

feiner fester Partikelchen, etwa von Ton oder Kreide, zentrifugiert, das heißt einem gegenüber der Norm erhöhten Schwerefeld aussetzt, dann werden die suspendierten Teilchen sich absetzen und zwar umso schneller, je größer und schwerer sie sind. Sehr feine Teilchen werden nur sehr langsam und bei hoher Tourenzahl zur Sedimentation zu bringen sein und die allerfeinsten schließlich werden bei einer gegebenen Tourenzahl als feine, „kolloidale“ Trübung in Schwebelag bleiben. Nun sind die Moleküle der Eiweißkörper zwar um mindestens das Hundertfache, in vielen Fällen um ein Vieltausendfaches schwerer als etwa eine Zuckermolekül, aber auch die größten von ihnen sind immer noch weit kleiner und leichter als die mechanisch suspendierten Teilchen, die wir in gewöhnlichen Zentrifugen zum Absitzen bringen können. Das bedeutet, daß eine Sedimentation von Eiweißkörpern aus ihren Lösungen zwar nicht mit gewöhnlichen Zentrifugen, wohl aber mit Zentrifugen von extrem hoher Tourenzahl, eben den Ultrazentrifugen, erreichbar ist. Nach dem Gesagten verstehen wir, daß in der Ultrazentrifuge bei einer gegebenen Tourenzahl relativ leichte Eiweißmoleküle am langsamsten und gegebenenfalls nur unvollständig, schwerere und größere Moleküle aber rascher und vollständig zur Sedimentation gebracht werden können. Man kann also bei geeigneter Wahl der Tourenzahl große und kleine Eiweißmoleküle voneinander trennen und man hat in der Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit ein Hilfsmittel, das eine eindeutige Bestimmung des Molekulargewichts jedes Eiweißkörpers und in vielen Fällen Aussagen über seine Gestalt ermöglicht. Die einzelnen Eiweißkörper unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer Molekulargewichte, die zwischen etwa 15 000 und einigen Millionen gelegen sind, wie hinsichtlich ihrer Formeigenschaften in charakteristischer Weise voneinander. Die experimentellen Schwierigkeiten und die apparativen Anforderungen dieser Methodik werden verständlich, wenn man bedenkt, daß der Bau derartiger hochtouriger Zentrifugen an sich eine technische Spitzenleistung ist, und daß die Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit während des Versuches in der mit ungeheurer Tourenzahl rasenden Zentrifuge vorgenommen werden muß, was nur mit sehr hochwertigen und kostspieligen optischen Hilfsmitteln möglich ist. Die Einrichtung einer Ultrazentrifuge erfordert einen Kostenaufwand von rund 70 000.— DM.

Während die Methode der Ultrazentrifuge im wesentlichen zu Aussagen über Gewicht und die äußere Gestalt der Eiweißmoleküle führt, erlaubt die Röntgenstrukturanalyse, die Grundlinien ihrer inneren Architektur aufzuhellen nach ähnlichen Prinzipien, wie dies für die Röntgenstrukturanalyse von Kristallen bekannt ist. Man hat auf diesem Wege schon wichtige Aussagen über den Aufbau einiger wohlkristallisierter Eiweißkörper (7), wie z. B. des Insulins und des Hämoglobins, und vor allem vieler faserförmiger Eiweißkörper (8), wie sie etwa in Wolle und Haar, in Seide, Sehnen und Hautfaser vorliegen, gewinnen können. Der apparative Aufwand für derartige Messungen ist immerhin wesentlich geringer als bei der Ultrazentrifuge; es stehen uns dafür auch in Regensburg in mehreren Hochschulinstituten Einrichtungen zur Verfügung. Die Auswertung der erhaltenen Röntgendiagramme aber ist rechnerisch schwierig und nur unter bestimmten Voraussetzungen eindeutig möglich. Besonders wertvolle Aufschlüsse mit dieser Methode sind neuerdings durch die sogenannten Kleinwinkelinterferenzen (9) gewonnen worden, welche beispielsweise Aussagen über bestimmte, innerhalb eines Faserproteins periodisch in Abständen von 50 bis 700 Angström-Einheiten\* wiederkehrende Anordnungen ermöglichen. Obwohl diese Messungen experimentell weit höhere Anforderungen stellen als die gewöhnlichen Röntgenstrukturaufnahmen, konnten wir in einer gemeinsam mit dem In-

