Zeitschrift: Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche

Herausgeber: Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften

Band: 17 (1961)

Artikel: Physikochemische Eigenschaften gelöster Proteine

Autor: Wiedemann, E.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-307469

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 05.12.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

D. K.: 547.96:541.1

Physikochemische Eigenschaften gelöster Proteine

Von E. Wiedemann, Basel

Vergleicht man die Lösung eines Proteins mit jener eines niedrigmolekularen Stoffes, so findet man nicht notwendigerweise augenfällige Unterschiede. Beide Lösungen können klar, farblos oder auch gefärbt sein, wenn man Chromoproteide, wie gelbes Atmungsferment, Hämoglobin oder Chloroplastin, um nur drei Beispiele zu nennen, in den Kreis der Betrachtung einbezieht. Es hält jedoch nicht schwer, diese Lösungen auf Grund der sehr viel größeren Empfindlichkeit der Proteine gegenüber äußeren Einflüssen zu unterscheiden. Proteine vertragen schon ein Erwärmen über den physiologischen Temperaturbereich hinaus nicht; es treten irreversible Veränderungen ein, deren Kompliziertheit jener der Proteinmoleküle entspricht. Oftmals genügt schon eine Änderung der Wasserstoffionenkonzentration ihres Milieus, um gravierende Veränderungen zu bewirken.

Diese große Empfindlichkeit der Proteine bildete früher ein ernstliches Hindernis für die nähere Untersuchung dieser insbesondere in biologischer Hinsicht höchst bedeutungsvollen Stoffe. Um Näheres über sie zu erfahren und daraus Nutzen zu ziehen, mußten sich Chemiker und Biologen dazu entschließen, höchst behutsam vorzugehen und das relativ grobe Werkzeug des chemischen Eingriffs fürs erste mit den subtileren Methoden der physikalischen Trennung und Messung zu vertauschen, die man im allgemeinen als die Methoden der physikalischen Chemie bezeichnet. Die Proteine waren also zunächst mit den ihrer Empfindlichkeit adäquaten Methoden zu untersuchen, auch wenn dieses Vorgehen anfänglich nicht sehr viel versprach.

Die am leichtesten zugängliche und auch durch relative Stabilität ausgezeichnete Erscheinungsform der meisten Proteine ist die ihrer Lösung in einem wäßrigen Milieu, das durch pH-Wert und Ionenstärke charakterisiert ist. Damit ist es verständlich, daß für die allermeisten Untersuchungen an Proteinen eine derartige Lösung den Ausgangspunkt bildet.

Solche Lösungen lassen sich im allgemeinen durch Extraktion zerkleinerten biologischen Materials mit Pufferlösungen bei niedriger Tem-

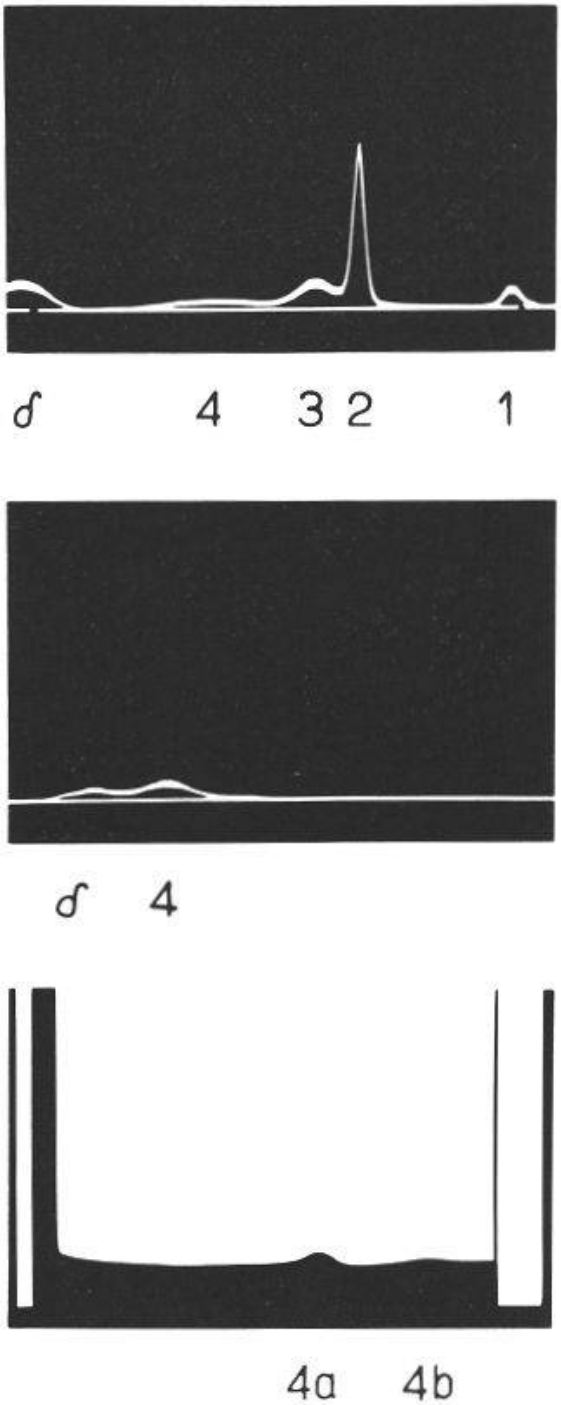

Abb. 1. Darstellung von Frauenmilchlipase.

peratur erhalten und durch Umfällen unter Erhöhung des Salzgehalts und Änderung der Wasserstoffionenkonzentration bis zu einem gewissen Grade auch von Ballaststoffen befreien. Man erhält auf diese Weise vorgereinigte Lösungen, die meistens neben dem interessierenden Protein noch andere Proteine sowie weitere Begleitstoffe enthalten, die dann unter Wahrung der Genuität des interessierenden Proteins zu entfernen sind.

An diesem Punkt des Darstellungsverfahrens können dann ein erstes Mal die Methoden der physikalischen Chemie, und zwar in präparativem

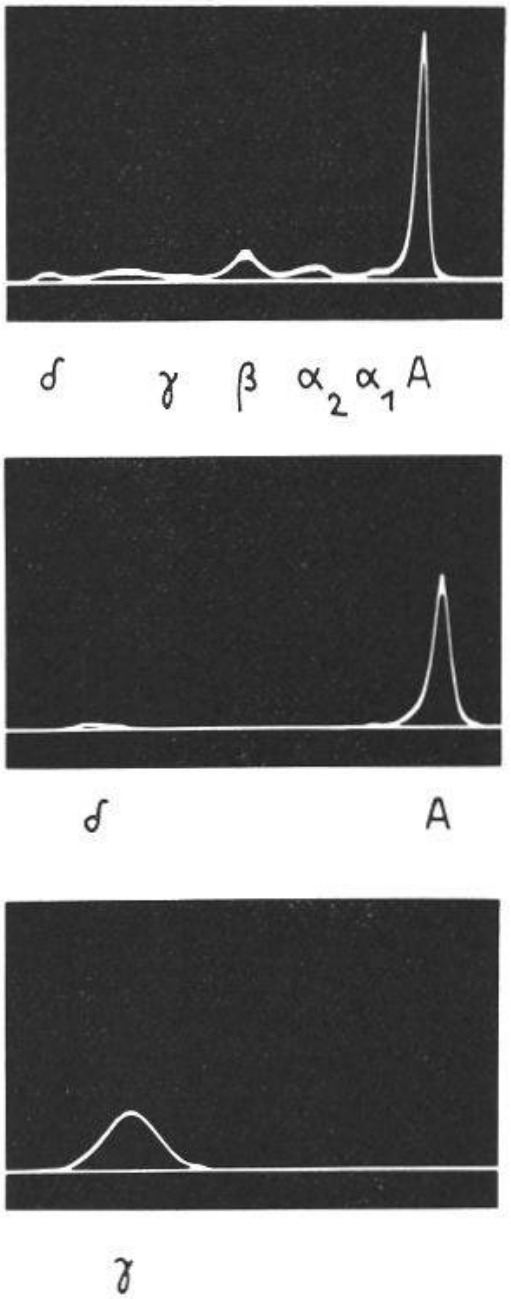

Abb. 2. Gewinnung von Albumin und γ-Globulin aus humanem Serum durch präparative Elektrophorese.

Sinne, eingesetzt werden, Methoden, die den Ladungsunterschied auch nahe verwandter Proteine zu ihrer Trennung auszunützen erlauben und den Unterschied ihres Teilchengewichts in analoger Weise dazu heranzuziehen gestatten. Eine Kombination dieser beiden Möglichkeiten, nämlich der präparativen Elektrophorese und der präparativen Hochtourenzentrifugierung, fälschlich auch als präparative Ultrazentrifugierung bezeichnet, führt dann im allgemeinen zum Ziel, nämlich zur Darstellung einer von Begleitstoffen befreiten Lösung des gesuchten Proteins in genuinem Zustand, der die weitere Betrachtung gewidmet sein soll. Ein erstes Beispiel möge dies konkret erläutern.

Der eben aufgezeigte Weg ist vor mehreren Jahren auch von uns in Zusammenarbeit mit *E. Freudenberg* [1] zur Darstellung reiner Frauenmilchlipase beschritten worden. Aus der vorgereinigten Lösung, die bei der elektrophoretischen Analyse noch die Anwesenheit von vier Proteinen in unterschiedlicher Menge erkennen ließ (Abb. 1, oberes Teilbild), wurde durch präparative Elektrophorese das aktive Prinzip abgetrennt, das sich auf Grund des Wirksamkeitstests als mit Fraktion 4 identisch erwiesen hatte (Abb. 1, mittleres Teilbild). Diese elektrophoretisch als einheitlich erscheinende Fraktion war dann durch Ultrazentrifugierung noch in zwei Unterfraktionen 4a und 4b zu zerlegen (Abb. 1, unteres Teilbild), von denen die eine dem reinen Wirkstoff mit höchster und nicht mehr zu steigernder Aktivität entsprach.

