

Über den Bau der Nucleinsäure aus der Thymusdrüse.

Von

H. Steudel.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität in Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. März 1912.)

Stellt man sich nach der Methode von Neumann nucleinsaures Natron aus Thymusdrüsen her, so erhält man als Endprodukt, vorausgesetzt, daß man sorgfältig mit absolutem Alkohol und Äther trocknet, ein feines, weißes, staubendes, nicht hygroskopisches Pulver. Das Präparat, das anscheinend vollkommen trocken ist, enthält nichtsdestoweniger noch Wasser: beim Trocknen in der Wärme nimmt es dauernd an Gewicht ab. Es ist aber unmöglich, den Endpunkt der Wasserabgabe zu bestimmen, denn hat man nach wochenlangem Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure bei einer bestimmten Temperatur Gewichtskonstanz erreicht, so tritt ein neuer Gewichtsverlust ein, wenn man die Temperatur um einige Grade steigert. Dies wiederholt sich so lange, bis eine eintretende Bräunung die beginnende Zersetzung des Körpers anzeigt.

Einer analytischen Bestimmung der elementaren Zusammensetzung der echten Nucleinsäure stellen diese Verhältnisse natürlich große Hindernisse in den Weg, und es ist zu verstehen, daß bisher außer den Analysen von Miescher und Schmiedeberg nur wenig brauchbare Elementaranalysen der Nucleinsäure existieren. Speziell von dem nach Neumann gewonnenen a-nucleinsaurem Natron sind überhaupt keine vollständigen Elementaranalysen vorhanden.

Ich habe nun die oben angedeuteten Schwierigkeiten bei der Trocknung dadurch zu umgehen versucht, daß ich von jeder Trocknung des Präparates in der Wärme Abstand nahm und die lufttrockene Substanz so analysierte, wie man sie nach der Trocknung mit Alkohol und Äther erhält.

Es wurden Thymusdrüsen nach Neumann in bekannter

Weise auf α -nucleinsaures Natron verarbeitet und das erhaltene Präparat zweimal aus Wasser unter Zusatz von wenig Natriumacetat umgefällt und mit absolutem Alkohol und Äther getrocknet. Dann resultierte ein weißes, staubendes Pulver, das keine Spur von Biuretreaktion mehr gab. In dieser lufttrockenen Substanz wurde der Stickstoff nach Kjeldahl und der Phosphor nach Neumann bestimmt. Das Natrium wurde bestimmt, indem die Substanz mit dem Neumannschen Säuregemisch in einer Platinschale verascht wurde; dann wurde die überschüssige Schwefelsäure und Salpetersäure abgeraucht, mit wenig heißem Wasser aufgenommen und durch einen kleinen Überschuß von alkalifreiem Baryt die Schwefelsäure und Phosphorsäure entfernt. Nach der Filtration vom schwefelsauren und phosphorsauren Baryt wurde im Filtrat der überschüssige Baryt mit Kohlensäure ausgefällt, filtriert, zur Trockne verdampft, mit heißem Wasser aufgenommen, wieder filtriert und noch einmal zur Trockne verdampft. Dann wurde wieder in heißem Wasser gelöst, filtriert, mit Salzsäure angesäuert, eingetrocknet, noch einmal mit heißem Wasser aufgenommen, von wenig ausgeschiedener Kieselsäure abfiltriert, nun im gewogenen Platinschälchen eingedampft und bis zur Gewichtskonstanz schwach geglüht.

Für die Kohlenstoff-Wasserstoffbestimmungen wurde die Substanz im Schiffchen mit Kaliumbichromat vermischt.

Es wurden folgende Werte erhalten:

0,1265 g sättigen 11,0 ccm n_{10} -Säure = 12,18% N (Kjeldahl).

0,1606 » » 14,1 » » = 12,30% N »

0,1200 » » 10,2 » » = 11,91% N »

0,1642 g sättigen 22,5 ccm $n_{1/2}$ -Lauge = 7,59% P (Neumann).

