

Mitteilung aus dem Analytischen Laboratorium der Universität
Riga, Lettland. Vorstand: Prof. Dr. M. Straumanis

Über die Umwandlung einiger Sphäroproteine in Linearproteine bei Desaminierung

Von B. Jirgensons

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 5. Oktober 1942)

Die Desaminierung von Proteinen ist schon früher untersucht worden¹⁾. Besonders eingehend wurden die chemischen Eigenschaften der Desaminoproteine studiert, weniger aber die kolloidchemische. So wurde z. B. gefunden, daß bei der Desaminierung des Caseins kein merklicher Abbau eintritt, und nur die freien Aminogruppen der Lysinradikale mit der salpetrigen Säure reagieren²⁾. Das hat auch der Verfasser dieser Arbeit (mit M. Strautmanis) vor kurzem bestätigt³⁾. Wir hatten aber auch die kolloidchemischen Eigenschaften des Desaminocaseins etwas eingehender untersucht, wobei unter anderem gefunden wurde, daß die Lösungen des Desaminocaseins eine unerwartet hohe Viscosität haben. Es wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß bei der Desaminierung die relativ kompakten, korpuskularen Moleküle des Caseins in linear-kolloide Teilchen umgewandelt wurden.

Es wäre nun interessant, die Frage zu klären, wie die anderen Sphäroproteine sich verhalten werden. Dabei ent-

¹⁾ S. J. Levites, Z. physiol. Chem. **43**, 202 (1904); Biochem. Z. **20**, 224 (1909); M. S. Dunn u. H. B. Lewis, J. biol. Chem. **49**, 343 (1921); W. M. Sandstrom, J. physic. Chem. **34**, 1071 (1930); E. B. R. Prideaux u. D. E. Woods, Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, **114**, 110 (1933), u. a.

²⁾ W. M. Sandstrom, J. physic. Chem. **34**, 1071 (1930).

³⁾ B. Jirgensons u. Milda Strautmanis, Kolloidny Schurnal (russ.) **7**, 129 (1941); B. Jirgensons, J. prakt. Chem. [2] **160**, 120 (1942).

stehen auch wichtige allgemeine Fragen über die Rolle von Aminogruppen der Lysinradikale bei der Knäuelung der Peptidketten, oder über die Zusammenhänge, die zwischen Molekülgestalt und Denaturierung bestehen.

Zu diesem Zweck wurden die Sphäroproteine Ovalbumin und Edestin mit salpetriger Säure behandelt. Es wurde dabei festgestellt, daß Ovalbumin bei der Desaminierung tatsächlich in ein Linearkolloid umgewandelt wird. Verdünnte Lösungen des Desaminoalbumins sind sehr zäh, ebenso wie die Lösungen des Desaminocaseins. Auch die Lösungen des Desaminoedestins sind zäher als die des unveränderten Edestins selbst, jedoch sind hier die Unterschiede nicht so groß.

Versuchsteil

A. Desaminoalbumin. 10 g getrocknetes Eialbumin wurde fein zerrieben, in 100 ccm Wasser gelöst, filtriert und dialysiert. Nach der Dialyse wurden die ausgefallenen Globulinflocken abfiltriert und dann so viel 3,3 n-Essigsäure zugegossen, daß die Konzentration der Säure im Gemisch 1 n war. Dann wurde die saure Albuminlösung bei Zimmertemperatur langsam mit einer Lösung von 5 g Natriumnitrit in 30 ccm Wasser versetzt und oft geschüttelt. Bald beginnt Gasentwicklung, und nach einer kurzen Zeit entsteht eine rasch zunehmende Trübung vom neu gebildeten Desaminoalbumin. Nach 20-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur (18–20° C) wurde der Niederschlag abgenutscht, mit warmem Wasser, nachher mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuumexsiccator getrocknet. Das getrocknete, fein verriebene Desaminoalbumin (I) ist eine schwach gelblichbraun gefärbte Substanz, die nur in basischen Flüssigkeiten mit rotbrauner Farbe sich auflöst. In 0,02 n-NaOH quillt die Substanz stark, wobei schon 0,5–1,0%ige Lösungen Gellösungen mit Glycerinkonsistenz sind. Die Zähigkeit fällt aber mit der Zeit.

