

Die N-endständigen Aminosäuren hochgereinigter Gammaglobuline aus Menschen-, Rinder-, Schweine- und Kaninchenserum

Von G. ZIMMERMANN und G. BRÄSE

Mit 4 Abbildungen

Inhaltsübersicht

Mit Hilfe der DNFB-Methode nach SANGER werden in hochgereinigten Gammaglobulinen aus Normal- und Immunsereen verschiedener Spezies die N-terminalen Aminosäuren bestimmt.

Wir untersuchten zur Vervollständigung der noch lückenhaften Daten die N-endständigen Aminosäuren von hochgereinigten Gammaglobulinen verschiedener Spezies mit der SANGERSchen Methode¹⁾²⁾³⁾. Mit Ausnahme der Serum-Albumine scheinen sich die übrigen Plasmaproteine gleichen Typs, aber verschiedener Spezies, in charakteristischer Weise auch in ihren N-endständigen Aminosäuren zu unterscheiden⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾. Am Beispiel von Rindernormal- und Immunsereen wurde ferner untersucht, ob Unterschiede in der Aminoendgruppe in den daraus isolierten Rinder-Normal- und Immungammaglobulinen bestehen. Endgruppenbestimmungen an Schweine-Gammaglobulinen sind unseres Wissens bisher nicht beschrieben worden.

Die benutzten Gammaglobuline wurden alle nach dem hier entwickelten Verfahren der „Methanol-Mitteltemperaturfraktionierung“ (unveröffentlicht) hergestellt. Die Proteine waren in der TISELIUS-Elektrophorese bei Verwendung des Standard-MICHAELIS-Puffers vom

¹⁾ F. SANGER, *Biochem. J.* **39**, 507 (1945).

²⁾ R. R. PORTER u. F. SANGER, *Biochem. J.* **42**, 287 (1948).

³⁾ R. R. PORTER, *Methods in Medical Research* **3**, 256 (1950).

⁴⁾ H. VAN VUNAKIS, *Univ. Microfilms (Ann. Arbor, Mich.) No. 2865; Chem. Abstr.* **46**, 2112 (1952).

⁵⁾ A. CAPUTO u. R. ZITO, *Bull. Soc. Chim. biol.* **37**, 1255 (1955).

⁶⁾ F. SANGER in: *Advanc. Prot. Chem.* **7**, 1 (1952).

⁷⁾ W. A. SCHROEDER in: *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* **11**, 240 (1954).

⁸⁾ E. O. P. THOMPSON, *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 643 (1958).

⁹⁾ G. BISERTE, *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 558 (1959).

Tabelle 1

Gammaglobulin-Präparat	hergestellt aus
1454 ÜIN	31,8 l Menschen-Citratsammelplasma
815 NII	5 l
846 NIII	10 l
807 NII	10 l Rinder-Normalserum (Mischserum)
843 NIII	13 l
925 NII	2,1 l
987 NIII	665 ml Kaninchen-Normalserum (Mischserum von 35 Tieren)
943 NII	150 ml Kaninchen-Normalserum (Mischserum von 8 Tieren)

Tabelle 2

Gammaglobulin (GG)-Präparate verschiedener Spezies	Übersicht und Vergleich der N-endständigen Aminosäuren		
	Literaturdaten	Autoren	eigene Ergebnisse
Menschen-GG Menschen-GG (1454 ÜIN)	Asp, Glu	¹⁰⁾ ¹¹⁾ ¹²⁾ ¹³⁾	Asp, Glu (Abb. 1)
Rinder-Normal-GG Rinder-Normal-GG (807 NII)	Asp, Glu, Ser, Ala, Val*)	¹⁰⁾ ¹²⁾ ¹³⁾	Asp, Glu, Ser, Ala, Val*)
Rinder-Immun-GG Rinder-Immun-GG (815 NII)	Asp, Glu, Ser, Ala, Val*)	¹⁴⁾	Asp, Glu, Ser, Ala, Val* (Abb. 2)
Rinder-Immun-GG (846 NIII)			Asp, Glu, Ser, Ala, Val*) (Abb. 2)
Kaninchen-Normal-GG Kaninchen-Normal-GG (943 NII)	Ala	¹⁵⁾ ¹⁶⁾	Asp, Ala (Abb. 3)
Kaninchen-Normal-GG (987 NIII)			Asp, Ala
Kaninchen-Immun-GG	Ala	¹⁵⁾ ¹⁶⁾	
Schweine-Normal-GG Schweine-Normal-GG (834 NIII)	—	—	Glu, Ala (Abb. 4)
Schweine-Normal-GG (925 NII)			Glu, Ala

