

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
[Vorstand: Geheimrat Prof. Dr. Borst].)

Über die Lage des isoelektrischen Punktes des Kernchromatins und Zellplasmas¹.

Von

Wilhelm Niethardt, Kiel.

(Eingegangen am 9. Februar 1935.)

Aus physikalisch-chemischen Untersuchungen ist bekannt, daß der isoelektrische Punkt mancher Eiweißsubstanzen im sauren Bereich gelegen ist. So gibt *O. Kestner* z. B. für Serumalbumin p_H 4,8, für denaturiertes Serumalbumin 5,09, für Serumglobulin 5,44, für Hämoglobin 6,8 an. Nach *Handovsky* wurde in neueren Bestimmungen für Serumalbumin ein isoelektrischer Punkt von 4,98, für Hämoglobin 7,0 gefunden. Durch histologische Untersuchungen mit gepufferten Farblösungen — also mit ganz anderer Methode — haben nun *Pischinger*, *Zeiger*, *Mommsen*, *Schwarz-Kasten*, *Sandels*, *Laves* Bestimmungen des isoelektrischen Punktes an Kernchromatinen und Zellplasma ausgeführt. Für beide fanden diese Autoren die Lage des isoelektrischen Punktes ebenfalls im sauren Bereich. Ich erwähne nur nach *Laves* für die Leberzellen: Kerne p_H 3,5—3,7, Plasma 4,2—4,4; *Pischinger*: Kerne 3,3, Plasma 4,0; *Zeiger*: Kerne 3,8, Plasma 4,8 (bei Formolfixierung Kerne 3,2, Plasma 4,1). Diese Werte erscheinen gegenüber den für Eiweißkörper auf chemisch-physikalischem Wege gefundenen im allgemeinen nach der sauren Seite zu verschoben; das gleiche gilt auch für die mit *Pischingers* Methode gewonnenen Werte für Hämoglobin (*Schwarz-Kasten* p_H 5,9, *Mommsen* 6,5).

Bei Untersuchungen über die Einwirkung von Fermenten auf Gewebsschnitte fanden nun anderseits *G. Merkle* und *Groll*, daß Papain bei p_H 5 eine eigenartige als „Gerinnungsverdauung“ bezeichnete Veränderung nativer Leber-Gewebsschnitte hervorruft. Da weder bei p_H 4 noch bei p_H 6 diese Veränderung zu erzielen war, so durfte angenommen werden, daß der isoelektrische Punkt des Lebergewebes ungefähr bei einem p_H von 5,0 gelegen sei; denn nach *Willstädter* liegt das Optimum der verdauenden Wirkung des Papains für die einzelnen Eiweißsubstanzen verschieden, je nach der Lage ihres isoelektrischen Punktes.

Nun ist zwar bekannt, daß der isoelektrische Punkt der Eiweißkörper als Ampholyten je nach den bei der Bestimmung bestehenden Bedingungen in verschiedenem p_H -Bereich gefunden wird. Auch *Laves* führt ja mit Recht an, daß bei der Anwendung gepufferter Farblösungen

¹ Dissertation, der Medizinischen Fakultät München vorgelegt.

zur Bestimmung elektrostatischer Eigenschaften fixierter Gewebe nur bei Einhaltung gleicher technischer Bedingungen vergleichbare Werte zu erzielen sind. Insbesondere hat vor allem *Zeiger* nachgewiesen, von welcher Bedeutung die Vorbehandlung, vor allem die Härtung des Gewebes für die spätere Bestimmung des isoelektrischen Punktes mit Farblösungen ist. Gerade in dieser Beziehung bestanden nun wesentliche Unterschiede der Methodik zwischen den Versuchen von *Merkle* und *Groll* und denen aller mit der Methode *Pischingers* arbeitenden Untersucher; denn bei der Einwirkung von Fermenten auf Gewebsschnitte erfolgte die Beobachtung und Bestimmung von nativen — ungehärteten — Gewebes und so mußte es interessant sein, zu untersuchen, zu welchen Ergebnissen die Methodik der Bestimmung des isoelektrischen Punktes mit gepufferten Farblösungen führen würde, wenn sie — ebenso wie die Einwirkung von Fermentlösungen — an nicht gehärteten, nativen Gefrierschnitten ausgeführt wurde.

