

THOMAS KAUFFMANN und FRITZ-PETER BOETTCHER

**Über die C-terminalen Aminosäuren
von Menschen-, Pferde- und Rinder-Hämoglobin *)**

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt
(Eingegangen am 5. März 1959)

Mit der kürzlich beschriebenen¹⁾, verbesserten Hydrazinolyse-Methode wurden die C-terminalen Aminosäuren der Hämoglobine und Globine von Mensch, Pferd und Rind bestimmt. In allen Fällen wurden pro Mol. Hämoglobin bzw. Globin rund 2 Moll. C-terminales Histidin nachgewiesen.

Seit den Bestimmungen der N-terminalen Aminosäuren, die R. R. PORTER und F. SANGER²⁾ vor 11 Jahren an den Hämoglobinen und Globinen des Menschen und verschiedener Säugetiere durchgeführt haben, hat die Bestimmung der Aminoendgruppen der Hämoglobine, vor allem des Menschen-Hämoglobins, zahlreiche Autoren beschäftigt³⁾. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob bei den verschiedenen Hämoglobinen die Zahl der N-terminalen Gruppen der Zahl der prothetisch gebundenen Häm-Moleküle entspricht. Nach den Untersuchungen von PORTER und SANGER²⁾ liegt diese einfache Beziehung bei den Hämoglobinen des Rindes, Schafes und der Ziege vor, beim Menschen, Pferd und Esel dagegen nicht. Neuere Arbeiten haben jedoch gezeigt, daß entgegen den ersten Beobachtungen auch bei den Hämoglobinen des foetalen⁴⁾ und erwachsenen Menschen⁵⁾ das Verhältnis Häm:Aminoendgruppen = 1:1 ist.

Im Gegensatz zu den N-terminalen wurden die C-terminalen Aminosäuren der Hämoglobine bisher noch wenig untersucht. T. H. J. HUISMAN und A. DOZY⁶⁾ konnten mit dem Enzym Carboxypeptidase aus den Menschen-Hämoglobinen A, F, S und C⁷⁾ bei pH 8 innerhalb von 72 Stdn. pro Mol. Hämoglobin je 1 Mol. Histidin und Tyrosin abspalten. Sie vermuteten daher, daß diese Aminosäuren die Carboxylendgruppen von zwei Polypeptidketten darstellen. H. A. ITANO und J. F. GLADNER⁸⁾ beobachteten bei zweistündiger Carboxypeptidase-Spaltung von Menschen-Hämoglobin bei pH 7.8 ebenfalls eine Abspaltung von Tyrosin und Histidin⁹⁾.

*) Anm. b. d. Korr.: Eine Publikation von K. HILSE und G. BRAUNITZER (Z. Naturforsch. 14b, 603 [1959]) veranlaßt uns, darauf hinzuweisen, daß die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von uns schon 1958 kurz mitgeteilt wurden (TH. KAUFFMANN und F.-P. BOETTCHER, Z. Naturforsch. 13b, 467 [1958]).

1) TH. KAUFFMANN und F.-P. BOETTCHER, Liebigs Ann. Chem. 625, 123 [1959].

2) Biochem. J. 42, 287 [1948].

3) Vgl. die Übersicht von H. A. ITANO, Advances Protein Chem. 12, 215 [1957].

4) W. A. SCHROEDER und G. MATSUDA, J. Amer. chem. Soc. 80, 1521 [1958].

5) H. S. RHINESMITH, W. A. SCHROEDER und L. PAULING, J. Amer. chem. Soc. 79, 4682 [1957].

6) Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 20, 400 [1956].

7) A = normales Hämoglobin, F = foetales Hämoglobin, S = Sichelzellen-Hämoglobin, C = weiteres anomales Menschen-Hämoglobin; Bezeichnung nach A. I. CHERNOFF, B. FISCHER, J. W. HARRIS, H. A. ITANO, E. KAPLAN und K. SINGER, Blood 8, 386 [1953]; Science [Washington] 118, 240 [1953].

8) Advances Protein Chem. 12, 240 [1957].

Bei p_{H} 7.0 wurde dagegen neben Histidin⁹⁾ kein oder nur wenig Tyrosin in Freiheit gesetzt. Die Autoren vermuten aufgrund ihrer Ergebnisse, daß Tyrosin keine C-terminalen Gruppe ist, sondern vielleicht in der C-terminalen Sequenz -Tyr-His vorliegt.

Die hinsichtlich der Sequenz -Tyr-His nicht ohne weiteres verständliche Argumentation¹⁰⁾ von ITANO und GLADNER sei wörtlich zitiert: „Since carboxypeptidase acts more slowly on C-terminal histidine than on tyrosine at p_{H} 7 (E. W. DAVIE, personal communication), the release of histidine and of little or no tyrosine suggests that tyrosine is not a C-terminal residue but that it may be penultimate to histidine“.

Um die Verhältnisse zu klären, haben wir Bestimmungen der C-terminalen Aminosäuren von Hämoglobinen mit der von uns verbesserten Hydrazinolyse-Methode¹¹⁾ durchgeführt.

