

6. Alle Ergebnisse sprechen eindeutig für die Annahme, dass in den Elapidae-Giften der e-Typ („echte“, „spezifische“ ChE) vorliegt. Die Übereinstimmung mit dem e-Typ des Gehirns und der Erythrozyten ist keine vollkommene. Der e-Typ stellt damit, wie es früher für den s-Typ gezeigt wurde, eine Gruppenbezeichnung dar.

Herrn Prof. Dr. A. Werthemann danke ich bestens für die Erlaubnis zur Durchführung der Versuche in seinem Institut, und Fr. I. Muhr für die wertvolle Mitarbeit.

Pathologisch-anatomische Anstalt der Universität Basel.

17. Untersuchungen über das Wal-myoglobin¹⁾

von Karl Schmid²⁾.

(7. XII. 48.)

Die rote Farbe des Muskels wurde erstmals von *Kölliker*³⁾ im Jahre 1850 einem dem Muskel eigenen Farbstoff — dem Myoglobin — zugeschrieben. Diese Annahme fand später ihre Bestätigung durch die von *Mörner*⁴⁾ gemachte Beobachtung, dass das spektroskopische Verhalten des Myoglobins von dem des Hämoglobins verschieden ist. Auf Grund des verschiedenen Gehaltes der Muskulatur an Myoglobin unterscheidet man in der Muskelphysiologie zwischen rotem und weissem Muskel. Die dabei — in chemischer und physiologischer Hinsicht — zu beobachtenden Unterschiede wurden eingehend von *Needham*⁵⁾ studiert. Erst 1932 gelang es *Theorell*⁶⁾, das Myoglobin aus dem Muskel des Pferdeherzens in krystallisierter Form darzustellen. Damit war die Möglichkeit gegeben, die Verschiedenheit dieser beiden Chromoproteide endgültig zu beweisen. In der Folge wurden auch die Eigenschaften des Myoglobins⁷⁾⁸⁾ weiter erforscht und von *Millikan*⁹⁾ und *Wyman*¹⁰⁾ zusammenfassend beschrieben. In den letzten Jahren wurden Muskelhämoglobine von verschiedenen Tierarten in krystallisiertem Zustand bereitet und von den vielen

¹⁾ Vorläufige Mitteilung: *Joan Keilin* und *K. Schmid*, *Nature* **162**, 496 (1948).

²⁾ Gegenwärtige Adresse: Department of Physical Chemistry, Harvard Medical School, Boston 15.

³⁾ *Kölliker*, *Mikroskop, Anatomie*, II, Bd. 1, S. 248 (1850).

⁴⁾ *K. A. H. Mörner*, *Nord. Med. Arkiv, Festband* (1897).

⁵⁾ *M. D. Needham*, *Physiol. Rev.* **6**, 1 (1926).

⁶⁾ *H. Theorell*, *Biochem. Z.* **252**, 1 (1932).

⁷⁾ *H. Theorell*, *Biochem. Z.* **268**, 46, 55, 64, 73 (1934).

⁸⁾ *V. E. Morgan*, *J. Biol. Chem.* **112**, 557 (1935).

⁹⁾ *G. A. Millikan*, *Physiol. Rev.* **19**, 503 (1939).

¹⁰⁾ *J. Wyman*, *Adv. Protein Chem.* **4**, 407 (1948).

Eigenschaften dieser Proteide auch ihre Zusammensetzung ermittelt¹⁻⁴).

In der vorliegenden Arbeit soll über die Darstellung und einige Eigenschaften des Wal-myoglobins berichtet werden. Überblickt man die von den verschiedenen Autoren beschriebenen Methoden zur Darstellung des Myoglobins, so erkennt man, dass sich die meisten Vorschriften an das von *Theorell*⁵) ausgearbeitete Verfahren anlehnen. Dieses besteht im Prinzip darin, dass das fein zerhackte Fleisch mit Wasser extrahiert wird. Der grösste Teil der ebenfalls in Lösung gegangenen Begleitstoffe wird mit basischem Bleiacetat ausgefällt. Das mitelierte Hämoglobin wird daraufhin durch fraktionierte Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ abgetrennt und das Myoglobin aus konzentrierter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung krystallisiert. Auch in den hier beschriebenen Versuchen wurde diese Methode angewandt. Jedoch wurde die mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraktionierte Lösung anschliessend gegen Wasser dialysiert⁶) und das Myoglobin zur Reindarstellung dreimal fraktioniert gefällt, entsprechend dem grossen Löslichkeitsunterschied zwischen Hämoglobin und Myoglobin der gleichen Tierart in konzentriertem Phosphatpuffer⁶)⁷). Die Krystallisation des so erhaltenen, spektroskopisch einheitlichen Proteids lässt sich dann leicht in schwach saurem Phosphatpuffer erreichen.