0,1450 » » 19,2 » » = 7,32% P

0,5132 g liefern 0,0701 g NaCl = 5,38% Na.

0,4713 » » 0,0689 g NaCl = 5,76% Na.

0,1936 g liefern 0,2143 g CO_2 und 0,0793 g H_2O = 30,19% C
und 4,58% H.

0,1553 g liefern 0,1706 g CO_2 und 0,0677 g H_2O = 29,96% C
und 4,88% H.

Ein zweites Präparat von nucleinsaurem Natron, das in gleicher Weise wie das erste Präparat hergestellt war und das ich Herrn Dr. Brossa verdanke, gab, nachdem ich es noch einmal umgefällt hatte, da es noch schwache Biuretreaktion gab, folgende Zahlen:

0,1381 g sättigen 12,2 ccm n_{10} -Säure = 12,38% N (Kjeldahl).

0,1304 » » 12,4 » » = 12,14% N »

0,1420 g sättigen 19,7 ccm n_{12} -Lauge = 7,68% P (Neumann).

0,1470 » » 20,3 » » = 7,65% P »

0,3355 g liefern 0,0472 g NaCl = 5,54% Na.

0,3894 » » 0,0557 » NaCl = 5,64% Na.

0,2139 g liefern 0,2375 g CO_2 und 0,0882 g H_2O = 30,28% C
und 4,61% H.

Erstes Präparat:

% C = 30,19 29,96

% H = 4,58 4,88

% N = 12,18 12,30 11,91

% P = 7,59 7,32

% Na = 5,38 5,76

Zweites Präparat:

30,28

4,61

12,38 12,14

7,68 7,65

5,54 5,64

Die Zahlen der beiden unabhängig von einander hergestellten Präparate zeigen eine so vollkommene Übereinstimmung, daß ich sie nicht für einen Zufall halte. Die Substanzen waren ursprünglich garnicht zum Zweck einer Elementaranalyse gewonnen, ich hatte anfangs nur Phosphor- und Stickstoffbestimmungen in meinem Präparat mit Rücksicht auf eine andere Untersuchung ausgeführt. Erst als ich hier das für die von mir vorgeschlagene Nucleinsäureformel $\text{C}_{43}\text{H}_{57}\text{N}_{15}\text{O}_{30}\text{P}_4$ verlangte Verhältnis von Phosphor zu Stickstoff vollkommen der Theorie entsprechend fand, entschloß ich mich dazu, auch die anderen Elemente quantitativ zu bestimmen. Die Untersuchung des zweiten, nicht von mir, sondern von Herrn Dr. Brossa hergestellten Präparates von nucleinsaurem Natron lieferte dann genau die gleichen Zahlen.

Man muß demnach annehmen, daß die mit Alkohol und Äther sorgfältig getrocknete Substanz eine konstante Menge Wasser zurückhält, dem Krystallwasser der krystallisierten

Körper entsprechend. Beim Trocknen in höherer Temperatur wird dieses «Konstitutionswasser» allmählich abgegeben, die letzten Anteile aber erst bei schon beginnender Zersetzung der Substanz. Diese letzten Mengen Wasser würden dem Wasser entsprechen, das Schmiedeberg¹⁾ als «zementartig» gebunden ansieht.

Versucht man nun die experimentell gefundenen Zahlen zu meiner Nucleinsäureformel in Beziehung zu setzen, so findet man, daß man zu dem Molekül der Nucleinsäure noch 11 Moleküle Konstitutionswasser hinzufügen muß, um eine annähernde Übereinstimmung zu erhalten:

Berechnet für	Gefunden:
$C_{43}H_{53}Na_4N_{15}O_{30}P_4 + 11H_2O$:	
% C = 30,82	30,19; 29,96; 30,28
% H = 4,48	4,58; 4,88; 4,61
% Na = 5,51	5,38; 5,76; 5,54; 5,64
% N = 12,58	12,18; 12,30; 12,38; 12,14; 11,91
% P = 7,41	7,59; 7,32; 7,68; 7,65

