

Über eine zusammengesetzte Nukleinsäure.

Vorläufige Mitteilung.

Von

R. Feulgen.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. August 1919.)

In der Pankreasdrüse liegen die Verhältnisse hinsichtlich der Nukleinsäuren besonders verwickelt. Es kommen nämlich hier zwei verschiedene Arten von Nukleinsäuren vor, die Guanylsäure und die Pankreasnukleinsäure, welche letztere offenbar zum Typus der echten Nukleinsäuren gehört.

Eine solche Nukleinsäure ist von verschiedenen Autoren isoliert worden. Zum Teil hatte man aber dabei gar keine Rücksicht auf die Guanylsäure genommen, deren Alkalisalz bei der Alkoholfällung ebenso niedergeschlagen wird wie die Pankreasnukleinsäure, so daß in einem solchen Falle ein Gemenge der beiden Arten erhalten wurde; und soweit Analysenzahlen überhaupt vorliegen, beweisen diese, daß eine Reindarstellung dieser Nukleinsäure noch nicht erfolgt ist, was wesentlich auch auf mangelhafte Methoden zur Trennung dieser beiden Nukleinsäuren zurückzuführen ist.

Nun ist bekannt, daß die Guanylsäure in Gestalt eines Nukleoproteids aus der Pankreasdrüse leicht extrahiert werden kann, wobei es in präparativer Hinsicht gleichgültig ist, nach welcher Methode man das Proteid herstellt. Will man auf die Guanylsäure hinarbeiten, so wird man natürlich dasjenige Verfahren wählen, welches die besten Ausbeuten liefert und das bequemste Arbeiten gestattet.

Am bequemsten läßt sich ein Körper von der Klasse der Nukleoproteide (bzw. Nukleine) nach der Methode von Ham-

marsten durch Auskochen der zerkleinerten Drüsenmasse mit Wasser gewinnen und die Ausbeute an Rohmaterial für die Guanylsäure wird wesentlich gesteigert, wenn man die wäßrigen Auszüge nicht mit Essigsäure, sondern nach dem Vorgange von H. Steudel mit Alkohol fällt.

Diese Eigentümlichkeit der leichten Extraktion des Proteids muß präparativ als ein überaus glücklicher Zufall bezeichnet werden, gelingt es doch auf diese Weise, durch einfaches Auskochen mit Wasser die Guanylsäure in Form einer verhältnismäßig einfachen Verbindung zu isolieren und durch eine einfache Operation von der überaus lästigen großen Masse der Drüsensubstanz zu befreien. So ist denn auch die Guanylsäure von Bang, wenn auch in sehr unreinem Zustande, zuerst aus dem Nukleoproteid dargestellt worden.

Offengeblieben war bisher die Frage, ob auch die Pankreasnukleinsäure im Proteid vertreten ist. Die Untersuchungen in dieser Richtung litten auch hier unter dem Mangel einer brauchbaren Methode, Guanylsäure und Pankreasnukleinsäure zu trennen, und letztere rein, vor allem biuretfrei darzustellen. Mit der Essigsäurefällung der Guanylsäure, mit der Bang seine Theorie von der α -, β - und γ -Guanylsäure begründet¹, kommt man nicht weiter, da, wie in der vorigen Arbeit²) auseinandergesetzt, die Guanylsäure nur in Gegenwart einer basischen Verunreinigung mit Essigsäure fällbar ist, mit welcher Feststellung diese Theorie zusammenfällt.

Erleichtert wurden mir meine Untersuchungen durch das Auffinden einer für das guanylsaure Natrium charakteristischen Fällungsmethode, die darin besteht, daß guanylsaures Natrium durch essigsaures Natrium äußerst leicht aus wäßrigen Lösungen ausgesalzen wird, während pankreasnukleinsaures Natrium in Lösung bleibt. Ferner wurde die in der vorigen Arbeit bei der Guanylsäure als notwendig erkannte Fällung mit Alkohol in alkalischer Reaktion verallgemeinert, und ich gewann den Eindruck, daß Nukleinsäuren bei der Um-

¹) Hofmeister, Beiträge Bd. 4, S. 175.

²) Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 249 (1919).

fällung mit Alkohol nur in alkalischer Reaktion von basischen Verunreinigungen befreit werden, die sonst leicht von den Nukleinsäuren in salzartiger Bindung mitgerissen werden. Ein Schulbeispiel hierfür werden wir im Laufe dieser Arbeit bekommen.

Aus diesen Gesichtspunkten heraus ist die in der vorigen Arbeit beschriebene Aufspaltung des Proteids und Trennung der beiden Nukleinsäuren erfolgt und damit der Nachweis erbracht, daß auch eine Nukleinsäure vom Typus der echten im Proteid enthalten ist.

Bei der quantitativen Verfolgung dieser Vorgänge zeigte es sich nun, daß die beiden Nukleinsäuren — Guanylsäure und Pankreasnukleinsäure — in molekularen Gewichtsverhältnissen im Proteid enthalten sind. Hieran habe ich weiter die Vermutung geknüpft, die beiden Nukleinsäuren könnten in stöchiometrischem Verhältnisse etwa zu einer zusammengesetzten Nukleinsäure höherer Ordnung gepaart, vorkommen, und ich nahm an, daß eine Darstellung dieser eigenartigen Nukleinsäure deswegen noch nicht geglückt ist, weil diese äußerst leicht durch Alkalien in die Komponenten — Guanylsäure und Pankreasnukleinsäure — gespalten wird. In der Tat wenden alle Autoren bei der Darstellung der Nukleinsäuren aus der Pankreasdrüse in irgend einem Stadium eingreifendere alkalische Reaktion an.

Ich versuchte also, ohne Anwendung von Alkalien das Proteid aufzuspalten und fand zu diesem Zwecke ein Ferment vorzüglich geeignet, das im käuflichen „Pankreatin Merck“ vorhanden ist. Eine Spaltung der Nukleinsäure selbst findet dabei nicht statt.

Nukleoproteide sind schon wiederholt verdaut worden; so hatte schon Umber¹⁾ vor vielen Jahren das Pankreasproteid der Trypsinverdauung unterworfen und gezeigt, daß eine Spaltung in Eiweiß, das weiter abgebaut wird, und in eine Nukleinsäurekomponente erfolgt. Die Nukleinsäurekomponente hielt er für Guanylsäure.

¹⁾ Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 43, S. 282 (1901).

Bringt man in eine Proteidlösung von 40° etwas (0,5 %) Pankreatin zur Auflösung, so beobachtet man innerhalb weniger Minuten eine Veränderung. Die vorher stark klebrige, visköse und schäumende Proteidlösung verliert diese Eigenschaften, ein Zeichen beginnenden Abbaus. Die Flüssigkeit wurde, mit etwas Toluol versetzt, noch einige Tage im Brutschrank gehalten, klar zentrifugiert und mit Alkohol gefällt. Es zeigte sich, daß ein Körper abgeschieden wurde, der seiner Zusammensetzung nach im wesentlichen das Natriumsalz einer Nukleinsäure sein mußte. Eine Lösung des so gewonnenen Präparates war nun mit Essigsäure fällbar. An sich wäre daran ja nichts Auffälliges zu erblicken; hier aber erwies sich die Fällbarkeit als im hohen Grade unerfreulich. Es zeigte sich nämlich, daß diese Fällbarkeit mit Essigsäure etwas ganz Unkontrollierbares war, mal war sie mehr, mal weniger ausgesprochen, und gerade deswegen mußte ich mich eingehend damit beschäftigen. Es sah nämlich so aus, als hätte ich gar keinen einheitlichen Körper in Händen. Versuche, durch fraktionierte Fällung eine Trennung zu bewerkstelligen, mißglückten gänzlich, und endlich kam ich zu der Überzeugung, daß die Fällbarkeit mit Essigsäure nur eine scheinbare war und bedingt wurde durch die Gegenwart einer basischen Verunreinigung, die in essigsaurer Lösung mit dem dargestellten nukleinsauren Natrium etwa durch doppelte Umsetzung ein unlösliches Salz bildete.

