

mittelbar nach Beendigung der Bestrahlung gross und nimmt dann innerhalb einiger Stunden beispielsweise auf die Hälfte des unmittelbar nach Beendigung der Bestrahlung festgestellten Betrages ab. Es kann daraus geschlossen werden, dass die Molekel des Umsetzungsproduktes nach der photochemischen Erzeugung zunächst noch eine gewisse Rotationsbeweglichkeit im Einbettungsmedium besitzt, diese aber durch Fixierung ans Einbettungsmedium allmählich (innerhalb von etwa 8 Stunden) verliert und dass es eine temporäre Beweglichkeit zufolge Absorption eines Lichtquants, ohne dass die Molekel deswegen photochemisch umgesetzt zu werden braucht, zurückerhalten kann (Photomobilisation).

Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Basel.

## 132. Über Gewinnung und Eigenschaften von humanem Globin<sup>1)</sup>

von P. Kistler, A. Buri und Hs. Nitschmann<sup>2)</sup>.

(2. VI. 53.)

### Einleitung.

Bei der Herstellung von Trockenplasma für die Humanmedizin, ein Prozess, der heute in vielen Ländern in technischem Maßstabe durchgeführt wird, fallen grosse Mengen von Erythrocyten an, für die kaum eine Verwendung besteht. Das gesamte Hämoglobin, ca.  $\frac{2}{3}$  des totalen Proteingehaltes des Blutes, geht somit der Nutzung verloren. Da andererseits wegen der Unmöglichkeit, beliebige Mengen menschlichen Blutes zu beschaffen, grosse Anstrengungen zur Entwicklung guter Plasmaersatzmittel gemacht werden, liegt der Gedanke nahe, dieses Hämoglobin hier einzusetzen. Es selber ist zwar untauglich für Transfusionen, jedoch sollte das Globin, das nach Abspaltung der Pigmentmolekeln aus dem Hämoglobin zurückbleibt, ein geeignetes Plasmaersatzmittel abgeben. In USA haben *Strumia*<sup>3)</sup> und seine Gruppe Anstrengungen in dieser Richtung gemacht. *Strumia* hat ein „modified globin“ entwickelt, das durch Behandlung des vermittels Säurespaltung nach *Anson & Mirsky*<sup>4)</sup> erhaltenen Globins mit Natronlauge bereitet wird. Wir haben uns bemüht, abzuklären, ob die Spaltung nicht ökonomischer und zudem so

<sup>1)</sup> Ein Teil der Versuche wurde mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt.

<sup>2)</sup> Adresse für Separata: Prof. Hs. Nitschmann, Institut für organische Chemie, Freiestr. 3, Bern.

<sup>3)</sup> M. M. *Strumia* et al., Am. J. Med. Sci. **209**, 436 (1945); **211**, 51 (1946); J. Lab. Clin. Med. **37**, 959 (1951); **40**, 211 (1952) usw.

<sup>4)</sup> M. L. *Anson & A. E. Mirsky*, J. Gen. Physiol. **13**, 469 (1930).

schonend durchgeführt werden kann, dass ein nahezu natives Globin resultiert, bei dem auf die nicht sehr sympathische Modifizierung mit Alkali verzichtet werden kann. Dieses Ziel wurde zwar vorerst nicht erreicht, doch haben unsere umfangreichen Versuche eine Reihe von Resultaten ergeben, die über das bereits Bekannte so weit hinausgehen, dass wir sie hier in aller Kürze mitteilen möchten. Ausführliche Darstellungen finden sich an anderer Stelle<sup>1)</sup>.

### 1. Die Säurespaltung des O<sub>2</sub>- und des CO-Hämoglobins.

Die Tatsache, dass bei stark saurem pH die 4 Hämolekeln vom Trägereiweiss abgelöst werden können, ist lange bekannt. Auf ihr beruhen alle angegebenen Präparationsmethoden für Globin. Die meistverwendete ist die von *Anson & Mirsky*<sup>2)</sup>. Bei ihr wird mit HCl bei pH 1–2 gespalten und dann Aceton zugesetzt, um das Globin zu fällen und das Hämin in Lösung zu bringen. Das salzsaure Globin wird dann in Wasser gelöst und neutralisiert. Dabei erweist sich ein beträchtlicher Teil als denaturiert und fällt aus. Der Rest ist beim isoelektrischen Punkt löslich, hat also Albumincharakter.

Wir haben nun systematisch den Einfluss einer Reihe von Faktoren auf die Säure-Spaltung von O<sub>2</sub>- bzw. CO-Hämoglobin untersucht. Dabei interessierte uns einerseits der Verlauf der Spaltung und andererseits die Ausbeute an beim isoelektrischen Punkt (pH 7,3) löslichem Globin, sowie der Gehalt des Globins an nichteliminiertem Pigment.

Als erstes untersuchten wir den Einfluss des pH. Mit Hilfe der Absorptionsspektren kann gezeigt werden, dass oberhalb pH 4 praktisch keine Spaltung von O<sub>2</sub>- bzw. CO-Hämoglobin stattfindet. Jedoch macht sich hier bei O<sub>2</sub>-Hämoglobin bald die Bildung von Hämiglobin bemerkbar.

Die in Fig. 1 dargestellte Spektrenschar zeigt dies sehr deutlich. Bis herunter zu pH 3,9 schneiden sich die Kurven in isobestischen Punkten, wie es für 2-Stoffsysteme typisch ist. Es sind O<sub>2</sub>-Hämoglobin-Hämiglobin-Mischspektren. Am Verschwinden der isobestischen Punkte zwischen pH 3 und 4 lässt sich erkennen, dass hier eine neue Komponente in Erscheinung tritt. Die Spektren lassen nicht entscheiden, ob es sich dabei um die abgespaltene prosthetische Gruppe, das Häm, bzw. dessen Ferri-Derivat, das Hämin, oder um denaturiertes Hämiglobin sog. Hämichromogen handelt.

