

## Röntgenkleinwinkeluntersuchungen an Lösungen von Schweineserum-Albumin bei verschiedenen pH-Werten\*

Von

**P. Laggner und O. Kratky**

Institut für physikalische Chemie der Universität Graz

und

**W. H. Palm und A. Holasek**

Institut für physiologische Chemie der Universität Graz

Mit 10 Abbildungen

(Eingegangen am 22. April 1971)

### *X-Ray Small-Angle Scattering Investigations on Solutions of Porcine Serum Albumin at Different pH-Values*

Highly purified samples of porcine serum albumin were measured by the X-ray small-angle scattering method at pH 7.0, 5.1, and 3.7. The molecular weight is found to be the same in all three cases: the mean value is  $70\,300 \pm 2\,500$ . The radius of gyration is 31.1 Å and 33.0 Å at pH 5.1 and 7.0 resp., whereas at pH 3.7 a value of 37.8 Å is found. The determination of the molecular conformation yields a similar axial ratio at pH 5.1 and pH 7.0 of 0.75 : 1 : 2; at pH 3.7 we find an axial ratio of 0.2 : 1 : 1 to be consistent with the scattering curves.

Schweineserum-Albumin wurde nach sorgfältiger Reinigung bei den pH-Werten 7,0, 5,1 und 3,7 mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht. Es wurde bei allen Messungen praktisch dasselbe Molekulargewicht gefunden: der Mittelwert liegt bei  $70\,300 \pm 2\,500$ . Die Ermittlung der Streumassenradien ergab bei pH 7,0 und pH 5,1 ähnliche Werte (33,0 Å bzw. 31,1 Å), bei pH 3,7 dagegen einen Wert von 37,8 Å. Die Formbestimmung ergab bei pH 7,0 und pH 5,1 identische Achsenverhältnisse (0,75 : 1 : 2), während bei pH 3,7 ein solches von 0,2 : 1 : 1 gefunden wurde.

### I. Einleitung

Serum-Albumin unterscheidet sich durch sein Verhalten im sauren pH-Bereich charakteristisch von allen anderen bekannten Serum-

\* Herrn Prof. Dr. H. Nowotny gewidmet.

proteinen. *Tanford*<sup>1</sup> wies erstmals darauf hin, daß eine strukturelle Veränderung des Moleküls bei pH-Werten unter 4,3 als Folge der bei diesen pH-Werten auftretenden hohen Ladungsdichte für die Titrationsanomalie verantwortlich sein könnte. Diese Vermutung wurde in der Folge durch Messungen der Viskosität, Lichtstreuung und optischen Drehung (*Yang* und *Foster*<sup>2</sup>) bestätigt. Die pH-abhängige Expansion des Albuminmoleküls ist jedoch, wie *Tanford*, *Buzzell*, *Rands* und *Swanson*<sup>3</sup> zeigen konnten, kein kontinuierlicher Vorgang. Danach bricht bei pH-Werten nahe 4,2 ein Teil der schwachen Nebervalenzen auf, worauf das Molekül eine ausgedehntere, an elektrostatischer freier Energie ärmere Form einnimmt. Die restlichen Nebervalenzbindungen sind schwach genug, um eine weitere, kontinuierliche Expansion bei noch größerer Acidität zu ermöglichen. Analoge Ergebnisse erbrachten elektrophoretische Untersuchungen von *Aoki* und *Foster*<sup>4</sup>, welche ebenfalls auf eine Isomerisierung des Moleküls um pH 4 schließen lassen. Alle bisherigen Untersuchungen ergaben, daß die pH-bedingte Strukturänderung vollkommen reversibel ist. Eine eingehende Darstellung des Verhaltens von Serum-Albumin bei niederen pH-Werten findet sich in einer Zusammenfassung bei *Foster*<sup>5</sup>.

Röntgenkleinwinkeluntersuchungen zur Strukturanalyse des Serum-Albumins wurden bisher von *Anderegg*, *Beeman*, *Shulman* und *Kaesberg*<sup>6</sup> und von *Luzzati*, *Witz* und *Nicolaieff*<sup>7</sup> unternommen. Während *Anderegg* et al. nur bei isoelektrischen Bedingungen arbeiteten (pH 4,65; 0,05M-NaCl), untersuchten *Luzzati* et al. Rinderserum-Albumin bei pH 5,3 und pH 3,6. In der vorliegenden Arbeit sind die Ergebnisse unserer Röntgenkleinwinkelmessungen an Schweineserum-Albumin bei den pH-Werten 7,0, 5,1 und 3,7 wiedergegeben. Ziel dieser Arbeit war es, Größe und Gestalt des Moleküls im „nativen“ Zustand (pH 7,0 und 5,1) zu bestimmen und eventuelle Formänderungen bei pH 3,7, wie sie von den genannten Autoren<sup>1-5, 7</sup> postuliert wurden, festzustellen.

## II. Isolierung und Reinigung von Schweineserum-Albumin

Um Verfälschungen der Meßergebnisse durch Verunreinigungen der Präparate an  $\alpha$ -Globulinen und Aggregaten, wie sie in käuflichen Prä-

<sup>1</sup> *C. Tanford*, Proc. Iowa Acad. Sci. **59**, 206 (1952).

<sup>2</sup> *J. T. Yang* und *J. F. Foster*, J. Amer. Chem. Soc. **76**, 1588 (1954).

<sup>3</sup> *C. Tanford*, *J. G. Buzzell*, *D. G. Rands* und *S. A. Swanson*, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 6421 (1955).

<sup>4</sup> *K. Aoki* und *J. F. Foster*, J. Amer. Chem. Soc. **79**, 3393 (1957).

<sup>5</sup> *J. F. Foster*, in: *F. W. Putnam*, The Plasma Proteins, Vol. I, Kapitel 6. New York-London: Academic Press. 1960.

<sup>6</sup> *J. W. Anderegg*, *W. W. Beeman*, *S. Shulman* und *P. Kaesberg*, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 2927 (1955).

