

Über die Kohlenhydratgruppe in der Nucleinsäure.¹⁾

II. Mitteilung.

Von

H. Steudel.

(Aus dem physiologischen Institut in Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 16. Mai 1908.)

Bei meinen Untersuchungen über die Struktur der Nucleinsäure,²⁾ im besonderen der in ihr enthaltenen Kohlenhydratgruppe, war unter anderem auch die Frage zu entscheiden, ob eine Pentose im Molekül der Nucleinsäure vorhanden war. Ein Grund dafür, auch in den echten Nucleinsäuren nach einer Pentose zu suchen, war gegeben durch die Beobachtung Kossels,³⁾ der aus der Hefenucleinsäure ein Osazon vom ungefähren

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 407, I. Mitteilung.

²⁾ Bezüglich der Nomenklatur der Nucleinsäuren möchte ich vorschlagen, die nach dem Typus der Säure aus der Thymusdrüse aufgebauten Körper als «echte» Nucleinsäuren zu bezeichnen: als eine solche wäre dann also auch die Nucleinsäure aus dem Spermatozoon des Herings anzusehen. Diese Säure unterscheidet sich in nichts von der Nucleinsäure aus Thymus. Nun kommen zweifellos in allen Organen, resp. in den Zellkernen aller Organe, ähnliche Substanzen vor, sie sind bisher aber wenig eingehend, teilweise nur recht oberflächlich untersucht; wenn sich bei genauerer Untersuchung, was ich für sehr wahrscheinlich halte, herausstellt, daß sie auch echte Nucleinsäuren sind, so wäre es überflüssig, die Nucleinsäuren nach dem Organ, aus dem sie gewonnen sind, zu unterscheiden, ebenso wie wir die aus verschiedenen Organen gewonnenen Lecithine nicht besonders unterscheiden.

Den «echten» Nucleinsäuren, zu denen eventuell auch die Nucleinsäuren pflanzlicher Herkunft zu zählen wären, würden dann die nucleinsäureähnlichen Körper gegenüberstehen, von denen es zweifelhaft ist, ob sie überhaupt im Zellkern vorkommen — Guanylsäure, Inosinsäure. Auch diese Körper werden sicher im Organismus noch an vielen anderen Stellen vorkommen als dort, wo man sie bisher aufgefunden hat.

³⁾ Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 1893, S. 159/160.

Schmelzpunkte eines Pentosazons gewinnen konnte und ferner aus dem aus 20 g Hefenucleinsäure erhaltenen Zucker 0,04 g Furfuramid darstellen konnte. Ferner hatten Hammarsten¹⁾ und Bang²⁾ im Pankreasnucleoproteid, resp. in der daraus abgespaltenen Guanylsäure das Vorkommen einer Pentose beweisen können. Die Möglichkeit war also gegeben, daß sich nun auch in den echten Nucleinsäuren die Gegenwart einer Pentose würde nachweisen lassen, umso mehr als Neumann³⁾ angegeben hatte, daß die Nucleinsäure (aus Thymus) einen positiven Ausfall der Phloroglucin-Salzsäurereaktion zeigte. Die gleiche Reaktion gibt nach meinen Beobachtungen die Nucleinsäure aus Heringssperma.

Bedenken gegen die Annahme einer Pentose in der Nucleinsäure konnte allerdings die Angabe Grunds⁴⁾ erwecken, daß er bei der Bestimmung der Pentosenausbeute aus Organen nach Tollens aus dem Nucleohiston aus Thymus eine über Erwarten geringe Menge Furfurolphloroglucid erhalten hatte.

Ich hatte deswegen schon vor längerer Zeit mehrere Furfurolbestimmungen an der Nucleinsäure (sowohl aus Thymus wie aus Heringssperma) nach Tollens ausgeführt, die nur ganz minimale Mengen Furfurol lieferten.

