Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel.

XII. Mitteilung.

Die Hydrolyse der Thymusnucleinsäure mit Pikrinsäure. Über die Zusammensetzung der Thyminsäure.

Von

S. J. Thannhauser und Berta Ottenstein.

(Aus der II. medizinischen Klinik [F. Müller] München.)
(Der Redaktion zugegangen am 31. Januar 1921.)

Die Aufspaltung von Polynucleotiden durch kochende Pikrinsäurelösung verläuft nach den Versuchen von Thannhauser und Dorf Müller¹⁾ derartig, daß die im Polynucleotidmolekül präformierten Purinnucleotide unter Abscheidung von Purinpikraten vollständig in ihre Bausteine zerlegt werden, während die präformierten Pyrimidinnucleotide nicht aufgespalten werden, wodurch ihre Isolierung aus der Hydrolysenflüssigkeit ermöglicht wird. Aus der Hefenucleinsäure wurde nach der Hydrolyse mit kochender Pikrinsäurelösung die Cytidin- und Uridinphosphorsäure isoliert. Wir versuchten, die an der Hefenucleinsäure gewonnenen Erfahrungen auf die tierische Nucleinsäure zu übertragen in der Hoffnung, daß auch hier bei der pikrinsauren Hydrolyse die Pyrimidinnucleotide intakt bleiben und sich isolieren lassen. Unsere Voraussetzung hat sich bestätigt.

Nach den bisherigen Arbeiten entsteht aus der Thymusnucleinsäure durch milde saure Hydrolyse mit 2%iger Schwefelsäure ein Körper, den zuerst Kossel und Neumann²⁾ als

¹⁾ S. J. Thannhauser und G. Dorf Müller, Diese Zeitschr. Bd. 104, S. 75 (1918).

²⁾ Kossel und Neumann, Diese Zeitschr. Bd. 22, S. 74 (1896).

Nähere Angaben über die Isolierung und die Analyse dieser Substanz wurden von den Autoren nicht gemacht.

Feulgen¹⁾ spaltet Thymusnucleinsäure in einer ca. 1%igen Schwefelsäurelösung $\frac{1}{2}$ Stunde bei 80°. Auch hier wurden die Purine aus dem Molekülverband vollständig abgespalten. Den verbleibenden Rest bezeichnet Feulgen als Thyminsäure. Er wurde als amorphes Bariumsalz gefällt und analysiert. Diese Substanz soll folgendermaßen zusammengesetzt sein:

Hierbei soll das Kohlehydrat ein Glukal ($C_6H_{10}O_4$) sein und der oben formulierte Körper zwei freie Aldehydgruppen (mit Phenylhydrazin entsteht eine amorphe Fällung²⁾) besitzen.

¹⁾ R. Feulgen, Diese Zeitschr. Bd. 101, S. 296 (1918).

²⁾ R. Feulgen, Diese Zeitschr. Bd. 102, S. 262 (1918).

Diese Thyminsäure wird als amorphes Bariumsalz aus dem Hydrolysegemisch niedergeschlagen. Feulgen hält „ein weiteres Umfällen des Körpers für zwecklos, eine Verbesserung würde dadurch nicht erzielt, höchstens kann man es durch Umfällen vor der Analyse etwas besser von den in erheblicher Menge mitgerissenen Bariumsalzen trennen“. Auf der Analyse dieses Körpers fußend, erscheinen so weitgehende Schlüsse wie die obige Formulierung vorläufig sicherlich nicht zwingend, zumal durch die Arbeit von Levene und Jakobs der Beweis schon erbracht war, daß man bei der milden sauren Hydrolyse der tierischen Nucleinsäuren Gemische von Pyrimidinnucleotiden erhält. Steudel und Peiser¹⁾ geben in einer unlängst erschienenen Mitteilung ein Verfahren der milden Hydrolyse von Nucleinsäuren mit Sulfatlösung (Sulfatlauge der Cellulosefabrikation) an, bei der ebenfalls die Purinnucleotide aufgespalten werden und ein einheitlicher Rest bestehen bleiben soll, der sich aus Thymin- und Cytosinnucleotid zusammensetzt. Steudel und Peiser halten diese Substanz mit der von Kossel und Neumann durch milde saure Hydrolyse aus Thymusnucleinsäure dargestellten Thyminsäure für identisch und schlagen vor, da ja diese Säure auch Cytosin im Molekülverband enthielte, ihr den Namen „Thymosinsäure“ zu geben. Analysiert wurde diese Substanz als amorphes Bariumsalz, das sich nicht umkristallisieren läßt, d. h. es wurde das Verhältnis P : N und Ba : N bestimmt.