Es war nun von besonderem Interesse, das Verhalten dieses krystallisierten Proteids im Elektrophorese-Versuch nach *Tiselius* zu beobachten. Innerhalb eines p_{H} -Bereiches von 5,9—9,3 liess sich dieses mit einer Ausnahme, die gleich unten erwähnt werden soll, in 2 resp. 3 Komponenten aufspalten. Kohlenoxymyoglobin, das bei einem $p_{\text{H}} = 7,62$ untersucht wurde, zeigte 3 (Fig. 1), Met-myoglobin bei einem $p_{\text{H}} = 8,15$ jedoch nur 2 Komponenten (Fig. 2). Auch nach drei weiteren fraktionierten Phosphatfällungen wurde dasselbe Resultat erhalten. Ein anderes Präparat, das auf dieselbe Art dargestellt worden war, wurde als Met-Verbindung bei den folgenden p_{H} -Werten elektrophoretisch geprüft: 9,3; 8,2; 7,1; 7,0 und 5,9. In den ersten beiden Fällen wurden 3 (Fig. 3), im letzten (Fig. 4) jedoch nur 2 verschiedene Anteile beobachtet. Wurde nun das Met-myoglobin in einem Puffer untersucht, dessen p_{H} nur wenig von seinem isoelektrischen Punkt entfernt ist, so erschien dieses als homogenes Protein (Fig. 5). *Theorell*⁶) erhielt ein ähnliches Resultat bei seinen Unter-

¹) *A. Rossi* und Mitarbeiter, *Science* **108**, 15 (1948); *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **23**, 119 (1947); *ibid.* **17**, 206 (1942).

²) *J. Roche* und *Y. Derrien*, *Soc. biol.* **136**, 41 (1942); *J. Roche*, *Y. Derrien* und *H. Vieil*, *Trav. membres Soc. chim. biol.* **24**, 1016 (1942).

³) *H. Theorell* und *Ch. de Duve*, *Arch. Biochem.* **12**, 113 (1947).

⁴) *D. L. Drabkin*, *Am. J. med. Sci.* **209**, 268 (1945).

⁵) *H. Theorell*, *Biochem. Z.* **252**, 1 (1932).

⁶) *H. Theorell* und *Ch. de Duve*, *Arch. Biochem.* **12**, 113 (1947).

⁷) *V. E. Morgan*, *J. Biol. Chem.* **112**, 557 (1935).

suchungen über das menschliche Myoglobin. Änderte man aber das p_H des Puffers um nur 0,09 Einheiten, so ging die scheinbare Einheitlichkeit des Präparates verloren. Ob sich die drei Komponenten während der Darstellung des Proteids oder beim Aufbewahren gebildet haben und ob sie in einem Gleichgewicht zu einander stehen, kann an Hand dieser Ergebnisse nicht entschieden werden. Hämocyanin z. B. erfährt — wenn dessen Lösung statt bei -10^0 bei $+2^0$ gehalten wird — in bezug auf die elektrophoretische Beweglichkeit nachweisbare Veränderungen¹⁾. Reines, krystallisiertes Insulin verliert seine Homogenität, wenn es bei $p_H = 1$ in Lösung gebracht wird²⁾. Auch das nach der ursprünglichen Methode von *Northrop* krystallisierte Pepsin erwies sich im Elektrophorese-Versuch als nicht einheitlich³⁾. Endlich zeigte β -Lactoglobulin⁴⁾ das dreimal krystallisiert worden war, ein ähnliches Verhalten wie das beschriebene Walmyoglobin, indem es in Puffern von $p_H = 5,3$ — $5,6$ elektrophoretisch homogen erschien, sich jedoch in mehr sauren oder alkalischen Lösungen in 3 Komponenten aufspalten liess.

Das Wal-myoglobin wurde anschliessend nach der Methode von *Anson* und *Mirsky*⁵⁾ in das Globinchlorid übergeführt, wobei nur zwei von den sechs ausgeführten Ansätzen ein natives Produkt ergaben. Dieses erwies sich als sehr instabil und veränderte seine Eigenschaften in bezug auf die Löslichkeit in kurzer Zeit selbst bei tiefer Temperatur. Auch verdünnte Lösungen in neutralem Puffer waren nur begrenzt haltbar. *Drabkin*⁶⁾, der Untersuchungen über das Pferde-myoglobin anstellte, gelang es auf demselben Weg ebenfalls natives Globinchlorid zu gewinnen. Das teilweise denaturierte Globinchlorid des Wal-myoglobins hingegen war nur in Puffern vollständig löslich, deren p_H entweder geringer als 4,8 oder höher als 10 waren, Interessanterweise konnte es aber auch in Eiswasser längere Zeit in Lösung gehalten werden, wenn beim Auflösen desselben die Alkalität nur innerhalb eines p_H -Bereiches von 8—10 variierte, doch bildete sich nach anschliessender Dialyse gegen schwach alkalischen Puffer ($p_H = 8,7$) in 8 Stunden schon eine geringe Fällung. Der denaturierte Anteil des Globins konnte durch Neutralisieren der stark sauren wässrigen Lösung mit NaHCO_3 auf $p_H = 7,5$ gefällt werden. Das verbliebene, native Globin war sehr stabil, und nachdem seine Lösung bei 0^0 gegen einen fast neutralen Puffer ($p_H = 7,7$) dialysiert worden war, fiel erst nach 10 Tagen ein geringer Niederschlag aus. Auch das

1) *A. Tiselius* und *F. Horsfall*, Ark. Kem. **13A**, Nr. 18 (1939).

