

ÜBER DAS MOLEKULARGEWICHT DER ENOLASE*

von

THEODOR BÜCHER

Kaiser Wilhelm Institut für Zellphysiologie, Liebenberg (Mark), Deutschland

I. ÜBERSICHT

PUTZEYS und BROSTEAUX¹ haben gezeigt, dass man aus der molekularen Lichtzerstreuung das Molekulargewicht von Proteinen erhalten kann. Ich habe es unternommen, diese Methode auf einige der Gärungsfermente anzuwenden, die in diesem Laboratorium kristallisiert worden sind und teile im Folgenden neben methodischen Verbesserungen die Ergebnisse mit, die ich bei Versuchen mit dem Fermentprotein Enolase erhalten habe.

Quecksilberenolase:

Enolase, dasjenige Ferment der Gärungskette, das (als Magnesium-, Zink- oder Manganproteid) die innere Dismutation von 2-Phosphoglyzerinsäure zu 2-Phosphoenolbrenztraubensäure katalysiert, ist 1941 von WARBURG und CHRISTIAN² als Quecksilberverbindung kristallisiert worden.

Diese Quecksilberenolase habe ich als Versuchsobjekt gewählt, da sie als kristallisierter Metallkomplex die Möglichkeit bietet, das mit der optischen Methode bestimmte Molekulargewicht (Abb. 1) durch Quecksilberanalysen zu kontrollieren.

Eine weitere Möglichkeit der Kontrolle bietet der Schwefelgehalt des Proteins, der niedrig ist und daher gestattet zwischen wenigen Vielfachen eines hohen Grundwertes zu wählen.

Schliesslich hat Herr Dr G. BERGOLD in Ludwigshafen liebenswürdigerweise die Sedimentationskonstante und Diffusionskonstante der Quecksilberenolase gemessen.

Tabelle I zeigt die Werte, die so auf vier verschiedenen Wegen für die Quecksilberenolase erhalten worden sind. Sie stimmen überein.

TABELLE I
MOLEKULARGEWICHT DER ENOLASE NACH VERSCHIEDENEN
METHODEN

Methode	Molekulargewicht
Lichtzerstreuung	66 000
Quecksilberbestimmung (1 Grammatom Hg)	64 000–68 000
Elementaranalyse ³ (8 Grammatome S)	67 300
Sedimentation und Diffusion ⁴ . .	63 700

* Vorläufige Mitteilung: *Angew. Chemie*, 56 (1943) 328.

Literatur S. 476.

Bei dem Ergebnis ist bemerkenswert, dass das Enolasemolekül nur ein Atom Quecksilber bindet. Dies legt den Gedanken nahe, dass das Quecksilberatome an der Wirkungsstelle des Fermentproteins gebunden wird. WARBURG und CHRISTIAN haben im halbquantitativen Versuch gemessen, dass die wirkende Enolase ein Grammatom Magnesium in 52 000 g Eisweiss enthält².

Freies Enolaseprotein in elektrolythaltigen Lösungen

Aus der Quecksilberenolase, die selbst katalytisch unwirksam ist, erhält man nach der Vorschrift von WARBURG und CHRISTIAN² durch Umsetzung mit Kaliumcyanid und Dialyse das freie, undenaturierte Fermentprotein, das in Gegenwart von Magnesiumsalzen optimale katalytische Wirksamkeit zeigt.

In Abbildung I ist die spezifische Lichtzerstreuung dieses Körpers, gelöst in m/50 Pyrophosphat, gegen die Konzentration aufgetragen. Die Werte liegen auf derselben

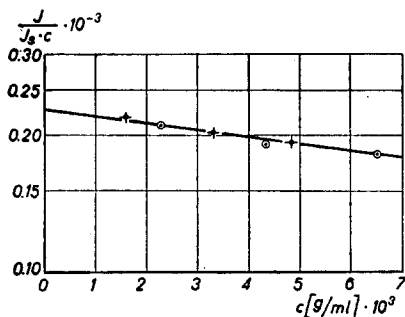


Abb. 1. Spezifische Lichtzerstreuung von Quecksilberenolase (Punkte) in m/10 Ammonazetat-Ammoniak ($P_H = 8.25$) und spezifische Lichtzerstreuung von freier Enolase (Kreuze) in m/50 Pyrophosphat ($P_H = 7.6$). (Standard 20/145)

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{J_s}{c} = 0.225 \cdot 10^3, K = 8.85, F = 33.1 : M = 66\,000$$

Kurve wie die der Quecksilberverbindung. Ich erhalte also aus meinen Messungen für freie Enolase denselben Grenzwert der spezifischen Lichtzerstreuung und damit auch das gleiche Molekulargewicht* wie für Quecksilberenolase, was zu erwarten war, da Quecksilber nur einen geringen prozentualen Gewichtsanteil ($3^0/_{00}$) am Molekül hat.

