

Zur Kenntniss der Pseudonucleine.

Von

K. H. Giertz, stud. med.

(Aus dem med.-chem. Laboratorium der Universität Upsala.)

(Der Redaction zugegangen am 30. Juni 1899.)

Bei seinen Untersuchungen über die Amyloidsubstanz hat Krawkow¹⁾ als Trennungsmittel des Amyloids von den Nucleinen das Barytwasser benutzt, von dem das Amyloid, nicht aber das Nuclein gelöst wird. Krawkow hat auch das Verhalten des Pseudonucleins (aus Casein) zu Barytwasser geprüft und er ist zu dem Resultate gelangt, dass sowohl die echten Nucleine wie die Pseudonucleine in Barytwasser unlöslich sind.

Diese letzte Angabe steht in scharfem Gegensatz zu der Erfahrung von Professor Hammarsten, welcher das Pseudonuclein aus Casein immer sehr leicht löslich in Barytwasser fand, und aus diesem Grunde forderte er mich auf, die Ursache dieses Widerspruches, wenn möglich, zu erforschen und auch andere Pseudonucleine in dieser Beziehung zu studiren.

Mein erstes Untersuchungsobject war das aus Casein dargestellte Pseudonuclein. Es wurde, wie gewöhnlich, durch Verdauung von Casein mit Pepsinchlorwasserstoffsäure gewonnen und durch wiederholtes Auflösen in Wasser mit möglichst wenig Alkali, Wiederausfällen mit Säure und gründliches Auswaschen gereinigt. Um jede Verunreinigung mit ungelöstem

¹⁾ Beiträge zur Chemie der Amyloidartung. Archiv für exper. Pathol. und Pharmak., Bd. XXXX.

Casein schon von Anfang an ausschliessen zu können, wurde das Casein stets vor der Verdauung in der verdünnten Säure gelöst und dann die saure Pepsinlösung zugefügt. In allen diesen vorläufigen Versuchen war das Pseudonuclein, den Erfahrungen von Hammarsten entsprechend, in Barytwasser sehr leicht und vollständig löslich.

Die einander widersprechenden Erfahrungen von Krawkow und Hammarsten mussten also in einer verschiedenen Versuchsanordnung ihren Grund haben, und ich suchte deshalb zuerst den Einfluss eines verschiedenen Säuregrades zu ermitteln. Ich stellte also zuerst einige Versuchsreihen mit resp. 0,10-, 0,25- und 0,50 %iger Chlorwasserstoffsäure und Pepsin unter sonst ganz gleichen Verhältnissen an, erhielt aber immer ein Pseudonuclein, welches von dem Barythydrate leicht und vollständig gelöst wurde, gleichgültig, ob ich das Barythydrat nur bis zu schwach alkalischer Reaction oder im Ueberschuss zugesetzt hatte.

Demnächst variierte ich die Versuchsdauer, indem ich die Pepsinchlorwasserstoffsäure verschieden lange Zeit, bezw. 24, 36, 48 und 72 Stunden einwirken liess. Dies änderte aber an den Resultaten nichts. Das Nuclein war immer leicht löslich in Barytwasser.

Bevor ich weiter gehe, muss ich an der Art und Weise, wie Krawkow die Löslichkeit des Pseudonucleins in Baryt geprüft hat, erinnern. Krawkow sagt hiervon nur, dass er das Pseudonuclein mit Barytwasser behandelte und dass die abfiltrirte alkalische Flüssigkeit nach Salzsäurezusatz selbst nach einigem Stehen keine Fällung gab. Ich habe mich von der Löslichkeit des Pseudonucleins in Barytwasser sowohl direkt wie durch Prüfung des Filtrates mit Salzsäure, wobei ich immer eine Fällung erhielt, überzeugen können. Hierbei muss ich aber sogleich bemerken, dass die Ausfällung mit Salzsäure stets unmittelbar nach der Auflösung und der Filtration geschah.

Da also die abweichenden Resultate Krawkow's weder durch einen verschiedenen Säuregrad der angewendeten Pepsinchlorwasserstoffsäure noch durch eine verschieden lange Verdauungszeit zu erklären waren, blieb es noch zu prüfen, in

wie weit sie in einer verändernden Einwirkung des Barythydrates auf das Pseudonuclein — sei es durch Anwendung einer zu concentrirten Barytlösung oder durch eine zu andauernde Einwirkung derselben — zu suchen sind. Es zeigte sich auch in der That, dass das Caseinpseudonuclein von dem Barytwasser leicht verändert wird. Unter dem Einflusse des Baryumhydrates wird es nämlich schon bei Zimmertemperatur verhältnissmässig rasch zersetzt, und es entstehen hierbei Spaltungsprodukte, die bei Zusatz von Salzsäure zu dem alkalischen Filtrate keine Fällung geben. Die Geschwindigkeit, mit welcher diese Zersetzung stattfindet, hängt selbstverständlich von der Concentration der angewandten Barytlösung ab: bei der Einwirkung von kalt gesättigtem Barytwasser findet aber eine durch eine auftretende Trübung sich kundgebende Zersetzung des Pseudonucleins schon nach 3 Stunden bei Zimmertemperatur statt.

