

## PHYSIKALISCH-CHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER PROTAMINE\*

I. TEIL. IRIDIN (AUS *SALMO IRIDEUS*)

MATATIAHU GEHATIA\*\* UND CHIEKO HASHIMOTO\*\*\*

*Institut für physikalische Chemie der Universität Frankfurt am Main,  
Institut für vegetative Physiologie und Institut für organische Chemie  
der Universität Frankfurt am Main (Deutschland)*

(Eingegangen am 22. Januar 1962)

## SUMMARY

*Physico-chemical studies of the protamines. I. Iridine (from Salmo irideus)*

The solution of iridine (from *Salmo irideus*) in 0.05 M triethanolamine hydrochloride buffer, pH 7.3, was investigated at 20° by means of ultracentrifugation, pycnometry, refractometry and viscosimetry.

The estimated increment of the index of refraction,  $dn/dc$  is 1.91, where the concentration  $c = g$  iridine chloride per g solution. The partial specific volume,  $\bar{v}$  is 0.66 ml/g. The results obtained from pycnometry thus show that iridine, as well as other protamines, is heavier than was previously assumed. In the case of protamine sulfates,  $\bar{v}$  is even lower: 0.58 ml/g.

The sedimentation coefficient extrapolated to  $c = 0$ ,  $s_{20,w}^0$  is 0.74 S. The diffusion coefficient evaluated from the ultracentrifugal diagram using the "Method of maximal gradient",  $D_{20}^0$  is  $13.0 \cdot 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/sec. The mol. wt. has been found to be 4100. The intrinsic viscosity  $[\eta]_c$  is 8.16.

On the assumption that the molecule of iridine chloride behaves as a flexible rod, a diameter of 7.6 Å and length of 104.5 Å (axes ratio of 13.8) is calculated.

## EINFÜHRUNG

Die systematische Untersuchung der Protamine: Clupein, Salmin und Iridin, die aus isolierten Spermatozookernen von Fischen hergestellt worden sind, haben hauptsächlich FELIX *et al.*<sup>1</sup> und ANDO *et al.*<sup>1</sup> ausgeführt.

Die chemische Struktur der Protamine wurde bereits in vielen Richtungen untersucht. Ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften sind dagegen bis jetzt noch wenig geklärt. Nur WATANABE *et al.*<sup>2</sup>, UI UND WATANABE<sup>3,4</sup> und UI<sup>5,6</sup> haben eine exakte systematische Arbeit über Clupein und Salmin von diesem Standpunkt aus veröffentlicht. Die Extraktion mit HCl, die von den genannten Autoren angewandt

\* Dem Andenken an Professor Dr. K. FELIX† gewidmet.

\*\* Unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft. Jetzige Adresse: ASRCNP, Wright-Patterson AFB, Ohio (U.S.A.).

\*\*\* Unterstützt durch Alexander von Humboldt Stipendium. Jetzige Adresse: Department of Biophysics and Biochemistry, Faculty of Science, University of Tokyo, Tokyo (Japan).

wurde, führt jedoch zu unphysiologischen Bedingungen, die zu physikalisch-chemischen Veränderungen der Moleküle führen können.

In dieser Arbeit wurde das Protamin Iridin-Chlorid unter sehr milden Bedingungen (mit Hilfe von Kochsalz) gewonnen, um einen möglichst natürlichen Zustand des Materials zu gewährleisten. Aus den refraktometrischen, pyknometrischen, viskosimetrischen und Sedimentations-Messungen wurden einige physikalisch-chemische Eigenschaften, sowie auch Molekulargewicht und Molekülform bestimmt.

#### MATERIALIEN

##### *Darstellung des Iridins<sup>7</sup>*

Aus der Milch von Regenbogenforellen (*Salmo irideus*) wurden zunächst die isolierten Spermatozoenzellkerne gewonnen; aus diesen wurde nach Methoden der vorhergehenden Mitteilungen<sup>7</sup> Iridin-Chlorid im natürlichen Zustand dargestellt.

Dieses Präparat wurde auf seinen Wassergehalt (4.9%), auf den Anteil des NaCl (12.1%), sowie auf die übrigen Cl-Ionen (20.6%) quantitativ geprüft. Zur quantitativen Bestimmung des Iridingehalts wurde die Stickstoffanalyse verwendet (26.5% freien Iridins). Die weitere Analyse ergab die Aminosäuren-Zusammensetzung (Arg, 90.6%; Ser, 2.8%; Pro, 2.7%; Gly, 1.8%; Ala, 0.4%; Val, 1.6%; Ileu, 0.25%).