Bei allen Säuregraden, die das Fermentprotein nicht denaturieren, misst man die gleichen Werte für die spezifische Lichtzerstreuung. In elektrolythaltigen Lösungen ist also Enolase durch Säurewirkung nicht in kleinere Einheiten spaltbar.

Spaltung des Enolaseproteins in elektrolytfreien Lösungen

Grundsätzlich anders ist das Verhalten desselben Körpers in ausdialysierten Lösungen.

Bereits bei der Dialyse, bei der sich das schwach saure P_H der Umgebung des isoelektrischen Punktes einstellt, sinkt die spezifische Lichtzerstreuung auf $\frac{3}{5}$ des Wertes ($P_H = 5.2$), den ich beim gleichen P_H in salzhaltiger Lösung messe.

Säuert man weiter an, dann erreicht man bei $P_H 4$ einen Grenzwert für die Lichtzerstreuung der 26 % des Wertes beträgt, den ich beim gleichen P_H und bei gleicher Proteinkonzentration in salzhaltiger Lösung messe.

Nimmt man an, dass bei Erreichen des Grenzwerts das Protein wieder monodispers ist, dann beträgt das Molekulargewicht 17 000 g/Mol. Dies bedeutet, dass die Enolase in salzfreier Lösung in 4 Teile spaltbar ist.

Die Wiedervereinigung der Spaltstücke geschieht bei Zusatz geringer Elektrolytmengen zur Versuchslösung (Abb. 2): Bereits eine Konzentration von m/4000 Mangan-

* Über die Extrapolation und die formelmässigen Zusammenhänge vgl. die nachfolgende Arbeit.

sulfat verdoppelt den Wert der Lichtzerstreuung. Andere Elektrolyte, zum Beispiel Ammonsulfat, bewirken das gleiche, wenn auch in wenig höheren Konzentrationen.

Mehrere Befunde sprechen dagegen, dass der Effekt der Resynthese durch eine Denaturierung des Fermentproteins vorgetäuscht wird:

1. Die Lichtzerstreuung geht bei Elektrolytzusatz nicht über den Anfangswert hinaus.
2. Stärkerer Säurezusatz bewirkt erneute Spaltung, wenn man nicht zuviel Elektrolyt in die Versuchslösung gebracht hat.
3. Schleudert man die Versuchslösung nach der Resynthese auf der Ultrazentrifuge und hebert einen Becher fraktioniert aus, dann zeigen die einzelnen Fraktionen gleiche spezifische Lichtzerstreuung (Abb. 3).
4. Das resynthetisierte Enolasepräparat ist katalytisch wirksam.

F. B. STRAUB hat 1943 mitgeteilt⁵, dass die Polymerisation eines Kugelproteins zu Fadenmolekülen, die Aktivierung von Aktin, durch Elektrolytzusatz bewirkt wird. Ansäuern wirkt im gleichen Sinne wie Salzzugabe. Der Vorgang der Aktinaktivierung ist

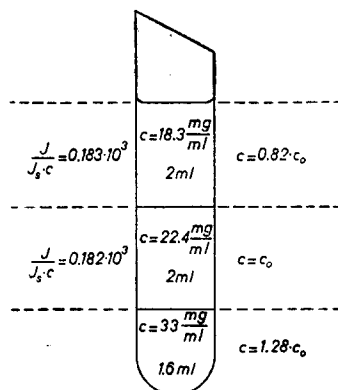


Abb. 3. Einheitliche Sedimentation eines resynthetisierten Enolasepräparates auf der präparativen Ultrazentrifuge (15 Minuten 50 000 Touren/Minute). Zur Messung der Lichtzerstreuung wurden die beiden obersten Fraktionen mit Wasser fünfmal verdünnt

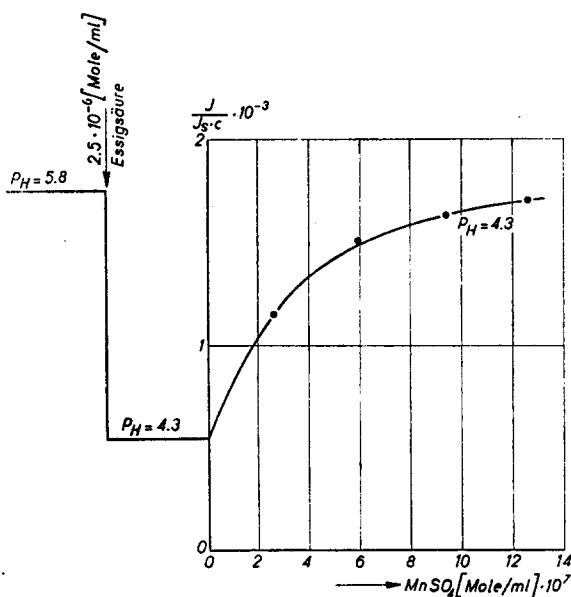


Abb. 2. Spaltung durch Ansäuern (links der Ordinate) und Resynthese durch Elektrolytzusatz (rechts der Ordinate) von Enolaseprotein. Fermentpräparat: Kristallisationsreife Enolase 8 Tage dialysiert, ultrazentrifugiert. Konzentration $3.24 \cdot 10^{-3}$ g/ml. Ordinate: spezifische Lichtzerstreuung

also, was den Salzeffekt anbetrifft gleichgerichtet, was die Wirkung der Wasserstoffionen anbetrifft invers zur Spaltung der Enolase.