Dieses erste Beispiel ist typisch dafür, daß man sich bei der Darstellung reiner Proteinlösungen prinzipiell nicht auf das Ergebnis einer Methode verlassen darf, sondern es stets mit mindestens einer weiteren Methode ergänzen und sichern muß.

Ein weiteres Beispiel dafür war die etwas später durchgeführte Reindarstellung von β-Galaktosidase in Zusammenarbeit mit *K. Wallenfels* [2], bei welcher das ebenfalls elektrophoretisch einheitliche Präparat auch erst durch eine weitere Auftrennung in der Ultrazentrifuge als einheitlich gewonnen werden konnte.

Bei der Isolierung der Komponenten des Serums liegen die Verhältnisse insofern einfacher, als man sie bereits ohne Ultrazentrifugierung in reinem Zustand erhalten kann, wenn man von der spezielleren Isolierung der Lipoproteine absieht. Es ist allgemein bekannt, daß die wichtigsten Serumproteine nach *E. J. Cohn* [3] durch eine Reihenfolge von Fällungsoperationen erhalten werden können. Im Laboratorium dagegen ist die präparative Elektrophorese die Methode der Wahl. Mit ihr können schon in einem einzigen Versuch, wie es Abb. 2 zeigt, die im Gesamtdiagramm endständigen Komponenten Albumin und (das allerdings komplexe) γ-Globulin frei von den übrigen Proteinen erhalten werden, deren Reindarstellung aus der Restlösung in der Folge auf gleiche Weise möglich ist.

Diese drei Beispiele mögen genügen, um aufzuzeigen, auf welche Weise in konkreten Fällen reine Lösungen genuiner Proteine erhalten werden können. Es sind nun die Charakterisierungsmöglichkeiten dieser Stoffe zu besprechen, immer unter der Annahme, daß sie sich in einem ihnen angepaßten Milieu von gegebenem pH-Wert und gegebener Ionenstärke μ befinden, wie es z. B. mit Hilfe des Universalpuffers von *L. Michaelis* [4] realisierbar ist.

Eine erste optische Prüfung einer solchen Reinlösung wird ergeben,

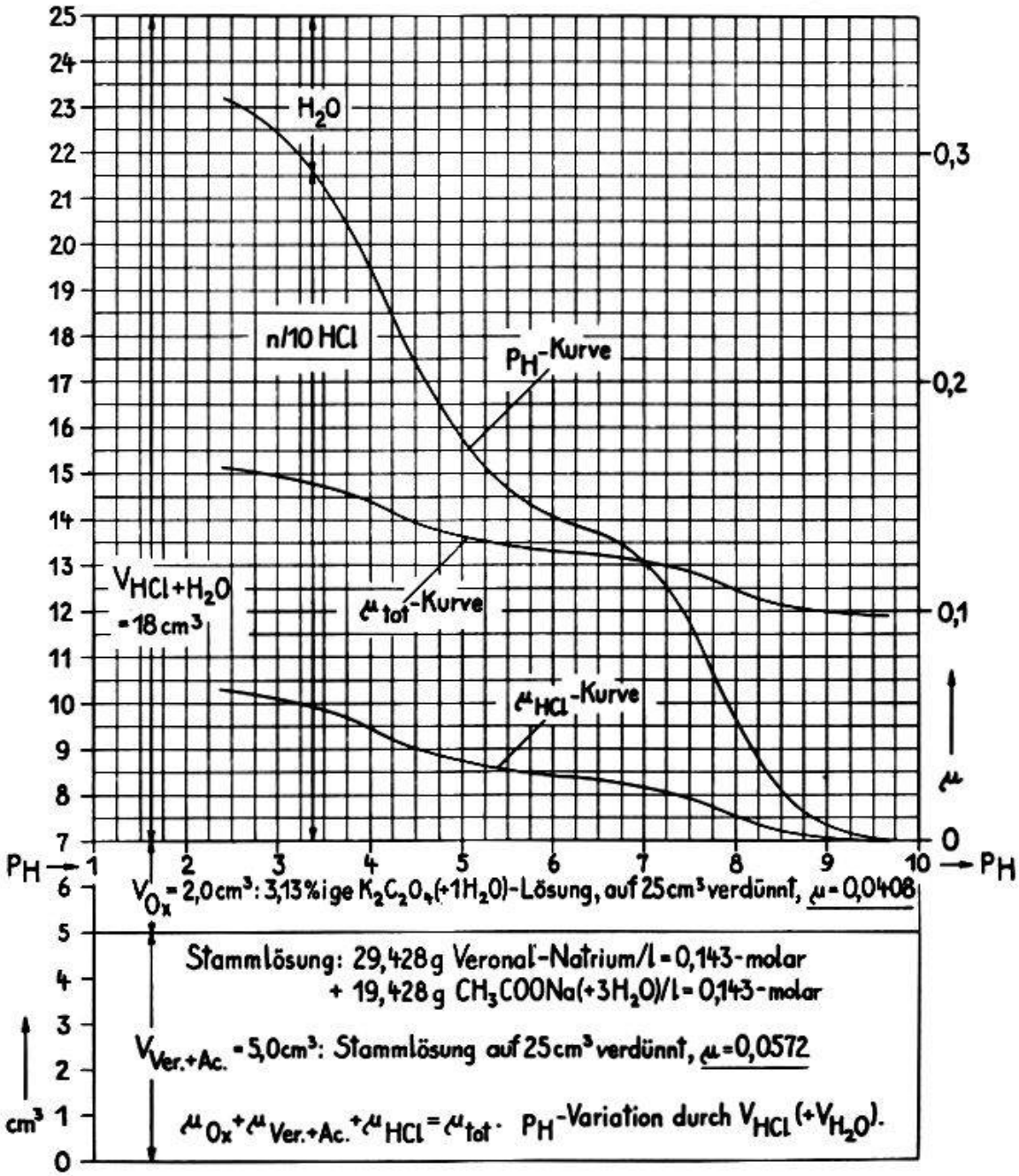

Abb. 3. Modifizierter Universalpuffer nach *L. Michaelis.*

daß sie im Falle des Vorliegens eines Chromoproteids eine Absorption im sichtbaren Spektralbereich aufweist, die jedoch im allgemeinen nicht so charakteristisch wie jene der farbgebenden Komponenten sein wird. Ein Beispiel dafür gibt Abb. 4, die, von oben nach unten gezählt, die Absorptionsspektren von Chloroplastin, kolloidal und echt gelöstem Chlorophyll wiedergibt.

Die weitaus größte Zahl der Proteine ist jedoch in Lösung farblos, so daß die Spektroskopie im sichtbaren Spektralbereich ergebnislos bleibt. Es ist jedoch schon seit langem bekannt, daß diese Proteine eine starke Lichtabsorption im ultravioletten Spektralbereich aufweisen, die wahr-

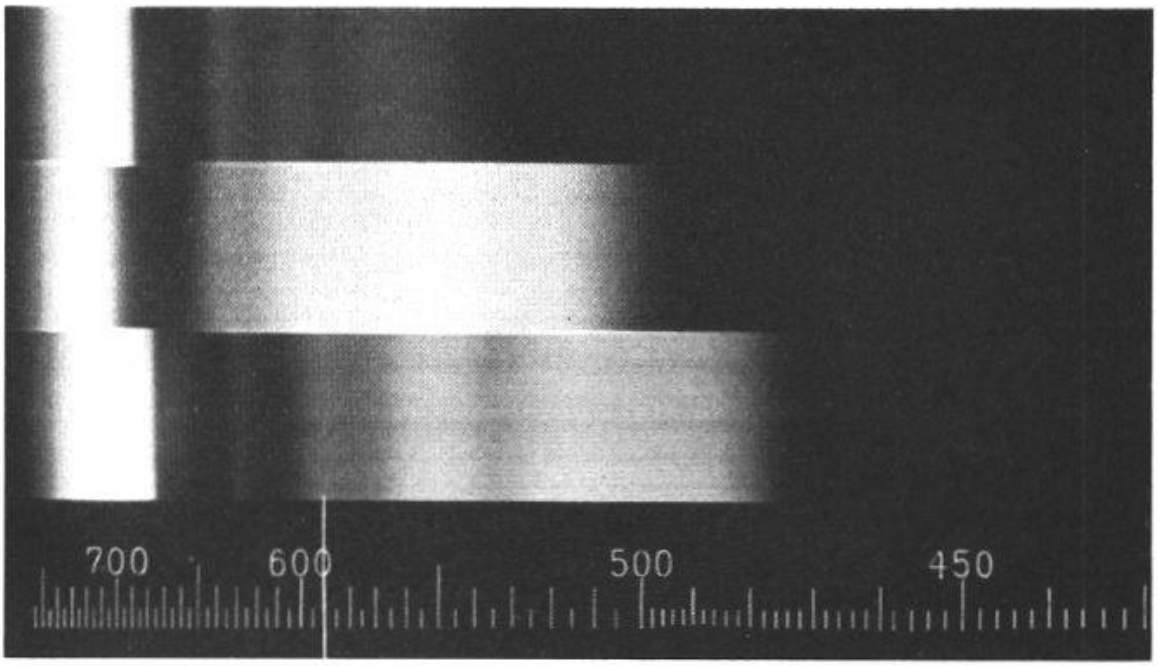

Abb. 4. Absorptionsspektren von Chloroplastin, kolloidal und echt gelöstem Chlorophyll.

scheinlich zuerst von *The Svedberg* [5] zur Verfolgung ihrer Sedimentation in der Ultrazentrifuge herangezogen worden ist, bevor die heute dafür üblichen optischen Methoden erdacht und ausgearbeitet worden waren. Ganz neuerdings macht man wieder davon Gebrauch, um sehr verdünnte Proteinlösungen in der Ultrazentrifuge nach speziellen Methoden zu untersuchen [6]. Die Ultraviolettabsorption der Proteine ist jedoch ein generelles Merkmal, das der Spezifität im Einzelfall entbehrt und deshalb nicht zu ihrer Unterscheidung und Charakterisierung herangezogen werden kann. Anders und erheblich günstiger scheinen die Verhältnisse in bezug auf die Infrarotspektren der Proteine zu liegen, deren Untersuchung in jüngster Zeit von *M. Beer* [7], *A. Elliott* [8] und anderen an Hand genommen worden ist. Man darf erwarten, daß sich hier mit der Zeit eine ähnlich wertvolle Dokumentation erreichen lassen wird, wie sie heute schon für niedrigmolekulare organische Stoffe besteht.

