



Das Uracil, das bei der Spaltung der Nucleinsäure immer neben dem Cytosin durch Ammoniakabspaltung entsteht, ebenso wie Xanthin aus Guanin und Hypoxanthin aus Adenin, halten sie in diesem Falle für ein primäres Spaltprodukt, trotzdem die Ausbeuten an Uracil, die von Frau Kowalevsky gefunden wurden, größer waren, als sie sich aus der Leveneschen Formel ergeben und trotzdem auch zweitens die Resultate der quantitativen Ammoniakbestimmung gegen einen solchen Schluß sprachen.

Wir haben nun noch einmal unternommen, eine Lösung der strittigen Frage zu finden, denn es besteht noch folgende Möglichkeit, die die vorhandenen Unstimmigkeiten erklären würde:

Fast allgemein wird als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen an der Hefenucleinsäure das Präparat benutzt, das die Firma C. F. Boehringer & Söhne in Mannheim in den Handel bringt. Nun wäre es immerhin möglich, daß das Präparat, das ja aus einem im lebhaften Stoffwechsel befindlichen Medium, der lebenden Hefe, gewonnen wird, nicht einheitlich wäre, sondern neben der reinen Nucleinsäure, vielleicht in wechselnden Mengen, Körper enthielte, die schon durch geringe hydrolytische Spaltungen, z. B. durch Ammoniakabspaltung an der Cytosin-Gruppe, verändert wären oder die durch anders verlaufende Spaltungen durch die an Fermenten aller Art reiche Hefe schon in einfachere Körper zerlegt wären.

Es wurde also eine genauere Untersuchung dieses Ausgangsmaterials in Angriff genommen und das Präparat in verschiedene Fraktionen zerlegt. Als Kriterium der einzelnen Fraktionen galt uns das Verhältnis von Phosphor zu Stickstoff, dessen Werte schon durch geringe Differenzen im P- und N-Gehalt deutlich und stark beeinflußt werden. Gaben sämtliche Fraktionen übereinstimmende Werte, so war die Wahrscheinlichkeit groß, daß es sich um ein einheitliches Ausgangsmaterial handelte; ergaben sich dagegen größere Unterschiede in der Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen, so mußte man doch an das Vorhandensein verschiedener Körper im Ausgangsmaterial denken. Die nicht miteinander überein-

stimmenden Resultate der verschiedenen Forscher hätten dann eine ausreichende Begründung gefunden in dem in seiner Zusammensetzung wechselnden Ausgangsmaterial.

Für die folgenden Untersuchungen wurde ein Präparat von Hefenucleinsäurem Natrium benutzt, das uns von der Firma C. F. Boehringer & Söhne in Mannheim<sup>1)</sup> freundlichst zur Verfügung gestellt war. Es gab bei der Analyse folgende Werte: (Sämtliche Stickstoffbestimmungen wurden nach Kjeldahl, die Phosphorbestimmungen nach Neumann ausgeführt.)

0,1753 (lufttrocken)	neutralisieren	17,6 ccm	$n_{/10} \text{H}_2\text{SO}_4$	=	14,06 % N
0,2097 ( " )	"	20,9 "	$n_{/10} \text{H}_2\text{SO}_4$	=	13,95 % N
0,1863 ( " )	"	18,6 "	$n_{/10} \text{H}_2\text{SO}_4$	=	13,98 % N
0,2033 ( " )	"	29,3 "	$n_{/2} \text{NaOH}$	=	7,98 % P
0,1957 ( " )	"	27,7 "	$n_{/2} \text{NaOH}$	=	7,84 % P
0,2405 ( " )	"	34,2 "	$n_{/2} \text{NaOH}$	=	7,88 % P

Im Mittel sind gefunden 14,00 % N und 7,90 % P, daraus berechnet sich ein Verhältnis von P : N = 1 : 1,77. Frau Kowalevsky hatte bei ihren Bestimmungen in einem gleichen Präparat, das bis zur Gewichtskonstanz getrocknet war, früher<sup>2)</sup> 16,16 % N und 8,65 % P gefunden, woraus sich P : N = 1 : 1,87 ergibt.

