

Aus dem Institut für Serologie und experimentelle Therapie (Direktor: Prof. Dr. F. JAHNEL) der Deutschen Forschungsgesellschaft für Psychiatrie (Max-Planck-Institut) in München.

## **Die Anwendung einiger Begriffe der Physik und Chemie auf die Deutung morphologischer Befunde am Zentralnervensystem\*.**

### **1. Strukturelemente und Denaturierung.**

Von

**FRANZISKA PRUCKNER.**

*(Eingegangen am 15. Dezember 1949.)*

Der Physiker und Chemiker, dem die Aufgabe gestellt ist, mit dem Psychiater und Neuropathologen zusammenzuarbeiten, hat hierzu grundsätzlich 2 Möglichkeiten: Er kann sich bemühen, da letzten Endes jedes biologische Problem in seiner Durchführung zu einem analytischen wird, neue Methoden der Analyse zu finden oder vorhandene dieser speziellen Aufgabe anzupassen und — wenn möglich — zu verfeinern. Er kann aber auch versuchen, Vorstellungen und Begriffe seines Arbeitsgebietes in die spezielle biologische Fragestellung hineinzutragen. Ist das erstere in der Regel der Gegenstand unserer täglichen, alltäglichen Arbeit, so mag einmal bei festlichem Anlaß, wie er hier geboten ist, mit geziemender Vorsicht auch das letztere versucht werden. Dies um so mehr, als in den vergangenen 2 Jahrzehnten die Biophysik und -chemie immer weitere Gebiete in den Kreis ihrer Betrachtungen einbezogen haben und andererseits die Histologie mit neuen, oder zumindest noch wenig erprobten Methoden in unlängst noch nicht zugängliche Bereiche vordringt. Wer mit Fluoreszenzmikroskop, Phasenkontrast, Polarisationsmikroskop und schließlich mit einem Elektronenmikroskop arbeiten kann, hat sich nicht nur die Frage vorzulegen: Was sehen wir, sondern erst recht die: Was wollen und müssen wir sehen. Die Lage des Histopathologen, der nach oft jahrelangem Krankheitsverlauf das Gehirn zur Untersuchung erhält, gleicht, sofern er nicht nur beschreiben, sondern auch funktionelle Zusammenhänge aufdecken will, ein wenig der des Geologen, der aus heute zu Tage geförderten Gesteinsproben Ereignisse längst vergangener Epochen rekonstruieren soll.

---

\* Herrn Professor WILLIBALD SCHOLZ zur Vollendung seines 60. Lebensjahres gewidmet.

Die *chemische* Analyse, wie groß ihre Bedeutung auch ist, gibt nur Aufschluß über das, *was* vorliegt, nicht darüber, *wie* es entstand. Überdies ist ein beachtlicher Teil der Geisteskrankheiten anscheinend so beschaffen, daß meßbare Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung des Gehirns dabei nicht auftreten. So wenig sich in vielen Fällen normale und pathologische Gehirne in Gewicht, Volumen und anatomischem Bau unterscheiden, so wenig auch in ihrem Gehalt an den chemischen Elementen, welche die lebende Materie aufbauen, also an C, H, O, N, P und S oder auch an Kohlenstoffverbindungen, wie z. B. Kohlenhydraten, Lecithin, Cholesterin u.a. Möglicherweise aber im Aufbau der Proteine, nämlich in deren Anordnung oder auch in der Anordnung der Aminosäuren im Proteinmolekül. Dagegen vermutlich weniger in der Zahl und Zusammensetzung der Aminosäuren, welche allein von der chemischen Analyse erfaßt wird, da dieser stets der hydrolytische Abbau der Proteine vorauszuweichen hat. Sofern Psychosen als Folge von Stoffwechselstörungen oder verbunden mit solchen auftreten, erstrecken sich diese sicherlich auf den Gesamtorganismus und man wird die pathologischen Veränderungen in jenen Organen suchen müssen, in denen der lebhafteste Stoffwechsel stattfindet.

„Experimentell“ durch chemische Substanzen erhält man Zustandsbilder, die an Psychosen erinnern, in vielen Fällen von Vergiftungen<sup>1</sup>. Dabei beeindruckt den Laien, welcher in Fragen der Psychiatrie ja auch der mit dem Psychiater arbeitende Chemiker ist, die Ähnlichkeit etwa eines Mescalinrausches mit einer Schizophrenie, eines Cardiazolkrampfes mit einem epileptischen Anfall, eines Alkoholdelirs mit einer Paralyse oder er wird angesichts der Wirkungen „innerer Vergiftungen“ etwa in Folge von Überproduktion oder Fehlleitung von Gallenfarbstoffen beim Ikterus oder in Folge einer Fehlsynthese von Porphyrinen bei der Porphyrurie an Fälle von Manisch-Depressiven erinnert. Hieraus Folgerungen zu ziehen wäre sehr voreilig und ist nicht unsere Sache, wohl aber mag die Bemerkung erlaubt sein — eben weil diese Vergiftungen die einzige Möglichkeit darstellen, von außen durch chemische Mittel auf das Zentralnervensystem einzuwirken — daß viele Stoffe, die der Chemiker gerade ihrer vergleichsweise beträchtlichen Reaktionsträgheit wegen als Lösungsmittel verwendet, wie Methyl- und Äthylalkohol, Chloroform, Äther, Schwefelkohlenstoff oder Benzol derart berauschend wirken. Setzen sie sich am Ende doch mit Bausteinen des Zentralnervensystems in echten chemischen Reaktionen um? Dies nachzuprüfen ist nur durch

<sup>1</sup> Wir ziehen hier die typischen Vergiftungen von Biokatalysatoren, wie z. B. die der Cytochromoxydase durch Kohlenoxyd, die den Vergiftungen von Katalysatoren der Chemie gleichen und in ihrem Mechanismus weitgehend aufgeklärt sind (vgl. WARBURG, O., Schwermetalle als Wirkgruppen von Fermenten, Berlin 1948), nicht in den Kreis unserer Betrachtungen.

