

Stand der konstitutionschemischen Forschung auf dem Gebiet der Eiweißkörper*)

Von Prof. Dr. W. GRASSMANN,
Dresden

Eingeg. 10. Juli 1936

Da die Proteinstoffe bei allen chemischen Prozessen im lebenden Organismus auf die eine oder andere Weise beteiligt sind, so darf man von der Aufklärung ihrer Struktur und ihrer Metamorphosen die wichtigsten Aufschlüsse für die biologische Chemie erwarten. Es ist deshalb kein Wunder, daß das Studium jener Stoffe, von dem die Chemiker seit länger als einem Menschenalter sich fast ganz zurückgezogen haben, weil sie lohnendere Arbeit in der Ausbildung der synthetischen Methoden oder beim Studium einfacher natürlicher Verbindungen fanden, von den Physiologen in immer steigendem Maße und mit unverkennbarem Erfolg gepflegt wurde. Trotzdem werden die Eingeweihten niemals gezweifelt haben, daß die organische Chemie, deren Wiege bei den Proteinen gestanden hat, sich ihnen schließlich wieder zuwenden wird. Nur über den Zeitpunkt, wo ein Zusammenwirken von Biologie und Chemie erfolgreich sein wird, ging und gehen noch heute die Ansichten auseinander.“

Diese Worte hat vor fast genau 30 Jahren *Emil Fischer* seinem Vortrag vor der Deutschen Chemischen Gesellschaft (1) vorangestellt, in dem er zum ersten Male zusammenfassend über das Ergebnis einer mehr als 6jährigen Arbeit auf dem Eiweißgebiet berichtet hat, einer Arbeit, durch welche die Führung in der Erforschung der Eiweißkörper aus den Händen der Physiologen wieder für die organische Chemie zurückgewonnen wurde. Trotz großer Fortschritte, die Chemie und Physiologie inzwischen erzielt haben, könnten diese Sätze im wesentlichen noch heute gesprochen sein. Auch heute ist es unsere Überzeugung, daß „die Proteinstoffe bei allen chemischen Prozessen im lebenden Organismus auf die eine oder andere Weise beteiligt sind“, aber auch heute kommen wir noch in einige Verlegenheit, wenn wir diese Aussage in einer bestimmteren Weise formulieren wollen; auch heute schließlich gibt es vielleicht Organiker, die zwar die überragende physiologische Rolle der Eiweißkörper voll anerkennen, aber den Zeitpunkt für ein erfolgreiches Vordringen des exakten Chemikers auf diesem Gebiet noch nicht für gekommen ansehen.

Durch *Emil Fischer* war endgültig sichergestellt worden, daß die Eiweißkörper zum größten Teil, manche von ihnen wohl ausschließlich, aus Aminosäuren aufgebaut sind und bei der Hydrolyse (sei es durch Säuren, Alkalien oder Fermente) ein Gemisch aus verschiedenen α -Aminosäuren und einigen Iminosäuren liefern. Die Methoden, um diese Gemische zu zerlegen und die einzelnen Aminosäuren aus ihnen herauszuarbeiten, sind von *Fischer* und von *A. Kossel* (2) geschaffen worden und neben einigen ergänzenden Methoden aus neuerer Zeit (3) bis jetzt maßgebend geblieben. Die Vorstellung, daß die große Zahl einzelner Aminosäuren durch amidartige Verknüpfung zwischen der Carboxylgruppe des einen und der Aminogruppe des anderen Aminosäurerestes zum großen Eiweißmolekül zusammengefügt seien, war damals, vor allem dank den Ergebnissen von *F. Hofmeister* (4) und *Theodor Curtius* (5), wohl schon Allgemeingut der Forschung; aber *E. Fischer* hat ihr die

wirklich sichere Grundlage gegeben durch die künstliche Verkettung von Aminosäuren nach diesem Prinzip, also durch die Synthese von Peptiden, durch den Vergleich dieser Peptide mit den Eiweißkörpern und ihren Abbauprodukten und durch die Isolierung einiger solcher Peptide beim Eiweißabbau.

Mit diesen Ergebnissen war ein klares strukturemisches Bild vom allgemeinen Aufbau der Eiweißkörper begründet, und die daran anknüpfende Forschung der folgenden Jahrzehnte hat von da aus wenigstens eine Seite der biologischen Bedeutung der Eiweißkörper aus dem Bereich mehr oder weniger spekulativer Hypothesen in das Gebiet der exakten chemischen Bearbeitung herübernehmen können. Es hat sich ergeben, daß wichtige Wirkstoffe des Organismus, so das Adrenalin und Cholin, das Thyroxin der Schilddrüse, die als Zellstreckungshormon der Pflanzen wirksame β -Indolyl-Essigsäure [*Kögl* (6)], das schwefelhaltige Redoxsystem des Glutathions, entweder Eiweißbausteine sind oder durch relativ einfache Umformungen aus bestimmten Aminosäuren hervorgehen. Bei anderen noch nicht in reiner Form dargestellten und chemisch noch unbekannten Wirkstoffen von hormonähnlichem Charakter haben wir einigen Grund zu der Annahme, daß es sich gleichfalls um den Eiweißabbauprodukten nahestehende Verbindungen handeln könnte, so beim Kallikrein (7), bei den Prolanen (8) des Hypophysenvorderlappens und beim Oxytocin (9) des Hypophysenhinterlappens, vielleicht beim antianämischen Leberstoff. Das große Eiweißmolekül ist damit als ein Depot erkannt, aus dem je nach der Bedürfnislage des Organismus bestimmte Wirkstoffe herausgenommen und als Sendboten in den Kreislauf entsandt werden können.

Die biologische Bedeutung der hochmolekularen Proteinstoffe selbst war mit dieser Feststellung genau so wenig zu erschöpfen, wie etwa durch die rein kolloidchemische Betrachtungsweise, die im Eiweiß nur einen mehr oder weniger indifferenten und unspezifischen Trägerstoff von großer Oberflächenentwicklung erblickt, dessen Studium sich wohl in bezug auf Quellungs- und Adsorptionsverhältnis lohne, dessen chemischer Aufbau im einzelnen aber weitgehend gleichgültig und zunächst auch einer exakten Aufklärung nicht zugänglich sei. Für eine solche Vorstellung erscheint dem Chemiker, schon rein gefühlsmäßig, der Aufbau der Eiweißkörper aus über 25 ganz verschiedenen Aminosäuren zu kunstvoll; ihr widersprechen eine Fülle von Befunden auf physiologischem und pathologischem Gebiet sowie die Ergebnisse der serologischen Forschung, welche bestimmte Funktionen und strenge Spezifität für jeden einzelnen Eiweißkörper fordern.

So ergibt sich die Frage, ob den einzelnen Eiweißkörpern als solchen bestimmte und spezifische Funktionen im Organismus zukommen, oder, was fast gleichbedeutend ist, ob die eigentlichen chemischen Feinwerkzeuge des Organismus, wie Fermente, Hormone, Toxine u. dgl., den Eiweißkörpern zuzuzählen sind. *E. Fischer* (10) war geneigt, diese Frage für die Enzyme und Toxine zu bejahen, von

*) Vorgetragen in der Fachgruppe für medizinische und pharmazeutische Chemie auf der 49. Hauptversammlung des V.D.Ch. in München am 9. Juli 1936.

Willstätter (11) ist sie in bezug auf eine Anzahl von ihm genauer untersuchter Enzyme verneint worden. Wichtige Ergebnisse des letzten Jahrzehnts haben für eine Reihe hierher gehörender Stoffe eine Klärung angebahnt. Das von J. J. Abel (12) in hochgereinigter und kristallisierter Form dargestellte Insulin ist ein Eiweißkörper, u. zw. ist das kristallisierte Produkt eine Protein-Zink-Verbindung (13). Für die Wirkung in erster Linie verantwortlich scheint nach Freudenberg (14) eine Disulfidgruppierung zu sein, an deren Aufbau neben Cystin wohl noch unbekannte Reste beteiligt sind.

