

## Zur Kenntnis der Hämocyanine.

Von

**Ernst Philippi**

Privatdozent am II. Chemischen Institut der Universität in Wien.

(Aus dem II. Chemischen Institut der Universität Wien.)

(Der Redaktion zugegangen am 31. Oktober 1918.)

Im Jahre 1914 habe ich eine kurze vorläufige Mitteilung veröffentlicht<sup>1)</sup>, des Inhaltes, daß es mir gelungen sei, aus dem Blute von *Helix pomatia* eine Substanz zu gewinnen, die sehr viel Kupfer enthielt und zugleich intensive Pyrrolreaktion zeigte, und daran die Vermutung geknüpft, daß es sich um eine dem Hämatin analoge Verbindung handle. Seither sind mehr als 4 Jahre verflossen, ohne daß es mir infolge des Krieges möglich gewesen wäre, meine Untersuchungen fortzusetzen, und da mir dies voraussichtlich in der nächsten Zeit ebenso wenig möglich sein wird, so sehe ich mich veranlaßt, nunmehr meine diesbezüglichen Untersuchungen mitzuteilen, obwohl ich mir bewußt bin, daß es sich nur um Vorversuche handelt, die noch in jeder Hinsicht des Ausbaues bedürfen.

Der Name Hämocyanin ist zum erstenmal von Frédéricq<sup>2)</sup> im Jahre 1878 gebraucht worden, der das Blut von *Oktopus vulgaris* untersuchte und feststellte, daß es Kupfer enthielt. Das arterielle Blut vieler Avertebraten ist bekanntlich blau, das venöse nahezu farblos; es lag also der Analogieschluß nahe, im Blute dieser Tiere analog dem Hämoglobin und Oxyhämoglobin im venösen und arteriellen Blute ein Hämocyanin (farblos) und ein Oxyhämocyanin (blau) anzunehmen. Frédéricq gibt nun auch bereits ohne experimentelle Begründung an,

<sup>1)</sup> Philippi, Chemisches Zentralblatt 1914, II, 1165.

<sup>2)</sup> Arch. de Zoolog. exper. 7, 535 (1878).

daß sich das Hämocyanin ganz analog dem Hämoglobin durch Säuren in zwei Komponenten spalten läßt, nämlich in einen kupferhaltigen Farbstoff und in einen dem Globin ähnlichen Eiweißkörper. Seither ist dieser interessante Stoff von mehreren Forschern untersucht worden, ich möchte hier nur Phisalix<sup>1)</sup>, Cuénot<sup>2)</sup>, Griffith<sup>3)</sup>, Henze<sup>4)</sup> und Dhéré<sup>5)</sup> nennen, und es wurden die widersprechendsten Behauptungen über den Kupfergehalt, sowie die Struktur desselben aufgestellt. Der erste Forscher, der ein kristallisiertes und einwandfrei definiertes Oxyhämocyanin in Händen hatte, war Henze, der 1901 in der zoologischen Station in Neapel eine Arbeit über das Blut von *Oktopus vulgaris* ausführte. Es gelang ihm mit Hilfe der Hopkins'schen Methode (Ammonsulfat und Essigsäure) dieses Oxyhämocyanin zur Kristallisation zu bringen und er stellte einwandfrei den Kupfergehalt desselben, sowie die dem Hämoglobin ähnliche elementare Zusammensetzung fest. Anbei die von Abderhalden für Oxyhämoglobin aus Pferdeblut und von Henze für Oxyhämocyanin aus *Oktopus vulgaris* angegebenen Werte:

	C	H	N	S	Fe	O	P
Oxyhämoglobin:	54,75	6,98	17,35	0,42	0,38	20,12	—
					Cu		
Oxyhämocyanin	53,66	7,33	16,09	0,86	0,38	21,67	—

Ferner ermittelte Henze, daß dem Hämocyanin ebenso wie dem Hämoglobin, auf Grund seiner Fähigkeit, Sauerstoff lose zu binden, respiratorische Eigenschaften zukommen müßten. Die Sauerstoffkapazität des Hämocyanins ist jedoch viel geringer.

