Myelom-Plasma-Proteine, II. Mitteilung*

Zur physikalischen und chemischen Natur der α - und β -Myelomproteine

Von FRIEDRICH LOHSS, ANNELIESE HILLMANN-ELIES und GÜNTHER HILLMANN

Aus dem Chemischen Laboratorium der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen

(Direktor Prof. Dr. H. Bennhold)

(Z. Naturforsch. 8b, 619–624 [1953]; eingegangen am 25. Juni 1953)

1. Durch Fällung mit Ammoniumsulfat konnten aus Serum 3 β -Myelomglobuline und 1 α -Myelomglobulin elektrophoretisch rein dargestellt werden. Ein weiteres β -Myelomprotein wurde in einem Reinheitsgrad von 62% erhalten.

2. Ein β -Myelomprotein erwies sich auch in der Ultrazentrifuge als einheitlich mit $s_{20} = 6,8$. Die übrigen 3 untersuchten Myelomfraktionen waren heterogen mit Sedimentationskonstanten zwischen $s_{20} = 7$ und $s_{20} = 26$.

4. Glucoproteid-Bestimmungen ergaben einen höheren Kohlenhydrat-Gehalt als γ -Globulin. Der Cholesteringehalt der Proteinfractionen war gering, Phosphorlipide in meßbarer Menge konnten nicht nachgewiesen werden, ihr Gehalt an Tyrosin und Tryptophan (UV-Spektren) ist dem γ -Globulin auffallend ähnlich.

Wir hatten in früheren Untersuchungen¹ über die chemische und physikalische Natur von γ -Myelom-Globulin berichtet. In der vorliegenden Arbeit werden analoge Untersuchungsergebnisse bei 4 Fällen von β -Myelom (Plasmocytom) sowie einem Fall von α -Myelom mitgeteilt. Physikalisch-chemische sowie chemische Daten von definierten α - und β -Myelom-Globulinfraktionen sind uns bisher nicht bekannt geworden. Auch von normalen, elektrophoretisch reinen α - und β -Human-Globulinfraktionen liegen nur wenige analytische Untersuchungsergebnisse vor, da die Reindarstellung mit großen methodischen Schwierigkeiten verbunden ist.

Bisher sind vom Cohnschen Arbeitskreis in zahlreichen Untersuchungen aus den α - und β -Globulinen folgende Eiweißunterfraktionen erhalten worden²:

1. α -Globulinfraktionen:

- Ein α_1 -Globulin vom Mol.-Gew. 200 000, etwa 35% Lipoid enthaltend.
- Ein α_2 -Globulin vom Mol.-Gew. 300 000.

2. β -Globulinfraktionen:

- Das kristallisierbare, eisenbindende β_1 -Globulin vom Mol.-Gew. 90 000. Es enthält nur wenig Lipide.

b) Ein β_1 -Globulin der Sedimentationskonstante $s_{20} = 7$.

c) Ein β_1 -Globulin der Sedimentationskonstante $s_{20} = 20$.

d) Das β_1 -Lipoproteid mit dem Mol.-Gew. 1 300 000, etwa 30% Cholesterin (75% des Gesamtplasmas) und etwa 30% Phosphorlipide enthaltend.

e) Ein β_2 -Globulin der Sedimentationskonstante $s_{20} = 7$.

Die Lipoproteide finden sich vorwiegend in der α_1 - und β_1 -Fraktion, während die α_2 - und β_2 -Komponenten fast ausschließlich aus Gluco- und Mucoproteiden bestehen.

Es war uns aus methodischen Gründen nicht möglich, die genannten Globulinfraktionen aus normalem Humanplasma zu isolieren und für vergleichende

² E. J. Cohn, L. E. Strong, W. L. Hughes, D. J. Mulford, J. N. Ashworth, M. Melin u. H. L. Taylor, J. Amer. chem. Soc. **68**, 459 [1946]; J. L. Oncley, G. Scatchard u. A. Brown, J. phys. Colloid Chem. **51**, 156 [1947]; J. L. Oncley, M. Melin, D. A. Richert, J. W. Cameron u. D. M. Gross, J. Amer. chem. Soc. **71**, 541 [1949]; D. M. Surgenor, L. E. Strong, H. L. Taylor, R. S. Gordon u. D. M. Gibson, J. Amer. chem. Soc. **71**, 1223 [1949]; J. L. Oncley, F. R. N. Gurd u. M. Melin, J. Amer. chem. Soc. **72**, 458 [1950]; D. M. Surgenor, B. A. Koechlin u. L. E. Strong, J. clin. Invest. **28**, 73 [1949].