Die Substanz, 2 resp. 5 g Nucleinsäure, wurde mit 100 ccm Salzsäure von 1,06 spezifischem Gewicht am absteigenden Kühler gekocht und jedesmal, nachdem 30 ccm abdestilliert waren, wurden durch einen Tropftrichter 30 ccm derselben Salzsäure nachgefüllt, bis 400 ccm überdestilliert waren. Das klare, farblose Destillat wurde mit einer Lösung von käuflichem Phloroglucin (Kahlbaum) in Salzsäure von 1,06 versetzt; es färbte sich dabei erst gelblich, dann allmählich dunkelgrün und hatte nach 24stündigem Stehen einen äußerst spärlichen dunkelgrünen, feinflockigen Niederschlag abgesetzt, der auf gewogenem Filter gesammelt, gewaschen und bei 105° getrocknet wurde. So wurden aber nur minimale Mengen Fur-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XIX, S. 19, 1894.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 133, 1898.

³⁾ Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 1898, S. 377.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXV, S. 111.

furoolphloroglucid erhalten, deren entsprechende Pentosenwerte noch nicht einmal aus der Kröberschen Tabelle¹⁾ abgelesen werden konnten, weil sie viel zu niedrig waren.

Ich bekam auf die beschriebene Weise, z. B. aus 2 g Nucleinsäure 0,0082 g, respektive aus 5 g Nucleinsäure 0,0100 g Phloroglucid. Diesen Mengen würden unter Zugrundelegung der Tollensschen Formel: $(\text{Phloroglucid} + 0,0052 \text{ g}) \times 0,920$ für Xylose 0,0123 resp. 0,0130 g Xylose entsprechen, in Prozenten also 0,62% resp. 0,26%.

Die Furfurolbestimmung, an und für sich rein konventionell, wird bei so kleinen Mengen Phloroglucid natürlich unscharf und es ist ganz willkürlich, die gefundene Menge Phloroglucid nun überhaupt auf Pentose umzurechnen, da auch Hexosen bei der Destillation mit Salzsäure kleine Mengen Furfurol liefern. Aber auch wenn man wirklich sämtliches gefundenes Furfurol auf Pentose beziehen wollte, so bliebe die gefundene Menge weit hinter der zurück, die verlangt wäre, wenn auch nur ein Molekül einer Pentose in der Nucleinsäure vorhanden sein sollte; hierfür berechnet sich nach der von mir²⁾ vorgeschlagenen Formel der Nucleinsäure $C_{43}H_{57}N_{15}O_{30}P_4$ 10,8% Pentose. (Gefunden: 0,62 resp. 0,26%).

Inzwischen hat nun auch Bang³⁾ zu dieser Frage Stellung genommen und behauptet, bei der Destillation der Thymusnucleinsäure nach Tollens entstände überhaupt kein Furfurol — eine Angabe, die ich nicht für richtig halten kann. Ferner haben v. Fürth⁴⁾ und Jerusalem die Bildung von Furfurol aus Nucleinsäuren verschiedener Herkunft untersucht und dabei wesentlich höhere Werte von Furfurol gefunden wie ich. Diese Differenz ist vielleicht dadurch zu erklären, daß sie mit sehr viel kleineren Mengen Substanz gearbeitet haben — die Fehler der Methode werden dann natürlich sehr viel grösser werden —, oder daß ihr Material, teilweise Handelsprodukte, nicht genügend rein gewesen ist. Jedenfalls kommen v. Fürth und Jerusalem

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, Anhang zu Tollens Aufsatz, S. 238.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 16.

³⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. IV, S. 341.

⁴⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. X, S. 179.

aber auch zu dem Schluß, daß in der echten Nucleinsäure keine Pentose enthalten ist.