<sup>7</sup> *V. Luzzati*, *J. Witz* und *A. Nicolaieff*, J. Mol. Biol. **3**, 379 (1961).

parationen meist vorliegen, zu vermeiden, wurde von uns der im Folgenden beschriebene Weg beschritten<sup>8</sup>:

Aus frischem Schweineserum wurden durch Halbsättigung an Ammonsulfat die Globuline zum Großteil ausgefällt und über Nacht bei 4° C in der Mutterlauge stehengelassen. Nach Abzentrifugieren des Niederschlages und Filtration der überstehenden Lösung durch ein mit Kieselgur belegtes Filter wurde diese durch Zutropfen einer an Ammonsulfat halbgesätt. 0,5M-Essigsäure auf pH 4,9 gebracht und 24 Stdn. stehengelassen. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und zweimal mit Waschlösung (Acetatpuffer pH 4,9, halbgesätt. mit Ammonsulfat) gewaschen. Dieser Niederschlag wurde in wenig 0,15M-CH<sub>3</sub>COONa-Lösung aufgelöst, dasselbe Volumen an gesätt. Ammonsulfatlösung zugegeben und mit 1M-Essigsäure auf pH 4,9 gebracht. Nach zwei- bis dreitäg. Stehen bei Zimmertemp. wurde der Niederschlag (Albumin) abzentrifugiert und in wenig *Tris*-HCl-Puffer pH 8,6 (0,2M) gelöst. Die so gewonnene Präparation zeigte in der Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese noch immer Verunreinigung durch  $\alpha$ -Globuline. Um diese zu beseitigen, wurde das Präparat durch präparative Zonenelektrophorese nach *Porath*<sup>9</sup> weiter gereinigt. Durch darauffolgende Gelchromatographie über Sephadex G-100 wurde eine optimale Reinheit und Einheitlichkeit der Präparation (Test durch Disc-Elektrophorese) erreicht.

Der Extinktionskoeffizient wurde durch Trockengewichtsbestimmung ermittelt:  $E_{280\text{ mm}}^{10\text{ mg/ml}} = 6,72$ , gemessen in 0,2M-*Tris*-HCl (pH 8,6) bei 22° C.

Die Untersuchung dieses Präparates in der Ultrazentrifuge ergab bei pH 7,0 einen Wert für  $s_{20,w}^0$  von 4,36. Dieser Wert stimmt gut mit den Ergebnissen von *Charlwood* und *Ens*<sup>10</sup> überein. Bei pH 5,1 fanden wir einen Wert von 4,40 S, während bei pH 3,7 ein  $s_{w,20}^0$ -Wert von 4,26 zu beobachten war. Alle Läufe wurden in einer Beckman-Ultrazentrifuge Modell E bei 60 000 U/Min. und 20,0° C unter Verwendung der Schlierenoptik aufgenommen.

Für die Messungen wurden die Lösungen des Präparates gegen die jeweiligen Lösungsmittel erschöpfend dialysiert: für pH 5,1 und pH 3,7 wurde 0,15M-NaCl mit 0,15M-HCl auf den gewünschten pH-Wert gestellt, bei pH 7,0 verwendeten wir einen KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (0,017M) als Lösungsmittel.

### III. Hinweise auf die Röntgenkleinwinkelmethodik

#### 1. Experimentelle Technik

Als Strahlungsquelle diente eine Röntgenröhre mit Kupferanode, die von einer beststabilisierten Röntgenanlage betrieben wurde. Die an der Breitseite des Fokus justierte Kamera war die a. a. O.<sup>11</sup> beschriebene praktisch blendenstreuungsfreie Type. Zur Registrierung wurde ein Proportionalzählrohr in Verbindung mit einem auf die CuK $\alpha$ -Linie (1,54 Å) eingestellten

<sup>8</sup> G. S. Adair und M. E. Robinson, *Biochem. J.* **24**, 993 (1930).

<sup>9</sup> J. Porath, in: C. A. Williams und M. W. Chase, *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Vol. II, S. 67—73. New York-London: Academic Press. 1968.

<sup>10</sup> P. A. Charlwood und A. Ens, *Canad. J. Chem.* **35**, 99 (1957).

<sup>11</sup> O. Kratky, *Z. Elektrochem. Ber. Bunsenges. phys. Chem.* **58**, 49 (1954); **62**, 66 (1958); O. Kratky und Z. Skala, *ibid.* **62**, 73 (1958).

Impulshöhendiskriminator verwendet. Um Temperatur- und Feuchtigkeitseinflüsse auf die Stabilität der elektronischen Meßeinrichtungen auszuschalten, wurde durch eine Klimaanlage eine konstante Raumtemp. von  $21 \pm 0,5^\circ\text{C}$  und eine relative Luftfeuchtigkeit von  $45 \pm 5\%$  aufrechterhalten. Die Eliminierung der von der  $\text{CuK}\beta$ -Linie hervorgerufenen Streuung, die vom Impulshöhendiskriminator nicht ausgeschieden wird, erfolgte rechnerisch nach einer von Zipper<sup>12</sup> in unserem Arbeitskreis entwickelten Methode.

