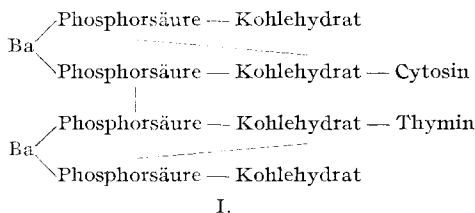


24. Hellmut Bredereck und Gerhard Müller: Über die Thyminsäure (Nucleinsäuren, XII. Mitteil.*).

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]

(Eingegangen am 19. Dezember 1938.)

Kossel und Neumann¹⁾ gelang es 1893, aus Thymonucleinsäure durch Erwärmen in Wasser unter Abspaltung der Purinbasen eine Substanz in Form ihres Bariumsalses zu isolieren, die sie als „Thyminsäure“ bezeichneten. Wenn sie auch ihre Zusammensetzung noch nicht richtig erkannten, so hatten sie doch, wie die Analysen zeigen, schon ein recht reines Produkt in Händen. Später versuchten Steudel und Brigl²⁾, fußend auf früheren Versuchen von Schmiedeberg³⁾, durch salpetersaure Hydrolyse der Thymonucleinsäure Thyminsäure zu erhalten. Wenn auch das von ihnen gewonnene Produkt wohl infolge weitergehender Oxydation noch recht unrein war, so stellten sie doch erstmals das Reduktionsvermögen fest. In eingehenden Untersuchungen hat dann Feulgen⁴⁾ Darstellung und Eigenschaften der Thyminsäure beschrieben. Insbesondere konnte er durch Darstellung eines Phenylhydrazons den von ihm angenommenen Aufbau der Thyminsäure stützen. Der Thyminsäure bzw. ihrem Bariumsals schrieb er die Struktur I zu, wobei er entsprechend den damaligen noch unsicheren Anschauungen für das Kohlehydrat die Molekülgröße $C_6H_{10}O_4$ annahm.



In einer sich über mehrere Jahre erstreckenden Polemik sucht Thannhauser⁵⁾ darzulegen, daß es sich bei der Thyminsäure um keine einheitliche Substanz handle, ebenso, daß keine freien Aldehydgruppen vorliegen. Demgegenüber versucht Feulgen⁶⁾, durch Hinweis auf seine experimentellen Befunde die Existenz der Thyminsäure mit dem von ihm angenommenen Aufbau zu beweisen.

Wenn wir selbst auch die Beweisführung von Feulgen für durchaus richtig halten, so mag doch die vorstehend kurz skizzierte Polemik daran schuld sein, daß die Thyminsäure im Rahmen der Konstitutionsaufklärung der Nucleinsäuren nicht in dem Maße herangezogen wurde, wie es ihr bei ihrer Bedeutung zukommt.

Wir haben daher im Rahmen unserer Nucleinsäure-Arbeiten auch die Bearbeitung der Thyminsäure aufgenommen und insbesondere folgende

*) XI. Mitteil.: Bredereck, Köthnig u. Lehmann, B. **71**, 2613 [1938].1) B. **26**, 2753 [1893]; Ztschr. physiol. Chem. **22**, 74 [1896/97].2) Ztschr. physiol. Chem. **70**, 398 [1911].3) Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **43**, 57 [1899].4) Ztschr. physiol. Chem. **101**, 296 [1918]; **102**, 262 [1918].5) Ztschr. physiol. Chem. **114**, 39 [1921]; **131**, 296 [1923]; **161**, 116 [1926].6) Ztschr. physiol. Chem. **128**, 154 [1923]; **137**, 272 [1924]; **165**, 215 [1927].

Fragen zu beantworten versucht: 1) Handelt es sich bei der Thyminsäure um eine einheitliche Substanz? 2) Welches ist die Konstitution der Thyminsäure?

Die Darstellung der Thyminsäure erfolgt durch schwach saure (Natriumbisulfat) Hydrolyse der Thymonucleinsäure im wesentlichen nach der von Feulgen⁴⁾ angegebenen Methode. Das erhaltene Produkt erwies sich bei der Prüfung auf Purine mittels der Chlorwasserstoff/Methanol-Probe⁷⁾ als frei von Guanin und Adenin.

