

# Ueber die Fällung von Toxalbuminen durch Nucleïnsäure.

von

Dr. med. **M. Tichomiroff** (Nischni-Nowgorod).

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)  
(Der Redaction zugegangen am 22. Juni 1895.)

Aus der Entdeckung der Thatsache, dass die pathogenen Wirkungen gewisser Mikroorganismen auf die von ihnen producirten Gifte zurückzuführen sind, haben sich für die physiologische Chemie neue Aufgaben ergeben. Zunächst handelt es sich darum, Mittel zu finden, um die bakteriellen Gifte aus ihren Lösungen in unzersetztem Zustande abzuscheiden. Erst wenn wir im Besitz derartiger Werkzeuge sind, können wir dem schwierigen Problem der chemischen Charakterisirung dieser Stoffe näher treten.

Am häufigsten wurde bisher nach dem Vorgang von Brieger und C. Fränkel das Ammoniumsulfat zur Abscheidung der Gifte aus ihren unreinen Lösungen angewandt. Auf den Vorschlag von Professor Dr. A. Kossel hin unternahm ich es, die Nucleïnsäure auf ihren Werth als Fällungsmittel für derartige Gifte zu prüfen.

## 1. Ricin.

Zuerst wurde versucht, das Ricin durch Nucleïnsäure niederzuschlagen<sup>1)</sup>. Die Untersuchungen von Ehrlich<sup>2)</sup> haben ergeben, dass 1 ccm. einer Ricinlösung von 1:200000 Wasser für 20 gr. Körpergewicht sicher tödtlich ist. Das Ricin mit

<sup>1)</sup> Versuche mit Ricin sind bereits früher im Laboratorium von Prof. A. Kossel durch Herrn Y. Inoko ausgeführt worden, aber in Folge des frühzeitigen Todes dieses Forschers nicht zum Abschluss gelangt.

<sup>2)</sup> Ehrlich, Deutsche med. Woch., 1891, Nr. 32.

25% Aschengehalt wurde von Merck bezogen. Eine gewogene Menge desselben wurde in einer entsprechenden Quantität destillirten Wassers unter Zusatz von Natriumcarbonat gelöst und von dieser Lösung wurde je 1 cbcm. weissen Mäusen subcutan injicirt. 0,005 mgr. reinen Ricins war für die Thiere tödtlich. Daher wurde 0,15 gr. reinen Ricins in 300 cbcm. Wasser gelöst, mit Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaction angesäuert und 20 cbcm. einer einprocentigen Nucleinsäurelösung hinzugesetzt. Der entstandene Niederschlag wurde auf ein gewogenes Filter gebracht, mit Alkohol und Aether ausgewaschen, im Exsiccator getrocknet und gewogen. Der Niederschlag, welcher 0,077 gr. betrug, wurde in Wasser unter Zusatz von Natriumcarbonat gelöst und seine Giftigkeit auf weisse Mäuse geprüft. Einer weissen Maus von 18 gr. Körpergewicht wurde soviel der Lösung subcutan injicirt, wie 0,02 mgr. des Niederschlages entsprach, worauf am nächsten Tage Krankheitssymptome hervortraten; das Thier sass ruhig im Käfig, nahm keine Nahrung zu sich. Nach zwei Tagen war es todt. Der zweiten weissen Maus von 16,5 gr. Gewicht wurde 0,01 mgr. des Niederschlages eingepfist; der Tod trat nach zwei Tagen ein. Der dritten Maus von 20 gr. Gewicht wurden 0,006 mgr. und einer vierten Maus von 21 gr. Gewicht 0,005 mgr. des Niederschlages subcutan injicirt. Die erste Maus ging nach zwei, die letzte nach fünf Tagen zu Grunde. Aus diesen Resultaten ergibt sich, dass das Ricin aus seinen Lösungen durch Nucleinsäure ausgefällt wird, ohne seine giftigen Eigenschaften einzubüssen.

