

# Ein Absorptionseffekt im UV-Spektrum hitzedenaturierter Serumproteine.

Von  
E. Schauenstein, H. Bayzer und K. Kronegger.

Aus dem Institut für Theoretische und Physikalische Chemie der Universität  
Graz.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 30. April 1955.)

Die Hitzedenaturierung von Serumalbumin und  $\gamma$ -Globulin läßt sich sowohl an entsprechend verdünnten wäßrigen Lösungen als auch an optisch klaren Filmpräparaten spektral einwandfrei feststellen: Verglichen mit dem Spektrum der nativen Proteine, weist das der hitzedenaturierten Proteine in den Gebieten von 2500, 3000 und 4000  $\nu'$  eine sehr erhebliche Mehrabsorption auf, die als praktisch reine Konsumtivabsorption anzuspochen ist.

Es handelt sich hier sicherlich um die gleiche Absorption, die bisher im Spektrum vieler Proteine als sogenannte „Zusatzabsorption“ festgestellt und speziell der H-gebundenen Peptidgruppe zugeordnet werden konnte.

Dieser Deutung zufolge läßt der mitgeteilte Spektraleffekt den Schluß zu, daß die Hitzedenaturierung unter Ausbildung zwischenmolekularer interpeptidischer Wasserstoffbrücken zu einer Aggregation der Teilchen führt. Dieser lediglich aus dem UV-Spektrum abzuleitende Schluß entspricht durchaus den heutigen, mit völlig anderen Untersuchungsmethoden gewonnenen Vorstellungen über die Hitzedenaturierung korpuskularer Eiweißstoffe.

In einer Reihe vorangegangener Untersuchungen<sup>1</sup> hat der eine von uns über das Auftreten einer bisher nicht beachteten, rein konsumptiven

<sup>1</sup> E. Schauenstein, Mh. Chem. 80, 820, 843 (1949). — E. Schauenstein und O. Kratky, Z. Naturforsch. 5 b, 281 (1950). — E. Schauenstein, Melliand Textilber. 33, 591 (1952). — O. Kratky und E. Schauenstein in Physik der Hochpolymeren, Bd. III, S. 179, herausgegeben von H. A. Stuart. Springer-Verlag. 1955.

Absorptionskomponente im UV-Spektrum von Proteinen bei zirka 2500, 3000 und 4000  $\text{mm}^{-1}$  berichtet, die sich der reinen Aminosäureabsorption (meist Tyrosin und Tryptophan) additiv überlagert und nach allen bisherigen Befunden speziell den H-gebundenen Peptidgruppen zuzuordnen ist.

Hierbei scheint eine gewisse Mindestgröße der peptidischen H-Brückensysteme eine wesentliche Voraussetzung für das Auftreten des ultravioletten Spektraleffektes zu sein, worauf auch *Wirtz*<sup>2</sup> auf Grund von theoretischen Überlegungen hingewiesen hat.

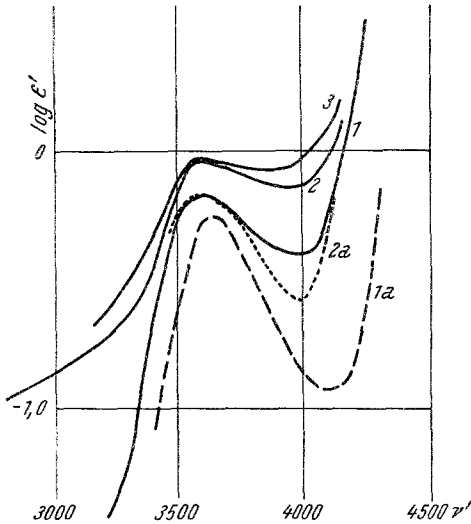


Abb. 1. Kurve 1: Rindenserumalbumin, 0,05% in 0,1% NaCl, nativ. Kurve 1a: Reine Tyrosin-Tryptophanabsorption des Serumalbumins. Kurve 2: Lösung, wie unter 1 beschrieben, im Wasserbad bei 78° 30 Min. denaturiert, bei Zimmertemp. aufgenommen. Kurve 2a: Zwischenstadium. Kurve 3: Lösung, wie unter 1 beschrieben, in Heizküvette bei zirka 100° aufgenommen.

Die experimentelle Feststellung der Zusatzabsorption und ihre Interpretation führen unter anderem zu der Erwartung, daß diese Absorption durch alle äußeren, chemischen oder mechanischen Eingriffe, die eine Änderung der interpeptidischen Wasserstoffbrücken bewirken, entsprechend beeinflusst werden müsse. Diese Erwartung konnte bereits bei der hydrolytischen Spaltung<sup>1,3</sup>, Hitzeschrumpfung<sup>4</sup>, Polymerisation<sup>5,6</sup> und mechanischen Deformation<sup>6-8</sup> einer Anzahl von Proteinen experimentell eindeutig bestätigt werden.