1. NACHWEIS VON ZWEI C-TERMINALEN HISTIDINRESTEN IM MENSCHEN-, PFERDE- UND RINDER-HÄMOGLOBIN BZW. -GLOBIN

Die von uns untersuchten kristallinen, normalen Hämoglobine¹¹⁾ von Mensch, Pferd und Rind stellten die BFHRINGWERKE in Marburg/Lahn zur Verfügung. Die entsprechenden Globine wurden aus den Hämoglobinen durch schonende Behandlung mit Oxalsäure nach A. HAMSIK¹²⁾ erhalten.

Da die Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren nach S. AKABORI^{13,14)} auch in der von G. BRAUNITZER¹⁵⁾ angegebenen Ausführungsform keine eindeutigen Ergebnisse lieferte, weil die Aminosäure-hydrazide nur unvollkommen von den freien, ehemals C-terminalen Aminosäuren abgetrennt werden konnten, haben wir die Hydrazinolyse-Methode dadurch verbessert, daß wir anstelle der bisher verwandten niedrigmolekularen Aldehyde zur Abtrennung der Hydrazide den nach R. C. SCHULZ, H. CHERDRON und W. KERN¹⁶⁾ dargestellten Polyaldehyd „Polyacrolein B3“ verwandten¹⁷⁾. Die an anderer Stelle veröffentlichte Methode, die sich beim Lysozym und Ovalbumin bewährt hat¹⁾, wurde nun auf die Hämoglobine angewandt. In den durch Umsetzung mit Polyacrolein von Hydraziden befreiten Hydrazinolysaten der

¹⁰⁾ Wenn es zutrifft, daß die C-terminalen Sequenz -Tyr-His vorliegt, und daß nach E.W. DAVIE (zit. bei Lit.⁸⁾) Carboxypeptidase bei p_{H} 7.0 C-terminales Tyrosin rascher als C-terminalen Histidin abspaltet, ist nicht einzusehen, warum bei den Versuchen von ITANO und GLADNER bei p_{H} 7.0 kein oder nur wenig Tyrosin gefunden wurde. Beim Vorliegen der C-terminalen Sequenz -Tyr-His wäre bei kurzer Einwirkung von Carboxypeptidase nur dann keine oder geringe Tyrosin-Abspaltung zu erwarten, wenn nach der primären Abtrennung des endständigen Histidins der Schritt der Tyrosin-Abspaltung langsamer oder höchstens an nähernd gleich schnell wie der Schritt der Histidin-Abspaltung erfolgen würde.

¹¹⁾ Im folgenden ist mit Hämoglobin stets normales Hämoglobin gemeint, für das A. I. CHERNOFF und Mitarbb.⁷⁾ die Bezeichnung Hämoglobin A vorgeschlagen haben.

¹²⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 187, 229 [1930].

¹³⁾ S. AKABORI, K. OHNO und K. NARITA, Bull. chem. Soc. Japan 25, 214 [1952].

¹⁴⁾ S. AKABORI, K. OHNO, T. IKENAKA, A. NAGATA und I. HARUNA, Proc. Japan Acad. 29, 561 [1953].

¹⁵⁾ Chem. Ber. 88, 2025 [1955].

¹⁶⁾ Makromolekulare Chem. 24, 141 [1957].

¹⁷⁾ R. H. LOCKER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 14, 533 [1954], trennt die Aminosäure-hydrazide mit Hilfe eines Ionenaustauschers von den freien Aminosäuren ab. Die basischen Aminosäuren bleiben dabei in der Hydrazidfraktion, werden also nicht gefunden, wenn sie als C-terminalen Aminosäuren vorliegen.

⁹⁾ Angaben über die Zahl der nachgewiesenen Histidinreste wurden von ITANO und GLADNER nicht gemacht.

erwähnten Hämoglobine konnte neben wenig Glycin, Serin, Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure hauptsächlich *Histidin* nachgewiesen werden.

Die Identifizierung des *Histidins* erfolgte erstens durch Papierelektrophorese der nach Abtrennung der Hydrazide vorliegenden Aminosäuren und Entwickeln der Pherogramme mit Ninhydrin oder mit PAULYSchem Diazoreagenz sowie durch Mischpherogramme mit authentischem Histidin. Zweitens wurden die Aminosäuren mit DNFB¹⁸⁾ umgesetzt, worauf das gebildete Bis-DNP-Histidin durch ein zweidimensionales Mischchromatogramm mit einer synthetischen Vergleichssubstanz identifiziert wurde. Der exakte Nachweis des Vorliegens von Bis-DNP-Histidin gelang durch Abbau zu α -DNP-Histidin¹⁹⁾, das durch ein zweidimensionales Mischchromatogramm mit α -DNP-Histidin sowie durch die positive Reaktion mit PAULYSchem Diazoreagenz identifiziert wurde.

