

Zur Chemie der Vogelblutkerne.

Von

D. Ackermann.

(Aus dem physiologischen Institut zu Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 21. Oktober 1904.)

Die Untersuchungen von Hoppe-Seyler über die quantitative Zusammensetzung der roten Blutkörperchen¹⁾ gaben wohl zuerst in überzeugender Weise dem Gedanken Ausdruck, daß ein aus tierischen Zellen zusammengesetztes Gewebe, wenn es morphologisch eine in sich gleichartige Beschaffenheit besitzt, auch in chemischer Hinsicht eine feststehende Zusammensetzung haben muß, wie ein Mineral. Diese Untersuchungen bezogen sich zunächst wesentlich auf kernlose Erythrocyten. Seitdem nun unsere Vorstellungen über die chemischen Bestandteile des Zellkerns mehr entwickelt sind, ist der Versuch naheliegend, auch diese in die quantitativen Untersuchungen der Blutzellen hineinzuziehen und auf diesem Wege unsere Kenntnisse über die gesetzmäßigen Beziehungen, welche zwischen den elementaren Bestandteilen der Zelle obwalten, zu erweitern.

Bekanntlich stellte Plosz²⁾ zuerst fest, daß der in Wasser unlösliche Rückstand der Erythrocyten des Vogelbluts die chemischen Reaktionen des «Nucleins» darbietet. Dies wurde sodann durch A. Kossel³⁾ bestätigt, welcher zeigte, daß diese Kernmasse, nachdem sie durch Salzsäure von allen löslichen Stoffen befreit ist, in Natronlauge gelöst werden kann und aus dieser Lösung nicht nur durch Säuren, sondern auch durch Barytwasser und Kalkwasser gefällt wird. Die Phosphorbestim-

¹⁾ Mediz.-chem. Untersuchungen. Tübingen, Heft 3, S. 386.

²⁾ Ebenda, Heft 4, S. 461.

³⁾ Untersuchungen über die Nucleine und ihre Spaltungsprodukte. Habilitationsschrift. Straßburg 1881.

mungen in dieser Substanz gaben aber, da die Reinigungsmethoden noch unvollkommene waren, schwankende Werte. Die in Wasser unlösliche Kernsubstanz gab die Reaktionen der Eiweißstoffe und enthält 0,4% S. Bald darauf beschrieb A. Kossel¹⁾ diesen Eiweißkörper näher, indem er feststellte, daß der durch Salzsäure aus dieser Kernmasse extrahierte Körper basische Eigenschaften besitzt und zu den Eiweißkörpern zu zählen ist. Diese Substanz, von Kossel als «Histon» bezeichnet, war der erste Repräsentant einer Körperklasse, welche später in weiter Verbreitung in den Zellkernen aufgefunden wurde. Hiernach müßten in dieser Kernmasse zwei Bestandteile vorhanden sein, ein saures, in Salzsäure unlösliches Prinzip, das «Nuclein», und ein alkalisches, in Salzsäure lösliches, das Histon, und zwar beide allem Anschein nach durch eine ähnliche Bindung vereinigt, wie das «Nuclein» Mieschers (die «Nucleinsäure» späterer Autoren in den Spermatozoen des Lachses mit einer Base, dem Protamin, verbunden ist.

Nähere Angaben über die Bindungsverhältnisse existieren nicht, auch blieb die Frage nach der Beteiligung einer dritten Substanz an dem Aufbau der Kernsubstanz zunächst noch ungelöst. Erst 20 Jahre später erschien eine kurze Mitteilung von J. Bang,²⁾ welcher das Verhalten dieses Kernrückstandes zu einigen Lösungs- und Fällungsmitteln untersuchte und zu dem Schluß kam, daß die Kernmasse nur aus Histon und Nucleinsäure besteht.

Nachdem Herr Dr. H. Plenge im hiesigen physiologischen Institut ein bequemes Verfahren zur Gewinnung der Kernmasse aus dem Vogelblut ausgearbeitet hatte, habe ich die Frage nach der Zusammensetzung des Kernrückstandes einer quantitativen Untersuchung unterzogen. Mir standen einige von Herrn Dr. Plenge aus Hühnerblut dargestellte Präparate zur Verfügung. Das Verfahren ist folgendes:

Das unter Umrühren fibrinfrei gewonnene Blut wird

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 512.