Ebenso erscheint für eine Reihe von Enzymen die Zugehörigkeit zu den Eiweißkörpern heute gesichert. Dies gilt von einigen häminhaltigen Atmungskatalysatoren, so von der Leberkatalase, die nach Zeile und Hellström (15), Agner (16) und Stern (17) in reversibler Weise in einen spezifischen Eiweißkörper und ein katalytisch unwirksames Hämin aufgespalten werden kann, genau so, wie dies beim Blutfarbstoff möglich ist [R. Hill u. H. F. Holden (18)]. Ähnlich dürften die Verhältnisse wohl beim häminhaltigen Atmungsferment von Warburg (19) und beim Cytochrom c von Keilin (20) liegen, das von H. Theorell (21) rein dargestellt und als eine Hämin-Eiweiß-Verbindung vom Molekulargewicht 35000 erkannt worden ist. Das gelbe Atmungsferment ist nach Warburg und Theorell (22) aus einem spezifischen Eiweißkörper und einer Flavinphosphorsäure aufgebaut; es kann in seine Komponenten zerlegt und unter Wiederherstellung der Wirksamkeit daraus wieder aufgebaut werden. Auch das wasserstoffübertragende Co-Ferment Warburgs (23), das aus Nicotinsäureamid, Adenin, Pentose und Phosphorsäure besteht, muß, um katalytisch wirken zu können, an ein spezifisches Protein gebunden sein. Während im gelben Ferment die Verbindung zwischen Wirkungsgruppe und Protein fest ist, dissoziiert die Verbindung zwischen Atmungs-Co-Ferment und Eiweiß in wässriger Lösung weitgehend in ihre Komponenten (23a).

In dieser Hinsicht scheinen ähnliche Verhältnisse bei der Leberesterase vorzuliegen. Dieses Enzym dissoziiert nach H. Kraut (24) verhältnismäßig leicht in eine anscheinend nicht hochmolekulare Wirkungsgruppe (Agon), die vielleicht der Ascorbinsäure nahesteht, und einen hochmolekularen Bestandteil (Pheron), der möglicherweise ein Eiweißkörper ist. Eigene Beobachtungen aus neuerer Zeit lassen es uns möglich erscheinen, daß auch die Dipeptidase aus Hefe in ähnlicher Weise als ein dissoziationsfähiger Symplex (25) aus zwei Komponenten betrachtet werden kann.

Eine Anzahl anderer Enzyme, und zwar Enzyme aus der eiweiß- und amidspaltenden Gruppe, wie Urease (26), Pepsin (27), Trypsin (28), Chymotrypsin (29) und Carboxypolypeptidase (30) sind als kristallisierte Eiweißkörper von z. T. beachtenswert hoher enzymatischer Wirksamkeit isoliert und beschrieben worden. Auch hier wird man aber für die besondere hochspezifische katalytische Wirksamkeit kaum irgendeine bestimmte Anordnung bekannter Aminosäuren verantwortlich machen; es ist wahrscheinlicher, daß besonders gebaute, vielleicht eiweißfremde und noch unbekannte Gruppierungen, in das Eiweißmolekül eingebaut oder in ihm verankert, die wesentlichen Träger der katalytischen Wirkung sind.

Man wird vielleicht noch einen Schritt weitergehen und annehmen dürfen, daß ganz allgemein überall da, wo Eiweißkörper als Träger besonderer und spezifischer Funktionen an den Lebensvorgängen beteiligt sind, diese Funktionen an räumlich eng umschriebene „aktive Zentren“ des großen Eiweißmoleküls gebunden sind. Damit gewinnen die „prothetischen“ Gruppen, die wir früher vielleicht als eine Art Fremdkörper innerhalb der Eiweißchemie

empfunden haben, eine besondere Bedeutung. Während wir bisher solche Eiweißkörper, in denen eine prothetische Gruppierung aus „eiweißfremdem“ Material nachzuweisen war, als „Proteide“ oder „eiweißähnliche Stoffe“ von den „eigentlichen“ Eiweißkörpern abzugrenzen pflegten, möchte ich glauben, daß wir für jeden an den Umsetzungen des Organismus aktiv beteiligten Eiweißkörper eine „prothetische Gruppe“, eine „hervorragende“ Gruppierung postulieren sollten. Diese aktive Gruppierung wird in manchen Fällen aus besonderen Anordnungen reaktionsfähiger (Cystein!), vielleicht seltener Aminosäuren, i. allg. wohl aus anderen Stoffen, Kohlenhydraten, Purinen, Farbstoffen, Schwermetallkomplexen, Lipoiden, Wasserstoffacceptoren und -donatoren bestehen. Die Einteilung in „Proteine“ und „Proteide“ scheint kaum mehr zweckmäßig, nachdem die Zahl der Eiweißkörper, die keine prothetische Gruppe enthalten, auf wenige und vergleichsweise unwichtige Vertreter zusammengeschrumpft ist. Das Eiweiß der Zellkerne enthält Purine, Phosphorsäure und Zucker. Das Eieralbumin, also das eigentliche „Ei-Weiß“, ist ebenso wie die verschiedenen tierischen Globuline seit langem als Kohlenhydratverbindung erkannt (31), es enthält Glucosamin und Mannose (32) als wesentlichen Bestandteil des Moleküls. Auch das Kollagen (33) bzw. die Gelatine ist ein Glucoprotein; ihre Kohlenhydratkomponente könnte Milchzucker sein. Casein enthält Phosphorsäurereste und etwas Zucker. Die serologische Spezifität der Eiweißkörper scheint im wesentlichen eine Funktion eingebauter Kohlenhydrat- oder Lipidreste zu sein (34). So bleiben als ausschließlich aus Aminosäuren bestehende Eiweißkörper vielleicht das gleichsam tote Fibroin der Seide und das Keratin der Haare und des Horns, ferner die Histone und Protamine, die aber in Wahrheit nur Bruchstücke ihrer natürlichen Symplexe mit Nucleinsäuren sind.

Es ist daher eine vordringliche Aufgabe, nicht nur die Natur dieser prothetischen Gruppen festzustellen, sondern auch die Art ihrer Bindung zu ermitteln. Sie kann durch Haupt- und Nebervalenzen vermittelt, salz- oder komplexartig sein. Wohl das wichtigste und interessanteste Problem auf diesem Gebiet betrifft die Bindung der Hämine an das Globin in den Hämoglobinen. Über die „hämaffine“ Gruppe der verschiedenen Globine ist viel gearbeitet worden, aber leider nur wenig Sicheres bekannt. Die Versuche, diese Gruppierung mit irgendeinem bestimmten Aminosäurerest (Histidin, Cystin bzw. Cystein, Prolin) zu identifizieren, sind ohne sicheres Ergebnis geblieben. Wir können lediglich aussagen, daß es sich um eine Gruppierung handelt, die bei der recht leicht erfolgenden Denaturierung des Globins zerstört oder verändert wird, wobei gleichzeitig der isoelektrische Punkt des Globins erheblich nach der alkalischen Seite verschoben wird [Haurowitz (35)].

Die Bindung von Eiweißresten an Zucker oder Aminozucker ist mehrfach an synthetischen Modellen studiert worden [Bergmann (36), Bertho (37), Maurer (38)], ohne daß über den Verknüpfungstyp in den natürlichen Glucoproteinen bis heute bestimmte Aussagen möglich wären. Auch Nebervalenzbindungen könnten in Frage kommen, da nach Befunden von Przylecki (39) zwei Aminosäuren, nämlich Arginin und Tyrosin, zur Bildung von z. T. ziemlich beständigen Additionsverbindungen mit Zuckerresten befähigt sind.

So bleibt vorläufig nur eine, freilich ziemlich bescheidene, prothetische Gruppe, über deren Bindungsart wir bestimmtere Aussagen machen können: die Phosphorsäure des Caseins und des Vitellins. Sie ist offenbar über die Hydroxylgruppen von Oxyaminosäuren gebunden; denn es ist gelungen, 3-Serinphosphorsäure sowie Peptidester aus Glutaminsäure, Serin- und Phosphorsäure aus den Produkten der tryptischen Verdauung des Caseins und Vitellins zu isolieren (40).

Es ist möglich, daß die Kenntnis der prosthetischen Gruppen und ihrer Bindungsverhältnisse einen Teil der etwas unbefriedigenden Gegensätze zu überbrücken erlaubt, die zwischen den Eigenschaften der natürlichen Eiweißkörper und den synthetisch zugänglichen Peptiden beim Abschluß der Arbeit *Emil Fischers* bestanden und im wesentlichen heute noch bestehen. Die Stabilität und geringe Reaktionsfähigkeit der meisten bisher zugänglichen synthetischen Peptide steht ja schlecht im Einklang mit den physiologischen Funktionen, mit der Gesamtheit der chemischen, physikalischen und kolloidchemischen Eigenschaften der empfindlichen und wandelbaren Proteine.

Wohl die merkwürdigste Eigenschaft der Proteine, die bisher an keinem synthetischen Peptid gefunden werden konnte, ist ihre Denaturierbarkeit, also die Eigenschaft, beim Erhitzen in Wasser, aber auch z. B. bei der Ausbreitung an Grenzflächen, unter Verlust der Wasserlöslichkeit verändert zu werden. Die rein kolloidchemischen Deutungen, die man für diese Erscheinung zu geben versucht hat, dürften seit langem als ungenügend erkannt sein. Es sind zahlreiche, mit der Denaturierung einhergehende Veränderungen beschrieben, die auf eine chemische Umlagerung hinweisen. SH- und SS-Gruppierungen, die im nativen Protein maskiert oder wenig reaktionsfähig waren, treten in Erscheinung (41). Auch andere reduzierende Gruppen sollen aktiviert werden [*Mirsky* u. *Anson* (42)]. Das Jodbindungsvermögen verändert sich [*Bauer* u. *Strauß* (43)], der isoelektrische Punkt wird in einzelnen Fällen verschoben (44), die enzymatische Angreifbarkeit wird gesteigert (45).