Die quantitative Bestimmung der in den Hydrazinolysaten enthaltenen Aminosäuren wurde im wesentlichen nach der Vorschrift von A. L. LEVY²⁰⁾ durch chromatographische Trennung und Photometrieren der DNP-Derivate durchgeführt. Hierbei wurden, wie aus den Tab. 2—4 hervorgeht, bei den Hämoglobinen pro Mol. Proteid (Mol.-Gew. 66 700²¹⁾) 0.7—1.0 Moll. Histidin gefunden. Bei den Globinen wurden 0.8—1.0 Moll. Histidin pro Mol. Protein (Mol.-Gew. 64 230²¹⁾) gefunden. Die Abweichung der einzelnen Meßwerte betrug maximal 10%. Die gefundenen Werte stellen naturgemäß nur Mindestwerte dar, die einer Korrektur bedürfen, weil z. B. freies Histidin unter den Bedingungen der Hydrazinolyse und der Aufarbeitung (10—14 stdg. Erhitzen mit Hydrazin auf 100° unter Zusatz von Hämoglobin oder Globin, Dinitrophenylierung und Chromatographie der DNP-Verbindungen) nach unseren Feststellungen nur zu 41—43% wiedergefunden wird²²⁾.

Unter Berücksichtigung des Histidin-Verlustes²³⁾ berechnen sich aus den Analysenergebnissen der Tab. 2—4 die in der nachstehenden Tab. 1 angegebenen Molzahlen

18) DNFB = 2,4-Dinitrofluorbenzol; DNP = 2,4-Dinitrophenyl.

19) Nach H. ZAHN und H. PFANNMÜLLER, Angew. Chem. 68, 40 [1956].

20) Nature [London] 174, 126 [1954].

21) Das der Berechnung zugrunde gelegte Mol.-Gew. der Hämoglobine von 66 700 wurde kürzlich von I. VINOGRAD (siehe Anm. 10 bei Lit.⁵⁾) angegeben und in der sehr sorgfältigen Arbeit von L. PAULING und Mitarbb.⁵⁾ zur Berechnung der Zahl der N-terminalen Aminosäuren (genau 4) des Menschen-Hämoglobins benutzt. Es stimmt im Gegensatz zum früher angenommenen Mol.-Gew. der Hämoglobine von 68 000 gut mit dem Mol.-Gew. 66 800 überein, das man bei der Annahme von genau 4 Eisenatomen/Mol. Hämoglobin berechnet. — In der erwähnten Übersicht von H. A. ITANO³⁾ wird der Diskussion der Analysenergebnisse von Menschen-Hämoglobinen ebenfalls ein Mol.-Gew. von 66 000—67 000 zugrunde gelegt. — Das bei den Carboxylengruppen-Bestimmungen für die Globine angenommene Mol.-Gew. von 64 230 erhält man durch Subtraktion des Mol.-Gew. von 4 Hämresten von 66 700.

22) Von C.-I. NIU und H. FRAENKEL-CONRAT, J. Amer. chem. Soc. 77, 5882 [1955], konnten nach 10stdg. Erhitzen mit Hydrazin durch Dinitrophenylierung und Chromatographie 43% der eingesetzten Menge Histidin zurückgewonnen werden. Dieser Wert stimmt mit unserem Wert sehr gut überein. Von den Aminosäuren Glycin, Serin, Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure erhielten NIU und FRAENKEL-CONRAT nur jeweils 37, 39, 45, 16 und 19% der eingesetzten Menge zurück.

23) Der unter Zusatz von Rinder-Hämoglobin bzw. Menschen-Globin bestimmte Histidin-Verlust wurde auch zur Berechnung der Endgruppen-Zahl der anderen Hämoglobine bzw. Globine benutzt. Angesichts der Ähnlichkeit der untersuchten Hämoglobine bzw. Globine untereinander dürfte diese Vereinfachung erlaubt sein.

C-terminales Histidin/Mol. Protein, die zwischen 1.9 und 2.3 Mol./Mol. Hämoglobin bzw. Globin liegen. Bei allen untersuchten Hämoglobinen und Globinen dürfen also zwei C-terminale Histidinreste vorliegen.

Tab. 1 zeigt, daß bei den untersuchten Hämoglobinen und Globinen nicht genau zwei Äquivalente C-terminales Histidin gefunden wurden, sondern, abgesehen vom Menschen-Hämoglobin, bis zu 15% mehr. Für die zu hohen Histidin-Werte lassen sich verschiedene Gründe anführen.

Tab. 1. Berechnung der Zahl der C-terminalen Aminosäuren von Hämoglobinen (Mol.-Gew. 66 700²¹⁾) und Globinen (Mol.-Gew. 64 230²¹⁾)

Protein	Hämoglobin von				Globin von		
	Mensch	Pferd	Rind		Mensch	Pferd	Rind
Hydrazinolysezeit (Stdn.)	10	10–12.5	10	14	14	14	10
gef. Moll. Histidin/Mol. Protein	*)	**)*)	*)*)		**)**)*)	**)**)*)	
(Mittel aus den Werten der Tabb. 2–4)	0.80	0.91	0.94	0.96	0.89	0.90	0.99
Histidin-Verlust ²³⁾ (%)			58	59		57	
ber. Moll. C-terminales Histidin/Mol. Protein	1.9	2.2	2.2	2.3	2.1	2.1	2.3

*) Mittelwert aus 3 Bestimmungen **) Mittelwert aus 2 Bestimmungen

Erstens muß damit gerechnet werden, daß das aus nicht C-terminalem Histidin entstandene Histidin-hydrazid bei der Hydrazinolyse und der Aufarbeitung wie die meisten Aminosäure-hydrazide zu einem kleinen Teil hydrolytisch in Histidin und Hydrazin zerfällt. Die gefundenen Histidin-Werte werden also etwas zu hoch liegen.

