

# Über ein Choriongonadotropin.

Von

H. Michl, K. Riedl und F. Wessely.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 6 Abbildungen.

(Eingelangt am 26. Febr. 1951. Vorgelegt in der Sitzung am 8. März 1951.)

Trotz der großen Zahl von Arbeiten<sup>1</sup>, die über das gonadotrope Hormon des Schwangerenarns bisher erschienen sind, weiß man eigentlich nur sehr wenig über seine Zusammensetzung. *M. Reiss* und *F. Haurowitz*<sup>2</sup> sprachen das Hormon zufolge seiner Löslichkeitseigenschaften und wegen des positiven Ausfalls einiger Farbreaktionen als ein Pepton an. Im folgenden konnte die Polypeptidnatur des Hormons durch die Arbeiten von *F. G. Fischer* und *L. Ertel*<sup>3</sup>, *F. Dickens*<sup>4</sup>, *F. Haurowitz*<sup>5</sup> und *P. G. Marshall*<sup>6</sup> bestätigt werden. Zugleich wurde ein Kohlehydratgehalt (Hexose) gefunden und mit 10 bis 30% bestimmt.

1939 begann die amerikanische Forschergruppe *S. Gurin*, *H. P. Lundgren*, *C. Bachman* und *D. W. Wilson* eine chemisch orientierte Untersuchung eines Choriongonadotropins. Als Untersuchungsmaterial verwendeten sie ein nach *P. A. Katzman* und *E. A. Doisy* dargestelltes und durch Umfällen gereinigtes Präparat<sup>7, 8</sup>. Dieses erwies sich in der

<sup>1</sup> *P. J. Denekamp*, Die Chemie der gonadotropen Hormone, in *Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abt. V, Teil 3 B, S. 1563—1638, 1938; enthält 500 Zitate. — *F. Haurowitz*, Fortschritte der Biochemie, 1938—1947.

<sup>2</sup> *M. Reiss* und *F. Haurowitz*, *Z. exper. Med.* **68**, 371 (1929).

<sup>3</sup> *F. G. Fischer* und *L. Ertel*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **202**, 83 (1931).

<sup>4</sup> *F. Dickens*, *Biochemic. J.* **24**, 1507 (1930).

<sup>5</sup> *F. Haurowitz*, *M. Reiss* und *L. Balint*, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **222**, 44 (1933).

<sup>6</sup> *P. G. Marshall*, *Biochemic. J.* **26**, 1358 (1932); **27**, 621 (1933).

<sup>7</sup> *P. A. Katzman* und *E. A. Doisy*, *J. biol. Chemistry* **98**, 739 (1932).

<sup>8</sup> *S. Gurin*, *C. Bachman* und *D. W. Wilson*, *J. biol. Chemistry* **128**, 525 (1939); **133**, 467 (1940).

Ultrazentrifuge und beim Elektrophoreseversuch als einheitlich<sup>9, 10</sup>. Als Molekulargewicht errechneten sie 100000<sup>9</sup>. Neben 10 bis 12% Galaktose wurden 5 bis 6% eines acetylierten Aminozuckers bestimmt. Reaktionen auf Pentosen, Kетоhexosen, Arginin und Histidin fielen negativ aus. Eine weitere chemische Untersuchung befaßte sich mit dem Zusammenhang von biologischer Wirksamkeit, Stickstoff-, Zucker- und Aschegehalt<sup>11</sup>.

Das Fehlen einer Untersuchung der am Aufbau des Glykoproteins beteiligten Aminosäuren ließ die Durchführung einer solchen wünschenswert erscheinen. Für diese Arbeit stellte uns die Firma Sanabo in ent-

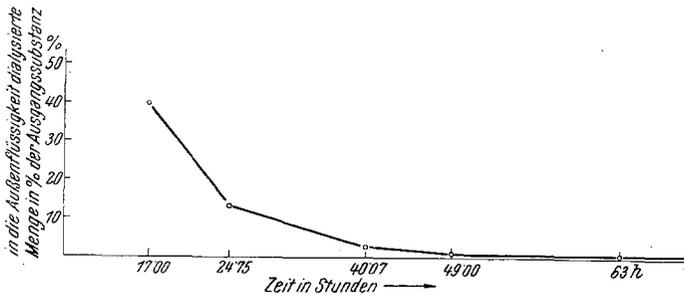


Abb. 1.

gegenkommender Weise Proben eines nach *P. A. Katzman* und *E. A. Doisy* aus Schwangerenarn gewonnenen Präparats zur Verfügung, welches bereits die hohe biologische Wertigkeit von 2,5 Millionen int. Einheiten zeigte und der Fabrik als Ausgangsmaterial für die Darstellung des gonadotropen Wirkstoffes „Praepitan“ dient.