* Die Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

¹ A. Hillmann, G. Hillmann u. F. Lohss, Z. Naturforsch. 8b, 28 [1953].

Nr.	Name	Diagnose	Serum Ges.-Eiw. g/o	BSG Wester- gren	Bence- Jones- (Urin)	Röntgenologische Befunde	Knochenpunktat	Besonderheiten
1	L.	α_2 - Myelom	11,3	158/160	—	Myelomherde am Schädeldach, an den BWK 6 u. 8 u. an beiden Hüftgelenkköpfen	Sternal- punktat: Myelomzellen	Urethan- therapie
2	Sch.	β_1 - Myelom	10,7	150/155	—	Spontanfrakturen der Rippen, im Ober- schenkelbereich Knochenaufhellungen	Sternalpunktat: Myelomzellen- nester	Plasmazellen im peripheren Blut
3	E.	β_2 - Myelom	10,8	151/153	—	Aufhellungen im Bereich der LWS. des Beckens und (umschrieben) am Schädeldach	Ileumpunktat: vorwiegend Plasmazellen	Urethan- therapie
4	Sa.	β_2 - Myelom	10,3	134/136	—	Myelomherde am Schädeldach, Deformierung LW 2 und 5, zahlreiche osteolytische Herde an BW und HWS	Sternalpunktat: typ. Myelom- zellen	Rapider Verlauf trotz Th. mit Stilbamidin, Vigantol in Cyren A
5	B.	β_2 - Myelom	7,7	154/160	—	Am Stirnbein Auf- hellungen, im Becken- und LW-Bereich diffuse osteolytische Herde	Sternalpunktat: zahlreiche Plasmazellen	—

Tab. 1. Einige klinische Daten der Patienten.

Das Untersuchungsmaterial und die klinischen Daten der Patienten L. und E. verdanken wir dem lebenswürdigen Entgegenkommen von Herrn Dr. med. Tiefensee (Diakonissen-Anstalt, Schwäbisch-Hall), ebenso sind wir den Herren Dr. med. habil. Robbers (Sigmaringen) und Dr. med. Bühler (Herbertingen, Kr. Saulgau) für die Überlassung von Serum und klinischen Unterlagen des Patienten Sch. zu Dank verpflichtet.

Nr.	Technik	A	α_1	α_2	β_1	β_2	γ
1	Grassmann	19	7	73	0,5		0,5
1	Tiselius	14,5	4,5	79	1,0	0,5	0,5
2	Grassmann	27	3	4	64		2
2	Tiselius	24	4	4	60	6	2
3	Grassmann	20	4	7	67		2
3	Tiselius	18,5	3	6	8	63	1,5
4	Grassmann	44	4	8	40		4
5	Grassmann	42	7	14	31		6

Tab. 2. Prozentuale Anteile (Elektrophorese) der untersuchten Seren an den einzelnen Eiweiß-Fractionen.

Untersuchungen mit den von uns dargestellten α - und β -Myelomglobulinen heranzuziehen.

I. Material und Methoden

1. Ausgangsmaterial: Es stand uns Serum bzw. Acid Citrate Dextrose Solution (A.C.D.)-Plasma³ von

einem Patienten mit α -Myelom sowie von 4 Patienten mit β -Plasmocytom zur Verfügung. Die wichtigsten Daten

³ E. J. Cohn, F. R. N. Gurd, D. M. Surgenor, B. A. Barnes, R. K. Brown, G. Derouaux, J. M. Gillespie, F. W. Kahnt, W. F. Lever, C. H. Liu, D. Mittelman, R. F. Mouton, K. Schmid u. E. Uroma, J. Amer. chem. Soc. 72, 465 [1950].

zur klinisch eindeutigen Myelomdiagnose der Patienten sind in Tab. 1 dargestellt.