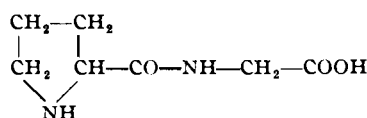
Beim Globin verschwindet mit der Denaturierung die Fähigkeit, das Hämin zur reversiblen Sauerstoffbindung zu befähigen (46). Bei den kristallisierten Enzymen geht parallel mit der Denaturierung die enzymatische Wirksamkeit verloren (47). Wie bei vielen Eiweißkörpern (47a) ist auch hier die Denaturierung und damit die Inaktivierung reversibel, und zwar bei vorsichtiger Einwirkung (47b) alkalischer Reaktion.

Wir vermögen vorerst nicht anzugeben, ob prosthetische Gruppen oder uns noch unbekannte Gruppierungen der Proteine an diesen Erscheinungen mitbeteiligt sind. Das Verhalten der normalen Polypeptide bietet jedenfalls kaum sichere Anhaltspunkte, wo ein Erklärungsversuch einsetzen könnte.

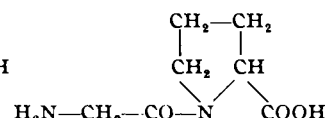
In diesem Zusammenhang ist zu betonen, daß in den synthetischen Peptiden *E. Fischers* nur ein verhältnismäßig kleiner Bruchteil derjenigen Verknüpfungstypen verwirklicht war, die man sich aus der großen Mannigfaltigkeit der natürlichen Aminosäuren theoretisch aufgebaut denken kann. Soweit *Emil Fischer* und seine Schüler lange Polypeptidketten synthetisiert haben, bestanden sie ausschließlich aus den Monoamino-monocarbonsäuren der aliphatischen Reihe. Haben auch die zweiten Carboxyle der Dicarbonsäuren, die endständigen Aminogruppen der Diaminosäuren, der cyclische Stickstoff des Prolins und des Oxyprolins, der Sauerstoff der Oxyaminosäuren Anteil an der Verknüpfung der Eiweißbausteine? Wie verhalten sich die unter Vermittlung dieser Gruppen aufgebauten peptidartigen Verbindungen chemisch, physikalisch und gegenüber Fermenten?

Voraussetzung für die Klärung dieser Fragen war auf der einen Seite eine weitgehende Verfeinerung des enzymatischen Eiweißabbaues unter Verwendung einheitlicher und definierter eiweißspaltender Enzyme, die wir im wesentlichen der *Willstätterschen* Schule (48) verdanken, auf der anderen Seite ein Ausbau der Methoden zur Peptidsynthese, der in der Hauptsache durch das sog. Carbobenzoxymethode von *Bergmann* und *Zervas* (49) erreicht wurde.

Verknüpfung des Prolins. Die Erfahrung, daß sowohl für die Wirkung der Dipeptidase als auch für diejenige der Aminopolypeptidase die Anwesenheit einer freien NH_2 -Gruppe erforderlich ist (50), legt die Frage nahe, wie sich Peptide enzymatisch verhalten werden, die an Stelle der freien Aminogruppe die Iminogruppe des Prolins oder Oxyprolins enthalten (I). Solche Peptide sind, wie wir gefunden haben, enzymatisch spaltbar, aber nicht durch die gewöhnlichen Aminopeptidasen, sondern durch ein besonderes Enzym (51). Auch Peptide, in denen umgekehrt der Imino-N des Prolins mit dem Carboxyl einer anderen Aminosäure verknüpft ist (II), sind spaltbar, aber wiederum durch ein von gewöhnlicher Peptidase verschiedenes Enzym (52). Der direkte Nachweis für das Vorkommen von Bindungen mit peptidartig verknüpftem Prolin-N im Eiweiß ist von *Bergmann* (53) und uns (54) erbracht worden.



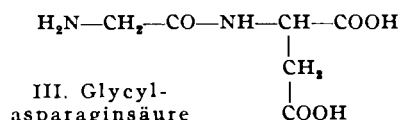
I. Prolyl-glycin



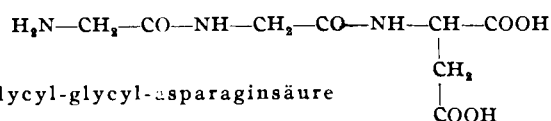
II. Glycyl-prolin

Der Prolinrest ist demnach im Eiweißmolekül peptidartig über Carboxyl und N eingebaut, aber sowohl Struktur wie enzymchemisches Verhalten der Prolingruppe sprechen für eine gewisse Sonderstellung.

Verknüpfung der Asparagin- und Glutaminsäure. Peptide der Asparagin- und der Glutaminsäure, in denen die Aminogruppe der Dicarbonsäure mit dem Carboxyl einer weiteren Aminosäure verknüpft ist, verhalten sich peptidspaltenden Enzymen gegenüber in jeder Hinsicht wie die Peptide der Monocarbonsäuren. Glycyl-asparaginsäure (III), Glycyl-asparagin, Leucyl-glutaminsäure sind durch Dipeptidase, Glycyl-glycyl-asparaginsäure (IV) ist durch Aminopolypeptidase zerlegbar (55). Man wird ohne weiteres annehmen dürfen, daß diese Verknüpfungstypen auch im Eiweiß vorkommen.

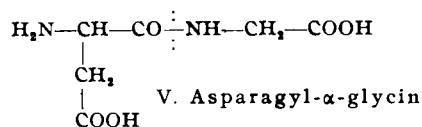


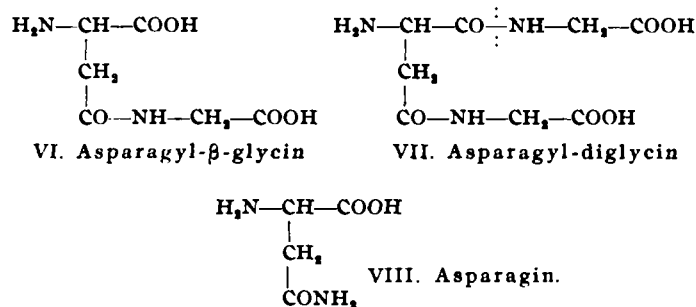
III. Glycyl-asparaginsäure



IV. Glycyl-glycyl-asparaginsäure

Durch Verknüpfung der Carboxylgruppen der Asparaginsäure mit anderen Aminosäureresten sind drei Typen darstellbar, je nachdem α - oder β -Carboxyl oder beide Carboxyle zugleich an der Bindung beteiligt sind. Das α -Peptid (V) hat sich als spaltbar, das β -Peptid (VI) als unspaltbar für Dipeptidase erwiesen. Das Asparagyl-diglycin (VII) wird nur an einer Peptidbindung, zweifellos der α -Bindung, aufgespalten. Die β -Bindung bleibt unberührt (56). Man wird daraus schließen dürfen, daß die Asparaginsäure durch ihre Aminogruppe und die ihr benachbarte α -Carboxylgruppe im Eiweißmolekül peptidartig verknüpft ist, während die Peptidverknüpfung des β -Carboxyls eiweißfremd zu sein scheint. Analog dürften die Verhältnisse bei der Glutaminsäure liegen.


