

Untersuchungen über lytische und plastische Systeme.

Von

Dr. W. Loele, Dresden.

(Eingegangen am 25. Februar 1933.)

Die Strukturen des Körpers sind das Ergebnis der Tätigkeit lebender Zellen. Ihre künstliche Darstellung ist bisher noch nicht möglich. Doch ist es der Biochemie gelungen die Bausteine, aus denen die Strukturen zusammengesetzt sind, zum Teil künstlich herzustellen und ihre Bedeutung für den zum Aufbau führenden Zwischenstoffwechsel klarzulegen. Guggenheim¹ bezeichnete die für den Zellstoffwechsel nötigen Amine als proteinogene, später als biogene Amine. Mit diesem Begriffe ist die Vorstellung verbunden, daß es einmal möglich sein wird, aus synthetisch hergestellten Stoffen Strukturen aufzubauen.

Es ist nun tatsächlich gelungen, wie in früheren Arbeiten gezeigt wurde, granuläre Gebilde im Reagensglase herzustellen, die nach Gestalt und Eigenschaft mit den Granula der Zelle verglichen werden können. Diese Granula entstehen aus reinen Lösungen durch einen Ausfällungsvorgang. Es ist daher wichtig, festzustellen, inwieweit Lösung und Fällung gemeinschaftliche Merkmale besitzen, weil auch in der Zelle die Strukturen das Ergebnis ähnlicher Vorgänge sind. Von der Beschaffenheit der Lösung hängt die Beschaffenheit der Struktur ab, die gewissermaßen aus der Lösung herauswächst.

Eine der Eigenschaften künstlicher Granula ist die mit dem Alter zunehmende Unempfindlichkeit gegenüber Säuren. Wie verhält sich in dieser Hinsicht eine Lösung, die aus den Granula hergestellt wird?

Löst man Granula des Systems Phenol-Aldehyd-Aminosäure-Salz-Säure) in einer Alkalilösung auf, so tritt nach Säurezusatz erneut eine Fällung auf, die sich als schleimartige Masse zu Boden setzt. Diese Trübung löst sich völlig nach Einwirkung von Aminosäure oder eines Gemisches von Formaldehydlösung mit Aminosäure. Mit dem Altern der gelösten Granula steigt die zur Fällung nötige Säuremenge und ändert sich der zur Lösung der Trübung notwendige Zusatz von Aminosäure oder Aminosäure-Aldehyd.

Wie die folgenden Versuche zeigen, ist der Verlauf der Reaktionen völlig gesetzmäßig.

¹ Guggenheim, M.: Die biogenen Amine. Berlin: Julius Springer 1920.

Versuch 1. Darstellung der Granula:

Phlorogluzin 1%	1,0 Teil
Formol 2%	0,5 Teil
Glykokollösung 2%	0,5 Teil
Calciumchlorid, Krystallwasser 1%	1,0 Teil

Nach 24 Stunden wurden die Granula gewaschen und in einer 1%igen Sodalösung gelöst. Es wurde bestimmt, wieviel Kubikzentimeter einer 10%igen Essigsäure und einer 1%igen Schwefelsäure nötig waren, um eine starke Trübung hervorzurufen und wieviel Aminosäure oder Aminosäuregemisch eine völlige Klärung der Trübung bewirkten, und zwar wurden von der Granulalösung 10 ccm mit Säure versetzt, von der Trübung 1 ccm mit Aminosäure.

Tag	Essigsäure 10% ccm	Glykokoll 2% ccm	Aldehyd 2%, Aminosäure 2%, Gemisch aa ccm	Tag	Schwefel- säure 1% ccm	Glykokoll 2% ccm	Aldehyd 2%, Aminosäure 2%, Gemisch aa ccm
8. 12.	2,0	3,0		19. 12.	0,35	0,1	0,2
9. 12.	2,0	1,5	1,0	22. 12.	0,75	0,1	0,1
10. 12.	2,0	1,0	0,5	27. 12.	0,8	0,1	0,2
12. 12.	2,5	1,5	1,0	2. 1.	1,0	0,25	0,5
13. 12.	3,0	1,0	1,0	6. 1.	1,0	0,25	0,5
14. 12.	3,5	1,0	1,0				
16. 12.	4,5	0,5	1,0				
19. 12.	7,0	0,5	1,0				
29. 12.	18,0	0,5	1,0				
6. 1.	28,0	0,5	1,0				
10. 1.	40,0	0,5	1,0				

