Über das α_2 -Makroglobulin

Von M. SCHÖNENBERGER, R. SCHMIDTBERGER und H. E. SCHULTZE

Aus den Behringwerken, Marburg a. d. L.

(Z. Naturforsch. **13 b**, 761—772 [1958]; eingegangen am 1. September 1958)

Die Darstellung und die chemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften des α_2 -Makroglobulins werden beschrieben. Das α_2 -Makroglobulin ist ein Bestandteil des normalen menschlichen Serums. Seine Isolierung erfolgt mit Ammonsulfat in praktisch homogener Form. Der Reinheitsgrad der untersuchten Präparate wird mit der Ultrazentrifuge, dem Elektrophorese-Gerät und einer neuen immunologischen Technik nachgewiesen. Das Mol.-Gew. ergibt sich aus der Sedimentation und Diffusion zu 820 000—950 000 und aus der Lichtzerstreuung zu 920 000—970 000. Die Sedimentationskonstante beträgt im Mittel $s_{20,w}^0 = 20 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ Dyn}^{-1}$, die Diffusionskonstante des reinsten Präparates $D_{20,w}^0 = 2,4 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ und die Viskositätszahl $[\eta] = 0,068$. Die Ergebnisse aus dem Reibungs- und Achsenverhältnis des reinsten Präparates sprechen für die Form eines Rotationsellipsoids. In 5-m. Harnstofflösung dissoziiert das α_2 -Makroglobulin reversibel in zwei Komponenten mit den Sedimentationskonstanten von $s_{20,w}^{1,5} = 15,7$ und $s_{20,w}^{1,5} = 11,0$.

Das von H. E. SCHULTZE und Mitarbb. aus menschlichem Normalserum isolierte und 1955 erstmalig beschriebene α_2 -Makroglobulin¹ ist definiert durch seine elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit und sein Sedimentationsverhalten im Zentrifugalfeld der Ultrazentrifuge. Es gehört zur Gruppe der α_2 -Globuline des menschlichen Serums und besitzt ein Mol.-Gew. von annähernd einer Million. PEDERSEN² vermutet, daß in der α -Globulinfraction ein Makroglobulin enthalten sei, konnte somit bestätigt werden. Das α_2 -Makroglobulin macht etwa 2% der Serumproteine aus³. Es findet sich als Bestandteil der von COHN und Mitarbb.⁴ beschriebenen β_1 -lipoidarmen Euglobulin-Fraktion und ist nach ONCLEY und Mitarbb.⁵ zu etwa 25% darin vertreten. Es ist verschieden von dem im γ_1 -Globulin enthaltenen Makroglobulin^{6,7}, bildet aber mit diesem die schon von McFARLANE⁸, MUTZENBECHER⁹ und PEDERSEN² bei der Ultrazentrifugation des menschlichen Normalserums beobachtete Makroglobulin-Fraktion mit der Sedimentationskonstante $s_{20} = \sim 20 \text{ S}$. Das Makroglobulin vom γ -Globulin-Typ haben KUNKEL u. a.^{3,7,10-12} eingehend

untersucht und durch Stärke-Elektrophorese vom α_2 -Makroglobulin getrennt¹³. Auch BRATTSTEN¹⁴ gelang es, in der durch kontinuierliche Zonenelektrophorese gewonnenen α -Globulin-Fraktion ein Makroglobulin mit der Sedimentationskonstante 19 S nachzuweisen. BROWN u. a.¹⁵ haben ein Glykoprotein durch langdauerndes, hochtouriges Zentrifugieren aus der durch Alkohol⁴ gewonnenen Plasmafraction III-0 isoliert und bis zur Kristallisation gereinigt. Die Sedimentationskonstante ihres Präparates beträgt in 2-proz. Lösung 14,6 S¹⁵ und etwa 16 S bei der Konzentration Null¹⁶. BROWN vermutet, daß die zu niedrige Sedimentationskonstante auf einer durch Einfrieren und Auftauen bedingten Dissoziation beruht¹⁵. Wie POULIK¹⁷ mit der Immuno-Elektrophorese in Stärkegel nachweisen konnte, erwies sich das BROWNSCHE Präparat als identisch mit dem von SCHULTZE und Mitarbb.¹ hergestellten α_2 -Makroglobulin. Auch die mit der zweidimensionalen Stärkegel-Elektrophorese¹⁸ aus Nephrotikerserum gewonnene 19 S-Komponente der α_2 -Fraktion unterschied sich immunologisch nicht von dem aus Normalserum isolierten α_2 -

¹ H. E. SCHULTZE, I. GÖLLNER, K. HEIDE, M. SCHÖNENBERGER u. G. SCHWICK, Z. Naturforsch. **10 b**, 463 [1955]; H. E. SCHULTZE, Ärztl. Lab. **1**, 81 [1955]; Z. Elektrochem., Ber. Bunsenges. physik. Chem. **60**, 262 [1956].

² K. O. PEDERSEN, Ultracentrifugal Studies on Serum and Serum Fractions, Uppsala 1945, S. 8 u. 65.

³ G. R. WALLENIUS, R. TRAUTMANN, H. G. KUNKEL u. E. C. FRANKLIN, J. biol. Chemistry **225**, 253 [1957].

⁴ E. J. COHN, Experientia [Basel] **3**, 125 [1947]; J. L. ONCLEY, M. MELIN, D. A. RICHERT, J. W. CAMERON u. P. M. GROSS, jr., J. Amer. chem. Soc. **71**, 541 [1949]; 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].

⁵ J. L. ONCLEY, G. SCATCHARD u. A. BROWN, J. phys. Colloid Chem. **51**, 184 [1947].

⁶ M. COHN, H. F. DEUTSCH u. L. R. WETTER, J. Immunology **64**, 381 [1950].

⁷ H. J. MÜLLER-EBERHARD, H. G. KUNKEL u. E. C. FRANKLIN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **93**, 146 [1956].

⁸ A. S. McFARLANE, Biochem. J. **29**, 407, 660, 1175, 1202 [1935].

⁹ R. V. MUTZENBECHER, Biochem. Z. **266**, 226, 250, 259 [1933].

¹⁰ R. J. SLATER, S. M. WARD u. H. G. KUNKEL, J. exp. Medicine **101**, 85 [1955].

¹¹ H. J. MÜLLER-EBERHARD u. H. G. KUNKEL, J. exp. Medicine **104**, 253 [1956].

¹² H. J. MÜLLER-EBERHARD, Klin. Wschr. **34**, 693 [1956].

¹³ G. R. WALLENIUS, R. TRAUTMANN, E. C. FRANKLIN u. H. G. KUNKEL, Fed. Proc. **15**, 378 [1956].

¹⁴ I. BRATTSTEN, Ark. Kemi **8**, 347 [1956].

¹⁵ R. K. BROWN, W. H. BAKER, A. PETERKOFKY u. D. L. KAUFFMAN, J. Amer. chem. Soc. **76**, 4244 [1954].

¹⁶ R. K. BROWN, private Mitteilung. Anm. b. d. Korr.: In einer Vortragsdiskussion während des IV. Internationalen Kongresses für Biochemie in Wien 1958 sieht sich Herr Dr. R. K. BROWN erfreulicherweise in der Lage, unsere höheren Sedimentationskonstanten für richtig zu halten.

¹⁷ M. D. POULIK, private Mitteilung.