Je 50 g Hefenucleinsäurem Natrium wurde in etwa 1 l Wasser gelöst und die Lösung mit basischem Bleiacetat ausgefällt. Das Filtrat gab dann mit Bleiessig und Ammoniak keinen Niederschlag mehr und enthielt nur noch spurenhaltig Phosphor. Die Bleifällung wurde abfiltriert, ausgepreßt und durch dreimaliges Verreiben mit Wasser sorgfältig ausgewaschen. Dann wurde sie in Wasser zu einem dünnen Brei aufgeschwemmt und mit Natriumkarbonatlösung zersetzt; hierbei schied sich das Bleikarbonat als schwerer pulveriger Niederschlag ab. Es wurde abfiltriert und die bleifreie Lösung im Vakuum bei niedrigerer Temperatur wieder auf etwa 500 ccm eingeeengt. Nun wurde mit Essigsäure schwach angesäuert,

<sup>1)</sup> Wir sprechen der Firma auch an dieser Stelle unsern besten Dank für ihr freundliches Entgegenkommen aus.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 69, S. 248.

die Kohlensäure vertrieben und die Lösung mit einer gesättigten Baryumacetatlösung versetzt. Es fiel ein flockiger weißer Niederschlag, der abgetrennt wurde und der sich zum größten Teil beim vorsichtigen Erwärmen in Wasser wieder auflöste. Beim Erkalten schied sich aus der klar filtrierten Lösung ein Teil des Niederschlages wieder aus, der nach dem Trocknen mit Alkohol und Vertreiben der letzten Reste Alkohols im Exsikkator 5 g betrug (Teil A).

Das Filtrat von A wurde wieder mit gesättigter Baryumacetatlösung versetzt. Hierbei fiel nach längerem Stehen ein weiterer Niederschlag aus, der durch Zentrifugieren von der Flüssigkeit getrennt wurde. Der so erhaltene Niederschlag konnte ebenfalls zum größten Teil in heißem Wasser wieder gelöst werden. Er wurde dann mit Alkohol aus der klar filtrierten Lösung niedergeschlagen und getrocknet: Teil B (5 g exsikkatortrocken).

Das Filtrat von dem mit Baryumacetat erzeugten Niederschlage wurde mit Alkohol versetzt, solange noch ein Niederschlag entstand. Auch dieser Niederschlag löste sich zum größten Teil in heißem Wasser und konnte durch Alkohol aus der Lösung wiedergewonnen werden: Teil C (exsikkatortrocken 5 g).

Die sämtlichen in heißem Wasser unlöslichen Rückstände wurden nun vereint und mit sehr verdünnter Natronlauge behandelt. Es ging fast alles in Lösung, die klar zentrifugierte Lösung wurde mit Essigsäure schwach angesäuert und gab beim Stehen über Nacht einen weißen, äußerst voluminösen Niederschlag, der die ganze Flüssigkeit erfüllte. Dieser Niederschlag, dessen Gewicht äußerst gering war, wurde abzentrifugiert und das Filtrat mit Alkohol gefällt: Teil D (exsikkatortrocken 10 g). Der auch in verdünnter Natronlauge unlösliche Teil wurde für sich untersucht, Teil E (exsikkatortrocken 2,5 g).

Nunmehr wurde in sämtlichen Fraktionen das Verhältnis von P : N bestimmt (für die Analysen wurden die exsikkatortrockenen Substanzen benutzt):

**Teil A:** 0,2154 neutralisieren 25,7 ccm  $n/2$  NaOH = 6,61 % P  
 0,2121 „ 25,2 „  $n/2$  NaOH = 6,58 % P  
 0,2239 „ 22,1 „  $n/10$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 13,82 % N  
 0,2140 „ 21,1 „  $n/10$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 13,79 % N  
 Im Mittel sind gefunden: 6,60 % P und 13,80 % N.