²⁾ Beiträge z. chem. Physiologie und Pathologie, herausg. v. Hofmeister, Bd. 5, S. 319.

möglichst frisch mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt und in einer 4 l fassenden Zentrifuge zentrifugiert. Die abgesetzten Blutkörperchen werden noch einmal mit 0,9%iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt und zentrifugiert.

Die gewaschenen Blutkörperchen werden je nach der Menge in 1 oder 2 Scheidetrichtern von je 2 l Inhalt eingebracht und in jedem mit 1500 ccm Wasser von 40° C. unter Umschütteln gelöst. Nach einiger Zeit wird zu je 1500 ccm Wasser 500 ccm NaCl-Lösung von 3,6% hinzugefügt und dann zentrifugiert. Die abgesetzten Kernmassen werden von neuem in einem Scheidetrichter in 1500 ccm Wasser von 40° unter Umschütteln suspendiert und nach Hinzufügen von 500 ccm NaCl-Lösung von 3,6% wiederum zentrifugiert.

Dies Vorgehen wird so oft wiederholt, bis die Masse ein farblos glasiges Aussehen ohne rote Streifen hat und an die Kochsalzlösung keinen Blutfarbstoff mehr abgibt. Dann wird die Kernmasse wiederum in Wasser zum Aufquellen gebracht und mit dem doppelten Volumen Alkohol zur Schrumpfung gebracht, zentrifugiert, in 96%igen Alkohol gebracht, abgesaugt, noch einmal mit 96%igem Alkohol verrieben und abgesaugt, dann in absolutem Alkohol und darauf in Äther getrocknet und abgesaugt.

Die ganzen Manipulationen dürfen bis zum Einbringen in Alkohol nicht mehr als 3 Tage in Anspruch nehmen. Es empfiehlt sich, die Kernmassen nachts über Nacht mit Wasser allein, sondern nach Zufügung der NaCl-Lösung an einem kühlen Platze aufzubewahren.»

Zur Entfernung des Lecithins, Cholesterins und ähnlicher Beimengungen kochte ich die Substanz zunächst mit Alkohol aus, solange dies Extraktionsmittel noch bemerkenswerte Mengen aufnahm. Ich bestimmte zunächst den Stickstoff und den Phosphor in der über Schwefelsäure bei 60—70° im Vacuum bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Kernmasse. Die Phosphorbestimmungen wurden nach der Methode von A. Neumann ausgeführt, nachdem die Substanz nach der Angabe desselben Autors auf feuchtem Wege verascht war. Zur Feststellung des Stickstoffgehalts diente die Kjeldahlsche Methode.

Bei der Analyse der gesamten Kernmasse erhielt ich folgende Werte:

I. 0,2605 g	erfordern	18,5 ccm	$n/8$	Natronlauge,	woraus	sich	ergeben	3,93%	P.
II. 0,2624	»	18,6	»	n_2	»	»	»	3,92%	»
I. 0,1780	»	21,8	»	$n/10$	Oxalsäure,	»	»	17,20%	N.
II. 0,2460	»	30,15	»	n_{10}	»	»	»	17,20%	»

Die bisher analysierten Nucleinsäuren verschiedenen Ursprungs haben mit wenigen Ausnahmen einen Phosphorgehalt von 9—10% und einen Stickstoffgehalt von 15—16% ergeben. Man wird also mit einiger Wahrscheinlichkeit auch für die in den Erythrocyten des Vogelbluts vorhandene Nucleinsäure eine ähnliche Zusammensetzung annehmen dürfen. Legt man die von Kostytschew im hiesigen Institut für die Thymonucleinsäure ermittelten Werte von 9,25% P der Berechnung zugrunde, so ergibt sich aus dem Phosphorgehalt der Kernmasse, daß 100 g der trockenen Kernsubstanz 42,16 g Nucleinsäure enthalten. Da die Nucleinsäure Kostytschews 15,55% N enthielt, so würden 42,16 g Nucleinsäure 6,55 g Stickstoff enthalten. Von den 17,2% N, welche in der trockenen Kernsubstanz enthalten sind, würden somit 6,55% auf die Nucleinsäure entfallen. Nimmt man an, daß die übrigen 10,65% Stickstoff im Histon enthalten sind, so ergibt sich, da der Stickstoffgehalt des Histons 18,3% beträgt, ein Histongehalt der Kerne von 57,82%. Die so berechneten Werte für Nucleinsäure und Histon ergänzen sich ungefähr zu 100:

42,10%	Nucleinsäure
57,82%	Histon
<hr/>	
99,92%	

Durch dieses Zahlenverhältnis gewinnt die obige Annahme an Wahrscheinlichkeit, jedoch bedarf diese Auffassung der Bestätigung durch weitere Versuche, die nach Beschaffung von genügendem Material angestellt werden sollen.

Wäre zwischen der Nucleinsäure und dem Histon eine «salzartige» Bindung vorhanden, so könnte man erwarten, daß die Kernsubstanz durch Extraktion mit Salzsäure glatt in unlösliche Nucleinsäure und lösliches Histonchlorhydrat zu zer-

legen sei. Ich habe derartige Versuche unternommen, doch hat sich hierbei kein Nucleinsäurerückstand mit dem oben angenommenen typischen Phosphorgehalt darstellen lassen.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß die mit Alkohol und Äther erschöpfte Kernsubstanz mit Salzsäure von 1% extrahiert wurde, bis das Filtrat, mit überschüssigem Kochsalz geschüttelt, keinen Niederschlag mehr erkennen ließ. Hierbei geht keine nach Veraschung mit Soda und Salpeter nachweisbare Phosphorsäure in das Filtrat über. Das Gewicht des Rückstandes betrug 46,1% der ursprünglichen Kernsubstanz, während es nach obiger Annahme 42,16% betragen sollte. Der Phosphorgehalt des Rückstandes war geringer, als dem Durchschnitt der Nucleinsäureanalysen entsprach.

Präparat I.

0,1076 g erfordern 15,5 ccm $n/2$ Natronlauge, woraus sich ergeben 7,99% P.
 0,1005 „ „ 10,0 „ $n/10$ Oxalsäure, „ „ „ 13,97% N.

Präparat II.

0,1132 g erfordern 15,7 ccm $n/2$ Natronlauge, woraus sich ergeben 7,70% P.
 0,1027 „ „ 14,1 „ $n/2$ „ „ „ 7,79% „
 0,1007 „ „ 10,9 „ $n/10$ Oxalsäure, „ „ „ 15,24% N.
 0,1013 „ „ 10,6 „ $n/10$ „ „ „ 14,75% „

Zur Erklärung dieser Zahlen wird man wohl anzunehmen haben, daß eine geringe Menge eiweißartiger Substanz (Histon?) mit der Nucleinsäure zurückgeblieben ist. Da die Kernmasse fein zerteilt war, ist ein mechanischer Einschluß nicht anzunehmen, es ist viel wahrscheinlicher, daß ein kleiner Teil des Histons (oder eines anderen Eiweißkörpers) in stärkerer, nicht durch 1%ige Salzsäure unter den gegebenen Bedingungen zersetzbarer Verbindung zurückgeblieben ist. Eine ähnliche Erscheinung ist in den Spermaköpfen des Lachses zu beobachten. Auch hier ist eine Vereinigung der Nucleinsäure mit einem basischen Eiweißkörper, dem Salmin, vorhanden, welche nach Miescher-Schmiedeberg durch Salzsäure nicht vollkommen gelöst wird. Die Spermaköpfe enthalten nach Miescher-Schmiedeberg 60,50% Nucleinsäure und 35,56% Protamin,¹⁾

¹⁾ Archiv f. experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. 37.

davon ist nur 19,78% Protamin durch Salzsäure direkt extrahierbar. In den Kernen der Erythrocyten ist der in Salzsäure lösliche Anteil des basischen Eiweißkörpers ein viel größerer, sodaß nur ein sehr geringer Bruchteil desselben bei der Nucleinsäure zurückbleibt.

Herrn Professor Kossel, der das Thema stellte und mich bei der Ausarbeitung sehr unterstützte, spreche ich meinen ergebensten Dank aus.