¹⁸ M. D. POULIK u. O. SMITHIES, Biochem. J. **68**, 636 [1958].

Makroglobulin¹⁷. BROWN und Mitarbb.¹⁹ konnten durch Bestimmung der Komplement C'-Bindung zeigen, daß der von ihnen als hitzelabiles α_2 -Glykoprotein bezeichnete Serum-Eiweißkörper in Nephroseserum vermehrt ist. Die gleiche Beobachtung machten CLEVE, HARTMANN und RITTER²⁰ bei der Immuno-Elektrophorese und dem Agargel-Diffusionstest von Nephrotikerserum sowie SCHULTZE und SCHWICK²¹ mit einer speziellen quantitativen immunologischen Bestimmungsmethode. ROWE²² fand bei osmotischen Messungen nephrotischer Seren ein mit der Schwere der Krankheit zunehmendes Mol.-Gew., das er mit der gleichzeitigen Vermehrung der α_2 -Globulinfraktion^{23, 24} in Verbindung brachte.

In der folgenden Darstellung geben wir eine Übersicht über die chemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften des α_2 -Makroglobulins. Wir prüften mit der Ultrazentrifuge, der Elektrophorese-Apparatur und einer immunochemischen Technik den Reinheitsgrad der isolierten Präparate, bestimmten ihre Sedimentations- und Diffusionskonstanten, berechneten aus diesen beiden Größen das Mol.-Gew. und stellten es den Mol.-Gew. aus der Lichtstreuung sowie dem osmotischen Druck gegenüber. Aus dem Reibungs- und Achsenverhältnis versuchten wir einen Einblick in die Form des Proteins zu erlangen. Eine Reihe chemischer Analysen soll die physikalisch-chemische Charakterisierung ergänzen.

Methodik

Isolierung des α_2 -Makroglobulins

Die in dieser Arbeit verwendeten α_2 -Makroglobulin-Präparate isolierten wir aus menschlichem Normalserum nach dem bereits früher von uns beschriebenen Verfahren¹ durch Ammonsulfat-Fällung. Um zu klären, ob das von BROWN u. a.¹⁵ gewonnene Globulin identisch mit unserem α_2 -Makroglobulin ist, bedienten wir uns auch noch des BROWNschen Verfahrens.

Isolierung des α_2 -Makroglobulins mit Ammonsulfat

Wir versetzten das mit physiologischer Kochsalzlösung auf 3,8% Eiweiß verdünnte Humanserum bei p_H 7,0 mit einer gesättigten Ammonsulfat-Lösung vom p_H 8,0 bis zu einer Konzentration von 45%, lösten den Rückstand, entfernten das Ammonsulfat durch zweitägige Dialyse und erniedrigten den p_H -Wert mit 1-n. Essigsäure auf p_H 5,0. Der Eiweißgehalt beträgt dann 2%, die Ionenstärke etwa 0,07. Es entsteht ein Niederschlag, den wir mit 0,2-proz. Kochsalzlösung (p_H 5,0) bei 0° C mehrere Stdn. rührten. Den in Lösung gegangenen Teil fällten wir bei p_H 7,2 mit 43% Ammonsulfat,

dialysierten bei 0° C und säuerten mit 1-n. Essigsäure bis p_H 5,1 an. Der Niederschlag ist das α_2 -Makroglobulin. Er wird isoliert, in dest. Wasser gelöst und mit 0,1-n. NaOH auf p_H 7,0 eingestellt. In dieser Lösung bewahrten wir das α_2 -Makroglobulin auf.

Das nach unserer Herstellungsmethode gewonnene α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1157 war praktisch einheitlich. Wir führten deshalb die meisten Untersuchungen mit dieser Substanz aus. Ein zweites Präparat (Op. Nr. 1106) bestand zu fast 90% aus α_2 -Makroglobulin. Es konnte durch eine Umfällung mit Kochsalz bei p_H 5,0 und 4° C weiter gereinigt und als drittes Präparat (Op. Nr. 1106 U) für die Untersuchung herangezogen werden.

Ein weiteres Präparat erhielten wir, wie im nächsten Abschnitt beschrieben ist, nach BROWN u. a. durch zweimaliges Ultrazentrifugieren.

Isolierung des α_2 -Makroglobulins aus Fraktion III-0

Bei der Nacharbeitung der von BROWN u. a.¹⁵ angegebenen Methode stellten wir zuerst nach COHN und Mitarb.⁴ die Fraktion III-0 her, die als Paste anfiel. Diese nahmen wir in Phosphatpuffer p_H 7,0 auf, dialysierten die erhaltene Lösung 2·24 Stdn. bei -5° C gegen 30 Tle. einer Lösung aus 1,65-m. Natriumchlorid und 0,004-m. Phosphatpuffer p_H 7,0 und zentrifugierten 18 Stdn. bei 97 720 g in der Spinco-Ultrazentrifuge Modell E*. Nach dem Zentrifugieren isolierten wir vier verschiedene Fraktionen.

I. Ultrazentrifugierung

1. Obere Fraktion (Lipoprotein),
2. Mittlere Fraktion (eiweißarm),
3. Untere Fraktion I (19,5% Eiweiß),
4. Sediment I.

Die untere Fraktion I und das Sediment I untersuchten wir in der analytischen Spinco-Ultrazentrifuge²⁵⁻²⁷. Der Rest des Sedimentes (ca. 90 ml) wurde in einer Lösung, die 1,64 Mole Natriumchlorid und 1,79 Mole Kaliumbromid im l enthielt und die Dichte 1,21 besaß, aufgenommen und nochmals 18 Stdn. bei 97 720 g ultrazentrifugiert. Auch diese Substanz teilten wir in vier Fraktionen auf.

II. Ultrazentrifugierung

Fraktion	Volumen [ml]	Eiweiß [%]	Ausbeute [g]
1. Obere Fraktion	47	6,5	0,325
2. Mittlere Fraktion	26	13,3	4,400
3. Untere Fraktion II	33	7,0	1,820
4. Sediment II	5	0,65	0,300

¹⁹ A. PETERKOFKY, L. LEVINE u. R. K. BROWN, J. Immunology **76**, 237 [1956].

²⁰ H. CLEVE, F. HARTMANN u. R. RITTER, Dtsch. Arch. klin. Med. **204**, 393 [1957].

²¹ H. E. SCHULTZE u. G. SCHWICK, im Druck.

²² D. S. ROWE, Biochem. J. **67**, 435 [1957].

²³ J. HARDWICKE, Proc. Roy. Soc. Med. **47**, 832 [1954].

²⁴ E. BENHAMOU, P. AMONCH u. E. CHEMLA, Presse méd. **61**, 1725 [1953].

* Beckman Instruments, Inc., Fullerton (California).

²⁵ G. BERGOLD, Z. Naturforschg. **1**, 100 [1946].

²⁶ H. E. SCHULTZE, M. SCHÖNENBERGER u. G. SCHWICK, Biochem. Z. **328**, 267 [1956].

²⁷ H. E. SCHULTZE, M. SCHÖNENBERGER u. G. SCHWICK, Med. u. Chem., VI, 451, 1958.

Wiederum prüften wir die untere Fraktion und das Sediment, das mit 5 ml Svedberg-Puffer p_H 6,8²⁸ aus den Zentrifugenbechern herausgelöst wurde, in der Ultrazentrifuge auf ihr Sedimentations-Verhalten.

