

# L'ÉTAT D'AGRÉGATION DE L'INSULINE EN COUCHES MONOMOLÉCULAIRES SUPERFICIELLES\*

par

EUGÈNE FREDERICQ

*Laboratoire de Chimie physique, Université de Liège (Belgique)*

Les recherches de GUTFREUND ET OGSTON<sup>1</sup> ont montré que l'insuline était capable de se dissocier suivant les conditions du milieu dans lequel elle se trouve dissoute, en "submolécules" dont le poids moléculaire serait de 12,000. ONCLEY ET ELLENBOGEN<sup>2</sup> ont confirmé ces vues et étudié la relation entre la charge, la concentration saline et la dissociation. Celle-ci est favorisée par la diminution de la concentration en protéine et par l'augmentation de la charge. Nous avons montré, avec NEURATH<sup>3</sup>, que le poids moléculaire de l'insuline était influencé dans une grande mesure par la nature des ions présents, probablement à cause de la faculté de l'insuline de se combiner à de nombreux ions simples, à des degrés divers. Des échantillons très purifiés d'insuline en tampon phosphate 0.1 N à pH 2.7 ont un poids moléculaire (déterminé par sémination et diffusion) bien inférieur à 12,000 et qui tend vers un minimum de 6,000 quand la concentration en protéine tend vers zéro.

Vu la divergence existant entre ces mesures et celles des autres auteurs, il nous a paru intéressant de confirmer les déterminations de poids moléculaire de l'insuline par la méthode des films superficiels telle qu'elle a été imaginée par GUASTALLA<sup>4</sup> et appliquée par BULL<sup>5</sup> à différentes protéines.

BULL ET DIEU<sup>6</sup> ont étudié entre autres l'insuline mais dans des conditions où cette protéine a un poids moléculaire supérieur à 18,000.

La méthode des films superficiels nous a permis en outre d'embrasser un domaine de pH beaucoup plus étendu que celui des techniques ordinaires: celles-ci sont en effet limitées par la quasi-insolubilité de l'insuline entre les pH 4 et 7.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Matériel:* Insuline de boeuf cristallisée, préparée par Eli Lilly Research Laboratories, Indiana-polis, U.S.A. Echantillons No 488 098 et T-2344, ce dernier recristallisé cinq fois. Concentration déterminée par Kjeldahl: concentration en azote: 16%. La suspension de cristaux était dialysée avec agitation pendant deux jours à 0° contre l'eau distillée, puis dissoute dans H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> dilué.

Phosphates primaires et secondaires: Baker Analytical reagent.

Thiocyanate de potassium: Malinckrodt, refondu vers 220°, pour éliminer toute impureté tensioactive.

Chlorure sodique fondu, Merck.

*Mesure des pressions superficielles.* La méthode est essentiellement celle décrite par BULL<sup>5</sup> et par DIEU<sup>7</sup>. Au moyen d'une micropipette de LANGMUIR, on étale 0.05 ml de solution d'insuline sur

\* Ce travail a fait l'objet d'une communication à la Société de Chimie Biologique, séance du 27 Février 1951, Liège.

Bibliographie p. 608.

le substrat salin. La variation de pression superficielle avec l'aire à température ordinaire, est déterminée avant étalement, puis cinq minutes après celui-ci. Deux à trois compressions sont réalisées sur le même film. Les mesures sont rejetées quand les résultats ne sont pas reproductibles.

Les mesures de pression superficielle sont effectuées par la méthode de WILHELMY au moyen d'une balance à chaînette ordinaire sensible au 0.1 mg, l'un des plateaux étant remplacé par une suspension de cinq à dix lames de verre, d'épaisseur égale à environ 100 microns. Il se révéla nécessaire de dépolariser ces lames par un traitement à l'acide fluorhydrique en vue d'en améliorer la mouillabilité.

La précision finale obtenue sur la valeur du poids moléculaire peut être évaluée à  $\pm 5\%$ .