Die Thyminsäure, von der durch Zerlegen des Bariumsalzes mit Schwefelsäure eine wäßrige Lösung bereitet wurde, erwies sich bei der Titration mit Alkali (gegen Phenolphthalein) als 5-basische Säure. Der Gehalt der Lösung an freier Thyminsäure wurde durch Rückstandsbestimmung ermittelt. Im Gegensatz zu den Angaben von Feulgen erwies sich die wäßrige Lösung der freien Thyminsäure als recht stabil. Beim Verdunsten einer wäßrigen Lösung bei Zimmertemperatur im Vakuum war der Rückstand kaum verfärbt. Trocknen bei höherer Temperatur führte jedoch zur raschen Dunkelfärbung. Die mit Natronlauge gegen Phenolphthalein neutralisierte Lösung der Thyminsäure erwies sich beim Aufbewahren bei 37° als instabil. Wir verfolgten den eintretenden Aciditätszuwachs, indem wir in bestimmten Zeitabständen die sauer gewordene Lösung wieder neutralisierten. In alkalischer Lösung, wo wir mit einem Überschuß an Alkali arbeiteten, ging die Zersetzung noch rascher vor sich, wobei auch das Reduktionsvermögen allmählich verschwand. In schwach saurer Lösung (verd. Salzsäure) erwies sich die Thyminsäure im Gegensatz zu den Angaben von Feulgen innerhalb der Beobachtungszeit als vollkommen stabil, was auf Grund der Darstellung der Thyminsäure in saurer Lösung durchaus zu erwarten war. Durch Titration ließ sich keinerlei Aciditätszuwachs feststellen. Daß ein durch Titration nicht erfaßbarer Zerfall eingetreten ist, glauben wir nicht, zumal auch rein äußerlich die Lösung vollkommen hell blieb, während im alkalischen eine sich allmählich verstärkende Rotbraunfärbung auftrat. Wir halten es für wahrscheinlich, daß der bei der gegen Phenolphthalein neutralisierten Lösung sowie bei der alkalischen Lösung eingetretene Aciditätszuwachs auf einer Aufspaltung in die Nucleotide bzw. Desoxyribose-phosphorsäure beruht, wenn er sicher z. Tl. auch auf eine Veränderung der beiden Desoxyribose-phosphorsäure-Reste zurückzuführen ist. Dafür spricht, daß wir bei der alkalischen Lösung einen Aciditätszuwachs entsprechend etwa 7 Äquivalenten beobachteten, während eine Aufspaltung lediglich einen solchen von 3 Äquivalenten verursachen dürfte.

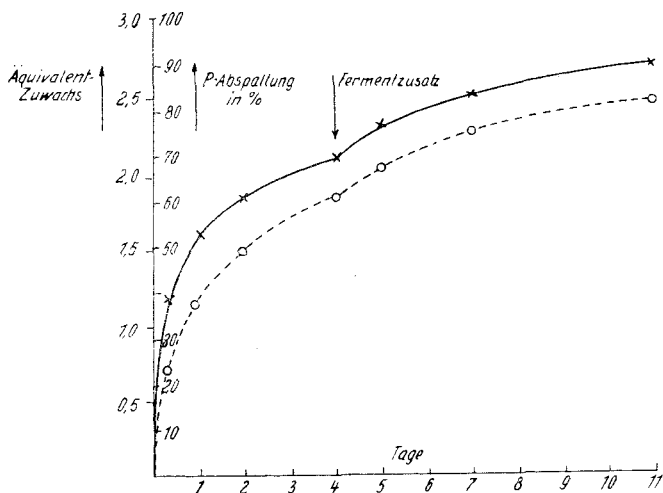
Blieb es nach den vorstehend beschriebenen Versuchen noch unklar, ob der Aciditätszuwachs auf einer Aufspaltung der Thyminsäure in Nucleotide bzw. Desoxyribose-phosphorsäure beruhte, so konnte durch die fermentative Hydrolyse eine solche Aufspaltung sichergestellt werden.