Zur Untersuchung gelangten nur tierische Organe, in den ersten Versuchen die Leber von Meerschweinchen, in späteren die Nieren. Die Fixierung der kleinen Organstückchen erfolgte in absolutem Alkohol und dann Einbettung in Paraffin oder es wurden die zum Vergleich mit den eingebetteten Organstückchen zur Untersuchung gelangenden Gewebsstückchen ohne irgendwelche Fixierung mit dem Messertiefkühler-Gefriermikrotom nach *Schultz-Brauns* geschnitten, sofort auf Glimmerplättchen angetrocknet und ohne jegliche Fixierung, also als native Schnitte der Färbung unterzogen.

Die Herstellung der Farblösungen erfolgte nach den Angaben von *Laves*, ebenso die Färbung und Eindeckung der Präparate. In den ersten Versuchen begnügten wir uns mit der Methylenblaufärbung, in späteren wurde auch Krystallponceau zur Färbung herangezogen, beide in m 250-Lösung mit gleichen Teilen n 50-Acetatpuffer. Da wir auch das Färbungsverhalten in Lösungen prüfen wollten, die noch stärker sauer reagierten als die von *Laves* verwandten Acetatpuffer, benützten wir für solche stärkere Säuregrade eine Zitratpufferung im Bereich von 2,08—4,0; der Wasserstoffionengehalt der Pufferungen wurde elektrometrisch mit der Gaskette bestimmt; für die Acetatpuffer ergab sich hierbei ein p_H von 3,38—5,66. Auch nach Zusatz der Farblösungen kontrollierten wir mit der Gaskette den Wasserstoffionengehalt nach; wenn auch solche Messungen in Farblösungen nicht ganz zuverlässig sind, so ergab sich doch bei unseren Messungen, daß höchstens Differenzen von 0,05 auftraten, also auch die Farblösungen selbst offenbar den erwarteten p_H zeigten.

Die Auswertung der mit den gepufferten Farblösungen behandelten Präparate machte allerdings, wie ja auch *Laves* angibt, gewisse Schwierigkeiten. Wir folgten zunächst den Angaben von *Laves*: Er stützt sich in Übereinstimmung mit *Zeiger* vorwiegend auf Methylenblaupräparate und gibt als „Lage des isoelektrischen Punktes eines Zellelementes jenen

p_H -Bereich“ an, „in welchem seine Struktur mit allen Einzelheiten noch deutlich hervortrat“. Auch in der späteren Arbeit wird keine objektivere Methode zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes angegeben: „Man bestimmt in erster Linie an den mit Methylenblau gefärbten Präparaten jene Aciditätsbereiche, in welchen die Farbbindung z. B. durch die Kerne eben angedeutet ist und dann jene H-Ionen-Konzentration, bei welcher alle Struktureinzelheiten des betreffenden Zellbestandteiles deutlich erkennbar sind. Diese Werte stellen dann die Grenze dar, zwischen denen die Lage des isoelektrischen Punktes des Strukturbestandteiles anzunehmen ist. Die Ermittlung dieser Bereiche erfordert Übung — letztere Erfahrung machten wir leider auch; um eine etwas größere Objektivität zu erzielen, wurden die Präparate unabhängig noch von einem Zweiten (*Groll*) begutachtet. Anfangs entstanden hierbei ziemliche Differenzen, nach einiger Übung ergaben sich aber doch annähernd übereinstimmende Werte. Schwieriger noch als beim Kern erschien uns die Feststellung des isoelektrischen Punktes beim Protoplasma. Am einfachsten und exaktesten sind offenbar die „ p_H -Bereiche des Beginnes der FarbadSORption“ festzustellen, während die „obere Grenze der Färbbarkeit“ wieder sehr schwer zu beurteilen ist. *Laves* gibt an: „Als obere Grenze der Färbbarkeit nahm ich durchweg jene Bereiche an, in welchen alle Strukturbestandteile eine intensive Färbung aufwiesen, die sich bei steigender (Krystallponceau) bzw. fallender H-Ionenkonzentration (Methylenblau) nicht mehr wesentlich änderte.“

Tabelle 1.