Die hierbei entstehenden Spaltungsprodukte sind je nach der Intensität der Barytwirkung, d. h. je nach der Relation zwischen Pseudonuclein und Barythydrat etwas verschieden. Setzte ich z. B. einer 1%igen Pseudonucleinlösung, die durch Auflösung dieses Stoffes in Wasser mit möglichst wenig Barythydrat dargestellt worden war, das gleiche Volumen einer kalt gesättigten Barytlösung hinzu, so konnte ich schon nach einigen Stunden die Ausscheidung einer aus Baryumorthophosphat und Eiweiss bestehenden Fällung beobachten. In einer 2%igen Pseudonucleinlösung trat dagegen durch die Einwirkung von derselben Menge Barythydrat kein Niederschlag auf; die Spaltung hatte aber auch in diesem Falle stattgefunden, denn bei vorsichtiger Neutralisation mit Salzsäure schied sich eine, in dem geringsten Ueberschusse der Säure leicht lösliche, acidalbuminatähnliche Substanz aus und das Filtrat hiervon enthielt Baryumorthophosphat und albumoseähnliche Substanz. In beiden Fällen spaltet sich also Baryumorthophosphat ab, dessen Ausfällung indessen durch das abgespaltene Eiweiss oder durch rückständiges, noch nicht zersetztes Pseudonuclein mehr oder weniger vollständig verhindert werden kann.

Wie durch Baryumhydroxyd kann das Pseudonuclein

auch durch Natronlauge (bis zu 2 % oder darüber) leicht gespalten werden.

Die durch Baryteinwirkung entstehenden eiweissartigen Spaltungsprodukte des Pseudonucleins habe ich keiner mehr eingehenden Prüfung unterzogen, denn es war für meinen Zweck hinreichend, die rasche Zersetzung des Pseudonucleins durch Barytwasser zu zeigen. In dieser zersetzenden Einwirkung des Barythydrates hat man nämlich allem Anscheine nach die Erklärung der von Krawkow erhaltenen Resultate zu suchen. Er behandelte, wie oben gesagt, das Pseudonuclein mit Barythydrat, konnte dann in dem Filtrate durch Zusatz von Salzsäure kein Pseudonuclein nachweisen und zog hieraus den Schluss, dass das Pseudonuclein von dem Barytwasser nicht gelöst worden war. Wie lange er hierbei das Barytwasser einwirken liess, hat er nicht angegeben, und es ist also sehr wohl möglich, dass er das letztere eine für die Zersetzung hinreichend lange Zeit hat einwirken lassen. Wenn dies der Fall gewesen ist, sind aber seine Resultate leicht erklärlich. Es konnte nämlich hierbei entweder Acidalbuminat, welches schon von dem allerkleinsten Säureüberschuss gelöst wird oder auch Albumose entstanden sein; und in beiden Fällen konnte also beim Ansäuern des Filtrates mit Salzsäure kein Niederschlag zum Vorschein kommen. Aus dem Umstande, dass er in dem Filtrate nach der Baryteinwirkung keine Fällung nach Salzsäurezusatz erhielt, lässt sich also nicht der Schluss ziehen, dass das Pseudonuclein eine in Barytwasser unlösliche Substanz ist. In einem solchen Filtrate kann man leicht durch die Heller'sche Probe den Nachweis von Eiweiss führen.

Das Pseudonuclein aus Casein ist also eine in Barytwasser leicht lösliche Substanz, die indessen von überschüssigem Baryt leicht denaturirt und zersetzt wird.

Für die echten Nucleine hat dagegen die Angabe von Krawkow ihre volle Gültigkeit, was ich durch besondere Versuche mit echten Nucleinen aus Leber, Milz, Niere, Thymus und Pankreas habe constatiren können. Diese Nucleine waren, wenn völlig rein, in Barytwasser vollständig unlöslich und sie wurden davon bei Zimmertemperatur nicht zersetzt.