Es sei darauf hingewiesen, dass das Enolasemolekül nur ein Quecksilberatom bindet, dass man angesichts der Spaltbarkeit des Moleküls in vier Teile fragen muss, ob die Spaltstücke einheitlich sind. Dafür spricht die glatte Resynthese. Dann müsste das Quecksilberatom zentral gebunden sein. Fragen, die den Ansatzpunkt für künftige Versuche abgeben.

Ausbau der Methodik

Aus praktischen und theoretischen Gründen habe ich mich bemüht, die Empfindlichkeit der Messungen bis an die durch die Eigenstreuung der Lösungsmittel gesetzte Grenze zu steigern. Dies gelingt durch Benutzung 1. einer Lichtquelle hoher Leuchtdichte und kleiner Abmessung, die einen scharf begrenzten und intensiven Primärstrahl zu erzeugen gestattet;

2. eines einfachen, aber sehr empfindlichen Empfängers für die Sekundärstrahlung, der erlaubt, die Öffnung genügend klein zu halten, so dass kein falsches Licht auf die Photozelle gelangen kann.

Verunreinigungen durch grobe Teilchen sind die ernsteste Quelle von Fehlern bei der optischen Molekulargewichtsbestimmung. Sie ist methodisch bedingt, da die Lichtzerstreuung mit dem Quadrat des Teilchenvolumens steigt, die Mittelwertbildung also nicht arithmetisch ist, sondern jedem Teilchen das statistische Gewicht seines Molekulargewichts zukommt.

Besonders gefährlich sind mir Verunreinigungen durch geringe Mengen hochmolekularer, denaturierter Eiweisssubstanz geworden, die beim Auflösen der Eiweissniederschläge, besonders der Trockenpräparate, weniger der Kristallsuspensionen entstehen.

Bei einem Molekulargewicht der Größenordnung 10^7 senken sich diese nicht auf schnelllaufenden Laboratoriumszentrifugen. Ich fand keine Proteinlösung gänzlich frei davon und habe deswegen die Substanzen nach dem Lösen stets dem Schwerefeld einer präparativen Ultrazentrifuge solange ausgesetzt, bis das zu untersuchende Protein selbst zu einem Zehntel niedergeschlagen war.

Durch fraktioniertes Abpipettieren (Abb. 3) oder durch Wiederholung der Prozedur (Tabelle II) habe ich mich von der Einheitlichkeit der Präparate überzeugt.

TABELLE II
WIRKUNG DER ULTRAZENTRIFUGATION AUF DIE SPEZIFISCHE LICHTZERSTREUUNG VON
PROTEINLÖSUNGEN

Protein	Reduzierendes Muskel-Gärungsferment (KUBOWITZ u. OTT ⁶)	Oxydierendes Gärungsferment (WARBURG u. CHRISTIAN ⁷)
Präparat	Trockenpulver aus dialysierten Kristallen	Kristallsuspension in Ammonsulfatlösung
Lösungsmittel	m/40 Phosphatpuffer PH = 7.2	m/20 Pyrophosphatpuffer PH = 7.3
Spez. Lichtzerstreuung nach: Laboratoriumszentrifuge, 20 Minuten, 15 000 Touren/Minute	$7.9 \cdot 10^3$	$3.33 \cdot 10^3$
Ultrazentrifuge, 15 Minuten, 50 000 Touren/Minute	$2.82 \cdot 10^3$	$3.27 \cdot 10^3$
Wiederholung der Ultrazentrifugation	$2.88 \cdot 10^3$	

2. METHODE

Das Prinzip der von mir angewandten Methode ist das gleiche wie bei PUTZEYS und BROSTEAUX¹: Vergleich der quer zum Primärstrahl zerstreuten Intensität der Versuchslösung mit der eines Glasstandards.

Den Quotienten dieser Intensitäten dividiert durch die Konzentration des Kolloids

$$\frac{J}{J_s c}$$

(J = Photostrom mit der Versuchslösung, J_s = Photostrom mit dem Standard, c = Konzentration des Kolloids [g/ml])

nenne ich spezifische Lichtzerstreuung.

Literatur S. 476.

