

Studien über die Kerne der Thymusdrüse und Anaphylaxieversuche mit Kernsubstanzen (Nucleoproteiden, Nucleinen und Nucleinsäuren).

Von

Emil Abderhalden und T. Kashiwado.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Halle a. S.)

(Der Redaktion zugegangen am 13. September 1912.)

Es unterliegt keinem Zweifel, daß die in den Nucleoproteiden vorhandenen Eiweißkomponenten je nach der Herkunft der Kernsubstanzen eigener Art sind. Bis jetzt sind noch keine Proteine aus solchen einzeln abgetrennt und auf ihre Zusammensetzung geprüft worden.¹⁾ Die Nucleoproteide sind sehr kompliziert gebaute Körper. Die Annahme, daß sie in Nucleine und Eiweiß gespalten werden können, und daß die ersteren wieder in Nucleinsäuren und Eiweiß zerfallen, bedarf noch weiterer Untersuchungen. Nach unseren Beobachtungen über die Verdauung der nach dem einen von uns (K.)²⁾ dargestellten Kernsubstanz aus Thymusdrüse vom Kalbe und manchen Beobachtungen an nach vorhandenen Vorschriften isolierten Nucleoproteiden scheint der ganze Abbauprozess insofern ein komplizierterer zu sein, als mehr Spaltstücke auftreten, und zwar scheint die Phosphorsäure als Bindeglied zwischen einzelnen Komponenten eine Rolle zu spielen.

¹⁾ Aus der Leber hat Wohlgemuth (Diese Zeitschrift, Bd. 44, S. 530, 1905) ein Nucleoprotein gewonnen und die Summe der Eiweißkomponenten auf Aminosäuren untersucht. Ferner haben Levene und Mandel (Biochemische Zeitschrift, Bd. 5, S. 33, 1907) ein Nucleoprotein aus Milz auf seinen Gehalt an einzelnen Bausteinen geprüft.

²⁾ T. Kashiwado, Ein Beitrag zur Kernverdauung und eine Vereinfachung der Schmidtschen Kernprobe zur Erkennung von Pankreasachylie. Deutsches Archiv für klinische Medizin, Bd. 104, S. 584, 1911.

Wir haben zunächst die Wirkung von kochendem Wasser und ferner von Magensaft auf die erwähnte Kernsubstanz untersucht. Das Ausgangsmaterial bestand, wie die mikroskopische Untersuchung ergab, fast ausschließlich aus Kernen. Spuren von Protoplasma mögen wohl noch da und dort an einzelnen Kernen haften geblieben sein. Die Analyse der Kernsubstanz ergab folgende Werte:

Stickstoff (nach Kjeldahl bestimmt)	12,73 ‰ 12,74 ‰	} 12,73 ‰.
Phosphor (nach Neumann bestimmt)	3,47 ‰ 3,38 ‰	
Schwefel (mit Salpetermischung verascht)	0,625 ‰ 0,690 ‰	} 0,657 ‰.
Gesamtasche	3,47 ‰ 3,30 ‰	
Verlust an Gewicht beim Trocknen bis 105°		9,429 ‰.

Die Veraschung bereitete ganz erhebliche Schwierigkeiten. Immer blieben kleine Kohlenpartikelchen eingeschlossen. Der erhaltene Wert ist somit kein ganz exakter.

Ein erheblicher Teil des Phosphorgehaltes der angewandten Kernsubstanz ist leicht abspaltbar, wie die folgende Beobachtung zeigt.

10,0 g Kernsubstanz wurden mit 100 ccm Wasser 6 Stunden lang gekocht. Dann wurde abfiltriert und gründlich mit Wasser nachgewaschen. Das gesamte Filtrat wurde auf Phosphor und Stickstoff untersucht. Es enthielt 0,33 g Stickstoff und 0,1765 g Phosphor. Zur Kontrolle haben wir den abfiltrierten Rückstand auch auf Stickstoff und Phosphor geprüft. Die folgende Übersicht gibt die erhaltenen Resultate wieder:

Die angewandten 10 g Kernsubstanz enthielten	Im Kochwasser waren enthalten	Der nicht gelöste Rückstand enthielt
N 1,1534 g	0,3334 g	0,7893 g
P 0,3277 „	0,1765 „	0,1392 „

