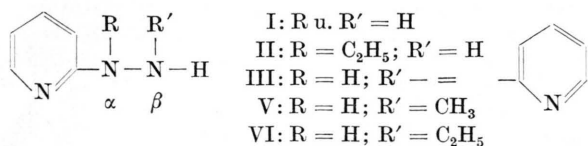
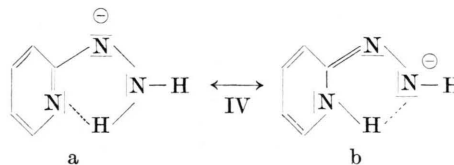


tisch quantitativ Substitution am α -Hydrazin-Stickstoff von I.



Die Bildung von II bzw. III bei der Reaktion von Natrium-2-hydrazino-pyridin mit Äthylbromid oder Pyridin zeigt, daß das Natrium oder die negative Ladung im Natrium-2-hydrazino-pyridin sowohl am α -Stickstoff als auch am β -Stickstoff lokalisiert sein kann. In dem gelben Natrium-2-hydrazino-pyridin, auf dessen salzartigen Charakter die Schwerlöslichkeit in Benzol oder Äther hinweist, liegt daher wahrscheinlich das mesomere Anion IV vor, das mit Äthylbromid in der Grenzformel IV a und mit Pyridin in der Grenzformel IV b reagiert.

³ E. FISCHER, Liebigs Ann. Chem. **199**, 287 [1879].



Die glatte Bildung von II aus der Natrium-Verbindung von I und Äthylbromid weist einen bequemen Weg zur Darstellung der α -Alkyl-Verbindungen von I. Die isomeren β -Alkyl-Verbindungen entstehen, wie wir am Beispiel der noch nicht beschriebenen Basen V (Schmp. 46 °C) und VI (Schmp. 44 °C) feststellen konnten (Ausbeuten 25–28%), durch Umsetzung der Natrium-Verbindungen entsprechend alkylierter Hydrazine mit Pyridin. — Das von FISCHER³ auf anderem Wege dargestellte Äthyl-hydrazin erhielten wir durch Umsetzung von Natrium-hydrazid mit Äthylbromid in Benzol. Zur Darstellung von VI wird es zweckmäßigerweise nicht isoliert, sondern nach Zugabe einer entsprechenden Menge Natriumamid unmittelbar mit Pyridin umgesetzt.

Hämoglobine VII*

Untersuchungen zur Konstitution der Peptidketten aus Humanhämoglobin A

Von K. HILSE und G. BRAUNITZER

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
 (Z. Naturforsch. **14b**, 603–604 [1959]; eingegangen am 1. Juli 1959)

Vor kurzem berichteten WILSON und SMITH über ein Verfahren zur Trennung der beiden Peptidketten des Pferdehämoglobins¹. Das Säulenverfahren arbeitet bei pH 2,0 unter Anwendung eines Harnstoffgradienten. HUNT² wie INGRAM³ berichteten über die Anwendung desselben Verfahrens bei Humanhämoglobin A: Durch den EDMANNschen Abbau konnte auch eine Zuordnung der N-terminalen Sequenzen zu den beiden Peptidketten erfolgen. Während das Harnstoff-Verfahren bei Pferdeglobin gute Ergebnisse liefert, gelang den englischen Autoren die Trennung der Peptidketten des menschlichen Globins nur schlecht. Unsere Versuche hatten das gleiche Ergebnis. Die Peptidketten im Humanhämoglobin sind ähnlicher und daher schwerer zu trennen. Wird jedoch das Verfahren dadurch variiert, daß die Laufgeschwindigkeit herabgesetzt wird, und die 8-m. Harnstofflösung noch zusätzlich mit Essigsäure versetzt wird, so wird zwar eine bessere Trennung erzielt, eine vollständige Trennung jedoch auch dann nicht er-

reicht, wenn die Säulenhöhe vergrößert wird (150 cm).

