

Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel.

I. Mitteilung.

Verdauung der Hefenucleinsäure durch menschlichen Duodenal- saft. Isolierung der Triphosphonucleinsäure.

Von

S. J. Thannhauser.

(Aus der II. medizinischen Klinik zu München.)

(Der Redaktion zugegangen am 9. Mai 1914.)

Bei der sauren Hydrolyse der echten Nucleinsäuren nach Kossel¹⁾ wird das Polynucleotidmolekül in seine Bausteine — Basen, Zucker, Phosphorsäure — zerlegt. Bei der alkalischen Hydrolyse nach Levene bleibt die Basenzuckerbindung bestehen, Phosphorsäure wird abgespalten. Die von Levene²⁾ und seinen Mitarbeitern in einer Reihe von grundlegenden Arbeiten beschriebenen Purin- und Pyrimidinzuckerverbindungen werden von ihm Nucleoside genannt.

Für den Nucleinstoffwechsel im Organismus ist es von weitgehender Bedeutung, ob die echten Nucleinsäuren bereits im Darm analog der sauren oder alkalischen Hydrolyse aufgespalten werden oder ob durch die fermentative Aufspaltung im Darm größere Bruchstücke des Polynucleotidmoleküls entstehen, die es durch ihre Eigenschaften wahrscheinlich machen, daß sie zur Resorption gelangen. Bei der fermentativen Aufspaltung der Polynucleotide mit Organbrei konnten nach den

¹⁾ A. Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. 3, S. 291 (1879); Bd. 4 (1880); Bd. 7, S. 15 (1882); Bd. S. 37, S. 177 (1902).

²⁾ P. A. Levene und W. A. Jacobs, B. B., Bd. 42, S. 335, 1198 und 2469 (1909). — P. A. Levene und W. A. Jacobs, B. B., Bd. 43, S. 3150 (1910).

Untersuchungen von Jones¹⁾ und Schittenhelm²⁾ Amino- und Oxypurine, nach den neueren Arbeiten von Jones³⁾ auch Nucleoside isoliert werden. Diese Versuche können jedoch für eine Beurteilung der fermentativen Veränderung des Nucleinsäurenmolküls im Darm nicht herangezogen werden. Fermentversuche mit Darmsaft wurden von Levene und Schittenhelm⁴⁾ angestellt. Verwendet wurde Ileumsaft von Hunden. Levene⁵⁾ verdaute die Natronsalze der Thymusnucleinsäure, Hefenucleinsäure und Guanylsäure. Hierbei beobachtete er bei der Thymus- und Hefenucleinsäure und besonders bei letzterer eine Abnahme der Rechtsdrehung, ferner konnte er abgespaltene Phosphorsäure nachweisen. Nach der Verdauung des thymusnucleinsäuren Natrons war es nicht mehr möglich, die freie Thymusnucleinsäure durch Chlorwasserstoffsäure zum Ausfallen zu bringen. Hefenucleinsäure war nach der Einwirkung von Darmsaft durch Eisessig nicht mehr fällbar. Bei der Verdauung der Polynucleotide konnte Levene weder Nucleoside noch freie Purinbasen nachweisen, während er aus dem Verdauungsgemisch der Guanylsäure (Mononucleotid) Krystalle isolierte, die Levene als Guanosinkrystalle anspricht. Schittenhelm unterwarf ebenfalls Thymus- und Hefenucleinsäure der Verdauung durch Darmsaft. Durch fraktioniertes Ausfällen des Verdauungsgemisches mit Bleiessig und durch Kjeldahlisieren

¹⁾ Jones und Partridge, Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 343 (1904). — Jones, Diese Zeitschrift, Bd. 45, S. 84 (1905). — Jones u. Austrian, Diese Zeitschrift, Bd. 48, S. 110 (1906). — Jones und Müller, Diese Zeitschrift, Bd. 61, S. 395 (1909). — Jones und Winternitz, Diese Zeitschrift, Bd. 60, S. 180 (1909).

²⁾ Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. 45, S. 121 (1909); Bd. 46, S. 354 (1905); Bd. 63, S. 248 (1909). — Schittenhelm und Schmid, Diese Zeitschrift, Bd. 50, S. 30 (1900). — Schittenhelm und Wiener, Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 77 (1912).

