

222. Ernst Klenk: Über die Ganglioside des Gehirns bei der infantilen amaurotischen Idiotie vom Typ Tay-Sachs.

[Aus d. Physiol.-chem. Institut d. Universität Köln.]

(Eingegangen am 13. November 1942.)

Die Tay-Sachssche Idiotie ist eine Gehirnerkrankung, die nur in den ersten Lebensjahren auftritt. Das morphologische Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch eine Aufblähung und Anschwellung der Ganglienzellen des Groß- und Kleinhirns. In den Zellen finden sich Ablagerungen, die ihrem färberischen Verhalten nach aus Lipoiden bestehen. Dieselben lipoiden Ablagerungen zeigen sich in den Gliazellen.

Morphologisch sehr ähnliche Veränderungen im Zentralnervensystem beobachtet man auch bei der Niemann-Pickschen Krankheit, bei welcher aber nicht nur das Nervensystem, sondern auch viele andere Organe, vor allem Milz und Leber, erkrankt sind.

In dem Schrifttum über diese beiden Krankheiten nimmt die Frage, ob die Tay-Sachssche Idiotie als eine auf das Zentralnervensystem beschränkte Form der Niemann-Pickschen Krankheit oder aber als eine, von der letzteren ihrem Wesen und ihrer Entstehung nach verschiedene Krankheit aufzufassen ist, einen breiten Raum ein. Der Lösung dieser Streitfrage kommt nach Letterer¹⁾ eine grundsätzliche Bedeutung zu, da es letzten Endes um die Frage geht, ob zwei wesensverschiedene Krankheiten an demselben Substrat (Gehirn) mit einem außerordentlich ähnlichen, wenn nicht völlig gleichen Bild verlaufen können, oder ob aus der morphologischen Gleichheit auch auf eine Wesensgleichheit geschlossen werden darf.

Durch die von mir durchgeführte Isolierung der Speichersubstanzen war es möglich, die Frage in, wie mir scheint, durchaus eindeutiger Weise dahin zu entscheiden, daß hier zwei verschiedene Krankheiten vorliegen. Die Niemann-Picksche Krankheit führt zu einer Sphingomyelinverfettung der befallenen Organe. Sowohl aus Leber und Milz als auch aus dem Gehirn konnten abnorm große Mengen dieses Phosphatids erhalten werden²⁾. Bei der Tay-Sachsschen Idiotie fand sich demgegenüber im Gehirn eine starke Anreicherung von einer, noch unbekannten, neuen Gruppe von zuckerhaltigen Lipoiden (Gangliosiden) und nicht, wie erwartet, eine solche des Sphingomyelins³⁾. Infolge der auftretenden methodischen Schwierigkeiten ließ der Reinheitsgrad der erhaltenen Substanz noch manches zu wünschen übrig, so daß eine genauere Charakterisierung derselben in Anbetracht der Seltenheit des Krankheitsbildes und der damit zusammenhängenden Schwierigkeiten der Materialbeschaffung bisher noch nicht möglich war. Dagegen gelang vor kurzem⁴⁾ die Isolierung eines Lipoids dieser Art aus Normalgehirn, in welchem es ebenfalls, allerdings in sehr viel kleineren Mengen, vorkommt. Nachdem mir von der Prosektur der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie (Kaiser-Wilhelm-Institut) in München durch die Freundlichkeit von Hrn. Prof. Schleußing das Gehirn eines weiteren Tay-Sachs-Falles überlassen worden ist, konnte nun in entsprechender Weise auch das Tay-

¹⁾ Verhandl. d. Ges. für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, XIV. Tagung in Stuttgart (1938), S. 41.

²⁾ E. Klenk, Ztschr. physiol. Chem. **229**, 151 [1934]; **235**, 24 [1935]; **262**, 128 [1939].

³⁾ E. Klenk, Ztschr. physiol. Chem. **262**, 128 [1939]; **267**, 128 [1940].

⁴⁾ F. Klenk, Ztschr. physiol. Chem. **273**, 76 [1942].

