

51. Über Darstellung und Eigenschaften von Proteinsolen mit gallensauren Salzen

von Ch. Wunderly.

(14. II. 42.)

Nachdem die Kenntnis von den Eigenschaften der Serumproteine durch Röntgenanalyse und Elektrophorese bedeutend vertieft worden ist, konnte die Eiweissforschung daran gehen, den Begleitsubstanzen von Nichtproteincharakter, wie den Nucleinsäuren, Gallensäuren, Sterinen, Kohlehydraten u. a. vermehrte Aufmerksamkeit zu widmen. Nach *Pedersen*¹⁾ ist es wohl möglich, dass diese Substanzen die primären Proteinaggregate zu koppeln vermögen und so als Bindeglieder eine fundamentale Rolle spielen bei den Reaktionen, welche zu Dispersitätsänderungen der Serumkolloide führen. Dahin zielende Arbeiten sind besonderem Interesse begegnet, weil sie zeigen, dass die Kenntnis dieser Begleitstoffe neue Wege weist für das Verständnis der Blutfunktionen während des Krankheitsablaufes. Um die Eigenschaften solcher Begleitstoffe, sowie ihre Wirkung auf die übrigen Serumbestandteile zu kennzeichnen, sind *Blix*²⁾ (Upsala), *Kendall*³⁾ u. a. zumeist so vorgegangen, dass sie die Begleitstoffe aus dem Serum isolierten und anschliessend prüften, wie sich die Eigenschaften des dergestalt veränderten Serums verhalten.

Im Folgenden wird versucht, auf Grund der Adsorptionspeptisation von Globularproteinen durch gallensaure Salze, sowie Gemischen von denselben mit Cholesterin, Systeme aufzubauen, welche in ihrer Zusammensetzung den nativen Lipoproteinen nahe kommen. Die Untersuchung der so gewonnenen Proteinsole geschieht nach kolloid-chemischen Gesichtspunkten. Aus den analytischen Daten, wie sie *Gardner*⁴⁾ und *Delage*⁵⁾ geben, geht hervor, dass die Bindungen der Lipoide an die Globuline zwar stärker sind, dass jedoch in quantitativer Hinsicht mehr an die Albumine gebunden ist. *Kendall*⁶⁾, *Svensson*⁷⁾, *Macheboeuf*⁸⁾ vermuten, dass die Lipoide besonders stark an die Euglobulin-Fraktion gebunden sind, sodass dadurch deren hydrophober Charakter bedingt werde. Infolgedessen musste es für die Synthese von Proteinsystemen von besonderem Interesse sein,

1) *Pedersen, K. O.*, Proc. Roy. Soc. (London) [A] **170** (1939).

2) *Blix, G.*, J. Biolog. Chem. **137**, 495 (1941).

3) *Kendall, F. E.*, J. Biolog. Chem. **138**, 97 (1940).

4) *Gardner, J. A.*, Biochem. J. **32**, 1457 (1938).

5) *Delage, B.*, Bull. Soc. Chim. Biol. **20**, 892 (1938).

6) *Kendall, F. E.*, J. clin. Invest. **16**, 921 (1937).

7) *Svensson, H.*, J. Biolog. Chem. **139**, 805 (1941).

8) *Macheboeuf, M.* und *Tayeau, F.*, Bull. Soc. chim. Biol. **23**, 49 (1941).