## 2. Tetanusgift.

Bei diesen Versuchen erwies es sich als nothwendig, die Lösung des Giftes vor der Nucleinsäure-Fällung durch eine Chamberland-Kerze zu filtriren, da man sonst vor dem Vorhandensein lebender Bacillen im Niederschlage nicht sicher ist. Ich konnte durch Culturversuche nachweisen, dass, wenn man ohne diese Cautelen arbeitet, Tetanusbacillen, die in der Lösung suspendirt sind, durch den Nucleinsäure-Niederschlag in lebendem Zustand niedergerissen werden.

Zu 275 cbcm. der zehntägigen Tetanusbacillen wurden 0,5% Phenol gesetzt und das ganze durch die Porzellankerze filtrirt. Das Filtrat wurde mit Essigsäure angesäuert und mit Nucleïnsäure versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde mit Alkohol und Aether gewaschen und in zwei Theile getheilt. Der eine Theil, welcher 0,044 gr. organischer Substanz enthielt, wurde in Wasser unter Zusatz von Natriumcarbonat gelöst. Von dieser Lösung wurde die 0,04 mgr. entsprechende Menge weissen Mäusen injicirt, worauf die Thiere nach 18—20 Stunden unter Tetanus-Symptomen zu Grunde gingen.

Der andere Theil des Niederschlages wurde in destillirtem Wasser suspendirt und von diesem Gemisch wurde je 1 cbcm. zwei weissen Mäusen injicirt. Die Thiere starben am nächsten Tage.

Die Lösung des Nucleïnsäure-Niederschlages wurde einen Monat aufbewahrt und büsste ihre toxische Wirkung nicht ein: Die weissen Mäuse starben nach zwei Tagen, nachdem je 0,4 mgr. organischer Substanz denselben subcutan injicirt worden war.

Aus diesen Versuchen kann man den Schluss ziehen, dass der durch Nucleïnsäure in der bacillenfrenen Bouillon-cultur entstandene Niederschlag auch toxisch wirkt und dass Nucleïnsäure nicht im Stande ist, die Wirkung des Giftes aufzuheben. Die Niederschläge gaben immer die Biuret- und Millon'sche Reaction.

### 3. Diphtheriegift<sup>1)</sup>.

Auf ähnliche Weise wurden Lösungen des Diphtheriegiftes in Bouillon behandelt. Mit Nucleïnsäure fällt ein Niederschlag aus, welcher stark giftige Wirkung besitzt. 0,04 mgr. von diesem Niederschlag waren für Meerschweinchen von 500 gr. Gewicht tödtlich. Dieser Niederschlag wurde drei

<sup>1)</sup> Diese Versuche schlossen sich an eine Untersuchung über die Fällbarkeit des Diphtheriegiftes und des Antitoxins durch Nucleïnsäure an, welche von den Herren A. und H. Kossel ausgeführt, aber noch nicht zum Abschluss gelangt ist. Die Lösung des Diphtheriegiftes verdanke ich der Freundlichkeit des Herrn Dr. H. Kossel.

Monate in einem gut<sup>1</sup> verstopften Gefäße im Dunkeln aufbewahrt und verlor seine giftige Wirkung nicht. So wurde einem Meerschweinchen von 500 gr. Gewicht 0,2 mgr. in Lösung injicirt, was den Tod des Thieres nach zwei Tagen zur Folge hatte. Einem zweiten Meerschweinchen von 470 gr. wurde 0,08 mgr. injicirt, es starb nach drei Tagen. Einem dritten Meerschweinchen von 465 gr. Gewicht wurde 0,04 mgr. injicirt, es trat der Tod nach vier Tagen ein.

