

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. E. LETTERER).

Vergleichende Untersuchungen über den Aminosäurenbestand von Serum-Eiweiß, Lebereiweiß, Amyloid, Hyalin und Kollagen.

Von

ERICH LETTERER, WOLFGANG GEROK* und GERHARD SCHNEIDER.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. März 1955.)

Um die Eigenschaften und die Abstammung pathologischer Eiweißablagerungen in Form von Amyloid und Hyalin weiter aufzuklären, wurde versucht, diese Proteine chemisch-analytisch näher zu charakterisieren. Da der Aminosäurenbestand ein wesentliches Charakteristicum jedes Proteins ist, lag es nahe, die Kenntnisse über die Aminosäurensammensetzung des Amyloideiweißkörpers zu erweitern und den Aminosäurenbestand des Bindegewebshyalins der Milzkapsel (Oberflächenhyalin nach MÜLLER) und des wasserlöslichen Lebereiweißes zu ermitteln. Es wurde damit Material zum Vergleich mit bekannten Analysen weiterer Gewebs- und Plasmaproteine gewonnen und versucht, in einer Gegenüberstellung von löslichen und unlöslichen Eiweißkörpern gemeinschaftliche Merkmale bzw. typische Unterschiede herauszuarbeiten.

Eine Ordnung der wasserlöslichen Eiweißkörper in der Reihenfolge ihrer Löslichkeit und der unlöslichen Proteine nach ihrer Fähigkeit, gewebliche Strukturen einzugehen, konnte vielleicht die Möglichkeit schaffen, nähere oder weitere Verwandtschaften des Amyloideiweißes zu diesen Gruppen zu erkennen. Es interessierte hierbei vor allem die Stellung des Amyloids zum Bluteiweiß, Hyalin und Kollagen und die des wasserlöslichen Lebereiweißes zu den Bluteiweißkörpern. Die Aminosäurenanalysen sollten gleichzeitig die histologische Charakterisierung der Gewebsproteine ergänzen und zur Klärung verschiedener physikalisch-chemischer Eigenschaften dieser Makromoleküle beitragen. Zu diesem Zweck mußte in kurzen Zügen auf die makromolekularen Eigenschaften und den Aufbau der globulären Proteine (Beispiel Bluteiweißkörper) und

* Herr Dr. med. GEROK konnte als Stipendiat der Sandoz-Stiftung die chemisch-analytische Arbeit im Laboratorium für Eiweißchemie der Medizinischen Universitätsklinik Zürich durchführen. Wir danken dem Direktor der Medizinischen Universitätsklinik Zürich, Herrn Prof. Dr. W. LÖFFLER sowie Herrn Direktor Prof. Dr. ROTHLIN von der Sandoz AG. und Herrn Dr. CH. WUNDERLY für großzügige Unterstützungen und wertvolle Anregungen.

eines Skleroproteins (Kollagen der Bindegewebsfaser und der leimgebenden Substanz des Knochens und Knorpels) eingegangen werden.

Wie durch jede andere Methode der Eiweißchemie wird durch die Aminosäuren-Bausteinanalyse das untersuchte Protein nur nach *einem*

Gesichtspunkt definiert. Die Analyse gibt Auskunft über die Art und das Mengenverhältnis der in das Makromolekül eingebauten Aminosäuren, aber nicht über Einzelheiten seines Aufbaus. Hierzu müßte die Reihenfolge der einzelnen Aminosäuren in der Polypeptidkette, deren Faltung, die Größe und Art von Unteraggregaten und die Verknüpfung der einzelnen Polypeptidketten bekannt sein. Damit ist die Feststellung der Aminosäuren-Bausteine nur ein erster Schritt zur chemischen Eiweißcharakterisierung. Dieser erscheint bedeutungsvoll, da aus der Art und Menge der Einzelbausteine gewisse Schlüsse auf die physikalisch-chemische Eigenschaft des gesamten Moleküls gezogen werden können.

Betrachten wir das Grundgerüst jedes Eiweißkörpers, die Polypeptidkette, so zeigt es sich, daß die den Aminosäuren obligaten Amino- und

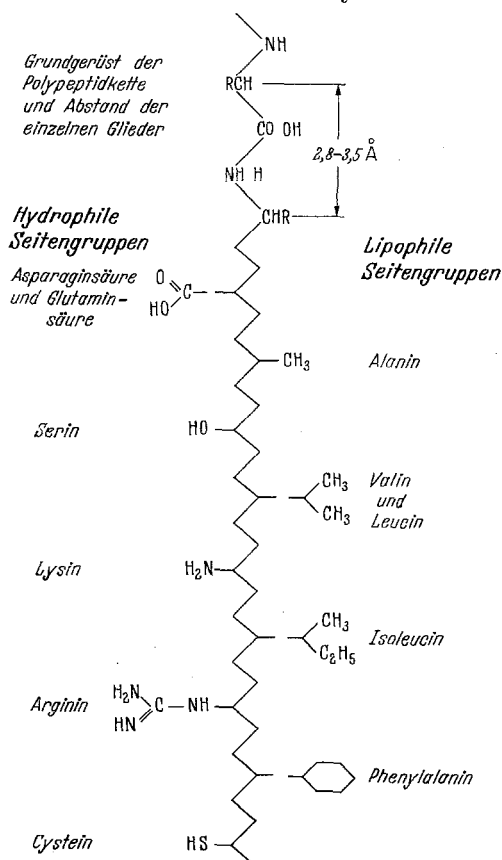


Abb. 1. Struktur einer Polypeptidkette mit Darstellung der wichtigsten funktionellen Gruppen der einzelnen Aminosäuren. (Links Gruppen mit hydrophilem, rechts solche mit lipophilem Charakter.)

Carboxylgruppen in der Biuretbindung aufgehen (Abb. 1). Darüber hinaus besitzen aber die meisten natürlich vorkommenden Aminosäuren noch weitere funktionell wichtige Gruppen, die je nach Streckung der Peptidkette in einem Abstand von 2,8 — 3,5 Å an dieser Kette aufgereiht sind. In der unteren Hälfte des Schemas sind einige dieser Seitengruppen aufgeführt. Durch den Einbau verschiedenster Aminosäuren in unterschiedlicher Reihenfolge ergibt sich eine Vielfalt der Art und räumlichen Anordnung. Ein Teil der funktionell wichtigen Gruppen

geht Adhäsions- bzw. echte chemische Valenzbindungen ein und ist auf diese Weise an der Bildung von Querverbindungen zwischen benachbarten Polypeptidketten beteiligt. Ein anderer Teil bleibt indessen frei und bestimmt im wesentlichen die Eigenschaften des Proteinmoleküls (Oberflächenladungsmuster, Löslichkeit).