Wie in der nachfolgenden Arbeit erörtert wird, ist der Grenzwert dieser spezifischen Lichtzerstreuung für die Konzentration Null unabhängig von der Gestalt der Teilchen proportional dem Molekulargewicht;

$$M = K \cdot F \cdot \lim_{c \rightarrow 0} \frac{J}{J_s \cdot c}$$

$$F = \left[\frac{d}{\frac{\left(\frac{n}{n_0}\right)^2 - 1}{n_0^2 \left(\frac{n}{n_0}\right)^2 + 2}} \right]^2$$

(M = Molekulargewicht, n, n_0 = Refraktionsindizes von Kolloid und Lösungsmittel, d = Dichte des Kolloids [g/ml]).

Die Apparaturkonstante K wird, wie weiter unten beschrieben, durch Eichung des Standards mit Edestin ermittelt. Für den in dieser Arbeit verwendeten Standard 20/145 finde ich (Tabelle III)

$$K = 8.85 \text{ [ml/Mol]}$$

Der Aufbau der Apparatur ist aus Abbildung 4 und deren Legende zu ersehen. Ich beschreibe im Folgenden Einzelheiten der Apparatur und Methodik. Ein Versuchsprotokoll ist in Tabelle III enthalten, die die Eichung des Standards mit Lösungen von Edestin beschreibt.

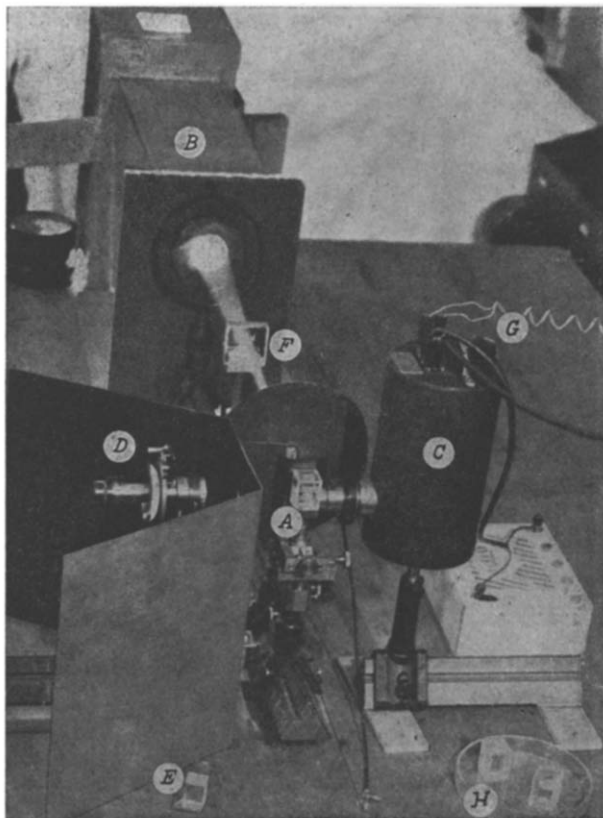


Abb. 4. Versuchsapparatur: A Versuchströg, B Lampengehäuse (überdeckt auch den Kondensor), C Empfänger (Photozelle und Gleichstromverstärker), D Polarisationsphotometer (zum Messen der Depolarisation), E Glasstandard (von gleichen Abmessungen wie der Versuchströg), F Lichtfilter für $\lambda = 546 \text{ m}\mu$, G Ableitung zum Spiegelgalvanometer (ZERNICKE Typ B), H weitere Versuchströge

Strahlengang

Als Lichtquelle dienen Quecksilberhöchstdrucklampen (Typ HBO der Osram Studiengesellschaft m.b.H.), deren wenig ausgedehnter, sehr intensiver Lichtbogen gestattet, einen scharf begrenzten Lichtstrahl hoher Leuchtdichte zu erzeugen. Bei einiger Erfahrung (Betrieb aus einem kräftig dimensionierten Gleichstrom-Drehstrom Umformer, der die Netzschwankungen puffert) gelingt es diese Lampen ohne alle kurzfristigen Intensitätsschwankungen brennen zu lassen.

Die grüne Quecksilberlinie habe ich mit SCHOTTschen Glasfiltern isoliert (BG18.3mm; BG11.16 mm; GG14.2 mm). Die Blende vor dem Versuchstrog hat scharfe Schneiden (Rasierklängen).

Empfänger

Den Empfänger für das Streulicht hat Herr Ing. KLICH (Optische Institut der TH Berlin) konstruiert und erbaut. Er ist ein Aggregat aus einer Alkalizelle (CsK M122 Vakuum von PRESSLER, Leipzig) und einem Gleichstromverstärker (zwei Elektrometerröhren T114 in Brückenschaltung) (Abb. 5).

Er wird aus einem 8 Volt Akkumulator betrieben. Die Handhabung ist nicht wesentlich komplizierter als bei einem Photoelement. Die Empfindlichkeit ist jedoch um Größenordnungen höher. Der Photostrom ist im Gebiet zwischen 10^{-6} und 10^{-3} Lumen proportional den einfallenden Intensitäten. Durch Blenden und ein einfaches Objektiv ist dafür gesorgt, dass Licht von den Durchtrittsstellen des Primärstrahles durch die Trogwandungen nicht direkt in den Empfänger gelangen kann.