von den labilsten Fraktionen, nämlich Euglobulin und Pseudoglobulin I, auszugehen. Für die Gewinnung dieser Unterfraktionen konnten jedoch die gebräuchlichen Aussalzungsmethoden nicht in Frage kommen, da die notwendige, lange Dauer der Dialyse die kolloidchemische Ausgangslage in irreversibler Weise beeinflusst; andererseits üben schon physiologische Mengen von Neutralsalz-Zusätzen eine unerwünschte Peptisationswirkung aus. Dagegen gelingt es, durch geeignetes Verdünnen des Serums mit Eiswasser und nachfolgende Behandlung mit Kohlendioxyd, die gewünschten grobdispersen Unter-Fraktionen salzfrei zu gewinnen. Nachdem diese gewaschen sind, kann der Proteingehalt nach *Kjeldahl* bestimmt werden. Darauf werden aliquote Teile gelöst, indem die Natrium-Salze physiologischer Gallensäuren als Peptisator dienen. Diese Euglobulin-Peptisation ist deshalb wichtig, weil die Löslichkeit der Proteine eine sehr viel charakteristischere Eigenschaft darstellt als ihre Fällbarkeit durch Neutralsalze. Fügen wir einer Reihe zunehmender Mengen von Euglobulin gleiche Teile von Peptisator zu, so gelangt man zu jener Konzentration, wo das Peptisationsvermögen erschöpft ist; diese Grenze zeigt uns die Lösungskapazität des betreffenden Cholates an. Bei dieser Grenzkonzentration ist genau die Gesamtmenge des Peptisators an Eiweiss gebunden; dabei tritt an die Stelle eines berechenbaren stöchiometrischen Verhältnisses die Bestimmung der Lösungskapazität. Wenn wir die verschieden konzentrierten Proteinsole nephelometrisch quantitativ auswerten, gelangen wir zu einer Aussage über die Abhängigkeit von Konzentration und Lösungsdispersität. Schliesslich wird noch die Lösungsintensität bestimmt. Dazu erhitzen wir aliquote Teile von solchen Proteinsohlen mit einer Verdünnungsreihe von Calciumchlorid-Lösungen. Dann gibt die Stellung des Schwellenwertes, bis zu welchem die Koagulation vollständig ist, ein Mass für die Lösungsintensität. Damit haben wir die drei hauptsächlichsten Faktoren gemessen, welche für die kolloiden Auflösungs Vorgänge massgebend sind. Um die Lösungsstabilität der Proteinsole zu charakterisieren, wird ihr isoelektrischer Punkt, sowie ihre Thermostabilität im I.E.P. gemessen. Mit Rücksicht auf die Wichtigkeit für die Permeabilität wird von einigen Proteinsohlen auch ihr Dissolutionsvermögen geprüft.

Herstellung der Proteinsole.

Dazu befolge ich die Methodik, wie ich sie ausgearbeitet habe für die Bearbeitung der kolloidchemischen Grundlagen der *Weltmann*-Reaktion (*Wunderly*¹⁾). Dank seinem hohen Gehalt an grobdispersen Anteilen ist frisches Rinderserum das bestgeeignete Ausgangsmaterial. Wir bringen 50 cm³ von solchem Spontanserum in einen Messzylinder und füllen mit doppelt destilliertem Wasser von 0° auf 500 cm³ auf. Es wird gut homogenisiert und für 2 Stunden in den Eisschrank gestellt. Darauf wird während 30 Minuten

¹⁾ *Wunderly, Ch., Z. ges. exptl. Med.* **108**, 324 (1940).

in langsamem Strom reines Kohlendioxyd durchgeperlt. Anschliessend wird für 2 Stunden in den Eisschrank gestellt. Damit ist die Aggregation kinetisch einheitlicher Teilchen quantitativ geworden. Das fertige Sol, welches in der Folge als Sol A bezeichnet wird, wird gut homogenisiert und je 15 cm³ davon in Zentrifugengläschen abgefüllt. Diese werden 3 Minuten bei 5000 T und 3 Minuten bei 10000 T zentrifugiert; darauf die überstehende, leicht gelblich gefärbte Flüssigkeit abgegossen und die Gläserchen zum Abtropfen auf 3 Lagen Filterpapier gestellt. Nun wird je Gläschen 2 cm³ doppelt destilliertes Wasser zugefügt und mit diesem Waschwasser gut umgeschwenkt. Anschliessend wie oben zentrifugiert und von der Waschflüssigkeit abgegossen. Dieses Waschen wird in gleicher Weise wiederholt. Jetzt sind in den Gläserchen als reinweisses Sediment jene Globuline, welche Stern¹⁾ als Paraglobuline bezeichnet hat. Im Durchschnitt von 10 Kjeldahl-Bestimmungen hat sich ergeben, dass der Proteingehalt pro Gläserchen je nach Ausgangsserum zwischen 4,5 und 6,0 mg schwankt. Im Interesse einer möglichst gleichbleibenden Darstellungsweise ist es geboten, morgens zu beginnen, damit am späten Nachmittag die Globuline bereit sind für die Peptisation.