Sachs-Lipoid isoliert und der Vergleich mit den Gangliosiden des Normalgehirns durchgeführt werden. Wie die Untersuchung ergab, bestehen die gespeicherten Ganglioside vorwiegend aus Stearyl-gangliosid. Dieses letztere herrscht auch im Normalgehirn vor.

Der Lipidgehalt des Tay-Sachs-Gehirns.

(Experimentell bearbeitet von Frl. E. Schumann.)

Das Gehirn stammte von einem 2 Jahre 10 Monate alten, der jüdischen Rasse angehörenden Knaben. Das in Aceton eingelegte Organ wurde in der üblichen Weise³⁾ mit folgendem Ergebnis aufgearbeitet:

Menge der Lipoidfraktionen in g.

| Trockengewicht | Fett und Cholesterin a | Glycerin-phosphatide | | Protagon-Fraktion | |
|----------------|---------------------------|----------------------|----------------|-------------------|----------------|
| | | b ₁ | b ₂ | c ₁ | c ₂ |
| 143.5 | 14.4 | 6.7 | 13.0 | 0.9 | 17.3 |

Fett und Cholesterin. a: 0.17 (0.19) % P; 0.34 (0.42) % N; 1.36 (1.19) % Glycerin.

Glycerin-phosphatide. b₁: 2.78 (2.83) % P; 1.67 (1.60) % N; 6.71 (6.82) % Glycerin.

b₂: 2.79 (2.82) % P; 2.68 (2.61) % N; 6.76 (6.67) % Glycerin; 9.2 (9.1) % Zucker (ber. als Galaktose).

Protagon. c₁: 1.93 (1.83) % P; 2.86 (2.82) % N; 3.90 (4.04) % Glycerin; 9.0 (9.0/8.1) % Zucker (ber. als Galaktose).

c₂: 1.57 (1.52) % P; 2.82 (2.76) % N; 2.90 (3.21) % Glycerin; 22.4 (22.6/22.8) % Zucker (ber. als Galaktose); 11.5 (11.2) % Neuraminsäure (nach E. Klenk u. H. Langerbeins⁵⁾).

Sphingomyelin. Die Isolierung eines auch nur einigermaßen reinen Sphingomyelinpräparates ist nicht gelungen. Die vereinigten Sphingomyelin-Fractionen aus c₁ und c₂ (0.35 g) zeigten folgende Zusammensetzung: 2.84 (2.86) % P; 3.07 (3.11) % N; 7.10 (7.19) % Glycerin; 6.1 (7.2) % Zucker (ber. als Galaktose). Demnach mußte im wesentlichen ein Gemisch von Cerebrosiden und ätherunlöslichen Glycerin-phosphatiden vorgelegen haben.

Cerebroside. c₁: 0.12 g (0.41 % P; 1.73 (1.77) % N; 18.8 (19.3) % Zucker (ber. als Galaktose)].

Gangliosid-Fraktion (Substanz X). 11.5 g [0.96 % P; 2.43 (2.48) % N; 2.63 (2.59) % Glycerin; 25.2 (24.0) % Zucker (ber. als Galaktose); 10.5 (10.9) % Neuraminsäure].

Lipidgehalt des Tay-Sachs-Gehirns in % des Trockengewichts.

| Fett und Cholesterin | Glycerin-phosphatide | Gereinigtes Sphingomyelin | Cerebroside | Gangliosid-Fraktion (Substanz X) |
|----------------------|----------------------|---------------------------|-------------|----------------------------------|
| 10 | 14 | Spur | 0.1 | 8.0 |

⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. **270**, 185 [1941].

Darstellung der Ganglioside.

Die Ganglioside waren vorwiegend, wenn nicht ausschließlich in der Protagon-Fraktion c_2 vorhanden. Ihre Menge errechnet sich auf Grund des Neuraminsäuregehalts dieser Fraktion zu 8.4 g. In der Gangliosid-Fraktion betrug die Menge der Ganglioside noch 5.3 g. Die ersten Schritte der Reinigung führten demnach zu einem beträchtlichen Gangliosidverlust.