Es stehen sich also die Befunde von Levene und Jakobs einerseits und von Steudel und Feulgen andererseits gegenüber. Die ersteren geben an, daß bei der milden sauren Hydrolyse der Thymusnucleinsäure ein Gemisch von zwei Pyrimidinnucleotiden entsteht, während Feulgen und Steudel in Anlehnung an die alte Bezeichnung Thyminsäure auf einen noch zusammenhaftenden Komplex von Pyrimidinnucleotiden schließen wollen. Allerdings ist die Methodik der Hydrolysen

¹⁾ H. Steudel und E. Peiser, Diese Zeitschr. Bd. 111, S. 297 (1920).

der einzelnen Autoren verschieden und hönnte zu dieser Unstimmigkeit geführt haben; jedoch erscheinen uns die von Steudel und Feulgen zu Analysen gebrachten amorphen Substanzen für ihre Einheitlichkeit nicht unbedingt beweiskräftig.

In den von uns hier mitgeteilten Versuchen wurde die Thymusnucleinsäure durch heißgesättigte Pikrinsäurelösung aufgespalten. Die Hydrolyse mit heißer Pikrinsäurelösung ist in ihrer Stärke nach den Erfahrungen an der Hefenucleinsäure einer Hydrolyse mit 2%iger Schwefelsäure gleichzusetzen. Es fallen die abgespaltenen Purine als Pikrate schon während des Kochens aus, in Lösung bleiben die ungespaltenen Pyrimidinnucleotide. Die überschüssige Pikrinsäurelösung wird aus der Hydrolysenflüssigkeit ausgeäthert und die Flüssigkeit selbst auf ein kleines Volumen im Vakuum eingengt. Durch Fällung der stark eingengten Lösung mit absolutem Alkohol fällt eine amorphe, klebrige Substanz aus. Sowohl die eingengte wäßrige alkoholische Mutterlauge wie auch die wiederum in Wasser gelöste amorphe Substanz gibt, mit alkoholischer Brucinlösung versetzt, kristallisierte Brucinsalze. Die Mutterlauge der aus dem Alkohol unlöslichen Körper gewonnenen Brucinsalze gibt mit absolutem Alkohol eine amorphe Fällung, die brucinhalzig ist, sich an der Luft verfärbt und zerfließt. Die Brucinkristallisate erwiesen sich bei der Aufarbeitung als Brucinsalze einfacher Pyrimidinnucleotide. Die Trennung der Gemische gelang durch wiederholtes fraktioniertes Kristallisieren. Die Methodik ist im experimentellen Teil beschrieben. Wir isolierten auf die angegebene Weise die Brucinsalze einer Cytosinhexosephosphorsäure, einer Thyminhexosephosphorsäure, die Brucinsalze einer Cytosinhexosediphosphorsäure (basisches und neutrales Salz) und einer Thyminhexosediphosphorsäure. Ferner wurden noch zwei Brucinsalze gewonnen und analysiert, deren saurer Komplex aus den Analysenzahlen allein nicht zu ersehen ist.