Die Desaminierung ist gut reproduzierbar. So wurde z. B. eine andere Portion des Albumins in 0,5 n-Essigsäure mit mehr als 5 g NaNO_2 versetzt, nach 24 Stunden filtriert usw. Eine etwas heller und mehr gelblich gefärbte Substanz (II) wurde erhalten. Der N- und S-Gehalt, sowie die Viscosität der Lösungen beider Desaminoalbumine war aber fast ganz gleich.

Die für die Analysen bestimmten Proben wurden fein zerrieben und bei 85° 2 Stunden getrocknet. Ebenso wurde auch eine Probe des reinen, dialysierten Ovalbumins (zum Vergleich) getrocknet. Die Analysenresultate sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Die Lösungen des Desaminoalbumins sind sehr ähnlich den Lösungen des Desaminocaseins (a. a. O.²⁾, und nicht nur hinsichtlich der Farbe und Viscosität, sondern auch hinsichtlich der Fällbarkeit mit

Elektrolyten oder durch Aceton. Bekanntlich wird Ovalbumin durch CaCl_2 oder MgCl_2 nicht koaguliert. Desaminoalbumin dagegen wird durch 0,1 m- CaCl_2 , BaBr_2 oder MgCl_2 , und sogar durch 1 n- NaCl koaguliert. Durch Aceton oder Alkohol ist Desaminoalbumin aus einer schwach basischen Lösung fast ebenso leicht fällbar wie Albumin. Die Teilchen des Desaminoalbumins diffundieren nicht durch eine dünne Kolloidmembran.

Tabelle 1

	N (nach Dumas)	S
Ovalbumin	14,42 %	1,63 %
Desaminoalbumin I . . .	14,17	1,26
Desaminoalbumin II . . .	14,12	1,38

Die Viscosität wurde mit einem Wi. Ostwaldschen Viscosimeter (Wasserzahl bei 25° C = 80,0 Sek.) im Thermostat bei 25,0° gemessen. Es wurde untersucht: 1. die Abhängigkeit der Viscosität von der Konzentration des Desaminoalbumins (c), 2. die Abhängigkeit der Viscosität von der Zeit (t), 3. von der zugesetzten Konzentration der Lauge oder des Natriumchlorids. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen und Abbildungen zu ersehen. Überall wurde die spezifische Viscosität $\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$ berechnet und angegeben.

Tabelle 2

Die Abhängigkeit der Viscosität von der Konzentration*)

Konzentration in %	Desaminoalbumin in 0,02 n-NaOH	Desaminoalbumin in 0,05 n-NaOH	Albumin in 0,02 n-NaOH
1,0	3,49	1,40	0,075
0,5	1,44	0,835	0,048
0,25	0,802	0,501	0,029
0,12	0,425	0,337	0,022
0,06	0,230	0,225	0,016

Die in der Tab. 2 angegebenen Zahlen zeigen, daß die Konzentration der Lauge einen großen Einfluß auf die Viscosität hat. Die Viscosität ist auch von dem Alter der Lösungen abhängig. Die in Tab. 2 angegebenen Meßergebnisse wurden bei Verwendung von 1 Tag alten Lösungen gewonnen. Das wichtigste Ergebnis in dieser Versuchsreihe ist aber das, daß die Viscosität des Desaminoalbumins 15—40-mal größer ist als die Viscosität des Albumins. Noch besser sind diese Verhältnisse in Abb. 1 sichtbar.

*) Die verdünnten Lösungen wurden aus der konz. durch Verdünnung mit Wasser hergestellt. Das Konzentrationsverhältnis der Lauge zur Substanz bleibt konstant.