2) *J. Lens*, Biochem. Biophysica Acta **2**, 76 (1948).

3) *A. Tiselius*, *G. H. Henschen* und *H. Svensson*, Biochem. J. **32**, 1814 (1938).

4) *C. H. Li*, Am. Soc. **68**, 2746 (1946); *T. L. McMeekin*, *B. D. Polis*, *E. S. Della-Monica* und *J. H. Custer*, Am. Soc. **70**, 881 (1948).

5) *M. L. Anson* und *A. E. Mirsky*, J. gen. Physiol. **14**, 605 (1930)

6) *D. L. Drabkin*, J. Biol. Chem. **158**, 721 (1945).

Globin des Hämoglobins verhält sich, wie *Anson* und *Mirsky* (l. c.), *Drabkin*¹⁾, *Kuhn*²⁾ und *Munro*³⁾ gezeigt haben, in dieser Hinsicht sehr ähnlich.

Ein Protein kann bekanntlich auf seine Einheitlichkeit in bezug auf verschiedene Eigenschaften (Molekulargewicht, chemische Zusammensetzung und physikalische Eigenschaften) geprüft werden. Jedoch erst an Hand der Ergebnisse von Untersuchungen hinsichtlich mehrerer Eigenschaften kann die Existenz eines Proteins wahrscheinlich gemacht werden. So geben Elektrophorese-Resultate nur Auskunft darüber, ob ein Eiweisskörper in bezug auf seine Beweglichkeit im elektrischen Feld unter den gewählten Bedingungen homogen ist. Mit Hilfe der Methode von *Sanger*^{4) 5)}, nach der die mit einer freien α -Aminogruppe gekennzeichneten Aminosäuren in einem Protein bestimmt werden, kann nur Auskunft über die Einheitlichkeit eines Proteins bezüglich dieser ausgezeichneten Aminosäuren erhalten werden. Auf Grund der in dieser Arbeit erhaltenen Resultate soll schliesslich untersucht werden, ob die im Elektrophorese-Versuch beobachtete Inhomogenität des Wal-myoglobins bedeutet, dass durch die angewandten Reinigungsoperationen ein Teil des Wal-hämoglobins nicht abgetrennt werden konnte.

Experimenteller Teil.

1. Darstellung des Wal-myoglobins.

10 kg tiefgefrorenes Walfischfleisch (*Balaenoptera musculus* oder *phapsalus*) wurden bei $+20^\circ$ aufgetaut, mit Hilfe einer Hackmaschine fein zerkleinert und mit 10 Liter Wasser bei 20° während 24 Stunden extrahiert. Nachdem die Mischung zentrifugiert worden war, wurde die erhaltene Lösung, die ein $p_H=5,4$ aufwies und deren Säuregrad sich nach Zusatz von 1-n. NaOH nur unwesentlich veränderte, zur Abscheidung von Begleitstoffen mit einer gesättigten Lösung von basischem Bleiacetat versetzt. Erst nach Zugabe eines kleinen Überschusses dieses Reagens erreichte das p_H den Wert von 5,8. Nach Abzentrifugieren des Niederschlages wurde die Myoglobinlösung über Nacht im Eisschrank aufbewahrt, um möglichst viel Fett abscheiden zu lassen. Nach Filtration der Lösung wurde deren Bleiüberschuss durch Zufügen von gesättigter $Na_4P_2O_7$ -Lösung entfernt und anschliessend deren aktuelle Reaktion mit 1-n. NaOH von $p_H=6,6$ auf $p_H=6,8$ gebracht. Die Hauptmenge der überstehenden Lösung konnte gut dekantiert werden; der Rest wurde abzentrifugiert. Die nochmals filtrierten, vereinigten Lösungen wurden durch Beifügen von festem $(NH_4)_2SO_4$ zu 62% gesättigt und der resultierende Niederschlag verworfen. Die Fällung, die nun volle $(NH_4)_2SO_4$ -Sättigung bei $p_H=7,1$ bewirkte, wurde in 2 Liter Wasser gelöst und nach dem Filtrieren bei 20 mm Hg während 3 Tagen gegen dest. Wasser dialysiert. Dabei wurde beobachtet, dass entsprechend seiner kleinen Molekülgröße das Myoglobin in geringen Mengen durch die Membran tritt. Nach Entfernen des denaturierten Proteins wurde die Lösung unter mechanischem Rühren allmählich mit einer Mischung von 374 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ und 416 g K_2HPO_4 ($p_H=6,6$) bis zu einer Konzentration von 3-m. versetzt, der Niederschlag wiederum bei 20 mm Hg abgenutscht und das Filtrat

1) *D. L. Drabkin*, *J. Biol. Chem.* **158**, 721 (1945).