Depolarisationsmessungen

Eine Einrichtung zum Messen von Depolarisationen der gestreuten Intensitäten habe ich aus dem Kopf eines KÖNIG-MARTENSschen Spektralphotometers (enthaltend Nikol und Holländisches Fernrohr) und einem Quarz-Wollastonprisma der Firma Bernhard Halle, Berlin Steglitz, zusammengestellt. Sie gestattet Beobachtungen des Streukegels mit und ohne seinen natürlichen Hintergrund. Ich habe verzichtet, Korrekturen für die

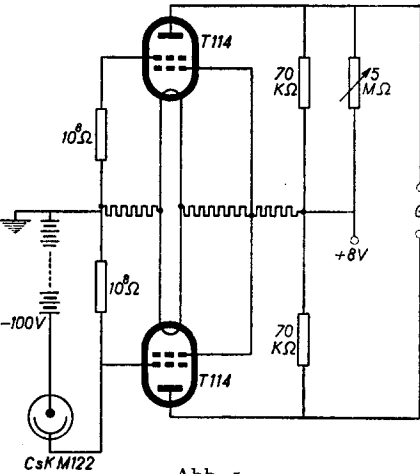


Abb. 5.

Schaltschema des Gleichstromverstärkers

Depolarisation an meinen Werten anzubringen, da es schwer ist, Depolarisationen fehlerfrei zu messen und die Korrekturen innerhalb der allgemeinen Fehlergrenze, die immerhin mit 15 % zu veranschlagen ist, liegen.

Vorbereitung der Lösungen

Erfordert einige Übung, Versuchslösungen und Versuchströge staubfrei zu erhalten. Routinemässig wurden die Lösungen dreifach konzentrierter, als für den Versuch benötigt, 10 Minuten im 170 000 fachen Schwerfeld einer präparativen Ultrazentrifuge geschleudert. Die Anlaufzeit betrug 20 Minuten, die Bremszeit 35 Minuten. Aus Abbildung 3 ersieht man die Konzentrationsverhältnisse, die sich dabei einstellen.

Nach der Verdünnung auf die gewünschte Konzentration werden die Lösungen nochmals 15 Minuten in verdeckelten Bechern auf der hochtourigen Laboratoriumszentrifuge (15 000 Touren/Minute) geschleudert und dann unmittelbar in die Versuchströge dekantiert.

Sind die Lösungen einmal ultrazentrifugiert, dann bleibt im allgemeinen ihre Lichtzerstreuung über längere Zeiträume konstant.

Versuchströge

Die Versuchströge (Innenmass $2 \times 2 \times 3$ cm) sind säurefest aus Spiegelglas gekittet. Sie werden vor jedem Versuch einige Minuten in warme Bichromat-Schwefelsäure getaucht, gründlich gespült und (ohne dass die Flächen berührt werden) in einen leeren Exsiccator gestellt und durch Evakuieren desselben mit der Ölpumpe getrocknet. Die Tröge halten diese Behandlung hundertmal aus, dann bekommen sie Risse in den Kittflächen.

Lichtbrechung des Lösungsmittels

Der Kolloid befindet sich in den Versuchslösungen in so geringer Konzentration, dass ich die Lichtbrechung des Lösungsmittels derjenigen der Lösung gleichgesetzt habe. Letztere bestimme ich unmittelbar nach dem Streuversuch, indem ich den Versuchstrog mit etwas Glyzerin auf die Flintglashalbkuugel eines Abbeschen Kristallrefraktometers kette. Zur Elimination eventueller Unparallelitäten des Trogbodens, durch den hindurch gemessen wird, wird die Halbkugel zu einer zweiten Ablesung zusammen mit dem Trog um 180° gedreht.

Literatur S. 476.

Eigenstreuung der Lösungsmittel, Empfindlichkeitsgrenze der Methode

Im Streuversuch addiert sich zur Lichtzerstreuung des Kolloids diejenige des Lösungsmittels. Diese wird im Leerversuch mit dem Standard verglichen und subtrahiert.

$$\frac{J}{J_s} = \frac{J + i}{J_s} - \frac{i}{J_s}$$

(i = Photostrom mit reinem Lösungsmittel)

Mit Standard 20/145 habe ich für mehrfach zentrifugiertes, destilliertes Wasser gemessen

$$\frac{i}{J_s} = 0.05$$

was beim Einsetzen der entsprechenden Konstanten in die Formel zum scheinbaren Molekulargewicht 10 [g/Mol] führt.

Aus Sicherheitsgründen habe ich mir zur Regel gemacht, dass die Gesamtlichtzerstreuung der Lösungen nicht geringere Werte annehmen soll, als den zehnfachen Betrag der Eigenstreuung des Lösungsmittels. Dies ergibt die technisch mögliche Grenze der Verdünnung. Sie ist abhängig vom Molekulargewicht der Substanz. Für Edestin ($M = 300\,000$) liegt sie bei $0.4 \cdot 10^{-8}$ [g/ml]. Der mittlere Teilchenabstand in einer solchen Lösung ist nicht grösser als $1/5 \lambda$.

