

The mechanism by which ovalbumin associates in the presence of AlCl_3 is not yet clear. The involvement of carboxylate groups on the protein is suggested by the acid limb of the pH profile, the reversal of the association by polycarboxylic acids, and the strong binding of aluminium to oxygen⁴. The failure of acetate to interfere with the association might suggest that chelation of the metal by the protein is necessary. However, simple trivalent aluminium only exists below pH 4.0 and a hydrolytic polymer $\text{Al}_8(\text{OH})_{20}^{4+}$, is postulated in the range pH 4-7 by MATIJEVIC and coworkers⁵. It appears that there is a progressive addition of hydroxide ions to the polymer and the eventual dissolution of the polymer into $\text{Al}(\text{OH})_3$ at alkaline pH. It is possible then, that the ovalbumin complex is dependent on the size and electrical state of the aluminium polymer.

In any case, it appears that polydisperse patterns of some proteins previously exposed to aluminium can, under certain conditions, be attributed to the presence of aluminium alone.

J.G. gratefully acknowledges a Special Fellowship, National Institute of Neurological Diseases and Blindness, U.S. Public Health Service.

*Carlsberg Laboratory, Chemical Department,
Copenhagen (Denmark)*

JULIUS A. GORDON*
MARTIN OTTESEN

¹ J. M. CREECH, L. W. NICHOL AND D. J. WINZOR, *J. Phys. Chem.*, 62 (1958) 1546.

² P. URNES AND P. DOTY, *Advan. Protein Chem.*, 16 (1961) 488.

³ H. K. SCHACHMAN, in S. P. COLOWICK AND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 4, Academic Press, New York, 1957, p. 32.

⁴ F. R. N. GURD AND P. E. WILCOX, *Advan. Protein Chem.*, 11 (1956) 324.

⁵ E. MATIJEVIC, K. G. MATHAI, R. H. OTTEWILL AND M. KERKER, *J. Phys. Chem.*, 65 (1961) 826.

Received September 9th, 1963

* Present address: University of Colorado, School of Medicine, Denver, Colo. (U.S.A.).

Biochim. Biophys. Acta, 75 (1963) 453-455

PN 1287

Magnetische Untersuchung einer reversiblen Myoglobin-Denaturierung

Anionische Netzmittel genügender Kettenlänge bewirken eine Denaturierung von Hämoglobin zu denaturiertem Globin-Hämochrom und von Myoglobin zu denaturiertem Myoglobin-Hämochrom. In einer vorangegangenen Arbeit (KROMPHARDT UND LÜBBERS¹) wurde der Umwandlungsprozess mit optischer Methodik untersucht und erkannt, dass er sich nach einem Alles-oder-Nichts-Gesetz vollzieht. Verdünnungsversuche liessen sich am besten so deuten, dass im Gegensatz zum Hc die Bildung des Mc beider Wertigkeitsstufen revertierbar sein kann. Da dieser Befund die Frage nahelegte, ob die Denaturierung zum Mc(II) wirklich in einer derartig vollständigen Umbildung der Bindung der prosthetischen Gruppe zum Eiweiss besteht wie bei dem

Abkürzungen: Hc(II), Denaturiertes Globin Ferrohämochrom; Hc(III), Denaturiertes Globin Ferrihämochrom; Mc(II), Denaturiertes Myoglobin Ferrohämochrom; Mc(III), Denaturiertes Myoglobin Ferrihämochrom.

Biochim. Biophys. Acta, 75 (1963) 455-457

kaum revertierbaren Hc(II), wurde mit Hilfe magnetochemischer Methodik nach Unterschieden im magnetischen Verhalten, d.h. in der Bindungsart des Fe im Hc(II) und Mc(II) gesucht.