Die weiteren Schritte der Reinigung erfolgten in enger Anlehnung an die bereits gegebene Vorschrift⁴⁾ mit der einzigen Abweichung, daß die Entfernung der Cerebroside durch Extraktion⁶⁾ mit 95-proz. Aceton im Soxhlet-Apparat vor der Reinigung über die Bleisalze vorgenommen und die Adsorption an Al_2O_3 in Pyridinlösung zur Entfernung der Phosphatide noch einmal wiederholt wurde.

Menge der durch 48-stdg. Extraktion erhaltenen Cerebroside: 1.04 g. Die Substanzen gaben noch eine positive Neuraminsäurereaktion mit dem Bialschen Reagens (Neuraminsäuregehalt 3—4%).

Nach Abtrennung eines in Eisessig schwer löslichen Stoffs wurden schließlich 4.12 g Gangliosid (aus Alkohol umkrystallisiert), d. h. ungefähr die Hälfte der im Gehirn vorhandenen Gesamtmenge, erhalten. Die Substanz enthielt noch eine Spur Phosphor (0.08%). Zur Analyse wurde sie im Hochvak. bei 80° getrocknet (5.222 mg Sbst.: 0.315 mg oder 6.03% Gewichtsverlust).

4.907 mg Sbst.: 10.485 mg CO_2 , 3.870 mg H_2O und 0.064 mg Rückstand. — 8.82, 9.72 mg Sbst.: 1.75, 1.95 ccm $n_{100}^{20}-HCl$. — 1.69, 1.65 mg Sbst.: 4.65, 4.48 ccm $n_{200}^{20}-KJO_3$, entsprechend 0.665, 0.637 mg Zucker (ber. als Galaktose).

Gef. C 59.0, H 8.9, N 2.78, 2.81, Zucker 39.3, 38.6 (ber. als Galaktose).

Eine völlig phosphor- und aschefreie Substanz wurde durch nochmalige Reinigung über das Bleisalz und durch eine dritte Adsorption an Al_2O_3 erhalten (1.92 g).

4.675, 4.676 mg Sbst.: 10.025, 10.035 mg CO_2 , 3.720, 3.690 mg H_2O . — 11.17 mg Sbst.: 2.17 ccm $n_{100}^{20}-HCl$. — 0.870 mg Sbst.: 2.42 ccm $n_{200}^{20}-KJO_3$, entsprechend 0.349 mg Zucker (ber. als Galaktose).

$C_{64}H_{118}O_{26}N_2$ (1331)⁷⁾. Ber. C 57.71, H 8.93, N 2.10, Zucker 40.6.

$C_{70}H_{128}O_{26}N_2$ (1413)⁸⁾. Ber. „ 59.45, „ 9.13, „ 1.98, „ 38.2.

Gef. „ 58.5, 58.5, „ 8.9, 8.8, „ 2.74, „ 40.1.

Die rein weiße, aus Alkohol in kleinen Sphärolithen krystallisierende Substanz gleicht in ihren Eigenschaften sehr weitgehend dem aus Normalgehirn gewonnenen Produkt. Aus einer stark konzentrierten benzolisch-methylalkohol. Lösung krystallisierte sie gelegentlich in einheitlichen, dünnen Blättchen bzw. breiten Nadeln. Jedoch war es noch nicht möglich die Bedingungen für die Krystallisation genau festzulegen. Zersetzungspunkt 200—210° unter Verkohlung. In einer etwa 5-proz. Pyridinlösung ist die Substanz optisch inaktiv (Gangliosid aus Normalgehirn $[\alpha]_D$: —2.79°). Die Neuraminsäurereaktion mit dem Bialschen Reagens ist stark positiv.

0.126 mg Sbst.: $E = 0.438$. Gef. 18.7% Neuraminsäure (Theorie 22.0—23.4%).

⁶⁾ Das Zusammenbacken des Extraktionsgutes wurde durch fortgesetztes mechanisches Rühren verhindert, wobei als Rührer ein langer, an dem unteren Ende schwach abgebogener Glasstab diente, den man durch den Kühler hindurch in die Extraktionshülse hineinführte.

⁷⁾ Stearyl-gangliosid.

⁸⁾ Nervonyl-gangliosid.