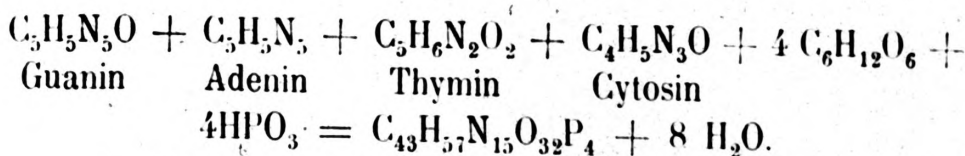
Im Durchschnitt gefunden:

30,14
4,69
5,58
12,18
7,56

Es ist auffallend, daß der Kohlenstoffwert um ein Beträchtliches hinter dem verlangten Wert zurückbleibt. Eine Erklärung hierfür läßt sich geben, wenn man sich erinnert, daß die Formel $C_{43}H_{57}N_{15}O_{30}P_4$ im Jahre 1907²⁾ von mir gewählt war, um die bisher in der Literatur vorhandenen Elementaranalysenzahlen mit den Ergebnissen meiner quantitativen Spaltungsversuche in Einklang zu bringen. Die Formel enthielt deswegen zwei Sauerstoffatome weniger, wie die einfache Aufrechnung der Spaltungsprodukte nach Abzug des Kondensationswassers verlangte.

¹⁾ Arch. f. exp. Path. u. Ther., Bd. 37. S. 100.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 53. S. 14.



Da ich damals nicht über eigene Elementaranalysenzahlen verfügte, habe ich meine Formel um die beiden Sauerstoffatome gekürzt, ohne eine nähere Erklärung dafür zu geben. Rechnet man sich heute die für die Formel $\text{C}_{43}\text{H}_{57}\text{N}_{15}\text{O}_{32}\text{P}_4 + 11\text{H}_2\text{O}$ verlangten Prozentzahlen aus, so fällt die oben konstatierte Differenz im Kohlenstoffgehalt der alten Formel fort und man erhält durchweg gute Übereinstimmung.

Berechnet für	Gefunden	Differenz zwischen berechnetem und gefundenem Wert:
$\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{N}_4\text{N}_{15}\text{O}_{32}\text{P}_4 + 11\text{H}_2\text{O}$:	im Mittel:	
% C = 30,25	30,14	÷ 0,11
% H = 4,40	4,69	+ 0,29
% Na = 5,40	5,58	+ 0,18
% N = 12,35	12,18	÷ 0,17
% P = 7,27	7,56	+ 0,29

Es wären also auf diese Weise die Resultate der quantitativen Spaltung und der Elementaranalysen in Einklang gebracht und es fragt sich, warum die früheren Untersucher Werte erhalten haben, die wesentlich höher liegen wie die aus der jetzt bewiesenen Formel berechneten. Z. B. sind von Miescher, resp. Schmiedeberg¹⁾ gefunden:

% C = 37,32	37,82	Dagegen sind nach der	% C = 36,34
% H = 4,21	4,46	wasserfreien Formel	% H = 4,05
% N = 15,24	15,77	$\text{C}_{43}\text{H}_{57}\text{N}_{15}\text{P}_4\text{O}_{32}$	% N = 14,82
% P = 9,62	9,17	verlangt:	% P = 8,74

Als Erklärung dafür läßt sich nach unseren neu erworbenen Kenntnissen anführen, daß die Präparate wahrscheinlich übertrocknet gewesen sind.