Zweitens kann nicht erwartet werden, daß bei gleich langem Erhitzen mit Hydrazin das C-terminale Histidin einer Polypeptidkette in genau gleichem Maße wie freies Histidin zerstört wird. Die mit freiem Histidin ermittelten Faktoren zur Korrektur des Histidin-Verlustes können daher nur Näherungswerte sein, die wahrscheinlich ebenfalls etwas zu hoch sind.

Einer besonderen Betrachtung bedarf noch die Tatsache, daß von den Aminosäuren Glycin, Serin, Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure in den Hydrazinolysaten der Hämoglobine durch Photometrieren der DNP-Derivate zwischen 0.2–0.6 Mol./Mol. Proteid (Tabb. 2–3) nachgewiesen werden konnten, so daß sie unter Berücksichtigung der Verluste²²⁾ ebenfalls als Carboxylendgruppen in Frage kamen. Bei den Globinen fanden wir dagegen diese Aminosäuren nur noch in Mengen unter 0.1 Mol./Mol. Globin, was nach der Korrektur weniger als 0.3 Mol./Mol. Globin entspricht. Diese Aminosäuren können daher wohl kaum aus Carboxylendgruppen stammen.

Wir nehmen an, daß die zusätzlichen Aminosäuren, deren Ausbeuten im Vergleich zu den ziemlich konstanten Histidin-Werten stark schwankten, während der Hydrazinolyse und der Aufarbeitung der Hydrazinolysate durch Hydrolyse ihrer Hydrazide gebildet werden. Für diese Deutung spricht, daß Glycin und Serin, deren Hydrazide nach den Angaben der Literatur¹⁵⁾ besonders leicht gespalten werden, in der größten Menge gefunden wurden. — Die auffallende Tatsache, daß bei den Bestimmungen an den Hämoglobinen viel größere Mengen Glycin, Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure gefunden wurden als bei den Globinen, können wir noch nicht erklären. Es scheint, daß die Anwesenheit des Häms die Bildung freier Aminosäuren aus den primär entstehenden Hydraziden fördert.

2. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Mit der verbesserten Hydrazinolyse-Methode¹⁾ konnten im normalen Menschen-Hämoglobin rund *zwei C-terminale Histidinreste* nachgewiesen werden. Da sonst keine weiteren *C-terminalen Aminosäuren* gefunden wurden²⁴⁾, die Hämoglobine von Mensch, Pferd und Rind aber mindestens vier *N-terminale Aminosäuren* besitzen³⁻⁵⁾, muß das Vorliegen zweier verzweigter Polypeptidketten oder durch Reaktion mit Ammoniak oder Ringschluß blockierter *C-terminale Aminosäuren* in Betracht gezogen werden.

Gegen zwei verzweigte Polypeptidketten spricht der Befund, daß Pferde-Globin in 0.05 m Natriumchlorid bei p_H 2 in vier Einheiten mit einem Mol.-Gewicht von etwa 16000 aufgespalten wird^{25, 26, 27)}. Unter den angewandten Bedingungen ist allerdings eine Spaltung kovalenter Bindungen nicht ausgeschlossen. Unter mildereren Bedingungen, z. B. in neutraler Harnstofflösung²⁸⁾ oder in 1.0 m Neutralsalz-Lösung²⁹⁾ wird das Mol.-Gewicht der Hämoglobine bekanntlich nur auf die Hälfte erniedrigt.

Unsere Untersuchungen bestätigen die Annahme von ITANO und GLADNER⁸⁾, daß Tyrosin keine *C-terminale Aminosäure* des Menschen-Hämoglobins ist. Das erstmals von HUISMAN und DOZY⁶⁾ beobachtete Auftreten von Tyrosin bei der Carboxypeptidase-Spaltung von Menschen-Hämoglobin bei p_H 8 ist entsprechend der Vermutung von ITANO und GLADNER durch das Vorliegen der *C-terminalen Sequenz -Tyr-His* zu deuten, aus der nach primärer Abspaltung des endständigen Histidins das Tyrosin sehr rasch in Freiheit gesetzt werden muß, weil Carboxypeptidase allgemein Tyrosin schneller als alle anderen Aminosäuren, ausgenommen Phenylalanin abspaltet^{30, 31)}.

Da wir pro Mol. Menschen-Hämoglobin 2 *C-terminale Histidinreste* fanden, bei der Carboxypeptidase-Spaltung nach HUISMAN und DOZY⁶⁾ aber nur 1 Mol. Tyrosin in Freiheit gesetzt wird, besitzt möglicherweise nur eine der beiden mit Histidin endenden Polypeptidketten die *C-terminalen Sequenz -Tyr-His*.

Die Tatsache, daß von HUISMAN und DOZY⁶⁾ bei der Carboxypeptidase-Spaltung von Menschen-Hämoglobin neben 1 Mol. Tyrosin nur 1 Mol. Histidin gefunden wurde, während die Hydrazinolyse rund 2 Moll. Histidin liefert, könnte vielleicht durch die Annahme erklärt werden, daß bei der zweiten mit Histidin endenden Polypeptidkette durch die Art der benachbarten Aminosäure ein Angriff der Carboxypeptidase auf das endständige Histidin erschwert oder unmöglich ist.