##### *Herstellung der Lösungen*

Als Lösungsmittel wurde 0.05 M Triäthanolamin-Hydrochlorid Puffer (pH 7.3) angewandt. Für jedes Präparat wurde die Gewichtskonzentration,  $c = \text{g Iridin-Chlorid/1 g Lösung}$  bestimmt. Dazu war es notwendig, den Wassergehalt, sowie die Menge NaCl festzustellen.

#### MESSMETHODEN UND ERGEBNISSE

##### *Refraktometrie*

Der optische Brechungsindex wurde aus einer Reihe der Lösungen bei verschiedenen Konzentrationen  $c$  mit einem Eintauchrefraktometer von Zeiss bei  $20.00 \pm 0.01^\circ$  bestimmt. Aus mehreren Messungen jeder Lösung, sowie des Puffers, ergab sich der Brechungsindexinkrement  $dn/dc = 1.91$ .

Wegen des Kochsalzgehaltes der trockenen Substanz war es notwendig, den Puffer entsprechend dem Anteil des NaCl in der Ausgangslösung mit Kochsalz zu versetzen. Dadurch bleibt dieser Zusatz während der weiteren Verdünnungen unverändert. Dieses Verfahren wurde auch bei den übrigen Messungen angewandt.

##### *Pyknometrie*

Die pyknometrischen Messungen wurden mittels eines Pyknometers mit dem Volumen  $v = 9.31 \text{ ml}$  bei  $20.00 \pm 0.01^\circ$  ausgeführt.

Die Auftragung des Lösungsgewichtes  $m$  gegen  $c$  ergab  $dm/dc = 3.152 \text{ g}$ . Daraus ergaben sich für Iridin-Chlorid  $\bar{v} = 0.665 \text{ ml/g}$  und  $(1 - \bar{v}\rho_0) = 0.339$ . Hier bedeutet  $\rho_0$  die aus der Extrapolation gewonnene Dichte des Lösungsmittels. Dazu liessen sich die folgenden Verhältnisse bestimmen:  $d\rho/dc = 0.342 \text{ g/ml}$  und  $\phi = 0.663$ , wobei  $\phi$  die voluminare Konzentration, ml Iridin-Chlorid/1 ml Lösung, bedeutet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Protamine wesentlich schwerere Substanzen

darstellen, als man bis jetzt angenommen hat. Darum darf man nicht  $\bar{v}$  nach dem entsprechenden Werte des Albumins gleich 0.74 ml/g setzen, wie es oft in der Literatur geschieht.

Die pyknometrischen Messungen wurden auch im Falle anderer Protamin-Chloride ausgeführt, wobei ähnliche Werte für  $\bar{v}$  resultieren. Die Protamin-Sulfate stellen noch schwerere Substanzen dar: für Clupein-Sulfat ergab sich beispielsweise  $\bar{v} = 0.584$  ml/g und  $(1 - \bar{v}\rho_0) = 0.416$ .

#### Viskosimetrie

Die viskosimetrischen Messungen der Lösung Iridin-Chlorid in 0.05 M Triäthanolamin-Hydrochlorid Puffer (pH 7.3) wurden bei  $20.00 \pm 0.01^\circ$  mit einem Ostwald Viskosimeter ausgeführt. Da nur eine geringe Menge der Substanz zur Verfügung stand, wurden nur drei verschiedene Lösungen bei niedrigen Konzentrationen untersucht.

Die Funktion  $\eta = \eta(c)$  lässt sich daraus durch:

$$\eta = \eta_0(1 + 8.16c + 267c^2) \quad (1)$$

darstellen;

die Funktion  $\eta = \eta(\phi)$  durch:

$$\eta = \eta_0(1 + 12.31\phi + 607.4\phi^2) \quad (1a)$$

Für die Grenzviskosität (intrinsic viscosity) ergibt sich danach  $[\eta]_c = 8.16$ , oder  $[\eta]_\phi = 12.31$ .

Es ist bemerkenswert, dass ISO, KITAMURA UND WATANABE<sup>2</sup> für die Grenzviskosität des Clupein-Sulfats in Phosphat-Puffer (pH 7.7;  $I$ , 0.2) den Wert  $[\eta]_c = 8.65$  und im Falle des Salmin-Sulfats in Phosphat-Puffer (pH 7.7) die Werte 9.2 für  $I = 0.2$  und 8.5 für  $I = 0.4$  mitteilen.