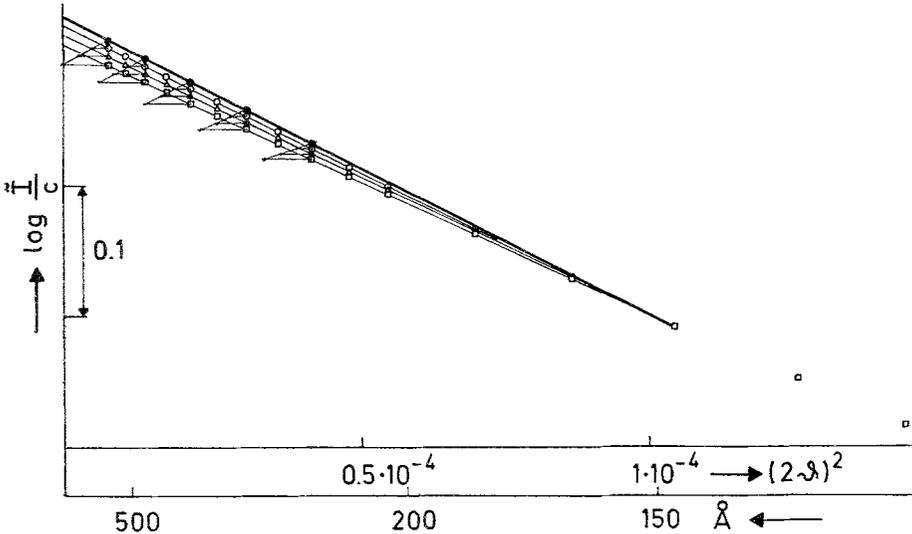


Abb. 1. Stark vergrößerte Darstellung des Innenteiles der verschmierten Guinierauftragung bei pH 5,1. Konzentration:  $\square$  = 1,45%,  $\Delta$  = 0,92%,  $\circ$  = 0,51%,  $\bullet$  = extrapoliert auf  $c = 0\%$

Ein elektronisch programmierbares, ebenfalls in unserem Laboratorium von Leopold entwickeltes Schrittschaltwerk<sup>13</sup> erlaubte einen vollautomatischen Ablauf der Messungen.

Um Veränderungen des Präparates durch Aggregation während der Messung zu vermeiden, wurden die Lösungen in einer Mark-Kapillare (0,82 mm Durchmesser) untersucht, die ihrerseits in einer temperierbaren Küvette<sup>14</sup> bei  $4^\circ\text{C}$  untergebracht war. In der Regel wurden für jede Streukurve 40–60 Meßpunkte aufgenommen und bei jedem dieser Punkte  $8 \cdot 10^4$  Impulse registriert, was einem statistischen Fehler von 0,35% entspricht.

Da bei Proteinlösungen auch schon bei relativ niedrigen Konzentrationen störende interpartikuläre Interferenzen auftreten, wurden von jedem Präparat Konzentrationsreihen im Bereich von 30 mg/ml bis 4 mg/ml aufgenommen und die auf Einheitskonzentration normierten Streukurven auf Konzentration Null extrapoliert (s. Abb. 1). Vor der Aufnahme dieser

<sup>12</sup> P. Zipper, Acta Phys. Austr. **30**, 143 (1969).

<sup>13</sup> H. Leopold, Z. Angew. Physik **25**, 81 (1968).

<sup>14</sup> H. Leopold, Elektronik **18**, 350 (1969).

Konzentrationsreihen wurde das Lösungsmittel in derselben Kapillare vermessen und dessen Streuung von jeder Präparatstreuurve subtrahiert.

Die zur Auswertung verwendeten theoretischen Beziehungen setzen einen Primärstrahl von punktförmigem Querschnitt voraus. Da die exper. Streukurven mit einem Primärstrahl von strichförmigem Querschnitt aufgenommen wurden, ist eine Umrechnung der Streukurven vorzunehmen, die wir als „Entschmierung“ bezeichnen<sup>15</sup>. Sie erfolgt nach einem von *Guinier* und *Fournet*<sup>16</sup> angegebenen rechnerischen Verfahren mit Hilfe eines in unserem Arbeitskreis von *Heine* und *Roppert*<sup>17</sup> entwickelten Rechenprogramms. Die Streuintensitäten der verschmierten (unkorrigierten) Kurven werden mit  $\tilde{I}$ , die der entschmierten mit  $I$  bezeichnet.

Die Absolutintensität, d. h. das Verhältnis der Streuintensität zur Primärintensität, welche man zur Bestimmung des Molekulargewichtes braucht, wurde durch Vergleich der Streuung des Präparates mit einem Lupolenblättchen bestimmt<sup>18</sup>, dessen absolute Streuintensität seinerseits mit Hilfe des „Rotatorverfahrens“<sup>19</sup> ermittelt worden war.

## 2. Auswertung

Zusammenfassende Darstellungen über die theoretischen Grundlagen der Kleinwinkelstreuung von Makromolekülen finden sich bei *Guinier* und *Fournet*<sup>20</sup>, *Beeman* u. a.<sup>21</sup>, *Kratky*<sup>22</sup> und *Alexander*<sup>23</sup>, vgl. ferner *Beeman*<sup>24</sup>. Hier soll eine kurze Zusammenstellung und Erläuterung der wichtigsten Beziehungen genügen:

a) *Molekulargewicht*. Das Molekulargewicht ergibt sich gemäß<sup>25</sup>

$$M = \frac{I_0/c}{P_0 \cdot F} \cdot \frac{\alpha^2 \cdot 10^3}{D \cdot (z_1 - \bar{v}_1 \rho_2)^2} \cdot \frac{1}{i_0 \cdot N} \quad (1)$$

<sup>15</sup> Zusammenfassende Darstellung aller mit dem Kollimationseinfluß zusammenhängenden Fragen: *O. Kratky, G. Porod* und *Z. Skala*, *Acta Phys. Austr.* **13**, 76 (1960).

<sup>16</sup> *A. Guinier* und *G. Fournet*, *J. Physique Radium* **8**, 345 (1947); *J. M. W. DuMond*, *Physic. Rev.* **72**, 83 (1947).

<sup>17</sup> *S. Heine* und *J. Roppert*, *Acta Phys. Austr.* **15**, 148 (1962); *S. Heine*, *ibid.* **16**, 144 (1963).

<sup>18</sup> *O. Kratky, I. Pilz* und *P. J. Schmitz*, *J. Coll. Interface Sci.* **21**, 24 (1966); *I. Pilz* und *O. Kratky*, *ibid.* **24**, 211 (1967); *I. Pilz*, *ibid.* **30**, 140 (1969).

<sup>19</sup> *O. Kratky*, *Makromol. Chem.* **35 A**, 12 (1960); *O. Kratky* und *H. Waura*, *Mh. Chem.* **94**, 981 (1963).

<sup>20</sup> *A. Guinier* und *G. Fournet*, *Small Angle Scattering of X-Rays*; New York: Wiley, 1955.