Wie FREY-WYSSLING gezeigt hat, vermindern Bausteine mit reinen Kohlenwasserstoffresten (apolaren Gruppen) die Wasserlöslichkeit und steigern die Lipophilie, während solche mit polaren Gruppen ($-\text{OH}$, NH_3^+ , COO^-) den hydrophilen Charakter eines Körpers fördern. In Abb. 1 sind auf der linken Seite die funktionellen Gruppen mit hydrophilem und auf der rechten Seite solche mit lipophilem Charakter dargestellt. Das Verhältnis von Aminosäuren mit einer freien Carboxyl- zu Aminosäuren mit einer freien Amino- oder Iminogruppe ist wesentlich für die Lage des isoelektrischen Punktes des Moleküls. Durch Säure-Basen-Titration eines Eiweißkörpers kann die direkte Abhängigkeit der Lage des isoelektrischen Punktes vom Gehalt an Monoamino-dicarbonsäuren und Diamino-monocarbonsäuren demonstriert werden (WEBER). Für intramolekulare Bindungen scheinen die schwefelhaltigen Aminosäuren von Bedeutung zu sein (ASTBURY, MARK und PHILIPP).

Es ergibt sich damit die Möglichkeit, die Löslichkeit, die elektrische Ladung, die Reaktionsfähigkeit eines Proteins mit bestimmten Farbstoffen und die Fähigkeit zur Faserbildung teilweise als eine Resultante der Aminosäurenzusammensetzung aufzufassen. Umgekehrt können aus den Aminosäureanalysen in gewissem Umfang Rückschlüsse auf die physikalisch-chemischen Unterschiede bzw. Ähnlichkeit der untersuchten Proteine gezogen werden.

Material und Methode.

A. Für die Darstellung des amyloiden Eiweißkörpers wurden verschiedene bei der Obduktion gewonnene, amyloidbefallene Organe verwendet.

Präparat 1: Milz eines 44jährigen Mannes mit Follikelamyloid und geringer Nierenamyloidose bei chronischer abscedierender Pneumonie der rechten Lunge, alter verschielender Pleuritis und fortgeleiteter eitrig-fibrinöser Perikarditis. (Tübingen 4/53.)

Präparat 2: Milz eines 35jährigen Mannes mit starker Amyloidose von Milz und Nieren bei Lymphogranulomatose. (Tübingen 388/53.)

Präparat 3: Nieren einer 71jährigen Frau mit starker Nieren- und geringerer Leber- und Milzamyloidose bei jahrelang bestehenden Bronchiektasen und hochgradiger Kachexie. (Zürich 1622/52¹.)

¹ Wir sind dem Direktor des Pathologischen Institutes der Universität Zürich, Herrn Prof. Dr. von MEYENBURG, für die Überlassung des Materials und Befundes dankbar.

Präparat 4: Leber eines 24jährigen Mannes mit starker Amyloidose der Leber, geringerer in Milz und Nieren bei chronischer kaverneröser Lungentuberkulose und Nierentuberkulose. (Tübingen 36/54.)

Das Organgewebe wurde auf dem Gefriermikrotom und im Falle der Leberamyloidose im Fleischwolf nach Auswahl bindegewebsarmer Partien zerkleinert und einer mehrere Wochen dauernden peptischen Verdauung mit 0,5%iger Pepsinlösung in n/100 HCl bei 37° C ausgesetzt. Nach mehrmaligem Wechsel der Pepsinlösung blieb nur noch ein graubraunes amorphes Material übrig, das mehrmals mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen wurde. Die Substanz enthielt im Ausstrichpräparat keine basophilen Zellkernreste und keine Faserbestandteile mehr.

Metachromasie mit Methylviolett schwach positiv; mit der Jodreaktion konnte an dem graubräunlichen Material die typische Mahagonifarbe nicht erzielt werden, Affinität zu Kongorot deutlich vorhanden. Offenbar hatte die amyloide Substanz, wie das bereits früher MISSMAHL beobachten konnte, bei der Verdauung die Fähigkeit zur Metachromasie und positiven Jodprobe weitgehend verloren. Da die Präparate bei der mikroskopischen Kontrolle frei von übrigen Gewebsbestandteilen erschienen und das Amyloid pepsinresistent ist (KÜHNE und RUDNEFF, MISSMAHL), schien das Material für die chromatographische Analyse geeignet.

B. Das Hyalin wurde ebenfalls dem Sektionsmaterial entnommen. Hyaline Auflagerungen der Milzkapsel (Zuckergußmilz) wurden abgetragen und kleine Stücke aus dem Innern der Schwarten der chemischen und histologischen Analyse zugeführt.

Präparat 1: Zuckergußmilz einer 68jährigen Frau mit chronischer lymphatischer Leukämie und posthepatotischer Lebereirrhose. (Tübingen 1/54.)

Präparat 2: Zuckergußmilz eines 55jährigen Mannes mit Emphysem, starker Hypertrophie und Dilatation des rechten Ventrikels. (Tübingen 33/54.)

Präparat 3: Zuckergußmilz eines 82jährigen Mannes mit Myokardinfarkt. (Tübingen A 124/53.)

Präparat 4: Hyaliner Knoten von der Oberfläche einer Zuckergußmilz. 80jähriger Mann mit Fettembolie der Lungen und abscedierenden Bronchopneumonien nach rechtsseitiger Schenkelhalsfraktur. (Zürich 979/53¹.)

Bei der histologischen Kontrolle erwiesen sich die Hyalinproben als völlig homogen, Farbreaktionen auf Fibrin, Fett und Eisen waren negativ.

C. Zur Gewinnung von wasserlöslichem Lebereiweiß mußte Lebergewebe von frisch getöteten Mäusen verwendet werden, da die menschliche Leber bei der Obduktion meist fortgeschritten und unkontrollierbar autolytisch verändert ist und außerdem zu viel nicht entfernbares Blut enthält.

Am getöteten Tier wurde das Organ zunächst mit Warmblüter-Ringerlösung blutfrei gespült und nach Zerkleinerung auf dem Gefriermikrotom in 0,9%iger Kochsalzlösung (pH 7,0) aufgeschwemmt. Nach Abzentrifugieren der korpuskulären Elemente in einem Schwerfeld von 25000 g für 15 min ergab sich ein serumklarer Extrakt, der bei der gesunden Maus etwa 50—60% des Lebergesamteiweißes enthält (SCHNEIDER). Diese Aufschwemmung der löslichen Lebereiweißkörper ist hinsichtlich ihrer Eiweißbestandteile sicher nicht einheitlich. Einzelne Fraktionen konnten jedoch elektrophoretisch präparativ nicht dargestellt werden. Hydrolysate von Fällungsfractionen waren nicht chromatographierbar. Es konnte deshalb nur die Aminosäurenanalyse des hydrolysierten Gesamtextraktes durchgeführt werden.

Im Extrakt enthaltene niedermolekulare, mit Trichloressigsäure nicht fällbare, N-haltige Substanzen (150—180 mg-% Rest-N der Leber), wurden durch 12stündige Dialyse bei 4° gegen Wasser entfernt. Die in der Dialysierhülle verbliebene Eiweißlösung wurde bei 50—60° zur Trockene eingedampft.

