

## Makromolekulares Kolloquium

Freiburg/Brsg., 5. bis 7. März 1964

Aus den Vorträgen:

### Chromatographie makromolekularer Verbindungen

*Th. Wieland*, Frankfurt/M.

Makromolekulare Verbindungen lassen sich durch Gelchromatographie nach ihren Molekulargewichten trennen. Für Proteine wurden die Dextrangele Sephadex G-100 und G-200 verwendet, mit denen die Trennung im Molekulargewichtsbereich von 10000 bis 200000 gelang. Die individuelle Wanderungsgeschwindigkeit ermöglichte eine einfache Molekulargewichtsbestimmung. Künstliche Polymere, die in Wasser unlöslich sind, wie Polystyrolgemische, lassen sich in organischen Lösungsmitteln (z.B. Chloroform/Cyclohexan = 3:1) mit Hilfe von Gelen fraktionieren, die in den Lösungsmitteln quellen. Als Gelen wurden Methacrylsäuremethylester-Äthylenglycoldimethacrylat-Polymeren verschiedenen Vernetzungsgrades (99:1 und 400:1) und verschiedener Herstellungsweise angewendet.

### Zur Quartärstruktur globulärer Proteine in Lösung

*R. Jaenicke*, Frankfurt/M.

Die Zusammenlagerung von Untereinheiten dissoziationsfähiger Proteine in Lösung zum „nativen Molekül“ lässt sich mit Hilfe hydrodynamischer Modelle in grober Näherung beschreiben. Systematische Variation der Mediums-Bedingungen zeigt, daß die Dissoziation abhängig ist von Proteinkonzentration, Nettoladung, Ionenstärke, Temperatur und spezifischen Zusatzkomponenten wie Harnstoff, Guanidin-Salzen, Detergentien, „SH-Reagentien“ etc. Diese Parameter können als Kriterien für die zwischenmolekularen Kräfte dienen, welche für die Stabilität des Protein-Moleküls in Lösung verantwortlich sind.

Am Beispiel einiger NAD-spezifischer Dehydrogenasen, (Isozyme von Lactatdehydrogenase, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, Maatdehydrogenase) wurden die molekularen Parameter (Sedimentationskonstante, Diffusionskonstante,  $[\eta]$ ,  $[\alpha]$ , Rotationsdispersionskonstante) in Abhängigkeit von den Bedingungen des Mediums untersucht. Erniedrigung der Proteinkonzentration und pH-Variation im Bereich der enzymatischen Aktivität führen innerhalb der Fehlergrenzen nicht zur Dissoziation des Moleküls. Bei  $\text{pH} > 11$  und  $< 3$  oder bei hoher Ionenstärke tritt Dissoziation ein. Aus dem Einfluß von Harnstoff und Guanidin-Salzen und der Aufspaltung infolge der Änderung von pH und Ionenstärke kann geschlossen werden, daß die Quartärstruktur der untersuchten Enzyme durch Wasserstoffbrücken (vor allem bei GAPDH), elektrostatische Wechselwirkungen (vor allem bei LDH) und (in geringerem Maße) hydrophobe Bindungen zusammengehalten wird.

### Zum molekularen Aufbau von Proteinen: Glutaminsäuredehydrogenase und $\beta$ -Galaktosidase

*H. Sund, K. Weber und K. Wallenfels*, Freiburg i. Br.

Die Untersuchung zahlreicher einheitlicher Proteine hat gezeigt, daß sie in vielen Fällen nicht aus einer einzigen Peptidkette bestehen: Eine jeweils definierte Zahl von Untereinheiten tritt zur funktionellen Einheit des nativen Proteins zu-

sammen. Diese Untereinheiten sind durch Nebenvalenzkräfte und/oder durch Disulfidbrücken, nicht aber durch Peptidbindungen miteinander verknüpft.

Glutaminsäuredehydrogenase aus Rinderleber liegt bei Konzentrationen oberhalb 7 mg/ml als langgestrecktes Teilchen mit einem Teilchengewicht von 2-10<sup>6</sup> und einem Achsenverhältnis von 13-14 vor. Bei kleineren Konzentrationen dissoziert das Protein entsprechend dem Schema

$$(2 \cdot 10^6) \rightleftharpoons 2 (1 \cdot 10^6) \rightleftharpoons 4 (0,5 \cdot 10^6) \rightleftharpoons 8 (0,25 \cdot 10^6)$$

in Teilchen höherer Symmetrie. Zahlreiche Verbindungen können dieses Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht beeinflussen. In Gegenwart von Harnstoff, Dodecyl- oder Decylsulfat sowie bei pH-Werten oberhalb 11 oder unterhalb 4 tritt eine Aufspaltung des Moleküls in Untereinheiten auf, die Teilchengewichte von 60-10<sup>3</sup> bis 80-10<sup>3</sup> besitzen [1].  $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli* mit einem Molekulargewicht von 518000 wird durch Guanidin-HCl, Harnstoff, Dodecylsulfat oder Bernsteinsäureanhydrid in vier Untereinheiten vom Teilchengewicht etwa 140000 zerlegt. Die Oxydation durch Perameisensäure führt dagegen zu wesentlich kleineren Untereinheiten vom Teilchengewicht 43000. Die Dissoziation in die größeren Untereinheiten kann reversibel verlaufen:

$$518000 \rightleftharpoons 4 \cdot 140000$$

Dagegen gelang es bisher nicht, den weiteren Zerfall

$$4 \cdot 140000 \rightarrow 12 \cdot 43000$$

rückgängig zu machen.

### Konformationsstudien an Insulin-Peptiden

*H. Zahn, E. Schnabel, P. Kusch und G. Heidemann*, Aachen

Das geschützte Dekapeptid aus der B-Kette des Insulins B<sub>21-30</sub>

[Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-(BOC)-Ala-OBu<sup>t</sup>]

erhält man aus 90-proz. Äthanol als Kristalle (1) vom Fp = 218°C. Nach gründlichem Auslaugen mit Chloroform wurden aus den Mutterlaugen Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 210 bis 212°C erhalten. Aus Dimethylformamid wurde ein kristallines Präparat (2) vom Fp = 213-215°C gewonnen.

Die beiden Präparate sind verschiedene Modifikationen, da sie sich in folgenden Eigenschaften charakteristisch unterscheiden: Debye-Scherrer-Röntgenogramm, Langperioden-Röntgenogramm, Infrarot-Spektrum und Viscosität. Stärkste Reflexe im Debyeogramm: (1) 4,9-5,0 Å, (2) 4,7 Å. Langperioden: (1) 61 Å, (2) 72 Å. Lage der Amidbande I im IR-Spektrum: (1) 1640 cm<sup>-1</sup>, (2) 1630 cm<sup>-1</sup>. Grenzviskosität in 80-proz. Äthanol 0,0035 l/g, in Dimethylformamid 0,005 l/g.

Die beiden Modifikationen lassen sich durch Umkristallisieren aus Dimethylformamid bzw. Alkohol/Chloroform ineinan-

[1] *H. Sund* in: *Mechanismen enzymatischer Reaktionen* (14. Mosbacher Colloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie). Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964, S. 318.