\* 1 Angström-Einheit =  $10^{-8}$  cm = 0,000 000 1 cm



stitut für Anorganische und Physikalische Chemie (Prof. Dr. U. Hofmann) durchgeführten Untersuchungsreihe die „Identitätsperioden“ der Kollagenfaser (Haut- und Sehnenfaser) bis hinauf zu etwa 400 Angström-Einheiten\* einwandfrei vermessen.

Mittels des Elektronenmikroskopes können Eiweißmoleküle ihrer beträchtlichen Größe wegen in günstigen Fällen unmittelbar sichtbar gemacht und so die mittels der Ultrazentrifuge und der Röntgenstrukturanalyse gewonnenen Ergebnisse überprüft und bestätigt werden. Dies gilt in erster Linie von den Virusproteinen, die mit Molekulargewichten von einigen Millionen allerdings um ein Vielfaches größer sind als die Mehrzahl anderer Eiweißmoleküle. Aber auch an den Faserproteinen sind mittels des Elektronenmikroskopes neue und völlig überraschende Entdeckungen gemacht worden. Wie während des Krieges ungefähr gleichzeitig von *Wolpers* (10) in Deutschland und von *C. E. Hall*, *M. A. Jakus* und *F. O. Schmitt* (11) in Amerika gefunden wurde, zeigen die meisten dieser faserförmigen Eiweißkörper, z. B. das Kollagen, das Fibrin des Blutes und das Myosin der Muskelfaser, im Elektronenmikroskop eine nach einem bestimmten Muster periodisch wiederkehrende Querstreifung, die man mit hoher Wahrscheinlichkeit als den Ausdruck eines periodisch wiederkehrenden Bauprinzipes der Molekülketten ansprechen darf. Beim Kollagen z. B. beträgt die Länge einer solchen Periode, innerhalb deren meist sechs untereinander etwas verschiedene Unterperioden erkennbar sind, etwas über 600 Angström-Einheiten\*. Das bedeutet, daß hier im Elektronenmikroskop periodisch wiederkehrende Strukturen sichtbar sind, deren kleinste der Länge von sicher weniger als 30 Aminosäuren entsprechen müssen. Gerade auf diesem Gebiet ist es ungeheuer schwer, den gewaltigen Vorsprung aufzuholen, den das Ausland in den Kriegs- und den ersten Nachkriegsjahren erzielt hat. Ein Elektronenmikroskop, dessen Beschaffung rund 100 000.— DM erfordert, steht uns z. Zt. in Regensburg nicht zur Verfügung. In einer gemeinsam mit unserem Institut für Anorganische und Physikalische Chemie bei dem Rheinisch-Westfälischen Institut für Übermikroskopie laufenden Untersuchungsreihe an Kollagenfaser konnten wir indessen Aufnahmen erhalten, von denen wir glauben möchten, daß sie dem letzten Stand des Auslandes auf diesem Gebiet mindestens sehr nahe kommen.

Als eine unerwartet leistungsfähige neue Methode zur Erforschung der Eiweißkörper hat sich die Wanderung im elektrischen Feld, die sogenannte *Elektrophorese*, erwiesen. Im elektrischen Feld wandert jeder gelöste Eiweißkörper, aber auch jeder andere in Ionenform vorliegende Stoff, mit einer ihm eigentümlichen Wanderungsgeschwindigkeit, die einerseits von der angelegten Feldstärke und andererseits von der elektrischen Ladung und von den Formeigenschaften des wandernden Teilchens abhängt. Man kann also z. B. verschiedene Eiweißstoffe auf Grund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit voneinander trennen und man benutzt diese Möglichkeit, um in Gemischen solcher Proteine die einzelnen Komponenten nach Menge und Art zu bestimmen und in reiner Form zu isolieren.