Ich mußte also daraus den Schluß ziehen, daß der durch Fermentwirkung und Alkoholfällung gewonnene Körper (trotz wiederholtem Umfällen) noch sehr unrein war. Auf der Suche nach Reinigungsmethoden fand ich nach vielen Versuchen eine Fällung mit käuflichem Kristallviolett als vorzüglich brauchbar. Kristallviolett bildet mit nukleinsaurem Natrium unter doppelter Umsetzung ein in Wasser unlösliches Farbsalz (und Natriumchlorid). Diese Fällung ist in dreifacher Hinsicht für den vorschwebenden Zweck besonders geeignet: Erstens ist sie bereits eine sehr elektive, zweitens ist der Niederschlag in wasserhaltigem Alkohol leicht löslich, und es gelingt auf diese Weise, eine große Menge weiterer Verunreinigungen

ungelöst zu entfernen; drittens gelingt es leicht, durch Zusatz von Natriumacetatlösung zur alkoholischen Lösung des Farbsalzes unter doppelter Umsetzung wieder das Natriumsalz der Nukleinsäure, weil in Alkohol unlöslich, zu gewinnen. Auch diese letzte Fällung muß als sehr elektiv angesehen werden. Durch wiederholtes Lösen in Wasser und Ausfällen mit Alkohol gelang es, das nukleinsaure Natrium frei von Farbstoff zu erhalten. Diese Reinigungsmethode bedient sich also nur doppelter Umsetzungen in neutralen Lösungen und indifferenten Lösungsmitteln: Eine chemische Veränderung (Hydrolyse) war gänzlich ausgeschlossen.

Um so merkwürdiger war der Erfolg der Reinigung; denn das nukleinsaure Natrium hatte seine Fällbarkeit mit Essigsäure vollständig eingebüßt. Der Verdacht bestärkte sich, daß nur eine basische Verunreinigung Schuld an der Fällbarkeit mit Essigsäure gewesen war.

Wenn dies wirklich der Fall war, so mußte es gelingen, die basische Verunreinigung aus dem Rohprodukte los zu werden, wenn man das gewonnene nukleinsaure Natrium in alkalischer Lösung mit Alkohol fällte; denn es war zu erwarten, daß dann die basische Verunreinigung durch das Alkali von einer Salzbindung freigehalten wird. Bei dieser Fällung in alkalischer Reaktion mußte ich sehr vorsichtig vorgehen, um eine Spaltung der Nukleinsäure zu vermeiden. Ich wandte daher Temperaturen von 0° an.

Da auch dieser Versuch in vollkommen befriedigender Weise ausfiel, so war die Essigsäure-Fällbarkeit der gewonnenen Nukleinsäure endgültig abgetan.

In diesem Stadium der Untersuchungen erinnerte ich mich der angeblichen Fällbarkeit der Guanylsäure Bangs mit Essigsäure und ich nahm an, daß diese Erscheinung ebenfalls auf dem Vorhandensein einer basischen Verunreinigung beruhe. Aus Gründen der Übersichtlichkeit habe ich darüber in der vorherigen Arbeit¹⁾ berichtet und die Darstellung der Guanylsäure einer entsprechenden Kritik unterzogen.

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 106, S. 249 (1919).

Was nun unsere aus dem Proteid gewonnene Nukleinsäure anbetrifft, so habe ich beide Reinigungsmethoden (Fällung mit Alkohol aus alkalischer Reaktion und Reinigung über das alkohollösliche Farbsalz) kombiniert und glaube dadurch Präparate von größerer Reinheit dargestellt zu haben.

Was war nun eigentlich der vorliegende Körper? Daß es eine Nukleinsäure war, ergab sich ohne weiteres aus den Analysen und aus den Resultaten der Spaltung. Ich konnte nämlich feststellen: Phosphorsäure, Lävulinsäure, Guanin, Adenin, Cytosin und Thymin, mithin alle Spaltprodukte der echten Nukleinsäure. Eine Biuret- oder sonstige Eiweißreaktion gab der Körper hingegen nicht.

