

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

Studien zur Korrelation der Eiweißkörper des Blutplasmas und der Organe bei experimenteller Dysproteinämie

III. Mitteilung

Charakterisierung des löslichen Lebereiweißes und Veränderungen dieser Fraktion bei dysproteinämischen Tieren

Von

GERHARD SCHNEIDER

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. März 1956)

Unsere in der I. und II. Mitteilung schon niedergelegten quantitativen Organanalysen haben für Milz, Leber und Nieren ein konstantes relatives Organgewicht und einen konstanten Gesamt-N- und Eiweißgehalt bei der gesunden Maus ergeben. Die dysproteinämischen Tiere zeigten eine Erhöhung des relativen Organgewichtes mit Vermehrung der N-haltigen Bestandteile der Milz und Leber. Diese Tatsache führte unter Berücksichtigung des zeitlichen Ablaufes der Organveränderungen und der Veränderungen des Bluteiweißbildes zum Nachweis enger Beziehungen zwischen Bluteiweißbild und Chemismus der Organe [SCHNEIDER (2)].

Die Leber, die sich im Frühstadium der Dysproteinämie wesentlich vergrößert und dabei proportional zur Gewichtszunahme ihren Gesamt-N-Faktor (Milligramm Leber-Gesamt-N je Gramm Körpergewicht) erhöht, zeigte außer dem Anstieg ihres Rest-N-Gehaltes auch eine vorübergehende Abnahme des Gehaltes an wasserlöslichen Eiweißkörpern. Ohne Anzeichen für eine Eiweißspeicherung zu bieten, wurde dieser im Frühstadium als Hyperplasie und später als Hypertrophie imponierende Umbau der Leber als Anpassung an einen erhöhten Umsatz N-haltiger Substanzen gedeutet. Die nur im Endeffekt der Substanzzunahme von Leber, Milz und in sehr geringem Grade auch der Nieren faßbare Größe des Stoffumsatzes entspricht in der ersten sog. akuten Phase der Dysproteinämie (1.—10. Tag der Behandlung) dem *Entzug des gesamten zirkulierenden Plasmaeiweißes* des Tieres.

Mit diesen Feststellungen war die Leber in den Mittelpunkt unserer Studien gerückt und es erschien zur weiteren Klärung der Umbauvorgänge an der Leber und einer der unspezifischen Dysproteinämie zugrunde liegenden Stoffwechselumstellung erforderlich, die qualitative Charakterisierung der löslichen Eiweißkörper der Leber beim gesunden und dysproteinämischen Tier anzuschließen.

Der Begriff der wasserlöslichen Fraktion des Lebereiweißes und die Methodik ihrer Charakterisierung

Mit der Isolierung des wasserlöslichen Lebereiweißes durch Aufschwemmung von Frischgewebe in 0,9%iger Kochsalzlösung und anschließender Zentrifugation in starkem Schwerfeld [methodische Einzelheiten s. SCHNEIDER (1)] wurde ein Weg beschritten, auf dem vor allem BENSLEY und seiner Schule die Darstellung von Mitochondrien und Mikrosomen neben dem leicht löslichen cytoplasmatischen Eiweiß gelungen ist.

Die Extraktion von gefriergetrocknetem wie auch von Frischgewebe der Leber mit 0,9%iger Kochsalzlösung beeinträchtigt nach HOERR und BENSLEY die Struktur der Leberzelle nicht wesentlich. Indessen verliert das Gewebe sofort und vollständig seine löslichen Eiweißkörper zugleich mit den feinsten korpuskulären Bestandteilen. Werden letztere bei ausreichendem Schwerfeld absedimentiert, so enthält der Überstand bis $\frac{2}{3}$ des Lebergesamteiweißes. Erst eine nachfolgende Extraktion des Rückstandes mit 10%iger Kochsalzlösung setzt das Plasmosin in Lösung, das nach MIRSKY und POLLISTER die Nukleoproteide des Kernchromatins und basophiler Bestandteile des Cytoplasma umfaßt. Dieses Plasmosin, eine außerordentlich visköse Fraktion, stellt zusammen mit den in niedriger Kochsalzlösung löslichen, nachfolgend kurz als wasserlöslich bezeichneten Eiweißkörpern rund 95% des Lebereiweißes. Der letzte Rückstand kann lediglich in stärkerem alkalischem Milieu ($n/2$ NaOH) in Lösung gebracht werden und wurde Ellipsin genannt. Wie mikroskopische Kontrollen in verschiedenen Stadien der Extraktion (HOERR und BENSLEY) gezeigt haben, ist das Ellipsin das formgebende Element der Zelle. Als schwerlöslicher Lipoproteidkomplex ist es wahrscheinlich der Baustein der Zell- und Kernmembran (DALLAM).

Nach diesen Erfahrungen erscheint es gesichert, daß das von uns gewonnene Lebereiweiß das cytoplasmatische Eiweiß der Leberzelle ist und frei von Chromatinsubstanzen des Kernes und von korpuskulären Elementen und Gerüstsubstanzen des Cytoplasma gewonnen wurde. Wir konnten dies durch wiederholtes Zentrifugieren des Extraktes, wobei kein weiterer unlöslicher Rückstand absedimentierte, und mikroskopische Kontrolle des ersten Rückstandes nach der Aufschwemmung von Lebergewebe, wo im Ausstrich reichlich basophile Kernsubstanzen und mit Eosin angefärbtes Bindegewebe gefunden wurden, bestätigen. Es erscheint auch wesentlich, daß der größte Teil der hydrophoben Lipoproteidkomplexe bei der Zentrifugation infolge des hohen Lipidgehaltes aufrahmt und meist als dünnes hellgraues Häutchen entfernt werden konnte.

Da das Material aus einem enzymreichen Organ stammt, ist bei längerem Stehen der Aufschwemmung bzw. des abzentrifugierten Extraktes mit einer fortschreitenden Autolyse und damit Denaturierung und Abbau der Eiweißsubstanzen zu rechnen.

Für unser Vorgehen, bei dem während der zeitlich auf 8—10 Std begrenzten Aufarbeitung der Extraktaufschwemmung bei 3°C nur geringe autolytische Veränderungen zu erwarten waren, war vor allem die Haltbarkeit des fertigen Extraktes von Bedeutung, da die eiweißchemische Charakterisierung meist längere Zeit in Anspruch nahm (höchstens 1 Woche). Es wurde deshalb das Verhalten des Rest-N als Maßstab autolytischer oder eventuell bakterieller Zersetzungen, die auch durch den Zusatz von KCN gehemmt werden sollten, bei verschieden langem Abstehen der Extrakte geprüft. Bis 4 Tage nach der Aufarbeitung fand sich keine wesentliche Vermehrung des nichtkoagulablen Stickstoffes und erst nach 7 Tagen stieg dieser an, um nach 12 Tagen das 1,5fache des Anfangswertes zu erreichen. Die absolute Zunahme betrug dabei 0,17 mg Rest-N je Kubikzentimeter Extrakt, was einem Abbau von rund 6% des extrahierten Eiweißes entspricht. Im ganzen ist damit die Gefahr wesentlicher autolytischer Veränderungen am Extrakteiweiß nach Abtrennung der korpuskulären und unlöslichen Elemente im Laufe unserer Verarbeitungszeiten nicht mehr gegeben. Dies steht auch im Einklang mit der Erfahrung, daß die Fermentsysteme der Leberzelle vorwiegend in den korpuskulären Anteilen, wie Mitochondrien und Kern, verankert sind.

Die *Charakterisierung des wasserlöslichen Lebereiweißes* erfolgte mit physikalisch-chemischen Methoden wie sie auch für das Serumeiweiß üblich sind. Außerdem wurde bei einer größeren Zahl von Extrakten verschiedener Behandlungsstadien eine quantitative Aminosäurenanalyse durch Dr. GEROK ausgeführt [papierchromatographische Methode nach GEROK (1)].

Die *Aussalzbarkeit und Löslichkeitsabnahme in destilliertem Wasser* wurde in Anbetracht des geringen Ausgangsmaterials nephelometrisch kontrolliert. Nach einigen Versuchen mit Ammonsulfat als Fällungsmittel, das einen schmalen Ausfällungsbereich (25—55%ige Sättigung) im Bereich der Globulinfällung zeigte, wurde die Fällung des Extraktes mit Phosphatpuffer nach BUTLER und MONTGOMERY (p_H 6,5; spezifische Dichte $\rho = 1,29—1,32$) in gleicher Weise dargestellt wie am Mäuseserum (LETTERER und SCHNEIDER). Zur näheren Charakterisierung der schwerlöslichen Anteile wurde eine Fällung mit 4 n Kochsalzlösung bei p_H 6,9 entsprechend dem Vorgehen von GEROK (2) bei der Fibrinogenbestimmung im Blutplasma durchgeführt.