In dem Verhalten zu Barytwasser besteht also ein wesentlicher Unterschied zwischen echten Nucleinen und dem Caseinpseudonuclein. Es war deshalb von Interesse, das Verhalten auch anderer Pseudonucleine dem Barytwasser gegenüber zu prüfen.

Das nächste von mir untersuchte Pseudonuclein war das aus dem Vitellin des Eidotters durch Pepsinverdauung dargestellte Pseudonuclein (Bunge's Hämätogen). Durch vollständiges Erschöpfen des Eigelbs mit Aether bei Zimmertemperatur wurden Fett und Farbstoff möglichst vollständig entfernt. Der Rückstand wurde in Salzsäure von 0,1% gelöst, die Lösung filtrirt und nach Zusatz von Pepsinlösung bei 40°C. während 24 Stunden verdaut. Das hierbei sich ausscheidende, sorgfältig ausgewaschene Pseudonuclein löste sich leicht in Wasser nach Zusatz von Alkali oder Barytwasser zu sehr schwach alkalischer Reaction, und aus dieser Lösung schied es sich nach Zusatz von Salzsäure zu 0,25% wieder reichlich aus. Es war aber dieses Pseudonuclein gegen die Einwirkung des Barythydrates derart empfindlich, dass, wenn es mit kalt gesättigtem Barytwasser direkt behandelt wurde, das Filtrat nunmehr kein mit Salzsäure fällbares Pseudonuclein mehr enthielt. Bei Prüfung mit der Heller'schen Probe erwies es sich dagegen als erweisshaltig, und es hatte also eine Spaltung des Hämätogens stattgefunden. Die Zersetzlichkeit dieses Pseudonucleins ist aber so gross, dass eine mit Barythydrat zu nur schwach alkalischer Reaction bereitete Lösung desselben nach einigem Stehen nicht mehr durch Salzsäure gefällt wird; und selbst durch wiederholtes Auflösen in Wasser mit möglichst wenig Alkali und Wiederausfällung mit Salzsäure kann es derart verändert werden, dass es in Barytwasser unlöslich wird. Das Pseudonuclein aus Vitellin (das Hämätogen) zersetzt sich also viel leichter als das Caseinpseudonuclein.

Mit dieser leichten Zersetzung des Hämätogens und dem Auftreten dabei von einem in Barytwasser unlöslichen Produkt steht auch die Beobachtung in gutem Einklang, dass das aus gekochtem Eidotter nach erschöpfender Alkoholätherbehandlung durch Pepsinverdauung gewonnene Pseudonuclein in Barytwasser unlöslich war, während es dagegen in Wasser nach

Zusatz von ein wenig Alkali sich löste. Ueber die Art dieser in Barytwasser unlöslichen Substanz wie auch der durch Barythydrat erzeugten Zersetzungsprodukte des Vitellinpseudonucleins überhaupt habe ich keine Untersuchungen gemacht.

Geht man von gekochtem Casein aus, so erhält man dagegen ein Pseudonuclein, welches, wie das gewöhnliche, sehr leicht löslich in Barytwasser ist, und die beiden Pseudonucleine aus Casein und Vitellin verhalten sich also wesentlich verschieden. Das aus nativem, nicht geronnenem Vitellin dargestellte Pseudonuclein ist aber ebenfalls eine in verdünntem Barytwasser lösliche Substanz.

Aus dem, nach den Untersuchungen von Paykull, in dem Gallenschleime wie in der Gallenblasenschleimhaut vorkommenden Nucleoalbumin habe ich ebenfalls ein Pseudonuclein dargestellt und dessen Verhalten zu Barytwasser geprüft. Dieses Pseudonuclein steht dem Pseudonuclein aus Casein viel näher als dem aus Vitellin. Es ist leicht und vollständig löslich in Barytwasser und kann durch Salzsäurezusatz wieder aus dieser Lösung ausgefällt werden.

Nach dem oben Mitgetheilten sind also die echten Nucleine, so weit sie bisher untersucht worden, sämmtlich in Barytwasser unlöslich. Die Pseudonucleine sind dagegen, so weit meine bisherigen Erfahrungen reichen und so lange diese Stoffe noch nicht ihre typische Beschaffenheit eingebüsst haben, in Barytwasser löslich. Sie sind aber, der Einwirkung von Barytwasser gegenüber, sehr empfindlich und werden durch dasselbe bei Zimmertemperatur leicht zersetzt.