*Steinhardt & Zaiser*<sup>3)</sup> haben an Pferde-CO-Hämoglobin zwischen pH 4 und 3 das Auftreten von 34–36 zusätzlichen H-ionenbindenden

<sup>1)</sup> *A. Buri*, Diss. phil. nat., Bern (1951); *P. Kistler*, Diss. phil. nat., Bern (1951).

<sup>2)</sup> *M. L. Anson & A. E. Mirsky*, J. Gen. Physiol. **13**, 369 (1930).

<sup>3)</sup> *J. Steinhardt & E. M. Zaiser*, J. Biol. Chem. **190**, 197 (1951); Am. Soc. **73**, 5568 (1951).

Gruppen pro Mol festgestellt. Die Demaskierung dieser Gruppen zeigt die eingetretene Denaturierung an. Wir kamen für humanes O<sub>2</sub>-Hämoglobin zu ziemlich genau demselben Ergebnis. Eine O<sub>2</sub>-Hämoglobinlösung wurde unter dem pH-Gerät bei Zimmertemperatur mit soviel 0,1-n. Salzsäure versetzt, dass das sofort gemessene pH ca. 3,2 betrug. Der nun erfolgende Anstieg des pH wurde von 10 sec

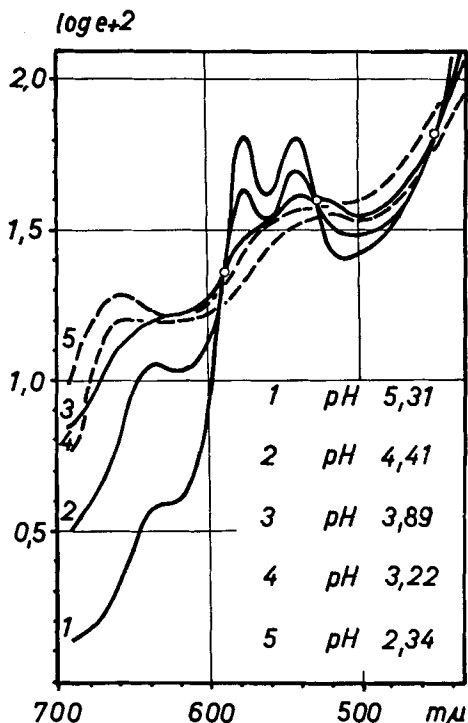


Fig. 1.

Spektren von fünf Proben einer 7-proz. O<sub>2</sub>-Hämoglobinlösung.

Die Proben wurden unter Kontrolle mit der Glaselektrode mittels 0,1-n. Salzsäure im Verlaufe von ca. 15 Min. auf die angegebenen pH-Werte gebracht. Nach 24 Std. Stehenlassen bei 0° wurden die Spektren mit dem *Beckman*-Spektralphotometer Modell DU gemessen.

nach Säurezugabe an bis zur Gleichgewichtseinstellung (24 h) zeitlich verfolgt. Eine graphische Darstellung des pH gegen den log der Zeit erlaubte eine gute Extrapolation des pH auf die Zeit 0. Nach 24 h<sup>1)</sup> wurde mit 0,1-n. Salzsäure auf diesen pH-Wert zur Zeit 0 zurücktitriert. Die dazu benötigte Menge Säure wird durch die bei der Denaturierung demaskierten, protonenbindenden Gruppen verbraucht. Pro 1 g O<sub>2</sub>-Hämoglobin brauchten wir 0,50 mMol Salzsäure; dies entspricht 34 Mol pro Mol Protein. Die Tatsache, dass trotz des

<sup>1)</sup> Die letzten 22 h war der Ansatz bei 0° gehalten worden.

unterschiedlichen Aminosäuregehaltes von Pferde-Hämoglobin und humanem Hämoglobin die gleiche Anzahl protonenbindender Gruppen gefunden wird, konnte nicht von vornherein erwartet werden.

Es steht fest, dass neben der Denaturierung auch eine Abspaltung von Pigment stattfindet. Dies geht aus einer Reihe quantitativer Versuche hervor, bei denen abgespaltenes Pigment nach *Anson & Mirsky* entfernt und vom zurückbleibenden Protein vor und nach der Neutralisation Ausbeute und Pigmentgehalt bestimmt wurden.

Tabelle 1.

Nr.	pH	Saures Globin		Neutrales Globin		
		% Lösl. bez. auf O <sub>2</sub> -Hb = 100	% Pigm.	% Lösl. bez. auf O <sub>2</sub> -Hb = 100	% Lösl. bez. auf GbHCl = 100	% Pigm.
1	3,93	75%	70%	51%	67%	62%
2	3,83	82%	56%	46%	56%	48%
3	3,66	83%	49%	39%	47%	21%
4	2,91	88%	13%	47%	54%	12%

Ausbeute und Pigmentgehalt an löslichem Protein bei Spaltungs-pH zwischen 4 und 3.

Proben einer O<sub>2</sub>-Hämoglobinlösung wurden bei 16° mit 0,1-n. Salzsäure auf die angegebenen pH-Werte gebracht. Nach 30 Min. wurde aus allen Proben das Eiweiss mit Aceton quantitativ gefällt, zentrifugiert, erschöpfend mit Aceton ausgewaschen und in Wasser aufgelöst. Die Neutralisationen erfolgten sehr langsam mit 0,1-n. Natronlauge. End-pH 7,3 (isoelektrischer Punkt des Globins). Nach 5 h Gleichgewichtseinstellung wurden die unlöslichen Anteile abgetrennt. Die Zahlen für Globin beruhen auf Stickstoffbestimmungen nach *Kjeldahl*. Die Prozentgehalte an Pigment beziehen sich auf den Pigmentgehalt von O<sub>2</sub>-Hämoglobin = 100%. Sie wurden auf spektralphotometrischem Wege bestimmt.

