

# Röntgenkleinwinkel- und Sedimentationsstudien am $\alpha$ -Hämocyanin *Helix pomatia* (halbe Moleküle) in Glycerin- und Saccharoselösungen

Small-Angle X-Ray and Sedimentation Studies on  $\alpha$ -Haemocyanin *H. pomatia*  
(Halve Molecules) in Glycerol and Sucrose Solutions

Johann Berger und Ingrid Pilz

Institut für Physikalische Chemie der Universität Graz

Raf Witters und René Lontie

Laboratorium voor Biochemie, Katholieke Universiteit Leuven

(Z. Naturforsch. 31 e, 238–244 [1976]; eingegangen am 9. Februar 1976)

Small-Angle X-Ray Scattering, Haemocyanin, Sedimentation, Multicomponent System

The  $\alpha$ -haemocyanin molecules of *Helix pomatia* were decomposed into halves and studied in solution by small-angle X-ray scattering. The following parameters of the molecule could be obtained: radius of gyration, volume, molecular weight, overall shape and dimensions of the molecule.

With small-angle X-ray scattering fluctuations of the electron density within the protein cause parasitic scattering at larger angles. According to Stuhrmann and Kirste it is possible to eliminate it mathematically by varying the electron density of the buffer. For this purpose different quantities of glycerol respectively saccharose were added to the solvent to study the scattering of  $\alpha$ -haemocyanin halves in solvents of varied electron density. The change of the isopotential specific volume of haemocyanin and the strong increase of the statistical errors of its scattering by decreasing of the excess scattering of solution over solvent per unit volume did not allow an application of the method of Stuhrmann and Kirste. The data obtained for  $\alpha$ -haemocyanin halves in different solvents are given.

Besides also the sedimentation of the  $\alpha$ -haemocyanin halves were studied in solutions containing varied amounts of glycerol and saccharose. An attempt was made to calculate the change of the partial specific volume of haemocyanin by adding glycerol or saccharose.

## Einleitung

Hämocyanine sind die blauen Blutfarbstoffe vieler Arthropoden und Mollusken. Zwei Cu-Atome übernehmen den Transport eines O<sub>2</sub>-Moleküls<sup>1–3</sup>. Die größten dieser an und für sich schon riesigen Moleküle (Molekulargewicht  $M = 5 \times 10^5 – 9 \times 10^6$ ) sind bei den Gastropoden zu finden. In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen am Hämocyanin der Weinbergschnecke *Helix pomatia* berichtet.

Das Blut der *H. pomatia* enthält zwei verschiedene Arten von Hämocyanin, die nach Brohult und Borgman<sup>4</sup> unterschieden werden: die  $\alpha$ -Komponente, mit 75% die dominierende, zerfällt in 1 M NaCl bei einem pH von 5,7, in Halbe, die  $\beta$ -Komponente nicht. 360 Cu-Atome sind fähig 180 O<sub>2</sub>-Moleküle zu binden. Da das  $M$  ungefähr  $9 \times 10^6$  beträgt, hat die kleinste funktionelle Einheit ein  $M$  von 50000.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. I. Pilz, Institut für Physikalische Chemie der Universität Graz, Heinrichstraße 28, A-8010 Graz oder Prof. Dr. R. Lontie, Laboratorium voor Biochemie, Katholieke Universiteit Leuven, Dekenstraat 6, B-3000 Leuven.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen<sup>5–7</sup> zeigen ein zylindrisches Molekül aus sechs morphologischen Untereinheiten. Die Höhe beträgt 34–38 nm, der Durchmesser 26–30 nm. Das ganze Molekül zerfällt quer zur Längsachse in zwei identische Moleküle<sup>5</sup>. Diese Bilder wurden durch Röntgenkleinwinkeluntersuchungen<sup>8–10</sup> bestätigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Theorie von Stuhrmann und Kirste<sup>11</sup>, die eine exaktere Auswertung der Meßdaten ermöglicht, praktisch anzuwenden.

Die Partikelstreukurve von Proteinmolekülen fällt bei größeren Streuwinkeln nicht auf Null ab, sondern auf einen über einen größeren Winkelbereich konstanten Restwert. Der Grund hierfür sind die Schwankungen der Elektronendichte im Inneren des Proteinmoleküls. Stuhrmann und Kirste fanden, daß die von diesen Schwankungen herrührende zusätzliche Streuintensität durch mindestens drei Messungen in Lösungen von unterschiedlicher Elektronendichte eliminiert werden kann.

Für diese Messungen wurde das halbe Molekül des  $\alpha$ -Hämocyanins der *H. pomatia* gewählt. Das



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Streuverhalten dieses Proteins wurde in Lösungen unterschiedlicher Elektronendichte, hergestellt durch Zugabe von Glycerin und Saccharose, untersucht.

### Material

Das  $\alpha$ -Hämocyanin der *H. pomatia* wurde nach Heirwegh et al.<sup>12</sup> präpariert und mit einer präparativen Ultrazentrifuge konzentriert. Eine Reinheitsprüfung der Lösung ergab einen Anteil von  $\beta$ -Hämocyanin von 2–3%. Diese Lösung, die eine Hämocyaninkonzentration von 80 mg/ml aufwies, wurde im Grazer Institut in einem für die Röntgenkleinwinkelmessungen geeigneten Puffer 24 Stunden dialysiert.