Wegen der Stabilität der Thyminsäure im sauren Milieu und ihrer Instabilität im alkalischen Milieu konnten wir für die fermentative Aufspaltung nur ein im sauren Gebiet wirkendes Ferment wählen. Wir haben bereits in früheren Arbeiten⁸⁾ berichtet, daß in Fermentpräparaten aus Süß-

⁷⁾ Levene, Journ. biol. Chem. **53**, 441 [1922].

⁸⁾ Bredereck, B. **71**, 408 [1938]; Bredereck, Beuchelt u. Richter, Ztschr. physiol. Chem. **244**, 102 [1936].

mandeln, Luzernensamen, Erbsen u. a. eine Polynucleotidase und Nucleotidase vorliegt. Solche Präparate spalten bei p_H etwa 5.0 sowohl Hefe- als auch Thymonucleinsäure in die Nucleoside, und zwar beide mit etwa gleicher Geschwindigkeit. Nunmehr fanden wir, daß auch Thyminsäure von einem Fermentpräparat aus Süßmandeln glatt gespalten wird. In Proben bestimmten wir sowohl die Menge abgespaltener Phosphorsäure als auch den eingetretenen Aciditätszuwachs. Während Gulland⁹⁾ mit „alkalischer“ Phosphatase einen Stillstand der Phosphorsäure-Abspaltung nach etwa 75% Abspaltung feststellen konnte, beobachteten wir bei der Thyminsäure, wie auch schon früher bei der Hefe- und Thymonucleinsäure, mit unserer „sauren“ Phosphatase einen solchen Stillstand nicht. Wir fanden, daß einer 100-proz. Phosphorsäure-Abspaltung ein Aciditätszuwachs von etwa 3 Äquivalenten entspricht (s. Kurven). Da eine Substratlösung + Puffer allein keinerlei Veränderung zeigte, so beruht dieser Aciditäts-



Fermentative Aufspaltung der Thyminsäure.

Ausgezogene Kurve = Äquivalentzuwachs. Gestrichelte Kurve = P-Abspaltung.

zuwachs lediglich auf einer Aufspaltung der Thyminsäure in Nucleotide bzw. Desoxyribose-phosphorsäure, aus denen dann sekundär durch die Nucleotidase (= Phosphatase) die Phosphorsäure abgespalten wird, ohne daß aber dadurch ein gegen Phenolphthalein titrierbarer Aciditätszuwachs erfolgt.

Durch die vorstehend beschriebene fermentative Spaltung ist eindeutig gezeigt, daß es sich bei der Thyminsäure, entsprechend der Auffassung von Feulgen, um eine einheitliche Substanz handelt. Bei Vorliegen eines Gemisches dürfte bei fermentativer Spaltung kein gegenüber Phenolphthalein titrierbarer Aciditätszuwachs von 3 Äquivalenten eingetreten sein.

Durch direkte Titration sowie durch die Bestimmung des Aciditätszuwachses bei der fermentativen Aufspaltung ist gezeigt, daß die Thyminsäure eine 5-basische Säure ist. Somit kann die von Feulgen befürwortete Konstitution, die eine 4-basische Säure annimmt, nicht zutreffen. Wir

⁹⁾ Journ. chem. Soc. London 1938, 1492.

nehmen für die Thyminsäure die Konstitution II an, wobei jedoch die Reihenfolge der Nucleotide bzw. Ribosephosphorsäure-Reste willkürlich gewählt ist.

Phosphorsäure — Desoxyribose

Phosphorsäure — Desoxyribose — Thymin

Phosphorsäure — Desoxyribose — Cytosin

Phosphorsäure — Desoxyribose

II.

Die Konstitution der Thyminsäure steht in bester Übereinstimmung mit den Erkenntnissen über die Konstitution ihrer Muttersubstanz, der Thymonucleinsäure. Auch die Thymonucleinsäure hat sich als 5-basische Säure erwiesen, auch bei ihr kann nur eine esterartige Verknüpfung vorliegen, zumal das Vorhandensein einer Bindung zwischen Phosphorsäure und Base (NH_2 -Gruppe) ausgeschlossen werden konnte, die auch auf Grund des Aufbaues der Thyminsäure ausscheidet. Über die Titration und Konstitution der Thymonucleinsäure ist in der folgenden Mitteilung berichtet.