Die elektrophoretisch ermittelte prozentuale Zusammensetzung der Serumfraktionen geht aus Tab. 2 hervor, siehe auch Abb. 1—5. Auffällig ist der geringe Gehalt fast aller Seren an γ -Globulin.

2. Elektrophoresen: Sie wurden bei Gesamtserum und Fraktionen nach der Methode von Grassmann durchgeführt. Bei Serum wurden 0,07 ccm, bei etwa 2% Protein enthaltenden Fraktionen 0,02 ccm aufgetragen (p_H 8,6, μ = 0,1, 1 mA).

Einige Analysen wurden auch in der Tiselius-Apparatur durchgeführt, Proteinkonzentrationen bei den Präparationen 0,9%, bei Fall B 0,5%, bei Gesamtserum 1,2%, p_H 8,6, μ = 0,11, 20 mA. Die Differenzierung in β_1 - und β_2 -Myelomglobuline konnte nur durch Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit nach Tiselius unter geeigneten Bedingungen erfolgen. Die Papierelektrophorese ergab keine genügende Auftrennung der β -Komponenten.

3. Plasmafraktionierung: Versuche zur präparativen Darstellung von α - und β -Myelomproteinen sind uns — mit Ausnahme eines Falles⁴ — nicht bekannt geworden. Bei diesem haben Luescher und Labhardt das exzessiv vermehrte β -Myelomprotein nach der Methode 6 von Cohn angereichert, um dessen gerinnungshemmende Eigenschaften zu studieren.

Wir haben einige Versuche mit der Äthanolfraktionierung 10 von Cohn³ unternommen. Im übrigen wurden die Myelomglobuline durch Ammonsulfatfällung von den anderen Serumkomponenten abgetrennt, α -Myelomprotein in 42,5%, β -Myelomproteine durch Aussalzung bei 40% Sättigung. Nach 3-maliger Fällung und Zentrifugation wurden die mit Wasser wieder gelösten Protein-Niederschläge 24 Stdn. gegen fließendes Wasser, anschließend 60 Stdn. gegen mehrmals gewechselte 0,9-proz. Kochsalzlösung (phosphatgepuffert p_H 7,0) im Eisschrank dialysiert. Alle anschließend gewonnenen analytischen Daten beruhen auf der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, aus der der Proteinwert mit dem Faktor 6,25 errechnet wurde.

4. Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten wurde in der analytischen PHYWE-Ultrazentrifuge bei 50 000 Umdrehungen (180 500 g) mit Lösungen von etwa 0,2% Protein in 0,9% NaCl durchgeführt.

5. Cholesterin wurde nach der Titrationsmethode von Schmidt-Thomé⁵ bestimmt, Phosphorlipide nach Thannhauser⁶ aus je 100 mg in der Kälte im Ölpumpenvakuum getrocknetem Proteinmaterial.

⁴ E. Luescher u. A. Labhardt, Schweiz. med. Wschr. 79, 598 [1949].

⁵ J. Schmidt-Thomé u. H. Augustin, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 275, 190 [1942].

⁶ S. J. Thannhauser u. P. Setz, J. biol. Chemistry 116, 533 [1936].

Abb. 1. α_2 -Myelom L.

Abb. 2. β_1 -Myelom Sch.

Abb. 3. β_2 -Myelom E.

Abb. 4. β_2 -Myelom Sa.

Abb. 5. β_2 -Myelom B.

Abb. 1—5. Papierelektrophoresen der Seren und der durch 3-malige Aussalzung gereinigten Myelomproteine sowie die der Überstände nach der ersten Aussalzung.

6. Der Glykoproteidgehalt wurde mit der Orcinreaktion von Tillmanns und Philippi nach einer früher beschriebenen Vorschrift ermittelt⁷.

7. UV-Messungen zur Ermittlung des Gehalts an Tyrosin und Tryptophan wurden im Beckman-Modell DU in *n*/20-NaOH bei etwa 40 mg Protein/100 ccm vorgenommen. Näheres siehe frühere Arbeiten^{7, 8}.

