

Ueber die Eiweiss-Verbindungen der Nucleïnsäure und Thyminsäure und ihre Beziehung zu den Nucleïnen und Paranucleïnen.

Von

T. H. Milroy.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 5. August 1896.)

Seitdem durch die Untersuchungen von Altmann¹⁾ bekannt geworden ist, dass die Nucleïnsäuren schwerlösliche Verbindungen mit Eiweiss ergeben, pflegt man die Nucleïne als derartige Verbindungen zu betrachten. Diese Anschauung stützt sich auf einige oberflächliche Beobachtungen; eine genauere Vergleichung der Eigenschaften der Nucleïne mit denen der künstlichen Nucleïnsäure-Eiweiss-Verbindungen ist bisher noch nicht durchgeführt worden. Nachdem durch die Darstellungsmethode von A. Kossel und A. Neumann die Nucleïnsäure leichter zugänglich geworden ist²⁾, ist die Möglichkeit zur Gewinnung grösserer Mengen dieser Verbindung gegeben und es ist der Zweck der folgenden Untersuchungen, festzustellen, inwiefern diese künstlich dargestellten Verbindungen mit den aus den thierischen Organen gewonnenen Nucleïnen übereinstimmen.

¹⁾ Archiv f. Anatomie u. Physiologie, Physiolog. Abth., 1889. S. 524

²⁾ Ber. d. deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 27, S. 2215.

An diese Frage knüpft sich eine zweite. A. Kossel hat gezeigt, dass diejenigen Stoffe, welche man früher unter dem Namen Nucleïne zusammenfasste, zweierlei Art sind¹⁾. Ein Theil derselben, die eigentlichen «Nucleïne», liefert bei der Zersetzung die Nucleinbasen, ein anderer Theil, die «Paranucleïne», liefert die Basen nicht. Da diese Basen auch aus der Nucleinsäure hervorgehen, so können nur die ersteren als Verbindungen von Nucleinsäure mit Eiweiss aufgefasst werden. Es liegt nun der Gedanke nahe, dass die Paranucleïne ebenfalls eine organische phosphorhaltige Säure in ihrem Moleküle enthalten, die sich analog zur Nucleinsäure verhält und man wird hierbei an die Thyminsäure erinnert, welche sich, wie Kossel und Neumann gezeigt haben, aus Nucleinsäure bildet und welche ebenfalls schwerlösliche Eiweissverbindungen liefert. Ich habe also in dem zweiten Theil meiner Arbeit diese Thyminsäure-Eiweiss-Verbindungen mit den natürlich vorkommenden Paranucleïnen verglichen.

I. Ueber die künstlich dargestellten Verbindungen der Nucleinsäure mit Eiweisskörpern. Vergleichung derselben mit den Nucleïnen.

A. Verbindungen der Nucleinsäure mit Syntonin.

Darstellung.

Die Nucleinsäure wurde nach dem Verfahren von A. Kossel und Neumann aus Thymusdrüsen gewonnen, sodann in Wasser, welches dem Siedepunkt nahe war, hineingebracht und unter häufigem Umrühren gelöst. In dieser Weise bereitete ich mir eine einprocentige Lösung der Nucleinsäure. Zu der abgekühlten Flüssigkeit liess ich eine salzsaure Lösung (0,25% HCl) von Syntonin, welche in der bekannten Weise aus Ochsenfleisch dargestellt war, aus einer Bürette so lange hinzutropfen, bis kein erheblicher Niederschlag mehr entstand. Der Niederschlag des so erzeugten «Syntonin-

¹⁾ A. Kossel, Untersuchungen über die Nucleïne. Strassburg 1881. S. 12. E. du Bois Reymond's Archiv f. Physiologie, 1891, S. 182—183.

Nucleïns» fällt schnell zu Boden, sodass die überstehende Flüssigkeit leicht abgegossen werden kann. Der Niederschlag wurde zunächst durch Decantiren später auf dem Saugfilter, anfangs mit verdünnter Salzsäure, zuletzt mit Wasser ausgewaschen und zwar wurde das Auswaschen länger fortgesetzt, als das Waschwasser deutliche Nucleïnsäure-Reactionen zeigte. Zuletzt wurde mit Alkohol und Aether gewaschen und bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Ueber die Festigkeit der Bindung der Nucleïnsäure an Eiweiss.

Aus den Untersuchungen von A. Kossel und A. Neumann ergibt sich, dass die Nucleïnsäure in mehr oder weniger fester Verbindung mit Eiweiss in den Organen vorhanden ist. A. Kossel unterscheidet¹⁾ 1. die feste Bindung, wie sie in vielen inneren Organen, z. B. im Pankreas, vorkommt; 2. die lockere Bindung, welche in der Thymusdrüse vorhanden ist, und 3. den ungebundenen Zustand, wie er von Miescher in den Spermatozoen des Rheinlacheses aufgefunden ist. Die unter 2. genannten Nucleïne werden in alkalischer Lösung durch Barytwasser unter Bildung schwer löslichen nucleïnsauren Baryts zerlegt, die unter 1. angeführten hingegen nicht. Ich versuchte nun zu entscheiden, welcher Kategorie das von mir dargestellte künstliche Product angehört.