$P = (e/c)/A \cdot 100\%$ ;  $e =$  Extinktion,  $c =$  Konzentration

$A = e/c$  einer sauer gespaltenen Lösung, aus der kein Pigment entfernt wurde.

Die in Tab. 1 dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich die Zunahme der Spaltung mit sinkendem pH in dem Gebiete, in dem *Steinhardt & Zaiser* gearbeitet haben. Man sieht ferner, dass bei Rückneutralisation der sauren Eiweisslösungen jeweils der pigmentreichste Teil unlöslich ausfällt (Absinken der Pigmentgehalte in der Lösung). Die Abnahme und das Wiederansteigen der Menge an löslichem Protein mit sinkendem pH zeigen, dass, je mehr gespalten wurde, desto mehr auch renaturiert wird. Die vorliegenden Ergebnisse berechtigen zum Schluss, dass denaturiertes Protein leichter wieder zu einer globulären Molekel zusammengefaltet wird, wenn es pigmentfrei ist, als wenn es den Farbstoff noch gebunden hält. Wenn man bedenkt, dass die Gewichtsanteile von Häm und Globin im Hämoglobin sich wie 600 : 16400 bzw. wie 1 : 27 verhalten, so ist es verständlich, dass die grossen, flachen Molekeln des Häms die präzise Rückbildung des nativen Faltenmusters der Peptidkette

erschweren müssen. (Vgl. hierzu das Strukturmodell des Hämoglobins von *Perutz*<sup>1</sup>.)

Da uns vornehmlich die abgespaltene Eiweisskomponente interessierte, erstreckten sich die meisten unserer Versuche auf ein pH-Gebiet unter 3,5, wo die Spaltung dominiert.

Hier stellt man interessanterweise fest, dass bei weiterem Senken des Spaltungs-pH die Ausbeute an Protein, das am isoelektrischen Punkt löslich ist, weiter zunimmt. Gleichzeitig werden die Präparate immer pigmentärmer.

Dieser Befund ist eigentlich unerwartet, würde man doch eher annehmen, dass um so mehr unlösliches, denaturiertes Globin entsteht, je saurer das Spaltungs-pH ist. Gerade das Gegenteil ist der Fall.

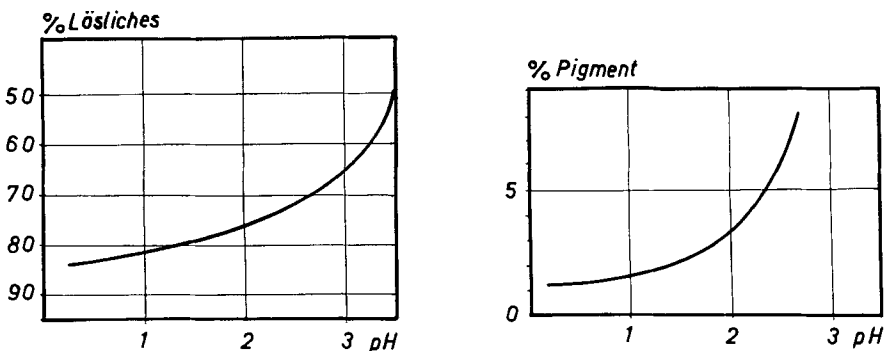


Fig. 2 und 3.

Ausbeute und Pigmentgehalt des löslichen Globins in Abhängigkeit vom Spaltungs-pH unter 3.

Proben einer O<sub>2</sub>-Hämoglobinlösung wurden mit 0,1-n. Salzsäure auf verschiedene pH-Werte gebracht ( $t = 18^\circ$ ). Nach 10 Min. wurde das Protein mit Aceton gefällt und erschöpfend ausgewaschen, in Wasser gelöst und langsam neutralisiert (pH 7,3). Ausbeute- und Pigmentgehaltsbestimmungen erfolgten wie bei Tab. 1 beschrieben.

Diese Verhältnisse sind nur verständlich, wenn man annimmt, dass der Spaltung eine Denaturierung vorangeht. Wenn nämlich vor der Spaltung auf alle Fälle denaturiert werden muss, ist es besser, ein tieferes pH anzuwenden, um wenigstens möglichst alles Hämin zu eliminieren, das die Renaturierung erschweren würde.

Schliesslich haben wir den Einfluss des pH auf die Spaltungsgeschwindigkeit verfolgt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Fig. 4 für O<sub>2</sub>-Hämoglobin graphisch dargestellt.

Die Analyse der Kurven lässt erkennen, dass eine Reaktion erster Ordnung vorliegt. Die Reaktionskonstanten wurden für ver-

<sup>1</sup> *M. F. Perutz*, Symp. Barcroft Memorial S. 135 (1948).

schiedene pH berechnet (Tab. 2). Sie zeigen, dass die Spaltungsgeschwindigkeit mit sinkendem pH zwischen 4 und 3 ausserordentlich stark zunimmt (log K ungefähr umgekehrt proportional dem pH). Für CO-Hämoglobin werden ähnliche Werte gefunden.

Tabelle 2.

Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten.

pH	4,06	3,90	3,75	3,51	3,29
O <sub>2</sub> -Hämogl.	0	0,000768	0,00128	0,00714	0,0337
CO-Hämogl.	0	0,0000268	0,00186	0,00976	0,0413

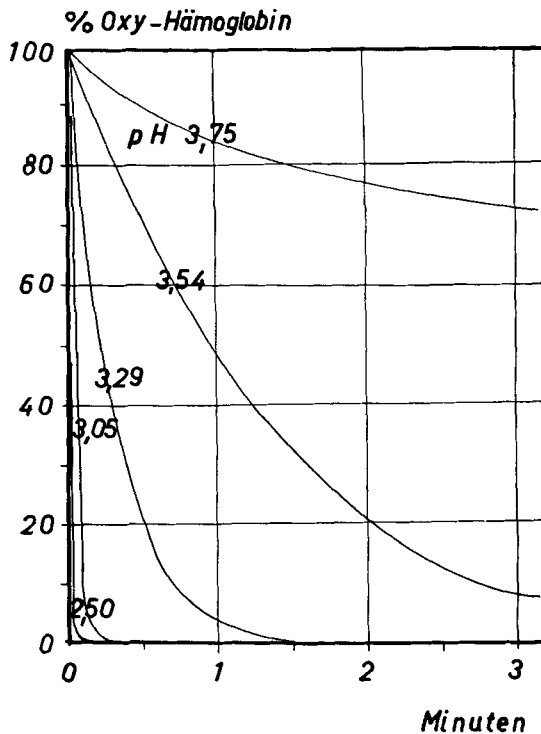


Fig. 4.

Spaltungsgeschwindigkeit von O<sub>2</sub>-Hämoglobin bei verschiedenen pH unter 4. Proben einer O<sub>2</sub>-Hämoglobinlösung wurden direkt in der Küvette des Spektralphotometers mit Puffern der angegebenen pH versetzt. Es wurde die zeitliche Änderung der Extinktion verfolgt (Zimmertemperatur). Die Extinktionsabnahmen gehen bei  $\lambda = 576 \text{ m}\mu$  parallel dem Verschwinden von O<sub>2</sub>-Hämoglobin. Gleich wie bei *Steinhardt & Zaiser* kann jedoch auch hier nicht zwischen entstehendem Hämin (abgespalten) und Hämichromogen (denaturiertes O<sub>2</sub>-Hämoglobin) unterschieden werden. Man weiss jedoch, dass bei den fraglichen pH die Hämichromogenbildung nur noch eine untergeordnete Rolle spielt.

## 2. Die Renaturierung.

Nach beendeter Säureeinwirkung mit Aceton gefälltes und erschöpfend vom Farbpigment befreites, saures Globin ist ohne weiteres in Wasser löslich. Nach dem schon Gesagten muss angenommen werden, dass sicher alle Proteinmolekeln denaturiert sind. Die Frage, ob es verschiedene Denaturierungsgrade des Globins gibt, können wir nicht entscheiden. Die Ansichten darüber, ob es überhaupt abgestufte Denaturierungen gibt oder ob die Denaturierung stets eine „Alles oder Nichts“-Reaktion ist, gehen noch auseinander. Eine uns interessierende Frage war natürlich die der Renaturierungsmöglichkeiten. Es darf kaum angenommen werden, dass selbst bei noch so sorgfältiger Rückneutralisation alle Molekeln des vom Pigment befreiten Proteins eine Rückfaltung genau zum ursprünglichen Faltenmuster erfahren werden. Hingegen zeugen die beim isoelektrischen Punkt löslichen Produkte, deren Ausbeuten unter günstigen Bedingungen bis 90 Prozent betragen können, dafür, dass eine gewisse Renaturierung tatsächlich erzielt wird. Genaueres über die günstigsten Neutralisationsbedingungen ist bis dahin nie mitgeteilt worden. Die meisten Autoren von Fraktionierungsvorschriften verlangen jedoch sorgfältiges, langsames Neutralisieren mit verdünnten Laugen<sup>1)2)</sup> oder durch Dialyse gegen Puffer<sup>3)</sup>. Die Polypeptidketten brauchen zur Wiederfaltung eine gewisse Zeit. Wird die Neutralisation zu rasch vorgenommen, so besteht die Gefahr, dass die dabei wirksam werdenden Kräfte sich nicht im gewünschten Sinne auswirken, sondern zu vermehrter Verfilzung der Molekeln führen, was einen grösseren Anteil an Unlöslichem bedeutet. Diese Gefahr besteht, wie eigene Versuche bewiesen haben, vor allem in konzentrierten Globinlösungen. Im übrigen scheint die Abscheidung des nicht renaturierten Globins bei Zimmertemperatur erst etwa 5 h nach erfolgter Neutralisation beendet zu sein.

## 3. Der Einfluss des Sauerstoffs bei der Säure-Spaltung von O<sub>2</sub>-Hämoglobin.

Es ist schon längere Zeit bekannt, dass beim Einwirken von Säure auf O<sub>2</sub>-Hämoglobin Sauerstoff frei wird (*Roaf*<sup>4)</sup>). Dieser Sauerstoff wirkt bei der Spaltung in der Weise auf das Eiweiss, dass die Ausbeute an löslichem Globin vermindert wird<sup>5)</sup>. Es muss angenommen werden, dass dieser Sauerstoff auf gewisse (evtl. durch Säureeinwirkung demaskierte) Gruppen oxydierend wirkt. Es ist auch schon beobachtet worden, dass die Ausbeuten bei Anwesenheit von

<sup>1)</sup> *M. L. Anson & A. E. Mirsky*, J. Gen. Physiol. **13**, 469 (1930).

<sup>2)</sup> *R. Hill & H. F. Holden*, Biochem. J. **20**, 1326 (1926).

<sup>3)</sup> *E. M. Jope & H. M. Jope*, Nature **164**, 622 (1949).

<sup>4)</sup> *H. E. Roaf*, Biochem. J. **17**, 579 (1923).

<sup>5)</sup> *H. F. Holden*, Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. **14**, 291 (1936); **15**, 43 (1937).