Versuch 2. Darstellung der Granula:

Resorcin 1%	1,0 ccm
Glykokoll 2%	0,5 ccm
Aldehyd 2%	0,5 ccm
Schwefelsäure 10%	1,0 ccm

Nach dem Waschen wurden die mit einer 1%igen Sodalösung aufgeschwemmten Granula tropfenweise mit einer 10%igen Kalilaugenslösung versetzt bis zur völligen Lösung.

Tag	Essigsäure ccm	Aminosäure ccm	Gemisch ccm	Tag	Schwefel- säure ccm	Aminosäure ccm	Gemisch ccm
23. 12.	0,2	2,0	2,0	23. 12.	1,0	2,0	2,0
27. 12.	9,0	2,0	über 2,0	29. 12.	1,4	1,0	2,0
29. 12.	25,0	0,25	0,1	5. 1.	2,5	0,5	1,0
2. 1.	60,0			10. 1.	4,5		
	keine Trübung						

Zeichnet man die Säurewerte als Kurven, so verläuft die Essigsäurekurve entsprechend der schwächeren Dissoziation der Säure steiler als

die Schwefelsäurekurve und die Kurven der Resorcingranula sind steiler als die der Phlorogluzingranula.

Aus den Versuchen ergeben sich die folgenden Schlüsse:

1. Mit dem Altern der Lösung nimmt genau so wie mit dem Altern der Granula die Empfindlichkeit gegen Säuren ab. In der gleichen Weise verändern sich auch in einer Zelle mit dem Alter die Systeme, die zur Strukturbildung oder zur Strukturlösung führen.

2. Strukturbildende Faktoren können in einem anderen System lösende Faktoren sein. In bestimmten Systemen kann die Aldehydgruppe die Wirkung einer Aminosäure steigern oder herabsetzen. In den Versuchen schwankt die lösende Menge Aminosäure zwischen 0,05 und 3,0 ccm. Die Veränderungen des Systemes durch das Altern steigern den Titer der Aminosäure um das 60fache.

3. Die Lösung der Trübung wird auch durch Alkali erreicht. Die Aminosäure wirkt in einem sauren System wie eine OH-Gruppe. Das p(H)-Optimum hängt somit hier von Art und Menge der Systemfaktoren ab.

Die bisher dargestellten künstlichen Granula des Systems Aminosäure-Aldehyd-Phenol-Salz-(Säure) sind empfindlich gegen Alkali und bilden sich nicht, wenn das System alkalisch gemacht wird. Es genügt schon der Zusatz von Galle um die Granulabildung zu verhindern. Nur wenn kleine Mengen Galle genommen werden oder wenn die Galle angesäuert wird, fallen Granula aus.

Vielleicht erklärt sich auf diese Weise eine pathologisch-anatomische Beobachtung. Bei jahrelang bestehendem schweren Ikterus findet man Granula in den Endothelien der Milzvenen, aber nicht in denen der Arterien. Die Kohlensäure wirkt hier als Faktor eines granulabildenden Systems.

Will man künstliche Granula in einem alkalisch reagierenden System erhalten, so muß man basische Farbstoffbildner an Stelle der sauren Phenole nehmen. Setzt man die Reihe an:

Paraphenyldiaminlösung (Base)	1 %	..	1 Teil
Glykokoll 2 %-, Formol 2 %-Gemisch	..	1 Teil	
Kochsalzlösung 3 %	1 Teil

und untersucht nach 24 Stunden den braunvioletten Bodensatz, so findet man neben länglich-runden, kleinen, $1-2 \mu$ messenden Körnchen runde, doppelt oder dreifach so große Scheiben von weinroter Farbe, die durch Oxydation und Quellung aus den kleinen Formen hervorgegangen sind. Sie sind im ganzen spärlich, bei längerem Stehen reichlicher.

