

# ANGEWANDTE CHEMIE

HERAUSGEGEBEN IM AUFTRAGE DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

62. Jahrgang · Nr. 17 · Seite 395–422 · 7. September 1950

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

## Die Plasmaeiweißkörper im Blickfeld des Chemikers\*

Von Dr. HERM. E. SCHULTZE, Behringwerke Marburg, Chemische Abteilung

Seit Anfang des Jahrhunderts haben die Biologen das Protein-Gebiet eingehend bearbeitet. Emil Fischer, dem wir den Nachweis von Peptid-Ketten in den Proteinen verdanken, hat 1906<sup>1)</sup> die Prophezeiung ausgesprochen, daß sich die organische Chemie eines Tages wieder den Eiweißkörpern zuwenden wird. Diesen Zeitpunkt hielt Graßmann 1937<sup>2)</sup> für noch nicht gekommen. Nach weiteren 12 Jahren erscheint es nun reizvoll, die Frage für das z. Z. besonders aktuelle Gebiet der Plasmaeiweißkörper erneut aufzuwerfen. Es wird daher eine Übersicht vorgelegt, welche den heutigen Stand der Plasmaeiweiß-Forschung vermittelt und dem Chemiker Anregungen geben soll.

Die Hauptfraktionen normaler Plasmaproteine  
Spezielle und atypische Plasmaeiweißkörper  
Biologische und kolloidchemische Bedeutung der Plasmaproteine  
Spezifische Bindungsreaktionen mit Plasmaeiweißkörpern  
Makromolekularer Aufbau

Einfluß der peripheren Aminosäuren auf die Löslichkeit und Ladung der Plasmaeiweißkörper  
Albumin-Reinigung  
Antikörperreinigung  
Alkohol-Fraktionierungsverfahren von Cohn

### Die Hauptfraktionen normaler Plasmaproteine

Das menschliche und tierische Plasma enthält sehr zahlreiche Eiweißkörper. Unter ihnen nimmt das nur in Durchschnittsmengen von 0,2–0,3% vorkommende Fibrinogen insofern eine Sonderstellung ein, als es das einzige im Plasma vorkommende Linearprotein<sup>2a)</sup> ist. Es bildet bei Anwesenheit von Spuren von Thrombin ein dichtes Fasernetz von Fibrin, das nach erfolgter Synärese die in Lösung verbliebenen Serumproteine zurückläßt. Diese sind Sphäroproteine und werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt, die Globuline und die Albumine, deren biologische, physikalische und chemische Eigenschaften erheblich voneinander abweichen. Die in einer großen Zahl von Varianten vorkommenden Globuline sind die Träger spezifischer biologischer Aktivitäten. Sie unterscheiden sich untereinander durch ihre verschiedene elektrophoretische Beweglichkeit, ihre Molekellgröße und -form, und sind chemisch betrachtet Glukoproteide oder Glukolipidproteide. Dagegen haben sich die Albumine des Säugерplasmas, nachdem sie durch Krystallisation in einem befriedigenden Reinheitsgrad gewonnen werden konnten, als eine in einem weiten pH-Bereich einheitliche Körperlasse vom Molekulargewicht ( $M = 69000$ ) und einer definierten Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Felde erwiesen. Im Gegensatz zu den Globulinen fehlen ihnen die Merkmale irgendeiner spezifischen Wirksamkeit und ebenso markante prothetische Gruppen. Abgesehen von minimalen Mengen Kohlenhydrat und freier Fettsäure setzen sich die Tierserumalbumine nur aus Aminosäuren zusammen, unter denen das Tryptophan in auffallend geringer Menge vertreten ist. Man kann also mit einfachen Reaktionen ein Albumin von einem Globulin unterscheiden.

Man hat versucht, die komplexe Globulin-Gruppe durch fraktionierte Fällung aufzuteilen. Die einschlägigen sehr zahlreichen Arbeiten wurden bisher unter vorwiegend biologischer Zielsetzung durchgeführt. Sie können den Chemiker nicht befriedigen, weil Definitionen von Unterfraktionen ohne ausreichende Kontrollen der Einheitlichkeit vorgenommen wurden. So hat man z. B. die Begriffsbestimmung des Euglobulins für

\* Vortragt am 13. 12. 1949 vor der Marburger Chem. Gesellschaft. Erweiterte Fassung.

<sup>1)</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. 39, 530 [1906].

<sup>2)</sup> Diese Ztschr. 50, 65 [1937].

<sup>2a)</sup> Die mit Hilfe indirekter phys. chem. Verfahren abgeleitete Faserstruktur des Fibrinogens steht in Widerspruch zu den Ergebnissen neuester Elektronenopt. Messungen von C. E. Hale, J. Amer. Chem. Soc. 71, 1138 [1949]; K. R. Porter u. Cl. von Zandt Hawn, J. exp. Medicine 90 [1949] u. von H. Braunsteiner u. H. Febré, Acta Haematol. 3, 174 [1950], nach denen das Fibrinogen des Menschen und Rindes einen scheibenförmigen Habitus mit einem Längsdurchmesser von nur 160–230 Å aufweist. Da sich das Fibrinogen somit hinsichtlich seiner Längsstruktur nicht mehr wesentlich von der übrigen Plasmaproteine unterscheiden scheint, wird man künftig auf eine Aufteilung der Plasmaeiweißkörper in Linear- und Sphäroproteine verzichten können.

eine Globulin-Fraktion eingeführt, die im isoelektrischen Punkt bei niederer Ionenstärke unlöslich ist und später dieselbe Definition auf die bei Drittelsättigung mit Ammonsulfat oder die bei einem bestimmten pH und nicht genau bestimmten Elektrolytgehalt fällbaren Serumproteine übertragen. Viel später hat man erkennen müssen, daß durch die angeführten Verfahren qualitativ und quantitativ verschiedene Globuline abgeschieden werden<sup>3)</sup>. Ebenso uneinheitlich sind die jeweiligen in Lösung verbleibenden Globulin-Anteile, für die man die Bezeichnung Pseudoglobulin vorgeschlagen hat. Selbst die lange als charakteristisch für Albumine betrachtete Löslichkeit in gesättigter Magnesiumsulfat-Lösung, halbgesättigter Ammonsulfat-Lösung oder in 22,5proz. Natriumsulfat-Lösung stellt nach neueren Untersuchungen kein Kriterium für Einheitlichkeit dar<sup>4)</sup>. Betrachtet man schließlich die Fraktionierungsergebnisse, die unlängst mit Kaliumphosphat<sup>5)</sup>, Natriumcitrat<sup>6)</sup> und mit Alkohol<sup>7)</sup> erzielt werden konnten, so muß gesagt werden, daß es bisher noch nicht gelungen ist, einen chemisch definierten Eiweißkörper durch eine einzige Fällung aus dem Plasma zu isolieren. Die besten Resultate werden durch geeignete Kombinierung verschiedener Verfahren erzielt, von denen jedes, um reproduziert werden zu können, hinsichtlich der Reaktionsbedingungen sehr genau durchgearbeitet sein muß.

### Spezielle und atypische Plasmaeiweißkörper

Dennoch ergaben sich einige recht interessante und auch für den Chemiker wichtige Ergebnisse. So konnte nachgewiesen werden, daß die Eiweißzusammensetzung im Plasma ausgewachsener Säuger auffallend konstant, von Art zu Art aber verschieden ist. In extremen Fällen ist es daher möglich, aus den durch Salz- oder Alkohol-Fraktionierung erhaltenen Fällungskurven auf eine bestimmte Tierart zu schließen.

- <sup>3)</sup> A. Tiselius, Biochemic. J. 31, 1464 [1937]; E. J. Cohn, T. L. McMeekin, J. L. Oncley, J. M. Newell u. W. L. Hughes Jr., J. Amer. Chem. Soc. 62, 3386 [1940]; H. Svensson, J. biol. Chemistry 139, 805 [1941]; J. T. Edsall, Adv. Protein Chem. 3, 429 [1947].  
<sup>4)</sup> P. E. Howe, J. biol. Chemistry 49, 93 [1921]; Physiologic. Rev. 5, 439 [1925]; E. J. Cohn, Chem. Rev. 28, 395 [1941]; K. O. Pedersen, Ultra-centrifugal Studies on Serum and Serum Fractions, Uppsala [1945].  
<sup>5)</sup> A. M. Butler u. H. Montgomery, J. biol. Chemistry 99, 173 [1932]; A. M. Butler, H. Blatt u. H. Southgate, ebenda 109, 755 [1935]; F. Wuhrmann u. C. Wunderly, Benno Schwabe u. Co. Verlag, Basel 1947, 64.  
<sup>6)</sup> E. Jameson u. C. Alvarez-Tostado, J. Amer. Chem. Soc. 65, 459 [1943].  
<sup>7)</sup> E. J. Cohn, J. A. Luetscher Jr., J. L. Oncley, J. Amer. Chem. Soc. 62, 3396 [1940]; E. J. Cohn, U. S. P. 2390074 [1945]; L. Pillemer u. C. Hutchinson, J. biol. Chemistry 158, 299 [1945]; E. J. Cohn, L. E. Strong, W. L. Hughes Jr., D. J. Mulford, J. Ashworth, M. Melin u. H. L. Taylor, J. Amer. Chem. Soc. 68, 459 [1946]; H. F. Deutsch, R. A. Alberta u. L. J. Gostling, J. biol. Chemistry 165, 21 [1946]; dieselben u. J. W. Williams, ebenda 164, 109 [1946]; E. L. Smith u. T. D. Gerlough, ebenda 167, 679 [1947]; E. C. Gessing u. A. Chanutin, ebenda 169, 657 [1947]; dieselben u. S. Ludewig, ebenda 170, 551 [1947]; J. C. Nichol u. H. F. Deutsch, J. Amer. Chem. Soc. 72, 80 [1948]; E. L. Hess u. H. F. Deutsch, ebenda 70, 84 [1948]; J. J. Quigley, J. biol. Chemistry 172, 713 [1948]; H. F. Deutsch u. J. C. Nichol, ebenda 176, 797 [1948].

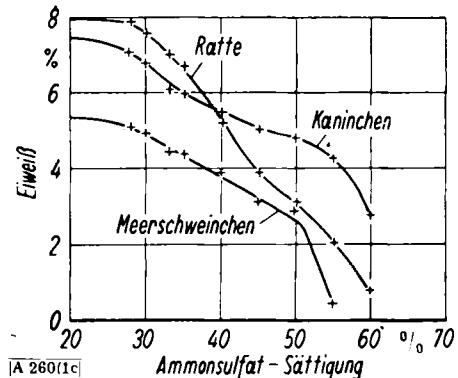
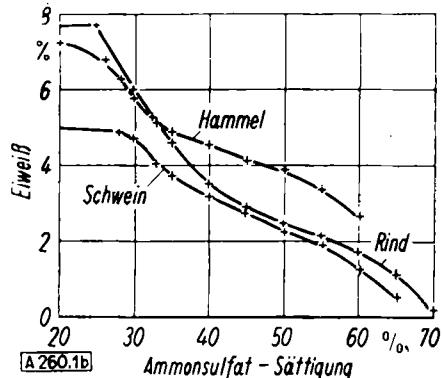
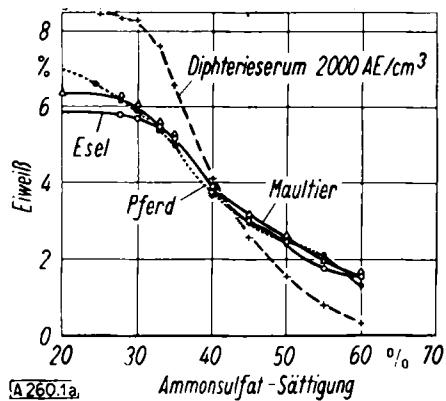


Bild 1a-c  
Ammonsulfat-Fällungskurven verschiedener Tierseren

Wie die bereits vor 20 Jahren<sup>8)</sup> aufgenommenen Kurven (Bild 1 a-c) zeigen, ist die Fällbarkeit der Serum eiweißkörper durch gesättigte neutrale Ammonsulfat-Lösung nur bei verwandten Tierarten (Pferd, Maultier, Esel) ähnlich. Bei anderen Tieren weist sie charakteristische Unterschiede auf. Auffallenderweise ist eine Konstanz im Eiweißaufbau immer erst nach Ablauf einer Entwicklungsperiode zu beobachten<sup>9)</sup>. Besonders typisch ist der Einfluß der embryonalen Entwicklung auf die Plasmazusammensetzung bei Huftieren, bei denen im sog. Fetus<sup>10)</sup> ein ungewöhnlich saurer Eiweißkörper vom Mol.-Gewicht 50000 gefunden wurde, der nach der Geburt im Verlaufe eines Jahres allmählich durch das normale Plasmaglobulin ersetzt wird. Das neugeborene Huftier enthält weder Globuline noch Antikörper. Die letzteren werden ihm erstmalig durch das Colostrum zugeführt<sup>11)</sup>. Dagegen sind bei Menschen und Nagetieren offenbar infolge einer günstigeren Placentapermeabilität die normalen Globuline und auch manche Antikörper im Plasma Neugeborener bereits vorhanden<sup>12)</sup>.