Reduktionsmitteln wie Ascorbinsäure<sup>1)</sup> oder besser durch Verwendung des sauerstofffreien CO-Hämoglobins<sup>2)</sup> gesteigert werden können.

Von uns systematisch durchgeführte Versuche bestätigen diese Befunde. Bei Einhaltung optimaler Bedingungen (siehe Kapitel 4) betragen die Ausbeuten an am isoelektrischen Punkt löslichem Globin bei O<sub>2</sub>-Hämoglobin 60–70 % und bei CO-Hämoglobin 80–90 %.

#### 4. Verbesserte Methode zur Darstellung von Globin.

Um optimale Bedingungen für Erzielung einer möglichst hohen Ausbeute an löslichem Globin von möglichst kleinem Pigmentgehalt zu finden, wurde systematisch ein Faktor nach dem anderen, unter Konstanthalten der übrigen, (pH, Konzentrationen, Temperaturen, Zeiten) bei Spaltung und Neutralisation variiert<sup>3)</sup>. Durch Vorfällen des viel unlöslicheren CO-Hämoglobins mit Aceton vor der Spaltung konnte bis zu 80 % Einsparung des sehr grossen Acetonverbrauchs bei der Methode von *Anson & Mirsky*<sup>4)</sup> erzielt werden, was für eine eventuelle technische Verwendung des Verfahrens wichtig ist.

Das Ergebnis aller dieser Bemühungen ist folgende verbesserte Methode:

a) Herstellung einer O<sub>2</sub>-Hämoglobinlösung aus menschlichen Erythrocyten. 100 cm<sup>3</sup> sedimentierte oder in der Becherzentrifuge zentrifugierte Erythrocyten aus möglichst frischem, ungerinnbar gemachtem Blut werden mit demselben Volumen 0,9-proz. Kochsalzlösung gründlich durchmischt und 15 Min. mit 1200 g bei 0° zentrifugiert. Dieser Waschprozess wird viermal wiederholt.

Hier wie auch im folgenden wenn möglich immer Kühlzentrifuge verwenden!

Nach beendetem Waschprozess werden die Erythrocyten mit dem doppelten Volumen destillierten Wassers versetzt und während 24 h im Kühlraum bei 0° stehengelassen.

Zur weiteren Reinigung der O<sub>2</sub>-Hämoglobinlösung wird kolloidales Aluminiumhydroxyd verwendet. 200 cm<sup>3</sup> 10-proz. Lösung von Aluminiumalaun wird bei Zimmertemperatur mit Ammoniak versetzt, bis ein leichter Ammoniakgeruch bestehen bleibt. Das gefällte Aluminiumhydroxyd wird sodann durch Dekantieren mit viel destilliertem Wasser ausgewaschen, bis im Waschwasser keine Sulfationen mehr nachgewiesen werden können. Man erhält auf diese Art eine gallertige Aluminiumhydroxydsuspension von ca. 100 cm<sup>3</sup>. Nach beendeter Hämolyse werden auf je 100 cm<sup>3</sup> Hämolyolat 20 cm<sup>3</sup> dieser Aluminiumhydroxydsuspension zugegeben. Nach gutem Durchmischen wird während 3 h in der Kälte zentrifugiert (0°). Man erhält so eine sehr klare reine O<sub>2</sub>-Hämoglobinlösung mit 30–50 mg Protein in cm<sup>3</sup>.

Zum Schutze gegen bakterielle Infektion kann der fertigen Lösung  $\frac{1}{10}$  Volumen gesättigte Borsäurelösung zugesetzt werden.

b) Herstellung einer Lösung von CO-Hämoglobin. Die Herstellung des CO-Hämoglobins geschieht, um rascher zum Ziele zu kommen, auf dem Umweg über das Hämoglobin.

<sup>1)</sup> *H. F. Holden*, *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **14**, 291 (1936); **15**, 43 (1937).

<sup>2)</sup> *R. Lemberg & J. W. Legge*, *Hematin Compounds and Bile Pigments*, S. 257, Interscience Publ. Inc. N. Y. 1949.

<sup>3)</sup> Einzelheiten können den Arbeiten von *Buri* und *Kistler* entnommen werden.

<sup>4)</sup> *M. L. Anson & A. E. Mirsky*, *J. Gen. Physiol.* **13**, 469 (1930).



Das O<sub>2</sub>-Hämoglobin wird während 8 h (bei grösserem Ansatz 12 h) an einer gut arbeitenden Wasserstrahlpumpe vom Sauerstoff befreit. Dies muss bei Zimmertemperatur erfolgen, da bei tiefer Temperatur die Reaktionsgeschwindigkeit zu klein wird. Zur Verhinderung des lästigen Schäumens, besonders am Anfang der Prozedur, wird fingerdick mit Toluol überschichtet. Das Toluol verdunstet später wieder vollständig.

Nach dem Absaugen des Sauerstoffs wird die Lösung erneut ganz dünn mit Toluol überschichtet und — zweckmässigerweise in der Kälte — einem lebhaften Strom von CO ausgesetzt. Das CO wird mit konzentrierter Schwefelsäure aus Ameisensäure entwickelt und mit konzentrierter Kalilauge gewaschen. Da sich CO-Hämoglobin am Lichte zersetzt, ist die Flasche mit Papier abzudunkeln. Nach 10 h lebhaften Einleitens kann man annehmen, dass die Umsetzung beendet ist.

c) Darstellung von Globin aus CO-Hämoglobin. 100 cm<sup>3</sup> kalte CO-Hämoglobinlösung werden mit 150 cm<sup>3</sup> auf -5° vorgekühltem Aceton durchmischt. Mischungswärme entsteht nicht merklich.