 V. Asparagyl- α -glycin



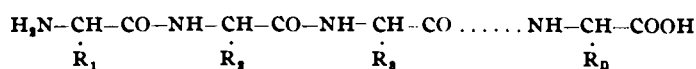
Noch auf einem anderen Wege ist man zu dem Ergebnis gelangt, daß die β - bzw. γ -Carboxyle der Asparagin- und Glutaminsäure an der Peptidverknüpfung im Eiweißmolekül nicht oder nicht wesentlich beteiligt sind, sondern andere Funktionen haben. Bekanntlich werden die beiden Aminosäuren in der Natur vornehmlich in Form ihrer β - bzw. γ -Amide [Asparagin (VIII) bzw. Glutamin] angetroffen, und schon Osborne (57) hatte aus der weitgehenden Übereinstimmung, die zwischen Amid-N und dem Gehalt an Dicarbonsäuren bei vielen Proteinen besteht, geschlossen, daß diese Aminosäuren auch im Eiweiß selbst in Form der oben genannten Amide vorliegen. Selbstverständlich können die empfindlichen Amide bei der Eiweißhydrolyse mit Säuren oder Alkalien nicht gefaßt werden. Spezifischer ist der enzymatische Abbau: keines der gebräuchlichen proteolytischen Enzyme greift Asparagin oder Glutamin an, während umgekehrt die Asparaginase unwirksam gegen Eiweißkörper und Peptide ist (58). Diese Erfahrung unserer Versuche haben M. Damodaran und Ch. Chibnall (59) ausgewertet. Es ist ihnen gelungen, asparaginsäure- bzw. glutaminsäurereiche Eiweißkörper enzymatisch unter weitgehender Erhaltung der Amidbindung aufzuspalten. Aus den Hydrolysaten konnte Asparagin in einer Ausbeute von etwa 25% der Theorie erhalten werden, ein gutes Ergebnis, wenn man die Schwierigkeit, diese Substanz aus Eiweißhydrolysaten zu isolieren, berücksichtigt. Auch Glutamin konnte in gleicher Weise als Eiweißbaustein isoliert werden, wenngleich in schlechterer Ausbeute.

Verknüpfung der Diaminosäuren. Daß die ϵ -Aminogruppe des Lysins im Eiweißmolekül ungebunden vorliegt, scheint aus dem Verhalten der Proteine gegen salpetrige Säure (60) und bei der Benzoylierung hervorzugehen (61). Die Menge des nach van Slyke bestimmbaren Aminostickstoffs der Eiweißkörper entspricht ungefähr dem Lysingehalt (62). Für die Guanidogruppe des Arginins ist das gleiche aus dem Verhalten bei der Nitrierung [Kossel (63)] zu folgern. Das Säurebindungsvermögen der Proteine entspricht ungefähr der Summe ihres Gehaltes an Lysin und Arginin (64). Von den Peptidasen werden die α -Peptide des Lysins zerlegt, während für die ϵ -Verbindungen dies nicht zuzutreffen scheint (65).

Verknüpfung der Oxyaminosäuren. Für eine esterartige Verknüpfung von Aminosäuren untereinander unter Beteiligung der Hydroxyle von Oxyaminosäuren hat sich bisher keinerlei direkter Anhaltspunkt gewinnen lassen. Die beim enzymatischen Eiweißabbau durchweg beobachtete Äquivalenz zwischen neugebildeten basischen und sauren Gruppen spricht im Gegenteil für das ausschließliche Vorliegen von $-\text{CO}-\text{N}$ -Verknüpfung. Die Hydroxyle der Oxyaminosäuren dürften daher, mindestens in der Hauptsache, im Eiweißmolekül unbesetzt sein, soweit sie nicht, wie im Casein, an Phosphorsäurereste oder an andere prosthetische Gruppen gebunden sind.

Das vorliegende Material, dessen Lückenhaftigkeit und Unsicherheit allerdings nicht übersehen werden soll, spricht also in seiner Gesamtheit dafür, daß die Aminosäuren im Eiweißmolekül, mindestens der Hauptsache nach, durch die Carboxyle und die ihnen benachbarten α -Amino- bzw.

-Iminogruppen miteinander verbunden sind. Damit erscheint das allgemeine Strukturbild der Eiweißkörper gekennzeichnet durch die unverzweigte Peptidkettenformel



wobei die hydrophilen und hydrophoben, basisch oder sauer substituierten Reste der einzelnen Aminosäuren nach der Art von Seitenketten herausragen und für Haupt- und Nebenvaleurenreaktionen mit dem Außenmedium oder mit benachbarten Peptidketten bereitstehen. Bei den gefaserten Proteinen, denen ein streng geordneter kristalliner Aufbau zukommen muß, wird man dieses allgemeine Strukturbild für gesichert halten dürfen. Es ist denkbar und sogar wahrscheinlich, daß es bei reaktionsfähigeren Eiweißkörpern an besonderen und ausgezeichneten Stellen des Moleküls verlassen wird zugunsten anderer innerhalb des peptidartigen Aufbaues möglicher Verknüpfungsweisen.

Wenn wir uns diese Polypeptidketten in Übereinstimmung mit Emil Fischer, aber im Gegensatz zu anderen Annahmen, die vor etwa 10 Jahren propagiert wurden (66) als außerordentlich lange Gebilde vorstellen, so entspricht dies den Erfahrungen bei allen übrigen hochpolymeren Stoffen. Im Falle der Eiweißkörper stehen uns für die Beurteilung des Molekulargewichts noch die überraschenden Ergebnisse zur Verfügung, die The Svedberg (67) mit der Ultrazentrifugenmethode gewonnen hat. Es ist hier nicht möglich, auf das Prinzip dieser Methode einzugehen, die nicht nur die Größe des kinetischen Teilchens (kinetisches Molekulargewicht) eindeutig zu bestimmen erlaubt, sondern auch exakte Aussagen über die Einheitlichkeit oder Nichteinheitlichkeit der Teilchengröße erlaubt. Die Anwendung der Methode auf die Eiweißkörper hat zunächst ergeben (Tabelle 1), daß die meisten von ihnen, aber nicht alle, aus Teilchen gleicher und definierter Größe bestehen, was bei hochmolekularen Substanzen ja keineswegs selbstverständlich ist. Das überraschendste Ergebnis ist aber, daß die gefundenen Teilchengrößen, die durchweg in guter Übereinstimmung mit den auf anderen Wegen ermittelten stehen, in sehr vielen Fällen Vielfache des Wertes 34 500 zu sein scheinen; und zwar finden wir neben dem einfachen Wert 34 500 dessen Doppeltes, Dreifaches, Sechsfaches und auch noch höhere Vielfache. Merkwürdig ist dabei weniger, daß sich irgendwelche Grundeinheiten zu definierten Assoziaten aus 2, 3 oder 6 Teilchen zusammenfügen; sondern merkwürdig und vorläufig schwer erklärbar ist, daß bei zahlreichen Eiweißkörpern vorzugsweise ein Grundmolekül von ungefähr der gleichen Größe entsprechend dem Molekulargewicht 34 500 gebildet wird, obwohl diese Eiweißkörper in bezug auf ihre Aminosäurezusammensetzung ganz verschieden sind. Hier begegnen wir zum erstenmal Verhältnissen, die etwas nach Zahlenmystik aussehen; sie weisen darauf hin, daß der Aufbau der Eiweißkörper bis zum ganz hochmolekularen System durch bestimmte, uns vorerst noch unbekannte Gesetzmäßigkeiten geregelt wird.

Diese Überzeugung gibt uns den Mut, auch an die spezielle Konstitutionsaufklärung der Eiweißkörper heranzutreten, also an die Frage, in welcher Anordnung und Reihenfolge die einzelnen Aminosäuren in der Molekülkette eines bestimmten Proteins miteinander verknüpft sind. Gewiß gibt es erhebliche methodische Fortschritte seit Emil Fischer, die die Bearbeitung dieser Frage erleichtern. In den einheitlich dargestellten Proteinasen und Peptidasen besitzen wir spezifische Abbaureagenzien, welche die Polypeptidkette offenbar immer an

ganz bestimmten, wenn auch meist im einzelnen noch nicht bekannten Stellen angreifen. Gut ausgebildete analytische, meist colorimetrische Methoden (68) ermöglichen es, nicht nur die Menge bestimmter Aminosäuren, oft schon in

verteilt sich auf andere einfache Aminosäuren wie Alanin, Valin und Serin. Damit ergibt sich als einfachste Zusammensetzung die folgende:

10 Arginin, 1 Prolin, 4 Monoaminosäuren.

Diese 15 Aminosäuren würden ein Protein vom Molekulargewicht 2021 ergeben. Da die in diesem Falle nur ungenau bestimmbare Teilchengröße nach den Ergebnissen von *Svedberg* zwischen 1700 und etwa 3000 liegt, ist nicht anzunehmen, daß das Molekulargewicht ein Vielfaches dieses Wertes wäre.

Diese 15 Aminosäuren müssen durch 14 Peptidbindungen untereinander verbunden sein; sie enthalten zusammen 45 N-Atome. Protaminase, ein enzymatisch einheitliches und auf basische Eiweißbausteine eingestelltes Ferment, spaltet von diesen 14 Peptidbindungen $\frac{1}{7}$, also 2 Bindungen auf, wobei $\frac{1}{5}$ des gesamten Arginins, also 2 Argininreste, in Freiheit gesetzt werden. Das bedeutet, daß beide Argininreste vom Ende der Peptidkette abgespalten werden. Nun ergibt sich aus der gesamten Spezifität der Protaminase und insbes. aus ihrer Unwirksamkeit gegenüber Clupein- und Salminester, daß dieses Enzym Peptidketten vom Carboxylende her angreift. Es sind also im Falle des Clupeins 2 Argininreste am Carboxylende der Kette abgespalten worden.