Bei einem genaueren Vergleich zwischen der Phloroglucinsalzsäurereaktion z. B. der Arabinose und der Neumannschen¹⁾ Reaktion der Nucleinsäure stellt sich denn auch heraus, daß die von Neumann beobachtete Reaktion nicht mit der für die Pentosen charakteristischen identisch ist. Erstens muß es an und für sich Bedenken erwecken, daß nur Phloroglucin für das Zustandekommen der Reaktion geeignet ist — Orcin gibt die Reaktion nicht,²⁾ während sonst alle Pentosen auch positiven Ausfall der Orcinprobe zeigen. Zweitens ist mir aufgefallen, daß sich bei Pentosen der gebildete Farbstoff leicht, wie bekannt, mit Amylalkohol aufnehmen läßt, sodaß die wässrige Lösung vollkommen farblos wird; bei der Nucleinsäure ist das aber nicht der Fall, hier bleibt dauernd die wässrige Lösung rötlich gefärbt.

So sind wir gewiß berechtigt, den Gedanken an das Vorhandensein einer Pentose im Molekül der echten Nucleinsäure fallen zu lassen. Mit Rücksicht auf die Befunde Kossels muß man freilich an die Möglichkeit denken, daß der Nucleinsäure als solcher noch reduzierende Kohlenhydrate, Pentosen resp. Hexosen, anhaften können, die nach dem Neumannschen Verfahren der Darstellung der Nucleinsäure von ihr losgelöst werden, aber bei weniger eingreifenden Darstellungsmethoden (z. B. Altmann) als Begleiter der Nucleinsäure gefunden werden.

Diese letztere Kohlenhydratgruppe gehört aber natürlich nicht zum eigentlichen Molekül der Nucleinsäure und braucht bei der Untersuchung über die Struktur der Nucleinsäure selbst nicht berücksichtigt zu werden.

Die echte Nucleinsäure enthält also keine Pentose in ihrem Molekül, und es würde sich bei der Kohlenhydratgruppe nur noch um eine Hexose handeln können. Nun läßt sich leicht durch Rechnung feststellen, wieviel von einem Hexakohlenhydrat in der Nucleinsäure vorhanden sein muß.

¹⁾ Siehe auch Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch, 7. Aufl., 1903, S. 112.

²⁾ Bang (l. c.) beobachtet dasselbe.

Meine früheren Versuche¹⁾ hatten ergeben, daß nach Abzug der vier stickstoffhaltigen Komponenten (Guanin, Adenin, Thymin, Cytosin) und einer Tetrametaphosphorsäure noch ein Rest der Nucleinsäure übrig bleibt, der 4 Molekülen einer Hexose entspricht. Für die Formel $C_{43}H_{57}N_{15}O_{30}P_4$ würde das einen Gehalt von 51,9% Kohlenhydrat ergeben; ²⁾ also über die Hälfte des Gewichtes der Nucleinsäure besteht aus einem Kohlenhydrat. Es kam nun darauf an, experimentell eine Zahl zu finden, aus der sich ein Rückschluß auf die Menge des Kohlenhydrates machen ließ. Da sich durch Reduktion der Zucker nicht bestimmen ließ, habe ich eine ältere Angabe von Conrad und Guthzeit³⁾ benutzt, die die Bildung von Lävulinsäure aus verschiedenen Zuckern quantitativ verfolgt haben.

Es wurden, entsprechend den Angaben von Conrad und Guthzeit, 10 g Nucleinsäure (aus Heringssperma) mit 100 ccm 10%iger HCl 18 Stunden lang im siedenden Wasserbad gehalten und dann die Reaktionsflüssigkeit nach Zugabe von 10 ccm konzentrierter H_2SO_4 mit Äther bis zur Erschöpfung extrahiert. Das Ätherextrakt wurde nach dem Verjagen des Äthers in wenig Wasser gelöst, vom Thymin abfiltriert und im gewogenen Glasschälchen eingedampft; der Rückstand, der ja im wesentlichen aus Lävulinsäure besteht, betrug 2 g.⁴⁾

Nach Conrad und Guthzeit liefern 100 g Rohrzucker 34,81 g Lävulinsäure, es würde also 2 g Lävulinsäure 5,7 g Rohrzucker entsprechen, oder die Nucleinsäure würde einem Gehalt von 57% Kohlenhydrat, auf Rohrzucker bezogen, haben. Mit der theoretisch verlangten Zahl 51,9% ist also eine befriedigende Übereinstimmung vorhanden.

