

# Intermolekulare Wechselwirkungen bei der Wärmeaggregation globulärer Proteine

R. JAENICKE

Institut für physikalische Biochemie im Institut für physikalische Chemie  
der Universität Frankfurt/Main

(Z. Naturforschg. 20 b, 21—31 [1965]; eingegangen am 15. Oktober 1964)

In order to determine the intermolecular forces in the process of the heat aggregation of globular proteins in solution, selected proteins with different amounts of disulfide- and thiolgroups were investigated by specific inhibition experiments and by degradation analysis, using light-scattering and ultracentrifugation methods.

In accordance with the mechanism of the heat aggregation, which in general (SH—SS-proteins) may be characterized as a coupled coagulation- and exchange-reaction, auxiliary valences and covalent bonds take part in the aggregation process.

Besides the  $pH$ -range of lanthionine-formation, the coagulation-mechanism by weak intermolecular forces exceeds the covalent type of aggregation.

If only one of the sulphur functional groups is present in the protein molecules the aggregation is merely the result of the coagulation-mechanism, i. e. the degradation by urea, guanidine·HCl, variation of  $pH$  etc. leads back to the monomer.

In the case of SH—SS-proteins the degradation rate depends on the temperature and duration of aggregation: In the range of predenaturation and under isoelectric conditions the native monomer is restored while increasing net charge leads more and more to covalently bound aggregates which are due to disulfide- and lanthionine-groups. High alkalinity promotes the formation of lanthionine.

Regarding the weak intermolecular bonds the application of specific criteria in degradation and inhibition experiments proves that H-bonds and hydrophobic interactions participate in the aggregation process while ion pair bonds may be excluded. The hydrophobic interactions do not become apparent, until partial denaturation of the aggregating protein takes place.

The proportion of the total aggregation at extreme  $pH$ -values which is produced by the coagulation mechanism may be explained in a tentative way by assuming specific electrostatic short range interactions between the partially dehydrated molecules, leading to fibrillar associates.

Der Mechanismus der Wärmeaggregation globulärer Proteine kann auf Nebenvalenzkräften (Koagulationsmechanismus) und auf kovalenten Bindungen (Austauschmechanismus) beruhen (STAUFF et al.<sup>1</sup>, JAENICKE<sup>2-4</sup>). Für den Fall, daß simultan beide Mechanismen möglich sind (SH und SS enthaltende Proteine), sind die Bereiche beider Mechanismen entlang der  $pH$ -Skala nicht streng getrennt; vielmehr ist die kovalente Austauschreaktion generell von der Koagulationsreaktion begleitet (JAENICKE<sup>4</sup>). Über den relativen Anteil beider Mechanismen und die für die Aggregation verantwortlichen Bindungen sind bisher quantitative Aussagen oder sichere Schlüsse

nicht zugänglich (vgl. HOSPELHORN und JENSEN<sup>5</sup>; KRATOCHVIL et al.<sup>6</sup>, JAENICKE<sup>3-4</sup>). Da beide Angaben auf Grund der Analogie des Aggregationsprozesses zur Assoziation von Untereinheiten dissoziationsfähiger Proteine Hinweise auf die molekulare Ursache der Quartärstruktur liefern könnten, soll im folgenden an Hand von Degradationsversuchen unter Anwendung spezifischer Zusatzkomponenten versucht werden, eine Aussage über das Gewicht beider Mechanismen und zugleich über die Bindungstypen zu gewinnen, die für die Aggregation verantwortlich sind.

## Experimenteller Teil

Es wurden Proteine mit unterschiedlichem SH- und SS-Gehalt untersucht, da diese Gruppen Voraussetzung

Abkürzungen: ADH: Hefe-Alkoholdehydrogenase,  $\beta$ -L:  $\beta$ -Lactoglobulin, LDH: Lactatdehydrogenase, MA: Mercaptalbumin, RSA: Rinder-Serumalbumin, RSA<sub>ox</sub>: oxydiertes RSA, pCMB: *p*-Chlormercuribenzoat.

<sup>1</sup> J. STAUFF, H. BARTHEL, R. JAENICKE, A. KREKEL u. E. ÜHLEIN, Kolloid-Z. **178**, 128 [1961].

<sup>2</sup> R. JAENICKE u. J. STAUFF, Kolloid-Z. **178**, 143 [1961].

<sup>3</sup> R. JAENICKE Habilitationsschrift Frankfurt/M. 1963.

<sup>4</sup> R. JAENICKE, Ber. Bunsengesellschaft **68**, 857 [1964].

<sup>5</sup> V. D. HOSPELHORN u. E. V. JENSEN, J. Amer. chem. Soc. **76**, 2830 [1954].

<sup>6</sup> P. KRATOCHVIL, P. MUNK u. B. SEDLÁČEK, Collect. czechoslov. chem. Commun. **26**, 2806 [1961]; **27**, 115, 788, 802 [1962].

und unterscheidendes Kriterium der verschiedenen Mechanismen sind. Als Repräsentanten für den Fall des gekoppelten Koagulations- und Austauschmechanismus dienen Rinderserumalbumin, Mercaptalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin (SH-SS-Proteine); für den reinen Koagulations-Mechanismus: Insulin (ohne SH-Gruppen); Alkoholdehydrogenase und Isozyme I und V von Lactatdehydrogenase (SH-Proteine) und schließlich oxydiertes Rinderserumalbumin (one SH und SS). Wegen der charakteristischen Daten vgl. JAENICKE<sup>4</sup>.

Die Bestimmung der Partikelgewichte erfolgte mit Hilfe der Ultrazentrifuge (Beckman, Spinco E) sowie der relativen Lichtstreuung (vgl. l. c.<sup>1, 2, 7</sup>). Die SH-Gruppen wurden ampèrometrisch nach BENESCH et al.<sup>8</sup> titriert. Als Eichsubstanz diente Glutathion (Boehringer).

Die Aggregations- resp. Desaggregations-Kinetik wurde aus der Zeitabhängigkeit der Streuintensität  $\sigma \sim R_{\vartheta}$  für  $\vartheta = 90^\circ$  entnommen. Im Falle der Aggregation wurden unter Variation der Parameter des Lösungsmittels [ $p_H$ , Ionenstärke, Zusatzkomponenten (DK etc.), Temperatur] jeweils 6 Proben synchron registriert. Es wurde bis zum Endzustand der Aggregation erwärmt. Die jeweilige Aggregations-Temperatur wurde, je nach der Thermolabilität der Systeme, durch Vorversuche festgelegt; für Versuche im isoelektrischen Bereich, bzw. für die labilen Dehydrogenasen betrug sie  $\leq 60^\circ\text{C}$ , für Versuche bei hoher Nettoladung und mittleren Ionenstärken ( $0,005 < I < 0,5$ ) 60 bis  $90^\circ\text{C}$ <sup>9</sup>. Versuche bei  $T > 90^\circ\text{C}$  wurden im zugeschmolzenen Rohr vorgenommen.

Zur Unterbrechung des Aggregationsprozesses wurden die Lösungen schnell abgekühlt. Die dabei resultierende Erhöhung von  $R_{90}$  folgt in erster Näherung aus dem Temperatureinfluß auf Brechungsindex  $n_0$

und Brechungsinkrement  $\frac{\Delta n}{c_p}$ , die in einem Abbe-Refraktometer (Zeiss) bzw. einem Differentialrefraktometer nach BRICE gemessen wurden<sup>10</sup>.

Das Brechungsinkrement  $\frac{\Delta n}{c_p}$  und der 2. Virialkoeffizient  $B$  ändern sich im Verlauf der Aggregation nur unbedeutend (Tab. 1), so daß die Änderung der Streuintensität auf die Änderung der Partikelgröße zurückgeführt werden kann.

