

## Die physikalische Chemie der Eiweißstoffe

Diskussionstagung der Faraday-Society Cambridge

6. bis 8. August 1952

Einer nützlichen Tradition und einer offensichtlichen wissenschaftlichen Notwendigkeit entsprechend, veranstaltete die *Faraday-Society* (London) vom 6. bis 8. August 1952 in Cambridge (England) eine vorbildlich durch den Sekretär der Gesellschaft *F. C. Tompkins* und *Fr. B. E. Kornitzer* organisierte und konsequent durchgeführte, internationale Diskussionstagung über physikalisch-chemische Probleme der modernen Eiweißforschung. Der Leiter der Tagung im Zoologischen Institut der Universität war *J. H. Schulman* (Cambridge), der Vorsitzende des „*Colloid and Biophysics Committee*“ der *Faraday-Society* und des Organisationskomitees. Die Zahl der Teilnehmer betrug rund 400, darunter etwa 80 aus Übersee, und zwar aus Ägypten, Australien, Belgien, Deutschland, Frankreich, Griechenland, Holland, Irland, Italien, Neuseeland, Schweden und den USA. Besonders zahlreich waren die USA, Holland und Schweden vertreten. Als besonders charakteristisch darf bemerkt werden, daß die meisten Ausländer in dem berühmten Colleges der alten Universitätsstadt untergebracht wurden und so den Geist dieser typisch englischen Bildungsstätten miterleben konnten.

Eingeleitet wurde die Tagung durch die „*6. Spiers Memorial Lecture*“ von *J. T. Edsall* (Harvard University, Boston) über: „Die molekulare Gestalt von Proteinen und einige ihrer Umsetzungen mit anderen Substanzen“, die sogleich vortrefflich in die Problematik des Diskussionsgegenstandes einführte. Dem Charakter der Tagung entsprechend, waren sämtlichen Teilnehmern einige Zeit vorher 24 umfangreiche Abhandlungen aus den verschiedensten Arbeitskreisen mit einem außerordentlich reichhaltigen experimentellen Material, die als Diskussionsgrundlage dienten, gedruckt zugänglich gemacht worden (rund 250 Seiten!). Damit war eine gute Vororientierung der Teilnehmer gewährleistet. Hinzu kam noch, daß auf der Tagung selbst den Autoren nochmals 5 min für eine kurze Erläuterung der Gesichtspunkte ihrer Manuskripte zur Verfügung standen.

Die vorgelegten Abhandlungen gruppierten sich um folgende fünf Hauptthemen: I.) Experimentelle Arbeitsmethoden, II.) Proteine mit niedrigem Molekulargewicht, III.) Systeme mit hohem Molekulargewicht, IV.) Umsetzungen mit Proteinen, V.) Konjugierte Systeme (Nucleo- und Mucoproteine). Die etwa 60 Diskussionsredner, die sich formlos aus der Versammlung meldeten und denen jeweils etwa 5 min Sprechzeit zugebilligt wurde, ergänzten die vorgelegten Abhandlungen mitunter auch durch wesentlich neue experimentelle Befunde. Verhandlungssprache war Englisch. Die Diskussionen zu den Hauptthemen leiteten nacheinander die Professoren *J. H. Schulman* (Cambridge), *J. T. Edsall* (Boston), *W. T. Astbury* (Leeds), *L. Pauling* (Pasadena) und *M. Stacey* (Birmingham). Im folgenden wird versucht, im Anschluß an eine kurze Charakterisierung der präsentierten Manuskripte die wesentlichsten Gesichtspunkte der lebhaft geführten Diskussion vor Augen zu führen.

*A. TISELIUS*, Upsala: *Zonenelektrophorese in Filtrierpapier und anderen Medien* (vorgetr. von *P. Flodin*, Upsala).

Als unbewegliche Phase lassen sich Filtrierpapierstreifen und -pulver, Glasperlen, Stärke und Gels verwenden. Die Zonenelektrophorese hieran besitzt als Trennungsmethode Vorteile gegenüber der sonst üblichen Technik, liefert völlig getrennte Zonen und ist auch als Mikromethode und bei geringen Konzentrationen und für Verbindungen mit kleinem Molekulargewicht (Aminosäuren, Peptide, Nucleotide usw.) brauchbar. Zonenelektrophoretische Messungen sind zur Bestimmung von Wanderungsgeschwindigkeiten und isoelektrischen Punkten geeignet.

In der Diskussion berichtete *P. Flodin* (Upsala) über papier-elektrophoretische Untersuchungen, bei denen der Papieroberfläche die gleiche Ladung wie die der zu untersuchenden Substanz erteilt wurde. Dieses erreichte man durch Behandlung des Filtrierpapiers mit 2-Aminoäthyl-schwefelsäure. Das verbehandelte Papier mit freien  $\text{NH}_2$ -Gruppen besitzt Anionenaustauschereigenschaften; für positiv geladene Substanzen kann es mit  $\text{HCl}$  in seine  $\text{NH}_3^+$ -Form übergeführt werden. Serum ließ sich damit bei  $\text{pH}$  8,6 in wenigen Versuchen in Komponenten zerlegen. Weiterhin beschrieb *R. Consden* (Maidenhead) eine einfache Apparatur für Papierlektrophorese für Routineuntersuchungen, bei der das sonst mit einem Elektrolyten befeuchtete Papier mit einer organischen Flüssigkeit (z. B. Chlorbenzol) als Kühlmittel bedeckt wird, was gleichzeitig das Verdunsten des Elektrolyten verhindert. *E. L. Durrumm* (Washington) erinnerte

in Bezug auf die historische Entwicklung von Papierlektrophorese und kontinuierlicher Elektrophorese (*Svensson* und *Brattsten*, *Graßmann* und *Hannig*) an die Mitteilung von *Klobusitzky* und *König* (Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 192, 271 [1939]) und an das US-Patent 2555487 von *Haugaard* und *Kroner* aus dem Jahre 1948. *E. Barbu* (Paris) wies darauf hin, daß sich polydisperse Proteinaggregate mittels der Papierzonenelektrophorese trennen lassen.