die Verwendung von mit Isotopen markierten Substanzen möglich. Von den bekannten radioaktiven Isotopen kommt dafür eigentlich nur der Schwefel  $^{35}\text{S}$  in Frage wegen seiner Halbwertszeit von 88 Tagen. Man wird also für solche Untersuchungen zu den, auch aus anderen Erwägungen heraus zu bevorzugenden, stabilen Isotopen greifen und sie mit Hilfe des Massenspektrographen nachweisen müssen. Wenn aber die oben erwähnten Stoffe *nicht* in Reaktion treten, was sehr wahrscheinlich ist, liegt ihre Wirkung dann darin, daß sie lebensnotwendige Stoffe aus dem Gewebe herauszulösen vermögen? Dies nachzuweisen erscheint ziemlich aussichtslos, überdies sind für eine solche Wirkung die wirksamen Konzentrationen vergleichsweise zu klein. Dagegen könnte man daran denken, daß sie die Proteine zu denaturieren vermögen. Ehe wir uns aber mit der Denaturierung befassen, haben wir uns einmal zu fragen, in welchen Bereichen pathologische Veränderungen zu suchen sind, sofern es sich nicht um die wohlbekannten und ausführlich beschriebenen, makroskopischen oder, wenn der Ausdruck erlaubt ist, „grobmikroskopischen“ handelt, wie man sie bei Geschwülsten oder Entzündungen findet, wenn schon die chemische Analyse, d. h. die Untersuchung des mikromolekularen Aufbaus der Substanz, uns im Stich läßt. Die Antwort kann nur sein: Im Bereich jener Gebilde, deren Ausdehnung zwischen  $10^{-6}$  und  $10^{-4}$  cm liegt, in den *Makromolekülen* und ihren Anordnungen zu Komplexen wie Lamellen, Schichten oder Micellen. Man liest auch gelegentlich von einer „kolloidchemischen Betrachtungsweise“, aber man sollte sich angewöhnen, wenngleich immer wieder aus alter Gewohnheit Bücher über „Kolloidchemie“ geschrieben werden, dieses etwas verwaschene, heterogene Erscheinungen umfassende Wort, das eben dort wo der Begriff fehlte, sich seinerzeit einstellte<sup>1</sup>, durch den wohldefinierten Begriff der „Chemie der Makromoleküle“ zu ersetzen. Die Bedeutung dieser Strukturelemente wird von P. JORDAN<sup>2</sup> in seiner Abhandlung: „Verstärkertheorie der Organismen“ hervorgehoben. Er schreibt da: „Wir dürfen als gesichert ansehen, daß in den Organismen zwischen der atomaren und molekularen Mikrostruktur und der makroskopischen Grobstruktur andererseits Strukturen eingeschaltet sind, deren Abmessungen in lückenloser Folge alle Größen zwischen atomaren und makroskopischen Dimensionen besetzen; während im Gegensatz dazu beispielsweise in einem NaCl-Kristall keine strukturellen Zwischenstufen zwischen den einzelnen Ionen und dem makroskopisch beliebig großen Kristall bestehen“. Da diese Strukturelemente tatsächlich in lückenloser Folge vorhanden sind, wie u. a. die Untersuchungen von W. J. SCHMIDT<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Der Chemiker pflegt so ziemlich alles als „kolloidal“ zu bezeichnen, was nicht ordentlich auskristallisiert.

<sup>2</sup> Naturwiss. 26, 537 (1938).

<sup>3</sup> SCHMIDT, W. J., Naturwiss. 31, 481, 509 (1938)

zeigen, ist die erste Aufgabe wohl, festzustellen, in welche Größenordnung jene fallen, die für die Funktionen des Z. N. S. von besonderer Bedeutung sind. Hierzu sei eine kleine Überlegung erlaubt: Wenn man das Bewußtsein und seine Inhalte als an ein materielles Substrat gebunden ansieht — und man muß dies wohl tun, so lange nicht das Gegenteil bewiesen ist — dann müssen die Zellen oder die oben erwähnten Strukturelemente dies sein. Welche Größenordnung dürfen sie haben? Die Annahme, daß eine Vielzahl von Einzelementen vorliegt, ist wohl am ehesten beim Gedächtnis erlaubt. Rechnet man daß, da ja — zumindest im Unterbewußtsein — jedes Einzelerlebnis gespeichert ist, für jeden durchlebten Zeitabschnitt von 3 sec zumindest *ein* solches „Erinnerungselement“ vorliegt, so ergibt das für täglich 14 Std bewußten Erlebens in einem 30jährigen Leben etwa  $2 \cdot 10^8$  solcher Elemente. Wäre für jedes davon ein materielles Substrat, ein „Träger“ von der Größe etwa eines Virus nötig, also von einem Molekulargewicht von  $10^7$  bis  $10^8$ , so wären in einem Gramm Gehirnmasse — sofern nur ein Promille aus solchen Trägern bestünde, das übrige aus Wasser, Stützgewebe oder Substanzen, die rein physiologischen Zwecken, wie der Ernährung, dienen — deren  $10^{13}$  enthalten, d. h. die materielle Basis würde reichlich für das Hunderttausendfache ausreichen. Nimmt man dagegen an, daß diese Träger die Größe von Zellen hätten, so sinkt dieser Faktor bereits auf die Größenordnung von 100. (Eine andere, recht bemerkenswerte Überschlagsrechnung hat TRURNIT<sup>1</sup> angestellt: Er berechnet die Menge Strychnin, die benötigt würde, um die Ganglienzellen des Rückenmarks mit einer monomolekularen Schicht zu überziehen. Diese Menge ist von gleicher Größenordnung wie die zu einer vollen Vergiftung ausreichende. H. MAYER<sup>2</sup> weist in diesem Zusammenhang darauf hin, welche große Bedeutung die dünnen Schichten für Fragen der Biologie gewinnen können.)

Solche Überlegungen mögen als müßige Spielerei erscheinen, sie zeigen aber doch, in welchen Dimensionen man die Elemente suchen darf, die Veränderungen aufweisen könnten, wenn psychische Störungen auftreten. Wohl kaum in den mit der üblichen Mikroskopie erfaßbaren größeren Strukturelementen, noch in den Molekülen der organischen Chemie, deren Ausdehnung bei  $10^{-8}$ — $10^{-6}$  cm liegt, sondern eben in den oben erwähnten Makromolekülen und ihren Komplexen. Von der Seite der Chemie her nähert man sich ihnen über die Chemie der Proteine, die vorwiegend ihre Bausteine bilden. Sei es, daß man mit entsprechend angestellten Modellversuchen arbeitet, wie z. B. der Herstellung monomolekularer Schichten und Adsorption an solchen, eine Arbeitsrichtung,

<sup>1</sup> TRURNIT, H. J., Pflügers Arch. 243, 526 (1940).