Zusatzkomponenten für die Hemmversuche wurden vor Versuchsbeginn zugegeben. Zur Desaggregation wurden im quasistationären Zustand der Aggregation (bei  $20^\circ\text{C}$ ) die Mediumsbedingungen verändert durch  $p_H$ -Variation bzw. Zugabe von festem Harnstoff (8 m), Guanidin·HCl (6 m), Mercaptoäthanol, Dioxan und so weiter. Der Endwert der Streuung wurde bezüglich der Verdünnung der Systeme und der Änderung von Brechungsindex und Brechungsinkrement korrigiert (Tab. 2). Der Einfluß möglicher präferentieller Adsorption der Zusatzkomponenten im Falle der Lichtstreuungs-Messungen wurde nicht berücksichtigt, da die Streuwerte im Referenzversuch am nichtaggregierten Protein genau im Verhältnis der Rayleigh-Konstanten  $K$  stehen. Die experimentelle Bestimmung von  $M_{s,D}$  bzw.  $M_w$  aus Ultrazentrifugen-Messungen (RSA in 10-m. Harnstoff oder 6-m. Guanidin·HCl) führt dagegen zur Erhöhung des scheinbaren Mol.-Gew. um 6 bis 10% (vgl. Tab. 5), doch ist die Bestimmung des partiellen spezifischen Volumens in Mehrkomponenten-Lösungsmitteln relativ unsicher und überdies liegen die Fehler der Partikelgewichts-Angaben bei den Rückführungsversuchen im gleichen Bereich ( $\sim 10\%$ ).

$T$ [°C]	RSA		MA		$\beta - L$ $\frac{\Delta n}{c_p}$	ADH		LDH	RSA <sub>ox</sub> <sup>a</sup>	
	$\frac{\Delta n}{c_p}$	$B \cdot 10^4$	$\frac{\Delta n}{c_p}$	$- B \cdot 10^4$		$\frac{\Delta n}{c_p}$	$- B \cdot 10^4$	$\frac{\Delta n}{c_p}$	$\frac{\Delta n}{c_p}$	$B \cdot 10^4$
20	0,185	2,0	0,185	1,75	0,184 <sub>5</sub>	0,178	0,2	0,183	0,185	$\sim 0$
40	0,183				0,183	0,175 <sup>b</sup> 0,175 <sup>d</sup> 0,169 <sup>e</sup>		0,180 0,179 <sup>c</sup>		
65	0,181 <sup>a</sup>		0,180 <sup>b</sup> 0,179 <sup>d</sup> 0,165 <sup>e</sup>	1,84 1,95 2,0	0,180		0,3			
80	0,179 <sup>c</sup>	1,3			0,175 <sup>c</sup> 0,168 <sup>e</sup>				0,180 <sup>b</sup>	$\sim 0$

Tab. 1. Einfluß von Temperatur und Aggregationsgrad auf das Brechungsindex-Inkrement  $\left(\frac{\Delta n}{c_p}\right)_{546}$  und den 2. Virialkoeffizienten  $B$  der Lichtstreuung ( $p_H$  7,  $I=0,15$ ). <sup>a</sup>  $p_H$  5,  $I=0,1$ , <sup>b</sup> opaleszent, <sup>c</sup> milchig trüb, <sup>d</sup> flockig trüb, <sup>e</sup> koaguliert.

<sup>7</sup> E. ÜHLEIN u. J. STAUFF, Kolloid-Z. **142**, 150 [1955].

<sup>8</sup> R. E. BENESCH, H. A. LARDY u. R. BENESCH, J. biol. Chemistry **216**, 663 [1955].

<sup>9</sup> Wegen der  $T$ - und  $c_p$ -Abhängigkeit der Aggregation vgl. JAENICKE<sup>4</sup>.

<sup>10</sup> Für den Fall extremer Temperaturen kann auf Grund der niedrigen Trennungenergie der Nebenvalenzen Aggregationshemmung oder Degradation eintreten, die durch  $T$ -Erniedrigung wieder rückgängig gemacht wird. Unter diesen Umständen führt Abkühlung zu starker sekundärer Aggregation, die den  $T$ -Einfluß auf die Rayleigh-Konstante  $K$  um Größenordnungen überschreitet<sup>2</sup>.

Medium	$n_0$	$\left(\frac{\Delta n}{c_p}\right)_{546}$	$K \cdot 10^7$	$k_v$
Wasser	1,3332	0,184	$2,217 \pm 0,020$	1
Glycin-NaOH $p_H$ 12,5, $I = 0,12$	1,3344	0,184	2,221	1
Acetat $p_H$ 2,0, $I = 0,15$	1,3360	0,180	2,131	1
8-m. Harnstoff (aq.)	1,3994	0,154	1,711	1,52
8-m. Harnstoff + 0,02-m. Mercaptoäthanol	1,4002	0,146	1,540	1,52
30 Vol.-% Dioxan	1,3641	0,173	2,05	1,43
60 Vol.-% 2-Chloräthanol	1,3997	—	—	2,5

Tab. 2. Brechungsindex  $n_0$ , Volumkorrektur  $k_v$  für  $R_{90}$ , Brechungsindex-Inkrement  $\left(\frac{\Delta n}{c_p}\right)$  von RSA und R a y l e i g h - Konstante  $K$  in den zur Degradation verwendeten Mischlösungsmitteln.  $T = 20^\circ C$ .  $K = \frac{2 \pi^2 n_0^2}{N_L \lambda^4} \left(\frac{\Delta n}{c_p}\right)$ .  $k_v$  berücksichtigt als Faktor den Verdünnungseffekt durch die Zusatzkomponente, bezogen auf Wasser ( $k_v=1$ ).

Es wurden analysenreine Chemikalien verwendet (Merck, Darmstadt; BASF, Ludwigshafen). Als Lösungsmittel diente bidestill. Wasser.

**Ergebnisse**

Die Abhängigkeit der Aggregations-Geschwindigkeit von den Parametern des Lösungsmittels war Gegenstand früherer Experimente (JAENICKE<sup>4</sup>; dort weitere Literatur).

Entsprechend dem spezifischen Einfluß der Schwefelfunktionen auf den Mechanismus der Aggregation sind die Degradationsversuche an Proteinen mit SH- und SS-Gruppen von denen mit nur einer oder keiner der beiden Gruppen zu trennen.

*Proteine mit SH- und SS-Gruppen*

Serumalbumin (17 SS + 0,7 SH), Mercaptalbumin (17 SS + 1 SH) und  $\beta$ -Lactoglobulin (4 SS + 2 SH) stimmen qualitativ in ihrem Aggregationsverhalten überein. Quantitativ übertrifft die Thermolabilität des

Medium			$\frac{\Delta \sigma^a}{\Delta t}$			
$p_H$	$I$	$T$ [°C]	RSA	MA	$\beta - L$	Ov
1,6	0,1	80	0		0	
3,5	0,1	75	168		258	
4,8	0 <sup>b</sup>		$\infty$ (58°)	$\infty$ (55°) <sup>c</sup>	$\infty$ (62°) <sup>c</sup>	
4,8	0,1	75	880	$\sim 1000$	760	
7,0	0,1	75	66	213	$80^d$ $57^e$	$> 1000$
7,0	0,001	75	4	12	$\sim 10$	110
10,8	0,1	80	8 <sup>f</sup>			$\sim 50$
12,2	0,1	80	72 <sup>f</sup>			

Tab. 3. Aggregation von Serumalbumin, Mercaptalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin und Ovalbumin ( $c_p=0,2$  g/100 ml). <sup>a</sup> Aggregationsgeschwindigkeit (Skt/Stde.) aus dem linearen Anfangsverlauf im  $\sigma/t$ -Diagramm, <sup>b</sup> isoionisch, nach Elektrodialyse, <sup>c</sup> partielle Fällung bereits im Verlauf der Dialyse (2 °C), <sup>d</sup> 1. Phase, <sup>e</sup> 2. Phase, <sup>f</sup> Lanthionin-Nachweis positiv.

MA die der beiden anderen Proteine unter gleichen äußeren Bedingungen (Tab. 3); die Unterschiede variieren stark mit den Bedingungen der Präparation.