Dieser Weg hat unter anderem eine besondere Bedeutung für das klinisch außerordentlich wichtige Gebiet der *Serumanalyse* (11a) gewonnen. Mittels der Elektrophorese können nämlich die einzelnen Eiweißbestandteile des Serums (Albumin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globuline) erstmals quantitativ genau bestimmt werden und es hat sich ergeben, daß der Anteil der einzelnen Proteinfractionen bei vielen Erkrankungen z. B. der Leber, Milz, Niere, des Knochenmarks und Lymphdrüsen systems, bei septischen und tuberkulösen Prozessen bedeutende und sehr charakteristische Verschiebungen erfährt, deren Verfolgung dem Arzt prognostisch und diagnostisch wichtige Anhaltspunkte von ähnlicher Bedeutung wie Blutbild, Senkungsgeschwindigkeit oder Elektrokardiogramm gibt.



Von *Tiselius* (12) in Uppsala, dem man die Pionierarbeiten auf diesem Gebiet verdankt, sind für die Auftrennung und Analyse von Serum und anderen Proteingemischen in Anlehnung an die klassische U-Rohranordnung von *Nernst* hochwertige Apparaturen entwickelt worden, bei denen die Verfolgung der Wanderung in einer ähnlichen optischen Anordnung wie bei der Ultrazentrifuge erfolgt. Obwohl auch diese Apparaturen außerordentlich kostspielig sind, haben sie im Hinblick auf die klinische Bedeutung der Elektrophorese in den großen Kliniken des reicheren Auslandes, namentlich in den U. S. A. und in der Schweiz, weitgehend Eingang gefunden.

Die Kostspieligkeit der Tiseliusapparatur, aber auch die in ihrem Prinzip bedingte relativ geringe Eignung für präparative Trennungen größeren Maßstabes hat uns veranlaßt, nach anderen Möglichkeiten der elektrophoretischen Trennung und Analyse zu suchen (13). Einen einfachen neuen und, wie sich gezeigt hat, recht entwicklungs-fähigen Weg zeigt schematisch Abbildung 1.

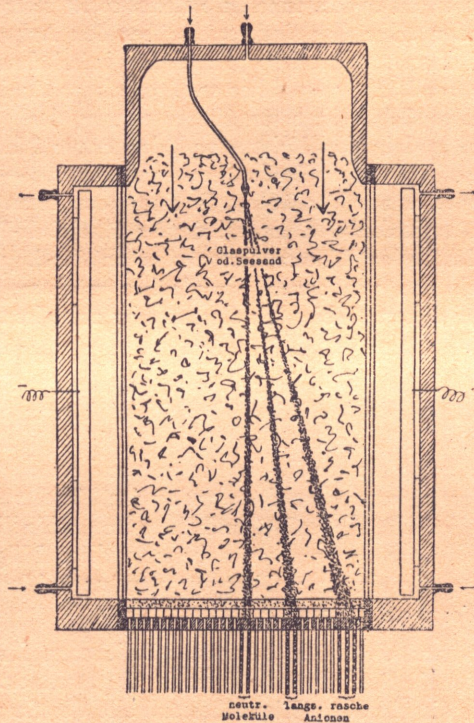


Abb. 1

Schema und Wirkungsart der Apparatur zur elektrophoretischen Trennung der Eiweißkörper. (Nach W. Grassmann und K. Hannig)