Das Verhalten zu Barytwasser kann also als vorläufige Reaction zur Entscheidung, ob ein Pseudonuclein oder ein echtes Nuclein vorliegt, benutzt werden. Löslichkeit der fraglichen Substanz in Barytwasser spricht entschieden für die Anwesenheit eines Pseudonucleins, während Unlöslichkeit derselben, bezw. die Nichtfällbarkeit des Filtrates durch Salzsäurezusatz — in Folge der leichten Zersetzung des Pseudonucleins — mit gewisser Vorsicht beurtheilt werden muss. Um eine solche Zersetzung möglichst zu vermeiden, sollte man hierbei übrigens nicht zu viel Barytwasser zusetzen.

In dem ungleichen Verhalten zu Barytwasser könnte man vielleicht auch ein Mittel zur Trennung der Pseudonucleine von den echten Nucleinen sehen wollen, und dies trifft in der That auch, wenigstens für gewisse Fälle, zu. Ich habe nämlich Pseudonuclein aus Casein oder aus sogenanntem Gallenschleim mit echtem Nuclein aus Pankreas oder Nieren zusammen gemischt und dann dieses Gemenge mit Barytwasser geprüft. Ich konnte hierbei das Pseudonuclein leicht in dem Filtrate nachweisen, während das echte Nuclein ungelöst zurückblieb. Auch hier ist es anzurathen, einen Ueberschuss von Barytwasser zu vermeiden.

Im Anschluss an die nun mitgetheilten Untersuchungen habe ich auch einige vergleichende Versuche mit durch Pepsinverdauung erhaltenem Pseudonuclein und den durch Fällung von Eiweisslösungen mit Metaphosphorsäure dargestellten, von Liebermann als Nucleinsubstanzen bezeichneten Verbindungen angestellt. Dass das echte Nuclein keine Verbindung von Eiweiss mit Metaphosphorsäure sein kann, ist schon längst von Kossel bewiesen worden. Für die Pseudonucleine, die als Spaltungsprodukte keine Nucleinbasen liefern und die, wie Liebermann gezeigt hat, in mehreren Beziehungen den Eiweissmetaphosphorsäureverbindungen ähnlich sind, müssten aber weitere Untersuchungen wünschenswerth erscheinen. Diese Verbindungen ähneln den Pseudonucleinen auch darin, dass sie in Barytwasser löslich sind; dass sie trotzdem aber mit ihnen nicht identisch sein können, dürfte aus den folgenden Beobachtungen hervorgehen.

Wenn man Pseudonuclein aus Casein in Wasser mit Hilfe von Natronlauge zu einer neutralen Flüssigkeit löst und darauf Natronlauge zu 0,1% hinzufügt, so spaltet sich aus dem Pseudonuclein keine Phosphorsäure ab. Dem entsprechend kann man diese Lösung tagelang gegen Wasser dialysiren, ohne dass in den sehr stark concentrirten und nach Salpetersäurezusatz gekochten Diffusaten eine Spur von Orthophosphorsäure nachzuweisen ist. Ganz anders verhält sich aber das aus Hühner- oder Serumweiess durch Fällung mit Metaphosphorsäure dargestellte, sogenannte Pseudonuclein. Löst man solches,

künstliches Pseudonuclein, welches vorher durch wiederholtes Auflösen und Ausfällen und durch sehr sorgfältiges Auswaschen von anhaftender, freier Metaphosphorsäure vollständig befreit worden ist, in Wasser mit Hilfe von Alkali in ganz derselben Weise wie das Caseinpseudonuclein und dialysirt, so kann man dagegen sogar in dem nicht concentrirten Diffusate recht bald das Vorkommen von reichlichen Mengen Phosphat nachweisen.

Zu demselben Resultate führt auch das folgende Verfahren. Aus einer schwach alkalischen Lösung von künstlichem Pseudonuclein scheidet man durch Sättigung mit Ammoniumsulfat sämmtliches Eiweiss aus, und in dem Filtrate kann man nun sehr leicht die Anwesenheit von Alkaliphosphat zeigen. Fällt man aus einer entsprechenden Lösung von Caseinpseudonuclein alles Eiweiss mit Ammoniumsulfat aus, so lässt sich dagegen in dem Filtrate keine Spur von Phosphorsäure nachweisen.

Das künstliche Pseudonuclein ist also eine salzähnliche Verbindung zwischen Eiweiss und Metaphosphorsäure, die beim Auflösen in alkalihaltigem Wasser in Alkaliphosphat und Eiweiss, das letztere vielleicht als eine lösliche Alkali Verbindung, sich umsetzt. Das Pseudonuclein (aus Casein) enthält dagegen keine derart gebundene Metaphosphorsäure. Es ist also nicht mit dem künstlichen Pseudonuclein identisch und es kann keine Verbindung zwischen Eiweiss und Metaphosphorsäure sein.