Ein weiteres optisches Merkmal farbloser und auch gefärbter Proteinlösungen ist ihr Tyndall-Effekt. Die Lichtstreuung dieser Lösungen ist ebenfalls eine seit langem bekannte Erscheinung, der aber erst in jüngerer Zeit die gebührende Beachtung geschenkt wurde, nachdem *A. Einstein* auf die einfache Beziehung zwischen Streueffekt und osmotischem Druck hingewiesen hatte. Für Moleküle, deren längste Achse 200 Å nicht übersteigt, steht die Lichtstreuung in einer einfachen Beziehung zur Teilchengröße[1], so daß damit Molekulargewichtsbestimmun-

[1] solange nämlich die Proteinteilchen in bezug auf die Wellenlänge des Lichtes als Punkte betrachtet werden dürfen.

gen möglich sind. Es ist zu erwarten, daß die inzwischen weiter vervollkommneten Meßeinrichtungen [9, 10] dieser relativ einfachen Methode zu vermehrter Anwendung verhelfen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Molekulargewichtsbestimmung folgt aus der Bestimmung des osmotischen Drucks unter Zugrundelegung des Raoultschen Gesetzes. Leider kann sich hier die Verbesserung der Meßeinrichtungen nicht im gewünschten Sinne auswirken, da die Versuchsergebnisse prinzipiell durch die Eigenladungen der Proteine in ungünstigem Sinne beeinflußt werden. Man kann diese Schwierigkeit nur in den seltensten Fällen eliminieren, weil nur die wenigsten Proteine in ungeladenem Zustand, also beim pH-Wert ihres isoelektrischen Punktes, löslich sind.

Viele Proteinteilchen weichen auf Grund ihres Aufbaus mehr oder weniger von der Kugelform ab. In diesen Fällen kann die Untersuchung ihres Verhaltens im Strömungsdoppelbrechungsversuch Aufschlüsse über ihr Achsenverhältnis geben [11], wie dies in speziellen Fällen auch von *R. Signer* [12] gezeigt worden ist. Hierzu wird die Proteinlösung in einem zylindrischen Hohlraum durch Rotation der äußeren Zylinderwandung in Rotation versetzt und zwischen gekreuzten Nicols beobachtet. Aus dem auf diese Weise sichtbar zu machenden Richteffekt, den die Proteinteilchen erleiden, kann dann das Achsenverhältnis abgeleitet werden. Dieses Achsenverhältnis ist um so genauer bestimmbar, je mehr eine der Teilchendimensionen 300 Å überschreitet. Mit abnehmenden Dimensionen wird die Messung der Strömungsdoppelbrechung durch die Eigenrotation der Moleküle mehr und mehr gestört, was zu beachten bleibt.

Bei den später zu besprechenden optischen Bildaufzeichnungen von Elektrophorese-, Diffusions- und Ultrazentrifugenmessungen ist der spezifische Brechwert oder Refraktionsindex der Proteinlösungen von Wichtigkeit, da von ihm die Absolutwerte der Messungen abhängen. Er bedarf trotzdem nur einer kurzen Erwähnung, weil es sich gezeigt hat, daß dieser Wert für Proteine in der bei diesen Messungen üblichen Konzentration von höchstens 1–1,5 % praktisch nur eine konzentrationsabhängige Konstante ist und als solche eingesetzt werden darf. Diese Konstante hat den Wert von 0,0018 Einheiten pro g Protein in 100 ml Lösungsmittel, das in diesem Falle eine verdünnte Pufferlösung ist. Eine Ausnahme von dieser Regel bilden die Lipoproteine, deren Refraktionsindex entsprechend ihrem Lipoidgehalt ansteigt, was bei der Untersuchung dieser Proteide zu berücksichtigen ist.

Da Proteine durchwegs optisch aktive Substanzen sind, liegt es auf der Hand, sie weiter durch ihren Drehwert zu kennzeichnen. Da man

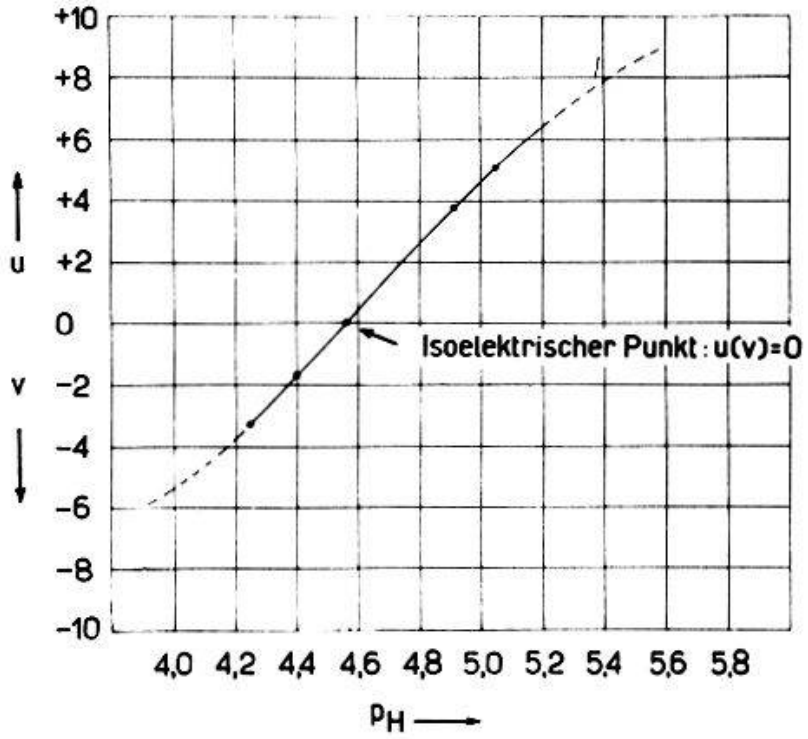

Abb. 5. Elektrophoretische Beweglichkeit und Bestimmung des isoelektrischen Punktes von Ovalbumin nach *A. Tiselius*.

für eine gegebene Lichtart jedoch oftmals fast gleiche Werte erhält, ist man in jüngerer Zeit dazu übergegangen, diese Werte durch die genaueren Diagramme der Rotationsdispersion und ihre Abhängigkeit vom pH-Wert des Milieus zu ersetzen. Die Messung der Rotationsdispersion erfordert die Kombination eines Polarimeters mit einem lichtstarken Monochromator, bietet aber im übrigen keine besonderen Schwierigkeiten, so daß sich, wie beispielsweise *B. Jirginsons* [13] in mehreren Arbeiten gezeigt hat, sowohl eine gute Charakterisierung als auch eine gute Differenzierung auch nahe verwandter Proteine erzielen läßt.

Damit sind die wichtigsten optischen Eigenschaften gelöster Proteine kurz beschrieben. Es ist nun auf ihre elektrischen Eigenschaften und ihr Verhalten in Gravitationsfeldern erheblicher Intensität einzugehen, deren Messung zwar den relativ größten apparativen Aufwand erfordert, dafür aber auch die wichtigsten Ergebnisse mit großer Genauigkeit und ohne wesentliche Einschränkungen liefert. Die dabei erforderliche Berücksichtigung thermodynamischer Einflüsse wird anschließend zu erwähnen sein.

Die große Mehrzahl der Proteine zeigt in Lösung amphoteren Charakter und ein Überwiegen der negativen Ladungen. Es ist nun höchst bedeutungsvoll, daß dieser Ladungszustand auf sehr einfache Weise durch Änderung der Wasserstoffionenkonzentration des Milieus geändert und auch auf die Resultante Null gebracht werden kann. Ist dies der Fall,

so hat man damit den isoelektrischen Punkt des betreffenden Proteins erreicht, dessen Lage auf der pH-Wert-Skala von der ihm eigentümlichen Ladungsverteilung abhängt und deshalb eine charakteristische Konstante ist. Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes erfolgt durch eine Reihe von Wanderungsversuchen im elektrischen Feld unter Änderung des pH-Wertes des Milieus. Man erhält auf diese Weise die in Abb. 5 gezeigte, meist leicht s-förmig gekrümmte Kurve der Beweglichkeitswerte in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration und damit auch den pH-Wert der Beweglichkeit Null, also den isoelektrischen Punkt.