2) *R. Kuhn*, *L. Birkhofer* und *F. W. Quakenbush*, *B.* **72**, 407 (1939).

3) *M. P. Munro* und *F. L. Munro*, *J. Biol. Chem.* **150**, 427 (1943).

4) *F. Sanger*, *Biochem. J.* **39**, 507 (1945).

5) *R. R. Porter* und *F. Sanger*, *Biochem. J.* **42**, 287 (1948).

anschliessend mit der gleichen Salzmischung vollständig gesättigt. Diese fraktionierende Fällung wurde noch dreimal wiederholt, wobei jedesmal der zweite Niederschlag einer Operation in einem stets kleineren Volumen Wasser gelöst und für die nächste Stufe verwendet wurde. Nach der zweiten fraktionierten Fällung blieb die Lage des α -Bandes des Kohlenoxyd-Myoglobins (Reduktion des Met-myoglobins mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ und Durchperlen von CO) bei $\lambda = 5793 \text{ \AA}$ (Messung mit Hartridge Reversion Spektroskop) konstant. Das endgültig erhaltene Gut konnte nun auf die unten beschriebene Weise kristallisiert werden.

2. Krystallisation des Myoglobins.

Vorversuche ergaben, dass Kohlenoxyd-Myoglobin in kurzer Zeit in die Met-form übergeht, und dass das Met-myoglobin leicht in schwach saurem Puffer kristallisiert.

Eine 5- bis 10-proz. Myoglobininlösung (bei zu hohem Proteingehalt kann das Gut als gummiartige Masse ausfallen) wurde unter mechanischem Rühren mit kleinen Portionen einer Phosphatsalzmischung (95 g K_2HPO_4 und 170 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) bis zum Auftreten einer geringen Fällung versetzt. Der gebildete Niederschlag wurde dann bei einem Unterdruck von 15 mm Hg abgenutscht. Aus dem Filtrat kristallisierte das Myoglobin in dunkelbraunen Krystallen gewöhnlich bis zum nächsten Morgen aus. Die Krystallisation kann jedoch schon 1–3 Stunden nach dem Abfiltrieren des erwähnten Niederschlages einsetzen. In einem besonders günstigen Fall kristallisierte das gesamte Gut schon während des Abnutschens der ursprünglich amorphen Fällung. Das p_H der Mutterlaugen variierte von 5,68–6,00. Wie zu erwarten ist, hängt die Grösse der Krystalle von der Geschwindigkeit der Krystallisation ab. Aus einer Lösung, deren $\text{p}_\text{H} = 5,68$ und deren Phosphatkonzentration 3,36-m. betrug, wurden über Nacht 1–2 cm lange Krystalle gebildet¹⁾. Meistens weisen sie eine sechseckige (orthorhombische)²⁾ Form auf; sie sind sehr dünn und ihre Länge ist 1,5 mal grösser als ihre Breite. Ausnahmsweise wurden auch Formen beobachtet, deren Breite-Längen-Verhältnis 1:5 war.

3. Elektrophoretische Untersuchungen.

In allen Versuchen wurden die Myoglobininlösungen gegen einen Phosphatpuffer (Jonenstärke = μ) von bestimmtem p_H bis zum Gleichgewicht dialysiert. Es wurden keine Massnahmen getroffen, um die Extragradiënten³⁾ (∂ - und ϵ -„boundaries“⁴⁾) zu eliminieren, die besonders in Fig. 9 deutlich zu erkennen sind. In allen Figuren sind die „ascending boundaries“ links. Die Zeit vom Beginn der Elektrophorese bis zum Zeitpunkt der Aufnahme wird in Minuten (t) angegeben (halbe Zellenlänge = 46 mm; Stromstärke = 15 mA; Neigungswinkel = w). Der Proteingehalt der Lösungen wurde nach der von Chibnall und Mitarbeitern⁴⁾ modifizierten Kjeldahl-Methode bestimmt. Der Gesamtstickstoff des Walmyoglobins beträgt 16,98%.

1. Versuch. Das kristallisierte Myoglobin wurde in Wasser gelöst, mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reduziert, mit CO in die Kohlenoxydverbindung übergeführt und gegen einen mit CO gesättigten Puffer dialysiert. Fig. 1 zeigt, dass das Protein in 3 Komponenten aufgespalten wurde, die alle Hämoprotein enthielten.

