

Über die Kohlenhydratgruppe in der Nucleinsäure.

Von

H. Steudel.

(Aus dem physiologischen Institut in Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 17. März 1908.)

Nachdem der stickstoffhaltige Teil der Nucleinsäure aufgelöst war,¹⁾ ließ sich erwarten, daß bei den nunmehr übersichtlich gewordenen Verhältnissen auch eine exakte Bestimmung der Kohlenhydratgruppe in der Nucleinsäure sich würde erreichen lassen.

Bei der früher fast ausschließlich angewandten Methode der Aufspaltung der Nucleinsäure mit siedender Schwefelsäure hatte man als Abkömmlinge des Kohlenhydratkomplexes Ameisensäure und Lävulinsäure aufgefunden.²⁾ Damit war wenigstens sichergestellt, daß ein Hexakohlenhydrat in der Nucleinsäure vorhanden war; etwas Näheres ließ sich aber nicht aussagen, besonders war es niemals geglückt, die Reduktionsfähigkeit des zugrunde liegenden Zuckers zu beweisen; in der Tat ließ sich weder an der Nucleinsäure selbst noch bei Benutzung der damals üblichen Spaltungsmethode an der Zersetzungsflüssigkeit, auch wenn man die störenden Nucleinbasen aus ihr herausschaffte, ein Reduktionsvermögen nachweisen. Ebensowenig Erfolg hatte ich bei Anwendung der Spaltung mit Salzsäure oder Jodwasserstoffsäure. Dadurch unterscheidet sich also die Kohlenhydratgruppe der Nucleinsäure von der entsprechenden Pentosegruppe der Guanylsäure und Inosinsäure. Während man bei den beiden letzten Körpern leicht zu reduzierenden Flüssigkeiten kommt, ist dies unter Einhaltung der gleichen Bedingungen bei der Nucleinsäure nicht möglich.

¹⁾ H. Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 14; Bd. XLIX, S. 406.

²⁾ A. Kossel und A. Neumann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XXVII, S. 2221.

Wollte man also bessere Kenntnisse über die Kohlenhydratgruppe sich erwerben, so mußte man andere Zersetzungsmethoden zu Hilfe nehmen. Von diesen erschien mir zuerst die enzymatische Spaltung der Nucleinsäure geeignet.

Wässrige Auszüge aus der Thymusdrüse, aus Pankreas und aus der Darmschleimhaut enthalten ein Ferment, das die Nucleinsäure unter Abspaltung von Phosphorsäure und Alloxurbasen zerstört. Ich bereitete mir also, nachdem ich schon früher¹⁾ die gänzliche Wirkungslosigkeit des käuflichen Trypsins (Grübler) und des aus der Pankreasdrüse nach Mays²⁾ dargestellten Trypsins auf Lösungen von nucleinsaurem Natron festgestellt hatte, nach Sachs' Vorschrift³⁾ einen Nuclease enthaltenden Auszug aus Thymus, indem ich 370 g rein präparierte Thymus durch die Fleischhackmaschine schickte, mit 750 ccm Wasser und einer genügenden Menge Seesand fein zerrieb und in einer gut verschlossenen Flasche unter Zusatz einer gehörigen Menge Toluol 12 Stunden stehen ließ. Am nächsten Tage wurde die Flüssigkeit zentrifugiert, die milchige Suspension noch einmal durch Gaze geseiht und auf 1000 ccm aufgefüllt. Sie reagierte schwach sauer auf Lackmus. Davon wurden 500 ccm ohne Zusatz in wohlverschlossener Flasche, und mit reichlich Toluol versehen in den Thermostaten gestellt: Lösung A, zur anderen Hälfte wurde eine Lösung von 50 g a-nucleinsaurem Natron (aus Thymusdrüsen gewonnen) gefügt und die Flasche, Lösung B, ebenfalls bei 38° gehalten. (Das verwendete nucleinsaure Natron war vollkommen rein, es gab keine Biuretreaktion mehr, gab auf Zusatz des gleichen Volumens 96%igen Alkohols keine Fällung, sondern erst nach Zufügen einiger Tropfen konzentrierter Natriumacetatlösung.) Es zeigte sich nun, daß das Gelatinierungsvermögen von B sehr bald unter der Einwirkung des Fermentes verschwand, und es wurde dann, um den Fortschritt der Spaltung zu kontrollieren, von Zeit zu Zeit in beiden Lösungen an filtrierten Proben mit Magnesia-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 341.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 428. Das Präparat verdanke ich Herrn Dr. Mays.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 337.