Die Suszeptibilitätsmessungen wurden mit einer sehr empfindlichen magnetischen Waage vorgenommen, die nach einem von HAAS UND GRÜN² angegebenen Differentialprinzip arbeitet und als Kraftindikator einen auf Schwebezustand einzustellenden Cartesianischen Taucher benutzt. Die vom Magnetfeld wirkende Kraft wird durch "magnetische Titration", d.h. Änderung der Konzentration und damit Suszeptibilität der umgebenden Co²⁺-Lösung (Schwebeflüssigkeit), kompensiert. Bei einer magnetischen Feldstärke von nur 10000 oersted ist eine Menge von approx. 20 µg Fe zur Messung ausreichend. Die genauere Beschreibung erfolgt an anderer Stelle. Als Netzmittel dienten Dodecyl- und Tetradecyl-Sulfat-Salze. Es wurde nach BOWEN³ aus Pferdeherz kristallisiertes und mit Na₂S₂O₄ reduziertes Mb benutzt. Die Reduktion und Durchführung der Messungen erfolgten ausschliesslich in reiner N₂-Atmosphäre.

Für Hb und Mb ergab sich in Übereinstimmung mit der Literatur ein $X \cdot 10^6$ -Wert von 12350 cgs Einheiten entsprechend 5.42 Bohr'schen Magnetonen (BM), für Hc(II) das magnetische Moment 0, dagegen für Mc(II) eine Restsuszeptibilität $X \cdot 10^6 = 1.730$ cgs Einheiten entsprechend 2.03 BM. Dieser Befund war auffallend; eine Verunreinigung mit paramagnetischen Metallionen konnte ausgeschlossen werden. Der Restmagnetismus war in allen Proben konstant. Der Grad der Umwandlung in Mc(II) konnte aus der Änderung der Extinktion (E) bei geeigneten Wellenlängen und parallel auch aus der der Suszeptibilität verfolgt werden und ergab sich aus den Messungen zu:

$$u_E = \frac{E - E_{Mb}}{E_{Mc} - E_{Mb}} \quad \text{bezw.: } u_X = \frac{X - X_{Mb}}{X_{Mc} - X_{Mb}} \quad (1)$$

Hier bedeutet der Index Mb den Wert für reines Myoglobin(II) und Mc den für reines Myoglobin-Ferrohämochrom. Die so ermittelten Umwandlungsgrade stimmen exakt überein; sie wurden in Abhängigkeit von der Konzentration des Detergens bei 22° untersucht.

Aus der bis zu dem Umwandlungsgrad $u = 1$ geradlinig verlaufenden Kurve seiner Abhängigkeit vom Molekельverhältnis Detergens: Mb(II) ergibt sich die zur Umwandlung erforderliche Zahl von Netzmittelionen pro Mb-Molekel. Sie beträgt 31. Die Zahl der basischen Aminosäuren inklusive der terminalen α -NH₂-Gruppe ist für das Pferde-Mb nach PORTER UND SANGER⁴ 30. Myoglobin(III) bindet 18 Detergensmoleküle übereinstimmend mit der Zahl der ϵ -Aminogruppen des vorhandenen Lysins¹.

Tetradecyl-Sulfat-Salz fällt bei Abkühlung auf 4° in Gegenwart von Kaliumionen praktisch quantitativ aus und trennt sich dabei vom Eiweiss. Bei der Untersuchung des Überstandes zeigte sich optisch und magnetisch eine 100 %ige Reversion von Mc(II) zu Mb(II). Die Untersuchung der O₂-Bindungskurve des revertierten Mb steht noch aus. Wenn die Myochrombildung tatsächlich wie die des Hämochroms als Denaturierung angesehen wird, ist mit diesem Versuch ein instruktives Beispiel ihrer Revertierbarkeit gegeben.

Das Entstehen eines Rest-Paramagnetismus im Mc(II) muss im Sinne der Ligandenfeldtheorie^{5,6} durch die Aufspaltung der 3d-Elektronen am zentralen Fe(II) in eine low- und eine high-spin-Form von unterschiedlicher Energie erklärt werden, die unter dem Einfluss des 6. Liganden im Oktaederfeld zustande kommt. Dabei steht

nach der hier gefundenen Suszeptibilität die high-spin-Form (4 ungepaarte Elektronen) mit etwa 10 % Anteil im thermischen Gleichgewicht mit der low-spin-Form (kein ungepaartes Elektron). Der 6. Koordinationspunkt im Fe des Mc(II) wird offenbar durch einen relativ schwächeren Liganden besetzt als beim Fe des Hc(II).