Im Rahmen der hiermit unmissenen Problemstellung erschien uns auch die Hitzedenaturierung korpuskularer Eiweißkörper von besonderem Interesse, bei der es nach der heute allgemein vertretenen Ansicht zu einer Assoziation der Partikel kommt<sup>9</sup> und sich die chemischen,

<sup>2</sup> K. Wirtz, Z. Elektrochem. 54, 47 (1950).

<sup>3</sup> E. Schauenstein und D. Stanke, Makromolek. Chem. 8, 7 (1951).

<sup>4</sup> E. Schauenstein und D. Stanke, ibid. 5, 262 (1951).

<sup>5</sup> O. Kratky und E. Schauenstein, Faraday Soc. Discuss. 1951, Nr. 11.

<sup>6</sup> P. Czokan und K. Laki, Z. physik. Chem., Abt. A 190, 278 (1942). — E. Schauenstein und M. Hochenegger, Z. Naturforsch. 8 b, 473 (1953).

<sup>7</sup> O. Kratky, E. Schauenstein und E. Treiber, Mh. Chem. 78, 174 (1947). — E. Schauenstein und J. Fial, ibid. 81, 1129 (1950). — E. Schauenstein, J. Fial und O. Kratky, ibid. 80, 144 (1949).

<sup>8</sup> O. Kratky und E. Schauenstein, Z. Elektrochem. 55, 626 (1951).

<sup>9</sup> M. Levy und R. Warner, J. Physic. Chem. 58, 106 (1954).

physikalischen und biologischen Proteineigenschaften in charakteristischer Weise ändern.

Die verhältnismäßig leicht — etwa durch pH-Verschiebungen — erzielbare Reversibilität der Hitzedenaturierung<sup>10</sup> läßt vermuten, daß hierbei, etwa wie bei der Fibrinbildung aus dem Fibrinogen, Nebenvalenzbindungen die entscheidende Rolle übernehmen.

Es leuchtet ein, daß die Peptid-Zusatzabsorption nun ein neues Kriterium dafür bietet, ob sich bei der Hitzedenaturierung auch die interpeptidischen Wasserstoffbrücken betätigen.

Wir verwendeten für unsere Aufnahmen Reinstpräparate von menschlichem  $\gamma$ -Globulin und Rinderserumalbumin der *Behring-Werke/Marburg*.

Die Abb. 1 und 3 bringen in den Kurven 1 die in wäßr.

Lösung aufgenommenen Spektren der beiden Proteine. Das pH betrug beim  $\gamma$ -Globulin 5,74, beim Albumin 6,15.

Zum Vergleich sind in den Abb. 1 und 3 auch die reinen Aminosäureabsorptionen (hier lediglich Tyrosin und Tryptophan als einzige, praktisch ins Gewicht fallende Chromophore) eingezeichnet, wobei die chemisch ermittelten Prozentgehalte als Grundlage für die Berechnung der Extinktionshöhe dienten.

Man erkennt, daß im Spektrum beider Proteine bereits im nativen Zustand eine deutliche Zusatzabsorption vorhanden ist, die beim Albumin wesentlich stärker ist als beim Globulin. Dies läßt auf bisher nicht bekannte Unterschiede im Vernetzungszustand durch interpeptidische H-Brücken in den beiden Proteinen schließen. Interessanterweise wurden kürzlich von *Lenormant* und *Blout*<sup>11</sup> Unterschiede in der UR-Absorption der CO—NH-Gruppen von Serumalbumin und  $\gamma$ -Globulin mitgeteilt.

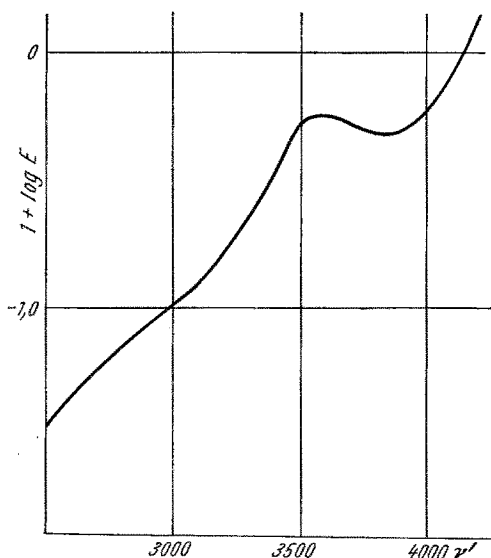


Abb. 2. Film aus Rinderserumalbumin, trocken hitzedenaturiert.