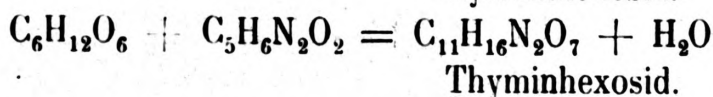
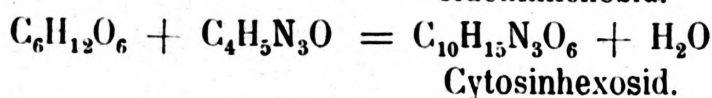
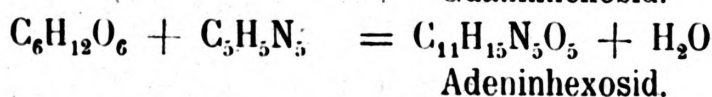
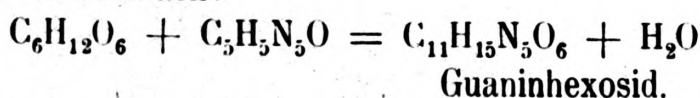
Als Beweis für diese Behauptung können auch folgende Überlegungen dienen:

Nach den übereinstimmenden Beobachtungen aller Untersucher der Thymusnucleinsäure, die auch durch meine jetzigen

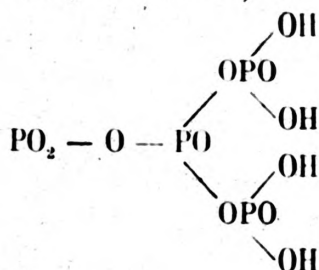
¹⁾ Miescher, Arbeiten, Bd. 2. S. 376.

Analysen wieder bestätigt werden, ist die Nucleinsäure eine vierbasische Säure. Ferner ist von mir festgestellt, daß die Alloxurbasen mit den Hexosen unter Besetzung der reduzierenden Gruppe derselben verknüpft sind. Denn nach vorsichtiger Abspaltung der Purinbasen mit Salpetersäure resp. Salzsäure gelangt man zu reduzierenden Körpern.¹⁾ Solche Substanzen, die Alloxurbasen und Kohlenhydrat glukosidartig verbunden enthalten, sind dann in der Tat von Haiser und Wenzel²⁾ aus dem Fleischextrakt, resp. der Inosinsäure (Inosin) und von Levene und Jacobs³⁾ aus der Guanylsäure und der Hefenucleinsäure gewonnen worden. Zweifellos ist also auch in der echten Nucleinsäure die Hexose mit den N-haltigen Körpern glukosidartig verbunden.

Es ist demnach:



Diese vier Glukoside bilden jetzt mit einer kondensierten Phosphorsäure Ester und zwar so, daß eine vierbasische Säure entsteht. Um dies darzustellen, reicht nun allerdings nicht das Bild einer Tetrametaphosphorsäure aus, von der folgende Konstitution angenommen⁴⁾ wird:



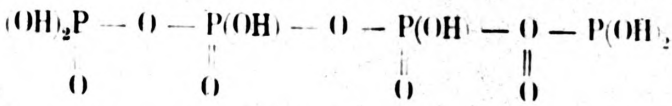
¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 55, S. 407.

²⁾ Monatsh. f. Chem., Bd. 30, S. 147.

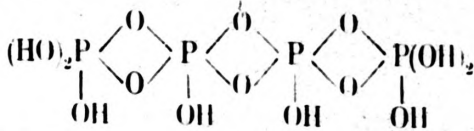
³⁾ Berichte, Bd. 42, S. 335, 1198; Bd. 43, S. 3150, 3164.

⁴⁾ Lüdert, Z. f. anorg. Chem., Bd. 5, S. 21.