Die von einer porösen Trägersubstanz, (Glaspulver, Seesand oder dergl.) erfüllte Trennkammer wird von einer Elektrolytlösung langsam und gleichmäßig von oben nach unten durchströmt. Die Elektroden befinden sich in den Elektrodenkammern zu beiden Seiten, sodaß die Kraftlinien des elektrischen Feldes innerhalb der Trennkammer senkrecht zur Strömungsrichtung der Flüssigkeit verlaufen. Führt man nun in den oberen Teil der Trennkammer an einer Stelle das aufzutrennende Substanzgemisch in einen feinen und gleichmäßigen Strahl ein, so werden ungeladene Teilchen, die im elektrischen Feld keine Ablenkung erfahren, mit der Strömungsrichtung nach abwärts wandern, geladene aber werden aus der Strömungsrichtung um einen Winkel abgelenkt werden, der sich als Resultante aus der Strömungsgeschwindigkeit des Mediums und der elektrophoretischen Beweglichkeit der Teilchen ergibt. Das der Trennapparatur an einer Stelle zugeführte Gemisch wird also in Komponenten von verschiedener elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit und gegebenenfalls -richtung aufgeteilt, die unten getrennt aus der Apparatur herausströmen. Das Verfahren eignet sich für die Trennung von Eiweißstoffen, aber auch von Eiweißabbauprodukten bis herunter zu den Aminosäuren und selbstverständlich auch zur Auftrennung anderer in Ionenform vorliegender Stoffe, wie z. B. von Farbstoffen, Gerbstoffen, Alkaloiden und anderen.

Die Analyse von Proteingemischen, insbesondere von Blutserum und Blutplasma, läßt sich aber auf einem noch viel einfacheren Weg erreichen, der zwar grundsätzlich schon seit einigen Jahren bekannt ist (13a), aber erst von uns zu einer quantitativen und für die Praxis geeigneten Methode ausgebaut wurde (14). Das Prinzip dieses Verfahrens ist folgendes: Wenn man auf einem mit Elektrolytlösung getränkten Filtrierpapierstreifen in Form eines kleinen Tropfens oder besser eines feinen Querstriches die Lösung einer im elektrischen Feld wandernden Substanz aufbringt und nun an die Enden des Streifens eine elektrische Spannung anlegt, so wird die Substanz nach einer bestimmten Zeit um eine bestimmte Strecke gewandert sein. Handelt es sich um gefärbte Substanzen, dann kann man diesen Vorgang unmittelbar verfolgen; Eiweiß und andere farblose Stoffe müssen nach Beendigung des Versuches durch geeignete Färbemethoden sichtbar gemacht werden. Hat man nicht eine einheitliche Substanz auf den Streifen aufgebracht, sondern ein Gemisch aus mehreren Komponenten, die sich in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit unterscheiden, so wird man nach der Wanderung nicht einen, sondern mehrere Flecken bzw. eine Reihe von Querstreifen feststellen. Wir konnten derartige Versuche auf überraschend einfache Weise quantitativ auswerten: der Streifen wird dazu nach der Wanderung mit einem für Eiweißstoffe spezifischen Farbstoff angefärbt, durch Einbetten in eine Flüssigkeit vom gleichen Brechungsindex wie die Papierfaser durchsichtig gemacht, worauf man den Grad der Anfärbung (Extinktion) entlang des Streifens photometrisch ausmißt. Dieses einfache Verfahren, dessen Ergebnisse in einem überraschenden Grad mit denen der Tiseliusmethode übereinstimmen, wird heute schon von zahlreichen Kliniken und Forschungsstellen des In- und Auslandes laufend verwendet. Da es nur sehr geringe Substanzmengen erfordert (beispielsweise 0,006 cm Serum), ermöglicht es erstmals die exakte Analyse solcher Eiweißgemische, die normalerweise nur in sehr geringen Mengen zugänglich sind, wie z. B. von Schlangen-, Insekten- und Bakterientonixen. Abb. 2-5 zeigen eine Reihe solcher Ergebnisse an normalen und pathologisch veränderten Seren, sowie an tierischen Tonixen.



