

Ueber den Phosphor der Nucleinstoffe.

Von
Alberto Ascoli.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 21. Oktober 1900.)

In einer früheren Abhandlung habe ich erwiesen, dass die Plasminsäure, ein von A. Kossel aus der Hefe dargestelltes phosphorreiches Produkt, sich aus verschiedenen Bestandtheilen zusammensetzt, unter denen Hefenucleinsäure und Metaphosphorsäure nachgewiesen werden können. Dieses Ergebniss legt den Gedanken nahe, die Bindungsweise des Phosphors in den Nucleinsäuren mit den von mir benutzten Methoden einer erneuten Untersuchung zu unterwerfen, um festzustellen, ob nicht auch hier die Metaphosphorsäure nachweisbar ist. Diese Frage musste sich nach meinen Untersuchungen um so mehr aufdrängen, da bekanntlich die Vermuthung, dass die Nucleinstoffe als Metaphosphorsäure-Derivate aufzunehmen seien, in der Litteratur bereits eine gewisse Rolle¹⁾ gespielt hat.

Ich habe bei meinen Untersuchungen folgenden Plan verfolgt:

¹⁾ Siehe hierüber Liebermann, Pflüger's Archiv, Bd. 43 u. 47; Ber. d. deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 21; Centralbl. f. d. mediz. Wissenschaften 1889; Pohl, Diese Zeitschrift, Bd. XIII; Malfatti, Diese Zeitschrift, Bd. XVI u. XVII; Altmann, Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abtheilung 1889; Kossel, Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abtheilung 1893; Salkowski u. Hahn, Pflüger's Archiv, Bd. 59; Giertz, Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII.

Das Nuclein oder das Paranuclein resp. seine Mutter-substanz wird mit kalten concentrirten Laugen gespalten: diese Zersetzung ist so weitgehend, dass die phosphorhaltige Gruppe abgespalten wird und in der Flüssigkeit sogar Orthophosphorsäure nachzuweisen ist: entsteht nun bei der Spaltung eine Metaphosphorsäure — und sie wird dann abgespalten werden, wenn sie in dem Molekül der Muttersubstanz vorhanden war —, dann muss sie, zumal die Umwandlungsgeschwindigkeit der Metaphosphorsäure durch kalte Laugen keineswegs eine rapide ist,¹⁾ nach der Methode, welche sich bei der Hefe so gut bewährt hat, auch nachgewiesen werden können. Der Gang der Untersuchung ist demnach folgender: es wird das Nuclein resp. das Paranuclein durch Einwirkung einer concentrirten (20–30%igen) Natronlauge 15–30 Minuten lang gespalten: hierauf wird die Lösung mit Wasser verdünnt und mit so viel Eisenchlorid gefällt, dass die Flüssigkeit zu einem nicht allzu dicken, aber doch gut filtrirbaren Brei wird: dieser wird durch Spitzbeutel filtrirt und in dem Filtrate durch Füllen mit salzsaurem Alkohol und weitere Behandlung, wie bei der Darstellung der Plasminsäure, nach der Anwesenheit eines solchen Complexes gefahndet. Es muss natürlich die Menge des in Anwendung kommenden Ausgangsmaterials eine grosse sein, da ja die Ausbeute nach meinen Erfahrungen über die Plasminsäure keine reichliche ist: und es muss die Menge eine um so grössere sein, je phosphorärmer das Ausgangsmaterial.

Meine Untersuchungen erstreckten sich bis jetzt nur auf je ein Glied der beiden zu studirenden Klassen: und zwar habe ich von den echten Nucleinen das Leukonuclein, von den Nucleoalbuminen, den Muttersubstanzen der Paranucleine, das Casein in der oben beschriebenen Weise behandelt: vom Leukonuclein kamen bei seinem Phosphorgehalte von etwa 5% 350 g zur Verarbeitung, während von dem phosphorarmen Casein einmal 2 kg, das andere Mal 500 g verarbeitet wurden.

¹⁾ Paul Sabatier, Sur la vitesse de transformation de l'acide métaphosphorique. Annales de Chimie et Physique, VI. S., T. 18, 1889

I. Untersuchung des Leukonucleins.

350 g Leukonuclein, welches mir Herr Professor Kossel freundlichst zur Verfügung stellte, wurden in 1 Liter Wasser aufgeschwemmt und durch allmählichen Zusatz von 2 Litern einer 45%igen Lösung von Aetznatron unter kräftigem Umrühren zur Lösung gebracht: nach etwa 15 Minuten wurde die Flüssigkeit mit 3 Liter Wasser verdünnt, mit circa 2 Liter einer 48%igen Eisenchloridlösung versetzt und der entstandene Brei auf Spitzbeutel gebracht. Das klare hellgelbe Filtrat, welches etwa 4 Liter betrug, wurde mit dem anderthalbfachen Volumen einer Mischung von concentrirter Salzsäure und 85%igem Alkohol gefällt: die Salzsäuremenge war durch Titration einer Portion des Filtrates ermittelt und genügte eben, um die alkalische Reaction des Filtrates in eine schwach saure umzuwandeln. Nachdem sich der entstandene Niederschlag abgesetzt hatte, wurde die darüberstehende Flüssigkeit abgehoben, der Niederschlag auf einem Faltenfilter gesammelt und durch systematische Behandlung mit Alkohol und Aether getrocknet. Die so gewonnene Substanz wog trocken 43 g. Sie wurde mehrmals mit Wasser extrahirt und die filtrirten Extracte durch salzsauren Alkohol gefällt. Die Ausbeute an diesem Produkt betrug etwas über 3 g: die Substanz war löslich in Wasser, die wässrige Lösung reagirte sauer und die Analyse charakterisirte sie als eine Nucleinsäure mit 9,49% P.