Um Aufschluß über die Einheitlichkeit und Identität mit früher beschriebenen Produkten zu erhalten, bestimmten wir zunächst einige physikalische Konstanten.

Unser Präparat stellte ein fast weißes, in Wasser teilweise lösliches Pulver dar. Der Verbrennungsrückstand betrug 30 bis 45% und bestand größtenteils aus Sulfaten. Vor jeder weiteren Untersuchung mußte zunächst der Aschegehalt vermindert werden. Da der wirksame Bestandteil, wie erwähnt, ein hohes Molekulargewicht besitzen soll, führten wir zur Abtrennung der Salze eine Dialyse durch. Nach Vorversuchen erwies sich Cellophanpapier von 0,023 mm Dicke als Membran am geeignetsten. Diese ließ Stoffe bis zu einer Teilchengröße von etwa 5000 durch, eine

<sup>9</sup> *H. P. Lundgren, S. Gurin, C. Bachman* und *D. W. Wilson*, *J. biol. Chemistry* **133**, 477 (1940).

<sup>10</sup> *S. Gurin, C. Bachman* und *D. W. Wilson*, *J. biol. Chemistry* **142**, 367 (1942).

<sup>11</sup> *H. Friedrich*, *Medizin und Chemie*, Bd. IV, S. 297. 1944.

Eigenschaft, die auch die Entfernung verunreinigender Stoffe organischer Natur gewährleistete. Um Anhaltspunkte über den Verlauf der Dialyse zu gewinnen, wurde nach jedem Wasserwechsel eine quantitative Bestimmung der durchgegangenen Substanzen ausgeführt (siehe Abb. 1). Die Kurve zeigte den erwarteten Abfall der jeweils herausdialysierten Substanzmengen. Diese enthielten neben anorganischen Stoffen freie Aminosäuren und bis zu 17% Galaktose. Der Aschegehalt des so gereinigten Produktes lag bei 3,5%, der Schwefelgehalt bei 2,55%. Zum Vergleich sei gesagt, daß unser Aschewert durchaus mit den niedrigsten in der Literatur angegebenen Werten vergleichbar ist<sup>11</sup>.

Die so gereinigte Substanz wurde nun mit Hilfe der Elektrophorese auf Einheitlichkeit untersucht. Die Versuche wurden bei pH 4 und 8 unter Verwendung von Phosphat-Zitratpuffer, Veronalpuffer nach *Michaelis* sowie Phosphatpuffer nach *Sørensen* durchgeführt. Schon die ersten Ansätze zeigten ein rasches Auseinanderfließen der Grenzfläche Substanzlösung/Puffer, eine Erscheinung, die auf ein verhältnismäßig kleines Molekulargewicht sowie auf große, scheinbare Diffusionskonstanten<sup>12</sup> schließen ließ. Diese begrenzten in unserem Falle die Versuchsdauer und erschwerten dadurch die Untersuchung beträchtlich. Es konnte nun weder in Veronal noch in Phosphat-Zitratpuffer bei Versuchszeiten von 1½ Stdn. und einem Spannungsgefälle von 4 Volt/cm ein Zeichen einer Aufspaltung beobachtet werden. Die untersuchte Substanz wanderte einheitlich mit einer Beweglichkeit von  $-4,3 \cdot 10^{-5}$  Volt<sup>-1</sup> · cm<sup>2</sup> · sec.<sup>-1</sup>. Elektrophoretische Spreitungsversuche ergaben, wie erwartet, eine scheinbare Diffusionskonstante, die um zwei Zehnerpotenzen größer war als die normale. Sie betrug  $1,6 \cdot 10^{-5}$  · cm<sup>2</sup> sec.<sup>-1</sup> bei pH 8, einem Spannungsgefälle von 4,88 Volt/cm und einer Stunde bis zur Stromumkehr. [Zum Vergleich sei gesagt, daß das  $\gamma_2$ -Globulin (Mensch) unter ähnlichen Bedingungen eine scheinbare Diffusionskonstante besitzt, die nur 2- bis 3mal größer ist als die normale<sup>12</sup>.]