Als Ausgangspuffer wurde ein 0,01 M Phosphatpuffer mit 1 M LiCl und einem pH-Wert von 6,19 bei 4 °C gewählt. Durch stufenweise Zugabe von Glycerin und Saccharose wurde die Elektronendichte  $\varrho$  von 0,565 auf 0,655 erhöht. Eine exakte Auswertung der Daten war allerdings nur bis zu einer Elektronendichte von  $\varrho = 0,617$  möglich; bei noch höherer Elektronendichte des Lösungsmittels war die Elektronendifferenz zwischen Makromolekül und Lösungsmittel zu gering um exakte Meßdaten zu erhalten.

Dem Ausgangspuffer wurden folgende Mengen an Glycerin bzw. Saccharose beigegeben: 1. 58,1 Gewichtsprozente Glycerin; 2. 35,2 Gewichtsprozente Glycerin; 3. 26,5 Gewichtsprozente Glycerin; 4. 19,3 Gewichtsprozente Saccharose; 5. 30,6 Gewichtsprozente Saccharose; 6. 40,0 Gewichtsprozente Saccharose.

Da eine Dialyse in Glycerin- bzw. Saccharolösungen nicht möglich ist<sup>13</sup>, wurden die Zusätze zur Lösung und zum Puffer eingewogen. Die Konzentration an Hämocyanin wurde bei 278 nm ( $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 14,16$ ) in 0,1 M Na-Tetraborat, pH = 9,2, bestimmt<sup>12</sup>.

### Methodik

Die RKW-Messungen wurden mit einer Philips PW 1140-Anlage (50 kV, 30 mA) mit Kupfer-K-Strahlung durchgeführt. Als Kleinwinkelkamera wurde die im Grazer Institut entwickelte Type<sup>14</sup> verwendet; ein elektronisches Schrittschaltwerk<sup>15</sup> ermöglichte einen kontinuierlichen Tag- und Nachtbetrieb. Die Lösungen wurden in Markkapillaren von 0,1 cm Durchmesser bei 4 °C untersucht. Die Registrierung der gestreuten Kupferstrahlung erfolgte mit einem Proportionalzählrohr; ein Impulsährendiskriminator, auf Cu-K $\alpha$  eingestellt, eliminierte die Bremsstrahlung.

Die erhaltenen Werte wurden durch verschiedene EDV-Programme an einer Univac 494 weiterver-

arbeitet. Durch das Programm Fylax<sup>16</sup> wurden zunächst die wiederholten gemessenen Streuintensitäten gemittelt und die Streuung des Untergrundes von der Präparatstreuung subtrahiert. Da aus Intensitätsgründen ein Primärstrahl von strichförmigem Querschnitt verwendet werden mußte, waren die erhaltenen Streukurven mit einem Kollimationseffekt behaftet (verschmiert). Dieser wurde im Programm Desmglat<sup>17</sup> gemeinsam mit der CuK $\beta$ -Strahlung eliminiert.

Die Messungen wurden mit zwei verschiedenen Eintrittsspalten vorgenommen: von  $7,48 \times 10^{-4}$  bis  $1,4 \times 10^{-2}$  radians wurde mit  $40 \mu\text{m}$  gemessen, von  $2,57 \times 10^{-3}$  bis  $1,17 \times 10^{-1}$  mit  $150 \mu\text{m}$ . Für die ganze Streukurve wurden 150 Punkte gemessen; mit 100 000 Impulsen pro Meßpunkt lag der relative statistische Fehler bei 0,3%.

Im konzentrationsabhängigen Innenteil wurden drei verschiedene Konzentrationen von 5–25 mg/ml vermessen, bei größeren Winkeln ebenfalls drei von 30–130 mg/ml. Durch das erwähnte Programm Fylax wurden außerdem alle Kurven auf die Konzentration  $c = 1$  normiert. Im Innenteil wurden die Kurven anschließend graphisch auf  $c = 0$  extrapoliert. Die Primärintensität wurde mit einem nach der Rotatormethode geeichten Lupolenplättchen bestimmt<sup>18, 19</sup>.

Die Dichtemessungen wurden mit einer digitalen Dichtemeßapparatur DMA 02/C<sup>20</sup> durchgeführt; für die Sedimentationsuntersuchungen wurde eine analytische Ultrazentrifuge (Beckman, Model E) verwendet.

## Resultate und Diskussion

### I. Röntgenkleinwinkelergebnisse

#### Streumassenradius

Der Streumassenradius  $R$  ist ein Maß für die räumliche Ausdehnung eines Moleküls (Wurzel aus dem mittleren Abstandsquadrat aller Elektronen vom Schwerpunkt).

