

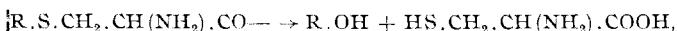
15. Fritz Micheel: Zur Kenntnis der Schlangengifte (IX. Mitteil.*)).

[Aus d. Organ. Abteilung d. Chem. Instituts d. Universität Münster i. W.]

(Eingegangen am 12. Dezember 1938.)

Man pflegt die bekannten schwefelhaltigen Bausteine von Eiweißstoffen nach deren totaler Hydrolyse mit Säuren zu bestimmen¹⁾. Wird die Hydrolyse mit nicht reduzierender Säure (Salzsäure, Schwefelsäure oder Salzsäure-Ameisensäure²⁾) vorgenommen, so finden sich im Hydrolysat Cystin und Methionin, während bei der reduzierenden Hydrolyse³⁾ (mit Jodwasserstoff) Cystein und Homocystein-lacton gefunden werden. Die Bestimmung des Cystins erfolgt meist nach den üblichen colorimetrischen Methoden, und man hat vielfach geschlossen²⁾⁴⁾, daß das gesamte gefundene Cystin auch in dieser Form im nativen Eiweiß vorliegt, und daraus weiterhin wichtige Schlußfolgerungen zu ziehen versucht⁴⁾. Insbesondere wird dabei von „Schwefelbilanzversuchen“ Gebrauch gemacht. Man bestimmt den Schwefelgehalt des betreffenden Eiweißstoffs durch Elementaranalyse und vergleicht mit diesen Werte die nach der totalen Hydrolyse gefundenen Werte für das Cystin und Methionin. Stimmen diese Werte überein, so wird angenommen, daß der gesamte Schwefel des betreffenden Eiweißstoffs als Cystin bzw. Methionin vorliegt²⁾⁴⁾. Besondere Beachtung muß dabei den nicht unerheblichen Fehlergrenzen der betreffenden Methoden geschenkt werden; leicht kann wenig Methionin neben viel Cystin übersehen werden⁵⁾.

Wie schon in der vorigen Mitteilung ausgeführt wurde, wird bei derartigen „Bilanzversuchen“ jedoch anscheinend nicht beachtet⁶⁾, daß auch bei der Bindung von Cysteinresten in folgender Art:



wobei R ein durch Säure hydrolysierbarer Rest ist, im Falle der Hydrolyse mit Jodwasserstoff Cystein entsteht und im Falle der Hydrolyse mit anderen Säuren zunächst ebenfalls Cystein, das unter den Bedingungen der Hydrolyse durch Dehydrierung in Cystin oder andere Oxydationsprodukte übergehen kann. Wie sich zeigte, ist Cystein in der zur Hydrolyse mit Eiweißstoffen verwandten verhältnismäßig konzentrierten Säure gegen Oxydation bei der hohen Temperatur der Hydrolyse nicht beständig⁷⁾. Lösungen von Cysteinhydrochlorid, in Salzsäure-Ameisensäure, unter den Bedingungen der Eiweiß-Hydrolyse erhitzt, verlieren beim Durchleiten von Luft oder besser Sauer-

* VIII. Mitteil.: B. 71, 2653 [1938].

¹⁾ Neuere Beispiele: Insulin (Miller u. du Vigneaud, Journ. biol. Chem. 118, 101 [1937]); Eiweiß-Komponente des gelben Ferments (Kuhn u. Desnuelle, B. 70, 1907 [1937]); Schlangengifte (Slotta u. Mitarbb., B. 71, 1082, 1623 [1938]).

²⁾ Miller u. du Vigneaud, l. c.

³⁾ Bärnstein, Journ. biol. Chem. 106, 453 [1934].

⁴⁾ Slotta u. Mitarbb., l. c. ⁵⁾ Miller u. du Vigneaud, l. c., S. 109.

⁶⁾ Vergl. jedoch eine Warnung von Lugg (Biochem. Journ. 27, 1023 [1933]), der, allerdings bei Gegenwart sehr großer Mengen von Kohlenhydraten, bedeutende Verluste an Cystein feststellte.