Molekulargewicht aus Sedimentation und Diffusion

Aus den bei der Konzentration Null gewonnenen Sedimentations-²⁵⁻²⁷ und Diffusionskonstanten²⁹ erhielten wir das Mol.-Gew. mit der von SVEDBERG³⁰ angegebenen Beziehung

$$M = \frac{s_{20,w}^0}{D_{20,w}^0} \frac{RT}{1 - V_0 \rho},$$

in der V_0 das partielle spezifische Volumen der gelösten Substanz und ρ die Dichte der Lösung bedeuten. Die Extrapolation der Sedimentations- und Diffusionskonstanten auf unendliche Verdünnung nahmen wir nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate vor. Für das partielle spezifische Volumen ermittelten wir in einem Pyknometer für fünf verschiedene Konzentrationen das spezifische Gewicht der Makroglobulin-Lösungen, rechneten daraus das den einzelnen Konzentrationen entsprechende Volumen für 1 g der Proteinlösungen aus und extrapolierten diese Volumina auf die Konzentration 100% Eiweiß. Der so erhaltene Wert entspricht dem partiellen spezifischen Volumen des α_2 -Makroglobulins.

Lichtzerstreuung

Die für die Ermittlung des Mol.-Gew. benötigte Streulicht-Intensität bestimmten wir mit dem von BRICE³¹ angegebenen Light Scattering-Photometer, die Brechungsincremente mit dem ebenfalls von BRICE³² entwickelten Differential-Refraktometer. Als Lösungsmittel diente doppelt dest. Wasser. Alle Lösungen wurden 20 Min. bei 40 000 U/min. in der präparativen Spinco-Ultrazentrifuge Modell L oder bei 15 000 in der Pirouette von Phywe* zentrifugiert, bevor ihre Lichtzerstreuung gemessen wurde. Die Eiweißkonzentration der Lösungen haben wir mit der Extinktion eingestellt³³.

Extinktion

Die Extinktion bestimmten wir mit dem Zeiss-Spektrophotometer PMQII bei der Wellenlänge $\lambda = 280 m\mu$, der Schichtdicke 1 cm und dem p_H -Wert 7,0. Der mit der Konzentration von 0,05% erhaltene Werte wurde auf die 1-proz. Lösung umgerechnet.

Viskosität

Wir bestimmten für die Konzentrationen 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 und 8,0% das Verhältnis η/η_0 der Viskosität der Eiweißlösung zur Viskosität des Wassers als Lösungsmittel bei p_H 7,0 und bei der Temperatur 20° C.

Die Viskosität bei unendlicher Verdünnung $[\eta]$ (Intrinsic-Viskosität) wird erhalten, wenn man die beobachteten Werte in die Gleichung

$$[\eta] = \left(\frac{\eta/\eta_0 - 1}{c} \right)_{c \rightarrow 0}$$

einsetzt und auf die Konzentration Null extrapoliert^{34, 35}.

Kolloidosmotischer Druck

Die Bestimmung des kolloidosmotischen Druckes erfolgte in dem von HEPP³⁶ entwickelten Osmometer. Die 8-proz. α_2 -Globulinlösung wurde bei 4° C 48 Stdn. der Dialyse unterzogen, wobei dreimal die Außendialysierflüssigkeit gewechselt wurde. Eine Probe der Eiweißlösung wurde gegen dest. Wasser, das mit 0,1-n. NaOH auf p_H 7,8 eingestellt war, eine zweite gegen Phosphatpuffer p_H 7,0; $\mu = 0,04$ dialysiert. Mit den Proteinlösungen wurden die folgenden Konzentrationen hergestellt: für die Messung

in dest. Wasser	7,6	3,8	1,9 Prozent,
in Phosphatpuffer	7,5	und	1,9 Prozent.

Die abgelesenen Werte werden durch die zugehörige Konzentration dividiert und gegen die Konzentration als Abszisse in ein Koordinatennetz eingetragen. Den auf unendliche Verdünnung extrapolierten kolloidosmotischen Druck setzt man in die Gleichung

$$M = \frac{RT}{P/c}$$

ein und erhält daraus das Mol.-Gew. des α_2 -Makroglobulins.

Reibungsverhältnis

Das Verhältnis der Reibung f des α_2 -Makroglobulins zu der Reibung f_0 einer Kugel des gleichen Mol.-Gew. berechneten wir nach einer auf SVEDBERG³⁷ zurückgehenden und von SCHRAMM³⁸ in der folgenden Form angegebenen Gleichung

$$f/f_0 = 1,19 \cdot 10^{-15} \frac{M^{2/3}(1 - V_0 \rho)}{s_{20} \cdot V^{1/3}}.$$

Isoelektrischer Punkt

Der isoelektrische Punkt ist charakterisiert durch den p_H -Wert, bei dem die positiven und negativen Ladungen des Moleküls gleich groß sind, bei dem das Molekül also keine Wanderung im elektrischen Feld zeigt. Wir bestimmten daher die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit bei verschiedenen p_H -Werten im sauren und alkalischen Bereich. Der isoelektrische Punkt wird aus diesen Daten durch Interpolation

²⁸ T. SVEDBERG u. K. O. PEDERSEN, Die Ultrazentrifuge, Dresden und Leipzig 1940, S. 262.

²⁹ G. MEYERHOFF, Makromolekulare Chem. **6**, 197 [1951].

³⁰ T. SVEDBERG u. K. O. PEDERSEN, Die Ultrazentrifuge, Dresden und Leipzig 1940, S. 6.

³¹ B. A. BRICE, M. HALWER u. R. SPEISER, J. opt. Soc. America **40**, 768 [1950].

³² B. A. BRICE u. R. SPEISER, J. opt. Soc. America **36**, 363 [1946].

* Physikalische Werkstätten, Göttingen.

³³ M. SCHÖNENBERGER, Z. Naturforschg. **10b**, 474 [1955].

³⁴ A. EINSTEIN, Ann. Physik **19**, 289 [1906]; **34**, 591 [1911].

³⁵ A. POLSON, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **21**, 185 [1956].

³⁶ O. HEPP, Z. ges. exp. Med. **99**, 709 [1936]; Z. Biol. **99**, 230 [1938].

³⁷ T. SVEDBERG u. K. O. PEDERSEN, Die Ultrazentrifuge, Dresden und Leipzig 1940, S. 10.

³⁸ G. SCHRAMM, Die Biochemie der Viren, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954, S. 43.

gefunden. Als Puffer wählten wir ein Gemisch aus diäthylbarbitursäurem Natrium, Natriumacetat und Salzsäure. Die Ionenstärke betrug bei allen pH -Werten $\mu=0,1$. In der folgenden Tab. 1 sind die Mengen der Puffersubstanzen für einen l Lösung zusammengestellt.

pH	diäthylbarbitursäures Natrium [g]	Natriumacetat 3 H ₂ O [g]	0,1-n · HCl [ml]
3,61	5,20	3,43	495
4,72	5,84	3,85	436
6,75	6,91	4,56	328
7,68	7,61	5,02	259
8,60	9,56	6,32	65

Tab. 1. Pufferzusammensetzung für die Bestimmung des isoelektrischen Punktes.