Die Proteinproben (5-20 mg) wurden mit 5 n HCl durch Kochen am Rückflußkühler während 24 Stunden hydrolysiert. Die Salzsäure wurde nach der Hydrolyse im Vakuum bei 50-55° abgedampft, der Rückstand mehrmals in

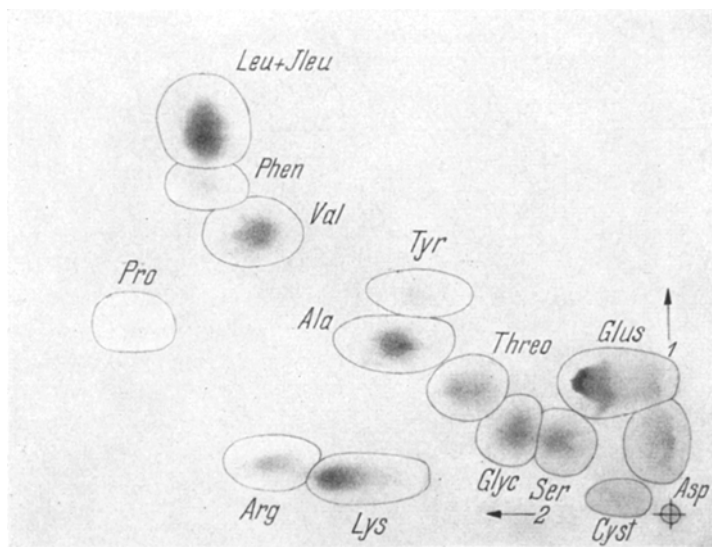


Abb. 2. Aminosäuren-Chromatogramm eines Lebereiweiß-Hydrolysates. Das Aminosäurengemisch wurde am Startpunkt \otimes aufgetragen. Nach Wanderung der beiden Lösungsmittelfronten in den mit Pfeil gekennzeichneten Richtungen wurden die einzelnen Aminosäurenflecke durch Anfärbung mit Ninhydrin sichtbar gemacht. Zur quantitativen Bestimmung werden die Flecke ausgeschnitten, ihr Farbstoff eluiert und das Eluat colorimetriert.

Wasser gelöst und erneut eingedampft. Durch 2-dimensionale Papierchromatographie konnten die AS ausreichend getrennt (Abb. 2) und in den Eluaten der ausgeschnittenen Flecke quantitativ bestimmt werden (Einzelheiten des Verfahrens s. GEROK). Von jedem Proteinhydrolysat wurden mindestens zwei Doppelchromatogramme hergestellt und ausgewertet.

Für die Deutung der Ergebnisse erschienen uns die molaren Verhältnisse der einzelnen Aminosäuren im Gesamthydrolysat wichtiger als die auf 100 g Protein berechneten Aminosäurenmengen. Deshalb wurde das Analysenergebnis in Mol-% angegeben, wobei dieser Wert besagt, welcher Anteil von 100 Mol Aminosäuren im Gesamthydrolysat auf die einzelnen Aminosäuren entfällt. Die aus der Literatur entnommenen, meist in Grammprozent Aminosäuren angegebenen Bausteinanalysen mußten in entsprechender Weise umgerechnet werden.

Ergebnisse und Diskussion.

Zunächst wird in Tabelle 1—3 die relative molare Konzentration der einzelnen Aminosäuren für die Amyloid- und Hyalinpräparate sowie für das wasserlösliche Lebereiweiß angegeben. Tryptophan und Histidin werden bei der Hydrolyse zerstört und kamen deshalb auf den Chromato-

Tabelle 1. Bausteinanalyse von Amyloidsubstanz. Relative Konzentration der Aminosäuren in Mol.-%.

	Milz-amyloid 1	Milz-amyloid 2	Nieren-amyloid 3	Leber-amyloid 4
Glycin	17,3	10,0	11,9	11,1
Alanin	14,4	9,7	10,7	10,5
Valin	4,1	7,1	6,2	7,1
Leucin, Isoleucin .	7,7	13,7	12,6	11,3
Gruppe I	43,5	40,5	41,4	40,0
Serin	6,3	5,1	4,7	6,5
Threonin	2,2	5,3	4,5	4,4
Gruppe II	8,5	10,4	9,2	10,9
Cystein	1,5	2,8	—	2,9
Methionin	1,1	—	2,0	—
Gruppe III	2,6	2,8	2,0	2,9
Asparaginsäure . .	10,0	8,1	7,4	11,3
Glutaminsäure . .	8,9	12,5	17,6	10,6
Gruppe IV	18,9	20,6	25,0	21,9
Lysin	3,8	5,5	4,6	2,9
Arginin	7,1	5,9	5,2	4,1
Histidin		nicht meßbar		
Gruppe V	10,9	11,4	9,8	7,0
Phenylalanin . . .	5,2	3,7	4,6	4,2
Tyrosin	3,7	3,6	2,7	3,1
Gruppe VI	8,9	7,3	7,3	7,3
Prolin	5,0	3,8	2,7	2,9
Oxyprolin	—	—	—	—
Total-%	98,3	96,8	97,4	92,9

grammen nicht zur Darstellung. Methionin, Cystein und Oxyprolin waren häufig nur in sehr geringer Menge vorhanden und konnten quantitativ nicht mit ausreichender Sicherheit bestimmt werden. Die übrigen 13 auf dem Chromatogramm lokalisierbaren Aminosäuren waren in allen untersuchten Proteinhydrolysaten in quantitativ faßbarer Menge enthalten.

Die in Tabelle 1 bis 3 gewählte, allgemein übliche Reihenfolge der Aminosäuren umfaßt vom Glycin bis Arginin die aliphatischen Aminosäuren, wobei die erste Gruppe mit Glycin, Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin aliphatische Kohlenwasserstoffreste trägt und neutralen Cha-

rakter besitzt, während die übrigen sehr unterschiedliche Seitengruppen haben. Es finden sich darunter Serin und Threonin mit einer Oxygruppe (Gruppe II), die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin (Gruppe III), eine IV. Gruppe mit Überwiegen der sauren (Monoamino-Dicarbonsäuren: Asparaginsäure und Glutaminsäure) und eine V. Gruppe mit Überwiegen der basischen Gruppen (Diamino-Monocarbonsäuren: Lysin und Arginin, ferner das heterocyclische Histidin). Zu den Aminosäuren mit aromatischem Rest zählen das Phenylalanin und Tyrosin (Gruppe VI). Als letzte Gruppe wurde die Sondergruppe der Iminosäuren

(Prolin und Oxyprolin) aufgeführt. Wir haben in Tabelle 1 bis 3 entsprechende Gruppen gebildet und ihren molaren Anteil jeweils unter die Einzeldaten gesetzt. Dabei zeigt es sich, daß in keiner der drei Eiweißarten eine der erwähnten Aminosäurengruppen oder eine einzelne Aminosäure bestimmter Art fehlt.