<sup>10</sup> *A. Kertész*, Bull. soc. chim. biol. **35**, 623 (1953). — *K. Strachitzkeij*, *K. Firfarowa* und *A. Gurvich*, Chem. Abstr. **48**, 761 (1954).

<sup>11</sup> *H. Lenormant* und *E. Blout*, Bull. soc. chim. France **1954**, 859.

0,05 bis 0,2%ige Lösungen der beiden Eiweißkörper wurden nun, teils im Wasserbad, teils in einer elektrisch geheizten Quarzküvette erhitzt. Dabei zeigte es sich, daß 0,05%ige Lösungen bis zu Temperaturen von etwa 85 bis 90° völlig klar blieben. Bei weiterer Temperaturerhöhung tritt zunehmende Opaleszenz auf, die bei längerem Stehen auch zur Flockung führt.

Die konzentrierteren Lösungen verhalten sich grundsätzlich analog, nur setzt die Opaleszenz bereits bei etwa 72 bis 75° ein.

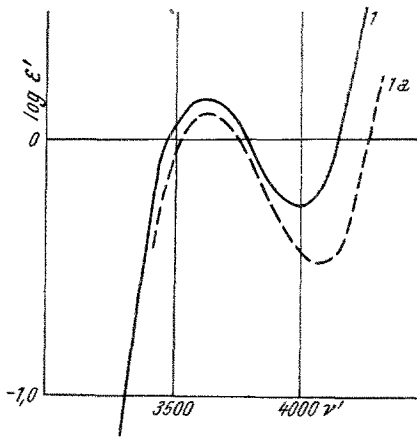


Abb. 3. Kurve 1:  $\gamma$ -Globulin, 0,05% in 0,9% NaCl, nativ. Kurve 1a: Reine Tyrosin-Tryptophanabsorption des  $\gamma$ -Globulins.

Wir spektrographierten sowohl die erhitzten, jedoch noch optisch klaren, als auch die opaleszierenden Lösungen der beiden Proteine. Dabei zeigte sich überraschenderweise, daß bereits in den noch klaren Lösungen ein starker Absorptionseffekt festzustellen ist, wie ihn beispielsweise die Abb. 1 in den Kurven 2 und 3 zeigt. Eine Kontrolle dieser Spektren mit Hilfe der sogenannten Extrapolationsmethode<sup>12</sup> ergab in der Tat noch keine Anhaltspunkte für eine meßbare Beeinflussung durch Tyndall-Absorption. Daher sind die Spektren der Abb. 1 bis 4 als praktisch reine Konsumptiv-Absorptionen zu diskutieren.

Man entnimmt den Kurven 2 und 3 der Abb. 1, daß sich bei der Hitzedenaturierung des Serumalbumins eine neue, zusätzliche Absorptionskomponente der Nativabsorption überlagert: Außer den mehr diffusen Banden im Gebiet von 2500 und 3300  $\text{mm}^{-1}$  fällt besonders die Absorptionzunahme bei 4000  $\nu'$  auf, die das Minimum der Aminosäureabsorption stark verflacht. Es besteht kein Zweifel, daß es sich hier um die eingangs beschriebene Peptid-Zusatzbanden handelt.

Es konnte ferner beobachtet werden, daß im Zuge der Hitzedenaturierung auch Stadien durchlaufen werden, in denen die Proteinabsorption im Bereich 4000  $\nu'$  mehr oder minder stark unter den im nativen Zustand gemessenen Wert absinkt, wie Kurve 2a der Abb. 1 veranschaulicht.

Diese Erniedrigungseffekte liegen teils knapp an der Meßfehlergrenze,

<sup>12</sup> E. Treiber und E. Schauenstein, Z. Naturforsch. 4 b, 252 (1949). — E. Treiber, Kolloid-Z. 130, 39 (1953). — E. Schauenstein und H. Bayzer, J. Polymer Sci. 16, 45 (1955).

können aber auch bis zu 0,6 in  $\log \epsilon'$  betragen; die Reproduzierbarkeit ist derzeit noch unbefriedigend.

Die Spektren der opaleszierenden Lösungen zeigen erwartungsgemäß eine bereits deutlich meßbare *Tyndall*-Streuabsorption. Nach Anbringung der auf dem extrapolativen Wege ermittelten Korrektur erhält man aber Spektren, die mit denen der erhitzten, aber noch *Tyndall*-freien Lösungen übereinstimmen.

Das UV-Spektrum läßt somit erkennen, daß die bei der Hitze- einwirkung auf Eiweißkörper einsetzenden Umwandlungsprozesse den äußerlich erkennbaren Kriterien der Hitzedenaturierung zeitlich beträchtlich vorausgehen.