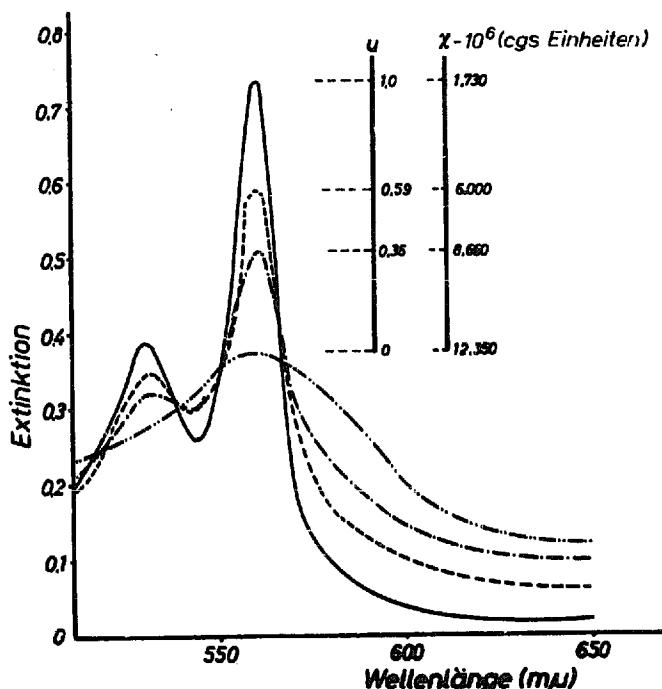


Fig. 1. Optisches und magnetisches Verhalten bei Renaturierung von Mc(II). Reversibilitätsversuch: Mb(II) $\xrightarrow{\text{TDS}}$ Mc(II). —, 4 % TDS; nach 15 Min bei 22°; -·-, 4 % TDS; nach 45 Min bei 22°; -··-, 4 % TDS; nach 60 Min bei 22°; -··-, 4 % TDS; nach 3 Std. bei 4° und nach 24 Std. bei 22°. TDS, Tetradecyl-Sulfat-Salze.

bei dem der starke Ligand Imidazol nur die kleinstmögliche parallele Spinanordnung erlaubt und die low-spin-Form 100 %ig vorliegt. Nach der Sequenz-Analyse⁷ kommt als solcher schwächerer Ligand möglicherweise Glutaminsäure in Frage. Das Vorliegen eines relativ schwächeren Komplexes im Myochrom ist wahrscheinlich eine der Ursachen für dessen bessere Reversibilität zu Myoglobin. Auf weitere Konsequenzen dieser Befunde soll an anderer Stelle eingegangen werden.

*Institut für physiologische Chemie und Physikochemie,
Kiel (Deutschland)*

KLAUS GERSONDE
HANS NETTER

¹ H. KROMPHARDT UND D. LÜBBERS, *Biochem. Z.*, 330 (1958) 342.

² R. HAAS UND F. GRÜN, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 1299.

³ W. J. BOWEN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 747; 179 (1949) 235.

⁴ R. R. PORTER AND F. SANGER, *Biochem. J.*, 42 (1948) 287.

⁵ L. E. ORGEL, IN J. E. FALK, R. LEWBERG AND R. K. MORTON, *Hematin Enzymes*, Pergamon Press Oxford, 1961, S. 1; *Endeavour*, 12 (1963) 42.

⁶ H. HARTMANN UND H. L. SCHLÄFER, *Angew. Chemie*, 70 (1958) 155.

⁷ M. F. PERUTZ, M. G. ROSSMANN, A. F. CULLIS, H. MUIRHEAD, G. WILL AND A. C. T. NORTH, *Nature*, 185 (1960) 416.

Eingegangen am 17. Mai, 1963