Wir möchten über zusätzliche Versuche berichten, die zur weiteren Charakterisierung der beiden Peptidketten (α - und β -Kette) führten. Nach Hydrazinolyse^{4,5} wurde im Humanglobin Histidin als C-terminale Aminosäure nachgewiesen. Die Wiederholung dieser Versuche an der α - und der β -Kette ergab, daß nur die β -Kette Histidin C-terminal enthält. Dieses Ergebnis konnte mit Carboxypeptidase bestätigt werden; es steht in befriedigender Übereinstimmung mit dem Befund, daß in der β -Kette nach tryptischer Spaltung Tyrosyl-Histidin⁶ als einziges Peptid ohne Lysin und Arginin erhalten wird.

In der β -Kette konnten wir auch das Peptid, in dem der Austausch einer Aminosäure bei der Sichelzellanämie, sowie das Arginylpeptid, in dem der spezifische Austausch einer Aminosäure bei Hämoglobin D stattfindet, nachweisen.

Bei der α -Kette konnten wir weder mit Hydrazinolyse noch mit Carboxypeptidase mit Sicherheit C-terminale Aminosäuren nachweisen. Schon früher berichteten wir jedoch, daß nach tryptischer Spaltung des Globins neben Tyrosyl-Histidin lediglich ein zweites Peptid mit der Bruttoformel (Glu + Gly + Ala)^{7,8} nachgewiesen wird, über dessen Position jedoch nichts ausgesagt werden konnte. Die Auffindung dieses Peptides als einziges von Lysin und Arginin freies Peptid in der α -Kette erhöht nun die Wahrscheinlichkeit, daß dieses Peptid C-terminal vorliegt.

* VI. Mitt.: V. RUDLOFF u. G. BRAUNITZER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., im Druck.

¹ S. WILSON u. D. B. SMITH, Canad. J. Biochem. Physiol. **37**, 405 [1959].

² I. HUNT, Nature [London] **183**, 1373 [1959].

³ V. M. INGRAM, Nature [London] **183**, 1795 [1959].

⁴ S. AKABORI, K. OHNO u. K. NARITA, Bull. chem. Soc. Japan **45**, 214 [1952].

⁵ G. BRAUNITZER, Chem. Ber. **88**, 2025 [1955].

⁶ G. BRAUNITZER, B. LIEBOLD, K. HILSE u. V. RUDLOFF, Angew. Chem. **71**, 376 [1959].

⁷ B. LIEBOLD u. G. BRAUNITZER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **315**, 271 [1959].

⁸ B. LIEBOLD, K. HILSE, S. SIMON u. G. BRAUNITZER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **315**, 278 [1959].

Aus Humanhämoglobin⁹, wie aus Globin⁷, kann nach geeigneter Denaturierung^{6,7} und tryptischer Spaltung bei p_H 6,4 ein Niederschlag erhalten werden, der im allgemeinen als „Core“ bezeichnet wird. Wir konnten zeigen, daß dieser Niederschlag nach chromatographischer Reinigung 2 *N*-terminale Aminosäuren enthält,

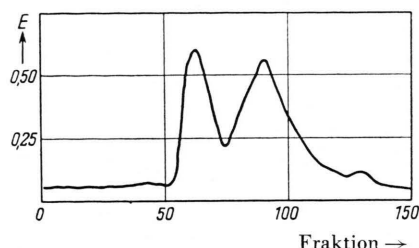


Abb. 1. Die chromatographische Analyse des Proteins aus Human-Globin A. *Versuchsbedingungen*: IRC/50, 200 bis 400 Mesh, Säulenhöhe 90 cm, Durchmesser 1,5 cm; Gradientenelution logarithmisch, Vorlage: 2-m. Harnstoff in 10-proz. Essigsäure, mit HCl auf p_H 2,0 titriert; Entwickler: 8-m. Harnstoff p_H 2,0, Temperatur 20 °C, Durchlaufgeschwindigkeit: 40 cm/Stunde. Ordinate: Extinktion bei 280 m μ ; Abszisse: Anzahl der Fraktionen.

nämlich Leucin und Valin⁶. Die Trennung der Core-Peptide gelang auf zwei verschiedenen Wegen⁶. Wir haben daher vermutet, daß im Humanhämoglobin A zwei

Core-Peptide vorliegen, die je einer der beiden Peptidketten zuzuordnen sind. Nach Auftrennung der Peptidketten konnten die beiden Core-Peptide auf einem dritten und unabhängigen Wege getrennt und charakterisiert werden, und es gelang erstmalig ihre Zuordnung zu den beiden Peptidketten. Das Core-Peptid mit der *N*-terminalen Gruppe Valin wurde aus der β -Kette isoliert, während das Core-Peptid mit der *N*-terminalen Aminosäure Leucin der α -Kette zuzuordnen ist. Hiermit ist die Existenz zweier „Core“-Peptide bewiesen und durch die Zuordnung derselben die frühere Vermutung, daß im Humanhämoglobin 2 Core vorliegen, gesichert.