Bestimmung der Lösungskapazität: Dazu wird in eine Reihe von zehn Zentrifugengläschen vom Sol A, welches an jenem Tage hergestellt wurde, je 45—30—20—15—12—10—8—6—4—2 cm³ abgefüllt. Je nach Fassungsvermögen der Zentrifugengläschen, kann der Gehalt auch durch entsprechendes Nachfüllen und Wiederholen der Zentrifugation hergestellt werden. Neben obiger Reihe wird immer in zwei Röhrcchen mit dem Zentrifugat von 15 cm³ Sol A, nach dem Waschen, der Proteingehalt als Doppelbestimmung ermittelt. Daraus berechnet sich nachher die Konzentration des Proteins. Wir haben nun, wie oben angeführt, in zehn Zentrifugengläschen abgestufte Mengen von Globularprotein. In jedes Gläschen einer solchen Reihe lassen wir aus einer Pipette 0,05 cm³ 1-proz. Natriumcholat²⁾ zufließen. Man bedient sich dafür vorteilhaft einer Mikrobloodpipette, welche Abmessungen bis zu 0,0005 cm³ gestattet. Nach einigem Umschwenken wird über Nacht, mindestens aber 15 Stunden, in den Eisschrank gestellt. Die entstehenden Sole stehen auf den folgenden Tabellen in der Kolonne a. Zu einer 2. Reihe von zehn Zentrifugengläschen mit Globularproteinen derselben Provenienz, wird je 0,05 cm³ 1-proz. Natriumdesoxycholat gegeben (Kol. b); zu einer 3. Reihe je 0,5 cm³ Glykocholat (Kol. c); zu einer 4. Reihe je 0,0165 cm³ einer Lösung, welche neben 3% Desoxycholat noch 0,2% Cholesterin enthält (Kol. d) und schliesslich zu einer 5. Reihe ebensoviel von einer Lösung, welche 3% Desoxycholat, 3% Glykocholat und 0,45% Cholesterin enthält (Kol. e). Versuche mit entsprechenden Taurocholat-Lösungen ergaben ungenügende peptisatorische Eigenschaften dieser substituierten Cholsäure. Nach 15 Stunden im Eisschrank wird in jedes Gläschen unter Umschwenken soviel doppelt destilliertes Wasser gegeben, dass das Volumen 12 cm³ ausmacht. In den Röhrcchen mit den höchsten Proteinkonzentrationen bleibt ein weisser, ungelöster

¹⁾ Stern, R., Biochem. Z. **144**, 115 (1923).

²⁾ Die verwendeten Gallensäuren und Sterine wurden von der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G., Basel, in verdankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

Rest von Protein zurück. Zu seiner Lösung hat die Peptisator-konzentration nicht ausgereicht; damit gibt das letzte Röhrchen mit vollständiger Peptisation den Umfang der Lösungskapazität an. Zur Bestimmung der

Lösungsdispersität werden die Proteinsole aus den Zentrifugengläschen (Volum 12 cm³) direkt in das 26 mm Becherglas aus geblasenem Spezialglas gegossen und die Trübung im Stufenphoto-meter von *Zeiss* mit Einrichtung für Trübungsmessung ausgewertet. Als Lichtfilter dient *L*₂ und als Vergleichshelligkeit Nr. 4. Wenn wir in einem Koordinatensystem auf der Abszisse die Proteinkonzentration in mg% und auf der Ordinate die absoluten Trübwerte eintragen, dann erhalten wir die Peptisationskurven der fünf geprüften Peptisatoren. Nachfolgende Tabelle 1 enthält die Lösungskapazitäten (in Tab. 1 die Werte eingerahmt) und —dispersitäten zahlenmässig ausgewertet durch ihre absoluten Trübwerte bei 15° C. Die Cholesterinkonzentration in den Röhrchen der Kol. d beträgt 2,7 mg% und von Kol. e 6,2 mg%.