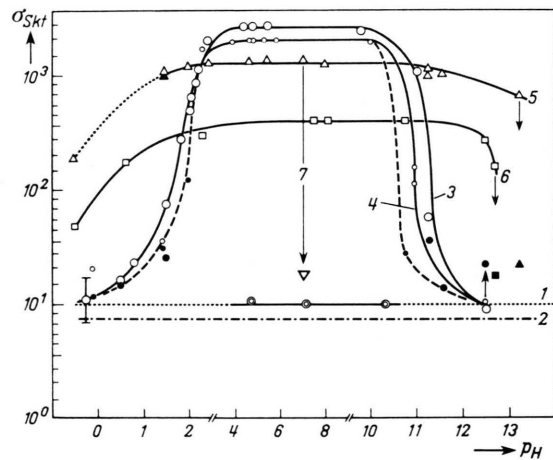


Abb. 1. Rückführungstiteration von RSA ( $c_p=0,5$  g/100 ml). Streulichintensität  $\sigma_{Skt} \sim R_{90}$  als Funktion des  $p_H$ -Wertes (Anzeige mit Lichtmarkengalvanometer HLM 3, Hartmann & Braun). Bezugsbasis: Kurve 1 natives RSA, Kurve 2 RSA + 8-m. Harnstoff. Rückführung nach Aggregation im IP ( $p_H$  4,6, 5 Min. 70 °C). Kurve 3  $I=0,24$ , Kurve 4  $I=0,07$ . Rückführung nach Aggregation bei  $p_H$  7,0 ( $I=0,6$ , 3 Stdn. 85 °C). Kurve 5 ohne Zusatz, Kurve 6 + 8-m. Harnstoff, 7 + 8-m. Harnstoff + 0,2-m. Mercaptoäthanol. Gestrichelte Kurven: Rückführung bei  $T=80^\circ C$ , entsprechende Meßwerte: Ausgefüllte Zeichen.

Die im Koagulationsbereich ( $IP = 4,2 - 4,8$ ) gebildeten Aggregate lassen sich je nach Aggregations-Temperatur und Aggregations-Dauer durch  $p_H$ -Erhöhung oder Harnstoffzugabe wieder auflösen (Abb. 1). Dies gilt vollständig und über lange Aggregationszeit hinweg für den Fall der Aggregation im Prädenaturierungs-Bereich und ebenso für hohe Aggregations-Temperaturen, wenn die Aggregationszeit hinreichend kurz ist (Tab. 4).

Aggregation			Degradation		$M_w \cdot 10^{-5}$ aggr.	$M_w \cdot 10^{-5}$ degrad. <sup>b</sup>	
Medium → [pH] [I]	Dauer [Stdn.]	Temp. [°C]	Medium <sup>a</sup>	[pH]			
HCOOH (NaCl) 1,0 1,0	0 <sup>c</sup>	20	—		0,7	0,7	
	0,5	85	H 8	1	7,6	0,7	
	22	100	H 10	1	9	1,5	
			D bzw. C		9	1,4	
Acetatpuffer 2,4 0,2	22	100	H 10	2,4 (+ M)	6,5	2,1 (2,1)	
			—	12 (1' 70°)	6,5	3,2 (1,6) <sup>d</sup>	
	3,4 0,2	0,5	70	H 8	3,4	2	0,95
		1		H 8	3,4	5	1,4
		3		H 8	3,4	11	3,4
	3,4 0,1	22	100	H 8	3,4 (+ M)	10	1,5 (1,3)
				H 10	12	10	1,3
				D		10	5,0
				H 8	4,5	∞	0,7
	4,5 0,2	0,1	100	H 8	4,5	∞	0,7
22		100	H 8	4,5 (+ M)	∞	~ 3,5 (~ 1)	
Phosphatpuffer 7,0 0,2		0,5	70	H 8	7 (+ M)	14	4,5 (0,7)
		3		H 8	7 (+ M)	49	16 (1,4)
Boratpuffer 9,0 0,2	1	85	H 8	9	1,4	1,2	
	3		H 8	9	3	2	
	22	100	H 8	9,4 (+ M)	7	2 (1,2) <sup>c</sup>	
			D		7	2	
			H 8	11 (+ M)	1,3	1,1 (1,1) <sup>d</sup>	
10,8 0,1 Glycin-NaOH	3	80	H 8	11 (+ M)	1,3	1,1 (1,1) <sup>d</sup>	
	12,2 0,1	80	H 10	12 (+ M)	5	4,2 (4) <sup>d</sup>	

Tab. 4. Wärmeaggregation und Degradation von RSA ( $c_p = 0,5$  g/100 ml). <sup>a</sup> Abkürzungen: H 8 (H 10): 8-m. (10-m.) Harnstoff; D: 30 Vol.-% Dioxan; C: 60 Vol.-% 2-Chloräthanol; (+M):  $+ \geq 0,02$ -m. Mercaptoäthanol, eingeklammerte Werte; <sup>b</sup> stationärer Wert unter Berücksichtigung von Tab. 1 und 2; <sup>c</sup> Bezugsbasis; <sup>d</sup> Lanthionin positiv.

Hier unterscheidet sich  $\beta$ -L charakteristisch von RSA: Während bei RSA der kovalente Anteil der Aggregation erst oberhalb  $60^\circ$  in Erscheinung tritt, laufen im Falle des  $\beta$ -L entsprechend der Strukturänderung bei  $T > 40^\circ$  C (l. c. <sup>3</sup>) der Koagulations- und Austauschmechanismus einander parallel, so daß hier eine Rückführung durch Harnstoffzugabe nur in geringerem Maße gelingt.

Oberhalb des „Schmelzpunkts“ der Proteine (KAUZMANN<sup>11</sup>) verläuft die Degradation durch  $p_H$ -Erhöhung nach Erreichen des stationären Zustandes der Aggregation nicht mehr augenblicklich, sondern es tritt ein exponentieller Abfall der Streuintensität auf, der im allgemeinen nicht auf den Anfangswert der Streuung zurückführt. Dabei scheint ein Teil der Aggregationszentren (aggregation sites<sup>6</sup>) abgesättigt zu werden, so daß Wiederherstellung der Anfangsbedingungen der Aggregation ( $p_H$  7,  $75^\circ$  C) zu einer Verminderung der Aggregations-Geschwindigkeit auf  $< 50\%$  führt, wogegen im *IP* die Aggregation begünstigt ist (Fällung).

Harnstoff oder Guanidin führen bei mittlerer Nettoladung zu einem geringeren Degradationseffekt als extreme  $p_H$ -Erhöhung.

Wie aus Tab. 4 hervorgeht, vermindert sich das Ausmaß der Degradation mehr und mehr, wenn die Aggregation bei zunehmender Entfernung vom *IP* vorgenommen wurde. Die im sauren Bereich gebildeten Aggregate werden dabei in höherem Maße abgebaut als die im alkalischen Bereich gebildeten. Hier gelingt die Degradation einerseits bei  $p_H > 10,5$  in der Wärme und andererseits durch überschüssiges Mercaptoäthanol oder Thioglykolsäure (vgl. Abb. 1). Erhöht man im isoelektrischen Bereich die Aggregations-Temperatur oder erhitzt das gefällte Protein über längere Zeit, so tritt „Alterung“ des Koagulats ein; die vollständige Degradation gelingt nur noch unter den Bedingungen der hydrolytischen oder reduktiven Spaltung von Disulfidbrücken (CECIL und MCPHEE<sup>12</sup>). Der Endzustand der Degradation entspricht dabei im Bereich der Fehlergrenzen der *M*-Bestimmung (s. o.) dem Wert des monomeren Moleküls (Tab. 5).

<sup>11</sup> W. KAUZMANN, in: „Mechanism of Enzyme Action“, Mc Elroy u. Glass, Eds., Baltimore 1954, p. 70 f.

<sup>12</sup> R. CECIL u. J. R. MCPHEE, Advances Protein Chem. 14, 255 [1959].



System (Medium)		$s^{20}(S)^a$	$D^{20}(F)^b$	M
1	nativ ( $p_H 7, I = 0,15$ )	4,49 <sup>c</sup>	6,29 <sup>c</sup>	66000 ± 2000
2	denaturiert (10-m. Harnstoff; $p_H 7, I = 0,15$ )	2,08 <sup>c</sup>	3,4 <sup>c</sup>	74000 ± 3200
3	aggregiert: 30 Min. 90°C ( $p_H 7, I = 0,15$ )	<55>		<~ 10 <sup>6</sup> > <sup>d</sup>
4	Degradation von 3 (10 m. Harnstoff; $p_H 7, I = 0,15$ )	~ 20		<~ 0,5 · 10 <sup>6</sup> > <sup>d</sup>
	( $p_H 12$ , Endwert)	1,64	~ 3	60000 ± 12000
	(10-m. Harnstoff + 0,2-m. Mercaptoäthanol)	2,7 <sub>6</sub>	4,5	69000 ± 4000

Tab. 5. Sedimentationsanalyse von aggregiertem und desaggregiertem RSA. <sup>a</sup> nach Svedberg-Methode, <sup>b</sup> nach Flächen-Höhen-Methode, <sup>c</sup> auf Wasserbasis reduziert, <sup>d</sup> polydispers.

