

Über die Hefenucleinsäure.

(Zur Mitteilung von H. Steudel und E. Peiser, Diese Zeitschrift
Bd. 108, S. 72.)

Von

S. J. Thannhauser und P. Sachs.

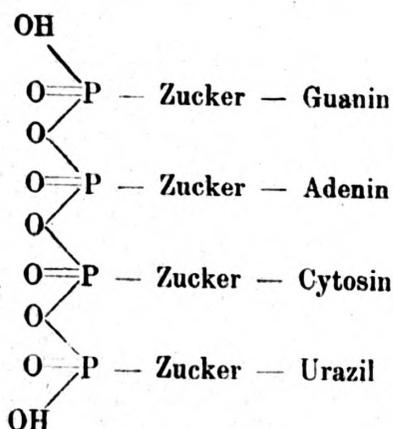
(Aus der II. med. Klinik (F. Müller), München.)

(Der Redaktion zugegangen am 27. Januar 1920.)

Nach den analytischen Resultaten der unter der Leitung von H. Steudel ausgeführten Arbeit von Kowalewsky¹⁾ soll die Hefenucleinsäure ein Trinucleotid sein, das aus drei Mononucleotiden, die Guanin, Adenin und Cytosin enthalten, aufgebaut ist. Das Urazil soll kein primäres Spaltstück der Hefenucleinsäure sein, da es sekundär durch saure Hydrolyse aus Cytosin entsteht. Durch die Untersuchungen von Levene und Jakobs²⁾ wurde zweifelsfrei erwiesen, daß das Urazil neben dem Cytosin in der Hefenucleinsäure vorgebildet ist. Levene konnte durch alkalische Hydrolyse der Hefenucleinsäure mit Ammoniak unter Druck ein Urazilglykosid, das Uridin, kristallisiert isolieren. Ferner beschrieben Levene und Jakobs eine Hydrolyse der Hefenucleinsäure mit 2% iger Schwefelsäure, wobei ein Gemisch von Uridin- und Cytidinphosphorsäure entsteht. Es gelang jedoch diesen Forschern nicht die beiden Mononucleotide zu trennen und kristallisierte Derivate derselben zu isolieren. Nach der Auffassung von Levene und Jakobs ist die Hefenucleinsäure ein Tetranucleotid, das aus vier Mononucleotiden, die Guanin, Adenin, Cytosin und Urazil enthalten, besteht. Das Molekül der Hefenucleinsäure sei derartig aufgebaut, daß die vier Mononucleotide nur durch Phosphorsäureanhydritbindungen zusammengehalten werden.

¹⁾ Kowalewsky, Diese Zeitschrift Bd. 69, S. 240 (1910).

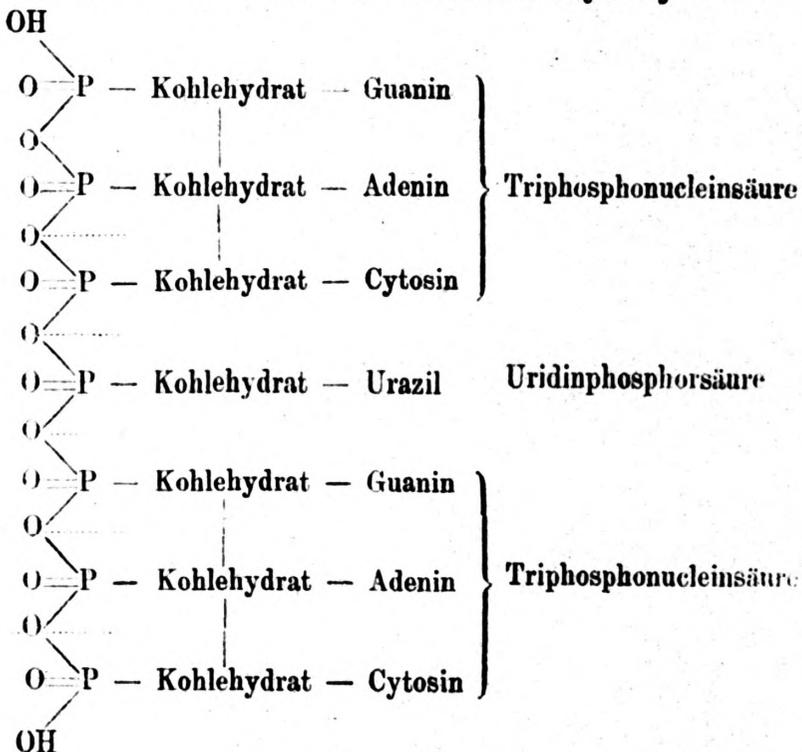
²⁾ P. A. Levene und Jakobs, Bericht der deutsch. chem. Gesellschaft Bd 42, S. 1198, 2469, 2474, 2703 (1909); ebenda Bd 43, S. 3162 (1910); Bd. 44, S. 740 (1911)