Bei der Darstellung der Thymonucleinsäure sind wir in dankenswerter Weise von Frl. E. Berger unterstützt worden. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Bereitstellung von Mitteln.

Beschreibung der Versuche.

Zur Darstellung des thyminsäuren Bariums diente die freie Thymonucleinsäure, die wir uns nach der früher¹⁰⁾ von uns mitgeteilten Methode aus Milz darstellten. Die rohe Thymonucleinsäure wurde in Abänderung der früher angewandten Reinigungsmethode wie folgt von der Hauptmenge vorhandenen Eisens befreit:

Reinigung der rohen Thymonucleinsäure.

50 g rohe Thymonucleinsäure wurden in 1 l Wasser aufgeschlämmt und durch Zugabe von 2-n. Natronlauge bis zur Neutralisation gegen Lackmus in Lösung gebracht. Die dunkelbraune, etwas trübe Lösung wurde nunmehr mit einem Überschuß von 60 ccm 2-n. Natronlauge versetzt und erwärmt, bis sich bei etwa 60° das Eisenhydroxyd in Flocken abschied. Die Lösung wurde filtriert, das Filtrat mit verd. Essigsäure neutralisiert und sodann in eine gut gekühlte Mischung von 600 ccm 2-n. Salzsäure, 2,4 l Alkohol und 1,8 l Wasser in dünnem Strahl unter dauerndem Rühren eingegossen. Die abgeschiedene Thymonucleinsäure wurde abgesaugt, mehrfach mit Alkohol, zuletzt mit Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet (Analysen so gereinigter Präparate siehe in der folgenden Mitteilung).

Darstellung des thyminsäuren Bariums (nach Feulgen).

10 g gereinigte Thymonucleinsäure wurden in 300 ccm Wasser aufgeschlämmt und durch Neutralisation mit 2-n. Natronlauge in Lösung gebracht. Die auf 80° erwärmte Lösung wurde mit 25 ccm 2-n. Schwefelsäure

¹⁰⁾ Bredereck u. Caro, Ztschr. physiol. Chem. **253**, 170 [1938].

versetzt und sodann 45 Min. im Wasserbad von 80° aufbewahrt. Durch öfteres Umschütteln ging der bei Zugabe der Schwefelsäure ausgefallene Niederschlag in Lösung. Nach 45 Min. wurden die abgespaltenen Purine durch Zugabe von Silbersulfat gefällt, wobei die Lösung unter dauerndem Rühren noch weitere 15 Min. im 80° warmen Wasserbad gelassen wurde. Nach dem Abkühlen wurde abgesaugt und das Filtrat durch Bariumchlorid/Bariumacetat (2.5 g BaCl₂, 17.5 g Ba(OOCC₂H₅)₂ u. 30 ccm Wasser) von SO₄ und Ag befreit. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert oder aber über einer Kieselschicht abgesaugt. Das klare schwach hellgelbe Filtrat wurde sodann mit dem 3-fachen Volumen Alkohol versetzt. Das in weißen Flocken ausgefallene thyminsäure Barium wurde nach Absitzenlassen von der überstehenden Flüssigkeit durch Abhebern befreit, nach Zugabe von Alkohol abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet.

Prüfung auf Purine: 1 g thyminsäures Barium wurde in 10 ccm 95-proz. Methylalkohol aufgeschlämmt und 1½ Stdn. bei Zimmertemperatur, sodann ½ Stde. unter Eiskühlung Chlorwasserstoff durchgeleitet. Die Lösung färbte sich tiefrot, ein Niederschlag von Chlorhydraten der Purine entstand nicht.

Titration der Thyminsäure: Zur Durchführung der Titration wurde eine wäßrige Lösung der freien Thyminsäure wie folgt hergestellt: Thyminsäures Barium wurde in Wasser gelöst und die Lösung durch Zugabe von verd. Schwefelsäure Ba-frei gemacht. Die von BaSO₄ befreite Lösung muß Ba- und SO₄-frei sein. Die Lösung wurde auf 100 ccm aufgefüllt und der Gehalt an freier Thyminsäure durch Entnahme von 5 ccm bestimmt. Die Probe wurde unter 2 mm bei Zimmertemperatur über Phosphorpentoxyd zur Konstanz getrocknet.