<sup>21</sup> *W. W. Beeman, P. Kaesberg, J. Anderegg* und *M. B. Webb*, in: *Handbuch der Physik*, Bd. XXXII (*S. Flüge*, ed.). Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer, 1957.

<sup>22</sup> *O. Kratky*, *Progress in Biophysics* **13**, 105 (1963).

<sup>23</sup> *L. E. Alexander*, *X-Ray Diffraction Methods in Polymer Science*, p. 280—353. New York-London-Sydney-Toronto: Wiley, 1969.

<sup>24</sup> *W. W. Beemann*, in: *H. Brumberger*, *Small Angle X-Ray Scattering*. New York-London-Paris: Gordon and Breach, 1967.

<sup>25</sup> *O. Kratky, G. Porod* und *L. Kahovec*, *Z. Elektrochem.* **55**, 53 (1951).

Hier bedeutet

- $c$  = Konzentration (g/cm<sup>3</sup>)  
 $I_0$  = Energie, die auf ein Stück des Primärstrahles von 1 cm Länge, gemessen in der Registrierebene, entfällt  
 $F$  = Fläche des Zählrohrspaltes (cm<sup>2</sup>)  
 $a$  = Abstand Präparat—Registrierebene (cm)  
 $D$  = Dicke des Präparates (cm)  
 $z_1$  = Zahl der Elektronenmol pro 1 g gelöster Substanz  
 $\bar{v}_1$  = Partielles spezifisches Volumen (cm<sup>3</sup>/g)  
 $\rho_2$  = Elektronendichte des Lösungsmittels  
 $i_0$  = Thomson-Konstante, d. i. die Streuintensität eines Elektrons  
 $N$  = Loschmidtsche Zahl.

Nach *Charlwood*<sup>26</sup> hat das partielle spezifische Volumen des Serum-Albumins bei allen drei pH-Werten den Wert 0,735 cm<sup>3</sup>/g.

b) *Volumen und Quellungsgrad*. Nach *Porod*<sup>27</sup> errechnet sich das Volumen der Teilchen bei homodisperser Lösung aus der „Invariante“

$$Q = \int_0^{\infty} I (2\theta)^2 \cdot d(2\theta) \quad (2)$$

$2\theta$  . . . Streuwinkel

und der Nullintensität,  $I_0$ , gemäß:

$$V = \frac{\lambda^3}{4\pi} \cdot \frac{I_0}{Q} = 0,290 \cdot \frac{I_0}{Q} \text{ \AA}^3 \quad (3)$$

$\lambda = 1,54 \text{ \AA}$  ist die Wellenlänge der CuK $\alpha$ -Linie.

Aus Molekulargewicht und Volumen finden wir den Quellungsgrad  $q$

$$q = \frac{N \cdot V}{\bar{v}_1 \cdot M \cdot 10^{24}} \quad (4)$$

Mit dem partiellen spezif. Volumen, der Dichte des Lösungsmittels  $d_2$  und dem Quellungsgrad  $q$  errechnet man die g Lösungsmittel /g Protein nach

$$g_{LM} / g_{\text{Protein}} = \bar{v}_1 \cdot d_2 \cdot (q - 1) \quad (5)$$

c) *Streumassenradius*. Mit abnehmendem Winkel nähern sich die Streukurven von Partikeln endlicher Größe mehr und mehr der Form einer *Gaußschen* Kurve. Trägt man daher  $\log I$  gegen  $(2\theta)^2$  auf (*Guinier-Auftragung*), so zeigen die Streukurven im Innenteil einen geradlinigen Verlauf, aus dessen Neigungstangente man den Streumassenradius der Teilchen nach

<sup>26</sup> P. Charlwood, J. Amer. Chem. Soc. **79**, 776 (1957).

<sup>27</sup> G. Porod, Kolloid-Z. **124**, 83 (1951).

$$R = \frac{\lambda}{2\pi} \cdot \sqrt{3 \cdot 2,3 \operatorname{tg} \alpha} \text{ \AA} \quad (6)$$

bestimmen kann. (Gleichzeitig erhält man durch Fortsetzung der Geraden zum Winkel Null die Größe von  $I_0$  zur Bestimmung des Molekulargewichtes und des Volumens.)

Bei stäbchenförmigen Teilchen, deren Querschnitt klein im Vergleich zur Länge ist, erhält man durch Auftragung von  $\log I \cdot 2 \theta$  gegen  $(2 \theta)^2$  in analoger Weise den Streumassenradius des Querschnittes  $R_Q$ <sup>28</sup>, nach

$$R_Q = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{2 \cdot 2,3 \operatorname{tg} \alpha} \text{ \AA} \quad (7)$$

und bei blättchenförmigen Partikeln durch Auftragung von  $\log I \cdot (2 \theta)^2$  gegen  $(2 \theta)^2$  den Streumassenradius der Dicke,  $R_D$ , nach

$$R_D = \frac{\lambda}{2\pi} \sqrt{2,3 \cdot \operatorname{tg} \alpha} \text{ \AA} \quad (8)$$

Die Beziehungen (7) und (8) gelten exakt nur bei Teilchen, die in einer bzw. zwei Dimensionen unendlich groß sind. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, so ergibt sich bei kleinen Winkeln ein Abfallen der Querschnitts- bzw. Dickenfaktoren, bedingt durch das Fehlen der extrem großen intrapartikulären Abstände. Bei einiger Erfahrung gelingt es jedoch, einen Querschnittsstreumassenradius bis zu einem minimalen Streckungsgrad des Teilchens von 1,5 ( $R/R_Q > 1,5$ ) in guter Näherung zu bestimmen. Für die Ermittlung eines Dickenfaktors muß ein Verhältnis von Breite zu Dicke bzw. von mittlerer zu kleiner Achse von mindestens 2 vorliegen<sup>29</sup>.