Nimmt man an Stelle des Kochsalzes Sodalösung oder Kalilauge (1%), so findet man einzelne ovale, in den größten Formen $5-10 \mu$ im Längendurchmesser messende Granula und nach mehreren Tagen eigenartige gekrümmte, faserig-höckerige Gebilde von sehr zerbrechlicher

Beschaffenheit. Durch die alkalische Reaktion wird die Form somit beeinflußt. Der Grund für diese Erscheinung dürfte darin zu suchen sein, daß Aldehydzusatz in Lösungen, aus denen sonst lange Krystallnadeln ausfallen, zu mehr rundlichen knopfförmigen Bildungen Anlaß gibt; durch Alkalien wird die Aldehydwirkung aber aufgehoben.

Es sind nach den bisherigen Untersuchungen somit zwei Gruppen von künstlichen Granula zu unterscheiden, die in zwei Unterabteilungen zerfallen:

A. Granula, die sich nur in neutraler oder saurer Lösung bilden.

B. Granula, die sich in neutraler oder alkalischer Lösung bilden.

Die dargestellten Granula scheiden sich wieder in zwei Gruppen, in Granula, die meist gleich groß sind, ein gleichmäßiges Aussehen besitzen und meist nicht oder schlecht färbbar sind und in Granula, die infolge autolytischer Vorgänge leicht färbbar sind, deren Größe sehr unregelmäßig ist und die wesentlich größer als die der ersten Gruppe sind.

In diese Gruppe gehören besonders die großen Leicingranula, von denen nicht zwei völlig gleich sind und deren Bau, wie bereits früher mitgeteilt wurde, von der Anwesenheit anderer Stoffe im System außerordentlich stark beeinflußt wird. Diese Beeinflussung zeigt deutlich auch der folgende Versuch.

Es wurde zunächst eine Mischung hergestellt von

Phlorogluzinlösung 1%	1 Teil
l-Leucin (Kahlbaum) ¹ 2%	0,5 Teil
Formalinlösung 2%	0,5 Teil
10%ige Lösung von Ferrocyanalkali	0,2 Teil

Zu 2,2 cem dieser Mischung wurden zugesetzt 0,8 cem der folgenden Lösungen:

1. Wasser: Nach 3 Stunden finden sich nur kokkengroße Gebilde, nach 24 Stunden bis zu 20 μ im Durchmesser messende konzentrisch geschichtete Scheiben in mäßiger Menge.

2. Alkohol (96%): Nach 3 Stunden sind die Granula etwa so groß wie rote Blutkörperchen, nach 24 Stunden nicht wesentlich größer.

3. Alkoholischer Auszug von Olivenöl: Nach 3 Stunden sind die Granula doppelt so groß wie rote Blutkörperchen, nach 24 Stunden zum Teil größer.

4. Kochsalz 1 und 10%. 1%: Nach 3 Stunden kokkengroß, nach 24 Stunden zum Teil über 20 μ im Durchmesser.

10%: Nach 3 Stunden etwa von der Größe von Sarcinen, nach 24 Stunden nur die gleichen Formen.

5. Alkoholische Naphthollösung: Nach 3 Stunden größer als rote Blutkörperchen mit einem zentralen Kern, nach 24 Stunden nicht größer.

Besonders bemerkenswert war das Verhalten der Leicingranula gegenüber *Lugolscher* Lösung.

¹ Das synthetische racemische Leucin ist für diese Versuche nicht geeignet.