Eichung der Standards (Apparaturkonstante K)

Glasstandards mit sehr feiner, homogener Trübung verdanke ich der Freundlichkeit von Herrn Dr KLEMM (Jenaer Glaswerk Schott & Gen.), der diese in den gleichen Abmessungen wie die Versuchströge für mich anfertigen liess.

Die Standards wurden mit einer Lösung von kristallisiertem Edestin geeicht. Dabei habe ich das Molekulargewicht des Edestins mit $300\,000$ g/Mol angesetzt, ein Wert, den Herr Dr G. BERGOLD⁴ an meinem Präparat gemessen hat, und der durch die Bestimmung zahlreicher Aminosäuren durch A. C. CHIBNALL⁹ gesichert ist.

Edestin wurde nach der Vorschrift von SVEDBERG und STAMM¹⁰ dargestellt. Zur Umkristallisation habe ich 5 g Edestinkristalle bei 45° in einer Mischung von 225 ml 2 % NaCl, 3.3 ml m/5 Natrium-pyrophosphat und 0.115 ml n HCl ($P_H = 7.9$) gelöst und nach Zusatz von etwas Super Cel durch eine vorgewärmte Nutsche bei ganz geringem Saugen in einen angewärmten Stutzen filtriert. Beim langsamen Abkühlen beginnt die Kristallisation bei 37° . Bei 28° wird dekantiert, das obenstehende ganz langsam auf 0° gekühlt und die Kristalle abzentrifugiert.

Die Operation wurde mehrmals wiederholt, dann die Kristalle unter 2 % NaCl im Eisschrank aufbewahrt.

Die Konzentrationsbestimmungen der Edestinlösungen habe ich optisch durchgeführt. Der Absorptionskoeffizient bei $\lambda = 280 \text{ m}\mu$ beträgt

$$\beta^{280} = 0.363 [\text{cm}^2/\text{mg KJELDAHL-Stickstoff}] = 1.96 [\text{cm}^2/\text{mg Edestin}]$$

TABELLE III

APPARATURKONSTANTE K AUS DER SPEZIFISCHEN LICHTZERSTREUUNG VON EDESTIN

DIE STAMMLÖSUNG WURDE ULTRAZENTRIFUGIERT, DIE EINZELNEN VERDÜNNUNGEN 15 MINUTEN BEI 15 000 TOUREN/MINUTE ZENTRIFUGIERT UND IN DIE MESSTRÖGE DEKANTIERT

LÖSUNGSMITTEL: 6.0 g NaCl; 4.0 ml m/5 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 0.15 ml n HCl in 100 ml H_2O

$n = 1.600$; $n_D = 1.3443$; $d = 1.343$ [g/ml]; $F = 37.15$

$M = 300\,000$ [g/Mol]

STANDARD 20/145

c [g/ml]	J + [Galvanometerausschlag cm]	J _s	$\frac{J + i}{J_s}$	$\frac{i}{J_s}$	$\frac{J}{J_s \cdot c}$ ml/g
$1.85 \cdot 10^{-3}$	43.5	24.4	1.785	0.049	$0.939 \cdot 10^3$
$0.994 \cdot 10^{-3}$	23.8	24.4	0.975	0.049	$0.932 \cdot 10^3$
$0.618 \cdot 10^{-3}$	15.1	24.4	0.618	0.049	$0.921 \cdot 10^3$
$0.366 \cdot 10^{-3}$	9.4	24.4	0.385	0.049	$0.918 \cdot 10^3$

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{J}{J_s \cdot c} = 0.915 \cdot 10^3$$

$$K = \frac{300\,000}{0.915 \cdot 10^3 \cdot 37.15} = 8.83 [\text{ml/Mol}]$$

3. MESSUNGEN

Lichtzerstreuung der Quecksilberenolase

Gelöste Quecksilberenolase ist nur bei schwach alkalischem P_H beständig. Ich wählte für die Lichtstreuversuche $m/10$ Ammonazetat-Ammoniak-Puffer vom $P_H = 8.25$ und ultrazentrifugierte kalt. Infolge Denaturierung steigt die Lichtzerstreuung bei Zimmertemperatur langsam an (1 % in 10 Minuten). Quecksilberverbindungen anderer Fermente verhalten sich ebenso. Es wurde daher rasch gearbeitet und gemessen.

Die spezifischen Lichtzerstreungen, die ich bei verschiedenen Konzentrationen gemessen habe, sind in Abbildung 1 gegen die Konzentration aufgetragen. Die Proteinkonzentrationen wurden aus der Lichtabsorption bei $280 m\mu$ errechnet. Dazu wurde der Absorptionskoeffizient der freien Enolase $\beta^{280} = 2.02 [cm^2/mg]$ benutzt.