Kohlenhydrate

Die Hexosen des α_2 -Makroglobulins bestimmten wir mit der Orcinmethode von SØRENSEN und HAUGAARD³⁹ in der bereits früher beschriebenen Modifikation⁴⁰, die Fucose mit Cystein nach DISCHE⁴¹, die Hexosamine nach der von BLIX⁴² abgeänderten Methode von ELSON und MORGAN⁴³, die Hexuronsäuren durch die Tollenssche Reaktion mit Naphthoresorcin in der Modifikation von MAUGHAN, EVELYN und BROWNE⁴⁴ und die *N*-Acetylsialinsäure nach einer Methode, die auf BÖHM, DAUBER und BAUMEISTER⁴⁵ zurückgeht.

Tryptophan-Tyrosin

Für die Ermittlung des Tryptophangehaltes bedienten wir uns der Methode von SPIES und CHAMBERS⁴⁶, den Gehalt des Tyrosins erhielten wir mit α -Nitroso- β -naphthol nach den Angaben von THOMAS⁴⁷.

Lipoproteine

Die α_2 -Lipoproteine versuchten wir immunologisch²¹, nach Extraktion mit Methanol und Petroläther gravimetrisch⁴ und durch Anfärbung mit Sudanschwarz nach SWAHN⁴⁸ in der schon früher beschriebenen Modifikation²⁶ nachzuweisen.

Daneben verwandten wir für β -Lipoproteine noch die Fällungsmethode mit Heparin nach BURSTEIN und SAMAILLE⁴⁹. Dazu vermischte man 2 ml einer 0,025-*m*. CaCl₂-Lösung mit 0,2 ml einer 1,6-proz. wäßrigen α_2 -Makroglobulin-Lösung. Zu einem zweiten Ansatz gab man 0,04 ml einer 1-proz. wäßrigen Heparinlösung. Es entstand eine Trübung, deren Intensität im Spektralphotometer bei 700 $m\mu$ gegen den ersten Ansatz gemessen wurde.

Ergebnisse

Elektrophorese⁵⁰: Wie aus der ersten Abbildung ersehen werden kann, ist das α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1157 in Diäthylbarbitursäure-Puffer pH 8,6 elektrophoretisch homogen. Der Reinheitsgrad der beiden α_2 -Makroglobuline 1106 und 1106 U beträgt 95,5% und 95,1 Prozent. In der Tab. 3, in die auch die nach den Angaben von BROWN u. a.¹⁵ hergestellte Makroglobulin-Fraktion aufgenommen ist, sind die Ergebnisse der Reinheitsprüfungen zusammengefaßt.

Die elektrophoretischen Beweglichkeiten betragen aufsteigend $-u = 4,7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ und absteigend $-u = 4,2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, sie entsprechen der Wanderungsgeschwindigkeit des α_2 -Globulins eines menschlichen Normalserums.

aufsteigend

absteigend

Abb. 1. Elektrophorese-Aufnahme des α_2 -Makroglobulins Op. Nr. 1157 nach 90 Min. Versuchsdauer.

³⁹ M. SØRENSEN u. G. HAUGAARD, *Biochem. Z.* **260**, 247 [1933].

⁴⁰ M. SCHÖNENBERGER, H. KELLNER, H. SÜDHOF u. H. HAUPT, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **309**, 145 [1958].

⁴¹ Z. DISCHE u. L. B. SHETTLES, *J. biol. Chemistry* **175**, 595 [1948].

⁴² G. BLIX, *Acta chem. scand.* **2**, 467 [1948].

⁴³ A. ELSON u. W. T. J. MORGAN, *Biochem. J.* **27**, 1824 [1933].

⁴⁴ G. B. MAUGHAN, K. A. EVELYN u. J. S. L. BROWNE, *J. biol. Chemistry* **126**, 567 [1938].

⁴⁵ P. BÖHM, St. DAUBER u. L. BAUMEISTER, *Klin. Wschr.* **32**, 289 [1954].

⁴⁶ J. R. SPIES u. D. C. CHAMBERS, *Analytic Chem.* **20**, 30 [1948].

⁴⁷ L. E. THOMAS, *Arch. Biochem. Biophysics* **5**, 175 [1944].

⁴⁸ B. SWAHN, *Skand. J. clin. Laborat. Invest.* **4**, 98, 247 [1952].

⁴⁹ M. BURSTEIN u. J. SAMAILLE, *C. R. hebdom. Séances Acad. Sci.* **243**, 2185 [1956]; *J. de Physiol.* **49**, 83 [1957].

Ultrazentrifuge: Die unten wiedergegebene Abb. 2 zeigt eine Sedimentations-Aufnahme des α_2 -Makroglobulins Op. Nr. 1157 in der Ultrazentrifuge nach einer Versuchsdauer von 136 Minuten. Die untersuchte Substanz ist nahezu einheitlich, sie enthält noch etwa 2% einer langsamer sedimentierenden Beimengung. Die Op. Nrn. 1106 und 1106 U enthalten 88% bzw. 91% α_2 -Makroglobulin (Tab. 3).

Abb. 2. Sedimentations-Diagramm des α_2 -Makroglobulins Op. Nr. 1157 nach 136 Min. Versuchsdauer.

In der folgenden Tabelle sind die nach dem Brown'schen Aufarbeitungsverfahren hergestellten Fraktionen, die wir in der analytischen Ultrazentrifuge geprüft haben, zusammengefaßt und die Sedimentationskonstanten ihrer Komponenten und deren prozentuale Verteilung angegeben. Das Sediment II ist die Fraktion, die das Brown'sche Globulin enthalten sollte. In allen Aufarbeitungen findet sich eine Fraktion, die mit $s_{20,w} = 18 - 19$ sedimentiert, während keine Komponente mit den Sedimentationskonstanten zwischen 10 und 18 beobachtet wurde (Tab. 2). Es zeigt sich also, daß beide Herstellungsverfahren, die Fraktionierung mit Ammonsulfat nach SCHULTZE und Mitarbb.¹ und die präparative Ultrazentrifugierung der durch Alkohol isolierten Fraktion III-0 nach BROWN u. a.¹⁵, α_2 -Makroglobuline mit identischem Sedimentations-Verhalten liefern.

Wie aus den mitgeteilten Daten entnommen werden kann, ist das α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1157 mit 2% eines niedermolekularen Proteins praktisch einheitlich, während die α_2 -Makroglobuline Op. Nr. 1106 und Op. Nr. 1106 U neben niedrig sedimentie-

	Fraktion	~ 7 $s_{20,w}^{1,5}$ [%]	8—10 $s_{20,w}^{1,5}$ [%]	18—19 $s_{20,w}^{1,5}$ [%]	~ 20 $s_{20,w}^{1,5}$ [%]
I. Ultrazentrifugierung	Sediment I	70	4	23	3
	untere Fraktion I	99	—	1	—
II. Ultrazentrifugierung	Sediment II	67	4	26	3
	untere Fraktion II	73	3	21	3

Tab. 2. Prozentuale Verteilung und Sedimentationskonstanten der vier nach BROWN isolierten Fraktionen.

renden Nebenkomponten auch höhermolekulare Beimengungen enthalten. Elektrophoretisch wurde das α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1157 als homogen gefunden, die Op. Nr. 1106 und 1106 U bestehen zu

