Fraktionierung von Proteingemischen

Von H. Nitschmann
Institut für organische Chemie der Universität Bern

Da in der Natur die Proteine so gut wie nie für sich allein, sondern immer vergesellschaftet mit anderen Proteinen sowie mit niedermolekularen Stoffen vorkommen, besteht die Hauptaufgabe der präparativen Eiweißchemie in der Abtrennung aller dieser Begleiter. Während die Entfernung niedermolekularer Stoffe meist keine besonderen Schwierigkeiten bietet, ist die Befreiung eines bestimmten Eiweißes von allen begleitenden Proteinen oft ein sehr schwieriges Problem, zu dem das ganze Rüstzeug moderner physikalisch-chemischer Methoden erforderlich ist. Ich möchte Ihnen zeigen, daß die Möglichkeiten zur Fraktionierung von Proteingemischen grund-

sätzlich die gleichen sind, wie wir sie auch bei anderen nichtflüchtigen organischen Stoffen anwenden, daß andererseits aber wegen des hochmolekularen Charakters und der eigenartigen Struktur der Proteine doch besondere Schwierigkeiten auftreten, die man kennen und berücksichtigen muß, wenn man Erfolg bei der Isolierung haben will.

Es gibt eine ganze Reihe von Proteinen, wie Keratin oder Kollagen, die ohne vorherigen Abbau absolut unlöslich in allen Lösungsmitteln sind, weil sie dreidimensional vernetzt sind ähnlich vulkanisiertem Kautschuk oder gehärteten Kunstharzen. Bei solchen Proteinen kann man von einer Isolierung nicht eigentlich sprechen. Man kann sie eventuell von niedermolekularen Begleitern befreien, aber trotzdem können die üblichen Reinheitskriterien auf sie nicht angewendet werden. Wir wollen uns also im folgenden nur mit löslichen Proteinen befassen.

Das Problem der Extraktion der Proteine aus biologischem Material, wie Organen, Pflanzenteilen, Samen usw., kann nicht näher behandelt werden. Besondere Aufgaben stellen sich hier dadurch, daß die Proteine, auf die man es abgesehen hat, in Zellen oder anderen strukturierten Teilchen eingeschlossen sind, die zunächst in geeigneter Weise für die Extraktion aufgebrochen werden müssen. Große Beachtung muß sodann den proteolytischen Enzymen geschenkt werden, die sozusagen regelmäßige Begleiter der Proteine sind. Durch Arbeiten bei tiefen Temperaturen, durch Zusatz von Inhibitoren und andere Kunstgriffe wird versucht, ihre abbauende Wirkung während der Extraktion auf ein Minimum herabzusetzen.

Die wichtigsten Methoden zur Fraktionierung von Proteingemischen lassen sich in vier Gruppen einteilen. Wir können nämlich für die Abtrennung verwenden:

Unterschiede der Löslichkeit in geeigneten Medien,
Unterschiede der Adsorbierbarkeit,
Unterschiede der elektrischen Ladung,
Unterschiede der Teilchengröße.

Die Trennungen, die auf den drei zuletzt genannten Eigenschaften beruhen, sind nicht allgemein anwendbar und eignen sich auch nicht zur Bearbeitung beliebig großer Mengen. Ihre Bedeutung liegt vor allem auf analytischem Gebiete. Weitaus am wichtigsten sind, gesamthaft betrachtet, die Methoden, die Löslichkeitsunterschiede benützen. Wir werden zunächst die drei letzteren relativ kurz behandeln, um uns sodann mit den Trennungsoperationen der ersten Kategorie ausführlicher zu befassen.

I. Trennungen mit Hilfe der Adsorption

Die Adsorption hat bei den Proteinen für ihre Auftrennung bisher nicht eine so große Rolle gespielt wie bei vielen niedermolekularen Stoffklassen. Eine besondere Schwierigkeit besteht darin, daß viele Proteine bei der Adsorption der Gefahr der Denaturierung ausgesetzt sind. Die Größe der Proteinmoleküle erschwert oder verunmöglicht unter Umständen sogar das Eindiffundieren in die Körner der Adsorptionsmittel, wenn die Porengröße sehr gering ist. Trotzdem hat man seit langem in besonderen Fällen die Adsorption bei der Isolierung von Proteinen verwendet, insbesondere dann, wenn man nur mit sehr geringen Mengen zu arbeiten hatte, wie z. B. bei den Fermenten. WILLSTÄTTER hat bei seinen klassischen Fermentarbeiten die bekannten Adsorptionsmittel, wie Aluminiumoxyd usw., reichlich verwendet. Prothrombin, um einen Vertreter der Plasmaproteine, die dem Vortragenden besonders nahestehen, zu erwähnen, läßt sich z. B. sehr gut und selektiv durch Tricalciumphosphat, Magnesiumhydroxyd oder Bariumsulfat[1] adsorbieren. Gelegentlich benützt man Adsorptionsmittel, um eine Reihe unerwünschter Begleitproteine zu eliminieren. Eine rohe Hämoglobinlösung, wie sie durch Hämolyse von Erythrocyten erhalten wird, läßt sich durch kolloides Aluminiumhydroxyd sehr gut fast vollständig von allen begleitenden Proteinen und von Stroma befreien.