Stunden nach dem Tode	Art des Schnittes	Ungefähre Lage des isoelektri- schen Punktes Kern	<i>Laves</i> Kern	Ungefähre Lage des isoelektri- schen Punktes Plasma	<i>Laves</i> Plasma
0	Paraffin	2,9	3,5	3,7	4,2
	Nativer Gefrierschnitt	2,9		3,7	
	Paraffin	3,9		4,0	
	Nativer Gefrierschnitt	3,9		4,0	
7	Nativer Gefrierschnitt, getrocknet	4,1	3,9	4,3	4,75
24	Paraffin	3,7		4,1	
	Nativer Gefrierschnitt	3,7		4,0	
37	Nativer Gefrierschnitt, getrocknet	4,0		4,3	
48			3,8		4,5
50	Paraffin	3,7		4,1	
	Nativer Gefrierschnitt	3,7		4,0	
	Paraffin	3,7		4,1	
	Nativer Gefrierschnitt	3,9		4,1	
72			3,9		5,1
100	Paraffin	4,3		4,5	
	Nativer Gefrierschnitt	4,1		4,1	

Unsere ersten Versuche betrafen das Verhalten der Leberzellen des Meerschweinchens. Wir untersuchten mit Methylenblaufärbung unter

verschiedenen Bedingungen. Zunächst entnahmen wir aus der Leber sofort, nach 24, 50 und 100 Stunden Aufbewahrung bei Zimmertemperatur kleine Stückchen, fixierten sie in Alkohol und betteten sie in Paraffin ein, gleichzeitig aber fertigten wir auch sofort Gefrierschnitte mit Messerunterkühlung an, untersuchten also native Schnitte. Zweimal trockneten wir auch die nativen Schnitte 7 bzw. 48 Stunden bei 37°. Die Ergebnisse zeigt die vorstehende Tabelle.

Zunächst geht aus den Werten für den isoelektrischen Punkt des Kerns und Protoplasmas hervor, daß zwischen Paraffinschnitten und nativen Gefrierschnitten keine wesentlichen Unterschiede bestehen. Im übrigen sind die Befunde zwar nicht so überzeugend wie die von *Laves*, immerhin aber scheint doch aus unseren wenigen Versuchen schon hervorzugehen, daß die Resultate mit denen von *Laves* annähernd übereinstimmen. Besonders bei der längsten Versuchsdauer — 100 Stunden — und bei dem Trocknen nativer Schnitte ließ sich eine Verschiebung der isoelektrischen Punkte von der sauren Seite nach dem Neutralpunkt hin erkennen. Überraschend mag erscheinen, daß diese Verschiebung bei den ungetrockneten nativen Gewebsschnitten nicht so in Erscheinung tritt. Vielleicht erklärt sich dieses Verhalten in ähnlicher Weise, wie *Laves* den Widerspruch zwischen dem von ihm beobachteten postmortalen Verhalten der Zelleiweißkörper (Zunahme der Alkalität) und den bekannten Reaktionsänderungen der Autolysate nach der sauren Seite hin deutet. Er nimmt an, daß die postmortal entstehenden Säuren sich bei der Fixierung und Einbettung lösen und nur die alkoholfällbaren „säureverarmten“ Gewebeskolloide und alkoholunlöslichen Stoffe zurückbleiben. Da bei der Untersuchung nativer Schnitte eine solche Lösung erst im Moment der Färbung möglich wäre, könnte hierdurch das Fehlen einer Verschiebung nach der neutralen Seite bei nativen Schnitten erklärt werden. Der Umstand aber, daß bei den vorher getrockneten nativen Schnitten der Ausschlag zu erkennen war, spricht gegen eine solche Deutung; auch fanden sich in den späteren Versuchen mit nativen Gewebsschnitten manchmal völlige Übereinstimmung mit den Werten bei Paraffinschnitten, manchmal bestanden Differenzen, so daß wir geneigt sind, aus solchen Differenzen keine weiteren Schlüsse zu ziehen. Wir führen sie auf Mängel der Methodik zurück.