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

Avant d'exposer les mesures de poids moléculaire, il peut être utile d'en discuter brièvement la signification. Dans la méthode préconisée par GUASTALLA ET BULL, on applique au film monomoléculaire la relation :

$$FA = (c/M) RT + \alpha F \quad (1)$$

où  $F$  désigne la pression superficielle du film,  $A$  l'aire totale,  $c$  la quantité de matière étalée,  $M$  le poids moléculaire,  $R$  la constante des gaz,  $T$  la température absolue et  $\alpha$  une constante.

Après avoir effectué des mesures de la pression superficielle pour une série d'aires différentes, on trace le graphique du produit  $FA$  en fonction de  $F$  et on extrapole la droite obtenue pour  $F = 0$ . On en déduit alors le poids moléculaire.

La relation (1) n'est autre que l'équivalent, pour un milieu à deux dimensions, de l'équation de VAN DER WAALS sans terme correctif pour les forces de cohésion. Or il est certain que nous travaillons dans un domaine de pressions (0.5 à 0.05 dyne par cm) où la surface occupée par les molécules de protéine constitue une partie notable de la surface totale du film; autrement dit, nous sommes dans un domaine correspondant à un gaz comprimé. Pourtant on a montré que la relation (1) était vérifiée par tous les films de protéines étudiés et que la cassure dans la courbe pression-aire correspondant au passage à l'état condensé ne se produisait que pour des pressions supérieures et à un moment où pratiquement toute la surface est occupée par les molécules.

BULL<sup>8</sup> a donné récemment une démonstration de la formule (1) par un raisonnement basé sur la théorie osmotique. Toutefois la difficulté théorique subsiste en ce qu'il admet que la présence de protéine ne modifie pas l'activité de l'eau en surface, ce qui est discutable quand on a affaire à des pressions superficielles élevées.

Si, théoriquement, il est encore difficile de justifier l'application à un tel milieu d'une relation où n'intervient aucun terme d'interaction particulière, il n'en reste pas moins que l'expérience vérifie cette relation. Les poids moléculaires obtenus par BULL pour l'ovalbumine, la lactoglobuline, la pepsine etc... sont en excellent accord avec les données des autres méthodes de mesure. Il en est de même pour les déterminations de poids moléculaire de la papaine par DIEU<sup>7</sup>, respectivement de 29,000 et de 32,000, par sédimentation-diffusion ou par la méthode des films superficiels. Nous pouvons donc légitimement appliquer la méthode à condition d'utiliser des concentrations en protéine aussi faibles que possible et de descendre aux pressions inférieures à 0.10 dyne par cm.

#### A. Etat de dissociation maxima

Nous avons tout d'abord utilisé l'acide chlorhydrique comme substrat d'étalement. A concentration 0.01 N, nous avons obtenu de façon répétée des valeurs de poids moléculaire variant de 5,000 à 6,000. Il en est de même pour l'acide 0.005 N.

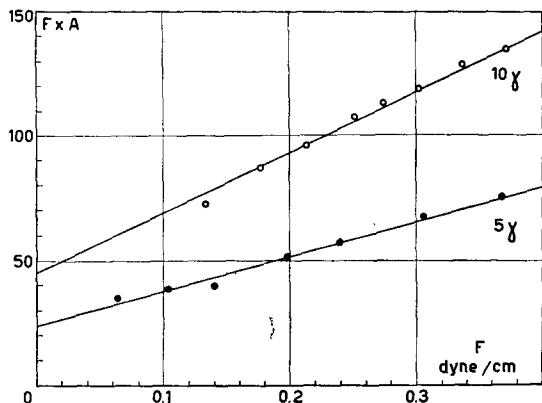


Fig. 1. Courbes d'étalement de l'insuline sur HCl 0.01 N

On peut voir d'après les figures donnant la variation du produit  $FA$  en fonction de  $F$  que la relation (1) est vérifiée dans un large domaine de pressions et pour différentes concentrations superficielles, les plus faibles descendant jusque 0.07 mg par  $m^2$ . Cette concentration ne représente que 6% environ de surface couverte. Aux plus faibles pressions étudiées, les points ne montrent aucune tendance à se placer sur une droite de pente moindre; on est donc justifié à considérer que l'état gazeux est atteint et que l'extrapolation fournit le poids moléculaire exact (Fig. 1). Nous ne pouvons toutefois comparer