Mit der Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurde bereits eine Aufgabe erwähnt, die in den Bereich der nun zu besprechenden Elektrophorese fällt. Nach *A. Tiselius* [14] bezeichnet man mit Elektrophorese die Bewegung oder den Transport elektrisch geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Hierzu wird die Proteinlösung in einem Nernstschen U-Rohr beidseits mit der das Milieu bildenden Pufferlösung überschichtet und über in diese eintauchende Elektroden, die zweckmäßigerweise unpolarisierbar gemacht sind, eine Gleichspannung angelegt. Unter dem Einfluß dieser Gleichspannung bewegen sich dann die Proteine gemäß ihrer Eigen- bzw. Restladung anodisch oder kathodisch, wobei die anodische Beweglichkeit mit u und die kathodische Beweglichkeit mit v bezeichnet wird.

Aus der Definition der Elektrophorese folgt in Verallgemeinerung der Aufgabe der Bestimmung des isoelektrischen Punktes die Bestimmung der elektrophoretischen Beweglichkeiten u bzw. v bei gegebener Wasserstoffionenkonzentration als ihr besonderer Zweck, und in der Tat war diese Bestimmung zunächst ihre Hauptaufgabe. Sie läßt sich, wie *A. Tiselius* und *E. A. Kabat* zuerst fanden, auch mit Gemischen durchführen [15], da die Wanderung der Proteine weitgehend unabhängig voneinander erfolgt. Beispielsweise kann man in einem einzigen Versuch, wie dies Abb. 6 zeigt, die Beweglichkeitswerte aller Hauptkomponenten des Serums, natürlich für dieselbe Wasserstoffionenkonzentration, erhalten.

Die Elektrophorese hat dann mit der Einführung optischer Meßmethoden, insbesondere durch *H. Svensson* [16] und nicht zuletzt durch deren Weiterentwicklung bis in die jüngste Zeit [17], sehr an Bedeutung gewonnen, da es damit möglich geworden ist, zusätzlich auch die Menge der anwesenden Proteine mit hoher Genauigkeit zu erfassen. Dieser wichtige Schritt ging von der Beobachtung aus, daß sich der Unterschied im Brechungsindex und sogar der Brechungsindexverlauf zwischen Lösung und Lösungsmittel, die bei den hier in Betracht kommen-

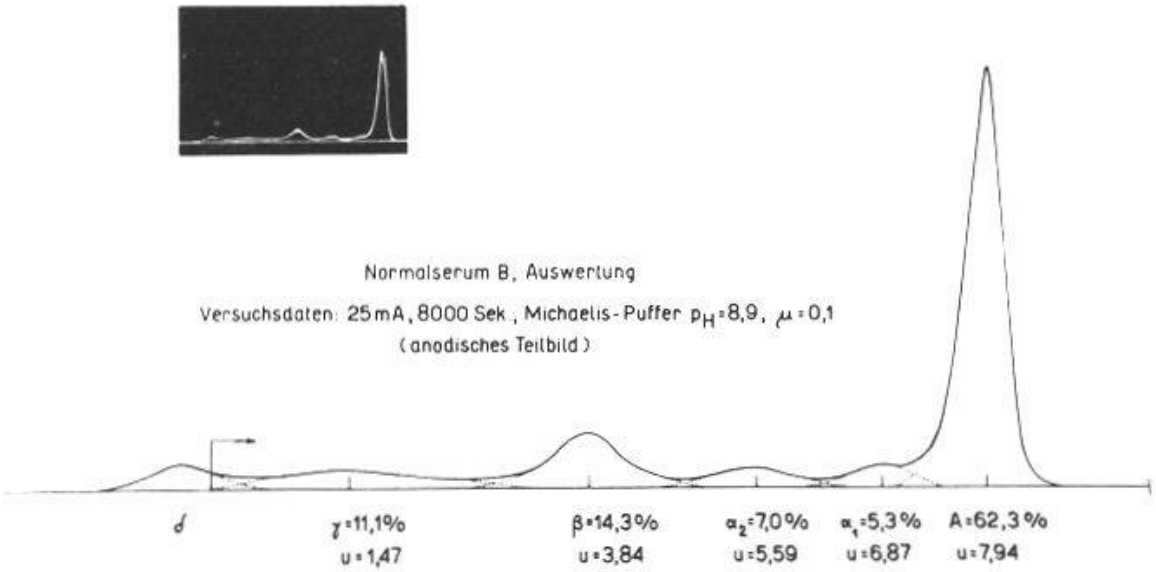

Abb. 6. Beweglichkeits- und Mengenwerte eines normalen humanen Serums.

den Konzentrationen in linearer Beziehung zur Proteinkonzentration stehen, optisch erfassen und sowohl direkt als auch in ihrer ersten Ableitung objektiv aufzeichnen lassen. Benützt man die heute allgemein bevorzugte letztgenannte Methode, so entspricht die von den einzelnen Komponenten zusammen mit der Basis eingenommene Fläche direkt der relativen Menge des betreffenden Proteins; unter Einbezug der Apparaturkonstanten und des Refraktionswertes ergeben sich weiter die absoluten Mengen.

Zu dieser Aufzeichnung wird die Proteinlösung mit parallelem Licht durchstrahlt, das von einem horizontalen Spalt ausgeht und wieder zu einem horizontalen Lichtstrich (Bild dieses Spaltes) gesammelt wird, wozu zwei sehr gut korrigierte Kollimatorsysteme entsprechender Apertur erforderlich sind. Weist die Lösung infolge von Konzentrationsänderungen, wie sie z. B. zwischen Lösung und Lösungsmittel oder zwischen Lösungen verschiedener Art oder Konzentration auftreten, entsprechende Brechungsindexänderungen oder Brechungsindexgradienten auf, so wird das diese Stellen durchlaufende Licht entsprechend der Stärke dieser Gradienten mehr oder weniger gegen das dichtere Medium zu abgelenkt. An Stelle eines Spaltbildes entsteht eine Vielzahl von solchen mit gleitenden Übergängen. Bildet man nun eine Lösung, die solche Inhomogenitäten aufweist, mittels eines sphärischen Objektivs in der Vertikalebene und die von ihr herrührenden Spaltbilder mittels eines Zylinderobjektivs in der Horizontalebene auf dieselbe Fläche (Mattscheibe oder photographische Schicht) ab, nachdem man am Ort der Spaltbilder eine schräge Schneide, einen schrägen Spalt oder eine Phasenkante angeordnet hat, so erhält man einerseits eine maßstäblich ge-

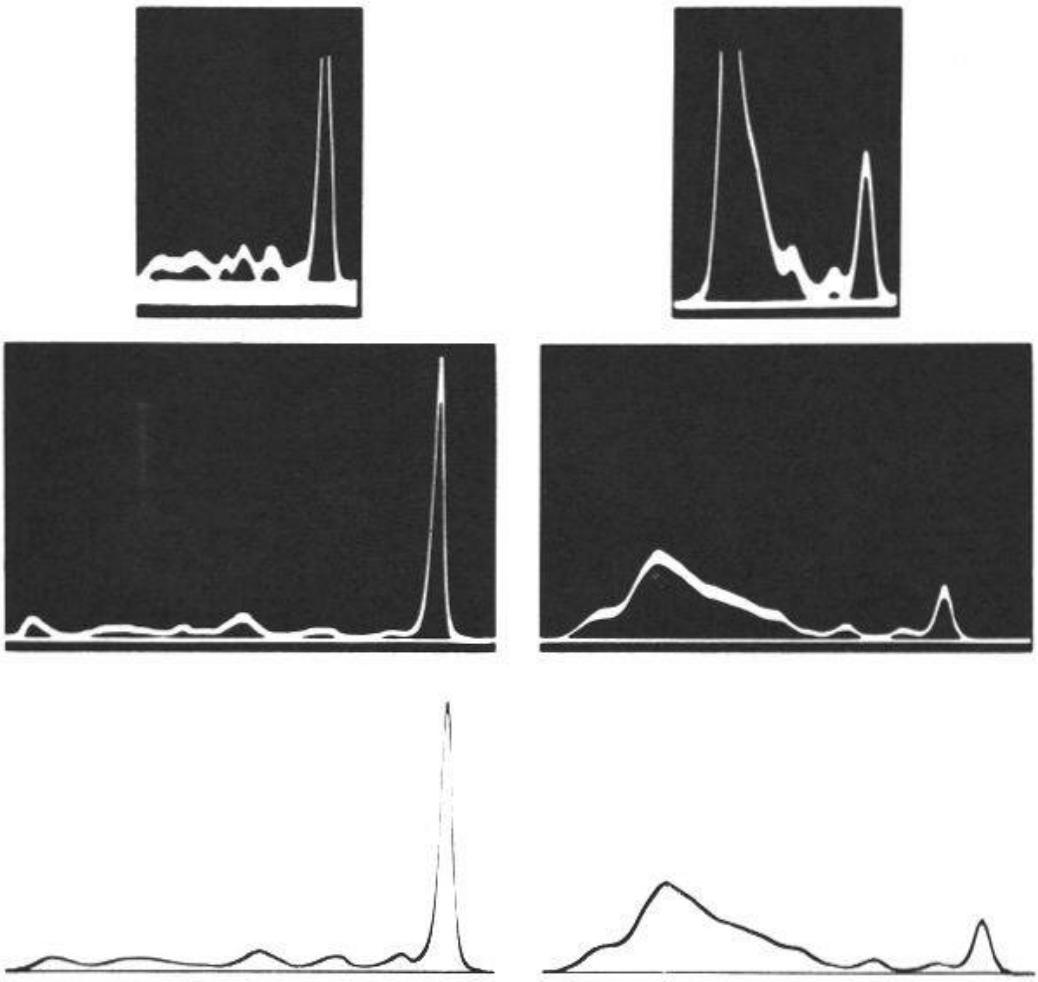

Abb. 7. Verfeinerungen des Elektrophoresediagramms.

treue Aufzeichnung der Lösung in vertikaler Richtung und andererseits eine Gradientenaufzeichnung in horizontaler Richtung, die Punkt für Punkt durch die Lage des Lichtdurchtritts auf dem schrägen Spalt oder den ihn ersetzenden Elementen bestimmt wird. Man erhält also ein Bild aller vorhandenen Gradienten in ihrer jeweiligen Lage, in ihrer Stärke und in ihrem Verlauf und damit eine vollständige Übersicht über Proteingehalt und Proteinverteilung in der Lösung.

