

Bence-Jonessche Eiweißkörper, 1. Mitt.:

Kristallisation und Molekulargewicht

Von

A. Holasek, I. Pascher und H. Hauser

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut und Pregl-Laboratorium
der Universität Graz

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 22. Februar 1961)

Drei *Bence-Jonessche* Eiweißkörper wurden aus menschlichem Harn isoliert und mehrfach umkristallisiert. Die aus den Sedimentations- und Diffusionskonstanten berechneten Molekulargewichte betragen 51 200, 43 000, 55 300.

*H. Bence Jones*¹ fand 1847 im Harn von Menschen, die an einer als Myelom bezeichneten Knochenmarkserkrankung litten, einen Eiweißkörper, der durch sein eigenartiges Verhalten beim Erhitzen des Harnes auffiel. Dieser *Bence-Jonessche* Eiweißkörper fällt nämlich bereits beim Erwärmen des Harnes auf etwa 50° C aus und löst sich bei höherer Temperatur, bei der andere Eiweißkörper erst koagulieren, mehr oder minder vollständig auf. Heute wissen wir, daß es nicht nur einen *Bence-Jonesschen* Eiweißkörper gibt, sondern daß es sich um eine Gruppe von Proteinen handelt^{2, 3}. Es ist sogar sehr wahrscheinlich, daß jeder Myelomkranke, bei dem ein solches Paraprotein im Harn erscheint, seinen spezifischen *Bence-Jonesschen* Eiweißkörper hat.

Allen diesen Proteinen ist außer dem Vorkommen im Harn Myelomkranke gemeinsam, daß sie bei etwa Halbsättigung der Lösung mit Ammoniumsulfat ausfallen und daß sie, dem normalen Blutserum zuge-

¹ *H. Bence Jones*, *Lancet* **2**, ii, 88 (1847).

² *W. F. Putnam*, „The Plasma Proteins“, Vol. II, 378—401, Academic Press, New York and London 1960 (umfassende Übersicht mit Literatur).

³ *Hoppe-Seyler/Thierfelders* Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl., S. 398 (1960) (Übersicht mit Literatur).

setzt, elektrophoretisch im Bereiche der β - und γ -Globuline wandern⁴. Untereinander unterscheiden sie sich jedoch oft beträchtlich sowohl in bezug auf ihre Löslichkeit, elektrophoretische Wanderung³ und Endgruppen⁵, als auch im Molekulargewicht^{4, 6, 7}.

In letzter Zeit stieg das Interesse an diesen Proteinen stark an, wobei es sich nicht nur um medizinische Fragen, sondern auch um die Erforschung der eigenartigen Löslichkeitsverhältnisse und vor allem des Ursprunges dieser Eiweißkörper handelt. Es wurde nämlich gefunden, daß *Bence-Jonessche* Eiweißkörper eine immunologische Verwandtschaft zum γ -Globulin besitzen^{2, 8}, was eine Ähnlichkeit im Aufbau dieser beiden Proteine andeutet. Da das γ -Globulin jedoch ein drei- bis viermal größeres Molekulargewicht hat, erscheint es wahrscheinlich, daß *Bence-Jonessche* Proteine Bruchstücke des Globulins sind. Diese Bruchstücke könnten infolge einer nicht beendeten Synthese⁸, vielleicht einer Fehlsynthese, entstanden sein.

Ungeklärt ist weiters die Frage, ob ein Kranker immer den gleichen *Bence-Jonesschen* Eiweißkörper ausscheidet oder ob sich dieser Eiweißkörper im Laufe der Erkrankung bzw. unter der Therapie verändert⁹. Manche Patienten scheiden mehrere Paraproteine aus; wir wissen jedoch nicht, ob sich das Mengenverhältnis der einzelnen Eiweißkörper zueinander ändert oder konstant ist.

Sollte der *Bence-Jonessche* Eiweißkörper infolge einer Fehlsynthese entstehen, so wäre es sehr interessant zu untersuchen, an welchen Stellen der Peptidkette diese Fehlsynthese eintrat und eventuell auch, aus welchem Grunde sie zum Stillstand kam. Sowohl diese Untersuchung als auch die Erforschung der eigenartigen Löslichkeitsverhältnisse¹⁰ und die Beantwortung der Frage, ob sich der *Bence-Jonessche* Eiweißkörper im Laufe der Erkrankung ändert, setzen die Isolierung einiger reiner, möglichst verschiedener Proteine dieser Art voraus.

Im Nachfolgenden wird die Darstellung dreier in der Ultrazentrifuge und zunächst auch elektrophoretisch einheitlich erscheinender, mehrfach umkristallisierter *Bence-Jonesscher* Proteine beschrieben. Im Papier-elektropherogramm zeigen sie untereinander deutliche Unterschiede und

⁴ F. Putnam und P. Stelos, J. biol. Chem. **203**, 347 (1953).