Die für RSA angegebenen Daten können als repräsentativ für die übrigen untersuchten SH-SS-Proteine gelten, wenngleich die Tertiärstruktur jedes einzelnen Proteins spezifische quantitative Unterschiede in Schmelzpunkt, Aggregations-Geschwin-

digkeit, Rückführbarkeit der Aggregate etc. bedingt (s. o.).

Neben der zuvor diskutierten Degradation ist die Hemmung oder Auslösung der Aggregation durch spezifische Zusatzkomponenten als Kriterium für die

Zusatzkomponente A	$c_A$	$p_H$	$(\Delta\sigma/\Delta t)^{75^\circ}$						
			RSA [5 · 10 <sup>-5</sup> -m.]	MA [5 · 10 <sup>-5</sup> -m.]	$\beta$ -L [1 · 10 <sup>-4</sup> -m.]	Ins. [4 · 10 <sup>-4</sup> -m.]	ADH [1 · 10 <sup>-5</sup> -m.]	LDH V [2 · 10 <sup>-5</sup> -m.]	RSA <sub>ox</sub> <sup>*</sup> [5 · 10 <sup>-5</sup> -m.]
Normierung <sup>b</sup>	—	—	1	1	1	1	1 <sup>g</sup>	1 <sup>g</sup>	1
Harnstoff	≅ 6-m.	2—11	0	0	0	0	0	0	0
Formaldehyd	1 · 10 <sup>-2</sup> -m.	3—11	0	0	0	0	0	0	0
Ascorbinsäure	1-m.	4—7	0	0					1
Dioxan	10 Vol.-%	4,8(7)	2(1,5)		> 1(1,3)		∞		0,8
	20 Vol.-%		4(~ 0)		> 1(0)		∞	(0,5) <sup>h</sup>	-0,2
	35 Vol.-%		0,25(~ 0)		> 1(~ 0)	-0,25	∞		-0,3 <sup>c</sup>
2-Chloräthanol	20—60 Vol.-%	4—8	0			-0,5 <sup>c</sup>	0	0	-0,3 <sup>c</sup>
Na-Dodecylsulfat <sup>d</sup>	2 · 10 <sup>-4</sup> -m.	4,8(7)	2(0,6)						~ 1
	2 · 10 <sup>-3</sup> -m.		∞(0)						
	2 · 10 <sup>-2</sup> -m.		0(0)			(-0,2)	0	0(0)	~ 1
	1 · 10 <sup>-1</sup> -m.		0(0)						
Polyglykol-äther	1 · 10 <sup>-5</sup> -m.	4,8—7	~ 1						1
	1 · 10 <sup>-4</sup> -m.		0,75						< 1
	≅ 1 · 10 <sup>-3</sup> -m.		> 1						~ 0
Jodacetat (Jodacetamid)	5 · 10 <sup>-3</sup> -m.	4,8—7	~ 1		0				1
pCMB	4 · 10 <sup>-4</sup> -m.	7					~ 18	10	
	2 · 10 <sup>-3</sup> -m.	5(7)	1(< 1)		1(< 1)			> 20	1
Fe <sup>2+</sup>	0,02-m.	7					∞	∞	
Ag <sup>+</sup>	0,02-m.	7					∞	∞	
NaCl	1-m.	7	3		~ 15	~ 10			2
p-Benzochinon	1 · 10 <sup>-3</sup> -m.	4,8(7)	~ 1(~ 0)						
Cystein	1 · 10 <sup>-4</sup> -m.	4—9	5 <sup>e</sup>	~ 10 <sup>e</sup>		8 <sup>e</sup>	6		1
	1 · 10 <sup>-3</sup> -m.		> 20 <sup>e</sup>	> 20 <sup>e</sup>		> 20 <sup>e</sup>	8		
	≅ 1 · 10 <sup>-2</sup> -m.		∞ <sup>f</sup>	∞ <sup>f</sup>		∞ <sup>f</sup>	15		1

Tab. 6. Hemmung und Aktivierung der Wärmeaggregation  $I = 0,1 \div 0,2$ ;  $T = 75^\circ C$ . <sup>a</sup> für RSA<sub>ox</sub> gelten alle Angaben im Aggregationsbereich  $p_H \sim 5$ , <sup>b</sup> Aggregations-Geschwindigkeit  $\Delta\sigma/\Delta t$  ohne Zusatz unter sonst identischen Bedingungen, <sup>c</sup> Monomerisierung, unabhängig vom  $p_H$ -Wert, <sup>d</sup> im Ionenstärke-Bereich  $0,01 \leq I \leq 1,0$  (Acetat) übereinstimmend, <sup>e</sup> durch 10-m. Harnstoff nur teilweise rückführbar, <sup>f</sup> durch 10-m. Harnstoff bei  $p_H \neq IP$  vollständig rückführbar, <sup>g</sup> durch  $5 \cdot 10^{-2}$ -m. Natriumdodecylsulfat vollständig rückführbar, <sup>h</sup> in der Wärme: Reversible Desaggregation von in der Kälte primär gebildeten Aggregaten.

an der Aggregation beteiligten intermolekularen Wechselwirkungen geeignet. Ergebnisse derartiger Versuche sind in Tab. 6 zusammengefaßt. Es zeigt sich, daß Agentien, die zur Besetzung der Carbamid-Gruppierung und der SH-Gruppen in der Lage sind, die Aggregation außerhalb des isoelektrischen Bereichs ebenso unterbinden wie Lösungsmittelkomponenten, die zur Solubilisation der unpolaren Seitenketten in der Lage sind. Im Bereich des Koagulations-Mechanismus sind außer Formaldehyd und Harnstoff solche Komponenten als Blockierungsmittel geeignet, welche die *DK* herabsetzen bzw. als ionische Detergentien vom Protein gebunden werden.

### SH-Proteine, SS-Proteine und SH – SS-freie Proteine

Der qualitative Unterschied im Aggregationsverhalten, der die zu Austauschreaktionen nicht befähigten Systeme von den SH – SS-Proteinen trennt, besteht in der verschiedenen Rückführbarkeit der Aggregate, die hier (für den Fall, daß partielle Reduktion oder Oxydation ausgeschlossen wird; vgl. l. c. <sup>4</sup>, dort S. 860, Tab. 2) generell durch  $p_H$ -Verschiebung jenseits des Aggregationsbereiches, Sättigung mit Harnstoff resp. Guanidin oder Erniedrigung der *DK* rückgängig gemacht werden kann. Auch extreme Temperaturerhöhung führt hier zu partieller Degradation. Die Verhältnisse werden für Insu-

lin, ADH, LDH und  $RSA_{ox}$  aus Tab. 7 deutlich; die Ergebnisse der entsprechenden Blockierungsversuche sind mit in Tab. 6 aufgenommen. Es folgt generell Analogie zum reinen Koagulationsverhalten oxydierter bzw. reduzierter, carboxymethylierter Proteine (vgl. JAENICKE und STAUFF <sup>2</sup>).

Für den Fall der Dehydrogenasen hängt die Rückführbarkeit im sauren Bereich vom Anion der Säure ab; während HCl,  $HClO_4$ ,  $HNO_3$ ,  $H_2SO_4$ ,  $(H_3BO_3)$  etc. im Verlauf der Titration der  $COO^\ominus$ -Gruppe zur quantitativen Fällung führen (Verschwinden der Aktivierungsenergie der Aggregation), sind  $H_3PO_4$  und organische Säuren (Ameisensäure, Essigsäure, Oxalsäure etc.) zur Auflösung primär gebildeter Aggregate in der Lage. Der spezifische Effekt von Kationen, die zur Addition an die SH-Gruppen befähigt sind (Schwermetallionen) ist vergleichbar, indem hier ebenfalls Beschleunigung der Aggregation resultiert (Tab. 6). Der bereits bei tiefer Temperatur (Dialyse bei 2°) aggregierende Anteil ist dabei – wie aus der Sedimentationsanalyse pCMB-inkubierter LDH deutlich wird (JAENICKE <sup>3</sup>) – etwa der Schwermetall-Konzentration proportional. Offensichtlich sind hier die SH-Gruppen von essentieller Bedeutung für die Tertiärstruktur des Moleküls. Für die Wärmeaggregation (ebenso wie für die Quartärstruktur) dürften sie, entsprechend der erwähnten Aggregationsauslösung durch Schwermetallionen, nicht verantwortlich sein. Einen vergleichbaren Effekt besitzen kleine Konzentrationen von Harnstoff oder Guanidin [ $0,5 \leq (c_H, c_G) \leq 3\text{-}m.$ ] (vgl. z. B. SUND <sup>13</sup>, ELÖDI <sup>14</sup>, JAENICKE <sup>3, 15</sup>).