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, wurden beim Rinder-Hämoglobin die gleichen *C-terminalen Gruppen* gefunden wie beim Menschen- und Pferde-Hämoglobin. Dieser

²⁴⁾ Nach G. BRAUNITZER¹⁵⁾ werden bei der Endgruppen-Bestimmung mit der Hydrazinolyse-Methode alle normalerweise im Eiweiß als Endgruppen vorkommenden Aminosäuren erfaßt. Der Nachweis von Glutaminsäure und Asparaginsäure ist wegen des relativ großen Verlustfaktors etwas unsicher. Ferner kann nicht zwischen Ornithin und Arginin unterschieden werden.

²⁵⁾ M. E. REICHMANN und J. R. COLVIN, Canad. J. Chem. 34, 411 [1956].

²⁶⁾ A. HAUG und D. B. SMITH, Canad. J. Chem. 35, 945 [1957].

²⁷⁾ Von den vier bei p_H 2 entstandenen Spaltstücken verhalten sich bei der Elektrophorese jeweils zwei identisch²⁶⁾. Ihre End-Aminosäuren wurden anscheinend noch nicht bestimmt.

²⁸⁾ H. WUNG und E. F. JANG, Chin. J. Physiol. 6, 51 [1932].

²⁹⁾ J. STEINHARDT, J. biol. Chemistry 123, 543 [1938].

³⁰⁾ M. A. STAHHAMM, J. S. FRUTON und M. BERGMANN, J. biol. Chemistry 164, 753 [1946].

³¹⁾ E. L. SMITH, J. biol. Chemistry 175, 39 [1948].

Befund ist deshalb interessant, weil sich Rinder-Hämoglobin in der Art der N-terminalen Gruppen vom Menschen- und Pferde-Hämoglobin unterscheidet. Nach unseren, vorerst nur qualitativen Beobachtungen³²⁾ werden auch aus Rinder-Hämoglobin durch Einwirkung von Carboxypeptidase bei $p_{H} 8$ annähernd gleiche Mengen Histidin und Tyrosin abgespalten. Somit liegt offenbar auch hier mindestens in einer Kette die C-terminale Sequenz -Tyr-His vor.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. Hämoglobine und Globine

Die von uns für die Hydrazinolyse benutzten kristallisierten *Hämoglobine*¹¹⁾ von Mensch, Pferd und Rind erhielten wir von der Fa. BEHRINGWERKE AG., Marburg (Lahn). — Analysenwerte der i. Hochvak. bei Raumtemperatur zum konstanten Gewicht getrockneten Hämoglobine³³⁾:

Menschen-Hämoglobin:	16.50% N; 2.4% Verbrennungsrückstand
Pferde-Hämoglobin:	16.74% N; 3.1% Verbrennungsrückstand
Rinder-Hämoglobin:	16.30% N; 3.1% Verbrennungsrückstand

Die *Globine* wurden in Anlehnung an eine Vorschrift von HAMSIK¹²⁾ wie folgt dargestellt: 200 mg krist. Menschen-, Pferde- oder Rinder-Hämoglobin wurden mit 10 ccm einer 3-proz. Lösung von Oxalsäure in Aceton und 3 ccm Wasser angerührt. Die Mischung wurde 30 Min. bei Raumtemp. stehengelassen. Nach dem Filtrieren und Waschen mit der angegebenen Oxalsäure-Lösung wurde die gesamte Operation wiederholt. Schließlich wurde der Filterrückstand mit der 3-proz. acetonischen Oxalsäure-Lösung, dann mit Aceton und darauf mit Äther gut ausgewaschen. Das zurückbleibende, hellgrau gefärbte Pulver wurde zur Analyse bei Raumtemperatur zur Gewichtskonstanz getrocknet. Analysenwerte³³⁾:

Menschen-Globin:	14.26% N; 0.67% Verbrennungsrückstand
Pferde-Globin:	14.52% N; 0.88% Verbrennungsrückstand
Rinder-Globin:	14.70% N; 1.70% Verbrennungsrückstand

2. Carboxylendgruppen-Bestimmungen

a) *Hydrazinolyse und Aufarbeitung der Hydrazinolysate*: Die Bestimmungen wurden mit dem verbesserten Hydrazinolyse-Verfahren durchgeführt, das für die Carboxylendgruppen-Bestimmungen am Ovalbumin ausgearbeitet wurde¹⁾. Einzelheiten über die Hydrazinolyse, die Abtrennung der Hydrazide mit Polyacrolein und die Dinitrophenylierung der Aminosäuren bei $p_{H} 8$ sind den Beschreibungen der entsprechenden, am Ovalbumin durchgeföhrten Operationen zu entnehmen. Nach der Dinitrophenylierung erfolgte die Isolierung der DNP-Aminosäuren nach BRAUNITZER¹⁵⁾ durch Ausschütteln der angesäuerten wäßr. Reaktionslösung mit Essigester und n-Butanol, Eindampfen des Essigester- und Butanol-Extrakts und Absublimieren des Dinitrophenols aus dem Rückstand des Essigester-Extrakts.

b) *Papierchromatographie der DNP-Aminosäuren*: Die DNP-Aminosäuren des Essigester- und Butanol-Extrakts wurden im Dunkeln durch zweidimensionale absteigende Papierchromatographie auf Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2040a getrennt. Als Lösungsmittel-

³²⁾ TH. KAUFFMANN und F.-P. BOETTCHER, Z. Naturforsch. 13b, 467 [1958].

