elution (enthalten 17,68 mg Stickstoff) zur Prüfung auf Einheitlichkeit abermals an Filtrol-Neutrol adsorbiert (Höhe der Adsorptionssäule = 20 mm, Durchmesser = 8 mm), die Säule darauf in einen oberen (= Fraktion 1) und einen unteren Anteil (= Fraktion 2) zerschnitten.

¹⁾ Bezogen von H. Bensmann, Bremen.

Fraktion 1. Quotient N:NH₂ (im Adsorbat bestimmt) = 17,0.

0,0422 g nach Kjeldahl: 3,28 ccm n/70-Säure: 0,653 mg Stickstoff. 0,4832 g nach van Slyke: 0,78 ccm N₂ (22°, 741 mm): 0,44 mg Aminostickstoff.

Fraktion 2. Quotient N:NH₂ (im Adsorbat bestimmt) = 16,7.

0,0579 g nach Kjeldahl: 3,58 ccm n/70-Säure: 0,716 mg Stickstoff. 0,5621 g nach van Slyke: 0,74 ccm N₂ (22°, 471 mm): 0,417 mg Aminostickstoff.

Fraktion II. Quotient N:NH₂, im Adsorbat (= 14,2681 g) bestimmt, = 8,6; Gesamtstickstoff: 225,3 mg = 33,6% (zu den Bestimmungen verbraucht insgesamt 9,0 mg Stickstoff).

0,0565 g nach Kjeldahl: 4,46 ccm n/70-Säure: 0,892 mg Stickstoff. 0,4556 g nach van Slyke: 1,50 ccm N₂ (24°, 743 mm): 0,84 mg Aminostickstoff.

Eluiert mit 380 ccm Elutionslösung.

Fraktion III. Quotient N:NH₂ (in der Elution von 250 ccm bestimmt) = 9,0 (zu den Bestimmungen verbraucht insgesamt 7,5 mg Stickstoff); Gesamtstickstoff: 154,7 mg = 23,1%.

1,00 ccm nach Kjeldahl: 3,09 ccm n/70-Säure: 6,19 mg Stickstoff. 10,00 ccm nach van Slyke: 1,24 ccm N₂ (25°, 741 mm): 0,690 mg Aminostickstoff.

Fraktion III und Elution von Fraktion II vereinigt und davon zur Prüfung auf Einheitlichkeit 20 ccm (enthalten 18,5 mg Stickstoff) wiederum an Filtrol-Neutrol adsorbiert (Höhe der Adsorptionssäule = 30 mm, Durchmesser = 10 mm), die Säule darauf in einen oberen (= Fraktion 3) und in einen unteren Anteil (= Fraktion 4) zerschnitten.

Fraktion 3. Quotient N:NH₂ (in wäßriger Suspension von 20 ccm bestimmt) = 9,0.

1,00 ccm nach Kjeldahl: 2,62 ccm n/70-Säure: 0,525 mg Stickstoff. 10,00 ccm nach van Slyke: 1,03 ccm N₂ (19°, 735 mm): 0,582 mg Aminostickstoff.

Fraktion 4. Quotient N:NH₂ (in wäßriger Suspension von 20 ccm bestimmt) = 8,8.

1,00 ccm nach Kjeldahl: 1,92 ccm n/70-Säure: 0,385 mg Stickstoff. 10,00 ccm nach van Slyke: 0,78 ccm N₂ (19°, 735 mm): 0,438 mg Aminostickstoff.

Fraktion IV. Quotient N:NH₂ (in der pyridinfreien Elution von 20 ccm bestimmt) = 4,9 (zu den Bestimmungen verbraucht insgesamt 5,4 mg Stickstoff); Gesamtstickstoff: 89,6 mg = 13,6%.

1,00 ccm nach Kjeldahl: 2,24 ccm n/70-Säure: 0,448 mg Stickstoff. 10,00 ccm nach van Slyke: 1,63 ccm N₂ (25°, 741 mm): 0,91 mg Aminostickstoff.

36,7 ccm der Elution (enthalten 16,5 mg Stickstoff) zur Prüfung auf Einheitlichkeit wiederum an Filtrol-Neutrol adsorbiert (Höhe der Adsorp-

tionssäule = 53 mm, Durchmesser = 15 mm), die Säule darauf in einen oberen (= Fraktion 5) und in einen unteren Anteil (= Fraktion 6) zerschnitten.

Fraktion 5. Quotient N: NH₂ (in wäßriger Suspension von 20 ccm bestimmt) = 5,0.

2,00 ccm nach Kjeldahl: 5,27 ccm n/70-Säure: 1,054 mg Stickstoff; 15,00 ccm nach van Slyke: 2,74 ccm N₂ (19°, 749 mm): 1,58 mg Aminostickstoff.

Fraktion 6. Quotient N: NH₂ (in wäßriger Suspension von 20 ccm bestimmt) = 4,8.

2,00 ccm nach Kjeldahl: 3,00 ccm n/70-Säure: 0,600 mg Stickstoff. 15,00 ccm nach van Slyke: 1,63 ccm N₂ (19°, 749 mm): 0,936 mg Aminostickstoff.

Fraktion V. Quotient N: NH₂ (in der Lösung von 50 ccm bestimmt) = 1,9 (zu den Bestimmungen verbraucht insgesamt 0,9 mg Stickstoff); Gesamtstickstoff: 1,74 mg = 0,3%.

5,00 ccm nach Kjeldahl: 0,87 ccm n/70-Säure: 0,174 mg Stickstoff. 15,00 ccm nach van Slyke: 0,48 ccm N₂ (20°, 743 mm): 0,273 mg Aminostickstoff.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir ergebenst für die zur Verfügung gestellten Mittel.