Levene und Jakobs haben bereits die Brucinsalze von Cytosin- und Thyminhexosediphosphorsäure durch Hydrolyse der Thymusnucleinsäure mit 2%iger Schwefelsäure in Händen

gehabt, allerdings haben sie nur die Phosphoranalysen der besagten Substanzen ausgeführt. Durch Hydrolyse mit Pikrinsäurelösung ist es nun gelungen, neben diesen beiden Diphosphorsäuren auch die entsprechenden Monophosphorsäuren aus dem Hydrolysengemisch darzustellen und zu analysieren.

Es dürfte wohl nicht wahrscheinlich sein, daß die den Cytosin- und Thyminhexosemonophosphorsäuren entsprechenden Diphosphorsäuren

¹⁾ Die Struktur des in den tierischen Nucleotiden vorgebildeten Zuckers ist noch ungeklärt.

im großen Thymusnucleinsäuremolekül jedes für sich als Mononucleotid vorgebildet ist. Es erscheint uns vielmehr möglich, daß die Cytosin- und Thyminhexosemonophosphorsäuren durch eine Phosphorsäurebrücke zusammengehalten werden. Bei der Hydrolyse würde dieser doppelseitig verankerte Phosphorsäureester einmal an der Cytosinhexosephosphorsäure, einmal an der Thyminhexosephosphorsäure haften bleiben und so die gleichzeitige Entstehung von Pyrimidinhexosemono- und Diphosphorsäuren bei der pikrinsauren Hydrolyse erklären.

Wir sehen, daß die pikrinsaure Hydrolyse der Thymusnucleinsäure zu einem Gemisch von Pyrimidinnucleotiden führt, aus dem sich die vier besprochenen Substanzen und noch zwei bisher ungeklärte Körper als Brucinsalze isolieren ließen. Die Hydrolyse wurde 3mal wiederholt und verlief immer gleichartig. Es darf als sicher gelten, daß die milde saure Hydrolyse der Thymusnucleinsäure zu einem einheitlichen Körper von der Art einer Thyminsäure nicht führt.

Experimenteller Teil.

30 g Natriumsalz der Thymusnucleinsäure (dargestellt nach den Angaben von Neumann¹⁾ und Feulgen²⁾) werden in 300 ccm Wasser heiß gelöst und heiß mit basisch essigsaurem Blei (D.A.B.) gefällt. Der feinflockige weiße Niederschlag wird kalt abfiltriert, gewaschen und in der Reibschale mit

¹⁾ Neumann, Arch. f. Physiol. 1899. Suppl. 553.

²⁾ R. Feulgen, Diese Zeitschr. Bd. 90, S. 261 (1914).

Wasser aufgeschlemmt und mit Schwefelwasserstoff unter gelinden Überdruck zersetzt. Vom Bleisulfid wird nach Aufkochen heiß abfiltriert. Das klare Filtrat wird unter vermindertem Druck auf ca. 100 ccm eingeeengt, mit 90 g Pikrinsäure versetzt und am Rückflußkühler 4 Stunden gekocht. Noch während des Kochens scheidet sich Pikrat aus. Der Kolbeninhalt wird heiß in einen Stutzen gespült und über Nacht in den Eisschrank gestellt. Nach 12 Stunden wird scharf von der ausgefallenen Pikrinsäure und vom Pikrat abgesaugt, das Filtrat im Vakuum auf 30 ccm eingeeengt und abermals in den Eisschrank gestellt. Der Rest der ausgefallenen Pikrate wird wieder abgesaugt und das Filtrat zur Entfernung der Pikrinsäure so lange ausgeäthert, bis der Äther farblos bleibt. Die ausgeätherte Lösung wird im Vakuum bis zur Sirupdicke eingeeengt. Der hellgelbe Sirup wird heiß, bevor er erstarrt ist in einen Stutzen gegossen und mit absolutem Alkohol so lange versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Durch Kneten wird die ausgefallene weiße Masse körnig und kann nach einiger Zeit abgesaugt werden. Die Substanz wird mit Alkohol und Äther nachgewaschen und im Exsikkator getrocknet. (Ausbeute 6,8 g.) Alkoholunlösliche Substanz wird mit A. bezeichnet. Der in Alkohol gelöst gebliebene Teil B. wird gesondert behandelt.