Das Syntonin-Nucleïn wurde ohne vorheriges Trocknen in einprocentiger Ammoniakflüssigkeit gelöst und mit einer heissen concentrirten Lösung von Aetzbaryt versetzt. Der Niederschlag wurde in Wasser fein vertheilt mit Essigsäure schwach angesäuert, ein bis zwei Stunden zum Sieden erhitzt und die filtrirte Flüssigkeit nach den von A. Kossel und A. Neumann angegebenen Vorschriften zur Darstellung der Nucleïnsäure behandelt. So oft auch dieser Versuch angestellt wurde, erhielt ich doch in keinem Falle in dieser Weise aus dem künstlichen Nucleïn die Nucleïnsäure wieder. Auch in

¹⁾ E. du Bois Reymond's Archiv f. Physiologie 1894 (Verh. d. physiol. Ges. zu Berlin, 8. December 1893).

der vom Barytniederschlag abfiltrirten Flüssigkeit konnte ich keine abgespaltene Nucleinsäure nachweisen, so dass ich den Schluss ziehen muss: die Bindung zwischen der Nucleinsäure und dem Eiweiss in dem Syntonin-Nuclein ist eine feste, mit der des Pankreasnucleins verglichen.

Der Phosphorgehalt des Syntonin-Nucleins.

Zur Bestimmung des Phosphors benutzte ich in allen Fällen das von Weibull¹⁾ beschriebene Verfahren, bei Gegenwart von Eisen wurde die Molybdänsäure-Fällung angewandt. Um eine Controlle für die Reinheit der von mir dargestellten Präparate zu besitzen, unterwarf ich einen Theil derselben der Pepsin-Verdauung. Die Präparate wurden stets bei 105° getrocknet.

Versuch I. 1,988 gr. Nucleinsäure werden in 200 ccm. Wasser gelöst und mit Syntoninlösung gefällt. Der Niederschlag wird in zwei ungefähr gleiche Portionen getheilt, deren eine (A) direct analysirt, deren zweite (B) zunächst der Pepsin-Verdauung unterworfen wird.

- a) 0,882 gr. Nuclein lieferten 0,2286 gr. $Mg_2P_2O_7$ entsprechend 0,327 gr. P. d. i. **3,71** % P.
- b) Die zweite Portion nach der 9 stündigen Einwirkung von 100 chem. Pepsin-Salzsäure wog 0,0675 gr. $Mg_2P_2O_7$ entsprechend 0,0188 gr. P. d. i. **4,01** % P.

Versuch II. 2,516 gr. Nucleinsäure wurden in 250 ccm. Wasser gelöst, mit Syntonin-Lösung gefällt und wie in Versuch I weiter behandelt.

- a) 0,5700 gr. Nuclein gaben 0,084 gr. $Mg_2P_2O_7$ entsprechend 0,0232 gr. P. d. i. **4,07** % P.
- b) Die zweite Portion nach 12 stündiger Einwirkung von 100 chem. künstlichem Magensaft wog 0,4717 gr. und lieferte 0,0692 gr. $Mg_2P_2O_7$ entsprechend 0,019 gr. P. d. i. **4,03** % P.

Versuch III. 2 gr. Nucleinsäure in 300 ccm. Wasser gelöst, wie oben mit Syntonin gefällt und weiter behandelt.

- a) 0,751 gr. Nuclein lieferten 0,112 gr. $Mg_2P_2O_7$ entsprechend 0,031 gr. P. d. i. **4,13** % P.
- b) Die zweite Portion wurde 13 Stunden mit 110 ccm. Pepsin-Salzsäure (aus Schweinemagen) verdaut. Nach dem Verdauen wog das Nuclein

¹⁾ Weibull, Chemiker-Ztg., 1892, XVI, Nr. 90.

0,294 gr. Es gab nach Veraschen 0,037 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ entsprechend 0,010 gr. P, d. i. **3,40%** P.

Versuch IV. 5 gr. Nucleinsäure wurden in circa 200 cem. 15 proc. Natriumacetat-Lösung in der Wärme gelöst und nach dem Erkalten mit Syntonin gefällt. Der Niederschlag wurde in der gewöhnlichen Weise behandelt.

- a) 0,893 gr. Nuclein von Portion I gaben 0,0215 gr. P, d. i. **2,41%** P.
 b) Die zweite Portion wurde mit 100 cem. künstlichem Magensaft $8\frac{1}{2}$ Stunden verdaut und der nicht verdaute Rest, wie beschrieben, gereinigt und getrocknet. Er wog 0,285 gr. und lieferte 0,0455 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ entsprechend 0,10258 gr. P., d. i. **4,41%** P.

In der gleichen Weise wurde noch eine Anzahl anderer Versuche mit Syntonin und Nucleinsäure angestellt.

Doch erscheint es nicht nöthig, dieselben hier anzuführen, da sie zu den gleichen Resultaten führten, wie die bisher mitgetheilten Untersuchungen. Stets betrug der Phosphorgehalt nach der Pepsin-Verdauung annähernd 4%.

Aus den angegebenen Untersuchungen folgt, dass die künstlich dargestellten Nucleine bezüglich ihres Phosphorgehalts den natürlichen entsprechen. Zwar gelingt es nicht immer, die Verbindung gleich rein zu fällen, sondern sie enthält zuweilen (Versuch I und IV) etwas Eiweiss, welches durch Pepsinverdauung fortgeschafft werden kann.

Andererseits kann auch die Pepsinwirkung bei zu langer Dauer zur Zersetzung führen, wie Versuch III zeigt.

Ich will hinzufügen, dass die Nucleinsäure — wie andere Versuche lehrten — von kräftiger wirkender Pepsinsalzsäure allmählig als solche gelöst wird. Doch war bei den eben angeführten Versuchen in dem pepsinhaltigen Filtrat niemals Nucleinsäure nachweisbar.

Für die Beurtheilung dieser Verbindungen wäre es wichtig, zu wissen, ob bei der Bildung derselben eine Sättigung der sauren Affinitäten der Phosphorsäure bemerkbar ist. Ich habe dies durch acidimetrische Versuche festzustellen versucht und es war in der That eine solche Abstumpfung nachweisbar. Da aber eine constante Grösse für diese Abstumpfung bei meinen Versuchen nicht beobachtet werden konnte, will ich von der Mittheilung derselben Abstand nehmen.