In einer weiteren Versuchsreihe setzten wir durch Unterbindung der Niere des Meerschweinchens am Hilus einen Totalinfarkt der Niere und verglichen die Befunde zwischen infarzierter und nichtinfarzierter Niere nach einer Unterbindungsdauer von 8 Stunden. Bei der Bestimmung des isoelektrischen Punktes ergab sich hierbei in zwei Fällen — die Untersuchung betraf nur native Gefrierschnitte — keinerlei Unterschied zwischen der abgebundenen und nicht abgebundenen Niere, während in zwei anderen Versuchen in der infarzierten Niere eine deutliche Verschiebung des isoelektrischen Punktes nach der neutralen Seite zu festgestellt

werden konnte. In den ersten beiden Fällen fand sich links wie rechts als isoelektrischer Punkt der Kerne 3,7 und 3,9, des Protoplasmas 4,0 und 4,1; bei den zwei anderen dagegen: Kerne links 3,7, rechts in der infarzierten Niere 4,0 bzw. 4,1, Protoplasma: links 5,0 und 4,0 in der infarzierten Niere in beiden Fällen 5,4. Wir hatten also bei diesen wenigen Versuchen immerhin zweimal eine deutliche Übereinstimmung mit den Versuchen von *Laves* gefunden, der ja in nekrotischen und geschädigten Leberzellen eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes nach der alkalischen bzw. neutralen Seite hin feststellte.

Andererseits erschien uns trotzdem die Methode doch zu subjektiv vom Beobachter abhängig und wir wollten nicht versäumen, durch Ausdehnung der Untersuchung auf die Färbung mit Krystallponceau vielleicht eindeutigere schärfere Resultate zu erhalten. Allerdings bestand hierfür von vornherein wenig Aussicht; denn *Laves* schreibt schon, daß die „Mehrzahl der gewebusbildenden Kolloide in den stärker sauren Bereichen bei Behandlung mit Krystallponceau mitgefärbt ist, so daß die Abschätzung der Farbbindung durch einzelne Gewebsbestandteile erschwert wird“. „Außerdem sind, wie *Pischinger* gezeigt hat, die mit substantiven sauren Farbstoffen erzielbaren Färbungsbilder, besonders der Kernchromatine nicht direkt mit jenen vergleichbar, die man nach Anwendung eines basischen Farbstoffes erhält.“ Deshalb verwendet ja auch *Laves* vorzugsweise zur Bestimmung der Werte bei Kernen die Methylenblaufärbung allein. Es gelang uns auch wirklich nicht, aus der Beurteilung von Krystallponceaupräparaten Werte zu erhalten, die mit denen der Methylenblaupräparate einigermaßen übereinstimmten. Sowohl bei Paraffin- wie bei nativen Gefrierschnitten der Meerschweinchenleber differierten die für den isoelektrischen Punkt der Leberzellkerne schätzungsweise gefundenen Werte nur etwa 0,5—1,0; der Krystallponceauwert war gegenüber dem Methylenblauwert regelmäßig nach der neutralen Seite zu verschoben. Bei der Bestimmung des isoelektrischen Punktes für das Zellprotoplasma stimmten die Werte etwas besser überein, aber auch hier bestand häufig eine Verschiebung der Werte bei Krystallponceaupräparaten nach der neutralen Seite hin, die Differenz betrug aber meist weniger als 0,5. Dieser Mißerfolg brachte uns aber auf den Gedanken, eine andere Art der Ermittlung des Wertes für den isoelektrischen Punkt vorzuschlagen. Alle, die sich mit der bisherigen Art befaßt haben, sind darüber einig, daß gerade die Grenze des Färbungsmaximums, die Bestimmung des Wertes, bei dem sich bei steigender (Krystallponceau) oder fallender (Methylenblau) H-Ionenkonzentration die Färbungsintensität nicht mehr wesentlich änderte, sehr schwer zu erfassen ist. Daher werden die Bestimmungen auch nicht objektiver werden, wenn man mit *Zeiger* als Lage der Umladepunkte die Mittelwerte zwischen den p_H -Bereichen maximaler und minimaler FarbadSORPTION annimmt. Dagegen ist das Minimum der FarbadSORPTION für Kerne und