2. Versuch. Wie Theorell⁵⁾ nachwies, lässt sich das Met-myoglobin nicht vollständig in seine CO-Verbindung umwandeln. Die in der Folge untersuchte Metform zeigte 2 Komponenten (Fig. 2). Wie in Fig. 2 zu erkennen ist, absorbiert das Met-myoglobin im sichtbaren Spektrum sehr stark; doch gelang es stets, mit Photoplatte „Kodak P300“ (special rapid, tropically hardened) gute Aufnahmen zu erhalten. Das in Versuch 1 und 2 verwendete Protein wurde in der oben beschriebenen Weise noch 3 mal fraktioniert gefällt, ohne dass aber eine weitere Reinigung erzielt werden konnte. Das Met-myoglobin zeigte

¹⁾ Vorläufige Mitteilung: Joan Keilin und K. Schmid, Nature **162**, 496 (1948).

²⁾ J. C. Kendrew, Privat-Mitteilung, aus Untersuchungen mit Röntgenstrahlen.

³⁾ A. Tiselius, Biochem. J. **31**, 1464 (1937); E. Wiedemann, Helv. **30**, 168 (1946).

⁴⁾ A. C. Chibnall, W. M. Röss und E. F. Williams, Biochem. J. **37**, 354 (1943).

⁵⁾ H. Theorell und Ch. de Duve, Arch. Biochem. **12**, 113 (1947).

wieder 2, das CO-Myoglobin 3 Komponenten, wobei sich das Verhältnis der „boundaries“ gegenüber Versuch 1 und 2 augenscheinlich nicht verändert hatte.

Von einem andern Präparat, das ebenfalls nach 3 fraktionierten Fällungen kristallisiert worden war, wurde eine bestimmte Menge gegen Wasser dialysiert. Der Proteingehalt dieser Ausgangslösung betrug 6%. Für die nachfolgenden Versuche (Fig. 3, 4, 5, 8 und 9; alle Metform) wurde ein aliquoter Teil davon verwendet und vor der Dialyse mit dem entsprechenden Puffer verdünnt.

3. Versuch. Wie Fig. 3 zeigt, spaltete sich die Metform dieses Präparates in 3 Komponenten auf. Diese stehen entsprechend der Flächen¹⁾ ihrer „boundaries“ mengenmässig in einem Verhältnis von ca. 63:25:12 zueinander. In einem weiteren Versuch, dessen Puffer nur schwach alkalisch ($p_H=8,02$) war, wurden ebenfalls 3 „boundaries“ beobachtet.

4. Versuch. In schwach saurem Medium ($p_H=5,90$) spaltete sich das Myoglobin in nur 2 Komponenten auf, wovon die grössere, entgegen dem Verhalten in alkalischen Puffern, der kleineren voran geht.

5. Versuch. Unter den in diesem Versuch (Fig. 5) gewählten Bedingungen verhielt sich das Myoglobin als scheinbar homogenes Protein. Die isoelektrischen Punkte der 3 in alkalischen Lösungen beobachteten Komponenten müssen daher sehr nahe beieinander liegen, oder die erwähnten 3 Komponenten können sich miteinander verbunden haben, so dass bei diesem Säuregrad des Puffers keine Trennung mehr eintritt. Infolge der sehr langen Versuchsdauer (23 Stunden), ist das zusätzliche „boundary“ des absteigenden Teils höchst wahrscheinlich mechanisch zu begründen.

4. Darstellung des Globinchlorids.

Eine möglichst konzentrierte Lösung von Myoglobin wurde über Nacht bei $+2^\circ\text{C}$ gegen Wasser dialysiert. Kurz vor der Spaltung wurde sie scharf abzentrifugiert und dann in 0,75 Liter frisch destilliertes, auf -5°C vorgekühltes Aceton getropft, dem zuvor 1,69 cm^3 konz. HCl zugegeben worden war. Während dieser Operation wurde das Aceton mechanisch gerührt und auf 0° gehalten. Das Globinchlorid fiel flockig aus. 3 Minuten nach dem Zutropfen wurde das rotbraun gefärbte Aceton abdekantiert, der Niederschlag dreimal in eisgekühltem Aceton aufgewirbelt, dekantiert, abgenutscht und so lange mit gekühltem Aceton nachgewaschen, bis die Waschlüssigkeit farblos erschien. Das erhaltene Produkt war fast weiss. Es war in neutralem, 3-m. Phosphatpuffer vollständig löslich. Der Grund, weshalb einmal ein natives, einmal ein teilweise denaturiertes Protein resultierte, wurde nicht erkannt.