Um festzustellen, ob dieses Verhalten der Kernsubstanz beim Kochen mit Wasser durch die Art des Darstellungs-

verfahrens bedingt ist, haben wir ganz frische Thymus vom Kalbe (92,7 g) 6 Stunden mit Wasser (200 ccm) gekocht. Dann wurde filtriert, der Rückstand gut ausgewaschen und das Filtrat auf N und P untersucht. Die frische Thymus enthielt 2,7263 g N und 0,5693 g P. Im Kochwasser waren enthalten 0,5636 g N und 0,2523 % P. Es war somit auch hier ein sehr beträchtlicher Teil (44,31 %) des Phosphors in Lösung übergegangen. Da er ohne weiteres fällbar war, darf man annehmen, daß er in Form anorganischer Phosphate resp. freier Phosphorsäure vorhanden war. Um uns davon zu überzeugen, daß die Phosphorsäure erst allmählich abgespalten wird, kochten wir Proben verschieden lange Zeit. Nach $\frac{1}{4}$ stündigem Kochen trat keine Fällung mit Magnesiamixtur ein, erst nach 30 Minuten langem Kochen war eine Trübung zu sehen. Die Fällung nahm mit fortgesetztem Kochen immer mehr zu.

Leider können wir zurzeit nichts darüber aussagen, in welcher Bindung die abgespaltene Phosphorsäure in der Kernsubstanz vorhanden ist. Eine Entscheidung dieser Frage ist deshalb vorläufig unmöglich, weil das Ausgangsmaterial sicher ein Gemisch mehrerer Substanzen darstellt. Die gemachte Beobachtung ist von Bedeutung, weil sie es erklärlich erscheinen läßt, weshalb Nucleoproteide unter Umständen einen verschieden hohen Gehalt an Phosphor je nach der Darstellungsart enthalten können.

Wir haben weiterhin geprüft, ob Magensaft vom Hunde imstande ist, Phosphorsäure aus Thymusgewebe und aus der Kernsubstanz aus Thymus abzuspalten. Es wurden 80 g ganz frischen, fein zerhackten Thymusgewebes mit 215 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Salzsäure und 185 ccm Magensaft übergossen. Das Gemisch wurde 13 Tage bei 37° aufbewahrt. Nunmehr wurde filtriert. Das Filtrat wies 0,33 g Phosphor auf. Der Magensaft selbst enthielt 0,0014 % Phosphor (bestimmt nach Neumann). Neben freier Phosphorsäure resp. neben Phosphaten fanden sich auch organische Phosphorverbindungen in Lösung.

Die folgende Übersicht zeigt, daß eine große Menge des gesamten Phosphorgehaltes der Thymusdrüse in das Filtrat übergegangen war. Es braucht wohl kaum besonders betont

zu werden, daß nicht aller Phosphor an die Kernsubstanz gebunden sein dürfte. Da ganze Zellkomplexe verdaut wurden, kommt natürlich der gesamte Phosphorgehalt des Zellinhaltes in Frage.

Es waren enthalten:

	In 80 g Thymusdrüse	In 185 ccm Magensaft	Im Filtrat	In Lösung gegangen waren in ‰
P	0,4901	0,0027	0,3300	67,33

Es sei an dieser Stelle auf die Beobachtung von Walter Jones¹⁾ hingewiesen, wonach in der Thymusdrüse sich ein Ferment findet, das Nucleoproteide rasch zerlegt und vor allem Phosphorsäure abspaltet. Dieses Ferment ist nach Jones in saurer Lösung am wirksamsten. Ferner spaltet dieses Ferment auch Xanthinbasen ab. Da wir die zu unserem Versuche angewandte Thymusdrüse absichtlich, um ein möglichst unverändertes Material zur Untersuchung zu haben, nicht aufgeköcht haben, dürfte dieses bereits von Kutscher beobachtete Ferment an der von uns beobachteten Abspaltung der Phosphorsäure lebhaften Anteil gehabt haben. Da jedoch auch aus der isolierten Kernsubstanz freie Phosphorsäure durch Magensaft abgespalten wird, so ist damit bewiesen, daß der Magensaft selbst auch solche in Freiheit setzen kann. Wir haben fernerhin festgestellt, daß vom Magensaft ein bestimmter Teil von stickstoff- und phosphorhaltigen Produkten in Lösung übergeführt wird, der auch bei mehrwöchentlicher Verdauung nicht mehr zunimmt. Läßt man nunmehr nach erfolgter Alkalisierung Pankreassaft auf das Verdauungsgemisch einwirken, dann setzt der Abbau von neuem ein. Es scheint nach unseren Beobachtungen, als ob die Magenverdauung für die Zerlegung der Kernsubstanzen und speziell der Nucleoproteide von ganz besonderer Bedeutung ist. Diese Annahme ergibt sich übrigens schon aus den ersten Beobachtungen von Miescher über die Bildung der Nucleine aus Nucleoproteiden. Wir werden diese Studien fortsetzen.

¹⁾ Walter Jones, Über das Enzym der Thymusdrüse. Diese Zeitschrift, Bd. 41, S. 101, 1904.