nos chiffres à aucune mesure de vitesse de sédimentation ou de diffusion, puisque par ces méthodes on est obligé de travailler à des forces ioniques d'au moins 0.1.

Sur l'acide chlorhydrique 0.1 N, le poids moléculaire remonte à environ 12,000; ceci correspond à l'observation de GUTFREUND suivant laquelle une réassociation s'effectue quand le pH diminue en dessous de 2 (Fig. 2).

On peut aussi d'après l'équation (1) calculer l'aire occupée par les molécules de protéine, le facteur  $a$  de l'équation étant analogue au covolume de l'équation de VAN DER

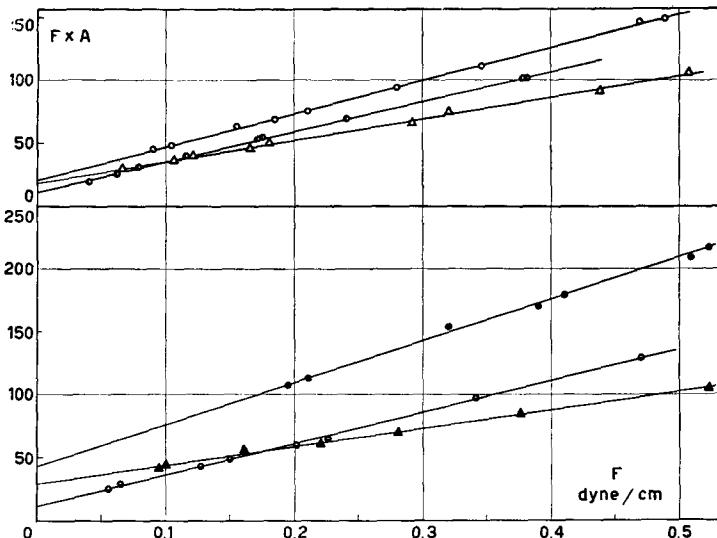


Fig. 2. Courbes d'étalement de l'insuline sur différents substrats.

- 25 gamma d'Insuline sur KCNS 0.1 N; pH 5.7
- ▲ 25 gamma d'Insuline sur NaCl 0.1 N; pH 4.1
- 28 gamma d'Insuline sur HCl 0.1 N
- △ 28 gamma d'Insuline sur phosphates 0.1 N; pH 4.5
- 25 gamma d'Insuline sur phosphates 0.1 N; pH 6.8
- 40 gamma d'Insuline sur phosphates 0.1 N; pH 6.4

WAALS et correspondant, d'après BULL, à la surface qu'occuperaient les molécules si elles étaient jointives. BULL avait déterminé par cette méthode une aire d'environ  $0.9 \text{ m}^2$  par mg. Cette aire augmente au cours du temps et tend vers un maximum de  $1.8 \text{ m}^2$  par mg.

La première valeur est celle qui correspond à une structure des chaînes polypeptidiques analogue à celle de la  $\beta$ -kératine avec les chaînes latérales normales à la surface du film, la seconde correspond à une structure complètement déployée, toutes les chaînes reposant à plat sur la surface.

GUASTALLA<sup>4</sup> par contre, assimile le facteur  $a$  à une surface d'encombrement, double de la surface réelle.