B. Verbindungen der Nucleinsäure mit Propeptonen (Albumosen).

Die Nucleinsäure ist im Stande, auch Propeptone und Peptone aus sauren Lösungen zu fällen. Ich versuchte zunächst das Verhalten dieser Säure zu der reinen nach Kühne- und Neumeister dargestellten Deuteroalbumose zu charakterisiren.

1,6495 gr. Nucleinsäure in 150 cbcm. Wasser gelöst, wurde zu einer mit Essigsäure versetzten Lösung von 1,3265 gr. Deuteroalbumose in 90 cbcm. Wasser hinzugefügt. Am nächsten Tage wurde die trübe über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit abgehebert, der Rückstand centrifugirt, der in dieser Weise abgetrennte Niederschlag mit destillirtem Wasser, Alkohol und Aether gewaschen und in zwei ungefähr gleiche Theile getheilt. Die erste Portion ergab nach dem Trocknen bei 105° einen Phosphorgehalt von 6,32% P, die zweite Portion wurde zunächst einer siebenstündigen Digestion mit 100 cbcm. einer wirksamen Lösung von Pepsinchlorwasserstoffsäure (0,25% HCl) unterworfen und das Ungelöste ebenfalls analysirt. Der Phosphorgehalt betrug 6,29% P.

Es scheint, als ob man bei Anwendung von mehr Deuteroalbumose phosphorärmere Producte erhält, wenigstens zeigte ein Präparat, welches ich durch Fällung von 1,664 gr. Nucleinsäure in 150 cbcm. Wasser mit 2,753 gr. Deuteroalbumose in 200 cbcm. essigsäurehaltigen Wassers erhielt, einen Phosphorgehalt von 5,04% P.

Den weiteren Untersuchungen dieser Verbindung stellten sich beträchtliche Schwierigkeiten entgegen, da erstens die Beschaffung grösserer Mengen von Deuteroalbumose Schwierigkeiten verursachte und zweitens die Verbindungen der Nucleinsäure mit Deuteroalbumose wegen ihrer leichteren Löslichkeit durch Pepsin schwer zu reinigen sind. Die Verbindungen der Protalbumose mit Nucleinsäure sind in säurehaltigem Wasser noch leichter löslich.

Ich habe mich deshalb damit begnügen müssen, diejenigen Verbindungen kennen zu lernen, welche aus dem Gemisch, das als «Witte's Pepton» im Handel erscheint, durch Nucleinsäure erhalten werden.

8,858 gr. Nucleinsäure wurden in 800 ccm. Wasser gelöst zu einer angesäuerten Lösung von 20 gr. «Pepton» in 400 ccm. Wasser hinzugefügt. Es schied sich langsam ein Niederschlag ab, dessen Phosphorgehalt 2,68% P betrug und der in Pepsin-Salzsäure leicht löslich war. Nach Entfernung des ersten Niederschlages wurde ein Ueberschuss von «Pepton»-Lösung hinzugefügt und hierdurch ein Niederschlag ausgeschieden, welcher 1,32% P enthielt.

Phosphorreichere Präparate erhält man bei Anwendung eines Ueberschusses von Nucleinsäure. Als ich 9 gr. «Witte's Pepton» in 200 ccm. mit Essigsäure angesäuerten Wassers durch 8 gr. Nucleinsäure in 800 ccm. Wasser fällte, erhielt ich einen Niederschlag, welcher nach dem Auswaschen mit essigsäurehaltigem Wasser, reinem Wasser, Alkohol und Aether 3,53% P enthielt und dessen Phosphorgehalt nach 6stündiger Digestion mit Pepsinchlorwasserstoff auf 5,42% P gesteigert war.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass die Zusammensetzung der durch Nucleinsäure in Albumoselösung erzeugten Niederschläge abhängig ist von den quantitativen Verhältnissen, unter welchen die beiden Componenten auf einander einwirken. Die phosphorreichsten Verbindungen werden dann erhalten, wenn Nucleinsäure im Ueberschuss zugegen ist. Die in dieser Weise erhaltene Verbindung der Deuteroalbumose ist phosphorreicher als die entsprechenden Verbindungen des Acidalbumins.

An die Darstellung dieser Albumose-Verbindungen knüpft sich die Frage nach der Festigkeit, mit welcher die Nucleinsäure in ihnen an die Albumose angefügt ist. Gehören dieselben ebenso wie die Syntonin-Nucleinsäure-Verbindungen in die erste der oben erwähnten Kategorien? Der folgende Versuch überzeugte mich davon, dass dies in der That der Fall ist.

12,893 gr. Nucleinsäure-Albumose, gewonnen durch Fällung von ca. 30 gr. «Witte's Pepton» mit 10 gr. Nucleinsäure, wurden in 200 ccm. Ammoniakwasser gelöst, mit einer heissen concentrirten Barytlösung gefällt und auf Nucleinsäure

verarbeitet. Es wurden nur Spuren von freier Nucleinsäure gewonnen.

C. Ueber die Einwirkung von Pepsinchlorwasserstoff, Trypsin und Alkalicarbonat auf die Verbindungen der Nucleinsäure.

Für die weitere Untersuchung der Nucleine ist es wünschenswerth, solche Spaltungsmittel ausfindig zu machen, welche die Verbindungen der Nucleinsäure mit Eiweiss lösen, ohne gleichzeitig eine Zersetzung der Nucleinsäure herbeizuführen. In dieser Hinsicht untersuchte ich die Verdauungsfermente und die Lösungen des kohlensauren Natrons auf die natürlich vorkommenden Nucleinsäure-Verbindungen.