Das Vorgehen bei der Nephelometrie stützte sich auf die Methode der nephelometrischen Globulinbestimmung von SCHNEIDER (3). Der Übergang auf andere Fällungsmittel machte keine Schwierigkeiten. Lediglich beim Ansatz der Lösungen ist auf völlige Klarheit des Fällungsmediums zu achten. Dies gilt vor allem für den Phosphatpuffer, der nur mit bidestilliertem, völlig kalkfreiem Wasser und

analytisch reinsten Substanzen angesetzt werden darf. Jede Verunreinigung mit Kalzium führt zur Kalziumphosphatbildung und damit hohen Leerwerten vor der Eiweißfällung. Entsprechend der geringen Eiweißkonzentration der Extrakte wurde in jeden Trübungsansatz 0,015 cm³ unverdünnter Extrakt (etwa 0,15 mg Eiweiß) unter vorsichtigem Umrühren eingebracht. Für jeden Extrakt wurde der Trübungszuwachs in 13 verschiedenen Stufen einer Pufferlösung von 0,9—3,0 mol PO₄ bestimmt und in rel.-% als Fällungskurve (Nephelogramm) aufgetragen. Ablesung im Reagenzglas mit 6 cm³ Pufferlösung und bei Filter L 2 h und Vergleichshelligkeit 1 des Nephelometeransatzes zum Pulfrich-Photometer der Firma Zeiss.

Außerdem wurde eine Auftrennung des Extraktes mit der *Papierelektrophorese* in der feuchten Kammer nach WUNDERLY, SCHNEIDER und HUGENTOBLE versucht. In einigen Fällen wurden Pherogramme nach Elution des Farbstoffes aus 5 mm breiten Streifen und anschließender Kolorimetrie aufgezeichnet. Färbung mit Bromphenolblau unter Berücksichtigung des Umrechnungsfaktors 1,6 für die Serumglobuline [CREMER und TISELIUS, SCHNEIDER (4)].

Als weiteres physikalisch-chemisches Charakteristikum wurde die *Viskosität* des Extraktes im Ostwald-Viskosimeter (4,5 cm³ Inhalt, Wasserwert 61 sec) bei 18—20° C gemessen. Die Proteinkonzentration wurde auch für Vergleichsmessungen am menschlichen Serum und Blutplasma auf 1 g.-% standardisiert. Errechnung der Viskositätszahl $Z\eta$ nach der Formel von SCHULZ

$$Z\eta = \frac{\log T/T_0 \cdot 2,303}{c}.$$

Dabei entsprechen 1000 $Z\eta$ der im angloamerikanischen Schrifttum gebräuchlichen „intrinsic viscosity“ $[\eta'] \times 10^2$.

Mit diesen Methoden, welche die Ermittlung verschiedenartiger physikalisch-chemischer Eigenschaften des löslichen Lebereiweißes zum Ziele haben, wurden insgesamt 60 Extrakte untersucht, darunter 15 Leberextrakte gesunder Tiere. Der physikalisch-chemischen Analyse und der quantitativen Aminosäurenbestimmung, letztere von GEROK im Papierchromatogrammverfahren durchgeführt, ging eine quantitative Bestimmung der Extraktionsausbeute [s. SCHNEIDER (1) und (2)] voraus. Bei der Behandlung der Tiere wurde an dem bisherigen Schema festgehalten [LETTERER und SCHNEIDER, SCHNEIDER (2)]. Als Tiergruppen mit wesentlicher Steigerung des Stoffumsatzes und mit unterschiedlicher Extraktionsausbeute kamen je 15 Tiere nach 10 und 20 Injektionen sowie nach 20 Injektionen mit nachfolgender Pause von mindestens 10 Tagen zur Untersuchung. Außerdem wurde an 5 Extrakten von Tieren mit 15 Injektionen zusätzlich die Viskosität bestimmt. Histologische Kontrolle von Milz, Leber und Nieren im H.-E.- und Fettschnitt nach Formolfixierung.

Ergebnisse

a) Charakterisierung des wasserlöslichen Lebereiweißes

Wird das extrahierte Lebereiweiß in *Phosphatpufferlösungen* nach BUTLER und MONTGOMERY mit einer steigenden Konzentration von 0,5—3,0 mol eingebracht, so beginnt die Aussalzung bei 1,3 mol PO₄.

Unter Bildung einer Hauptfraktion sehr instabiler Proteine bei 1,3 bis 2,0 mol ist die Fällung bei 2,3 mol im wesentlichen abgeschlossen. Dabei hat sich meist kurz zuvor noch eine weitere Fraktion abgebildet. In den folgenden Stufen stellen sich noch bis 3,0 mol geringe Trübwerthanstiege ein, die zusammen mit der relativ kleinen vorhergehenden Fraktion auf das Vorliegen stabilerer Bestandteile hinweisen, aber quantitativ nicht sehr ins Gewicht fallen. Zudem konnte gelegentlich bei hoher Phosphatkonzentration eine leichte Flockenbildung beobachtet werden, so daß aus dem weiteren Kurvenverlauf nicht mit Sicherheit auf distinkte Fraktionen geschlossen werden darf.

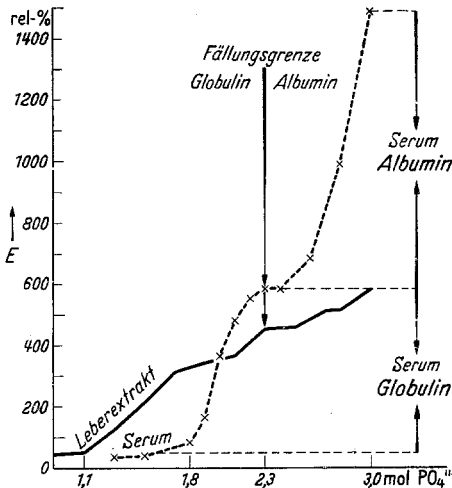


Abb. 1. PO_4 -Fällungskurve des Leberextraktes gesunder Tiere im Vergleich zur Fällungskurve des Blutserums gesunder Mäuse

Das der Abb. 1 unterlegte Nephelogramm eines normalen Mäuseserums [vgl. LETTERER (2)] besitzt den typischen Einschnitt der Albumin-Globulingrenze bei 2,3 mol. Da der größte Teil der wasserlöslichen Eiweißkörper der Leber unterhalb dieser Grenze ausfällt und bei der an 10 gesunden Lebern mit normaler Extraktausbeute ermittelten Mittelwertskurve der charakteristische Trübungszuwachs für Eiweiß-

körper vom Charakter des Serumalbumins fehlt, ist das wasserlösliche Lebereiweiß den Globulinen zuzuordnen. Für eine wesentliche Beimischung albuminartiger Proteine ergeben sich keine Anhaltspunkte. Die Globuline des Extraktes fallen aber in ihrem Großteil schon vor den Serumglobulinen, deren untere Fällungsgrenze bei 1,8 mol liegt. Demnach sind sie mit den Serumglobulinen nicht völlig identisch. Immerhin finden sich im Lebereiweiß auch stabilere Proteine, die erst knapp vor der Globulin-Albumingrenze ausfallen und damit Ähnlichkeit mit den Pseudoglobulinen des Serums besitzen.