II. Diskussion der Versuchsergebnisse

1. Präparation der β -Myeloglobulin-Fractionen: Bei A.C.D.-Plasma der Patienten E., Sa. und B. wurde eine Äthanolfraktionierung nach der Methode 10 von Cohn³ versucht. Der erste Arbeitsgang, Trennung der Globuline vom Albumin durch Fällung der ersteren mit Äthanol und Na-Acetatpuffer ($\mu = 0,8$, $p_H 4,0$) ergab ähnliche Verhältnisse wie beim Normalserum. Entsprechend dem geringen Gehalt an γ -Globulin (siehe Tab. 2) konnten bei der Extraktion der γ -Globuline aus den mit Äthanol gefällten Gesamtglobulinen nach Vorschrift³ aus 50 ccm Plasma nur wenige mg Protein gewonnen werden. Das β -Myelomprotein blieb jeweils ungelöst und zeigte somit gegenüber normalen β -Globulinen keine Besonderheit bezüglich seiner Löslichkeit in Äthanol-Pufferlösung.

Da uns zur weiteren Auftrennung der gefällten Globuline nach der Methode 10 von Cohn der notwendige technische Aufwand nicht zur Verfügung stand, versuchten wir, durch Ammonsulfatfällung zu definierten Fraktionen zu gelangen.

Alle untersuchten β -Myelomseren zeigten einen auffallend geringen Gehalt an γ -Globulin, ein Befund, der bezüglich der Pathogenese der Myelomproteine unseres Erachtens besonders betont werden muß.

Es gelang durch 3-fach wiederholte Ammonsulfatfällung (s. I, 3), die β -Globulinfraktionen bei 3 Fällen in praktisch 100% elektrophoretisch reiner Form zu gewinnen, in einem Fall (Patient B.) konnte eine 62-proz. Reinheit erzielt werden. Dabei erscheint bemerkenswert, daß dieses Elektrophoresediagramm (Abb. 5) am wenigsten vom Normaltyp abweicht. Diese auffallend leichte Reindarstellung der exzessiv vermehrten β -Globulinfraktionen kann zu der von uns früher beobachteten leichten Reindarstellbarkeit der γ -Myelomproteinfraktionen¹ in Beziehung gebracht werden.

2. Präparation des α_2 -Myeloglobulins

Da uns für einen Isolierungsversuch des α -Myelomproteins nach der Cohnschen Methode³ nicht ge-

	Cholesterin (Gesamt) in g %	Cholesterin (Ester) in g %	% KH
1. α_2 -Myeloglob.	2,5	2,35	3,4
2. β_1 -Myeloglob.	5,2	2,9	3,8
3. β_2 -Myeloglob.	1,9	1,0	2,7
4. β_2 -Myeloglob.	1,0	0,8	4,0
5. β_2 -Myeloglob.	4,0	3,4	3,6
6. γ -Globulin	als Vergl. für KH-Bestimm.		2,4

Tab. 3. Cholesterin- und Kohlenhydratgehalt der α - und β -Myeloglobulinfraktionen.

nügend Ausgangsmaterial zur Verfügung stand, wurde analog dem obenerwähnten Verfahren die Reindarstellung durch wiederholte Ammonsulfatfällung mit 42,5% Sättigung erzielt. Es wurde auch in diesem Fall ein fast 100% elektrophoretisch reines α -Myelomprotein erhalten. Empirische Ermittlungen ergaben, daß bei 42,5 und 40% Sättigung der weitestgrößte Teil sowohl der β -Myelom- wie α -Myeloglobuline von den rascher wandernden Serumkomponenten abgetrennt werden kann. Im α_2 -Myelomserum fehlt außer der γ - auch die β -Globulin-Komponente fast vollständig.

Der Grund für diese, von uns schon früher beobachtete überaus leichte Isolierungsmöglichkeit der für das Myelom spezifischen Proteinfractionen, dürfte in der exzessiven Vermehrung dieser Komponenten gegenüber den des normalen Humanplasmas zu suchen sein. Es erscheint uns notwendig, darauf hinzuweisen, daß die Cohnschen Fraktionierungsmethoden für die Isolierung von normalen Plasma-protein-Komponenten entwickelt worden sind. Wir halten es deshalb für richtig, bei so extremen Dysproteinämien — zur Begriffsbestimmung⁹ — jeweils die optimalen Isolierungsmöglichkeiten empirisch zu ermitteln.