Es ist verständlich, daß einer Methode, die dies zu leisten vermag, ohne dem Untersuchungsmaterial die Genuität zu nehmen, besondere Bedeutung zukommt; damit rechtfertigen sich auch der erforderliche apparative Aufwand und das Bestreben, diese Methode immer weiter zu verfeinern.

Ein Beispiel für diese Verfeinerungen gibt Abb. 7, in welcher oben zwei Diagramme aus dem Jahre 1940, dem Einführungsjahr der optischen Meßmethoden, dann zwei Diagramme von 1950 [18] und schließlich zwei weitere Diagramme von 1957 [19] wiedergegeben sind. Die Diagramme von 1950, mit einem verbesserten schrägen Spalt aufge-

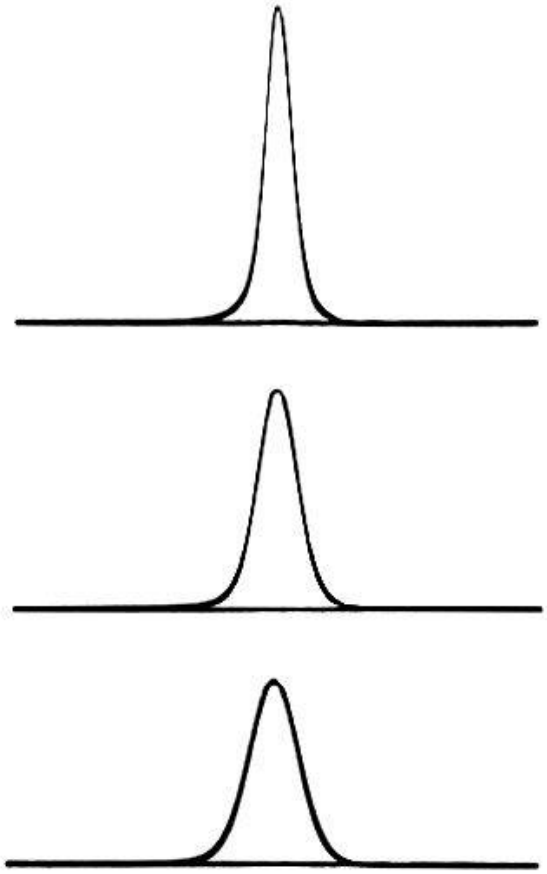

Abb. 8. Verlauf eines Diffusionsversuchs.

nommen, wurden längere Zeit hindurch als die bestmöglichen angesehen; sie wurden schließlich von den nachfolgenden überholt, zu deren Aufnahme der schräge Spalt durch eine spezielle Phasenplatte ersetzt ist. Die Meßgenauigkeit stieg damit abermals um mindestens einen Faktor 5 weiter an, da mit dem Phasenplatten-Aufnahmeverfahren praktisch alle noch störenden Linienverbreiterungen beseitigt werden konnten. Mit den neuen Phasenplattendiagrammen dürfte die gegenwärtige Grenze dieser Bildaufzeichnungsart erreicht sein. Noch höhere Meßgenauigkeiten sind etwa gleichzeitig durch eine Bildaufzeichnung mit Interferenzlinien erzielt worden [20]; obschon dieser Vorgang keineswegs schwieriger zu verwirklichen ist als die Diagrammaufzeichnung, hat doch das weniger anschauliche Bild seiner breiteren Anwendung bisher hindernd im Wege gestanden. Es sei jedoch auf seine Vorzüge für genaueste Messungen ausdrücklich hingewiesen.

Praktisch eng verknüpft mit der Elektrophorese, weil mit denselben apparativen Hilfsmitteln durchzuführen, ist die Diffusionsmessung, die zur Bestimmung einer weiteren charakteristischen Konstante, der Diffusionskonstante, führt. Überschichtet man eine Proteinlösung mit dem Lösungsmittel und überläßt man diesen Ansatz unter konstanten äußeren Bedingungen, wie sie die Elektrophorese ebenfalls erfordert, sich

selbst, so entwickelt sich an der Grenzfläche ein mit der Zeit sich verbreiternder Konzentrationsgradient von s-förmigem Verlauf, dessen erste Ableitung im Idealfall der Verteilungsfunktion von *Gauss* entspricht und meistens in dieser Form aufgezeichnet wird.

Abb. 8 zeigt von oben nach unten drei zeitlich aufeinanderfolgende Aufnahmen desselben Diffusionsgradienten nach der Phasenplattenmethode. Die Geschwindigkeit, mit welcher sich ein derartiger Diffusionsgradient verflacht, ist in erster Linie abhängig von der Masse und dem Reibungskoeffizient der diffundierenden Proteinteilchen und somit ein Maß für diese Größen. Die hieraus zu berechnende Diffusionskonstante D hat ihre besondere Bedeutung für die Bestimmung des Molekulargewichts, insbesondere in Verbindung mit der Sedimentationskonstanten s, wie sie mittels der Ultrazentrifuge erhalten wird.

Die Sedimentationskonstante s ist eine weitere sehr wichtige Größe, wie sie an Proteinlösungen bestimmt werden kann. Setzt man solche Lösungen nach dem berühmten Vorgang von *The Svedberg* [21] sehr intensiven und konstanten Schwerefeldern aus, so zwingt man damit die Proteinteilchen zur Sedimentation oder wenigstens zur Einstellung eines Sedimentationsgleichgewichts, womit der Gleichgewichtszustand zwischen Sedimentation und der ihr entgegenwirkenden Diffusion bezeichnet wird.

Abb. 9 zeigt an Hand von fünf zeitlich aufeinanderfolgenden Aufnahmen den Verlauf eines Sedimentationsgeschwindigkeitsversuchs in der Ultrazentrifuge. Die Wanderung der Gradienten erfolgt, vom Meniskus (der Grenzfläche Lösung-Gasraum) ausgehend, von rechts nach links und das sedimentierte Material sammelt sich am Boden der Zelle an, erkennbar an der zunehmenden Beschattung des linken Bildrandes.

Die Sedimentationsgeschwindigkeit ist bei Konstanz der äußeren Bedingungen der Masse der Teilchen direkt und ihrem Reibungskoeffizienten umgekehrt proportional; die hieraus zu berechnende Sedimentationskonstante, die die Dimension einer sehr kleinen Zeit hat, ist wie die Diffusionskonstante eine für ein gegebenes Protein charakteristische Größe.

Die Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit erfolgt durch mehrfache Bestimmung der Lage der unter dem Einfluß des Schwerefeldes radial auswärts wandernden Gradienten in passend gewählten Zeitintervallen, wie das Abb. 9 zeigt.

Die sich hieraus ergebende Bestimmung der Sedimentationskonstante zählt im Hinblick auf die mit ihr mögliche Berechnung des Molekulargewichts zu den wichtigsten an Proteinlösungen möglichen Messungen, so daß auch hier der relativ große apparative Aufwand als gerechtfertigt erscheint.

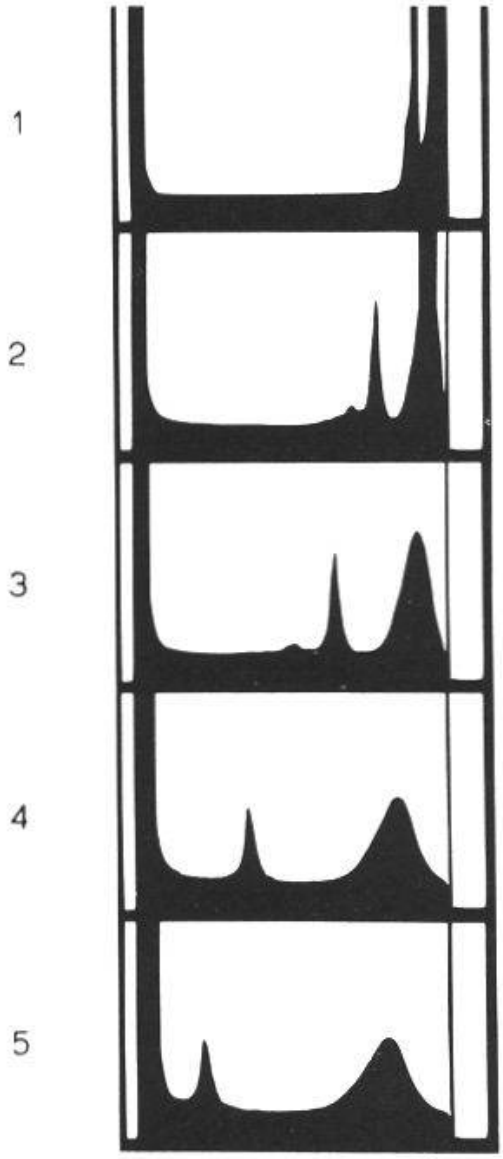

Abb. 9. Verlauf eines Sedimentationsgeschwindigkeitsversuchs.