Aufarbeitung der alkoholunlöslichen Substanz A.

Die alkoholunlösliche Substanz A. (6,8 g) wird in der 11fachen Menge Wasser heiß gelöst und mit 14 g Brucin in 30 ccm heißem Alkohol gelöst in der Hitze versetzt. Es flocken sofort geringe Mengen (ca. 0,2 g) eines amorphen Niederschlages (A_1) aus.

Nach dem Erkalten wird A_1 abfiltriert. A_1 läßt sich nicht kristallisieren und wird verworfen. Nach 24stündigem Stehen entsteht in der Mutterlauge (M. A.) ein Kristallinat ($A_2 = 6$ g). A_2 wird abfiltriert auf Ton getrocknet und in Chloroform zur Entfernung vom Brucin suspendiert. Nach dem Absaugen des Chloroforms $A_2 = 3,9$ g. A_2 wird in möglichst wenig 35%igem Alkohol heiß gelöst und nach 10 Stun-

den vom ausgeschiedenen Kristallinat abgesaugt ($IA_2 = 2$ g). Nach 2tägigem Stehen kristallisiert aus der Mutterlauge von IA_2 eine Substanz in kleinen, feinsten drusenförmig angeordneten Nadeln aus ($A_3 = 0,6$ g). Die Mutterlauge von A_3 wird zuerst auf dem Wasserbad, das im Exsikkator vollständig zur Trockne eingengt. Der Sirup erstarrt allmählich zu einer sirupösen kristallinen Masse (1,2 g), die nicht weiter verarbeitet wurde. IA_2 wird in 35%igem Alkohol heiß gelöst und nochmals fraktioniert. Sofort fällt eine in charakteristisch doppelseitig zugespitzten Spindeln kristallisierende Substanz aus (IIA_2). Von dieser Substanz wird abfiltriert. Nach mehrstündigem Stehen beginnt eine zweite Kristallisation eines Körpers, der in prismatischen Nadeln ausfällt (IIA_2M). IIA_2 wird 3mal aus 35%igem Alkohol umkristallisiert. Doppelseitig zugespitzte Spindeln. S.-P. $215^\circ/216^\circ$. Die Analysen von IIA_2 aus verschiedenen Hydrolysen stimmen auf ein Brucinsalz der Cytosinhexosephosphorsäure $C_{10}H_{16}O_9N_3P$.

0,1423 g Substanz	0,3060 g CO_2	0,0806 g H_2O
0,1363 g "	0,2934 g CO_2	0,0713 g H_2O
0,1044 g "	7,3 ccm N	(18° 777 mm)
3,98 mg "	0,287 ccm N	(15° 765 mm)
0,0620 g "	0,1002 g	(24 $MoO_3 \cdot P_2O_5$).

Cytosinhexosephosphorsäurebrucinsalz $C_{10}H_{16}O_9N_3P(C_{23}H_{26}O_4N_2)_2$.

Ber.: C 58,92% H 5,96% N 8,59% P 2,72%

I. Gef.: C 58,63% H 6,33% N 8,41% P 2,78%

II. Gef.: C 58,68% H 5,85% N 8,60%.

IIA_2M wird ebenfalls mehrmals aus 35%igem Alkohol umkristallisiert. Prismatische Nadeln S.-P. $190^\circ/192^\circ$. Die Analysen von IIA_2M aus verschiedenen Hydrolysen stimmen auf ein Brucinsalz der Thyminhexosephosphorsäure $C_{10}H_{17}O_{10}N_2P$.