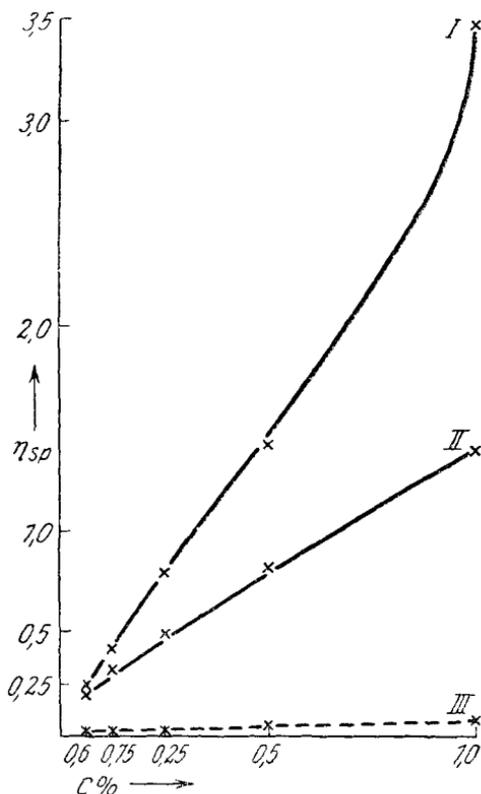


Abb. 1. Die Abhängigkeit der spezifischen Viscosität von der Konzentration (c) des Desaminoalbumins (Kurven I u. II) und Albumins (Kurve III)

Aus der Tab. 3 und Abb. 2 ist die Änderung der Viscosität mit der Zeit (t) zu ersehen.

Tabelle 3

$\eta_{sp} = f(t)$. 0,5% Desaminoalbumin in 0,01 n-NaOH bei +25,0°

η_{sp}	1 Tag nach der Herstellung der Lösung	1,44
"	3 Tage " " " " " "	1,03
"	5 " " " " " "	0,895
"	7 " " " " " "	0,745
"	10 " " " " " "	0,558

1,0% Desaminoalbumin in 0,05 n-NaOH bei 25,0°

η_{sp}	1 Tag nach der Herstellung der Lösung	1,40
"	2 Tage " " " " " "	1,03
"	3 " " " " " "	0,916
"	4 " " " " " "	0,895
"	7 " " " " " "	0,552

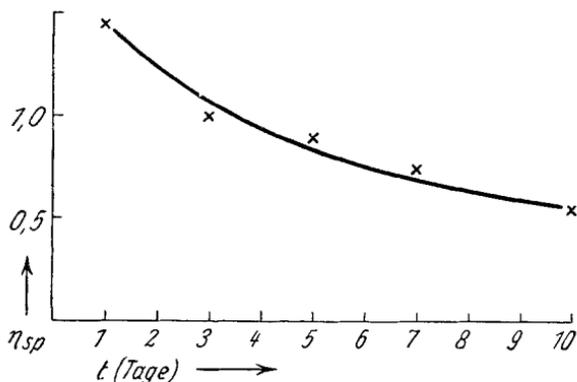


Abb. 2. Die Abhängigkeit der Viscosität einer 0,5%-igen Lösung des Desaminoalbumins von der Zeit

In der Tab. 4 und Abb. 3 ist die Abhängigkeit der Viscosität von der zugesetzten Menge des Natriumhydroxyds sichtbar.

Tabelle 4
 η_{sp} als Funktion der $[OH^-]$

NaOH Mol im Liter des Gemisches	Desaminoalbumin 0,5 %
0,002	$\eta_{sp} = 0,738$
0,006	1,168
0,010	1,440
0,015	1,165
0,020	0,874
0,100	0,492

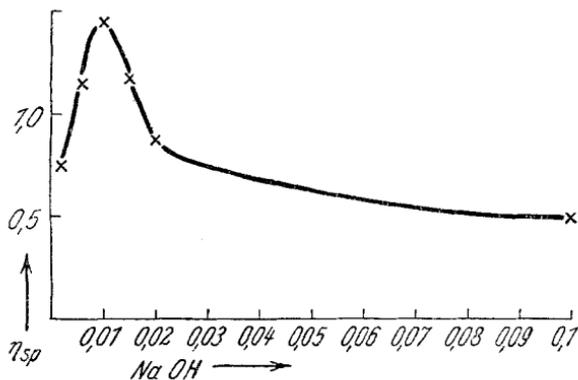


Abb. 3. Die Abhängigkeit der Viscosität einer 0,5%-igen Lösung des Desaminoalbumins von der Konzentration des NaOH

