

Ueber das Vorkommen von Spaltungsprodukten der Eiweisskörper in der degenerirten Leber.

Von

Alonzo Englebert Taylor,

Professor der Pathologie an der Universität Californien.

(Aus dem Hearst Laboratory of Pathology, University of California.)

(Der Redaction zugegangen am 30. Januar 1902.)

Die Spaltungsprodukte der Eiweisskörper sind in den letzten Jahren das Object genauerer Untersuchungen geworden. Sie sind von dem Standpunkt der reinen Chemie von grosser Bedeutung, denn durch die Kenntniss dieser Substanzen hofft man zu einem Begriff von dem Bau des Eiweissmoleküls zu gelangen. Dem Forscher auf dem Gebiet der biologischen Wissenschaften sind sie aber eben so wichtig, denn sie geben ein Bild von den Processen und Endresultaten der fermentativen resp. bacteriellen Zersetzungen. Unter den Spaltungsprodukten der Eiweisskörper sind zwei Gruppen, welche vorwiegend Object der Untersuchungen gewesen sind, die Hexonbasen und die Amidosäuren. Hauptsächlich durch die Arbeiten der Kossel'schen Schule sind wir jetzt im Stande, die Hexonbasen zu isoliren und identificiren. Durch die Arbeiten von E. Fischer kennen wir eine Methode, welche uns gestattet, die Amidosäuren zu trennen und zu isoliren. Man kann also hoffen, durch die Vervollkommnung der chemischen Technik einigen Problemen der Biochemie näher treten zu können.

Die acute gelbe Leberatrophie bildet eine Krankheit, deren Hauptmerkmal in einer intensiven, schnellen und weitgehenden Degeneration des Lebergewebes besteht. Innerhalb weniger Tage schmilzt der grösste Theil der Leber ein. Man findet in dem Organ post mortem wenig von dem nativen Lebergewebe. Das Organ zeigt eine hochgradige Ansammlung von Fett, die nach heutigen Anschauungen wohl als eine fettige Infiltration aufzufassen ist. In dem Harn sind Leucin und Tyrosin zu finden, oft in beträchtlicher Menge. Dieselben Substanzen sind auch in der Leber gefunden worden. Die Ursache

der Krankheit ist nicht bekannt. Nach dem Gesamtbild der Krankheit zu urtheilen, kann man aber kaum daran zweifeln, dass sie fermentativer oder bacterieller Natur ist. Die Krankheit scheint eine gute Gelegenheit zu bieten, nach den Endprodukten einer natürlichen Eiweisszersetzung zu forschen.

Ein Fall von acuter gelber Leberatrophie ist in letzter Zeit in dem städtischen Krankenhaus zur Obduction gekommen. Die Autopsie ist 6 Stunden nach dem Tode ausgeführt worden. Die Leber wog 900 g und bot das charakteristische Aussehen der Krankheit. Ein kleines Stück wurde zu einer mikroskopischen Untersuchung verwandt, welche ergab, dass der grösste Theil der Leberzellen zerfallen war. Das Organ wurde unter Alkohol fein geschnitten und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tage wurde der Alkohol gewechselt, um den Haupttheil der Fette zu entziehen. Am dritten Tage wurden die Gewebestücke mit Aether extrahirt. Alkohol und Aether wurden vereinigt, bei 50° unter 100 mm Druck zur Trockene verdampft, der Rückstand mit Petroleumäther mehrmals extrahirt, um die Fette zu entfernen, vom Rückstand der Rest des Aethers verdampft und der trockne Rückstand in Wasser aufgenommen. Die gehärteten und grösstentheils entfetteten Stücke wurden getrocknet und dann zum feinsten Pulver gemahlen. Dieses Pulver wurde dann mit heissem Wasser mehrmals extrahirt und die Auszüge vereinigt. Der Rückstand wurde darauf mit einem mit Chlorwasserstoffsäure schwach angesäuerten Wasser mehrmals heiss extrahirt und die sauren mit den neutralen Auszügen vereinigt. Die wässrige Lösung des alkoholischen Extracts wurde jetzt hinzugegossen. Die Lösung zeigte nach der Neutralisation keine Eiweissreactionen; die Biuretreaction und Millon'sche Probe fielen schwach positiv aus. Die braune Flüssigkeit wurde bei 60° unter 100 mm Druck zu 1 l. eingedampft und in zwei Hälften getheilt.