<sup>2</sup> MAYER, HERBERT, Aktuelle Forschungsprobleme in der Physik dünner Schichten, München 1949, Verlag R. Oldenburg, im Druck.

die vorwiegend von LANGMUIR<sup>1</sup> und seiner Schule entwickelt wurde, sei es, daß man mit den wenigen Analysenmethoden, die das Gefüge der Komplexe einigermaßen schonen, sie zu untersuchen versucht. Also vorzüglich entweder mit optischen Methoden wie Messung der Absorption, Refraktion, des Dichroismus, der Doppelbrechung und der Drehung des polarisierten Lichtes, oder mit Methoden, die auf die Oberflächeneigenschaften ansprechen, also Adsorption von Farbstoffen, Fluorescenzanregung, Chromatographie und Elektrophorese. Letztere allerdings liefert zunächst nur eine Aufteilung der Proteine in Fraktionen nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, also das Verhältnis  $e/m$  von Ladung und Masse. Dabei gelangen unter Umständen Teilchen recht verschiedener Art und Größe in die gleiche Fraktion, sofern sie nur gleiches  $e/m$  haben. Daneben wirken die Oberflächenkräfte nur als Größe 2. Ordnung, dadurch daß durch sie Assoziationen von Molekülen sekundär eintreten oder daß durch Hydratation die innere Reibung und damit auch die Wanderungsgeschwindigkeit verändert wird. Man darf sich also nicht wundern, wenn die Elektrophorese, obzwar sie die weitaus exaktere Methode ist, nicht immer das erfäßt, was die althergebrachten, vergleichsweise primitiven Liquorreaktionen wie Goldsol- und Mastixreaktion erfassen können. Diese nämlich, so ungeklärt sie in ihrem Mechanismus auch sind, beruhen doch in 1. Linie auf der Ausfällung von Kolloiden und sprechen sowohl auf die Oberflächenkräfte der Makromoleküle im Liquor als auch auf dessen Elektrolytgehalt an. Darauf beruht ihr durch die Erfahrung immer wieder bestätigter diagnostischer Wert. Auch die Tatsache, daß diese „Liquorkurven“ nicht immer mit dem Eiweißgehalt oder mit dem Eiweißquotienten parallel gehen, ist dadurch bedingt, daß sie nicht nur die Mengen, sondern daneben auch die Eigenschaften der im Liquor gelösten Makromoleküle abbilden.

Eine reine Oberflächenreaktion dürfte dagegen die von PLAUT, BOSSERT und BÜLOW<sup>2</sup> aufgefundene Fluorescenzanregung des Urobilins sein, die allerdings nicht von ihnen als das erkannt wurde, was sie ist. In der Absicht nämlich, festzustellen, ob manche Liquores Bestandteile enthalten, die eine vorhandene Fluorescenz — sie dachten dabei an das Lactoflavin — „maskieren“ könnten, gaben sie zu Liquor Urobilin und fanden, daß es dann in Konzentrationen, in denen es spontan keine Fluorescenz zeigt, deutlich grün fluoresciert. Es war mir von Anfang an klar, daß hier eine ausgesprochene Fluorescenzanregung durch Adsorption an Eiweiß vorliegt. Systematische Versuche dazu<sup>3</sup> erwiesen u.a., daß die Bindung ziemlich fest ist, denn der gesamte Komplex läßt sich — einmal entstanden — als ganzes an Kieselgur adsorbieren und wieder

<sup>1</sup> Vgl. MAYER, H., ebenda, S. 220 ff.

<sup>2</sup> PLAUT, F., H. BOSSERT und M. BÜLOW, Klin. Wschr. **13**, 1455 (1934).

<sup>3</sup> Unveröffentlicht.

mit NaCl-Lösung eluieren. Es werden auch jene Proteine, die starke Fluoreszenzanregung geben, selbst leicht an Adsorbentien gebunden und können so angereichert werden. Der Sättigungswert wird schon bei geringen Konzentrationen von Urobilin erreicht. Denaturierung durch Erhitzen oder Zusatz von Alkohol nimmt den Proteinen diese Fähigkeit zur Fluoreszenzanregung weitgehend. Ob man daraus ein Verfahren zum „Austitrieren“ oberflächenaktiver Liquorproteine entwickeln kann, muß sich erst erweisen. Wir haben hier diese Erscheinungen lediglich erwähnt, weil sie besonders deutlich bei entzündlichen Prozessen zu beobachten sind und anzunehmen ist, daß in diesen Fällen die Proteine so, wie sie im Gehirn vorhanden sind, also in der wahrhaft „nativen“ Form auch in den Liquor gelangen. Normalerweise dürfte der Liquor sie bereits als Abbauprodukte in verändertem Zustand enthalten und man hat auch in pathologischen Liquores im allgemeinen nur ein abgeflachtes flaves Bild der pathologischen Veränderungen im Gehirn. Da man aber von den Kranken zu Lebzeiten nur Blut und Liquor untersuchen kann, muß man eben herauszuholen versuchen, was nur irgendwie möglich ist. Über die Bluteiweißkörper ist eine Fülle von Einzeltatsachen festgestellt worden<sup>1</sup>. Ob Veränderungen in den Proteinen des Zentralnervensystems sich auch im Serum bemerkbar machen oder ob hier der Anteil zu klein ist, wäre erst zu untersuchen. Daß selbst bei schwerwiegenden Veränderungen im Gehirn nicht entsprechende im Serum und Liquor auftreten *müssen*, sehen wir bei der amaurotischen Idiotie<sup>2</sup>, bei der einer starken Cholesterinablagerung im Gehirn keine äquivalente Erhöhung der Cholesterinwerte im Serum und Liquor gegenübersteht. Wie aber kommen solche Ablagerungen zustande? Es wäre möglich, durch eine Fehlleistung beim Aufbau der Zellen, also durch eine echte biochemische *Reaktion*, wobei die gespeichert erscheinende Substanz nicht wie im normalen Fall aus dem Reaktionsmechanismus herausgenommen wird. Oder aber durch eine „Ausfällung“, nach der sie in einem physikalischen Zustand vorliegt, der ihre weitere Beteiligung am biologischen Geschehen unmöglich macht, sie zur Schlacke stempelt, die eigentlich nun entfernt werden müßte. Ob bei solchen Ablagerungen der pathologische Vorgang in ihrer Entstehung liegt oder vielmehr darin, daß sie nicht aus dem Gewebe entfernt werden, wird schwer zu entscheiden sein. Zu den meist erwähnten derartigen Ablagerungen gehören die „senilen Drusen“, Ablagerungen offenbar von Proteinen, die der Histologe mittels ihres argentophilen Verhaltens nachweist. A. VON BRAUNMÜHL<sup>3</sup> erklärt sie als Ausfällungen von Kolloiden, also nach neuerer Terminologie von Makromolekülen.

