

EIWEISSCHEMIE*

Der heutige Stand der chemischen Erforschung der Proteine

Von R. SIGNER

Institut für organische Chemie der Universität Bern

Die Bedeutung der Eiweiße im biologischen Geschehen und in der chemischen Technik rechtfertigt hinreichend das unablässige Bemühen von Generationen von Chemikern, diese hochkomplizierten, zu so vielen Funktionen befähigten Naturstoffe eingehend zu erforschen. Der Umfang der neueren Eiweißchemie spiegelt sowohl die Verschiedenheit der heute bekannten, zahllosen Proteine als auch die Komplikation des molekularen Aufbaues jedes einzelnen Vertreters wieder. Zu welcher Mannigfaltigkeit und Spezifität der physikochemischen und biologischen Eigenschaften das Prinzip des Zusammenbaues sehr weniger Atomarten über eine mäßige Zahl von Atomgruppen zu Makromolekülen führen kann, demonstriert die Natur in keiner andern Verbindungsklasse so eindrucksvoll wie bei den Proteinen.

Trotz dieses Herausragens der Proteine über die andern Verbindungsklassen hat die chemische Forschung in diesem Gebiet die gleichen grundsätzlichen Probleme zu lösen wie in den andern, einfacheren Gebieten, und sie hat im wesentlichen auch nur die gleichen Methoden zur Lösung der Probleme zur Verfügung.

Man hat auch in der Eiweißchemie erstens aus dem naturgegebenen Material, das meistens viele und oft recht ähnliche Moleküle in Mischung enthält, reine Stoffe zu isolieren, also die verschiedenen Molekülarten auseinander zu sondern.

Man wird an zweiter Stelle die Zusammensetzung des Moleküls an den verschiedenen Bausteinen, meist vorwiegend Aminosäuren, die man durch einen geeigneten Abbauprozess freisetzt, qualitativ und wenn möglich quantitativ bestimmen.

Die Ermittlung der gegenseitigen Valenzabsättigung der einzelnen Aminosäurereste, die Bestimmung der Konstitution, ist das dritte Problem.

Aus der Konstitution wird man an vierter Stelle die Eigenschaften des speziellen Proteins herauszulesen versuchen, die chemischen, physikochemischen und wenn möglich auch die biologischen.

An jedem einzelnen Protein wird logischerweise ein Problem nach dem andern in der obigen Reihenfolge

* Die vier folgenden Vorträge wurden am Kurs über Eiweißchemie des Schweizerischen Chemiker-Verbandes am 22. November 1952 in Bern gehalten.

Tab. 1. Einige historische Daten der Eiweißchemie

| | |
|--------------------|---|
| 1829 | erkennt BRACONNOT die Aminosäure Leucin als Spaltprodukt eines Proteins |
| 1862 | kristallisiert HOPPE-SEYLER das Hämoglobin |
| 1880 bis etwa 1910 | synthetisieren CURTIUS und FISCHER die ersten aus verschiedenen Aminosäuren zusammengesetzten Polypeptide |
| 1923 | erkennt BJERRUM den Zwitterioneneharakter der Aminosäuren |
| 1926 | kristallisiert SUMNER das erste Ferment (Urease) |
| 1926 | isoliert ABEL das erste Proteinormon (Insulin) |
| 1926 | erkennt SVEDBERG die molekulare Einheitlichkeit der Proteine mit der Ultrazentrifuge |
| 1952 | ermittelt SANGER viele konstitutionelle Einzelheiten des Insulins |

bearbeitet, da jedes folgende die Lösung der vorhergehenden voraussetzt. Die Geschichte der Proteinforschung lehrt selbstverständlich große Phasenverschiebungen, da man natürlich verschiedene Proteine zu recht verschiedenen Zeiten in Angriff nahm und die einzelnen Probleme ungleich lange Zeitspannen zur Lösung benötigten. In Tab. 1 sind einige wichtige historische Daten der Eiweißforschung zusammengestellt, aus denen nebst der erwähnten Phasenverschiebung auch zu ersehen ist, daß die Eiweißchemie auf ein ähnliches Alter wie die übrigen Zweige der organischen Chemie zurückblicken kann.