Sie sind unternommen worden, um einerseits die Bedeutung der Verdauung von Nucleoproteiden durch Magensaft klarzulegen und ferner um zu prüfen, ob das allgemein angenommene Schema des Zerfalls der Nucleoproteide in Nuclein und Eiweiß der Wirklichkeit vollständig entspricht. Uns scheinen, wie schon betont, die Verhältnisse nicht so einfach zu liegen. Endlich ist es von Interesse, festzustellen, ob im Magensaft neben den bekannten Fermenten nicht vielleicht ein auf Nucleoproteide eingestelltes vorhanden ist. Trotz vielfacher Bemühungen sind wir vorläufig noch zu keinem klaren Resultate gelangt.

Wir haben ferner versucht, die am Aufbau der Eiweißkomponenten beteiligten Aminosäuren möglichst genau zu bestimmen, doch ist die Beschaffung von genügend Material mit zu großen Kosten verknüpft. Wir mußten uns vorläufig damit begnügen, in 60 g Ausgangsmaterial die einzelnen Aminosäuren qualitativ nachzuweisen. Gefunden wurden mit Hilfe der Estermethode: Glykokoll, Alanin, Valin, Leucin, Prolin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Phenylalanin. Tyrosin und Tryptophan sind auch vorhanden und ferner Cystin. Eine exaktere Untersuchung hätte nur dann Wert, wenn es gelänge, die einzelnen Eiweißkomponenten zu trennen und ihre Zusammensetzung zu vergleichen.

Schließlich haben wir die isolierte Kernsubstanz noch auf ihren Gehalt an Fettsubstanzen untersucht. 5 g Kernsubstanz wurden ohne weitere Vorbehandlung 24 Stunden im Soxhlet mit Äther extrahiert. Es wurden $0,1649 \text{ g} = 3,3\%$ Extrakt erhalten. Es schmolz bei 38° und erstarrte bei 37° . Wurde die Kernsubstanz vor der Extraktion 8 Tage lang mit Magensaft behandelt, dann betrug der ätherlösliche Anteil $5,76\%$. Zu dem gleichen Resultate führte der folgende Kontrollversuch. Es wurde Kernsubstanz direkt mit Äther erschöpft, dann der in Äther unlösliche Rückstand der Einwirkung von Magensaft unterworfen. Nun wurde die Extraktion mit Äther wiederholt. Die Summe aus den beiden erhaltenen ätherlöslichen Anteilen betrug wieder annähernd $5,8\%$. Das erhaltene Extrakt enthielt nach Kumagawa-Suto aufgearbeitet geringe Mengen von Cholesterin und Spuren von Phosphor. In der Hauptsache

Nummer des Tieres	Sensibilisierung (intraperitoneale Injektion)			
	Datum	Antigen	dessen Menge	Erscheinung der Injekt
1	6. 12. 11	Kernsubstanz aus Thymus	0,1	keine
2	»	»	0,1	Vorübergehende Schüttelbewegungen des Kopfes
2'	»	»	0,1	»
3	22. 12. 11	16 Tage mit Magensaft ver- daute Kerne aus Thymus (Nucleine)	0,2	keine
4	»	»	0,2	»
5	»	»	0,2	»
6	»	Mit Magen-und Pankreassaft abgebaute Kernsubstanz	0,1	»
7	»	»	0,1	»
8	»	Kerne aus Entenblut- körperchen	0,05	»
9	»	»	0,1	»
10	11. 1. 12	Nucleinsaures Natron aus Hefe	0,02	»
11	»	»	0,04	»
12	»	β -Nucleinsäure aus Rindermilz	0,04	»
13	»	»	0,05	»
14	3. 5. 12	Nuclein aus Hefe	0,04	»
15	»	»	0,03	»
16	»	Nucleinsäure aus Thymus	0,1	»
17	»	» » »	0,1	»
18	»	» » Hefe	0,1	»
19	»	» » »	0,1	»
20	»	» » Pankreas- drüse	0,1	»
21	»	» » »	0,1	»
22	26. 6. 12	Nuclein aus Hefe	0,1	»
23	»	»	0,1	»
24	»	Nuclein aus Pankreasdrüse	0,1	»
25	»	»	0,1	»

