

Das Endvolumen beträgt bei allen Versuchen 3 cm³. Nach Sättigung der Ansätze (Flüssigkeit- und Gasraum) mit 5-proz. CO₂ wird bei 30° inkubiert; 5 Min. vor der ersten Ableseung wird die Reaktion durch Einkippung der Glucose aus dem Anhang ausgelöst.

Herrn Prof. *F. Leuthardt* sei auch an dieser Stelle für das Interesse und die Unterstützung, die er dieser Arbeit zuteil werden liess, bestens gedankt.

Zusammenfassung.

Die Mg²⁺-Abhängigkeit der durch Hexokinase katalysierten Übertragung eines Phosphatrests von ATP auf Glucose wird mit Hilfe von Metallpuffern untersucht. Die pMg-Aktivitätskurve fällt im pMg-Bereich 4–6 ab. Die Interpretation dieses Befundes führt zum Schluss, dass das aktive Ferment eine Mg-Protein-Verbindung ist, die bei abnehmender Magnesiumionenkonzentration in Mg²⁺ und inaktives Protein dissoziiert.

Physiologisch-chemisches Institut
der Universität Zürich.

100. Über das Cu²⁺-Bindungsvermögen von Proteinen

von G. H. Wolff und S. Fallab.

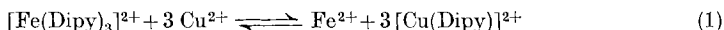
(13. III. 56.)

Bei unseren Untersuchungen über das Cu²⁺-Bindungsvermögen von Aminosäuren und Peptiden¹⁾ zeigte sich, dass die Komplexbildung der Peptide nicht ohne weiteres aus dem Verhalten ihrer Aminosäure-Bausteine erklärt werden kann. Bei der Peptid-artigen Verknüpfung gewisser Aminosäuren können Konfigurationen entstehen, die zur Ausbildung von Metallehelaten besonders befähigt sind.

In der vorliegenden Arbeit versuchten wir, mit der gleichen Messmethode unsere Untersuchungen auf Proteine auszudehnen. Wir gingen dabei von der Vorstellung aus, dass bei hochmolekularen Stoffen zwei grundlegend verschiedene Arten der Komplexbildung möglich sind. Einmal kann das Metall an eine endständige basische Gruppe gebunden sein (Fig. 1). Da sich die Konzentration endständiger Aminogruppen angenähert umgekehrt proportional zum mittleren Molekulargewicht verhält, ist hier zu erwarten, dass bei einer Verkleinerung der Molekeln – immer bei konstanter Gewichtskonzentration der Protein-Lösung – das Metall-Bindungsvermögen steigt, *et v. v.* Zweitens kann im Protein eine räumliche Konfiguration ausgebildet sein, die als 3- oder mehrzähliger Ligand ein besonders starkes Komplexbildungsvermögen besitzt, wie dies z. B. beim Histidyl-histidin der Fall sein muss¹⁾.

¹⁾ G. Wolff, S. Fallab & H. Erlenmeyer, *Experientia* **11**, 440 (1955).

Zur Verifizierung dieser Vorstellungen studierten wir das Cu^{2+} -Bindungsvermögen von Gelatine und Gelatine-Hydrolysaten mittels der früher beschriebenen Methode¹⁾, die auf der Austauschreaktion (1) beruht.



Um die so zunächst erhaltene Beziehung zwischen der Menge des in unserer Versuchsanordnung gebundenen Cu^{2+} und dem Protein-Gehalt der Lösung (Gew.-%) interpretieren zu können, suchten wir einen Vergleich mit den auf gleiche Weise erhaltenen Messwerten eines Peptids. Da Gelatine zu einem grossen Teil aus Glycin besteht²⁾, wählten wir hierfür Glycyl-glycyl-glycin¹⁾.

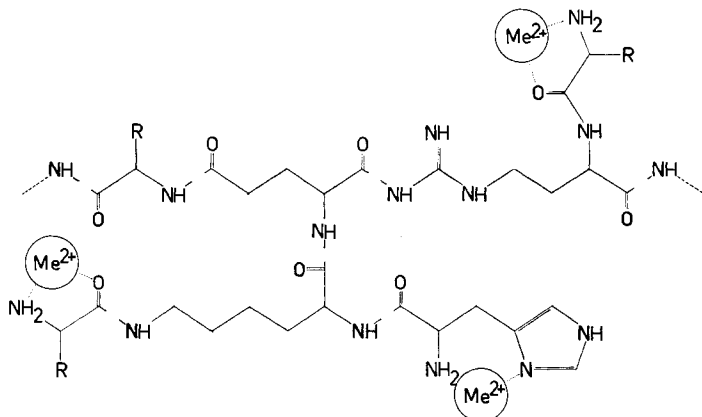


Fig. 1.