*G. WEBER*, Cambridge (England): *Polarisation der Fluoreszenz von gekennzeichneten Protein-Molekeln*.

Messungen der Fluoreszenzpolarisation von Proteinkonjugaten, für die eine Reinigung durch Ionenaustausch beschrieben wird. Papierchromatographie diente zur Unterscheidung reversibler Adsorption und chemischer Vereinigung kleiner Molekeln mit Proteinen. Die reversible Protein-Dissoziation, die z. B. mit Rinder Serumalbumin in saurer Lösung (um  $\text{pH}$  1,8) nach mehreren Methoden (Sedimentations- und Diffusionsmessungen) beweisbar ist, hängt in Gegenwart von Neutralsalzen vom Anion ab; ihre Umkehr steigt in der Reihenfolge  $\text{Cl} < \text{Br} < \text{NO}_3 < \text{SCN} < \text{p-Toluolsulfonat}$ . Die elektrostatische Abstoßung zwischen Untereinheiten soll für die Säuredissoziation unentbehrlich sein.

*G. Ogston* (Oxford) macht hierzu darauf aufmerksam, daß auch das Albumin-Dissoziationsgleichgewicht den thermodynamischen Gesetzen gehorchen müsse. Wenn daher, wie mitgeteilt wurde, Verdünnung das Gleichgewicht nicht beeinflusst, dann kann sich auch die Zahl der gelösten Partikelchen nicht ändern. Auch *K. O. Pedersen* (Upsala) wundert sich über die Dissoziation von Serumalbumin in sauren Lösungen und weist darauf hin, daß zwischen  $\text{pH}$  2,3 und 3 solche Molekeln eine ausgesprochene Veränderung erleiden, ohne daß sich merkwürdigerweise das Molekulargewicht ändert.

*J. S. FALCONER*, *D. J. JENDEN*, *D. B. TAYLOR*, San Francisco: *Über die Anwendung von Löslichkeitsmessungen auf das Studium komplexer Protein-Lösungen und für die Isolierung von Einzelproteinen* (vorgetr. von *D. B. Taylor*).

Der Einfluß der Gesamteiweißkonzentration auf die Abtrennung von zwei Einzelkomponenten wurde theoretisch behandelt. Im Anschluß daran wurde eine neue Methode zur Fraktionierung von Rattenleber mitgeteilt, beruhend auf der Unlöslichkeit von Proteinen in starken Salzlösungen.

In der Diskussion macht u. a. *G. S. Adair* (Cambridge) auf die Nützlichkeit der von den Autoren angegebenen Kriterien für die Reinheitsbestimmung eines Proteins aufmerksam. Zum Hauptthema berichtet schließlich noch *B. Robert* (Paris) über die ausgeprägten Konfigurationsänderungen der meisten Proteine bei  $\text{pH}$ -Werten um 9, wobei sich sofort physikalische und chemische Eigenschaften ändern. Diese Konfigurationsänderung ist beim Serumalbumin mit dem Auftreten von SH-Gruppen verbunden, die Eisen(III)-Kaliumcyanid bei  $\text{pH}$  8,5 reduzieren und oberhalb  $\text{pH}$  10 von Luft oxydiert werden. Die Guanidin-Gruppen des Arginins und die Cystin-S-S-Bindungen sollen an der Stabilität der Albumin-Molekel beteiligt sein. Die Strukturänderung oberhalb  $\text{pH}$  9 ist nur dann reversibel, wenn Oxydationsmöglichkeit der Molekel ausgeschlossen wird.

*P. DOTY*, *G. E. MYERS*, Cambridge (Mass.): *Thermodynamik der Assoziation von Insulin-Molekeln* (vorgetr. von *P. Doty*).

Die Untersuchung der Lichtstreuung von Insulin-Lösungen bei  $\text{pH}$  1,9 und 2,6 in 0,1 mol.  $\text{NaCl}$  und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  gestattet die Berechnung der Konstanten, die das Gleichgewicht zwischen Mono-, Di- und Trimeren beherrschen. Variation der Konstanten kann vielleicht durch Änderung der elektrostatischen Abstoßung erklärt werden. Wärmetönungen und Entropien ergaben sich aus Messungen im Temperaturbereich 20 bis 40 °C. Sie sind überraschend niedrig und lassen eine erhöhte Solvatation des Monomeren vermuten.

In der Diskussion wandte sich *H. Neurath* (Washington) gegen die Sicherheit der gezogenen Schlüsse; er glaubt, daß die abgeleiteten thermodynamischen Konstanten keine absolute Bedeutung zu haben brauchen. Kristallisierte Zn-Insulin-Präparate können sich beträchtlich in ihrer Lichtstreuung unterscheiden, was nicht nur von ihrer Herkunft abhängt. Neueste Messungen der Sedimentationskonstanten ergaben für Insulin ein Mindestmolekulargewicht von 12000. Der von anderer Seite mitgeteilte

Wert von 6000 darf jedoch auch nicht ignoriert werden. Im Hinblick auf analoge Verhältnisse bei der Vereinigung von Proteinen mit Farbstoffen oder von Antigenproteinen mit Antikörpern fragte F. Haurowitz (Bloomington, Ind.), ob die Entropieerhöhung nicht auf eine Dehydratation ionisierter Gruppen zurückgeführt werden könne.

L. W. CUNNINGHAM, F. TIETZE, M. M. CREAM, H. NEURATH, Seattle (Wash.): *Molekularkinetische Eigenschaften von Trypsin und verwandten Proteinen* (vorgetr. von H. Neurath).