Anmerkung. Alle Versuche sind ein zweites Mal ausgeführt worden

Reinjektion (intraperitoneal)			Reaktion	
tum	Antigen	dessen Menge	positiv (+) oder negativ (-)	Auffallende Symptome
12. 11	Kernsubstanz aus Thymus	0,1 0,1	+	Krämpfe der Kiefermuskeln, Atemnot, Temp.-Absturz von 37 auf 34° C. Kotabgang.
"	"	0,1	+	Klonische Krämpfe in den Nacken- muskeln. Temp. 37—34° C. Häufige Kotentleerung.
"	Kernsubstanz aus roten Blutkörperchen der Ente	0,1	—	Keine Reaktion.
1. 12	Dasselbe wie bei der I. Injektion	0,1	+ +	Krämpfe, Temp.-Absturz von 37,5 auf 34°, häufiger Kotabgang.
"	Kernsubstanz aus Enten- blutkörperchen	0,1	—	Keine Reaktion.
"	Verdauungsprodukt der Kerne (Verdauung mit Magen- und Pankreassaft)	0,1	—	Keine Reaktion.
"	"	0,1	—	Keine besonderen Er- scheinungen.
"	Verdaute Kernsubstanz	0,1	?	Lähmung der Hinterbeine.
"	Dasselbe wie bei I. In- jektion	0,1	+	Lähmung der Hinterbeine. Temp.-Erniedrigung 37,5—30,5°.
"	"	0,1	+	Krämpfe des Kopfes, Temp.- Absturz 38—32,0°. Häufiges Kot- lassen.
2. 12	Dasselbe, wie bei der I. Injektion	0,04	—	
"	"	0,04	—	
"	"	0,04	—	Kein Temp.-Absturz.
"	"	0,04	—	
5. 12	"	0,04	+	
"	"	0,04	+	
"	"	0,1	—	
"	"	0,1	—	
"	"	0,1	—	
"	"	0,1	—	
"	"	0,1	—	
"	"	0,1	—	
"	"	0,1	—	
7. 12	"	0,1	+	Temperatursturz von 37,5° auf 32°. Krämpfe in der Kiefermuskulatur. Viele Kotentleerungen.
"	"	0,1	+	"
"	"	0,1	+	"
"	"	0,1	+	"

kult war das gleiche.

bestand es aus Neutralfett. So enthielten z. B. 1,5109 g ätherlöslicher Extrakt 1,4244 g Neutralfett und 0,0740 g Cholesterin, Phosphatide usw.

War vorläufig das gesteckte Ziel, die Eiweißkomponenten von verschiedenen Nucleoproteiden und speziell auch von Nucleinen auf ihre Zusammensetzung an einzelnen Aminosäuren vergleichend zu prüfen, aus Mangel an Material nicht erreichbar, so suchten wir auf einem andern Wege die Frage nach der Verschiedenheit der am Aufbau der Nucleoproteide und Nucleine verschiedener Herkunft beteiligten Eiweißanteile zu entscheiden. Wir wählten die biologische Methode und untersuchten, ob die wiederholte Injektion einer bestimmten Kernsubstanz Anaphylaxie hervorruft. Es zeigte sich, wie die folgende Tabelle ergibt, daß die Reinjektion des gleichen Materiales zu anaphylaktischen Symptomen führt. Sie äußerten sich in einem Temperatursturz. Ferner waren stets eigenartige Krämpfe in der Nackenmuskulatur und zum Teil in der Gesichts-, speziell in der Kiefermuskulatur zu beobachten. Endlich trat ganz plötzlich vermehrte Peristaltik auf. Der Darm wurde zum Teil vollständig entleert. Wurde zuerst Kernsubstanz aus der Thymusdrüse gespritzt und bei der Reinjektion solche aus den roten Blutkörperchen der Ente gewählt, dann blieb jede Reaktion aus. Ferner haben wir die aus den Nucleoproteiden darstellbaren Nucleine verglichen. Auch hier traten nur dann anaphylaktische Erscheinungen auf, wenn das gleiche Material reinjiziert wurde. Schließlich prüften wir auch Nucleinsäuren. Wir vermochten mit den reinen Nucleinsäuren in keinem Falle Anaphylaxie zu erzeugen. Es spricht alles dafür, daß die beobachteten anaphylaktischen Erscheinungen nach wiederholter Injektion von Nucleoproteiden und Nucleinen der gleichen Art auf die mit diesen eingespritzten Eiweißkomponenten zurückzuführen sind. Ferner ergibt sich aus den Beobachtungen, daß offenbar jede Kernart spezifisch gebaute Eiweißanteile besitzt. Daß die Reinjektion des gleichen Materiales in keinem Fall zum Tode führte, dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die verwendeten Materialien in Wasser unlöslich waren. Es konnten nur Sus-

pensionen in 37° warmer physiologischer Kochsalzlösung verwendet werden. Die Resorption vom Peritoneum aus war ohne Zweifel eine sehr langsame.

Wir haben endlich damit begonnen, Kernsubstanzen und die daraus gewinnbaren Nucleoproteide aus verschiedenen Organen der gleichen Tierart zu gewinnen, um zu prüfen, ob arteigene Kernsubstanzen unter sich Verschiedenheiten zeigen. Die bisherigen Versuche ergeben, wie zu erwarten war, daß Unterschiede existieren. Jede Zellart wird auch über eigenartige Kernsubstanzen verfügen.