Es ist wahrscheinlich, daß das Häm im nativen Hämoglobin in den Core-Peptiden lokalisiert ist. Die einfachste Deutung dieser Befunde muß dahin erfolgen, daß die Fixierung der prosthetischen Gruppen des Hämoglobins über beide Peptidketten im Bereich der Core-Peptide stattfindet.

In diesem Zusammenhang sei noch erwähnt, daß im Pferde-Hämoglobin ebenfalls Histidin als C-terminale Gruppe nachgewiesen wird⁸.

Die ausführliche Mitteilung erscheint in Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie.

Herrn Dr. D. B. SMITH, Ottawa (Canada), danken wir für die freundliche Überlassung eines Präprints.

⁹ V. M. INGRAM u. H. HUNT, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **28**, 339 [1958].

Hämoglobine VIII Zur chemischen Charakterisierung des Proteins aus Humanhämoglobin A

Von K. HILSE und G. BRAUNITZER

Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Z. Naturforschg. **14 b**, 604—606 [1959]; eingegangen am 25. Juli 1959)

In vorhergehenden Mitteilungen berichteten wir über die Spaltung des aus kristallisiertem Humanhämoglobin A dargestellten Globins durch Trypsin¹, über die qualitative Charakterisierung seiner Spaltprodukte^{2,3,4}, über ein einfaches Verfahren zur Auftrennung der tryptischen Peptide, über Dowex 1-X 2^{3,5} und über das chromatographische Verhalten der Globinkomponente⁶ über CG 50-III bei p_H 2,0 unter Anlegung eines Harnstoffgradienten nach WILSON und SMITH⁷. Hierbei konnte das Protein in 2 Komponenten aufgetrennt werden; im ersten Gipfel wurde als *N*-terminale Sequenz Valyl-Leucin, im zweiten Valyl-Histidin-Leucin gefunden. Wir haben die Proteinanteile der einzelnen Gipfel durch

Komponente	1	2	Globin ^{15,16}
<i>N</i> -terminale Sequenz	Val-Leu	Val-Hist-Leu	Val-Hist-Leu + Val-Leu
Cystein	1	2	3
Arginin	3	3	6
Tyrosin	3	3	6
Histidin	10	7,3	18
Lysin	10,7	10,2	21—22
Methionin	2	1	3
Tryptophan	1	2	3

Tab. 1. Verteilung einiger Aminosäure-Reste in den beiden Proteinanteilen aus Human-Globin A nach deren chromatographischer Auftrennung nach l. c.⁷.

Rechromatographie nachgereinigt und anschließend weiter chemisch charakterisiert.

Die quantitative Aminosäure-Analyse wurde in einem aliquoten Proteinanteil nach der Methode von SPACKMAN und MOORE^{8,9} durchgeführt. Einige der ermittelten

¹ B. LIEBOLD u. G. BRAUNITZER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **315**, 271 [1959].

² B. LIEBOLD, K. HILSE, K. SIMON u. G. BRAUNITZER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **315**, 278 [1959].

³ B. LIEBOLD, K. HILSE, V. RUDLOFF u. G. BRAUNITZER, Angew. Chem. **71**, 376 [1959].

⁴ K. HILSE u. G. BRAUNITZER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., im Druck.

⁵ V. RUDLOFF u. G. BRAUNITZER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., im Druck.

⁶ K. HILSE u. G. BRAUNITZER, Z. Naturforschg. **14 b**, 603 [1959].

⁷ S. WILSON u. D. B. SMITH, Canad. J. Biochem. Physiol. **37**, 405 [1959].

⁸ D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN u. S. MOORE, Fed. Proc. **15**, 358 [1956].

⁹ D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN u. S. MOORE, Analytic. Chem. **30**, 1190 [1958].