Der verbleibende Rest (Clupean) steht dem Clupein noch sehr nahe. Er muß nach dem Vorausgehenden noch 8 Arginin, 1 Prolin und 4 Monoaminosäuren (entsprechend insgesamt 37 Stickstoffatomen) enthalten, die durch 12 Peptidbindungen vereinigt sind.

Aktiviertes Trypsin spaltet nun genau $\frac{1}{3}$ dieser Bindungen, löst also die Kette an 4 Stellen auf, wobei 5 Bruchstücke entstehen. Freie Aminosäuren sind in dem Abbaugemisch nicht enthalten. Durch eine systematische Fraktionierung mit Alkohol läßt sich das Hydrolysegemisch in eine leichter lösliche Fraktion und eine schwerer lösliche Fraktion zerlegen. In der leicht löslichen Fraktion ist das Verhältnis zwischen Amino- und Gesamtstickstoff = 1 : 5, in der schwerlöslichen Fraktion = 1 : 9; und zwar ist dieser Wert in beiden Fraktionen bei weiterer Fraktionierung konstant (Tabelle 2).

Tabelle 2.

	Dipeptidfraktion	Tripeptidfraktion
Anteil (Proz. des Gesamt-N)...	27 (= $\frac{10}{37}$)	73 (= $\frac{27}{37}$)
Amino-N : Gesamt-N	1 : 5	1 : 9
Arginin : Monoaminosäure	1 : 1	2 : 1
Prolin	fehlt	vorh.
Spaltbarkeit durch:		
Arginase	0	0
Dipeptidase (in Proz. der Bindungen)	100	0
Amino-Polypeptidase (in Proz. der Bindungen)	0	0
Carboxy-Polypeptidase (in Proz. der Bindungen)	50	50
Dipeptidase nach Carb.-Polypeptidase	—	30*)
Zusammensetzung**)	A—M } M—A }	A—M—A } A—M—A } A—P—A }

*) Proz. der ursprüngl. Peptidbindungen.

**) A = Arginin, M = Monoaminosäure, P = Prolin.

Ein Aminostickstoffgehalt von $\frac{1}{3}$ des Gesamtstickstoffs entspricht einem Dipeptid aus Arginin und einer anderen Monoaminosäure bzw. einem Gemisch aus Dipeptiden dieser Zusammensetzung. Das Verhältnis Aminostickstoff zu Gesamtstickstoff = 1 : 9 weist auf Tripeptide der Zusammensetzung 2 Arginin + 1 Monoaminosäure hin. Der quantitativ ermittelte Arginingehalt beider Fraktionen entspricht genau dieser Annahme.

Die Tripeptidfraktion enthält das gesamte Prolin, die Dipeptidfraktion ist frei davon. Auf die Dipeptidfraktion entfallen etwa 27% (= 10 N), auf die Tripeptidfraktion etwa 73% (= 27 N) des Gesamtstickstoffs (= 37 N). Dies bedeutet, daß das Clupein in 2 Dipeptide aus Arginin und Monoaminosäure und 3 Tripeptide aus 2 Arginin und einer Monoaminosäure zerlegt worden ist.

Die Tripeptidfraktion ist selbstverständlich unspaltbar für Dipeptidase, aber auch unspaltbar für Aminopolypeptidase;

Tabelle 1.

Eiweißkörper	Ultrazentrif. <i>Svedberg</i>	Osmot. Druck	Diffusion	Chem. Werte Schätzung
Eieralbumin	34 500	35 000	29 000	33 800
<i>Bence-Jones</i> Pr.	35 000			
Insulin	35 100			
Trypsin		34 500		
Pepsin	35 500		33 000	
Hämoglobin	68 000	67 000	68 500	68 000 (4Fe)
Katalase			68 900	
Casein	75 000			98 000
	100 000			
Serumglobulin ...	103 800			81 000
Edestin	208 000			
Amandin	208 000			
Excelsin	212 000			

Mikroansätzen, zu bestimmen, sondern auch vielfach ihre Abspaltung aus dem Eiweißverband beim Eiweißabbau quantitativ zu verfolgen. Auch die synthetischen Methoden sind erheblich weiter entwickelt (s. o.). Trotz allem würde die Lösung des Problems ziemlich hoffnungslos erscheinen, wenn wir uns vorstellen, daß die Natur die etwa 25 verschiedenen Aminosäuren, die ihr als Bausteine zur Verfügung stehen, ohne Regel und System zu dem aus etwa 300 Einzelbausteinen aufgebauten Riesenmolekül vom Molekulargewicht 35000 vereinige. In Wirklichkeit nützt aber die Natur wohl niemals alle theoretisch denkbaren Kombinationsmöglichkeiten aus, sondern sie bevorzugt einige wenige bestimmte Typen der Anordnung.

Ein Blick auf die Chemie der zusammengesetzten Kohlenhydrate soll dies erläutern. Schon die glucosidische Verknüpfung zweier Glucosereste zum Disaccharid läßt nicht weniger als 80 Isomeriemöglichkeiten zu, wenn wir die Konstitutions- und Ringisomerie und das Auftreten der α - und β -Form berücksichtigen. Wenn wir nur die wichtigsten der übrigen in der Natur vorkommenden Monosaccharide einbeziehen, dann steigt die Zahl der theoretisch denkbaren Isomeriemöglichkeiten schon für Tri- und Tetrasaccharide in astronomische Dimensionen. Trotzdem hat man bisher noch jedes natürliche Di- oder Trisaccharid in den Einzelheiten seiner Konstitution und Konfiguration aufklären können, und dabei hat sich ergeben, daß nur sehr wenige von den denkbaren Isomeriemöglichkeiten von der Natur tatsächlich verwirklicht worden sind.

Man darf daher überzeugt sein, daß die Natur auch im Gebiet der Eiweißkörper die theoretisch vorhandenen Kombinationsmöglichkeiten durch Bevorzugung bestimmter Verknüpfungstypen außerordentlich stark einschränkt. Die erste Einschränkung ist durch den Aufbau im wesentlichen unverzweigter Peptidketten unter Verknüpfung durch das Carboxyl und die ihm benachbarten α -Aminogruppen gegeben, die zweite sehe ich in einem periodischen Aufbau der Peptidkette selbst, d. h. in einer gesetzmäßigen Wiederholung gleicher oder doch analog gebauter Anordnungen aus verhältnismäßig wenigen Aminosäuren durch das gesamte Kettenmolekül der Eiweißkörper hindurch.

Ein erstes Beispiel dafür haben wir in der Konstitution des Clupeins, das dank den gründlichen Untersuchungen von *Waldschmidt-Leitz* (69) als erstes natürliches, wenn auch nicht ausgesprochen hochmolekulares Protein konstitutionell weitgehend als aufgeklärt gelten kann.

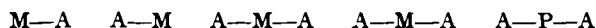
Im Clupein, dem basischen Eiweißkörper des Hering-spermas, trifft auf 2 Argininreste genau eine Monoaminosäure [*Kossel* (70)]. Von den Monoaminosäuren ist $\frac{1}{2}$ Prolin, der Rest

unter Berücksichtigung der Erfahrungen über die Spezifität dieses Enzyms ist hieraus zu schließen, daß keine Monoamino-säuren am Aminoende dieser Tripeptide stehen können, sondern, daß deren freie Aminogruppe einem Argininrest an-gehören muß.

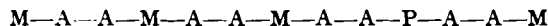
Carboxy-polypeptidase zerlegt in der Tripeptidfraktion die Hälfte der vorhandenen Peptidbindungen, wobei die Hälfte des Arginins, also Argininreste am Carboxylende, in Freiheit gesetzt werden. Demnach müssen die Tripeptide am Amino- und am Carboxylende Argininreste, in der Mitte eine andere Aminosäure enthalten. Nach der Einwirkung der Carboxy-polypeptidase findet man $\frac{2}{3}$ der verbleibenden Dipeptide für Dipeptidase spaltbar, ent-sprechend der Annahme, daß das Prolinedipeptid für Di-peptidase unangreifbar, die beiden anderen Peptide an-greifbar sind.

Die Dipeptidfraktion ent-hält Arginin und Monoamino-säure im Verhältnis 1:1 und kein Prolin. Sie wird von Dipepti-dase vollständig zerlegt, wäh-rend Carboxypolypeptidase nur die Hälfte der Peptidbindungen angreift und dabei die Hälfte des Arginins in Freiheit setzt. Dem entspricht nur die An-nahme, daß die Dipeptidfraktion eine Mischung aus gleichen Teilen eines Dipeptids Arginyl-monoamino-säure und Mono-amino-säure-arginin ist, wobei nur das letztere durch Carboxy-polypeptidase angegriffen wird.