En fait, BULL<sup>8</sup> lui-même a trouvé des valeurs de  $a$  bien supérieures à  $2 \text{ m}^2$  par mg. Nous avons trouvé des valeurs semblables aux très faibles concentrations superficielles. Ces faits sont plutôt en faveur des conceptions de GUASTALLA, puisque la surface maxima que puisse occuper une protéine dans un film superficiel est de  $1.8 \text{ m}^2$  par mg. Il faudrait donc diviser tous les chiffres de cosurface par 2 pour obtenir une valeur de la surface effective des molécules. Si ces conceptions se révèlent exactes, il faudra considérer que l'étalement des protéines dans les conditions normales conduit à un déroulement moins poussé qu'on ne l'a cru d'abord. Ce ne serait que très exceptionnellement et aux très grandes dilutions, qu'on obtiendrait une structure " $\beta$ -kératine".

Sans vouloir attacher trop d'importance quantitative à ces valeurs, elles nous fournissent des indications comparatives intéressantes quant à la régularité et au degré d'étalement réalisés.

Nos mesures fournissent une valeur de  $2 \text{ m}^2$  par mg pour la cosurface des films d'insuline sur  $\text{HCl } 0.01 N$ . Il semble donc que lorsque l'insuline a atteint son état de dissociation maxima, elle s'étale avec extension immédiate des chaînes polypeptidiques, les facteurs de répulsion qui provoquent la dissociation favorisant de même le déroulement des chaînes. Sur  $\text{HCl } 0.1 N$ , on retrouve par contre une aire plus faible de  $1 \text{ m}^2$  par mg.

Nos expériences étaient réalisées en étalant sur le substrat choisi, une solution d'insuline à concentration inférieure à  $0.1\%$  dans l'acide phosphorique très dilué. Dans ces conditions, nous partons donc d'une insuline qui est complètement dissociée.

Si, par contre, nous partons d'une solution d'insuline dans  $\text{KCl } 0.2 N$ , pH 3.6, conditions dans lesquelles l'insuline est associée, nous n'obtenons plus la dissociation lors de l'étalement sur  $\text{HCl } 0.01 N$ . Ceci indique que les molécules agrégées d'insuline ne s'étaient pas convenablement ou, tout au moins, ne se dissocient plus lors de l'étalement. Il convient donc de partir toujours de solutions acides pour réaliser les expériences.

Sur l'eau distillée, on obtient des films stables où le degré d'association est beaucoup plus élevé et le poids moléculaire de 120,000. On ne peut comparer ce chiffre à aucun autre puisque l'insuline est trop peu soluble à ce pH pour permettre d'autres types de mesure. Nous verrons par la suite que ce poids moléculaire correspond au maximum que l'on puisse mesurer en étalant sur des solutions salines, dans les environs du point isoélectrique.

#### B. Variation de l'état d'agrégation avec le pH

Nous avons suivi la variation du poids moléculaire de l'insuline avec le pH, en étalant cette protéine sur une série de tampons phosphates à concentration 0.1 normale constante et dont le pH variait depuis 2.5 jusque 7. La courbe de la Fig. 3 montre

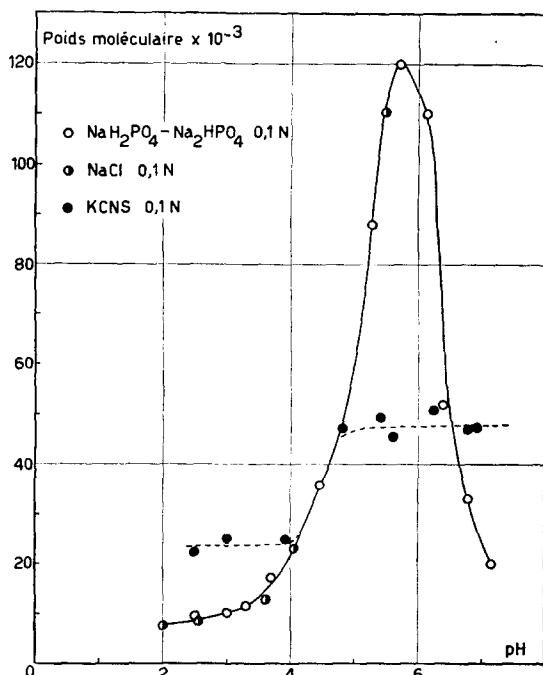


Fig. 3. Variation du poids moléculaire de l'Insuline en fonction du pH des substrats.