System	Medium (Aggregation)			Degradation							
	$p_H$	<i>I</i>	<i>T</i> [°C]	Q	$p_H \uparrow$	$p_H \downarrow$	H	G	D	C	N
<i>Insulin</i> $c_p = 0,2 \text{ g/100 ml}$	2	0,1	75		+				+	+	
	3–5	0,1	75	+	+ <sup>a</sup>	+	+	+ <sup>a</sup>	+	+ <sup>a</sup>	+
	7	0,1	75	+	+	+	+	+	+	+	
	9	0,1	75		+		±		±	+	
<i>ADH</i> $c_p = 0,2 \text{ g/100 ml}$	3,6	0,2	60		+		+ <sup>b</sup>	+ <sup>b</sup>			
	5,4	0,2	60		+ <sup>a</sup>		± <sup>c</sup>	+ <sup>b</sup>		+	
	7,6	0,2	80		+		+ <sup>b</sup>	+ <sup>b</sup>			
<i>LDH I</i> $c_p = 0,1 \text{ g/100 ml}$	4,5	0,2	40		+ <sup>a</sup>	+	+ <sup>a</sup>	+ <sup>b</sup>		+ <sup>a</sup>	
	6,5	0,1	70				+ <sup>a</sup>		±	+	
<i>LDH V</i> $c_p = 0,1 \text{ g/100 ml}$	4,7	0,2	35		+ <sup>a</sup>		+ <sup>a</sup>	+ <sup>b</sup>			
	5–10	0,2	40				+ <sup>a</sup>	+ <sup>b</sup>			
	7,8	0,2	45								+ <sup>a</sup>
<i>RSA<sub>ox</sub></i> $c_p = 0,2 \text{ g/100 ml}$	5,5	0,2	75	+ <sup>a</sup>	+	+	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	

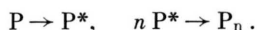
Tab. 7. Degradation von Insulin, ADH, LDH und  $RSA_{ox}$ . Erklärungen: Q:  $T=90^\circ\text{C}$ ;  $p_H \uparrow$ :  $p_H 11$  (NaOH);  $p_H \downarrow$ :  $p_H 1$  (HCOOH); H: 10-m. Harnstoff; G: 6-m. Guanidin·HCl; D: 30 Vol.-% Dioxan; C: 60 Vol.-% 2-Chloräthanol; N:  $5 \cdot 10^{-2}\text{-}m.$  Natriumdodecylsulfat. <sup>a</sup> führt zum Monomeren zurück, <sup>b</sup> Degradation + Dissoziation (Aufhebung der Quartärstruktur), <sup>c</sup> vollständige Degradation bei erhöhter Nettoladung ( $p_H \neq IP$ ).

<sup>13</sup> H. SUND, Biochem. Z. **333**, 205 [1960].

<sup>14</sup> P. ELÖDI, G. JÉCSAI u. A. MOZOLOVSKY, Acta physiol. Acad. Sci. hung. **17**, 165, 175 [1960].

<sup>15</sup> R. JAENICKE u. G. PFELEIDERER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **60**, 215 [1962].

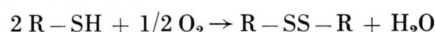
In beiden Fällen führt partielle Entfaltung zur „Aktivierung“ im Sinne einer Zweistufenreaktion nach dem Schema



Aggregation tritt in allen diesen Fällen schon bei  $T < 20^\circ$  ein.

Die Hemmung der Aggregation gelingt, wie aus Tab. 6 hervorgeht, in völlig analoger Weise wie im Koagulationsbereich der SH – SS-Proteine.

Während diese Analogie für den Fall der SH-freien Proteine wegen der Stabilität der SS-Gruppe unmittelbar einleuchtet, könnte im Falle der SH-Proteine die Labilität der SH-Gruppe auf Grund der möglichen Autoxydationsreaktion



einen Redox-Anteil an der Gesamtreaktion induzieren. Wie die Sauerstoff-Abhängigkeit der Hitze-Aggregation zeigt (vgl. JAENICKE<sup>4</sup>), scheint dies tatsächlich der Fall zu sein; doch dürfte, wie aus den Rückführungsversuchen hervorgeht, das Gewicht dieser Reaktion an der Gesamtreaktion nur gering sein (vgl. Tab. 7).

#### *Aggregation bei extremen $p_H$ -Werten*

Die Degradation von RSA bei  $1 > p_H > 11$  führt nach dem primären Abfall der Streuung bei hoher Temperatur zu einer neuerlichen langsamen Aggregation, die entsprechend der maximalen einsinnigen Ladung der Aggregationspartner und der Spaltung der Disulfidbrücken unter den experimentellen Bedingungen weder als normale Koagulation noch als Austauschreaktion angesehen werden kann. Im Bereich  $1 < p_H < 3$  verschwindet die Aggregation bei kleinen und mittleren Ionenstärken vollständig (Tab. 3).

Insulin zeigt in der  $p_H$ -Abhängigkeit der Wärmeaggregation bei  $p_H = 12$  ebenfalls einen Wiederanstieg der Aggregations-Geschwindigkeit, dem im sauren Bereich die von LANGMUIR und WAUGH<sup>16</sup> beobachtete fibrilläre Aggregation entspricht.

Die Rückführung gelingt im Falle des RSA nur unvollkommen (Tab. 4). Einen Hinweis auf den hier zugrunde liegenden Mechanismus gibt die Rückführung der Aggregation bei  $p_H > 11,5$  durch Ansäuern, indem hier aus der Analyse der  $H_2S$ -Entwicklung und der direkten Oxydation (DECROIX und MAZINGUE<sup>17</sup>) die Beteiligung der Lanthionin-Bildung an

der Aggregation in diesem Bereich hervorgeht. Die Verhältnisse bedürfen, insbesondere für die Aggregation im sauren Bereich, weiterer Untersuchung.

#### **Diskussion**

Die Wärmeaggregation globulärer Proteine folgt in ihrer spezifischen Abhängigkeit von den Parametern des Lösungsmittels aus dem Polyelektrolyt-Charakter der Proteine und der prinzipiellen Möglichkeit der Peptidketten zur Betätigung intermolekularer Bindungen. Die Unterschiede in den Aggregations-Mechanismen beruhen dabei auf dem unterschiedlichen Gehalt an SH- und SS-Gruppen, die zusätzlich zu den möglichen Bindungen durch Nebenvalenzen zu kovalenten intermolekularen Austauschreaktionen Anlaß geben können. Für die Nebenvalenzen kann angenommen werden, daß dieselben Kräfte, die intramolekular die Struktur des Proteins stabilisieren, auch intermolekular zur Aggregation führen können. Als intermolekulare Kräfte sind demnach im folgenden neben Disulfid- resp. Lanthionin-Brücken Wasserstoff-Brückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Ionenpaar-Bindungen zu diskutieren. Kriterien zu ihrer Unterscheidung mit Hilfe der Variation der Mediumsbedingungen sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

Die Anwesenheit *kovalenter Bindungen* im Falle der Aggregation von SH – SS-Proteinen folgt eindeutig aus der nur partiell möglichen Degradation unter extremen „dissoziierenden“ Bedingungen. Daß dabei die SH- und SS-Gruppen beteiligt sind, folgt sowohl aus der spezifischen Hemmbarkeit der Aggregation und aus der Degradation durch Mercaptoäthanol bzw. Thioglykolsäure (JAENICKE<sup>4</sup>), als auch aus der Koinzidenz der Anfangstemperatur der kovalenten Aggregation mit der Temperatur, bei der primär maskierte Schwefelfunktionen im Molekül zugänglich werden (vgl. z. B. für RSA: STAUFF und DUDEN<sup>19</sup>; ferner CECIL und MCPHEE<sup>12</sup>). Austausch-Mechanismus und Lanthionin-Bildung sind beide an der Aggregation beteiligt.