Unter pathologischen Einflüssen vollzieht sich eine oft sehr beträchtliche Verschiebung im Eiweißspektrum im Sinne einer Globulin-Vermehrung und einer Albumin-Verminderung<sup>13)</sup>. Da die Albumine ausschließlich in der Leber, die Globuline dagegen auch extrahepatogen gebildet werden<sup>14)</sup>, läßt sich das Albumin-Defizit vielleicht dadurch erklären, daß je nach den Krankheitsbildern entweder eine Störung der Leberfunktion die Albumin-Synthese unterbindet oder eine Gefäß- bzw. Permeabilitätsstörung eine Abschwemmung der verhältnismäßig niedermolekularen Albumine in das Gewebe oder den Harn verursacht. Bei bestimmten Krankheiten (Nephrose, Nephritis, Leberatrophie, Arthritis, Myelomatose) wird auch die Bildung sog. atypischer Eiweißkörper<sup>15)</sup> beobachtet. Charakteristisch für das menschliche Plasma ist die Anwesenheit des Protein X<sup>16)</sup>, eines sehr hochmolekularen ( $M = \text{ca. } 1,3 \text{ Millionen}$ ), lipoid-reichen Eiweißkörpers, der beim Verdünnen dissoziiert und im Tierreich noch nicht oder nur in sehr kleinen Mengen aufgefunden werden konnte. Während es sich bei den atypischen Proteinen wie z. B. dem Bence-Jones-Eiweiß ( $M = 35000$ )<sup>17)</sup> oder

dem Pneumokokken-Polysaccharid-Antikörper der Huftiere ( $M = 990000$ )<sup>18)</sup> um chemisch charakterisierbare Protein-Individuen handelt, liegt im normalen menschlichen Protein X eine Komplexverbindung vor, die an die von Bungenberg de Jong bei Leцитin-Eiweißsystemen beschriebenen Komplexkoazervate erinnert<sup>19)</sup>. (In Bild 1a ist eine bei der Hyperimmunisierung mit Diphtherietoxin sich einstellende Verschiebung des „Eiweißspektrums“ im Beispiel des Pferdeserums dargestellt).

### Biologische und kolloidchemische Bedeutung der Plasmaproteine

Um die biologischen Funktionen der Plasmaeiweißkörper verstehen zu können, muß man sich vergegenwärtigen, daß das Plasma als Betriebsstoff des Kreislaufes auf seinem Weg vom Herzen durch die Gewebe und zurück innerhalb einer einzigen Minute ein System von etwa 100 Milliarden Kapillaren mit einer Oberfläche von etwa  $800 \text{ m}^2$  zu durchlaufen hat. Bedenkt man ferner, daß die Oberfläche der menschlichen Plasmaeiweißkörper etwa  $140000 \text{ m}^2$  beträgt<sup>20)</sup>, so wird klar, daß sich auf so enorm großen Flächen eine Fülle von Austauschreaktionen zwischen Plasma- und Gewebeeiweißkörnern abspielen können. Diese sind nach Whipple<sup>21)</sup> von großer Bedeutung für den Ernährungsstoffwechsel der Körperzellen. Bekanntlich konnte Schönheimer<sup>22)</sup> durch seine Versuche mit  $^{18}\text{N}$  nachweisen, daß der Stoffwechsel über die Eiweißabbauprodukte verläuft und daß z. B. zwischen den Aminosäuren der Plasmaproteine und denen der Gewebe ein dynamischer Austausch stattfindet. Da die mittlere Lebensdauer der Plasmaproteine nur 24 h, im Höchstfalle 2 Wochen beträgt<sup>23)</sup>, darf man die ernährungsphysiologische Funktion der Plasmaeiweißkörper wohl in erster Linie auf ihre relative Kurzlebigkeit zurückführen.

In unversehrtem Zustand spielen die Eiweißmoleküle des Plasmas eine wichtige kolloidchemische Rolle, indem sie die Konstanthaltung des Blutvolumens und des osmotischen Druckes in den Gefäßen und Kapillaren gewährleisten<sup>24)</sup>. Hierbei sind die Albumine<sup>24a)</sup> etwa 2,4 mal wirksamer als die Globuline, so daß bei pathologischer Albumin-Verminderung (Lebercirrhose, Nephrose) Wasser in die Gewebe austreten kann und sich Ödeme bilden<sup>25)</sup>. Möglicherweise ist die bei derartigen Krankheiten beobachtete starke Globulin-Vermehrung die Folge eines Regulationsvorganges, durch die dem Abfall des kolloidosmotischen Druckes entgegengewirkt werden soll. Als therapeutische Maßnahme zur Regulierung des gestörten Wasseraushalts kommt die intravenöse Verabreichung geeigneter

<sup>8)</sup> Fällungsschema: H. Schultze u. H. Groß, Biochem. Z. 215, 115 [1929].

<sup>9)</sup> M. L. Orcutt u. P. E. Howe, J. exp. Medicine 36, 291 [1921]; P. E. Howe, J. biol. Chemistry 53, 479 [1922]; W. Knoll, Schweiz. med. Wschr. 78, 979 [1948].

<sup>10)</sup> K. O. Pedersen, Svedberg-Festschrift 1944, 490; J. physio. coll. Chemistry 51, 164 [1947].

<sup>11)</sup> P. E. Howe, J. exp. Medicine 39, 303 [1924]; Schneider u. Szalmary, Z. Immunitätsf. 95, 16, 177, 189 [1931]; E. Lemétayer, L. Nicol, L. Jakob, O. Girard u. R. Corvazin, Ann. Inst. Pasteur 73, 297 [1947]; P. A. Charlwood u. A. Thomson, Nature [London], 161, 59 [1948]; E. L. Smith u. A. Holin, J. biol. Chemistry 175, 349 [1948].

<sup>12)</sup> R. F. W. Brambell, W. A. Hemmings u. W. T. Rowlands, Lancet 1947, 759; W. Knoll, Schweiz. med. Wschr. 78, 979 [1948]; derselbe u. C. Sievers, Arztl. Forsch., 2, 396 [1948]; W. Weitbrecht, Dtsch. med. Wschr. 74, 1146 [1949]; R. Thurau, Monatsztschr. f. Kinderhkr. 97, 59 [1949].

<sup>13)</sup> Die Literatur ist so umfangreich, daß hier nur auf die neuesten Zusammenfassungen von F. Wuhrmann u. Ch. Wunderly, I. c. und von A. B. Gutman, Adv. Protein Chem. 4, 155 [1948] und einige Arbeiten aus dem deutschen Schrifttum des vergangenen Jahres hingewiesen werden kann: F. Wuhrmann, Ch. Wunderly u. F. Hugentobler, Dtsch. med. Wschr. 74, 482, 1263 [1949]; W. Seitz u. H. G. Betzler, Med. Klinik 44, 1569 [1949]; H. Gohr, K. H. Falkenbach u. H. Langenberg, Z. ges. inn. Med. 4, 69 [1949]; F. Hartmann, Klin. Wschr. 27, 210 [1949]; A. Linke, Med. Klinik 44, 569 [1949]; N. Zöllner, K. P. Eymer u. L. Scheid, Dtsch. med. Wschr. 74, 486 [1949]; H. Esser u. F. E. Schmiegler, ebenda 74, 1323 [1949].

<sup>14)</sup> H. Tarver u. Mitarb., J. biol. Chemistry 167, 395 [1947]; 173, 53 [1948]. Umfassende Literatur siehe in F. Wuhrmann u. Ch. Wunderly, I. c. Kap. V, 313 [1947].

<sup>15)</sup> E. Goetsch u. F. E. Kendall, J. biol. Chemistry 109, 221 [1935]; E. Goetsch u. Mitarb., J. clin. Invest. 15, 173 [1936]; 19, 9 [1940]; B. v. Bonsdorff, H. Groth u. T. Packalén, Folia haemat. 59, 184 [1938]; T. Packalén, Acta med. Scand. 100, 1 [1939]; J. A. Luetscher Jr., J. clin. Invest. 19, 313 [1940]; C. G. Holmberg u. A. Grönwall, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 273, 199 [1942]; J. Waldenström, Acta med. Scand. 117, 216 [1944].

<sup>16)</sup> A. S. Mc Farlane, Biochemic. J. 29, 407, 660 [1935]; K. O. Pedersen, J. physio. coll. Chemistry 51, 156 [1947].

<sup>17)</sup> A. G. Polson, Kolloid-Z. 87, 149 [1939]; Th. Svedberg u. K. O. Pedersen: Die Ultrazentrifuge, Verl. Th. Steinkopf, Dresden, 1940.

<sup>18)</sup> E. A. Kabat, J. exp. Medicine 69, 103 [1939].

<sup>19)</sup> H. G. Bungenberg de Jong u. R. F. Westerkamp, Biochem. Z. 234, 367 [1931].

<sup>20)</sup> J. T. Edsall, Adv. Protein Chem. 3, 387 [1947]; F. Wuhrmann u. Ch. Wunderly, Benno Schwabe u. Co., Basel 1947, 15.

<sup>21)</sup> S. C. Madden u. G. H. Whipple, Physiologic. Rev. 20, 194 [1940]; Amer. J. med. Sci. 211, 149 [1946].

<sup>22)</sup> R. Schönheimer: The dynamic state of body constituents, Harvard Univ. Press, Cambridge [1942].

<sup>23)</sup> H. Keilhack, Arch. exp. Path. 180, 1 [1935]; M. Heidelberger, H. P. Treffers, R. Schönheimer, S. Ratner u. D. Rittenberg, J. biol. Chemistry 144, 535 [1942]; R. Schönheimer, S. Ratner, D. Rittenberg u. M. Heidelberger, ebenda 144, 541, 545 [1942]; I. J. Zeidis, E. I. Alling u. Mitarb., J. exp. Medicine 81, 515 [1945].

<sup>24)</sup> E. H. Starling, J. Physiology 19, 312 [1896]; F. Wuhrmann u. Ch. Wunderly, I. c. 47.

<sup>24a)</sup> Nach J. T. Heyl, J. G. Gipson u. C. A. Janeway, J. clin. Invest. 22, 763 [1943] bewirkt 1 g Serumalbumin nach 1 h eine Zunahme des Plasmavolumens um  $17,4 \text{ cm}^3$ .

<sup>25)</sup> G. C. Linder, C. Lundsgaard u. D. D. van Slyke, J. exp. Medicine 39, 887 [1924]; D. H. Moore u. D. D. Van Slyke, J. clin. Invest. 8, 337 [1930]; I. A. Luetscher Jr., ebenda 20, 99 [1941]; J. Post u. A. J. Patek jr., Arch. Internat. Med. 69, 67, 83 [1942]. Über Ödembildung ohne Albumin-Verminderung vgl. A. Henschel, O. Mickelsen, H. L. Taylor u. A. Keep, Amer. J. Physiol. 150, 170 [1947].