Der Grenzwert der spezifischen Lichtzerstreuung beträgt

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{J}{J_s c} = 0.225 \cdot 10^3$$

Zur Berechnung des Molekulargewichts ist man, wie bei der Konzentrationsbestimmung, gezwungen, die Konstanten der freien Enolase zu benutzen, da sich Quecksilberenolase ohne völlige Denaturierung nicht dialysieren lässt, was für die Bestimmung von Trockengewicht, Dichte und Brechungsindex erforderlich ist. Es ist nicht anzunehmen, dass durch dieses Vorgehen ein wesentlicher Fehler entsteht da bei der Grösse des Proteinmoleküls Quecksilber analytisch nur den Anteil einer Verunreinigung hat. Der Refraktionsindex des Lösungsmittels betrug $n_0 = 1.335$ und man errechnet mit $n = 1.612$, $d = 1.358$: $F = 33.1$. Für den verwendeten Standard 20/145 beträgt $K = 8.83$. Aus diesen Daten ergibt sich das Molekulargewicht der Quecksilberenolase aus der Lichtzerstreuung

$$M = 66\,000 [g/Mol].$$

Quecksilberbestimmung (gemeinsam mit W. LÜTTGENS)

Vor der Quecksilberbestimmung haben wir die Quecksilberenolasekristalle mehrmals, längere Zeit in schwach ammoniakalischer, 0.65 gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen.

Zur Analyse benutzten wir die extractive Titration mit Dithizon nach FISCHER und LEOPOLDI¹¹, die trotz ihrer grossen Empfindlichkeit makroanalytischen Titrationen an Zuverlässigkeit kaum nachsteht.

0.55 ml Kristallsuspension, enthaltend 12.0 mg Enolase (spektralphotometrisch bestimmt), wurden mit 0.3 ml konzentrierter Schwefelsäure unter wiederholtem Zusatz von rauchender Salpetersäure über dem Sparflämmchen bis zu klarer, farbloser Lösung verascht.

Nach dem Vertreiben der Salpetersäure wurde mit Wasser auf 10 ml verdünnt und im Scheidetrichter portionsweise mit 7 ml Dithizonlösung nach FISCHER und LEOPOLDI bis zu konstanter Grünfärbung extrahiert. Zu den gesammelten Extrakten wurden weitere 2 ml Dithizonlösung gegeben und geschüttelt (notwendige, geringe Änderung gegenüber der Vorschrift), dann war alles Quecksilber mit Dithizon gesättigt ($Hg(Dithizon)_2$).

Die Rücktitration geschah nach der Vorschrift. Die Reagenzien waren schwermetallfrei. Störende Schwermetalle waren nicht zugegen.

12 mg Quecksilberenolase verbrauchten 6.9 ml Dithizonlösung entsprechend 37.7γ Hg. Das bedeutet, dass in 64 000 g Enolase ein Grammatom Quecksilber enthalten ist.

In einer anderen Präparation kristallisierter Quecksilberenolase fanden wir 68 000 g Enolase/Grammatom Hg.

Literatur S. 476.

Dichte und Brechungsindex des Enolaseproteins

Kristallisierte Quecksilberenolase wurde nach der Vorschrift von WARBURG und CHRISTIAN durch Umsetzung mit Kaliumcyanid von Quecksilber, durch siebentätige Dialyse von Salzen befreit. Es wurden die Dichten (Mikropipette nach PREGL) und die Refraktionsindizes (OSTWALScher Doppeltrog des PULFRICH-Refraktometers) von Aussen- und Innenflüssigkeit des Dialysators bestimmt. Bei der Berechnung des Brechungsindex wurde angenommen, dass sich in Lösungen die spezifischen Refraktionen addieren, worauf PUTZEYS und BROSTEAX¹ aufmerksam gemacht haben. Den Verlauf der Bestimmung und die bestimmten Konstanten sind Tabelle IV zu entnehmen.

Lichtzerstreuung von Enolaseprotein

Reines Enolaseprotein ist, wie auch die langen Dialysenzeiten zeigen, in wässriger Lösung sehr beständig. Ich hatte keine Schwierigkeiten bei den Messungen. Die gemessenen Werte sind in Abbildung 1 aufgetragen. Sie stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit den Werten der Quecksilberenolase überein.