$$P : N = 1 : 2,09.$$

**Teil B:** 0,1968 neutralisieren 21,7 ccm  $n/2$  NaOH = 6,11 % P  
 0,2244 „ 24,6 „  $n/2$  NaOH = 6,07 % P  
 0,1946 „ 14,5 „  $n/10$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 10,43 % N  
 0,2150 „ 15,9 „  $n/10$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 10,35 % N

Mittel: 6,09 % P, 10,39 % N.

$$P : N = 1 : 1,80.$$

**Teil C:** 0,2170 neutralisieren 20,1 ccm  $n/2$  NaOH = 5,13 % P  
 0,2207 „ 20,8 „  $n/2$  NaOH = 5,22 % P  
 0,2108 „ 12,3 „  $n/10$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 8,17 % N  
 0,1971 „ 11,5 „  $n/10$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 8,17 % N

Mittel: 5,17 % P, 8,17 % N.

$$P : N = 1 : 1,58.$$

**Teil D:** 0,2342 neutralisieren 21,1 ccm  $n/2$  NaOH = 4,99 % P  
 0,2025 „ 18,4 „  $n/2$  NaOH = 5,03 % P  
 0,2121 „ 13,9 „  $n/10$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 9,17 % N  
 0,2140 „ 14,2 „  $n/10$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 9,29 % N

Mittel: 5,01 % P, 9,23 % N.

$$P : N = 1 : 1,84.$$

**Teil E:** 0,2140 neutralisieren 17,1 ccm  $n/2$  NaOH = 4,43 % P  
 0,1928 „ 15,0 „  $n/2$  NaOH = 4,31 % P  
 0,2152 „ 5,8 „  $n/10$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 3,77 % N  
 0,1845 „ 5,0 „  $n/10$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 3,79 % N

Mittel: 4,37 % P, 3,78 % N.

$$P : N = 1 : 0,87.$$

Überblickt man die gefundenen Werte für das Verhältnis P : N

$$A. P : N = 1 : 2,09$$

$$B. P : N = 1 : 1,80$$

$$C. P : N = 1 : 1,58$$

$$D. P : N = 1 : 1,84$$

$$E. P : N = 1 : 0,87,$$

so ergibt sich ohne weiteres, daß das untersuchte Präparat keine gleichmäßige Zusammensetzung hat, sondern daß ver-

schiedene Körper darin enthalten sein müssen. An eine Veränderung des Präparates durch die analytische Fraktionierung ist wohl kaum zu denken: es handelt sich ja durchweg um Operationen, die die Hefenucleinsäure nicht angreifen und die ganz harmlos sind: Bleifällung, Zersetzung mit Natriumkarbonat, Baryumacetatfällung; auch das Erwärmen der Baryumsalze in neutraler Lösung kann eine Spaltung oder Veränderung der Hefenucleinsäure nicht bewirken.

Um nun einen weiteren Einblick in die einzelnen Fraktionen zu gewinnen, haben wir zunächst die Fraktion A näher untersucht. Die Substanz wurde bei  $56^{\circ}$  und 0,1 mm Druck bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gab dann folgende Zahlen:

0,1814	neutralisieren	18,7 ccm	$n_{/10} \text{H}_2\text{SO}_4 = 14,43\%$	N (Kjeldahl)
0,1829	"	18,8 "	$n_{/10} \text{H}_2\text{SO}_4 = 14,39\%$	N ( " )
0,1743	"	23,3 "	$n_{/2} \text{NaOH} = 7,41\%$	P (Neumann)
0,1831	"	24,3 "	$n_{/2} \text{NaOH} = 7,35\%$	P ( " )
0,1886	gaben	0,0542 g	$\text{BaSO}_4 = 16,91\%$	Ba
0,1888	"	0,0544 g	$\text{BaSO}_4 = 16,95\%$	Ba
0,1846	"	0,1877 $\text{CO}_2$ und	0,0558 $\text{H}_2\text{O} = 27,74\%$	C und 3,36% H
0,1938	"	0,1986 $\text{CO}_2$ "	0,0557 $\text{H}_2\text{O} = 27,95\%$	C " 3,13% H