Aus  $R$ ,  $R_Q$  und  $R_D$  errechnen sich die Kantenlängen streuungsäquivalenter rechtwinkliger Prismen nach

$$l_R^2 = 12 \cdot (R^2 - R_Q^2) \quad (9)$$

$$b_R^2 = 12 \cdot (R_Q^2 - R_D^2) \quad (10)$$

$$d_R^2 = 12 \cdot R_D^2 \quad (11)$$

d) *Vergleich mit theoretischen Streukurven.* Hat man durch Auswertung der Streumassenradien gewisse Vorstellungen über die Achsenverhältnisse des Teilchens gewonnen, so kann man die experimentellen Streukurven mit den theoretischen Kurven für verschiedene geometrische Körper vergleichen. Diesen Vergleich führt man am zweckmäßigsten in

<sup>28</sup> O. Kratky und G. Porod, Acta Phys. Austr. **2** 133 (1948); G. Porod, ibid. **2**, 255 (1948).

<sup>29</sup> P. Mittelbach, Acta Phys. Austr. **19**, 53 (1964).

der doppeltlogarithmischen Auftragung,  $\log \phi$  gegen  $\log h \cdot R$ , durch.  $\phi$  bedeutet die auf  $I_0 = 1$  normierte Streuung und  $h$  das Argument der Streukurven  $h = 2 \pi \sin 2 \theta$ .

Unsere experimentellen Streukurven wurden in dieser Weise mit den für Ellipsoide, elliptische Zylinder und rechtwinkelige Prismen verschiedener Achsenverhältnisse berechneten Kurven verglichen.

Aus dem Achsenverhältnis und dem experimentellen Streumassenradius lassen sich die Abmessungen der vergleichbaren streuungsäquivalenten Körper mit Hilfe der folgenden Beziehungen ermitteln:

Ellipsoid mit den Halbachsen  $a$ ,  $b$  und  $c$ :

$$5 R^2 = a^2 + b^2 + c^2 \quad (12)$$

Rechtwinkl. Prisma mit den Kantenlängen  $A$ ,  $B$  und  $C$ :

$$12 R^2 = A^2 + B^2 + C^2 \quad (13)$$

Elliptischer Zylinder mit Halbachsen  $a$ ,  $b$  und der Höhe  $h$ :

$$4 R^2 = a^2 + b^2 + \frac{h^2}{3} \quad (14)$$

Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß die Annäherung an die Teilchenform durch die beschriebenen geometrischen Körper nicht exakt ist und die durch den Kurvenvergleich ermittelten Achsenverhältnisse wegen der relativ geringen Präzision der Kurvenaußenteile nicht mit ähnlich großer Genauigkeit wie z. B. der Streumassenradius bestimmbar sind.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

In Tab. 1 sind die Parameter zusammengestellt, welche mit Hilfe der in III beschriebenen Methoden erhalten wurden.

Tabelle 1. Molekülparameter von Schweineserum-Albumin bei verschiedenen pH-Werten

|                                 | pH 7,0 | pH 5,1 | pH 3,7 |
|---------------------------------|--------|--------|--------|
| $M \cdot 10^{-4}$               | 7,0    | 6,8    | 7,3    |
| $V \cdot 10^{-5} \text{ \AA}^3$ | 1,31   | 1,25   | 1,51   |
| g H <sub>2</sub> O/g Protein    | 0,40   | 0,37   | 0,50   |
| $R$ , \AA                       | 33,0   | 31,1   | 37,8   |
| $R_Q$ , \AA                     | 18,6   | 18,1   | —      |
| $R_D$ , \AA                     | —      | —      | 6,2    |
| $l_R$ , \AA                     | 94     | 88     | —      |
| $d_R$ , \AA                     | —      | —      | 21,5   |

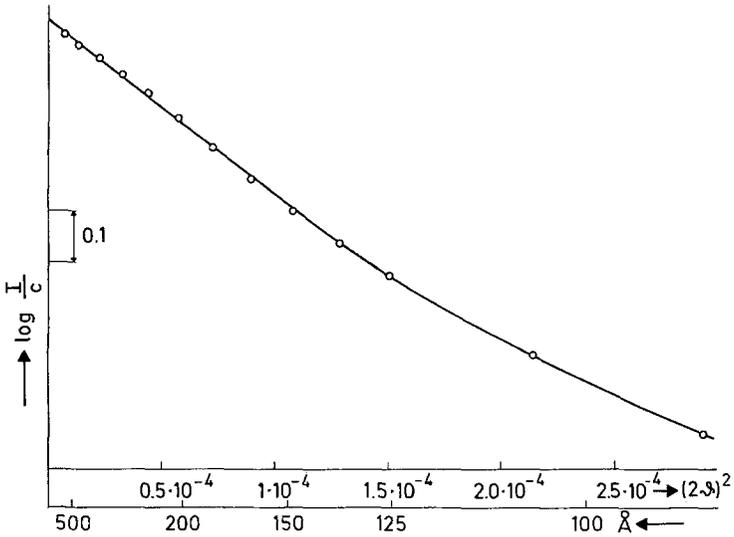


Abb. 2. Guinierauftragung der entschmierten Streukurve bei pH 3,7

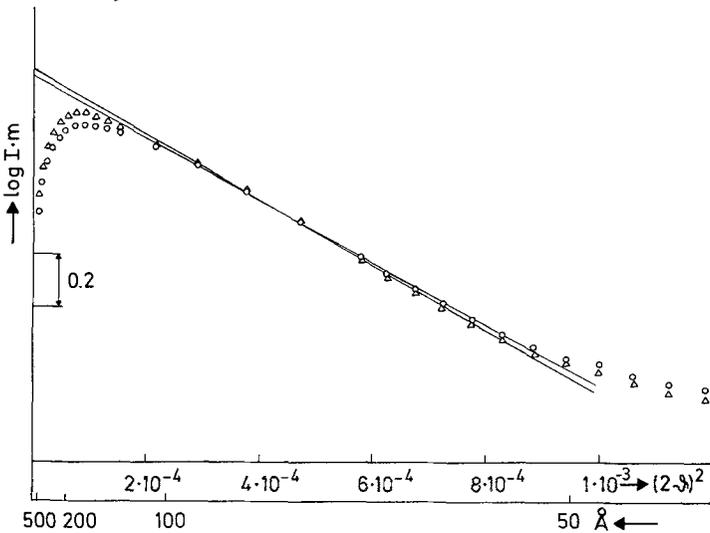


Abb. 3. Querschnittsauftragung bei pH 5,1 (○) und pH 7,0 (△)  
 $m = 21,2 \text{ tg } (2 \vartheta) \approx 21,2 \cdot 2 \vartheta$

Das Molekulargewicht liegt bei allen untersuchten pH-Werten nahe bei  $7 \cdot 10^4$ . Daraus geht hervor, daß eine Assoziation<sup>30</sup> oder Dissoziation<sup>31</sup>

<sup>30</sup> S. Bjornholm, E. Barbu und M. Macheboeuf, Bull. Soc. Chim. Biol. **32**, 924 (1950).