Trotz des frühen Beginns der Fällung im PO_4 -Nephelogramm sind die Extrakte aus gesunden Lebern bei einer Aufschwemmung in 4 n Kochsalzlösung und in destilliertem Wasser ziemlich stabil (Abb. 2). Es kommt nur zu einem geringen Trübwerthanstieg, der bei der Kochsalzfällung etwa das Doppelte des Leerwertes in 0,9%iger Kochsalzlösung erreicht. Die Trübungsintensität einer Fibrinogenausfällung aus Blut-

plasma wird in keinem Falle erzielt, so daß der Schluß nahe liegt, daß das leicht lösliche Lebereiweiß keine leicht fällbaren Proteine von der Art des langgestreckten Fadenmoleküls Fibrinogen enthält. Der Einsalzeffekt des Extraktes bei einer Verdünnung mit destilliertem Wasser ist auffallend gering. Offenbar liegt in der Leber ein sehr inhomogenes Proteingemisch mit erheblichen Wechselwirkungen der Eiweißkörper untereinander vor, wie dies auch der flache Anstieg der Phosphatfällungskurve demonstriert. Dieses kolloidale System wird lediglich in hoher Ionenstärke durch mehrwertige Salze gefällt, wobei sich die

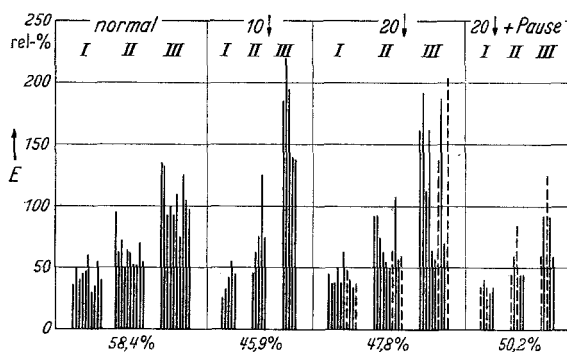


Abb. 2. Löslichkeit von Leberextrakten gesunder und behandelter Tiere. Die gestrichelten Linien sind Werte der Tiere mit Milzamyloid. In den einzelnen Gruppen bringt Spalte I Leerwert bei Verdünnung in 0,9 %iger Kochsalzlösung (zugleich Reinheitskontrolle). Spalte II geringe Ausfällung bei Verdünnung mit destilliertem Wasser (Einsalzeffekt). Spalte III Fällung in 4 n Kochsalzlösung von pH 6,8 (Fibrinogenprobe). Unter den einzelnen Versuchsgruppen die mittlere Extraktionsausbeute in Prozenten des Lebergesamteiweißes

leichter und schwerer fällbaren Globuline lange Zeit die Waage halten, wie dies das Verhalten gegenüber Kochsalz und destilliertem Wasser zeigt. Ein ähnliches Verhalten können gelegentlich stark dysproteinämische Seren mit erheblicher Albuminverminderung und starkem Anstieg der Pseudoglobuline bzw. des α -Globulins zeigen (Stabilitätserhöhung, d. h. Verkürzung des Weltmannbandes).

Im Einklang mit dem Vorherrschen grobdispenser Globuline bei der Salzfallung stehen die bisherigen Erfahrungen beim Versuch einer *elektrophoretischen Auftrennung* der löslichen Lebereiweißkörper auf dem Filterpapier oder in der freien Elektrophorese. Entsprechend der Komplexität des Proteingemisches ist bei beiden Methoden die Auftrennung unvollständig. Dazu fällt bei der Papierelektrophorese auf Grund der Unstabilität des größeren Proteinanteiles und wahrscheinlich als Folge eines relativ hohen Gehaltes der Leber an lipophilen und damit hydrophoben Kolloiden eine erhebliche Menge des aufgetropften Eiweißes am Startpunkt aus. Die noch wandernden Eiweißkörper zeigen wenig Neigung zur Auftrennung und es ist vereinzelt erst nach

partieller Autolyse des Organextraktes vor der Elektrophorese gelungen, einigermaßen reproduzierbare Diagramme mit Bildung mehr oder weniger distinkter Fraktionen zu erzielen (L. DEMLING; DEMLING, KINZLMEIER und HENNING). Wir sehen aber in der Autolyse eines zerriebenen Organbreies, der also noch sämtliche Enzyme der Zelle enthält, einen unkontrollierbaren Faktor und haben deshalb auf eine derartige Darstellung verschiedener Lebereiweißfraktionen und ihre quantitative

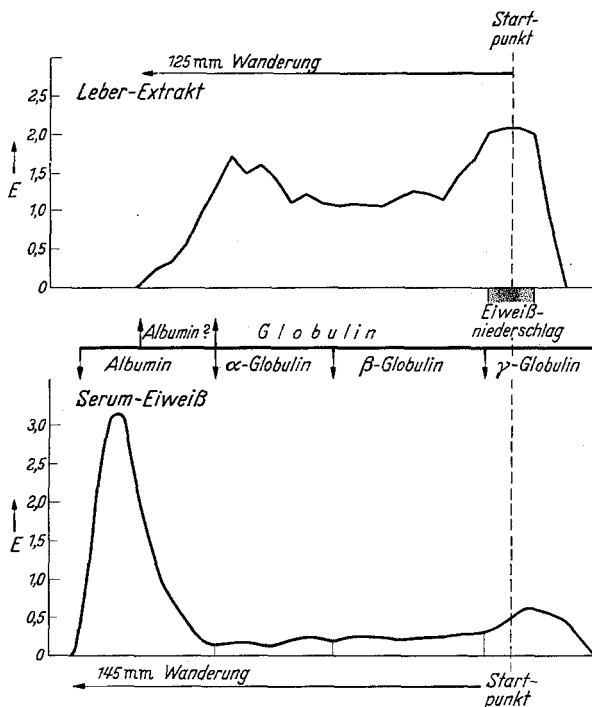


Abb. 3. Papierelektrophorese der löslichen Lebereiweißkörper im Vergleich zum Serum-Pherogramm der Maus. Startpunkt rechts, beachte die Unterschiede in der Wanderungsstrecke trotz völlig gleichen Versuchsbedingungen (Simultanlauf)

Bestimmung verzichtet. Vielleicht bringt einmal eine besondere Präparation des Papierses eine bessere Auftrennung zustande; bei Versuchen mit verschiedenen Puffergemischen, Papiersorten und auch nach Beimischung von Reinalbumin konnten wir zunächst keine bessere Auftrennung erzielen.

Lediglich die Bestimmung des Ladungscharakters der noch wandernden, nativen Lebereiweißkörper mittels Papierelektrophorese und im Vergleich zum Pherogramm des Normalserums erscheint möglich. Es wurde deshalb eine simultan laufende Auftrennung der Serumproteine der Maus und elektrophoretische Wanderung der löslichen Lebereiweiß-

körper durchgeführt. Wie Abb. 3 zeigt, ist dabei die Wanderung der nicht am Startpunkt ausgefallenen Leberproteine (oberes Pherogramm) durchweg geringer als die des Serumalbumins (unteres Pherogramm). Damit wurde auch mit der Papierelektrophorese in der blutfrei gespülten Leber der Maus kein Albumin nachgewiesen. Vergleicht man mit der Lebereiweißkurve das Serum-Pherogramm, so kommt es beim Leberextrakt im Wanderungsbereich des α - und β -Globulins des Serums zu einer Anreicherung der wandernden Fraktionen, ohne daß diese Bestandteile als völlig identisch mit den Serumbestandteilen gelten können. Denn es ist nicht angängig, schon aus *einer* Eigenschaft des Moleküls, wie hier der elektrischen Ladung, Schlüsse auf die gesamte Molekülbeschaffenheit zu ziehen.

Da die instabilen Leberproteine bei der freien Elektrophorese voll zur Darstellung kommen, möchten wir zur Abrundung der bisherigen Erkenntnisse noch die Werte von SOROF und COHEN wiedergeben, denen bis heute nach sorgfältiger Aufarbeitung der blutfrei gespülten Frischleber die beste, wenn auch noch unvollständige Auftrennung gelungen ist. Wiederum von einem Vergleich mit den gegenüber den menschlichen Serumfraktionen etwas rascher wandernden Komponenten des Mäuseserums ausgehend (Werte nach OTT und SCHNEIDER), ergeben sich in Tabelle 1 keine sicheren Anhaltspunkte für das Vorliegen einer Fraktion mit Albumincharakter. Werden die einzelnen Lebereiweißbestandteile entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit eingeordnet, so liegt die Beweglichkeit des Serumalbumin mit $u = 7,7-8,4$ deutlich über derjenigen der am raschesten wandernden und gleichzeitig auch kleinsten Fraktion N. Die etwas größere A-Fraktion kommt in den Bereich des Serum- α_2 -Globulins zu liegen und insgesamt wandern über 50% der löslichen Lebereiweißkörper (Fraktionen A, $\alpha_1 + \alpha_2$ und b) in der Höhe der Serum- α - und - β -Globuline. Als Besonderheit fanden

Tabelle 1. *Elektrophoretische Wanderung der einzelnen Komponenten des Mäuseplasmas und des Mäuseleberextraktes bei Veronalpuffer pH 8,6.*
(Beweglichkeit u in $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{sec}^{-1} \cdot 10^5$)

Albumin	Globuline						
	α_1	α_2	β_1	β_2	$\beta_2 + \varphi$	γ	
Mäuseplasma (OTT und SCHNEIDER)							
8,4—7,7	7,3—6,8	6,4—5,8	5,3—4,9	4,6—4,2	3,7—3,1	2,4—1,5	
Mäuseleberextrakt (SOROF und COHEN)							
	7,57	6,01	4,90	4,18	3,38	2,26	1,25 0,84 + 0,60
Fraktion							
	N	A	α_1	α_2	b	g	h_1 h_2 i

Größe der Fraktionen. Leber: N=3,0%; A=12,6%; α_1 —b=57,3%. Mäuseplasma: Albumin=45%; Globuline α_1 — β_2 =44,2%.