In den letzten Jahren haben auch verschiedene Leute mit beachtlichem Erfolg versucht, Proteingemische mit Hilfe von Adsorptionskolonnen zu trennen. 1948 hat TISELIUS[2] gezeigt, daß die Adsorption an vielen an sich nicht sehr aktiven Adsorbenzien sehr stark erhöht wird, wenn man die Proteine z. B. durch Zusatz löslichkeitsvermindernder Salze bis nahe an ihre Sättigungskonzentration bringt. MITCHELL, GORDON und HASKINS[3] haben eine Reihe erfolgreicher Enzymtrennungen mit Hilfe eines «*chromatopile*» aus Papierrundfiltern durchgeführt. Das Proteingemisch wird in einigen Papieren aufgesogen, die zuoberst auf den Pile kommen. Es folgt Elution mit einem Elutionsmittel, dessen Proteinlösungsvermögen stetig gesteigert wird. Über die Anwendung der Verteilungschromatographie, die ja eher zu den Löslichkeitsmethoden gehört, soll später noch etwas gesagt werden. Von besonderem Interesse sind neuere Arbeiten, bei denen höchst spezifische Adsorptionsmittel verwendet wurden. CAMPBELL, LÜSCHER und LERMAN[4] haben gezeigt, daß man Antigene mit Hauptvalenzbindungen an die Oberfläche fester Adsorptionsmittel, z. B. Cellulose, anhängen kann. Sie haben dazu Cellulose zunächst mit p-Nitrobenzylchlorid verätherт, die Nitrogruppe reduziert und diazotiert. Mit der Diazoniumgruppe wurde schließlich ein Protein, eben das Antigen, angekuppelt. Mit diesem Adsorptionsmittel gelang es ihnen, aus dem Serum gerade den zu diesem Antigen gehörenden Antikörper, ein γ-Globulin, sehr spezifisch herauszuholen. Es werden hier dieselben Kräfte benützt, die bei den sero-

[1] D. M. SURGENOR und J. F. NOERTKER, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 3448 (1952).
[2] A. TISELIUS, Ark. Kem. Min. Geol. *26* B, No. 1 (1948).
[3] H. K. MITCHELL, M. GORDON und F. A. HASKINS, J. Biol. Chem. *180*, 1071 (1949).
[4] D. H. CAMPBELL, E. LÜSCHER und L. S. LERMAN, Proc. Nat. Acad. Sci. *37*, 575 (1951).

logischen Fällungsreaktionen Antigen und Antikörper zusammenhalten. Auf ähnliche Weise hat ISLIKER[5] Isoagglutinine unter Verwendung einer Säule, an der Stromaprotein fixiert worden war, isoliert. Man darf hoffen, daß mit dieser Methode insbesondere das überaus schwierige Problem der Auftrennung der γ-Globulin-Fraktion des Plasmas in die einzelnen Antikörper weiter gefördert werden kann.

II. Trennungen auf Grund unterschiedlicher elektrischer Ladung

Die Proteine mit ihren zahlreichen sauren und basischen Gruppen gehören zu den amphoteren, polyvalenten Elektrolyten, deren Ladung eine Funktion des *p*H ist. Je nach dem *p*H des Milieus werden sich also die Proteinmoleküle im elektrischen Feld verschieden schnell oder sogar nach verschiedenen Richtungen bewegen. Der schwedische Forscher TISELIUS hat schon vor Jahren die Elektrophorese der Proteine technisch so vervollkommnet, daß sie heute eine der allerwichtigsten analytischen Methoden des Eiweißchemikers darstellt. Die Bedeutung der Leistung von TISELIUS wurde durch die Erteilung des Nobelpreises im Jahre 1948 vor aller Welt dokumentiert. Isolieren kann man Proteine mit Hilfe der TISELIUSschen Apparatur leider nur in sehr kleinen Mengen. Dasselbe gilt erst recht für die gewöhnliche Papierelektrophorese. Es ist zwar eine Reihe von Vorschlägen für kontinuierliche elektrophoretische Verfahren zum präparativen Arbeiten gemacht worden, die sich aber nicht durchzusetzen vermochten. Von besonderem Interesse dagegen sind neuere Vorschläge, die von den Erfahrungen mit der Papierelektrophorese ausgehen. Ich erwähne die Anordnung von GRASSMANN und HANNIG[6], bei welcher über einen vertikal hängenden Bogen Filtrierpapier langsam Puffer-

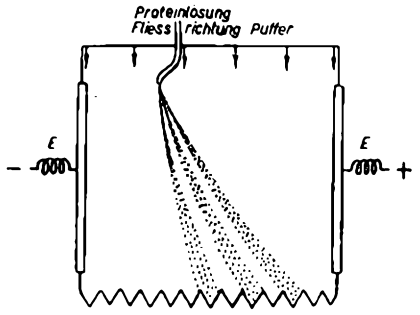


Abb. 1. Kontinuierliche Papierelektrophorese (schematisch)

lösung herabsickert. An einer punktförmigen Stelle wird kontinuierlich etwas Proteinlösung zugeführt, die sich mit dem Puffer im Papier abwärts bewegt. Die Elektroden *E* liegen an den Seiten des Papierbogens, so daß das elektrische Feld senkrecht zur Fließrichtung wirkt. Dadurch wird eine Aufteilung des schmalen Flußbandes der Proteine in einzelne Bänder entsprechend der Zahl der Komponenten erreicht. Die von den Zacken am unteren Ende des Papieres abtropfende Flüssigkeit kann in einzelne Gläschen aufgefangen werden (siehe Abb. 1). Eine ähnliche Anordnung ergibt sich, wenn man statt des Papierbogens einen mit Sand gefüllten schmalen Kasten verwendet.