⁷⁾ Die bisherigen Versuche umfassen nur eine qualitative (nicht quantitative) Prüfung in Luft oder reinem Sauerstoff unter den im Versuchsteil angegebenen Bedingungen (48 Stdn. Dauer).

stoff nach einiger Zeit die Thiol-Reaktion⁸⁾. Setzt man ferner zu Eiweiß-Hydrolysen (zur Verwendung gelangten verschiedene Präparate von Serumalbumin, Eieralbumin, Casein und Gift von *Naja tripudians*) Cystein-hydrochlorid (1—3%) zu, so ist je nach Art und Menge des verwandten Eiweißes in etwa 12—48 Stdn. unter den Bedingungen der Hydrolyse ein Verschwinden der Thiolreaktion festzustellen, falls nicht für Ausschluß von Sauerstoff gesorgt wird.

Wie die Versuche zeigen, müssen also Thiolverbindungen (Cystein), die nach obiger Gleichung bei der Eiweiß-Hydrolyse entstehen, bei den bisherigen Bestimmungsmethoden als Disulfid gefunden werden, sofern nicht überhaupt tiefergehende Zersetzung eintritt.

Nimmt man jedoch gleichartige Hydrolysen unter Zusatz von Cystein-hydrochlorid in reinem CO₂ vor, so ist auch in 48—65 Stdn. qualitativ ein Verschwinden des zugesetzten Cysteins nicht festzustellen⁹⁾.

Es wurden nun, nachdem diese Feststellungen über das Verhalten von Cystein bei Ausschluß von Sauerstoff vorlagen, Versuche gemacht, ob u. U. bei der anaeroben Hydrolyse von Eiweiß und Schlangengift auftretende SH-Gruppen nachzuweisen sind¹⁰⁾. Diese Versuche führten im Falle des Giftes der *Naja tripudians* zu einem eindeutig positiven Ergebnis. Hydrolysiert man dieses Gift mit Salzsäure-Ameisensäure in der üblichen Art (s. Versuchsteil), so ist nach 24 Stdn. durch die Nitroprussid-Reaktion und die Reaktion mit Phosphorwolframsäure (pH 5.2) freies Thiol mit Sicherheit festzustellen. Dies Thiol kann nicht aus einer Hydrolyse von Methionin oder Cystin entstanden sein, da beide Stoffe unter den Bedingungen der Hydrolyse, wie gesonderte Versuche zeigten, nicht zur Bildung von Thiol Anlaß geben. Es muß also nach diesen Befunden damit gerechnet werden, daß im Neurotoxin der *Naja tripudians* ein Teil des Schwefels in einer hydrolysierbaren Gruppierung vorliegt: R.S.CH₂— oder allgemeiner R.S.R', wobei R ein durch Säure hydrolysierbarer Rest ist. Quantitative Versuche müssen darüber Auskunft geben, in welchem Umfange dies der Fall ist, und ob diese Gruppierung mit der durch Sulfit aufspaltbaren der aktiven Gruppe¹¹⁾ identisch ist. Zunächst sagen die jetzigen Befunde noch nichts darüber.

⁸⁾ Dabei scheinen noch unbekannte katalytische Einflüsse (Fe?) eine Rolle zu spielen: mit Ameisensäure (zur Analyse, Merck) geht die Oxydation von Cystein allein viel schneller als mit einer im Vak. destillierten Ameisensäure (de Haen rein). Diese Unterschiede treten jedoch nicht auf, sobald bei der Reaktion Eiweiß zugegen ist.

⁹⁾ Ob ein Teil des zugesetzten Cysteins auf Kosten von Abbauprodukten des Eiweißes dehydriert wird, darüber lassen die bisherigen Versuche keine eindeutigen Schlüsse zu. Nach den Befunden von Lugg, Biochem. Journ. **27**, 1023 [1933], ist bei Gegenwart großer Mengen von Kohlenhydrat und Eiweißabbauprodukten mit starken Verlusten an Cystein zu rechnen (Erhitzen im Bombenrohr auf 100°).