Im neutralen und schwach sauren  $p_H$ -Bereich kann die Lanthionin-Bildung nur Nebenreaktion sein, da hier die Degradation mit Hilfe von Harnstoff + Mercaptoäthanol im Bereich der Fehlergrenzen zum Mol.-Gew.

<sup>16</sup> I. LANGMUIR u. D. F. WAUGH, J. Amer. chem. Soc. **62**, 2771 [1940]; D. F. WAUGH, J. Amer. chem. Soc. **66**, 663 [1944], **68**, 247 [1946].

<sup>17</sup> G. DECROIX u. G. MAZINGUE, Fédération Lanière Internationale, Commission Technique, Rapport No. 11, Paris

1957. Bull. Inst. Textile France **73**, 41 [1958]; Bull. Trim. C.T.C.R.S. **33**, 5 [1958].

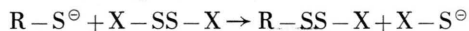
<sup>19</sup> J. STAUFF u. R. DUDEN, Biochem. Z. **331**, 10 [1958].

Bindung	Variation der Mediumsbedingungen	
	Schwächung der Bindung durch	Stärkung der Bindung durch
Wasserstoff- Brückenbindung	Erhöhung der H-Bindungskapazität des Mediums (+ Harnstoff, Guanidin) Gruppenspezifische Blockierung (Formaldehyd, Ascorbinsäure etc.) $p_H$ -Variation (COOH $\cdots$ COOH)	Verminderung der H-Bindungskapazität des Mediums (+ LiBr, Chloräthanol, Dioxan)
Hydrophobe Wechselwirkung	Verminderung der Polaritätsdifferenz: $DK$ -Erniedrigung. (+ Dioxan etc.) Solubilisation der unpolaren Komponente [Detergentien, Harnstoff (Clathratbildung)] Temperatur-Erniedrigung (endotherme R.)	$p_H$ -Variation Verminderung der Löslichkeit der unpolaren Komponente: Elektrolyt-Zugabe
Ionenpaar- Bindung	Abschirmung der Ladungen durch Elektrolytzugabe (Gouy-Chapman-Atmosphäre) $p_H$ -Variation (entsprechend $p'_K$ des Ionenpaares)	Temperatur-Erhöhung Erniedrigung der $DK$ (Coulombsches Gesetz) $p_H$ -Variation

Tab. 8. Kriterien zur Unterscheidung der wichtigsten Typen intermolekularer Wechselwirkungen im wäßrigen Medium (vgl. KAUFMANN<sup>18</sup>).

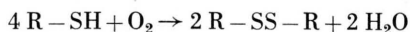
des nativen Proteins zurückführt (Tab. 4). Im alkalischen Bereich nimmt die Lanthionin-Bildung mit wachsendem  $p_H$  zu, um bei extremer Basizität den Hauptanteil an der Aggregation zu erreichen. Die Rückführbarkeit mit Mercaptoäthanol geht hier mehr und mehr zurück<sup>20</sup>.

Diese Tatsache widerspricht der Annahme, daß für die Aggregation bei hohen  $p_H$ -Werten ein ionischer Mechanismus entsprechend



verantwortlich sei, der ja auf Grund des  $p_K$ -Wertes der SH-Gruppe bei  $p_H \geq 9$  begünstigt sein sollte. Wie die  $p_H$ -Abhängigkeit der Aggregation zeigt, fällt die Aggregations-Geschwindigkeit für die untersuchten Systeme in diesem Bereich stetig ab. Die Erhöhung der Aktivierungsenergie durch die zunehmend ein-sinnige Ladung des Ampholyten und die Hydratation des Mercaptid-Ions scheint demnach die mögliche Begünstigung der Ionenreaktion überzukompensieren; die Aggregation wird im wesentlichen durch Lanthionin-Bildung verursacht.

Schließlich könnte mit zunehmendem  $p_H$  auch die Oxydation von Thiol-Gruppen durch molekularen Sauerstoff entsprechend



zur Aggregation beitragen (DIXON und TUNNICLIFFE<sup>24</sup>, FRUTON und CLARK<sup>25</sup>). Mit dieser Reaktion ließe sich die  $O_2$ -Abhängigkeit der Aggregation von SH-Proteinen

(intermolekulare Vernetzung), ebenso wie die von SH-SS-Proteinen (Kettenabbruch-Reaktion) erklären. Im sauren  $p_H$ -Bereich sollte die kovalente Aggregation über das Sulfonium-Kation verlaufen oder wiederum zur Lanthionin-Bildung führen (RYLE und SANGER<sup>26</sup>, BENESCH und BENESCH<sup>27</sup>, ZAHN<sup>20</sup>).

Wie die Rückführungsversuche zeigen, gelingt die partielle Degradation durch Mercaptoäthanol, so daß die Austauschreaktion jedenfalls an der Aggregation beteiligt zu sein scheint. Der Lanthionin-Nachweis ( $H_2S$ ) nach der Rückführung bei hohem  $p_H$  kann auf eine Nebenreaktion im Verlauf der Hydrolyse der SS-Gruppen zurückgehen. Die Beteiligung der Lanthionin-Bildung an der Aggregations-Reaktion selbst kann hier nur aus dem Restanteil der Aggregation geschlossen werden, der durch SS-Brücken spaltende Agentien nicht angegriffen wird.

Es ergibt sich zusammenfassend, daß sowohl SH-SS-Austausch als auch Lanthionin-Bildung am *kovalenten Anteil* der Aggregation beteiligt sind, wobei mit zunehmend basischem  $p_H$  die Lanthionin-Bildung mehr und mehr in den Vordergrund tritt.

Der durch *Nebenvalenzen* bedingte Anteil der Aggregation, der durch hohe Harnstoff- oder Guanidin-Konzentrationen etc. aufgehoben wird, kann bezüglich des Gewichts der möglichen zwischenmolekularen Kräfte nur durch indirekte Schlüsse analysiert wer-

<sup>20</sup> Von der primären Lanthionin-Bildung im Verlauf der Aggregation ist die sekundäre während der Rückführung in alkalischer Harnstoff-Lösung zu trennen (vgl. HUGGINS<sup>21</sup>, KAUFMANN und DOUGLAS<sup>22</sup>, ZAHN<sup>23</sup>). Sie kann durch Arbeiten in der Kälte gering gehalten werden und spielt zumindest bei den schnellen Degradations-Reaktionen durch Erhöhung der Netto-Ladung keine Rolle.

<sup>21</sup> C. HUGGINS, D. F. TAPLEY u. E. V. JENSEN, Nature [London] **167**, 592 [1951].

<sup>22</sup> W. KAUFMANN u. R. G. DOUGLAS JR., Arch. Biochem. Biophysics **65**, 106 [1956].

<sup>23</sup> H. ZAHN, Chimia [Zürich] **15**, 378 [1961].

<sup>24</sup> M. DIXON u. H. E. TUNNICLIFFE, Proc. Roy. Soc. [London] Ser. B **94**, 266 [1923].

<sup>25</sup> J. S. FRUTON u. H. T. CLARK, J. biol. Chemistry **106**, 667 [1934].

<sup>26</sup> A. P. RYLE u. F. SANGER, Biochem. J. **60**, 535 [1955].