Nach Guinier<sup>21</sup> ist der innerste Teil der Streukurve einer homodispersen Lösung bei Vorliegen aller räumlichen Orientierungen der Teilchen eine Gauß'sche Kurve<sup>22</sup>:

$$I = I_0 \cdot e^{-KR^2\theta^2}; \quad K = 16 \pi^2 / 3 \lambda^2. \quad (1)$$

$I$  ist die Streuintensität beim Streuwinkel  $2\theta$ ,  $I_0$  jene beim Winkel null. Trägt man  $\log I$  gegen  $\theta^2$  auf, so erhält man im Gauß-Bereich eine Gerade, deren Neigung gleich  $-KR^2$  ist.

Es gilt dann<sup>23</sup>:

$$R = A \cdot \sqrt{-\log \alpha} \quad [\text{nm}],$$

$$A = \sqrt{\frac{3}{\log e}} \cdot \frac{\lambda}{2\pi} = 0,0644, \quad (2)$$

wobei  $\lambda$ , die Wellenlänge der  $CuK\alpha$ -Strahlung, 0,154 nm ist.

Die so erhaltenen Werte sind mit einem Konzentrationseffekt behaftet und müssen auf die Konzentration  $c=0$  extrapoliert werden. Abb. 1 zeigt als

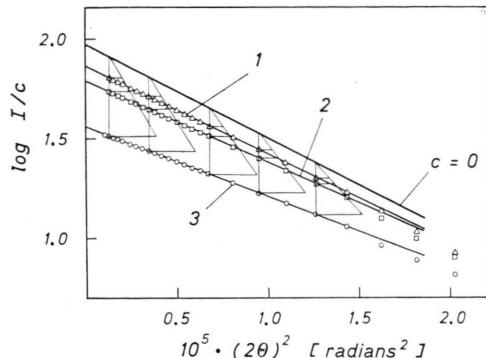


Abb. 1. Guinier-Auftragung der Streukurve des halben  $\alpha$ -Hämocyanin in Lösung ohne Zusatz. Konzentration des  $\alpha$ -Hämocyanin in Lösung; Kurve 1: 7,11 mg/ml; Kurve 2: 10,23 mg/ml; Kurve 3: 23,78 mg/ml. Auf die Konzentration  $c=0$  wurde graphisch extrapoliert. Im Entschwundungsprogramm Desmglat wurden alle Guinier-Punkte auf eine Gerade gezwungen. Aus der Neigung der Geraden wurde der Streumassenradius  $R$  berechnet.  $I$  = Intensität (Impulse/sec),  $c$  = Konzentration (mg/ml).

Beispiel die Bestimmung des Streumassenradius' der halben Moleküle des  $\alpha$ -Hämocyanins *H. pomatia* beim Präparat im Ausgangspuffer ohne Zusatz von Saccharose oder Glycerin.

Nach Extrapolation auf die Konzentration null wurden für die verschiedenen Lösungen die in Tab. I angegebenen Werte des Streumassenradius  $R$  erhalten.

Lösung	$R$ [nm]
ohne Zusatz	$13,9 \pm 2$
58,1% Glycerin	$14,4 \pm 4$
35,2% Glycerin	$14,5 \pm 4$
25,5% Glycerin	$14,0 \pm 3$
19,3% Saccharose	$13,8 \pm 4$

Der für das Präparat ohne Zusatz erhaltene Wert stimmt mit früheren Messungen sehr gut überein<sup>10</sup>. Die übrigen Werte sind mit einem größeren Fehler behaftet. Eine geringe Zunahme des Streumassenradius proportional dem Zusatz zum Puffer ist möglich, nur kann man nicht entscheiden, wie sich die Form des Moleküls geändert hat.

Bei Zugabe von 30,6 bzw. 40,0 Gew.% Saccharose konnte kein exakter Streumassenradius mehr ermit-

telt werden, da die Lösungen mit niedriger Hämocyaninkonzentration zu schwach streuten und daher keine Extrapolation des  $R$ -Wertes auf  $c=0$  durchgeführt werden konnte. Abb. 2 zeigt den verschmierten Innenteil der jeweils höchsten Hämocyaninkon-

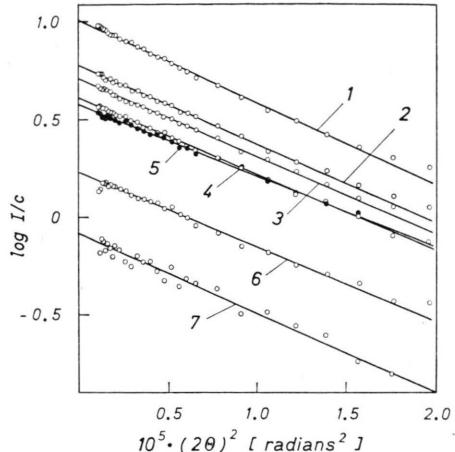


Abb. 2. Innenteile der verschmierten Streukurven des halben  $\alpha$ -Hämocyanin, Guinier-Auftragung der jeweils höchsten Konzentration. Kurve 1: Präparat ohne Zusatz; Kurve 2: 26,5 Gew.% Glycerin; Kurve 3: 35,2 Gew.% Glycerin; Kurve 4: 19,3 Gew.% Saccharose; Kurve 5: 58,1 Gew.% Glycerin; Kurve 6: 30,6 Gew.% Saccharose; Kurve 7: 40,0 Gew.% Saccharose. Mit steigender Elektronendichte des Lösungsmittels nimmt die Streuintensität ab. Erklärung der Symbole Fig. 1.

zentration. Man erkennt deutlich, wie die Streuintensität des gelösten Hämocyanins mit zunehmender Zuckerkonzentration, d. h. steigender Elektronendichte des Lösungsmittels und somit verringerter Elektronendichtendifferenz zwischen Makromolekül und Lösungsmittel abnimmt und damit natürlich die statistischen Fehler steigen.