Die untersuchten Eigenschaften des nativen und des denaturierten Globinchlorids wurden teilweise schon in der Einleitung beschrieben. Da die Globinlösungen sich als sehr unbeständig erwiesen, und deshalb ein Teil des Proteins aus Puffern ausfiel, deren p_H zwischen 5,9 und 10 lag, war es nur ausserhalb dieses p_H -Bereiches möglich, Elektrophoreseversuche anzustellen, wenn der denaturierte Anteil auch erfasst werden sollte. Wie Fig. 6 und 7 aber zeigen, ist unter diesen Bedingungen der relative Unterschied der elektrostatischen Ladungen zwischen den einzelnen Proteinkomponenten so klein und die Beweglichkeit des Proteins während der Elektrophorese so gross, dass keine Trennung eintrat. Zum Vergleich wurde das Met-myoglobin, das sich in Versuch 3 als inhomogen erwies, unter denselben Bedingungen nochmals untersucht und erschien aus dem gleichen Grund ebenfalls einheitlich (Fig. 8 und 9). Fig. 6 zeigt das für denaturierte Proteine typische, sehr scharfe „rising boundary“.

In alkalischem Milieu geht die braune Farbe des Met-myoglobins in Rot über und nach den Anschauungen von *Haurowitz*²⁾ erfolgt dabei eine Umwandlung in der Hämkomponente des Proteins. Die damit verbundene Veränderung der Absorption ist in Fig. 9 leicht zu erkennen. Spektroskopische Untersuchungen ergaben, dass sich bei einer Alkalität von $p_H=11,7$ aber noch keine dem Hämochromogen entsprechende Verbindung gebildet hatte.

¹⁾ *E. Wiedemann*, *Helv.* **30**, 892 (1947).

²⁾ *F. Haurowitz*, *Z. physiol. Ch.* **232**, 151 (1935).



Fig. 1.
 $p_H = 7,62$ $\mu = 0,1$ $c = 0,56\%$
 $t = 260$ Min. $w = 35^\circ$.



Fig. 2.
 $p_H = 8,15$ $\mu = 0,1$ $c = 0,81\%$
 $t = 50$ Min. $w = 43^\circ$.



Fig. 3.
 $p_H = 9,26$ $\mu = 0,1$ $c = 0,75\%$
 $t = 60$ Min. $w = 38^\circ$.



Fig. 4.
 $p_H = 5,90$ $\mu = 0,1$ $c = 0,98\%$
 $t = 310$ Min. $w = 30^\circ$.

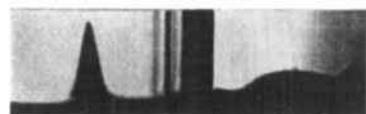


Fig. 5.
 $p_H = 7,04$ $\mu = 0,1$ $c = 0,75\%$
 $t = 1380$ Min. $w = 40^\circ$.



Fig. 6.
 $p_H = 4,50$ $\mu = 0,1$ $t = 30$ Min.
 $w = 60^\circ$.



Fig. 7.
 $p_H = 11,50$ $\mu = 0,1$ $t = 30$ Min.
 $w = 54^\circ$.



Fig. 8.
 $p_H = 4,63$ $\mu = 0,1$ $c = 0,75\%$
 $t = 80$ Min. $w = 47^\circ$.

δ ϵ



Fig. 9.
 $p_H = 11,69$ $\mu = 0,1$ $c = 0,75\%$
 $t = 43$ Min. $w = 58^\circ$.

5. Hitzekoagulation des Globins.

Alles Globinchlorid wurde in Wasser gelöst und zur vollständigen Entfernung des Hämins nach der oben beschriebenen Weise nochmals in salzsaurem Aceton gefällt. Das so gereinigte Protein (22 g) wurde in 200 cm³ Wasser gelöst, die gelbliche Lösung filtriert, mit NaOH neutralisiert ($p_H=7.7$) und nach Zusatz von ca. 300 mg Na₂SO₄ während 30 Minuten im siedenden Wasserbad gehalten. Die abgekühlte Suspension wurde danach abgenutscht und mit Wasser, Alkohol und Äther gut gewaschen; das fein verriebene Gut wurde dann während 3 Stunden bei 105° und zum Feuchtigkeitsausgleich danach 1 ½ Tage bei Zimmertemperatur offen stehen gelassen. Ausbeute 10 g (nicht alle Myoglobinslösungen waren aufgearbeitet worden).

6. Bestimmung der mit einer freien α -Aminogruppe gekennzeichneten Aminosäure¹).

500 mg hitzecoagulierendes Globin wurden in 5 cm³ 10 Gew.-proz. NaHCO₃-Lösung suspendiert, mit 10 cm³ 5 Vol.-proz. alkoholischer Lösung von Dinitrofluorbenzol²) versetzt und bei Zimmertemperatur während 2 ½ Stunden geschüttelt. Danach wurde der Niederschlag abgenutscht, sorgfältig mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen, fein gemahlen, während 3 Stunden bei 105° und anschliessend während 2 Tagen bei Zimmertemperatur gehalten. Ausbeute 655 mg.