⁵ F. Putnam und A. Miyake, J. biol. Chem. **227**, 1083 (1957).

⁶ T. Svedberg und K. O. Pedersen, The Ultracentrifuge, London and New York 1940.

⁷ H. F. Deutsch, J. biol. Chem. **216**, 97 (1955).

⁸ H. F. Deutsch, C. H. Kratochvill und A. E. Reif, J. biol. Chem. **216**, 103 (1956).

⁹ J. J. Witte, Over de variabiliteit in de proteinurie bij de ziekte van Kahler. Dissertation Utrecht 1959.

¹⁰ F. Putnam, C. W. Easley, L. T. Lynn, A. E. Ritchie und R. A. Phelps, Arch. Biochem. Biophys. **83**, 115 (1959).

wandern, dem Serum zugesetzt, im Bereiche der β - und γ -Globuline. Interessant mag noch die Feststellung sein, daß im Blutserum zweier Menschen, die *Bence-Jonessche* Proteine ausscheiden (*R* und *T*), das γ -Globulin nur in sehr kleinen Mengen (unter 5% gegenüber einem Normalwert von über 15%) vorhanden war. Dies ist insbesondere im Zusammenhang mit der Möglichkeit einer Fehlsynthese von γ -Globulin bemerkenswert.

Der Eiweißkörper *M* ließ sich mit Ammoniumsulfat und durch Dialyse gegen destilliertes Wasser nur als amorph, in Salzlösungen leicht und

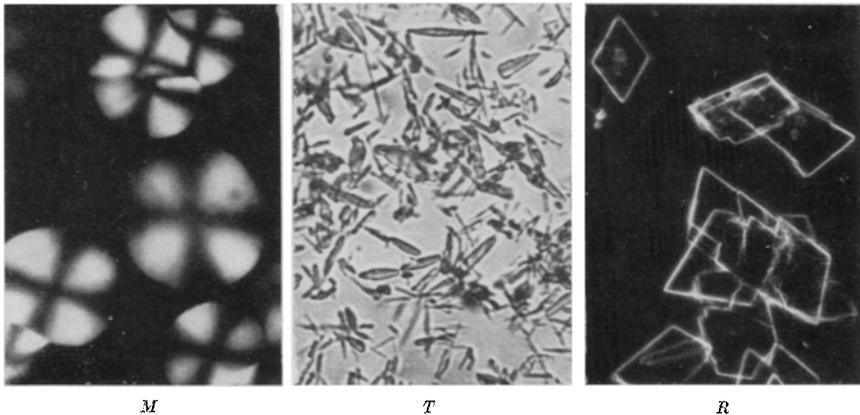


Abb. 1. Mikroskopische Aufnahmen der drei kristallisierten *Bence-Jonesschen* Eiweißkörper *M* (polarisiertes Licht), *T* (durchfallendes Licht) und *R* (Dunkelfeld)

praktisch vollständig löslicher Niederschlag gewinnen. Die Kristallisation gelang durch Dialyse gegen salzarme Lösungen, z. B. gegen fließendes Leitungswasser. Der Eiweißkörper bildet feinste, im Mikroskop gerade noch sichtbare Nadeln, die sich zu Kugeln anordnen (Abb. 1 *M*). Die Löslichkeit in destilliertem Wasser ist gering, etwa 0,5%. Bei neutraler Reaktion zeigt die Lösung von 1 mg/ml bei 280 $m\mu$ und einer Schichtdicke von 1 cm eine Extinktion $E = 1,36$.

Der Eiweißkörper *R* ließ sich einerseits aus einer konzentrierten Lösung durch vorsichtige Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration kristallisieren; andererseits erhielt man salzfreie Kristalle nach wochenlanger Dialyse gegen destilliertes Wasser. Diese Kristalle waren dicke Platten von rhombenförmiger Begrenzung (Abb. 1, *R*).

Insbesondere, wenn nicht zu konzentrierte Lösungen des Proteins zur Umkristallisation verwendet wurden und der Dialysierschlauch nicht geschüttelt wurde, konnten Kristalle von mehreren Millimetern Durchmesser gezüchtet werden. Die Löslichkeit in destilliertem Wasser ist beträchtlich, etwa 4%. Die neutrale Lösung von 1 mg/ml zeigt bei 280 $m\mu$ und einer Schichtdicke von 1 cm eine Extinktion $E = 1,425$.

Der Eiweißkörper *T* kristallisierte erstmalig beim Abkühlen einer salzfreien konzentrierten Lösung (Abb. 1, *T*). Er ist bei Zimmertemperatur in destilliertem Wasser oder einer salzarmen Lösung nur wenig löslich. Auffallend ist die starke Zunahme der Löslichkeit mit steigender Temperatur bis 35° C. Besonders schöne, nadelförmige Kristalle können auch durch Änderung des pH-Wertes erzielt werden; bei 280 μ und einer Schichtdicke von 1 cm zeigt die Lösung von 1 mg/ml eine Extinktion von $E = 1,29$.

