

Kristallisation des Präalbumins aus Humanserum

Das von BÜCHER¹ im Liquor entdeckte und von ALY² daraus isolierte Präalbumin, das identisch³ ist mit dem von SCHULTZE et al.⁴ aus Serum dargestellten, spielt, wie aus den Arbeiten von INGBAR⁵ hervorgeht, eine wesentliche Rolle bei der Bindung des Thyroxins. Kürzlich gelang INGBAR et al.⁶ die Kristallisation des Präalbumins mit Hilfe von Ammoniumsulfat. Beim Nacharbeiten dieser Versuche fanden wir, dass außer Ammoniumsulfat auch andere Mineralsalze zur Kristallisation dieses Proteins geeignet sind. Eine Beschreibung der dabei erhaltenen vielfältigen Formen schien uns interessant.

Wir verwandten bei der Kristallisation des nach einem früher von uns⁷ beschriebenen Verfahren dargestellten Präalbumins Ammonium-, Natrium- und Magnesium-

sulfat sowie Natrium- und Kaliumphosphat bei Zimmertemperatur. Die genauen Versuchsbedingungen sind in der Tabelle zusammengestellt. Wir setzten die Fällungsmittel langsam und in kleinen Dosen den Proteinlösungen

¹ Th. BÜCHER, D. MATZELT und D. PETTE, Klin. Wschr. 30, 325 (1952).

² F. W. ALY, Biochem. Z. 325, 505 (1954).

³ P. GRABAR, K. GAVRILESCO, J. COURZON, P. HILLION, J. URIEL und J. LEWIN, Nature 176, 976 (1955).

⁴ H. E. SCHULTZE, M. SCHÖNENBERGER und G. SCHWICK, Biochem. Z. 328, 267 (1956).

⁵ S. H. INGBAR, J. clin. Invest. 42, 143 (1963).

⁶ R. H. PURDY, K. A. WOEGER, M. T. HOLLOWAY und S. H. INGBAR, Biochemistry 4, 1888 (1965).

⁷ K. HEIDE und H. HAUPT, Behringwerk-Mitteilungen, Heft 43 (1964).

Kristallisation des Präalbumins aus Humanserum

Fällungsmittel	Präalbumin-Ausgangslösung		pH	Zugesetztes Fällungsmittel ca. ml
	mg Präalbumin	in ml Puffer		
Ammoniumsulfat (gesättigte Lösung)	200	4 0,4 M Acetat	4,6	3
	200	3 0,2 M Phosphat	6,5	3
	200	3 0,2 M Phosphat	7,4	3
	200	3 0,2 M Phosphat	9,0	4
	200	2,5 ml Wasser + 1,5 ml 0,4 M Acetat	3,9	2,7
Natriumsulfat (31%ig, G/V)	200	3 0,4 M Acetat	4,6	2
	200	2 0,4 M Acetat	6,0	2,5
	200	2 0,2 M Phosphat	6,8	2,75
Natriumdihydrogenphosphat (85 g + 100 ml Wasser mit NaOH pH 4,6 eingestellt)	200	3 ml Wasser	4,6	6
Magnesiumsulfat (gesättigte Lösung)	200	3 0,4 M Acetat	4,6	6
Kaliumphosphat ^a (2,8 M, pH 6,8)	200	1 ml Wasser	6,8	4,5

^a Nach D. L. DRABKIN, Arch. biochem. 27, 224 (1949).