Hyalin und *wasserlösliches Lebereiweiß* sind beim Vergleich der einzelnen Präparate sehr einheitlich, die verschiedenen Amyloidpräparate wechseln jedoch in ihrer Zusammensetzung. Bei der Analyse von Lebereiweiß ist auffallend, daß sich die Gesamtextrakte verschiedener Lebern nur sehr wenig voneinander unterscheiden, obwohl im Extrakt sicherlich mehrere, differente Eiweißfraktionen enthalten sind. Man kann aus der Einheitlichkeit des Aminosäurenbestandes schließen, daß entweder das Mengenverhältnis der einzelnen Fraktionen im Extrakt weitgehend gewahrt bleibt oder daß der Extrakt aus einer chemisch einheitlichen und mengenmäßig sehr

Tabelle 2. Bausteinanalyse von *Hyalin*. Relative Konzentration der Aminosäuren in Mol.-%.

	Präparat Nr.				Mittelwert
	1	2	3	4	
Glycin	25,4	27,6	28,3	28,3	27,4
Alanin	9,3	9,7	10,6	11,1	10,2
Valin	3,6	3,6	3,5	3,5	3,6
Leucin, Isoleucin .	5,3	4,4	4,6	4,4	4,7
Gruppe I	43,6	45,3	47,0	47,3	45,8
Serin	4,5	3,9	4,1	4,1	4,2
Threonin	2,8	2,3	2,5	2,6	2,6
Gruppe II	7,3	6,2	6,6	6,7	6,7
Cystein	2,1	2,5	2,2	1,6	2,1
Methionin	nur in Spuren nachweisbar				
Gruppe III	2,1	2,5	2,2	1,6	2,1
Asparaginsäure . .	6,5	5,8	5,5	6,3	6,0
Glutaminsäure . .	12,1	9,8	10,4	10,5	10,7
Gruppe IV	18,6	15,6	15,9	16,8	16,7
Lysin	2,9	2,4	2,6	2,4	2,6
Arginin	4,7	4,4	4,4	4,3	4,5
Histidin	nicht meßbar				
Gruppe V	7,6	6,8	7,0	6,7	7,1
Phenylalanin . . .	2,1	2,2	2,1	2,4	2,2
Tyrosin	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Gruppe VI	2,9	2,2	2,1	2,4	3,0
Prolin	8,9	9,9	8,9	8,9	9,2
Oxyprolin	5,4	6,2	5,9	5,0	5,6
Gruppe VII	14,3	16,1	14,8	13,9	14,7
Total- %	96,4	94,7	95,6	95,4	95,3

stark überwiegenden Hauptfraktion besteht, so daß qualitative und quantitative Veränderungen der übrigen Bestandteile nicht ins Gewicht fallen. Zur Klärung dieser biologisch wichtigen Frage einer Einheitlichkeit bzw. strengen Wahrung der Proportionen der einzelnen wasserlöslichen Eiweißkörper in der Leber wurden die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Gesamtextraktes und die Veränderungen des Lebereiweißes unter experimentell erzeugten dysproteinämischen Zuständen geprüft. Darüber soll demnächst ausführlich berichtet werden (SCHNEIDER).

Tabelle 3. Bausteinanalyse der wasserlöslichen Leberproteine. Relative Konzentration der Aminosäuren in Mol.-%.

	Präparat Nr.							Mittelwert
	1	2	3	4	5	6	7	
Glycin	7,7	7,4	7,8	7,4	7,4	7,3	6,8	7,4
Alanin	8,6	7,9	8,5	7,9	8,0	8,9	8,1	8,3
Valin	6,8	6,9	6,4	7,0	7,6	8,1	7,9	7,2
Leucin, Isoleucin .	11,2	12,5	11,1	11,3	12,0	14,0	13,6	12,2
Gruppe I	34,3	34,7	33,8	33,6	35,0	38,3	36,4	35,1
Serin	6,1	7,2	6,1	6,3	5,8	6,3	5,0	6,1
Threonin	5,4	5,3	5,2	5,0	5,3	5,4	4,6	5,2
Gruppe II	11,5	12,5	11,3	11,3	11,1	11,7	9,6	11,3
Cystein	2,1	2,0	2,2	1,0	1,2	1,3	1,8	1,7
Methionin	—	1,8	—	1,5	—	—	—	1,6
Gruppe III	2,1	3,8	2,2	2,5	1,2	1,3	1,8	3,3
Asparaginsäure . .	11,6	12,6	11,3	11,6	10,2	10,3	9,7	11,0
Glutaminsäure . .	16,5	15,9	15,1	15,9	15,5	16,8	14,9	15,8
Gruppe IV	28,1	28,5	26,4	27,5	25,7	27,1	24,6	26,8
Lysin	6,4	6,6	6,7	6,6	6,6	6,4	5,8	6,4
Arginin	4,6	5,1	4,5	4,9	4,9	4,8	4,4	4,7
Histidin				nicht meßbar				
Gruppe V	11,0	11,7	11,2	11,5	11,5	11,2	10,2	11,1
Phenylalanin . . .	2,9	2,9	2,7	2,6	3,0	3,1	3,2	2,9
Tyrosin	3,5	2,9	3,3	2,7	3,1	3,2	3,4	3,2
Gruppe VI	6,4	5,9	6,0	5,3	6,1	6,3	6,6	6,1
Prolin	3,8	4,5	3,9	4,1	3,6	4,7	4,0	4,1
Oxyprolin				nur in Spuren vorhanden				
Total. %	97,2	101,5	94,8	95,8	94,2	100,6	93,2	97,8

Die Analysen von *Amyloid* ergaben, daß dieser Eiweißkörper nicht einheitlich zusammengesetzt ist. In gleichem Sinne spricht der bereits früher festgestellte wechselnde Ausfall der Farbreaktionen und ihre Beeinflußbarkeit (LETTERER, MISSMAHL). Wenn die bisher bekannten Aminosäurenanalysen ziemlich unterschiedliche Werte aufweisen (EPPINGER, v. BONSDORFF, NEUBERG), so ist dies nicht nur methodisch bedingt. Wir sehen vielmehr darin einen weiteren Beweis für die Uneinheitlichkeit des Amyloideiweißes. Im Falle einer Amyloidaufarbeitung durch peptische Abdaunung des Organgewebes wäre noch zu bedenken, daß dadurch einzelne für die spezifischen Farbreaktionen unerläßliche Gruppen verloren gehen (MISSMAHL) und eventuell die Präparate durch Organgewebsreste verunreinigt bleiben. Letzteres ist indessen recht unwahrscheinlich, weil die aus verschiedenen Organen gewonnenen Präparate sowohl gleicher wie verschiedener Herkunft in gleicher Weise variieren. So ist der Unterschied zwischen dem Amyloidpräparat aus der

Leber und dem der Nieren und Milz nicht größer als die Differenz der beiden Milzpräparate. Die Varietät des Aminosäurenbestandes von Amyloideiweiß läßt sich am ehesten damit erklären, daß sich mindestens 2 Proteine bei der Amyloidbildung in wechselndem Mengenverhältnis vereinigen und das Amyloid ein Mischkörper ist. Wir werden auf diese These noch bei der Besprechung der von uns aufgestellten Vergleichsreihe zurückkommen.