96,2 mg „Dinitrophenyl (weiterhin als DNP bezeichnet)-globin“ wurde innerhalb einer Stunde in 5 cm³ konz. HCl bei ca. 50° gelöst und nach Zugabe von 4 cm³ heissem Wasser während 24 Stunden am Rückfluss erhitzt. Das braun gefärbte Hydrolysat, das schwarzen, ungelösten Huminstoff enthielt, wurde mit Wasser verdünnt und mit Äther extrahiert.

Vom wässrigen Anteil, der auf 100 cm³ ergänzt worden war, wurden 5 cm³ im Vakuum zur Trockne eingengt, in wenig Methyl-äthylketon-Äther-Gemisch auf eine lange, enge „Methyl-äthylketon-Äther-Kolonne“ (Lösungsgemische, sowie Darstellung der Kolonnen siehe *Sanger*, l. c.) gegeben. Es trat keine Trennung des Bandes auf, das entsprechend seiner Wanderungsgrösse als ϵ -DNP-Lysin identifiziert wurde (Oxylysin wurde nicht beobachtet). Dieselbe Menge wurde in einem weiteren Ansatz auf eine kurze, weite Kolonne gebracht, schliesslich in 100 cm³ 1-proz. NaHCO₃-Lösung aufgenommen und die Intensität der Gelbfärbung mit Hilfe eines *Beckman*-Photometers bei 350 m μ bestimmt (0,044 mg α -Amino-Lysin-N). Daraus ergibt sich, dass 19 Mol Lysin (Zerfallsfaktor des DNP-Lysins = 0,15; angenommenes Molekulargewicht = 17000) im Wal-myoglobin enthalten sind.

Der ätherische Auszug des Hydrolysates wurde im Vakuum zur Trockne eingengt und auf eine „CHCl₃-Kolonne“ gegeben. Das erste Band, das ein Zerfallsprodukt darstellt und sich schnell bewegt, wurde verworfen. Das zweite Band (Wanderungsgrösse R = 0,8) konnte danach gut abgetrennt werden. Das dritte und letzte blieb am oberen Ende der Kolonne haften. Die zweite Fraktion wurde, wie oben beschrieben, photometrisch bestimmt (0,040 mg Amino-N) und die Hälfte davon auf eine „Alkohol-Ligroin-Kolonne“ gebracht. Nach dem R-Wert enthielt sie entweder DNP-Phenylalanin, -Leucin oder -Valin. Die zu identifizierende Substanz wurde daher mit den fraglichen Aminosäurederivaten vermischt und auf gleiche Kolonnen gebracht. Im Falle des DNP-Phenylalanins und -Leucins trat eine Spaltung der Bänder ein. Dadurch wurde die Anwesenheit des Valins als endständige Aminosäure erwiesen. Um die Abwesenheit des Prolins zu zeigen, dessen DNP-Verbindung während 24-stündiger Hydrolyse mit konstant siedender HCl grösstenteils zerstört wird, wurde eine bestimmte Menge DNP-Globin während 40 Stunden bei 105° mit konz. HCl im zugeschmolzenen Rohr hydrolysiert. Die R-Werte der daraus resultierenden Bänder an einer „CHCl₃-Kolonne“ wurden mit denjenigen des reinen DNP-Prolins verglichen (Fehlergrenze max. 5%).

¹) Herrn Dr. R. R. Porter bin ich für die Freundlichkeit, mich in diese Methode einzuführen, zu bestem Dank verpflichtet.

²) H. G. Cook und B. C. Saunders, *Biochem. J.* **41**, 558 (1947).