Konstruiertes Beispiel eines Proteingerüsts mit endständigen Chelatgruppen.

Das Cu^{2+} -Bindungsvermögen der Gelatine erwies sich, wie erwartet, um ein vielfaches stärker als dasjenige von Glycyl-glycyl-glycin bei gleicher molarer Konzentration (Fig. 2, A).

Erstaunlich ist hingegen, dass die Gelatine-Lösung mehr Cu^{2+} bindet als eine Glycyl-glycyl-glycin-Lösung von gleicher Konzentration an freien endständigen Aminogruppen (Fig. 2, B). Diese Beobachtung kann als Hinweis dafür aufgefasst werden, dass die Makromolekel Konfigurationen enthält, die Cu^{2+} fester zu binden vermögen als eine endständige Chelat-Gruppe wie in Glycyl-glycyl-glycin.

Bemerkenswert ist ferner, dass verschiedene Gelatinesorten³⁾ in diesem Test deutliche Unterschiede im Komplexbildungsvermögen zeigen (Fig. 2).

Um den Einfluss endständiger Chelatgruppen weiter zu verfolgen, untersuchten wir durch 120stündige Einwirkung von Trypsin erhaltene Gelatine-Hydrolysate. Wie erwartet, ist deren Cu^{2+} -Bindungsvermögen höher (Fig. 2). Zum Vergleich wurde noch das Bindungsvermögen von

²⁾ F. Leuthardt, Lehrbuch der physiologischen Chemie, Berlin 1954, p. 114.

³⁾ Drog. Kamber, Basel.

Glycin- und Glycyl-glycyl-glycin-Lösungen gleichen Prozentgehaltes eingetragen (Fig. 2, C, D).

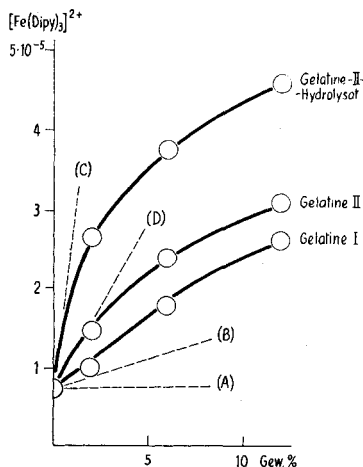


Fig. 2.

Fig. 2. Cu^{2+} -Bindungsvermögen von Gelatine, Gelatine-Hydrolysat und von Modell-Lösungen. (A) Glycyl-glycyl-glycin-Lösung gleicher molarer Konzentration, (B) Glycyl-glycyl-glycin-Lösung gleicher Konzentration an freien NH_2 -Gruppen, (C) Glycin-Lösung gleichen Prozentgehaltes, (D) Glycyl-glycyl-glycin-Lösung gleichen Prozentgehaltes (Konzentrationen verglichen mit denjenigen der Gelatine-Lösungen).

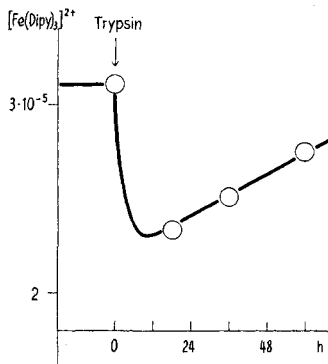


Fig. 3.

Fig. 3. Veränderung des Cu^{2+} -Bindungsvermögens einer Gelatine-Lösung im Verlaufe der Hydrolyse.

Im Verlaufe der Hydrolyse sinkt das Cu^{2+} -Bindungsvermögen vorerst (Fig. 3). Dieser Verlauf beweist, dass die ersten hydrolytischen Spaltungen Konfigurationen zerstören, die für das hohe Cu^{2+} -Bindungsvermögen dieser Gelatine von entscheidender Bedeutung sind.

