

Über das Nucleoproteid nach Hammarsten aus Rinderpankreas.

I. Mitteilung.

Von

Martin Knopf.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität in Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 10. Dezember 1913.)

Das Studium des feineren Baues der unter dem Sammelnamen Nucleoproteide zusammengefaßten Stoffe ist erst möglich geworden, seitdem die eine Komponente dieser Körper — die Nucleinsäure — wenigstens in ihren Hauptvertretern zu einer chemisch genau definierbaren Substanz geworden ist. So hat sich z. B. bezüglich des wasser-, alkohol- und ätherunlöslichen Anteils des Kopfes von Heringsspermien ergeben,¹⁾ daß er, wie schon Miescher meinte, aus einem neutralen Salz der echten Nucleinsäure mit Protamin besteht, und zwar zu 74% aus Nucleinsäure und zu 26% aus Protamin. Durch Zusammenbringen von nucleinsaurem Natron und Protaminsulfat kann man in der Tat künstlich einen Körper gewinnen, der dasselbe Verhältnis von Phosphor zu Stickstoff hat, wie das natürliche Produkt.²⁾

In gleicher Weise wie aus dem nucleinsauren Protamin der Fischspermien läßt sich an einem anderen Nucleoproteid, dem Nucleohiston aus der Thymusdrüse, nachweisen,³⁾ daß auch hier sämtlicher Phosphor in Form von echter Nucleinsäure vorkommt.

Ich habe nun das Nucleoproteid aus der Pankreasdrüse, das man nach den Angaben Hammarstens gewinnen kann,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 305; Bd. 73, S. 471; Bd. 83, S. 172.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 72.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 87, S. 207.

in den Kreis der Untersuchungen gezogen. Hier waren die Verhältnisse insofern interessant, als von Bang als Bestandteil dieses Nucleoproteids eine einfache Nucleinsäure, die Guanylsäure, aufgefunden worden war. Dieser Befund ließ den Gedanken aufkommen, als sei nun auch dieses Protein sehr einfach zusammengesetzt. Hammarsten¹⁾ gibt dieser Ansicht in folgenden Worten Ausdruck: «Es wäre auch möglich, daß die einfachen Nucleinsäuren durch Spaltung aus mehr zusammengesetzten hervorgegangen wären. Für die Guanylsäure trifft jedoch eine solche Annahme nicht zu, denn ihr Mutterprotein enthält nur eine Base, das Guanin.»

Einer solchen Ansicht stehen aber mehrere Bedenken gegenüber. Erstens sind von amerikanischen Forschern (Levene und Stookey,²⁾ Jones und Whipple)³⁾ als Spaltungsprodukte eines Proteins aus Pankreas außer Guanin andere Spaltstücke der echten Nucleinsäure aufgefunden worden und selbst wenn man annehmen wollte, daß diese Körper einer etwaigen Verunreinigung des Hammarstenschen Proteins mit einem oder mehreren anderen ähnlichen Körpern ihre Entstehung verdanken, so bliebe noch folgendes Bedenken:

Der Phosphorgehalt des nach Hammarsten gewonnenen Körpers ist nach den übereinstimmenden Angaben von Hammarsten,⁴⁾ Steudel⁵⁾ und Brigl⁶⁾ ein konstanter Wert — ca. 4,5% P bei lufttrockener Substanz. Da nun die Guanylsäure 8,5% P enthält, so müßte — die Abwesenheit von anorganischen Phosphaten und organischen Phosphorverbindungen, die nicht zu den Nucleinsäuren gehören, vorausgesetzt — das Protein fast zu 50% aus Guanylsäure bestehen, wenn sie die einzige P-haltige Komponente des Proteins wäre. In Wirklichkeit erhält man aber nach der üblichen Darstellungsmethode nur ca. 12 g Guanylsäure aus 100 g Nucleoprotein. Hier mußte also entweder ein

¹⁾ Lehrbuch der physiologischen Chemie, 7. Auflage, Wiesbaden 1910, S. 173.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 41, S. 404.

³⁾ Am. Journ. of physiol., Bd. 7, S. 423.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 19, S. 19.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 53, S. 539.

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 40.

großer Verlust an Guanylsäure bei der Darstellung stattfinden oder es mußte im Filtrat von der Guanylsäurefällung noch eine leichter lösliche Nucleinsäure vorhanden sein.

Eine Antwort auf diese Fragen war durch eine quantitative Guaninbestimmung im Proteid zu erwarten.

Es wurde also eine größere Menge Nucleoproteid nach dem Verfahren von Steudel und Brigl dargestellt. Der Phosphorgehalt des lufttrockenen Präparates entsprach den bisher gefundenen Werten:

0,1124 g entsprechen 9,7 ccm $n/10$ -NaOH = 4,78% P (Neumann).
Gefunden von Hammarsten: 4,5%, von Steudel und Brigl 4,5% P,
von Steudel 4,6 P (Mittelwerte).