Es besteht hier also ein deutliches Wirkungsmaximum des NaOH, ebenso wie es früher beim Desaminocasein beobachtet wurde [a. a. O.³⁾]. Das unveränderte Ovalbumin dagegen hat kein solches Maximum; die Viscositätswerte sind viel kleiner und schwanken zwischen $\eta_{sp} = 0,025$ bis 0,052.

Durch Natriumchlorid oder andere Salze wird die η_{sp} vermindert, wie es aus der Tab. 5 ersichtlich ist.

Tabelle 5
 η_{sp} als Funktion der [NaCl]

NaCl Mol im Liter des Gemisches	Desaminoalbumin 0,5 % in 0,025 n-NaOH
0,000	0,925
0,002	0,798
0,005	0,620
0,010	0,565
0,050	0,402
0,200	0,245

B. Desaminoedestin. 5,0 g Edestin (Edestin aus Hanfsamen von Hoffmann-La Roche) wurde in 100 ccm 1 n-Essigsäure gelöst und zu der Lösung 2 g NaNO_2 (gelöst in 20 ccm Wasser) langsam zugesetzt. Bald nach der Zugabe der Nitritlösung entsteht ein Niederschlag, der nach 3 Stunden langem Stehen bei Zimmertemperatur abfiltriert wurde. Die Substanz wurde weiter ebenso wie Desaminoalbumin gewaschen und getrocknet. Das getrocknete Desaminoedestin hat eine gelbbraune Farbe und ist in 0,02 n-NaOH schwer löslich. Die Substanz wurde in 0,05 n-NaOH aufgelöst, wobei eine rotbraune Lösung entstand.

3 Stunden bei 85—90° getrocknetes Desaminoedestin enthielt 17,40% N (Bestimmungen nach Dumas), während ebenso getrocknetes Edestin 17,71% N hatte.

Einige Viscositätsmessungen mit den Lösungen des Desaminoedestins im Vergleich mit entsprechenden Lösungen des Edestins sind in Tab. 6 angeführt. 1%-ige Lösungen in 0,05 n-NaOH wurden mit Wasser progressiv verdünnt, ebenso wie im Falle des Desaminoalbumins.

Tabelle 6
Viscositätsmessungen an Desaminoedestin und Edestin

Konzentration in %	Desaminoedestin	Edestin
1 %	0,328	0,126
0,5	0,226	0,092
0,25	0,131	0,056
0,12	0,086	0,029

Besprechung der Ergebnisse

Nach den grundlegenden Untersuchungen von H. Staudinger und seiner Schule⁴⁾ ist es jetzt sichergestellt, daß die Viscosität der Lösungen verschiedener Stoffe hauptsächlich von der Molekülgestalt abhängt. Bezüglich der Proteine wurde das besonders durch die Arbeiten von Polson⁵⁾ und Neurath⁶⁾ bestätigt und präzisiert. Es besteht somit kein Zweifel, daß auch die vom Verfasser festgestellte hohe Viscosität der Desaminoproteine durch die fadenförmige Gestalt der in den Lösungen befindlichen Moleküle bedingt ist. Bei der Desaminierung erfolgt also die Umwandlung der Sphäroproteine in Linearproteine.