tion protéique qui est très important en solution, paraît jouer un rôle secondaire en surface, puisque les poids moléculaires ne semblent pas dépendre des quantités étalementes, ni de la variation de l'aire d'expansion pour une quantité donnée.

Le fait que l'association de l'insuline augmente régulièrement de pH 4 à pH 5.6 puis diminue ensuite vers les milieux alcalins correspond qualitativement à la variation de solubilité de la protéine dans cette zone de pH (COHN, FERRY, LIVINGOOD ET BLANCHARD<sup>9</sup>). Le point maximum (pH 5.6) est identique au pH de solubilité minima dans une solution de phosphates. On peut le considérer comme étant le point isoélectrique de l'insuline et peut être même le point isoionique en admettant que le phosphate n'est pas lié à la protéine. Rappelons que l'on n'a pu déterminer ces valeurs par les méthodes ordinaires en raison de l'insolubilité de l'insuline.

Enfin, au pH 6.5 on retombe dans un domaine où l'on possède des données de sédimentation, encore que les valeurs de poids moléculaire y soient controversées; on admet qu'elles se situent aux environs de 36,000. Dans la région de pH à partir de 7, la méthode d'étalement devient sujette à caution d'après BULL.

#### C. Influence des ions

Nous avons voulu vérifier si la nature des ions du substrat influençait le poids moléculaire comme elle le fait pour l'insuline en solution<sup>3</sup>. Les valeurs obtenues lors de l'étalement sur chlorure sodique 0.1 N montrent qu'il n'en est rien (Fig. 3): elles ne se distinguent pas de celles que l'on obtient en tampon phosphates. Par sédimentation, nous avons montré que la présence des ions  $\text{Cl}^-$  favorisait notablement l'association de l'insuline, ce que nous avons mis en rapport avec la capacité de l'insuline de se combiner

les résultats de cette étude. Dans le domaine de pH où la solubilité de l'insuline permet des mesures de constante de sédimentation, il est remarquable de constater que les poids moléculaires obtenus par étalement sont très voisins de ceux que l'on peut déduire des mesures de sédimentation de FREDERICQ ET NEURATH<sup>3</sup>, faites dans les tampons correspondants, à une concentration en insuline de 0.25%, et en supposant une molécule sphérique, ce qui doit être très proche de la réalité. Remarquons néanmoins que les mesures présentes fournissent une moyenne en nombre, tandis que la méthode de sédimentation donne une moyenne en poids. On peut conclure que la méthode d'étalement est valide dans ce cas et d'autre part que les facteurs de charge électrique qui conditionnent l'équilibre de dissociation de l'insuline en solution agissent d'une façon tout analogue dans le film.

Par contre, le facteur concentra-

à ces ions. Les ions thiocyanate ont un effet encore plus marqué, mais rendu plus complexe par le fait que du côté acide ils favorisent l'association et ont par contre une action solubilisante au dessus de pH 5<sup>3,10</sup>.

Quand on prend pour substrat d'étalement du thiocyanate 0.1 N, on peut observer une faible action en faveur de l'association en dessous de pH 4 et une action dissociante notable au-dessus.

On peut donc conclure d'une façon générale, que la propriété des ions Cl<sup>-</sup> et SCN<sup>-</sup> d'associer les particules d'insuline en solution par suite de leur fixation sur la protéine, est nulle ou très faible dans les films superficiels.