Gegen Fällungsmittel verhielt er sich ebenfalls genau so wie gewöhnliches und zwar (wegen mangelnder Gelatinierfähigkeit) wie b-nukleinsaures Natrium. Aus der wäßrigen Lösung wurde die freie Säure ebenso wie die echte Nukleinsäure und im Gegensatze zu der Guanylsäure durch Mineralsäuren als Niederschlag ausgefällt; sie ist also in Wasser sehr schwer löslich. Das Natriumsalz der neuen Nukleinsäure war leicht löslich in Wasser und wurde — im Gegensatze zu dem guanylsauren Natrium — durch essigsaures Natrium nicht ausgesalzen, vielmehr war es in 20%iger Natriumacetatlösung sehr leicht löslich, also unter Bedingungen, unter denen guanylsaures Natrium sehr schwer löslich ist (vgl. vorige Arbeit). Durch Alkohol wurde es aus wäßriger Lösung — wie alle Natriumsalze von Nukleinsäuren — gefällt. Aus diesen Erscheinungen geht hervor, daß der Körper weder guanylsaures Natrium war noch solches mechanisch beigemischt enthielt, vielmehr sah es ganz so aus, als ob eine Thymonukleinsäure vorläge.

Indessen ergaben sich wesentliche Unterschiede gegenüber einer solchen Säure. Zunächst gab der Körper mit Phloroglucin und Salzsäure echte Pentosenreaktion und bei der Destillation mit Salzsäure lieferte er erheblich mehr Furfurol als eine echte Nukleinsäure. Die Vermutung war also berechtigt, daß neben dem Kohlenhydrat der echten Nukleinsäure auch noch eine Pentose vorhanden war. Da nun aber Pentosen in der

Guanylsäure vorkommen, so mußte man annehmen, daß die neue Nukleinsäure eine Verbindung von Guanylsäure mit der Pankreasnukleinsäure war.

Dieser Verdacht wurde durch das eigenartige optische Verhalten des Körpers bestätigt. Das neutrale Natriumsalz dieser Nukleinsäure dreht nämlich stark rechts ($[\alpha]_D^{20} = \text{ca. } 50^\circ$), nach Zusatz von Natronlauge aber sehr schwach links, und nach Abstumpfen des Alkalis trat wieder die ursprüngliche Rechtsdrehung auf. Diese merkwürdige scheinbare Inversion war mir lange Zeit unerklärlich, bis ein genaues Studium derselben Verhältnisse bei der echten Nukleinsäure das merkwürdige Resultat hatte, daß das echte nukleinsäure Natrium in alkalischer Reaktion seine Rechtsdrehung vollständig verliert und optisch inaktiv wird, während die Guanylsäure unter ähnlichen Bedingungen ihre Aktivität nicht wesentlich ändert. Über diese Dinge habe ich bereits in einer früheren Arbeit ausführlich berichtet¹⁾. Jetzt erst war die scheinbare Inversion im Falle der neuen Nukleinsäure erklärlich: Der Körper ist eine Verbindung von Guanylsäure und einer Nukleinsäure vom Typus der echten (Pankreasnukleinsäure). Die beobachtete Rechtsdrehung ihres Natriumsalzes ist etwa die Resultante aus der starken Rechtsdrehung der Pankreasnukleinsäure und der schwachen Linksdrehung der Guanylsäure. Auf Zusatz von NaOH aber verschwindet die Rechtsdrehung der Pankreasnukleinsäure, während die schwache Linksdrehung der Guanylsäure bestehen bleibt (vgl. vorige Arbeit).

Dieses optische Verhalten der neuen Nukleinsäure ist nun in zweifacher Hinsicht von Wichtigkeit: Erstens zeigt es mit Wahrscheinlichkeit, daß die neue Nukleinsäure eine Verbindung von Guanylsäure mit der Pankreasnukleinsäure ist, zweitens ergibt sich daraus, daß die optische Inaktivierung der Nukleinsäuren vom Typus der echten mittels Alkalien auch in Verbindungen der Nukleinsäure zu Tage tritt. Da sie auch bei direkten niederen Derivaten (Thyminsäure) zu beobachten ist, so folgt daraus, daß die optische Inaktivierung

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 104, S. 189 (1919).

in alkalischer Lösung keine Zufallserscheinung ist, sondern im innersten Wesen des Nukleinsäurekernes begründet sein muß.