Wäscht man Leucingranula, die sich nach 24 Stunden in einer 1%igen NaCl- oder KCl-Lösung mit gelbem Blutlaugensalz gebildet haben und betropft sie mit *Lugolscher* Lösung, so färben sich die großen Formen zum Teil mahagonibraun, noch stärker wird die Reaktion, wenn man vorher verdünnte Schwefelsäure hat einwirken lassen. Läßt man auf die zunächst homogenen Granula verdünnte Lauge einwirken, welche die Scheiben zur Aufquellung, aber nicht zur Lösung bringt, so erhält man sehr zierliche radiale und konzentrische Schichtungen. Bringt man jetzt *Lugolsche* Lösung darauf, so findet man manchmal braunviolette, sehr selten bläuliche Farbreaktionen. Die Granula verhalten sich somit ähnlich wie die Aleurongranula in manchen Keimblättern.

Worauf beruht diese Farbreaktion? Die Scheiben enthalten weder Lipoide noch Fette, die beide Braunfärbung — Cholesterin auch Blaufärbung — mit Jodlösung zeigen, wenn man auf sie Äther und angesäuerte *Lugolsche* Lösung einwirken läßt. Es handelt sich hier wahrscheinlich um Bildung von kohlehydratähnlichen Verbindungen, die eine gewisse Verwandtschaft zu Glykogen und Stärke besitzen. Hierfür spricht auch der Umstand, daß die Leucinscheiben mit Speichel behandelt, wobei sie sich ebenfalls zu eigenartigen Bildungen aufschließen, die Jodreaktion wesentlich schwächer oder nicht mehr geben.

Besondere Aufmerksamkeit verdienen zwei Formen, die man durch Aufschließung der Granula erhält, die Bildung von Wimperkränzen und von Gitterkugeln, die es an Zierlichkeit und Regelmäßigkeit mit den Gerüsten von Radiolarien aufnehmen.

Die Wimperbildung ist eine Loslösung der radialen Schichten. Sie kann manchmal doppelt sein, indem der innere Kreis eine besondere Strahlung am Rande zeigt. Derartige Bilder entstanden nach Behandlung von Leucin-Ferrocyan-Kali-KCL-Scheiben mit Speichel. Die Gitterkugelbildung ist seltener und wird durch Einwirkung schwacher Laugen erhalten. Sie kommt dadurch zustande, daß infolge der radiären und konzentrischen Schichtung sich an der Peripherie der Scheiben regelmäßige Segmente bilden, die sich in Kapseln auflösen, deren Wände miteinander verschmelzen. Auch Granula anderer Systeme werden durch Einwirkung mancher Zusätze wesentlich verändert, z. B. durch Zusatz von Fett.

Man löst das Fett in absolutem Alkohol und setzt die Lösung dem System zu. Setzt man folgende Reihe an:

Resorcinlösung 1%	1	Teil
Glykokoll-Formolgemisch 2%	1	Teil
Alkoholische Sesamöllösung . . .	0,2	Teil
Schwefelsäure 10%	0,8	Teil

so werden die Granula doppelt so groß wie ohne Fett und zeigen eine deutliche Kapselbildung. Im Innern der Kugeln liegen kleine Tröpfchen. Färbt man die gewaschenen Granula mit Nilblausulfat, so färben sie sich

nur schwach grün, das Tröpfchen erscheint gelbrötlich. Behandelt man die Granula vorher mit Äther, so verschwinden die Tröpfchen und die meist größer werdenden Kugeln färben sich dunkelblau.

Es wird durch den Einbau von Fett die Färbung der Granula verhindert.

Der Nachweis von Naphthaloxonen gewinnt eine gewisse Bedeutung für die Zelle, weil er das Vorhandensein von strukturbildenden Faktoren beweist. Bakterien, bei denen sich Kernsubstanzen über das ganze Plasma verteilen können, enthalten noch keine Naphthaloxone. Diese treten zuerst als Peroxydasen auf bei höheren Pilzen. Man weist sie nach, indem man den Pilz halbiert und auf die eine Hälfte eine Lösung von α -Naphtholkochsalz und H_2O_2 auf die andere nur H_2O_2 -Lösung bringt. Es tritt bei Naphtholbehandlung schnell eine hell bis schwärzlichviolette Färbung auf. Bisher fand ich positive Reaktion (nach der Bestimmung von Herrn Dr. Friese) bei:

Tricholoma (Ritterling), besonders bei *nudum* und *terreum*.