Das Sedimentationsverhalten von Trypsin hängt in für enzymatische Aktivität günstigen  $p_H$ -Bereichen ab von Alter und  $p_H$  der Lösung und zeigt ein konzentrationsabhängiges Gleichgewicht von Monomeren und Polymeren. Die Veränderung der Sedimentationskonstanten mit der Zeit fällt zusammen mit einem Abfall der enzymatischen Aktivität (Autolyse). Kristallisiertes Trypsin und umkristallisiertes Trypsinogen besitzen keine solchen Sedimentationsanomalien. Bei enzymatisch inaktiven Proteinen ist die Sedimentation unabhängig von Zeit und  $p_H$ . Für sie wird ein Molekulargewicht von etwa 24000 errechnet.

G. E. PERLMANN, New York: *Elektrophoretische Studien an enzymatisch verändertem Ovalbumin und Kasein*.

Die elektrophoretische Analyse ist eine empfindliche Methode zum Studium von enzymatischen Reaktionen an geladenen Gruppen. Die hier diskutierten Veränderungen schließen Reaktionen ein, bei denen Carboxyl- und Phosphat-Gruppen aus den Proteinen (Ovalbumin, Kasein) entfernt werden.

E. BARBU und M. JOLY, Paris: *Die globulär-fibrilläre Protein-Umwandlung* (vorgetr. von M. Joly).

Der Vorgang der Umwandlung globulärer Proteine in fibrilläre Proteine etwa durch mäßiges Erhitzen, Salzeffekt oder hohen Druck wurde nach verschiedenen Methoden studiert. Das Problem dabei ist, ob diese Umwandlung zurückzuführen ist entweder auf eine Entfaltung der Peptidketten oder auf eine End-zu-End-Aggregation globulär bleibender Molekeln. Zahlreiche experimentelle Tatsachen sprechen für die zweite Annahme. Die Denaturierung der Proteinmolekeln ist ein Aktivierungsprozess.

In der Diskussion äußerte sich W. T. Astbury (Leeds) in prinzipiellen Ausführungen und legte zunächst dar, daß aus eigenen Röntgenstrahlenuntersuchungen nicht gefolgert wurde, daß die Denaturierung von korpuskularen Proteinen immer zu einer vollständigen Entfaltung der Peptidketten führen müsse. Es tritt vielmehr nur eine Desorganisation ein, die je nach Intensität der Behandlung in jene Richtung weist, von intramolekularen Bindungen abhängt und die schließlich in einer Aggregation zu  $\beta$ -Bündeln kulminiert. Die Vorstellung, daß dieser Vorgang von einer Aggregation unveränderter korpuskularer Einheiten herühre, bereitet nach Astbury Schwierigkeiten. Solche Prozesse werden nur bei der Biogenese von Proteinfasern (etwa aus Tropomyosin oder Actin) für möglich gehalten. Auch W. E. F. Naismith (Dumfries) zieht zur Erklärung von Viscositätsänderungen in alkalischen Lösungen von Erdnußprotein, die zur Faserherstellung dienen, die Hypothese von Astbury vor und F. Haurowitz (Bloomington, Ind.) warf die berechtigte Frage auf, ob alle Arten von Denaturierung wirklich immer mit einem Übergang des globulären in den fibrillären Zustand verbunden sind. Schließlich stellte M. Joly (Paris) abschließend nochmals 7 Gesichtspunkte heraus, die für seine Ansicht sprechen (Untersuchungen an denaturiertem Serumalbumin). U. a. wurde dabei darauf verwiesen, daß die nach Denaturierung erhaltenen Partikelchen häufig viel länger als die Gesamtlänge einer Polypeptidkette sind, daß die Partikelchen sich in der Nähe des isoelektrischen Punktes vergrößern und daß die zum Aufbrechen eines denaturierten Partikelchens notwendige Energie beträchtlich geringer als für eine covalente Bindung ist.

P. JOHNSON und W. E. F. NAISMITH, Cambridge: *Physikalisch-chemische Prüfung der Conarachin-Fraktion der Erdnußglobuline (Arachis hypogaea)*, (vorgetr. von W. E. F. Naismith).

In der Conarachin-Fraktion der Erdnußglobuline lassen sich mit der Ultrazentrifuge und durch Lichtstreuung Assoziations-Dissoziationsreaktionen beobachten. Der dissoziierte Zustand, der einem Mol.gew. von etwa 190000 entspricht, wird durch hohe Ionenstärke und hohes  $p_H$  begünstigt, während durch entgegengesetzte Bedingungen der Assoziationsgrad steigt. Es entstehen wenigstens vier neue Systeme mit Molekulargewichten bis zu  $2 \cdot 10^6$  und die Gleichgewichte werden innerhalb einer Minute erreicht. Elektrophorese zeigt diese Veränderungen nicht an (elektrophoretische Beweglichkeit daher vom Assoziationsgrad unabhängig).

In der Diskussion weist G. A. Gilbert (Birmingham) auf den wichtigen Einfluß der Sedimentation auf das zu studierende

Gleichgewicht hin. Wenn z. B. ein Dimeres oberhalb eines Monomeren sedimentiert, wird das Gleichgewicht des Systems gestört und das Monomere assoziiert sich unter Bildung des Dimeren. Dieser Komplikation der Interpretierung der Sedimentation wird von P. Johnson beigeplichtet.

S. SHULMAN, Buffalo (vorgelegt von J. T. Edsall): *Einwirkung gewisser Ionen und neutraler Molekeln auf die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin*.