mixtur auf frei gewordene Phosphorsäure und mit ammoniakalischer Silberlösung auf abgespaltene Alloxurbasen geprüft. Beide Reagenzien gaben schon nach wenigen Tagen in B kräftige Fällungen, während in A nur spärliche Niederschläge entstanden. Untersuchte man nun aber B auf noch unzersetzte Nucleinsäure, so ließ sich auch nach lange fortgesetzter Digestion hier noch immer ein erheblicher Teil davon nachweisen. Nach Zusatz des gleichen Volumens Alkohol zu einer Probe von B blieb diese zunächst völlig klar, um nach dem Zufügen weniger Tropfen konzentrierter Natriumacetatlösung sofort einen Niederschlag fallen zu lassen, der durchaus den Eindruck von nucleinsaurem Natron macht. Es wurde deshalb, um die Zersetzung auch des Restes womöglich noch herbeizuführen, nach 60 Tagen noch einmal eine Fermentlösung hinzugefügt.

225 g Thymus wurden mit Seesand und 500 ccm Wasser fein verrieben, unter Toluolzusatz 12 Stunden stehen gelassen, dann zentrifugiert und auf 1000 ccm verdünnt, je 500 ccm kamen in die beiden Reaktionsflüssigkeiten.

Als dann nach weiterer 20 tägiger Digestion kein sichtbarer Fortschritt in der Spaltung mehr eintrat, wurde der Versuch abgebrochen. Die Überführung der Nucleinsäure in die nicht gelatinierende Form läßt sich mit Hilfe der Nuclease offenbar leicht bewerkstelligen, eine gänzliche Aufspaltung scheint aber nur schwer zu erreichen zu sein.

Die Digestionsflüssigkeiten waren während des Versuches regelmäßig auf ihre Reduktionsfähigkeit Fehlingscher Lösung gegenüber geprüft worden, und es zeigte sich bald in beiden Lösungen nach Entfernung der Alloxurbasen ein positiver Ausfall der Trommerschen Probe, der aber in der Lösung B bei weitem stärker war. Ich habe nun versucht, den reduzierenden Körper zu isolieren, bin aber bisher noch nicht damit zum Ziele gekommen.

Es wurden beide Lösungen, die schwach sauer reagierten, aufgeköcht, vom geringfügigen Niederschlag abfiltriert, dann mit Barytwasser ausgefällt, das nunmehrige Filtrat mit Schwefelsäure schwach angesäuert und mit Silbersulfat die Alloxurbasen entfernt. Dann wurde das Silber mit Schwefelwasserstoff fort-

geschafft und die genau mit Barythydrat neutralisierten wasserklaren Lösungen vorsichtig eingengt. Es sollten nun die Flüssigkeiten mit Fehlingscher Lösung titriert werden, dies ist mir aber bisher nicht möglich gewesen genau durchzuführen, da sich keine scharfe Endreaktion feststellen ließ, nur das eine ließ sich auch bei der Titration erkennen, daß das Reduktionsvermögen der Lösung, die die zersetzte Nucleinsäure enthielt, sehr viel größer war als das der Kontrollösung, daß also die Reduktion nicht alleine auf Substanzen beruht, die in der zugesetzten Fermentlösung vorhanden waren, sondern daß augenscheinlich aus der Nucleinsäure durch die Nuclease ein reduzierender Körper abgespalten worden war. Die Lösung dieses Körpers war rechtsdrehend, aber weder konnte sie bisher mit Hefe vergoren werden noch gelang es mit Phenylhydrazin zu einem faßbaren Derivate zu kommen.