Im Verlauf einer Reihe von Untersuchungen, die den Zweck hatten, hochmolekulare Spaltstücke der Hefenucleinsäure zu isolieren und die Aufspaltung der Nucleinsäuren im menschlichen Darmkanal aufzuklären, konnte der eine von uns und G. Dorf Müller¹⁾ sowohl durch milde ammoniakalische Hydrolyse als auch durch Verdauung mit menschlichem Duodenalsaft ein hochmolekulares Spaltstück gewinnen, das mit Brucin ein kristallisiertes Salz gibt. Dieser Körper erwies sich durch Analyse und vollständige Hydrolyse als ein Trinucleotid, das aus den Mononucleotiden Guanidin-Adenin- und Cytidinphosphorsäure besteht und mit 6 Molekülen Brucin kristallisiert. Diese Substanz nannten wir Triphosphonucleinsäure. Neben der Triphosphonucleinsäure konnten wir bei den gleichen chemischen und fermentativen Hydrolysen ein Mononucleotid, die Uridinphosphorsäure als kristallisiertes Brucinsalz isolieren und durch vollständige Hydrolyse, Analyse und optische Aktivität charakterisieren. Auf Grund dieser analytischen Resultate, insbesondere aus der Tatsache, daß die Triphosphonucleinsäure mit 6 Mol. Brucin ein kristallisiertes Salz bildet, nahmen wir an, daß die vier Mononucleotide im Hefenucleinsäuremolekül nicht nur durch Phosphorsäureanhydritbrücken verbunden sind, sondern daß drei Mononucleotide, und zwar die das Molekül der Triphosphonucleinsäure aufbauenden Guanidin-Adenin- und Cytidinphosphorsäuren noch durch intramolekulare Bindungen, wahrscheinlich

¹⁾ S. J. Thannhauser und G. Dorf Müller, Diese Zeitschrift Bd. 91, S. 329; Bd. 95, S. 259; Bd. 100, S. 121. — S. J. Thannhauser, Habilitationsschrift, München (1917).

durch ätherartige Sauerstoffbrücken von Kohlehydrat zu Kohlehydrat, zusammengehalten werden. Durch die milde, ammoniakalische Hydrolyse und durch die fermentative Hydrolyse im menschlichen Dünndarm werden nur die Phosphorsäureanhydridbindungen gelöst, so daß die mit 6 Mol. Brucin ein Salz bildende Triphosphonucleinsäure und die mit 2 Mol. Brucin kristallisierende Uridinphosphorsäure entstehen. Die Uridinphosphorsäure dürfte somit lediglich durch eine Phosphorsäureanhydritbindung im Molekül der Hefenucleinsäure verankert sein, während die drei anderen Mononucleotide noch durch intermolekulare Bindungen aneinandergesetzt sind. Die durch die Isolierung der Triphosphonucleinsäure begründete Annahme, daß im Hefenucleinsäuremolekül außer den Phosphorsäureanhydritbindungen noch intermolekulare Verkettungen der Kohlehydrate bestehen, wurde, zunächst ohne experimentelle Beweise, von Feulgen¹⁾ auch für die tierischen Nucleinsäuren postuliert. In einem Schema können wir uns den Aufbau der Hefenucleinsäure auf nebenstehende Weise veranschaulichen. Die punktierten Linien zeigen den Verlauf der milden ammoniakalischen und fermentativen Hydrolyse an.



¹⁾ R. Feulgen, Diese Zeitschrift Bd. 101, S. 288 (1918).

Steudel und E. Peiser suchen nun in einer neuerlichen Untersuchung über die Hefenucleinsäure¹⁾ die divergierenden Befunde der Beteiligung der Uridinphosphorsäure an dem Aufbau der Hefenucleinsäure von Levene und Jakobs und von dem einen von uns und G. Dorfmueller einerseits und der aus dem Steudelschen Laboratorium stammenden Untersuchung von Kowalewsky andererseits aufzuklären. Steudel glaubt, daß das Ausgangsmaterial für die Untersuchungen, die von Böhringer und Söhne gelieferte Hefenucleinsäure, durch den Darstellungsprozeß in der Fabrik derartig verändert sein könnte, daß bereits die Uridinphosphorsäure in dem gelieferten Präparat nicht mehr in molekularer Bindung mit den drei anderen Mononucleotiden vorhanden sei und eventuell durch einen hydrolytischen Prozeß der an Fermenten reichen Hefe aus der Cytidinphosphorsäure sekundär hervorgegangen sein könnte. Als experimentellen Beweis dieser nicht direkt von der Hand zu weisenden Voraussetzung verwandelte Steudel zuerst die von Böhringer gelieferte Hefenucleinsäure über das Bleisalz in die freie Nucleinsäure und fällte dann die schwach essigsäure Lösung der freien Nucleinsäure fraktioniert mit Baryumacetat und Alkohol. Die in den Fraktionen entstandenen Niederschläge wurden in heißem Wasser gelöst und wieder mit Alkohol gefällt. Beim Lösen in heißem Wasser blieb bei jeder Fraktion ein unlöslicher Rückstand. Diese unlöslichen Rückstände wurden vereint mit Natronlauge gelöst, mit Essigsäure angesäuert und mit Alkohol gefällt. Beim Lösen in verdünnter Natronlauge blieb ein kleiner unlöslicher Rückstand.