Von etwa 40 Substanzen wurde mitgeteilt, daß sie die Fibrinogen-Gerinnung durch Thrombin um mindestens 24 h hemmen. Hierher gehören z. B.: Glykole, Cyclohexandiol, Harnstoff, Semicarbazid, Formamid, Cystein, Guanidin, Histamin, Imidazol, Na-ascorbinat, Na-benzolsulfonat,  $Na_2S_2O_8$ , NaSCN,  $Na_2SO_4$ , NaBr, NaJ. Eine viel geringere Verzögerung ergeben: Äthylenglykol, Glycerin, Mannit, Äthanol, Cyclohexanol, Biuret, Glykokoll, Taurin, Histidin, Lysin, Methylamin,  $Na_2S_2O_3$ , NaCl. Diese Hemmung, die sich sogar noch nach Zugabe des Thrombins erzeugen läßt, ist reversibel. Es wird versucht, zwischen Struktur und Wirksamkeit der Hemmstoffe Beziehungen aufzufinden.

L. Nanninga (Leiden) diskutiert die Frage, ob der Inhibitor Fibrinogen oder Thrombin beeinflußt; der Inhibitor sollte mit Thrombin gemischt und die Mischung dann an Fibrinogen geprüft werden.

G. HAMOIR, Lüttich: *Elektrophoretische Untersuchung der Strukturproteine des Muskels*.

Die Elektrophorese scheint zur Untersuchung von Mischungen der Hauptproteine der Myofibrillen (Actomyosin, Actin, Myosin, Tropomyosin) weit nützlicher zu sein als die Ultrazentrifugierung, die vor allem bei reinen Proteinen in Frage kommt.

Auf eine Diskussionsbemerkung von P. Johnson (Cambridge) teilte Vortr. mit, daß bei der Ionenstärke 0,35 bis 0,4 und bei neutraler Reaktion in den elektrophoretischen Versuchen nie eine Dissoziation von Actomyosin in Actin und Myosin beobachtet wurde.

M. MORALES, J. BOTTS und T. L. HILL, Bethesda: *Energetik und molekularer Mechanismus der Muskelkontraktion*.

I. Teil: *Übersicht über eine Theorie der Muskelkontraktion und ihre experimentelle Grundlage* (vorgetr. von M. Morales).

Es werden zusammengefaßt thermoelastische Studien an Myosinfäden, Lichtstreuungsstudien an dem Myosin-ATP-System und eine kinetische Analyse der Myosin-ATP-ase. Interpretation der Resultate durch eine Theorie, die annimmt, daß die elastische Myosin-Partikel Gegenstand einer kontraktiven Entropiekraft und einer extensilen elektrostatischen Abstoßungskraft ist.

2. Teil: *Statistisch-thermodynamische Behandlung der kontraktiven Systeme* (vorgetr. von T. L. Hill).

Für das fundamentale elastische Element im Muskel werden verschiedene Modelle illustriert. Vielleicht sind Phasenveränderungen kombiniert mit relativ kleinen Änderungen im Ladungszustand für die Natur der Muskelkontraktion verantwortlich.

An der Diskussion beteiligten sich hier A. Weissermann (London), A. G. Ogston (Oxford), W. T. Astbury (Leeds) und J. T. Edsall (Boston). Weissermann betrachtet Actomyosin als einen biegsamen, kettenähnlichen Polyelektrolyten (keine starre Struktur und reversible Polymerisation), während Ogston auf Schwierigkeiten hinweist, wenn man die Einwirkung von ATP auf Viscosität und Sedimentation von Actomyosin durch Änderung von Volumen und Gestalt und nicht durch Dissoziation erklären will. Nach Astbury darf eine Theorie der Muskelkontraktion das Actin nicht vernachlässigen. Denn die Makroperiode (etwa 400 Å), die kontinuierlich entlang der kontraktiven Fibrillen verläuft, stellt eine Folge von Myosin-Ketten parallel mit einer regulären Reihe von Actin-Einheiten dar. Edsall erinnert daran, daß die vorgelegte Anschauung bereits in der alten Grundidee von K. H. Meyer mitenthalten war, und hebt die Wichtigkeit der Bestimmung der Spannungsenergien des Muskels (Hill) und des Befundes von der Abspaltung von ATP aus Muskelfasern und Actomyosin-Fäden (Weber) hervor.

E. M. PETRI und A. J. STAVERMAN, Delft: *Elektrochemische Eigenschaften von Lupinensamenprotein* (vorgetr. von E. M. Petri).

Membranen aus reinem Lupinensamenprotein wurden hergestellt und in ihren elektrochemischen Eigenschaften studiert. Diese Prüfmethode ist auch für das Verständnis chemischer Proteinveränderungen, etwa bei ihrer praktischen Verwertung, sehr geeignet.

Diskussion: Nach K. H. Gustavson eignet sich die Bestimmung des Dialysenpotentials von Proteinmembranen ausgezeichnet zur Ermittlung des isoelektrischen Punktes von unlöslichen und ver-

änderten Proteinen. *Gustavson* bespricht auch noch eigene Versuche über Hautkollagen, besonders was die Bildung der Cr-Komplexe und der  $\text{CH}_2\text{O}$ -Bindung anlangt. Kollagen gibt bei  $p_{\text{H}}$  7–8 mit  $\text{CH}_2\text{O}$  starke Brückenbindung. Bei niedrigen  $p_{\text{H}}$ -Werten benötigt Fixierung sehr hohe  $\text{CH}_2\text{O}$ -Konzentrationen. Auch *M. G. ter Horst* (Leeuwarden, Ndl.), diskutierte das  $\text{CH}_2\text{O}$ -Bindungsvermögen von Proteinen (Kasein). Die Menge an gebundenem  $\text{CH}_2\text{O}$  nimmt von  $p_{\text{H}}$  9–1 ständig ab. In stark saurer Lösung soll die  $\epsilon\text{-NH}_2$ -Gruppe der Lysin-Reste nicht mit  $\text{CH}_2\text{O}$  reagieren.