Kolloidlösungen, vor allem die von Humanalbumin in Frage<sup>26</sup>). Auch der nach stärkeren Blutverlusten auftretende Kreislaufschok ist auf eine Kolloidverarmung zurückzuführen und kann daher nur durch Transfusion von Blut, Albumin oder Kollidon behoben werden, nicht aber durch physiol. Kochsalz- oder Traubenzuckerlösung<sup>27</sup>.

Eine recht wichtige biologische Aufgabe erfüllen die Plasmaproteine auch auf Grund ihrer Fähigkeit, Antikörper zu transportieren und zu mobilisieren. Schließlich sind sie durch ihren Gehalt an Gerinnungsfaktoren dazu befähigt, den Organismus vor Blutverlusten zu schützen. Manche gerinnungsaktiven Eiweißkörper wie das Prothrombin<sup>28</sup>) und das Acceleratorglobulin<sup>29</sup>) kommen nur in sehr kleinen Mengen vor. Dasselbe gilt für die Plasmafermente, von denen eine saure und eine alkalische Phosphatase, verschiedene Esterasen und Peptidasen, die Amylase, Zymohexase, Isomerase und Hydrogenase nachgewiesen wurden. Das proteolytische Plasmaferment, das Plasmin (Fibrinolysin) kommt in einer inaktiven Vorstufe, dem Plasminogen (Profibrinolysin) vor und wird durch ein Antiplasmin (Antifibrinolysin) gedrosselt<sup>30</sup>). Es ist anzunehmen, daß noch andere Enzyme im Plasma vorkommen, die sich aber bisher infolge zu geringer Konzentration dem Nachweis entzogen haben. Analog dürften die Verhältnisse bei den Drüsenhormonen liegen. In kleinen Mengen sind ferner das Hypertensinogen<sup>31</sup>), das eisenbindende Globulin<sup>32</sup>) und ein Kupferprotein<sup>33</sup>) im Plasma zugegen. Es ergibt sich also eine sehr große Zahl verschiedener Plasmaeiweißkörper. Sie ist sicher größer als 100, wenn man die Vielzahl natürlicher Antikörper und Isoagglutinine des Plasmas in Rechnung setzt. Ein mit der Plasmafraktionierung sich befassender Chemiker kann aus der Kenntnis der einschlägigen biologischen Nachweisverfahren, die fast regelmäßig viel empfindlicher sind als die chemischen, großen Nutzen ziehen. Es gibt aber eine Reihe biologisch nicht markierter Globuline, bei denen man, wie wir sehen werden, physikalische Methoden zur Charakterisierung heranziehen muß.

### Spezifische Bindungsreaktionen mit Plasmaeiweißkörpern

Nach Bennhold<sup>34</sup>) vermitteln die intakten Plasmaproteine den Transport von Vitaminen, Hormonen und Medikamenten zu den in Frage kommenden Zellen und den Abtransport von Körperschlacken zu den Ausscheidungsorganen. Diese Vehikel-funktion läßt sich durch Elektrophorese nachweisen. Man kann mit ihrer Hilfe zeigen, daß das Bilirubin<sup>35</sup>), Hämin<sup>36</sup>), die

wasserlöslichen Vitamine<sup>37</sup>), freie Fettsäuren<sup>38</sup>), die Sulfonamide<sup>39</sup>), das Atebrin<sup>40</sup>) und das Penicillin<sup>41</sup>) und eine große Zahl von Farbstoffen<sup>42</sup>) ausschließlich von den Albuminen gebunden werden. Bei manchen Farbstoffen beteiligen sich nach Absättigung der Bindungskapazität der Albumine auch die Globuline an der Bindung. Auch von Bilirubin ist bekannt geworden, daß Überschußmengen von  $\alpha$ -Globulin gebunden werden<sup>41</sup>). Meist ist aber die Albumin-Bindung so spezifisch, daß nach ihrer Erschöpfung die Komponenten frei gelöst bleiben<sup>41a</sup>). Z. Z. sind Luck<sup>42</sup>) und Klotz<sup>43</sup>) mit Mitarbeitern mit systematischen Untersuchungen über die Bindung organischer Anionen mit Carboxyl- und Sulfo-Gruppen an reines Rinderserumalbumin beschäftigt. Dabei hat sich gezeigt, daß die Bindungsreaktion dem Massenwirkungsgesetz folgt und daß bei aliphatischen Verbindungen eine bestimmte Kettenlänge von  $\text{CH}_2$ -Gruppen, bei aromatischen Säuren der apolare Benzol-Rest die Bindung begünstigt. Die Art der Abhängigkeit der Bindungskapazität vom  $p_{\text{H}}$  weist auf eine Beteiligung freier  $\epsilon$ -Amino-Gruppen von Lysin-Resten der Albumin-Moleköl hin. Eine Abhängigkeit von der Temperatur wurde bisher nur bei sauren mono- und divalenten Azofarbstoffen beobachtet. Auch die Adenylsäure gehört zu der hier angeführten Substanzgruppe, die vom Serumalbumin und nicht vom Globulin gebunden wird<sup>44</sup>).

Die Globuline vermögen mit Phosphatiden, Cholesterin, Cholesterinestern und Neutralfetten Bindungen einzugehen. Auch die fettlöslichen Vitamine und fettlöslichen Farbstoffe wandern im elektrischen Feld mit bestimmten Globulin-Fraktionen<sup>45</sup>), so daß sich eine ausgesprochene Lipotropie der Globuline und eine Anionotropie der Albumine einander gegenüberstehen. Es ist einleuchtend, daß diese Unterschiede konstitutionell bedingt sind, und der organische Chemiker steht z. Z. vor der Aufgabe, die für die verschiedene Reaktionsweise verantwortlichen Atomgruppen auf der Oberfläche der Proteinmoleküle aufzufinden zu machen. Es liegt nahe, für diesen Zweck die altbewährten Methoden der Konstitutionsaufklärung zu Hilfe zu nehmen. Leider war dieses Vorgehen bisher wenig fruchtbar, da die hochmolekulare Struktur der Eiweißkörper den Ablauf der chemischen Reaktionen in unerwünschter und unübersichtlicher Weise abzulenken pflegt. Es ist daher notwendig, sich auch über die Strukturchemie der Proteine gewisse Vorstellungen machen zu können.

### Makromolekularer Aufbau

Wenn es auch bisher noch in keinem Falle gelang, die Feinstruktur eines Eiweißkörpers aufzuklären, so konnten doch eine Reihe aussichtsreicher physikalischer und physikalisch-chemischer Methoden in den Dienst der Eiweiß-Konstitutionsermittlung gestellt werden. In erster Linie scheint das röntgenoptische Verfahren dazu berufen, Lage, Abstände und Valenzwinkel der Atome einer Eiweißmoleköl ausfindig zu machen. Z. Z. bestehen allerdings noch erhebliche Schwierigkeiten in der Auswertung und theoretischen Interpretation der Meßergebnisse.

Zwar haben die grundlegenden Untersuchungen Astburys<sup>46</sup>) über die Faserproteine vom Keratin-Myosin-Kollagentyp den heute allgem. anerkannten Nachweis erbracht, daß die Peptidketten in Richtung der Faserachse mehr oder weniger gestreckt sind, wir wissen aber noch nichts Näheres über die Art ihrer Faltung, die neben der Aminosäure-Zusammensetzung das wesentlichste Merkmal der Spezifität der Eiweißkörper zu sein

- <sup>26</sup>) I. A. Luetscher Jr., J. clin. Invest. 23, 365 [1944]; C. A. Janeway, S. T. Gibson, L. M. Woodruff, I. T. Heyl, O. T. Bailey u. L. R. Newhouse, ebenda 23, 465 [1944]; C. A. Janeway, S. T. Gibson u. L. M. Woodruff, ebenda 24, 465 [1945]; G. W. Thorn, S. H. Armstrong Jr., V. D. Davenport, L. M. Woodruff u. F. H. Tyler, ebenda 24, 802 [1945]; G. W. Thorn, S. H. Armstrong Jr., D. V. Davenport, ebenda 25, 304 [1946]; C. A. Janeway, Ann. internat. Medicine 26, 368 [1947]; Columbia combined Staff Clinics, Amer. J. Medicine 2, 386 [1947]; S. H. Armstrong Jr., ebenda 4, 390 [1948]; A. J. Patek Jr., H. Mankin, H. Colcher, A. Lowell u. D. P. Earle Jr., J. clin. Invest. 27, 135 [1948]; C. A. Janeway, J. Amer. med. Assoc. 138, 859 [1948].
- <sup>27</sup>) J. Rehn, Vortrag 66. Tagung der Dtsch. Ges. f. Chirurgie, Frankfurt-Main, 8. 6. 1949, Bruns, Beitr. z. klin. Chir., i. Druck 1950.
- <sup>28</sup>) W. H. Seegers, E. C. Loomis u. J. M. Vandenberg, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 56, 70 [1944]; dieselben, Arch. Biochemistry 6, 85 [1945]; A. G. Ware u. W. H. Seegers, J. biol. Chemistry 174, 565 [1948]; H. E. Schultz, Naunyn-Schmiedebergs Archiv 207, 173 [1949].
- <sup>29</sup>) P. A. Owren: The coagulation of blood, investigations on a new clotting factor, J. Chr. Gunderson, Oslo [1947]; A. G. Ware u. W. H. Seegers, Amer. J. Physiol. 152, 567 [1948]; dieselben, J. biol. Chemistry 172, 699 [1948]; H. E. Schultz l. c.; K. Felix, I. Pendl, P. Pin u. L. Roka, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 284, 185 [1949]; H. E. Schultz, „Neuere Erkenntnisse über das Prothrombin und das Acceleratorglobulin“, Dtsch. med. Wschr., im Druck 1950.
- <sup>30</sup>) L. R. Christensen, J. gen. Physiol. 28, 363 [1945]; derselbe u. C. M. McLean, ebenda 28, 559 [1945]; E. C. Loomis, C. George u. A. Ryder, Arch. Biochemistry 12, 1 [1947]; T. Astrup u. M. Permin, Nature (London) 159, 681 [1947]; M. M. Guest, B. M. Daly, A. G. Ware u. W. H. Seegers, J. clin. Invest. 27, 785, 793 [1948]; M. Schierge, Ärztl. Forsch. 3, 289 [1949]; L. F. Remmert u. P. P. Cohen, J. biol. Chemistry 181, 431 [1949].
- <sup>31</sup>) P. Holtz, Klin. Wschr. 27, 338 [1949].
- <sup>32</sup>) C. G. Holmberg u. C. B. Laurell, Acta Physiol. Scand. 10, 307 [1945]; A. L. Schade u. L. Caroline, Science (New York) 104, 340 [1946].
- <sup>33</sup>) T. Maun u. O. Keilin, Proc. Roy. Soc. B (London) 126, 303 [1938]; H. Berger u. M. Macheboeuf, Ann. Inst. Pasteur 73, 879, 882 [1947]; C. G. Holmberg u. C. B. Laurell, Nature (London) 161, 236 [1948].
- <sup>34</sup>) Die Eiweißkörper des Blutplasmas, Th. Steinkopf, Dresden 1938, 470.
- <sup>35</sup>) H. Bennhold, Ergebn. inn. Med. u. Kinderheilk. 42, 273 [1932]; derselbe u. R. Schubert, Z. exp. Medizin 113, 722 [1944]; N. H. Martin, Biochem. J. 42, XV [1948]; U. Westphal u. P. Gedigk, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 283, 161 [1948]; N. H. Martin, J. Amer. Chem. Soc. 71, 1230 [1949]; H. Bennhold, H. Ott u. M. Wiech, Dtsch. med. Wschr. 75, 11 [1950].
- <sup>36</sup>) J. Keilin, Nature (London) 154, 120 [1944].
- <sup>37</sup>) H. Bennhold, Dtsch. med. Wschr. 29/30, 401 [1947].
- <sup>38</sup>) G. A. Ballou, P. D. Boyer, I. M. Luck u. F. G. Lum, J. biol. Chemistry 153, 589 [1944]; G. A. Ballou, P. D. Boyer u. I. M. Luck, ebenda 159, 111 [1945]; 162, 199 [1946]; 167, 407 [1947]; R. I. Dubois, J. exp. Medicine 85, 9 [1947].
- <sup>39</sup>) G. Schönholzer, Klin. Wschr. 19, 790 [1940]; B. O. Davis, J. clin. Invest. 22, 753 [1943]; I. M. Klotz u. F. M. Walker, J. Amer. Chem. Soc. 70, 943 [1948].
- <sup>40</sup>) D. F. Chow u. C. M. McKee, Science (New York) 101, 67 [1945].
- <sup>41</sup>) N. H. Martin, l. c.
- <sup>42</sup>) Nach R. Levi (Schweiz. med. Wschr. 74, 912 [1944]) läuft die Abnahme des menschlichen Serumalbumins der verminderten Bindungsfähigkeit des Serums gegenüber Naphtholgelb, Azorubin und Azoblaub parallel.
- <sup>43</sup>) J. phys. coll. Chemistry 51, 229 [1947]; E. L. Ougan u. I. M. Luck, J. biol. Chemistry 172, 205 [1948]; D. Teresi u. M. Luck, J. biol. Chemistry 174, 653 [1948].
- <sup>44</sup>) J. Amer. chem. Soc. 68, 1486 [1947]; I. M. Klotz, ebenda 68, 2299 [1947]; I. M. Klotz u. F. M. Walker, ebenda 69, 1612 [1947]; I. M. Klotz, ebenda 71, 847 [1949]. Vgl. auch F. W. Putnam u. H. Neurath, ebenda 68, 1992 [1944]; J. biol. Chemistry 159, 195 [1945].
- <sup>45</sup>) I. M. Klotz u. I. M. Urquhart, J. biol. Chemistry 173, 21 [1948].
- <sup>46</sup>) Vgl. H. Bennhold l. c.
- <sup>47</sup>) W. T. Astbury, Trans. Faraday Soc. 29, 193 [1933]; 36, 871 [1940]; J. chem. Soc. (London) 1942, 337; vgl. Bamann-Myrbäck: Die Methoden der Fermentforschung, G. Thieme, Leipzig 1941, 498; W. T. Astbury u. F. O. Bell, Nature (London) 147, 696 [1941].