*) Bis auf Val in submolaren Mengen.

¹⁰⁾ M. L. McFADDEN u. E. L. SMITH, J. Amer. chem. Soc. **75**, 2784 (1953).

¹¹⁾ F. W. PUTNAM, J. Amer. chem. Soc. **75**, 2785 (1953).

¹²⁾ J. GÖLLNER, Behringwerk-Mitt. **30**, 42 (1955).

¹³⁾ LAY WOO-POK u. W. J. POLGLASE, Can. J. Biochem. Physiol. **35**, 39 (1957).

¹⁴⁾ E. L. SMITH, J. biol. Chem. **164**, 345 (1946).

¹⁵⁾ R. R. PORTER, Biochem. J. **46**, 473 (1950).

¹⁶⁾ M. L. McFADDEN u. E. L. SMITH, J. biol. Chem. **214**, 185 (1955).

¹⁷⁾ S. BLACKBURN u. A. G. LOWTHER, Biochem. J. **48**, 126 (1951).

p_H 8,6 einheitlich, zeigten jedoch bei der Immunelektrophorese, soweit untersucht, noch Spuren von ein bis zwei NebenkompONENTEN (β_2 -Globulin und β_1 -Lipoprotein) in der Größenordnung von etwa 1% bis maximal etwa 3%. Wir bezeichnen diese Gammaglobuline deshalb als

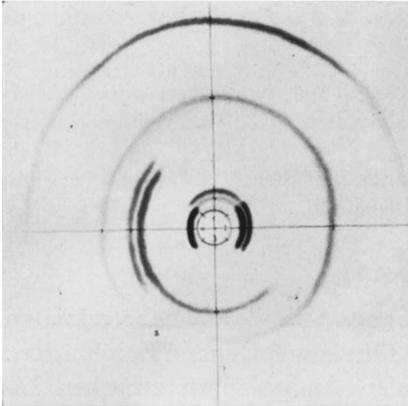


Abb. 1. Human- γ -Globulin (1454 UIN). Entwicklungsdauer 16 Stunden. 1. ätherl. DNP-AS (1454 ÜIN). 2. DNP-Asp, -Glu, DNP, DNA. 3. wasserl. DNP-AS (1454 ÜIN). 4. DNP-CySO₃H, ϵ -DNP-Lys, DNP-Arg, DNP

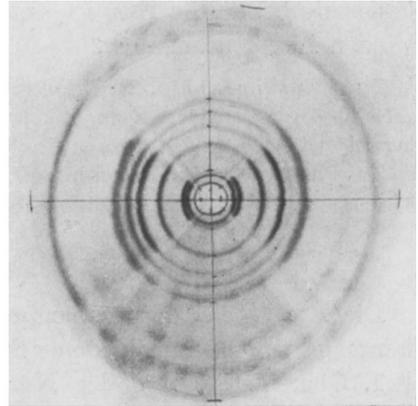


Abb. 2. Rinder-Immun- γ -Globulin (846 NIII und 815 NII) Entwicklungsdauer 22 Std. 1. ätherl. DNP-AS (815 NII). 2. DNP-Asp, -Glu, -Ser, -Ala, -Val, DNA. 3. ätherl. DNP-AS (846 NIII). 4. DNP-Asp, -Glu, -Ser, -Ala, DNP, Val, DNA