Eine sehr viel versprechende Methode mit besonders hoher Trennschärfe haben KIRKWOOD und Mitarbeiter[7] entwickelt. Man kann sie als Konvektionselektrophorese bezeichnen, denn die Wanderung der Proteinteilchen im elektrischen Feld wird bei ihr mit einer Konvektionsströmung kombiniert, um die elektrophoretische Trennung zu potenzieren. Die Methode hat demnach große Ähnlichkeit mit der Thermodiffusion für Gase, mit welcher es ja bekanntlich gelingt, weitgehende Auftrennung bei Isotopengemischen zu erreichen. In der Konvektionselektrophoresezelle wandern die Proteinteilchen im elektrischen Feld, im Gegensatz zum U-Rohr nach TISELIUS, in horizontaler Richtung. Es wollen sich deshalb vertikale Dichtegradienten ausbilden, die aber sofort durch eine Konvektionsströmung ausgeglichen werden. Im unteren Teil der Zelle werden deshalb mehr und mehr die am schnellsten wandernden Teilchen angereichert, während sich oben die langsamsten ansammeln. Das Prinzip der Methode geht aus Abb. 2 hervor. Die Methode gestattet, auch Proteine, welche sich in der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit nur sehr wenig voneinander unterscheiden, aufzutrennen. Sie arbeitet ohne Materialverlust und äußerst schonend. Die Autoren haben z. B. in der Gruppe der γ-Globuline des Blutplasmas sehr bemerkenswerte Trenneffekte erhalten.

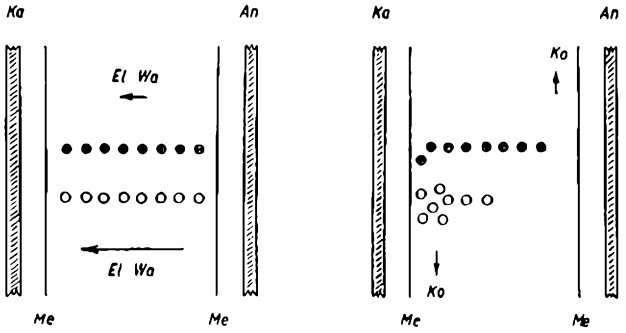


Abb. 2. Wirkungsweise der Konvektionselektrophorese (schematisch). *Ka* Kathode. *An* Anode. *Me* Membran. *El Wa* Elektrophoretische Wanderung. *Ko* Konvektion

[5] H. C. ISLIKER, Résumés du *11e Congrès International de Biochimie*, p. 393, Paris 1952.

[6] W. GRASSMANN und K. HANNIG, Naturwiss. *37*, 397 (1950).

[7] J. G. KIRKWOOD, J. Physic. Chem. *9*, 878 (1941); J. R. CANN, J. G. KIRKWOOD, R. A. BROWN und O. J. PLESCIA, J. Amer. Chem. Soc. *71*, 1603 (1949); J. R. CANN, D. H. CAMPBELL, R. A. BROWN und J. G. KIRKWOOD, J. Amer. Chem. Soc. *73*, 4611 (1951).

III. Trennungen auf Grund verschiedener Teilchengröße

Die von SVEDBERG entwickelte Ultrazentrifuge, in welcher Proteinmoleküle entsprechend ihrem verschiedenen Gewicht fraktioniert zur Sedimentation gebracht werden können, fehlt heute in keinem der großen und modernen Proteinlaboratorien. Sie ist aber in erster Linie ein analytisches Gerät, das zur Prüfung von Einheitlichkeit und zur Bestimmung von Molekulargewichten unentbehrlich ist. Präparative Abtrennungen können höchstens in kleinem Maßstab durchgeführt werden. Wenn die Unterschiede in der Sedimentationsgeschwindigkeit groß sind, wie z. B. die zwischen Viren und gewöhnlichen Proteinen, bedient man sich jedoch gerne der Zentrifuge, um die schweren Teilchen als Sediment abzutrennen, bevor die leichteren merklich sedimentiert haben. Auch die Ultrafiltration wird nur in besonderen Fällen sehr kleine Proteinmoleküle von sehr großen abzutrennen gestatten.

IV. Trennungen auf Grund von Löslichkeitsunterschieden

Außer den anfangs erwähnten, vernetzten Proteinen vom Typus des Keratins sind alle Proteine in geeigneten wässerigen Medien löslich. Die Wasserlöslichkeit kann nicht ohne weiteres aus dem Molekulargewicht und dem Aminosäurebestand eines Proteins abgeleitet werden. Nicht nur die Gesamtzahl der polaren Gruppen ist entscheidend, sondern ganz besonders auch ihre Konzentration und Verteilung an der Oberfläche der Moleküle.

Bei der Beeinflussung der Löslichkeit durch das Medium sind vier Faktoren von großer Bedeutung:

das *p*H,
der Salzgehalt,
organische Lösungsgenossen und
die Temperatur.

1. Einfluß des pH auf die Löslichkeit

Ganz allgemein gilt für alle Proteine, ebenso wie für Peptide und Aminosäuren, daß die Löslichkeit beim isoelektrischen Punkt ein Minimum aufweist. Dies ist leicht verständlich, wenn wir bedenken, daß die amphoteren Proteinmoleküle beim isoelektrischen Punkt definitionsgemäß gleichviel positiv wie negativ geladene Gruppen besitzen, deren Wirkungen sich gegenseitig aufheben, so daß das Teilchen als Ganzes ungeladen erscheint. Beim Senken des *p*H wird aus dem Zwitterion ein Kation, beim Erhöhen des *p*H ein Anion. In beiden Fällen erhalten die Teilchen alle gleichsinnige Ladung, wodurch, wie allgemein bei Kolloiden, ihre Dispersion im Lösungsmittel begünstigt wird. Es gibt Proteine, deren Löslichkeit in Wasser auch beim isoelektrischen Punkt noch außerordentlich groß ist, nämlich die weitverbreitete Klasse der Albumine. Die Proteine, die beim isoelektrischen Punkt schwer, darüber und darunter aber leicht löslich sind, bilden die Klasse der Globuline. Ein auch jedem Laien bekanntes Beispiel für diese letzte Gruppe ist das Casein, das sich in der Milch etwa 2 *p*H-Einheiten über seinem isoelektrischen Punkte befindet. Bei der natürlichen Säuerung der Milch durch Milchsäurebakterien wird das Casein in den isoelektrischen Zustand übergeführt und koaguliert in der bekannten Weise.