SOROF und COHEN drei weitere, bei p_H 8,6 nur unwesentlich anodisch bzw. sogar kathodenwärts wandernde Fraktionen, die wahrscheinlich den obengenannten außerordentlich labilen Proteinen entsprechen. Es können also auch mit der freien Elektrophorese wie der Papierelektrophorese albuminartige Eiweißkörper in der Leber nicht nachgewiesen werden. Dazu kommt eine Verwandtschaft der Leberglobuline mit den rascher wandernden Serumglobulinen, die keineswegs eine Identität bedeuten muß, aber im Hinblick auf das Verhalten bei der Ausfällung und in Beziehung zu den folgenden Aminosäureanalysen erwähnenswert ist.

Der *quantitative Aminosäurenbestand* des Lebereiweißextraktes gesunder Tiere ist, wie bereits mitgeteilt (LETTERER, GEROK und SCHNEIDER), sehr konstant. Im einzelnen entspricht der Aminosäurenbestand weitgehend dem der Serum- α - und Serum- β -Globuline, vor allem was die Aminosäuren mit Oxygruppen und die schwefelhaltigen Aminosäuren betrifft. In dem Gehalt an sauren und basischen Aminosäuren sowie in den einzelnen aliphatischen Aminosäuren sind gewisse Unterschiede zu konstatieren, ohne daß aber die Übereinstimmung in den großen Gruppen wesentlich gestört wird. Kommen wir an dieser Stelle auf das physikalisch-chemische Verhalten der Lebereiweißkörper hinsichtlich Fällbarkeit und Ladung zurück, so wird die Verwandtschaft zwischen Lebereiweiß und bestimmten Globulinen (vor allem dem α -Globulin) durch das Ergebnis der Aminosäureanalyse noch erhärtet. Denn es können, wie LETTERER, GEROK und SCHNEIDER an löslichen und unlöslichen und an bestimmte Strukturen bildenden Proteinen gezeigt haben, mit einem bestimmten Aminosäurenbestand auch gewisse Moleküleigenschaften, wie Löslichkeit, Ladung und Fähigkeit zur Strukturbildung, in engen Zusammenhang gebracht werden. Wir sind deshalb der Auffassung, daß die mit verschiedenen Methoden nachweisbare Ähnlichkeit zwischen dem löslichen Lebereiweiß und bestimmten Serumglobulinen nicht zufällig ist, sondern daß enge Beziehungen zwischen diesen beiden Substanzen wohl in dem Sinne bestehen, daß das *lösliche Lebereiweiß eine Vorstufe der α - und β -Globuline des Blutserums darstellt*. Zu dieser Annahme führen auch Beobachtungen an dysproteinämischen Tieren, bei denen zugleich und im Zusammenhang mit Veränderungen des Lebereiweißes die akute Phase der unspezifischen Dysproteinämie mit Anstieg des Serum- α - und - β -Globulins zu Tage tritt. Davon soll später noch eingehender die Rede sein. Weiterhin ist bemerkenswert, daß beide Substanzen sicherlich reichlich Lipotide enthalten.

Um die Charakterisierung des Lebereiweißes abzurunden, wurden auch *immunologische Versuche* durchgeführt. Zwei Kaninchen wurden mit je 8 cm³ Mäuseplasma, verteilt auf 8 Tage, sensibilisiert. Nach Feststellung eines Antikörpertiters von 1/5000 bzw. 1/10000 gegen

Mäuseserum wurde die Uhlenhut-Probe mit verschiedenen Leberextrakten gesunder Tiere angesetzt. Dabei fand sich lediglich eine unspezifische Ringtrübung bis zum Verdünnungsansatz 1/10. Derartige Ringtrübungen bei geringer Antigenverdünnung kommen bei der Uhlenhut-Probe nicht selten zur Beobachtung, ohne daß daraus Rückschlüsse auf eine echte Antikörper-Antigen-Präzipitation gezogen werden dürfen. DOLD bewertet deshalb erst Ringtrübungen bei Verdünnungen über 1/50 als positiv im Sinne einer echten Präzipitinreaktion. Das Ausbleiben einer Ringtrübung bei den Verdünnungsansätzen über 1/10 spricht also in unserem Falle dafür, daß trotz des Globulincharakters des Lebereiweißes und seiner Verwandtschaft zum Serum- α -Globulin im Aminosäurenbestand und elektrophoretischen Verhalten eines Großteils seiner Eiweißkörper keine völlige Identität besteht. Die Möglichkeit einer nahen Verwandtschaft beider Proteine bzw. eines raschen Überganges des einen in das andere ist damit aber nicht ausgeschlossen.

b) Veränderungen des löslichen Lebereiweißes bei dysproteinämischen Tieren

Mit dem Eintritt der akuten Phase der experimentellen Dysproteinämie nimmt, wie wir feststellen konnten (s. II. Mitteilung), die Extrahierbarkeit des Lebereiweißes ab. Der Extrakt wird zudem auch leichter mit Phosphatpuffer und 4 n Kochsalzlösung fällbar.

Nach Abb. 2 ist die Extraktionsausbeute der Tiere mit 10 und 20 Injektionen deutlich vermindert und beträgt auf einen Mittelwert berechnet 45,9% bzw. 47,8% gegenüber 58,4% Normalwert. Gegenüber der Norm wird auch ein vermehrter Anteil dieser Proteine durch 4 n Kochsalzlösung ausgefällt, und die Stabilität gegenüber der Verdünnung mit destilliertem Wasser ist etwas herabgemindert. Erst nach 20 Injektionen und einer vor der Untersuchung liegenden injektionsfreien Pause von mindestens 10 Tagen, also in einem Stadium, in welchem die Serum-eiweißveränderungen sich in der Regel dem Normalwert wieder angleichen und die bereits dargestellten Organveränderungen (Zunahme des relativen Organgewichtes, N- und Eiweißfaktors und Veränderungen der prozentualen Zusammensetzung der Leber) ihren Höhepunkt deutlich überschritten haben, hat sich wieder eine Normalisierung der Fällbarkeit der Extrakte eingestellt. Die Veränderungen im Verlaufe des amyloidkrank machenden Versuches und der damit einhergehenden unspezifischen Dysproteinämie sind besonders deutlich aus den Phosphatfällungskurven (Abb. 4) abzulesen. Hier bringt die frühe Phase der Eiweißstoffwechselumstellung deutliche Hinweise für eine Stabilitätsverminderung der löslichen Leberproteine. Nach 10 Injektionen ist die Eiweißfällung bei einem geraden Anstieg der Fällungskurve, die keine Fraktionierung erkennen läßt und deshalb auf eine starke Inhomogenität des Proteingemisches hinweist, in einer Phosphatkonzentration von

2,5 mol komplett. Nach 20 Injektionen zeigt sich nur eine geringe Trübungszunahme oberhalb dieser Grenze und nach einer an die Injektionen sich anschließenden Pause von mindestens 10 Tagen ist das normale Fällungsbild wieder erreicht. Bemerkenswert ist, daß in keiner Behandlungsphase die obere und untere Grenze der Fällbarkeit des Leberextraktes gesunder Tiere über- bzw. unterschritten wird. Da somit der normale Fällungsbereich gewahrt ist, liegt der Schluß

nahe, daß es sich bei den Abweichungen im Kurvenverlauf lediglich um quantitative Veränderungen innerhalb vorbestehender Proteinfractionen handelt und die *Qualität* des löslichen Lebereiweißes sich durch die Behandlung nicht grundlegend geändert hat.