In Abb. 3 wurden die eigenen Analysenresultate den bekannten Bausteinanalysen weiterer *einheitlich* beschaffener Eiweißkörper zur Seite gestellt. Die in Gruppen zusammengefaßten Analysenwerte jedes Proteins sind aus den jeweils senkrecht untereinander stehenden Säulen zu ersehen. In waagerechter Richtung steht am weitesten links das am besten, d. h. in destilliertem Wasser lösliche Albumin. Es folgen die Serumglobuline in der Reihenfolge des Anstiegs ihres isoelektrischen Punktes. Diesem Anstieg geht eine Abnahme ihrer Löslichkeit weitgehend parallel (GRABAR). Mit dem Lebereiweiß ist die Gruppe der löslichen Proteine abgeschlossen. Bei der folgenden Gruppe der unlöslichen Eiweißkörper ist am weitesten links das Amyloid, dann das Hyalin und das Kollagen der Bindegewebsfaser eingetragen. Histologisch erscheinen dabei das Amyloid und Oberflächenhyalin als amorphes Gel. Das Kollagen wurde als Prototyp eines faserbildenden Eiweißkörpers in den Vergleich einbezogen. Schließlich sind noch gesondert die Daten des Fibrinogen und Myosin aufgeführt.

Das für die *Löslichkeit* der Proteine wesentliche Verhältnis der polaren Gruppen (Summe der Monoaminodicarbonsäuren und Diaminomonocarbonsäuren) zu den apolaren Gruppen (Summe der aliphatischen und cyclischen Aminosäuren mit Kohlenwasserstoffresten) ändert sich bei dieser Anordnung von 1:0,81 für das Albumin bis zum Kollagen mit 1:2,52 zugunsten der apolaren Gruppen ständig (vgl. oberste Reihe der Abb. 3). Wenn also bei dem leicht löslichen Albumin und α -Globulin des Serums die Zahl der polaren (hydrophilen) Gruppen dem Bestand an apolaren (lipophilen) Gruppen annähernd gleichkommt, so zeigt schon das Amyloideiweiß mit einem Verhältnis von 1:1,40 bis 1:1,76 ein Überwiegen der die Löslichkeit beeinträchtigenden Gruppen. Es steht damit zwischen dem leicht fällbaren β - und γ -Globulin des Serums und dem Hyalin. Das unlösliche, faserbildende Kollagen hat das stärkste Überwiegen apolarer Gruppen.

Das Verhältnis der freien Carboxyl- zu den freien Amino- bzw. Iminogruppen fällt bei sämtlichen dargestellten Proteinen zugunsten der sauren Gruppen aus. Es überwiegen beim Lebereiweiß und Hyalin die Monoamino-dicarbonsäuren über die Hexonbasen im Verhältnis 2,42:1 bzw. 2,37:1. Bei den verschiedenen Amyloidpräparaten variiert die Relation zwischen 1,73:1 und 3,13:1. Damit hat auch das Amyloid-

eiweiß und Oberflächenhyalin einen überwiegend sauren Charakter. Die schon früher mehrfach angezweifelte (MAYEDA, PERNIS, SCHNEIDER und

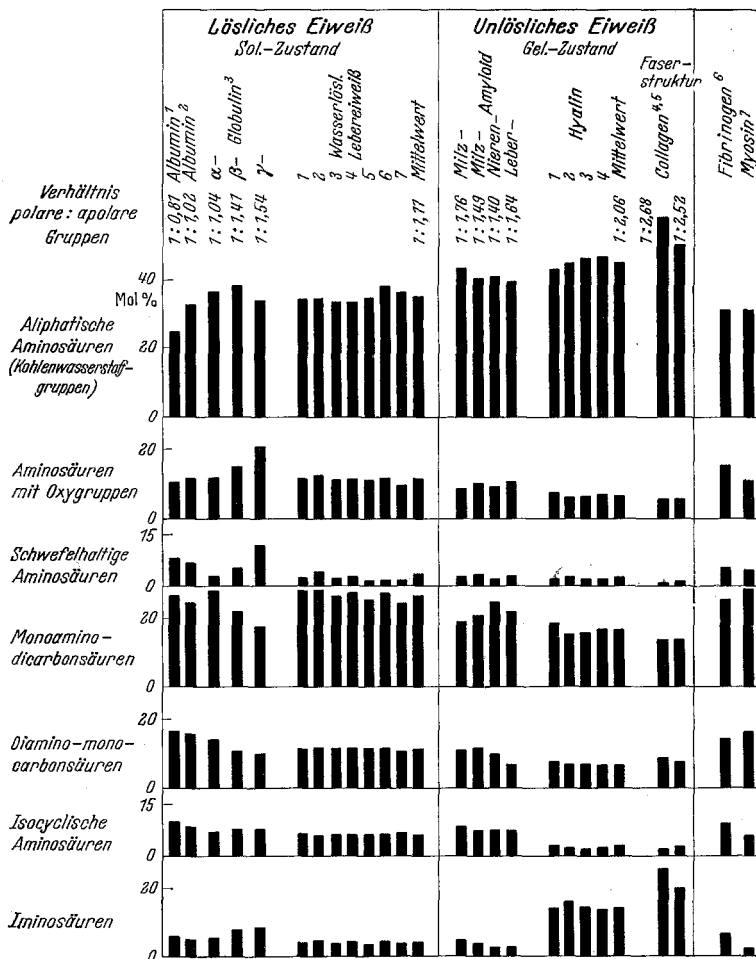


Abb. 3. Aminosäurezusammensetzung verschiedener Plasma- und Gewebsproteine im Vergleich zum Amyloid und Hyalin. Die senkrecht untereinander stehenden Säulen geben in Mol.-% den Anteil der einzelnen Aminosäuregruppen für jedes Protein. Auf der linken Seite finden sich die wasserlöslichen Eiweißkörper, auf der rechten Seite die festen, in Wasser nicht löslichen Eiweißsubstanzen sowie die Daten für Fibrinogen und Myosin. Die Analysenwerte stammen, soweit sie nicht den Tab. 1—3 entnommen wurden, von Brand (1), Pernis (2), Brand, Kassel u. Seidel (3), Bowes u. Kenten (4), Pernis, Schneider u. Wunderly (5), Brand u. Edsall (6) und Bailey (7).