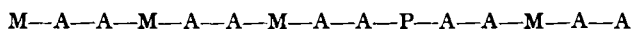
Die 5 Bruckstücke des Clupeanmoleküls lassen sich also in folgender Weise formulieren:



und zwanglos zum ursprünglichen Clupeanmolekül zusammen-fügen:



Fügen wir noch die beiden Argininreste hinzu, die von Prot-aminase am Carboxylende abgespalten worden waren, so ge-langen wir zum folgenden Strukturschema des Clupeins:



Hier mag die vorgenommene Zusammenfügung der 5 Peptid-bruchstücke willkürlich erscheinen. Sie ist aber die einzige, die eine einheitliche Deutung für die Angriffsweise des Tryp-sins zuläßt. Bei dieser Anordnung spaltet nämlich das Trypsin alle Peptidbindungen, die zwischen 2 Argininresten innerhalb der Peptidkette gelegen sind und nur diese; die Funktion der Protaminase dagegen besteht in der Abspaltung der Arginin-reste am Carboxylende.

Willkürlich in dieser Anordnung ist dagegen die Ein-reihung des Prolinrestes; er könnte ebensogut an Stelle einer beliebigen anderen mittelständigen Monoamino-säure in un-serem Schema stehen.

Gehen wir von den vergleichsweise niedermolekularen Protaminen zu hochmolekularen Eiweißkörpern über, dann vergrößern sich die Schwierigkeiten, die mit der Ermittlung der Aminosäureanordnung verbunden sind, ganz erheblich. Teilbezirke des Moleküls sind aber auch hier der Aufklärung zugänglich. Wir haben uns vor einiger Zeit der Unter-suchung des sog. Glutokyrins zugewandt, eines Gemisches basischer Abbauprodukte, die nach schon länger zurück-liegenden Untersuchungen von *M. Siegfried* (71) beim vor-sichtigen Abbau von Gelatine mit Säure entstehen und durch Phosphorwolframsäure abgeschieden werden können. Das Kyrin enthält, in üblicher Ausbeute isoliert, noch etwa die Hälfte der in der Gelatine vorhandenen basischen Aminosäuren. Die Ermittlung seiner Konstitution erlaubt also Aussagen, die für die Bindung dieser Aminosäuren im Gelatinemolekül immerhin wesentlich sind.

Das Glutokyrin, das in gut reproduzierbarer Zusammen-setzung gewonnen werden kann, haben wir mit Hilfe der von *van Slyke* (72) ausgearbeiteten Methode zur Bestimmung der N-Verteilung untersucht und die gewonnenen Ergebnisse, so-weit wie möglich, mit Hilfe präparativer Methoden kon-trolliert (73). Nach durchgreifender Hydrolyse findet man genau $\frac{2}{3}$ des Gesamtstickstoffs mit Phosphorwolframsäure fällbar, und zwar besteht dieser Anteil, wie aus dem Verhältnis von Amino- und Gesamtstickstoff und aus der quantitativen Argininbestimmung hervorgeht, aus Arginin und Lysin im

Tabelle 3.

	Amino-N/Gesamt-N		Basen-N/ Gesamt-N	Mono- amino- säure-N/ Gesamt-N	Amino-N/Gesamt-N		Arginin - N (als Flavi- anat best.) in % des Gesamt - N
	vor der Hydrolyse	nach der Hydrolyse			in den Basen	in den M.- Amino- säuren	
	%	%	%	%	%	%	%
Kyrin							
gef.	32,3	55,1	66,6	33,4	49,1	66,3	44,2
ber.	33,3	55,5	66,7	33,3	50,0	66,7	44,4
Argininpeptid							
gef.	19,7	40,1	80,1	19,9	26,5	95,5	78,3
ber.	20,0	40,0	80,0	20,0	25,0	100,0	80,0
Lysinpeptid							
gef.	49,6	74,8	48,3	51,7	100,7	47,9	—
ber.	50,0	75,0	50,0	50,0	100,0	50,0	—

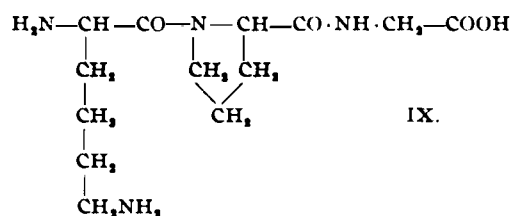
Verhältnis von 1:1 (Tabelle 3). Vom Stickstoff der Mono-amino-säurefraktion entfällt $\frac{1}{3}$ auf Prolin, der Rest auf nicht-cyclische Monoamino-säuren. Die Zusammensetzung ist also:

1 Arginin, 1 Lysin, 1 Prolin, 2 nichtcyclische Mono-amino-säuren.

Wenn diese 5 Aminosäuren, die zusammen 9 N-Atome enthalten, zu einem Pentapeptid vereinigt wären, müßten 2 Aminogruppen ($\approx \frac{2}{5}$ des Gesamtstickstoffs) nach *van Slyke* bestimmbar sein. In Wirklichkeit sind aber 3 freie Amino-gruppen vorhanden, woraus hervorgeht, daß es sich um ein Gemisch aus Dipeptid und Tripeptid handeln muß.

Die Zerlegung des Gemisches ist gelungen. Das erhaltene Tripeptid besteht aus Lysin, Prolin und Glykokoll im mo-laren Verhältnis. Es ist frei von Arginin. Die Dipeptidfraktion besteht aus Arginin und Monoamino-säure im Verhältnis 1:1. Sie ist frei von Prolin und Glykokoll.

Die Dipeptidfraktion scheint nicht völlig einheitlich zu sein. Dagegen konnte das lysinhaltige Tripeptid in seiner Konstitution aufgeklärt werden. Durch Nierenpeptidase wird eine von den beiden Peptidbindungen gelöst, wobei nur Carb-oxylzuwachs, aber kein Zuwachs an NH_2 -Gruppen entsteht. Zugleich wird das gesamte Lysin in Freiheit gesetzt. Es ist also eine Peptidbindung zwischen dem Stickstoff des Prolins und der Carboxylgruppe des Lysins gelöst worden. Das ver-bleibende Dipeptid (Prolyl-glycin) kann zu Prolin und Glyko-koll aufgespalten werden. Das Tripeptid muß also Lysyl-prolyl-glycin sein. (IX.)



Bergmann hat kürzlich auf Grund neuer Baustein-analysen eine Hypothese über den Aufbau des Gelatine-moleküls aufgestellt (74). Nach seinen Befunden macht Glykokoll $\frac{1}{3}$, Prolin $\frac{1}{6}$ und Oxyprolin $\frac{1}{6}$ der in der Gelatine anwesenden Aminosäuren aus. In Anlehnung an Vor-stellungen von *Atkin* und *Asbury* vertritt er die Ansicht,

daß diese 3 Aminosäuren eine periodisch wiederkehrende Anordnung im Kollagenmolekül bilden:

1. G—P—X—G—X—X—G—P—X—G—X—X
oder
 2. G—X—P—G—X—X—G—X—P—G—X—X
- (G = Glykokoll, P = Prolin, X = andere Aminosäuren)

Lysyl-prolyl-glycin läßt sich nur in Schema 2 einreihen, während es in der Anordnung 1 nicht untergebracht werden kann.

Bausteinanalyse und systematischer Abbau führen also zunächst bei den Protaminen und beim Kollagen zur Vorstellung eines periodischen Aufbaues der Molekülkette. Allerdings wird man mit einer Verallgemeinerung der an den genannten Eiweißkörpern gefundenen Regelmäßigkeiten vorsichtig sein müssen. Kollagen ist ein Fasereiweiß, bei dem der molekulare Aufbau schon mit Rücksicht auf die Gitterstruktur besonders regelmäßig sein muß; die Protamine andererseits nehmen wohl überhaupt eine Sonderstellung innerhalb der Eiweißkörper ein.

Nun gibt es aber noch eine weitere Gruppe von Beobachtungen, die nur in der gleichen Weise erklärt werden können. Es sind dies die eigentümlichen ganzzahligen Verhältnisse, die von *Waldschmidt-Leitz*, *Schäffner* und mir (75) erstmals schon vor 10 Jahren bei stufenweisem Abbau von Eiweißkörpern beobachtet und inzwischen immer wieder angetroffen worden sind. Behandelt man Eiweißkörper aufeinanderfolgend mit einheitlichen proteolytischen Enzymen, und zwar jeweils bis zur völligen Aufspaltung der für das betreffende Enzym löslichen Peptidbindungen, so findet man, daß jedes der angewandten Enzyme einen bestimmten einfachen Bruchteil der Gesamtpeptidbindung aufzulösen vermag, und daß die Leistungen der einzelnen Enzyme untereinander in einem einfachen ganzzahligen Verhältnis stehen.