Tabelle 1.

Protein-konzentrationen mg%	Als Peptisator verwendet:				
	Cholat 0,05 cm ³ a	Desoxy-cholat 0,05 cm ³ b	Glyko-cholat 0,5 cm ³ c	Desoxychololat + 0,2% Cholesterin 0,0165 cm ³ d	Desoxychololat + 0,45% Cholesterin 0,0165 cm ³ e
360	unvollständige Peptisation			0,074	0,083
240	0,050	0,051	0,083	056	062
180	039	039	067	044	049
144	029	030	055	036	038
120	026	027	045	029	032
96	020	020	036	024	026
72	016	016	027	018	020
48	010	010	018	012	014
24	004	004	009	006	007

15 cm³ von Sol A, mit welchem die Versuche für Tab. 1 ausgeführt wurden, enthalten 5,4 mg Protein. Wie aus der Zusammenstellung hervorgeht, ist die Peptisationsfähigkeit der Sole mit Cholat und Desoxychololat nahezu gleich gross, während diejenige von Glykocholat etwa zehnmal geringer ist. Es geht daraus hervor, dass die endständige freie Säuregruppe die Peptisationsfähigkeit in positivem Sinne beeinflusst, indem sie stärker aufladend wirken kann und die Möglichkeit besitzt, kovalenzartige Bindungen einzugehen. Dort, wo Cholesterin miteingebaut wird, ergeben sich interessante Zusammenhänge mit der Konkrementbildung, womit auf die physio-

logische Bedeutung dieser Versuche hingewiesen sei. Allgemein ist zu sagen, dass die Sole reproduzierbare Trübungen ergeben, welche bis zum Erreichen der Lösungskapazität genau proportional sind zur Proteinkonzentration. Die unterstrichenen Werte sind die Grenzkonzentrationen, bis zu welchen vollständige Peptisation eingetreten ist.

Zur Prüfung der Lösungsintensität der Proteinsole benutze ich das abgestuft schwächer werdende Fällungsvermögen einer Calciumchlorid-Verdünnungsreihe. Werden aliquote Teile der Sole mit solchen Calciumchlorid-Lösungen 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt und anschliessend in fliessendem Wasser abgekühlt, so zeigt sich, dass in einer Anzahl der Röhrchen die Koagulation vollständig ist. Bei einer gewissen Grenzkonzentration von Calciumchlorid, welche wir als Schwellenwert bezeichnen wollen, setzt sich kein Koagulum mehr ab, sondern bleibt eine kolloidale Trübung zurück. Durch geeignete Filtration mit harten Filtern (*Schleicher* und *Schüll*, Nr. 602 e. h.) werden Sole erhalten (*Wunderly*¹), welche für die quantitative nephelometrische Auswertung genügend isodispers sind. Trägt man die erhaltenen absoluten Trübwerte als Ordinaten auf und die Laufnummern der Röhrchen entsprechend ihrer Stellung in der Verdünnungsreihe auf die Abszisse, dann ergibt jede Ablesung am Stufenphotometer einen Punkt. Verbinden wir dieselben, so entsteht eine Kurve, welche wir Nephelogramm benennen (*Wunderly* und *Wuhrmann*²). Sie gibt genaue Auskunft über die Lösungsintensität der Proteine; denn es kommen in ihr ebensosehr die verschieden starke Solvation der lyophilen Kolloide zum Ausdruck, wie die hitzebedingten Molekelordnungsvorgänge der lyophoben Globularproteine. Mit diesen letzteren haben wir es in erster Linie zu tun, da wir nicht von Vollserum, sondern von seinen grobdispersen Anteilen ausgegangen sind. Um den Vergleich beider Wirkungen zu ermöglichen, gebe ich in der Fig. 1 auch das Nephelogramm des Rinderserums, von dem ausgegangen wurde.