³³⁾ Zur Berechnung der Stickstoffwerte wurden die Verbrennungsrückstände von der Einwaage nicht abgezogen.

system diente in der ersten Richtung nach BRAUNITZER¹⁵⁾ die beim Mischen gleicher Teile n-Butanol und 0.1-proz. währ. NH₃ erhaltene organische Phase. In der zweiten Dimension wurde nach LEVY²⁰⁾ mit 1.5 m Phosphatpuffer vom *p*_H 6 (0.5 m Na₂HPO₄ + 1 m NaH₂PO₄) chromatographiert, wobei der Phosphatpuffer so lange durchlief, bis die am schnellsten wandernde DNP-Glutaminsäure und DNP-Asparaginsäure den unteren Rand des 50 × 50 cm großen Chromatogramms fast erreicht hatten. Die Chromatogramme der Essigester-Extrakte zeigten bei sämtlichen Bestimmungen neben dem Fleck des Dinitrophenols, der sich durch Entfärbung beim Besprühen mit verd. Salzsäure zu erkennen gibt, einen großen, intensiv gelben Fleck und mehrere kleinere gelbe Flecke von DNP-Aminosäuren. Bei den kleineren Flecken handelt es sich nach der Lage in den zweidimensionalen Chromatogrammen um die DNP-Derivate von Glycin, Serin, Alanin, Glutaminsäure und Asparaginsäure. Der auf den Chromatogrammen aller Essigester-Extrakte vorhandene Hauptfleck wurde nach den *R*_F-Werten (im Butanol/NH₃-System *R*_F 0.33; im Phosphatpuffer *R*_F 0.08) durch Bis-DNP-Histidin gebildet. Die Chromatogramme der Butanol-Extrakte zeigten bei sämtlichen Bestimmungen einen schwachen, in manchen Fällen kaum sichtbaren Fleck, bei dem es sich nach den *R*_F-Werten^{20,34)} (im Butanol/NH₃-System *R*_F 0.35; im Phosphatpuffer *R*_F 0.52) wahrscheinlich um α-DNP-Histidin handelte.

c) Identifizierung der C-terminalen Aminosäure: Aus zwei Chromatogrammen der Essigester-Auszüge wurden die als Bis-DNP-Histidin angesprochenen Flecke ausgeschnitten und mit 10 ccm 2-proz. NaHCO₃-Lösung durch 15 Min. langes Erwärmen auf 50–60° eluiert. Die Hälfte des Eluats wurde mit 2 n HCl kongosauer gemacht und ausgeäthert. Die ausgeätherte Substanz wanderte im zweidimensionalen Mischchromatogramm mit authent. Bis-DNP-Histidin in den oben angegebenen Laufmitteln als einheitlicher Fleck.

Die zweite Hälfte des Eluats wurde nach einer Vorschrift von ZAHN und PFANNMÜLLER¹⁹⁾ zur Darstellung von α-DNP-Histidin aus Bis-DNP-Histidin unter Zusatz von einigen Kristallen Glycin in 15 ccm Äthanol 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Dann wurde das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert, der währ. Rückstand mit 2 n HCl angesäuert und mit 3 × 3 ccm n-Butanol ausgeschüttelt. Im zweidimensionalen Chromatogramm des n-Butanol-Auszuges war außer der Ausgangssubstanz, dem Bis-DNP-Histidin, noch ein weiterer gelber Fleck zu erkennen, bei dem es sich nach den *R*_F-Werten^{20,34)} um das erwartete α-DNP-Histidin handelte. Die Substanz erwies sich durch zweidimensionale Mischchromatographie mit synthet. α-DNP-Histidin identisch. Außerdem gab sie wie die synthet. Substanz beim Besprühen mit einer frisch bereiteten Lösung von 100 mg diazotierter Sulfanilsäure in 50 ccm n Natriumcarbonatlösung (PAULYSCHES Diazoreagenz)³⁵⁾ eine intensive Rotsfärbung. Die Flecke auf den Chromatogrammen der n-Butanol-Extrakte wurden ebenfalls durch zweidimensionale Mischchromatographie und durch Besprühen mit einer natriumcarbonatalkalischen Lösung von diazotierter Sulfanilsäure als α-DNP-Histidin identifiziert. Das Auftreten von wenig α-DNP-Histidin neben Bis-DNP-Histidin zeigt, daß die Dinitrophenylierung des Histidins unvollständig war.