Der Grad der Arbeitsfreudigkeit an den Proteinen unterlag im großen geschehen einigen ausgeprägten und leicht verständlichen Schwankungen. In einer ersten Periode, in der schon Eiweiße kristallisiert, die Aminosäuren als Bausteine und deren Zusammenbau nach dem Peptidprinzip erkannt wurden, verbreitete sich die Auffassung, die Proteine seien der endgültigen organisch-chemischen Erforschung ebenso zugänglich wie beispielsweise Kohlehydrate und Fette. Um die Jahrhundertwende verringerte sich dieser Optimismus. Die synthetischen Arbeiten von E. FISCHER zeigten die relativ engen Grenzen der Bemühungen, eiweißartige Peptide aus Aminosäuren in bestimmter Reihenfolge herzustellen. Die systematische Untersuchung der Kolloide im allgemeinen führte zur Kenntnis vieler Systeme, bei denen die Teilchengröße etwas sehr Zufälliges, von äußern Bedingungen stark Abhängiges ist, und es schien, wie wenn auch bei vielen Proteinen schwer zu definierende Aggregationen verschiedenartiger Teilchen zu la-

bilen Mizellen eine bedeutende Rolle spielen würden. Dazu kam, daß der organischen Chemie in den neuentdeckten Vitaminen und Hormonen ein biologisch höchst aktuelles Arbeitsgebiet zufiel, dessen Durchforschung mit den klassischen Methoden größere Erfolgsaussichten bot als die «kolloiden Proteine», sobald man diese klassischen Methoden den kleinen Substanzmengen der zugänglichen Wirkstoffe angepaßt hatte. So war etwa um 1920 herum unter den führenden Forschern die Lust, sich mit Proteinen abzugeben, recht klein geworden. Im folgenden zeigte sich aber in der ganzen biochemischen Forschung immer deutlicher, daß eine Vertiefung der verschiedensten Einsichten über Entstehung und Bedeutung der einfacheren Verbindungsklassen nur möglich sei auf der Basis von viel genaueren Einblicken in die Konstitution der Proteine. Die schon den frühesten Forschern auf diesem Gebiet geläufige und im Namen Protein = Ursubstanz des Lebenden festgelegte Auffassung brach erneut durch. Dazu kamen die in Tab. 1 für die Zeitspanne 1920–1930 aufgeführten neuen wissenschaftlichen Einblicke. Man konnte die Erkenntnisse der Ionentheorie auf Aminosäuren und Eiweiße anwenden und ihr physikochemisches Verhalten grundsätzlich verstehen. Im osmotischen Verhalten und ganz besonders eindrucksvoll in der Ultrazentrifugenzelle erwiesen viele Proteine ihren Aufbau aus diskreten, stöchiometrisch zusammengesetzten Teilchen, also Molekülen im Sinne der allgemeinen organischen Chemie.

Damit waren die Voraussetzungen für neue systematische Untersuchungen geschaffen, die auch mit überraschender Intensität einsetzten. Viele Fermente und andere biologisch bedeutungsvolle Proteine wurden isoliert, und es erweiterte sich die Kunst, Proteingemische zu zerlegen durch die systematische Untersuchung der Einflüsse des pH, der Ionenstärke, von organischen Fällungsmitteln usw., rasch zu einer besonderen Wissenschaft. Der Bedeutung und dem Umfang dieser Probleme Rechnung tragend, wird H. NITSCHMANN im Rahmen des Kurses die Zerlegung von Proteingemischen in einem besonderen Referat behandeln.

Eine wichtige Rolle spielen bei der Zerlegung von Proteingemischen analytische Kontrollmethoden, die bei jedem Schritt der Aufteilung die Zusammensetzung der Fraktionen an den verschiedenen Komponenten zeigen. Ultrazentrifuge und Elektrophoreseapparatur sind derartige, allerdings kostspielige, aber unentbehrliche Hilfsapparate der Eiweißlabore. Ihre Besichtigung im Physiologischen Institut der Universität Bern im Rahmen der Demonstrationen in der zweiten Hälfte dieses Kurses wird hier durch einige theoretische Erläuterungen vorbereitet.