5 ccm der Lösung enthielten 0.0330 g Thyminsäure.

20 ccm (0.1320 g) verbr. 6.63 ccm $n/10$ -NaOH \approx 5.04 Äquival. (ber. für C₂₉H₄₅O₂₆N₅P₄). Weitere Titrationsergebnisse s. unten.

Versuche zur Stabilität der Thyminsäure: Eine wäßrige Lösung der freien Thyminsäure zeigte bei 24- bzw. 48-stdg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur keinerlei titrierbare Aciditätsvermehrung.

Ein Versuch mit gegen Phenolphthalein neutralisierter wäßriger Thyminsäurelösung wurde wie folgt durchgeführt: 15 ccm einer wäßrigen Thyminsäurelösung (2 ccm enthielten 0.0601 g) wurden mit 30 ccm Wasser verdünnt und mit $n/10$ -NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert. Sodann wurde die Lösung bei 37° aufbewahrt. In den aus der Tafel 1 ersichtlichen Zeitabständen wurde die gesamte Lösung erneut mit $n/10$ -NaOH neutralisiert. Die Bestimmung wurde fortgesetzt, bis die zunehmende Verfärbung der Lösung eine einwandfreie Feststellung des Indicatorumschlags unmöglich machte. 15 ccm wäßr. Thyminsäurelösung verbr. zur Neutralisation 23.17 ccm $n/10$ -NaOH = 5.16 Äquivalente.

Die Durchführung eines entsprechenden Versuches auf dem Wasserbad ließ sich nur für wenige Stunden ermöglichen, da bald starke Dunkelfärbung auftrat. Nach 6 Stdn. wurden 6.54 Äquival. gefunden.

Entsprechende Versuche mit einem Alkaliüberschuß wurden wie folgt durchgeführt: 20 ccm einer wäßr. Thyminsäurelösung (enthaltend 0.623 g) wurden mit $n/10$ -NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert, wobei 31.96 ccm verbraucht wurden. Die Lösung wurde sodann mit 5 ccm 1.01- n -NaOH

Tafel 1.

Titration nach Stdn.	Gesamtzeit der Aufbewahrung (Tage)	verbr. $n/_{10}$ -NaOH in ccm	Zuwachs in Äquival.	Gesamtäquiv.
0	0	(23.17)	0	5.16
24	1	1.92	0.42	5.58
24	2	1.01	0.23	5.81
24	3	0.78	0.17	5.98
24	4	0.71	0.16	6.14
24	5	0.40	0.09	6.23
24	6	0.40	0.09	6.32
24	7	0.40	0.09	6.41
24	8	0.45	0.10	6.51
48	10	0.40	0.09	6.60
24	11	0.33	0.07	6.67

versetzt, auf insgesamt 100 ccm aufgefüllt und bei 37° aufbewahrt. Zur Titration wurden jeweils 10 ccm entnommen, die mit $n/_{10}$ -HCl zurücktitriert wurden, s. Tafel 2.

Tafel 2.

Titration nach Stdn.	Zeit der Aufbewahrung (Stdn.)	zurück- titriert $n/_{10}$ -HCl	verbr. $n/_{10}$ - NaOH	Zuwachs in Äquival.	Gesamtäquiv.
0	0	5.05	0	0	5.13
6	6	3.74	1.31	2.10	7.23
10	16	3.34	0.40	0.64	7.87
24	40	2.85	0.49	0.79	8.66
24	64	2.49	0.36	0.58	9.24
48	112	1.88	0.61	0.97	10.21
48	160	1.46	0.42	0.67	10.88
48	208	1.23	0.23	0.37	11.25
72	280	0.69	0.54	0.87	12.12

Nach Beendigung des Versuchs zeigte die Lösung kein Reduktionsvermögen mehr.