### Gestalt

Abb. 3 zeigt die Streukurven der halben Moleküle des  $\alpha$ -Hämocyanin ohne und mit Glycerinzusatz, Abb. 4 ohne und mit 19,3% Saccharose in doppelt logarithmischer Auftragung (log der Intensität gegen  $\log h$ ;  $h = (4\pi/\lambda)\sin\theta$ ,  $\theta$  = halber Streuwinkel,  $\lambda$  = Wellenlänge der  $CuK\alpha$ -Linie 0,154 nm).

Die Messungen in 30- bzw. 40-prozentiger Saccharose waren leider unbrauchbar; die Affinität der Saccharosemoleküle zur Glaskapillare scheint eine Inhomogenität der Lösung bewirkt zu haben.

Natürlich ist, wie bereits erwähnt (vgl. Abb. 2), die Streuintensität beim Winkel null ( $I_0$ ) nicht bei allen Messungen gleich groß. Die Kurven wurden

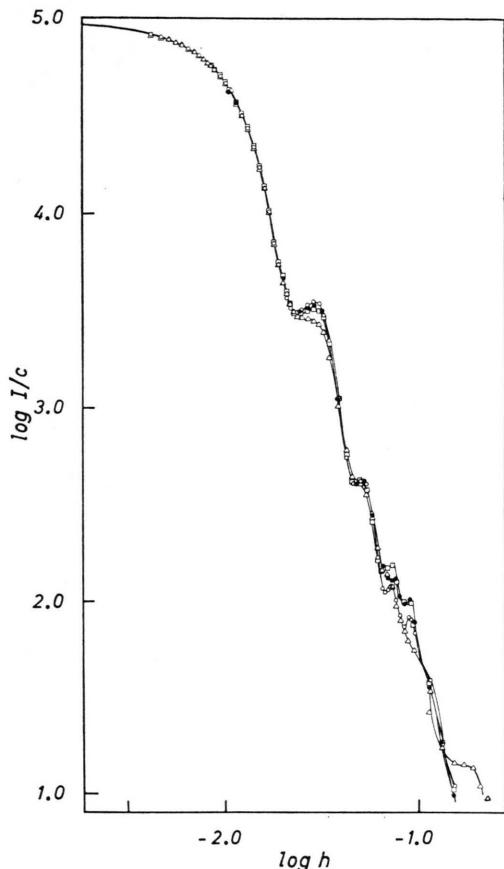


Abb. 3. Log-log Auftragung der Streukurve des halben  $\alpha$ -Hämocyanin. ○, Präparat ohne Zusatz; ●, in 26,5 Gew.% Glycerinlösung; □, in 35,2 Gew.% Glycerinlösung; △, in 58,1 Gew.% Glycerinlösung;  $h = 4\pi/\lambda \cdot \sin \theta$ ,  $\theta$  = halber Streuwinkel,  $\lambda$  = Wellenlänge der CuK $\alpha$ -Strahlung (0,154 nm),  $I$  = Intensität [Impulse/sec],  $c$  = Konzentration [mg/ml].

deshalb auf dieselbe Intensität beim Winkel null, die durch Extrapolation der Guinier-Auftragung erhalten wurde, normiert.

Die Form der Streukurven ergibt die beste Übereinstimmung mit der Streukurve eines Hohlzyinders mit einem Verhältnis von Höhe zu Außendurchmesser von 0,55 und Innen- zu Außenradius von 0,45. Es wurde versucht, verschiedene denkbare Deformationen des Moleküls, d. h. Abweichungen von der hochsymmetrischen Gestalt, vor allem verschieden starke Verzerrungen quer zur Längsachse (elliptische Hohlzyylinder) zu rechnen. Abb. 5 zeigt den Vergleich der experimentellen mit einigen theoretischen Streukurven. Man erkennt deutlich, daß von den homogenen Modellkörpern ein hochsymmetrischer Hohlzyylinder der angegebene