Histidin wurde außerdem nachgewiesen durch Papierelektrophorese der mit Polyacrolein von Hydraziden befreiten Hydrazinolysate (Papier: Fa. Macherey, Nagel & Co., Düren [Rhld.]; Puffer vom *p*_H 6.5:100 ccm Pyridin, 10 ccm Eisessig, 890 ccm Wasser; Gerät nach TH. WIELAND und H. PFLEIDERER³⁶⁾) und Entwickeln der Pherogramme mit Ninhydrin oder

³⁴⁾ Im n-Butanol/NH₃-System von BRAUNITZER¹⁵⁾ ermittelten wir mit Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2040a bei 21° für synthet. α-DNP-Histidin den *R*_F-Wert 0.36.

³⁵⁾ H. PAULY, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 42, 508 [1904].

³⁶⁾ Angew. Chem. 67, 257 [1955]; Hersteller: Fa. L. Hormuth, Heidelberg-Wiesloch.

Tab. 2. Quantitative Bestimmung der Carboxylengruppen von Menschen- und Pferde-Hämoglobin
Spalte I: nachgewiesene μ Mole DNP-Aminosäuren. Spalte II: nachgewiesene Mole DNP-Aminosäuren/Mol Proteid (Mol.-Gew. 66700) 21)

Proteid	Menschen-Hämoglobin										Pferde-Hämoglobin		
	Proteideinwaage μ Mole	14.5					14.3					14.7	
		10	1	II	1	II	10	II	1	II	12.5	1	II
Bis-DNP-Histidin	0.152	0.70	0.144	0.66	0.198	0.89	0.196	0.96	0.176	0.96	0.204	13.6	0.220
α -DNP-Histidin	0.010	0.05	0.012	0.06	0.011	0.05	Spuren	—	0.012	0.06	—	—	—
Σ DNP-Histidin	0.162	0.75	0.156	0.72	0.209	0.94	0.196	0.96	0.188	0.86	—	—	—
DNP-Glycin	0.094	0.44	0.048	0.22	0.072	0.33	—	—	0.060	0.27	—	—	—
DNP-Serin	0.036	0.17	0.020	0.09	0.016	0.07	0.060	0.29	0.028	0.13	—	—	—
DNP-Alanin	0.012	0.06	—	—	0.016	0.07	—	—	0.014	0.06	—	—	—
DNP-Asparaginsäure + DNP-Glutaminsäure	0.004	0.02	—	—	—	—	0.016	0.07	—	—	—	—	—

Tab. 3. Quantitative Bestimmung der Carboxylengruppen von Rinder-Hämoglobin
Spalte I: nachgewiesene μ Mole DNP-Aminosäuren. Spalte II: nachgewiesene Mole DNP-Aminosäuren/Mol Proteid (Mol.-Gew. 66700) 21)

Proteid	Rinder-Hämoglobin										15.6		
	Proteideinwaage μ Mole	14.7					14.3					0.234	
		10	1	II	1	II	10	II	1	II	1	II	14
Bis-DNP-Histidin	0.190	0.86	0.100	0.92	0.192	0.90	0.230	0.98	0.200	0.86	—	—	0.220
α -DNP-Histidin	0.018	0.08	—	—	0.012	0.06	—	—	0.016	0.07	—	—	0.04
Σ DNP-Histidin	0.208	0.94	0.100	0.92	0.204	0.96	0.230	0.98	0.216	0.93	0.230	0.98	—
DNP-Glycin	0.044	0.20	0.038	0.35	0.076	0.35	0.080	0.34	0.062	0.26	0.102	0.44	—
DNP-Serin	0.028	0.13	0.020	0.18	0.056	0.26	0.042	0.18	0.028	0.12	0.064	0.27	—
DNP-Alanin	0.026	0.12	0.018	0.17	0.016	0.07	0.050	0.21	0.042	0.18	0.068	0.29	—
DNP-Asparaginsäure + DNP-Glutaminsäure	—	—	—	—	0.010	0.05	—	—	—	—	—	—	—

Tab. 4. Quantitative Bestimmung der Carboxyendgruppen von Globinen
Spalte I: nachgewiesene μ Mole DNP-Aminosäuren. Spalte II: nachgewiesene Mole DNP-Aminosäuren/Mol Protein (Mol.-Gew. 64.230) ²¹⁾

Protein	Proteineinwaage μ Mole	Hydrazinolysezeit (Stdn.)	Menschen-Globin				Pferde-Globin				Rinder-Globin			
			I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Bis-DNP-Histidin	0.220	0.90	0.188	0.78	0.215	0.89	0.190	0.79	0.220	0.91	0.230	0.95		
α -DNP-Histidin	0.010	0.04	0.016	0.06	0.014	0.06	0.014	0.06	0.016	0.07	0.012	0.05		
Σ DNP-Histidin	0.230	0.94	0.204	0.84	0.229	0.95	0.204	0.85	0.236	0.98	0.242	1.00		
DNP-Glycin	0.024	0.10	0.027	0.11	0.029	0.12	0.024	0.10	0.024	0.10	0.018	0.07		
DNP-Serin	0.019	0.08	0.024	0.10	0.029	0.12	0.020	0.08	0.014	0.06	—	—		
DNP-Alanin	—	—	—	—	—	—	—	—	0.014	0.06	0.022	0.09		

PAULYSchem Diazoreagenz³⁵⁾ sowie durch Mischphero gramm mit authent. Histidin. Die Pherogramme blieben beim Besprühen mit ammoniakalischer AgNO_3 -Lösung farblos, waren also frei von Hydraziden.