Wir können dies durch Befunde bei der Aminosäurebausteinanalyse bestätigen. Wurde am Leberextrakt verschieden lang behandelter Tiere die *papierchromatographische Analyse* der Aminosäurebestandteile durchgeführt, so waren sämtliche im Leberextrakt gesunder Tiere feststellbaren Aminosäuren auch hier nachweisbar. Im quantitativen Amino-

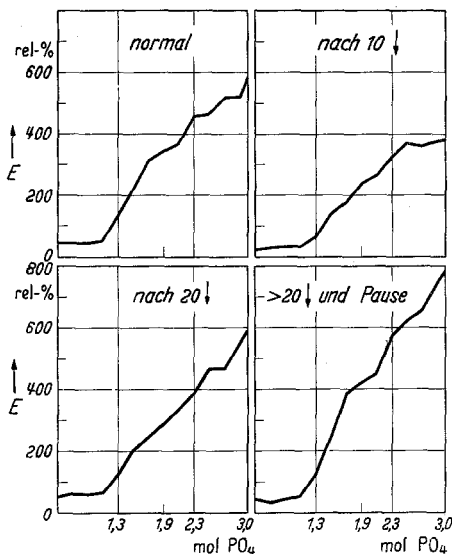


Abb. 4. Nephelogramm der löslichen Lebereiweißkörper (PO_4 -Fällung) in verschiedenen Stadien der Behandlung

säurenbestand zeigten je 5 Leberextrakte von Tieren mit 10 und 20 Injektionen trotz deutlicher Abnahme der Extraktionsausbeute und eines Anstiegs des Leber-Rest-N auf das $1\frac{1}{2}$ fache keine ins Gewicht fallenden Veränderungen (Tabelle 2). Lediglich das bereits im Normal-extrakt nur spärlich vorhandene Methionin war unter die Grenze einer exakten Meßbarkeit abgesunken. Damit dürften die in denselben Versuchsstadien feststellbaren physikalisch-chemischen Abweichungen von der Norm lediglich Ausdruck kolloidaler Zustandsänderungen und nicht einer einschneidenden Veränderung der chemischen Zusammensetzung sein. Ob die Verminderung des Methionins unter die Grenze einer exakten Meßbarkeit für unseren Fall eines erhöhten Eiweißeinbaues in die Leber und einer Steigerung des Rest-N, d. h. verstärkten Eiweißum- und -abbaues von Bedeutung ist, läßt sich nicht sicher sagen. Immerhin ist auffällig, daß im Rahmen dieser Stoffwechsel-

Tabelle 2. *Bausteinanalyse der wasserlöslichen Leberproteine.*
(Nach Dialyse gegen Wasser; Konzentration in Mol.-%)

	Leberextrakt von Tieren mit		Normalbefund ¹ mit Mittelwert ()
	10 Injektionen	20 Injektionen	
Glycin	6,9— 8,0	7,6— 8,1	6,8— 7,8 (7,4)
Alanin	8,1— 8,9	7,8— 9,3	7,9— 8,9 (8,3)
Valin	6,9— 8,1	7,4— 8,4	6,4— 8,1 (7,2)
Leucin + Isoleucin	10,9—13,6	10,9—14,5	11,1—14,0 (12,2)
Gruppe I	32,8—38,6	33,7—40,3	(35,1)
Serin	6,2— 7,7	5,3— 6,1	5,0— 7,2 (6,1)
Threonin	5,1— 5,7	5,0— 5,5	4,6— 5,4 (5,2)
Gruppe II	11,3—13,4	10,3—11,6	(11,3)
Cystein	1,0— 1,8	1,1— 1,9	1,0— 2,2 (1,7)
Methionin	nur in Spuren		1,5— 1,8 (1,6)
Gruppe III	1,0— 1,8	1,1— 1,9	(3,3)
Asparaginsäure	10,2—12,0	10,0—10,8	9,7—12,6 (11,0)
Glutaminsäure	13,9—20,2	13,5—14,9	14,9—16,8 (15,8)
Gruppe IV	24,1*—32,2	23,5—25,7	(26,8)
Lysin	6,5— 7,3	4,8— 6,3	5,8— 6,7 (6,4)
Arginin	3,9— 4,9	4,0— 5,1	4,4— 5,1 (4,7)
Gruppe V	10,4—12,2	8,8—11,4	(11,1)
Phenylalanin	2,8— 3,2	1,7— 3,1	2,6— 3,2 (2,9)
Tyrosin	3,0— 3,3	2,5— 3,4	2,7— 3,5 (3,5)
Gruppe VI	5,8— 6,5	4,2— 6,5	(6,1)
Prolin	3,3— 4,9	2,0— 4,5	3,6— 4,7 (4,1)
Extraktionsausbeute	47,8 %	49,8 %	62,1 %
Rest-N in % des Leber-Gesamt-N	9,4	9,7	6,3

¹ Werte der wasserlöslichen Leberproteine gesunder Tiere nach LETTERER, GEROK und SCHNEIDER.

änderungen zeitweilig ein relativer Mangel an Methionin auftritt, das als exogene Aminosäure für die Eiweißbildung unentbehrlich ist.

Einen weiteren Beitrag zur physikalisch-chemischen Charakterisierung des löslichen Lebereiweißes bringt die *Viscosimetrie*. Es gelingt mit der SCHULZschen Viscositätszahl $Z\eta$, die eine konzentrations-unabhängige Größe und Materialkonstante gibt, gewisse Charakteristika für die Molekülform (globär, fibrillär oder Aggregate aus Stäbchen) und die Molekülgröße zu geben. Zudem ist das Verfahren außerordentlich empfindlich und jede Zustandsänderung eines Kolloids zeigt sich in Veränderungen der Viscositätszahl an. Im einzelnen liegt die Viscositätszahl für globäre Proteine um 0,004—0,01 und für Fadenmoleküle mit Ausnahme des relativ wenig gestreckten Fibrinogens zwischen 0,075—0,155 (HASSELBACH und SCHNEIDER). Noch höhere Werte lassen

Tabelle 3. Die Viskosität des Leberextraktes gesunder und behandelter Tiere im Vergleich zur Viskosität reiner Proteine und von Proteingemischen bekannter Zusammensetzung

	Viscositätszahl $Z\eta$	Intrinsic viscosity $[\eta'] \cdot 10^2$
<i>Leberextrakte:</i>		
Normalbefund	0,0055	5,5
Nach 10 Injektionen	0,00985	9,85
Nach 15 Injektionen	0,00834	8,34
Nach 20 Injektionen	0,01054	10,54
Menschliches Blutplasma	0,0063	6,3
<i>Sphärokolloide:</i>		
Albumine ¹		
Ovalbumin		4,3
Serumalbumin (Pferd)		4,9
(Mensch)		4,2
Globuline des menschlichen Serum ²		
α_1 -Globulin		6,6
α_2 -Globulin		9,2
β_1 -Globulin		5,5
γ -Globulin		6,0
<i>Fadenmoleküle:</i>		
Fibrinogen ¹		25,0
Tropomyosin ¹		52,0
Kollidon ³		175,5
<i>Eiweißstäbchen und Eiweißfäden aus Eiweißmicellen:</i>		
Gelatine ³		191,0
L'Myosin ³		175,0
F-Aktin ⁴		260,0
Aktomyosin ⁵ (je nach Zusammensetzung)		460,0—980,0

¹⁻⁵ Werte nach J. T. EDSALL in „The Proteins“ Bd. IB, 692 (1), nach J. T. EDSALL in Adv. of Protein Chem. III, 460 (2) und nach H. H. WEBER und B. V. KEREKJARTO (3), HASSELBACH und SCHNEIDER (4) und F. JAISLE (5).

auf eine stäbchen- oder fadenförmige Micellarstruktur (Aktomyosin) schließen. Wird $Z\eta$ auf die in der anglo-amerikanischen Literatur gebräuchliche Bezeichnung „intrinsic viscosity“ mit der Formel $[\eta'] \cdot 10^2 = 1000 Z\eta$ umgerechnet, so bietet sich weiterhin ein Vergleich mit den Werten für reine Proteine mit weitgehend durch andere physikalisch-chemische Methoden aufgeklärter Molekularstruktur.

Es wurden nun die Viscositätszahlen für Leberextrakte gesunder und behandelter Tiere bestimmt. Gleichzeitig wurde die Viscositätszahl von menschlichem Plasma als Vergleichswert ermittelt und den Befunden an reinen Proteinlösungen zur Seite gestellt (Tabelle 3). Es zeigt sich dabei, daß der Leberextrakt gesunder Tiere die Viscosität von Serumglobulinen besitzt. Da die Viscositätszahl von Serumalbumin und Ovalbumin deutlich geringer ist, liegt wiederum der Schluß nahe,

daß das wasserlösliche Lebereiweiß keine wesentliche Mengen an albuminartigen Proteinen enthält. Wenn das menschliche Blutplasma eine Viscositätszahl in der Größenanordnung der Globuline besitzt, so ist dies als Folge seines Gehaltes an Fibrinogen anzusehen, das als angedeutet fibrilläres Protein bereits in geringer Zumischung die Viscosität des Plasma wesentlich beeinflusst und damit den prozentual hohen Gehalt des Blutplasmas an Albumin kompensiert. In Verbindung mit dem übrigen physikalisch-chemischen Verhalten des Extraktes kann aus der Ähnlichkeit der Plasmaviskosität mit der des löslichen Lebereiweißes allein nicht der Schluß gezogen werden, daß das Lebereiweiß Fibrinogen enthält. Vielmehr liegt es nahe, ein Gemisch globärer, wahrscheinlich globulinartiger Eiweißkörper in der Leberzelle zu vermuten.