Berechnet für	Gefunden:
$(\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{O}_{23}\text{N}_{13}\text{P}_3)_2\text{Ba}_3$ :	
28,14 % C	27,74, 27,95 % C
3,18 % H	3,36, 3,13 % H
14,73 % N	14,43, 14,39 % N
7,53 % P	7,41, 7,35 % P
16,66 % Ba	16,91, 16,95 % Ba

Die Fraktion A besteht also aus dem Baryumsalz der Hefenucleinsäure  $\text{C}_{29}\text{H}_{42}\text{O}_{23}\text{N}_{13}\text{P}_3$  — die Levenesche Formel paßt nicht zu den gefundenen Werten; aus ihr ( $\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{Ba}_2\text{O}_{29}\text{N}_{15}\text{P}_4$ ) berechnen sich folgende verlangte Werte:

28,95 % C, 2,89 % H, 13,37 % N, 7,87 % P, 17,45 % Ba.

Für die Fraktionen B, C und D haben wir bisher eine einfache Lösung nicht gefunden, sie scheinen uns noch Gemenge stickstoffreicherer und stickstoffärmerer Produkte zu sein; das Verhältnis P : N kann hier wohl Fingerzeige geben, die Bestimmung der andern Elemente läßt sich aber noch

nicht zu einem Gesamtbilde vereinigen. Dagegen halten wir die Fraktion E für die von Levene beschriebene Uridinphosphorsäure, für die sich ein Verhältnis von  $P : N = 1 : 0,90$  berechnet, während wir  $1 : 0,87$  in unserem Präparat gefunden haben.

Es kann nach den eben beschriebenen Resultaten gar keinem Zweifel mehr unterliegen, daß das von uns untersuchte Präparat eine Nucleinsäure von der Formel  $C_{29}H_{42}O_{23}N_{13}P_3$ , der von Frau Kowalevsky aufgestellten Formel der Hefenucleinsäure, enthalten hat und daß daneben noch einfachere Nucleinsäure, etwa vom Typus der Uridinphosphorsäure, vorkommen. Nun erklären sich auch die Resultate der amerikanischen Forscher, die das Uracil für ein primäres Spaltungsprodukt der Hefenucleinsäure gehalten haben — ihren für die Spaltung benutzten Präparaten ist eben von Anfang an schon Uridinphosphorsäure beigemischt gewesen. Es erscheinen ferner auch die interessanten Resultate, die Thannhauser<sup>1)</sup> in den letzten Jahren durch Untersuchung der Hefenucleinsäure gewonnen hat, in neuer Beleuchtung. Er hat z. B. durch milde ammoniakalische Hydrolyse aus der Hefenucleinsäure die sog. Triphosphornucleinsäure (unsere „Hefenucleinsäure“) und die Uridinphosphorsäure erhalten und er meint, 2 Moleküle Triphosphorsäure und 1 Molekül Uridinphosphorsäure seien in der ursprünglichen Hefenucleinsäure zu einem größeren Komplex vereinigt. Solche Möglichkeiten sind natürlich nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen, besonders seitdem sich durch die Untersuchungen von Feulgen<sup>2)</sup> im hiesigen Laboratorium ergeben hat, daß die Nucleinsäure des Pancreas, die der Thymusnucleinsäure entspricht, mit der Guanylsäure sich zu einem Komplex vereinigen kann und als solcher im Pancreasproteid vorhanden ist. Bedenkt man aber, daß die Nucleinsäuren im allgemeinen gegen Alkalien in der Wärme ziemlich beständig sind und daß in dem meist benutzten Ausgangsmaterial, eben dem von uns benutzten Präparat, das ja im

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 100, S. 121.

<sup>2)</sup> Die Arbeit wird in dieser Zeitschrift demnächst veröffentlicht werden.

Handel zu haben ist, neben der reinen Hefenucleinsäure einfachere Nucleinsäuren schon vorkommen, so erscheint uns die Existenz solcher komplexen Körper in der Hefe noch nicht streng genug bewiesen.

Für die Durchführung der Untersuchungen hat uns das Kuratorium der Gräfin Bosestiftung eine größere Summe bewilligt, wofür wir auch an dieser Stelle unsern besten Dank sagen.