Man muß es also als sehr wahrscheinlich ansehen, daß der vorliegende Körper eine Verbindung der Guanylsäure mit der Pankreasnukleinsäure ist. Der endgültige Beweis für diese Anschauung konnte durch die partielle Hydrolyse erbracht werden. Es zeigte sich nämlich, daß der Körper in Gegenwart von Alkalien sehr leicht quantitativ gespalten wird in guanylsaures Natrium, das nunmehr mit Natriumacetat ausgesalzen werden kann, und pankreasnukleinsaures Natrium, das in Lösung bleibt. Die Spaltung vollzieht sich schon beim Stehen einer Lösung der Nukleinsäure in 2%iger Natronlauge. Bei 40° war die Spaltung in 24 Stunden beendet.

Zur quantitativen Ausführung der Hydrolyse werden in einem Zentrifugenglase 5,00 g der Substanz in 25 ccm 2%iger Natronlauge gelöst und die Lösung 24 Stunden im Brutschrank stehen gelassen. Sodann löst man darin noch 1 g kristallisiertes Natriumacetat auf, macht mit 50%iger Essigsäure neutral, wobei dichte Ausflockung des guanylsauren Natriums erfolgt, und stellt das Glas zur völligen Abscheidung des guanylsauren Natriums für mehrere Stunden in Eis. Alsdann zentrifugiert man eiskalt, wäscht das guanylsaure Natrium mit wenig eiskalter 10%iger Natriumacetatlösung nach, entwässert mit Alkohol und trocknet. Ausbeute an guanylsaurem Natrium 1,20 g = 24% des angewandten nukleinsauren Natriums (ber. 23,2%).

Zur völligen Reinigung und Identifizierung des guanylsauren Natriums wird dieses durch Umscheiden aus heißer 20%iger Natriumacetatlösung vollends gereinigt. Es ist mit dem guanylsauren Natrium der vorigen Arbeit identisch und gelatiniert mit verdünnter Essigsäure unter Bildung des sauren Salzes.

Die abzentrifugierte Lösung läßt auf Zusatz von 4 Volumen Alkohol das Natriumsalz der Pankreasnukleinsäure ausfallen; sie gab die grüne Fichtenspanreaktion, ein Zeichen, daß auch das Kohlenhydrat mit dem der echten Nukleinsäure

sehr nahe verwandt, vielleicht identisch ist, und wurde in überschüssiger Natronlauge optisch inaktiv. Sie gehört mithin zum Typus der echten Nukleinsäure.

Die mitgeteilten Versuche haben also ergeben, daß in der Tat eine Verbindung der Guanylsäure mit der Pankreasnukleinsäure vorliegt, wobei zunächst die Frage nicht endgültig entschieden werden kann, ob die Bindung durch Vermittlung eines dritten noch unbekanntes Körpers erfolgt, oder nach Art der Nukleotidbindungen in der echten Nukleinsäure zu denken ist. Im ersteren Falle könnte dieser dritte Stoff nur ein kleines Molekulargewicht haben, in welchem Falle er sich in Anbetracht des großen Moleküls der gesamten Nukleinsäure (ca. 1800) beim präparativen und analytischen Arbeiten der Aufmerksamkeit entziehen könnte. Die einfachste und vorläufig wahrscheinlichste Annahme ist die, daß auch die neue Nukleinsäure nur aus Nukleotiden besteht. Ich bezeichne diesen Körper als Guanylnukleinsäure. Man kann Stoffe dieser Art als Dinukleinsäuren auffassen, weil sie aus zwei selbständig vorkommenden Nukleinsäuren bestehen. Doch lägen einer solchen Auffassung lediglich präparative Eigenschaften zu Grunde. Im Gegensatze hierzu sei die Struktur der Guanylnukleinsäure von einem allgemeineren Standpunkte aus betrachtet.

Nach Levene bezeichnet man Komplexe, bestehend aus Phosphorsäure, Kohlenhydrat und Base als Nukleotide. Guanylsäure wäre danach ein einfaches Nukleotid, die echte Nukleinsäure aber ein Polinukleotid, und zwar ein Tetranukleotid. Von diesem Gesichtspunkte aus wäre die Guanylnukleinsäure ein Pentanukleotid, von dem bisher wegen der Unvollkommenheit der Methoden nur zwei Bruchstücke bekannt waren. Guanylsäure und Pankreasnukleinsäure sind also lediglich Kunstprodukte, entstanden wegen der leichten Spaltbarkeit der Guanylnukleinsäure bei den bisherigen Darstellungsmethoden.