Die Betrachtung der Kurven zeigt sogleich, wie die Lösungsintensität der grobdispersen Proteine (Nephelogramme 2—6) gegenüber dem Ausgangsserum (Nephelogramm 1) abgenommen hat. Während dieses durch 0,15 $\frac{0}{100}$ Calciumchlorid nicht mehr vollständig koaguliert wird, genügen dazu bei den grobdispersen Proteinen noch 0,09 $\frac{0}{100}$ Calciumchlorid. Weiter hat sich bei diesen der Scheitelpunkt der Kurven gesenkt, und zwar bei den cholesterinhaltigen Solen relativ am stärksten. Wir erkennen darin den cholesterinbedingten, verstärkt lyophoben Aufbau dieser Proteinsole. Aus diesem Befunde ergeben sich interessante Parallelen zu den Nephelogrammen von Nephrose-Sera, welche mitbedingt sind durch bedeu-

¹) *Wunderly, Ch.*, Koll. Z. **93**, 318 (1940).

²) *Wunderly, Ch.* und *Wuhrmann, F.*, Klin. Wschr. **20**, 564 (1941).

tende Hypercholesterinaemien und infolgedessen stets einen stark erniedrigten Scheitelpunkt besitzen.

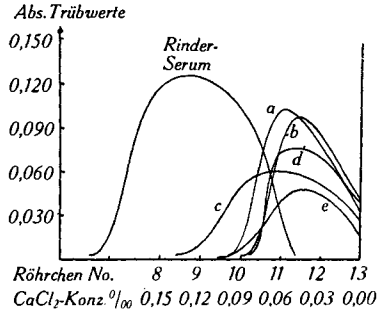


Fig. 1.

Nephelogramm des Lipoproteines mit der Lipoidkomponente:

- Kurve a: Natrium-Cholat.
 b: Natrium-Desoxycholot.
 c: Natrium-Glykocholat.
 d: Natrium-Desoxycholot / Cholesterin.
 e: Natrium-Desoxycholot / Natrium-Glykocholat / Cholesterin.

Um die Lösungsstabilität der fünf Proteinsole noch weiter zu kennzeichnen, prüfe ich die Lage ihres isoelektrischen Punktes sowie die Thermostabilität in demselben. Das Maximum der Unstabilität, wie es sich im I.E.P. zu erkennen gibt, hat *Eirich*¹⁾ durch konduktometrische Titration ermittelt. Dem Beispiel *Kylin's*²⁾ folgend, messe ich quantitativ die auftretenden Trübungen im p_H-Bereich von 4,4 bis 6,7. Für die Pufferung erwiesen sich der Veronal-Acetat-Puffer von *Michaelis* in der Ausführung von *King* und *Delory*³⁾, sowie der Universalpuffer von *Teorell* und *Stenhagen*⁴⁾ wegen ihres relativ hohen Salzgehaltes als ungeeignet. Dank seinem geringen und konstanten Gesamtelektrolytgehalt (keine mehrwertigen Kationen) wurde dem 0,1-m. Natriumacetat/Essigsäure-Puffer der Vorzug gegeben; *Kolthoff*⁵⁾ hat allerdings nachgewiesen, dass die Pufferkapazität dieses Systems im beobachteten p_H-Gebiet einen erheblichen Abfall zeigt. Die Pufferlösungen wurden mit hochohmiger Glaselektrode und Röhrenverstärkungspotentiometer kontrolliert.

Es ergibt sich, dass der I.E.P. der fünf Proteinsole bei p_H = 5,15 liegt. Die Lipoidkomponenten haben somit bei dieser Temperatur noch keinen Einfluss auf seine Lage; diese wird vielmehr bestimmt durch die Proteinkomponente.

¹⁾ *Eirich, F.*, Koll. Z. **85**, 260 (1938).

²⁾ *Kylin, E.*, Biochem. Z. **285**.

³⁾ *King, E.* und *Delory, G.*, Enzymologia **8**, 278 (1940).

⁴⁾ *Teorell, T.* und *Stenhagen, E.*, Biochem. Z. **299**, 416 (1938).

⁵⁾ *Kolthoff, I. M.*, Säure-Basen-Indikatoren, S. 29 (Berlin 1932).