Wegen des überragenden Einflusses des *p*H auf die Löslichkeit sind präparative Arbeiten in der Proteinchemie heute ohne ein elektrisches *p*H-Meßgerät kaum mehr denkbar. Die normalen Indikatorpapiere geben keine exakten Werte, da die Umschläge der Indikatoren durch Proteine mehr oder weniger beeinflußt werden.

2. Einfluß der Salze auf die Löslichkeit

Aminosäuren, Peptide und Proteine zeigen alle ein prinzipiell analoges Verhalten, indem mit steigender Salzkonzentration die Löslichkeit zunächst ansteigt, durch ein Maximum geht und dann wiederum abfällt, wie es in Abb. 3 schematisch dargestellt ist. Selbstverständ-

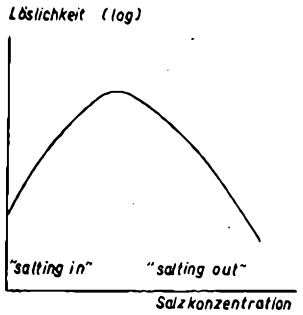


Abb. 3. Beeinflussung der Löslichkeit von Proteinen durch Salze (schematisch)

lich zeigen die Kurven von Fall zu Fall in ihrem Verlaufe, was Steilheit und Länge der beiden Schenkel und Lage des Maximums anbelangt, sehr große Unterschiede. Das Maximum kommt dadurch zustande, daß sich zwei verschiedene Salzeffekte überlagern, die in ihrer Wirkung entgegengesetzt sind. Sie werden in der angelsächsischen Literatur, welche in den letzten drei Jahrzehnten besonders wichtige Beiträge zur physikalischen Chemie der Proteine geliefert hat [8], als «*salting in*» und «*salting out*» bezeichnet. Wenn man im Deutschen auch schon lange vom «Aussalzen» sprach, hat sich doch bis jetzt die Übersetzung «Einsalzen» nicht richtig eingebürgert, weshalb sich auch in deutschsprachigen Arbeiten meist die englischen Ausdrücke finden.

a) «*Salting in*». Dieser Effekt ist bei den Globulinen, die bei ihrem isoelektrischen Punkt sehr schwer löslich sind, schon lange wohlbekannt. Er dominiert bei kleinen Salzkonzentrationen. Jedem Kliniker ist beispielsweise bekannt, daß Plasma oder Serum beim Verdünnen mit destilliertem Wasser Trübungen oder sogar Ausfällungen

[8] E. J. COHN und J. T. EDSALL, *Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and dipolar Ions*, Reinhold, New York 1943.

gibt, weil für einige der Globuline die Salzkonzentration, die nötig ist, um sie in Lösung zu halten, unterschritten wird. Die Löslichkeitserhöhung kommt durch die Ionenwolken, die sich um die polaren Gruppen der Proteinmoleküle bilden, zustande und kann auf Grund der DEBYE-HÜCKELschen Theorie der starken Elektrolyte theoretisch gedeutet werden.

Die verschiedenen Salze wirken unspezifisch im «*salting in*»-Effekt, sofern die Ionen keine festen Komplexe mit dem Protein bilden. Dagegen ist ihre Wertigkeit von großem Einfluß, indem mehrwertige Ionen stärker als einwertige Ionen wirken. Die löslichkeitserhöhende Wirkung der Salze kann durch folgende Formel wiedergegeben werden.

$$\log \frac{L}{L_0} \quad \text{proportional} \quad \frac{\Gamma}{2}$$

Dabei bedeutet L die Löslichkeit mit Salz,

L_0 die Löslichkeit ohne Salz und

$\frac{\Gamma}{2}$ die Ionenstärke.

Γ ist gegeben durch:

$$\Gamma = \sum c_i z_i^2,$$

worin c_i die molare Konzentration der einzelnen Ionen und z_i ihre Wertigkeit bedeutet.

Man sieht ohne weiteres, daß die Ionenstärke für Salze, die aus zwei einwertigen Ionen aufgebaut sind, wie NaCl, gleich der Normalität wird. Wenn mehrwertige Ionen vorhanden sind, wird die Ionenstärke aber größer als n. Die Salzkonzentrationen werden in der Eiweißchemie heute wegen der obigen Beziehung mehr und mehr durch die Ionenstärke und nicht mehr durch die Normalität ausgedrückt.

b) «*Salting out*». Die Wirkung des «*salting out*»-Effektes läßt sich durch folgende Näherungsformel ausdrücken:

$$\log L = \beta - K_s \frac{\Gamma}{2}.$$

Hierin ist L Löslichkeit,

β eine Konstante,

K_s die sogenannte Aussalzkonstante und

$\frac{\Gamma}{2}$ die Ionenstärke.