Il faut remarquer que la concentration de ces ions est probablement plus faible dans la couche de passage qu'elle ne l'est dans la solution.

De plus, la dénaturation peut modifier considérablement la fixation d'ions par les protéines: c'est ainsi que d'après KLOTZ, TRIWUSH, ET WALKER<sup>11</sup> la sérumalbumine dénaturée par l'alcali perd son pouvoir de combinaison avec le méthylorange.

Les cosurfaces sont à peu près constantes sur les différents substrats salins étudiés et voisines de 0.7 m<sup>2</sup> par mg, ce qui est un peu plus faible que la valeur normale de 0.9 m<sup>2</sup> par mg.

Il est encore impossible de dire si ceci est dû à un déroulement partiel des particules ou à un début de désorption; dans ce dernier cas il faudrait évidemment considérer que les valeurs de poids moléculaire mesurées seraient un peu plus élevées qu'il n'en est en réalité.

#### CONCLUSIONS

Revenons à la question de la validité de la formule (1), d'où nous déduisons les poids moléculaires. Nous pensons que la correspondance entre les mesures exécutées par sédimentation et diffusion, d'une part et par étalement de l'autre, est un argument de plus en faveur de l'applicabilité de la formule au cas de l'insuline. Dans tout le domaine de pressions étudié depuis 0.05 dyne jusque 0.5 dyne, nous n'avons observé aucune tendance des points expérimentaux à dévier d'une ligne droite lorsque l'on porte le produit FA en fonction de F (Figs. 1 et 2) et ce pour une variété de substrats salins et de pH.

De plus, des mesures récentes effectuées par DIEU en utilisant la technique plus sensible de GUASTALLA<sup>4</sup> ont montré qu'en descendant à des pressions de l'ordre de 0.005 dyne par cm, on obtenait la même extrapolation de la droite FA-F; ceci fut vérifié notamment pour l'insuline comme pour plusieurs autres espèces de macromolécules. Dans ce domaine, on réalise un état gazeux à très faible pression. L'applicabilité de l'équation de VAN DER WAALS y est donc justifiée.

Nous n'avons pas observé dans nos conditions expérimentales le phénomène décrit par BULL<sup>1</sup> et suivant lequel on aurait des variations de pente importante de la fonction FA-F suivant les concentrations d'étalement utilisées. Il nous est impossible de comparer les poids moléculaires de l'insuline obtenus par cet auteur avec les nôtres, les substrats salins qu'il utilise étant beaucoup plus concentrés. Il est en tous cas logique qu'il obtienne des valeurs de poids moléculaire supérieures dans ces conditions.

Signalons enfin que nous n'avons pas observé d'influence notable de la pureté des échantillons utilisés, comme ce fut le cas pour les mesures de vitesse de sédimentation. Il semble que les expériences d'étalement réalisent les conditions d'une dialyse prolongée, toutes les impuretés solubles de la protéine passant en solution.

Il semble aussi très improbable qu'il y ait des impuretés peu solubles de nature

tensioactive qui viendraient se fixer en surface, ce qui aurait pour effet de réduire la masse moléculaire moyenne mesurée.

Ces impuretés ne pourraient provenir des substrats utilisés, puisque ceux-ci sont contrôlés par une courbe de blanc, mais pourraient éventuellement se trouver dans les préparations d'insuline, par exemple des complexes lipide-protéine, se dissociant en surface. Si tel était le cas, on ne s'expliquerait pas pourquoi ces impuretés ne se manifestent pas lorsque l'on étale sur l'eau pure ou sur phosphates, précisément dans la zone isoélectrique de l'insuline.

La constance des valeurs de cosurface obtenues dans des conditions variées est aussi une garantie de l'efficacité et de la régularité de l'étalement.

Quelle est la portée de ces résultats en ce qui concerne le problème de l'unité fondamentale de la molécule d'insuline?