Eine von Henze ausgeführte Säurehydrolyse des Hämocyanins lieferte analoge Spaltungsprodukte, wie sie Abderhalden beim Hämoglobin gefunden hatte, nämlich Tyrosin, Leucin,

<sup>1)</sup> Phisalix, *Compt. rend. de la Soc. de Biol.* 52, 729 (1900).

<sup>2)</sup> Cuénot, *Compt. rend. de l'academie de sc.* 115, 127 (1892).

<sup>3)</sup> Griffith, *Compt. rend. de l'academie de sc.* 114, 496 (1892).

<sup>4)</sup> Henze, *Zeitschrift für physiol. Chemie* 33, 370 (1901).

<sup>5)</sup> Dhéré, *Compt. rend. de l'academie de sc.* 146, 784 (1908). Dhéré *Compt. rend. de la Soc. de Biol.* 55, 1012—1162 (1903): 60, 788 (1908). Dhéré, *Compt. rend. de l'academie de sc.* 158, 978 (1914).

Histidin, Lysin und wahrscheinlich auch Glutaminsäure. Außerdem gibt Henze an, daß die Bindung des Kupfers viel lockerer sei, als die des Eisens im Hämoglobin; eine kupferhaltige Farbstoffkomponente konnte er niemals auffinden. Er kommt also zu dem Schlusse, daß im Hämocyanin kein hämatinartiger Komplex vorliege, sondern daß dasselbe als Kupferalbuminat aufzufassen sei.

Seither ist das Hämocyanin — wohl infolge seiner schweren Zugänglichkeit — in chemischer Hinsicht kaum mehr untersucht worden. Keineswegs unerwähnt können aber die Arbeiten Dhérés bleiben, der sich mehr mit der physikalischen Seite des Problems beschäftigte. Diesem Forscher, der das Hämocyanin der verschiedensten Tiere, wie Oktopus, Eledone, Saepia, Languste, Krebs und Weinbergschnecke studierte, gelang es, neue Methoden zur Abscheidung bzw. Kristallisation des Hämocyanins aus dem Blute ausfindig zu machen. Die eine Methode besteht darin, daß das dialysierte Blut elektrolysiert wird, wobei sich das Hämocyanin abscheidet, die andere beruht darauf, daß sich bei langdauernder Dialyse durch Kollodium bei Eiskühlung das Oxyhämocyanin bei Blut von *Helix pomatia* in kristallisiertem Zustand, bei anderen Blutarten in amorphem Zustande, ausscheidet. Ein weiteres Verdienst Dhérés besteht darin, daß es ihm als Erstem gelang, — entgegen früheren Behauptungen — zu zeigen, daß das Oxyhämocyanin ein charakteristisches Spektrum besitzt. Den früheren Forschern war dasselbe infolge der dunklen Farbe und geringen Lichtdurchlässigkeit des Blutes entgangen.

Soweit standen die Kenntnisse des Hämocyanins, als ich mich entschloß, diese Substanz neuerdings zu untersuchen und zu prüfen, ob nicht doch etwa ein dem Hämochromogen des roten Blutes oder dem Phytochromin des Chlorophylles ähnlich gebauter, aber statt Eisen oder Magnesium, Kupfer enthaltender Komplex im Hämocyanin auffindbar wäre.

Meine erste Sorge galt der Auffindung eines geeigneten Ausgangsmateriales für die Gewinnung von Kupfer enthaltendem Blut. Da das in dieser Hinsicht am besten studierte Material, das auch im Hinblick auf den Arbeitsaufwand beim

Sezieren die besten Ausbeuten liefert, nämlich *Oktopus vulgaris* gerade in der Adria ziemlich selten ist, so kamen für mich an Seetieren hauptsächlich *Saepia* und *Eledone* in Betracht, von deren Blut ich Proben durch die Güte des Vorstandes der zoologischen Station in Triest, Herrn Prof. Dr. C. Cori erhielt. Außerdem war noch die Weinbergschnecke *Helix pomatia* in Betracht zu ziehen. Nach einigen Vorversuchen und nachdem mir die Ausarbeitung eines sehr raschen und gute Ausbeuten liefernden Seziervfahrens gelungen war, entschied ich mich für letztere, obwohl eine Trockengewichtsbestimmung für Schneckenblut nur etwa 4%, für *Saepia*blut aber etwa 8% ergeben hatte.