Ultrazentrifuge ³⁰		Tiselius-Elektrophorese ⁵⁰		Immunochemische Bestimmung ²¹
1106	[%]	$s_{20,w}^*$	95,1	$A \sim 0,07$
	8	—		$\beta \sim 0,41$
	88	20,0		$\gamma \sim 2,8$
1106 U	4	—	95,5	
	[%]	$s_{20,w}^{**}$		$A \sim 0,08$
	6	—		$\beta \sim 0,04$
1157	91	20,5	100	$\gamma \sim 0,27$
	3	—		
	[%]	$s_{20,w}^{**}$		$A \sim 0,1$
α_2 -Makroglobulin-Fraktion nach BROWN	2	19,6	—	$\beta < 0,015$
	98	—		$\gamma \sim 0,8$
	[%]	$s_{20,w}^{**}$		
	67	~ 7		$A \sim 0,3$
	4	8—10		$\beta < 0,49$
	26	18—19		
	3	> 20		$\gamma \sim 15,8$

Tab. 3. Zusammensetzung der verwendeten α_2 -Makroglobuline. * Ultrazentrifuge der Phywe (Physikalische Werkstätten, Göttingen) bei 25 000 U/min, d. h. bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 45 500 g. ** Ultrazentrifuge der Spinco bei 29 500 U/min, d. h. bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 63 241 g.

etwa 95% aus α_2 -Globulin. Immunologisch konnten im α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1106 etwa 2,8% γ -Globulin nachgewiesen werden, dagegen hat das γ -Glo-

bulin in α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1157 wie das Albumin und das β_1 -metallbindende Globulin einen so niedrigen Wert, daß er auch immunologisch nicht mehr genau bestimmbar ist.

Sedimentation: Die Sedimentationskonstante ist von der Konzentration abhängig. Wir erhielten mit dem α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1157 für drei verschiedene Konzentrationen die folgenden Sedimentationskonstanten:

[%]	$s_{20,w}^0$
0,2	19,4
0,9	18,6
1,2	18,3

deren Extrapolation auf die Konzentration Null eine Sedimentationskonstante von $s_{20,w}^0 = 19,6 \cdot 10^{-13} \text{ cm sec}^{-1} \text{ Dyn}^{-1}$ liefert (Abb. 3). Die Sedimentationskonstanten der α_2 -Makroglobuline Op. Nr. 1106 und 1106 U ($s_{20,w}^0 = 20,0$ und $20,5$) stimmen mit diesem Wert gut überein.

Abb. 3. Extrapolation der Sedimentationskonstanten des α_2 -Makroglobulins Op. Nr. 1157.

Diffusion: Auch die Diffusionskonstante erwies sich, wie die angegebenen Daten zeigen, von der Eiweißkonzentration abhängig.

[%]	$D_{20,w}^0$
0,5	2,40
0,8	2,17
1,0	2,26
1,3	2,31
1,5	2,14

Dieser Konzentrations-Einfluß macht es notwendig, die Diffusionskonstante auf die Konzentration Null zu extrapolieren. Wie aus der Abb. 4 ersichtlich, liegt dieser Wert für das α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1157 bei $D_{20,w}^0 = 2,41 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$.

Das α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1106 besitzt bei unendlicher Verdünnung eine Diffusionskonstante von 1,97 und das α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1106 U

Abb. 4. Extrapolation der Diffusionskonstanten des α_2 -Makroglobulins Op. Nr. 1157.

von $2,20 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$. Obwohl für die Diffusions-Bestimmungen zwei verschiedene Geräte, die Original-Meyerhoffsche²⁹ und die Spinco*-Diffusions-Apparatur, Verwendung fanden, weisen die Diffusions-Ergebnisse Unterschiede auf, die wir auf methodische Schwankungen zurückführen. Sie üben aber keinen entscheidenden Einfluß auf die

Abb. 5. Diffusionsdiagramme des α_2 -Makroglobulins Op. Nr. 1106 bei $c = 1,0$ Prozent.

* Beckman Instruments, Inc., Fullerton (California).

Größe der Mol.-Gew. aus. Die Diffusionskonstanten bewegen sich zwischen 1,97 und 2,41, umfassen somit einen Streubereich von ± 10 Prozent. Die mit diesen Diffusionskonstanten aus der Svedbergschen Gleichung errechneten Mol.-Gew. liegen zwischen 820 000 und 950 000, streuen also um ± 7 Prozent. Das Mol.-Gew. des α_2 -Makroglobulins ist somit auch in Übereinstimmung mit den aus der Lichtzerstreuung gewonnenen Mol.-Gew. zwischen 900 000 und 1 000 000 anzunehmen.

Die Abb. 5 zeigt die aufeinanderfolgenden Aufnahmen eines Diffusionsversuches des α_2 -Makroglobulins Op. Nr. 1106 bei der Konzentration $c = 1,0$ Prozent.

Viskosität: Die bei den Viskositäts-Messungen erhaltenen Daten für das α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1106

[%]	$\left(\frac{\eta/\eta_0 - 1}{c}\right)$
2,0	0,075
3,0	0,079
4,0	0,085
5,0	0,094
6,0	0,106
8,0	0,160

werden, wie es in Abb. 6 dargestellt ist, auf unendliche Verdünnung extrapoliert. Der dabei ermittelte Wert, die Intrinsic-Viskosität, beträgt 0,068 (c in g/100 ml).

Abb. 6. Extrapolation der Viskositätszahlen des α_2 -Makroglobulins Op. Nr. 1106.

Kolloidosmotischer Druck: Bei der Bestimmung des kolloidosmotischen Druckes wurden für das α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1106 in den beiden Lösungsmitteln die folgenden Daten erhalten:

Dest. Wasser p_H 7,8

c [%]	H ₂ O [mm]	P/c
7,6	220	29
3,8	60	16
1,9	19	10

Phosphatpuffer p_H 7,0; $\mu = 0,04$

c [%]	H ₂ O [mm]	P/c
7,5	130	17,4
1,9	10	5,3

Die Werte P/c werden gegen c aufgetragen und, wie aus der nächsten Abbildung ersichtlich, gegen $c = 0$ extrapoliert (Abb. 7).

Abb. 7. Kolloidosmotischer Druck des α_2 -Makroglobulins Op. Nr. 1106 gegen die Konzentration.

Die abgelesenen Werte P/c bei unendlicher Verdünnung ergeben Mol.-Gew. von 830 000 bis 1 200 000. Es kann nur ein Mol.-Gew.-Bereich angegeben werden, da bei hohen Mol.-Gew. der osmotische Druck immer kleinere und ungenauere Meßeffekte liefert.

Molekulargewichte aus Sedimentation und Diffusion sowie aus der Lichtzerstreuung: Mit den auf $c = 0$ extrapolierten physikalischen Größen errechneten wir die angegebenen Molekulargewichte:

	Op. Nr. 1106	Op. Nr. 1106 U	Op. Nr. 1157
$s_{20,w}$	20,0	20,5	19,6
$D_{20,w}$	1,97	2,20	2,41
aus Sedimentation und Diffusion ($M_{s,D}$)	950 000	880 000	820 000
aus Lichtzerstreuung (M_L)	970 000	960 000	920 000

Die aus der Sedimentation und Diffusion ermittelten Mol.-Gew. weisen deutliche Unterschiede auf. Wie aus den gleichzeitig angeführten Konstanten hervorgeht, sind diese Unterschiede auf die Diffusion zurückzuführen, bei deren Ermittlung wir stark streuende Meßwerte erhielten. Geringe Beimengungen scheinen von nur untergeordnetem Einfluß zu sein, wenngleich die Diffusion eine Größe liefert, an

deren Zustandekommen alle in der Lösung enthaltenen Komponenten beteiligt sind. Es wird deshalb immer ein Mittelwert erhalten. Die Sedimentationskonstante dagegen ist nur einer Molekülgröße zugeordnet. Auch an eine, wenn auch geringfügige Dissoziation unseres Globulins während der Diffusion ist zu denken. Wir behandelten deshalb das α_2 -Makroglobulin bei p_H 7,0 mit 5-m. Harnstoff und überprüften sein Verhalten in der Ultrazentrifuge. In der Abb. 8 ist das α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1106 dargestellt. Die Abb. 9 zeigt, wie sich die gleiche Substanz unter dem Einfluß des Harnstoffes aufspaltet.