Einwirkung des Trypsins auf die Syntonin-Verbindung.

Die Untersuchungen von Popoff¹⁾ und von Gumlich²⁾ haben gezeigt, dass die Nucleine der Thymusdrüse unter der Einwirkung des Pankreassaftes in Lösung gehen und dass der in ihnen enthaltene Phosphor in den Stoffwechsel des Säugthier-Organismus hineingelangt.

Für die Untersuchung der künstlichen Verbindungen benutzte ich eine nach der Vorschrift von Kühne und Chittenden dargestellte Trypsinlösung. Diese Pankreasflüssigkeit enthielt nach 14stündiger Selbstverdauung weder freie noch locker gebundene Nucleinsäure, wohl aber Phosphorsäure in freier und organisch gebundener Form, und zwar in 100 chem. Pankreassaft 0,1164 gr. Gesamt-Phosphor, wovon 0,0409 gr. durch Magnesiamischung direct ohne vorherige Veraschung fällbar waren.

Das Syntonin-Nuclein, welches für den Versuch benutzt wurde, enthielt 3,49% P. Dieser Phosphorgehalt konnte durch Pepsinverdauung auf 3,86% P gesteigert werden, es

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 533.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 508.

wurde aber zu den Versuchen das ursprüngliche Präparat benutzt.

Ich stellte nun zwei Versuche an, von denen der erstere a) bei längerer, der zweite b) bei kürzerer Einwirkung des Trypsins ausgeführt wurde.

- a) 4,0819 gr. Syntonin-Nuclein mit 220 ccm. Trypsinflüssigkeit 11 Stunden bei 38° digerirt. Der unverdaute Rückstand enthielt 0,99% P.
 b) 1 gr. Syntonin-Nuclein wurde 6 Stunden mit 60 ccm. Pankreasflüssigkeit verdaut, der nicht gelöste Rückstand enthielt 1,469% P.

Hieraus ergibt sich, dass das Trypsin den Phosphor des Nucleins allmählig abspaltet, und dass das langsam erfolgende Verschwinden des Syntonin-Nucleins unter dem Einfluss der Pankreasflüssigkeit nicht etwa auf eine Lösung der unzersetzten Verbindung zurückzuführen ist.

In welcher Form erfolgt diese Abspaltung der Phosphorsäure? Hierüber musste die Untersuchung des Filtrats Aufschluss geben.

In 100 ccm. des Filtrats wurden nach 14stündiger Verdauung 0,2034 gr. Gesamt-Phosphor gefunden, davon waren 0,054 gr. in einer direct durch Magnesiamischung fällbaren Form. Zieht man nun die oben angeführten Phosphorzahlen in Betracht, welche die Trypsinflüssigkeit nach 14stündiger Selbstverdauung ergeben hatte, so zeigt sich, dass die Gesamtmenge des vom Syntonin-Nuclein abgespaltenen Phosphors beträgt:

$$0,2034 - 0,1164 = 0,0870 \text{ gr. für 100 ccm. Lösung.}$$

Hierin waren enthalten an Orthophosphorsäure:

$$0,0504 - 0,0409^1) = 0,0095 \text{ gr. für 100 ccm. Lösung.}$$

Somit ist 89,08% des vom Syntonin-Nuclein abgespaltenen Phosphors nicht in Form der Orthophosphorsäure im Filtrat enthalten.

Diese Säure kann auch keine Metaphosphorsäure sein, weil man die Filtrate längere Zeit kochen kann, ohne dass

¹⁾ Siehe vorige Seite.

eine Vermehrung der Orthophosphorsäure eintritt. Hingegen konnte ich nachweisen, dass die Filtrate im Stande waren, nach dem Ansäuern mit Essigsäure oder Salzsäure Albumosen oder Syntonin zu fällen. Auch gelang es mir, durch Alkohol das Barytsalz einer eiweissfällenden Säure niederzuschlagen, aber die Identität dieser Säure mit der ursprünglich angewandten Nucleinsäure konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Durch einen zweiten Versuch mit gleichem Resultat konnte ich das eben angeführte Resultat bestätigen (siehe Tabelle I). Nach sehr langer Einwirkung des Trypsins scheint die Menge der Orthophosphorsäure im Filtrat zuzunehmen.

Einwirkung von kohlensaurem Natron auf Syntonin-Nuclein.

Die eben angeführten Versuche regten die Frage an, ob die Zersetzung nicht auch ohne die Wirkung des Trypsins durch schwach alkalische Flüssigkeiten herbeigeführt werde. Ich habe deshalb 2,4416 gr. Syntonin-Nuclein mit 50 ccm. 0,25% Lösung von Na_2CO_3 15 Stunden bei 38° digerirt. Bei weitem die grösste Menge war in Lösung übergegangen, der Rest, dessen Menge 0,245 gr. betrug, enthielt 0,653% P. Zu einem ähnlichen Resultate führte ein zweiter Versuch (siehe Tabelle II). In den Filtraten war der Phosphor — ebenso wie bei den Trypsinversuchen — vorwiegend in organischer Bindung enthalten (siehe Tabelle I). Wenn man die Filtrate mit Baryt übersättigte, so konnte man auch hier das Barytsalz einer eiweissfällenden Säure durch Alkohol ausfällen.

Somit ergibt sich, dass die Einwirkung der wässrigen Natriumcarbonatlösung derjenigen einer Trypsinlösung gleichartig ist, indess verläuft sie, wie aus den Tabellen zu ersehen ist, viel langsamer. Sowohl Natriumcarbonat wie Trypsinlösung spalten Phosphor aus dem Syntonin-Nuclein ab, und zwar in Form einer organischen Phosphorsäure und diese abgespaltene Säure ist zum Theil in freiem Zustand; zum Theil vielleicht in Verbindung mit Albumosen oder Alkalialbuminat in der Flüssigkeit gelöst.