Die eine Portion unterwarf ich dem Kossel'schen Verfahren zur Auffindung der Hexonbasen, wie es in der letzten Arbeit von Kossel und Kutscher¹⁾ angewandt worden ist. Von Arginin, Histidin und Lysin war keine Spur zu finden.

1) Diese Zeitschrift. Bd. XXXI, S. 165.

Die Fällungen und Auswaschungen wurden immer durch Kjeldahl-Bestimmungen kontrollirt. Eine kleine Menge Harnsäure wurde erhalten, aber keine Purinbasen. Da die Methode relativ kleine Mengen Hexonbasen aufzufinden vermag, bleibt nur der Schluss gerechtfertigt, dass zur Zeit des Todes die Leber nichts oder nur Spuren von den Basen enthielt.

Das Filtrat der versuchten Fällung von Lysin mit Phosphorwolframsäure, das Amidosäuren enthalten könnte, wurde durch Baryt von Phosphorwolframsäure befreit, das Baryum durch Kohlensäure beseitigt und das Filtrat mit der zweiten Hälfte der ursprünglichen Lösung vereinigt. Diese Lösung wurde der Fischer'schen Methode¹⁾ zur Trennung der Amidosäuren unterworfen. Ich verfuhr genau nach den Vorschriften Fischer's. Ich möchte nur bemerken, dass man bei Anwendung der Methode auf complexe Flüssigkeiten eine sehr niedrige Temperatur während der Aussalzung vortheilhaft finden wird, da unter diesen Bedingungen erheblich weniger von den Pigmenten in den Aether übertreten. Die Methode ist gut ausführbar und gestattet, wie ich mich bei Kontrollversuchen an Amidosäuren überzeugen konnte, eine schnelle und glatte Trennung der Amidosäuren. Bei der fractionirten Destillation der Ester, die bei einem Druck von 12—15 mm. ausgeführt wurde, ging, ausser ein wenig Alkohol bei niedriger Temperatur, bis 85° nichts über. Bei 85—100° wurden etwa 0,600 g erhalten; bei 110—125° wurden weitere 1,700 g erhalten. Ein kleiner Rest von brauner Substanz blieb im Kolben.

Die erste Fraction wurde in Wasser gebracht und sechs Stunden am Rückflusskühler gekocht, wobei die Reaction der Flüssigkeit neutral wurde. Die Lösung wurde dann auf ein sehr kleines Volumen eingedampft und zur Krystallisation in den Kühlschrank gestellt. Der Krystallbrei wurde nach einigen Tagen getrocknet, in wenig heissem Wasser gelöst und wieder krystallisirt. Endlich wurde aus Alkohol umkrystallisirt. Die Krystalle waren fast farblos und wogen 0,350 g. Sie schmolzen bei 173° unter Zersetzung. Die Substanz gab die Probe von

1) Fischer, Diese Zeitschrift, Bd. XXXIII, S. 151.

Scherer. 0,100 g wurden in 10 cem. 20%iger Salzsäure gelöst und polarimetrisch untersucht; die spezifische Drehung im Natriumlicht bei 15° war $+15,6^{\circ}$. Diese salzsäurehaltige Lösung wurde dann dem Kjeldahl-Verfahren unterworfen; sie enthielt 0,0112 g N. Die Elementaranalyse ergab folgende Zahlen:

0,0982 g Substanz gaben 0,1985 CO_2 und 0,0884 g H_2O .	
Berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{4,3}\text{NO}_2$:	Gefunden:
C — 54,89 %	55,12 %
H — 10,00 %	10,08
N — 10,70 %	11,2

Die Substanz ist zweifellos gewöhnliches Leucin.