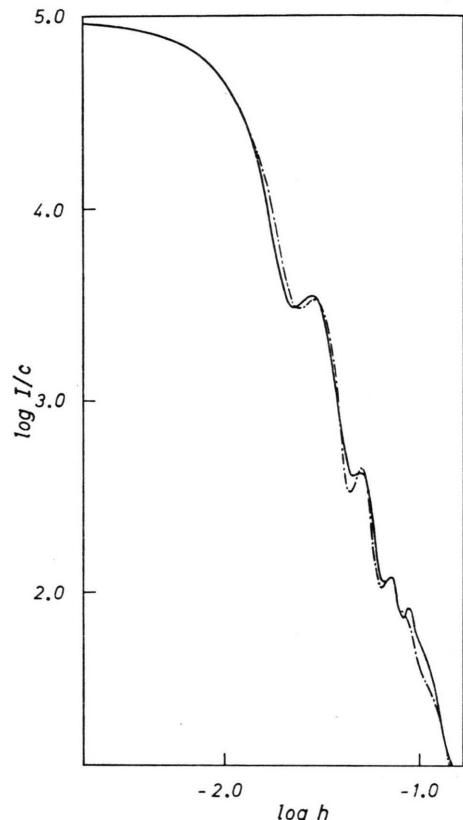


Fig. 4. Log-log Auftragung der Streukurve des halben  $\alpha$ -Hämocyanin in Lösung ohne Zusatz (—) und mit 19,3 Gew.% Saccharose (---). Erklärung der Symbole Fig. 3.

nen Achsenverhältnisse, bzw. der im folgenden angegebenen Dimensionen die relativ beste Übereinstimmung zeigt. Eine noch bessere Übereinstimmung zeigt ein Modell aus 180 kugeligen Untereinheiten, das bei einer früheren Untersuchung<sup>10</sup> gerechnet wurde.

Folgende Dimensionen ergeben sich aus Streumassenradius und Kurvenform für einen streuungsäquivalenten Modellkörper:

$R = 14,0$  nm: Höhe: 18,4 nm,  
Außenradius: 16,7 nm,  
Innenradius: 7,5 nm.

$R = 14,5$  nm: Höhe: 19,0 nm,  
Außenradius: 17,3 nm,  
Innenradius: 7,8 nm.

#### Volumen und Hydratation

Das Volumen des gelösten Makromoleküls ist direkt proportional seiner Streuintensität beim Winkel null und indirekt der Invariante<sup>24</sup>:

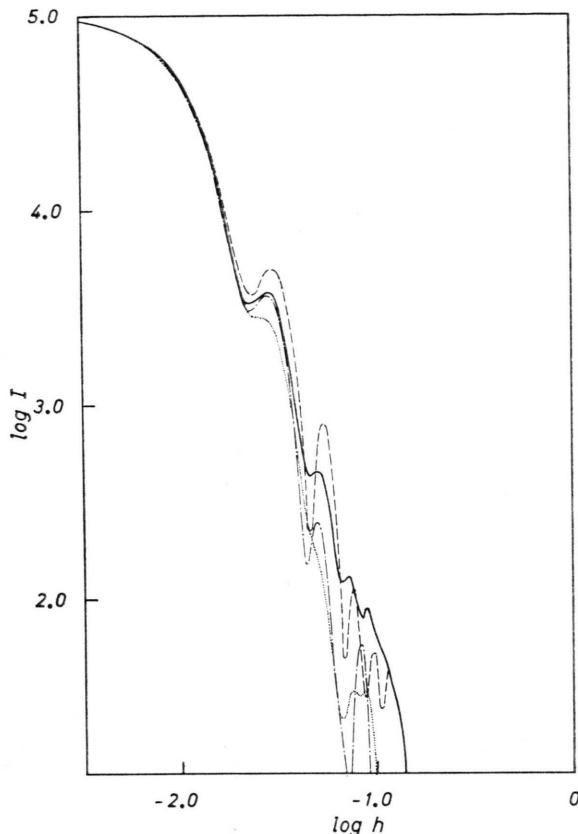


Abb. 5. Log-log Auftragung der Streukurven des halben  $\alpha$ -Hämocyanin in Lösung ohne Zusatz (—) und verschiedener homogener Modellkörper: (—·—·—) runder Hohlzylinder (Höhe 19 nm, Außenradius 17,5 nm, Innenradius 7,5 nm); (····) elliptischer Hohlzylinder (Höhe 19 nm, äußere Halbachsen 20 und 16 nm, innere Halbachsen 9 und 5 nm); (—·—) Modell aus 180 kugelförmigen Untereinheiten<sup>10</sup>.

#### Die Invariante

$$Q = \int_0^\infty I \cdot (2\theta)^2 d2\theta \quad (3)$$

wurde folgenderweise berechnet:

Im Winkelbereich von  $0 - 0,065$  radians wurde sie graphisch nach der Formel von Simpson berechnet. Der Außenteil der Streukurve fällt nach  $k/(2\theta)^4$  ab;  $k$  wurde ermittelt und die Integration des Außenteiles bis  $\infty$  analytisch durchgeführt. Da Inhomogenitäten in der Elektronendichte des Moleküls zu großen Winkeln streuen, kann die Bestimmung der Invariante nicht genauer als höchstens  $\pm 5\%$  sein.

Die für die verschiedenen Lösungen erhaltenen Werte sind in Tab. II angegeben.