Prot.	<i>V</i>	$S_{20, w}$	$D_{20, w}$	<i>MG</i>	F/F_0
<i>M</i>	(0,736)	3,91	7,02	51200	1,23
<i>R</i>	0,736	3,60	7,71	43000	1,19
<i>T</i>	(0,736)	4,04	6,71	55300	1,26

Die Sedimentationskonstanten der mindestens viermal umkristallisierten Proteine wurden in der Phywe-Ultrazentrifuge bei 50000 U/min bestimmt. Die Proteine *M* und *R* befanden sich in einer 0,15 m Natriumchloridlösung, der Eiweißkörper *T* in einer Lösung, die 0,075 m an Natriumchlorid und 0,075 m an Kaliumdihydrogenphosphat ist. Die Diffusionskonstante wurde in der Diffusionseinrichtung zur Phywe-Ultrazentrifuge bestimmt, wobei etwa 0,5proz. Lösungen in den oben genannten Salzlösungen verwendet wurden. Das partielle spezifische Volumen ermittelten wir nur beim Eiweißkörper *R*, da dieser die größte Löslichkeit besitzt. Bei der Berechnung der Molekulargewichte wurde auch für die Eiweißkörper *M* und *T* dieses spezifische Volumen angenommen.

Experimenteller Teil

Alle Eiweißkörper wurden zunächst durch Fällung mit Ammoniumsulfat aus dem Harn isoliert, wobei 3 bis 5 kg Ammoniumsulfat auf 10 l Harn zugesetzt wurden. Der auf der Nutsche gesammelte Niederschlag löst sich leicht, jedoch nicht vollständig in Wasser auf. Vom ungelösten Rückstand, der zu einem großen Teil aus Urat besteht, wurde abfiltriert. Bei starker Färbung der Lösung muß man mehrmals mit Ammoniumsulfat umfällen, wobei die Lösung jeweils auf das ursprüngliche Harnvolumen gebracht wird.

Die Dialyse erfolgte in Visking-Schläuchen zunächst durch 1 bis 2 Tage gegen fließendes Leitungswasser, dann wurde die Lösung der Proteine *R* und *T* gegen täglich gewechseltes, mit wenig Toluol oder Thymol versetztes destilliertes Wasser, die Lösung des Proteins *M* weiter gegen Leitungswasser dialysiert.

Die oft stark verdünnten Lösungen konnten nach einer der folgenden Methoden ohne Denaturierung eingeengt werden: Druckdialyse; Abdampfen im Dialysierschlauch unter Zuhilfenahme eines kühlen Luftstromes; Absaugen des Wassers durch einen Dialysierschlauch mit Hilfe von Polyäthylenglykol (Oxydwachs der BASF); Eindampfen der Lösung im rotierenden Destillationsapparat bei 35° C Wasserbadtemperatur.

Zwecks Kristallisation und Umkristallisation werden die Eiweißkörper M und R möglichst konzentriert in einer Kochsalzlösung gelöst, eventuell über Kieselgur klar filtriert und gegen Leitungswasser (M) bzw. gegen täglich gewechseltes, destilliertes Wasser (R) dialysiert. Wenn die Kristallisation beendet ist, werden die Kristalle abgenutscht, jedoch nicht trocken gesaugt. Für die Umkristallisation werden sie wieder in dest. Wasser suspendiert und durch Zusatz einiger Tropfen einer gesätt. Natriumchloridlösung gelöst. Wenn nötig, wird über Kieselgur filtriert und anschließend dialysiert. Die Kristalle werden bei 2°C unter der letzten Mutterlauge aufbewahrt. Die Kristallisation des Proteins T erfolgt ähnlich wie bei R gegen destilliertes Wasser, nur wird der Ammoniumsulfatniederschlag oder die Kristallsuspension statt in Kochsalz in einem Gemisch von Natriumchlorid und Kaliumdihydrogenphosphat gelöst.

Zur Konservierung konnte man Toluol (insbesondere beim Protein T) nur in kleinen Mengen verwenden, weil die Kristalle durch einen Toluolüberschuß angegriffen werden. Thymol war manchmal vorteilhafter.

Die Molekulargewichte wurden aus den Sedimentationskonstanten $S_{20,w}$ und Diffusionskonstanten $D_{20,w}$, die nicht auf die Konzentration Null extrapoliert sind, nach der *Svedberg*-Formel

$$M = \frac{R \cdot T \cdot S_{20,w}}{D_{20,w} \cdot (1 - V \rho)}$$

errechnet.