#### Die Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation des Iridin-Chlorids in 0.05 M Triäthanolamin-Hydrochlorid Puffer (pH 7.3) wurde mittels einer luftgetriebenen Phywe Ultrazentrifuge (Modell, Jahr 1957) und einer Kapillarunterschichtungszelle bei Rotationsgeschwindigkeiten von 30000 Umdr./min und 48000 Umdr./min ausgeführt. Die Temperatur wurde während der Versuche möglichst nahe bei  $20^\circ$  gehalten. Die Philpot-Svensson Optik war mit einer Phasenplatte als Schlierendiaphragma ausgerüstet. Die sich ergebenden Sedimentationsdiagramme wurden bei einer Belichtungszeit von 20 sec mit Perutz Silbereosin Platten aufgenommen.

Die untersuchten Lösungen wurden zusätzlich bei 1500 Umdr./min photographiert, wobei an Stelle der Balance-Zelle eine mit einem prismatischen Keil ausgerüstete Zelle verwendet wurde. Da die durch den prismatischen Keil bewirkte Verschiebung des Lichtbündels zuvor bestimmt worden war, konnte aus dem Abstand zwischen den zwei sich ergebenden Basislinien der optische Vergrößerungsfaktor entlang der Gradientenkoordinate leicht und exakt bestimmt werden<sup>13</sup>. Die Kenntnis der Linsenabstände und der Einstellung des Schlierenwinkels war in diesem Falle nicht nötig.

Da Iridin aus verhältnismässig kleinen Molekeln besteht, liess sich mangels geeigneter Membranen keine Vordialyse ausführen. Es ist daher anzunehmen, dass gewisse Störungen infolge nicht ausgeglichener Donnan Potentiale und Salzkonzen-

trationen der Lösung und des Lösungsmittels auftreten. Auch hier, wie vorher, erfordert der Kochsalzanteil der trockenen Substanz eine entsprechende Zugabe von NaCl zum Puffer, um die Ausgangslösung weiter verdünnen zu können. Es ist möglich, dass die kleinen Ungenauigkeiten dieses Ausgleiches sich als Fehlerquellen auf die Genauigkeit der Experimente auswirken. Eine weitere Störung, besonders bei hohen Rotationsgeschwindigkeiten, verursachte das für die Stabilität des Iridins notwendige pH 7.3, welches von dem isoelektrischen Punkt (pH  $\approx$  12) ziemlich weit entfernt liegt.

Wegen der kleinen Dimensionen der untersuchten Molekeln verbreitet sich die Gradientenkurve schon während des Unterschichtungsvorgangs und der Beschleunigung des Rotors sehr stark. Die weitere rasche Verbreiterung der Kurven bringt es mit sich, dass die Versuche nicht länger als 70–80 min dauern konnten. Wegen der flachen Form der Kurve und wegen der geringen Sedimentationsgeschwindigkeit des Iridins war die Verschiebung des Gipfels kaum bemerkbar.

All diese Schwierigkeit machten die Ausführung mehrerer Versuche für jede Lösung notwendig, um auf Grund vielfacher Messungen die sich ergebenden Werte genauer mitteln zu können. Obwohl mit Hilfe einiger Auswertungsmethoden zuverlässige Ergebnisse gewonnen werden konnten, verursachten die vorhandenen Störungen sekundäre Abweichungen von der Theorie. Diese Diskrepanzen liessen sich jedoch durch die mathematische Analyse der experimentellen Gradientenkurve vermindern.

#### *Auswertung der Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten*

*Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten nach der Svedberg-Methode:* Aus den experimentellen Gradientenkurven wurden zunächst die Sedimentationskoeffizienten nach der Svedberg Formel<sup>14</sup> ausgewertet:

$$\ln r_{\max} = \ln r_0 + \beta t. \quad (2)$$

Hier ist  $r_{\max}$  der Abstand der Maximalgradientenkoordinate vom Rotationszentrum;  $r_0$ , dieser Abstand am Beginn des Experimentes;  $t$ , die Zeit;  $\beta = s\omega^2$ ;  $s$ , der Sedimentationskoeffizient und  $\omega$  die Winkelgeschwindigkeit.

Die gewonnenen Sedimentationskoeffizienten lassen sich mit Hilfe der Quotienten der Viskositätskoeffizienten  $\eta_t$  und  $\eta_{20^\circ}$  auf Standardbasis reduzieren.