Für die Gewinnung des Blutes hat sich folgendes Verfahren als zweckentsprechend erwiesen: Die beste Ausbeute liefert die Weinbergschnecke zur Befruchtungszeit, etwa im Mai. Die Tiere werden in einen Exsikkator gegeben, auf dessen Boden sich Äther befindet, und beginnen sofort lebhaft Schleim abzusondern, wodurch die spätere Gewinnung reinen Blutes wesentlich erleichtert wird. Nach ca. 10 Minuten befinden sich die Schnecken in einem Zustand tiefer Betäubung und fallen in weit ausgestrecktem Zustand zur Seite. Nun wird die Schale in der Herzgegend vorsichtig abgetragen und das Herz geöffnet. Auf den Schnitt reagieren die Tiere fast gar nicht und es fließen nur wenige Tropfen Blut aus. Träufelt man nun wenige Tropfen Äther auf Kopf und Fuß der Schnecke, so kontrahiert sie sich heftig und preßt den größten Teil des Blutes bei raschgehenden Pulsschlägen aus. Es empfiehlt sich vorher einen Streifen Filtrierpapier zwischen Fuß und Mantelrand zu schieben, um eine allfällige Verunreinigung des Blutes durch Schleim oder Exkremeute zu verhindern. Auf diese Art erhält man von großen Exemplaren 5—6 cm<sup>3</sup> Blut bei einem Zeitaufwand von etwa 2 Minuten für die Arbeit des Sezieren.

Zunächst stellte ich Versuche über die Kristallisation verschiedener Hämocyane unter verschiedenen Bedingungen an, und zwar bediente ich mich vorwiegend der Dialyse. Meine diesbezüglichen Erfahrungen decken sich mit den in-

zwischen von Dhéré veröffentlichten: Saepia- und Eledone-Blut konnte ich ebensowenig zur Kristallisation bringen wie Dhéré, wohl aber gelingt die Abscheidung von kristallisiertem Oxyhämocyanin aus Schneckenblut. Die käuflichen Schleicher- und Schüllschen Dialysierhülsen eignen sich wenig, viel besser arbeitet man mit den von Pregl beschriebenen Dialysatoren<sup>1)</sup>. Beim Arbeiten im Eisschrank mit diesen Hülsen erfolgt Kristallisation in der Regel nach 7—9 Tagen.

Trotz der so einfachen Gewinnung von kristallisiertem Oxyhämocyanin war ich nicht in der Lage, meine chemischen Abbauversuche mit kristallisiertem Material auszuführen, da mir die Apparaturen zur Verarbeitung größerer Mengen dieses Materials fehlten. Das kristallisierte Oxyhämocyanin geht nämlich schon bei Anwesenheit geringster Spuren von Elektrolyten wieder in Lösung; Dhéré mußte zum Beispiel zur mikroskopischen Untersuchung seiner Kristalle Objektträger aus Quarz verwenden, da die aus dem Glas herausgelösten Spuren von Alkali genügten, um eine teilweise Auflösung der Kristalle zu bewirken. Schließlich möchte ich noch einen mit Schleicher- und Schüllschen Dialysierhülsen ausgeführten Versuch erwähnen: Bei der Dialyse im Eisschrank erfolgte durch 3 Wochen keinerlei Kristallisation; nach dieser Zeit begann, vom Boden des Gefäßes ausgehend, das dunkelblaue Blut sich zu entfärben, also Autoreduktion, ohne daß der geringste Fäulnisgeruch wahrnehmbar gewesen wäre. Nach 6 Wochen endlich schieden sich in geringer Menge schneeweiße, prachtvoll ausgebildete rhombische Blättchen ab, die abzentrifugiert und mit destilliertem Wasser gewaschen wurden. In Wasser, dem eine Spur von Ammonsulfat zugesetzt war, lösten sie sich sofort auf. Nach meiner Ansicht lag in diesen Blättchen kristallisiertes Hämocyanin vor, während bisher lediglich kristallisiertes Oxyhämocyanin bekannt war.

Was die chemische Konstitution des Hämocyanins betrifft, so hatten bisher alle Forscher, die sich damit beschäftigt hatten, einen Abbau in saurer Lösung versucht. Auch mein

<sup>1)</sup> Pregl, Fermentforschung, Band I, 7—19 (1914).