Während die C-Werte des Gangliosids aus Normalgehirn für die noch einigermaßen hypothetische Formel $C_{64}H_{118}O_{26}N_2$ des Stearyl-gangliosids etwas zu niedrig waren, sind sie im vorliegenden Fall etwas zu hoch. Das letztere ist vielleicht auf eine Beimengung von Gangliosiden mit höheren Fettsäuren zurückzuführen, deren Vorkommen in der Rindermilz⁹⁾ sicher gestellt ist. In dem etwas zu hohen N-Wert gleicht die Substanz wieder dem aus Normalgehirn gewonnenen Produkt. Nur die Ganglioside der Rindermilz zeigten bis jetzt den der Theorie entsprechenden Stickstoffgehalt.

Die Spaltprodukte.

0.80 g des noch nicht völlig aschefreien Gangliosids (0.08 % P) wurden nach E. Klenk u. F. Rennkamp⁹⁾ durch $\frac{1}{2}$ -stdg. Erhitzen mit 10-proz. Salzsäure im siedenden Wasserbad gespalten, wobei ein durch die Zersetzungsprodukte der Neuraminsäure tiefschwarzer Niederschlag sich bildete.

Fettsäuremethylester: 0.17 g oder 21 % (für Stearyl-gangliosid ber. 22%). Schmp. 35—36°. JZ. 4.1. Die Verseifung von 0.12 g Ester führte zu 0.10 g freier Säure. Schmp. 65—66°. Äquiv.-Gew. 293. Durch Umkrystallisieren aus Aceton wurde annähernd reine Stearinsäure erhalten. Schmp. 66—66.5°. Mit Stearinsäure keine Schmelzpunktserniedrigung.

39.25 mg Sbst.: 1.37 ccm n_{10} -alkohol. NaOH.

$C_{18}H_{36}O_2$. Ber. Äquiv.-Gew. 284.3. Gef. Äquiv.-Gew. 286.

Das höhere Äquivalentgewicht der nicht umkrystallisierten Säure weist auf die Anwesenheit von höhermolekularen Säuren hin. Infolge der kleinen Mengen mußte auf eine Identifizierung derselben verzichtet werden. Da diese beim Umkrystallisieren in der Mutterlauge bleiben, handelt es sich vielleicht um ungesättigte Fettsäuren von der Art der Nervonsäure $C_{24}H_{46}O_2$.

Sphingosinsulfat: 0.09 g (Rohprodukt).

5.32, 5.56 mg Sbst.: 1.38, 1.45 ccm n_{100} -HCl.

$(C_{18}H_{37}O_2N)_2 \cdot H_2SO_4$. Ber. N 4.02. Gef. N 3.62, 3.65.

Zucker: Das wäßr. Filtrat wurde nach der Entfernung der Salzsäure, der Vorschrift entsprechend, auf ein Vol. von 10 ccm gebracht.

1) Gärwert: Im Lohnsteinschen Apparat mit Hefe nach $3\frac{1}{2}$ Stdn. bei 40° gef. 0.75 % Glucose.

2) Drehwert: α : + 3.61° (im 2-dm-Rohr bei 20°), nach Abzug des durch Glucose bedingten Werts + 2.82°. Daher Gehalt der Lösung an unvergärbarem Zucker: 1.7 % (ber. als Galaktose).

3) Reduktionswert: 1 ccm: 4.4 ccm $KMnO_4$ nach Bertrand (1 ccm $KMnO_4$ entsprach 9.73 mg Cu). Restbetrag nach Abzug des durch Glucose bedingten Werts: 2.9 ccm $KMnO_4$. Daher Gehalt der Lösung an unvergärbarem Zucker 1.5 % (ber. als Galaktose).

In dem noch verbliebenen Teil der Lösung (7 ccm) wurde der unvergärbare Zucker als Galaktose in Form des Methylphenylhydrazons identifiziert. Zu diesem Zweck verdünnte man die im Vak. stark konzentrierte Lösung mit dem gleichen Vol. Alkohol und versetzte mit 0.25 g Methylphenylhydrazin. Nach einigen Minuten begann sich das Galaktose-methylphenylhydrazon in glänzenden, breiten Nadeln abzuscheiden. 0.06 g. Schmp. 190° unter Zers. (Schmp. des reinen Galaktose-methylphenylhydrazons 191° unter Zers.).