Die Tatsache, daß bei der Desaminierung ein Sphäroprotein in ein Linearkolloid verwandelt wird, kann als Beweis dafür erbracht werden, daß die freien Aminogruppen der Lysinradikale einen entscheidenden Einfluß auf die Biegung und Knäuelung der Peptidketten haben. Es ist schon lange bekannt, daß diese Aminogruppen mit den freien Carboxylgruppen der Aminodicarbonsäureradikale salzartige Bindungen geben können, wobei sogenannte „Salzbrücken“ entstehen. Solche Salzbrücken können in einer und derselben Peptidkette Biegungen hervorrufen nach dem in Abb. 4 gezeichneten Schema. Nach Desaminierung kann dann eine Streckung der Peptidkette erfolgen⁷⁾. Außerdem können Salzbrücken auch zwischen zwei nebenstehenden Peptidketten entstehen. Bei der Desaminierung erfolgt in diesem Falle die Auflockerung des Faserbündels der Ketten, wobei einige Ketten oder Kettenbündel auch ganz abspreizen können⁸⁾ (nach dem in Abb. 5 gezeichneten Schema). Bei der Desaminierung werden also die Moleküle der Sphäroproteine eigenartig denaturiert. Auch bei der

⁴⁾ Vgl. z. B. H. Staudinger, Ber. dtsch. chem. Ges. 68, 1618 (1935); Organische Kolloidchemie, 2. Aufl. 1941.

⁵⁾ A. Polson, Kolloid-Z. 88, 51 (1939).

⁶⁾ H. Neurath, J. Amer. chem. Soc. 61, 1841 (1939).

⁷⁾ F. Haurowitz, Kolloid-Z. 71, 198 (1935); K. H. Meyer und H. Mark, Hochpolymere Chemie, II. Bd. 1940.

⁸⁾ G. Ettisch u. G. V. Schulz, Biochem. Z. 239, 48 (1931); H. Nitschmann u. H. Guggisberg, Helv. chim. Acta 24, 434, 574 (1941).

üblichen Denaturierung wird die Viscosität erhöht⁹⁾, jedoch bei weitem nicht so viel als bei der Desaminierung.

Viele Einzelheiten sind bei den Desaminoproteinen noch unklar. Im Falle des Desaminocaseins sowie Desaminoedestins werden alle freien Aminogruppen der Lysinradikale durch Hydroxyle ersetzt, im Falle des Desaminoalbumins ist der

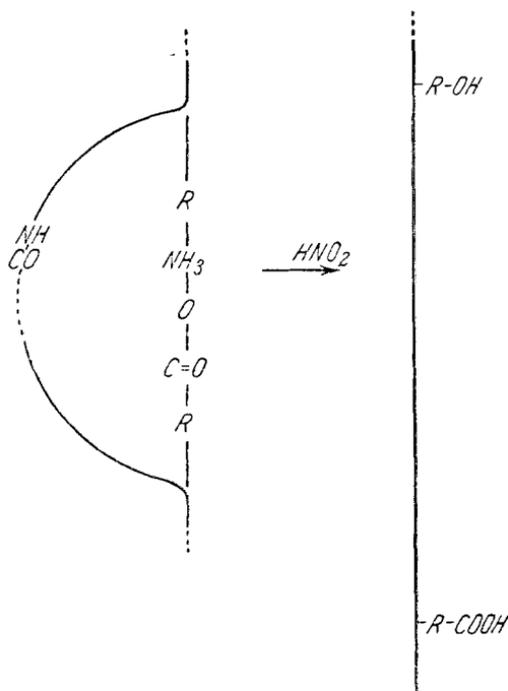


Abb. 4. Schematische Darstellung der Streckung einer Peptidkette bei Desaminierung

Stickstoffverlust aber geringer. Nach den neuesten Bestimmungen enthält Ovalbumin 6,4% Lysin. Bei vollständiger Desaminierung der freien Aminogruppe der Lysinradikale sollte der N-Verlust also 0,61% sein. Aus der Tab. 1 ist aber zu ersehen, daß der tatsächliche Verlust viel geringer ist, nämlich 0,275%. Aus dieser Tatsache könnte man schließen, daß

⁹⁾ M. L. Anson u. A. E. Mirsky, J. Physiol. **60**, 50 (1925); W. J. Loughlin u. W. C. M. Lewis, Biochemical J. **26**, 476 (1932); B. Jirgensons, J. prakt. Chem. [2] **160**, 120 (1942).