Eine Aufspaltung in zwei Komponenten gelang bei Verwendung von Phosphatpuffer von pH 8 und verlängerter Versuchszeit. Diese Versuche wurden sowohl bei 2,3° als auch bei 15° C durchgeführt. Die

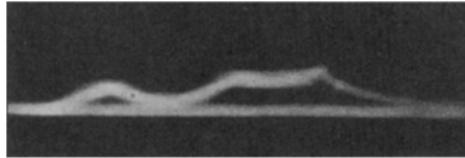


Abb. 2. Versuchsdauer: 90 Min., Spannungsgefälle: 10,3 V/cm, Winkel  $\theta$  des schrägen Spaltes: 70°.

<sup>12</sup> A. Alberty, J. Amer. chem. Soc. 70, 1679 (1948).

Untersuchung bei 2,3° erfolgte in der *Wiedemann-Apparatur*<sup>13, 14</sup>, (Abb. 2) die bei 15° C in der Elektrophoreseeinrichtung nach *H. Michl*<sup>15</sup> (Abb. 3). Besonders bei letzterem Versuch ist, wie man aus den Bildern sieht, eine deutliche Auftrennung zu erreichen gewesen. Die quantitative Auswertung<sup>16</sup> ergibt, daß die langsamere Komponente 20% der Gesamtmenge ausmacht. Es sei erwähnt, daß sich die Beweglichkeiten bei

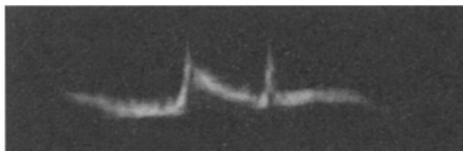


Abb. 3. Versuchsdauer: 265 Min., Spannungsfälle: 4,88 V/cm, Winkel  $\theta$  des schrägen Spaltes: 70°.

2,3° und 15° C nur wenig unterscheiden; sie liegen für die schnellere Komponente bei  $-4,6$  bzw.  $-4,7 \cdot 10^{-5}$ , für die langsamere bei  $-3,0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec.}^{-1} \text{ Volt}^{-1}$ .

Die amerikanischen Autoren geben für ihre Substanz eine Beweglichkeit von  $-4,8 \cdot 10^{-5} \cdot \text{cm}^2 \text{ sec.}^{-1} \text{ Volt}^{-1}$  an (bei pH 7 und 0° C). Aus diesen Werten läßt sich schließen, daß unsere schnellere Komponente mit der von den obigen Autoren untersuchten Substanz ähnlich oder identisch ist.

Eine bequeme und schnelle Auftrennung in beide Komponenten läßt sich auch durch die Elektrophorese auf Filtrierpapier in der von einem von uns angegebenen Form<sup>17</sup> erreichen. Abb. 4 zeigt die bei pH 4,3, einem mittleren Spannungsfälle von 42 Volt/cm und 20 Min. Versuchsdauer erreichte Auftrennung. Beide Komponenten konnten mit Ninhydrin oder *Pauly-Reagens*<sup>18</sup> sichtbar gemacht werden. Führte man die Entwicklung durch Anfärben mit Azokarmin B<sup>19</sup> durch, so trat nur die Hauptkomponente (in Abb. 4 zwischen der Markierung der

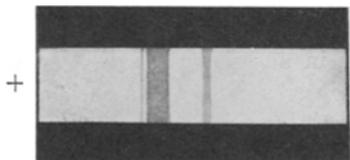


Abb. 4.

Ausgangsstellung und der zweiten Komponente) in Erscheinung. Wir bestimmten nun die Diffusionskonstante, um einerseits eine weitere Vergleichsmöglichkeit mit der von den Amerikanern untersuchten Substanz zu haben, andererseits um Rückschlüsse auf das Molekulargewicht ziehen und schließlich um das schon besprochene Verhältnis zur schein-

<sup>13</sup> Hersteller: *Strübin*, Schweiz.

<sup>14</sup> Prof. Dr. *G. Schubert*, Vorstand des physiol. Inst. der Univ. Wien, und Doz. Dr. *W. Auerswald* danken wir bestens für die Durchführung der Messung.

<sup>15</sup> *H. Michl*, Mh. Chem. **82**, 23 (1951).

<sup>16</sup> *E. Wiedemann*, Helv. chim. Acta **30**, 892 (1947).

<sup>17</sup> *H. Michl*, Mh. Chem. **82**, 489 (1951).