Das Verhalten der natürlichen Nucleine zu den Verdauungsfermenten.

1. Nucleine der Thymusdrüse (Leukonuclein). Dasselbe wurde in der früher beschriebenen Weise aus Nucleohiston dargestellt¹⁾, indem das wässrige Extract der Thymusdrüse mit Essigsäure gefällt, in schwach ammoniakhaltigem Wasser gelöst und wieder gefällt wurde. Dieses Verfahren wurde viermal wiederholt. Das Nuclein wurde sodann zuerst mit salzsäurehaltigem und darauf mit destillirtem Wasser gewaschen, darauf wurde es längere Zeit zunächst mit Alkohol bei 45° und dann mit Aether extrahirt, und schliesslich bei 105° zur Gewichtsconstanz getrocknet und der Phosphor-Gehalt bestimmt. Derselbe betrug 4,416% P.

Ich untersuchte zunächst die Einwirkung des Pepsins, die bereits mehrfach von anderen Gesichtspunkten aus studirt ist.

4,128 gr. (wasserfrei berechnet) Leukonuclein wurden 10 Stunden mit 100 ccm. Pepsin-Lösung bei 38° verdaut. Ungefähr ein Drittel war in Lösung gegangen. Der ungelöste Theil wurde in der gewöhnlichen Weise gereinigt und bei 105—110° zur Gewichtsconstanz getrocknet, verascht und der Phosphor bestimmt. Er enthielt 4,325% P entsprechend einem Verlust von 0,091% P nach 10stündiger Einwirkung der Pepsinlösung.

Die Untersuchung des salzsauren pepsinhaltigen Filtrates ergab, dass der Phosphorgehalt desselben um 0,0484 gr. P während der Verdauung zugenommen hatte. Hieraus ergibt sich, dass 26,54% des gesammten im Leukonuclein enthaltenen Phosphors in Lösung übergeführt worden ist. Zieht man nun auch die geringfügige Abnahme im Procentgehalt des unverdauten Nucleinrestes in Betracht, so ergibt sich, dass der Phosphor und die organische Substanz im Wesentlichen in demselben Verhältnisse in die Lösung übergeführt sind, in welchem sie in dem ursprünglichen Leukonuclein enthalten waren. Die Menge von Phosphorsäure,

¹⁾ Liliensfeld, diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 473.

welche als Nucleinsäure unabhängig von der organischen Substanz abgespalten ist, beträgt nicht mehr als 7,65% der gesamten abgespaltenen Phosphorsäure. Die Analyse des Filtrates ergab, dass ungefähr 91,3% der Phosphorsäure in organischer Bindung, 8,7% in Form der Orthophosphorsäure aus dem Nuclein abgespalten waren — was mit der obigen Berechnung gut übereinstimmt — Diese Flüssigkeit war nicht im Stande, Eiweiss zu fällen.

Die weiteren Versuche bezweckten das Studium der Trypsinwirkung.

Eine Portion von dem Leukonuclein wurde zuerst mit Pepsin kurze Zeit (4 Stunden) verdaut und dann in der gewöhnlichen Weise gereinigt. In einem kleinen Theil desselben wurde der Phosphor bestimmt. Es enthielt 4,32%.

1,2417 gr. (wasserfrei berechnet) von diesem Nuclein wurden mit 60 chem. Pankreassaft 48 Stunden lang bei 38° verdaut. Etwas mehr als die Hälfte war in die Lösung übergegangen.

- a) Der nicht gelöste Theil mit salzsäurehaltigem Wasser, dest. Wasser, Alkohol und Aether behandelt und bei 105°–110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, ergab 1,84% P.
- b) Das Filtrat von dem verdauten Leukonuclein reagierte am Ende des Versuchs schwach alkalisch und fällte Albumosen in essigsaurer Lösung. Die Darstellung der Nucleinsäure aus dieser Flüssigkeit gelang aber nicht.

Die Untersuchung in der mehrfach erwähnten Weise ergab, dass 57,55% des gesamten Nucleinphosphors in Lösung übergeführt waren und dass von diesem gelösten Phosphor nur 8,37% in Form der Orthophosphorsäure abgespalten, hingegen 91,63% in organischer Form vorhanden waren. Somit stimmt das Verhalten des Leukonucleins zu Trypsinlösung mit dem des Syntonin-Nucleins im Wesentlichen überein. Zu einem ähnlichen Resultate führten auch die Versuche über die Einwirkung der Natriumcarbonat-Lösung.

1,1402 gr. von demselben Nuclein wurden mit 60 chem. Lösung von Na_2CO_3 (0,25%) ebenfalls 4 Stunden verdaut. Ungefähr die Hälfte war in die Lösung übergegangen (nicht so viel wie nach Trypsin-

Einwirkung). Der Rückstand wurde in der mehrfach beschriebenen Weise behandelt. Er enthielt 2,50 % P.

Im Filtrat wurde nur 4,737 % von dem gesammten Phosphor als Orthophosphorsäure gefunden. Die Flüssigkeit reagirte schwach alkalisch und fällte nach dem Ansäuern Albumosen, doch konnte ich keine Nucleinsäure aus ihr gewinnen.