Im «*salting out*»-Effekt wirken die Salze nun recht verschieden, d. h. K_s ist nicht nur von Protein zu Protein verschieden, sondern hängt auch noch vom Salz bzw. den Ionen ab. K_s ist dagegen unabhängig vom *p*H und von der Temperatur. Es sind besonders die Anionen, welche bei der Größe des «*salting out*»-Effektes eine große Rolle spielen. Ordnet man die gebräuchlicheren Anionen nach abnehmendem K_s, so findet man folgende Reihe

$$PO_4 > SO_4 > \text{Citrat, Tartrat} > F, \text{Acetat} > Cl > Br, NO_3 > J > CNS$$

Bei dieser Reihe handelt es sich um die aus der Kolloidchemie bekannte HOFMEISTERsche Reihe (1888). Die stark aussalzend wirkenden Ionen sind auch die, die am stärksten hydratisiert sind; der Effekt muß deshalb durch eine Verminderung der Aktivität des Wassers in der Proteinlösung durch diese Ionen erklärt werden. Bei den Alkaliionen nimmt die aussalzende Wirkung mit steigendem Atomgewicht zu. Bei den Endgliedern insbesondere der Anionenreihe ist die aussalzende Wirkung so gering, daß der «*salting in*»-Effekt bis zu hohen Konzentrationen überwiegt. Solche Salze, wie z. B. Lithiumjodid und Lithiumrhodanid, sind deshalb in hohen Konzentrationen außerordentlich wirksame Mittel zur Dispergierung von Proteinen. Selbst weitgehend kristalline und äußerst schwer lösliche Proteine, wie z. B. das Seidenfibroin, lassen sich in konzentrierten Lösungen dieser Salze auflösen. Bei globulären Proteinen muß man damit rechnen, daß ihre Wirkung auch in die Struktur des Moleküles eingreift, indem sie die Falten der Peptidkette öffnen und so Denaturierung bewirken.

c) Beeinflussung der Löslichkeit durch komplexbildende Ionen. Wenn Ionen fest ans Protein gebunden werden, so können Löslichkeitsveränderungen resultieren, die nichts mit dem «*salting in*»- oder «*salting out*»-Effekt zu tun haben. Es ist klar, daß die Wirkung in diesem Falle je nach Protein und nach der Natur des angelagerten Ions sehr verschieden sein wird. In der Eiweißchemie spricht man bei solchen Kombinationen zwischen Protein und einfacheren Ionen gewöhnlich von Komplexbildung, ohne zunächst zu unterscheiden, ob es sich wirklich um einen Komplex im Sinne der WERNERschen Theorie handelt oder nicht. Die fällende Wirkung gewisser Schwermetallionen (Cu, Hg, Pb usw.) ist seit langem bekannt und wird zum Teil benützt, um unerwünschte Proteine aus Lösungen zu eliminieren. Es gibt auch komplexbildende Anionen, die zum Teil sehr schwer lösliche Niederschläge mit Proteinen ergeben, wie Trichloressigsäure, Sulfosalicylsäure, Phosphorwolframsäure, Metaphosphorsäure und andere polyvalente Säuren. Die Trichloressigsäure wird heute besonders viel verwendet, um in biologischem Material den sogenannten Nichtproteinstickstoff (NPN) zu bestimmen. Es muß allerdings gesagt werden, daß man nicht genau weiß, wo in der Reihe Protein–Pepton–Peptid–Aminosäure die fällende Wirkung der Trichloressigsäure aufhört. Von besonderer biologischer Bedeutung ist das Bindungsvermögen vieler Proteine für Calcium. Im Blutplasma ist ein großer Teil des Calciums an die Proteine, vor allem gewisse Globuline, gebunden, was durch Analyse der Ultrafiltrate leicht festgestellt werden kann. Die Calciumbindung durch das Casein ist besonders bekannt, kommt doch die Bildung der submikroskopischen kugeligen Aggregate, die der Magermilch die weiße Farbe erteilen, durch die assoziierende Wirkung des Calciums zustande.

Neuerdings werden komplexbildende Metallionen zur fraktionierten Fällung von Plasmaproteinen vorgeschla-

gen. Die Schule von Professor E. J. COHN in Boston (USA)[9], auf deren bahnbrechende Arbeiten zur Auftrennung dieses Proteinsystemes noch zurückgekommen wird, hat gezeigt, daß mit Zink (15 m-molar) aus dem Plasma ohne Veränderung des *p*H fast alle Globuline ausgefüllt werden können. Das Filtrat, das im wesentlichen von den Eiweißen nur noch das Albumin enthält, läßt sich mit Hilfe von Kationenaustauschern leicht vom Zink befreien und stellt dann eine Lösung dar, die für Transfusionen sehr geeignet sein dürfte. Sie wird von der COHNschen Schule als «*stable plasma protein solution*» (SPPS) bezeichnet, weil sie sich erhitzen läßt, ohne zu koagulieren. Sie wird zurzeit in den USA klinisch getestet. Der Zinkniederschlag der Globuline kann durch Zusatz niedermolekularer Stoffe, die mit Zink Komplexe eingehen (Citrat, Komplexone), leicht in Lösung gebracht und dann weiter fraktioniert werden.

3. Einfluß organischer Lösungsgenossen auf die Löslichkeit

Organische, mit Wasser mischbare Lösungsmittel, wie Alkohol, Aceton und Äther, setzen, sofern sie die Dielektrizitätskonstante des Mediums vermindern, die Löslichkeit der Proteine in der Regel herab. Die fällende Wirkung solcher Stoffe wird schon seit langem in der Eiweißchemie verwendet. Die Löslichkeitsverminderung ist gewöhnlich um so größer, je höher die Konzentration beispielsweise an Alkohol ist, ausgenommen bei der Gruppe der Prolamine (in Getreidekörnern), die ein Löslichkeitsmaximum bei Alkoholkonzentrationen von 60 bis 80 % aufweisen. Diese Proteine enthalten besonders viel Prolin und relativ wenig saure und basische Gruppen.