Das CO-Hämoglobin wird ohne Denaturierung als feinflockiger Niederschlag ausgefällt.

Jetzt wird 10 Min. mit 600 g bei -5° zentrifugiert.

Der Niederschlag des CO-Hämoglobins wird in 100 cm<sup>3</sup> gut vorgekühltem Aceton aufgeschlämmt.

Die so erhaltene Suspension wird auf möglichst tiefe Temperatur (wenigstens -5°) vorgekühlt.

Die Suspension wird nun mit 5 cm<sup>3</sup> einer vorgekühlten Mischung von gleichen Teilen halbkonzentrierter Salzsäure und Aceton versetzt. Mischungswärme entsteht nicht merklich.

Nach 30—40 Min. wird die Reaktionsmischung immer in der Kälte, langsam unter ständigem Umrühren mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt. Dabei fällt das Globin flockig aus. 10 Min. später wird es (nach Prüfung in einer Probe der überstehenden Lösung, ob alles gefällt ist) rasch abzentrifugiert und mit Aceton ausgewaschen, bis das Waschaceton farblos bleibt.

Das so erhaltene, vollständig weisse, salzsaure Globin wird sofort in 200 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst.

Die Lösung von salzsaurem Globin weist erfahrungsgemäss ein pH von ca. 2,6 auf. Sie wird sofort durch Zutropfenlassen von 0,1-n. Natronlauge aus einer Kapillare und unter ständiger pH-Kontrolle neutralisiert (vorher an einer Probe Laugenverbrauch feststellen). Diese Neutralisation erfolgt bei Zimmertemperatur. Dabei trübt sich die Lösung bei pH ca. 6,2, und bei pH ca. 6,8 beginnt denaturiertes Globin auszuflocken. Der Neutralisationsvorgang soll ungefähr eine Std. beanspruchen und stetig vor sich gehen, so dass lokale Überneutralisationen tunlichst vermieden werden. Hier soll ein langsam drehender, grosser Rührer verwendet werden (keine Schaumbildung!). End-pH 7,3.

Die Lösung wird unter ständigem langsamem Rühren zur Einstellung des Gleichgewichtes 5 h stehengelassen.

Jetzt wird der Niederschlag scharf abzentrifugiert. Die neutrale Globinlösung, die nur noch schwach gelb gefärbt sein soll, wird in sehr saubere, nach Spülung mit Alkohol mehrere Std. im Trockenschrank bei 105° getrocknete Flaschen abgefüllt und gut verschlossen.

Die Lösung kann nach dem Gefriertrocknungsverfahren getrocknet werden. Das Trockenpräparat soll rein weiss sein. Die ganze Präparation soll möglichst rasch erfolgen. Einzig die reine O<sub>2</sub>-Hämoglobinlösung darf 2—3 Tage bei 0° aufbewahrt werden, andere Unterbrüche sind im Arbeitsgang nicht statthaft. Es empfiehlt sich daher, vorher einen genauen Zeitplan aufzustellen!

##### 5. Eigenschaften des Globins.

Das nach vorstehender Vorschrift gewonnene, beim isoelektrischen Punkt lösliche Globin enthält nur noch Bruchteile eines Prozentes des im Hämoglobin vorhandenen Pigments.

Es lässt sich, wie schon *Anson & Mirsky*<sup>1)</sup> für Globin aus O<sub>2</sub>-Hämoglobin gezeigt haben, mit Ammonsulfat fraktionieren. Die bei 40-proz. Sättigung an Ammonsulfat ausfallende Fraktion ist nicht mehr löslich, stellt also offenbar die nur sehr unvollkommenen renaturierten Anteile dar. Sie ist auch verhältnismässig pigmentreicher, wodurch das in Lösung verbleibende Globin noch heller wird. Die ausfallende Fraktion ist bei Globin aus O<sub>2</sub>-Hämoglobin sehr beträchtlich, bei dem nach unserer Vorschrift aus CO-Hämoglobin hergestellten dagegen sehr gering, gelegentlich sogar überhaupt nicht vorhanden. Die schlecht renaturierten Anteile sind es wohl auch, die in Lösungen von nicht fraktioniertem Globin während längerer Zeit Nachfällungen entstehen lassen. Das bei 40-proz. Sättigung an Ammonsulfat in Lösung bleibende Globin kann bei noch höherer Sulfatkonzentration gefällt werden, ohne dabei seine Löslichkeit zu verlieren.

Die Fraktionierungsversuche zeigen, dass das nach der Neutralisation in Lösung bleibende Globin nicht einheitlich ist. Wenn es auch fraglich ist, ob es verschiedene Grade der Denaturierung gibt, so gibt es hier doch sicherlich verschiedene Grade der Renaturierung.

Sowohl rohes wie fraktioniertes Globin verhalten sich in Veronalpuffer bei pH 2,6 bis 9,6 elektrophoretisch einheitlich, was in Übereinstimmung mit den Versuchen von *Reiner*<sup>2)</sup> und *Munro & Munro*<sup>3)</sup> mit Globin aus O<sub>2</sub>-Hämoglobin steht. Der isoelektrische Punkt wurde elektrophoretisch bei pH 7,35 festgestellt, wo auch das Löslichkeitsminimum gefunden wurde.

Im Hinblick auf eine eventuelle Verwendung als Plasmaersatz wurden die Globinlösungen auch auf ihre Thermostabilität untersucht. Lösungen vom pH 7,3 (pH des Blutes) fangen schon bei 35° an, sich zu trüben, und geben bald Flockungen. Das gilt auch für fraktioniertes Globin. Da die Stabilität auch in Mischung mit humanem Plasma nicht wesentlich grösser ist, dürfte nicht daran gedacht werden, das Globin unverändert als Plasmaersatz zu verwenden. Die Stabilität verbessert sich aber sofort, wenn man das pH vom isoelektrischen Punkt weg ein wenig senkt. Bei pH unter 6 kann man die Lösungen sogar kochen, ohne dass sie sich trüben oder flocken. Abgekühlt und rückneutralisiert koagulieren sie nicht etwa, sondern zeigen ungefähr die gleichen Eigenschaften wie zuvor. Die gegenüber Hämoglobin deutlich verringerte Thermostabilität muss wohl auch auf die Unvollkommenheit der Renaturierung zurückgeführt werden.