WUNDERLY) Verwandtschaft des Amyloid mit den basischen Protaminen (NEUBERG) erscheint nunmehr an einem größeren Material widerlegt. Diese Feststellung ist für das histologisch-färberische Verhalten

der Amyloidsubstanz, d. h. seine Affinität zu verschiedenen Farbstoffen von Bedeutung. Eine geweblich-färberische Studie von RÖCKER-SCHRÖDER am Tübinger Institut, bei der die Affinität der Amyloidsubstanz zu Methylenblau und Kristallponceau ermittelt wurde, ergab, daß die Aufnahme des basischen Farbstoffes unter p_H 4 sehr gering war und die Adsorption des sauren Farbstoffes über p_H 4,9 ein Ende fand. Somit trägt die Amyloidsubstanz zwischen p_H 4 und 5 die geringste Nettoladung, was gleichermaßen für ein Überwiegen des sauren Charakters spricht.

Betrachten wir das Vorkommen der einzelnen Aminosäuregruppen bei den verschiedenen Proteinen, so stellen die aliphatischen Aminosäuren mit lipophiler Seitengruppe und das Glycin den Hauptanteil. In der Reihe Albumin-Serumglobulin-Lebereiweiß und Amyloid-Hyalin bis zum Kollagen nimmt ihr Anteil stetig zu. Abb. 4 zeigt für die einzelnen Aminosäuren, daß an der starken Zunahme vor allem das Glycin beteiligt ist, welches im Kollagen über die Hälfte des Gesamtanteils dieser Gruppe ausmacht. Nur der Alaninanteil bleibt im wesentlichen unverändert, während Valin, Leucin und Isoleucin abnehmen. Die Aminosäuren mit Oxygruppen sind am stärksten im β - und γ -Globulin und etwas weniger im Albumin, α -Globulin und Lebereiweiß vertreten. Ihr Anteil nimmt über das Amyloid bis zum Kollagen etwa um die Hälfte ab. Amyloid nimmt eine Zwischenstellung zwischen Lebereiweiß und Hyalin ein.

Die beiden für die elektrische Ladung wesentlichen Aminosäuregruppen mit überwiegend saurem bzw. basischem Charakter zeigen in dieser Reihe eine Abnahme, die bei den Monoamino-dicarbonsäuren besonders deutlich ist. Es bleibt aber, wie oben erwähnt, das Überwiegen der Aminosäuren mit saurem Charakter gewahrt. Die schwefelhaltigen und isocyclischen Aminosäuren nehmen in Richtung zum Kollagen hin ebenfalls ab. Allerdings ist die Fehlerbreite ihrer Bestimmung infolge geringer Konzentration relativ groß, so daß diesen Unterschieden keine wesentliche Bedeutung zukommt. Die Iminosäuren sind in auffallend großer Menge am Aufbau von Hyalin und Kollagen beteiligt.

Myosin und Fibrinogen, welche besondere biologische Funktionen, wie die Bindung mit Aktin zu Aktomyosin beim Ablauf der Muskelkontraktion bzw. den Übergang in Fibrin bei der Blutgerinnung haben, lassen sich in die dargestellte Proteinreihe nicht sicher einordnen. Hinsichtlich ihres Aminosäuregehaltes scheinen sie mehr mit den löslichen als den unlöslichen Proteinen übereinzustimmen.

Auf Grund physikalisch-chemischer Eigenschaften können bekanntlich globuläre und fibrilläre Proteine unterschieden werden. In unserer Reihe stehen auf der einen Seite die Serumproteine als typische globuläre Eiweißkörper, auf der anderen Seite das Kollagen mit den charakteristischen Eigenschaften eines Faserproteins.

Für die *globulären Proteine* ist die molekular gelöste Form des Emulsionssols charakteristisch. Mit physikalisch-chemischen Methoden lassen sich die Einzelelemente der dispersen Phase nachweisen und es zeigt sich, daß lediglich ihre ungewöhnliche Molekülgröße für den eigenartigen Zu-

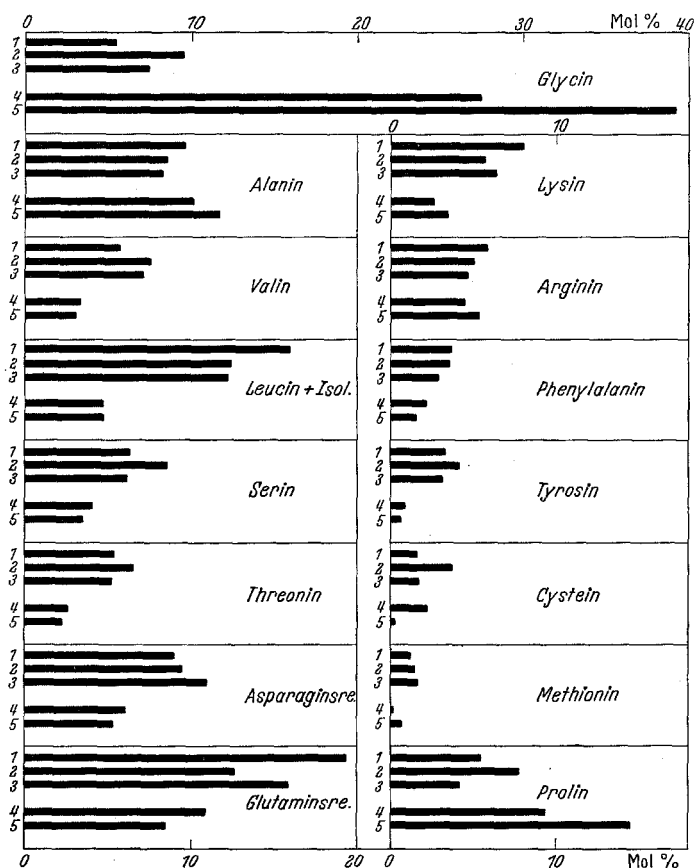


Abb. 4. Anteil der einzelnen Aminosäuren (in Mol.-%) am Aufbau der in Abb. 3 aufgeführten Proteine. Die fünf für jede Aminosäure aufgetragenen Säulen beziehen sich auf 1. Serum- α -Globulin; 2. Serum- β -Globulin; 3. Wasserlösliches Lebereiweiß (Mittelwert von 8 Präparaten); 4. Oberflächenhyalin der Milz (Mittelwert von 4 Präparaten); 5. Kollagen. Beachte den Unterschied zwischen leicht und schwer löslichen Eiweißkörpern, die Ähnlichkeit von wasserlöslichem Lebereiweiß und α - bzw. β -Globulin sowie von Oberflächenhyalin und Kollagen.

stand der Lösung verantwortlich ist. Es bestehen fließende Übergänge zur echten kristalloiden Löslichkeit. Das Sol ist unbegrenzt verdünnbar und hat trotz der erheblichen Größe seiner Partikel eine relativ große Stabilität. Diese ist Folge einer Abstoßung gleichsinnig geladener Teilchen und des Bestrebens der Partikel, sich mit einem Wassermantel zu umgeben (Hydratation). Die Ladung des Moleküls und die Größe seines