<sup>31</sup> G. Weber, Biochem. J. **51**, 155 (1952).

des Moleküls beim Übergang in den sauren Bereich ausgeschlossen werden kann. Das gefundene Molekulargewicht steht in guter Übereinstimmung mit den für Serum-Albumin anderer Species gefundenen Werten<sup>32</sup>.

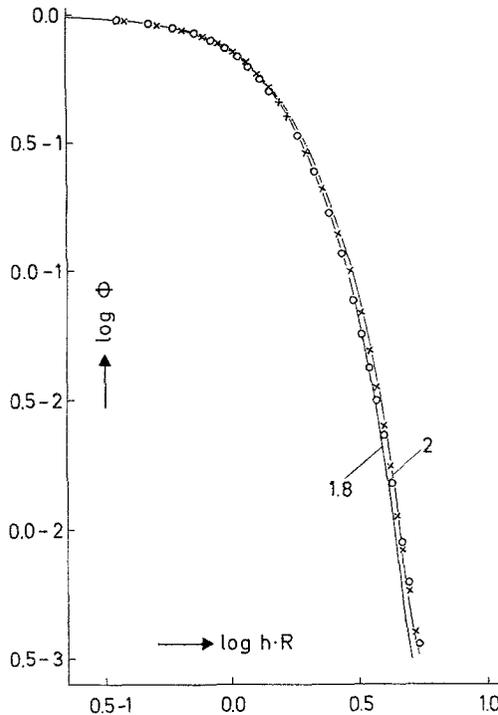


Abb. 4. Vergleich der exper. Streukurven bei pH 5,1 (○) und pH 7,0 (×) mit den theoret. Kurven für rechtwinklige Prismen mit den Kantenverhältnissen 0,75 : 1 : c

Der Vergleich der aus der Invarianten ermittelten Volumina der gelösten Teilchen mit den aus Molekulargewicht und partiellem spezifischen Volumen errechneten Volumen des ungequollenen Moleküls läßt eine erhebliche Zunahme der inneren Solvation bei pH 3,7 erkennen. Während beim Übergang von pH 5,1 auf pH 7,0, also über 1,9 pH-Einheiten, sich das Volumen nur um etwa 5% erhöht, steigt es bei einer pH-Änderung von 1,4 Einheiten zum sauren Bereich hin um 21%.

Der Streumassenradius von 31,3 Å bei pH 5,1 stimmt mit den von *Anderegg* u. a.<sup>6</sup> und *Luzzati* u. a.<sup>7</sup> gefundenen Werten von 29,8 bzw.

<sup>32</sup> R. A. Phelps und F. W. Putnam, in: F. W. Putnam, The Plasma Proteins, Vol. I, Kapitel 5. New York-London: Academic Press. 1960.

30,6 Å gut überein. Die kleinen Differenzen könnten durch Speciesunterschiede zu erklären sein, da *Anderegg* und *Luzzati* diese Werte an Rinderserum-Albumin beobachteten, wogegen *Anderegg* u. a. für monomeres humanes Mercaptalbumin einen Wert von 31,0 Å fand. Bei pH 7,0 zeigt sich eine leichte Zunahme des Streumassenradius parallel zur Ver-

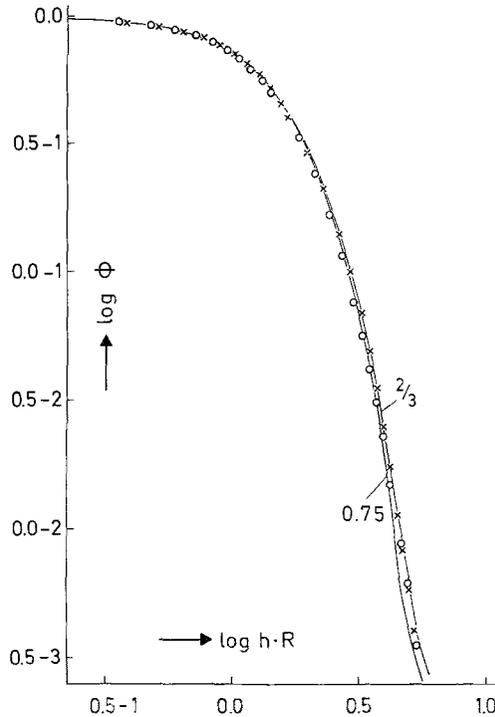


Abb. 5. Kurvenvergleich (○ = pH 5,1, × = pH 7,0) mit Ellipsoiden vom Achsenverhältnis  $a : 1 : 2$

größerung des Volumens. Die Erhöhung des Streumassenradius auf 37,8 Å bei pH 3,7 kann allerdings durch die Volumszunahme allein nicht mehr erklärt werden, da diese Änderung des Streumassenradius um 21% bei gleichbleibender Form einer Volumszunahme um den Faktor  $1,21^3 = 1,78$  entsprechen würde. Neben der beobachteten Volumszunahme kann eine Vergrößerung des Streumassenradius bei gleichbleibender Masse folgende Ursachen haben:

a) Änderung der radialen Elektronendichteverteilung (Kern—Hülle-Modell),

b) Veränderung der Teilchenform unter Zunahme der Anisotropie.