0,1968 g. derselben bei 90° getrocknet, mit Soda und Salpeter verascht gaben nach der Molybdänmethode 0,06709 g $Mg_2P_2O_7$.

Es war nicht möglich, auf den bei der Plasminsäuregewinnung zur Anwendung gekommenen Wegen daraus ein phosphorreicherer Präparat zu gewinnen. Etwa 2 g dieser Nucleinsäure in Wasser gelöst und mit NH_3 neutralisirt wurden mit überschüssiger Strychninchloridlösung versetzt: es entstand, genau so wie bei anderen von mir untersuchten Nucleinsäuren, nur eine geringe milchige Trübung, die sich in Eiskühlung als klebriger Wand- und Bodenbesatz ausschied, der auf keine Weise zur Krystallisation gebracht werden kann. Der für die Plasminsäure so charakteristische Atomcomplex,

der bei derselben Behandlung so leicht und schön krystallisirte, war also nicht vorhanden. Es enthielt mithin das Leukonuclein keinen in Form von Metaphosphorsäure gebundenen Phosphor.

II. Untersuchung des Caseins.

2 kg Caseinum siccum des Handels (von Dr. Grübler bezogen) wurden mit 3 Liter 30%iger Natronlauge versetzt, wodurch die gut durchgeknetete Masse zum Quellen gebracht wurde: nach etwa $\frac{1}{4}$ Stunde wurde die Gallerte mit $4\frac{1}{2}$ Liter Wasser verdünnt und wiederum gut durchgeknetet, sodass sie sich zum grösseren Theile löste, hierauf das Ganze mit etwa 2 Liter 48%iger Eisenchloridlösung gefällt und der entstandene Brei auf Spitzbeutel gebracht. Am nächsten Morgen wurde das dickflüssige klare Filtrat mit dem gleichen Volumen einer Mischung von concentrirter Salzsäure und 90%igem Alkohol gefällt, nachdem die nöthige Salzsäuremenge in üblicher Weise durch Titration einer Portion bestimmt worden war. Der entstandene Niederschlag war phosphorhaltig, aber es gelang nicht, daraus durch eine verdünnte (0,8%ige) Salzsäure einen durch salzsauren Alkohol fällbaren, also der Plasminsäure analogen Körper zu gewinnen; noch gaben die neutralisirten Extracte einen Niederschlag mit Strychninchlorid.

Um die durch die Bildung von Alkalialbuminat entstehende Quellung des Caseins zu verhindern, stellte ich mit dem Casein noch einen zweiten Versuch an, wobei ich folgenden Weg einschlug: 500 g des obigen Caseins wurden einer Verdauung mit 2500 ccm. Pepsinsalzsäurelösung im Brutschrank so lange unterworfen, bis beim Versetzen einer Probe der Verdauungsflüssigkeit mit starker Natronlauge keine Gallertbildung mehr stattfand. Als dies eingetreten, wurde die Verdauungsflüssigkeit mit 2 Litern einer 45%igen Natronlauge versetzt, sodass die Mischung einen Gehalt von 20% an Aetznatron aufwies: es bildete sich keine Gallerte. Nach etwa $\frac{1}{2}$ Stunde wurde die Lösung mit 4 Liter Wasser verdünnt und mit ca. 2 Liter einer 48%igen Eisenchloridlösung versetzt, der entstandene Brei auf Spitzbeutel gebracht. Das klare gelbliche Filtrat gab

keinen Niederschlag mit salzsaurem Alkohol, sodass die Abwesenheit des gesuchten Complexes ebenso wie in dem vorigen Versuche bewiesen war.

Aus meinen bisherigen Untersuchungen ergibt sich also, dass weder aus dem Leukonuclein noch aus dem Casein ein zur Gruppe der Metaphosphorsäuren gehöriger Atomcomplex entsteht, wie er aus der Hefezelle zu gewinnen ist. Das Paranuclein aus Casein kann also schon deshalb nicht als eine Verbindung von Eiweiss mit Metaphosphorsäure angesehen werden, weil es überhaupt keine Metaphosphorsäure enthält; und dasselbe gilt für das Leukonuclein. Andererseits ist es aber nicht gestattet, die bis jetzt gewonnenen Resultate zu verallgemeinern und auf alle Nucleinstoffe auszudehnen. Wir sind nämlich im Laufe des letzten Jahrzehntes so gewaltige Unterschiede im Baue der Nucleine gewärtig geworden, dass wir keineswegs berechtigt sind, die Bindungsweise des Phosphors in den Nucleinsäuren im Vorhinein als eine gleichartige anzusehen; und auch für die Paranucleine sind schon grundlegende Verschiedenheiten aufgefunden worden, wie das Vorkommen einer Kohlenhydratgruppe in den einen¹⁾, die den andern fehlt, sodass wir uns auch bei diesen vor einer Verallgemeinerung unserer Ergebnisse hüten müssen.

Es sind also zur Lösung der uns vorgelegten Frage weitere Untersuchungen nothwendig, die sich auf die verschiedenartigsten Nucleine und Paranucleine erstrecken sollen. Die Schwierigkeiten, welche die unumgängliche Beschaffung grösserer Mengen Ausgangsmaterial bieten wird, werden hoffentlich keine unüberwindlichen sein. Es wird weiterhin geboten sein, sich über das Vorkommen des in der Hefezelle nachgewiesenen eigenthümlichen, zu den Metaphosphorsäuren gehörigen Complexes, auch in thierischen Zellen zu orientiren. Beides soll weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

¹⁾ Walter, Zur Kenntniss des Ichthulins und seiner Spaltungsprodukte, Diese Zeitschrift, Bd. XV, S. 447; siehe auch Hammarsten, Archiv f. d. ges. Physiologie, Bd. 36, S. 440.