Die seinerzeit von *Waldschmidt-Leitz* und Mitarb. gefundenen Zahlen, die, wie wir heute wissen, aus Versuchen mit noch nicht genügend einheitlichen Enzymen und Substraten herrühren, mögen da und dort revisionsbedürftig sein. Sicher ist, daß das damalige Ergebnis im wesentlichen richtig und für das Eindringen in die Aufbauprinzipien der Eiweißkörper grundlegend war. Daß auch bei hochmolekularen und physiologisch aktiven Eiweißkörpern diese eigentümlichen ganzzahligen Verhältnisse wieder gefunden werden, zeigen neue Ergebnisse von *Calvery* (76), die sich auf Versuche mit kristallisiertem Eialbumin und

anordnungen eindeutig zuzuordnen. So liegt, wie ich glaube, die Aufklärung der Eiweißkörper oder doch ihrer wesentlichsten Strukturprinzipien durchaus im Bereiche unserer methodischen Möglichkeiten, wenn auch noch eine wahrscheinlich jahrzehntelange und mühsame Forschungsarbeit erforderlich sein wird, um solche Ziele zu erreichen.

Schrifttum.

- (1) E. Fischer, Ber. dtsch. chem. Ges. **39**, 530 [1906].
- (2) E. Fischer, ebenda **34**, 433 [1901]; Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **33**, 151 [1901]; E. Fischer u. E. Abderhalden, ebenda **36**, 268 [1902]; A. Kossel u. F. Kutscher, ebenda **31**, 165 [1900]; A. Kossel u. A. J. Patten, ebenda **38**, 39 [1903].
- (3) H. J. Dakin, J. biol. Chemistry **44**, 499 [1920]; Jones-Foreman, ebenda **8**, 463 [1914]; **13**, 378 [1919]; M. A. B. Brazier, Biochemical J. **24**, 1188 [1930]; M. Bergmann, L. Zervas, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **152**, 282 [1926]; J. Kapfhammer u. R. Eck, ebenda **170**, 294 [1927]; M. Bergmann, J. biol. Chemistry **109**, 317; **110**, 471 [1935].
- (4) Zusammenfassender Vortrag von F. Hofmeister, Naturwiss. Rdsch. **17**, 529 [1902].
- (5) Th. Curtius, J. prakt. Chem. [2] **70**, 57 [1904], daselbst auch historischer Überblick.
- (6) F. Kögl, A. Hagen-Smith u. H. Erxleben, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **228**, 90 [1934].
- (7) H. Kraut, E. K. Frey, F. Schultz, ebenda **205**, 99 [1932].
- (8) F. G. Fischer u. H. Ertel, ebenda **202**, 83 [1931].
- (9) K. Freudenberg, E. Weiß u. H. Biller, ebenda **233**, 172 [1935].
- (10) E. Fischer, S.-B. preuß. Akad. Wiss., Physik.-math. Kl. **1907**, 35.
- (11) R. Willstätter, K. Schneider u. E. Wenzel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **151**, 1 [1926]; R. Willstätter u. E. Bamann, ebenda **173**, 17 [1928]; R. Willstätter, J. Chem. Soc., London **1927**, 1359; Naturwiss. **15**, 585 [1927].
- (12) J. J. Abel, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. **12**, 132 [1926].
- (13) D. A. Scott, Biochemical J. **28**, 1592 [1934]; D. A. Scott u. A. M. Fisher, ebenda **29**, 1048 [1935].
- (14) K. Freudenberg u. Th. Wegmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **233**, 159 [1935].
- (15) K. Zeile u. H. Hellström, ebenda **192**, 171 [1930].
- (16) K. Agner, ebenda **235**, Nr. 3/4, II—III [1935].
- (17) K. G. Stern, J. biol. Chemistry **112**, 661 [1935].
- (18) R. Hill u. H. F. Holden, Biochemical J. **20**, 1326 [1926].
- (19) O. Warburg u. E. Negelein, Biochem. Z. **244**, 9 [1931].
- (20) D. Keilin, Proc. Roy. Soc., London, Ser. B **106**, 418 [1930].
- (21) H. Theorell, Biochem. Z. **285**, 207 [1936].
- (22) O. Warburg u. W. Christian, ebenda **254**, 438 [1932]; **266**, 377 [1933]; H. Theorell, ebenda **272**, 155 [1934]; **278**, 263 [1935].
- (23) O. Warburg, W. Christian u. A. Griese, ebenda **282**, 157 [1935]; **279**, 143 [1935]; O. Warburg u. W. Christian, ebenda **274**, 112 [1934]; **275**, 37, 347 [1935].
- (23a) E. Negelein u. E. Haas, Biochem. Z. **282**, 206 [1935].
- (24) H. Kraut u. W. v. Panschenko-Jurewicz, ebenda **275**, 114 [1935]; **285**, 407 [1936].
- (25) W. Graßmann und Mitarbeiter, unveröffentlicht.
- (26) J. B. Sumner, J. biol. Chemistry **69**, 435 [1926].
- (27) J. H. Northrop, J. gen. Physiol. **13**, 739, 767 [1930].
- (28) J. H. Northrop u. M. Kunitz, ebenda **16**, 267 [1934].
- (29) J. H. Northrop u. M. Kunitz, ebenda **18**, 433 [1935].
- (30) M. L. Anson, Science, New York **81**, 467 [1935].
- (31) L. Langstein, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **31**, 49 [1900]; H. Steudel, ebenda **34**, 535 [1901].
- (32) P. A. Levene, J. biol. Chemistry **84**, 51 [1929]; M. Soerensen u. M. Haugaard, Biochem. Z. **260**, 247 [1933].
- (33) W. Graßmann u. H. Schleich, ebenda **277**, 320 [1935].
- (34) K. Landsteiner, ebenda **119**, 294 [1921]; M. Heidelberger u. O. T. Avery, J. exp. Medicine **40**, 301 [1924].
- (35) F. Haurowitz u. H. Waelsch, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **182**, 82 [1929].
- (36) M. Bergmann u. L. Zervas, Ber. dtsch. chem. Ges. **65**, 1902 [1932].
- (37) A. Bertho u. J. Maier, Liebigs Ann. Chem. **495**, 113 [1932].
- (38) K. Maurer u. B. Schiedt, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **231**, 1 [1934].
- (39) v. Przlecki u. Mitarbeiter, Biochem. Z. **277**, 416, 420, 424; **280**, 92 [1935/36].
- (40) P. A. Levene, J. biol. Chemistry **101**, 711 [1933]; G. Schmidt, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **223**, 86 [1933]; P. A. Levene u. F. Lipmann, J. biol. Chemistry **98**, 109 [1932]; F. Lipmann Naturwiss. **21**, 236 [1933].
- (41) A. E. Mirsky u. M. L. Anson, J. gen. Physiol. **19**, 427, 439 [1936].
- (42) A. E. Mirsky u. M. L. Anson, ebenda **19**, 451 [1936].
- (43) H. Baue u. G. Strauß, Biochem. Z. **284**, 197 [1936].
- (44) F. Haurowitz

Tabelle 4.

Protein	Reihenfolge der Enzyme	Zuwachs COOH	(cm ³ n/100 NH ₂)	Enzymatische Leistung
Eialbumin	Papain	2,7	2,8	9
	Erepsin	5,0	5,1	18
	Trypsin	2,6	2,7	9
	Protaminase	0,6	0,7	2
	Erepsin	4,5	4,5	16
	Papain-HCN	5,6	5,6	18
	Erepsin		2,2	9

einwandfrei definierten Enzymen beziehen. Diese Zahlen (Tabelle 4) lassen eine Scheidung der Peptidbindungen in Gruppen zu Dritteln der überhaupt spaltbaren erkennen. Man wird sie wohl am besten durch die Annahme verstehen können, daß auch im Eialbumin wie in den Protaminen und im Kollagen analog oder ähnlich gebaute Gruppen aus je 3 Aminosäuren in periodischer Weise stetig wiederkehren. Die Molekülstruktur des Eialbumins wird in dem Augenblick im wesentlichen geklärt sein, wo es gelungen ist, den Zahlen von *Calvery* bestimmte Struktur-