Der Einfluß der Elektrolyte bleibt in alkohol- oder acetonhaltigem Wasser erhalten. Im «*salting in*»-Gebiet ist die relative Löslichkeitserhöhung durch die Salze sogar größer als in reinem Wasser.

Organische Verbindungen, die die Dielektrizitätskonstante heraufsetzen, wie Aminosäuren und ander Zwitterionen, Formamid, Harnstoff usw., erhöhen die Löslichkeit der Proteine in Wasser. In hoher Konzentration lösen aber manche nicht nur die Nebenvalenzbindungen zwischen den Molekülen, sondern zum Teil auch die innerhalb der Moleküle. Die Auflösung des Proteins ist dann mit einer Denaturierung verbunden. Besonders beim Harnstoff ist diese Wirkung wohlbekannt.

Die Beeinflussung der Löslichkeit eines Proteins durch ein anderes Protein wird besonders dann groß sein, wenn das *p*H der Lösung zwischen den isoelektrischen Punkten der beiden Proteine liegt. Das eine ist dann Kation, das andere Anion, was zur Bildung einer schwer löslichen Verbindung zwischen ihnen führen kann. Fraktionierte Fällungen werden deshalb im allgemeinen bei *p*H ausgeführt, bei denen alle Proteine gleichsinnig geladen sind.

[9] E. J. COHN et al., J. Amer. Chem. Soc. *72*, 465 (1950); E. J. COHN in *Blood Cells and Plasma Proteins—Their State in Nature*, edited by J. L. TULLIS, Academic Press, New York 1953.

4. Verfahren

Bei der Ausarbeitung eines Fraktionierschemas auf Grund von Löslichkeitsunterschieden für ein noch nicht genau bekanntes Proteinsystem steht man vor dem Dilemma, daß man über die Löslichkeiten der einzelnen Komponenten Bescheid wissen sollte. Um diese Löslichkeiten aber zu bestimmen, sollte man die einzelnen Proteine zuerst rein dargestellt haben. Das Ausarbeiten von Trennrezepten erfordert deshalb immer eine sehr große Anzahl von empirischen Versuchen. Bei der Verfolgung des Hauptzieles, das in der Erreichung maximaler Trenneffekte besteht, darf nicht außer acht gelassen werden, daß man alles vermeiden muß, was zur Denaturierung der einen oder anderen Komponenten führen könnte. Die wichtigsten Faktoren, die Denaturierung bewirken können, sind: erhöhte Temperatur, extreme *p*H-Werte, organische Lösungsmittel in höheren Konzentrationen, wasserstoffbindungenspaltende Stoffe, wie Harnstoff, Phenol usw., Oberflächenkräfte. Auch gewöhnliches Trocknen ist für manche Proteine gefährlich, weshalb prinzipiell stets die Gefriertrocknung angewendet werden sollte.

Beim Trennen auf Grund von Löslichkeitsunterschieden kann man entweder fraktioniert fällen oder fraktioniert extrahieren. Das letztere Verfahren wird seltener angewendet, da man damit rechnen muß, daß eventuell ein Teil der leicht löslichen Proteine im Bodenkörper eingeschlossen bleibt. Das Extrahieren hat dafür den Vorteil, daß erfahrungsgemäß die Gleichgewichtseinstellung zwischen Lösung und Bodenkörper, soweit der letztere eben zugänglich ist, schneller erreicht wird. Gewöhnlich wird mit *einer* Lösungsmittelphase gearbeitet, jedoch besteht prinzipiell auch die Möglichkeit, mit zwei nicht mischbaren flüssigen Lösungsmittelphasen zu arbeiten. Wir kommen darauf später zurück.

Die klassischen Verfahren benützen hauptsächlich die Ausfällung beim isoelektrischen Punkt (nur für Globuline) und das Aussalzen, wobei vor allem die folgenden Salze viel gebraucht werden: Ammoniumsulfat,

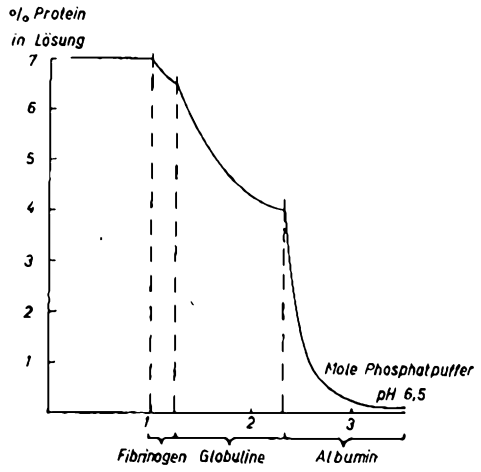


Abb. 4. Aussalzkurve des Blutplasmas (Mensch)