Es ist bemerkenswert, dass die bei 48000 Umdr./min gewonnenen Sedimentationskoeffizienten niedriger liegen, als die aus den Versuchen bei 30000 Umdr./min gewonnenen Werte. Jedoch die für beide Fälle resultierenden Geraden liefern einen und denselben Extrapolationswert,  $(s_0)_{20^\circ} = 0.739$  S, sodass angenommen werden muss, dass die  $s$ -Werte bei hohen Rotationsgeschwindigkeiten stärker von der Konzentration abhängen, als bei kleinen.

*Die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten und des Quotienten  $s/D$ :* Für die Bestimmung des Quotienten  $s/D$  und des Diffusionskoeffizienten aus den experimentellen Gradientenkurven der Ultrazentrifuge wurden zunächst die "Drei-Punkt-Methode"<sup>15,16</sup> und die "Zwei-Punkt-Methode"<sup>13,15</sup> angewandt. Nach diesen sehr empfindlichen Methoden lassen sich mehrere Werte für jede experimentelle Kurve erhalten. Auf Grund der oben dargestellten Störeffekte und wegen der Unvollkommenheit der Schlierenoptik, resultiert erwartungsgemäss eine beträchtliche Streuung der Ergebnisse. Da die Ergebnisse jedoch immer um denselben Mittelwert schwanken

und kein Teil der Kurven (aus allen Versuchen) auf systematische Abweichungen hinweist, kann im Rahmen der experimentellen Genauigkeit die Substanz als homogen angesehen werden. Der Wert des Quotienten  $s/D$  und des Diffusionskoeffizienten kann nicht mit Hilfe der erwähnten Methoden mit der erforderlichen Sicherheit ermittelt

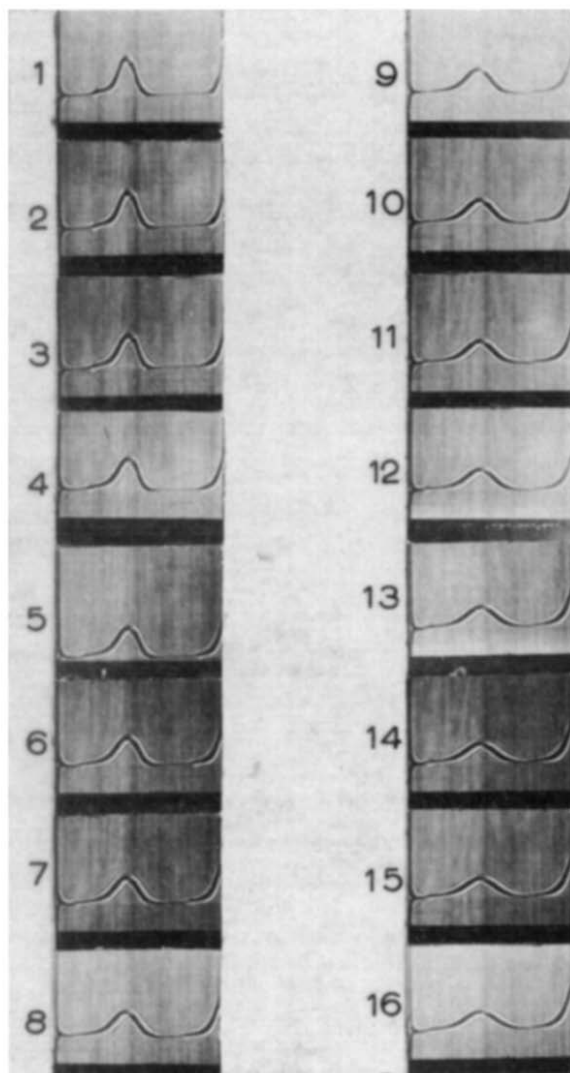


Fig. 1. Verlauf eines Sedimentationsversuchs mit Iridin-Chlorid.  $c = 3.74 \cdot 10^{-3}$ . Die erste Aufnahme 25 min nach dem Schichtungsverfahren. Die nächsten in Zeitabständen von 3 min.