¹⁰⁾ Nach älteren Ergebnissen soll bei der Hydrolyse von Eiweiß-Stoffen nur Cystin, kein Cystein entstehen; vergl. Platten, Ztschr. physiol. Chem. **39**, 350 [1903]; Mörner, Ztschr. physiol. Chem. **34**, 207 [1901], u. a.; hingegen kommen Mirsky u. Anson (Journ. gen. Physiol. **18**, 307 [1935]; **19**, 427, 439, 451, 559 [1936]) zu dem Ergebnis, daß auch einige nicht denaturierte Eiweißstoffe freie Thiol-Gruppen enthalten. (Es könnte sich dabei jedoch um andere reduzierende Stoffe handeln, z. B. beim Protein der Krystalllinse um Ascorbinsäure.) Vergl. dagegen Todrick u. Walker, Biochem. Journ. **31**, 292 [1937].

¹¹⁾ s. die Mitteil. VII (B. **71**, 2653 [1938]) und frühere darüber.

Bemerkenswert ist, daß auch andere Eiweißstoffe (untersucht wurden bisher kryst. Eieralbumin und Casein) bei der Hydrolyse unter anaeroben Bedingungen zu einer Substanz führen, die Phosphorwolframsäure reduziert, wenn auch in viel schwächerem Maße als beim Cobra-Neurotoxin. Bisher gelang es jedoch nicht, bei solchen Hydrolysaten eine positive Nitroprussid-Reaktion zu erhalten. Da die Reduktion von Phosphorwolframsäure auch durch andere Stoffe als Thiol erfolgen kann¹²⁾, so ist damit bisher das Auftreten von Thiol bei der Hydrolyse der genannten Eiweißstoffe nicht nachgewiesen. Die Versuche werden jedoch fortgesetzt.

Für die Ermittlung der schwefelhaltigen Komponenten im Eiweiß ergibt sich also, daß aus der Bestimmung des Cystins im Hydrolysat von Eiweiß oder eiweißartigen Produkten nach den bisherigen Methoden noch nicht auf das ausschließliche Vorliegen von Cystingruppen in den betreffenden Naturstoffen geschlossen werden darf. Lassen sich in solchen Stoffen auf anderem Wege S.S-Bindungen nachweisen, etwa durch Reduktion mit Thiol-Verbindungen (Auftreten von SH-Gruppen, Inaktivierung beim Insulin) oder durch Spaltung mit Sulfit nach dem von Clarke¹³⁾ gefundenen Reaktionsmechanismus (Auftreten von SH- und S.SO₃H), so kann man auf das Vorliegen von S.S-Gruppen in den nativen Stoffen schließen. Jedoch ist damit zunächst nichts darüber gesagt, inwieweit neben diesen auch eine Bindung von Cysteinresten im oben angegebenen Sinne vorkommt. Dies trifft insbesondere auf die Bindung des Schwefels im Cobra-Neurotoxin zu. Während die neurotoxische Komponente von *Crotalus*(Klapperschlangen)-Arten, wie die Inaktivierung durch Reduktion mit Cystein zeigt¹⁴⁾, wahrscheinlich in der aktiven Gruppe S.S-Bindungen enthält, ist dies bei der aktiven Gruppe des Cobra-Neurotoxins auf Grund von dessen Verhalten gegenüber Cystein und Sulfit nicht der Fall¹⁵⁾. In einem gewissen Widerspruch dazu schienen Versuche über die Schwefelbilanz des Cobragiftes zu stehen¹⁶⁾. Wie die obigen Befunde und Ausführungen zeigen, ist dies jedoch nicht der Fall, abgesehen davon, daß schon die Fehlergrenzen derartiger „Bilanz“-Versuche durchaus das Vorliegen kleiner Mengen andersartig gebundenen Schwefels zulassen. Es ist beabsichtigt, die beschriebenen Ergebnisse, die sich zunächst nur auf qualitative Ermittlungen stützen, durch quantitative Messungen zu ergänzen.

Für die vorstehenden Untersuchungen standen Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Firma C. F. Boehringer u. Söhne zur Verfügung, denen auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

Anm. b. d. Korrektur (20. 12. 38).