Les mesures de GUTFREUND ET OGSTON<sup>1</sup> comme celles d'ONCLEY ET ELLENBOGEN<sup>2</sup> militent en faveur d'un poids moléculaire minimum de 12,000. Nos mesures sont incompatibles avec cette valeur, même en tenant compte des erreurs expérimentales relativement élevées affectant les constantes de sédimentation dans ce domaine: nous avons en effet été amenés à admettre le chiffre de 6,000 comme poids moléculaire élémentaire\*.

Rappelons que SANGER<sup>12</sup> n'écarte pas cette possibilité à partir des données de l'analyse chimique et a imaginé un schéma de représentation de l'insuline composé de deux chaînes polypeptidiques ayant chacune un poids moléculaire de 3,000.

Il est bien évident qu'une protéine étalée en surface voit sa structure profondément bouleversée et l'on ne peut appliquer sans précaution aux molécules natives des données tirées des films.

Pourtant, l'extension d'une protéine en surface ne peut faire intervenir que des énergies faibles et incapables de rompre des liaisons covalentes. Il est donc certain que si l'on peut prouver de façon irréfutable que l'insuline en couches superficielles a des particules d'un poids moléculaire de 6,000, celles-ci ne pourront être éventuellement associées en solution que par des liaisons faibles aisément dissociables telles que des liaisons hydrogène ou des liaisons électrostatiques.

Elles ne pourraient pas en tous cas, être constituées par des ponts disulfure, lesquels sont supposés établir le lien entre les chaînes polypeptidiques de l'insuline. Il faudrait donc rejeter le schéma à quatre chaînes avec poids moléculaire de 12,000.

C'est pourquoi, tout en restant conscients du caractère encore hypothétique inhérent à l'étude cinétique de ces gaz à deux dimensions que constituent les films superficiels, nous pensons que ces expériences apportent néanmoins un argument de plus en faveur de la valeur de 6,000, comme poids moléculaire unitaire de l'insuline. Elles nous apportent aussi des renseignements intéressants et une confirmation de cette propriété assez exceptionnelle de l'insuline, de se polymériser réversiblement à des degrés variables suivant le pH. Peut-être l'avenir nous apprendra-t-il qu'il s'agit là d'un phénomène plus courant qu'on ne le pense généralement, remettant ainsi en vedette la théorie de SØRENSEN suivant laquelle les protéines seraient des systèmes dissociables réversiblement.

Nous adressons tous nos remerciements aux Laboratoires de Recherche de "Eli Lilly and Co" Indianapolis, U.S.A. qui ont subsidié ces recherches et nous ont fourni l'insuline cristallisée.

\* Des expériences actuellement en cours nous ont permis aussi de montrer que du côté alcalin du point isoélectrique, l'insuline se dissocie de façon à avoir vers pH 10, une constante de sédimentation aux environs de 1.2 S.

Nous remercions également le Centre National de Biologie physico-chimique pour son appui.

Nous exprimons toute notre reconnaissance au Professeur V. DESREUX pour l'intérêt constant qu'il a témoigné à notre travail.

#### RÉSUMÉ

L'existence des "submolécules" d'insuline à très bas poids moléculaire a été confirmée par l'étude des couches superficielles de cette protéine dans le domaine des très faibles pressions superficielles (0.05 à 0.5 dyne/cm).

Par la méthode de GUASTALLA ET BULL, on peut calculer un poids moléculaire de l'ordre de 5 à 6,000 pour les particules d'insuline étalée sur de l'acide chlorhydrique 0.01 N.

De même, lorsque l'on étale l'insuline sur des tampons de phosphates à force ionique constante et égale à 0.1 et à pH croissant depuis 2.5 jusque 7, on observe une forte variation du poids moléculaire qui passe par un maximum de 120,000 à pH 5.6 pour redescendre ensuite à 30,000 (pH 7). Ce comportement est analogue à ce qui se passe en solution dans le domaine de pH restreint (2 à 4) où la solubilité de l'insuline permet des mesures.