<sup>18</sup> *H. Pauly*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **42**, 508 (1904).

<sup>19</sup> *F. Turba* und *H. J. Erlenkel*, Naturwiss. **37**, 93 (1950).

baren Diffusionskonstante bestimmen zu können. Die Diffusionskonstante wurde in den oben angeführten Elektrophoreseeinrichtungen gemessen. Sie betrug  $7 \cdot 10^{-7} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ . Die Amerikaner fanden  $4,4 \cdot 10^{-7} \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ . Mit Hilfe der Sedimentationskonstanten und des spezifischen Volumens errechneten sie daraus — wie erwähnt — ein Molekulargewicht von 100000. Da der Diffusionskoeffizient unserer Substanz deutlich höher ist, kann man bei ihr auf ein niedrigeres Molekulargewicht bzw. auf eine niedrigmolekulare Begleitsubstanz schließen.

Nach der physikalisch-chemischen Charakterisierung unseres Choriongonadotropins wurden die bei der Hydrolyse entstehenden Spaltstücke festgestellt.

Als einziges Kohlehydrat konnte in dem elektrophoretisch nicht aufgeteilten Präparat Galaktose nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden (vgl. S. 545). Der Galaktosegehalt des durch Dialyse gereinigten Produktes betrug 40%, der der Ausgangssubstanz 26%. Der Acetylgehalt der letzteren war 4,3%. Aminosucker wurden wohl qualitativ nachgewiesen, aber nicht als solche quantitativ bestimmt. Aus dem Acetylgehalt errechneten sich 22% Acetylhexosamin.

Vor der Untersuchung der bei der Hydrolyse entstehenden Aminosäuren war eine Auftrennung in beide Komponenten notwendig. Diese wurde erst auf die von den Amerikanern angegebene Weise<sup>8</sup>, nämlich durch Ausschütteln mit Chloroform und Fällen mit Aceton versucht. Bei der elektrophoretischen Überprüfung des Verfahrens konnte jedoch keinerlei Trenneffekt wahrgenommen werden. Auch eine fraktionierte Fällung mit Alkohol führte zu keinem Erfolg.

Eine präparative Trennung im Milligrammaßstab gelang schließlich mit Hilfe der Elektrophorese auf Filtrierpapier. Beide auf diese Weise rein dargestellten Komponenten wurden totalhydrolysiert und von dem Hydrolysat die Aminosäurezusammensetzung bestimmt. Während auf Monoaminodikarbonsäuren und Hexonbasen papierionophoretisch geprüft wurde, bestimmte man die Gesamtaminosäurezusammensetzung mit Hilfe der Papierchromatographie.

Die Identifizierung der Aminosäuren erfolgte entweder durch ihre Lage am Papier oder zusätzlich durch spezifische Farbreaktionen. So wurde Arginin durch seine Lage am zweidimensionalen Papierchromatogramm, durch die Reaktion nach *Sakaguchi* in einem eindimensionalen Diagramm und auch papierionophoretisch nachgewiesen. Histidin wurde am Papier an der aus dem  $R_f$ -Wert berechneten Stelle durch die *Paulysche* Diazoreaktion<sup>18</sup> identifiziert. Die Ermittlung der S-haltigen Aminosäuren ließ sich ebenfalls gut papierchromatographisch durchführen.

Da die Versuche, mit Benzylalkohol-Butanolgemischen<sup>20</sup> eine Trennung

<sup>20</sup> R. Conden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin, *Biochemic. J.* **38**, 224 (1944).

der rasch wandernden Aminosäuren zu erreichen, von uns nicht reproduzierbar waren, kombinierten wir die Papierchromatographie mit einer anderen Methode. Wir teilten nämlich das erhaltene Hydrolysat an Tierkohle auf und trennten die beiden so erhaltenen Gruppen auf Filtrierpapier.

Im Hydrolysat der *Hauptfraktion* waren folgende Aminosäuren vorhanden:

Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin bzw. Isoleucin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Tyrosin, Lysin, Arginin, Histidin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Prolin, Cystin, Methionin. Ein schwacher Fleck an der für ein Hexosamin charakteristischen Stelle deutete auf das Vorhandensein dieser Verbindung hin. Ebenso konnte das Vorliegen von Galaktose in einem zweiten, unter milderer Bedingungen gewonnenen Hydrolysat der Hauptfraktion papierchromatographisch nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der *Nebenfraktion* war durch Substanzmangel erschwert. Es konnten folgende Aminosäuren nachgewiesen werden:

Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin bzw. Isoleucin, Lysin, Arginin?, Histidin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Prolin. Kohlehydrate wurden nicht gefunden.