scheint<sup>47</sup>). Jedenfalls läßt sich die von Astbury aus den Röntgendiagrammen künstlich gedehnter Faserproteine ( $\beta$ -Keratintyp) abgeleitete Einordnung der Peptidketten in leicht übersehbare Gitterebenen (mit einem Abstand von 4,5 Å in der durch die Bindungskräfte zwischen den Carbonyl- und Imino-Gruppen benachbarter Ketten verknüpften „Backbone“-Ebene und von 10 Å in der senkrecht zu ihr stehenden, durch Disulfid-Brücken, Kovalenzbindungen oder Salzbindungen zwischen den Seitengruppen zusammengehaltenen Ebene) nicht auf native Linear- und Sphäroproteine übertragen, bei denen die Raumgitter sehr dicht verpackt sein müssen<sup>48</sup>). Man hat daher eine Reihe von Theorien aufgestellt, die sich mit einer möglichst raumsparenden Unterbringung der Peptidketten befassen, wobei man zeitweise eine cyclische<sup>49</sup>) und neuerdings eine geknäuelte<sup>47</sup>) Anordnung der Ketten in Erwägung zog. Heute nimmt man an, daß die Faltung der Polypeptidketten in der Eiweißmolekel durch H-Brücken<sup>49a</sup>) zwischen den Imino- und Carbonyl-Gruppen (bzw. ihren tautomeren Umlagerungsformen) benachbarter Aminosäure-Reste bewerkstelligt wird, die in senkrechter Richtung zur Achse der Peptidkette ein in sich ausgerichtetes System bilden können. Nach Wirtz<sup>50</sup>) und Schmitt<sup>51</sup>) soll das H-Brückensystem zur Energieleitung befähigt sein. Bei der Denaturierung werden die H-Bindungen zerstört, wodurch eine Streckung der Peptidketten ermöglicht und zuvor sterisch behinderten Gruppen Gelegenheit geboten wird, sich in neuen, mehr oder weniger festen Bindungen zu vereinen<sup>52</sup>).

Für die Ermittlung des äußeren Habitus von Eiweißmolekülen war das Röntgenverfahren erfolgreicher. Es liegen bereits einige auf Röntgenuntersuchungen basierende Angaben über die Molekulgröße und -form des krystallisierten  $\beta$ -Lactoglobulins<sup>53</sup>) und des Insulins<sup>54</sup>) vor. Besonders überzeugend sind von Perutz<sup>55</sup>) mit Hilfe von Patterson-Projektionen und Fourier-Analysen erhaltenen Auswertungsergebnisse von in verschiedenen Richtungen aufgenommenen Röntgendiagrammen des krystallisierten Methämoglobins vom Pferd. Danach besteht die Hämoglobinmolekel aus einem kreisförmigen Zylinder von 57 Å Durchmesser und 34 Å Höhe. Der Zylinder besteht aus 4 parallelen Schichten einer Dicke von 8,5 Å, die durch H<sub>2</sub>O-Einlagerungen getrennt sind und in mäßig konzentrierten Salzlösungen paarweise dissoziieren können<sup>56</sup>).

Für die Plasmaproteine wurden entspr. Untersuchungen noch nicht durchgeführt. Wir kennen aber die Molekulargewichte einiger in ausreichender Reinheit aus dem Plasma isolierter Eiweißkörper. Ihre Bestimmung erfolgte durch Messung des osmotischen Druckes<sup>57</sup>), hauptsächlich aber mit Hilfe des von Svedberg<sup>17</sup>, <sup>58</sup>) und Mitarbeitern ausgearbeiteten Sedimentations- und Diffusionsverfahrens, das in den USA von Oncley<sup>58</sup>) für die nach Cohn<sup>3</sup>, <sup>4</sup>, <sup>7</sup>) gewonnenen Plasmaproteine und in Deutschland von Bergold<sup>59</sup>) unter Benutzung der von Schramm<sup>60</sup>) entwickelten luftgetriebenen Ultrazentrifuge für reine Serumalbumine angewandt wurde. Die Kenntnis der Sedimentations- und Diffusionskonstanten sowie die des partiellen spezifischen Volumens in nicht hydratisiertem Zustand führten zur Berechnung des Reibungsverhältnisses f/fo, aus dem sich erstmalig erkennen ließ, daß die Gestalt der bisher als Sphäroproteine bezeichneten Serumproteine zum Teil recht beträchtlich

von der Kugelform abweicht<sup>17</sup>). Neuerdings haben Edsall<sup>61</sup>) und Oncley<sup>62</sup>) Messungen der Strömungsdoppelbrechung und der elektrischen Dispersion vorgenommen, die zu einer noch exakteren Definition der Molekeldimensionen der Plasmaproteine geführt haben. Wie aus einer Zusammenfassung von Edsall<sup>63</sup>) ersichtlich, weist nur das  $\beta_1$ -Lipoprotein des menschlichen Plasmas Kugelform auf, während die übrigen menschlichen und tierischen Plasmaproteine mehr oder weniger stark abgeplattete Rotationsellipsoide sind. (S. Tabelle 8). Es darf erwartet werden, daß die Ergebnisse Edsalls und Oncleys einst durch direkte elektronenoptische Messungen, die sich bisher nur für das Polymerisationsprodukt des Fibrinogens, das Fibrin, als anwendbar erwiesen haben<sup>64</sup>), bewiesen werden.

Vergleichen wir die Molekelform des Serumalbumins, für das von Edsall eine Länge von 150 Å und 36 Å Dicke angegeben wird, mit den von Perutz gefundenen Dimensionen des Hämoglobins von 57 Å und 34 Å, so ergibt sich weitgehende Übereinstimmung der kürzeren Molekelachse. Da beide Eiweißkörper auch nahezu dasselbe Molekulargewicht (69000 und 68000) besitzen, läßt sich die verschiedene Länge kaum anders als durch eine unterschiedliche Faltung der Peptidketten erklären. Damit stoßen wir wiederum auf dieses noch recht undurchsichtige Bauprinzip der Eiweißstruktur, dessen Aufklärung in das Gebiet der organischen Strukturchemie fällt. Es wird eine der nächsten Aufgaben des Chemikers sein, durch schonenden Abbau größere Eiweißbruchstücke darzustellen, wobei sich die Anwendung fermentchemischer Methoden, unter Umständen auch die Verwendung der bisher noch selten angewandten Proteasen mikrobieller Herkunft, lohnen dürfte. Auch umgekehrt durch Synthese erscheint eine Erweiterung der bisherigen Methodik durch enzymatische Verfahren<sup>64a</sup>) erfolgversprechend. Die chemischen Arbeiten auf dem Eiweißgebiet werden durch den in letzter Zeit vollzogenen Ausbau exakter chromatographischer und biologischer Bestimmungsverfahren für Aminosäuren wesentlich erleichtert<sup>65</sup>).

### Einfluß der peripheren Aminosäuren auf die Löslichkeit und Ladung der Plasmaeiweißkörper

Hier interessiert vor allem der Einfluß der 20 bisher in Plasmaproteinen nachgewiesenen Aminosäuren auf deren äußere Eigenschaften, z. B. auf die Löslichkeit und die elektrische Ladung<sup>66</sup>). Eine Häufung von peripheren Aminosäuren mit lipophilen Kohlenwasserstoffresten (Aminobuttersäure, Valin, Leucin, Phenylalanin) bedingt eine erhöhte Löslichkeit in Alkohol, während Aminosäuren mit freien OH-, COOH- oder NH<sub>2</sub>-Gruppen (Serin, Tyrosin, Threonin, Oxyprolin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin und Arginin) die Wasserlöslichkeit erhöhen. Bei den Plasmaproteinen überwiegen die polaren Gruppen. Sie bestimmen die Pufferkapazität und die elektrische Ladung. Als Träger negativer Ladungen kommen die nicht bei der Peptidbindung beteiligten Carboxyl-Gruppen der Asparaginsäure und Glutaminsäure, wie auch die freien  $\alpha$ -Carboxyl-Endgruppen in Frage. Bei stärker alkalischer Reaktion sind auch die OH-Gruppen des Tyrosins und die SH-Gruppen des Cysteins negativ geladen. Eine positive Ladung bewirken die  $\epsilon$ -Amino-Gruppe des Lysins, der Guanidin-Rest des Arginins, die NH-Gruppe des Histidins und die freien  $\alpha$ -Amino-Endgruppen. Beim Verbringen in ein polares Lösungsmittel wie Wasser üben alle geladenen Gruppen eine elektrostatische Anziehung auf die sie umgebenden Wasserdipole

<sup>47</sup>) L. Pauling, J. Amer. Chem. Soc. 62, 2643 [1940].  
<sup>48</sup>) Vgl. M. L. Huggins, Chem. Rev. 32, 195 [1943]; J. Fankuchen, Adv. Protein Chem. 2, 387 [1945]; R. B. Corey, ebenda 4, 385 [1948].

<sup>49</sup>) N. Troensegaard, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 112, 86 [1921]. Über die Struktur des Proteinkomplexes, Einar Munksgaard, Kopenhagen 1942; D. M. Wrinch, Proc. Roy. Soc. [London] 160 A, 59 [1937]; Trans. Faraday Soc. 33, 1368 [1937]; D. Dervichian, C. r. hebdo. Séances Acad. Sci. 211, 792 [1940].

<sup>49a</sup>) M. L. Huggins, J. chem. Physics 8, 598 [1940].

<sup>50</sup>) K. Wirtz, Z. Naturforsch. 2b, 94 [1947].

<sup>51</sup>) W. Schmitt, ebenda 2b, 98 [1947].

<sup>52</sup>) A. E. Mirsky u. L. Pauling, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 22, 439 [1936].