Wassermantels werden außer durch die Molekülgröße und -form, also Eigenarten des Aufbaues, auch vor allem durch die Qualität der eingebauten Aminosäuren bestimmt. Strukturell bestehen die globulären Proteine wie auch das fibrilläre Eiweiß aus Polypeptidketten, die nach neuesten Erkenntnissen beim globulären Protein in einer weitgehenden Fältelung bzw. Knäuelung gelagert sein müssen (PAULING). Schon SOERENSEN vermutete angesichts der kompakten Molekülstruktur, daß lange Polypeptidketten biegsam sind und damit eine Neigung zur Aufrollung und Knäuelbildung haben. Die hierfür erforderlichen intramolekularen Kohäsionskräfte sollen von den zahlreichen unterschiedlich geladenen Seitengruppen der eingebauten Aminosäuren ausgehen. Somit spielt auch für die Knäuelbildung die Eigenart des Aminosäurenbestandes eine Rolle, wobei der Reichtum globulärer Proteine an Aminosäuren mit funktionellen Seitengruppen diese Vorstellung bekräftigt. Über die Oberflächenladung der einzelnen Makromoleküle ist relativ wenig bekannt. Auf Grund des physikalisch-chemischen Verhaltens ist es dennoch sicher, daß das Albuminmolekül eine sehr große Nettoladung besitzt und seine Hydratationsfähigkeit im Löslichkeitsversuch groß ist. Schon das γ -Globulin ist wesentlich unstabiler und trägt nur eine geringe Nettoladung. Dementsprechend finden sich auch wesentliche Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung beider Eiweißkörper.

Die *fibrillären Proteine* sind weitgehend unlöslich. Beim Kollagen läßt sich bis in die kleinste Untereinheit eine gestreckte Form der Polypeptidketten nachweisen. Im Verlauf der Fadenstruktur kommen röntgenspektroskopisch und elektronenmikroskopisch verschieden lange Perioden zur Darstellung. Kleine und größere Untereinheiten, die beim Kollagen bis zu 216 Aminosäurereste enthalten können, wechseln in einem bestimmten Rhythmus, wobei die größte Periode eine Länge von 640 Å hat (GRASSMANN). Das Faserprotein ist somit bis in seine kleinsten und deutlich gestreckten Untereinheiten regelmäßig strukturiert. Auch die fibrillären Proteine der Keratin-Myosin-Fibrinogen-Gruppe zeigen ähnliche, mehr oder weniger gestreckte regelmäßige Strukturen. Für die Neigung zur Strukturbildung muß letzten Endes eine besondere Anordnung der Aminosäurenreihenfolge und die Qualität der eingebauten Aminosäuren verantwortlich gemacht werden. Im Falle des Kollagens fällt vor allem der relative Mangel an Aminosäuren mit funktionellen Seitengruppen auf (Überwiegen des Glycin, vgl. BERGMANN). Weiterhin ist der hohe Gehalt an Aminosäuren mit hydrophoben Gruppen bemerkenswert. Vielleicht ist dadurch die Fähigkeit zur intra- und intermolekularen Brückenbildung vermindert und die Polypeptidketten bleiben eher gestreckt. NEURATH hebt in diesem Zusammenhang den relativ hohen Glycingehalt des Kollagens hervor und PAULING weist auf den hohen Anteil des Prolin am Aufbau des Kollagens hin, wobei das Prolin in

Verbindung mit Glycin und einer weiteren Aminosäure eine immer wiederkehrende Tripeptiduntereinheit des Kollagens bilden soll. Die Tendenz dieser Moleküle, Ketten und Fasern zu bilden, geht sogar so weit, daß nativ gelöstes Kollagen in geeignetem Milieu wieder zu einer Faser auskristallisiert, die unter dem Elektronenmikroskop auch wieder die charakteristische Querstreifung der natürlichen Faser aufweist (RANDALL).

Dieser Ausblick auf verschiedene physikalisch-chemische Eigenschaften zeigt, daß mit einem bestimmten Aminosäurenbestand auch gewisse Moleküleigenschaften, wie Löslichkeit, Ladung und Fähigkeit zur Strukturbildung in engem Zusammenhang stehen können. Eine nähere Ausdeutung erscheint heute noch unmöglich, ist aber bei weiterer Klärung der chemischen Struktur von Eiweißsubstanzen zu erwarten.

Wie unsere Aminosäureanalysen gezeigt haben, stehen Amyloid und Oberflächenhyalin in ihrer Stoffzusammensetzung zwischen dem globulären und fibrillären Protein. Da bislang wegen der Unlöslichkeit und des amorphen gelartigen Zustandes von Amyloid und Hyalin eine physikalisch-chemische und submikroskopische Charakterisierung nicht möglich war, ist auch die Ausdeutung der Aminosäurebefunde nur beschränkt. Immerhin steht fest, daß beide Proteine auf Grund der Aminosäureanalyse weder rein globuläre, noch einheitlich fibrilläre Eiweißkörper sind. Es liegt vielmehr die Annahme nahe, daß es sich um Gemische beider Elemente handelt, die je nach Ausfall ihrer Aminosäureanalyse mehr globuläres Protein (beim Amyloid) oder fibrilläres Protein (beim Oberflächenhyalin) enthalten. Möglicherweise ist es beim Amyloid und Hyalin zu einer Anlagerung von globulären Proteinen an das Fasernetz fibrillärer Eiweißkörper gekommen, ohne daß bis jetzt sichere Aussagen darüber möglich sind, auf welche Weise solche Gemische entstehen und zu der eigentümlichen amorphen Gelierung gebracht werden.

Wir können diese Vorstellung durch grundlegende Befunde von ERICH MÜLLER stützen, der beim Bindegewebshyalin eine Adsorption globulinartiger Eiweißkörper an die kollagene Faser nachgewiesen hat. Obwohl die Bildung dieser Hyalinart stets an der kollagenen Faser ansetzt, bestand ihr Eiweiß nicht ausschließlich aus Kollagen, sondern es ließen sich je nach Alter und Abstammung des Hyalins mehr oder weniger reichlich globuläre Eiweißkörper, darunter sogar Albumin, extrahieren. Alte Milzschwarten hatten ziemlich einheitlich einen Kollagengehalt von 60—80%. In jüngeren, mit einem fibrinösen Erguß einhergehenden Schwartenbildungen der Pleura fand sich indessen nur zu 30—50% Kollagen. In diesem Fall hatte der Hauptanteil des Gesamteiweißes Globulincharakter. Theoretisch ergeben sich so fließende Übergänge bis zu dem letztlich nur noch aus globulären Proteinen sich zusammen-

setzenden „fibrinösen“ Hyalin, das MÜLLER in Form des hyalinen Thrombus und der hyalinisierten diphtherischen Membran von den Grundtypen des epithelialen und bindegewebigen Hyalin abtrennt. Durch Adsorption von Plasmaprotein an angesäuerte kollagene Fasern konnte außerdem in vitro ein dem nativen Bindegewebshyalin entsprechendes histologisches Bild erzielt werden.