Zur Erzeugung der sehr intensiven Schwerefelder von 300 000 g und mehr ist eine Maschinenanlage nötig, die Rotoren von ca. 20 cm Durchmesser und nicht unerheblicher Masse in relativ kurzer Zeit auf Drehzahlen von 65 000 pro Minute und darüber beschleunigen kann, sie dann unter konstanten äußeren Bedingungen auf der erforderlichen Drehzahl hält und schließlich wieder zum Stillstand bringt. Diese Rotoren pflegen die Untersuchungslösung in Zellen zu enthalten, deren mittlerer Abstand vom Rotationszentrum 6,5 cm beträgt und die zur Verfolgung des Sedimentationsvorgangs durchsichtig sein müssen. Obschon die damit aufgeworfenen Probleme nicht zu unterschätzen sind, wurden sie schon vor mehr als zwanzig Jahren von *The Svedberg* in bewundernswerter Weise gelöst, der damit zugleich die Einheitlichkeit von Proteinen, also ihre Individualität, die vordem bestritten war, unter Beweis zu stellen vermochte.

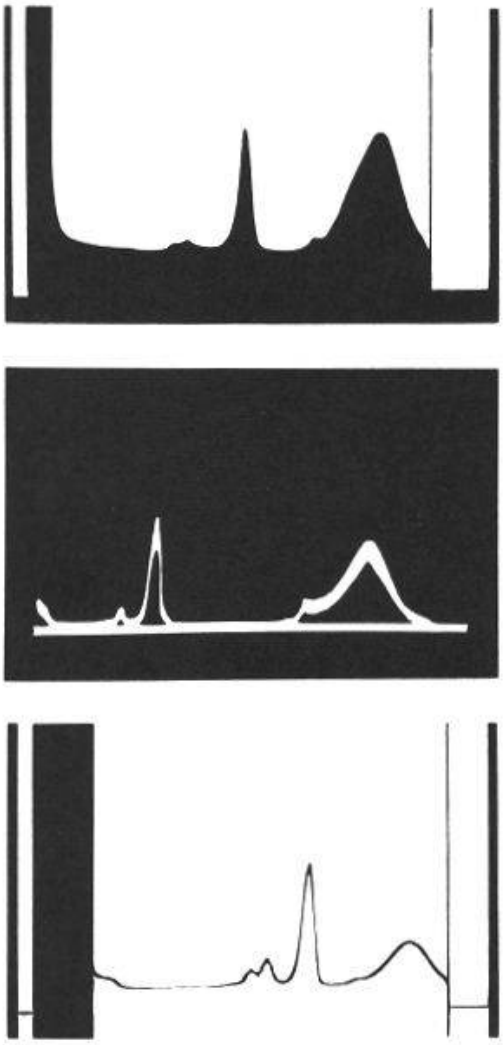

Abb. 10. Verfeinerung des Ultrazentrifugendiagramms.

Seither erzielte Verbesserungen verschiedenster Art haben den Platzbedarf der Ultrazentrifuge ganz erheblich verringert, ihre Bedienung sehr vereinfacht und durch die Übernahme der neuen optischen Beobachtungs- und Meßmethoden ihre Möglichkeiten erheblich erweitert. Aus der früheren mehr oder weniger einmaligen Anlage ist ein Laboratoriumsgerät entstanden, das heute fast überall und für die verschiedensten Zwecke eingesetzt werden kann.

Da die optischen Meßmethoden bei der Elektrophorese und der Ultrazentrifuge prinzipiell dieselben sind, konnte die Ultrazentrifuge in gleicher Weise von deren Entwicklung Nutzen ziehen. Abb. 10 zeigt den Fortschritt auf, wie er seit 1940 erzielt werden konnte. Auf eine Wiedergabe früherer Schlieren- und Skalenbildaufnahmen ist verzichtet worden. Oben dargestellt ist der erste Typ des Diagrammbildes, wie er von *J. St. L. Philpot* [22] angegeben worden ist; das folgende Teilbild zeigt eine spätere Anwendung der Schrägspaltmethode [23], während mit dem dritten Teilbild, dem seit etwa drei Jahren möglichen Phasenplatten-

bild [24], die gegenwärtige Grenze der Leistungsfähigkeit der Diagrammabbildung erreicht sein dürfte. Auch bei der Ultrazentrifuge sind mittels Interferenzmethoden noch höhere Meßgenauigkeiten erreichbar, worauf hier jedoch nur verwiesen werden kann [25].

Damit dürften die wichtigsten physikochemischen Eigenschaften gelöster Proteine an Hand der mit solchen Lösungen ausführbaren Messungen kurz besprochen sein. Es bleibt noch, darauf hinzuweisen, daß in diese Messungen weitere mehr oder weniger variable Werte eingehen, von denen Reibungsfaktor und Temperatur, subsumierbar unter dem Viskositätsfaktor, sowie das partielle spezifische Volumen der Proteinteilchen und die Lösungsdichte die wichtigsten sind.

Der Reibungsfaktor ist das Verhältnis der experimentell bestimmbaren molaren Reibungskonstante zur theoretisch berechneten Reibungskonstante einer Kugel von entsprechendem spezifischem Volumen; er ist daher für kugelförmige Teilchen gleich Eins, während er für davon abweichende Teilchenformen größer ist. Für eine gegebene Temperatur entspricht er dem Viskositätswert, wie er mit dem Ostwaldschen Viskosimeter bestimmbar ist. Der Viskositätswert geht in die Berechnung der Bewegung gelöster Proteine als Faktor ein, der insbesondere bei der Berechnung der Sedimentationskonstante nicht außer acht gelassen werden darf. Er kann aber auch, wie *W. Kuhn* und später *A. Polson* gezeigt haben, zur Berechnung von Molekulargewichten aus Diffusionsmessungen dienen [26].

In ähnlicher Weise wird das partielle spezifische Volumen, wie es aus Pyknometerbestimmungen hervorgeht, multipliziert mit der Dichte der Lösung, als Korrektionsfaktor bei der Berechnung der Sedimentationskonstante benötigt.

Es sei bemerkt, daß mitunter auch Ladungsdichte und Ladungsverteilung entsprechend zu berücksichtigen sind.

In welchem Maße diese Faktoren die Versuche beeinflussen können, sei schließlich an einem typischen Beispiel gezeigt. Um die spezifisch leichten Lipoproteine des humanen Serums mit der Ultrazentrifuge analysieren zu können, muß man den Dichteunterschied zwischen ihnen und dem Milieu vergrößern. Am besten verkehrt man ihn beispielsweise durch Verwendung von Deuteriumoxyd (D_2O) statt Wasser als Lösungsmittel ins Negative, so daß statt einer Sedimentation eine Flotation erfolgt. In Abb. 11 sind vier derartige Flotationsmessungen wiedergegeben. Die beiden ersten Teilbilder wurden mit den Lipoproteinen normaler Seren, die beiden folgenden mit jenen von Arterioskleroseseren erhalten. Die Unterschiede sind signifikant. Die Wanderung der Gradienten erfolgte hier von links nach rechts, also auf das Rotationszentrum zu, und

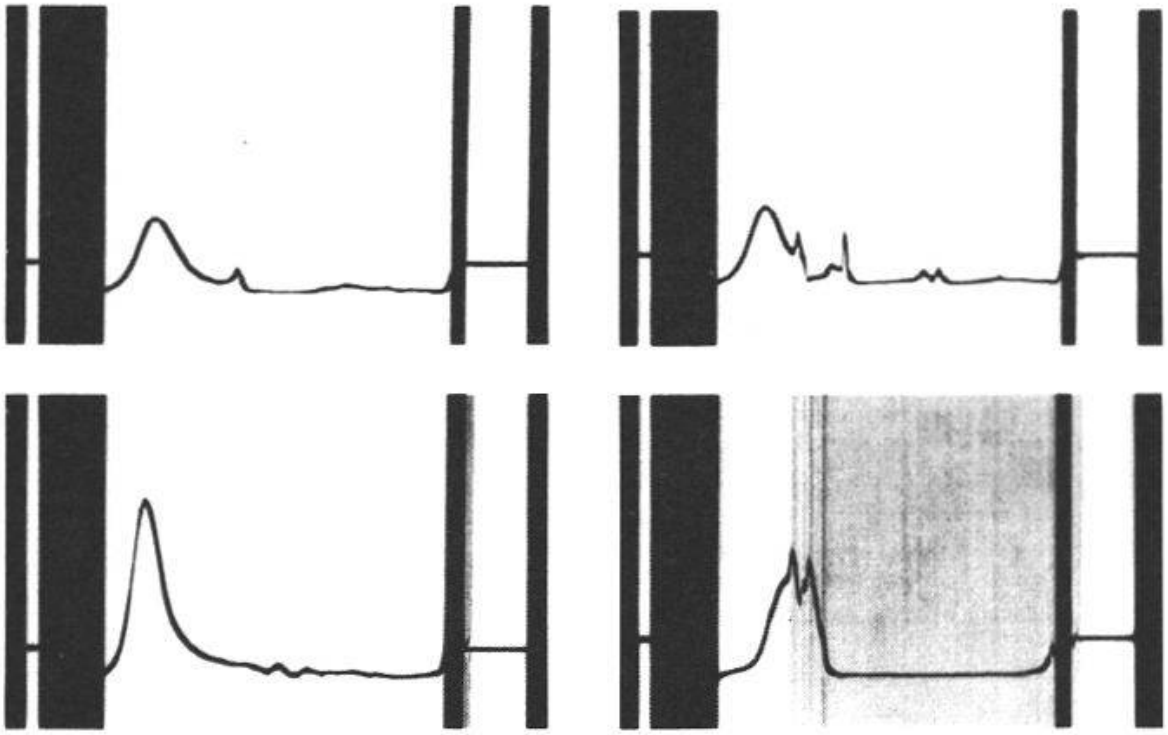

Abb. 11. Flotationsdiagramme der Lipoproteine humaner Seren.

das flotierende Material sammelte sich an der Grenzfläche zwischen Lösung und Gasraum an, weshalb in diesen Aufnahmen der Meniscus als verdickt erscheint.