Zur Prüfung der Stabilität in schwach salzsaurer Lösung wurden 15 ccm wäbr. Thyminsäurelösung (Thyminsäure-Gehalt 0.4508 g) mit 30 ccm Wasser versetzt, mit NaOH neutralisiert und 10 ccm $n/_{10}$ -HCl zugegeben. Wie durch Probeentnahme von je 10 ccm festgestellt wurde, trat während der Versuchsdauer von 11 Tagen kein Aciditätszuwachs auf.

Fermentspaltung der Thyminsäure.

20 ccm Thyminsäurelösung (enthaltend 0.4440 g Thyminsäure) wurden mit n -NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert. Verbraucht wurden 2.21 ccm, entspr. 4.96 Äquivalenten. Hinzugegeben wurden 10 ccm Fermentlösung aus Süßmandeln (1%), wie sie früher⁸⁾ beschrieben wurde, und mit Acetatpuffer (p_H 4.9) auf 100 ccm aufgefüllt. Bei dem Kontrollansatz wurden

22.2 ccm Wasser, 10 ccm Fermentlösung mit Acetatpuffer auf 100 ccm aufgefüllt. Von beiden Ansätzen wurde je eine Probe von 10 ccm sofort neutralisiert und die Ansätze sodann bei 37° aufbewahrt. Zu Beginn des Versuches enthielten beide Ansätze praktisch keine freie Phosphorsäure. Nach 4 Tagen wurden weitere 3 ccm Fermentlösung zugegeben und der Ansatz mit Acetatpuffer auf das Doppelte des vor dem Fermentzusatz noch vorhandenen Volumens aufgefüllt. Zur Probe wurden je 10 ccm entnommen, die mit $n/10$ -NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert wurden. Die neutralisierte Probe wurde sodann mit 10 ccm einer 10-proz. Trichloressigsäure-Lösung versetzt, das ausgefallene Eiweiß abfiltriert, mit trichloressigsäurehaltigem Wasser ausgewaschen und die freie Phosphorsäure nach Teorell¹¹⁾ spektrophotometrisch bestimmt.

Tafel 3.

Versuchsdauer in Tagen	Verbraucht ccm $n/10$ -NaOH			Zuwachs in Äquiv.	Gesamt- äqui- valent	abgespaltener P	
	Haupt- versuch	Kontroll- versuch	Gesamt- zunahme			mg je Probe	% Ge- samt-P
0	9.48	9.83	—	—	4.97	—	—
$\frac{1}{4}$	9.90	9.72	0.53	1.20	6.17	1.295	23.6
1	10.07	9.73	0.16	0.36	6.53	2.075	37.8
2	10.23	9.79	0.10	0.225	6.76	2.680	48.9
4	10.25	9.67	0.14	0.315	7.07	3.350	61.2
Ferment- zusatz							
—	8.25	7.93	—	—	7.07	—	—
5	8.33	7.96	0.05	0.225	7.30	1.842	67.3
7	8.38	7.96	0.05	0.225	7.52	2.060	75.2
11	8.41	7.96	0.03	0.14	7.66	2.240	81.8

25. Hellmut Bredereck und Martin Köthnig: Zur Konstitution der Polynucleotide: Über die Basizität der Thymonucleinsäure (Nucleinsäuren, XIII. Mitteil.*).

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]

(Eingegangen am 19. Dezember 1938.)

Im Gegensatz zu den Ribo-nucleotiden der Hefenucleinsäure, deren Konstitution aufgeklärt ist, ist diejenige der in der Thymonucleinsäure vorliegenden Desoxyribo-nucleotide noch nicht mit Sicherheit bekannt. Man darf jedoch mit sehr großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die Phosphorsäure in diesen Desoxyribo-nucleotiden analog den Ribo-nucleotiden am C-Atom 3 der Desoxyribose sitzt. Trotz dieser Unsicherheit hat man schon seit längerer Zeit die Fragen nach der Art der Verknüpfung der einzelnen Nucleotide im Molekül der Thymonucleinsäure zu beantworten gesucht.

¹¹⁾ Biochem. Ztschr. **230**, 1; **232**, 485 [1931].

*) XII. Mitteil.: s. voranstehende Mitteil.