Protoplasma exakter feststellbar, wenn man den p_H -Bereich als Minimum angibt, bei dem die erste Spur von Färbung der Kerne oder des Protoplasmas zu erkennen ist. Bei Anwendung der *beiden* Färbungen (Methylenblau und Krystallpoceau) erhält man also je zwei scharf erkennbare Grenzwerte; der eine (Methylenblau) liegt nach der sauren Seite zu, der andere (Krystallpoceau) näher der neutralen Seite noch im sauren Bereich. Der Mittelwert aus diesen beiden leicht feststellbaren Werten ergäbe dann einen rechnerisch festgelegten Wert für den isoelektrischen Punkt, der also dann nicht direkt subjektiv und schätzungsweise „aus dem deutlichen Hervortreten der Struktureinzelheiten“ ermittelt werden müßte.

Tabelle 2.

Stunden nach dem Tode	Art des Schnittes	Leber			
		Ungefähre Lage des isoelektrischen Punktes			
		Kern		Plasma	
0	Paraffin	4,5		4,9	
	Paraffin	4,7		5,0	
50	Nativer Gefrierschnitt . . .	3,9		4,4	
	Paraffin	4,7		5,0	
	Nativer Gefrierschnitt . . .	4,4		4,7	
	Nativer Gefrierschnitt . . .	4,4		4,7	
		Linke Niere	Rechte Infarkt-niere	Linke Niere	Rechte Infarkt-niere
	Paraffin	4,0	4,5	4,1	5,9
	Paraffin	4,6	4,0	5,1	4,7
	Nativer Gefrierschnitt . . .	4,1	4,4	4,4	4,4
	Nativer Gefrierschnitt . . .	4,0	4,5	4,7	4,9

Aber auch die Anwendung dieser Bestimmungsmethode für den isoelektrischen Punkt ließ schon bei den ersten Versuchen erkennen, daß die Resultate durch sie auch nicht eindeutiger wurden. Wie aus der beistehenden Tabelle 2 ersichtbar ist, war in Übereinstimmung mit den Befunden von *Laves* der isoelektrische Punkt des Protoplasmas gegenüber dem der Kerne nach der neutralen Seite zu verlagert und wenn man will kann man in den Zahlen auch trotz der geringen Zahl von Versuchen eine Bestätigung finden, dafür, daß der isoelektrische Punkt der Zelleiweißsubstanzen sowohl bei der postmortalen Autolyse (Leber) wie bei der Gewebsschädigung (Nierenunterbindung) nach der neutralen Seite verlagert wird. Bei den letzteren Versuchen fiel allerdings auf, daß einmal bei der Untersuchung von Paraffinschnitten die infarzierte Niere gegenüber der nichtinfarzierten Niere sogar Verschiebung des isoelektrischen Punktes nach der sauren Seite hin zeigte, also ein gegensätzliches Verhalten. Man könnte natürlich daran denken, daß bei einseitiger

Nierenunterbindung die andere „gesunde“ ja auch durch erhöhte Inanspruchnahme im Sinne einer Trübung des Parenchyms verändert wird. Aber warum konnte dies dann nur einmal beobachtet werden? Wir glaubten deshalb wieder die Versuchsmethodik selbst für solche Schwankungen in den Versuchsergebnissen verantwortlich machen zu müssen. Wir haben ja schon verschiedentlich darauf hingewiesen, daß eben die Lage des isoelektrischen Punktes nur schätzungsweise, subjektiv beeinflusst, bestimmt werden kann. Offenbar führt auch die rechnerische Ermittlung des isoelektrischen Punktes aus den p_H -Bereichen der Minima von FarbadSORPTION bei Methylenblau und Krystallponceaufärbung nicht zu besseren Resultaten. Auch *Laves* hat ja solche Schwierigkeiten gefunden, denn er gibt an, „daß die Bereiche des Maximums und des Beginnes der FarbadSORPTION durch die Zellen in den geschädigten Leberabschnitten weitgehende Unterschiede aufwiesen. Aus jedem Präparat wurde daher eine ganze Reihe von Werten sorgfältig aufgezeichnet.“ Er hat deshalb nur die Grenzwerte, die jeweils geringgradigsten und weitgehendsten Verschiebungen in den Tabellen eingetragen. Unter diesen Umständen erschien uns eine weitere Fortsetzung der Versuche zwecklos, zumal uns der Ausgangspunkt unserer Fragestellung hinreichend geklärt erschien.