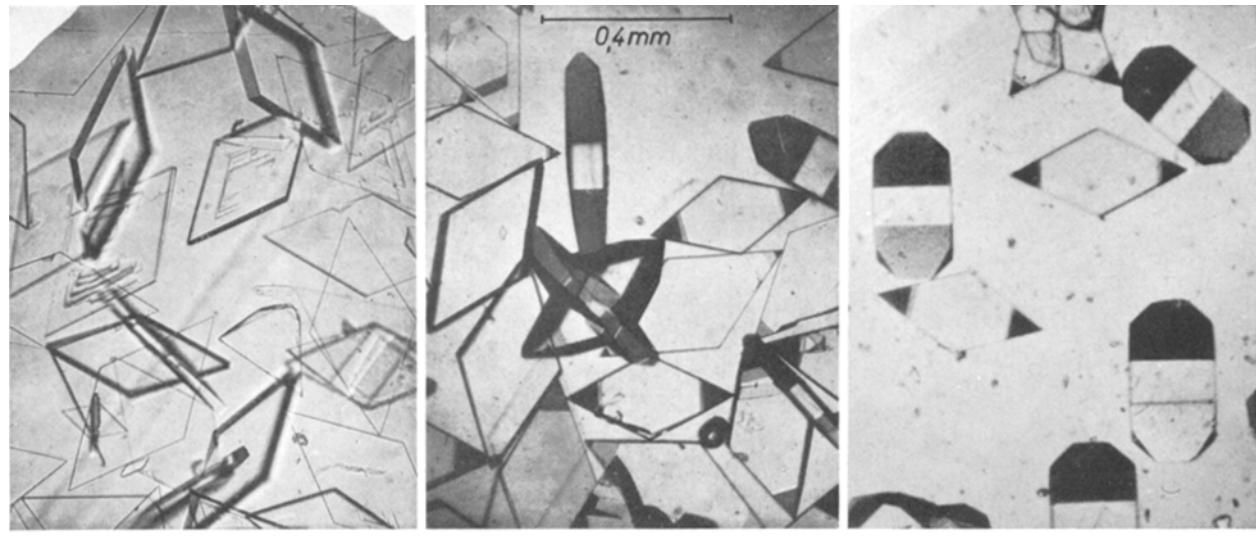


Fig. 1. Kristallisation von Präalbumin mit Ammoniumsulfat. a) pH 4,6; b) pH 6,5; c) pH 7,4.

bis zur beginnenden Opaleszenz zu. Nach einigem Stehen wurden die Lösungen steif und gelartig. Am anderen Tag hatten sich gelbliche Kristalle gebildet, die gelegentlich eine Länge von 1 mm erreichten.

Die Form der Kristalle, die in allen Fällen dem orthorhombischen System angehörten, war im wesentlichen abhängig vom pH-Wert der Lösung. Sie hing aber auch von der Geschwindigkeit des Kristallwachstums ab. Das zur Kristallisation verwendete Mineralsalz hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Kristallform. So erhielten wir mit allen verwendeten Mineralsalzen bei pH 4,6 rhombische Platten. Im Falle des Ammonsulfats waren bei pH 6,5 die Rhomben schon erheblich dicker und an den spitzen Winkeln abgeflacht, so dass Dekaeder resultierten. Bei pH 7,4 war in der Aufsicht die rhombische Form ebenfalls noch erhalten, die Rhomben waren jedoch wesentlich höher, so dass die bei pH 6,5 in der Seitenansicht durch die Abflachung beobachtete Spitze nun in eine stumpfe Kante überging (Figur 1).

Mit Natriumsulfat bei pH 6,0 bildeten sich Rhomboeder. Bei pH 6,8 erhielten wir Dekaeder wie sie in Figur 2 wiedergegeben sind. Ähnliche Dekaeder erhielten wir auch mit Kaliumphosphat bei pH 6,8 (Figur 3).

Die Kristallisation bei pH-Werten an der Grenze des für Proteine allgemein geltenden Stabilitätsbereiches (pH 4–9) war ebenfalls möglich. Sie war jedoch bei pH 3,9 erschwert durch die geringe Löslichkeit des Präalbumins bei diesem pH-Wert. Auch hierbei resultierten die für saure bzw. alkalische pH-Werte charakteristischen Kristallformen, die Kanten der Kristalle zeigten jedoch bereits deutlich erkennbare Krümmungen.

Die unterschiedliche Form der Kristalle bei verschiedenen pH-Werten kann dadurch erklärt werden, dass sich die Konfiguration des Proteinmoleküls in Abhängigkeit vom pH-Wert ändert⁸. Parallel mit dieser von der Ver-

⁸ H. A. SCHERAGA, *Protein Structure* (Academic Press, New York-London 1961), p. 189.