Von allen Fraktionen (5) wurde das Verhältnis P:N untersucht. Es wurden natürlich große Schwankungen (1 : 2,09 bis 1 : 0,87) gefunden, da die auf diese Art gewonnenen Präparate keine analysenreifen Körper sein können.

Die in verdünnter Natronlauge unlösliche Baryumfällung zeigt ein Verhältnis von P:N von 1 : 0,87, das dem Verhältnis P:N der Uridinphosphorsäure entsprechen würde. Steu-

¹⁾ H. Steudel und E. Peiser, Diese Zeitschrift Bd. 108, S. 42.

del und Peiser halten daher diese Fällung für ein Baryumsalz der Uridinphosphorsäure und schließen, daß in dem Hefenucleinsäuren Natrium Böhringer die Uridinphosphorsäure von dem Polynucleotidkomplex losgelöst sei. Dieser Befund würde nach Steudel die Resultate des einen von uns „in einer neuen Beleuchtung“ zeigen. Dieser Ansicht Steudels können wir nicht beipflichten, selbst wenn die für Uridinphosphorsäure angesprochene Baryumfällung tatsächlich ein Baryumsalz der Uridinphosphorsäure wäre. Ein derartiger Befund würde nur sagen, daß bei der üblichen präparativen Darstellung der Hefenucleinsäure ein Teil der Uridinphosphorsäure aus dem Hefenucleinsäuremolekül losgelöst wird, wie dies in vollständiger Weise durch die von uns ausgeführte milde, chemische und fermentative Hydrolyse bewirkt wird. Der Befund Steudels würde eine Stütze unserer experimentell begründeten Annahme sein, daß die Uridinphosphorsäure im Hefenucleinsäuremolekül lockerer als die anderen Nucleotide verankert ist und jedenfalls nur durch die Phosphorsäureanhydritbildung im großen Molekül gehalten wird.

Um festzustellen, ob die von Böhringer bezogene Hefenucleinsäure tatsächlich freie Uridinphosphorsäure enthält, suspendierten wir 30 g freie Hefenucleinsäure in 500 ccm Wasser und schüttelten die Suspension 24 Stunden auf der Schüttelmaschine. Die Uridinphosphorsäure ist in Wasser außerordentlich leicht löslich. Vom ungelösten Rückstand wurde abfiltriert und die Flüssigkeit unter vermindertem Druck auf ca. 60 ccm eingeengt. Diese Lösung wurde zum Kochen erhitzt und 30 gr Brucin, in 60 ccm heißem Alkohol gelöst, hinzugegeben. Nach vierwöchentlichem Stehen war kein Brucinsalz ausgefallen. Die Hauptmenge des Brucins konnte der Lösung durch Ausschütteln mit Chloroform wieder entzogen werden. Wäre freie Uridinphosphorsäure in der Lösung der von Böhringer gelieferten Hefenucleinsäure zugegen, so würde das Brucinsalz dieser Säure ausgefallen sein, da das Uridinphosphorsäurebrucinsalz in Wasser und verdünntem Alkohol außerordentlich schwer löslich ist. Die Uridinphosphorsäure ist durch ihr kristallisiertes Brucinsalz vom

S. P. 177/178 und durch ihre optische Aktivität $\alpha_D = +14,4'$ charakterisiert¹⁾. Die von Steudel und Peiser mit Baryumacetat aus der Hefenucleinsäure fraktionierte Substanz ist bisher nicht genügend charakterisiert, um als Baryumsalz der Uridinphosphorsäure angesprochen zu werden. Die Hefenucleinsäure ist nach den bisherigen analytischen Daten als Tetranucleotid, das aus der Guanodin-Adenin-Cytidin- und Uridinphosphorsäure aufgebaut ist, anzusprechen.

¹⁾ Diese Zeitschrift Bd. 100, S. 121.