Russula vesca (Speisetäubling).

Lactaria torminosa (Giftreizker), nicht beim echten Reizker.

Lycopodium gemmatum (Bovist).

Pleurotus ostreatus (Austernpilz), schwach.

I. Wolf beschreibt das Vorkommen einer bisher unbekannten Oxydase in Pilzen, einer Ferrase, die Ferro- in Ferriverbindungen umwandelt und Tyrosin und Guajakol zu Farbstoffen oxydiert. Das dreiwertige Eisen ist auch ein Faktor der Naphthaloxone.

Bei den höheren Pflanzen ist die Naphtholperoxydase so häufig wie die labile Nadioxydase in tierischen Zellen. Besonders häufig in den Zellen des Leptom, im Gefäßsystem des Eiweißstoffwechsels. *Raciborsky* hat deshalb diese Stoffe mit einem gewissen Recht als Leptomine bezeichnet.

Naphthaloxon und Amylase treten nun häufig verbunden auf. Die Parotis enthält granuläre Naphtholoxydases (Mensch). Der Speichel ist frei von Naphthaloxonen, soweit sie nicht von Leukocyten stammen. Stärkekleister wird durch Eisenchlorid und H_2O_2 gelöst. Der Gedanke liegt nahe, ob nicht bei der Zersetzung von Naphtholoxydases amyloytische Systeme entstehen.

In der Tat ist es mir gelungen, durch Schaltung mehrere Systeme auf diesem Wege ein amyloytisches System zu erhalten.

I. Darstellung von Phlorogluzin-Kalk- und von Resorcin-Schwefelsäuregranula.

II. Waschen der Granula und Auflösung in Alkali.

III. Fällung der Phlorogluzingranulalösung mit Säure. (10,0 Lösung + 1,0 Schwefelsäure (1%).)

IV. Auflösung der Fällung mit einer bestimmten Menge Glykokolllösung. (1,0 Fällung + 2,0 Glykokollösung (2%).)

V. Neutralisierung der Lösung durch aufgelöste Resorcingranula bis zur schwach alkalischen Reaktion.

Die Lösung von Stärkekleister trat innerhalb 48 Stunden im Brutschrank ein und zwar nur bei Gegenwart von Kochsalz. Nach Hefezusatz trat Gährung ein ebenfalls nur bei Zusatz von Kochsalzlösung. Das Wesentliche dieser noch umständlichen Versuchsanordnung ist es, ein System zu finden, das wie Eisenchlorid + H_2O_2 wirkt.

Da das Gelingen des Versuches von Zeit und Menge abhängig ist und schwer zu sagen ist, was für Zwischenprodukte auftreten, kann eine bestimmte Vorschrift nicht gegeben werden, vielleicht läßt sich die Methode vereinfachen und sicherer gestalten.

In früheren Arbeiten ist auf die Bedeutung des Systems Aminosäure-Aldehyd-Farbstoffbildner für die Bildung der eosinophilen Leukocytengranula, der Kernkörperchen und pflanzlicher Reservevorräte hingewiesen worden. Es lassen sich nunmehr die Versuche des Glases auf die gesamte Blutzellbildung anwenden.

Die Stammzellen der myeloischen und lymphatischen Blutzellen sind Zellen mit Kern und Kernkörperchen, die myeloischen Zellen enthalten im Protoplasma Granula, die kleinen Lymphocyten haben die Hauptmasse ihres Protoplasmas abgestoßen.