0,0838 g Substanz	0,1825 g CO_2	0,0460 g H_2O
0,1081 g "	0,2359 g CO_2	0,0591 g H_2O
3,91 mg "	0,238 ccm N	(15° 765 mm)
7,39 mg "	0,466 ccm N	(16° 766 mm)

Thyminhexosephosphorsäurebrucinsalz $C_{10}H_{17}O_{10}N_2P(C_{23}H_{26}O_4N_2)_2$.

Ber.: C 59,28% H 5,97% N 7,26%

I. Gef.: C 59,38% H 6,14% N 7,27%

II. Gef.: C 59,51% H 6,11% N 7,50%.

A_3 wird 3mal aus 35%igem Alkohol umkristallisiert. Kleine in Drusen angeordnete Nadelchen. S.-P. 200°/202°. Die Analysen von A_3 stimmen auf ein Brucinsalz der Cytosinhexosediphosphorsäure $C_{10}H_{17}O_{12}N_3P_2$ mit 4 Mol. Brucin.

0,0574 g Substanz	0,1273 g CO_2	0,0339 g H_2O
4,59 mg	0,322 ccm N	(15° 749 mm)
4,27 mg	0,278 ccm N	(14° 766 mm)
0,1241 mg	0,2198 g	(24 $MoO_3 \cdot P_2O_5$).

Cytosinhexosediphosphorsäurebrucinsalz $C_{10}H_{17}O_{12}N_3P_2(C_{23}H_{28}O_4N_2)_4$.

Ber.:	C 60,93%	H 6,02%	N 7,67%	P 3,09%
I. Gef.:	C 60,48%	H 6,59%	N 8,19%	P 3,05%
			N 7,80%	

Die ursprüngliche Mutterlauge (M. A.) wird zuerst auf dem Wasserbade, dann im Exsikkator eingengt. Auf Ton vollständig getrocknet und dann in Chloroform zur Entfernung von freiem Brucin suspendiert. Nach dem Abfiltrieren des Chloroforms ca. 9 g. Diese Menge wird in wenig 17%igem Alkohol gelöst und zur Staubtrockne im Exsikkator abgedunstet. Die absolut trockene Substanz wird in 20 ccm Wasser aufgenommen. Es entsteht sofort ein Kristallinat, das sich nach 24stündigem Stehen vermehrt (A_5). A_5 wird abfiltriert, auf Ton getrocknet und mehrmals aus 35%igem Alkohol umkristallisiert. Charakteristische, tönchenförmige Kristalle S.-P. 226°/227°. Die Analysen dieser Substanz stimmen auf ein basisches Brucinsalz der Cytosinhexosediphosphorsäure $C_{10}H_{17}O_{12}N_3P_2$ mit 2 Mol. Brucin.

0,1042 g Substanz	0,2125 g CO_2	0,0561 g H_2O
0,1336 g	0,2708 g CO_2	0,0697 g H_2O
6,14 mg	0,451 ccm N	(24° 760 mm)
6,08 mg	0,445 ccm N	(16° 764 mm)
0,0927 g	0,2327 g	24 $MoO_3 \cdot P_2O_5$
0,1695 g	0,4503 g	24 $MoO_3 \cdot P_2O_5$.

Cytosinhexosediphosphorsäurebrucinsalz (basisch)

Ber.:	C 55,06%	H 5,80%	N 8,03%	P 5,08%
I. Gef.:	C 55,63%	H 6,02%	N 8,44%	P 4,33%
II. Gef.:	C 55,28%	H 5,83%	N 8,68%	P 4,57%

Die wäßrige Mutterlauge von A_5 wird abfiltriert, eingengt und mit viel absolutem Alkohol versetzt. Es entsteht ein

flockiger Niederschlag, der nach längerem Stehen fest wird. Der Niederschlag enthält reichlich Brucin; an der Luft verfärbt er sich und zerfließt. Versuche, diese Substanz nach Entfernung des Brucins mit Ammoniak über das Bleisalz zu reinigen, führten zu keinem Erfolg. Die aus dem Bleisalz nach dem Zersetzen mit Schwefelwasserstoff erhaltene wäßrige Lösung gibt mit p. Nitrophenylhydrazin einen spärlichen amorphen Niederschlag. Die aus der Mutterlauge von A₅ mit Alkohol fällbare brucinreiche, an der Luft zerfließende Masse ist wahrscheinlich eine Mischung von Produkten unvollständiger Hydrolyse.