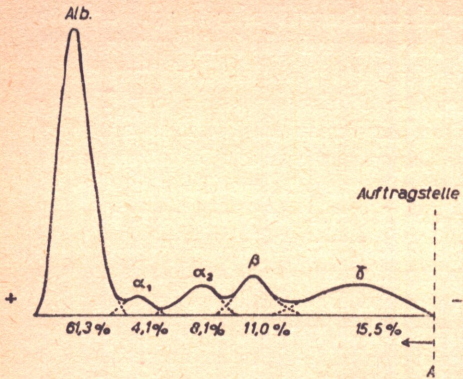


Abb. 2. Diagramm der Eiweißkomponenten eines Normalserums, erhalten durch Papierelektrophorese.

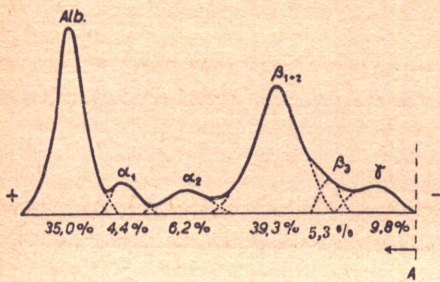


Abb. 3. Wie Abb. 2, jedoch verändertes, pathologisches Serum ( $\beta$ -Myelom).

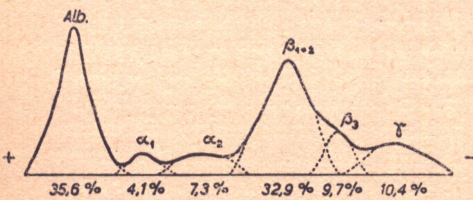


Abb. 4. Diagramm der Eiweißkomponenten, aufgenommen mit der Tiselius-Apparatur. Pathologisches Serum wie in Abb. 3.

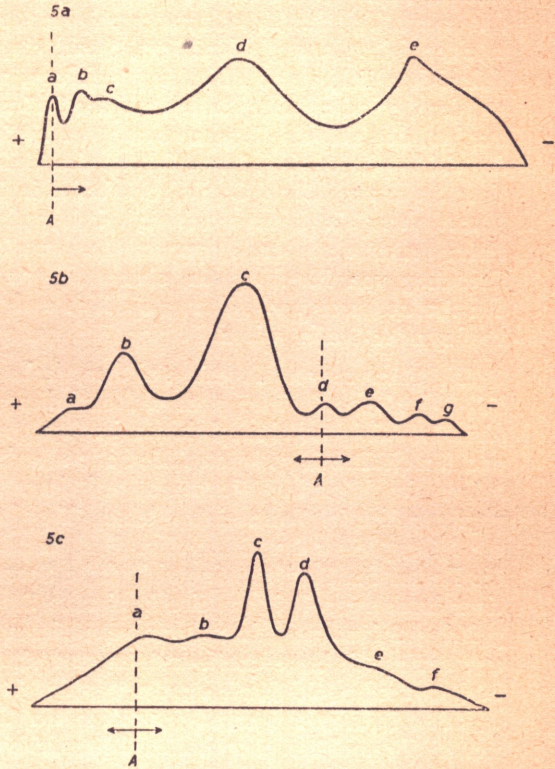


Abb. 5. Diagramme der Eiweißkomponenten, erhalten durch Papierelektrophorese: a) Bienengift, b) Toxin der Kreuzotter (*Vipera berus*) c) Toxin der siamesischen Brillenschlange (*Naja tripudians*).