Tabelle 2.

p _H	Lipoidkomponente:			Desoxy- cholat/ Cholesterin d	Desoxy- cholat/ Glykocholat/ Cholesterin e
	Cholat a	Desoxycholat b	Glykocholat c		
6,7	0,013	0,006	0,012	0,008	0,009
6,4	017	009	017	009	012
6,1	027	018	029	016	019
5,8	046	035	049	024	027
5,55	067	059	069	037	041
5,3	078	073	080	048	052
5,15	080	076	083	052	055
5,0	077	075	081	051	054
4,85	071	071	077	044	047
4,7	061	064	072	036	039
4,4	037	045	060	016	019

Damit ist es wenig wahrscheinlich, dass die Globularproteine durch die Peptisation mit den gallensauren Salzen denaturiert wurden. An denselben war zudem nie ein Überschuss vorhanden, da die Konzentration des Peptisators stets nach Massgabe seiner Lösungskapazität eingestellt wurde. Wenn deshalb Anson¹⁾ bei Haemoglobin durch die Wirkung von gallensauren Salzen und weiterer synthetischer Netzmittel spektrophotometrisch eine Denaturation feststellt, so haben bei seinen Versuchen andere Bedingungen vorgelegen. Dass zudem lytisch aktive Substanzen auf Haemoglobin besonders stark reagieren, zeigten die Versuche von Anson und Mirsky²⁾ mit Natriumsalicylat.

Nun haben Kylin und Koranyi³⁾ den I.E.P. für elektrophoretisch gewonnene Globuline, mit Phosphat- und Citratpuffern, bei p_H = 5,1 und 6,2 gefunden; während Stenhagen⁴⁾ ihn findet für α -Globulin bei 4,8; β -Globulin bei 5,2 und γ -Globulin bei 6,4; ferner Tiselius⁵⁾ für β -Globulin bei p_H = 5,1. Diese letzteren Messungen wurden mit Acetat-Puffer erreicht, sodass sie mit Tab. 2 gut vergleichbar sind. Es ergibt sich somit aus dieser Gegenüberstellung, dass der undissoziierte Teil der fünf besprochenen Proteinsole bei demselben p_H-Wert seine Maximalkonzentration erreicht, wie das β -Globulin. Von diesem letzteren konnten Gutmann⁶⁾ und Mitarbeiter nach der Elektrophoresemethode von Longsworth⁷⁾ zeigen, dass es bei Myelom zumeist die Ursache der Hyperglobulinämie ist. Weiter haben die Forschungen von Pedersen⁸⁾, Sandor⁹⁾ und Smith¹⁰⁾ gezeigt, dass der

¹⁾ Anson, L., J. Gen. Physiol. **23**, 239 (1940).

²⁾ Anson, L. und Mirsky, A. E., J. Gen. Physiol. **17**, 399 (1934).

³⁾ Kylin, E. und Koranyi, A., Z. ges. exptl. Med. **110**, 83 (1938).

⁴⁾ Stenhagen, E., Biochem. J. **32**, 714 (1938).

⁵⁾ Tiselius, A., Biochem. J. **31**, 1464 (1937).

⁶⁾ Gutman A., Moore D., Gutman E., J. clin. Invest. **20**, 765 (1941).

⁷⁾ Longsworth, L. G., J. Am. Soc. **61**, 529 (1939).

⁸⁾ Pedersen, K. O., Koll. Z. **63**, 268 (1933).

⁹⁾ Sandor, G., Bull. Soc. chim. Biol. **18**, 877 (1936); **19**, 555 (1937).

¹⁰⁾ Smith, E. R., J. Biolog. Chem. **113**, 473 (1936).

I.E.P., ebenso wie der isoionische Punkt, bei Proteinsolen vom benutzten Puffersystem beeinflusst werden. Ich habe deshalb ebenfalls mit den vorerwähnten beiden Puffersystemen die Reihen durchgemessen. Der I.E.P. änderte jedoch seine Lage nicht. Diese Messungen waren notwendig, weil die Lipoproteinsole Systeme darstellen, deren Stabilität stärker von ihrer Aufladung abhängt als diejenige des Serums.