Aufarbeitung des in Alkohol löslichen Teiles B.

Der alkoholische Teil wird im Vakuum vollständig eingeeengt, mit 30 ccm Wasser aufgenommen und mit 16 g Brucin, das in 32 ccm Alkohol gelöst ist, versetzt. Die Lösung erstarrt zu einem Kristallbrei, der nach 12stündigem Stehen abgesaugt wird (11 g). Nach Suspension in Chloroform 3,5 g (B). B wird in möglichst wenig heißem 35%igem Alkohol gelöst und von dem ausfallenden Kristallinat nach 6 Stunden abfiltriert (B₁ = 1 g). Die Mutterlauge von B₁ wird eingeeengt. Es fällt ein Körper in feinen, langen Nadeln aus (B₂). Nach weiterem Einengen kristallisieren große, rechteckige Kristallprismen (B₃).

B₁ wird 3mal aus 35%igem Alkohol umkristallisiert. Feinste seidenglänzende Nadeln (S.-P. 186°/187°). Die Analysenzahlen von B₁ (aus verschiedenen Hydrolysen dargestellt) stimmen auf ein Brucinsalz der Thyminhexosediphosphorsäure C₁₁H₁₈O₁₃N₂P₂.

0,1450 g Substanz	0,3253 g CO ₂	0,0830 g H ₂ O
0,1467 g „	0,3261 g CO ₂	0,0821 g H ₂ O
0,1160 g „	7,15 ccm N	(18° 780 mm)
0,1074 g „	6,7 ccm N	(18° 781 mm)
0,1861 g „	0,2913 g	24 Mo·O ₃ P ₂ O ₅ .

Thyminhexosediphosphorsäure C₁₁H₁₈O₁₃N₂P(C₂₃H₂₆O₄N₂)₄.

Ber.: C 61,07% H 6,03% N 6,92% P 3,06%

I. Gef.: C 61,19% H 6,40% N 7,4 %

II. Gef.: C 61,20% H 6,26% N 7,5 % P 2,69%.

B_2 und B_3 sind außerordentlich leicht löslich in 35%igem Alkohol. Sie kristallisieren gleichheitlich in makroskopischen, rechtwinkligen Prismen und zeigen den gleichen S.-P. $175^\circ/180^\circ$. Wir hielten die Substanz nach ihrem Aussehen für Brucinphosphat. Die Analysen ergaben jedoch Werte, die gegen diese Annahme sprechen.

Für B_2 wurden gefunden:

0,1513 g Substanz	0,3132 g CO_2	0,0831 g H_2O
0,1413 g "	0,2933 g CO_2	0,0762 g H_2O
0,2203 g "	6,1 ccm N	(18° 780 mm)
5,00 mg "	0,277 ccm N	(17° 765 mm)
0,1704 g "	0,5470 g	(24 $MoO_3 \cdot P_2O_5$)
I. Gef.: C 56,46%	H 6,14%	N 6,10% P —
II. Gef.: C 56,61%	H 5,89%	N 6,56% P 5,53%

Für B_3 wurden gefunden:

0,1013 g Substanz	0,2111 g CO_2	0,0552 g H_2O
6,38 mg "	0,285 ccm N	(15° 749 mm)
0,0613 g "	0,1685 g	(24 $MoO_3 \cdot P_2O_5$)
Gef.: C 56,39%	H 6,03%	N 5,21% P 4,73%

Es bleibt weiterer Untersuchung vorbehalten, die Brucinsalze B_2 und B_3 aufzuklären.