In beiden Fraktionen fehlte Tryptophan und Oxyprolin.

### Experimenteller Teil.

*Dialyse.* Das Verhältnis der Volumina Innenflüssigkeit : Außenflüssigkeit war 1 : 4, die Konzentration der Innenflüssigkeit betrug 36,60 mg/ccm.

*Trennung der Fraktionen* durch Elektrophorese in der Versuchsanordnung nach H. Michl<sup>17</sup>. Filtrierpapier von *Schleicher* und *Schüll* 602 hart wurde in Streifen von 5 × 15 cm geschnitten. Diese wurden mit dem Lösungsmittel, einem wäßrigen Essigsäure-Pyridingemisch (10%ig an Essigsäure, 2%ig an Pyridin) von pH 4,3 (Antimonelektrode) getränkt und zwischen Filtrierpapier gut abgepreßt. Dann trug man die Substanz normal zur Längsrichtung des Streifens in Form eines Striches auf, und zwar höchstens 0,5 bis 1 mg/cm. Nach Einhängen zwischen den Elektroden erfolgte die Wanderung bei einem mittleren Spannungsgefälle von 45 Volt/cm und einer Stromstärke von 8 bis 10 mA 30 Min. lang. Der Streifen wurde nun im Vak. getrocknet und mit Äther von den Resten des Lösungsmittels befreit. Zur Orientierung über die Lage der Fraktionen wurde ein schmaler Streifen abgeschnitten und mit Ninhydrin entwickelt. Die substanzhaltigen Stellen schnitten wir aus und eluierten die Fraktionen mit dest. Wasser. Insgesamt wurden so wieder bis zu 90% der eingesetzten Substanz erhalten.

*Hydrolyse.* Einige Milligramm der Fraktionen wurden mit 2 ccm 6 n HCl versetzt und 24 Stdn. zum gelinden Sieden erhitzt. Hierauf wurde die dunkelgefärbte Lösung im Vak. eingedampft und dieser Vorgang nach Zusatz von Wasser mehrmals wiederholt, um die freie Säure möglichst weitgehend zu entfernen. Der Rückstand wurde mit 5 ccm Wasser versetzt, die Huminstoffen abzentrifugiert und die überstehende Lösung entsalzt. Nach Einengen wurde die Lösung direkt zu papierchromatographischen Versuchen verwendet.

Zur Ermittlung der Kohlehydrate wurde 0,1 g Dialysat mit Salzsäure bis zu einer Konzentration von 0,2 n versetzt und 8 Stdn. am lebhaft siedenden Wasserbad erhitzt. Das klare Hydrolysat wurde im Vak. zur Trockene gebracht. Vom Rückstand brachte man eine konz. Lösung aufs Papier.

*Galaktosegehalt.* Nachdem das Vorliegen von Galaktose auch durch Farbreaktionen bestätigt werden konnte, wurde diese kolor. bestimmt<sup>21</sup>. Die Ablesung erfolgte in einem Zeiß-Stufenphotometer unter Verwendung des Filters S 53.

*Feststellung der S-haltigen Aminosäuren.* Auf einem 10 cm breiten Filtrierpapierstreifen (*Whatman* Nr. 1) wurden in der Mitte etwa 8  $\mu$ l des Hydrolyсата und zu beiden Seiten Vergleichslösungen von Cystin und Methionin aufgetragen. Es wurde mit der oberen Phase eines Butanol-Eisessig-Wasser-

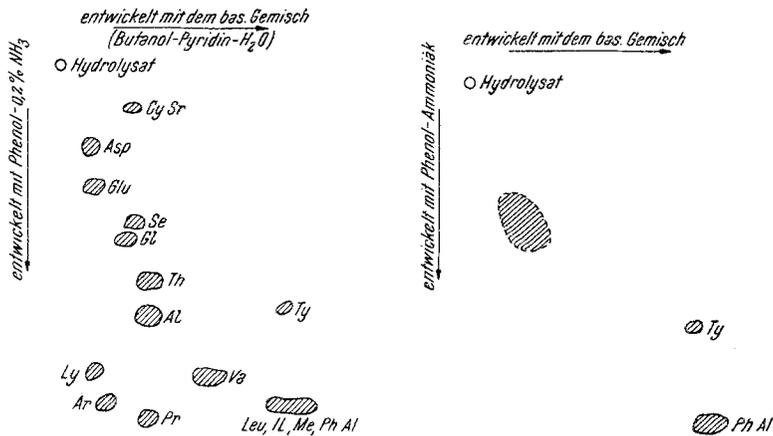


Abb. 5.