Aus dem Amid-N-Gehalt¹⁾ des DNP-Globins (0,393 mg Amid-N in 100 g Substanz) und des Globins selbst (0,572 mg Amid-N in 100 g Substanz) ergibt sich ein Proteingehalt der DNP-Verbindung von 68,8%. Als Endgruppe enthält demnach das Wal-myoglobin in einem Molekül 1,15 Mol Valin (Pferdemyoglobin²⁾, MG = 17000: 1 Mol Glycin; 20 Mol Lysin. Pferdehäemoglobin, MG = 660000: 6 Mol Valin; 41 Mol Lysin.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Verschiebung der Absorptionsbänder des Myoglobin-spektrums während der Reinigung dieses Proteids bis zum konstanten Wert bedeutet, dass das Hämoglobin entsprechend dem grossen Löslichkeitsunterschied in konzentriertem Phosphatpuffer³⁾⁴⁾ entweder vollständig oder aber nur bis zu einer bestimmten Menge entsprechend einer Verbindung zwischen diesen beiden Chromoproteiden getrennt werden kann. In letzterem Fall müsste diese Verbindung zwischen Hämoglobin und Myoglobin weiterhin auch als solche krystallisieren (der krystallisierte Zustand eines Proteins bietet durchwegs keine Gewähr für seine Einheitlichkeit⁵⁾) und dazu noch so beschaffen sein, dass das darin enthaltene Hämoglobin entsprechend dem wahrscheinlich verschiedenen Gehalt an polaren Gruppen eine der drei gefärbten elektrophoretisch unterscheidbaren Komponenten darstellen würde. Ausserdem müssten noch die Forderungen erfüllt werden, dass die isoelektrischen Punkte dieser drei Komponenten entweder gleich sind oder doch sehr nahe beieinander liegen, und dass die Verunreinigung entsprechend der Flächen der „boundaries“ zu etwa 25% resp. 12% im untersuchten Protein enthalten ist. Endlich müssten nach dem Ergebnis der Endgruppenbestimmung beide Hämoproteide Valin als endständige Aminosäure besitzen. Wie *Porter* und *Sanger*²⁾ gezeigt haben, sind die Hämoglobin-molekeln verschiedener Tierarten aus 4, 5 oder 6 Peptidketten aufgebaut. Deshalb ist nicht anzunehmen, dass die Peptidketten im Hämoglobin des Walfisches sehr hohe Molekulargewichte oder cyklischen Bau besitzen, um sich dadurch den Beobachtungen bei der Endgruppenbestimmung entziehen zu können. Die Erfüllung aller dieser Bedingungen (1. Nur teilweise Abtrennung des Hämoglobins, trotz des grossen Löslichkeitsunterschiedes zwischen den beiden Chromoproteiden. 2. Bildung einer Verbindung zwischen dem verbliebenen Hämoglobin und dem Myoglobin. 3. Krystallisation dieser Verbindung. 4. Elektrophoretisch unterscheidbar. 5. Gleicher isoelektrischer Punkt. 6. Hämoglobingehalt des untersuchten Eiweisskörpers 25 resp. 12%. 7. Valin als gemeinsame endständige Aminosäure), die

¹⁾ Bestimmt nach *J. W. H. Lugg*, *Biochem. J.* **32**, 2123 (1938).

²⁾ *R. R. Porter* und *F. Sanger*, *Biochem. J.* **42** 287 (1948).

³⁾ *V. E. Morgan*, *J. Biol. Chem.* **112**, 557 (1935).

⁴⁾ Das Löslichkeitsverhältnis in 3-m. Phosphatpuffer beträgt: Hämoglobin: Myoglobin = 1:10⁶.

⁵⁾ *H. T. Clark*, *Ann. New York Acad. Sciences* **47**, 238 (1946).

die Anwesenheit des Wal-hämoglobins im untersuchten Eiweisskörper verlangen würde, scheint mir sehr unwahrscheinlich. Das Wal-myoglobin, das einerseits spektroskopisch einheitlich ist, zeigt andererseits im Elektrophorese-Versuch 3 Komponenten, wovon eine mengenmässig dominiert. Diese Diskrepanz lässt sich nun auf folgende Art erklären: Die eine Komponente stellt unverändertes Myoglobin dar und die beiden andern sind aus diesem Proteid während der Darstellung entstanden. Doch sind die Veränderungen nur so gering, dass infolge der noch vorhandenen grossen Ähnlichkeit der drei Komponenten diese nur im Elektrophorese-Versuch unterschieden werden können. Deshalb ist weiterhin anzunehmen, dass sie auch in ihrer chemischen Zusammensetzung (z. B. Endgruppe) miteinander übereinstimmen.

Zusammenfassung.

1. Es wird ein Verfahren zur Krystallisierung des Wal-myoglobins beschrieben.

2. Dieses krystallisierte Proteid erweist sich im Elektrophorese-Versuch als nicht homogen; es lassen sich je nach Versuchsbedingungen 2—3 Komponenten unterscheiden, wobei jeweilen eine mengenmässig dominiert.

3. Das daraus dargestellte Globin unterliegt einer raschen Denaturierung.

4. Bei einem angenommenen Molekulargewicht von 17000 enthält das Wal-myoglobin 19 Mol Lysin in der Peptidkette und 1 Mol Valin als endständige, mit einer freien α -Aminogruppe ausgezeichnete Aminosäure.

Die Ausführung dieser Arbeit wurde mir durch die Erteilung eines grosszügigen Stipendiums der schweizerischen „*Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie*“ ermöglicht. Dem Stiftungsrat, sowie Herrn Prof. A. C. Chibnall, F.R.S., der die Anregung zu dieser Arbeit gab und in dessen Institut sie ausgeführt wurde, sei auch an dieser Stelle für ihre Unterstützung bestens gedankt. Herrn M. W. Roes möchte ich auch hier für seine wertvolle Hilfe meinen Dank aussprechen.

School of Biochemistry, University of Cambridge, England.