*E. J. COHN, D. M. SURGENOR, K. SCHMID, W. H. BATCHELOR* und *H. C. ISLIKER*, Boston: *Die Reaktion von Plasmaproteinen mit Schwermetallen und Erdalkalien, mit spezif. Anionen und spezif. Steroiden, mit spezif. Polysacchariden und mit Form-Elementen des Blutes* (vorgetr. von *H. C. Isliker*).

Die mit Plasmaproteinen und Schwermetallen im physiologischen  $p_{\text{H}}$ -Bereich entstehenden Komplexe sind neue gesättigte Substanzen und im allgemeinen weniger löslich als die dissoziierten Proteine. Zn-Komplexe mancher Globuline sind in Wasser unlöslich. Zn-Komplexe von Albuminen und gewissen Pseudoglobulinen wasserlöslich, Zn-Hg-Komplexe dieser Proteine jedoch wasserunlöslich. Ca und Ba können unlösliche Komplexe geben, können aber auch lösend wirken. Mg und Mn sind auch an Enzymumsetzungen beteiligt. Cu und Fe scheinen fast ausschließlich mit Caeruloplasmin und dem  $\beta_1$ -metallbindenden Protein verbunden zu sein. Pb erwies sich auch als nützlich zur Abtrennung der kleineren Proteine des Plasmas, einschließlich des sauren Glykoproteins.

In der Diskussion berichtete *A. Schöberl* (Hannover) über den Eintritt großer Cu-Mengen in Cystin-reiche Proteine und *B. Robert* (Paris) referierte über den Einfluß von Cu auf die Autoxydation von Proteinen mit SH-Gruppen, wobei drei Phasen zu unterscheiden sind und Cu beschleunigende und hemmende Effekte auslöst. Dies hängt von der Zahl der pro Protein-Molekel gebundenen Cu-Atome ab. *L. Robert* (Paris) fand, daß spezifische Metall-Protein-Reaktionen mit Vorteil zur Abtrennung von Enzymen aus Protein-Mischungen benutzt werden können. Die Hg-Hemmung von Serumcholinesterase unterscheidet sich im Mechanismus von anderen Hemmstoffen.  $\text{Hg}^{2+}$  und Acetylcholin konkurrieren vermutlich um die SH-Gruppe der Cholinesterase.

*J. M. KLOTZ* und *J. AYERS*, Evanston: *Proteinreaktionen mit organischen Molekeln* (vorgetr. von *J. M. Klotz*).

Der Bericht versuchte, mannigfaltige experimentelle Tatsachen zu einem vernünftigen molekularen Bild zu koordinieren. Zunächst wurden viele Anionen-Komplexe von Serumalbumin besprochen, z. B. mit Ionen organischer Säuren (Essig-, Valerian-, Capronsäure usw.), mit Octylsulfat-, Decylsulfat-, Methylorange- und Azosulfathiazol-Ionen. Die Umsetzungen von Proteinen mit Kationen sind teilweise denen mit Anionen ähnlich, zeigen aber auch beträchtliche Unterschiede. Als Beispiel einer neutralen organischen Molekel wurde die Bindungsfähigkeit von p-Aminoazobenzol an Albumin studiert, die mit dem  $p_{\text{H}}$  zunimmt. Das gleiche ist mit Chrysoidin der Fall ( $p_{\text{H}}$ -Bereich 4–9). Zahlreiche Beobachtungen zeigen, daß Serumalbumin bei  $p_{\text{H}}$ -Änderung seiner Umgebung beträchtliche konfigurative Veränderungen erleidet. Die Ergebnisse werden im Sinne der Anwesenheit polarer Reste in den Proteinmolekeln gedeutet.

In der Diskussion ergänzte *K. H. Gustavson* die Befunde von *Klotz* durch Bemerkungen über Kollagen aus Fischhaut, das gegenüber H- und OH-Ionen und Anionen sehr empfindlich ist. Die Fischkollagenstruktur besitzt geringere Starrheit als die von Rinderhautkollagen, was vielleicht mit dem geringeren Gehalt an OH-Gruppen (weniger Oxyprolin) zusammenhängt. Oxyaminosäure-Reste spielen hier bei der Bindung neutraler Molekeln (Tannin, Cr-Komplexe) eine Rolle. *J. M. Luck* (Stanford Univ., Calif.) meinte, daß die Bindung aliphatischer Ionen auch von der Seitenkette, nicht nur von den positiv geladenen Gruppen des Proteins abhängt. Die freie Energie der Bindung steigt nämlich mit zunehmender Länge der nichtpolaren Seitenkette. Vermutlich wirken also bei der Bindung aliphatischer Anionen elektrostatische Assoziation und Brückenbindung durch van der Waals'sche Kräfte zusammen. Auch *B. Robert* (Paris) beobachtete Variation der Affinität von Serumalbumin-Molekeln mit dem  $p_{\text{H}}$ , was – besonders oberhalb  $p_{\text{H}}$  8–9 – für eine Beteiligung von SH-Gruppen sprechen soll.

*B. S. HARRAP* und *J. H. SCHULMAN*, Cambridge: *Der Salzeinfluß auf Größe und Gestalt eines Protein-Seife-Komplexes* (vorgetr. von *J. H. Schulman*).

Studien von Viscosität und Lichtstreuung wäßriger Lösungen von Rinderserumalbumin (=A) und Na-Dodecyl-sulfat (=D) bei ganz verschiedenen Verhältnissen von A zu D. In Salzlösungen (0,05 mol. NaCl) sind stöchiometrische Komplexe  $\text{AD}_n$  und  $\text{AD}_{2n}$  wahrscheinlich, bei höherer D-Konzentration auch Bildung von

$\text{AD}_{4n}$ , der beim Verdünnen und Abkühlen zu  $\text{AD}_{2n}$  und D dissoziiert. Die größte Dimension der Komplexe beträgt weniger als 400 Å. In salzfreien Lösungen wird kein  $\text{AD}_n$  gebildet.