⁹⁾ E. Klenk u. F. Rennkamp, Ztschr. physiol. Chem. **273**, 253 [1942].

Die Berechnung des Galaktosegehalts der Lösung erfolgte unter der Voraussetzung, daß der mit Bäckerhefe vergärbare Zucker mit Glucose identisch ist. Die annähernde Übereinstimmung der so unter 2) und 3) erhaltenen Werte spricht für die Richtigkeit der gemachten Voraussetzung. Für den Fall, daß es sich um die linksdrehende Fructose oder um die nur schwach rechtsdrehende Mannose gehandelt hätte, müßte sich dies durch stark abweichende Werte bemerkbar gemacht haben. Im Vergleich zu dem aus Normalgehirn gewonnenen Gangliosid (Galaktose:Glucose = 6:1) zeichnet sich das vorliegende Produkt durch einen wesentlich höheren Glucosegehalt aus (Galaktose:Glucose = 2:1).

Die Untersuchung wurde durch Mittel des Reichsforschungsrats unterstützt.

223. Wolfgang Heubner und Fritz Jung: Über eine Katalyse durch Methämoglobin (Hämiglobin).

[Aus d. Pharmakolog. Institut d. Universität Berlin.]

(Eingegangen am 9. November 1942.).

I.

Bei Versuchen zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der Chloratvergiftung beobachteten wir die interessante Erscheinung, daß das als Ergebnis dieser Vergiftung auftretende (bisher Methämoglobin genannte) Hämiglobin¹⁾ zugleich als beschleunigender, selbst auslösender Faktor bei der Vergiftung wirkt.

Zuerst hatte 1914 A. Nickel im Göttinger Pharmakologischen Institut²⁾ ermittelt, daß in Blut-Chloratmischungen die Umwandlung des Blutfarbstoffs mit steigender Blutkonzentration anwächst, und R. Mayer³⁾ hat auf Grund messender Verfolgung dieser Beobachtung eine Katalyse durch Blutfarbstoff angenommen. Heute liegt ausreichender Anlaß dazu vor, diese Erscheinung auf den in jedem Blut beim Stehenlassen auftretenden Gehalt an Hämiglobin zurückzuführen. Überdies ist es als höchst wahrscheinlich anzusehen, daß auch schon im strömenden Blut, mindestens mancher Tierarten und mancher Individuen, meßbare Mengen Hämiglobin vorhanden sind; daß Spuren davon niemals fehlen, ist geradezu ein theoretisches Postulat.

Neben dem Entstehen von größeren Mengen Hämiglobin ist für die Chloratvergiftung charakteristisch das Auftreten weiterer Abwandlungsprodukte des Blutfarbstoffs; auch bei ihrer Entstehung handelt es sich um eine Oxydation, wie bei der Umwandlung des Eisens aus der 2-wertigen in die 3-wertige Stufe (Hämiglobin aus Hämoglobin): Oxydation am Porphyrinring führt zur Bildung grüner Farbstoffe, Oxydation am Eiweißrest (Globin) zur Bildung von Hämo- und Verdochromogenen sowie zu Koagulationsvorgängen; auch Spaltprodukte wie Hämin sind bei Chloratvergiftung festgestellt worden.

Am leichtesten meßbar ist von diesen Veränderungen die zuerst eintretende, nämlich die Bildung des Hämiglobins. Verfolgt man mit solchen Messungen die Bildung von Hämiglobin außerhalb des Tierkörpers in Mischungen von Lösungen gewaschener Blutkörperchen mit Chlorat, so beobachtet man eine gewisse Zeit keine Veränderung; mit deutlicher Latenz

¹⁾ Kiese, Klin. Wschr. **1942**, 565; Kiese u. Kaeske, Biochem. Ztschr. **312**, 121 [1942]; Heubner, Klin. Wschr. **1942**, 520.

²⁾ Nickel, Inaug. Dissertat. Göttingen 1921, Studien über die Blutwirkung der Chlorate.

³⁾ Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **95**, 351 [1922].