Die oberhalb 40-proz. Sättigung an Ammonsulfat lösliche Fraktion wurde nach *Northrop*<sup>4)</sup> auf Einheitlichkeit geprüft. Diese Prüfung verlangt Unabhängigkeit der Löslichkeit von der Bodenkörpermenge. Aus praktischen Gründen wurde nicht trockenes Globin eingewogen, sondern es wurden Lösungen verschiedener Proteinkonzentration hergestellt, die dann alle auf dieselbe hohe Salzkonzentration gebracht wurden, so dass die Bodenkörper also durch Fällung (Aussalzung) entstanden. In Fig. 5 sind die Ergebnisse dreier Versuchsreihen dargestellt.

<sup>1)</sup> *M. L. Anson & A. E. Mirsky*, J. Gen. Physiol. **13**, 469 (1930).

<sup>2)</sup> *L. Reiner*, J. Biol. Chem. **146**, 583 (1943).

<sup>3)</sup> *R. Munro & A. W. Munro*, J. Biol. Chem. **150**, 427 (1943).

<sup>4)</sup> *J. H. Northrop*, J. Gen. Physiol. **13**, 781 (1930); id., Crystalline Enzymes, Columbia Univ. Press 1948.

Löslichkeit von Globin in Abhängigkeit von der Bodenkörpermenge.

Lösungen der oberhalb 40-proz. Sättigung an Ammonsulfat löslichen Globinfraktion wurden auf verschiedene Proteinkonzentrationen verdünnt. Bei konstanter Temperatur ( $0^{\circ}$ ) wurden sie mit gleichen Volumina 68-proz. Ammonsulfatlösung auf 50- (Kurve 1), 55- (Kurve 2) und 61-proz. (Kurve 3) Sättigung gebracht. Nach Gleichgewichtseinstellung während 16 h wurden die ausgefällten Anteile abzentrifugiert und die Proteinkonzentrationen in den Zentrifugatn durch UV.-Absorptionsmessungen bei  $280\text{ m}\mu$  bestimmt.

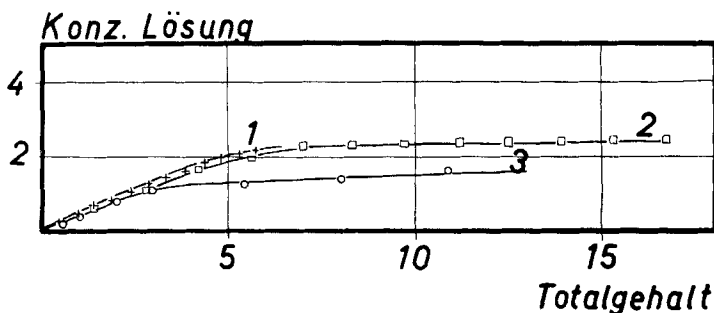


Fig. 5.

Für ein im Sinne der Phasenregel einheitliches Protein sollten die Kurven zuerst bei gleichem Maßstab der beiden Achsen mit  $45^{\circ}$  Steigung linear ansteigen (kein Bodenkörper) und dann nach scharfem Knickpunkt parallel der Abszisse verlaufen (Konzentration unabhängig vom Bodenkörper). Die drei Kurven zeigen klar, dass diese Bedingungen nicht erfüllt sind.

Ein natives bzw. vollständig renaturiertes Globin sollte mit Hämin zu Hämoglobin und seinen Derivaten rekombiniert werden können. Solche Rekombinationsversuche sind schon vielfach und mit wechselndem Erfolg unternommen worden<sup>1)</sup>2). Als Kriterien für eine gelungene Rekombination werden die wiedererlangte Fähigkeit der reversiblen Sauerstoffaufnahme und die Korrektheit der Spektren angesehen. In einem einzigen Falle<sup>2)</sup> scheint es auch gelungen zu sein, rekombinierte Derivate eines hochfraktionierten Globins zur Kristallisation zu bringen.

Das Rekombinieren geschah meist durch Zusammenmischen einer neutralen Globinlösung und einer alkalischen Hämatinlösung in stöchiometrischen Verhältnissen. Das rekombinierte Hämoglobin wird bei dem sich einstellenden, schwach alkalischen pH mit etwas Natriumdithionit zu Hämoglobin reduziert und dieses mit Luft oder  $O_2$  in  $O_2$ -Hämoglobin übergeführt. Denaturiertes Globin, wie übrigens auch andere Proteine, reagiert ebenfalls mit Hämin, zeigt aber nach

<sup>1)</sup> M. L. Anson & A. E. Mirsky, *J. Gen. Physiol.* **13**, 469 (1930); N. Gralén, *Biochem. J.* **33**, 107 (1939); H. Theorell, *Arkiv för Kemi* **16 A**, Nr. 7 (1942); J. Roche, *Biochem. J.* **26**, 1811 (1932); A. Hamsik, *C. r. Soc. biol.* **104**, 243 (1930); R. Hill & H. F. Holden, *Biochem. J.* **20**, 1326 (1926); O. Warburg & E. Negelein, *Bioch. Z.* **238**, 135 (1935).