Ich habe mich dann noch davon überzeugt, daß in dem Proteid kein freies Adenin vorhanden war, indem ich 10 g in ammoniakalischem Wasser löste und gegen Wasser dialysierte. Das Dialysat lieferte mit ammoniakalischer Silbernitratlösung keine Spur eines Niederschlages.

100 g Nucleoproteid wurden jetzt mit $1\frac{1}{2}$ l 5 volumprozentiger Schwefelsäure 4 Stunden lang am Rückflußkühler über freier Flamme gekocht; die nach dem Erkalten auftretende Krystallisation langer prismatischer Nadeln von Guaninsulfat wurde durch schwaches Erwärmen wieder in Lösung gebracht und die klare dunkelbraune Lösung mit Ammoniak übersättigt. Es entstand ein dicker körniger Niederschlag, der abgesaugt wurde und getrocknet 6,5 g wog. Er wurde in verdünnter Schwefelsäure gelöst, mit Tierkohle entfärbt und lieferte nun eine Krystallisation von reinem Guaninsulfat.

0,1688 g sättigen 38,6 ccm $n/10$ -H₂SO₄ = 32,01% N (Kjeldahl).

Berechnet für (C₅H₅N₅O)₂H₂SO₄ + 2H₂O = 32,11% N.

Das Filtrat von der Ammoniakfällung des Guanins wurde auf ein Drittel seines Volumens eingengt, von einer sich dabei ausscheidenden schwarzen huminartigen Masse abfiltriert, und nun die Lösung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung völlig ausgefällt. Der Niederschlag wurde filtriert, mit ammoniakalischem Wasser ausgewaschen und mit Salzsäure in der Wärme zersetzt. Das vom Chlorsilber ablaufende Filtrat wurde auf dem Wasserbade durch vorsichtige Konzentration von der über-

schüssigen Salzsäure befreit und schließlich unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand war leicht in Wasser restlos löslich und wurde mit Natriumpikrat ausgefällt. Der Niederschlag wurde aus stark verdünnter Pikrinsäurelösung umkrystallisiert und lieferte eine Krystallisation von 2 g Adeninpicrat vom Schmelzpunkt 280°.

0,1485 g Substanz liefern 39,4 ccm N ($t = 19^\circ$, $p = 76,0$ cm)

Berechnet für $C_5H_5N_5 \cdot C_6H_3N_3O_7$: 30,78 % N.

Gefunden: 30,68 % N.

Wenn man sich aus dem Phosphorgehalt des Proteids unter der Voraussetzung, daß sämtlicher Phosphor als Guanylsäure im Proteid vorhanden wäre, die Menge des Guanins berechnet, die man aus dem Proteid erhalten müßte, so ergibt sich ein Wert von 23,3 g Guanin. In meinem Versuch habe ich dagegen nur 6,5 g, also etwa nur den vierten Teil gefunden. Der große Unterschied kann nicht nur durch Verluste bei der Darstellung erklärt werden, weil gerade das Guanin wegen seiner Schwerlöslichkeit sich verhältnismäßig leicht quantitativ bestimmen läßt. Der von mir gefundene Wert entspricht vielmehr annähernd dem Werte, der sich aus derjenigen Menge Guanylsäure berechnet, die man auf die übliche Weise aus dem Proteid gewinnt. Für 12 g saures guanylsaures Kali sind 4,52 g Guanin verlangt. Daß man mehr findet wie die berechnete Menge, scheint ein deutlicher Hinweis dafür zu sein, daß die Guanylsäure nicht die einzige P-haltige Komponente des Nucleoproteids ist: hiermit steht das zweifellose Vorkommen von Adenin in guter Übereinstimmung.

Freilich könnte eingewendet werden, daß das relativ kurze Kochen mit der wenig konzentrierten Schwefelsäure nicht alles Guanin aus seinem Verbande im Molekül herausgelöst hat. Nach den bisherigen Erfahrungen ist das aber durchaus unwahrscheinlich. Dagegen verdient ein zweiter Einwand mehr Beachtung: Streng genommen ist ja nicht genau bewiesen, daß das Nucleoproteid Hammarstens und das von mir untersuchte dieselben Substanzen sind, da mein Darstellungsverfahren etwas von dem Hammarstens abweicht. Die beiden Präparate haben zwar denselben Phosphorgehalt, man könnte

sich aber vorstellen, daß trotzdem mein Präparat nicht ganz so rein gewesen wäre wie das von Hammarsten; durch die Fällung mit Alkohol könnten andere Proteide mit niedergeschlagen sein wie das Hammarstensche.

Auf diesen Punkt soll bei weiteren Untersuchungen meine besondere Aufmerksamkeit gerichtet sein.

Ich habe mich nun ferner bemüht, die vermutete andere Nucleinsäure des Proteids zu isolieren und deshalb größere Mengen Proteid auf Guanylsäure verarbeitet. Aus den Mutterlaugen des guanylsauren Kalis habe ich nun auch einen in Wasser leicht löslichen phosphorhaltigen Körper erhalten, der aber bisher noch nicht frei von Eiweiß zu bekommen war. Eine genauere Beschreibung der Substanz wird erfolgen, sobald ich größere Mengen des reinen Produktes gesammelt habe.
