

The above conclusions on the nature of the biphenyl system were strengthened by a correlation of the ultraviolet spectra of the aporphines (Table II). Natural aporphines substituted at position 4, or at 3 and 4, exhibited a central peak at 268–270 m μ , while 2, 3-substituted aporphines exhibited a similar peak around 282 m μ . Furthermore, both of these types of aporphines showed a peak in the 303–310 m μ region, but the intensity of this peak is log 4 or less than log 4 when position 4 is substituted, and around log 4.2 when this position is free. These variations again are a reflexion of the rigid and strained biphenyl system existing in the 4-substituted aporphines¹².

Finally, GOODWIN, SHOOLERY, and JOHNSON¹³, on the basis of a study of the nuclear magnetic resonance spectra of the aporphines dicentrine and bulbocapnine methyl ether conjectured that the observed non-equivalence of the methylenedioxy hydrogens (quadruplet instead of singlet) could be explained by either of two views: (a) the aromatic rings are oscillating about the bond connecting them from one non-coplanar conformation to another, but the residence time in one conformation is very much greater; or (b) the relative position of the aromatic rings is fixed in some non-coplanar conformation. The above discussion makes it clear that, at least in the case of the 4,5-substituted aporphines, it is view (b) that is correct.

M. SHAMMA

Department of Chemistry, Pennsylvania State University, University Park (Pennsylvania), May 19, 1960.

Résumé

Par l'étude des rotations optiques, des spectres de l'ultraviolet, et des modèles moléculaires des alcaloïdes de l'aporphine, il a été démontré que dans les aporphines substituées en positions 4 et 5 le système biphenyl est rigide et tordu.

Physikalisch-chemische Untersuchungen eines komplexen Eiweisses: das lösliche Eiweiss der Augenlinse, α -Crystallin

Die physikalisch-chemische Untersuchung des α -Crystallins gibt ein nahezu klassisches Beispiel davon, wie man durch Kombination von grundsätzlich verschiedenen Methoden Einsicht in die komplizierte Natur von Proteinen gewinnen kann, auch dann, wenn die Komplexität so gross ist, dass exakte Bestimmungen von Molekulargewicht und -form, Diffusionskonstante usw. unmöglich sind.

Man lese zum Beispiel die Verhandlungen von LUNDGREN und WILLIAMS^{1,2}, worin ausführlich über die Ergebnisse der Sedimentations- und elektrophoretischen Analyse berichtet wird.

Die löslichen Proteine der Augenlinse der Vertebraten sind nicht nur vom rein chemischen Standpunkt aus wichtig, sondern auch für immunbiologische, Induktions- und ontogenetische Differenzierungsversuche^{3–6}.

Die Augenlinse von höchstwahrscheinlich allen Vertebraten enthält α -Crystallin⁷. Die serologische Identität ist bei Säugetieren, Reptilien, Amphibien und Vögeln dargelegt^{8,9}; beim Fisch ist dies noch einigermassen zweifelhaft. Es ist sogar möglich, dass der *Octopus vulgaris* α -Crystallin in der Augenlinse enthält¹⁰.

Extraktion der Augenlinse von Vertebraten mit verdünnten Pufferlösungen bei einem pH über 7.0 ergibt eine trübe Lösung, die α -Crystallin, andere organspezifische Eiweisse (zum Beispiel β -Crystallin) und ein unlösliches Eiweissgemisch (Albuminoid genannt) enthält^{11,12}. Die Peripherie der Linse dispergiert sehr leicht. Da der Linsenkern in der Hauptsache unlösliche Proteinaggregate enthält, wird bei den Versuchen nur die Linsenperipherie extrahiert^{13,14}. Man kann α -Crystallin von den anderen löslichen Crystallinen trennen durch Fällung am isoelektrischen Punkt (pH 5.0), wobei die anderen Proteine in Lösung bleiben.

Der Niederschlag von α -Crystallin ergibt nach Auflösen in schwach alkalischer Milieum eine klare Lösung, die bei Elektrophorese nur einen Gradient bildet^{15,16} (Fig. 1a). Bei Sedimentation dieser Lösung entstehen aber zwei deutliche Gradienten mit Sedimentationskonstanten von $S_{20} \sim 15$ und $S_{20} \sim 7.5$ (Fig. 1b).

Man kann also annehmen, dass α -Crystallin (mindestens) aus zwei Komponenten α_A und α_B besteht, welche bei der Elektrophorese nur einen Gradient bilden.

Die Aminosäurezusammensetzung von isoelektrisch präzipitiertem α -Crystallin ist von verschiedenen Forschern untersucht worden^{18–21}. Diesen analytischen Angaben zufolge scheint die Zusammenstellung der α -Crystallinfaktion, unabhängig von der Darstellungsweise, konstant zu sein. Sedimentationsmessungen deuten aber an, dass das Konzentrationsverhältnis der zwei α -Komponenten bei verschiedenen Präparaten stark wechselt. Wenn also diese Komponenten verschiedene Aminosäurezusammensetzungen besäßen, müssten die Zusammenstellungen verschiedener Präparate ebenfalls stark voneinander abweichen. Dieses scheint jedoch nicht der Fall zu sein. Man kann daher wohl mit grosser Wahrscheinlichkeit annehmen, dass die Aminosäurezusammensetzung der zwei α -Komponenten die gleiche ist.