Im Verlaufe der bei der experimentellen Dysproteinämie sich einstellenden Veränderungen des Lebereiweißes steigt nun die Viscositätszahl fast auf das Doppelte des Normalwertes an, erreicht aber weder die Werte für Fadenmoleküle wie Fibrinogen und Kollidon, noch die der Eiweißstäbchen Gelatine und L'Myosin oder des hochviscösen Aktomyosinkomplexes. Auch erscheint es wenig wahrscheinlich, daß der Leberextrakt in irgendeiner Phase der amyloidkrank bzw. dysproteinämisch machenden Behandlung wesentliche Mengen derartiger Bestandteile enthält, da deren Viscosität mindestens eine Zehnerpotenz höher liegt und nach der Mischregel von WEBER und v. KEREKJARTO schon bei geringer Zumischung derartiger Proteine die Gesamtviskosität viel stärker ansteigen müßte. Die aus Tabelle 3 ersichtlichen weiteren Abweichungen der stark erhöhten Viskositätszahl nach 15 und 20 Injektionen von dem Wert nach 10 Injektionen sind nicht weiter ausdeutbar, da hier auch die Auswahl der Tiere eine gewisse Rolle spielen kann. Die Viscositätszunahme der Extrakte unter der Behandlung ist indessen hinreichend gesichert. Sie setzt früh ein, reiht sich damit folgerichtig an die Veränderungen der Salzfallbarkeit der Extrakte an und ist ein weiterer Hinweis auf durchgreifende Veränderungen am Zellplasma, was auch aus der relativen Abnahme der wasserlöslichen und Zunahme der unlöslichen strukturbildenden Zellsubstanz abzulesen war. Darüber hinaus ist es wichtig festzustellen, daß die stärkste Viscositätszunahme in das Stadium der Leberzellhyperplasie und der stärksten Bluteiweißveränderungen fällt. Offenbar bildet die Leber zu Beginn der experimentellen Dysproteinämie vermehrt strukturiertes Eiweiß und grob disperse wasserlösliche Eiweißkörper. Da auch in der Leber der prozentuale Gesamteiweißgehalt gleichbleibt bzw. eine Tendenz zum Abfall zeigt, ähneln diese Veränderungen des kolloidalen Zustandes der Leberzellproteine im ganzen gesehen dem im Serum als inversen Regulationsmechanismus bezeichneten Vorgang einer Globulinzunahme, d. h. Vermehrung der grobdispersen Phase auf Kosten der feindispersen.

Die histologische Kontrolle von Milz, Leber und Nieren sämtlicher Tiere ergab bei 4 Mäusen aus den Tiergruppen mit 20 Injektionen einen Amyloidbefall der Milz. Es zeigten sich einfache Ringe von Amyloidsubstanz jeweils um mehrere Follikel der Milz. Lediglich bei einem Tier, das auch in Venen und Capillaren der Leber Amyloid aufwies, berührten sich die Ringe gegenseitig. Eine diffuse Amyloidose der Milz war in keinem Fall aufgetreten. Damit ist nach LETTERER (1) bei diesen Tieren der Amyloidstärkegrad 1—2 erreicht. Eiweißchemisch zeigten diese Tiere eine Verminderung der Extraktionsausbeute an der Leber, die bei den beiden Tieren der letzten Gruppe (20 Injektionen + 10 Tage Pause) mit einem Mittel von 42,3% deutlich unter den Werten bei den übrigen Tieren dieser Gruppe lag (Abb. 2). Indessen zeigten auch die amyloidfreien Tiere der vorhergehenden Behandlungsstadien gelegentlich gleich niedrige Werte, so daß daraus, wie bereits in der vorhergehenden Mitteilung festgestellt wurde, *nicht* auf eine für den Amyloidbefall spezifische Veränderung des Chemismus der Leber geschlossen werden darf.

Was das qualitative Verhalten der Leberextrakte der Amyloidtiere betrifft, so war bei den Tieren der Gruppe mit 20 Injektionen die Fällbarkeit gegenüber 4 n Kochsalzlösung gleichermaßen erhöht wie bei den übrigen Tieren dieser Gruppe. Die Amyloidtiere der letzten Gruppe zeigten wie die amyloidfreien Tiere eine normale Fällbarkeit. Leider waren sämtliche Tiere, bei denen eine quantitative Aminosäurenanalyse und eine viscosimetrische Charakterisierung der Leberextrakte durchgeführt werden konnte, ohne Amyloidbefall. Deshalb sind unsere Aussagen über eventuelle qualitative Veränderungen des Leberextraktes bei Amyloidbefall beschränkt. Es zeichnet sich aber auch hier wieder die Tatsache ab, daß dem Amyloidbefall wohl deutliche Veränderungen im Eiweißbestand der Organe und im kolloid-chemischen Verhalten des Lebereiweißes vorausgehen. Diese Veränderungen laufen aber bei amyloidfreien wie später von Amyloid befallenen Tieren in gleicher Art und weitgehend auch in gleicher Stärke ab. Es tritt daher weder an den Organen noch im Zuge der in 2 Phasen ablaufenden Bluteiweißveränderungen in irgendeiner Phase der Behandlung ein etwa amyloid-spezifisches Bild auf, welches die Amyloidose als „Stoffwechselentgleisung“ bzw. als Paraproteinoase charakterisieren könnte.

Besprechung

Nach der Darstellung der eiweißchemischen Veränderungen an den Organen soll nun abschließend versucht werden, unsere Erkenntnisse im Zusammenhang mit dem Ablauf der Bluteiweißveränderungen zu betrachten. Trotz der Komplexität beider Vorgänge erscheint es möglich, eine synoptische Darstellung zu geben, da ihre Dynamik weitgehende Ähnlichkeiten aufweist.

Gehen wir von den Serumveränderungen aus, so zeigt es sich, daß der biphasische Ablauf der experimentellen Dysproteinämie (LETTERER und SCHNEIDER) von bestimmten, bei sämtlichen behandelten Tieren gleichartigen Organveränderungen an Milz und Leber begleitet ist. In der akuten Phase der stärksten Bluteiweißveränderungen mit Zunahme des Albumin/Globulin-Quotienten und Hervortreten der α -Globulinvermehrung, die mehr oder weniger deutlich ein Ausdruck der Irritation des Stoffwechsels ist, kommt unmittelbar nach Beginn der Behandlung ein Umbau der Organe zustande. Es wird innerhalb von 10 Tagen Eiweiß in einer dem gesamten zirkulierenden Plasmaeiweiß unmittelbar vergleichbaren Menge in Leber und Milz eingebaut, und in der vergrößerten Leber zeigt sich der von HASHIMOTO und PICK am Meerschweinchen beobachtete Zustand: Gesamtstickstoffgehalt gleichbleibend, Eiweiß vermindert und Rest-N vermehrt. Die weitere Analyse ergibt dabei die absolute Vermehrung des Lebergewebes und quantitativ-morphologisch betrachtet die Leberzellhyperplasie. Diese ist begleitet von einem charakteristischen Wandel des physikalisch-chemischen Verhaltens des Lebereiweißes in dem Sinne, daß das wasserunlösliche Lebereiweiß relativ und absolut zunimmt und das lösliche Eiweiß, wenn auch in seinem absoluten Bestand nur unwesentlich vermindert, so doch deutlich grobdispers geworden ist. Dementsprechend ist es leichter fällbar und hat eine höhere Viskosität.

Hat das Tier diesen Umbau seiner Organe und vor allem auch die celluläre Transformation seiner Milz abgeschlossen, was sich in einer Normalisierung des relativen Gehaltes an wasserlöslichem Eiweiß und in einem nunmehr wieder der Norm angeglichenen physikalisch-chemischen Verhalten seines Lebereiweißes äußert, so ist auch der Höhepunkt der Dysproteinämie überschritten und es bildet sich eine 2. Phase der Bluteiweißveränderung aus. Diese ist durch einen Wiederanstieg des γ -Globulins und Abfall der α -Globulinvermehrung sowie geringen Anstieg des β -Globulins und Fibrinogens gekennzeichnet (LETTERER und SCHNEIDER). Sowohl das Bluteiweißbild wie das histologische und das eiweißchemische Verhalten der Organe lassen zu diesem Zeitpunkt eine gewisse Einregulation des Stoffwechsels, insbesondere der Milz und Leber, auf die schädigende Noxe erkennen. Diese Regulation geht sogar soweit, daß trotz der Fortsetzung der Eiweißinjektionen das Serumeiweißbild eine Normalisierung in ähnlicher Weise wie das Organeiweiß anstrebt. Der Umbau von Milz und Leber ist abgeschlossen und es hat sich auch morphologisch in der Leber mit dem Eintritt einer Zellhypertrophie eine Daueranpassung eingestellt.