Les ions chlore n'influencent pas ces phénomènes, tandis que les ions thiocyanate abaissent considérablement le poids moléculaire entre les pH 4.5 et 7, zone où précisément ils exercent une action solubilisante considérable.

#### SUMMARY

The existence of insulin submolecules having a very low molecular weight has been confirmed by studying surface monolayers of this protein in a range of very low surface pressures (0.05 to 0.5 dyne/cm).

By the method of GUASTALLA AND BULL, a molecular weight of the order of 5,000 to 6,000 can be calculated for insulin particles spread on 0.01 N hydrochloric acid.

When insulin is spread on phosphate buffers at a constant ionic strength of 0.1 and pH increasing from 2.5 up to 7, a strong variation of the molecular weight is observed, values of the latter passing through a maximum of 120,000 at pH 5.6 and going down to 30,000 at pH 7.

This behavior is similar to what happens in the bulk phase, in the restricted pH range (2 to 4), where the solubility of insulin allows measurements to be made.

Chloride ions do not influence these processes, while thiocyanate ions considerably lower the molecular weight between pH 4.5 and 7, a range where they actually promote solubilization.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Das Bestehen von Insulinsubmolekülen von sehr geringem Molekulargewicht ist durch das Studium der Oberflächenschichten dieses Proteins im Bereich sehr geringer Oberflächendrücke (0.05 bis 0.5 dyne/cm) bestätigt worden.

Aus der Methode von GUASTALLA UND BULL ergeben sich Molekulargewichte von der Größenordnung 5–6,000 für auf 0.01 N Salzsäure ausgebreitete Insulinpartikel.

Wird ferner Insulin auf Phosphatpuffern ausgebreitet, deren Ionenstärke auf 0.01 konstant gehalten wird und deren pH-Wert von 2.5 auf 7 ansteigt, so stellt man eine starke Veränderung des Molekulargewichts fest, welches einen Maximalwert von 120,000 bei pH 5.6 erreicht und dann wieder auf 30,000 bei pH 7 herabsinkt.

Chlorionen haben auf diesen Prozess keinen Einfluss, während Thiocyanationen das Molekulargewicht erheblich herabsetzen im pH Bereich 4.5 bis 7, in welchem sie gerade die Löslichkeit stark heraussetzen.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> H. GUTFREUND ET A. G. OGSTON, *Biochem. J.*, 40 (1946) 432; H. GUTFREUND, *Biochem. J.*, 42 (1948) 432 et 554; *Biochem. J.*, 50 (1952) 564.
- <sup>2</sup> E. ELLENBOGEN, Thesis, Harvard University 1949;
- <sup>3</sup> J. L. ONCLEY ET E. ELLENBOGEN, *J. Phys. Chem.*, 56 (1952) 85.
- <sup>4</sup> E. FREDERICQ ET H. NEURATH, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 2684.
- <sup>5</sup> J. GUASTALLA, *Compt. rend.*, 208 (1939) 1078; Thèse, Paris 1948.
- <sup>6</sup> H. B. BULL, *Advances in Protein Chem.*, 3 (1947) 95.
- <sup>7</sup> H. B. BULL ET H. A. DIEU, *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 450.
- <sup>8</sup> H. A. DIEU, *Maandschr. Kindergeneesk.*, 19 (1951) 293.
- <sup>9</sup> H. B. BULL, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 27.
- <sup>10</sup> E. J. COHN, J. D. FERRY, J. J. LIVINGOOD ET M. H. BLANCHARD, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 17.
- <sup>11</sup> E. VOLKIN, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 675.
- <sup>12</sup> I. M. KLOTZ, H. TRIWUSH, ET F. M. WALKER, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 2935.
- <sup>13</sup> F. SANGER, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, New York 1950, Vol. 14, p. 153.

Reçu le 23 avril 1952