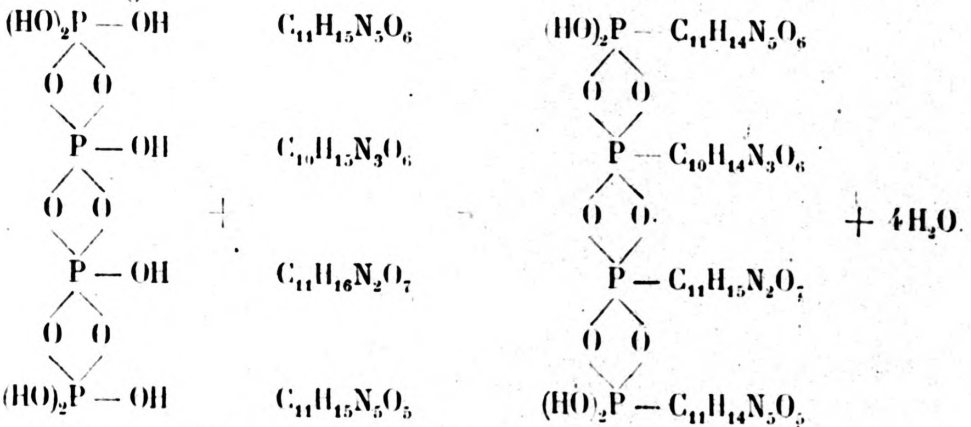
Vielmehr wird man auf die Anschauungen Fleitmanns¹⁾ zurückgreifen und eine seiner Tetraphosphorsäure $H_6P_4O_{13}$:



ähnliche Säure der Nucleinsäure zugrunde legen müssen. Die Tetraphosphorsäure selbst kann deswegen nicht in Frage kommen, weil aus ihr bei einer esterartigen Substitution durch 4 Glukoside eine zweibasische und keine vierbasische Säure hervorgehen würde. Zu einem vierbasischen Phosphorsäureester gelangt man aber mit Leichtigkeit, wenn man der Nucleinsäure folgendes Phosphorsäureskelett zugrunde legt:



Dann ergibt sich der Aufbau der Nucleinsäure folgendermaßen: ²⁾



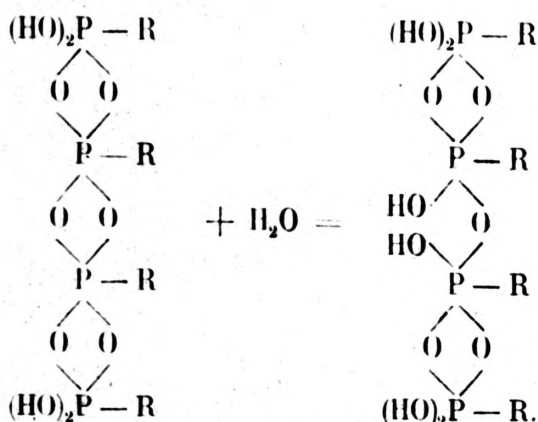
Die Aufrechnung der Elemente für die eben entwickelte Formel ergibt: $C_{43}H_{61}N_{15}P_4O_{34}$, sie unterscheidet sich also von der anfangs von mir entwickelten um den Mehrgehalt von $2 H_2O$. Das hat natürlich seinen Grund darin, daß das Phosphorsäureskelett zwei Moleküle Wasser mehr verlangt wie eine Tetrametaphosphorsäure.

Auf meine anfangs mitgeteilten Analysenzahlen ist dies

¹⁾ Liebigs Annalen, Bd. 65, S. 322. Schwarz, Zeitschr. f. anorg. Chem., Bd. 9, S. 251.

²⁾ Die Reihenfolge der Hexoside, die ja wahrscheinlich Glukoside sind, ist willkürlich angenommen.

neue Resultat natürlich ohne Einfluß, es ist jetzt nur für $C_{43}H_{57}N_{15}P_4O_{30} + 11 H_2O$ zu schreiben $C_{43}H_{61}N_{15}P_4O_{34} + 9H_2O$. Es zeigt sich aber, wie vorsichtig man beim Trocknen der Nucleinsäure zu Werke gehen muß, und für das eigenartige Verhalten des «zementartig» gebundenen Wassers Schmiedebergs wäre eine plausible Erklärung gefunden: es ist ein Teil des zum Molekül der Nucleinsäure gehörenden Wassers, das in der Wärme im Vakuum unter Anhydridbildung¹⁾ vertrieben wird. Aus der Verbindung der Phosphoratome durch Brückensauerstoff läßt sich ableiten, daß ein Teil der Bindungen unter Wasseraufnahme leicht aufgespalten wird und so zur Bildung sogenannter basischer Salze, die ja mehrfach beobachtet sind, Anlaß gibt, z. B.:



Ich habe mich selbstverständlich bemüht, weitere Beweise für die hier entwickelten Anschauungen beizubringen, und habe zunächst versucht, der Glukoside habhaft zu werden.