Natriumsulfat, Natriumchlorid und Phosphatpuffer. In Abb. 4 ist das Verhalten von Blutplasma bei steigenden Zusätzen von Salz (Ammoniumsulfat oder Phosphat) wiedergegeben. Die Ausfällkurve zeigt drei deutlich ausgeprägte Stufen. Die oberste ist dem Fibrinogen, die zweite den Globulinen und die dritte dem Albumin zuzuschreiben. Die Aufnahme solcher Aussalzkurven zur Charakterisierung pathologischer Blutbilder ist von LEUTHARDT und WUHRMANN[10] in die Klinik eingeführt worden. Die Globuline, deren es mehrere gibt, erleiden durch das Aussalzen keine starke Fraktionierung und können auch bei wiederholtem Fällen mit Salz nur mangelhaft voneinander getrennt werden. Die Niederschläge enthalten naturgemäß große Mengen Salz, von denen sie nur durch Dialyse oder Elektrodialyse getrennt werden können. Die Notwendigkeit der Dialyse erweist sich als ein großer Nachteil, wenn die Fraktionierung in technischem Maßstabe durchgeführt werden soll. Diese Schwierigkeit fällt weg, wenn bei kleinen Salzkonzentrationen, d. h. im «*salting in*»-Gebiet mit Alkohol oder ähnlichen organischen Lösungsmitteln gefällt wird. Alkohol kann nämlich zusammen mit dem Wasser durch Gefriertrocknung entfernt werden. Der enorme Vorteil, den die Verwendung von Alkohol bei der Verarbeitung von großen Mengen bringt, ist von E. J. COHN (Boston, USA) erkannt worden. Er hat während des Zweiten Weltkrieges mit einem großen Mitarbeiterstab und mit Unterstützung staatlicher Stellen eine Methode der Fraktionierung von Blutplasma mit Alkohol ausgearbeitet, die zuerst in den USA und später auch in zahlreichen andern Ländern zur Fabrikation klinischer Präparate angewendet worden ist und noch angewendet wird[11].

Durch eine Reihe von fraktionierten Fällungen und Extraktionen bei genau vorgeschriebenen *p*H, Ionenstärken und Alkoholkonzentrationen kann das Plasma nach dem COHNschen Verfahren in zahlreiche Fraktionen zerlegt werden, die zum Teil elektrophoretisch rein oder sogar kristallisiert erhalten werden können. Dabei ist es wichtig, daß, sobald Alkohol im System enthalten ist, durchwegs bei tiefen Temperaturen (0–5°) gearbeitet wird, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. In Tab. 1 sind die Fällungsbedingungen für die Zerlegung des Plasmas in die Hauptfraktionen wiedergegeben.

Dabei wird so vorgegangen, daß die Fällung der Fraktion I durch Zentrifugieren abgetrennt wird und alsdann das Zentrifugat auf die Fällungsbedingungen für Fraktionen II + III gebracht wird usw.

Um elektrophoretisch einheitliche Präparate zu erhalten, müssen die Hauptfraktionen durch weitere Fraktionierung unterteilt werden. Folgende Komponenten

Tab. 1. Plasmafraktionierung nach COHN (Methode 6)

Fraktion	Fällungsbedingungen				
	Protein-Konzentration %	C_2H_5OH-Konzentration %	*p*H	Ionenstärke	Temperatur
I	5,1	8	7,2	0,14	−3°
II+III	3,0	25	6,8	0,09	−5°
IV	1,6	40	5,8	0,09	−5°
V	0,8	40	4,8	0,09	−5°

haben sich bisher als klinisch wertvoll erwiesen: Fibrinogen und Fibrin (Fraktion I), Prothrombin bzw. das aus ihm herstellbare Gerinnungsferment Thrombin (Fraktion II + III), γ-Globulin, in welchem die Antikörper und Immunproteine enthalten sind (Fraktion II + III), und schließlich Albumin, das zur Hauptsache den kolloidosmotischen Druck des Blutes ausmacht und somit ein hervorragendes Mittel zur Schockbekämpfung darstellt. Auf die klinische Bedeutung dieser Fraktionen hier näher einzutreten, ist nicht möglich. Es sei aber darauf hingewiesen, daß die beiden wichtigsten Präparate, nämlich humanes Albumin und γ-Globulin, seit einiger Zeit auch in der Schweiz, und zwar durch das Zentrallaboratorium des *Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes* in Bern, hergestellt und abgegeben werden.

Eine fraktionierte Ausfällung von Globulinen ist prinzipiell auch ohne irgendwelche Fällungsmittel durch Senkung der Ionenstärke in der Lösung auf genügend kleine Werte möglich. A. R. REID und F. JONES[12] haben gezeigt, daß man mit Hilfe einer geeigneten Mischung von Kationen- und Anionenaustauschern im Serum die Ionenstärke sukzessive so weit herabsetzen kann, daß die Globuline fraktioniert ausfallen. Diese Methode ist bisher noch nicht im großen für die Plasmafraktionierung verwendet worden, scheint uns aber vielversprechend zu sein.

Zerlegungen von Proteingemischen mit Hilfe von zwei nicht mischbaren Lösungsmitteln sind bisher erst wenige durchgeführt worden. Das Hauptproblem ist hier, zwei Phasen zu finden, die beide ein Lösungsvermögen für die Proteine besitzen und die keine denaturierende Wirkung ausüben. Natürlich müssen sich die zu trennenden Proteine durch ihre Verteilungskoeffizienten für die beiden Phasen unterscheiden. Je weniger sie dies tun, desto mehr Trennstufen müssen angewendet werden. In der methodischen Ausführung hat man deshalb alle Möglichkeiten von der Verwendung des Scheidetrichters über die Gegenstromextraktion bis zur Verteilungschromatographie in Betracht zu ziehen. MARTIN und PORTER[13] haben Ribonuclease verteilungschromatographisch unter Verwendung von Wasser / $(NH_4)_2SO_4$ und Cellosolve an Kieselguhr als Träger zerlegt. SIGNER

[10] F. LEUTHARDT und F. WUHRMANN, Klin. Wschr. *17*, 409 (1938); F. WUHRMANN und CH. WUNDERLY, *Die Bluteiweißkörper des Menschen*, 2. Auflage, Verlag Schwabe, Basel 1952.