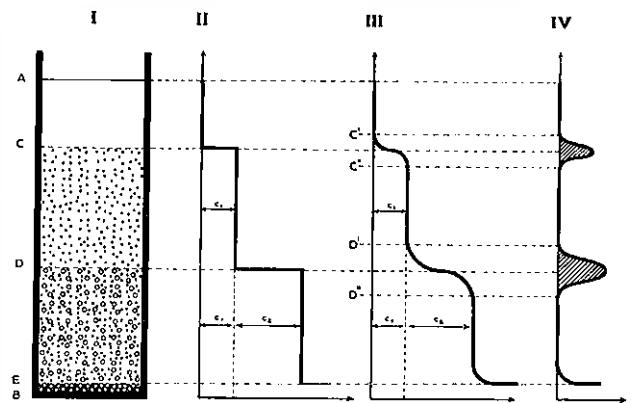


Abb. 1. Sedimentation einer kolloidalen Lösung mit zwei Teilchensorten in der Ultrazentrifugenzelle

In der Ultrazentrifugenzelle werden Kolloidteilchen verschiedener Masse, wie dies Abb. 1 (I) schematisch zeigt, mit verschiedener Geschwindigkeit sedimentiert. Wenn zwei recht unterschiedliche Molekulargewichte vorliegen, aber die Teilchen einer Art unter sich genau gleich sind, stellt sich nach längerer Zentrifugierzeit eine Konzentrationsverteilung gemäß II von Abb. 1 ein. Zuerst in der Zelle ist Lösungsmittel, dann folgt eine Schicht mit den langsamer sedimentierenden Teilchen allein, weiter unten eine mit beiden Teilchenarten in der ursprünglichen Konzentration und zuunterst der aus-zentrifugierte Bodenkörper. Eine geringe Diffusion der Kolloidteilchen an den Orten der Konzentrations-sprünge ändert die ideale Kurve II in die Kurve III ab. Durch geeignete optische Verfahren läßt sich die Konzentrationsverteilung in der Zelle in jedem Zeitpunkt der Sedimentation photographisch feststellen, wobei Diagramme entsprechend Bild IV von Abb. 1 erhalten werden. Die schraffierten Flächen zeigen den Gewichtsanteil jeder Eiweißkomponente an; die Wanderungsgeschwindigkeit der Glockenkurven ergibt die Sedimentations-

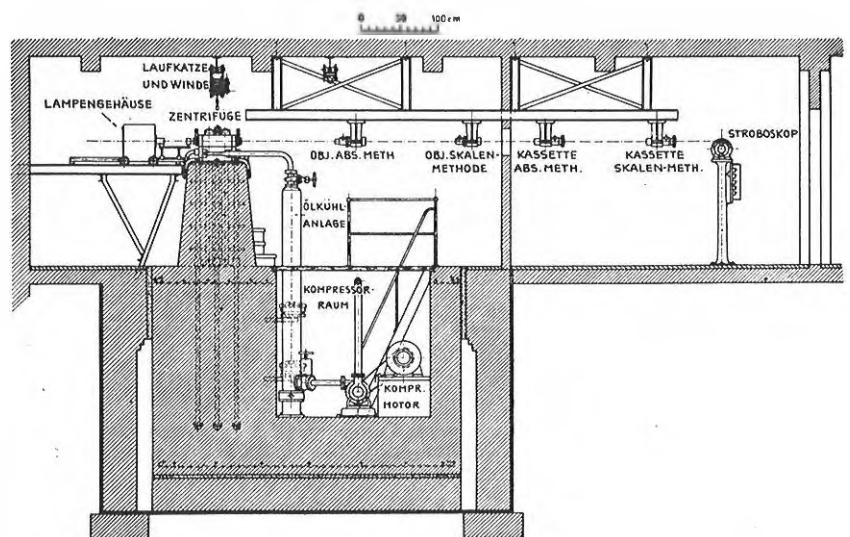


Abb. 2. Schnitt durch eine Ultrazentrifugenanlage aus dem Jahre 1935

geschwindigkeit der entsprechenden Molekülsorten. Die ersten Ultrazentrifugen¹ hatten beträchtliche Ausmaße, wie dies Abb. 2 erkennen läßt. Heute werden diese Apparate schon in großen Serien in viel gedrängterer Form hergestellt (vgl. Abb. 3).