Spaltet man nach den Angaben Levenes und Jacobs nucleinsaures Natron aus Hefe, so erhält man,²⁾ den Angaben der Autoren entsprechend, das Guanodin, das mit dem von Schulze im Jahre 1885³⁾ aufgefundenen Vernin identisch ist.

¹⁾ Schmiedeberg (Arch. f. exp. Path., Bd. 43, S. 64) hat schon eine ähnliche Vermutung ausgesprochen.

²⁾ Aus der Guanylsäure war es mir in Gemeinschaft mit P. Brigl, (Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 40), nicht gelungen, Guanodin, resp. Vernin krystallisiert zu erhalten. Schulze und Trier geben (Diese Zeitschrift, Bd. 70, S. 145) dasselbe für die Hefenucleinsäure an.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 9, S. 420; Bd. 10, S. 80; Bd. 66, S. 128; Bd. 70, S. 143.

50 g nucleinsaures Natron aus Hefe werden in 250 ccm Wasser auf dem Wasserbade gelöst und im Drucktopf 3¹/₂ Stunden bei 160° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde von der ausgeschiedenen Kohle usw. abfiltriert, der Rückstand noch zweimal mit Wasser ausgekocht und die Extrakte mit der Hauptflüssigkeit vereint. Diese wurde jetzt mit Baryt ausgefällt, vom Niederschlag getrennt und mit Essigsäure angesäuert. Dann wurde die saure Lösung mit Bleiessig ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert, gründlich gewaschen und das Filtrat solange mit Ammoniak und Bleiessig versetzt, bis kein Niederschlag auf Zugabe eines dieser Reagenzien entstand. Dieser zweite Bleiniederschlag wurde von der Flüssigkeit getrennt und gewaschen und beide Bleiniederschläge mit Schwefelwasserstoff in der Kälte zersetzt. Nach Zugabe von Baryumcarbonat wurde erwärmt und heiß vom Schwefelblei abfiltriert. Aus den Filtraten beider Fraktionen schieden sich beim Einengen reichlich Krystalle ab. Die Körper zeigten dabei das von Levene beschriebene Verhalten, daß sie zunächst gelatinös sich abschieden, um dann rasch sich in Krystalle umzuwandeln. Auch nach dem Umkrystallisieren aus heißem Wasser schied sich zunächst eine farblose Gallerte aus, die manchmal aber schon im Trichterrohr in dünnen Nadeln krystallisierte.

Die Substanz enthielt 2 Moleküle Krystallwasser und schmolz resp. zersetzte sich ziemlich scharf bei raschem Erhitzen bei 238° (unkorrigiert). (Schulze gibt 240°, Levene 237° an).

0,1561 g verlieren bei 110° 0,0177 g = 11,35% Ber.: 11,29%.

0,1384 (bei 110° getrocknet) sättigen 24,4 ccm n_{10} -Säure = 24,70% N (Kjeldahl). Berechnet 24,75% N.

An der Identität der Substanz, die mit Phloroglucin und Salzsäure Pentosenreaktion gab, mit Vernin konnte also kein Zweifel sein.

Spaltet man nun aber in gleicher Weise wie das nucleinsaure Natron aus Hefe das nucleinsaure Natron aus der Thymusdrüse, so kommt man nicht zu ähnlichen Körpern. Ich habe die Versuche in der verschiedensten Weise modifiziert, ohne jedoch ein anderes Resultat zu bekommen.

Es trat sofort eine Abspaltung von Purinbasen ein, wenn überhaupt eine Aufspaltung des Moleküls der Nucleinsäure erfolgte: operierte man aber mit so milden Eingriffen, daß keine Alloxurbasen abgespalten wurden, so befand sich auch noch sämtliche Phosphorsäure in organischer Bindung.