<sup>1</sup> Vgl. vor allem: WUHRMANN, F. und C. H. WUNDERLI, Die Bluteiweißkörper des Menschen, Basel 1947.

<sup>2</sup> Unveröffentlicht.

<sup>3</sup> Zbl. Neur. 167, 78 (1939).

Dabei ist allerdings zu bedenken, ob man von einer „Fällung“ sprechen darf, da eine solche strenggenommen voraussetzt, daß die Proteine im Gehirn gelöst vorlagen, was zumindest für einen Teil von ihnen bedeutet, daß sie dort nicht definierte Lagen gegeneinander einnehmen, sondern jede beliebige Anordnung gleichwertig ist. (Dies gilt natürlich nur für den „gelösten“ Anteil, der als solcher „fällbar“ ist.) Vergleicht man, wie von BRAUNMÜHL es tut, diese Ausfällungen mit der von Ferrocyan kupfer, die er als Modellversuch heranzieht, so setzt man eben dies voraus, denn in diesem Modellversuch wird ja aus echten Lösungen (überdies von Ionen!) ausgefällt. Ist aber diese Voraussetzung erfüllt, dann sagt die Übereinstimmung des Bildes der Fällung in beiden Systemen vielleicht noch mehr aus, als v. BRAUNMÜHL daraus schließt. Denn die von ihm als Modell herangezogene Fällung des Ferrocyan kupfers ist ein ganz spezieller Einzelfall, bei dem in der zu fällenden Lösung eine semipermeable Niederschlagsmembran entsteht, die zunächst den Tropfen des Fällungsmittels umhüllt, dann infolge der Osmose zerreißt, worauf eine zweite solche Membran mit etwas größerem Radius entsteht und abermals zerreißt und jenes Bild von „Kern“ und „Hof“ bleibt, das so verblüffend an die Drusen erinnert. Nun kann man allerdings nach Wahl der Konzentration und der Geschwindigkeit des Zusammengebens beider Lösungen gerade mit dieser, durch PFEFFER so berühmt gewordenen, Ferrocyan kupfermembran die seltsamsten Gebilde erzeugen, so auch kugelige und schlauchartige, die an Algen erinnern und bisweilen dazu verführt haben, sie als „anorganische Zellen“ zu bezeichnen. Sie haben mit den lebenden Zellen nichts gemeinsam als ihr Verhalten gegenüber der Osmose und die Tendenz aller nichtkrystallinen Materie Formen geringster Oberflächenspannung anzunehmen. Dies nur als Hinweis darauf, wie leicht derartige Modelle dazu verführen können, aus morphologischer Ähnlichkeit, bedingt durch einige Eigenschaften, eine wesentliche Übereinstimmung abzuleiten.

Fragen wir uns, worin der 1. Schritt zu einer solchen Ausfällung oder Ablagerung besteht, so ist die Antwort, so weit es sich um Proteine handelt: in der *Denaturierung*. Darunter versteht man jenen Vorgang, der die Proteine so verändert, daß sie am isoelektrischen Punkt unlöslich werden und ausfallen. Also nicht die Fällung ist die Denaturierung, sondern die ihr vorausgehende Veränderung der Proteine, deren Natur bisher unbekannt ist. Sie kann durch Erhitzen erfolgen, durch Zusatz von Denaturierungsmitteln wie Alkali, Säure, Harnstoff, Alkohol u. a. oder durch Röntgenstrahlen, UV-Belichtung, Belichtung mit sichtbarem Licht in Anwesenheit eines Sensibilisators und sogar schon durch Schütteln der Lösungen. Ob es stets die gleiche Veränderung ist, die eine Ausfällung am isoelektrischen Punkt zur Folge hat, ist ungewiß, nur diese Folge haben alle erwähnten Vorgänge gemeinsam. Native Proteine,

so wie sie im lebenden Organismus vorkommen, sind außerhalb dieses somit recht instabile Gebilde. Die Denaturierung erfolgt nicht wie etwa das Auskristallisieren eines Salzes bei einem definierten Temperaturpunkt, sondern bei jeder Temperatur in bestimmtem Maß, dem Gesetz der monomolekularen Reaktion folgend, mit einem enorm hohen Temperaturkoeffizienten von etwa 600, wie ihn keine andere biochemische Reaktion aufweist, wohl aber manche biologischen Vorgänge, wie die Zerstörung von Bakterien, Antikörpern und Enzymen (die in der folgenden Mitteilung im Zusammenhang mit der Treffertheorie von BOHR eingehender erörtert werden sollen) und anderem biologischen Material durch Hitze. Man zog daraus den Schluß, daß der 1. Schritt bei all diesen Vorgängen die Denaturierung ist. Auch für die Abtötung von Zellen durch Strahlung wird von DESSAUER angenommen, daß der Primärvorgang in der Denaturierung der Proteine besteht. Hier mag im Zusammenhang mit den senilen Drusen erwähnt sein, daß vielfach als Ursache des Alterns eine Anreicherung radioaktiver Substanzen im Organismus und die damit folgende Strahlenschädigung — die ja zu Denaturierungen und anschließend Ablagerungen führen könnte — angesehen wird. (Von all diesen Methoden der Denaturierung sind es vorzüglich die mittels chemischer Verbindungen wie Alkohol oder mit Röntgenstrahlen<sup>1</sup>, die Material für histologische Untersuchungen bieten können.) So hat auch A. KREBS<sup>2</sup> gezeigt, daß die Bioradioaktivität, die normalerweise pro Gramm Gewebe im menschlichen Organismus  $10^{-14}$ — $10^{-12}$  g Radiumäquivalent beträgt, im Lauf des Lebens beträchtlich zunimmt. (Man könnte einmal, um zu sehen wie stark diese Zunahme im Gehirn ist und ob dort, wo Alterungserscheinungen besonders leicht beobachtet werden, eine stärkere Anreicherung der radioaktiven Stoffe erfolgt, Radiogramme von jungen und alten Gehirnen nach der Methode von H. SCHÄFER<sup>3</sup> miteinander vergleichen.)