Lösung	$V$ [nm <sup>3</sup> ]
ohne Zusatz	7000
58,1% Glycerin	7200
35,1% Glycerin	7000
26,5% Glycerin	7500
19,3% Saccharose	7350

Tab. II. Volumina  $V$  der halben Moleküle von  $\alpha$ -Hämocyanin *H. pomatia*.

Eine einheitliche Tendenz der Änderung der Werte durch steigenden Glycerin- oder Saccharosezusatz ist nicht zu finden; mit der größten Differenz zwischen den Werten von  $500$  nm<sup>3</sup>, was einem Fehler von 3,45% entspricht, liegen sie innerhalb der erwarteten Fehlergrenzen.

Aufschluß über geringe Strukturänderungen im Hämocyaninmolekül durch Glycerin- oder Saccharosezusatz kann das Invariantenvolumen nicht geben, dazu ist die Bestimmung zu ungenau. Für das halbe  $\alpha$ -Hämocyanin wurde im Ausgangspuffer (ohne Glycerin oder Zuckerzusatz) ein isopotentiales spezifisches Volumen<sup>12</sup>  $v_2'$  von  $0,727$  cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> gefunden. Mit diesem Wert und dem gefundenen Molekulargewicht von  $4,52 \times 10^6$  kann für das ungequollene Molekül ein Volumen von  $V = 4,52 \cdot 10^6 \times 0,727 \cdot 10^{21} / 6,02 \cdot 10^{23} = 5460$  nm<sup>3</sup> berechnet werden. Das ergibt bei einem Invariantenvolumen von  $7000$  nm<sup>3</sup>, das für das hydratisierte Teilchen im Ausgangspuffer gefunden wurde, einen intersubpartikulären Quellungsgrad von 1,28, das entspricht  $0,20$  g H<sub>2</sub>O pro 1 g Protein.

#### Molekulargewicht

Auch das Molekulargewicht ist direkt proportional der Streuintensität beim Winkel null. Außerdem ist es indirekt proportional dem Quadrat der Elektronendichtendifferenz  $\Delta z$ <sup>25</sup>.

$\Delta z$  ist durch folgende Beziehung gegeben:

$$\Delta z = (z_1 - v_2' \cdot \rho_2), \quad (4)$$

$z_1$  = Zahl der Elektronenmole pro 1 g des Moleküls, für Proteine meist 0,535.

$v_2'$  = isopotentiales spezifisches Volumen,

$\rho_2$  = Elektronendichte des Lösungsmittels.

Da  $\Delta z$  bei wässrigen Lösungen sehr klein ist, bedingt ein geringer Fehler im  $v_2'$ , der außerdem noch quadriert wird, eine große Verfälschung des Molekulargewichts.

Ein ausreichend genauer Wert des isopotentialen spezifischen Volumens war nur vom Präparat ohne Zusatz zu erhalten mit  $v_2' = 0,727 \pm 0,002$ ; er stimmt mit früheren Messungen überein<sup>10, 27</sup>. Der

Fehler von  $\pm 0,002$  stammt hauptsächlich aus der Konzentrationsbestimmung, die nicht genauer als auf 0,5% zu erhalten ist. Mit dem Wert von 0,727 für das isopotentiale spezifische Volumen errechnet sich ein Molekulargewicht von  $4,52 \times 10^6$ ; der Wert stimmt mit anderen Messungen gut überein<sup>10</sup>.

Dichtemessungen an den Saccharose- und Glycerinlösungen mit Hilfe des eingangs beschriebenen Dichtemeßgerätes führten zu stärker streuenden Werten, die keine genügend genaue Berechnung des spezifischen Volumens erlaubten. Die Störungen bei den Messungen scheinen durch Inhomogenitäten der Saccharoselösung im Glasschwinger des Dichtemeßgerätes<sup>20</sup> verursacht zu werden. Befriedigende Ergebnisse bei Dichtemessungen an Zuckerlösungen konnten nach der Methode von Schausberger und Pilz<sup>28</sup> erhalten werden, aber für diese Methode war im vorliegenden Fall zu wenig Präparat vorhanden. Für die halben  $\alpha$ -Hämocyaninmoleküle in Glycerin- und Saccharoselösungen konnten daher keine Molekulargewichte berechnet werden. Aus den Werten des Streumassenradius, des Volumens und der Kurvenform geht jedoch eindeutig hervor, daß auch in diesen Lösungen das halbe Molekül vorlag.

Da für die Auswertung der Röntgenkleinwinkelmessungen nach Stuhrmann und Kirste ein gleichbleibendes spezifisches Volumen vorausgesetzt werden muß und die Dichtebestimmungen zur Ermittlung dieser Größe wie erwähnt keine zufriedenstellenden Ergebnisse brachten, wurde im biochemischen Institut von Leuven eine indirekte Bestimmung des partiellen spezifischen Volumens aus Ultrazentrifugenmessungen nach verschiedenen Methoden versucht. Der folgende Teil dieser Arbeit bringt eine Zusammenfassung der erhaltenen Daten.