Die Messung der Thermostabilität im I.E.P. lässt sich im Stufenphotometer mit Einrichtung für Trübungsmessung leicht durchführen, da die Kammer, in welche die zu messenden Flüssigkeiten in den Spezialbechergläsern eingetaucht werden, mit einem Heizmantel umgeben ist. Wird derselbe mit entsprechend vorgewärmtem Wasser durchspült, so lässt sich im Messraum die Temperatur beliebig variieren. In den folgenden Versuchen wurde die Erwärmung so geleitet, dass innerhalb einer halben Stunde das Temperaturintervall von 10° — 70° C durchlaufen wurde. Die Herstellung der Proteinsole erfolgt wieder wie unter a) bis e). Nach ihrer Bildung werden sie mit zweifach destilliertem Wasser auf 20 cm^3 aufgefüllt; von diesen Solen werden je 5 cm^3 herauspipettiert, 1 cm^3 0.1-m. Natriumacetat-Essigsäure-Puffer von $p_H = 5,15$ hinzugefügt und auf 20 cm^3 aufgefüllt. Diese frisch hergestellten Sole werden für 10 Minuten in Wasser von 10° gestellt und gelangen darauf zur Trübungsmessung. Unmittelbar nachher wird der Heizstrom eingeschaltet, welcher das Spülwasser des Heizmantels erwärmt. Die Stromstärke ist so reguliert, dass der Temperaturanstieg 10° pro 5 Minuten beträgt. Untenstehende Tab. 3 gibt die absoluten Trübungen im Verhältnis zu der Temperatursteigerung.

Tabelle 3.

Lipoidkomponente	10°	30°	40°	50°	70°
Cholat a	0,040	0,049	0,057	0,067	0,112
Desoxycholat b	0,033	040	045	054	087
Glykocholat c	046	050	058	066	094
Desoxycholat/Cholesterin . . d	043	051	058	068	62° Flockung
Desoxycholat/Glykocholat/ Cholesterin e	041	052	064	43° Flockung	

Die Sole a), b) und c) wurden nach der 70° -Messung für 4 Stunden beiseitegestellt und auf 10° abkühlen gelassen. Nach dieser Zeit haben die Sole a) und b) ihre Trübungsdispersität nahezu unverändert beibehalten, während Sol c) beginnende Ausflockung zeigte. Die Beobachtung des zeitlichen Ablaufes ist deshalb wichtig, weil sie den Umfang der irreversiblen Denaturationsvorgänge anzeigt. Aus Tab. 3 geht die cholesterinbedingte, verminderte Thermostabilität eindeutig hervor. Da sich bei Sol e) die Unstabilität schon im Bereich

febriler Temperaturen zeigt, ergeben sich hier interessante Möglichkeiten, neue Einblicke zu gewinnen zum Cholesterinstoffwechsel.

Wie *Schally*¹⁾ erwähnt hat, kann der Cholesteringehalt im Blute bei Hypercholesterinämien bis zum 10-fachen des Normalwertes ansteigen; ebenso wurde seine starke Vermehrung im Krebsgewebe letzthin quantitativ durch *Bürger* und *Plötner*²⁾ gemessen. Wenn man mit *Mühlbock* und *Kaufmann*³⁾ schon die Normalwerte des Cholesteringehaltes im Blute zwischen 147 und 322 mg% annimmt, dann lässt sich anhand unserer Versuche ermes sen, wie gross erst die lytischen, stabilisierenden Faktoren in pathologischen Sera sein müssen, um das vorzeitige Eintreten irreversibler Vorgänge zu verhindern.

Unter dem Dissolutionsvermögen eines Proteinsoles verstehen wir seine Fähigkeit, Micellkolloide in molekulare Dispersion überzuführen. Diese Fähigkeit ist wichtig für das Verständnis der Permeabilitätsprobleme, wie solche an der Zellmembran auftreten. Zur Messung dieser Eigenschaft verwende ich Sole von Acridinorange, welcher Farbstoff als heteropolares Micellkolloid in Lösung geht. Als solches wird er aus Lösungen von 0,5 mg% von den *Schleicher* und *Schüll*-Filtern 602 e. h. quantitativ zurückbehalten. Geben wir hingegen zu einer solchen Farbstofflösung Serum oder Lipoproteinsole, so erscheint das Filtrat gefärbt. Die Konzentration dieses molekular gelösten Farbstoffes wird im Stufenphotometer quantitativ ausgewertet; Farbfilter S 47 und 20 mm-Küvetten. Vorerst wird eine Eichkurve aufgezeichnet, welche die Abhängigkeit von Extinktion und Acridinorangegehalt der Filtrate festlegt. Sodann stelle ich fest, dass in dieser Konzentration Desoxycholatlösungen keine Dissolutionswirkung besitzen. In der ersten Kolonne (Tab. 4)

Tabelle 4.