[11] Zusammenfassungen: E. J. COHN, Experientia *3*, 125 (1947); E. J. COHN in *Advances in Military Medicine*, Boston 1948, Band I; J. T. EDSALL, *Advances in Proteinchemistry III*, 383 (1947).

[12] A. R. REID und F. JONES, Ind. Eng. Chem. *43*, 1074 (1951).

[13] A. J. P. MARTIN und R. R. PORTER, Biochem. J. *49*, 215 (1951).

und WALTHER[14] berichten über die Zerlegung von Casein in seine Fraktionen mit Hilfe von Wasser und Phenol im Scheidetrichter. Sie weisen dabei auf die wichtige Tatsache hin, daß die beiden Phasen durch geeignete Zusätze (in diesem Falle Alkohol) bis kurz vor die Homogenisierung gebracht werden müssen, wenn man die sonst außerordentlich störende emulgierende Wirkung des Proteins vermeiden will. HARFENIST und CRAIG[15] haben in ihrem vielstufigen Gegenstromextraktor mit den Phasen 2-Butanol und 1prozentige wässerige Dichloressigsäure Insulinpräparate zerlegt. Sie konnten dabei zeigen, daß auch kristallisierte Handelspräparate sich bei diesem Trennverfahren als nicht einheitlich erweisen. Die Gegenstromextraktion mit sehr viel Stufen darf nach ihren Untersuchungen heute als die empfindlichste der physikalisch-chemischen Methoden angesehen werden, wenn es sich darum handelt, Proteine auf Einheitlichkeit zu prüfen.

V. Kristallisation von Protein

Bekanntlich gewinnt ein Stoff, wenn er als wohldefiniertes Individuum betrachtet werden soll, bei den Chemikern sehr an Ansehen, wenn er sich kristallisieren läßt. Tatsächlich sind schon sehr viele Proteine zur Kristallisation gebracht worden, wobei es sich vielleicht zur Hälfte um Fermente handelt. Wegen der geringen Diffusionsgeschwindigkeit der großen Proteinmoleküle ist das Kristallwachstum im allgemeinen sehr langsam, und man darf deshalb nur mit kleinen Übersättigungen arbeiten, wenn man die Ausscheidung in amorphem Zustande vermeiden will. Um die nötige Übersättigung herbeizuführen, benützt man vor allem Salze oder organische Lösungsmittel, Verschiebungen des *p*H und – seltener – Verschiebungen der Temperatur. Die Veränderung dieser Bedingungen hat aus den oben erwähnten Gründen sehr langsam zu geschehen. Fällende Zusätze sind ganz allmählich zu machen oder vielleicht sogar durch eine Membran zudialysieren zu lassen. Da die Oberfläche eines Proteinkristalles stark absorbierend auf alle möglichen Begleitsubstanzen, auch auf andere Proteine, wirkt, ist im allgemeinen erst nach weitgehender Vorreinigung Erfolg bei Kristallisationsversuchen zu erwarten. Es gibt allerdings auch Fälle, wo Lösungsgenossen die Kristallisation sehr erleichtern, indem sie selber mit in dem Kristall eingebaut werden. Humanes Albumin beispielsweise läßt sich erst nach Zusatz sehr kleiner Mengen von Dodecanol oder Mercuriionen leicht kristallisieren. Es gibt aber auch Proteine, die aus ihrem natürlichen Milieu mit großer Leichtigkeit direkt zur Kristallisation gebracht werden können. Bei der Hämolyse von Pferde-Erythrocyten z. B. pflegt das Hämoglobin regelmäßig spontan auszukristallisieren.

Die Bedeutung des kristallisierten Zustandes darf nicht überschätzt werden. Nicht nur enthalten diese Kristalle alle reichlich Wasser, mit welchem auch niedermolekulare Stoffe mit eingebaut werden können, sondern es sind auch viele Fälle bekannt, wo ähnliche Proteine zu Mischkristallen zusammentreten. Es sei an die schon zitierten Untersuchungen von HARFENIST und CRAIG erinnert, nach denen sich kristallisierte Insulinpräparate als inhomogen erwiesen haben. Der kristallisierte Zustand wird natürlich bei der Präparation eines Proteins immer angestrebt, bietet aber keine Gewähr für absolute Einheitlichkeit.

Der strenge Beweis, daß ein Protein einen chemisch reinen Stoff darstellt, ist eine der schwierigsten Aufgaben und kann heute vielleicht überhaupt noch nicht mit absoluter Sicherheit geführt werden. Man wird stets eine Reihe von verschiedenen Reinheitskriterien verlangen müssen, unter denen folgende die wichtigsten sind: Einheitlichkeit der Teilchengröße (Ultrazentrifuge und Diffusion), elektrophoretische Einheitlichkeit bei verschiedenen *p*H, Unabhängigkeit der Löslichkeit von der Bodenkörpermenge, Einheitlichkeit bei der Gegenstromextraktion, Unmöglichkeit der Zerlegung in serologisch differenzierbare Anteile. Wenn alle diese Kriterien erfüllt sind, ist es immer noch denkbar, daß die Proteinmoleküle in ihrem Feinbau ganz kleine Differenzen aufweisen, ohne daß wir das mit den heute zur Verfügung stehenden Prüfmethoden feststellen können.

[14] R. SIGNER und J. O. WALTHER, siehe Dissertation von J. O. WALTHER, Bern 1952.

[15] E. J. HARFENIST und L. C. CRAIG, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 3083 (1952).