Der Vorgang der Denaturierung ist, wie oben erwähnt, noch nicht geklärt. Er kann in einer Veränderung der Oberflächenkräfte bestehen, in einer Formänderung der Makromoleküle oder in einer Veränderung der aus ihnen aufgebauten Komplexe. Wie aber kann sie der Histologe nachweisen? Im fixierten Gewebe auf keinen Fall, da die Proteine hier schon weitgehend denaturiert und teilweise sogar abgebaut sind, besonders bei Formolfixierung, da Formaldehyd mit Eiweißstoffen reagiert<sup>4</sup>. Ist die Denaturierung eine Veränderung der Oberflächenkräfte, so wird man sie

<sup>1</sup> SCHOLZ, W., Klin. Wschr. 14, 189 (1935).

<sup>2</sup> Z. Altersforsch. IV, 53 (1942).

<sup>3</sup> Naturwiss. 31, 383 (1943).

<sup>4</sup> Die beim Fixieren fortschreitende Denaturierung könnte man mittels der Nitroprussidreaktion, die natives Eiweiß nicht gibt, wohl aber denaturiertes, verfolgen.



mittels der Färbemethoden nachweisen können, die ja, sofern sie nicht — in einigen seltenen Fällen — das Ergebnis einer chemischen Reaktion sind, die ein farbiges Produkt liefert, oder durch Auflösen des Farbstoffs in Bestandteilen des Gewebes (Färben der Fette) zustandekommen, auf einer Adsorption der Farbstoffe beruhen. Meist durch eine von basischen Farbstoffen an sauren Gruppen des Substrats oder umgekehrt, wie aus der Abhängigkeit dieser Färbungen vom pH-Wert des Substrats ersichtlich ist. Die oft bedauerte Tatsache, daß das Gehirn so schwer „vital“ zu färben ist, wird darauf zurückgeführt, daß die Farbstoffe die Blut-Hirnschranke nicht passieren können. Da aber die Proteine des unverdünnten Blutes, die Poren von Ultrafiltern mit einem Durchmesser von 40—50  $\mu$  verstopfen<sup>1</sup> offenbar doch ins Gehirn gelangen, müßten eigentlich die so viel kleineren Farbstoffmoleküle das auch können. Wenn aber im nativen Zustand der Proteine des Gehirns deren basische und saure Gruppen im Inneren der aus den Molekülen aufgebauten Micellen liegen, dann wäre es verständlich, daß basische und saure Farbstoffe nicht angelagert werden, sondern dazu erst ein Abbau vorausgehen muß. SPATZ<sup>2</sup> weist darauf hin, daß es doch Vitalfärbungen an Gehirnen gäbe, nämlich beim Ikterus der Neugeborenen. Allerdings liegt hier keine Färbung im üblichen Sinne vor, der Gallenfarbstoff ist vielmehr die prosthetische Gruppe eines Makromoleküls analog dem Hämin im Hämoglobin. W. SCHOLZ<sup>3</sup> führt diesen Kernikterus auf einen Sauerstoffmangel der betroffenen Gehirnpartien zurück. Man kann in diesem Zusammenhang die Frage stellen, ob in diesem Fall die prosthetische Gruppe auch wirklich das Bilirubin ist, oder nicht etwa ein Dioxymethen, das unter diesen besonderen Umständen an Stelle eines der farblosen, zweikernigen Pyrrolderivate auftritt, die als Propentdyopente bezeichnet werden<sup>4</sup>. So könnte bei genauer Analyse derartiger Fälle aus der Feststellung von W. SCHOLZ ein wertvoller Beitrag zur Kenntnis des Bildungsmechanismus der Pyrrolfarbstoffe im Organismus resultieren. Jedenfalls erscheint es in diesem Zusammenhang verlockend, einmal zu versuchen, ob man mit Stoffen der Bilirubinoidgruppe, die als prosthetische Gruppe auftreten, solche Vital-„Färbungen“ auch experimentell erzielen kann.

Die aussichtsreichste Methode zur Bestimmung der Oberflächeneigenschaften dürfte die Fluorochromierung sein. Es sei hier vorzüglich die bekannte Methode von S. STRUGGER<sup>5</sup> erwähnt, mit Acridinorange als

<sup>1</sup> Vgl. WUHRMANN, F. und C. H. WUNDERLI, Die Bluteiweißkörper des Menschen, Basel 1947, S. 13.

<sup>2</sup> SPATZ, H., Arch. f. Psychiatr. **101**, 267 (1933).

<sup>3</sup> SCHOLZ, W., persönliche Mitteilung.

<sup>4</sup> FISCHER, H. und H. v. DOBENECK, HOPPE SEYLER'S Z. **263**, 125 (1940) sowie PRUCKNER, F. und H. v. DOBENECK, Z. physik. Chem. (A) **190**, 43 (1941).

<sup>5</sup> Jena. Z. Naturwiss. **73**, 97 (1940); Protoplasma (Berl.) **37**, 73 (1943); Naturwiss. **34**, 267 (1947).