Mit der gleichen Methode untersuchten wir das Cu^{2+} -Bindungsvermögen von Plasma-Albumin⁴⁾ (3-proz. Lösung), Albumin-Fraktion-V⁴⁾ (2-proz.), Rinderserumalbumin⁵⁾ (0,4-proz.), Bovine- γ -Globulin⁴⁾ (2-proz.), und Pepton *Roche* (0,5-proz.). Pepton *Roche* zeigte eine schwache Komplexbildung, während bei den übrigen Proteinen bei den von uns verwendeten Konzentrationen keine Cu^{2+} -Bindung nachgewiesen werden konnte.

Bemerkenswert ist, dass in den Kontroll-Lösungen, die Fe^{2+} , Dipyridyl und Fibrinogen⁴⁾ oder Ovalbumin enthalten, die Konzentration des gefärbten Komplexes $[\text{Fe}(\text{Dipy})_3]^{2+}$ sinkt, dass also bei diesen Proteinen eine ausserordentlich hohe Affinität zu Fe^{2+} , wenn nicht sogar eine Fe^{2+} -Spezifität, vorliegen muss. Über diese unerwarteten Verhältnisse werden wir in einer späteren Arbeit berichten.

⁴⁾ *Armour & Co.*, London.

⁵⁾ Der Firma *Hoffmann-La Roche & Cie. AG.* danken wir an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Präparates.

Experimentelles. Zur vergleichweisen Bestimmung des Cu^{2+} -Bindungsvermögens nach der früher beschriebenen kolorimetrischen Methode¹⁾ wurde die Gelatine in Acetatpuffer gelöst, das pH mit einigen Tropfen Eisessig auf 5,2 gebracht, das aus Fe^{2+} und Dipyridyl bestehende Indikator-System und Cu^{2+} zugesetzt, das Ganze zur Gleichgewichtseinstellung 12 Std. bei 40° stengelassen und schliesslich die Absorption der bei 60° pipettierten Lösungen (Konzentrationen s. Fig. 2) bei 5250 Å gegen eine entsprechende Gelatine-Vergleichslösung gemessen. Gleichzeitig wurde die Absorption einer Lösung bestehend aus Gelatine, Fe^{2+} und Dipyridyl kontrolliert.

Zur Hydrolyse wurden 500 cm³ einer 20-proz. Gelatine-Lösung vom pH 5,2 unter Zusatz von 5 mg Trypsin 120 Std. bei 40° stengelassen, das pH anschliessend mit Eisessig wieder auf 5,2 gebracht, das Indikatorsystem zugesetzt und danach die Absorptionen nach dem oben beschriebenen Verfahren bestimmt. Das pH hat sich während der für die Gleichgewichtseinstellung benötigten Zeit nicht mehr verändert.

Die Berechnung der in Fig. 2 angegebenen Vergleichskurven A und B basiert auf der Annahme eines mittleren Molekulargewichts von 60000⁶⁾.

Die Säure-Bindungskapazität der Gelatine bestimmten wir mit einem von *C. Tanford* beschriebenen Verfahren⁷⁾. Aus der pH-Titration von 0,5 g Gelatine mit 1-n. HCl ergibt sich für die darin enthaltenen Protonen-Akzeptoren die Zahl von $4 \cdot 10^{-4}$ Äquivalenten. Die Gelatine-Molekel enthält somit im Mittel ca. 48 basische Haftstellen.

Zur zeitlichen Verfolgung der Hydrolyse (Fig. 3) wurden 1000 cm³ einer 20-proz. Gelatine-Lösung bei pH 5,2 und 40° mit 10 mg Trypsin versetzt. Dieser Lösung wurden in gewissen Abständen Proben entnommen und darin nach Verdünnen auf einen Gelatine-Gehalt von 12% nach dem oben beschriebenen Verfahren das Cu^{2+} -Bindungsvermögen bestimmt. Vor der Zugabe des Enzyms wurde durch eine Kontrollbestimmung sichergestellt, dass die Komplexbildung durch keine anderen Faktoren verändert wird.

Herrn Prof. *H. Erlenmeyer* danken wir für seine Anregungen und für das Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat.

SUMMARY.

The capacity of binding copper ions of several proteins has been investigated by a colorimetric method described in an earlier paper. A relation between the copper binding capacity and the degree of hydrolysis of gelatine has been found. This relationship permits conclusions concerning structure and chelating properties of proteins.

Anstalt für anorganische Chemie
der Universität Basel.

⁶⁾ *A. Courts*, *Biochem. J.* **58**, 70 (1954).

⁷⁾ *C. Tanford*, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 441 (1950); *H. Neurath*, *The Proteins*, Vol. I, Part A, p. 481, New York 1953.