Das Bild, das wir uns von dem Aufbau der Nucleinsäure machen können, gewinnt mehr und mehr an Klarheit; durch die quantitative Bestimmung der Hexose ist nunmehr die letzte

¹⁾ H. Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 16.

²⁾ Siehe auch H. Steudel, Neuere Fortschritte auf dem Gebiete der chemischen Physiologie des Zellkerns, Münch. med. Wochenschrift, 1907.

³⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Bd. XIX, S. 2572.

⁴⁾ Die gleiche Zahl findet Neumann, Diese Zeitschrift, Bd. XXXVII, S. 148, berechnet aber merkwürdigerweise nur 25—30% Hexose.

Zahl gewonnen, die noch an der Aufteilung der Nucleinsäure fehlte. Zur besseren Übersicht stelle ich noch einmal die theoretisch verlangten Werte der Spaltungsprodukte mit den von mir experimentell gefundenen zusammen:

	Für $C_{43}H_{57}N_{15}O_{30}P_4$ berechnet:	Gefunden:
Guanin	10,88%	8,7% ¹⁾
Adenin	9,73%	10,5% ¹⁾
Thymin	9,08%	8,2% ¹⁾
Cytosin	9,15%	4,2% ¹⁾
Phosphorsäure (P_2O_5)	20,46%	20,31, 20,14% ¹⁾
Hexose	51,90%	57%
	<hr/> 111,20%	

Die experimentell gefundenen Zahlen stimmen natürlich mit den theoretisch verlangten nicht in der Schärfe überein, wie das bei anorganischen Metallanalysen der Fall ist. Wer aber jemals selbst solche quantitativen Bestimmungen hydrolytischer Spaltungsprodukte gemacht hat, der wird die großen Schwierigkeiten kennen, hier auch nur annähernd befriedigende Resultate zu erhalten. Dazu kommt, daß wir z. B. keine zuverlässige Methode haben, Guanin und Adenin quantitativ von einander zu trennen; es ist wohl möglich, jede Base allein für sich qualitativ absolut rein darzustellen, aber dabei hat man große Verluste. Ferner verändert die langdauernde Hydrolyse mit siedender Schwefelsäure einen Teil des Cytosins durch Desamidierung in Uracil, sodaß es nicht wundernehmen darf, wenn der experimentell gefundene Wert erheblich hinter dem verlangten zurückbleibt.

Trotz all dieser Schwierigkeiten, die erst in einer langen Reihe erfolglos verlaufener quantitativer Spaltungen überwunden werden mußten, zeigt eine Vergleichung der Zahlen für die Mengen der theoretisch geforderten und der experimentell gefundenen Spaltungsprodukte eine solche Übereinstimmung, daß man wohl den Schluß ziehen darf, die Nucleinsäure sei nunmehr aufgeteilt.

Man hat heute gewiß das Recht, sie als einen bekannten Körper zu bezeichnen; es bleibt nur noch die Aufgabe, die

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIX, S. 408/409.

Hexose, die rechtsdrehend ist und deren Reduktionsvermögen sich unter gewissen Umständen nachweisen¹⁾ läßt, näher zu klassifizieren. Vielleicht liegen die Verhältnisse ähnlich wie beim Glukosamin; auch hier haben lange Zweifel geherrscht über die Natur des dem Körper zugrunde liegenden Zuckers und die Glukose läßt sich selbst heute noch nicht durch einfache Desamidierung des Glukosamins als solche nachweisen.

Anmerkung bei der Korrektur.