Der unter a) angeführte Fall könnte bei einem Proteinmolekül dann eintreten, wenn durch Veränderung des umgebenden Milieus an der Oberfläche des Teilchens Nebervalenzbindungen gelöst würden und

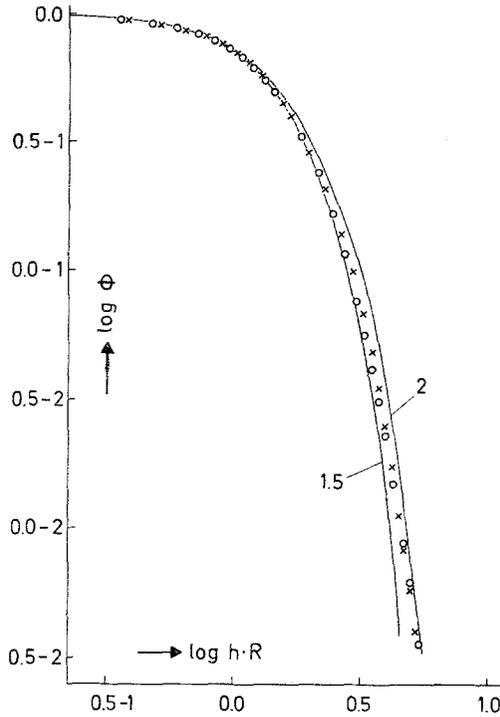


Abb. 6. Kurvenvergleich (○ = pH 5,1, × = pH 7,0) mit elliptischen Zylindern mit dem Verhältnis von kleiner Achse zu großer Achse zu Höhe von 0,75 : 1 :  $v$

Tabelle 2. Abmessungen der streuungsäquivalenten elliptischen Zylinder bei pH 7,0 und 5,1 ( $a$  und  $b$ : Halbachsen,  $h$ : Zylinderhöhe)

|        | $a$ , Å | $b$ , Å | $h$ , Å |
|--------|---------|---------|---------|
| pH 7,0 | 18      | 25      | 99      |
| pH 5,1 | 18      | 24      | 95      |

dadurch die in diesem Bereich liegenden Ketten eine weniger dichte Packung einnehmen. Das Molekül würde dann aus einem Kern „normaler“ Elektronendichte, umgeben von einer Hülle geringerer Dichte bestehen. Die *Guinier*-Auftragung der Streukurve müßte in diesem Fall im Innenteil einen nichtlinearen Verlauf zeigen, da sich hier die Streu-

amplituden von Kern und Hülle überlagern würden. Ein solches Verhalten wurde von *Luzzati*<sup>7</sup> an Rinderserum-Albumin bei pH 3,6 beobachtet und im obigen Sinne gedeutet.

Wie Abb. 2 zeigt, weist die *Guinierauftragung* nach unseren Messungen im Gegensatz zu den Angaben von *Luzzati* u. a.<sup>7</sup> einen normalen,

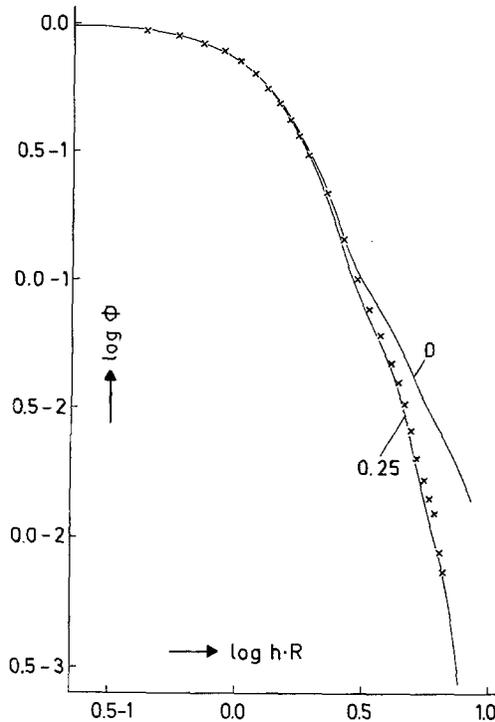


Abb. 7. Vergleich der exper. Streukurve bei pH 3,7 (x) mit den theoret. Kurven für rechtwinklige Prismen vom Kantenverhältnis  $A : 1 : 1$

linearen Verlauf auf. Daraus schließen wir, daß die Vergrößerung des Streumassenradius auf eine Formänderung des gesamten Teilchens zurückzuführen ist.

Die Formanalyse stützt sich auf die Auswertung der Querschnitts- und Dickenstreumassenradien sowie auf den Kurvenvergleich:

Bei pH 5,1 und pH 7,0 kann man aus dem Vorhandensein eines Querschnittsbereiches (Abb. 3) und dem Fehlen eines Dickenbereiches schließen, daß eine gestreckte Form mit nicht sehr anisotropen Querschnitt vorliegt. Der in den Abb. 4, 5 und 6 gezeigte Kurvenvergleich ergibt für beide pH-Werte eine Übereinstimmung mit dreiachsigen Körpern mit einem Achsenverhältnis von etwa 0,75 : 1 : 2. Berechnet

man aus diesem Achsenverhältnis und den Streumassenradien nach den Beziehungen (12), (13) und (14) die Dimensionen dieser Körper und vergleicht die sich daraus ergebenden Volumina mit den aus der Invariante gefundenen Werten, so ergibt sich für elliptische Zylinder die beste Über-

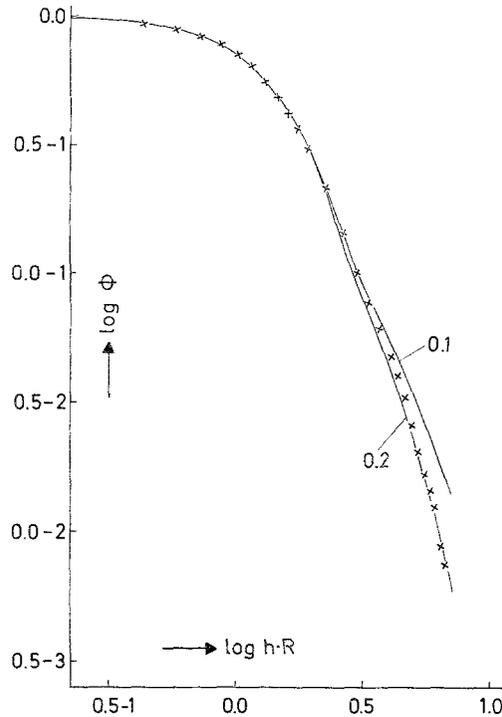


Abb. 8. Kurvenvergleich ( $\times = \text{pH } 3,7$ ) mit Ellipsoiden vom Achsenverhältnis  $a : 1 : 1$

einstimmung. Die Dimensionen dieser Zylinder sind im Tab. 2 zusammengestellt.