Denn es sollte vor allem festgestellt werden, ob durch die Methode der Bestimmung des isoelektrischen Punktes mit gepufferten Farblösungen bei der Anwendung auf native, unfixierte Gewebsschnitte wesentlich andere Resultate gewonnen würden als bei fixierten Geweben; daß dies nicht der Fall ist, ging ja schon aus den allerersten Versuchen hervor.

Es konnte also nicht durch die Verwendung von nativen Gefrierschnitten bedingt sein, daß *Merkle* und *Groll* bei der verdauenden Einwirkung des Papains ein Optimum bei p_H 5 und damit auch die Lage des isoelektrischen Punktes weiter nach der neutralen Seite hin verschoben fanden als die mit gepufferten Farbstoffen arbeitenden Autoren (p_H 3,5 bis 4). Da dieses Optimum der Papainverdauung von *Merkle* und *Groll* nur annähernd bestimmt war, insofern sie die Verdauungsversuche nur mit Puffern von 4,0, 5,0 und 6,0 vornahmen, so wurde auch noch zwischen p_H 4 und 6 Reihenversuche angestellt, bei denen die Differenzen des p_H -Bereiches nur um 0,1 in den einzelnen Verdauungsproben gestaffelt waren. Bei diesen Untersuchungen wurde die „Verdauungsgerinnung“ im Bereich von p_H 4,8—5,6 beobachtet. Es ergab sich aber bei diesen Untersuchungen — ähnlich wie bei den Versuchen mit gepufferten Lösungen —, daß eben die Festlegung eines Optimums der Verdauungswirkung (und damit des isoelektrischen Punktes) durch rein morphologische Abschätzung der Verdauungswirkung am Gewebsschnitt nicht exakt und objektiv ist, daß sich vor allem meist nicht sagen läßt, ob die Wirkung nun z. B. bei p_H 4,9, 5,0 oder 5,1 intensiver

sei. Man könnte also höchstens feststellen, daß das Optimum ungefähr bei p_H 5 gelegen ist und dementsprechend auch die Lage des isoelektrischen Punktes *annäherungsweise* annehmen.

Da wir wissen, daß auch bei exakten physikalischen Bestimmungen des isoelektrischen Punktes der Eiweißkörper, die ja Ampholyten sind, je nach den bestehenden Bedingungen infolge von Umladungen wechseln kann, so dürfen wir offenbar auch bei morphologischen Bestimmungsversuchen nicht annehmen, der auf die eine oder andere Art gefundene Wert sei der „richtigere“, wir dürfen Differenzen der gefundenen Werte nicht als Widersprüche ansehen. Zweifellos aber geben solche morphologische Untersuchungen eine Bestätigung der bekannten Tatsache, daß der isoelektrische Punkt vieler Eiweißsubstanzen im sauren Bereich gelegen ist.

Schrifttum.

Groll: Beitr. path. Anat. **93** (1934). — *Kestner*: Chemie der Eiweißkörper. Braunschweig: Vieweg 1925. — *Laves*: Virchows Arch. **279** (1931). — Frankf. Z. Path. **43** (1932). — *Merkle*: Beitr. path. Anat. **92** (1934). — *Mommsen*: Fol. haemat. (Lpz.) **34** (1927). — *Pischinger*: Z. Zellforsch. **3** (1926); **5** (1927). — Pflügers Arch. **217** (1927). *Schwartz-Kasten*: Dtsch. med. Wschr. **1927**. — *Zeiger*: Z. Zellforsch. **10** (1930).