Abb. 8. Sedimentations-Verhalten des α_2 -Makroglobulins Op. Nr. 1106.

Abb. 9. Sedimentations-Diagramm des α_2 -Makroglobulins Op. Nr. 1106 in 5-m. Harnstoff.

Die beiden Hauptkomponenten besitzen die Sedimentationskonstanten:

$s_{20,w}^{1,5}$	[%]
—	7
11,0	42
15,7	49
—	2

Wir entfernten darauf den Harnstoff aus der Proteinlösung durch eine 24-stdg. Dialyse gegen den bei den Ultrazentrifugier-Versuchen verwendeten Phosphatpuffer und untersuchten diese Substanz in der Ultrazentrifuge. Die beiden durch den Harnstoff entstandenen Fraktionen waren fast völlig verschwunden und eine Komponente mit $s_{20,w}^{1,5} = 18,1$ hatte sich zurückgebildet¹⁰. Daneben lassen sich noch drei niedrig-sedimentierende Proteine und eine höhermolekulare Komponente unterscheiden:

$s_{20,w}^{1,5}$	[%]
—	3
—	3
—	6
18	72
~ 25	16

Abb. 10. SedimentationsDiagramm des α_2 -Makroglobulins Op. Nr. 1106 nach der Reaggregation.

Auch bei der Dialyse gegen Phosphatpuffer in Gegenwart von dem Sulfhydryl-Reagens Jodacetamid in einer Konzentration von 0,01-m. erfolgt Reaggregation zu einem hochmolekularen Protein mit der Sedimentationskonstante $s_{20,w}^{1,5} = 18$. Die relative Verteilung beträgt:

$s_{20,w}^{1,5}$	[%]
—	10
—	5
18	76
—	9

Unter dem Einfluß von Harnstoff wird also das α_2 -Makroglobulin aufgespalten. Entfernt man den Harnstoff, so reaggregieren die Komponenten wieder zu einem dem α_2 -Makroglobulin ähnlichen Protein. Durch Jodacetamid wird dieser Vorgang nicht aufgehoben, er erfolgt somit nicht über Sulfhydrylgruppen.

Auch das α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1157 wird in Gegenwart von Harnstoff in zwei Komponenten aufgespalten. In der höher-sedimentierenden Fraktion, deren Heterogenität im α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1106 angedeutet ist, lassen sich nochmals zwei nahe beieinander sedimentierende Komponenten unterscheiden.

Molekülform: Da das Reibungsverhältnis f/f_0 der drei untersuchten α_2 -Makroglobuline Op. Nr. 1106, 1106 U und 1157 mit 1,65, 1,53 und 1,43 größer als 1 ist, muß das Molekül von der Gestalt der kompakten Kugel abweichen. Es kann eine solvatisierte Kugel darstellen oder eine längliche Form, etwa die eines Ellipsoides, besitzen.

Um uns über die Molekülgestalt des α_2 -Makroglobulins eine Vorstellung machen zu können, berechneten wir für die zwei extremen Modelle, die solvatisierte Kugel und das unhydratisierte Ellipsoid die Viskositätszahl.

1. Da die Reibung der Sedimentation umgekehrt proportional ist, läßt sich die Beziehung aufstellen

$$\frac{f}{f_0} = \frac{S_{\text{ungequollen}}}{S_{\text{gemessen}}} = \frac{r}{r_0},$$

wobei r_0 der Radius der kompakten Kugel und r der Radius der hydratisierten Kugel bedeuten.

Die Viskosität einer Lösung starrer Kugeln ist von EINSTEIN behandelt worden. Nach EINSTEIN beträgt die spezifische Viskosität

$$\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_{sp} = 2,5 \varphi.$$

In dieser Gleichung ist η die Viskosität der Lösung, η_0 die Viskosität des Lösungsmittels und

$$\varphi = \varphi_0 (r/r_0)^3$$

das Volumen der hydratisierten Moleküle. Die Größe $\varphi_0 = cV$ ist das Volumen der als starre Kugeln vorhandenen gelösten Substanz in ml pro ml Lösung.

Wenn man den Wert für r/r_0 einsetzt, erhält man die spezifische Viskosität $\eta_{sp} = 2,5 \varphi = 2,5 \varphi_0 (r/r_0)^3$ und daraus die Intrinsic-Viskosität $\eta_{sp}/c = [\eta]$, wobei c in g/ml angegeben wird.

2. Mit dem Reibungsverhältnis f/f_0 läßt sich in einem von ONCLEY⁵¹ angegebenen Diagramm (Abb. 11), in welchem für Ellipsoide das Achsenverhältnis in logarithmischem Maßstab gegen die Hydratation mit dem Reibungsverhältnis als Para-

Abb. 11. Beziehung zwischen Achsenverhältnis, Hydratation und Reibungsverhältnis (Parameter) nach ONCLEY⁵¹.

Abb. 12. Viskosität der Rotationsellipsoide in Abhängigkeit vom Achsenverhältnis (nach KUHN, KUHN und BUCHNER⁵²).

⁵⁰ A. TISELIUS, Trans. Faraday Soc. **33**, 524 [1937].

⁵¹ J. L. ONCLEY, Ann. N. Y. Acad. Sci. **41**, 121 [1941].

⁵² W. KUHN, H. KUHN u. P. BUCHNER in: Ergebnisse der exakten Naturwissenschaften, Berlin-Göttingen-Heidelberg **25**, 1 [1951].

meter aufgetragen ist, für das unhydratisierte Molekül das Achsenverhältnis ablesen. Aus einer von KUHN, KUHN und BUCHNER⁵² aufgestellten graphischen Darstellung der Viskosität von Rotationsellipsoiden in Abhängigkeit vom Verhältnis der Teilchenachsen (Abb. 12) ergibt sich die spezifische Viskosität η_{sp} und damit auch die Intrinsic-Viskosität $\eta_{sp}/c = [\eta]$. Die Symbole sind die gleichen wie beim Einsteinschen Viskositätsgesetz.

Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tab. 4 wiedergegeben.

	Op. Nr. 1106	Op. Nr. 1106 U	Op. Nr. 1157
Reibungsverhältnis f/f_0	1,65	1,53	1,43
Achsenverhältnis a/b	12 : 1	10 : 1	8 : 1
$[\eta]$ exp., c in g/ml	6,80		
$[\eta]$ Kugel theoret.	8,25	6,57	5,50
$[\eta]$ Ellipsoid theoret.	12,90	9,92	7,51

Tab. 4. Reibungsverhältnis, Achsenverhältnis und Intrinsic-Viskosität der α_2 -Makroglobuline Op. Nr. 1106, 1106 U und 1157.