Die Streukurve bei pH 3,7 unterscheidet sich stark von den beiden anderen Streukurven. Schon die Anwesenheit eines Dickenfaktors und das Fehlen eines Querschnittsbereiches (s. Tab. 1) deuten darauf hin, daß es sich hier um ein blättchenförmiges Teilchen mit annähernd gleichen Dimensionen der großen Achsen handelt. Der Vergleich mit den theoretischen Streukurven (Abb. 7, 8 und 9) erhärtet diese Annahme und zeigt, daß hier Blättchen mit einem Achsenverhältnis von etwa 0,2 : 1 : 1 vorliegen.

Diese Formänderung läßt sich leicht dadurch erklären, daß das Molekül aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt ist, die sich bei

pH-Werten um pH 4 in einer Weise umlagern — man könnte sagen, aufklappen —, wie dies in Abb. 10 schematisch dargestellt ist. Die beste Annäherung an die experimentell ermittelten Daten — Streumassenradien, Volumina und Kurvenform — ergibt sich auch hier durch die

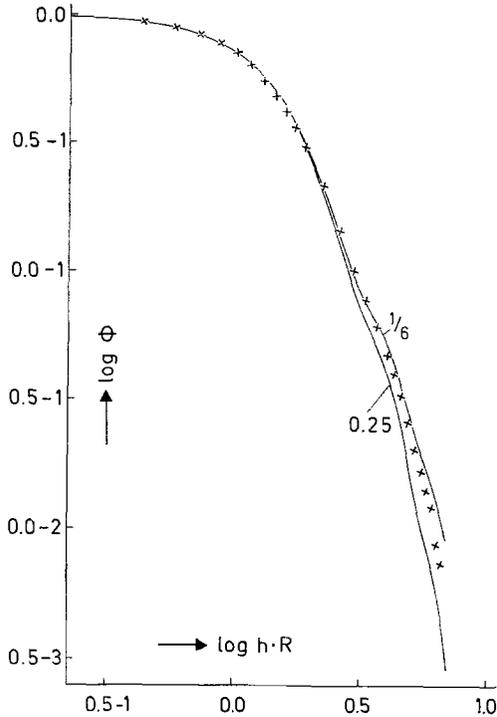


Abb. 9. Kurvenvergleich ( $\times = \text{pH } 3,7$ ) mit Kreiszyindern mit dem Verhältnis von Durchmesser zu Höhe von  $1 : v$

Annahme elliptischer Zylinder. Die entsprechenden Dimensionen sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß ein teilweises Aufquellen der äußeren Bereiche des Moleküls, wie es von *Luzzati*<sup>7</sup> an Rinderserum-Albumin gefunden wurde, nach unseren Messungen ausgeschlossen werden kann. Die Frage, ob es sich hierbei um Speciesunterschiede handelt, und ob bei den Untersuchungen von *Luzzati* die durch die Entfettung des Präparates bedingte Aggregation einen Einfluß auf die Ergebnisse hatte, wäre nur durch eine parallele Messung an beiden Präparaten zu klären. Angesichts der Übereinstimmung der Molekulargewichte verschiedener Species und der weitgehenden Ähnlichkeit des physikochemischen und biochemischen Verhaltens<sup>32</sup> scheinen uns so

weitgehende Unterschiede zumindest unwahrscheinlich. Es ist schwer zu verstehen, daß sich die strukturverändernde Wirkung der  $H^+$ -Ionen nur auf den Außenteil des aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebauten Moleküls<sup>33</sup> beschränken sollte, da ja gerade diese Lockerung äußerer Bereiche einem weiteren Zugriff der Protonen entgegenkommen würde.

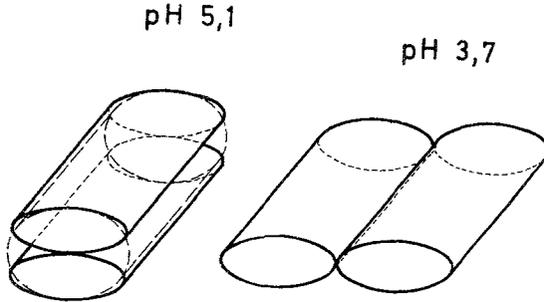


Abb. 10. Schematische Darstellung der Isomerisierung des Schweineserum-Albumins

Tabelle 3. Abmessungen der Untereinheiten bei pH 5,1 und 3,7

|        | <i>a</i> , Å | <i>b</i> , Å | <i>h</i> , Å |
|--------|--------------|--------------|--------------|
| pH 5,1 | 9            | 23           | 95           |
| pH 3,7 | 10,5         | 23           | 97           |

Unsere Ergebnisse stimmen teilweise mit der von *Aoki* und *Foster*<sup>4</sup> auf Grund elektrophoretischer Untersuchungen aufgestellten Theorie der „*N*—*F*-Isomerisierung“ des Serum-Albumins überein. Allerdings wird von diesen Autoren eine aus vier Untereinheiten zusammengesetzte Struktur gefordert. Diese Möglichkeit ist nach unseren Messungen nicht auszuschließen, da eine paarweise Zusammenlagerung zu einer unserem Modell entsprechenden Struktur führen könnte.

Dem Österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung sagen wir für vielfache Unterstützung den verbindlichsten Dank.

<sup>33</sup> *C. B. Anfinsen* und *R. R. Redfield*, Adv. in Protein Chem. **11**, 1 (1956).