Einen weiteren Aufschluß über die Natur des Kohlenhydrates im Molekül der Nucleinsäure hat mir die Spaltung der Nucleinsäure mit konzentrierter Salpetersäure gegeben. Auch hier gelangt man leicht zu Flüssigkeiten, die Fehlingsche Lösung reduzieren. Trennt man, entsprechend meinen früheren Angaben,¹⁾ z. B. aus freier Nucleinsäure die Alloxurbasen als Nitrate ab, so erhält man eine hellbernsteingelbe Flüssigkeit, die nach der Neutralisation kräftig reduziert. Es läßt sich nun leicht nachweisen, daß in diesem Falle noch der gesamte Phosphor an das Kohlenhydrat gebunden ist.

10 g freie Nucleinsäure wurden mit 10 ccm Wasser + 10 ccm konzentrierte HNO_3 (spez. Gew. 1,4) übergossen, nach mehrtägigem Stehen die Flüssigkeit von dem krystallinischen Bodensatz getrennt und auf 100 ccm aufgefüllt. In 10 ccm wurde die mit Magnesiamixtur fällbare Phosphorsäure bestimmt und in weiteren 10 ccm wurde die Gesamtphosphorsäuremenge nach dem Veraschen mit Soda und Salpeter festgestellt. In den ersten 10 ccm wurden $0,0326 \text{ g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0091 \text{ g P}$ erhalten, in den zweiten 10 ccm $0,3062 \text{ g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0852 \text{ P}$.

Es waren also in diesem Versuch die Alloxurbasen von dem Molekül der Nucleinsäure abgetrennt und in der Lösung

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVIII, S. 425.

war ein Körper zurückgeblieben, der noch fast die gesamte Phosphorsäuremenge in organischer Bindung enthielt. Dieser Körper reduziert nun kräftig Fehlingsche Lösung und dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts.

Eine quantitative Bestimmung durch Titration ist mir hier aber ebensowenig wie in dem Versuch mit Nuclease gelungen, desgleichen habe ich bisher mit Phenylhydrazin keine Verbindung bekommen.

Der negative Ausfall dieser Versuche ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß das Kohlenhydrat noch die Phosphorsäure in ihrem Molekül gebunden hält.

Von Gamgee und Jones¹⁾ ist mitgeteilt worden, daß die Nucleoproteide rechtsdrehend sind. Es würde nun die einfachste Erklärung dieser Rechtsdrehung sein, sie auf das Kohlenhydrat der Nucleinsäure zu beziehen und in diesem letzteren etwa Glukose zu vermuten. Hierfür fehlt freilich noch ein exakter Beweis, ja die Beobachtung, daß die Epizuckersäure²⁾ optisch inaktiv ist, würde dagegen sprechen, wenn man nicht annehmen wollte, daß die zuerst entstandene d-Zuckersäure durch die Manipulationen bei ihrer Isolierung racemisiert wäre.

Das eigenartige Verhalten der reduzierenden Gruppe müßte man wohl so erklären, daß sie ursprünglich im intakten Molekül der Nucleinsäure irgendwie mit den Alloxurbasen verbunden ist und daß sie nur unter ganz bestimmten Bedingungen bei der Abtrennung der Alloxurbasen als solche erhalten bleibt; dazu scheint eine einfache hydrolytische Spaltung wie die mit Schwefelsäure nicht geeignet zu sein; hier wird die reduzierende Gruppe sofort weiter verändert.

Die Untersuchungen werden von mir fortgesetzt.

¹⁾ Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol., Bd. IV, Heft 1/2.

²⁾ H. Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. L, S. 538.; Bd. LII, S. 62; Bd. LIII, S. 14.