*B. A. Pethica* (Birmingham) kann die Bildung solcher Komplexe durch calorimetrische Messungen bei  $p_{\text{H}}$  6,8 bestätigen.

*E. GORTER* und *L. NANNINGA*, Leiden: *Komplexe zwischen Heparin und Proteinen* (vorgetr. von *L. Nanninga*).

Das negativ geladene Heparin (viele  $\text{SO}_3^-$ -Gruppen) bildet mit Proteinen (z. B. Serum-, Ovalbumin, Thrombin, Lipoproteine, Thromboplastin) salzartige Komplexe, auch oberhalb des isoelektrischen Punktes. Diese Umsetzungen wurden nach sechs verschiedenen Methoden studiert (z. B. durch Elektrophorese, Trübungsmessungen, Bestimmung von Gerinnungszeiten). Auch das Suramin ist einer solchen Komplexbildung fähig.

*K. Walton* (Birmingham) berichtete anschließend über die Komplexbildung zwischen Fibrinogen und Heparin und verglich dabei das Heparin mit Schwefelsäureestern von Polysacchariden von verschiedener Molekulargröße. Es gibt Dextransulfate, die im physiologischen  $p_{\text{H}}$ -Bereich unlösliche Komplexe mit Fibrinogen bilden. Oberhalb des isoelektrischen Punktes ist die Komplexbildung wahrscheinlich auf nichtionische Kräfte zurückzuführen. Die Beobachtungen sind klinisch von Interesse (therapeutisch benutzbare Antikoagulationsmittel).

*M. FLEMING* und *D. O. JORDAN*, Nottingham: *Reaktionen zwischen Nucleinsäure und Protein – eine elektrophoretische Untersuchung von Kalbsthymus-desoxyribose-nucleoprotein und von Tabakmosaikvirus* (vorgetr. von *D. O. Jordan*).

Änderungen im  $p_{\text{H}}$  und in der Ionenstärke ergaben eine Variation der elektrophoretischen Beweglichkeit des Desoxyribose-nucleoproteins aus Kalbsthymus und von Tabakmosaikvirus. Nach längerer Elektrophorese wurden die Fraktionen auf Nucleoprotein und Nucleinsäure analysiert. Das Nucleoprotein dissoziiert in zwei Fraktionen, von denen eine bei  $p_{\text{H}}$  12 reines Protein war. Es wird geschlossen, daß unter den gewählten Bedingungen folgende Dissoziation stattfindet:  $(np)' \rightleftharpoons p + (np)''$ , wobei  $(np)'$  und  $(np)''$  verschiedene Nucleoproteine darstellen und p Protein ist.

*D. Hamer* (Birmingham) wies in der Diskussion vor allem auf die säurelöslichen und säureunlöslichen (= „Restprotein“) Proteinkomponenten, die verschieden voneinander sind, in Nucleoproteinen hin. Das „Restprotein“ ließ sich bis jetzt noch nicht undenaturiert von der Nucleinsäure abtrennen. Auch *J. A. V. Buller* (London) beschäftigte sich mit der Frage der Abspaltung von Protein aus Thymusnucleoprotein, die sich beispielsweise durch Äthanol-Fällung konzentrierter Salzlösungen des Nucleoproteins teilweise erreichen läßt.

*M. STACEY*, Birmingham: *Konjugierte Proteine*.

Vortr. gab zunächst eine Übersicht über Protein-Nucleinsäure- und Protein-Kohlehydrat-Komplexe. Im besonderen beschäftigte er sich mit den bisher von Eiweißchemikern vernachlässigten Mucoproteinen, die durch Hitze nicht koaguliert und von den üblichen Protein-Fällungsmitteln nicht gefällt werden. Bei der Untersuchung eines Ovomucoids wurde festgestellt, daß der Kohlehydratanteil ein hochverzweigtes Oligosaccharid mit N-Acetylglucosamin- und Galactose-Resten war. Die Art der Bindung der Peptidkette an dem Glucosamin-Rest ist noch unbekannt. Eine Sprengung dieser Bindung ist nur durch ziemlich starke Alkalibehandlung möglich. Eine ähnliche Oligosaccharid-Einheit ließ sich auch in einem Serum-mucoprotein feststellen. Noch eine Reihe von Mucoproteinen in Serum und Urin harren der Untersuchung. Manche Mucoproteine können durch Adsorption an Benzoesäure abgetrennt werden. Ihre Molekulargewichte liegen um 100000. Vortr. hat mit der Bearbeitung von Mucoproteinen aus Baumwollsaamen, Bakterien und Melasse („künstliche“ Mucoproteine) begonnen.

*R. Cosden* (Maidenhead) teilte in der Diskussion mit, daß auf dreierlei Weise dargestellte Fibrin-Präparate nach Säurehydrolyse beträchtliche Mengen von reduzierenden Zuckern (3,8–4,8 %) und ein Hexosamin (0,8–1,2 %) lieferten. Fibrin enthält also ein Polysaccharid. Gleiches gilt für Fibrinogen (4,6 % reduz. Zucker, 1,1 % Hexosamin). Durch Papierionophorese ließen sich in den Hydrolysaten Hexosamin, Mannose und Galactose identifizieren. Zu den Blutgruppensubstanzen meinte *F. Haurowitz* (Bloomington, Ind.), daß die Oberfläche ihrer Makromolekeln von Kohlehydrat-Resten und nicht von Aminosäuren gebildet wird. *J. T. Edsall* (Boston) machte schließlich noch Angaben über ein merkwürdiges, saures, äußerst leicht lösliches Glykoprotein mit einem isoelektrischen Punkt bei  $p_{\text{H}}$  2,7, das aus menschlichem Plasma kristallisiert erhalten wurde (Gehalt im Plasma um 0,7 % des Gesamtproteins). Fällung möglich aus alkoholischer Lösung in Gegenwart von Ba-Ionen. Gehalt an Hexose 17 % (!), an Hexosamin 12 %.