Seit einer Reihe von Jahren bemüht sich Herr P. A. Levene²⁾ in zahlreichen Veröffentlichungen an der Erforschung der Nucleinsäure Anteil zu nehmen. In enger Anlehnung an Arbeiten, die meist einige Monate vorher in Deutschland erschienen sind, haben er und seine Mitarbeiter getreulich alle Wandlungen mitgemacht, die die Forschung über die Nucleinsäure durchgemacht hat. So hat Levene zuerst versucht, wie Schmiedeberg die elementare Zusammensetzung der Nucleinsäure zu ermitteln, dann hat er im wesentlichen nach dem Neumannschen Verfahren, das er nicht zu seinem Vorteil abgeändert hat, alle möglichen Organe auf Nucleinsäure untersucht. Als ferner von Kossel und mir das Cytosin neu formuliert und untersucht war, hat er ebenfalls eine Reihe von Arbeiten über das Cytosin veröffentlicht und endlich hat er sich mir angeschlossen und meine Untersuchungen über die quantitative Verteilung der stickstoffhaltigen Komponenten der Nucleinsäure wiederholt.

Bei der wenig genauen Art und Weise, wie Levene publiziert, ist eine Nachprüfung seiner Resultate ganz ausgeschlossen; sie würde auch gar keinen Zweck haben, weil er niemals irgend etwas Neues entdeckt hat, sondern sich immer an die Resultate meiner zuletzt veröffentlichten Arbeiten gehalten hat.

Als von mir³⁾ die Frage über die Herkunft der Pyrimidinkörper bei der hydrolytischen Spaltung der Nucleinsäure entgegen den Versuchen Burians⁴⁾ aufgeklärt war, hat auch Levene in einem Aufsatz⁵⁾ über

¹⁾ H. Steudel, Diese Zeitschrift, Bd. LV, S. 407.

²⁾ Darstellung und Analyse einiger Nucleinsäuren. I. Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 541; II. Bd. XXXVII, S. 402; III. Bd. XXXVIII, S. 80; IV. Bd. XXXIX, S. 4; V. Bd. XXXIX, S. 133; VI. Bd. XXXIX, S. 479; VII. Bd. XLIII, S. 199; VIII. Bd. XLV, S. 370; IX. Bd. XLVI, S. 155; X. Bd. XLVII, S. 140; XI. Bd. XLIX, S. 262; XII. Bd. L, S. 1; XIII. Biochem. Zeitschrift, Bd. X, S. 215.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 508.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LI, S. 438.

⁵⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. IX, S. 233.

die Herkunft des Cytosins bei der Spaltung der Nucleinsäure mit Schwefelsäure seine frühere Ansicht ¹⁾ schnell geändert; nachdem die wirkliche Existenz einer Guanylsäure ²⁾ nach Bang im Gegensatz zu den Behauptungen v. Fürths ³⁾ von mir nachgewiesen war, haben P. A. Levene ⁴⁾ sowohl wie W. Jones ⁵⁾ sofort eine Guanylsäure aufgefunden; nachdem jetzt die Verteilung der Komponenten der Nucleinsäure von mir festgestellt ist, kommt Levene ⁶⁾ ebenfalls zu denselben Zahlen.

So behandelt er fortwährend Probleme, die gerade vorher gelöst sind, und das in einer Weise, daß er bei Lesern, die nicht über die Fragen genau orientiert sind, den Eindruck einer Originalität erweckt, die er in Wirklichkeit garnicht besitzt.

Er wird gewiß auch in Zukunft so weiterarbeiten und ich werde mich nicht wundern, wenn er auch fernerhin meine Methoden und Resultate abfällig kritisiert, um sich dann doch meiner Arbeitsmethoden ⁷⁾ zu bedienen, freilich ohne dabei meinen Namen zu nennen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. L, S. 9.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIII, S. 539.

³⁾ Beiträge zur chem. Physiol., Bd. X, S. 174.

⁴⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. X, S. 221.

⁵⁾ Americ. Journ. of biolog. Chemistry, Bd. IV, S. 289.

⁶⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. X, S. 219.

⁷⁾ Die Spaltung der Nucleinsäure mit Essigsäure, deren sich L. jetzt bedient, wurde schon von mir gelegentlich eines Referates im biochemischen Zentralblatt (Bd. VI, S. 5 des Referates «Nucleine, Nucleinsäuren und ihre Spaltungsprodukte») im Prinzip veröffentlicht.