<sup>53</sup>) D. Crowfoot, Chem. Rev. 28, 215 [1941]; F. R. Senti u. R. C. Warner, J. Amer. Chem. Soc. 70, 3318 [1948].

<sup>54</sup>) D. Crowfoot, Proc. Roy. Soc. [London] A 164, 580 [1938]; D. Crowfoot u. D. Riley, Nature [London] 144, 1011 [1939].

<sup>55</sup>) M. F. Perutz, Nature [London] 149, 491; 150, 324 [1942]; J. Boyes-Watson u. M. F. Perutz, ebenda 151, 714 [1943]; M. F. Perutz, Proc. Roy. Soc. [London] A 195, 474 [1949].

<sup>56</sup>) Th. Svedberg u. K. O. Pedersen: Die Ultrazentrifuge, Verl. Th. Steinopff, Dresden, 1940, 320, 373.

<sup>57</sup>) G. Scatchard, J. Amer. Chem. Soc. 68, 2315 [1946]; derselbe u. A. Brown, ebenda 68, 2320 [1946].

<sup>58</sup>) J. L. Oncley, Ann. New York Acad. Sci. 41, 121 [1941]; derselbe, G. Scatchard u. A. Brown, J. physic. coll. Chemistry 51, 184 [1947].

<sup>59</sup>) G. Bergold, Z. Naturforsch. 1, 100 [1946].

<sup>60</sup>) G. Schramm, Kolloid-Z. 97, 106 [1941].

<sup>61</sup>) J. T. Edsall in E. J. Cohn u. J. T. Edsall: Proteins, Amino Acids and Peptides, New York, Reinhold Publishing Corporation 1943, 506; J. T. Edsall, J. F. Foster u. H. Scheinberg, J. Amer. Chem. Soc. 69, 2731 [1947]; J. T. Edsall u. J. F. Foster, ebenda 70, 1860 [1948].

<sup>62</sup>) J. L. Oncley, Chem. Rev. 30, 433 [1942].

<sup>63</sup>) Fortschr. chem. Forsch. 1, 119 [1949].

<sup>64</sup>) H. Ruska u. C. H. Wolpers, Klin. Wschr. 1939, 1077, 1940, 645; C. H. Wolpers, ebenda 1947, 424; Cl. van Zandt Hawn u. K. R. Porter, J. exp. Medicine 86, 285 [1947].

<sup>64a</sup>) S. J. Bressler, Ber. Akad. Wiss. UdSSR 55, 145 [1947]; Ph. P. Cohen u. R. W. Gilvary, J. biol. Chemistry 166, 261 [1946]; dieselben, Chem. Zbl. 118 B, 1770 [1947]; E. Waldschmidt-Leitz, diese Ztschr. 61, 437 [1949].

<sup>65</sup>) G. Schramm u. Primoshig, Ber. dtsch. chem. Ges. 76, 373 [1943]; 77, 417 [1944]; Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 282, 271 [1947]; 283, 34 [1948]; E. E. Snell, Adv. Protein Chem. 2, 85 [1945]; E. F. Gale, Biochem. J. 39, 46 [1945]; A. Tiselius, Adv. Protein Chem. 3, 67 [1947]; F. Turba, Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. 2, 49 [1948/49]; Th. Wieland, Fortschr. chem. Forsch. 1, 211 [1949].

<sup>66</sup>) Vgl. zu diesem Abschnitt die grundlegenden Arbeiten des Arbeitskreises der Harvard Universität, Boston: E. J. Cohn u. J. T. Edsall<sup>61</sup>); J. T. Edsall<sup>63</sup>).

aus und erhöhen so die Löslichkeit. Dieselben Gruppen vermindern die Löslichkeit in einem Medium mit niedriger Dielektrizitätskonstante. In gleicher Richtung aber mit geringerer Intensität wirken die ungeladenen aber polaren CO- und NH-Gruppen der Peptidketten und die OH-Gruppen von Serin und Threonin. Besonders deutlich wird der Einfluß des Dipolmoments der Aminosäuren auf die Löslichkeit, wenn man die  $\epsilon$ -Amino-capronsäure mit einem Dipolmoment  $\mu = 29$  und einer tausendfach größeren Löslichkeit in Wasser als in Alkohol mit der  $\alpha$ -Aminocapronsäure,  $\mu = 15,5$  vergleicht, bei der die Löslichkeit in Wasser nur 25 mal so groß ist als in Alkohol. Die Erhöhung des Dipolmoments ist z. B. auch der Grund, daß eine am Ende eines Kohlenwasserstoff-Restes oder einer Phenyl-Gruppe befindliche polare Gruppe dem Einfluß des nicht polaren Restes auf die Löslichkeit entgegenwirkt. Enthält das zur Auflösung eines Proteins bestimmte Wasser Elektrolyte, so bewirkt die Attraktion ihrer interionischen Kräfte eine Erhöhung der Löslichkeit. Dieser Einsalzungseffekt nimmt, wie aus einem Beispiel mit Hämoglobin hervorgeht (vgl. Bild 2), in der Reihenfolge  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$  in Abhängigkeit von der Ionenstärke zu. Nach Überschreiten einer bestimmten Ionenstärke nimmt die Löslichkeit wieder ab und bei manchen Salzen kommt es zur Aussalzung. Die Abhängigkeit der Löslichkeit von der Salzkonzentration ist bei den einzelnen Eiweißkörpern sehr verschieden. Für die Aussalzung des Fibrinogens aus Plasma ist  $\text{NaCl}$  geeignet, das auf die übrigen Plasmabestandteile nicht fällend wirkt, während die Globuline sich auf Grund ihrer verschiedenen Löslichkeit durch geeignete Ammonsulfat-Konzentration voneinander trennen lassen. Der Aussalzungseffekt ist in einem weiten Bereich durch die lineare Beziehung:  $\log S = \beta - K_s \cdot \Gamma/2$  charakterisiert, bei der  $\beta$  die extrapolierte hypothetische Löslichkeit bei der Ionenstärke 0 bedeutet. Die Konstante  $K_s$  hängt von der Natur des Proteins und des fällenden Salzes ab, aber nicht vom  $p_{\text{H}}$ . Am stärksten ist die Abhängigkeit der Löslichkeit von der Ionenstärke ( $\Gamma/2$ ). Da  $\beta$  vom  $p_{\text{H}}$  abhängig ist und im isoelektrischen Punkt des Proteins ein Minimum aufweist, besteht die Möglichkeit, zwei Proteine mit verschiedener Abhängigkeit ihres  $\beta$ -Wertes vom  $p_{\text{H}}$  durch Aussalzung bei einem verschiedenen  $p_{\text{H}}$  voneinander zu trennen. Hierbei ist allerdings zu beachten, daß mit zunehmender Ionenstärke das Löslichkeitsminimum schnell ansteigt.

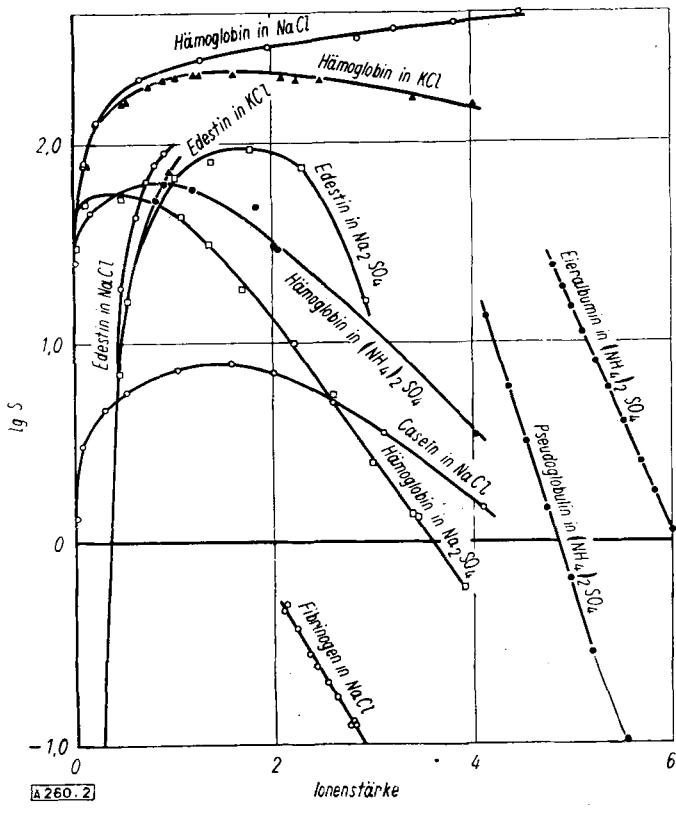


Bild 2

Löslichkeit verschiedener Proteine in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Ordinate:  $\log$  der Löslichkeit, Abszisse: Ionenstärke. (Nach E. J. Cohn, Naturwiss. 20, 663 [1932].)

Cohn und Mitarbeiter<sup>3</sup>) haben im Kriege ein Fraktionsverfahren für die Eiweißkörper des Pferde- und Rinderserums beschrieben, bei dem sie das jeweilige Fällungsmilieu hinsichtlich der Salz- und Proteinkonzentration, des  $p_{\text{H}}$  und der Temperatur genau definierten und die Zugabe des benutzten Ammonsulfats zur Vermeidung lokaler Konzentrationsstörungen sehr viel langsamer erfolgt als es früher üblich war. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahmen ist der mit Ammonsulfat erzielbare Fraktionierungseffekt nicht befriedigend, was besonders aus der elektrophoretischen Unhomogenität der gewonnenen Fraktionen hervorgeht. Die Charakterisierung der Serumglobuline mit Hilfe der Elektrophorese hat die früher übliche Bezeichnungsweise für Globulin-Unterfraktionen weitgehend verdrängt. Wir unterscheiden heute die Globuline in der Regel nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Felde bei  $p_{\text{H}} 8-8,6$  und bezeichnen die am langsamsten wandernden Globuline als  $\gamma$ -Globuline, die schneller wandernden als  $\beta$ -Globuline und die beweglichsten als  $\alpha$ -Globuline.

Ammonsulfat-Konzentration mol je l	% Sättigung	Art des gefällten Proteins	% d. Ge-	% gefällt.
			samt- protein	wasser- löslich
1,39	34	Hauptsächlich $\gamma$ -Globulin	20	71
1,64	40	$\gamma$ -, $\beta$ -, $\alpha$ -Globulin	15	67
2,05	50	$\beta$ -, $\alpha$ -Globulin, Mukoglobulin	14	94
2,57	62	Hauptsächlich kryst. Albumine	32	98
2,80	68	kryst. Albumine, Hämocuprein Cholinesterase, Glykoprotein Phosphatase	4	99

Tabelle 1. Fraktionierung der Serumproteine des Pferdes mit Hilfe von Ammonsulfat nach Cohn, McMeekin, Oncley, Newell u. Hughes, J. Amer. Chem. Soc. 62, 3386 [1940].

### Albumin-Reinigung

Wir haben uns in letzter Zeit eingehend mit der Reinigung der Serumalbumine befaßt. Dabei haben wir angeknüpft an die ausgezeichneten, aber leider erfolglosen Arbeiten Sørensens<sup>67)</sup> vom Jahre 1930 und die wertvollen Erfahrungen, die später von den Engländern Adair<sup>68)</sup>, Hewitt<sup>69)</sup> und Keckwick<sup>70)</sup> und in jüngster Zeit von den Amerikanern McMeekin<sup>71)</sup>, Kendall<sup>72)</sup> und Cohn<sup>73)</sup> gesammelt werden konnten. Wir haben bald erkannt, daß der wesentlichste Faktor für die Gewinnung reiner Albumine die restlose Entfernung einer Glykoproteid-Fraktion ist, die mit den Albuminen Mischkristallisate mit über 2% Galaktomannosid bildet. Da die kohlenhydrat-haltigen Anteile etwas löslicher sind als die freien Albumine, lassen sie sich durch häufiges Umkristallisieren entfernen und in den Mutterlaugen anreichern. Kabat und Mayer<sup>74)</sup> halten fünfmaliges Umkristallisieren für ausreichend zur Gewinnung eines immunchemisch einheitlichen Serumalbumins mit einem Kohlenhydratgehalt von etwa 0,1%. Bei dem uns zur Verfügung stehenden Ausgangsmaterial, das aus dem antikörperfreien und relativ albuminarmen Filtrat der Globulin-Fällung (50 proz. Sättigung mit Ammonsulfat) antitoxischer Seren bestand, mußten wir freilich erfahren, daß wir erst nach neunmaliger Kristallisation zu dem gewünschten Reinheitsgrad gelangten. An Stelle dieser sehr verlustreichen Arbeitsweise haben wir dann ein rentableres und auch im Großen durchführbares Verfahren entwickelt, das die Abscheidung der Albumine mit einem Reinheitsgrad von etwa 97–99%<sup>73a)</sup> (entsprechend dem der Cohnschen Fraktion V 7) ermöglicht.