werden. Darum wurde die "Maximalgradientenmethode"<sup>15,16</sup> angewandt, mit deren Hilfe sich der Diffusionskoeffizient  $D$  mit einer befriedigenden Genauigkeit aus der Formel:

$$Z = \frac{1}{KD} \cdot \frac{1}{t} - \frac{1}{K} \cdot \frac{5\beta}{D} \quad (3)$$

bestimmen liess, wobei  $Z$  den auf den Aufnahmen gemessenen Maximalgradienten,  $K = (4\pi F)/(\Delta n)_0^2$ ,  $F$  den optischen Vergrösserungsfaktor entlang der Gradientenkoordinate und  $(\Delta n)_0$  die Differenz zwischen den Brechungsindices der Lösung und des Lösungsmittels am Beginn des Versuchs bedeuten (Fig. 3). Für die genaue unmittelbare bestimmung des Quotienten  $s/D$  ist jedoch die vorhandene Optik ungeeignet. Darum wurden die entsprechenden  $s$ -Werte aus der Gl. 2 ausgewertet.

TABELLE I

SEDIMENTATIONSKOEFFIZIENTEN DES IRIDIN-CHLORIDS IN  
0.05 M TRIAETHANOLAMIN-HYDROCHLORID PUFFER (pH 7.3) BEI 20°

$c$	$10^3$	Umdr./min	$10^{-3}$	$s_{20^\circ}(S)$
3.74		48		0.646
4.35		30		0.690
6.05		30		0.678
7.67		48		0.550
9.90		30		0.639
12.45		30		0.591

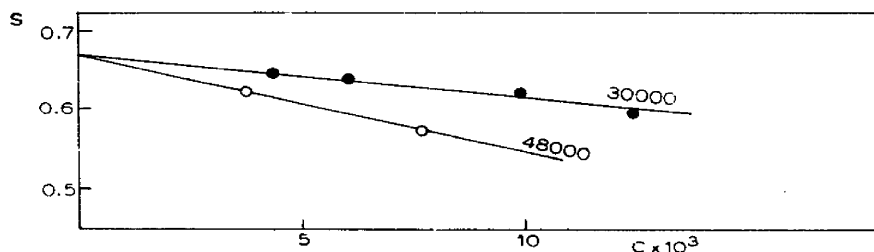


Fig. 2. Sedimentationsanalyse des Iridin-Chlorids in 0.05 M Triäthanolamin-Hydrochlorid Puffer (pH 7.3). ●—●, Die Konzentrationsabhängigkeit von  $s_{20^\circ}$  bei 30000 Umdr./min; ○—○,  $s_{20^\circ}$  bei 48000 Umdr./min.

Um den Diffusionskoeffizienten nach Gl. 2 zu ermitteln, ist es notwendig, die entsprechende Zeit  $t$  vorher zu bestimmen. Wegen der Verbreiterung der Kurve während des Schichtungsverfahrens und des Anlaufs der Ultrazentrifuge darf man die Unterschichtungszeit nicht als "Nullzeit" ansehen; vielmehr muss man hypothetisch annehmen, dass die Diffusion schon vor dem Schichtungsvorgang eingesetzt hat. Die "wahre Diffusionszeit"  $t_D$  kann nach der noch nicht veröffentlichten und aus der Sedimentationstheorie abgeleiteten "Methode der Umgebung des Maximalgradienten" bestimmt werden, und ergibt sich für die vorliegenden Versuche im Mittel zu etwa 470 sec vor dem Beginn des Schichtungsverfahrens.

Die gewonnenen  $D_t$  Werte wurden nun in  $D_{20^\circ}$  umgerechnet. Die auf diesem Wege resultierenden Werte für  $(s/D)_{20^\circ}$  und  $D_{20^\circ}$  stimmen mit den zuvor nach anderen Methoden erhaltenen überein.

Analog dem Verlauf der Sedimentationskoeffizienten unterscheiden sich die bei 30000 Umdr./min gewonnenen Diffusionskoeffizienten von ihren entsprechenden Werten bei 48000 Umdr./min. Die in beiden Fällen resultierenden Geraden führen jedoch zu ein und demselben Extrapolationswert  $(D_0)_{20^\circ} = 12.96 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ . Bei dem Quotienten  $(s/D)_{20^\circ}$  sind diese Unterschiede nicht bemerkbar; es ergibt sich  $(s_0/D_0)_{20^\circ} = 5.70 \cdot 10^{-8} \text{ sec}^2/\text{cm}^2$ .

Wegen der sekundären Störungen liess sich der Quotient ( $s/D$ ) nach der Formel 3 nicht ermitteln. Die Streuung der Ergebnisse war viel grösser als üblich und die Abweichung von der Theorie deutet auf zusätzliche elektrische, chemische oder andere Effekte hin.