Läßt man die Proteinlösungen auf Quarzplättchen an der Luft eindunsten, so erhält man glasklare, spröde, leicht wasserlösliche Filme, deren Spektrum mit dem der nativen wäßrigen Lösung der Proteine vollkommen identisch ist.

Setzt man die Filme jedoch im Trockenschrank Temperaturen von zirka

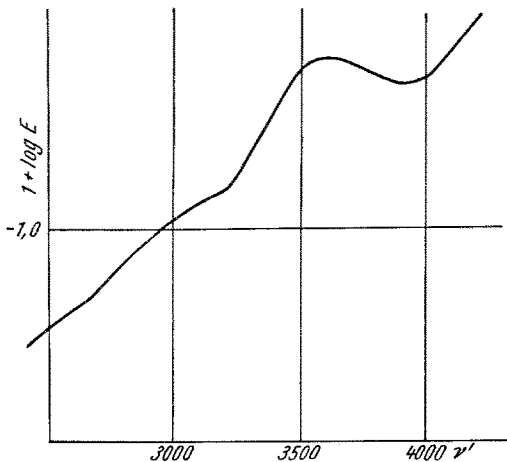


Abb. 4. Film aus  $\gamma$ -Globulin, trocken, hitzedenaturiert.

200° C aus, so bleiben sie zwar noch ebenso klar, werden aber wasserunlöslich und lassen sich auch im gequollenen Zustand mechanisch deformieren, wobei Doppelbrechung auftritt. Die UV-Spektren solcher Filme (Abb. 2 und 4) zeigen in allen Fällen, ebenso wie die Spektren der hitzedenaturierten Lösungen, die starke Zunahme der Peptidzusatzabsorption.

Folgen wir der bisherigen Deutung dieser Zusatzabsorption, so kommen wir zu dem Ergebnis, daß bei der durch die Hitzedenaturierung bewirkten Assoziation der Teilchen interpeptidische Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Dabei entstehen zweifellos viel ausgedehntere Systeme von CO—NH-Gruppen, deren  $\pi$ -Elektronen durch die H-Brücke miteinander in Kopplung stehen und damit die Voraussetzung für die Zunahme der Zusatzabsorption schaffen.

Das bisher nur unregelmäßig festgestellte, primäre Absinken der Zusatzabsorption läßt eine der Assoziation vorangehende Sprengung von H-Brücken (Entfaltung?) annehmen, wie sie schon von *Seelich* und

*Holzlöchner*<sup>13</sup> aus Volumsmessungen gefolgert wurde. Die schlechte Reproduzierbarkeit deutet darauf hin, daß dieses Vorstadium der Aggregation ein außerordentlich instabiles sein muß, das von zahlreichen, derzeit noch nicht näher bekannten Faktoren abhängt.

Im Zusammenhang mit den hier mitgeteilten ultravioletten Spektraleffekten bei der Hitzedenaturierung erscheinen die bereits erwähnten Untersuchungen von *Lenormant* und *Blout*<sup>11</sup> wiederum erwähnenswert, bei denen sich eine typische Veränderung der ultraroten CO—NH-Banden von  $\gamma$ -Globulin und Serumalbumin bei der Hitzedenaturierung ergaben.

Schließlich soll noch darauf hingewiesen werden, daß bei der Polymerisation des Fibrinogens zum Fibrin der praktisch analoge ultraviolette Spektraleffekt auftritt<sup>5</sup>. Hitzedenaturierung und Fibrinbildung müssen also ein gemeinsames Prinzip aufweisen, das sich spektral eindeutig zu erkennen gibt und nach dem oben Gesagten in der Ausbildung ausgedehnter interpeptidischer H-Brücken-Resonanzsysteme bestehen dürfte.

Weitere Untersuchungen über die hier nur kurz mitgeteilten Spektraleffekte sind im Gange, insbesondere auch gemeinsame Messungen mit *E. Bickert* (Max-Planck-Institut für Biochemie, Tübingen, Vorstand: Prof. Dr. *A. Butenandt*), bei denen erstmals versucht werden soll, die ultravioletten und ultraroten Spektralbefunde miteinander zu koordinieren.

Hierüber wird zu gegebener Zeit ausführlich berichtet werden.

Wir sind Herrn Prof. Dr. *O. Kratky* für die Förderung und Unterstützung unserer Untersuchungen, der *Rockefeller Foundation* für die Bereitstellung von Meßapparaten zu Dank verpflichtet.

---

<sup>13</sup> *A. Holzlöchner* und *F. Seelich*, *Klin. Wschr.* **2**, 1169 (1938).