die Desaminierung nur unvollständig vollzogen wäre. Um die Frage zu klären, wurde eine Probe des Albumins noch stärker als die übrigen mit HNO_2 behandelt, nämlich mit einer weiteren Portion von NaNO_2 versetzt und 30 Minuten bei 50° erwärmt. Die sorgfältig gewaschene und getrocknete Probe wurde analysiert und kein weiterer Stickstoffverlust festgestellt. Im Gegenteil — dieses Desaminoalbumin enthielt 14,31% N, also sogar etwas mehr N als die übrigen. Es ist aber auch möglich, daß der geringe N-Verlust nicht auf unvollständige Desaminierung, sondern auf Einführung neuer N-haltiger Gruppen hinweist. Die Lösungen der Desaminoproteine sind gelblich (verdünnte) oder sogar rotbraun (konzentriertere 0,5—1%) gefärbt, ein Hinweis, daß im Molekül neue Chromophore eingetreten sind. Durch Einwirkung von salpetriger Säure auf die Iminogruppen der Histidinradikale können Nitrosogruppen entstehen, durch Einwirkung von Salpetersäure (die aus HNO_2 entstehen kann) auf aromatische Radikale auch Nitrogruppen.

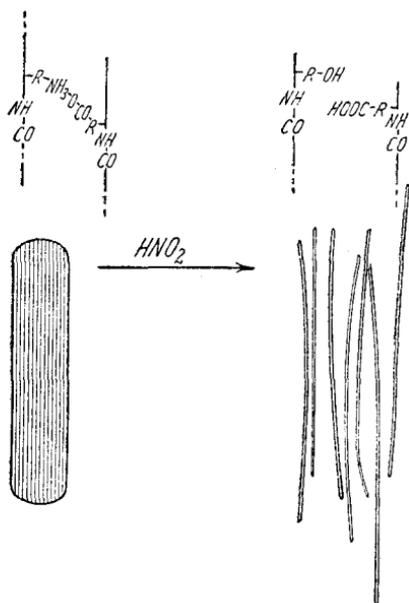


Abb. 5. Schematische Darstellung der Umwandlung eines korpuskularen Proteinteilchens in ein Linearkolloid als Folge der Desaminierung, wobei die zwischen den Peptidketten bestehenden „Salzbrücken“ gesprengt werden

Es ist auch noch nicht geklärt, in welchem Umfange die hydrolytische Spaltung der Peptidketten bei der Desaminierung stattfindet. Von den bisherigen Untersuchungen [a. a. O.¹⁾] kann man schließen, daß ein weitgehender Abbau nicht stattfindet. Auch die hier angeführten Versuche mit dem Desaminoalbumin zeigten, daß hinsichtlich der Dialyse und Fällbarkeit, sowie auch bezüglich der Viscosität die Substanz als ein makromolekularer Stoff sich verhält. Es wäre doch interessant, die Frage z. B. mit Hilfe der Ultrazentrifuge näher aufzuklären.

Zusammenfassung

Anschließend an die früheren Untersuchungen über das Desaminocasein wurde auch die Viscosität der Lösungen von Desaminoalbumin und Desaminoedestin gemessen. Untersucht wurde die Abhängigkeit der Viscosität von der Konzentration des Desaminoproteins, von der Zeit, sowie von der Konzentration der Lauge und von Salzkonzentration. Die Lösungen des Desaminoalbumins, ebenso wie die früher untersuchten Lösungen des Desaminocaseins haben eine sehr hohe Viscosität. Auch die Lösungen des Desaminoedestins haben größere Viscosität als entsprechende Lösungen des Edestins. Es wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß die Moleküle der verwendeten Sphäroproteine bei Desaminierung in Linearkolloide umgewandelt werden. Die freien Aminogruppen der Lysinradikale haben also einen entscheidenden Einfluß auf die Biegung und Zusammenlagerung der Peptidketten.

Dem Vorstand des Analytischen Laboratoriums, Herrn Prof. Dr. M. Straumanis dankt der Verfasser für das große Entgegenkommen, das er ihm während der Ausführung dieser Arbeit zeigte. Ebenso danke ich auch Frl. Assistentin A. Dombrovski für die Ausführung der N- und S-Bestimmungen.