Bestreben war anfangs, in saurer Lösung entweder eine Substanz mit porphyrinartigem Spektrum oder ein Analogon zu den Teichmannschen Häminkristallen zu erhalten. Alle diesbezüglichen Versuche, die ich mit Blut von *Eledone*, *Saepia* und *Helix Pomatia* anstellte, verliefen vollkommen negativ. Die Hämocyane sind eben gegen Säuren sehr empfindlich; Schneckenblut wird schon von wenigen Tropfen 1%iger Oxalsäure momentan entfärbt und sicherlich weitgehend verändert. Unter solchen Umständen lag der Gedanke nahe, den Abbau in alkalischer Lösung zu versuchen. Ist doch auch der Phytochromkern des Chlorophylls im Gegensatz zum Hämin schon gegen verdünnte Oxalsäure äußerst empfindlich, widersteht aber der Einwirkung von starken Alkalilaugen selbst bei Temperaturen von etwa 200° C.

Nach wiederholten Vorversuchen schien mir folgende Art des Abbaues die zweckmäßigste:

400 g Blut von *Helix pomatia* wurden mit 40 g pulverisiertem reinen Ätzkali verrührt. Dabei verwandelt sich die ganze Masse fast augenblicklich in eine gelb gefärbte steife Gallerte. Nach kurzem Erwärmen auf 40° C. löst sich die Gallerte zu einer immer dunkler werdenden klaren Flüssigkeit, die im auffallenden Lichte dunkelgrün, im durchfallenden rotbraun gefärbt ist. Bald beginnt sich ein dunkler Niederschlag abzuscheiden. Derselbe wurde durch wiederholtes Zentrifugieren gereinigt und schließlich in Wasser aufgeschlemmt und so lange dialysiert, bis keine alkalische Reaktion mehr wahrnehmbar war. Durch Digerieren in der Wärme mit verdünnter Essigsäure wurde der noch vorhandene kohlen saure Kalk entfernt. Es resultierten nun etwa 0,2 g eines dunkelgrünen Produktes, das in Wasser, Alkohol, Äther, Essigester und verdünnter Essigsäure unlöslich war, sich aber in Eisessig oder starken Alkalien löste. Diese Substanz enthielt 10,9% Gesamtasche.

Eine mikroanalytische Kupferbestimmung nach Pregl ergab 7,0% Cu (7,01 mg lieferten 0,49 mg Cu).

Schon geringe Spuren dieses Körpers gaben intensive Pyrrolreaktion (Fichtenspanreaktion).

Obwohl sicherlich noch kein reiner Körper vorlag, so

halte ich die oben erwähnten, bei mehreren Versuchen beobachteten Tatsachen dennoch für einen Hinweis dafür, daß auch im Hämocyanin das Kupfer in ähnlicher Weise gebunden ist, wie das Eisen im Hämoglobin oder das Magnesium im Chlorophyll. Alle Anzeichen sprechen dafür, daß sich der kupferhaltige Komplex in seiner großen Beständigkeit gegen Alkalien und Empfindlichkeit gegen Säuren mehr dem Phytochrominkern des Chlorophylls anschließt und daher der alkalische Abbau eher zum Ziele führen dürfte, wie die Säurehydrolyse.

In der Literatur findet sich ferner eine Angabe<sup>1)</sup>, daß sich im Blute von *Pinna squamosa* Mangan vorfinde, welches im Pinnaglobin gebunden sei. Seit 40 Jahren findet sich darüber keinerlei Angabe mehr. Der Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. Dr. C. Cori verdanke ich etliche Exemplare von *Pinna squamosa*, mit deren Blut ich einige Vorversuche ausführte. Es ist mir bei diesen Vorversuchen, bei denen ich nur über sehr geringe Blutmengen verfügte, nicht gelungen, durch Dialyse kristallisiertes Pinnaglobin zu erhalten, wohl konnte ich aber durch Koagulation und Veraschen eines ca. 14 Tage durch Kollodium dialysierten Blutes den Mangangehalt desselben bestätigen.

Jedenfalls beabsichtige ich, sobald es die äußeren Umstände erlauben, dieses Arbeitsgebiet wieder aufzunehmen.

<sup>1)</sup> Griffith, Bl. (3) 7, 397.