Ein Vergleich der gemessenen Viskositätszahl $[\eta] = 6,8$ mit den aus dem Reibungsverhältnis gewonnenen Ergebnissen läßt den Schluß zu, daß die α_2 -Makroglobuline Op. Nr. 1106 und 1106 U die Gestalt einer Kugel besitzen. Beim α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1157 stimmt dagegen der Wert des Rotationsellipsoides besser mit der experimentell gefundenen Viskositätszahl überein, so daß man dieser Substanz die Form eines Rotationsellipsoides zuschreiben könnte. Eine eindeutige Entscheidung über die Gestalt läßt sich mit der beschriebenen Methode beim Fibrinogen treffen.

Fibrinogen: Mit einem Mol.-Gew. von 350 000²⁷ errechnet sich für das Fibrinogen ein Reibungsverhältnis von $f/f_0 = 1,88$. Seine Viskosität würde bei Kugelform $\eta_{sp} = 2,5 \varphi$ betragen. Setzt man, wie beim α_2 -Makroglobulin, die Werte ein, erhält man

$$\eta_{sp} = 2,5 \varphi_0 (r/r_0)^3 = 2,5 (1,88)^3 \cdot c \cdot V$$

$$= 2,5 (1,88)^3 \cdot 0,725 \cdot c,$$

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = 2,5 \cdot (1,88)^3 \cdot 0,725 = 12,075,$$

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] = 12,1.$$

Da die Viskosität des Fibrinogens, das frei von kälte-unlöslichem Globulin ist, von EDSALL, GILBERT

und SCHERAGA⁵³ zu $[\eta] = 25$ gefunden wurde, kann das Fibrinogen nicht die Form einer Kugel besitzen. Nach ONCLEY ergibt sich ein Achsenverhältnis von 1 : 20 und daraus nach KUHN u. a. $\eta_{sp}/\varphi = 35,0$. Da $\varphi = V c$, ergibt sich

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] = 35,0 \cdot 0,725 = 25,375, \quad [\eta] = 25,4,$$

also eine gute Übereinstimmung mit dem experimentellen Wert und mit der Vorstellung, daß das Fibrinogen ein gestrecktes Molekül darstellt^{54, 55}.

Isoelektrischer Punkt: In der folgenden Tab. 5 haben wir die in Diäthylbarbitursäure-Acetat-Salzsäure-Puffer von verschiedenem p_H -Wert ermittelten elektrophoretischen Beweglichkeiten der aufsteigenden Seite der Kuvette zusammengestellt.

p_H	u
3,61	6,5
4,72	2,2
6,75	— 2,8
7,68	— 3,8
8,60	— 4,0

Tab. 5. Beweglichkeiten für den isoelektrischen Punkt.

Aus der graphischen Darstellung der Beweglichkeiten gegen die p_H -Werte ergibt sich für das α_2 -Makroglobulin der Op. Nr. 1106 ein isoelektrischer Punkt von $I.P. = 5,4$ (Abb. 13).

Abb. 13. Diagramm der Wanderungsgeschwindigkeiten für den isoelektrischen Punkt.

Chemische Eigenschaften: In der Tab. 6 finden sich die chemischen Daten der α_2 -Makroglobuline Op. Nr. 1157 und 1106. Wie aus den Werten ersen werden kann, setzt sich das α_2 -Makroglobulin zu über 90% aus Aminosäuren zusammen, von denen Tyrosin im α_2 -Makroglobulin Op. Nr. 1157 mit 5,4% und Tryptophan mit 1,3% vertreten sind.

⁵³ J. T. EDSALL, G. A. GILBERT u. H. A. SCHERAGA, J. Amer. chem. Soc. 77, 157 [1955].

Das α_2 -Makroglobulin besitzt keine freie SH-Gruppe. Etwa 8% Kohlenhydrate sind in dem Eiweißmolekül enthalten. Mit vier verschiedenen chemischen und biochemischen Analysemethoden konnte nachgewiesen werden, daß das α_2 -Makroglobulin frei von Lipoid ist.

	α_2 -Makro- globulin Op. Nr. 1157 [%]	α_2 -Makro- globulin Op. Nr. 1106 [%]
N	14,8	14,3
Biuret (Albumin = 100)	92	92
Tyrosin	5,4	—
Tryptophan	1,3	—
Galaktose-Mannose (1:1)	3,7	3,6
Fucose	0,12	0,16
N-Acetyl-hexosamin	3,1	2,9
Hexuronsäuren	0,13	0,15
Acetylsialinsäure	1,8	1,7

Tab. 6. Chemische Daten.

Elektrophorese	aufsteigend — $u = 4,7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ absteigend — $u = 4,2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$
Sedimentation	$s_{20,w}^\circ = 19,6 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ Dyn ⁻¹
Diffusion	$D_{20,w}^\circ = 2,41 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$
Viskosität (c in g/100 ml)	$[\eta] = 0,068$
Mol.-Gew. $M_{s,D}$ M_L	820 000 920 000
Reibungs- verhältnis	$f/f_0 = 1,43$
Isoelektrischer Punkt	$I.P. = 5,4$
Extinktion	$[E] \frac{1\%}{280 \text{ m}\mu} = 6,9$

Tab. 7. Physikalisch-chemische Eigenschaften des α_2 -Makroglobulins Op. Nr. 1157.

Diskussion

Wie aus der Zusammenstellung (Tab. 7) hervorgeht, besitzt das von uns isolierte Protein, das ONCLEY den β -Globulinen zugerechnet hat, die elektrophoretische Wanderungs-Geschwindigkeit eines α_2 -Globulins. Es läßt sich durch Fällung mit Ammonsulfat darstellen und besitzt in der Ultrazentrifuge eine auf die Konzentration Null extrapolierte Sedimentationskonstante von $s_{20,w}^\circ \sim 20 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ Dyn}^{-1}$. Auch eine durch Alkoholfällung

nach COHN und durch präparative Ultrazentrifugierung aus Humanplasma isolierte Fraktion sedimentiert in der gleichen Größenordnung. Bei den Diffusions-Bestimmungen zeigten sich Schwankungen wahrscheinlich methodischer Art. Die aus den Diffusions-Daten mit der Methode vom kleinsten Fehlerquadrat für unendliche Verdünnung ermittelten Diffusionskonstanten und die Mol.-Gew., die sich unter Verwendung der Diffusionskonstanten aus der Svedbergschen Gleichung für die Mol.-Gew.-Bestimmung errechnen, weisen deshalb unterschiedliche Werte auf.

Die Mol.-Gew. aus der Lichtstreuung zeigen eine geringere Schwankung, liegen aber insgesamt höher. Es ist bekannt, daß die größeren Moleküle einen verhältnismäßig höheren Beitrag zur Streulicht-Intensität liefern. Umgekehrt geben die großen Moleküle einen kleinen, nicht sehr genau bestimmbaren osmotischen Druck. Wir haben deshalb den Bereich abgegrenzt, in dem das Mol.-Gew. liegen muß. Um eine Aussage über die Molekülgestalt machen zu können, berechneten wir für zwei Modelle, nämlich für die hydratisierte Kugel und für das unhydratisierte Ellipsoid, die Viskositätszahlen und stellten sie zu der gemessenen Viskositätszahl in Beziehung. Die Unterschiede in den erhaltenen Daten erlaubten keine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten Molekülgestalt. Die Richtigkeit der angewandten Methode ist mit dem Fibrinogen belegt, dessen gestreckte Molekülform bestätigt werden konnte.