Fragt man nach den Mechanismen, deren sich der Organismus bei diesem Vorgang bedient, so wird eiweißchemisch wie histologisch betrachtet kein neuartiger Weg beschritten, sondern der Organismus

bedient sich der bereits in seiner orthischen Biotik vorgezeichneten Reaktionsmöglichkeiten. Dies geht in dieser Studie besonders eindrucksvoll aus den Aminosäurebefunden am kolloid-chemisch veränderten Leberextrakt hervor, da der normale quantitative Aminosäurenbestand völlig gewahrt bleibt. Auch die für bestimmte Fällungsmittel am Leberextrakt gesunder Tiere charakteristischen Fällbarkeitsgrenzen werden in keinem Fall unter- oder überschritten. Damit ergibt sich in keiner Phase ein Anhaltspunkt für das Auftreten oder die Produktion organ- und blutfremder, d. h. krankhaft abgewandelter Proteine.

Im Hintergrund dieses im Bluteiweißbild und im Chemismus der Organe wie im feingeweblichen Verhalten gleichermaßen zum Ausdruck kommenden Geschehens, das den Beweis enger Beziehungen zwischen Bluteiweiß und Gewebeiweiß von Leber, Milz und Nieren bringt, stehen noch wichtige Einzelerkenntnisse über den Chemismus der Leber und jetzt auch deutbare Zusammenhänge zwischen geweblichen Reaktionen und der Vermehrung bestimmter Bluteiweißfraktionen. Es zeigt sich deutlich, daß die Leber zu einem hohen Prozentsatz wasserlösliche Eiweißkörper enthält, die Globulincharakter haben und zu einem nicht geringen Anteil sowohl entsprechend ihrer Fällbarkeit wie nach Viskosität, elektrophoretischer Wanderung und quantitativem Aminosäurenbestand dem Serum- α - und - β -Globulin nahestehen. Indessen sind diese Eiweißkörper mit den Serumproteinen nicht völlig identisch. Wie die immunologischen Studien und auch die mit physikalisch-chemischen Methoden darstellbaren Differenzen beweisen, ist es daher nicht zugänglich, in der Leberzelle schon fertige Bluteiweißkörper zu suchen. Vor allem enthält die Leber kein sicher nachweisbares Albumin und Fibrinogen. Es ist also nicht möglich, den Anstieg einer Serum-Eiweißfraktion und den gleichzeitig erfolgenden Abfall einer sich elektrophoretisch weitgehend ähnlich verhaltenden Leberproteinfraktion dahingehend zu deuten, daß die Leber das Serumprotein in fertiger Form abgegeben habe. Vielmehr liegt es nahe, daß das Eiweiß erst beim Durchtritt durch die Zellmembran seine endgültige Form als Bluteiweiß erhält. Wenn auch die Leber im Zentrum des Stoffwechsels steht, so weist vor allem die bereits vorgelegte Berechnung der Bilanz des Stickstoffes und Eiweißes, auf Grund deren zu ersehen ist, daß sich trotz erheblichem Eiweißeinbau in die Organe keine wesentliche Verminderung des Serumgesamteiweißes ergibt, auf andere Faktoren im Stoffwechselgeschehen, wie Eiweißgehalt weiterer Gewebe und die exogene Eiweißzufuhr hin, die offenbar eine große, aber heute noch nicht voll übersichtbare Rolle spielen. Wahrscheinlich ist die Leber nur Durchgangsstätte für das Eiweiß und seine Bausteine, wobei intermediäre Stoffwechselvorgänge sich vielfach überschneiden und die Vorstellung einer Aufnahme von

nicht eiweißartigen N-Substanzen und der Abgabe fertigen Bluteiweißes zu einfach erscheint.

Bis jetzt läßt sich also lediglich nachweisen, daß bei der experimentellen Dysproteinämie im Serum- und Lebereiweiß gleichgerichtete Veränderungen in dem Sinne auftreten, daß im akuten Stadium der Dysproteinämie der Gesamteiweißbestand der Leber, bezogen auf das Körpergewicht, zunimmt, während derjenige des Serum nur unwesentlich abnimmt und die Löslichkeit der Leber- und Serumeiweißkörper nach Art des inversen Regulationsmechanismus, wie ihn WUHRMANN und WUNDERLY am Serum nachgewiesen haben, vermindert ist. Daß dabei im Blutserum das α -Globulin als rasch mit einer Vermehrung reagierende Komponente eine wesentliche Rolle spielt, ist in Anbetracht der Verwandtschaft eines Großteils der Leberproteine mit dieser Fraktion nicht auffällig. Vielleicht ist diese Serumfraktion, die nach heutiger Ansicht auch manche funktionelle Ähnlichkeiten mit dem Serumalbumin hat, in einer leicht disponiblen Vorstufe in der Leber vorhanden und kann bei Bedarf und insbesondere wenn das Serumalbumin schwindet, rasch in das Blut übertreten. Es sei an dieser Stelle auch darauf hingewiesen, daß bei jeder stärkeren Irritation des Organismus und jedem vermehrten Austausch zwischen Blut und Gewebe diese Komponente im Serum sofort ansteigt. So ist die α -Globulinzunahme das wesentliche Charakteristikum der akuten entzündlichen Reaktionskonstellation von WUHRMANN und WUNDERLY. Ähnliche Serumeiweißveränderungen sind bei ausgedehnten Nekrosen, wie z. B. dem frischen Myokardinfarkt zu beobachten (WUHRMANN). Auch nach Röntgenbestrahlung stellt sich ein rascher Anstieg der α -Globuline ein (HÖHNE, JESTER und KUNKEL), der im Experiment offenbar in engem Zusammenhang mit der verabreichten Strahlendosis steht (BAUER, PILLER und SCHNEIDER). Bei Stoffwechselkrankheiten, insbesondere im Coma diabeticum fand SCHEURLLEN (1) eine starke Reaktion des α -Globulins und schließlich kann ein starker Eiweißverlust (Blutverlust, Plasmapherese) und auch die Nephrose und eine Eiweißverarmung des Organismus durch langdauernden Hunger zu einer wesentlichen Vermehrung der α -Globuline und in geringerem Grad der β -Globuline führen (ZELDIS und ALLING, WERNER). Erwähnenswert sind noch ähnliche Bluteiweißbefunde von GJESSING und CHANUTIN bei Verbrennungsversuchen und von KOSLOWSKI, HARTMANN und VOGEL beim experimentellen Crush-Syndrom. Auf Grund eigener Beobachtungen beim Amyloidversuch (OTT und SCHNEIDER) und vor allem nach Cortisonverabreichung bei der Maus [SCHNEIDER (5)] haben wir enge Beziehungen zwischen der α -Globulinzunahme und Stoffwechselumstellungen im Sinne einer negativen Stickstoffbilanz vermutet, was SCHEURLLEN (2) vom klinischen

Blickpunkt aus weitgehend unterbauen konnte. Für die Deutung der sog. ersten Phase der unspezifischen Dysproteinämie haben BENNHOLD und OTT in einer kritischen Wertung des Eiweißspektrums und seiner klinischen Bedeutung den charakteristischen Albuminabfall mit entsprechender Vermehrung des α_2 -Globulins und weniger konstantem Anstieg des α_1 - und β -Globulins mit einer katabolischen Stoffwechseleinstellung, einem Luxusverbrauch von Eiweiß, einer Gewebszerstörung, Exsudation und Destruktion in Verbindung gebracht. Damit tritt vom klinischen wie experimentellen Standpunkt aus die besondere Rolle der α -Globuline beim gesteigerten Stoffumsatz und vor allem bei jedem vermehrten Austausch zwischen Blut und Gewebe deutlich hervor. Dies bezieht sich insbesondere auf den an die Schädigung noch nicht adaptierten Organismus.

Das γ -Globulin fällt nach unseren Beobachtungen in der Phase des Organumbaues, also beim Anlaufen der geweblichen Reaktionen, deutlich ab. Es steigt erst wieder an, wenn der Umbau der Milz und die Proliferation lympho-histioeytärer Zellherde in der Leber abgeschlossen sind. Man geht deshalb wohl nicht fehl, die Entstehung mancher Globuline und dabei vor allem des γ -Globulins in der Milz und im aktiven Mesenchym der Leber zu suchen.