Der elektrophoretische Reinheitsgrad der Fraktionen wurde mit der Tiselius- und Papierelektrophorese geprüft (die Abb. 10 ist vergrößert, die Wanderungsgeschwindigkeit kann deshalb mit der der übrigen Fraktionen nicht verglichen werden).

2. Ultrazentrifugation: Trotz der elektrophoretischen Einheitlichkeit der 4-Myeloglobuline

⁷ F. Lohss, E. Roth, E. Weiler u. G. Hillmann, Z. Naturforschg. **7b**, 600 [1952].

⁸ F. Lohss, F. Methfessel u. G. Hillmann, Z. Naturforschg. **8b**, 288 [1953].

⁹ s. H. Bennhold, Klin. Wschr. **31**, 388 [1953].

zeigten diese nur bei dem β_2 -Myelomprotein der Patientin E. Homogenität mit $s_{20} = 6,8$. Die Sedimentationsdiagramme der beiden anderen untersuchten β -Myelomproteine wiesen außer der Komponente $s_{20} = 7$ jeweils die Komponenten $s_{20} = 13$, beim Fall Sa. außerdem eine hochmolekulare Komponente von $s_{20} = 26$ auf (20%). Das α_2 -Myelomglobulin besteht aus 3 Komponenten, $s_{20} = 9, 11$ und 20.

Proteinmoleküle der Größenordnung über $s_{20} = 20$ sind bei Makroglobulinämien¹⁰ in Mengen von 20% und mehr (bezogen auf Gesamtplasma) gefunden worden. In geringeren Mengen werden solche Proteinmoleküle auch in normalem Humanplasma gefunden^{2, 11}. Der Anteil solcher hochmolekularen Proteine am Gesamtplasma ist für die Begriffsbestimmung der Makroglobulinämie herangezogen worden¹². Wir halten es nicht für sinnvoll, zu diskutieren, ob das von uns untersuchte, auf Grund seiner elektrophoretischen Wanderung als β_2 -Globulin definierte Myelomprotein des Patienten Sa. wegen seiner hochmolekularen Komponente in die Gruppe der Makroglobulinämie einzureihen ist. Dies gilt in gleichem Maße für das von uns isolierte α_2 -Myelomprotein, welches eine erhebliche hochmolekulare Komponente besitzt. Es muß betont werden, daß für die eindeutige Differenzierung von Proteinfractionen bei Dysproteinämien einzelne physikalisch-chemische Untersuchungsmethoden auf Grund der überaus großen Variationsvalenzen von Proteinen nur unzulängliche Aussagen erlaubten.

3. UV-Spektren: Aus der Abb. 11 geht hervor, daß die Spektren aller untersuchten Myelomproteine dem normalen γ -Globulin und somit auch dem der früher beschriebenen γ -Myelom-Globuline¹ auffallend ähnlich sind. Wie in früheren Arbeiten haben wir auf die Angabe der Absolutwerte verzichtet, da diese je nach Berechnungsmethode zu verschiedenen Ergebnissen führen kann. Das UV-Spektrum des γ -Globulins ist wie der Wert der folgenden Kohlenhydrat (KH) - Bestimmung ein Mittelwert aus 4 γ -Globulinfraktionen, über die bereits⁸ berichtet wurde.

Das Resultat ist insofern bemerkenswert, als die Analysenergebnisse von Brand und Mitarbeitern¹³

¹⁰ J. Waldenström, Schweiz. med. Wschr. 1948, 927.

¹¹ K. O. Pedersen, Ultracentrif. Studies on Serum and Subfraktionen, Uppsala 1945.

¹² F. Wuhrmann u. Ch. Wunderly, Die Blut-eiweißkörper des Menschen, Basel 1952.

¹³ Zit. nach J. T. Edsall, Advances Protein Chemistry 3, 464 [1947].