Der Ansatz enthält:			Globularproteine im Ansatz mg%	E	%	Serumansatz		
Globularprotein mg	1% Desoxycholatlösung cm ³	1 mg% Acridinorangellösung cm ³				Gesamtprotein im Ansatz mg%	E	%
Dissolution durch Proteinsol mit Desoxycholat								
6,6	0,05	5	66	0,092	22	136	0,175	41
4,4	0,05	5	44	066	13	114	140	34
2,2	0,05	5	22	037	9	92	122	30
—	—	5 + 0,1 cm ³ Serum	—	—	—	70	088	21
Dissolution durch Proteinsol mit Glykocholat								
6,6	0,5	5	66	0,047	11	136	0,137	32
4,4	0,5	5	44	027	6	114	117	30
2,2	0,5	5	22	014	3	92	105	25
—	—	5 + 0,1 cm ³ Serum	—	—	—	70	088	21

1) *Schally, A. O.*, Erg. inn. Med. **50**, 480 (1936).

2) *Bürger, M.* und *Plötner, K.*, Klin. Wschr. **20**, 1209 (1941).

3) *Mühlbock, O.* und *Kaufmann, C.*, Z. ges. exptl. Med. **102**, 461 (1938).

wird die Wirkung der Lipoproteinsole gemessen, indem abgestufte Mengen von Sol A mit konstanten Mengen an Desoxycholat, in der unteren Reihe an Glykocholat, peptisiert werden. In Kolonne rechts besteht der Ansatz aus denselben Lipoproteinsolen und einem gleichbleibenden Zusatz von je $0,1 \text{ cm}^3$ Normalserum. (Gesamtproteingehalt 7,0 %); Volum des Ansatzes 10 cm^3 ; Volum-Ausgleichflüssigkeit: Wasser; E = Extinktion; die % geben an, wieviel Farbstoff im Filtrat erscheint, wenn die Ausgangskonzentration an Acridinorange von $0,5 \text{ mg}\%$ gleich 100 gesetzt wird.

Es geht daraus hervor, dass das Dissolutionsvermögen der Proteinsysteme nicht in einfacher Weise der Konzentration der Proteinkomponente proportional ist. Da andererseits die Gallensäuren in der gewählten Konzentration keine Dissolution hervorrufen, so haben wir in der verschieden starken Dissolutionswirkung eine Eigenschaft, welche spezifisch ist für den Aufbau der betreffenden Proteinsole. Die Serumansätze zeigen eine einfache additive Wirkung von Serum und Proteinsystem.

Zusammenfassung.

Es wird die Darstellung beschrieben von fünf Proteinsystemen, wobei die Proteinkomponente aus Globularproteinen besteht und die Lipoidkomponente aus Natrium-Cholat, Natrium-Desoxycholat, Natrium-Glykocholat, Gemischen von Natrium-Desoxycholat mit Cholesterin und solchen von Natrium-Desoxycholat und Natrium-Glykocholat mit Cholesterin.

Die kolloiden Auflösungsvorgänge dieser fünf Proteinsysteme werden charakterisiert durch ihre Lösungsdispersität, ihre Lösungsintensität und die Lösungskapazität des Peptisators.

Ihre Lösungsstabilität wird gekennzeichnet durch die Lage ihres isoelektrischen Punktes, sowie die Thermostabilität in demselben.

Auf die Beziehungen dieser Eigenschaften zu den physiologischen Gegebenheiten wird hingewiesen.

Medizin. Universitätsklinik Zürich
(Direktor Prof. Dr. W. Löffler).