F. B. SEIBERT, Philadelphia: *Tuberkulinproteine*.

Vier Proteinpräparate aus nicht erhitzten Tuberkulin-Filtraten und ein Präparat aus lebenden Bazillenkörpern wurden in ihren chemischen, physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften verglichen.

K. MEYER, New York: *Hyaluronsäure, Chondroitinsulfate und ihre Protein Komplexe*.

Die Beweise für die Existenz von Proteinkomplexen mit Hyaluronsäure und Chondroitinsulfaten aus Knorpel und Bindegewebe wurden zusammengefaßt. Sehr wahrscheinlich liegen reversible polare Komplexe vor. Der irreversible Verlust der Viscosität bei der Isolierung kann auf Depolarisation der Kohlenhydratkette zurückgeführt werden.

A. G. OGSTON (Oxford) weist darauf hin, daß bei der Beurteilung analytischer Daten auf den komplexen Familienbegriff der „Hyaluronsäuren“ geachtet werden müsse.

E. J. AMBROSE und J. A. V. BUTLER, London: *Quellungs- und Orientierungserscheinungen an Nucleoprotein-Filmen* (vorgelegt von E. J. Ambrose).

Filme aus Nucleoproteinen, hergestellt durch Gefrierdrying dünner Schichten von Lösungen, quellen in Wasser etwa um das 6-fache ihrer Fläche. Diese Quellung wird durch geringe Konzentrationen polyvalenter Kationen gehemmt, und bei höherer Konzentration tritt eine Kontraktion des Filmes ein. Die zur Verhinderung der Quellung nötige Salzkonzentration ist die gleiche wie jene zur Fällung des Nucleoproteins aus einer verdünnten Lösung notwendige Konzentration. Trockenfilme wurden ebenfalls hergestellt, in denen die Fasern bis zu einem gewissen Grad orientiert sind.

R. D. B. FRASER (London) berichtete dazu über Versuche an hochorientierten Desoxyribosenucleoprotein aus den Köpfchen von Octopusperma, die abgetrennt und auf AgCl-Platten aufgereicht wurden.

A. G. OGSTON und J. E. STANIER, Oxford: *Zusammensetzung und Eigenschaften eines Hyaluronsäure-Komplexes aus Ochsen synovialflüssigkeit* (vorgelegt von A. G. Ogston).

Isolierung von Hyaluronsäure durch Ultrafiltration gibt ein Material mit unveränderten physikalischen Eigenschaften; Fäl-

lungsmethoden beeinflussen diese. Die Substanz enthielt etwa 27 % Protein, der Rest bestand zum größten Teil aus Glucuronsäure, Acetylglucosamin und Asche. Der native Hyaluronsäure-Komplex besitzt fast sphärische Gestalt und ist sehr stark hydratisiert.

Anschließend diskutierte R. CONSDEN (Maidenhead) ausführlich über die Zusammensetzung verschiedener Hyaluronsäure-Präparate auf Grund von Untersuchungen der Hydrolysate mittels Papierionophorese und -chromatographie. Die Hyaluronsäure von OGSTON ergab Galactose und Mannose (3–5 %). Auch Präparate aus menschlicher Nabelschnur enthielten Galactose und Glucose, aber wenig oder keine Mannose. Hyaluronate verschiedener Herkunft, die während ihrer Darstellung mit proteolytischen Fermenten behandelt wurden und teilweise depolymerisiert waren, enthielten viel weniger oder gar keine neutralen Zucker. Da diese in nativen Präparaten auch nach Entfernung des größten Teiles des Proteins in gleicher Menge anwesend sind, glaubt CONSDEN, daß sie wirklich einen Teil des Kohlehydratkomplexes ausmachen und nicht zu dem assoziierten Protein gehören.

Besonderes Interesse fand ein eingeschobener Vortrag von L. PAULING, Pasadena: „Über die Aggregation globulärer Proteine“, in dem dieser seine neue, originelle Idee von der Fibrillenentstehung durch schraubenförmige Verknüpfung monomerer Einheiten auseinandersetzt<sup>1)</sup>. PAULING nimmt an, daß die sich polymerisierende Molekel asymmetrisch ist und zwei lokalisierte Haftstellen in ihr die Aneinanderreihung der Partikelchen ermöglichen, so daß „Spiralfedern“ von Protein-Molekeln entstehen. Diese sich im Stadium der Entwicklung befindliche Theorie wird zwar noch nicht allgemein angenommen, wie auch die Cambridgeer Diskussion hierüber (Butler, Edsall) zeigte, muß aber doch als geistreiche Interpretation immer noch unklarer Zustandsformen von Eiweißaggregaten gewertet werden.

Die Diskussionstagung machte in hervorragender Weise die Problematik der gegenwärtigen Eiweißforschung klar. Sie zeigte die Notwendigkeit subtilster Arbeitsmethoden zur Ermittlung zahlreicher Einzeltatsachen. So hat die Tagung der zukünftigen Proteinforschung einen großen Dienst erwiesen. Bedauerlich ist, daß die deutsche Forschung nur durch einen einzigen Teilnehmer (Berichterstatler) vertreten war. A. Schöberl [VB 464]

<sup>1)</sup> Vgl. diese Ztschr. 65, 220 [1953].