Bei Absendung dieser Arbeit (11. 12. 38) waren neuere Arbeiten von Kassell und Brand (Journ. biol. Chem. **125**, 115, 131, 145, 435 [1938]) noch nicht bekannt, da die Hefte der Bände 123, 124 und 125 des Journ. biol. Chem. erst am 15. 12. 38 bei der Uni-

¹²⁾ Vielleicht Zersetzungprodukte der Kohlenhydratkomponente aus Eieralbumin.

¹³⁾ Journ. biol. Chem. **97**, 235 [1932].

¹⁴⁾ Slotta u. Fraenkel-Conrat, B. **71**, 264 [1938]; Micheel u. Schmitz, B. **71**, 703 [1938].

¹⁵⁾ Micheel u. Schmitz, B. **71**, 703, 1446 [1938]; Micheel u. Bode, Naturwiss. **26**, 289 [1938]; B. **71**, 2653 [1938].

¹⁶⁾ Am nativen Gift der *Naja tripudians*, Slotta, Forster u. Fraenkel-Conrat, B. **71**, 1623 [1938].

versitätsbibliothek Münster eingegangen sind und am 16. 12. 38 zu erhalten waren. Die genannten Autoren haben ebenfalls Eiweiß-Hydrolysen unter inerten Gasen (N_2 u. CO_2) ausgeführt und Bestimmungen der schwefelhaltigen Bausteine gemacht. Soweit sie sich mit den gleichen Eiweißstoffen wie in dieser Arbeit beschäftigen, stehen ihre Beobachtungen in Übereinstimmung mit den hier und in einer noch folgenden Arbeit zu beschreibenden.

Beschreibung der Versuche.

Zur Verwendung gelangten Cystein-hydrochlorid (rein, z. Anal.), Serumalbumin (kryst., dann elektrodialysiert), Eieralbumin (kryst.), Casein (nach Hammarsten) und Gift der Naja tripudians. Die Ameisensäure war analysenrein (98—100-proz.) (Merck, z. Analyse oder de Haen rein, im Vak. dest.) und die Salzsäure 38-prozentig.

Versuche über die Beständigkeit von Cystein.

Die Reaktionen wurden in Schliffkölbchen mit Luftkühler ausgeführt: zu den in der Tafel angegebenen Mengen Cystein-hydrochlorid und Eiweißstoff wurde eine Mischung von 5.8 ccm konz. Salzsäure und 6.2 ccm Ameisensäure gegeben¹⁷⁾ und die Lösung im Glycerinbade (Badtemperatur 120—135°) zum Sieden erhitzt. Gegebenenfalls wurde Sauerstoff oder luftfreies Kohlendioxyd durch den Kolben geleitet. Zur Prüfung auf Thiol wurden kleine Proben (0.5—1 ccm) entnommen und unter Eiskühlung mit Ammoniak alkalisch gemacht. Sodann wurden die eiskalten Lösungen mit Nitroprussidnatrium in bekannter Weise geprüft. Kontrollversuche zeigten, daß die Ammoniumsalze die Reaktion nicht störten. War die Reaktionszeit

| Ver- such Nr. | Cystein-hydro- chlorid (mg) | Eiweißstoff (mg) | Thiol-Reaktion nach Stunden | | | | Gas |
|---------------------|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------------|----|-----|----|------------|
| | | | 6 | 12 | 24 | 48 | |
| 21 | 5.11 ¹⁸⁾ | — | + | + | — | . | Sauerstoff |
| 25 | 5.111 ¹⁹⁾ | — | + | + | + | + | „ |
| 26 | 4.929 ¹⁸⁾ | — | . | + | — | . | „ |
| 29 | 5.124 ¹⁹⁾ | — | + | + | + | . | „ |
| 44 | 5.0 ²⁰⁾ | — | + | + | + | — | „ |
| 12 | 2.551 ²¹⁾ | 102.2 (Serumalbumin) | + | . | — | . | Luft |
| 13 | 2.684 | 104.2 (Eieralbumin) | + | . | (+) | — | „ |
| 14 | 2.626 | 67.2 (Eieralbumin) | + | . | (+) | — | „ |
| 16 | 2.654 | 102.4 (Casein) | + | + | (+) | — | „ |
| 18 | 2.581 | 105 (Casein) | + | . | — | . | Sauerstoff |
| 30 | 5.161 | 107.5 (Eieralbumin) | + | . | — | . | „ |
| 27 | 2.505 | 200.1 (Eieralbumin) | + | . | + | + | CO_2 |
| 28 | 1.634 | 151.6 (Naja tripudians) | + | . | + | + | „ |

¹⁷⁾ Miller u. du Vigneaud, Journ. biol. Chem. 118, 101 [1937].