TABELLE IV
DICHTE UND REFRAKTIONSINDEX DES ENOLASEPROTEINS IN WÄSSRIGER LÖSUNG

	Dialysat	Aussenflüssigkeit
Trockengew. [g/ml]	14.6 · 10 ⁻³ (C)	0.005 · 10 ⁻³
Dichte [g/ml]	1.001416 (A)	0.997530 (B)
Refraktionsindex (λ = 546 mμ) .	1.33703 (n _L)	1.33432 (n _O)

$$d = \frac{C \cdot B}{B + C - A} = 1.358 \text{ g/ml}$$
$$\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} = \frac{d}{C} \left[\frac{n_L^2 - 1}{n_L^2 + 2} - \left(1 - \frac{C}{d} \right) \frac{n_O^2 - 1}{n_O^2 + 2} \right] = 0.3479$$
$$n^{546} = 1.612$$

TABELLE V
SPALTUNG VON ENOLASE UND RESYNTHESE MIT
AMMONSULFAT. KRISTALLISATIONSREIFE ENOLASE
8 TAGE GEGEN WASSER DIALYSIERT
c = 3.16 · 10⁻³ g/ml STANDARD 20/145

Zusätze zu 8 ml Versuchslösung	$\frac{J}{J_s \cdot c}$
—	0.180 · 10 ³
0.013 ml 2n Essigsäure	
nach 2 Minuten	0.059 · 10 ³
nach 10 Minuten	0.057 · 10 ³
0.013 ml 4n Ammonsulfat	
nach 1 Minute	0.183 · 10 ³
nach 15 Minuten	0.178 · 10 ³

Spaltungsversuche

Säure (0.01 ml 2n Essigsäure) und Mangansulfat (n/10 Lösung) werden in dem in Literatur S. 476.

Abbildung 2 dargestellten Versuch unmittelbar vor der Photozelle in den Versuchstrog gegeben. Man kann dann die Spaltung und Resynthese, die nahezu augenblicklich erfolgen an den Sprüngen des Galvanometerzeigers verfolgen. Da die Konzentration während des Versuchs konstant bleibt, verhalten sich die Ausschläge zu einander wie die mittleren Molgewichte.

Es sei noch darauf hingewiesen, dass sich durch den Elektrolytzusatz der P_H Wert nicht ändert, dass also die Resynthese ein reiner Salzeffekt ist.

Ein Versuch, bei dem die Resynthese mit Ammonsulfat bewirkt wird, ist in Tabelle V eingetragen. An diesen Versuch schliesst sich der Ultrazentrifugenversuch an, der in Abbildung 3 dargestellt ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Molekulargewicht, das aus der Lichtstreuung für die kristallisierbare Quecksilberverbindung des Gärungsferments Enolase bestimmt wird, stimmt überein mit den Werten, die mit drei anderen Methoden gefunden worden sind.

Freies Enolaseprotein ist unter bestimmten Bedingungen in kleinere Einheiten spaltbar. Unerlässlich dafür ist Abwesenheit von Elektrolyten in der Lösung. Die *restitutio ad integrum* gespaltener Enolase wird bewirkt durch den Zusatz geringer Elektrolytmengen.

SUMMARY

The molecular weight of the crystalline mercury compound of the enolase calculated from the measurement of light scattering, is found to agree with the values given by three other methods.

Free enolase protein can be split, under certain conditions, into smaller units provided that electrolytes are absent from the solution. The re-association of split enolase is brought about by the addition of small quantities of electrolytes.

RÉSUMÉ

Le poids moléculaire de la combinaison cristallisée de l'énolase et du mercure, déterminé grâce à la diffusion de la lumière, correspond à celui que l'on peut obtenir à l'aide de trois autres méthodes.

La protéine de l'énolase, à l'état libre, peut être scindée, dans certaines conditions, en unités plus petites. Cette scission nécessite l'absence d'électrolyte dans la solution. L'énolase ainsi scindée peut être reconstituée sous sa forme initiale par addition de faible quantité d'électrolyte.

LITERATUR

- ¹ P. PUTZEYS UND J. BROSTEAUX, *Trans. Faraday Soc.*, 31 II (1935) 1314; *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 18 (1936) 1681; *Med. Kon. Vlaamsche Akademie, Kl. Wetensch.* 3 (1941) 3.
- ² K. LOHMANN UND O. MEYERHOF, *Biochemische Z.*, 273 (1934) 66.
- ³ O. WARBURG UND W. CHRISTIAN, *Biochemische Z.*, 310 (1942) 384.
- ⁴ G. BERGOLD, *Zeitschrift für Naturforschung*, 1 (1946) 100.
- ⁵ F. B. STRAUB, *Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged*, III (1943) 23.
- ⁶ F. KUBOWITZ UND P. OTT, *Biochemische Z.*, 314 (1943) 94.
- ⁷ O. WARBURG UND W. CHRISTIAN, *Biochemische Z.*, 303 (1939) 40.
- ⁸ W. LOTMAR, *Helvetica chimica acta*, 21 (1938) 792, 953.
- ⁹ A. C. CHIBNALL, *Second Procter Memorial Lecture, J. Intern. Soc. Leather Trades Chemists*, 30 (1946) 1.
- ¹⁰ T. SVEDBERG UND A. J. STAMM, *J. am. chem. Soc.*, 52 (1929) 2170.
- ¹¹ H. FISCHER UND G. LEOPOLDI, *Zeitschrift für analytische Chemie*, 103 (1935) 241.

Eingegangen den 19. Juni 1947