Die zweite Fraction wurde mit heissem Barytwasser verseift. Ungefähr die Hälfte bleibt als braune ölartige Substanz zurück. Die alkalische Flüssigkeit zeigte beim Eindampfen und nach dem Erkalten keine Krystallisation. Die Lösung wurde in zwei Volumen Alkohol gegossen, und am nächsten Tage der Niederschlag abfiltrirt, in wenig warmem Wasser gelöst, von etwas Baryumcarbonat abfiltrirt, und das Filtrat wieder mit Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde mit Alkohol gewaschen, in Wasser gelöst, und das Baryum mit Schwefelsäure sorgfältig ausgefällt. Das Filtrat wurde eingedampft und über drei Tage zur Krystallisation stehen gelassen. Die Krystalle wurden in warmem Wasser gelöst und, nachdem das Fehlen von Glutaminsäure festgestellt worden war, als Kupfersalz niedergeschlagen. Das Kupfersalz wurde in wenig Wasser gewaschen, in heissem Wasser gelöst, das Kupfer mit Schwefelwasserstoff niedergeschlagen und heiss filtrirt. Aus dem Filtrat schieden sich beim Eindampfen, unter Zusatz von Alkohol, Krystalle aus, welche getrocknet 0,612 g wogen. 0,100 g wurden in 10%iger Salpetersäure gelöst und im Polarisationsapparat untersucht; die spezifische Drehung im Natriumlicht bei 15° war $+24,3^{\circ}$. Die Elementaranalyse ergab folgende Zahlen:

0,1412 g gaben 0,0152 N.	
0,1854 g gaben 0,2437 CO_2 und 0,0913 H_2O .	
Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$:	Gefunden:
C — 36,06 %	35,76 %
H — 5,31 %	5,51 %
N — 10,54 %	10,77 %

Das Kupfersalz enthielt 22,82% Cu, berechnet 23,06%.

Die Zahlen passen ziemlich gut auf Asparaginsäure.

Den unverseifbaren braunen Rest habe ich mit stärkerer Barytlösung zu verseifen versucht, es ergab sich jedoch kein Resultat. Es ist sicher, dass kein Phenylalanin anwesend war.

Da das ganze Verfahren mit grossen Verlusten behaftet ist, dürfen wir annehmen, dass in der Leber etwa doppelt so viel Leucin und Asparaginsäure vorhanden, als durch die Manipulation isolirt waren. Die Leber würde demnach ca. 2 g der zwei Amidosäuren enthalten haben.

Der Befund kann streng genommen nur für die tote Leber gelten; über die Zustände in der Leber während des Lebens kann er nichts Sicheres aussagen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Amidosäuren erst nach dem Tode entstanden sind; da aber die Obduction kurze Zeit nach dem Tode ausgeführt worden ist, muss dies doch als unwahrscheinlich betrachtet werden. Es ist andererseits aber auch leicht möglich, dass während der Dauer der Krankheit andere oder noch mehr von den genannten Amidosäuren gebildet, aber sofort weggeschafft worden sind. Man könnte zum Beispiel vermuthen, dass Amidovaleriansäure gebildet wäre. Anhaltspunkte für solche theoretischen Betrachtungen fehlen aber vollständig.

Dass keine Hexonbasen aufzufinden waren, ist auffallend. Es ist aber wohl möglich, dass sie während des Lebens gebildet und durch den Kreislauf weggeschafft oder dass sie weiter gespalten sind. Trotz des negativen Ausfalls dieser Untersuchung bleibt es noch eine offene Frage, ob nicht bei solchen natürlichen Degenerationen Hexonbasen auftreten; man wird die Frage erst auf Grund eines grossen Materials entscheiden können. Zu der Lösung der Frage nach dem Auftreten und Verhalten der Spaltungsprodukte der Eiweisskörper kann auch auf experimentellem Wege beigetragen werden. Durch die Analyse der Nährmedien von Culturen verschiedener Mikroorganismen, denen man die verschiedenen Eiweisskörper zugefügt hat, darf man hoffen, die Kenntnisse auf diesem Gebiet zu erweitern. Solche Untersuchungen sind im hiesigen Laboratorium jetzt im Gange.