Freie, nicht organisch gebundene Guanylsäure bzw. deren Salze habe ich im Pankreasnukleoproteid nicht nachweisen können.

Es wäre nun von großem Interesse, nachzuprüfen, ob die Guanylsäure bei ihrem Vorkommen in andern Organen stets mit einer andern Nukleinsäure gepaart vorkommt; sollte das der Fall sein, so wäre die Guanylsäure überhaupt nicht als selbständige Nukleinsäure aufzufassen, sondern nur als ein einfaches, aus einer Nukleinsäure abgespaltenes Nukleotid.

Bei der Beurteilung der Analysenzahlen kommt es nun vor allem auch auf das Molekulargewicht des Körpers an. Obgleich die Molekulargröße des kohlenhydratähnlichen Körpers in der echten Nukleinsäure noch nicht endgültig feststeht, kann man doch sagen, daß das Molekulargewicht des gesamten Komplexes der echten Nukleinsäure sehr nahe bei 1390—1400 liegt (für das Na-Salz). Das Molekulargewicht der freien Guanylnukleinsäure bekommt man also durch Addition der Molekulargewichte der Komponenten und Abzug eines Moleküls Wasser. Es bleibt aber noch die Frage offen, wieviel durch Metall ersetzbare Wasserstoffatome die Säure besitzt. Die Anzahl der phosphorsauren Wasserstoffatome in Nukleinsäuren ist, wie ich früher gezeigt habe¹⁾, abhängig von der Bindungsart der einzelnen Nukleotide untereinander. Nun wissen wir aber über die Art der Bindung der Guanylsäure mit der Pankreasnukleinsäure zurzeit noch nichts, mithin kann auch die Frage nach der Wertigkeit der Säure noch nicht entschieden werden. Bei der freien Säure wäre diese Frage für die Analyse zwar unerheblich, indessen ist die Säure in freiem Zustande wie die echte Nukleinsäure leicht zersetzlich und nicht mit wünschenswerter Reinheit zu gewinnen; ob sie zu Analysenzwecken geeignet ist, sollen spätere Versuche zeigen; vorläufig habe ich nur mit Na-Salzen gearbeitet. Das Na-Salz der echten Nukleinsäure ist quaternär. Guanylnukleinsaures Natrium kann 5 oder 6 Natriumatome enthalten je nach der Beteiligung der Phosphorsäuremoleküle an der Bindung der Nukleotide. Eine endgültige Entscheidung in dieser Frage muß ich mir vorbehalten. Praktisch kommen diese Unterschiede allerdings kaum in Frage, denn die beiden Salze

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 101, S. 288 (1918).

unterscheiden sich nur um das Atomgewicht des Natriums abzüglich des Atomgewichtes des Wasserstoffs, mithin um 22. Da der gesamte Komplex des guanylnukleinsauren Natriums aber ein Molekulargewicht von etwa 1760 hat, so sind die Unterschiede in den Analysenzahlen, das eine Mal mit dem fünf-, das andere Mal mit dem sechswertigen Salze berechnet, zu vernachlässigen. Ich rechne vorderhand mit dem fünfwertigen Natriumsalz von der Molekulargröße 1760. Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

0,1622 g verloren bei 100° über P_2O_5 , 0,0294 g Wasser;
 0,1078 g entsprachen 10,2 ccm $n_{/10}$ -Säure (Kjeldahl);
 0,2488 g „ 22,7 ccm $n_{/10}$ „ „ „ ;
 0,0998 g „ 12,2 ccm $n_{/3}$ -Lauge (Neumann).

	Berechnet für das guanylnukleinsaure Natrium	Gefunden
N	15,95%	15,72%, 15,62%
P	8,83%	8,60%

Die Untersuchungen wurden mit Mitteln aus der „Gräfin Bose-Stiftung“ ausgeführt.