Als einziges Beispiel von vielen Versuchen sei folgender Versuch angeführt:

50 g lufttrockenes nucleinsaures Natron aus Thymus (die analytischen Resultate siehe oben) wird in 500 ccm Wasser im Wasserbade gelöst und dann 3 Stunden auf 135° im Drucktopf erhitzt. Nach dem Abkühlen erscheint in der kaffeebraunen Lösung ein weißlicher Niederschlag, der abzentrifugiert und mit Alkohol und Äther getrocknet wird. Er wiegt 3,5 g und enthält 32,68% N: er ist leicht in Natronlauge löslich und fällt mit Essigsäure amorph und vollständig wieder aus. Er gibt positive Murexidprobe starke Diazoreaktion und in viel Ammoniak gelöst, mit ammoniakalischer Silberlösung einen starken Niederschlag — ist also größtenteils Guanin. Aus dem Stickstoffgehalt des Niederschlages berechnen sich 2,45 g Guanin.

0,1417 g sättigen 32,3 ccm n_{10} -Säure = 32,68% N (Kjeldahl).

Die vom Guanin abgetrennte Zersetzungsflüssigkeit wird auf 1 l aufgefüllt und zweimal 5 ccm für eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, sowie zweimal 5 ccm für eine Gesamtphosphorbestimmung nach Neumann benutzt. Ferner werden in 10 und in 5 ccm Bestimmungen der anorganischen Phosphorsäure durch Fällung mit Magnesiamixtur vorgenommen.

5 ccm sättigen 18,1 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl) = 5,068 g N in 1000 ccm.

5 ccm sättigen 18,3 ccm n_{10} -Säure (Kjeldahl) = 5,124 g N in 1000 ccm.

5 ccm sättigen 32,5 ccm $n_{1/2}$ -Lauge (Neumann) = 3,601 g P in 1000 ccm.

5 ccm sättigen 33,6 ccm $n_{1/2}$ -Lauge (Neumann) = 3,723 g P in 1000 ccm.

10 ccm liefern 0,0782 g $Mg_2P_2O_7$ = 2,18 g anorganischen P in 1000 ccm.

5 ccm liefern $0,0378 \text{ g Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 2,10 \text{ g}$ anorganischen P in 1000 ccm.

Die weitere Verarbeitung der Reaktionsflüssigkeit ist hier nicht von Interesse, es ist nur wichtig, noch zu erwähnen, daß mit ammoniakalischer Silberlösung in ihr kein Niederschlag mehr erhalten werden konnte.

In diesem Versuch ist mit der Phosphorsäure eine ihr fast entsprechende Menge Guanin abgespalten worden.

1. Als anorganischer Phosphor sind $58,74\%$ abgespalten.
2. 50 g nucleinsaures Natron, die auf wasserfreie Substanz berechnet $43,5 \text{ g}$ Substanz entsprechen und $4,45 \text{ g}$ Guanin enthalten, haben $2,45 \text{ g} = 55,8\%$ geliefert.

Dieses verschiedene Verhalten des thymonucleinsauren Natrons von dem nucleinsauren Natron aus Hefe unter den gleichen Bedingungen ist jedenfalls auffallend; es scheint also doch in der Thymonucleinsäure die Hexose mit den Alloxur-basen sehr viel lockerer verbunden zu sein, wie in der Hefenucleinsäure die Pentose mit den Purinkörpern. Hiermit stimmt die Beobachtung von Frau Kowalevsky¹⁾ überein, die gefunden hat, daß sich aus der Hefenucleinsäure die Alloxur-basen sehr viel schwerer durch kalte Salpetersäure abtrennen lassen, wie aus der Thymusnucleinsäure.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Gräfin-Bose-Stiftung ausgeführt.

¹⁾ Diese Zeitschrift. Bd. 69, S. 248.