<sup>67)</sup> S. P. L. Sørensen, Kolloid-Z. 53, 102, 170, 306 [1930].

<sup>68)</sup> G. S. Adair u. M. E. Robinson, Biochemic. J. 24, 993 [1930]; M. E. Adair u. G. L. Taylor, Nature [London] 135, 307 [1935].

<sup>69)</sup> L. F. Hewitt, Biochemic. J. 28, 2080 [1934]; 30, 2229 [1936]; 31, 360, 1047, 1537 [1937]; 32, 1554 [1938]; 33, 1496 [1939]; vgl. auch C. Rimington u. M. Van den Ende, Biochemic. J. 34, 941 [1940]. 1945 haben sich auch O. Westphal u. Kickhöfen mit der Reinigung des Pferdeserumalbumins nach Hewitt beschäftigt und uns dankenswerterweise über ihre Ergebnisse informiert.

<sup>70)</sup> R. A. Keckwick, Biochemic. J. 32, 552 [1938]; vgl. auch H. Neurath, G. R. Cooper u. J. O. Erickson, ebenda 142, 249 [1942]; D. G. Sharp, G. R. Cooper, J. O. Erickson u. H. Neurath, J. biol. Chemistry 144, 139 [1942].

<sup>71)</sup> T. L. McMeekin, J. Amer. Chem. Soc. 61, 2884 [1939]; 62, 3393 [1940].

<sup>72)</sup> F. E. Kendall, J. biol. Chemistry 138, 97 [1941].

<sup>73)</sup> E. J. Cohn, W. L. Hughes jr. u. I. H. Weare, J. Amer. Chem. Soc. 69, 1753 [1947]; s. auch W. L. Hughes jr., ebenda 69, 1836 [1947].

<sup>73a)</sup> Wir sind Herrn Prof. U. Westphal zu großem Dank verpflichtet, daß er die Bestimmungen des Reinheitsgrades der Albumine aus Menschen-, Pferde-, Rinder- und Hammelserum mit der Elektrophoreseeapparatur von Tiselius (Skalenmethode) 1948 in der Mediz. Klinik Tübingen durchgeführt hat.

Es beruht darauf, daß die von Immunglobulinen befreiten Filtrate durch Elektrodialyse von Salzen und wasserunlöslichen Bestandteilen befreit und anschließend unter jeweils gleichmäßigen Bedingungen mit Äther versetzt werden. Dabei scheiden sich die Glykoproteide als ein zähflüssiges Koazervat ab, nach dessen Entfernung praktisch kohlenhydrat-freie Albumine durch Ammonsulfat granulär oder kristallisiert abgeschieden werden, die nach Befreien von Salzresten in gefrorenem Zustand getrocknet werden.

Die Glykoproteid-Fraktion besteht, wie aus dem in Bild 3 abgebildeten Sedimentationsdiagramm hervorgeht, aus 4 verschiedenen schweren Komponenten. Dagegen verhält sich das nach der Abscheidung der Glykoproteid-Fraktion aus menschlichem Serum gewonnene Albumin in der Ultrazentrifuge wie ein einheitlich zusammengesetzter weißkörper (Bild 4)<sup>73b</sup>.

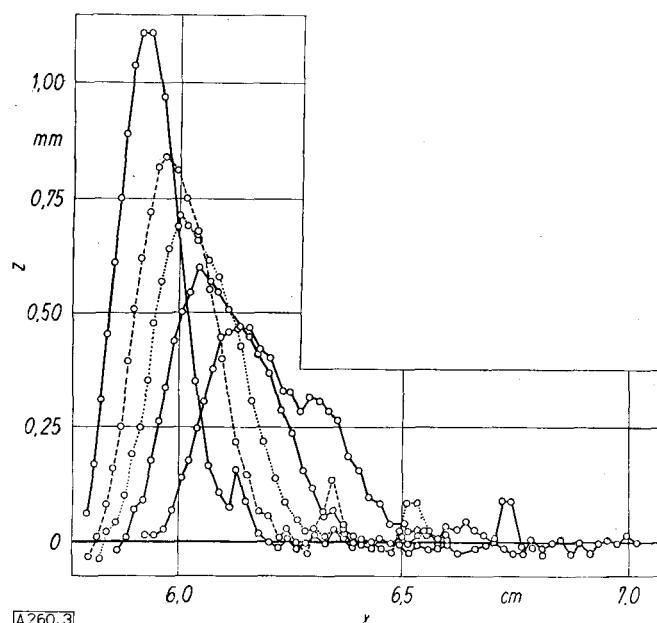


Bild 3  
Humanalbumin (8 R), Äther-gefällte, Glykoproteidfraktion,  
Phosphatpuffer  $p_H$  6,9, 50000 U/min. Skalenabst. 5 cm.

Die gefundenen Analysenwerte für den Tyrosin-, Tryptophan-, Arginin- und Cystin-Gehalt stimmen bei den einzelnen von uns isolierten Tierserumalbuminen weitgehend überein. Nach

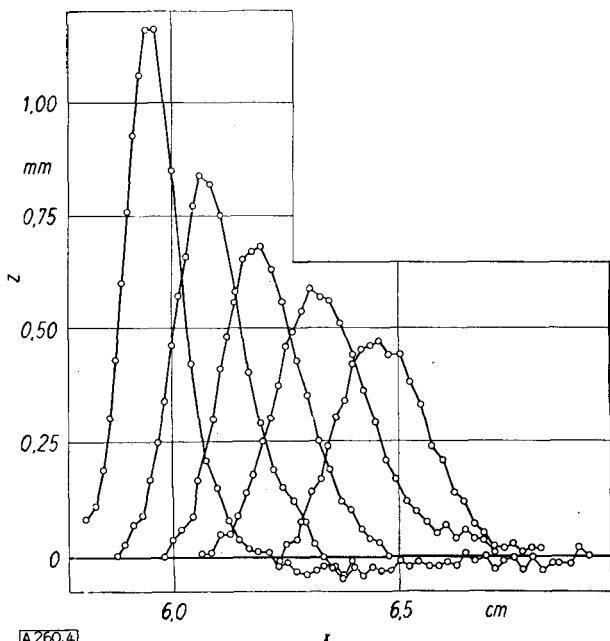


Bild 4  
Humanalbumin (8),  $3_{10} = 4,5$ , Phosphatpuffer  $p_H$  6,9, 50000 U/min.  
Skalenabst. 5 cm.

<sup>73b)</sup> Herr Dr. G. Bergold (Sault Ste. Marie, Canada) hatte die Liebenswürdigkeit, uns 1944/47 im KWI für Biochemie in Tübingen seine reichen Erfahrungen auf dem Gebiet der Ultrazentrifugentechnik großzügig zur Verfügung zu stellen, wofür wir ihm auch an dieser Stelle unseren aufrichtigsten Dank aussprechen.

<sup>74)</sup> E. A. Kabat u. M. M. Mayer, Experimental Immunoochemistry Charles C. Thomas, Springfield, Illinois U.S.A. 1948, 451.

Untersuchungen von Brand<sup>75</sup>) bestehen jedoch gewisse Unterschiede im Gehalt an Leucin. Sehr erheblich sind dagegen die Abweichungen im Aminosäure-Aufbau und Kohlenhydrat-Gehalt zwischen den Albuminen und den von uns aus der rohen Albumin-Fraktion isolierten Glykoproteiden (Tabelle 2).

	Kohlenhydrat <sup>a)</sup> %	N <sup>b)</sup> %	Tyrosin <sup>c)</sup> %	Tryptophan <sup>d)</sup> %	Arginin <sup>e)</sup> %	Cystin <sup>f)</sup> %
Glykoproteid-Fraktion						
„ Mensch	2,0	14,8	4,5	0,6	4,0	4,4
„ Pferd	2,2	15,0	4,2	0,6	4,0	4,2
„ Rind	2,1	15,3	4,7	0,6	5,0	5,0
„ Hammel	2,0	15,3	4,8	0,6	4,6	5,0
Gereinigt. Albumin						
„ Mensch	0,07	16,1	5,2	0,2	6,2	5,7
„ Pferd	0,09	16,4	5,1	0,3	5,8	5,9
„ Rind	0,10	16,4	5,4	0,4	5,8	6,0
„ Hammel	0,09	16,3	5,5	0,4	6,1	6,2

C. Haugaard, Biochem. Z. 260, 247

<sup>a)</sup> Bestimmt nach Brand.

<sup>b)</sup> Bestimmt nach O. Folin u. V. Ciocalteu, J. biol. Chemistry 73, 627 [1927].

<sup>c)</sup> Bestimmt nach M. J. Horn u. D. B. Jones, J. biol. Chemistry 157, 153 [1945].

<sup>d)</sup> Bestimmt nach E. Jorpes u. Cleghorn, Biochemic. J. 26, 1504 [1932].

<sup>e)</sup> Bestimmt durch die Gruppenreaktion von O. Folin u. A. D. Marenzi, J. biol. Chemistry 83, 103 [1929] u. Schöberl u. Conney, Ber. dtsch. chem. Ges. 71, 2361 [1938].

Tabelle 2

Chemische Charakterisierung der Glykoproteid-Fraktionen und der Rein-albumine verschiedener Säugerseren.

Eine besonders empfindliche Testreaktion für die Reinheit von Albuminpräparaten konnten wir aus ihrem Verhalten gegenüber proteolytischen Fermenten entwickeln. Es ist uns aufgefallen, daß einzelne Chargen eine deutliche Resistenz gegenüber reinem Trypsin aufwiesen. Da dieselben Aufbereitungen auf die Spaltung des von Trypsin äußerst leicht angreifbaren Caseins hemmend wirkten, lag es nahe, die beobachteten Abweichungen vom normalen Verlauf der Trypsin-Verdauung auf Verunreinigungen durch Antitrypsin<sup>76)</sup> zurückzuführen, das von Schmitz<sup>77)</sup> bereits früher in der Albumin-Fraktion nachgewiesen worden war. Auch diese Substanz läßt sich mit Hilfe des Äther-Verfahrens entfernen und wird in der Glykoproteid-Fraktion stark angereichert. Das Hammelalbumin konnten wir jedoch auf diese Weise nicht antitrypsin-frei gewinnen (Tabelle 3).

	% Spaltung von 40 mg Serumprotein in 10 cm <sup>3</sup> Veronalpuffer $p_H$ 8,1,	% Hemmung der Spaltung von 100 mg Casein in 10 cm <sup>3</sup> Veronalpuffer 8,1, 2
Glykoproteid-Fraktion		
„ Mensch	0	7
„ Pferd	0	3
„ Rind	0	0
„ Hammel	0	0
Gereinigt. Albumin		
„ Mensch	16	24
„ Pferd	21	46
„ Rind	19	38
„ Hammel	4	20

<sup>\*)</sup> Die zu prüfende Serumfraktion wurde 15 min mit dem Trypsin auf 37° erwärmt, bevor das Casein zugesetzt wurde. Der Verlauf der Proteolyse wurde durch photoelektrische Messung der Sulfoalicylsäure-Trübwerke unter Verwendung besonderer Eichkurven für die verschiedenen Substrate nach einem früher beschriebenen Verfahren<sup>12a)</sup> bestimmt.