Unsere Beobachtungen bringen, was die Löslichkeitsverminderung des Lebereiweißes bei dysproteinämischen Zuständen und den Gesamteiweiß- und Rest-N-Gehalt der gesunden Leber betrifft, eine Bestätigung der vor Jahren schon erhobenen Befunde von BERGER und BLEYER. Jedoch fanden wir im Leberextrakt gesunder und dysproteinämischer Tiere kein Albumin und müssen deshalb den Begriff eines Albumin-Globulinquotienten für das Lebereiweiß ablehnen. Dieser von BERGER und BLEYER durch Mg-Sulfatfällung ermittelte Quotient ist wohl Ausdruck für das Vorliegen verschiedenartiger Proteine in der Leber. Doch es steht heute fest, daß bei der Aussalzung von Serumproteinen in der mit Albumin bezeichneten Stufe auch Pseudoglobuline und vor allem das elektrophoretisch sich als α -Globulin charakterisierende Protein mit zur Ausfällung kommen können (GUTMAN, PEDERSEN). Wir vermuten daher, daß BERGER und BLEYER diese Fraktion als Albumin angesehen haben. Wenn sie aber mit der Mg-Sulfatmethode im Kaninchenserum durchschnittlich 75% Albumin gefunden haben, so ist dies gegenüber den elektrophoretischen Befunden (50—55% Albumin) zu hoch und wiederum ein Beweis, daß auch andere Proteine zusammen mit dem Albumin bei der Aussalzung ausgefällt wurden. Im Leberextrakt gesunder Kaninchen fanden sie etwa 32% „Albumin“ und es muß vermutet werden, daß sie dabei innerhalb der „Albuminfraktion“ auch diejenigen Proteine ausgefällt haben, die bei unseren Bestimmungen sich als Pseudoglobuline erwiesen. Entsprechend diesen Erhebungen

bei den Normaltieren fanden BERGER und BLEYER dann auch in der Leber ihrer dysproteinämischen Tiere vermehrt „Albumin“ und eine Erhöhung des Albumin-Globulinquotienten. Unsere und die Befunde anderer Untersucher, wie ORGLMEISTER u. a. weichen davon aber wesentlich ab. Wir halten die beobachtete Vermehrung grobdisperser Proteine in der weniger erschöpfend extrahierbaren Leber vor allem deshalb für stichhaltig, weil sich die Dispersitätsänderung mit mehreren, voneinander unabhängigen Methoden gleichartig nachweisen ließ und auch vom physikalisch-chemischen Standpunkt aus eine Zunahme der Fällbarkeit eines Proteins bei gleichzeitig verminderter Extrahierbarkeit viel wahrscheinlicher ist als ein umgekehrtes Verhalten.

Aus den vergleichenden Befunden an der Leber und am Bluteiweiß könnte man die Vorstellung entwickeln [LETTERER (3)], daß der von uns erzeugten Dysproteinämie eine erhöhte Proteolyse mit graduell verschiedenem Abbau der einzelnen Bluteiweißfraktionen und einem daraus sich herleitenden Albuminverlust durch Übergang dieser Fraktion in Polypeptide und andere niedermolekulare Eiweißbausteine zugrunde liegt. Entsprechend dem Albuminverlust würde dann Globulin nachgeschoben und dieses dann wieder aus den leichter und schließlich schwerer löslichen oder gar unlöslichen Zellproteinen seine Ergänzung finden. Die Leber würde hierbei eine Schlüsselstellung einnehmen. Man könnte aus ihrem Umbau und den Veränderungen ihrer wasserlöslichen Fraktion den Schluß ziehen, daß sie vor allem zu Beginn vermehrt unlösliche Eiweißsubstanzen bildet, um einerseits ihr stoffwechselaktives Parenchym zu vergrößern und um andererseits graduell unterschiedlich und mehr oder weniger schnell wasserlösliche Proteine abzugeben. Dabei könnten die α -Globuline als weitgehend vorgebildete und rasch zur Verfügung stehende Komponente eine wesentliche Rolle spielen. Diese Vorstellung kann durch die meisten unserer Befunde gestützt werden. So fand sich im Blut und Lebergewebe zugleich das inverse Verhalten von leicht und schwerer löslichen Bestandteilen und auch ein erhöhter Rest-N-Gehalt der Leber während der Dysproteinämie. Indessen fehlen noch jegliche Anhaltspunkte für einen unmittelbaren Übergang von Globulin in Serumalbumin. Eine solche Umwandlung wird zumindest im Milieu des strömenden Blutes noch sehr angezweifelt.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

- BAUER, R., S. PILLER u. G. SCHNEIDER: Strahlenther. 1955. — BENNHOLD, H., u. H. OTT: Klin. Gegenw. 1, 623 (1955). — BENSLEY, R. R.: Biol. Symp. 10 (1943). — BERGER, W., u. L. BLEYER: Z. exper. Med. 45, 386 (1925). — BUTLER, A. M., u. MONTGOMERY: Siehe F. WUHRMANN u. CH. WUNDERLY, Die Bluteiweißkörper des Menschen, 1. Aufl., S. 69. Basel 1947. — CREMER, D., u. A. TISELIUS: Biochem. Z. 320, 273 (1950). — DALLAM, R. D.: Arch. of Biochem.

a. Biophysics **54**, 24 (1955). — DEMLING, L.: Gastroenterologia (Basel) **81**, 129 (1954). — DEMLING, L., H. KINZLMEIER u. N. HENNING: Z. exper. Med. **122**, 416 (1954). — DOLD: In ABDERHALDENS Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. XIII, Teil 2, S. 129. — GEROK, W.: (1) Z. physiol. Chem. **299**, 112 (1955). — (2) Z. physiol. Chem. **291**, 129 (1952). — GJESSING, F. C., and A. CHANUTIN: J. of Biol. Chem. **169**, 657 (1947); **174**, 683 (1948). — GUTMANN, A. B.: Adv. Protein Chem. **4**, 155 (1948). — HASHIMOTO, M., u. E. P. PICK: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **76**, 89 (1914). — HASSELBACH, W., u. G. SCHNEIDER: Biochem. Z. **321**, 462 (1951). — HÖHNE, G., R. JESTER u. H. KUNKEL: Klin. Wschr. **1952**, 481. — HOERR, N. L., and R. R. BENSLEY: Biol. Symp. **10**, 185 (1943). — KOSLOWSKI, L., F. HARTMANN u. W. VOGEL: Klin. Wschr. **1950**, 757. — LETTERER, E.: (1) Virchows Arch. **317**, 8 (1949). — (2) Dtsch. med. Wschr. **1950**, 15. — (3) Mündliche Mitteilung. — LETTERER, E., W. GEROK u. G. SCHNEIDER: Virchows Arch. **327**, 327 (1955). — LETTERER, E., u. G. SCHNEIDER: Plasma **1**, 263 (1953). — MIRSKY, A. E., and A. W. POLLISTER: Biol. Symp. **10**, 247 (1943). — ORGLMEISTER: Z. exper. Path. u. Ther. **3**, 219 (1906). — OTT, H., u. G. SCHNEIDER: Z. exper. Med. **116**, 545 (1951). — PEDERSEN, K. O.: Ultracentrifugal studies on serum and serum-fractions. Uppsala 1945. — SCHEURLIN, P. G.: (1) Klin. Wschr. **1955**, 198. — (2) Z. klin. Med. **152**, 500 (1955). — SCHNEIDER, G.: (1) Virchows Arch. **327**, 343 (1955). — (2) Virchows Arch. **327**, 354 (1955). — (3) Z. physiol. Chem. **283**, 112 (1948). — (4) Acta chem. scand. (Copenh.) **5**, 1020 (1951). — (5) Verh. dtsch. Ges. Path. **1952**, 178. — SOROF, S., and P. H. COHEN: Cancer Res. **11**, 378 (1951). — WEBER, H. H., u. B. v. KERÉKJARTO: Z. Naturforsch. **7b**, 94 (1952). — WERNER, J.: Acta physiol. scand (Stockh.) **19**, 27 (1949). — WUHRMANN, F., u. CH. WUNDERLY: Die Bluteiweißkörper des Menschen, 1. u. 2. Aufl. Basel 1947 u. 1952. — WUHRMANN, F.: Dtsch. med. Wschr. **1952**, 749. — WUNDERLY, CH., G. SCHNEIDER u. F. HUGENTOBLE: C. r. Congr. Soc. internat. europ. d'Hématol. **1951**, 242. — ZELDIS, L. J., and E. L. ALLING: J. of Exper. Med. **81**, 515 (1945).

Dr. G. SCHNEIDER, Patholog. Inst. d. Univ. Tübingen