<sup>2)</sup> E. M. Jope & H. M. Jope, *Nature* **164**, 622 (1949).

der Reduktion das bekannte Hämochromogenspektrum (2 in Fig. 6), das mit dem O<sub>2</sub>-Hämoglobinspektrum (1 in Fig. 6) nicht verwechselt werden kann. Eine O<sub>2</sub>-Bindung findet durch Hämochromogen nicht statt. Die Überführung des Globins in CO-Hämoglobin ist weniger günstig, da sein Spektrum von demjenigen des CO-Häms kaum verschieden ist.

Unser bei 40-proz. Sättigung an Ammonsulfat lösliches Globin liess sich gut rekombinieren. Fig. 7 zeigt die erhaltenen Spektren von Hämoglobin und O<sub>2</sub>-Hämoglobin, die bezüglich Form und Lage der Maxima mit denjenigen der nativen Stoffe übereinstimmen.

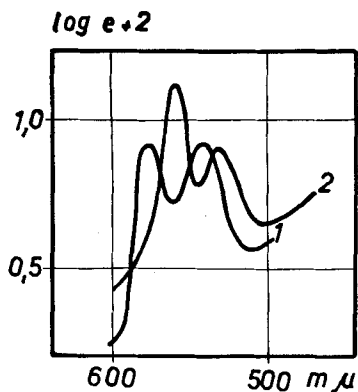


Fig. 6.

Fig. 6. Spektren von O<sub>2</sub>-Hämoglobin und Hämochromogen.

Kurve 1: O<sub>2</sub>-Hämoglobin. Kurve 2: Globin-Hämochromogen.

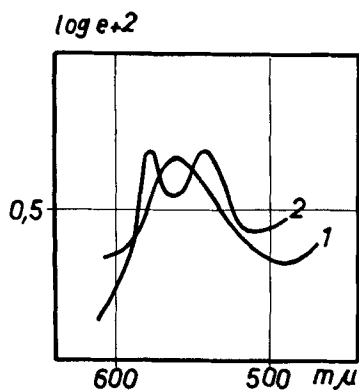


Fig. 7.

Fig. 7. Spektren von rekombinierten Hämoglobinderivaten.

Zu neutralen Globinlösungen (bei 40-proz. Sättigung an Ammonsulfat lösliche Fraktion) wurden Lösungen von Hämin (bzw. Hämatin) in Carbonat-Hydrogencarbonatpuffer zugegeben. Reduktion mit sehr wenig Natriumdithionit. Kurve 1: Hämoglobin. Kurve 2: O<sub>2</sub>-Hämoglobin.

Wenn das fraktionierte Globin auch physikalisch-chemisch nicht als einheitlich gelten darf, so zeigen die Rekombinationsversuche doch, dass die Renaturierung mindestens für diesen Teil des Proteins sehr nahe an die native Struktur zurückgeführt hat.

#### SUMMARY.

The influence of a range of acid pH values on human oxy- and carboxyhemoglobin was thoroughly investigated. Above pH 4 at most a very slow conversion into hemoglobin (in the presence of O<sub>2</sub>) takes place. Denaturation sets in below pH 4 unmasking approximately 34 proton-binding groups per mole of oxyhemoglobin. Heme always appears as a cleavage product with the acid-denaturation, the cleavage becoming more and more quantitative on lowering the pH

value. The split-off heme or hemin can be extracted with acetone which simultaneously precipitates the protein. After reneutralization to pH 7.3, it is soluble in water, the solubility percentage increasing with decreasing pH values of the cleavage process. The extent of renaturation which occurs on neutralization of the hydrochloric acid globin increases with increasing completeness of removal of the pigment. The cleavage velocity of oxy- and carboxyhemoglobin at various pH values was spectroscopically measured.

An improved and very detailed method is given for the preparation of globin from carboxyhemoglobin. This method which requires only little acetone gives a maximum yield of globin, soluble at the isoelectric point. The product contains only slight traces of pigment and on 40% saturation with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , an absolutely minimum or no precipitation results. Further, it is electrophoretically homogeneous and can be recombined with hemin giving compounds with the same spectra as the natural substances. However, solubility curves of the globin obtained with the *Northrop* method, and a decreased thermostability show that the renaturation has not proceeded to the same extent with all the molecules.

Bern, Blutspendedienst des Schweizerischen Roten Kreuzes,  
Theodor-Kocher-Institut und Institut für organische Chemie  
der Universität.

### 133. Zur Kenntnis der Kupplungsreaktion.

#### V: Die Reaktionsfähigkeit des undissoziierten Phenols.

#### Kupplungen in hochkonzentrierten Schwefelsäuren

(Vorläufige Mitteilung)<sup>1)</sup>

von **Hch. Zollinger**.

(10. VI. 53.)

Eine Arbeit von *Z. J. Allan*<sup>2)</sup>, die uns infolge äusserer Umstände erst vor kurzem zur Kenntnis gekommen ist, veranlasst uns, über vorläufige Ergebnisse von Untersuchungen zu berichten, die unabhängig von *Allan* zu ähnlichen Schlüssen geführt haben. Diese 1951 ausgeführten Versuche sind bis jetzt nur in einer nicht allgemein bekannten und zugänglichen Arbeit<sup>3)</sup> niedergelegt und in einem Vor-

<sup>1)</sup> III. Mitteilung: *Hch. Zollinger & W. Büchler*, *Helv.* **34**, 591 (1951). Als IV. Mitteilung wird bezeichnet: *Hch. Zollinger & C. Wittwer*, *Helv.* **35**, 1209 (1952).

<sup>2)</sup> *Coll. Czech. Chem. Com.* **16—17**, 620 (1952).

<sup>3)</sup> „Kinetik und Mechanismus der Kupplungsreaktion“. Habilitationsschrift Universität Basel (1951), im folgenden als l. c. I bezeichnet.