## II. Indirekte Bestimmung des partiellen spezifischen Volumens aus Ultrazentrifugenmessungen nach verschiedenen Methoden

### Ultrazentrifugenuntersuchungen des $\alpha$ -Hämocyanin in Lösungen von 15–45% Saccharose und 15–35% Glycerin

Die übliche Korrektur von  $s_{20}$  auf  $s_{20,w}$  ist in diesem Fall unzulänglich:

$$s_{20,w} = s_{20} \frac{\eta_{20}}{\eta_{20,w}} \frac{1 - \bar{v}_{20} d_{20,w}}{1 - \bar{v}_{20} d_{20}}. \quad (5)$$

Mit einem konstanten partiellen spezifischen Volumen  $\bar{v}_{20}$  von  $0,727 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  waren die in den ver-

schiedenen Lösungsmitteln gemessenen Sedimentationskonstanten nach der Korrektur mit der Viskosität  $\eta$  und der Dichte  $d$  nicht gleich.

Nach dem Verfahren von Katz und Schachmann<sup>29</sup> wurde das partielle spezifische Volumen  $\bar{v}$  durch Extrapolation von  $s_{20} \eta$  gegen die Dichte  $d$  ermittelt. Für das Dreikomponentensystem Hämocyanin-Saccharose-Puffer wurde mit steigendem Saccharosegehalt eine Zunahme des  $\bar{v}$  von 0,727 bis 0,771  $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$  gefunden. Eine ähnliche Zunahme wurde bei dem System Hämocyanin-Glycerin-Puffer ermittelt.

### Schätzung des $\bar{v}$ nach Williams et al.<sup>30</sup>

Die Untersuchung der  $\alpha$ -Präparation des Hämocyanin *H. pomatia* in 1 M LiCl ( $\eta = 1,527 \cdot 10^{-5}$ ;  $d = 1,02413$ ) ergab einen  $s_{20}$ -Wert von 50,77 S für die halben und einen Wert von 82,38 S für die ganzen Moleküle. Nach Williams et al.<sup>30</sup> gilt:

$$s \eta (1 - \bar{v} d) = \Phi. \quad (6)$$

Ein  $\bar{v}$ -Wert von 0,727 ergibt für die halben Moleküle ein  $\Phi$  von 229,08; für die ganzen Moleküle ist  $\Phi = 371,73$ . Bei Zugabe von Saccharose bzw. Glycerin errechnen sich die in den Tabn. III und IV zusammengefaßten Werte für die halben und ganzen Moleküle. Mit der Größe des in den Tabellen angeführten Korrekturfaktors nimmt natürlich die Ungenauigkeit der Werte zu; insbesondere die Werte für die Halben in 45-prozentiger Saccharoselösung sind wegen des hohen Korrekturfaktors unrealistisch und aus diesem Grunde in Klammern angeführt. Stufenweise Erhöhung des Saccharose- oder

Tab. III. Korrigierte Werte des  $\bar{v}$  für die halben  $\alpha$ -Hämocyanin-Moleküle *H. pomatia* nach dem Verfahren von Williams et al.<sup>30</sup>.

Zusatz zur Lösung	$\Phi^*$	$\bar{v}^{**}$	$s_{20,w}[\text{S}]$	Korrekturfaktor ***
Glycerin	15%	222,02	0,734	62,60
	25%	212,21	0,742	62,61
	35%	208,97	0,743	62,59
Saccharose	15%	184,73	0,765	62,66
	30%	162,37	0,770	62,71
	45% (127,95)	(0,768)	(62,14)	(51,35)
	kein Zusatz	229,08	0,727	62,50
				1,231

\* Berechnet mit  $\bar{v} = 0,727$ .

\*\* Berechnet mit  $\Phi = 229,08$ .

\*\*\* Korrekturfaktor =  $\frac{\eta}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{1 - \bar{v}_{20,w} \cdot d_{20,w}}{1 - \bar{v} d}$ .

Tab. IV. Korrigierte Werte des  $\bar{v}$  für die ganzen Hämocyanin-Moleküle nach dem Verfahren von Williams et al.<sup>30</sup>.

Zusatz zur Lösung	$\Phi^*$	$\bar{v}^{**}$	$s_{20,w}[S]$	Korrekturfaktor ***
Glycerin	15%	354,51	0,737	101,4
	25%	345,51	0,741	101,4
	35%	326,62	0,749	101,5
Saccharose	15%	282,72	0,774	101,8
	30%	250,97	0,775	101,9
	45%	—	—	—
kein Zusatz	371,73	0,727	101,4	1,231

\* Berechnet mit  $\bar{v}=0,727$ .

\*\* Berechnet mit  $\Phi=371,73$ .

$$*** \text{ Korrekturfaktor} = \frac{\eta}{\eta_{20,w}} \cdot \frac{1-\bar{v}_{20,w} \cdot d_{20,w}}{1-\bar{v} d}.$$

Glyceringehaltes führt nach der Schätzung von Williams et al., wie aus den Tabellen ersichtlich, zu einer deutlichen Erhöhung des partiellen spezifischen Volumens.