Die geschilderten physikalischen bzw. physikalisch-chemischen Methoden erlauben es, in Eiweißgemischen die einzelnen Eiweißkomponenten ihrer Menge nach quantitativ zu bestimmen, sie voneinander zu trennen und jede einzelne von ihnen in reiner Form zu isolieren; sie ermöglichen es weiterhin, für jeden einzelnen Eiweißkörper Größe (Molekulargewicht) und die ungefähre Molekulargestalt zu bestimmen und sie führen darüber hinaus in vielen Fällen zu Aussagen über Symmetrieeigenschaften, Ladungsverteilung und andere Fragen des allgemeinen Bauplanes eines Eiweißkörpers. Will man aber weiter in die Struktur des Eiweißmoleküls eindringen, will man zu wirklichen Aussagen gelangen über das Muster, nach dem die Bausteine zu dem kunstvollen Gebäude des Eiweißmoleküls zusammengefügt sind, dann bedarf es dazu noch anderer und zwar chemischer Methoden. Das zur Zeit *Emil Fischer's* allein mögliche Vorgehen zu diesem Zweck bestand darin, den Eiweißstoff durch Abbau mit starken Säuren und andere sehr eingreifende Methoden vollständig in seine letzten Bausteine zu zerschlagen, diese voneinander zu trennen und nach Art und Menge zu bestimmen, was damals ein äußerst langwieriges und im Ergebnis recht ungenaues Unternehmen war, heute aber, dank neuartiger Trennungsmethoden, rasch und genau möglich ist. Die grundsätzlichen Grenzen dieses Weges begreift man vielleicht am besten an einem Vergleich: Würde man dieses Vorgehen etwa auf den Dom zu Mailand, den Dom zu Siena und die Münchner Frauenkirche anwenden, dann würden die erhaltenen Trümmer zwar nach Zahl und Art sicher Unterschiede aufweisen, von denen einige sogar als charakteristisch für das ursprüngliche Bauwerk anzusehen wären; aber zu dessen Architektur und Schönheit führt von da kein Weg zurück. Das Vorgehen der modernen Forschung und der Weg der Zukunft ist der planmäßige Abbau, die schrittweise und schonende Zerlegung zuerst in große und dann in immer kleinere Teilstücke. Diesen Weg einzuschlagen, erlauben uns die Fermente, also die vom lebenden Organismus selbst erzeugten Katalysatoren, die etwa im Verdauungstraktus oder auch in den Organzellen selbst den Abbau und Umbau der Eiweißkörper unter denkbar schonenden Bedingungen tatsächlich nach diesem Schema vollziehen. Freilich bedarf es auch in diesem Falle der Isolierung und der Reindarstellung jedes einzelnen größeren und kleineren Molekülbruchstückes. Diese Aufgabe ist heute grundsätzlich lösbar. Wir bedienen uns dabei, neben den oben besprochenen elektrophoretischen Methoden, einer großen Gruppe neuartiger und vielfältig anwendbarer Trennverfahren, die man als Verfahren der chromatographischen Trennung (14a) bezeichnet; auf sie einzugehen würde hier zu weit führen.

Die Eiweißkörper stellen die chemische Forschung vor andersartige und wohl schwierigere Aufgaben als alle anderen Naturstoffe, deren Aufklärung sie bisher unternommen hat. Eine Fülle neuer Methoden ist an diesem Problem entwickelt worden, Methoden, die das Gesicht der gesamten chemischen Forschung in den nächsten Jahrzehnten mitbestimmen werden. In ihrer Feinheit und Differenziertheit, in der Vermeidung brutaler Reaktionsbedingungen bedeuten sie eine bescheidene Annäherung an die Art und Weise, in welcher der Mikrokosmos des Lebens selbst arbeitet. Vielfach sind diese Methoden an sehr hochwertige Apparaturen gebunden und es ist der arm gewordenen deutschen Wissenschaft oft sehr schwer, sie überall da anzuwenden, wo es wünschenswert wäre. Aber gerade deshalb sollte unsere Forschung bestrebt sein, das zu erreichen, was die Natur uns in so wunderbarer Vollkommenheit lehrt: Das Komplizierte mit dem Einfachen zu verbinden.