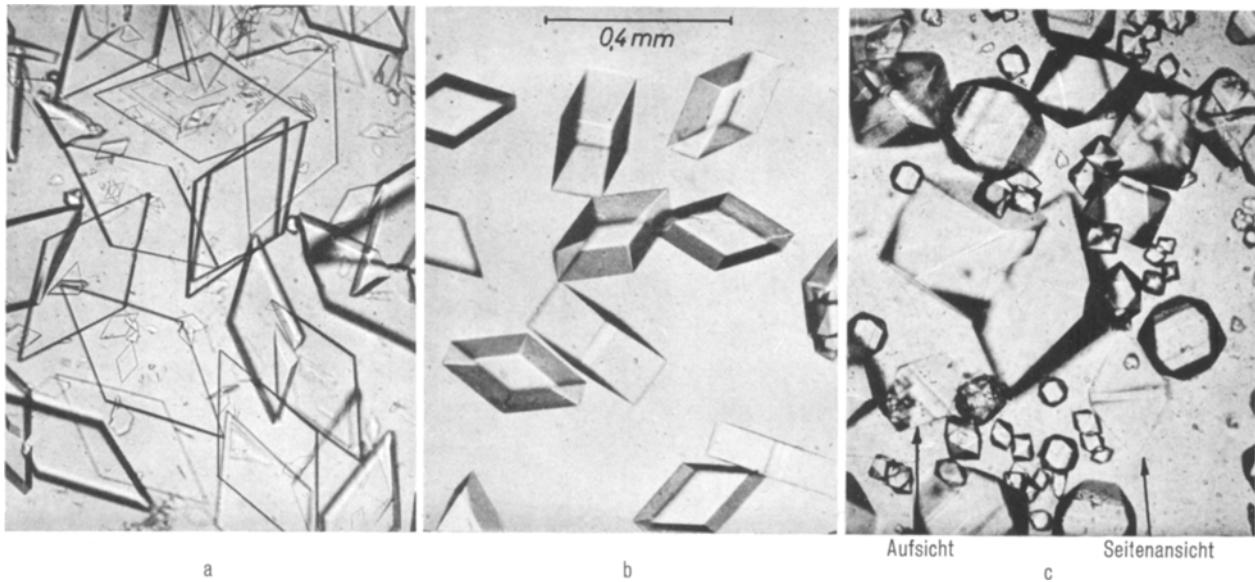


Fig. 2. Próalbumin mit Natriumsulfat kristallisiert. a) pH 4,6; b) pH 6,0; c) pH 6,8.

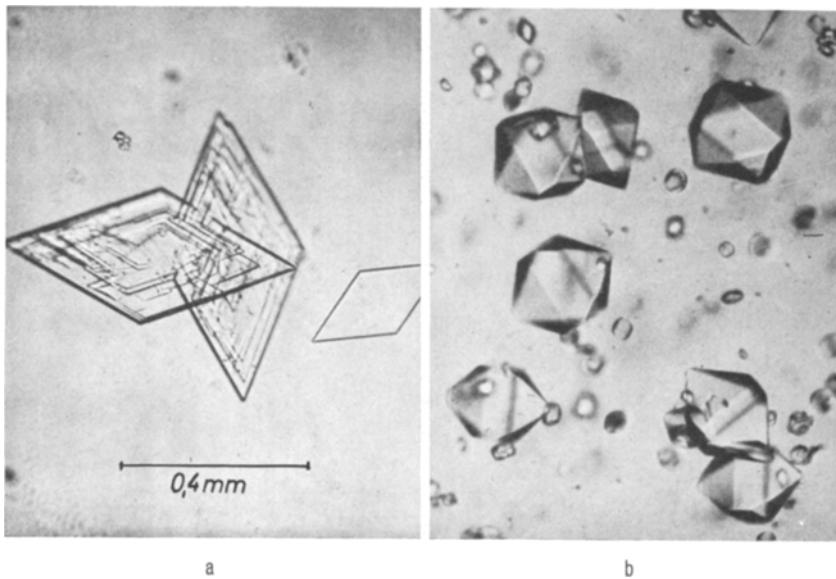


Fig. 3. Próalbumin-Kristallisation. a) mit Natriumphosphat, pH 4,6; b) mit Kaliumphosphat, pH 6,8.

änderung der Nettoladung begleiteten Änderung der Moleküldimensionen ändern sich weitere Parameter wie zum Beispiel Viskosität und optische Drehung. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die N-F-Transformation des Albumins⁹. Das Albumin ist jedoch hinsichtlich seiner Struktur noch wesentlich stabiler als das Präalbumin, denn es wird durch zahlreiche Disulfidbindungen stabilisiert, während Präalbumin kein Cystein und somit keine Schwefelbrücken enthält. Albumin liefert nach unseren Befunden bei der Kristallisation mit Ammoniumsulfat im pH-Bereich von 4,6–7,7 immer die gleiche Kristallform. Schliesslich könnte die Anlagerung von Ionen des Fällungsmittels eine Rolle spielen. Sie sollte sich beim isoelektrischen Punkt (pH 4,7¹⁰) weniger bemerkbar machen, als bei pH-Werten, bei denen das Protein eine beträchtliche negative Ladung aufweist (pH 6,5 und 7,4). Eine pH-Abhängigkeit der Kristallform von Proteinen wurde schon früher von KING et al.¹¹ im Falle der Ribonuklease und von CZOK und BÜCHER¹² bei Enolase und Triose-Phosphat-Isomerase beobachtet.

Die erhaltenen Präalbumin-Kristalle waren auch nach mehrwöchigem Stehen stabil und lagerten sich nicht in andere Formen um. Sie besaßen die für Proteinkristalle wie zum Beispiel Hämoglobin charakteristische weiche Konsistenz, so dass sie bei mikroskopischer Betrachtung schon vom Deckgläschen zerdrückt wurden. Zum Nachweis ihrer Proteinnatur wurden die Kristalle durch Abzentrifugieren von der Mutterlauge getrennt. Abguss und Rückstand wurden mit der Biuret-Reaktion sowie mit

der Extinktion bei 280 nm ($E^{1\text{cm}}_{1\%} = 13,2$) auf ihren Eiweissgehalt geprüft. Bei schneller Kristallisation (relativ kleine Kristalle) waren im allgemeinen 80–90% des Proteins kristallisiert. Bei langsamer Kristallisation waren nur etwa 60–70% des Proteins an der Kristallisation beteiligt.