#### 4. Streptococcusgift.

Die Bouillonculturen von anderen Mikroorganismen wurden auf dieselbe Weise, wie oben, behandelt, hier erhielt ich indess weniger günstige Resultate. Eine Bouillonkultur von *Streptococcus pyogenes* wurde mit Nucleinsäure versetzt, der Niederschlag war für Kaninchen und weisse Mäuse unwirksam, trotzdem die ursprüngliche Lösung einen hohen Grad von Wirksamkeit besass. Die sechstägige *Streptococcus*bouillon wurde nämlich einem Kaninchen von 1915 gr. Gewicht in 4 cbcm. Menge in die Bauchhöhle injicirt und tödtete das Thier nach vier Tagen. Nach dem Tode wurden Hyperämie des Peritoneums und geringe Mengen seröser Flüssigkeit in der Bauchhöhle gefunden. Von dieser Flüssigkeit wurde eine reine *Streptococcus*cultur auf Agar erhalten.

Das Fleisch des gestorbenen Kaninchens wurde mit sterilisirtem Wasser versetzt und 24 Stunden stehen gelassen. Der Fleischauszug wurde filtrirt und in drei Portionen getheilt. Der erste Theil wurde gekocht, filtrirt und das Filtrat mit Nucleinsäure versetzt, der andere Theil wurde in ungekochtem Zustande mit Nucleinsäure versetzt. Beide Niederschläge zeigten sich ohne Wirkung auf Kaninchen und weisse Mäuse, während ein dritter nicht mit Nucleinsäure behandelter Theil des Fleischauszuges, von welchem 6 cbcm. einem Kaninchen in die Bauchhöhle injicirt wurden, das Thier nach vier Tagen tödtete.

Auch eine Bouillonkultur von *Streptococcus*, welche in einer Wasserstoffatmosphäre gezüchtet worden war, gab mit Nucleinsäure einen ungiftigen Niederschlag. *Streptococcus*-bouillon verschiedenen Alters wurde auf ähnliche Weise be-

handelt und gab immer ungiftige Niederschläge. Die gleichen Resultate wurden mit *Staphylococcus aureus* und Typhusbacillen erhalten.

### 5. Gift faulenden Fleisches.

Bei meinen Versuchen mit gefaultem Fleisch und Fisch konnte ich zwar nachweisen, dass unter Umständen ein giftig wirkender Nucleinsäure-Niederschlag erzielt werden kann, indess gelang es mir noch nicht, die Bedingungen genauer zu präcisiren.

Meine Versuche mit Rindfleischbouillon waren ohne Ergebniss, da ich hier unwirksame Niederschläge erhielt, wohl aber gewann ich aus gefaultem Fisch giftige Producte, wie folgender Versuch ergibt:

400 gr. Zander wurden mit 400 ccm. Wasser bei gewöhnlicher Temperatur faulen gelassen. Nach drei Tagen wurde dieses Gemisch zwei Stunden gekocht, colirt und filtrirt, das Filtrat mit Essigsäure angesäuert und mit Nucleinsäure versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde in 40 ccm Wasser gelöst und von dieser Lösung wurde 1 ccm. einer Maus und 0,5 ccm. der anderen injicirt. Die erste Maus starb nach 24 Stunden, die zweite nach drei Tagen.

### 6. Cholera gift.

Eine Rindfleischbouillon wurde mit Cholera bacterien injicirt und 24 Stunden bei Bruttemperatur stehen gelassen. Nach 24 Stunden wurde 1 ccm. von dieser Bouillon einem Meerschweinchen in die Bauchhöhle injicirt und das Meerschweinchen starb am nächsten Tage. Bei der Autopsie war Hyperämie des Peritoneums und Darmes aufzuweisen.

Von der durch die Porzellankerze filtrirten Bouillon wurde einem Meerschweinchen 4 ccm. in die Bauchhöhle injicirt; das Meerschweinchen blieb am Leben. Einem anderen von 420 gr. Gewicht wurde 6 ccm. injicirt, es ging nach zwei Tagen zu Grunde.