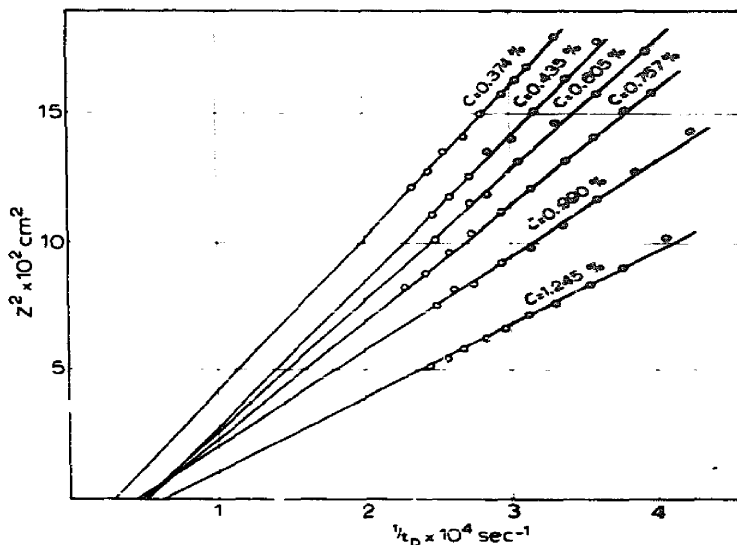


Fig. 3. Verlauf der Funktion  $Z^2$  nach der "Maximal-Gradienten-Methode".

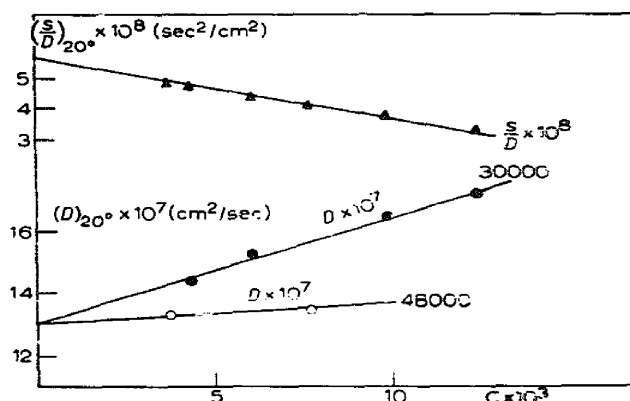


Fig. 4. Konzentrationsabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten und der Quotienten ( $s/D$ ) bei der Sedimentation des Iridin-Chlorids in 0.05 M Triäthanolamin-Hydrochlorid Puffer (pH 7.3) bei 20°. ●—●,  $D_{20^\circ}$  bei 30000 Umdr./min; ○—○,  $D_{20^\circ}$  bei 48000 Umdr./min; ▲—▲,  $(s/D)_{20^\circ}$ .

#### Die Bestimmung des Molekulargewichtes und der Moleküldimensionen

Nach der bekannten Formel von SVEDBERG<sup>17</sup>:

$$M = \frac{R \cdot 293^\circ}{(1 - \bar{v}\rho_0)_{20^\circ}} \cdot \left(\frac{s_0}{D_0}\right)_{20^\circ} \quad (5)$$

mit  $R$  = Gaskonstante, liess sich das Molekulargewicht des Iridin-Chlorids zu  $M = 4100$  bestimmen.

TABELLE II

 DIFFUSIONSKOEFFIZIENTEN  $D$  UND QUOTIENTEN  $(s/D)$  BEI DER SEDIMENTATION  
 DES IRIDIN-CHLORIDS IN 0.05 M TRIÄTHANOLAMIN-HYDROCHLORID PUFFER (pH 7.0) BEI 20

$v \times 10^3$	$U_{\text{mdr}}/\text{min}$ $\times 10^{-3}$	$(D)_{20^\circ} \times 10^7$ ( $\text{cm}^2/\text{sec}$ )	$(s/D)_{20^\circ} \times 10^8$ ( $\text{sec}^2/\text{cm}^2$ )
3.74	48	13.3	4.95
4.35	30	14.4	5.03
6.05	30	15.3	4.56
7.67	48	13.4	4.20
9.90	30	16.2	4.26
12.45	30	17.3	3.65

Um die Dimensionen des Moleküls zu berechnen, wurden als Modelle der starre oder flexible Zylinder angenommen.