³⁾ Jones, Journ. of biol. Chem., Bd. 9, S. 109 (1911). — Jones und W. Amberg, Diese Zeitschrift, Bd. 73, S. 407 (1911).

⁴⁾ Schittenhelm, London u. Wiener, Diese Zeitschrift, Bd. 70. (1910); Bd. 72, S. 459 (1911); Bd. 77, S. 86 (1912).

⁵⁾ Levene und Medigreceanu, Journ. of biolog. Chem., Bd. 9, S. 375 (1911).

der Bleiniederschläge glaubt Schittenhelm Nucleoside im Verdauungsgemisch nachgewiesen zu haben.

In den von mir angestellten Versuchen wurde Hefenucleinsäure mit menschlichem Duodenalsaft dreimal 24 Stunden verdaut. Der Darmsaft war mittels der von Rosenberger¹⁾ modifizierten Einhornschen Duodenalsonde von gesunden Menschen gewonnen. Die Verdauung wurde unter Toluol bei 37° vorgenommen. In der Verdauungsflüssigkeit konnte ich weder Nucleoside noch freie Purinbasen nachweisen, freie Phosphorsäure ist vorhanden. Es ist mir jedoch gelungen, aus dem Verdauungsgemisch eine Substanz zu isolieren, die nach den erhaltenen analytischen Daten noch ein Polynucleotid ist und sich nur um einen Phosphorsäurezuckerkomplex von der ursprünglichen Nucleinsäure unterscheiden dürfte. Dieser Körper wäre das erste, bisher erhaltene hochmolekulare Spaltstück einer echten Nucleinsäure. Die aus der Analyse berechnete Bruttoformel ergibt $C_{32}H_{49}P_3N_{15}O_{23}$. Da in dem Körper noch drei Phosphoratome enthalten sind, möchte ich ihn Triphosphonucleinsäure benennen. Die Substanz selbst ist wie alle Nucleinsäuren nicht krystallisiert, gibt aber ein einheitlich schön krystallisiertes Brucinsalz. Die freie Säure ist hygroskopisch, mit Alkohol und Äther getrocknet ist sie luftbeständig und haltbar. Die chemische Einheitlichkeit der freien Triphosphonucleinsäure ist durch eine konstante optische Aktivität und eine konstante Titrationsacidität bei Substanzen, die aus verschiedenen Darstellungen gewonnen waren, erwiesen. Die Triphosphonucleinsäure dreht im Gegensatz zur ursprünglichen Hefenucleinsäure nach links ($-19,6^\circ$). Sie ist im Wasser spielend löslich, in allen anderen Lösungsmitteln unlöslich. Aus wässrigen Lösungen wird sie mit Alkohol als schneeweißes Pulver gefällt; durch Eisessig ist sie nicht fällbar. Das Baryumsalz der Triphosphonucleinsäure ist in Wasser löslich. Diese Eigenschaft des Baryumsalzes ermöglicht es, die Triphosphonucleinsäure aus dem Verdauungsgemisch von der unveränderten Hefenucleinsäure zu trennen. Bei der ammoniakalischen Hydrolyse der Triphosphonucleinsäure im Autoklaven konnte ich Guanosin,

¹⁾ Münch. med. Wochenschr., S. 1354, 1913.

Adenosin und Cystidin isolieren und analysieren. Ein Uracil-komplex konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Experimentelles.

Gewinnung von menschlichem Duodenalsaft.

Der Patient schluckt abends eine Stunde nach dem Essen die Duodenalsonde bis zur Marke 80. Der Patient wird in rechte Seitenlage gebracht und die Sonde mit einem freien Spielraum von 10 ccm an der Wange des Patienten befestigt. Die Duodenalsonde muß aus einem am Röntgenschirm sichtbaren Gummi hergestellt sein und ein Metallkopfstück tragen. Am anderen Morgen — der Patient bleibt nüchtern — wird vor dem Röntgenschirm kontrolliert, ob die Sonde tief genug im Duodenum sitzt; dann wird mit der Aspiration von Duodenalsaft begonnen. Die Aspiration geschah in dem von Rosenberger¹⁾ angegebenen Aufnahmegefäß. Eine Viertelstunde vor und während der Aspiration läßt man mehrere Schluck Wasser trinken. Der Duodenalsaft ist goldgelb und reagiert gegen Lackmus alkalisch. Saft, der gegen Lackmus nicht deutlich alkalische Reaktion zeigte, wurde für die Verdauungsversuche nicht benützt.²⁾

Verdauung von Hefennucleinsäure und Darstellung der Triphosphonucleinsäure.