Dem mit Essigsäure angesäuerten Filtrate wurde Nucleinsäure zugesetzt. Der entstandene Niederschlag wurde in einigen

Tropfen Natriumcarbonatlösung gelöst und die Lösung mit Wasser verdünnt. Von dieser Lösung wurde einem Meer-schweinchen und einer weissen Maus injicirt. Beide Thiere blieben am Leben.

Dieselben Resultate wurden mit Cholerabouillon, welche zuerst während mehrerer Stunden bei 55° C. erwärmt worden war, erhalten, d. h. der Nucleinsäure-Niederschlag war un-giftig; ebenso unwirksam zeigte sich der Niederschlag von Cholerabouillon, welche 2 Stunden bei 70° C. erwärmt wor-den war.

Es ergab sich somit, dass die Nucleinsäure nicht im Stande war, aus der bacillenfreien giftigen Bouillon ein «Choleragift» niederzuschlagen. Ich hoffte zu günstigeren Resultaten zu gelangen, indem ich die Bacillenleiber auflöste, aber auch hier gelangte ich nicht zu einem durch Nucleinsäure fällbaren Gift. Weder Kali (in 0,5procentiger Lösung) noch Ammoniak ist im Stande, den Bacillenleibern einen mit dieser Eigenschaft begabten Giftstoff in unzersetztem Zustand zu entziehen. —

Aus diesen Versuchen ergeben sich beträchtliche Unter-schiede zwischen den verschiedenen Giften, bezüglich ihres Verhaltens zur Nucleinsäure. Das Tetanus- und Diphtherie-gift können verhältnissmässig leicht durch Nucleinsäure aus ihren Lösungen gefällt werden, dasselbe scheint zum Theil auch bei den durch Fäulniss auftretenden Giften der Fall zu sein, während ich aus den Culturen der Choleraerreger und der Streptococcen derartige durch Nucleinsäure fällbaren Gifte nicht erhielt. Bekanntlich werden Eiweisskörper und Pro-peptone durch Nucleinsäure in saurer Lösung gefällt, es würde aber voreilig sein, wegen dieser Fällbarkeit den Giften eine eiweissartige Beschaffenheit zuzuerkennen. Denn wir beobachten häufig bei derartigen Niederschlagsbildungen, dass nicht nur die eigentlich fällbaren Stoffe, sondern auch andere eigentlich nicht fällbare in die Niederschläge hineintreten und dies könnte auch bei einigen der erwähnten Gifte der Fall sein. Wir werden dies umsomehr vermuthen, da nach den Unter-suchungen von Brieger sowohl Tetanus- wie Diphtheriegift

bei weiterer Reinigung ihre eiweissartigen Eigenschaften verlieren sollen<sup>1)</sup>).

Dieses «Mitreissen» kommt bei den verschiedensten Stoffen, Colloiden und Krystalloiden, anorganischen und organischen, vor und dürfte in verschiedenen Fällen auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Mit dem Wort «Mitreissen» ist also eine Erklärung für diese Art der Fällung noch nicht gegeben.

In Anbetracht der Thatsache, dass unsere Hilfsmittel zur Bearbeitung der Krankheitsgifte noch sehr geringe sind, verdient die Nucleinsäure als Fällungsmittel volle Beachtung. Sie ist leicht in grösseren Mengen darzustellen<sup>2)</sup>, ist aber für die Zwecke dieser Fällungen nur in geringer Menge erforderlich und ihre Anwendung erfordert keine so umständlichen Manipulationen, wie sie bei der Sättigung einer Flüssigkeit mit Ammoniumsulfat nöthig sind.

Am Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. A. Kossel für das freundliche Interesse, welches er mir bei der Durchführung dieser Arbeit zu Theil werden liess, meinen wärmsten Dank auszusprechen.

<sup>1)</sup> Brieger, Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankheiten, Bd. 19, S. 101—112.

<sup>2)</sup> A. Kossel und A. Neumann, Darstellung und Eigenschaften der Nucleinsäure. Ber. d. D. chem. Ges., 1894, Bd. 2, S. 2215.

---