**Modell eines starren Zylinders:** Nach der Perrin'schen Methode<sup>18</sup> lässt sich das Achsen-Verhältnis aus dem Quotienten  $(f/f_0)$  berechnen, wobei  $f$  den experimentellen Reibungsfaktor und  $f_0$  den für den Fall einer sedimentierenden Kugel berechneten Reibungsfaktor bedeuten. Aus den Formeln<sup>19</sup>:

$$f = \frac{M(1 - \bar{v}\rho_0)}{s_0} \quad (6)$$

und

$$f_0 = 6\pi\eta N \left( \frac{3M\bar{v}}{4\pi N} \right)^{1/3} \quad (7)$$

( $N$  = Loschmidt'sche Zahl) ergibt sich der Quotient  $(f/f_0) = 1.60$ . Die Perrin'sche Funktion liefert in diesem Falle das Achsenverhältnis für ein gestrecktes Ellipsoid bzw. für einen Zylinder,  $p = 11$ .

Da jedoch im Falle eines Zylinders:

$$M = \frac{2\pi r^3 p N}{\bar{v}} \quad (8)$$

gilt, folgt für den Radius  $r$  des Zylinders  $r = 4.02 \text{ Å}$ , für den Durchmesser  $d = 8.04 \text{ Å}$  und für die Länge  $l = 88.44 \text{ Å}$ .

**Modell eines flexiblen Zylinders:** Für diesen Fall wurde  $p$  als Funktion der voluminären Grenzviskosität  $[\eta]_\phi$  nach der SIMHA Formel<sup>20</sup> ausgedrückt:

$$[\eta]_\phi = \frac{14}{15} + \frac{p^2}{15(\ln 2p - 1.5)} + \frac{p^2}{5(\ln 2p - 0.5)} \quad (9)$$

wobei  $\phi = \text{ml Iridin-Chlorid}/1 \text{ ml Lösung}$ . Da  $[\eta]_\phi = 12.31$ , ergibt sich für Achsenverhältnis  $p = 13.8$ . Für den Durchmesser folgt nach Gl. 7,  $d = 7.57 \text{ Å}$ ; für die Länge  $l = 104.5 \text{ Å}$ .

## DISKUSSION

Die physikalische Untersuchung, ebenso wie die chemische Analyse<sup>7</sup> des Iridins ergeben, dass ein Mol Iridin aus 16 Mol Arginin und 8–9 Mol anderer Monoamino-säuren: Serin, Glycin, Valin, Alanin, Leucin und Prolin besteht. Bei den Arginin Molekeln sind die Guanidin-Gruppen mit Chlor-Ionen besetzt.



Es ist bekannt, dass manche Polyamino-säuren, wie Polyarginin und Polyalanin in wässriger Lösung eine  $\alpha$ -Helix bilden. Diese Neigung ist jedoch nicht bei allen Polyamino-säuren gleich stark. Daher kommt es vor, dass die Helix-Struktur in einigen Polymeren mit statistisch ungeordneten Bereichen abwechselt.

Die Frage der Struktur wird im Falle des Iridins noch dadurch erschwert, dass es sich hier nicht um eine einheitliche Polyamino-säure handelt, sondern um Kopoly-mere mehrerer Aminosäuren. Eine durchgehende  $\alpha$ -Helix dürfte hier nicht vorliegen: im Fall der reinen  $\alpha$ -Helix sollte Iridin die Form eines starren Stäbchens mit einem Durchmesser von etwa 10 Å besitzen, während die Experimente  $d \sim 8$  Å liefern.

Auch die entgegengesetzte Annahme voller flexibler Struktur widerspricht den Ergebnissen, da mit dem Vorliegen eines statistischen Knäuels der verhältnismässig hohe Wert der Grenzviskosität nicht vereinbar ist.

Es wäre daher notwendig, entweder eine neue bisher unbekannte starrere Struktur für das Iridin-Molekül vorauszusetzen, oder, was wahrscheinlicher sein dürfte, das Molekül als eine Kombination starrer und flexibler Anteile anzusehen. Unter dieser Voraussetzung könnte man als mittleren Durchmesser des flexiblen Zylinders den Wert 7.6 Å und als Länge 105 Å (Achsenverhältnis  $p = 13.8$ ) annehmen.

Die Bestätigung dieser Hypothese bedarf jedoch weiterer experimenteller Überprüfung der Struktur des Iridin-Moleküls.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Lösungen des Iridins (aus *Salmo irideus*) in 0.05 M Triäthanolamin-hydrochlorid Puffer (pH 7.3) wurden bei 20° mittels Ultrazentrifuge, Pyknometrie, Refraktometrie und Viskositätsmessungen untersucht.