Summary. The thyroxine binding prealbumin was crystallized by ammonium sulphate, sodium sulphate, magnesium sulphate, sodium phosphate and potassium phosphate. The form of the orthorhombic crystals was dependent on pH.

H. HAUPT und K. HEIDE¹³

*Behringwerke AG, Marburg, Lahn (Deutschland),
8. März 1966.*

⁹ J. F. FOSTER, in *Plasma Albumin* (Ed., F. W. PUTNAM; Academic Press, New York-London 1960).

¹⁰ R. GOT, R. BOURRILLON und J. MICHON, *Protides of the Biological Fluids* (Elsevier, Amsterdam 1962), p. 125.

¹¹ M. V. KING, B. S. MAGDOFF, M. B. ADELMAN und D. HARKER, *Acta crystallogr.* 9, 460 (1956).

¹² R. CZOK und TH. BÜCHER, *Adv. Protein Chem.* 15, 335 (1960).

¹³ Für Diskussionen über die Form der Kristalle sind wir Herrn Prof. Dr. E. HELLNER und Herrn Dr. R. ALLMANN vom Mineralogischen Institut der Universität Marburg zu Dank verpflichtet.

The Length-Tension Diagram of Single Muscle Fibres of the Crayfish

As shown by RAMSEY and STREET¹ on single twitch fibres of the frog, the tension developed in a maintained tetanus is a maximum at a definite length of the fibre and decreases with stretching or shortening of the fibre. The shape of the length-tension diagram is related very closely to the amount of overlap between the thick and thin filaments².

The length-tension diagram of isolated muscle fibres of the crayfish (Figure) differs from that of the frog muscle fibres by a steeper fall in tension after stretching the fibre beyond its optimal length. The diagram was constructed from the records of potassium contractures evoked by sudden application of solutions containing 174 mM K and 7.8 mM Cl. The potassium contracture represents practically the only available way of obtaining maximal tension in crayfish muscle fibres in view of the multiple innervation and the local character of membrane responses as well as of the accompanying contractions³. Single fibres were dissected from the extensor carpopoditi muscle of the crayfish (*Astacus fluviatilis*) and the tension was recorded by the RCA 5734 transducer⁴.

Crayfish muscle fibres develop maximal tension when stretched to 1.25 l_0 , where l_0 is defined as the length at which the fibre is just held taut horizontally in van Harreveld solution (5.4 mM K, 250 mM Cl). At the optimal length the sarcomere length was $10.5 \pm 0.3 \mu$ and the length of the A band was $3.95 \pm 0.8 \mu$. The sarcomere length was directly proportional to the amount of extension, the length of the A band remaining constant. It is

thus simple to transform the abscissa in units of initial length to the abscissa in microns of sarcomere length. The length of the sarcomere was measured from microphotographs made with the use of a double-objective microscope constructed according to the principle of LAU⁵.

When the fibre was stretched beyond 1.35 l_0 , there was an almost linear decrease in tension. The explanation is that the overlap between the thick and thin filaments decreases in this range of extension. If we take into account the values of the sarcomere length as well as the length of the A band measured at the optimal length ($= 1.25 l_0$), we would expect the tension to fall to zero values at the sarcomere length $10.50 + 3.95 = 14.45 \mu$, which corresponds to the extension of the fibre to 1.72 l_0 . At this length the thick and thin filaments ought to be just 'out of mesh' (inset diagram on the right). The fact that fibres are still capable of generating tension at this length can be explained by assuming that tension is generated in those parts of the fibre close to the insertions, where filaments still overlap, while central parts of the fibre are already 'out of mesh'⁶. The value of the residual

¹ R. W. RAMSEY and S. F. STREET, *J. cell. comp. Physiol.* 15, 11 (1940).

² A. M. GORDON, A. F. HUXLEY, and F. J. JULIAN, *J. Physiol.* 171, 28 P (1964).

³ D. ZACHAROVÁ and J. ZACHAR, *Physiologia bohemoslov.* 14, 401 (1965).

⁴ J. ZACHAR, D. ZACHAROVÁ, and M. HENČEK, *Physiologia bohemoslov.* 13, 117 (1964).

⁵ F. LAU, *Feingeräte-Tech.* 9, 112 (1960).

⁶ A. F. HUXLEY and L. D. PEACHEY, *J. Physiol.* 156, 150 (1961).