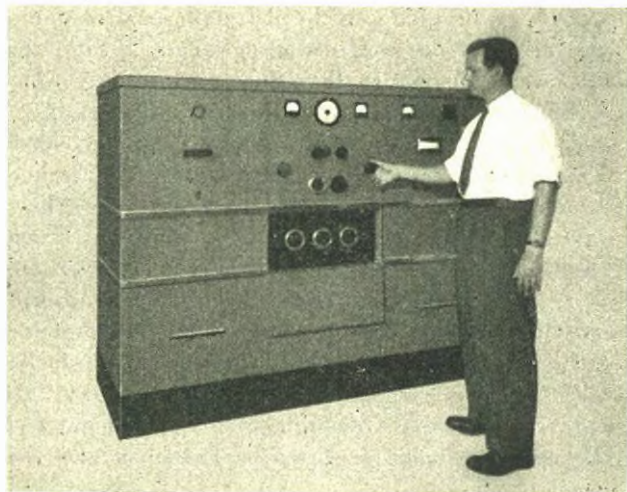


Abb. 3. Neueste Ultrazentrifuge

Bei der Analyse eines Eiweißgemisches durch Elektrophorese werden die einzelnen Teilchensorten zwischen zwei Elektroden auf Grund ihrer verschiedenen elektrischen Ladung mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Pufferlösung bewegt. Es treten analog wie bei der Bewegung durch die Zentrifugalkräfte so viele Konzentrationsprünge auf, als Teilchensorten verschiedener Wanderungsgeschwindigkeit vorliegen, und auch hier kann mit den gleichen optischen Methoden der Gewichtsanteil und die Beweglichkeit jeder Komponente im elektrischen Feld bestimmt werden.

Wenn durch geeignete fraktionierte Fällungen ein Protein zerlegt und eine Fraktion elektrophoretisch einheitlich geworden ist, darf natürlich noch nicht geschlossen werden, daß in dieser Fraktion nur Teilchen einer Art vorliegen. Es können vielmehr noch mehrere

¹ THE SVEDBERG und K. O. PEDERSON, *Die Ultrazentrifuge*. Handbuch der Kolloid-Wissenschaft in Einzeldarstellungen, Bd. VII, Dresden und Leipzig 1940.

Teilchenarten mit verschiedenen Massen und Ladungen anwesend sein, die zufällig dieselbe Beweglichkeit im elektrischen Feld aufweisen. Die Ultrazentrifuge wird eine solche Substanz in den meisten Fällen als Gemisch erkennen lassen. Hieraus erkennt man die Bedeutung der Kombination von Analysemethoden bei der Beurteilung der chemischen Einheitlichkeit von Proteinen. Bei den hohen Molekulargewichten dieser Stoffe ist natürlich die Isolierung chemischer Individuen und der Beweis ihrer Reinheit noch viel schwieriger als bei allen niedermolekularen Verbindungen. Neuerdings nehmen in der Proteinchemie auch die chromatographischen Verfahren zur Gemischerlegung und Einheitlichkeitsprüfung einen wichtigen Platz ein.

In reinen Proteinen läßt sich heute ohne große Mühe und mit beträchtlicher Genauigkeit der Aminosäurebestand ermitteln, dank der großen Leistungsfähigkeit der chromatographischen Methoden².

Die erstaunlichsten Fortschritte der jüngsten Zeit liegen aber im Gebiet der Konstitutionsermittlung der Proteine. Über die auf diesem Gebiet neugeschaffenen Methoden, ihre bisherigen Ergebnisse und ihre Bedeutung in der zukünftigen Proteinforschung berichtet in einem folgenden Referat M. BRENNER.

Ein weiterer Vortrag des Kurses, gehalten von E. LÜSCHER, ist dem modernen Stand der Fermentchemie gewidmet. Es wird damit eines der biologisch bedeutungsvollsten Teilgebiete der Proteinchemie zur Sprache kommen, an dem in den letzten Jahrzehnten mit ganz besonderer Intensität gearbeitet wurde. Wie weit oder – anders betrachtet – wie wenig weit das eingangs erwähnte vierte Ziel der organischen Chemie, die wesentlichen Eigenschaften eines Stoffes auf seine Konstitution zurückzuführen, bei den Proteinen gediehen ist, wird gerade am Stande der Fermentchemie deutlich.

Die verschiedenen Referate dieses Kurses sollen die großen Fortschritte aufzeigen, die in der chemischen Erforschung der Proteine im letzten Vierteljahrhundert erzielt wurden. Sie sollen andererseits aber auch erkennen lassen, daß die Eiweißstoffe trotz der neugeschaffenen Untersuchungsmethoden immer noch zu den problemreichsten und damit interessantesten Verbindungen der organischen Chemie gehören.

² Vgl. *Chimia* 5, 246 (1951).