Da die Änderung der spezifischen Volumina in den Lösungen mit Glycerin- bzw. Saccharosezusatz außergewöhnlich groß war und mit keinem Ver-

fahren konstante Werte erzielt werden konnten, war es leider nicht möglich, die auf diesem Weg erhaltenen spezifischen Volumengrößen für die Röntgenkleinwinkeluntersuchungen heranzuziehen. Ein Verfahren, das auch in Mehrkomponentensystemen Werte liefert, die für die Röntgenkleinwinkeluntersuchungen genau genug sind, ist im Grazer Institut in Vorbereitung<sup>28</sup>.

Für die Auswertung der Röntgenkleinwinkeldaten nach Stuhrmann und Kirste muß vorausgesetzt werden, daß sich das partielle (bzw. isopotentiale) spezifische Volumen des gelösten Makromoleküls nicht ändert, wenn die Elektronendichte des Lösungsmittels variiert wird. Da diese Voraussetzung bei den Untersuchungen am Hämocyanin weder bei Zusatz von Saccharose noch bei Zusatz von Glycerin gegeben war, konnte die genannte Methode nicht angewendet werden.

Dem Österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung danken I. Pilz und J. Berger für die großzügige Unterstützung und Bereitstellung apparativer Hilfsmittel. Alle Berechnungen der Röntgenkleinwinkeldaten wurden an einer UNIVAC 494 am Rechenzentrum Graz durchgeführt.

- <sup>1</sup> R. Guillemet u. G. Gosselin, C. R. Soc. **111**, 733 [1932].
- <sup>2</sup> A. C. Redfield, T. Coolidge u. H. Montgomery, J. Biol. Chem. **76**, 197 [1928].
- <sup>3</sup> W. N. Konings, Dissertation, Groningen 1969.
- <sup>4</sup> S. Brohult u. K. Borgman, The Svedberg 1884–1944, p. 429, Almqvist Wiksell, Uppsala 1944.
- <sup>5</sup> E. F. J. van Bruggen, E. H. Wiebenga u. M. Gruber, J. Mol. Biol. **4**, 1 [1962].
- <sup>6</sup> T. Eskeland, J. Ultrastruct. Res. **17**, 544 [1967].
- <sup>7</sup> J. E. Mellema u. A. Klug, Nature **239**, 146 [1972].
- <sup>8</sup> I. Pilz, O. Kratky u. I. Moring-Claesson, Z. Naturforsch. **25 b**, 600 [1970].
- <sup>9</sup> I. Pilz, O. Glatter u. O. Kratky, Z. Naturforsch. **27 b**, 518 [1972].
- <sup>10</sup> I. Pilz, Y. Engelborghs, R. Witters u. R. Lontie, Eur. J. Biochem. **42**, 195 [1974].
- <sup>11</sup> H. B. Stuhrmann u. R. G. Kirste, Z. Physikal. Chem. Neue Folge **46**, 247 [1965].
- <sup>12</sup> K. Heirwegh, H. Borginou u. R. Lontie, Biochem. Biophys. Acta **48**, 517 [1961].
- <sup>13</sup> D. W. Kupke, Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry, vol. III (Hrsg. S. J. Leach), Academic Press, New York 1972.
- <sup>14</sup> O. Kratky, Z. Elektrochem. **62**, 66 [1958].
- <sup>15</sup> H. Leopold, Elektronik **14**, 359 [1965].
- <sup>16</sup> P. Zipper, Acta Phys. Austriaca **36**, 27 [1972].
- <sup>17</sup> O. Glatter, J. Appl. Crystallogr. **7**, 147 [1974].
- <sup>18</sup> O. Kratky, I. Pilz u. P. J. Schmitz, J. Colloid Interface Sci. **21**, 24 [1966].
- <sup>19</sup> O. Kratky, Makromol. Chem. **35 a**, 12 [1960].
- <sup>20</sup> O. Kratky, H. Leopold u. H. Stabinger, Z. Angew. Phys. **27**, 273 [1969].
- <sup>21</sup> A. Guinier, C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Paris **204**, 1115 [1937]; Ann. Phys. **12**, 161 [1939].
- <sup>22</sup> E. Guth u. H. Mark, Monatsh. Chem. **65**, 93 [1935].
- <sup>23</sup> P. Flory, Principles of Polymer Chemistry, p. 613, Cornell Univ. Press, New York 1953.
- <sup>24</sup> G. Porod, Kolloid Z. **124**, 83 [1951].
- <sup>25</sup> O. Kratky, G. Porod u. L. Kahovec, Z. Elektrochem. **55**, 53 [1950].
- <sup>26</sup> G. Oster u. D. P. Riley, Acta Crystallogr. **5**, 1 [1951].
- <sup>27</sup> Y. Engelborghs u. R. Lontie, J. Mol. Biol. **77**, 577 [1973].
- <sup>28</sup> A. Schausberger u. I. Pilz, zur Publikation eingereicht.
- <sup>29</sup> S. Katz u. H. K. Schachman, Biochem. Biophys. Acta **18**, 28 [1955].
- <sup>30</sup> J. W. Williams, K. E. Van Holde, R. L. Baldwin u. H. Fujita, Chem. Rev. **58**, 715 [1958].