Einige Aussagen, wie sie sich aus den physikochemischen Eigenschaften gelöster Proteine ergeben, sind in Tab. 1 für die Hauptkomponenten des humanen Plasmas zusammengestellt. Ähnliche Zusammenstellungen liegen für viele Proteingruppen vor [27]. Da Tabelle 1 keine Plasmabestandteile enthält, deren Anteil weniger als 0,1% ausmacht, sei ergänzend angeführt, daß das Coeruloplasmin den isoelektrischen Punkt 4,4 besitzt, die Sedimentationskonstante 7,08 aufweist und zuletzt von *H. F. Deutsch* in schönen Kristallen erhalten werden konnte [28].

Zusammenfassend lassen sich gelöste Proteine wie folgt physikalisch-chemisch charakterisieren:

1. Sie zeigen Infrarotspektren, gelegentlich auch Absorptionsspektren im sichtbaren Bereich (Chromoproteide) sowie eine starke, aber unspezifische Absorption im Ultraviolett.

2. Sie geben durch Messung ihres Tyndall-Effekts und ihrer Strömungsdoppelbrechung Aufschlüsse über ihre Teilchengröße und über ihr Achsenverhältnis und damit über ihre Form.

3. Sie sind weiter charakterisierbar durch das Diagramm ihrer Rotationsdispersion und die Lage ihres isoelektrischen Punktes.

Eigenschaften der Hauptkomponenten des humanen Plasmas

nach J.L. Oncley, H. Schultze u.a.

Komponente des Plasmas	%-Gehalt im Plasma (Mittelwert)	Isoelektr. Punkt (p_H)	elektrophoretische Beweglichkeit[1] (Mittelwert $u \times 10^{-5}$)	Sedimentations-Konstante $s_{20} \times 10^{-13}$	Molekular-Gewicht M	Achsen-Verhältnis in Å	Grössen- und Form-Vergleich (⟷ = 100 Å)
Albumin[2]	52	4,9	7,5	4,6	69 000	150/38	
α_1-Lipoprotein	3	5,2	7,0	5	200 000	300/50	
α_1-Säureprotein	0,5	3	6,0	3,5			
α_2-Protein	0,1		5,5	2,9			
α_2-Glycoprotein	1,2	4,9	5,0	9	300 000		
α_2-Mucoprotein	0,5	4,9	4,4	9			
β_1-Lipoprotein	2		4,3	2,9	1 300 000	185/185	
β_1-Euglobulin(e)	1		4,0	20	1 000 000		
	2	5,5	3,8	7	150 000		
β_1-Globulin[2]	3	5,8	3,6	5	90 000	190/37	
β_2-Globulin	3	6,3	3,4	7	156 000		
Fibrinogen	4	<5,3	2,6	9	400 000	700/38	
γ_1-Globulin(e)	4-5	7,3	1,8	10	300 000	235/44	
γ_2-Globulin(e)	6-7	6,3	1,0	7	156 000		
Kryoglobulin(e)	0,2	<5,3	1,0	7			

[1]) für Michaelis-Puffer $p_H = 8,9$, $\mu = 0,1$

[2]) kristallisiert

Tab. 1. Eigenschaften der Hauptkomponenten des humanen Plasmas.

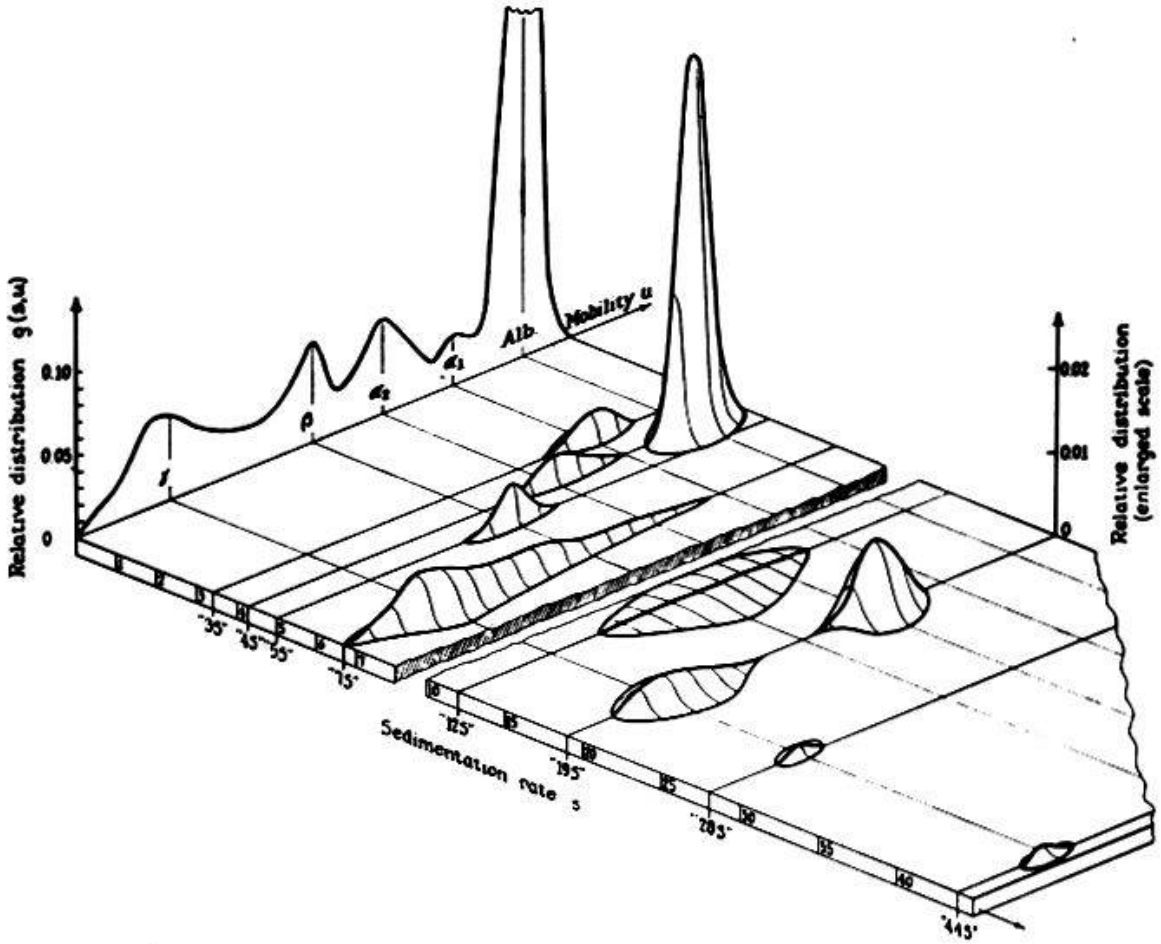

Abb. 12. Übersicht über die Aufteilung der Hauptfraktionen des humanen Serums durch Elektrophorese und Ultrazentrifugierung.

4. Sie lassen sich in der Elektrophorese sowohl durch ihre Beweglichkeitswerte u oder v charakterisieren als auch mengenmäßig bestimmen.

5. Sie liefern schließlich im Diffusionsversuch und im Sedimentationsversuch die wichtigen Konstanten D und s, aus denen sich mit guter Genauigkeit das Molekulargewicht M berechnen läßt.

Abb. 12, die einer Arbeit von *G. Wallenius* [29] entnommen ist, zeigt in besonders anschaulicher Weise die Aufteilung der Hauptfraktionen des humanen Serums, wie sie einerseits durch die Elektrophorese und andererseits mit der Ultrazentrifuge möglich ist. Diese Möglichkeiten gewinnen dadurch an Bedeutung, daß sie nicht auf die Analyse beschränkt sind, sondern auch präparativen Wert besitzen. Sie bieten damit die Möglichkeit, Proteine aus ihren Rohlösungen in reinem, genuinem Zustand zu isolieren und sie damit erst den eigentlichen charakterisierenden physikalischen Messungen zugänglich zu machen. Sie helfen damit auch, reine Proteine für die chemische Untersuchung bereitzustellen, die letzten Endes dazu berufen ist, uns ihre Zusammensetzung und ihren strukturellen Aufbau zu erklären.

Résumé

A l'examen par les méthodes physicochimiques, les protéines en solution nous donnent les informations suivantes:

1. Elles présentent des spectres d'absorption dans l'infrarouge, parfois des spectres d'absorption dans la région visible (par exemple, les chromoprotéides), ainsi qu'une forte absorption dans l'ultraviolet, qui, cependant, n'est toutefois pas spécifique.

2. Par la détermination de l'effet Tyndall et de la biréfringence, l'on peut apprécier la grandeur des particules, le rapport de leurs axes et leurs formes.

3. Les protéines en solution se caractérisent, ensuite, par le diagramme de leur dispersion rotative et la valeur pH de leur point isoélectrique.

4. A l'aide de l'électrophorèse, les protéines en solution peuvent être caractérisées par leur mobilité anodique (u) ou cathodique (v); en même temps, leurs quantités peuvent être déterminées en valeurs relatives ou absolues.

5. Finalement, des expériences de diffusion et de sédimentation mènent à la détermination des valeurs D et s, les constantes de diffusion et sédimentation, qui permettent le calcul le plus exact des poids moléculaires M.