2. Nuclein der rothen Blutkörperchen. Für weitere Versuche benutzte ich die Kernsubstanz aus den rothen Blutkörperchen des Gänse- und Entenbluts. Dieselbe wurde aus den durch Senkung isolirten Blutkörperchen durch Auflösung in Wasser und Schütteln mit Aether gewonnen¹⁾, mit Wasser möglichst vollständig ausgewaschen, wobei stets eine Färbung der Kernsubstanz übrig blieb, wenn auch das Waschwasser völlig ungefärbt ablief. Die Kernsubstanz blieb über Nacht in 0,25 % Salzsäure stehen, darauf filtrirt, der Rückstand mit sehr wenig verd. Salzsäure in der Wärme zur Entfernung des Hämatins extrahirt und zum Schluss mit Alkohol und Aether gewaschen. Der graue pulverige Niederschlag wurde zuerst im Exsiccator getrocknet und in einer Portion wurde der Phosphorgehalt bestimmt. Die Kernsubstanz des Entenblutes enthielt 5,91 % P, diese Zahl stimmt annähernd überein mit dem von A. Kossel für die ohne Pepsinbehandlung dargestellte Kernsubstanz des Gänseblutes gefundenen Werth von 5,62 % P²⁾. Das von mir aus Gänseblut dargestellte Präparat hatte einen zu niedrigen Phosphorgehalt (4,25 % und 4,30 % P), weil ich dasselbe zur Entfernung des Hämatins längere Zeit bei 60° mit alkoholischer Salzsäure erwärmt hatte.

Bei der Pepsinverdauung dieser Präparate ging ungefähr 41,2 % des Nucleinphosphors in Lösung und von dem gelösten Phosphor war 15,7 % in Form von Orthophosphorsäure 84,3 % in organischer Form vorhanden. Eiweissfällende Wirkung wurde im Filtrat nicht wahrgenommen, auch konnte aus demselben keine Nucleinsäure dargestellt werden.

¹⁾ Plosz, Med.-chem. Untersuchungen, herausg. v. F. Hoppe-Seyler, S. 461. Kossel, diese Zeitschrift, Bd. V, S. 153.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. V, S. 154.

Unter der Einwirkung des Pankressaftes zeigten diese Präparate insofern eine Abweichung von dem Verhalten des künstlichen Nucleïns und des Leukonucleïns, als in diesem Falle keine eiweissfällende Wirkung im Filtrate beobachtet wurde, weder in salzsaurer noch in essigsaurer Lösung. Die Lösung der Kernsubstanz durch die Trypsinlösung erfolgte sehr leicht. In einem Versuch (bei der Kernsubstanz des Entenbluts) war die Menge des als Phosphorsäure abgespaltenen Phosphors aussergewöhnlich hoch (47%), in einem anderen Fall betrug sie nur 6%.

Ich will noch hinzufügen, dass die Bindung der Nucleïnsäure in dem Nucleïn des Entenbluts eine festere ist, da es nicht gelingt, aus der ammoniakalischen Lösung der Kernsubstanz nach dem Verfahren von Kossel und Neumann Nucleïnsäure zu isoliren.

Das Nucleoproteïd der Pankreasdrüse.

Ich habe dies Nucleoproteïd nach der Methode von Hammarsten dargestellt, indess noch nicht in reinem Zustand erhalten. Ich erwähne dasselbe trotzdem deshalb, weil es in dem Verhalten zu Pepsinsalzsäure eine Abweichung gegenüber den bisherigen Nucleïnen zu erkennen gab. Das Filtrat erhielt nach Abstumpfung der Salzsäure auf Zusatz von Essigsäure die Fähigkeit, Albumoselösung zu fällen. Die Fällung war in Salzsäure löslich. Fast sämtlicher Phosphor dieses Nucleoproteïds wird bei der Pepsinverdauung in organischer Verbindung in Lösung übergeführt, nur ein kleiner Theil (etwa 3%) ist in Form der Phosphorsäure in der Flüssigkeit vorhanden.

Auch bei der Trypsinverdauung wurde aus diesem Proteïd ein Körper abgespalten, der in essigsaurer Lösung mit Eiweiss einen Niederschlag gab. Dieser Körper ist eine Säure, deren Barytsalz durch Barytwasser ausgefällt wurde und die sich bezüglich der Löslichkeit dieses Salzes wie Nucleïnsäure verhält. Die Menge des als Phosphorsäure abgespaltenen Phosphors betrug 23,5% des in Lösung befindlichen Phosphors.

Die Einwirkung der Verdauungsfermente auf verschiedene Nucleine.
A. Der Phosphor in den gelösten Producten.

Bezeichnung der untersuchten Nucleine.	Nach Einwirkung von Pepsin - Salzsäure.	Nach Einwirkung von HCl (0,25 %).	Nach Einwirkung von Trypsin.	Nach Einwirkung von Na ₂ CO ₃ (0,25 %).	Bemerkungen.
A. Syntonin-Nuclein	(a) 8,013 % (b) 91,987 %	— —	(a) 15,172 % (α) (b) 84,828 %	(a) 28,00 % (α) (b) 72,00 %	A = Frisch bereitetes Präparat.
B. »	(a) 7,799 % (b) 92,201 %	(a) 6,945 % (b) 93,055 %	(a) 17,143 % (β) (b) 82,857 %	(a) 39,454 % (β) (b) 60,546 %	B = Alkohol-Präparat.
C. Nuclein aus dem Entenblut . . .	(a) 42,858 % (7½ St. verdaut) (b) 57,142 %	— —	(a) 47,223 % (γ) (b) 52,777 %	— —	
D. Nuclein aus dem Gänseblut . . .	(a) 15,71 % (8 St. verdaut) (b) 84,29 %	— —	(a) 6,10 % (7 St. verd.) (b) 93,90 %	— —	
E. Das Leukonuclein	(a) 8,678 % (10 St. verdaut) (b) 91,322 %	(a) circa 2 % (10 St. verd.) (b) » 98 %	(a) 8,373 % (4 St.) (b) 91,627 %	(a) 4,737 % (4 St. verd.) (b) 95,263 %	
F. Pankreas-Nucleo-Protoid . . .	(a) 3,18 % (b) 96,82 %	— —	(a) 23,53 % (b) 76,47 %	— —	

(a) Durch Magnesia-Mischung direct fällbare Phosphorsäure. (α) = 12 Stunden verdaut.
 (b) Durch Magnesia-Mischung nicht direct fällbare Phosphorsäure in Procenten der Gesamt-Phosphorsäure. (β) = 17 » »
 (γ) = 7½ » »

Tabelle II.