Als Brechungsindexinkrement ergab sich der Quotient  $dn/dc = 1.91$ , wobei die Konzentration  $c = g$  Iridin-Chlorid/1 g Lösung. Das partielle spezifische Volumen beträgt  $\bar{v} = 0.66$  ml/g. Daraus folgt, dass die Protamine schwerere Substanzen darstellen, als es bis jetzt angenommen wurde. Für die Protamin-Sulfate ergab sich  $\bar{v} = 0.58$  ml/g.

Der Sedimentationskoeffizient extrapoliert zu  $c = 0$  ist 0.74 S. Der aus den Sedimentationsaufnahmen nach der "Maximalgradientenmethode" errechnete Diffusionskoeffizient beträgt  $(D_0)_{20^\circ} = 13.0 \cdot 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/sec. Daraus ergibt sich das Molekulargewicht  $M = 4100$ .

Unter der Annahme, dass Iridin sich wie ein flexibles Stäbchen verhält, liessen sich aus dem Molekulargewicht und der Grenzviskosität (intrinsic viscosity)  $[\eta]_c = 8.16$  der Durchmesser des Moleküls zu 7.6 Å und seine Länge zu 104.5 Å bestimmen (Achsenverhältnis 13.8).

#### DANK

Die Anregung zur vorliegenden Arbeit verdanken wir Herrn Professor Dr. K. FELIX†.

Unser besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. E. HEINZ, für die freundliche Erlaubnis zur Benutzung der Instituteinrichtungen für die experimentellen Arbeiten.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup> K. FELIX, *Advances in Protein Chemistry*, 15 (1960) 1.
- <sup>2</sup> K. ISO, T. KITAHARA UND I. WATANABE, *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Section*, 75 (1954) 342.
- <sup>3</sup> N. UI UND I. WATANABE, *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Section*, 74 (1953) 647.

- <sup>4</sup> N. UI UND I. WATANABE, *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Section*, 74 (1953) 651.
- <sup>5</sup> N. UI, *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Section*, 77 (1956) 947.
- <sup>6</sup> N. UI, *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Section*, 77 (1956) 1735.
- <sup>7</sup> K. FELIX UND C. HASHIMOTO, *Wiederholte Untersuchungen über die chemische Struktur von Protaminen*, *Z. physiol. Chem.*, in the press.
- <sup>8</sup> K. H. KIMBELL, *Z. Physiol. Chem.*, 295 (1953) 132.
- <sup>9</sup> I. K. PARNAS UND R. WAGNER, *Biochem. Z.*, 125 (1921) 253.
- <sup>10</sup> S. SAKAGUCHI, *J. Biochem.*, 37 (1950) 231.
- <sup>11</sup> S. SAKAGUCHI, *J. Biochem.*, 38 (1951) 91.
- <sup>12</sup> T. SVEDBERG UND K. O. PEDERSEN, *Die Ultrazentrifuge*, Theodor Steinkopff, Dresden, 1939, S. 53.
- <sup>13</sup> R. JAENICKE UND M. GEHATIA, *Biochim. Biophys. Acta*, 45 (1960) 217.
- <sup>14</sup> T. SVEDBERG UND K. O. PEDERSEN, *Die Ultrazentrifuge*, Theodor Steinkopff, Dresden, 1939, S. 16.
- <sup>15</sup> M. GEHATIA, *Kolloid Z.*, 167 (1959) 1.
- <sup>16</sup> M. GEHATIA UND L. HÜBNER, *Z. Naturforsch.*, 156 (1960) 351.
- <sup>17</sup> T. SVEDBERG UND K. O. PEDERSEN, *Die Ultrazentrifuge*, Theodor Steinkopff, Dresden, 1939, S. 6.
- <sup>18</sup> T. SVEDBERG UND K. O. PEDERSEN, *Die Ultrazentrifuge*, Theodor Steinkopff, Dresden, 1939, S. 38.
- <sup>19</sup> T. SVEDBERG UND K. O. PEDERSEN, *Die Ultrazentrifuge*, Theodor Steinkopff, Dresden, 1939, S. 36.
- <sup>20</sup> R. J. SIMHA, *Chem. Phys.*, 44 (1940) 25.

*Biochim. Biophys. Acta*, 69 (1963) 212-221