¹⁸⁾ Ameisensäure Merck, z. Analyse mit Garantieschein.

¹⁹⁾ Ameisensäure de Haen rein, im Vak. destilliert.

²⁰⁾ 20-proz. Salzsäure ohne Ameisensäure.

²¹⁾ Für die Reaktion bei Gegenwart von Eiweiß war die Qualität der Ameisensäure ohne Bedeutung.

abgelaufen, so wurde im Vak. eingedampft und am Abdampfrückstand der Befund der letzten Probe kontrolliert²²⁾. Eine Übersicht einer Reihe von Versuchen wird in der Tafel gegeben. Darin bedeutet: + positiv; — negativ; (+) schwach positiv (eben noch erkennbar); . nicht geprüft. Sauerstoff oder CO₂ wurden in langsamem Strome zunächst 1—2 Std. durch die kalte Flüssigkeit geleitet, sodann wurde im Gasstrom erhitzt wie üblich. Bei den Versuchen in Luft wurde ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen im Kolben mit offnem Steigrohr erhitzt.

Hydrolysen unter Ausschluß von Sauerstoff. Gift der *Naja tripudians*.

150 mg Gift wurden in 5.8 ccm konz. 12-n. HCl und 6.2 ccm Ameisensäure (Merck z. Anal.) im Glycerinbad (120—135°) zum Sieden erhitzt. Gleichzeitig wurde ein luftfreier CO₂-Strom hindurchgeleitet. Nach 6 Std. wurden 5 ccm der Lösung im Vakuum (unter CO₂) eingedampft, mit 3 ccm Wasser (CO₂-gesättigt) aufgenommen, mit Talk entfärbt und auf Thiol geprüft. 1 ccm der Lösung wurde mit konz. 13-n. Ammoniak versetzt und mit Nitroprussidnatrium geprüft: negativ. 1 ccm wurde mit 2 ccm Acetat-Puffer auf pH 5.2 gebracht und mit Phosphorwolframsäure (nach Folin) versetzt: deutliche Blaufärbung. Nach insgesamt 24-stdg. Hydrolyse wurden die restlichen etwa 6—7 ccm des Ansatzes im Vak. abgedampft und geprüft wie beschrieben: Reaktion mit Nitroprussidnatrium positiv, mit Phosphorwolframsäure stark positiv.

Eiweißstoffe.

150 mg kryst. Eieralbumin wurden in der gleichen Weise, wie beim Gift der *Naja tripudians* angegeben, hydrolysiert und geprüft. Nach 15 Std. war die Probe mit Phosphorwolframsäure schwach positiv, die Nitroprussid-Probe negativ. Ebenso waren die Ergebnisse nach 41 Std.

250 mg Casein (nach Hammarsten) wurden in der gleichen Weise, wie oben beschrieben, hydrolysiert und geprüft. Die Phosphorwolframsäure-Probe war nach 24 und 48 Std. schwach positiv, die Nitroprussid-Reaktion in beiden Fällen negativ.

Methionin.

5 mg *d,l*-Methionin wurden in 5.8 ccm konz. 12-n. HCl und 6.2 ccm Ameisensäure (Merck z. Anal.) wie bei den vorigen Versuchen behandelt. Nach 22 Std. und nach 48 Std. war die Prüfung auf Thiol negativ.

Cystin.

5 mg Cystin, wie beim vorigen Versuch behandelt, gaben keine SH-Reaktion.

²²⁾ Da die Lösungen aus Eiweißhydrolysen eine gelb-braune Farbe zeigten (auch die unter CO₂ erhaltenen, wenn auch eine schwächere), so wurde gegebenenfalls nach dem Abdampfen und Wiederaufnehmen mit Talk entfärbt.