Die Einwirkung der Verdauungsfermente auf verschiedene Nucleine.

B. Der Phosphorgehalt der Nucleine vor der Verdauung, verglichen mit dem Phosphorgehalt des unverdauten (ungelösten) Rückstandes.

Die untersuchten Nucleine.	Vor der Verdauung.	Nach Einwirkung von Pepsin.	Nach Einwirkung von Trypsin.	Nach Einwirkung von Na ₂ CO ₃ (0,25%).
Syntonin-Nuclein	3,490 %	3,859 % (10 St. verdaut)	1,469 % (6 St. verdaut)	1,998 % (12 St. verdaut)
»	3,494 »	3,679 » (15 St. verdaut)	0,993 » (10 St. verdaut)	0,653 » (17 St. verdaut)
Deutero-Albumose-Nuclein	6,327 »	6,29 »	—	—
(Witte's) »	3,535 »	5,426 »	—	—
Kernsubstanz aus Entenblut	5,914 »	5,809 »	—	—
Nuclein (Thymus)	4,416 »	4,325 »	1,838 » (4 St. verdaut)	2,503 » (4 St. verdaut)
Nucleo-Proteid (Pankreas)	2,796 »	3,196 »	1,12 »	—

II. Ueber die Verbindungen der Thyminsäure mit Eiweiss. Vergleichung derselben mit den Paranucleïnen.

Wie ich am Eingang dieser Mittheilung hervorgehoben habe, knüpft sich an die Eigenschaften der Thyminsäure die Frage, ob nicht vielleicht die Paranucleïne als Verbindungen der Thyminsäure mit Eiweiss aufzufassen sind. Freilich drängte sich bei der Betrachtung der Literatur die Wahrnehmung auf, dass man unter dem Namen «Paranucleïne» ganz verschiedene Substanzen zusammenfasst.

Für diese Untersuchungen bereitete ich mir zunächst nach der Vorschrift von A. Kossel und A. Neumann¹⁾ thyminsauren Baryt. Das aus 5 gr. Nucleïnsäure dargestellte Barytsalz wurde in 200 ccm. Wasser gelöst und mit verd. Essigsäure angesäuert. Eine in der bekannten Weise zubereitete Syntonin-Lösung in 2% Essigsäure wurde allmähig zu der Thyminsäure-Lösung hinzugefügt. Es entstand sogleich ein dicker flockiger Niederschlag, welcher sich schnell zu Boden setzte. Wenn nach Zusatz von Syntonin keine Fällung mehr erschien, wurden die Niederschläge abfiltrirt und in der beschriebenen Weise gereinigt.

- a) Eine Portion wurde bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Diese enthielt 2,75% Phosphor.
- b) 1,4685 gr. (wasserfrei berechnet) — ohne vorher bei 105° getrocknet zu sein — wurden mit 100 ccm. Pepsinsalzsäure 16 Stunden verdaut. Bei weitem der grösste Theil war in Lösung gegangen. Der ungelöste Theil wurde in der gewöhnlichen Weise gereinigt. Er wog 0,133 gr. und enthielt 5,04% Phosphor, stand also bezüglich des Phosphorgehalts demjenigen Paranucleïn nahe, welches Bunge unter dem Namen «Hämatogen» beschrieben hat (5,19% P).

Das nach der Verdauung gewonnene Filtrat fällte Albumosen. Nur 7,44% des gesammten abgespaltenen Phosphors war als Phosphorsäure nachweisbar. Von dem Gesammtphosphor des ursprünglichen thyminsauren Syntonin war 90% in löslicher Form in die Verdauungsflüssigkeit übergegangen. Eine Portion von dem Filtrat wurde mit gesättigter Baryt-Lösung schwach alkalisch gemacht und mit Alkohol

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 22, S. 74.

sogleich gefällt. Der Niederschlag löste sich in Wasser auf und wurde aus demselben mit Alkohol gefällt und die Fällung wiederum in Wasser gelöst. Diese wässrige Lösung fällte nach Ansäuern mit verd. Essigsäure Albumosen in ausgeprägter Weise.

Ich stellte in gleicher Weise noch einige Präparate von thyminsaurem Syntonin dar, deren Phosphorgehalt folgende waren:

Präp. I.	II.	III.	IV.
2,75	2,80	3,01	2,35 % P.

Unterwarf ich diese Producte der Pepsinverdauung und analysirte den hierbei unlöslich zurückbleibenden Rest, so erwies dieser sich in allen Fällen reicher an Phosphor und zwar betrug er in

Präp. I.	II.	III ¹⁾	IV.
5,04	4,29	—	4,34 % P.

Das Verhalten der Filtrate war ähnlich wie oben beschrieben, nur im Filtrat von Präp. II, dessen Verdauung sehr langsam vor sich gegangen war, vermisste ich die eiweissfällende Wirkung.