<sup>27</sup> R. E. BENESCH u. R. BENESCH, J. Amer. chem. Soc. **80**, 1666 [1958].

den. Guanidin·HCl verknüpft die Assoziations-tendenz zur Peptidbindung mit der abschirmenden Wirkung auf Grund hoher Ionenstärke und ist daher als Kriterium zur Unterscheidung der intermolekularen Wechselwirkungen nicht geeignet (vgl. Tab. 8). Harnstoff wirkt in analoger Weise auf die H-Bindung und zusätzlich durch Clathrat-Bildung auf die hydrophoben Wechselwirkungen. Hier ist durch Variation der *DK* des Lösungsmittels oder durch die spezifische Wirkung von Detergentien sowie durch den Einfluß von Ionenstärke und Temperatur eine Unterscheidung – auch von der möglichen Aggregation durch Ionenpaar-Bindungen – möglich. Die aggregationshemmende Wirkung von Dioxan, Chloräthanol oder Natriumdodecylsulfat kann allerdings a priori nicht als hinreichender Beweis für hydrophobe Bindungen im Verlauf der Aggregation angesehen werden, da diese Agentien die Struktur der betrachteten Proteine zumindest im nativen Ausgangszustand nicht so grundlegend ändern, daß die im nativen Zustand im Molekülinnern liegenden und daher für intermolekulare Wechselwirkungen primär nicht in Betracht kommenden hydrophoben Gruppen<sup>28</sup> an die Peripherie gelangen (vgl. BRESLER<sup>29</sup>, FOSTER<sup>30</sup>, VAN HOLDE und SUN<sup>31</sup>).

Wie aus der Messung der optischen Rotationsdispersion hervorgeht<sup>32</sup>, sind diese Verhältnisse unter den experimentellen Bedingungen der Aggregation insofern modifiziert, als bei  $pH \neq IP$  im wäßrigen Medium und in geringerem Maße auch in Gegenwart von Dioxan oder Chloräthanol die Rotationsdispersions-Konstante  $\lambda_c$  abfällt, so daß *inter*-molekulare hydrophobe Wechselwirkungen prinzipiell möglich wären. Sie wären im wäßrigen Medium gegenüber einem Lösungsmittel niedriger *DK* begünstigt und könnten die Aggregationshemmung durch unpolare Zusatzkomponenten erklären. Im Koagulationsbereich scheint die Aggregation jedoch ohne Denaturierung zu erfolgen (Konstanz von  $\lambda_c$ ), so daß hier auf Grund der nativen Struktur der Proteine (s. o.) hydrophobe Wechselwirkungen als Ursache der Aggregation praktisch ausgeschlossen werden können.

In speziellen Fällen (vgl. z. B. die reversible Aggregation von Insulin: STAUFF et al.<sup>1</sup>, S. 134) und allgemein im denaturierten Zustand kann unabhängig vom Aggregations-Mechanismus die Beteiligung hydrophober Wechselwirkungen an der Aggregation

wahrscheinlich gemacht werden, indem hier gleichzeitig Nebenvalenzen verschiedener Bindungsenergie beobachtet werden. So kann die 1. Aggregationsphase des Koagulations-Mechanismus von  $RSA_{ox}$  (l. c.<sup>2,3</sup>) auf Grund ihres positiven Temperaturkoeffizienten und der Ionenstärke-Abhängigkeit sowie der Blockierung durch Dioxan, Chloräthanol bzw. hohe Konzentrationen von Polyglykoläther als Folge hydrophober Wechselwirkungen gedeutet werden, während die zweite (reversible) Aggregationsphase auf H-Bindungen beruhen dürfte. Beide Anteile werden durch Harnstoff inhibiert. Dagegen ist Dinitrophenylierung oder Acetylierung ohne Einfluß auf die Koagulation, so daß Ionenpaar-Bindungen als Aggregationsursache ausgeschlossen werden können; zu dem gleichen Schluß führt die Ionenstärke-Abhängigkeit der Aggregation<sup>2,4</sup> (vgl. Tab. 8). Die partielle Degradation durch Dioxan nach Aggregation unter extremen Bedingungen (RSA, 22 Std. 100 °C) läßt wiederum auf die Beteiligung hydrophober Wechselwirkungen schließen, sobald durch partielle Denaturierung intermolekulare Wechselwirkungen der unpolaren Gruppen möglich werden.

Die Auslösung der Aggregation bei kleinen Inhibitor-Konzentrationen (Dioxan, Chloräthanol, Harnstoff, Natriumdodecylsulfat) muß auf Änderungen der Tertiärstruktur beruhen, die zusätzliche Aggregationszentren zugänglich machen<sup>33</sup>.

Zunehmende Konzentration des Inhibitors unterbindet infolge von Solvation bzw. Ionenwechselwirkung in zunehmendem Maße die Aggregation. Die Ergebnisse legen die Annahme nahe, daß beim Übergang zum nichtwäßrigen Lösungsmittel mehrere aufeinanderfolgende Konformations-Änderungen eintreten, die sich in Analogie zu dem Modell von WEBER und TANFORD<sup>34</sup> veranschaulichen lassen. Die Labilität der Struktur kann dabei elektrostatisch erklärt werden als Folge der Abnahme der *DK* mit zunehmender Konzentration der schwach protischen Lösungsmittel.

Die elektrostatische freie Energie der nativen Konformation des Proteins im wäßrigen Medium wächst bei konstanter Nettoladung zunächst an, um dann entsprechend der Begünstigung entfalteter Strukturen bei mittleren Konzentrationen des nicht wäßrigen Lösungsmittels wieder abzufallen (SINGER<sup>35</sup>).

Bei  $D > 50$  (< 25% Dioxan) scheint die elektrostatische freie Energie des Proteins den Wert für das Protein im wäßrigen Medium zu übertreffen, während

<sup>28</sup> J. C. KENDREW, Ber. Bunsengesellschaft **68**, 721 [1964].

<sup>29</sup> S. E. BRESLER, Discuss. Faraday Soc. **25**, 158 [1958].

<sup>30</sup> J. F. FOSTER, in: „The Plasma Proteins“ (F. W. PUTNAM, Ed.), Vol. I, New York, London 1960, p. 179, 197 f.

<sup>31</sup> K. E. VAN HOLDE u. S. F. SUN, J. Amer. chem. Soc. **84**, 66 [1962].

<sup>32</sup> R. JAENICKE, in Vorbereitung.

<sup>33</sup> Die Wirkung von Cystein auf Proteine mit Cystinbrücken ist analog zu erklären.

<sup>34</sup> R. E. WEBER u. C. TANFORD, J. Amer. chem. Soc. **81**, 3255 [1959]; s. auch C. TANFORD, **82**, 6028 [1960]; J. biol. Chemistry **236**, 1711 [1961].

<sup>35</sup> S. J. SINGER, Advances Protein Chem. **17**, 1, 11 f. [1962].



für  $D \leq 50$  das Gegenteil gilt, so daß die elektrostatische Tendenz zur Entfaltung der nativen Konformation, d. h. zur Bildung zusätzlicher Aggregationszentren gegenüber dem Wert für das wäßrige Lösungsmittel stark herabgesetzt ist.

Die Verminderung der H-Bindungskapazität der Mischlösungsmittel und die Abnahme der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den fixierten Ladungen am Proteinmolekül in Lösungsmitteln niedriger *DK* führen zu einer stärkeren *intra*-molekularen Absättigung der im wäßrigen Medium auch *inter*-molekular betätigten Bindungen: Der Helix-Gehalt steigt an und die Aggregationszentren werden blockiert<sup>36</sup>.

Detergentien hemmen im gesamten  $p_H$ -Bereich die Aggregation, sind jedoch zur Degradation von in der Wärme gebildeten Aggregaten im allgemeinen nicht in der Lage. Für den Fall des Polyglykoläthers als nicht dissoziierendes Detergens beschränkt sich die hemmende Wirkung auf den Bereich der kritischen Konzentration der Mizellbildung ( $c_K = 10^{-4} \cdot m$ , STAUFF und RASPER<sup>37</sup>).

Eine Variation der Molekülkonformation kann hier nicht festgestellt werden (für RSA:  $p_H 4 \div 7$ ;  $I = 0,1 : 0 \div 10^{-3} \cdot m$ . Polyglykoläther:  $\lambda_c = 271,9 \pm 2,6 \text{ m}\mu$ ;  $[\eta] = 3,8 \pm 0,3 \text{ (cm}^3 \cdot \text{g}^{-1})$ ), so daß die Wirkung ausschließlich auf der Variation des Lösungsmittels zu beruhen scheint.

Für die im Überschuß des Detergens eintretende Aggregation kann von der Struktur des Proteins her bisher keine Begründung gegeben werden.