Indikator, das von lebenden Zellen grün, von abgetöteten rotfluoreszierend gespeichert wird, wobei maßgebend für die Fluoreszenzfarbe bzw. deren Umschlag der pH-Wert des Mediums ist. Bisweilen erhält man auch bei zweifelsohne abgetöteten Zellen grüne Fluoreszenz, wie wir das z. B. bei Spermatozoen sahen, die mit Sublimat, Toxiferin u. a. und durch Erhitzen abgetötet waren<sup>1</sup>. Gleiche Ergebnisse erhielt auch A. KREBS und schreibt dazu u. a.<sup>2</sup>: „ . . . fluoresciert nämlich, wie das STRUGGER für acridinorange-vital gefärbte Zellen behauptet, lebendes Eiweiß grün, totes hingegen rot und kann der Farbumschlag als einwandfreies Kriterium für das Eintreten des Zelltodes angenommen werden . . . “. Nun fluoresciert allerdings Eiweiß selbst weder „lebend“ noch „tot“ grün oder rot, sondern in beiden Fällen blau und die Fluoreszenz, von der hier die Rede ist, kommt ausschließlich dem Komplex Acridinorange + Eiweiß zu. Die Möglichkeit aber, durch die STRUGGERSche Methode lebende und abgetötete Zellen zu unterscheiden, ist so wichtig, daß man schon einige Mühe darauf verwenden darf, die Versuchsbedingungen derart festzulegen, daß sichere Resultate zu erzielen sind. Nach KREBS beruht die grüne Fluorochromierung auch abgetöteter Zellen, die dann permanent ist, auf Quellungs- und Diffusionsvorgängen. Wir möchten eher annehmen, vor allem nach den Versuchen von H. KÖLBEL<sup>3</sup>, die zeigen, daß tote Hefezellen mehr als 10mal so viel Acridinorange speichern als lebende, daß zunächst die „nativen“ Eiweißkomplexe, die nur geringe Mengen speichern, wie schon oben erwähnt, außen keine sauren Gruppen haben. Solche werden frei, wenn beim Tod der Zelle der Zerfall dieser Komplexe einsetzt und damit wird die starke Adsorption von Acridinorange und Rotfluorochromierung möglich. Bei noch weitergehender, völliger Zerstörung werden dann diese Gruppen abgebaut und die von KREBS erwähnte permanente Grünfluorochromierung tritt auf. Es wird sich also hier darum handeln, gerade jene Stufe zwischen nativem Eiweiß und gänzlichem Abbau, also den Zustand der primären Denaturierung zu erfassen, wenn man mit der STRUGGERschen Methode abgetötete Zellen, eventuell auch im Gewebe, einwandfrei feststellen will.

Neben der Fluorochromierung dürfte die Adsorption mit Isotopen markierter Stoffe, besonders wenn es sich um radioaktive Isotope handelt, die sich durch den Spitzenzähler oder für diese Zwecke noch besser mittels der bereits erwähnten Radiographie nachweisen lassen, gute Resultate liefern. So hat F. ROEDER<sup>4</sup> in einer interessanten und eingehenden Untersuchung das Adsorptionsvermögen einzelner Gehirn-

<sup>1</sup> Dissertation FARMANFARMAYAN, K., Techn. Hochschule München 1942.

<sup>2</sup> Naturwiss. **34**, 59 (1947).

<sup>3</sup> Z. f. Naturforsch. **26**, 382 (1947).

<sup>4</sup> Naturwiss. **33**, 111 (1946).

partien für Phosphationen festgestellt. Die Unterschiede betragen bis zu einigen 100%. Daß hier vorwiegend die *Adsorption* dieser Ionen und nicht — wie ROEDER es eigentlich beabsichtigte — der *Phosphorstoffwechsel* gemessen wurde, beweisen seine eigenen Versuche<sup>1</sup> und die von ihm erwähnten von NIEMER mit zerriebener Hirn- und Muskelsubstanz. (Will man die Intensität des Phosphorstoffwechsels untersuchen, so muß man sich schon die Mühe machen, dessen Produkte rein zu isolieren oder man muß zumindest nachweisen, daß die mit dem Spitzenzähler untersuchten Substanzen kein unverändertes adsorbiertes Phosphat mehr enthalten.)

Wir haben angenommen, daß die Denaturierung im engen Zusammenhang mit dem Zerfall der Micellarstruktur der Proteine steht. Sie zu untersuchen, vermag nur der Histologe und dies am besten am unfixierten Präparat. Die großen Hoffnungen, die P. JORDAN<sup>2</sup> in das Elektronenmikroskop als Mittel zur Untersuchung dieser Strukturelemente der Organismen setzte, haben sich bis jetzt nicht ganz erfüllt. Der Grund hierfür liegt vor allem in dem durchaus berechtigten Bedenken gegen eine so intensive Beanspruchung des Materials, die Artefakte verursachen kann und der daraus folgenden Unsicherheit in der Deutung der Befunde. Vergleicht man die — wenn wir es so nennen dürfen — Unbekümmertheit, mit der man sowohl im Elektronenmikroskop wie bei den meisten Färb- und Fixierungsmethoden das organische Material behandelt, mit der Vorsicht, mit welcher etwa beim TISELIUSSchen Verfahren Eiweißkörper untersucht werden, so wünscht man sich für die Histologie ähnliche materialschonende Methoden. Sie existieren in all den Verfahren, welche die auch ohne Färbung bestehenden optischen Unterschiede zu verwenden erlauben. Zunächst einmal hat ja jede chemische Verbindung, auch die im Sichtbaren farblose, eine charakteristische Absorption und somit „Farbe“, allerdings im Ultraviolett. Wer über ein Mikroskop mit Quarzoptik verfügt, kann so die Unterschiede in der Zusammensetzung sichtbar machen, sofern nur die Partien einheitlicher Stoffe groß genug und ihre Absorptionsbanden, vor allem die Minima, weit genug voneinander getrennt sind. Es wäre z. B. prinzipiell möglich und auch praktisch nicht allzu schwierig durchzuführen, die Farbenunterschiede im UV ins Sichtbare zu übertragen. Man muß dazu nur zunächst mit einer Serie passender Filter, die man durch Lösungen herstellen kann, eine Reihe von Aufnahmen mit aufeinander folgenden schmalen Spektralbereichen machen. Hat man so etwa im Bereich von 3000, 3200 . . . . bis 4200 ÅE 6 Negative erhalten und kopiert sie nacheinander mit den Wellenlängen 4400, 4800 . . . . bis 6400 ÅE auf eine farbenempfindliche Platte, so kann man ein farbiges Bild erhalten, auf dem nun z. B. eine

<sup>1</sup> ebenda S. 117.