Gegen Trypsinlösung verhielt sich das Präparat ähnlich wie die Verbindungen der Nucleinsäure, wie folgender Versuch zeigt:

0,9696 gr. thyminsaures Syntonin (wasserfrei berechnet) wurden 10 Stunden mit 60 chem. Pankreassaft verdaut. Die Lösung war fast eine vollständige. Der in der gewöhnlichen Weise gereinigte Rückstand enthielt 1,584 % P.

Das Filtrat fällt nach Ansäuern mit Essigsäure Syntonin und Albumosen. 96,07 % von dem Gesamtposphor des Filtrates war in organischer Verbindung. Aus dem Filtrate konnte man das in Wasser lösliche Baryumsalz des eiweissfällenden Körpers darstellen, man ist also zu der Annahme berechtigt, dass die Thyminsäure durch das Trypsin aus der Verbindung mit Eiweiss losgelöst werden kann.

¹⁾ Hier trat völlige Lösung ein.

Zum Vergleich stellte ich mir nun nach Bunge's Vorschrift aus dem Ovovitellin das Paranuclein (Hämatogen) dar und untersuchte die Einwirkung des Pepsins und des Trypsins. Hierbei ergab sich, dass nach der Einwirkung des Pepsins auf dieses Paranuclein der grösste Theil des Phosphors in organischer Verbindung im Filtrat enthalten ist. Nach 12stündiger Pepsinwirkung waren nur Spuren von Orthophosphorsäure in den Verdauungsproducten gelöst, jedoch war kein eiweissfällender Körper nachweisbar. Die Einwirkung des Trypsins ergab sich aus folgendem Versuch:

1,251 gr. Paranuclein (wasserfrei berechnet) wurden 5 Stunden lang mit 80 cbcm. Pankreassaft verdaut. Ungefähr die Hälfte ging in Lösung. Der unverdaute Rest wurde abfiltrirt und mit essigsäurehaltigem Wasser, dest. Wasser, Alkohol und Aether ausgewaschen. Er wurde zunächst im Exsiccator und zum Schluss bei 105° zur Gewichtsconstanz getrocknet und zeigte einen Phosphorgehalt von **1,345 % P.** Das Filtrat reagirte alkalisch. Nach Ansäuern mit Essigsäure wurde es trübe. Wenn Albumose-Lösung zu dieser angesäuerten Flüssigkeit hinzugefügt wurde, entstand ein dicker flockiger Niederschlag, welcher sich leicht in Salzsäure (0,25 %) löste, die Darstellung des eiweissfällenden Barytsalzes gelang jedoch in diesem Falle nicht.

Diese Untersuchungen zeigen zwar, dass die Verbindungen der Thyminsäure mit Eiweiss eine gewisse Aehnlichkeit mit den Paranucleinen besitzen, sie sind jedoch nicht im Stande, die Identität beider zu erweisen. Um weiteres Material zur Lösung dieser Frage zu erhalten, versuchte ich die Darstellung des eiweissfällenden Körpers aus diesem Paranuclein in der Absicht, ihn mit der Thyminsäure zu vergleichen.

Hierbei verfuhr ich im Wesentlichen nach den Angaben von Altmann¹⁾ und erhielt Präparate von verschiedenen Phosphorgehalten:

Präp. I.	II.	III.	IV.
7,51	7,51	7,80	7,94 % P.

Altmann erhielt 7,9 % P.

Der Stickstoff betrug 12,42 % und in einem anderen Präparat 12,90 % N.

¹⁾ E. du Bois-Reymond's Archiv f. Physiologie 1889, S. 524—536.

Vergleicht man nun diese Säure mit der Thyminsäure, so ergibt sich sogleich, dass beide nicht identisch sein können. Das Verhältniss des N:P in der Thyminsäure beträgt nach meinen Analysen 1,6:1, nach Kossel und Neumann¹⁾ 1,5:1, in der aus Eidotter gewonnenen Säure kamen auf 3,7 Atome N nur 1 Atom P.

Die aus Eidotter gewonnene Säure fällt Syntonin in 2% Essigsäure. Die Fällungen sind weiss und flockig und werden durch 0,25% Salzsäure leicht gelöst. Altmann hielt diese Säure für eine nicht völlig reine Nucleinsäure, diese Ansicht lässt sich jedoch nicht aufrechterhalten, nachdem Kossel nachgewiesen hat, dass aus dem unbebrüteten Eidotter keine Nucleinbasen gewonnen werden. Auch die von mir dargestellten Präparate lieferten nach dem Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure keine Nucleinbasen. Zum Unterschied von der Thyminsäure geben sie deutliche Biuretreaction, aber (ebenso wie die Thyminsäure) keine Rothfärbung mit Millon's Reagens, keine Fällung mit Essigsäure und Ferrocyankalium. Man kann die wässrige oder essigsäurehaltige Lösung längere Zeit kochen, ehe die eiweissfällende Eigenschaft verloren geht oder Phosphorsäure in der Flüssigkeit nachweisbar ist.

Fassen wir die Resultate der vorliegenden Mittheilung zusammen, so ergibt sich, dass die künstlich dargestellten Verbindungen der Nucleinsäure mit Eiweiss sich den natürlich vorkommenden Nucleinen im Wesentlichen gleich verhalten. Auch sind die Verbindungen der Thyminsäure mit Eiweiss den Paranucleinen ähnlich, sie können aber nicht für identisch gehalten werden, weil die aus ihnen abgespaltene eiweissfällende Säure in ihren Eigenschaften von der Thyminsäure völlig abweicht. —

Es sei mir erlaubt, Herrn Prof. Kossel an dieser Stelle dafür zu danken, dass er stets freundlichst bereit war, mich bei diesen auf seine Veranlassung unternommenen Untersuchungen mit Rath und That reichlich zu unterstützen. —

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 22, S. 74.