Im Falle ionischer Detergentien wird der gleiche Effekt nur auf der sauren Seite des *IP* beobachtet, wenn das Gewichtsverhältnis Protein : Detergens etwa 5 : 1 beträgt, d. h. für RSA im etwa 50-fach molaren Überschuß von Natriumdodecylsulfat (vgl. PUTNAM und NEURATH<sup>38</sup>). Außerhalb dieses Bereiches wird mehr oder weniger vollständige Hemmung der Aggregation beobachtet. Auf der alkalischen Seite des *IP* wird, schon im 5-fachen molaren Überschuß Hemmung beobachtet, die oberhalb 50 Äquivalenten vollständig ist. Die mögliche Interpretation der Verhältnisse als Konsequenz einer reversiblen Konfigurations-Änderung mit zunehmender Detergens-Konzentration, bei der die Hemmung auf der Erhöhung der einsinnigen Ladung

durch Komplexbildung mit kationischen Gruppen des Proteins beruhen könnte, wird in Bezug auf den elektrostatischen Charakter der Hemmung durch das identische Verhalten der verschiedenen untersuchten Proteine bei unterschiedlichen  $p_H$ -Werten und insbesondere durch die Unabhängigkeit der Hemmung von der Ionenstärke fragwürdig, da Abschirmung der Ladungen die elektrostatisch bedingte Hemmung aufheben sollte.

Berücksichtigt man die Molekülkonformation des Protein-Dodecylsulfat-Komplexes, so folgt, daß bei kleinen Konzentrationen des Detergens (bis in den Bereich der Fällung) mit Hilfe hydrodynamischer Methoden keine Strukturänderungen festgestellt werden können<sup>30, 39-42</sup>; doch wird durch die partielle Solubilisation hydrophober Bereiche die Stabilität der nativen Struktur vermindert, und zuvor *intra*-molekular betätigte Bindungen können *inter*-molekular betätigt werden. Die der N-F-Isomerisation analoge Umwandlung bei Erhöhung der Detergens-Konzentration bringt große, mehr und mehr solubilierte hydrophobe Bereiche an die Moleküloberfläche, so daß durch Bildung einer neuen Grenzschicht zwischen dem wäßrigen Medium und der hydrophoben Moleküloberfläche die Aggregation schließlich unterbunden wird. Als primärer Schritt dürfte allerdings die elektrostatische Wechselwirkung im Komplex anzusehen sein, da anders die verschiedene Wirkung ionisierbarer und nicht ionisierbarer Detergentien nicht verstanden werden könnte.

Die Aggregationshemmung ist hier also die Folge einer primären Strukturänderung und der Ausbildung von Mizellen und liefert keinen Beweis für die Beteiligung hydrophober Wechselwirkungen an der Wärmeaggregation<sup>43</sup>. Daß sich dabei, ebenso wie im Fall der Aggregation in Mischlösungsmitteln niedriger *DK*, die hemmende Wirkung auf den Koagulations- und Austauschmechanismus erstreckt, kann auf einer Maskierung etwa vorhandener Schwefelfunktionen beruhen oder auf die Kopplung von

<sup>36</sup> Diese Wirkung der schwach protischen Lösungsmittel wird besonders deutlich aus der Wiederherstellung des nativen Helix-Gehaltes ( $\sim \lambda_c$ ) in partiell denaturierten wäßrigen Proteinlösungen durch Dioxan: RSA  $p_H 7$ ,  $I = 0,1$ :  $\lambda_c = 264 \text{ m}\mu$ ; 6 Min.  $70^\circ$ :  $\lambda_c = 252 \text{ m}\mu$ ; +30% Dioxan:  $\lambda_c = 268 \text{ m}\mu$ .

<sup>37</sup> J. STAUFF u. J. RASPER, Kolloid-Z. **151**, 148 [1957].

<sup>38</sup> F. W. PUTNAM u. H. NEURATH, J. biol. Chemistry **150**, 263 [1943]; J. Amer. chem. Soc. **66**, 692 [1944].

<sup>39</sup> H. NEURATH u. F. W. PUTNAM, J. biol. Chemistry **160**, 397 [1945].

<sup>40</sup> G. DI SABATO u. N. O. KAPLAN, J. biol. Chemistry **239**, 438 [1964].

<sup>41</sup> J. T. YANG u. P. DOTY, J. Amer. chem. Soc. **79**, 761 [1957].

<sup>42</sup> M. PALLANSCH u. D. R. BRIGGS, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1396 [1954].

<sup>43</sup> Die Dissoziation von Proteinen mit quartärer Struktur, welche unter den gleichen Bedingungen gelingt, die zuvor als hemmende Faktoren bei der Aggregation diskutiert wurden, steht in Analogie zur Aggregation. Auch im Fall der die Quartärstruktur stabilisierenden Kräfte konnte bisher die Wirkung hydrophober Wechselwirkungen als bestimmender Faktor nicht widerspruchsfrei nachgewiesen werden (JAENICKE<sup>3</sup>).



Koagulation (als Primärreaktion) und SH – SS-Austausch (als Konsekutivreaktion) hinweisen.

Hydrophobe Wechselwirkungen als Ursache der Aggregation sind demnach nur im Gefolge primärer Denaturierung festzustellen, während bei Erhaltung der nativen Struktur per exclusionem H-Bindungen für die Aggregation verantwortlich gemacht werden müssen. Mit dieser Folgerung stehen die Degradations- und Blockierungsversuche in Übereinstimmung.

Das Gewicht der verschiedenen möglichen intermolekularen Wechselwirkungen hängt von der Zugänglichkeit der beteiligten Gruppen, d. h. von der Sekundär- und Tertiär-Struktur der betrachteten Proteine ab. Generell überwiegt die Aggregation durch Nebervalenzen den Anteil, der durch SH – SS-Austausch oder Lanthionin-Bildung bedingt ist (vgl. Tab. 4). Unterhalb des „Schmelzpunkts“ der betrachteten Systeme und im isoelektrischen Bereich können nur die peripheren (polaren) Gruppen in Wechselwirkung treten, d. h. H-Bindungen und (in geringem Maße) Ionenpaar-Bindungen. Kovalente Aggregations-Reaktionen sind hier nicht meßbar beteiligt. Zunehmende Denaturierung ermöglicht mehr und mehr die Wechselwirkung primär maskierter Gruppen, wobei für den Fall der hydrophoben Wechselwirkungen auf Grund ihres endothermen Charakters<sup>18</sup> Temperaturerhöhung stabilisierend wirkt. Die eindeutige Zuordnung eines Anteils der Aggregation mit Hilfe dieses Kriteriums ist allerdings wegen der

Temperaturabhängigkeit der bimolekularen Aggregations-Reaktion<sup>1-3</sup> nicht ohne weiteres möglich.

Im Bereich extremer  $p_H$ -Werte liegen die Proteine unter den Bedingungen der Aggregation mehr oder weniger denaturiert vor. Hier könnte der Koagulationsanteil in Analogie zur fibrillären Aggregation des Insulins auf spezifische elektrostatische Wechselwirkungen kurzer Reichweite zurückgehen (WAUGH<sup>44</sup>).

Für den Fall hoher Ionenstärke wäre ein derartiger Mechanismus durch die (partielle) Dehydratation des Proteinmoleküls begünstigt.

Die intermolekularen Wechselwirkungen im Verlauf der Aggregation unter quasi-physiologischen Bedingungen sind nach dem Vorausgegangenen insgesamt die gleichen, die auch für die Tertiär- und Quartär-Struktur globulärer Proteine verantwortlich sind. Daraus ergibt sich, daß die Aggregation unter bestimmten Voraussetzungen als Modellreaktion für die Ausbildung der Quartärstruktur angesehen werden kann und daß auf der anderen Seite das Aggregations-Verhalten unmittelbar Rückschlüsse auf die Struktur der Proteine erlaubt. Auf Fragen in diesem Zusammenhang soll an anderer Stelle ausführlicher eingegangen werden.

Die Arbeit wurde ermöglicht durch die Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Fonds der Chemischen Industrie. Herrn Prof. Dr. J. STAUFF danke ich für förderndes Interesse, Fräulein S. HOLTZ für technische Assistenz.

<sup>44</sup> D. F. WAUGH, *J. cellular comparat. Physiol.* **49** (Suppl. 1), 145 [1957].