d) *Quantitative Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren:* Die chromatographisch getrennten DNP-Aminosäuren wurden nach LEVY ²⁰⁾ durch Photometrieren bei 360 m μ bestimmt. Die gemessenen Werte wurden mit Hilfe von Eichkurven, die mit synthet. DNP-Aminosäuren bestimmt wurden, in μ Mole umgerechnet. Die gefundenen Werte sind in den Spalten I der Tabb. 2—4 aufgeführt. Mit den Hämoglobin- bzw. Globin-Einwaagen errechnen sich daraus die in den Spalten II der Tabb. 2—4 angegebenen Mole Aminosäuren pro Mol Hämoglobin bzw. Globin.

e) *Bestimmung des Histidin-Verlustes:* Da bei der Hydrazinolyse und der Aufarbeitung der Hydrazinolysate ein Teil des Histidins zerstört wird bzw. verlorengeht, stellen die in den Spalten II der Tabb. 2—4 angegebenen Mole DNP-Histidin/Mol Protein nicht die Mengen des tatsächlich vorhandenen C-terminalen Histidins dar. Zur Berechnung der in Tab. 1 angegebenen Zahl der C-terminalen Aminosäuren wurde der Histidin-Verlust wie folgt bestimmt: Das 10fache der in Tab. 5 angegebenen Menge Histidin und Rinder-Hämoglobin bzw. Menschen-Globin wurde jeweils mit 1 ccm wasserfreiem Hydrazin 10—14 Std. (s. Tab. 5) auf 100° erhitzt. Die Aufarbeitung der Hydrazinolysate erfolgte wie bei den ohne Histidin-Zusatz durchgeführten Endgruppen-Bestimmungen. Für die einzelnen Bestimmungen wurde jeweils $1/10$ der Ansätze, wie beim Ovalbumin beschrieben¹⁾, mit 1 g Polyacrolein B 3 umgesetzt. Aus den Ausbeuten an DNP-Histidin (Σ Bis-DNP-Histidin + α -DNP-Histidin) errechnet sich, wie im einzelnen aus Tab. 5 hervorgeht, der dort angegebene Histidin-Verlust.

Tab. 5. Bestimmung des Histidin-Verlustes bei den hydrazinolytischen Endgruppen-Bestimmungen am Rinder-Hämoglobin und Menschen-Globin

Protein		Rinder-Hämoglobin	Menschen-Globin
Hydrazinolysezeit	(Stdn.)	10	14
Proteineinwaage	µMol	0.115	0.109
Histidineinwaage	µMol	0.230	0.230
DNP-Histidin aus Protein und Histidin	µMol *)	0.205	0.199
DNP-Histidin aus Protein	µMol **)	0.108	0.105
DNP-Histidin aus eingewogenem Histidin	µMol	0.097	0.094
Histidin-Verlust	%	58	59
			57

*) Mittelwerte, die bei je 2 Endgruppen-Bestimmungen am Rinder-Hämoglobin mit Zusatz einer gewogenen Menge Histidin erhalten wurden.

**) Berechnet aus den Mittelwerten von Tab. 3 und 4.

HEINRICH HOCK und FRANZ ERNST

Autoxydation von Kohlenwasserstoffen, XXIV¹⁾

Hydroperoxyde aus metallierten Kohlenwasserstoffen, I

Aus dem Institut für Brennstoffchemie der Bergakademie Clausthal (Harz)
(Eingegangen am 23. April 1959)

Molekularer Sauerstoff reagiert mit Alkylverbindungen des Lithiums, Magnesiums, Zinks, Cadmiums, Bors und Aluminiums primär zu Alkylmetallperoxyden, die sich zu den entsprechenden Alkylhydroperoxyden hydrolysieren lassen. Bei alkali- und magnesiumorganischen Verbindungen verläuft die Umsetzung selbst bei -150° fast momentan. Bei -10 bis $+10^\circ$ kann man aus zink- oder cadmiumorganischen Verbindungen die zugehörigen Hydroperoxyde mit Ausbeuten über 90 % d. Th. erhalten.

Bekanntlich sind die meisten Organometallverbindungen, besonders die der Leichtmetalle, äußerst luftrömpfindlich. So erhält man durch Einleiten von Sauerstoff in Lösungen von Grignard- oder Lithium-Verbindungen, die das Metall am gesättigten Kohlenstoff tragen, nach Hydrolyse der Reaktionsprodukte im allgemeinen die zugehörigen *Alkohole* in guten Ausbeuten²⁾. Daß sich bei der Einwirkung von Sauerstoff auf metallierte Kohlenwasserstoffe auch organische Peroxyde bilden, wurde bereits 1890 von V. MEYER und R. DEMUTH³⁾ beim Diäthyl-zink bemerkt; jedoch scheint

1) XXIII. Mitteil.: H. HOCK und H. KROPP, Chem. Ber. 92, 1115 [1959].

2) F. RUNGE, Organo-Metallverbindungen, Wissenschaftl. Verl.-Ges., Stuttgart, 1944, S. 138, 299.

3) Ber. dtsch. chem. Ges. 23, 394 [1890].