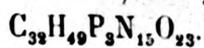
40 g Hefennucleinsäure (Böhringer) werden in einem Erlenmeyer mit 80—90 ccm Duodenalsaft übergossen und noch ca. 200 ccm destilliertes Wasser zugegeben. Das Gemisch wird fest geschüttelt und unter einer dicken Schicht Toluol dreimal 24 Stunden bei 37° sich selbst überlassen. Die Flüssigkeit färbt sich bald grün, die Nucleinsäure geht allmählich bis auf einen kleinen Rückstand in Lösung. Vom Rückstand wird abgegossen und dann die trübe Flüssigkeit mit 96% igem Alkohol solange versetzt, bis die überstehende Flüssigkeit

¹⁾ Rosenberger, l. c.

²⁾ Herrn Dr. G. Böhm und Herrn Grassmann möchte ich auch an dieser Stelle für ihre Bemühungen danken.

ganz klar ist und kein weiterer Niederschlag entsteht. Der sehr voluminöse weiße Niederschlag wird auf der Nutsche abgesaugt und muß sofort mit Alkohol und Äther nachgewaschen werden, da der Niederschlag sonst Wasser anzieht und zerfließt. Die Substanz wird in 400—500 ccm kalten Wassers unter oftmaligem Schütteln aufgeschwemmt und vom Ungelösten durch ein Faltenfilter abfiltriert. Darauf versetzt man unter starkem Rühren die Lösung solange mit 5%iger Barytlösung, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Vom Barytniederschlag (I) wird abfiltriert und das Filtrat mit der drei- bis vierfachen Menge 96%igen Alkohols versetzt. Das jetzt ausfallende Barytsalz (II) wird nach dem Absitzen auf einer Nutsche abfiltriert und mit Alkohol nachgewaschen. Hierauf bringt man das Barytsalz (II) in Wasser von Zimmertemperatur wieder in Lösung (von Ungelöstem wird eventuell abfiltriert) und versetzt die wässrige Lösung des Baryumsalzes mit Silbernitratlösung, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Das nun ausfallende weiße Silbersalz wird abgenutscht, in kaltem Wasser suspendiert, mit einigen Tropfen Bleiessig versetzt und durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Schwefelsilber abfiltrierte wasserklare Lösung wird im Vakuum auf 5—10 ccm eingeengt, und zur klaren Lösung die fünf- bis sechsfache Menge Alkohol zugegeben. Die nun ausfallende schneeweiße, krümelige Substanz wird abgesaugt, rasch mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Der so erhaltene Körper ist noch etwas baryumhaltig. Er wird in möglichst wenig kaltem Wasser gelöst, mit einigen Kubikzentimetern $\frac{1}{10}$ -n- H_2SO_4 versetzt, vom ausgeschiedenen $BaSO_4$ abfiltriert und wieder mit Alkohol gefällt. Die Triphosphonucleinsäure ist jetzt vollständig baryumfrei. Zur weiteren Reinigung kann man sie noch mehrmals aus Wasser, Alkohol umfällen oder über das krystallisierte Brucinsalz reinigen. Ausbeute an reiner Substanz aus 40 g Hefenucleinsäure 1,5—3 g.

Analyse: 0,1359 g Substanz: 0,1711 g CO_2 , 0,0535 g H_2O
 0,1519 „ „ 24,6 ccm N (11°, 763 mm)
 0,2092 „ „ 0,0636 g $Mg_2P_2O_7$.



Berechnet: C = 34,78%, H = 4,43%, N = 19,02%, P = 8,42%.

Gefunden: > = 34,34%, > = 4,40%, > = 19,62%, > = 8,46%
> = 19,60%.

Titration gegen Phenolphthalein.