Die myeloischen Zellen verdanken ihre Entstehung einem asphyktischen Abbau des Kernes, also einer verminderten Sauerstoffzufuhr der Zelle. Das heißt nicht, daß etwa dem Knochenmark weniger Sauerstoff zugeführt wird, es wird nur der zugeführte Sauerstoff von anderen Strukturen den Blutzellen entzogen. Die Kohlensäureüberladung der Zelle schafft erst die Grundlage zur Bildung der Granula, da sich bei alkalischer Reaktion aus den drei Faktoren Granula nicht bilden können. Das Auftreten einer Naphtholoxidase setzt voraus, daß Aminosäure, Aldehyd und Eisen in gewissen Mengenverhältnissen vorhanden sind. Es ist somit die Bildung oxydasehaltiger Granula ein ziemlich zusammengezetter Vorgang, der besondere Voraussetzungen zu seinem Zustandekommen nötig hat. Im roten Blutkörperchen wird der ganze Kern gelöst. Bei den Säugetieren wird, mit Ausnahme der Kamel- und Lama-Gruppe, die Zelle zu einer kernlosen runden Scheibe, die nach den Untersuchungen von *Bechhold* als eine Blase anzusehen ist. Die ovalen Blutkörperchen der übrigen Wirbeltiere haben noch einen Kernrest, der kein Naphtholkernkörperchen mehr besitzt. Die roten Blutzellen bilden mit Phenolen durch Vermittlung der Phenolperoxydase sehr widerstandsfähige Membranen. Phenole sind somit hier Faktoren eines plastischen Systems.

Ein Faktor, der auf die Zellform Einfluß hat, ist die $p(H)$ -Konzentration eines bestimmten Systems. Denkt man sich in der roten Blutzelle Kern und Protoplasmastoffe gleichmäßig gemischt, so ist zweifellos das kernhaltige Blutkörperchen basischer als das kernlose, weil ein Teil des

sauren Kernes nicht gelöst ist. Möglicherweise ist das die Ursache der ovalen Form.

Etwas Ähnliches gilt auch für die Form des Kernes und des Kernkörperchens. Wo nicht mechanische Einflüsse die Kernform verändern, kommen nur chemische in Betracht. Die Hauptsache für die Formgebung ist das System, nicht allein die p(H)-Konzentration. In allen myeloischen Kernen ist die Kernform verändert bis zur Stäbchenform. Daß in diesen Zellen eine wesentliche Änderung der Kermischung stattfindet, geht daraus hervor, daß Naphtholkernkörperchen nur in denjenigen Zellen als Reste gefunden werden, die einen nur wenig veränderten Kern aufweisen, in den übrigen Zellen fehlen sie.

Wenn nun für die Entstehung der Lymphocyten das gleiche System haftbar gemacht werden soll, so muß der Nachweis geliefert werden, daß auch in den Stammzellen der Lymphocyten ein proteolytischer Vorgang sich abspielt, der Aminosäuren, Aldehyd und Chromogen frei macht. Wenn nach der von mir aufgestellten Theorie der kleine Lymphocyt das Ergebnis eines peptischen Systems ist, können die Granula im Zustande der Lösung durch Säure in eine Art Schleim umgewandelt werden, der durch Aminosäuren gelöst wird. Durch die Untersuchungen von Willstätter ist bekannt, daß im Magen neben dem Pepsin eine Protease vorkommt, die auch dem Lymphocyt nicht fehlt. Damit ist aber das Auftreten intermediärer Aminosäuren möglich gemacht. Es wird auch verständlich, warum die wieder an Größe zunehmende lymphocytäre Zelle, dadurch, daß der Schleim sich verdichtet, zur Plasma- und schließlich zur granulierten Mastzelle wird. Aber nur im Gewebe, denn im Blute ist infolge der gleichmäßigen Beschaffenheit des umgebenden Plasmas ein stärkerer reduktiver Abbau nicht möglich.

Tatsächlich haben die Mastzellgranula mit den eosinophilen Granula eine Eigenschaft gemeinsam.

Behandelt man Gefrierschnitte, die beide Zellen enthalten, mit einer H_2O_2 -haltigen α -Naphthollösung und danach mit Naphthol-Kresylviolett und Alkohol (verdünt), dann färben sich die eosinophilen Granula blau, die Mastzellgranula rot, alle anderen Zellen können entfärbt werden. Nur die Färbung der eosinophilen Granula ist aber echt, die der Mastzellgranula sehr vergänglich.

Das Mosaikspiel des Lebens ist wie das Schachspiel, jeder Zug der Steine bestimmt den Ausgang des Spieles und kann nicht zurückgenommen werden.