Abb. 6. α_2 -Myelomglobulin L. $s_{20} = 9,0$ (50%), 11,0 (30%), 20,0 (20%).

Abb. 7. β_1 -Myelomglobulin Sch. $s_{20} = 7,0$ (70%), 13,0 (30%).

Abb. 8. β_2 -Myelomglobulin E. $s_{20} = 6,8$ (einheitlich).

Abb. 9. β_2 -Myelomglobulin Sa. $s_{20} = 7,3$ (40%), 13,0 (40%), 26,0 (20%).

Abb. 10. β_2 -Myelomglobulin B. (62% β_2 -Myelomglobulin), Sedimentation wurde nicht bestimmt.

Abb. 6—10. Tiselius-Diagramme der gereinigten Myelomglobuline und Angaben über deren Sedimentation (Ultrazentrifuge).

bei einer β -Globulinfraktion im Vergleich zum γ -Globulin wenig, bei einer angereicherten α -Globulinfraktion erheblich geringere Mengen von Tyrosin und

Tryptophan ergaben. Trotz der auffälligen Ähnlichkeit der Spektren der untersuchten Myelomproteine mit denen des normalen γ -Globulins halten wir eine

Abb. 11. UV-Spektren in $n/20$ -NaOH. Ausgezogene Linie = Normal- γ -Globulin.

- = α -Myelom-Globulin L.
- ▼ = β_1 -Myelom-Globulin Sch.
- = β_2 -Myelom-Globulin E.
- × = β_2 -Myelom-Globulin Sa.
- = β_2 -Myelom-Globulin B.

Diskussion über eine etwaige gemeinsame Ätiologie für verfrüht, da aus der Analyse von 2 Bausteinen ein allgemeiner Schluß nicht gezogen werden kann und ferner für die quantitative Bestimmung von

Aminosäuren in Plasmaproteinkomponenten noch kein allgemeines Bezugssystem vorliegt. Es erscheint uns notwendig, darauf hinzuweisen, daß eine Diskussion der chemischen Verwandtschaft verschiedener Proteine nur nach möglichst vollständiger Kenntnis der Feinstruktur — also der spezifischen Reihenfolge der Aminosäuren in den Peptidketten — möglich ist.

4. Lipoid- und Kohlenhydratbestimmungen: Der Cholesteringehalt aller untersuchten Myelomglobulin-Fractionen ist gegenüber den im normalen Plasma vorkommenden α - und β -Lipoproteiden gering und in Tab. 3 dargestellt.

Phosphorlipide wurden bei keiner Fraktion in meßbarer Menge gefunden.

Die Kohlenhydratwerte (Berechnung s. l. c.⁸) liegen bei allen Fraktionen höher als die des normalen γ -Globulins.

Die von uns isolierten Myelom-Globuline erwiesen sich somit als Glucoproteide mit geringem Lipidgehalt.

Bestimmungen bezüglich der Löslichkeit der genannten Myelomglobuline in dest. Wasser, wie wir sie bei den γ -Myelom-Proteinen durchgeführt haben¹, konnten aus Materialmangel nicht angestellt werden.

5. Aus den vorliegenden Untersuchungen können Rückschlüsse auf die Abartigkeit bzw. qualitative Differenzierung gegenüber den normalen Human- α - und - β -Globulinen, also eine Zuordnung zu den „Paraproteinen“ oder „Alloproteinen“ im Sinne Bence-Jones⁹, nicht gezogen werden. Diese Frage wird in weiteren Untersuchungen über die immunochemischen Eigenschaften der Fraktionen geprüft werden.

Wir sind Herrn Prof. Dr. G. Schramm (Max-Planck-Institut für Biochemie, Abt. Virusforschung) für die Bestimmung der Sedimentationskonstanten in der Ultrazentrifuge zu besonderem Dank verpflichtet, ebenso Herrn Prof. Dr. A. Schmid, der die UV-Messungen am Beckman-Spektrophotometer des Pharmakologischen Institutes ermöglichte.

Frl. Dr. E. Roth sowie Herrn Dr. H. Ott und Frl. K. Seeger danken wir für die Durchführung der Papier- und Tiselius-Elektrophoresen.