Abb. 6.

gemisches (4 : 1 : 5) entwickelt. Zur Sichtbarmachung der S-haltigen Aminosäuren wurde Kaliumjodoplatinat verwendet<sup>22</sup>. Die Anwesenheit von Cystin und Methionin gab sich durch ausgebleichte Stellen in der Untergrundfärbung zu erkennen.

*Nachweis von Histidin und Arginin.* Histidin wurde im eindimensionalen Papierchromatogramm durch diazotierte Sulfanilsäure erkannt<sup>18</sup>. Arginin wurde mit der *Sakaguchi*-Reaktion nachgewiesen<sup>23</sup>. Zuerst wurde mit der  $\alpha$ -Naphthollösung besprüht und nach kurzem Trocknen mit Hypobromit.

*Zweidimensionale Papierchromatogramme.* Die zweidimensionalen Papierchromatogramme wurden auf *Whatman*-Filtrierpapierbögen Nr. 1 (57  $\times$  46 cm) in *Dent*-Kästen<sup>24</sup> ausgeführt. Zuerst wurde in der Längsrichtung des Papiers mit einem basischen Gemisch (Butanol-Pyridin-Wasser 1 : 0,6 : 1) unter Zugabe von 2 Tropfen einer 33%igen Diäthylaminlösung in die Kammer entwickelt. Nach sorgfältiger Trocknung wurde das Ende des Bogens, gegen das das Lösungsmittel gewandert war, weggeschnitten. Damit wurde be-

<sup>21</sup> Z. Dische, Mikrochem. 7, 33 (1929).

<sup>22</sup> H. M. Winigard und G. Toennies, Science (New York) 108, 506 (1948).

<sup>23</sup> C. J. Weber, J. biol. Chemistry 86, 217 (1930).

<sup>24</sup> C. E. Dent, Biochemic. J. 43, 169 (1948).

zweckt, daß die dort befindlichen, dem oberen Teil des Papiers entstammenden Verunreinigungen, die eine Verzerrung der Lösungsmittelfront bewirken, entfernt werden. In der zweiten Richtung wurde sodann mit Phenol-0,2% Ammoniak entwickelt<sup>20</sup>. Diese Reihenfolge der Lösungsmittel erschien uns geeigneter, als die von *Dent* angegebene<sup>24</sup>, da so eine geringere Verzerrung der Flecken eintrat. Die Sichtbarmachung der Aminosäuren wurde durch Besprengen mit einer 0,2%igen Ninhydrinlösung bewirkt (Abb. 5).

*Abtrennung der aromatischen Aminosäuren aus dem Hydrolysat durch Adsorption an Kohle.* Für diese Versuche wurde ein Hydrolysat verwendet, das aus 40 mg ausdialysierter Ausgangssubstanz dargestellt worden war. Als Aktivkohle verwendeten wir das Präparat „Carbo adsorbens granulatus“ der Firma *Merck*, das entsprechend den Angaben von *Schramm*<sup>25</sup> vorbehandelt worden war. Die Filtrationsgeschwindigkeit unseres Präparats war jedoch geringer als die der in der Literatur beschriebenen. Das Hydrolysat wurde zur Trockene eingedampft und in 5 ccm 5%iger Essigsäure aufgenommen. Nach Reduktion des Cystins mit H<sub>2</sub>S in der Wärme wurde an 2,5 g vorbehandelter Aktivkohle adsorbiert und die nichtaromatischen Aminosäuren mit 75 ccm 5%iger Essigsäure eluiert. Zur darauffolgenden Elution der aromatischen Aminosäuren verwendeten wir heiße 20%ige Essigsäure, der wenige Tropfen frisch dest. Phenol zugefügt worden waren. Es wurde mit insgesamt 100 ccm Lösungsmittel eluiert und nach Eindampfen auch von dieser Fraktion ein Chromatogramm aufgenommen (Abb. 6).

---

<sup>25</sup> *G. Schramm* und *J. Primosigh*, Ber. dtsch. chem. Ges. **77**, 417 (1944).