Riassunto

Riassumendo, le proteine in soluzione possono esser caratterizzate, dal punto di vista chimico-fisico, nel seguente modo:

1. Esse presentano spettri nell'infrarosso, talvolta anche spettri d'assorbimento nella parte visibile (cromoproteidi) come pure un forte ma non specifico assorbimento nell'ultravioletto.

2. Permettono di trarre dalla misura del loro effetto Tyndall e del loro potere birifrangente della corrente deduzioni circa la grandezza delle loro particelle e circa la situazione del loro asse e di conseguenza circa la loro forma.

3. Esse si possono inoltre caratterizzare sulla base del diagramma della loro dispersione rotatoria ed in base alla posizione del loro punto isoelettrico.

4. Mediante elettroforesi esse possono essere caratterizzate sulla base dei loro valori u oppure v di migrazione ed anche determinate quantitativamente.

5. Esse forniscono infine nella prova di diffusione ed in quella di sedimentazione le importanti constanti D e s in base alle quali si può calcolare con buona esattezza il peso moleculare M.

Summary

Proteins in solution may be characterised, by the methods of physical chemistry, in the following way:

1. They show absorption bands in the infra-red region, sometimes also within the visible region (e.g. the chromoproteids), and always a strong but not specific absorption within the region of the near ultraviolet.

2. Measurements of the Tyndall effect and the birefringence of flow provide information about the size of the particles and the rate of their axes and, hence, of their shape.

3. Proteins in solution can be characterised further by their diagrams of rotation dispersion and by the pH values of their isoelectric points.

4. By electrophoresis experiments, dissolved proteins may be characterised by their anodic or cathodic mobilities (u or v) respectively; at the same time, their relative and absolute quantities can be determined.

5. From diffusion and sedimentation experiments, the important constants D and s (diffusion and sedimentation constants) can be calculated from which the most precise determinations of the molecular weight M may be obtained.

1. *Freudenberg E.:* Suppl. Ann. paediat. **54,** 1 (1953). – 2. *Wallenfels K., Zarnitz, M. L., Laule G., Bender H.* und *Keser M.:* Biochem. Z. **331,** 459 (1959). – 3. *Cohn E. J.:* Chem. Rev. **28,** 359 (1941). – 4. *Michaelis L.:* Biochem. Z. **234,** 139 (1931). – 5. *Svedberg Th.* and *Nichols B.:* J. Amer. chem. Soc. **48,** 3081 (1926). – 6. *Archibald W. J.:* J. phys. Coll. Chem. **51,** 1204 (1947). – 7. *Beer M., Sutherland G. B. B. M., Tanner K. N.* and *Wood D. L.:* Proc. roy. Soc. (Lond.) A **249,** 147 (1959). – 8. *Elliott A., Hanby W. E.* and *Malcolm B. R.:* Disc. Faraday Soc. **25,** 167 (1958). – 9. *Brice B. A., Halwer M.* and *Speiser R.:* J. opt. Soc. Amer. **40,** 768 (1950). – 10. *Mohring D.:* Ärztl. Wschr. **13,** 366 (1958). – 11. *von Muralt A. L.* and *Edsall J. T.:* J. biol. Chem. **89,** 315 (1930). – 12. *Signer R.* und *Meyer W.:* Helv. chim. Acta **28,** 325 (1945). – 13. *Jirginsons B.:* Arch. Biochem. Biophys. **74,** 57 (1958). – 14. *Tiselius A.:* Kolloid-Z. **85,** 129 (1938). – 15. *Tiselius A.* and *Kabat E. A.:* Science **87,** 416 (1938). – 16. *Svensson H.:* Kolloid-Z. **87,** 181 (1939); **90,** 141 (1940). – 17. *Wiedemann E.:* Helv. chim. Acta **31,** 40 (1947). – 18. *Wiedemann E.:* Elektrophorese, in: Hoppe-Seyler/Thierfelder Bd. I (1953), S. 54. – 19. *Wiedemann E.:* Helv. chim. Acta **40,** 2074 (1957). – 20. *Wiedemann E.:* Helv. chim. Acta **35,** 82, 1895; 2341 (1952). – 21. *Svedberg Th.:* Z. physiol. Chem. **127,** 51 (1927). – 22. *Philpot J. St. L.:* Nature (Lond.) **141,** 238 (1938). – 23. *Wiedemann E.:* Helv. chim. Acta **40,** 1834 (1957). – 24. *Wiedemann E.:* Clin. chim. Acta **4,** 6 (1959). – 25. *Wiedemann E.:* Dechema-Monographien **26,** 333 (1956). – 26. *Kuhn W.:* Z. physiol. Chem. A **161,** 427 (1932); Kolloid-Z. **62,** 269 (1933). *Polson A.:* Nature (Lond.) **137,** 740 (1936). – 27. *Svedberg Th.* und *Pedersen K. O.:* Die Ultrazentrifuge. Hdb. der Kolloidwissenschaft VII (1940). *Fox S. W.:* Introduction to Protein Chemistry (1957). *Bier M.:* Electrophoresis (1959). *Schachman H. K.:* Ultracentrifugation in Biochemistry (1959). – 28. *Deutsch H. F.:* Arch. Biochem. Biophys. **89,** 225 (1960). – 29. *Wallenius G., Trautman R., Kunkel H. G.* and *Franklin E. C.:* J. biol. Chem. **225,** 264 (1957).

Formeln

1. Lichtstreuung

$$HC/\tau = 1/M$$

H = wellenlängenabhängige Konstante
C = Proteinkonzentration
τ = Trübungsgrad
M = Molekulargewicht

Die zu untersuchenden Teilchen sollen keinen größeren Durchmesser als $^1/_{20}\ \lambda$ haben, welcher Wert bei sichtbarem Licht ungefähr einer größten Achse von 200 Å entspricht. Können sie nicht mehr als Punkte betrachtet werden, so machen sich störende Effekte bemerkbar (z. B. Vorwärtsstreuung ≠ Rückwärtsstreuung usw.).

2. Osmotischer Druck

*Raoult*sches Gesetz: $\pi = p_{\text{Lösung}}/p_{\text{Protein}}$

van't Hoff-Gleichung: $\pi = (g/M)\ RT/V;\ \pi = \dfrac{(g/V)\,RT}{M};\ M = \dfrac{(g/V)\,RT}{\pi}$

R = Gaskonstante ($8{,}313 \cdot 10^7$ erg Grad^{-1} Mol^{-1})
T = absolute Temperatur
g = g Protein
V = Vol. Lösungsmittel
π = osmotischer Druck

3. Elektrophorese

Elektrophoretische Beweglichkeit: $\dfrac{q\,s\,\varkappa}{I\,t} = u\ (v)$

q = Lösungsquerschnitt in cm²
s = Weg in cm
$\varkappa$ = Leitfähigkeit in Ohm¹–cm^{-1}
I = Stromstärke in A
t = Zeit in Sekunden

Relative Menge: $\int y\,dx$

Der Ausdruck entspricht der Gradientenfläche

Absolute Menge: $\int y\,dx\ \dfrac{1}{FGK\,\text{ab}\ tg\ \Theta}$

F = Horizontalvergrößerung
G = Vertikalvergrößerung
Θ = Schrägspalt-, Phasenkanten- usw. -winkel gegen die Vertikale

4. *Diffusionsmessung*

Ficks erstes Gesetz: $$\frac{ds}{dt} = -DA\,\frac{\partial C}{\partial X}$$

Ficks zweites Gesetz: $$\frac{C}{t} = D\,\frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

$\frac{ds}{dt} = \frac{\text{Weg}}{\text{Zeit}}$ in cm pro Sekunde

D = Diffusionskonstante ($\frac{\text{cm}^2}{\text{sec}}$)

A = Gradientenfläche im Querschnitt

$\frac{\partial C}{\partial X}$ = Konzentrationsgradient

Praktische Berechnung von D: $$D_{t^\circ} = \frac{x_2^2 - x_1^2}{2\,(t_2 - t_1)}$$

$$D_{20^\circ} = D_{t^\circ}\,\frac{\eta t^\circ}{\eta_{20}{}^\circ}$$

$$D_{H_2O/20^\circ} = D_{t^\circ}\,\frac{\eta}{\eta_\circ}$$

t = Zeit in Sekunden
x = Gradientenhalbwertsbreite
(Breite in 0,606 Gradientenhöhe)
η = Viskositätswert

5. *Ultrazentrifugierung*

Svedbergs Fundamentalformel: $$M = \frac{R\,T\,s}{D(1 - V\varrho)}$$

R = Gaskonstante
T = absolute Temperatur
s = Sedimentationskonstante
D = Diffusionskonstante
$V\varrho$ = partielles spezifisches Volumen

Sedimentations*geschwindigkeits*gleichung:

$$M = \frac{R\,T}{D(1 - V\varrho)}\;\frac{dx/dt}{\omega^2 x}$$

Sedimentations*gleichgewichts*gleichung:

$$M = \frac{R\,T}{D(1 - V\varrho)}\;\frac{ln\; c_2/c_1}{\omega^2\,(x_2^2 - x_1^2)}$$

Bestimmung von s: $$s_{t^\circ} = \frac{x_2 - x_1}{(t_2 - t_1)\,r_m \omega^2}$$

$$s_{20^\circ} = s_{t^\circ}\;\frac{\eta_{t^\circ}}{\eta_{20^\circ}}\;\frac{\eta}{\eta_\circ}\;\frac{0{,}2523}{1 - (V_{t^\circ}\,\varrho_{t^\circ})}$$

x = Weg in cm
t = Zeit in Sekunden
r = Radius
ω = Winkelgeschwindigkeit
η = Viskosität

Dr. ing. E. Wiedemann, Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Sandoz AG, Basel 13.