<sup>2</sup> s. S. Naturwiss. 26, 539 (1926).

Stelle, die im UV bei 3200 ÅE ein Absorptionsminimum hat, grün, eine andere, für die es bei 3800 ÅE liegt, orange erscheint. Solche Unterschiede beziehen sich selbstverständlich auf die chemische Zusammensetzung, während die Anordnung gleicher Stoffe zu Micellen, wie sie theoretisch grundlegend bereits in der Micellartheorie von NÄGELI diskutiert und für die Makromoleküle zuerst von H. MARK<sup>1</sup> und W. J. SCHMIDT<sup>2</sup> bewiesen wurde, mittels der Doppelbrechung und des Dichroismus zu messen ist. Es sei hierfür besonders auf die ausführlichen Untersuchungen von W. J. SCHMIDT<sup>3</sup> über die „molekulare Bauweise tierischer Zellen und Gewebe und ihre polarisations-optische Erforschung“ hingewiesen sowie auf neuere Untersuchungen von H. H. PFEIFFER<sup>4</sup> über „Lebendmikroskopie mit monochromatischem polarisiertem Licht“. Neben der Formdoppelbrechung der Micellen erfassen diese Methoden auch die Eigendoppelbrechung und die optische Aktivität der Moleküle und mit dieser, der optischen Aktivität, einen der wesentlichsten und interessantesten Züge der lebenden Materie. Während bei Verbindungen, die asymmetrische C-Atome enthalten, also optisch aktive Antipoden zu bilden vermögen, die sich in ihrer räumlichen Anordnung der Atome wie Bild und Spiegelbild unterscheiden, bei der Totalsynthese in vitro stets beide Formen in gleicher Menge gemäß dem Gesetz der Wahrscheinlichkeit entstehen *müssen*, also ein Racemat erhalten wird, tritt im lebenden Organismus jeweils nur die *eine* Form auf. Man sieht, da alle weiteren optisch aktiven Naturstoffe, wie Proteine, Kohlenhydrate u. a. teilsynthetisch aus bereits optisch aktiven Bausteinen entstehen, den Beginn dieser Reihe, also die primäre optisch aktive Teilsynthese des Lebendigen, in der Bildung der Hexose bei der Assimilation in der Pflanze. Sie erfolgt unter maßgebender Beteiligung des selbst optisch aktiven Chlorophylls. Wir konnten zeigen<sup>5</sup>, daß das Chlorophyll und seine Derivate eine außerordentlich starke Rotationsdispersion besitzen, also eine hohe Abhängigkeit der optischen Drehung von der Wellenlänge des zur Messung verwendeten Lichtes, und im Bereich der starken Absorptionsbanden im Blau Werte der spezifischen Drehung bis zu 5000° erreicht werden. Eine derart hohe optische Aktivität ist nur verständlich, wenn größere Molekülkomplexe dazu beitragen. Da aus anderen Gründen, auf die hier nicht einzugehen ist, selbst in den verdünnten Lösungen ( $10^{-5}$ — $10^{-6}$  molar), mit denen wir unsere Messungen ausführten, eine Assoziation der Moleküle anzunehmen ist, darf man vermuten, daß die „Assimilationseinheit“<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Naturwiss. 16, 892 (1928).

<sup>2</sup> Naturwiss. 16, 900 (1928).

<sup>3</sup> Naturwiss. 31, 481, 509 (1938).

<sup>4</sup> Naturwiss. 36, 318 (1949).

<sup>5</sup> PRUCKNER, F., A. OESTREICHER u. HANS FISCHER, Ann. Chem. 546, 41 (1940).

<sup>6</sup> Vgl. FISCHER-ORTH, Die Chemie des Pyrolls II/2, Leipzig 1940, S. 364 ff.

solche Komplexe von vielleicht noch höherer optischer Aktivität enthält. Die spezifische Drehung der Aminosäuren, der Bauelemente der Proteine, liegt in der Größenordnung von  $20^\circ$  (mit Ausnahme des Cystins: d-Cystin  $-221^\circ$ , l-Cystin  $-200^\circ$  in HCl), die der Proteine selbst wird nicht viel höher angegeben, z. B. Serumalbumin in Wasser  $-54^\circ$ . Dies bedeutet zunächst, daß jedes Protein aus vielen Aminosäuren besteht, daß entweder nur solche Kombinationen vorkommen, die jeweils rechts- und linksdrehende Aminosäuren in annähernd gleicher Zahl enthalten, deren Summe sich bis auf diesen geringen Betrag aufhebt, was für ihre Entstehung ein über der reinen Statistik stehendes Ordnungsprinzip bedeuten würde, oder aber daß man sie nur in ziemlich zerstörtem Zustand gemessen hat. Wie leicht solche Zerstörung eintritt, zeigt die Abhängigkeit der Rotation vom  $pH$  und vom Neutralsalzgehalt der Lösung. Man sollte aber einmal die Drehung solcher Molekülkomplexe und Strukturelemente, die sich aus Proteinen aufbauen, systematisch untersuchen. Allerdings wird man auch dazu, wie wir es bei den Chlorophyllderivaten getan haben, um entsprechend hohe Werte zu erhalten, mutig in das Gebiet der anormalen Dispersion, d. h. in die starken Absorptionsbanden bei etwa  $2800 \text{ \AA}$  hineingehen müssen.

Unter dem Eindruck der hohen Bedeutung der optischen Aktivität der lebenden Substanz entstand die Auffassung, daß das Altern durch einen Racemisierungsprozeß bedingt sei. Experimentelle Beweise für die Abnahme der optischen Aktivität im alternden Organismus liegen meines Wissens noch nicht vor, doch könnte man sie mit den genannten Methoden suchen, am besten wohl im Gehirn. Der bekannteste und viel umstrittene Fall einer analytisch nachgewiesenen Bildung eines Racemats im Organismus ist die von F. KÖGL<sup>1</sup> entdeckte Racemisierung der d-Glutaminsäure in Carcinomen. Es scheint aber doch, daß hier die Racemisierung erst bei der Aufarbeitung, also beim hydrolytischen Abbau der Proteine erfolgt. Es erscheint auch einigermaßen schwer vorstellbar, daß eine solche eingreifende Veränderung einer Aminosäuregruppe erfolgt, so lange sie noch Bestandteil des Proteinmoleküls ist, umsomehr, als der Abbau der d-Aminosäuren in anderer Weise erfolgt als jener der natürlichen l-Aminosäuren. Doch darf man annehmen, daß im Carcinomgewebe bereits an den Proteinen Veränderungen einsetzen, die einer solchen anschließend bei der Hydrolyse eintretenden Racemisierung Vorschub leisten. Auch hier kann eine vergleichende Untersuchung der Strukturelemente von normalem und Krebsgewebe mit den erwähnten Methoden und schließlich auch die von lebendem und totem Gewebe manchen Aufschluß geben.