Tabelle 3

Verhalten der Glykoproteid-Fraktionen und Reinalbumine des menschlichen und tierischen Serums gegenüber Trypsin.

Erwähnt sei noch, daß die photoelektrische Bestimmung der Ammoniumsulfat-Trübungszone nach Schmitz-Wulkow<sup>78)</sup> bei Einhaltung konstanter Arbeitsbedingungen uns bei der Reinigung der Albumine wertvolle Dienste leistete. Mit ihrer Hilfe

<sup>75)</sup> E. Brand, B. Kassel u. L. J. Saidel, J. Clin. Invest. 23, 437 [1944]; E. Brand, Ann. N. Y. Acad. Sci. 47, 187 [1946].

<sup>76)</sup> Von Dungen, Münch. med. Wschr. 45, 1039 [1898]; L. Utkin-Ljubowzow, Biochem. Z. 188, 134 [1927]; D. Grob, J. gen. Physiol. 24, 405 [1942]; J. H. Ferguson, Science [New York] 97, 319 [1943]; H. J. Tagnon u. J. P. Soulier, Proc. Soc. exp. Med. 61, 440 [1946]; R. G. McFarlane u. J. Pillinger, Lancet 1964 I, 888; R. G. McFarlane, J. Physiol. (Brit.) 106, 104 [1947]; E. W. Todd, J. exp. Medicine 89, 295, 301 [1949]; G. H. L. Dillard u. A. Chanutin, Cancer Research 9, 665 [1949].

<sup>77)</sup> A. Schmitz, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 244, 89 [1936]; 250, 37 [1937]; 255, 234 [1938].

<sup>78)</sup> Biochem. Z. 245, 408 [1932]; vgl. H. Herken u. H. Remmer, Dtsch. Gesundheitswes. 1, 683 [1946]; Ärztl. Wschr. 1, 289 [1946]; Klin. Wschr. 24/25, 217, 469 [1947].

konnten wir uns einen schnellen Überblick verschaffen, ob leichter fällbare Verunreinigungen vorlagen oder Denaturierungen eingetreten waren. Die gereinigten Albumine ergeben in stark verdünnter Lösung bei Zusatz steigender Mengen gesättigter Ammonsulfat-Lösung einen gut erkennbaren Fällungspunkt bei 77–78 proz. Sättigung. Er ist durch ein scharfes Maximum der Trübungsintensität charakterisiert, das bei geringfügigem Überschreiten der kritischen Salzkonzentration infolge verstärkter Teilchenaggregation steil abfällt. Verunreinigung durch Globuline, die bekanntlich bei niederer Ammonsulfat-Konzentration gefällt werden, machen sich durch eine Verbreiterung der Trübungszone nach dem Bereich geringerer Salzkonzentration bemerkbar.

Auch bei unsachgemäßer Aufarbeitung auftretende Denaturierungen lassen sich an einer Linksverschiebung der Albumin-Trübungszone leicht erkennen und durch chemische Analyse von der durch andere Serum-eiweißkörper verursachten Verzerrung der Nephelogramme nativer Reinalbumine unterscheiden. Da nach unseren derzeitigen Kenntnissen sämtliche Globuline kohlenhydrat-haltig sind, genügt eine Kohlenhydrat-Bestimmung zu ihrer Differenzierung gegenüber den praktisch kohlenhydrat-freien Serumalbuminen, falls diese infolge Denaturierung sich nicht mit Hilfe von Ammonsulfat von den Globulinen unterscheiden lassen. Die besonders kohlenhydrat-reichen Proteid-Fraktionen roher Albumin-Filtrate verhalten sich nach ihrer Abscheidung durch Äther, (der vor allen Untersuchungen durch Dialyse entfernt wurde), insofern völlig abweichend beim Versetzen mit Ammonsulfat, als ihre Trübungs-zonen viel breiter sind und bereits bei geringeren Salzkonzentrationen erscheinen als die der Albumine. Auch die maximalen Trübwerthe sind bei beiden Proteinen verschieden.

Recht charakteristisch ist ebenso das unterschiedliche Verhalten der Glykoproteide und Albumine gegenüber Sulfosalicylsäure, die bei dem erstgenannten Eiweißkörper nur eine schwache Trübung, aber keine Fällung hervorruft. Diese Beobachtung ist von allgemeinerem Interesse, denn sie zeigt, daß die so häufig benutzte Sulfosalicylsäure als Eiweißfällungsmittel versagen kann, wenn besonders kohlenhydrat-reiche Proteine vorliegen (Tabelle 4).

	Ammonsulfat-Trübungszone (0,05 % Protein, pH 7,0, 20%). % Sättigung:	Maximaler Trübwert Ammonsulfat (0,05% Protein, pH 7,0, 20%). mV	Sulfosalicylsäure 2,7 proz. (0,005% Protein, 20%). mV
Glykoproteid-Fraktion Mensch	43–53	250	95
Pferd	45–55	240	110
Rind	53–73	260	120
Hammel	53–62	210	110
Gereinigt. Albumin Mensch	67–78	360	460
Pferd	69–77	340	470
Rind	68–78	350	450
Hammel	67–78	360	450

Charakterisierung der Glykoproteid-Fraktionen und Reinalbumine aus Saugerserum durch photoelektrische Trübungsmeßungen.

Die genannten Verfahren zeichnen sich durch Einfachheit aus. Sie erleichtern präparative Arbeiten, vermögen aber die Prüfungen in der Ultrazentrifuge und der Elektrophoreseapparatur nicht zu ersetzen. Als eines der schärfsten Kriterien für Einheitlichkeit gilt auch die Bestimmung der Löslichkeit, wie sie von *McMeekin*<sup>79)</sup> bei kryst. Pferdeserumalbumin nach einer Methode von *Cohn* und *McMeekin*<sup>80)</sup> durchgeführt wurde. Danach und nach den Ergebnissen, die *Armstrong*<sup>81)</sup> und Mitarb. bei der Bestimmung der elektrophoretischen Beweglichkeit sowie *Oncley*<sup>82)</sup> und Mitarb. bei Ermittlung der Sedimentations- und Diffusionskonstanten der mehrfach umkristallisierten Serumalbumine des Menschen und Rindes erhielt ( $-\mu \cdot 10^5 = 6,0$  bei  $p_H 8,6$  u.  $\Gamma/2 = 0,1$ ;  $S_{20}, w = 4,5–4,6$ ;  $D_{20}, w = 6,1$ ), ist man berechtigt, die genannten Albumine als eine physikalisch-chemisch einheitliche Substanzgruppe vom Molekulargewicht 69000 zu betrachten. Für die Einheitlichkeit des Humanalbumins spricht auch, daß es *Hughes*<sup>83)</sup> geglückt ist, eine krystallisierende Hg-Verbindung desselben darzustellen, die je Albuminmoleköl genau  $1/2$  Atom Hg enthält und sich bei der Sedimentation wie eine dimere Albumin-Verbindung verhält.

<sup>79)</sup> J. Amer. chem. Soc. 61, 2884 [1939].

<sup>80)</sup> Ebenda 56, 2270 [1934].

<sup>81)</sup> S. H. Armstrong Jr., M. J. E. Budka u. K. C. Morrison, J. chem. Soc. 69, 416 [1947]; S. H. Armstrong Jr., M. E. Budka, K. C. Morrison u. M. Hasson, ebenda 69, 1747 [1947].

Es liegen einige Beobachtungen über Dissoziationserscheinungen reiner Serumalbumine bei  $p_H 4$  vor, die aber nicht unbedingt deren Einheitlichkeit in Frage stellen, weil sie unter Versuchsbedingungen gemacht wurden, die an der Stabilitätsgrenze der Serumalbumine liegen<sup>82)</sup>. Als erster hat *McMeekin*<sup>71)</sup> beobachtet, daß Pferdeserumalbumin, das sich bei der Elektrophorese bei  $p_H 7,4$  als homogen erweist, bei  $p_H 4$  in 2 Komponenten zerfällt. Die Befunde wurden später von *Neurath*<sup>83)</sup> und Mitarb. bestätigt. Bei menschlichem Albumin hat *Luetscher*<sup>84)</sup> ebenfalls das Auftreten von 2 Komponenten bei  $p_H 4$  elektrophoretisch ermittelt und nachgewiesen, daß bei Nephrosen die Tendenz zur Bildung der schwerer beweglichen Komponente erhöht ist. Neuerdings hat *Alberty*<sup>85)</sup> die Untersuchung auch auf das krystallisierte Rinderalbumin ausgedehnt und im  $p_H$ -Bereich 5–7 eine einheitliche Wanderung, bei  $p_H 4,15$  in 0,15 m NaCl-Lösung jedoch eine Dissoziation in 3 Teilkomponenten festgestellt, die 57%, 33% und 10% der Gesamtmenge ausmachen. Unter denselben Versuchsbedingungen treten nach *Alberty* bei krystallisiertem menschlichem Albumin nur 2 Komponenten auf, deren Beweglichkeiten den Komponenten 1 und 3 des Rinderalbumins entsprechen. Diese Untersuchungen, die unter Umständen die Grundlage für die Präparation definierter Albumin-Bruchstücke bilden könnten, zeigen dem Chemiker vor allem den überragenden Einfluß der  $H^+$ -Konzentration bei Untersuchungen auf dem Eiweißgebiet.

Ein chemisch interessantes Problem stellt auch die große Affinität der Albumine zu den höheren Fettsäuren dar. Das aus wäßrigem Milieu krystallisierte Humanalbumin *Kendalls*<sup>72)</sup> enthält 2% Lipoid, die durch Äther nicht entfernt werden können, aber auch das nach *Cohn* und Mitarb.<sup>73)</sup> mehrfach aus verdünntem Alkohol umkristallisierte Humanalbumin enthält noch ein Mol Stearinäsure, die nur durch Extraktion mit unverdünntem Methylalkohol entfernt werden kann. Durch diese Behandlung, selbst wenn sie bei sehr niederer Temperatur durchgeführt wird, büßt das Albumin seine Krystallisierungsfähigkeit ein und bildet ein in der Ultrazentrifuge schneller wanderndes Polymerisationsprodukt. Diese Veränderungen können durch nachträglichen Zusatz von 1 Mol Na-oleat oder -stearat wieder weitgehend rückgängig gemacht werden. Wie *Cohn*<sup>73)</sup> weiter zeigen konnte, wirken auch Zusätze höherer Fettsäuren, besonders Decylalkohol, krystallisationsfördernd auf Humanalbumin. Die Frage, ob die Stabilität der Nativstruktur des Albumins an die Anwesenheit einer langketigen Kohlenwasserstoffverbindung gebunden ist, bedarf allerdings noch näherer Klärung.

*Dubos*<sup>86)</sup> hat den genialen Einfall gehabt, die große Bindungsfähigkeit der Serumalbumine gegenüber Fettsäuren für die Züchtung von Tuberkelbazillen nutzbar zu machen, deren Wachstum durch die in flüssigen Nährböden vorhandenen oder entstehenden ungesättigten Fettsäuren gehemmt wird. Durch Zugabe von Rinderalbumin, das je Moleköl maximal 9 Molekülen Oleat zu binden vermag<sup>87)</sup>, hat *Dubos* die Wachstumsbedingungen verbessern können und schließlich einen netzmittelhaltigen Albumin-Nährboden geschaffen, der das für chemotherapeutische Studien erforderliche submerse Wachstum der Tuberkelbazillen unter Vermeidung von Verklumpungen ermöglicht.

Über das immunchemische Verhalten der Serumalbumine liegen sich widersprechende Beobachtungen aus älterer Zeit vor<sup>88)</sup>. Nach neueren, mit Präparaten definierten Reinheitsgraden durchgeföhrten Untersuchungen<sup>89)</sup> besitzen die Serumalbumine eine deutlich ausgeprägte Antigenatur, nur *Hewitt*<sup>90)</sup> berichtet, daß sie bei dem von ihm gereinigten Pferdealbumin

<sup>82)</sup> Nach Th. Svedberg u. B. Sjögren, J. Amer. Chem. Soc. 52, 2855 [1930] ist krystallisiertes Pferdeserumalbumin nur im  $p_H$ -Gebiet 4–9, Pferde-serumglobulin nur im  $p_H$ -Bereich 4–8 stabil.