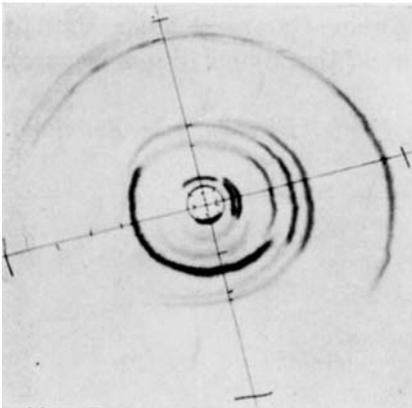


Abb. 3. Kaninchen-Normal- γ -Globulin (943 NII) Entwicklungsdauer 18 Stunden. 1. ätherl. DNP-AS (943 NII). 2. DNP-Asp, -Glu, -Gly, -Ala, DNP, DNA. 3. wasserl. DNP-AS (943 NII) 4. ϵ -DNP-Lys

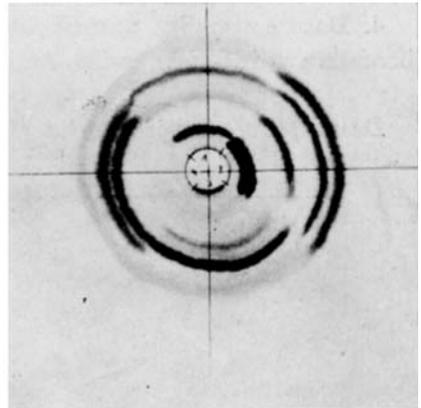


Abb. 4. Schweine-Normal- γ -Globulin (843 NIII) Entwicklungsdauer 18½ Stunde. 1. ätherl. DNP-AS (843 NIII). 2. DNP-Asp, -Glu, -Ser, -Ala, DNP, DNA. 3. wasserl. DNP-AS (843 NIII). 4. ϵ -DNP-Lys, DNP-Arg.

„> 97proz. elektrophoretisch rein“. Derartig geringe Mengen von Fremdproteinen verfälschen das Ergebnis einer Endgruppenbestimmung nicht mehr. Der Aschegehalt betrug 0% bis maximal 0,3%, berechnet auf über P_2O_5 (Trockenpistole) getrocknetes Protein.

Tab. 1 enthält die untersuchten Gammaglobuline mit den zur Fraktionierung benutzten Ausgangsseren; Tab. 2 die Ergebnisse, verglichen mit den Literaturangaben.

Zur Papyrographie. Schleicher u. Schüll 2043b Mgl, imprägniert mit Phthalatpuffer p_H 6,0; Entwickler: t.-Amylalkohol/Phthalatpuffer p_H 6,0¹⁷). Weitere benutzte Entwickler führten zu den gleichen Ergebnissen.

Zur Phototechnik. Aufgenommen durch starkes Blaufilter; 6/10chromatischer Film; Beleuchtung 600 W; Belichtungszeit 5-50 Sek.; Blende 16.

Zusammenfassung

Die SANGERSche Endgruppenbestimmungsmethode an hochgereinigten Gammaglobulinen verschiedener Spezies führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Übereinstimmung der N-terminalen Aminosäuren zwischen Literaturangaben und eigenen Befunden an Menschen- und Rinder-Gammaglobulinen (Tab. 2).

2. Gleiche N-terminale Endgruppen von Rinder-Normal- und Immungammaglobulinen.

3. Zwei N-endständige Aminosäuren (Alanin und Asparaginsäure) bei Kaninchen-Gammaglobulinen; das viel zitierte Ergebnis einer einzigen N-endständigen Aminosäure (Alanin) ist zu revidieren.

4. Das erstmalig untersuchte Schweine-Gammaglobulin enthält ebenfalls zwei N-endständige Aminosäuren (Alanin und Glutaminsäure).

Dessau, Forschungs-Institut für Impfstoffe, Biochemische Abteilung.

Bei der Redaktion eingegangen am 13. Mai 1961.