0,1 g Säure = 4,0 ccm $\frac{1}{10}$ -n-Lauge,

0,1 > > = 4,1 > >

0,3815 werden in einem 10 ccm-Kölbchen in wenig Wasser gelöst und dann bis zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung dreht bei 17° Zimmertemperatur im 2 dm-Rohr — 1,49°. Die daraus berechnete spezifische Drehung $[\alpha]_D = -19,6^\circ$.

Eine weitere Bestimmung ergab $[\alpha]_D = -19,8^\circ$.

Das Barytsalz (I) besteht zum größten Teil aus wasserunlöslichem Baryumsalz der Hefenucleinsäure. Durch Aufschwemmen in kaltem Wasser, Fällen der wässrigen Lösung mit Alkohol und Weiterbehandeln, wie bei Barytsalz (II) angegeben, können noch kleine Mengen Triphosphonucleinsäure isoliert werden.

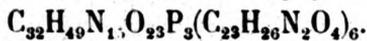
Darstellung des Brucinsalzes:

0,74 g Triphosphonucleinsäure wird in wenig Wasser gelöst und dazu 1,5 g Brucin in heißer alkoholischer Lösung gegeben. Die Lösung wird am Faust-Hayemschen Apparat fast vollständig eingeeengt und dann in der Kälte der Krystallisation überlassen. Die Rohkrystallisation wird zuerst mit Chloroform fest durchgeschüttelt und dann aus wenig heißem Wasser umkrystallisiert. Schöne kräftige Prismen vom S. P. 200 bis 205°.

0,1645 g Substanz: 0,3566 g CO₂, 0,0866 g H₂O

0,1494 > > 12,8 ccm N (bei 10°, 762 mm)

0,1865 > > 0,0182 g Mg₃P₂.



Berechnet: C = 58,82%, H = 5,77, N = 10,9%, P = 2,88%

Gefunden: > = 59,12%, > = 5,88, > = 10,36%, > = 2,71%

Hydrolyse der Triphosphonucleinsäure.

Die Hydrolyse wurde in ammoniakalischer Lösung nach den von Levene für die Hefenucleinsäure angegebenen Vorschriften ausgeführt. Da sich kleinere Substanzmengen im Auto-

klaven nur unter großen Verlusten hydrolysieren lassen und bei kostbarem Material eine Hydrolyse im Einschmelzrohr zu riskant ist, habe ich die Hydrolyse in einem kleinen zugeschmolzenen Fläschchen ausgeführt. Der Autoklav wurde mit Ammoniakwasser von gleicher Konzentration, wie in dem Fläschchen, gefüllt, das Fläschchen in das Ammoniakwasser gelegt und der Autoklav auf die gewünschte Temperatur gebracht. Die Hydrolyse wurde mit 10 g Triphosphonucleinsäure ausgeführt. Aus der Hydrolysenflüssigkeit konnte ich nach den oben zitierten Leveneschen Vorschriften Guanosin, Adenosin und Cystidin isolieren. Guanosin: weiße prismatische Nadeln S. P. 230—235° (unter Verkohlung).

0,1477 g Substanz: 30,9 ccm (16°, 757 mm).

N berechnet: 24,74%

gefunden: 24,6%

Adenosin: gelbe Täfelchen, S. P. 190°.

0,1514 g Substanz: 30 ccm N (17°, 760 mm).

N berechnet: 22,6%

gefunden: 23,3%

Cystidin: in Rosetten vereinigte Nadelchen S. P. 183.

0,1214 g Substanz: 17,85 ccm N (16°, 755 mm).

N berechnet: 17,79%

gefunden: 17,3%

Die zur Hydrolyse verwendete Triphosphonucleinsäure war über das kristallisierte Brucinsalz gereinigt; das Brucinsalz wurde in wenig heißem Wasser gelöst, mit 10%igem Ammoniak versetzt und in Eis gestellt. Es fällt das Brucin vollständig aus: in Lösung bleibt das Ammoniumsalz der Triphosphonucleinsäure. Das überschüssige Ammoniak wird im Luftstrom weggetrieben und dann die nach den Angaben von Levene für die Hydrolyse nötige Menge Ammoniak zugesetzt.