Die betreffenden Untersuchungen wurden ausgeführt unter der Ägide der Niederländischen Stiftung für Chemische Forschung (S. O. N.) mit Unterstützung der Niederländischen Organisation für reinwissenschaftliche Forschung (Z. W. O.).

¹ H. P. LUNDGREN and J. W. WILLIAMS, *J. physic. Chem.* **43**, 989 (1939).

² J. W. WILLIAMS, *J. Polymer. Sci.* **12**, 351 (1954).

³ M. W. WOERDEMAN, *Problems of Induction in Biological Specificity and Growth* (Ed. Elmer G. Butler, United Press, Princeton 1955).

⁴ P. RÖMER, *Arch. Augenheilk.* **76**, 120 (1914).

⁵ G. TEN CATE and W. J. VAN DOORENMAALEN, *Proc. Koninkl. nederl. Akad. Wetensch.* **53**, 894 (1950).

⁶ M. DE VINCENTIS, *Boll. Zool.* **21**, 379 (1954).

⁷ Der Name *Crystallin* stammt von J. J. BERZELIUS, *Lärölok i Kemien* **2**, 512 (1830), Vit. KRAUSE¹².

⁸ L. HEKTOEN, *J. infect. Dis.* **31**, 72 (1922).

⁹ L. HEKTOEN and K. SCHULHOFF, *J. infect. Dis.* **34**, 433 (1924).

¹⁰ Nicht publizierte eigene elektrophoretische Versuche in der Stazione Zoologica, Neapel (1957).

¹¹ C. TH. MÖRNER, *Hoppe Seylers Z.* **18**, 60 (1893).

¹² A. C. KRAUSE, *Arch. Ophtalmol.* **8**, 166 (1932); **9**, 617 (1933); **10**, 631, 788 (1933).

¹³ W. F. BON, *Proc. Koninkl. nederl. Akad. Wetensch. [C]* **57**, 517 (1954); *[C]* **58**, 344 (1955).

¹⁴ W. F. BON, Thesis Amsterdam (1955).

¹⁵ G. VIOLIER, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* *[C]* **5**, 10 (1947).

¹⁶ C. WOODS and E. L. BURKY, *J. Amer. med. Ass.* **89**, 102 (1927).

¹⁷ A. J. SCHAEFFER and J. D. MURRAY, *Arch. Ophtalmol.* **43**, 1056 (1950).

¹⁸ K. ULLBERG-OLSSON, *Acta ophtalmol.* **29**, 191 (1951).

¹⁹ B. CAGIANUT, B. PERNIS, and CH. WUNDERLY, *Exper.* **9**, 218 (1953).

²⁰ W. F. BON, *Proc. Koninkl. nederl. Akad. Wetensch. [C]* **57**, 347 (1954).

²¹ H. BLOEMENDAL, Thesis Amsterdam (1957).

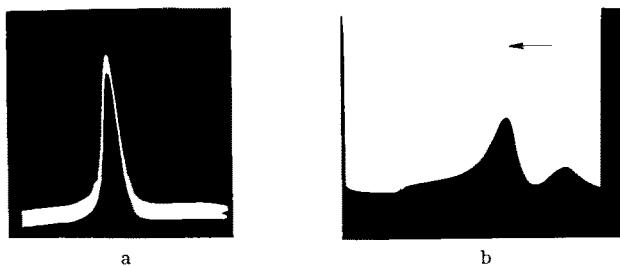


Fig. 1. a) Elektrophorese-Gradient von isoelektrisch präzipitiertem α -Crystallin. 165 V, 12 mA, 8°C, 40 min, 0,1 M NaOAc, 0,05 M Glycin, pH 7,8 (NaOH). b) Sedimentations-Gradient vom gleichen Präparat. 50000 rpm, 1500 sec, 17°C, 15° ≤, 1,1% Conc.



Fig. 2. a) und b) Sedimentationsgradienten von ein- und zweimal präzipitiertem α -Crystallin. 42000 rpm, 1500 sec, 45° ≤, 1,2% Conc., Temp.: a: 21,1°C; b: 20,0°C.

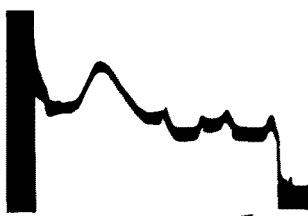


Fig. 3. Sedimentationsgradient von zweimal isoelektrisch präzipitiertem α -Crystallin, wieder aufgelöst in 0,1 M NaOAc, 0,05 M Glycin, pH 7,1; 1,4% Conc.; 47,760 rpm, 2820 sec, 12,1°C, 45° ≤.