<sup>83)</sup> O. G. Sharp, G. R. Cooper, J. O. Erickson u. H. Neurath, J. biol. Chemistry 144, 139 [1942].

<sup>84)</sup> J. A. Luetscher, J. Amer. Chem. Soc. 61, 2888 [1939]; J. clin. Invest. 19, 313 [1940].

<sup>85)</sup> R. A. Alberty, J. physic. coll. Chemistry 53, 114 [1949].

<sup>86)</sup> R. J. Dubos u. B. D. Davis, J. exp. Medicine 83, 409 [1946].

<sup>87)</sup> B. D. Davis u. R. J. Dubos, Arch. Biochem. 11, 201 [1946].

<sup>88)</sup> Nolf, Ann. Inst. Pasteur, 14, 297 [1900]; Landsteiner u. Calos, Zbl. Bakteriol. 31, 781 [1902]; Michaelis, Dtsch. med. Wschr. 28, 733 [1902]; Ruppel, Ornstein, Carl u. Lasch, Z. Hygiene 97, 188 [1923]; Hektoen u. Walker, J. inf. Diseases 35, 295 [1924].

<sup>89)</sup> Kabat u. Heidelberger, J. exp. Medicine 66, 229 [1937]; Gell u. Vuill, Biochem. J. 32, 560 [1938]; J. O. Erickson u. H. Neurath, J. exp. Medicine 78, 1 [1943].

<sup>90)</sup>

sehr schwach in Erscheinung trat. Die von uns hergestellten Serumpräparate verhalten sich wie die von *Janeway und Beeson*<sup>91)</sup> untersuchten Albumine aus dem *Cohnschen* Laboratorium wie arteigene Vollantigene. Was den Grad der serologischen Spezifität betrifft, so haben unsere Kaninchenversuche gezeigt, daß sie nicht regelmäßig und meist nur im Anfangsstadium der Immunisierung, also nach wenigen Antigeninjektionen, in Erscheinung tritt. Nach mehr als 9 Antigenverabreichungen treten fast regelmäßig Kreuzreaktionen, bes. zwischen Rinder- und Hammelalbumin, auf. Aber auch die zunächst stärker ausgeprägte spezifische Reaktionsfähigkeit des Pferdeserumalbumins greift nach 14 Injektionen auf die Anti-Rinder- und Hammelalbuminseren über. Wir möchten aus unseren Befunden schließen, daß die Strukturmerkmale der Tierspezifität in den Serumalbuminmolekülen schwächer ausgebildet sind als die der Gruppenspezifität. Schonend eingeführtes Jod<sup>92)</sup> bewirkt spontan ein Verschwinden der Artspezifität der von uns untersuchten Pferde-, Rinder- und Hammelalbumine, während der Antigencharakter erhalten bleibt. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten *Rothen und Landsteiner*<sup>93)</sup>, die fanden, daß die serologische bei Kaninchen nachweisbare Antigennatur vom Pferde- und Menschenalbumin nach der Spreitung noch erhalten, aber hinsichtlich der Artspezifität stark verwischt war. Da unter den bei der Spreitung angewandten Versuchsbedingungen die Globularstruktur der Proteine aufgehoben wird und sich nach totaler Entfaltung Filmdicken von nur 6–8 Å ergaben, die der mittleren Dicke ausgezogener Peptidketten entsprechen, nimmt *Landsteiner*<sup>94)</sup> an, daß die serologische Reaktionsfähigkeit (Antigennatur) der Eiweißkörper an die Unversehrtheit der Polypeptidketten gebunden ist, d. h., daß sie durch Hauptvalenzen verankert ist und von der Natur und Reihenfolge der Aminosäure-Reste in den Polypeptidketten abhängt.

Bei Versuchen, eine Desantigenisierung der Serumalbumine herbeizuführen, haben wir in Übereinstimmung mit *Mayer und Heidelberger*<sup>95)</sup> feststellen können, daß die Antigenstruktur durch längeres Erhitzen verdünnter Albumin-Lösungen im pH-Bereich 6,8–8,7 nicht zerstört wird. Auch nach Behandlung mit Harnstoff, die, wie bereits *Neurath*<sup>96)</sup> bei Pferdeserumalbumin fand, auch bei Rinder- und Hammelalbumin zur Bildung von 2 Komponenten verschiedener Sedimentationskonstante führte (von denen die eine ein höher molekulares Denaturierungsprodukt, die andere ein „regeneriertes“ Albumin darstellt), blieb die Antigennatur bestehen. Auch die mehrtägige Einwirkung von Harnstoff bei höherer Temperatur und neutraler Reaktion führte nicht zum Ziel. Erst Erhöhung des pH bis nahe an die Stabilitätsgrenze der Albumine und durch 4-tägiges Erhitzen auf 57° gelang es uns, völlige Desantigenisierung herbeizuführen (Tabelle 5). Die ihres Antigenvermögens beraubten Serumalbumine gaben nach Wiederentfernung des Harnstoffs keine Präzipitin-Reaktionen mit homologen und heterologen Antiseren, die mit den unbehandelten Albuminen bereit worden waren. Sie waren auch nicht mehr imstande, die Kaninchenhaut zu sensibilisieren oder beim Meerschweinchen anaphylaktische Reaktionen zu provozieren, bzw. bei durch Nativalbumine sensibilisierten Meerschweinchen anaphylaktische Erscheinungen auszulösen.

Die Aufhebung der Antigennatur der Serumalbumine wird nach unseren Versuchsergebnissen von drastischen irreversiblen Veränderungen der Eiweißstruktur begleitet. Wie Tabelle 5 zeigt, wird die Fällungszone stark in das Gebiet niederer Ammonsulfat-Konzentrationen verschoben. Dabei steigt der maximale Trübwert auf den doppelten, während der Sulfosalicylsäure-Trübwert auf den halben Ausgangswert abfällt. Diese Veränderungen vollziehen sich kontinuierlich und laufen mit einer

<sup>91)</sup> Zit. nach *Cohn*, Chem. Rev. 28, 395 [1941].

<sup>92)</sup> Vgl. *Bahmann u. Shahrock*, J. biol. Chemistry 151, 659 [1943].

<sup>93)</sup> J. exp. Medicine 66, 229 [1937].

<sup>94)</sup> Vgl.: Die Spezifität serologischer Reaktionen, Springfield, Illinois 1936.

<sup>95)</sup> J. exp. Medicine 78, 1 [1943].

<sup>96)</sup> *H. Neurath, G. R. Cooper u. J. O. Erickson*, J. biol. Chemistry 142, 249 [1942]; *J. Bernheim, H. Neurath u. J. O. Erickson*, ebenda 144, 259 [1943].

Reaktionsbedingungen: 1 proz. Albumin-Lösung				Ammon-sulfat-Trübungs-zone, vgl. Tab. 4. % Sättig.	Maxim. Ammon-sulfat vgl. Tab. 4. mV	Trüb-wert Sulfosalicylsr. vgl. Tab. 4. mV	Spaltg. durch 0,1 mg Trypsin vgl. Tab. 3. %	NH <sub>2</sub> -N (van Slyke) %	Serolog. Anti-gentest mit Kanin- chense- rum*)
<b>Hammelalbumin</b>									
—	—	—	7,0	68–77	360	420	6	1,13	x x x
—	196	37	7,0	63–77	320	350	84	1,03	x x x
5	196	37	7,2	62–77	320	360	90		x x x
20	196	37	7,2	37–53	300	385	60		x x
40	40	45	7,1	30–47	480	340			x x x
40	96	45	7,3	32–42	500	310	69	0,58	x x
40	170	45	7,3	32–42	500	245			x x
—	96	57	7,0	35–50	335	380		1,03	x x x
5	96	57	7,2	23–37	720	270			x x
20	96	57	8,5	17–32	750	230	48	0,34	0
40	96	57	8,7	17–28	750	155	52		0
<b>Rinderalbumin</b>									
20	96	57	8,5	19–30	710	240	60	0,28	0
<b>Pferdealbumin</b>									
20	96	57	8,5	22–33	700	250	66	0,55	0
<b>Kaninchenalbumin</b>									
20	96	57	8,5	23–35	690	260	62	0,42	—
<b>Humanalbumin</b>									
20	96	57	8,5	20–35	725	240	68	0,34	0

Sämtliche Reaktionen wurden nach Wiederentfernung des Harnstoffs durch Dialyse ausgeführt.

\*) Zur Herstellung der Antiseren wurde das unbehandelte homologe Albumin benutzt (14 Injektionen, Antigendosen von 10–200 mg ansteigend, im Abstand von 3–4 Tagen i. v. injiziert.)

Tabelle 5  
Versuche über die Desantigenisierung von Serumalbumin verschiedener Herkunft durch Harnstoff.

Erhöhung der Viscosität und einer zunehmenden Fällbarkeit durch verd. Essigsäure parallel. Auch die beträchtliche Abnahme des nach van Slyke bestimmten Amino-stickstoffs, die auf Kondensations- oder Polymerisationsvorgänge hinweist, scheint einem die Desantigenisierung schrittweise begleitenden Vorgange zu entspringen. Dagegen zeigt das Verhalten der Serumalbumine gegenüber Trypsin, das im Anfangsstadium der Harnstoff-Denaturierung bessere Angriffsmöglichkeiten findet als im Endstadium, daß im Verlaufe der Desantigenisierung auch diskontinuierliche Reaktionen auftreten. Diskontinuierliche Veränderungen lassen sich auch in der Ultrazentrifuge beobachten. Nach kurzfristiger Harnstoff-Einwirkung ist neben unverändertem Albumin eine hochmolekulare Komponente von der Sedimentationskonstante  $s_{20} = 16$  erkennbar, die später wieder verschwindet und durch eine mengenmäßig überwiegende Komponente mit  $s_{20} = 6,3$  abgelöst wird. Die sich ständig verminderte Albumin-Komponente geht schließlich im Endstadium im Umwandlungsprodukt auf und sedimentiert mit diesem gemeinsam mit einer Konstanten  $s_{20} (0,8\%) = 5,9$ . Alle diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß bei der Aufhebung der Antigennatur nicht nur periphere Gruppen, sondern die gesamte Innenstruktur der Albuminmoleküle verändert wird. Hierfür spricht auch die erhöhte Jod-Aufnahme nach vollzogener Desantigenisierung. Wir möchten sogar bezweifeln, daß die Hauptvalenzketten unter den Reaktionsbedingungen des hier beschriebenen Desantigenisierungsverfahrens völlig unversehrt bleiben und sehen daher keinen Widerspruch zwischen unseren Befunden und der zuvor erwähnten Landsteinerschen<sup>93, 94)</sup> Theorie. Da auch bei der zur Desantigenisierung von Rinderserum oder Kälberplasma vorgeschlagenen Behandlung mit 1 proz. Natronlauge<sup>97)</sup> oder mit Formaldehyd und Ammoniak<sup>98)</sup> bei 100° eine partielle Hydrolyse bzw. Polymerisation der Polypeptidketten nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, muß z. Z. noch offen bleiben, ob eine völlige Desantigenisierung eines Eiweißkörpers unter Reaktionsbedingungen, die keine Beeinträchtigung der Polypeptid-Struktur verursachen können, überhaupt möglich ist.

(Fortsetzung und Schluß im nächsten Heft).

<sup>97)</sup> L. A. Kazal, R. J. De Falco u. L. E. Arnow, J. Immunol. 54, 245 [1946].

<sup>98)</sup> J. M. Massons, Lancet 253, 341 [1947]; Ref. Med. Klin. 43, 32 [1948]; J. Melka, V. Rapaut u. B. Zapletal, Lancet 253, 382 [1947].