## Rundschau

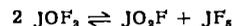
Eine Abtrennung des Technetiums von Molybdän, aus dem es durch Bestrahlung mit Neutronen entsteht, wird von S. TRIBALAT und J. BEYDON durch Extraktion mit Tetraphenylarsoniumchlorid (I) und Chloroform erreicht. Nach Lösen des MoO<sub>3</sub> in Soda unter Zusatz von Natriumpersulfat oder Wasserstoffperoxyd zwecks Oxydation des Technetiums zu Tc(VII) wird bei p<sub>H</sub> 10–11 so viel I zugesetzt, daß die Lösung daran 5·10<sup>-6</sup>m ist und mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert. Durch Waschen des mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrockneten Extraktes mit verd. Sodaauslösung von p<sub>H</sub> 10–11 wird der mitextrahierte Reagensüberschuß weitgehend beseitigt. Schüttelt man jetzt den Chloroformextrakt mit Wasser, so geht der größte Teil des Technetiums praktisch rein in das Wasser. Allerdings gehen bei dieser Arbeitsweise etwa 15 % des extrahierten Technetiums verloren, was sich vermeiden läßt, wenn man auf die Abtrennung des Reagensüberschusses verzichtet, den Chloroform-Extrakt eindampft und den Rückstand mit heißem Wasser aufnimmt. Eine quantitative Extraktion des Technetiums aus der Ausgangslösung läßt sich aber auch so nicht erreichen. Hierzu ist es notwendig, daß die Ausgangslösung etwa 0,1 n an NaCl ist. In diesem Fall begleitet dann infolge einer Verschiebung des Verteilungsgleichgewichtes der größte Teil des angewandten Reagenzes das Technetium. Das gleiche Verfahren wird von den Verf. auch auf die Abtrennung des Technetiums aus den Zerfallsprodukten von mit Neutronen bestrahltem Uran angewandt. Störungen durch Adsorption des Technetiums an Filtern oder Glasoberflächen wurden nicht beobachtet. (Anal. Chim. Acta 8, 22 [1953]). —Bd. (918)

Eine Steigerung in der Genauigkeit der Aluminiumbestimmung durch Fällung des Aluminiums als Oxychinolat aus homogener Lösung erreicht K. E. STUMPF. Er erhält so einen relativ grobkristallinen Niederschlag, der sehr gut zu filtrieren und auszuwaschen ist und bei dem infolge verringerteter Oberfläche die Adsorption und wegen des gleichmäßigen Fällungsverlaufes auch die Okklusion von Fremdbestandteilen aus der Lösung gering ist. Die Probelösung, die nicht mehr als 25–50 mg Aluminium und 1,25 bis 2 ml konz. HCl in 150–200 ml enthalten soll, wird je 25 mg Al mit 5–6 ml 10proz. Oxin-Lösung in 20proz. Essigsäure sowie 5 g Harnstoff versetzt, zum Sieden erhitzt und 2–3 h bei 95 °C gehalten. Durch die Hydrolyse des Harnstoffs stellt sich in dieser

Zeit ein p<sub>H</sub> zwischen 4,4 und 5,6 ein, wobei das Aluminiumoxychinolat ausfällt, das mit Wasser gewaschen und nach Trocknen bei 130 °C gewogen wird. Der mittlere Fehler der Einzelbestimmung beträgt bei Al-Werten zwischen 25 und 50 mg ± 0,043 mg. (Z. analyt. Chem. 138, 30–41 [1953]). —Bd. (919)

Über die Elemente in Kohlenaschen und ihre mögliche industrielle Bedeutung berichten A. J. W. HEADLEE und R. G. HUNTER. Sie untersuchten spektographisch 596 Ascheproben von Kohlen aus West-Virginia auf 38 Elemente. Der Gehalt an Na, K, Rb, Ca, Mg, Si, Cr und Mn ist geringer als der mittlere Gehalt der Erdrinde. Demgegenüber sind die Elemente Li, Sr, Ag, As, Bi, P, Ga, Ge, La, Hg, Pb, Sb, Sn, Zn und Zr angereichert in Verhältnissen von 10 (Zn) bis 185 (Hg). Die unterschiedlichen Gehalte der Proben an den einzelnen Elementen werden erörtert, ebenso die Möglichkeiten für eine industrielle Gewinnung. Beim Germanium ist die Ausbeute lohnend, wenn der Bedarf weiterhin ansteigt; ebenso würde sich die Gewinnung von Rubidium lohnen, wenn genügend Absatz gefunden würde. Die Lithium-Gewinnung aus Kohlenasche lohnt sich für Betriebe, die Säure als Abfallprodukt haben. Bei der Verkokung und katalytischen Hydrierung der Kohle kann die Anwesenheit von Elementen bedeutend sein, die als Katalysatoren oder Kontaktgifte wirken. Wenn die heutigen Kohlenaschen und die Aschen der Pflanzen, aus denen die Kohle entstanden ist, einander in der Zusammensetzung entsprechen, so erscheinen entspr. abgestimmte Kunstdünger aussichtsreich. (Ind. Engng. Chem. 45, 548 [1953]). —Ro. (922)

Das Jodyl-Fluorid erhielten E. E. AYNLEY, R. NICHOLS und P. L. ROBINSON beim Erhitzen von Jod-oxytrifluorid auf 110 °C. Die Ausgangsverbindung entsteht bei der Reaktion von Jod-pentafluorid mit Jod-pentoxyd nach J<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 3 JF<sub>5</sub> → 5 JOF<sub>2</sub>. Die Spaltungsreaktion



ist dadurch besonders eigentümlich, daß sie reversibel ist. Sie entspricht dem Zerfall des K<sup>+</sup>(JF<sub>4</sub>)<sup>-</sup> in KF und JF<sub>5</sub><sup>-</sup>, da das Jod-oxyfluorid wahrscheinlich eine Ionenverbindung (JO<sub>2</sub>)<sup>+</sup>(JF<sub>4</sub>)<sup>-</sup> ist. Das neue Jodylfluorid ist weiß, stabil an trockener Luft, nicht merklich hygroskopisch. An feuchter Luft zerfällt es langsam unter Entwicklung von Fluorwasserstoff. Es löst sich unter