In Gegenwart von 5 Molen Harnstoff dissoziiert das α_2 -Makroglobulin vollständig in kleinere Bruchstücke, in der Ultrazentrifuge beobachtet man im Verhältnis 1:1 zwei Komponenten mit den Sedimentationskonstanten 11,0 und 15,7. Diese kann man sich aus dem α_2 -Makroglobulin-Molekül entstanden denken. Legt man das Mol.-Gew. des γ -Globulins ($s_{20,w}^\circ \sim 7$) mit 150 000 als Einheit zugrunde, so kann man für die niedriger sedimentierende (11,0 S) der beiden Komponenten wie für das meist im γ -Globulin beobachtete Dimere (~ 10 S) ein Mol.-Gew. von 300 000 annehmen. Der höher sedimentierenden Komponente ist entsprechend das doppelte Mol.-Gew., also etwa 600 000 zuzuordnen. Die Aggregation der beiden Moleküle beim Entfernen des Harnstoffes ergibt dann ein Mol.-Gew. von 900 000, das dem Mol.-Gew. des α_2 -Makroglobulins entspricht. Man kann also vermuten, daß das α_2 -Makroglobulin durch den

Harnstoff in äquimolarem Verhältnis in zwei Moleküle mit den Mol.-Gew. 600 000 und 300 000 dissoziiert und daß diese wieder im gleichen Verhältnis aggregieren, wenn man den Harnstoff entfernt, zumal die Sedimentationskonstante der dialysierten Substanz $s_{20,w}^{1.5} = 18,1$ beträgt. Auch in Gegenwart von Jodacetamid erfolgt Reaggregation. Von Jodacetamid ist bekannt⁵⁴, daß es die Sulfhydrylgruppen blockiert. Wir nehmen deshalb an, daß die Reaggregation über andere als SH-Gruppen erfolgt, wahrscheinlich über Wasserstoffbrücken.

Wie wir mit der immunchemischen Methode, der Fällung mit Heparin in Gegenwart von Calciumchlorid, der gravimetrischen Bestimmung des in

Petroläther löslichen Anteils und der Anfärbung mit Sudanschwarz nachweisen konnten, enthält das α_2 -Makroglobulin kein Lipoid. Es besteht zu mehr als 90% aus Aminosäuren und zu etwa 8% aus Kohlenhydraten, davon 1,8% Acetylsialinsäure. Der isoelektrische Punkt liegt bei $p_H 5,4$ und stimmt überein mit dem von COHN angegebenen isoelektrischen Punkt ($p_H 5,5$) für das β_1 -lipoidarme Euglobulin.

Für wertvolle Diskussionen sind wir Herrn Professor Dr. HANS KUHN, Direktor des Physik.-chem. Instituts der Universität Marburg, zu großem Dank verpflichtet.

Wesentlichen Anteil am Zustandekommen der Arbeit hatten: Fräulein I. WEBER, Herr H. MÜLLER, Herr H. HAUPT und Frau I. BIEL. Ihnen sei auch an dieser Stelle gedankt.

⁵⁴ J. T. EDSALL, J. F. FOSTER u. E. H. SCHEINBERG, J. Amer. chem. Soc. **69**, 2731 [1947].

⁵⁵ C. E. HALL, J. biol. Chemistry **179**, 857 [1949].

⁵⁶ R. B. SIMPSON u. W. KAUFMANN, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5139 [1953]; H. K. FRENSDORFF, M. T. WATSON u. W. KAUFMANN, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5167 [1953]; R. LONTIE u. G. BECKERS, J. Indian chem. Soc. **34**, 93 [1957].

Zonenelektrophorese in Agar-Gel

II. Ein interferometrisches Verfahren

Von W. BOCKEMÜLLER

Aus dem Chemotherapeutischen Forschungsinstitut, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt a. Main
(Z. Naturforsch. **13 b**, 772—783 [1958]; eingegangen am 10. Juli 1958)

Die Zonenelektrophorese besitzt gegenüber der Elektrophorese im U-Rohr verschiedene methodisch bedingte Vorteile, von denen der geringe Substanzbedarf und die Auftrennung des Gemisches in Einzelkomponenten von einheitlicher Wanderungsgeschwindigkeit bereits in der Papierelektrophorese zum Ausdruck kommen. Wie wir bereits vor kurzem zeigten¹, kann man bei der in Agar-Gel durchgeführten Zonenelektrophorese mittels der PHILPOT-SVENSSON-Methode den Verlauf der Trennung optisch verfolgen und die relativen Konzentrationen der Einzelkomponenten bestimmen. Das Diagramm der PHILPOT-SVENSSON-Methode zeigt nicht den Konzentrationsverlauf längs des Wanderungsweges y an, sondern die Änderung der Konzentration c pro Wegänderung, also dc/dy als Funktion des Weges y . Diese Gradientenkurve wird für die Auswertung der Ergebnisse bei der U-Rohr-Elektrophorese und bei der Ultrazentrifuge gebraucht; für die Auswertung der Zonenelektrophorese ist jedoch das Konzentrations-Diagramm erforderlich, welches sich recht einfach aus dem PHILPOT-SVENSSON-Diagramm berechnen läßt¹.

Nicht allein die Absicht, diese Umrechnung zu ersparen, sondern in erster Linie der Wunsch, dem Diagramm der Zonenelektrophorese die gewohnte, anschauliche und direkt auswertbare Form der Konzentrations-Kurve zu geben, war die Veranlassung, die optische Registrierung des Elektrophorese-Verlaufs nun auf interferometrischem Wege vorzunehmen. Die interferometrische Darstellung des Konzentrations-Verlaufs ist z. B. von SVENSSON² für die U-Rohr-Elektrophorese schon gezeigt worden. Das Konzentrations-Diagramm hat jedoch aus den oben gesagten Gründen für die U-Rohr-Elektrophorese oder für die Ultrazentrifuge kaum praktische Bedeutung. Dagegen verdient diese physikalische Methode, welche direkt den Konzentrations-Verlauf als Funktion des Wanderungsweges darstellt, bei der Zonenelektrophorese besondere Beachtung.

1. Das optische System

Der von SVENSSON² in die Interferometrie eingeführte Gitterspalt ermöglicht es, ohne größeren optischen Aufwand eine einwandfreie Darstellung des Konzentra-

tions-Verlaufs innerhalb der Elektrophorese-Zelle durch Interferenz zu erzielen.

In Abb. 1 stellt S einen mit Natriumlicht beleuchteten Horizontalspalt (20 · 3 mm) dar, welcher ein senkrecht-Strichgitter trägt. Das Gitter besitzt 10 Striche pro

¹ Vorl. Mitt.: W. BOCKEMÜLLER, A. OERTER, Naturwissenschaften **43**, 398 [1956]; I. Mitt.: W. BOCKEMÜLLER, A. OERTER,

Arb. Paul-Ehrlich-Inst., dem Georg-Speyer-Haus, Ferdinand-Blum-Inst. Frankfurt a. M. Heft **52**, 61 [1956].

² H. SVENSSON, Acta chem. scand. **5**, 1301 [1951].