witz u. H. Waelsch, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 182, 82 [1929]; L. Michaelis u. H. Davidsohn, Biochem. Z. 33, 456 [1911]; F. Mainzer, ebenda 246, 156, 182 [1932]. — (45) R. Willstätter, W. Graßmann u. O. Ambros, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 151, 286 [1925]; R. Willstätter u. H. Persiel, ebenda 142, 245 [1925] u. zwar S. 253, vgl. hierzu die Beiträge von A. K. Balls u. T. C. Swenson, J. biol. Chemistry 106, 109 [1934]. — (46) F. Haurowitz, l. c.; R. Hill u. H. F. Holden, l. c. — (47) J. H. Northrop u. M. Kunitz: Ergebnisse d. Enzymforsch. I 1931, S. 302, II 1932, S. 104, V 1936, S. 79. — (47a) M. Spiegel-Adolf, Biochem. Z. 170, 126 [1926]; Naturwiss. 15, 799 [1927]; M. L. Anson u. A. E. Mirsky, siehe bei Wo. Pauli u. E. Valkó: Kolloidchemie der Eiweißkörper, Theod. Steinkopf 1933, S. 127. — (47b) M. L. Anson u. A. E. Mirsky, J. gen. Physiol. 17, 393 [1934]. — (48) E. Waldschmidt-Leitz, W. Graßmann, Übersicht in W. Graßmann Erg. d. Enzymforsch. I, 1931, S. 127. — (49) M. Bergmann u. L. Zervas, Ber. dtsh. chem. Ges. 65, 1192 [1932]. — (50) H. v. Euler u. K. Josephson, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 157, 122 [1926]; 162, 85 [1926]; Ber. dtsh. chem. Ges. 60, 1351 [1927]; E. Waldschmidt-Leitz u. Mitarbeiter, ebenda 60, 359 [1927]; 61, 229, 640, 645 [1928]; W. Graßmann u. H. Dyckerhoff, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 175, 18 [1928]; Ber. dtsh. chem. Ges. 61, 656 [1928]. — (51) W. Graßmann, H. Dyckerhoff u. O. v. Schoenebeck, ebenda 62, 1307 [1929]; W. Graßmann, O. v. Schoenebeck u. G. Auerbach, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 210, 1 [1932]; E. Abderhalden u. H. Nienburg, Fermentforsch. 13, 573 [1932]. — (52) M. Bergmann u. J. S. Fruton, Science, New York 83, 2152 [1936]. — (53) M. Bergmann, L. Zervas u. H. Schleich, Ber. dtsh. chem. Ges. 65, 1747 [1932]. — (54) W. Graßmann u. O. Lang, Biochem. Z. 269, 211 [1934]; W. Graßmann u. K. Riederle, ebenda 284, 177 [1936]. — (55) W. Graßmann u. H. Bayerle,

ebenda 268, 214 [1934]. — (56) W. Graßmann u. F. Schneider, ebenda 273, 452 [1934]. — (57) Osborne u. Gilbert, Amer. J. Physiol. 15, 333 [1906]. — (58) W. Graßmann, Habilitationsschrift München 1928; W. Graßmann u. O. Mayer, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 214, 185 [1933]. — (59) M. Damodaran u. Ch. Chibnall, Biochemical J. 26, 235, 1704 [1932]. — (60) Skraup, Mh. Chem. 27, 631 [1906]; D. van Slyke u. L. Birchard, J. biol. Chemistry 16, 539 [1913]. — (61) St. Goldschmidt u. A. Kinsky, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 183, 244 [1929]. — (62) D. van Slyke u. W. Birchard, J. biol. Chemistry 15, 539 [1914]; vgl. aber hierzu K. Felix, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 110, 217 [1920]. — (63) A. Kossel u. F. Weiß, ebenda 78, 402 [1912]; 84, 1 [1913]. — (64) E. J. Czarnetzky u. C. L. A. Schmidt, J. biol. Chemistry 105, 301 [1933]. — (65) E. Abderhalden u. F. Schweitzer, Fermentforsch. 12, 350 [1931]. — (66) E. Abderhalden, M. Bergmann u. a. — (67) The Svedberg, Literaturzusammenstellg. Naturwiss. 22, 225 [1934]. — (68) Z. B. Arginin als Flavianat oder mit Arginase; Prolin als Isatinfarbstoff; colorimetrische Methoden für Glykokoll, Tyrosin, Histidin, Tryptophan, Cystin s. A. Winterstein, Klein: Hdb. der Pflanzenanalyse, Bd. IV, 1. — (69) E. Waldschmidt-Leitz u. E. Kofranyi, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 236, 181 [1935]. — (70) A. Kossel u. H. D. Dakin, ebenda 41, 414 [1904]. — (71) M. Siegfried, ebenda 43, 46 [1904]; 48, 54 [1906]; 50, 163 [1906]; 84, 288 [1913]; 97, 233 [1916]. — (72) D. van Slyke, J. biol. Chemistry 10, 15 [1911]; 22, 281 [1915]; 39, 479 [1919]. — (73) W. Graßmann u. O. Lang, Biochem. Z. 269, 211 [1934]; W. Graßmann u. K. Riederle, ebenda 284, 177 [1936]. — (74) M. Bergmann, J. biol. Chemistry 110, 470 [1935]. — (75) E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner u. W. Graßmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 156, 68 [1926]. — (76) H. O. Calvery, J. biol. Chemistry 102, 73 [1933]. [A. 141.]

Dielektrische Verlustmessung als physikalisch-chemische Untersuchungsmethode für flüssige Nichtleiter und Halbleiter*)

Von Doz. Dr. P. WULFF,

nach Versuchen von H. SCHWINDT

Physikalisch-Chemisches Institut

der Universität München

Eingeg. 8. Oktober 1936

Nach Erörterung der Grundlagen der dielektrischen Verlustmessung¹⁾ und der allgemeinen Erscheinungen, die man dabei beobachten kann, und der bisher dafür entwickelten Theorie, durch welche diese zum mindesten qualitativ gut erfaßt werden, erheben sich verschiedene Fragen, von denen zunächst drei als besonders wichtig herausgegriffen seien:

1. Was bietet die Verlustmessung Neues für die Erkenntnis der Struktur der Materie und ihres Verhaltens?
2. Inwiefern kann die Verlustmessung als Untersuchungsverfahren mehr oder weniger Aussagen liefern als die Bestimmung der Dielektrizitätskonstanten?
3. Was für Aussichten eröffnet die Verlustmessung für die praktisch-technische Anwendung?

Da es sich um wissenschaftliches Neuland handelt, muß man sich zu allererst einen Überblick über das Verhalten des Dielektrischen Verlustfaktors (DV) bei verschiedenen Stoffklassen und Systemen verschaffen. Mit dieser Frage haben wir systematisch begonnen und haben trotz zahlreicher Meßreihen erst einen recht kleinen Ausschnitt gewonnen. Unsere Meßergebnisse sollen jedoch nach einer anderen Ordnung besprochen werden, als sie durch die oben angeführten Fragen gegeben ist. Diese

Fragen werden dann anläßlich der Erörterung des DV 1. bei Einstoffsystemen, 2. bei Zweistoffsystemen und 3. bei der Veränderung vorgegebener Systeme durch chemische Vorgänge beantwortet.

A. Einstoffsysteme.

Es erhebt sich zunächst die Frage, ob reine dipollose Stoffe überhaupt dielektrische Verluste haben. Nach Formel (16)²⁾ unserer früheren Arbeit müßte für den Fall, daß die elektrostatische $DK = \epsilon_1$ dem Quadrat des Brechungsindex für lange Wellen $n_\infty^2 = \epsilon_0$ gleich ist, $\text{tg} \delta$ verschwinden. Nach der Theorie der anomalen Dispersion von Debye³⁾ tritt dies dann ein, wenn das Dipolmoment μ den Wert Null hat. Wie wir jedoch schon in unserer früheren Arbeit¹⁾ zeigten, findet man auch für dipollose Stoffe einen zwar sehr kleinen, aber durchaus endlichen und meßbaren, anscheinend frequenz- und temperaturunabhängigen DV (vgl. auch Tab. 1 und Abb. 1). Vielleicht macht sich hier der Beitrag bemerkbar, den induzierte Dipole zur gesamten Polarisation liefern.

Bei dieser Zusammenstellung fällt, wie schon früher angedeutet, auf, daß auch Toluol einen kaum größeren Verlustfaktor hat als Benzol. Die Ursache hierfür ist, daß

*) Vorgetragen in der Fachgruppe für Fettchemie auf der 49. Hauptversammlung des V. D. Ch. in München am 9. Juli 1936.

¹⁾ Vgl. L. Rohde, P. Wulff u. H. Schwindt, diese Ztschr. 49, 437 [1936].

²⁾ Diese Ztschr. 40, 437 [1936].

(16) $\text{tg} \delta = \frac{(\epsilon_1 - \epsilon_0)x}{\epsilon_1 + \epsilon_0 x^2}$ (17) $x = \frac{\epsilon_1 + 2}{\epsilon_0 + 2} \omega \tau$.

³⁾ Vgl. P. Debye: Polare Molekeln, Leipzig 1929.