Wenn man die Lösung von α -Crystallin bis pH 2.5 an säuert, entsteht eine klare Lösung, die in der Ultrazentrifuge nur *einen* Gradienten bildet mit einer Sedimentationskonstante von $S \sim 1$. Dies bedeutet, dass beide Komponenten zu einer einzelnen Verbindung dissoziieren. Dieses Spaltungsprodukt besitzt noch alle typischen Eiweiß-eigenschaften und ist serologisch identisch mit α -Crystallin.

Wenn man das isoelektrische Präzipitat bei pH 7.8 auflöst und diese Lösung wiederholt durch Ansäuern bei pH 5.0 präzipitiert und diesen Niederschlag erneut bei pH 7.8 auflöst, so ändert sich das Sedimentationsdiagramm. Die Konzentration der schnellen Komponente nimmt ab, die der langsamen Komponente nimmt zu. (Fig. 2a und 2b.)

Nach langdauernden Arbeitsgängen sowie nach fortgesetzter Sedimentation ergibt sich öfters eine Aggregation der α_B -Komponente: Figur 3.

Der verbleibende Hauptgradient röhrt von der α_A -Komponente her. Dies weist darauf hin, dass der Unterschied zwischen den zwei Komponenten in der Form der Teilchen zu suchen ist, dass also die (native) α_A -Komponente entfaltet worden ist.

Die gleichmäßige Abflachung des α_A -Gradienten während der Sedimentation weist darauf hin, dass die native Komponente kugelförmige Gestalt hat. Eine exakte Messung der Diffusionskonstante ist jedoch völlig ausgeschlossen, weil wir die zwei Komponenten nicht quantitativ trennen können, so dass es unmöglich ist, eine homogene Lösung der α_A -Komponente zu erhalten.

Rein theoretisch könnten wir aber beweisen²², dass eine Lösung, welche kugelförmige und gestreckte Teilchen von gleichem Molekulargewicht enthält, wobei das Achsenverhältnis der gestreckten Teilchen $1_1/1_0 = 20$ beträgt,

zwei Gradienten in der Ultrazentrifuge bildet, deren Sedimentationskonstanten sich wie 1 zu 2 verhalten, während sich bei der Elektrophorese dieser Lösung nur *ein* Gradient bilden muss, wie dies beim α -Crystallin der Fall ist. Dass es sich beim α -Crystallin um einen Entartungsvorgang handelt, worin mehr oder weniger globuläre, native Teilchen einer Streckung unterzogen werden, ehe die weitere Denaturierung fortschreiten kann, wird durch die obigen theoretischen Überlegungen wahrscheinlich gemacht und wird unterstützt durch die Kristallisierungsversuche von Wood *et al.*²³. Diese Forscher arbeiten mit Präparaten, welche durch ihre Bereitungsweise entartete Linseneiweiße enthielten. Die Nadelstruktur der α_B -Kristalle weist auf eine langgestreckte Form dieser entarteten Eiweißteilchen hin.

Die bisherige physikalisch-chemische Untersuchung des Linseneiweißes α -Crystallin ergibt ein Bild, das, obgleich noch hauptsächlich qualitativ, doch den Weg zeigt, nach welchem weitere quantitative Untersuchungen erfolgen müssen, um die Struktur dieses besonders interessanten Eiweißes zu klären.

W. F. Bon

Laboratorium für Biochemie und Toxikologie der Universität Amsterdam (Niederlande), 7. April 1960.

Summary

Ultracentrifugal and electrophoretic investigations of the eye lens protein α -crystallin show the probability that this protein exists in the lens and in its solutions (between pH 3.5 and 9.5) in two sub-units only differing in shape: a globular and a stretched unit.

²² W. F. Bon, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 78, 75 (1959).

²³ DON C. WOOD *et al.*, J. biol. Chem. 234, 329 (1959).

The Investigation of the Action of Ultrasound on some Proteid Substances. Part II.¹ The Action of Ultrasound on Diastase

Numerous publications which have appeared in recent years² show that in addition to engineering, medicine and biology, chemistry and particularly biochemistry represent a broad field of application for ultrasound. Its action on ferments has been established on oxidases³, blood catalase⁴, yeast ferments⁵, pepsin⁶, salivary diastase⁷, and trypsin⁸.

¹ Part I: Bull. Soc. chim. Belgrade (in press).

² L. BERGMANN, *Ultraschall und seine Anwendung in Wissenschaft und Technik* (Zürich 1954).

³ R. J. CHRISTENSEN and R. SAMISCH, Plant Physiol. 9, 385 (1934).

⁴ H. SIBIYA and J. TOHOKU, Exp. Med. 30, 181 (1936).

⁵ H. VON EULER and B. SKARZYNSKI, Naturwissenschaften 31, 389 (1943).

⁶ G. MILHAUD and R. O. PRUDHOMME, Ann. Inst. Pasteur 76, 333 (1943).

⁷ M. BUONSANTO, Boll. Soc. ital. Biol. sper. 28, 950 (1952).

⁸ V. STEFANOVIĆ, I. KOSTIĆ, M. BRESJANAC, and D. ŽIVANOVIĆ, Bull. Soc. chim. Belgrade, in press.

⁹ R. WILLSTÄTTER *et al.*, Z. physiol. Chem. 126, 143 (1923).