Die Klassifizierung der Hyalinbildungen in Präzipitations- und Adsorptionshyalin einschließlich der Kollagengruppe erscheint nach unseren Befunden auch unter dem Gesichtspunkt des Aminosäurenbestandes berechtigt, da Amyloideiweiß und Oberflächenhyalin schon ihrer chemischen Zusammensetzung nach verschiedene Substanzen sind. Insbesondere ist erwähnenswert, daß die Aminosäurezusammensetzung der Milzschwarte eine Verwandtschaft zum Kollagen nahelegt. Da unser Material durchwegs alten Schwarten entnommen wurde, ist eine weitgehende Einheitlichkeit in der Aminosäurezusammensetzung verständlich.

Wenn hier auf Zusammenhänge zwischen Aminosäurenbestand, physikalisch-chemischem und morphologischem Erscheinungsbild verschiedener pathologischer Eiweißablagerungen und physiologischer Proteine eingegangen wurde, so erscheint uns dies als ein möglicher Weg weiterer Forschung und als der Versuch eines Brückenschlages zwischen mikroskopischer, submikroskopischer und chemisch-konstitutiver Struktur. Wir stehen jedoch noch ziemlich fern von einer endgültigen Klärung, dennoch wird deutlich, daß die Aminosäuren-Bausteinanalyse geeignet ist, unsere Vorstellungen von der mikroskopischen und submikroskopischen Struktur der Proteine und Gewebe zu erweitern.

Zusammenfassung.

Da Menge und Art der eingebauten Aminosäuren ein wesentliches Charakteristicum jedes Eiweißkörpers sind, wurde die Aminosäurezusammensetzung von verschiedenen Amyloideiweißpräparaten, mehreren Hyalinproben (Oberflächenhyalin der Milzkapsel) und wasserlöslichen Eiweißkörpern der Leber (Präparat aus der Mäuseleber) mit einer quantitativen papierchromatographischen Methode ermittelt. Dabei hatten die Hyalin- und Leberpräparate einen qualitativ und quantitativ konstanten Aminosäurenbestand. Die Zusammensetzung des Amyloideiweißes war nicht einheitlich.

Für die Deutung der Aminosäurebefunde erwies es sich als vorteilhaft, Aminosäuren mit chemisch verwandten Seitengruppen zusammenzufassen und dabei für die Charakterisierung des Löslichkeitsverhaltens und der Ladungsqualität des Moleküls den Anteil an Aminosäuren mit polarer und apolarer Seitengruppe bzw. das Verhältnis der Monoamino-dicarbon-säuren zu den Hexonbasen herauszustellen. Es

zeigt sich beim Vergleich mit den wasserlöslichen Eiweißkörpern des Serums und dem unlöslichen Kollagen, daß Amyloid und Bindegewebs-hyalin eine Zwischenstellung einnehmen und wahrscheinlich Proteingemische sind. Dabei ist das Kapselhyalin dem Kollagen nahe verwandt und das Amyloideiweiß, welches zu den sauren Eiweißkörpern zu rechnen ist, steht einerseits den Serumglobulinen und andererseits dem Kollagen und Hyalin nahe. Das wasserlösliche Lebereiweiß gleicht im quantitativen Aminosäurenaufbau weitgehend dem α - und β -Globulin des Blutserums.

In einem Vergleich der Ergebnisse mit weiteren bekannten Analysen verschiedener Eiweißkörper wird auf mögliche Zusammenhänge zwischen Aminosäurenbestand, physikalisch-chemischem und morphologischem Erscheinungsbild näher eingegangen. Obwohl mangels näherer Kenntnisse über die Reihenfolge der Aminosäuren in den einzelnen Polypeptidketten und deren Verknüpfung zum Makromolekül die Ausdeutung von Aminosäurenanalysen heute noch beschränkt erscheint, so zeichnen sich doch Unterschiede ab, die je nach Löslichkeitsverhalten und molekularer Struktur der einzelnen Körper (globuläres und fibrilläres Protein) verschieden sind.

Literatur.

- ASTBURY, W. T.: Fundamentals of fibre structure. Oxford 1933. Zit. nach FREY-WYSSLING. — BAILEY, K.: Biochemic. J. **43**, 271 (1948). — BERGMANN, M.: J. of Biol. Chem. **110**, 471 (1935). — BONSDORFF, B. v.: Veröff. path. Inst. Helsingfors **7**, 386 (1933). — BOWES, I. H., and R. H. KENTEN: Biochemic. J. **43**, 358 (1948). — BRAND, E.: Ann. N. Y. Acad. Sci. **47**, 187 (1946). — BRAND, E., and I. T. EDSALL: Annual Rev. Biochem. **16**, 223 (1947). — BRAND, E., B. KASSEL and L. J. SEIDEL: J. Clin. Invest. **23**, 437 (1944). — EPPINGER, H.: Biochem. Z. **127**, 107 (1922). — FREY-WYSSLING, A.: Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. New York 1948. — GEROK, W.: Z. physiol. Chem. **1954**. — GRABAR, P.: Les globulines du serum sanguin. Paris: Masson & Cie. 1947. — GRASSMANN, W.: The chemical structure of proteins. London: Ciba-Foundation-Symposium 1953. — KÜHNE, W., u. RUDNEFF: Virchows Arch. **33**, 66 (1865). — LETTERER, E.: Beitr. path. Anat. **75**, 549 (1926). — Dtsch. med. Wschr. **1950**, 15. — MARK u. PHILIPP: Zit. nach FREY-WYSSLING. — MAYEDA, M.: Z. physiol. Chem. **58**, 469 (1909). — MISSMAHL, P.: Virchows Arch. **318**, 518 (1950). — MÜLLER, E.: Beitr. path. Anat. **97**, 41 (1936). — NEUBERG: Verh. Dtsch. Path. Ges. 7. Tagg 1904. — NEURATH: Zit. nach SPRINGALL, The structural chemistry of proteins. London 1954. — PAULING, L.: The configuration of polypeptide chains in protein, IX. Conseil de chimie. Brüssel 1953. — PERNIS, B.: Plasma **1**, 365 (1953). — PERNIS, B., G. SCHNEIDER u. CH. WUNDERLY: Ärztl. Forsch. **7**, 454 (1953). — RANDALL, J. T.: Nature and structure of collagen. Faraday Soc. discussion, London 1953. — RÖCKER-SCHRÖDER, M.: Nicht veröffentlicht. — SOERENSEN, S. P.: C. r. Trav. Labor. Carlsberg **18**, 5 (1930). — WEBER, H. H.: Sehr. Königsberg. gelehrte Ges., Naturwiss. Kl. **18**, 45 (1942).

Professor Dr. E. LETTERER, Pathologisches Institut der Universität,
Tübingen.