Ob die erwähnten Strukturelemente beim Tod zerfallen, wie dies mit der Denaturierung zusammenhängt, wie beides parallel geht mit der

<sup>1</sup> KÖGL, F., Hoppe-Seylers Z. 258, 57 (1939).

„vitalen“ und „toten“ Fluorochromierung, erscheint eingehender experimenteller Untersuchungen durchaus würdig. Hier aber rührt man an die Frage: Wodurch ist die *lebende* Materie ausgezeichnet gegenüber der toten? Macht der Stoffwechsel das Leben aus — aber den haben streng genommen auch die Mischkrystalle im Gleichgewicht mit der Lösung ihrer Ionen und er fehlt bei tiefgeköhlten Bakterien oder Spermatozoen, die dennoch auf höhere Temperatur gebracht wieder lebendig werden. Ist es die Fähigkeit zur Fortpflanzung, zur Autoreproduktion, die auch den Viren zukommt, die man wohl kaum als „lebend“ ansehen darf, und die andererseits jedem sterilen Lebewesen fehlt, das deshalb noch lange nicht tot ist. Vielleicht kann man es am besten so definieren: Ein System, das lebte, also sowohl Stoffwechsel wie die Fähigkeit zur Fortpflanzung besaß, ist dann tot, wenn *irreversible* Vorgänge eintraten, die es unfähig machen, beides wieder aufzunehmen. Dies gilt jeweils für eine Gesamtheit, ein Kollektiv, wobei durchaus möglich ist, daß Einzelteile, z. B. einzelne Zellen den Tod des Ganzen überleben. Man könnte vielleicht auch sagen, ein solches Kollektiv sei dann tot, wenn an Stelle eines Ordnungsprinzips, das dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik, dem Entropiesatz entgegensteht, nun dieser tritt, als Ergebnis der reinen Statistik, die das Grundgesetz der anorganischen leblosen Substanz darstellt. (Wobei wir hier dessen *statistische* Deutung, im Sinne BOLTZMANNs zugrundelegen.) Man braucht nur zu überlegen, worin denn eigentlich diese „Zunahme der Unordnung“, dieses Streben nach einem Endzustand völliger Gleichverteilung, welche den Inhalt des Entropiesatzes ausmacht, begründet ist. Offenbar darin, daß von allen *möglichen* Permutationen der Elemente des Kollektivs *jede* gleiches statistisches Gewicht hat, d. h. alle gleich wahrscheinlich sind. Eine „regelmäßige“ Anordnung der Elemente, wie a, b, a, b, . . . oder a,a, b,b, a,a, b,b . . . unterscheidet sich in ihrem Gewicht von keiner anderen möglichen unregelmäßigen a, b, a, a, b, a, b, b . . . Man könnte dies auch so ausdrücken: Die Elemente des Kollektivs, innerhalb dessen die Permutationen erfolgen, wissen nichts voneinander. Auf dieser Basis ruht die Thermodynamik, die kinetische Gastheorie, die Avogadrosche Regel und mit ihr die ganze Chemie — die Chemie der toten Materie.

Die klassische Statistik versagt im Bereich der Atome und Moleküle und an ihre Stelle tritt die Quantenstatistik und das Pauliprinzip, nach dem jeder durch 4 Größen bestimmte Quantenzustand nur von *einem* Elektron besetzt sein darf. Es ist dort also so, als ob die Elektronen eines abgeschlossenen Systems, Atom oder Molekül, von einander wüßten. Die klassische Statistik versagt vielleicht auch dort, wo ein „Wissen um Symmetrie und Ordnung“ besteht und bestimmte Gruppierungen, selbst wenn sie *energetisch* gleichwertig mit anderen sind, dennoch bevorzugt werden. *Wir* vermögen, denkend und urteilend, regelmäßige von regel-

losen Anordnungen zu unterscheiden und ihnen so unterschiedliches Gewicht zu geben. Wenn die lebende Materie auch solche Auswahl befolgt, wenn sie Anordnungen besonderer Regelmäßigkeit für ihren Aufbau bevorzugt, so wäre eben dies der grundlegende Unterschied von der unbelebten Materie. So könnten etwa die oben schon erwähnte Anordnung der Aminosäuren in den Proteinen in solcher Reihenfolge, daß die optische Aktivität innerhalb bestimmter Grenzen bleibt oder der Aufbau der Lamellen und Micellen aus kleinsten Formelementen Beispiele dafür sein. Sie zu suchen ist Aufgabe der physikalischen Chemie der Makromoleküle, aber auch der Histologie, nicht zuletzt der Histopathologie des Zentralnervensystems, wo eine Zerstörung solcher Ordnungen mit Funktionsstörungen des Organs konform gehen kann. Diese Störung der mizellaren Ordnung mag der 1. Schritt sein eines Vorganges, dem als nächster die Denaturierung der Proteine folgt und dann die Ausfällungen und Ablagerungen, deren Bild dem Histologen geläufig ist.

So zeigt sich, daß man bei der Betrachtung irgendeines Gebietes des Lebendigen kein noch so enges Teilproblem aufgreifen kann, ohne an die großen Fragen zu stoßen. Hierin liegt die besondere Schwierigkeit. Sie wird wettgemacht durch das Bewußtsein, daß auch jede Lösung eines noch so kleinen Teilproblems beiträgt zur Lösung eben jener großen Probleme.

Dr. phil. FRANZISKA PRUCKNER, (13b) München 23, Kraepelinstr. 2