

Ueber Nucleïnsäure und Thyminsäure.

Von

A. Kossel und Albert Neumann.

Durch die Untersuchungen des einen von uns ist erwiesen, dass man zwei Gruppen von Nucleïnstoffen unterscheiden muss. Die der ersten Gruppe zugehörigen Substanzen zerfallen unter Bildung der Nucleïnbasen, die Substanzen der zweiten Gruppe enthalten diesen Atomcomplex nicht¹⁾. Die letzteren wurden von A. Kossel unter dem Namen «Paranucleïne» den ersteren — den «Nucleïnen» gegenübergestellt²⁾. Hammarsten hat statt der Bezeichnung Paranucleïn³⁾ das Wort «Pseudonucleïn» gewählt.

Miescher, der Entdecker der Nucleïne, fand in dem Nucleïn des Lachssperma eine eiweissfreie Substanz, welche man später mit dem Namen «Nucleïnsäure» bezeichnet hat⁴⁾. Die Untersuchung dieser Substanz wurde zunächst von Altmann⁵⁾, (später von A. Kossel⁶⁾) und sodann von uns beiden fortgesetzt⁷⁾. Altmann erwies die allgemeine Verbreitung

¹⁾ A. Kossel: Untersuchung über die Nucleïne und ihre Spaltungsproducte. Strassburg, Trübner 1881, S. 12.

²⁾ E. du Bois-Reymond's Archiv für Physiologie 1891, S. 182 bis 183.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 19, S. 37

⁴⁾ Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft zu Basel 1874. Bd. 6, S. 138.

⁵⁾ Archiv f. Anatomie u. Physiologie, Physiol. Abth., 1889, S. 525.

⁶⁾ Ebenda 1891, S. 184; 1893, S. 157.

⁷⁾ Berichte der dtsh. ch. Ges., Bd. 26, S. 2753; Bd. 27, S. 2215. Sitzungsbericht d. Kgl. Preuss. Akademie d. Wissenschaften, 12. April 1894. S. 321.

der Nucleinsäure und zeigte, dass dieselbe im Stande ist, in sauren Lösungen von Eiweiss einen Niederschlag zu erzeugen. Es ergab sich aus diesen Befunden, dass die Nucleine als Verbindungen von Nucleinsäuren und Eiweiss zu betrachten sind. Einzelne Nucleine können in der That leicht in Nucleinsäure und Eiweiss zerlegt werden, während andere nur wenig oder gar keine Nucleinsäure liefern. Die Untersuchungen des einen von uns haben nun ferner ergeben, dass die Nucleinbasen, welche bei der Zersetzung der Nucleine entstehen, dem Atomcomplex der Nucleinsäure angehören, denn die Nucleinsäure der Hefe ergab bei der Einwirkung verdünnter Säuren eine reichliche Menge von Adenin, Guanin, Xanthin und Hypoxanthin¹⁾.

Aus der Thatsache, dass einzelne Nucleine leicht in eine organische phosphorhaltige Säure (Nucleinsäure) und Eiweiss zerlegt werden können, ergibt sich die Frage, ob nicht auch die Paranucleine in ähnlicher Weise zusammengesetzt sind. Entsteht bei der Zerlegung der Paranucleine eine organische Säure, welche als Analogon der Nucleinsäure aufgefasst werden muss, welche ebenso wie diese sich mit Eiweiss verbindet und als deren Eiweissverbindungen die Paranucleine zu betrachten sind? Oder ist in den Paranucleinen die Phosphorsäure direct an die Eiweisskörper angefügt?

In der That gibt es einige Beobachtungen, welche als Stütze für die erste Auffassung angeführt werden können. Altmann stellte aus dem Eidotter eine Säure dar, welche er für Nucleinsäure hielt. Nun kann aber diese Säure aus dem Eidotter nicht hervorgehen, da ihre Spaltungsproducte, die Nucleinbasen, in dem zersetzten Dotter nicht aufzufinden sind. Es ist also wahrscheinlich, dass Altmann hier eine andere ähnliche Säure in Händen gehabt hat, welche sich durch das Fehlen der Nucleinbasen von der Nucleinsäure unterscheidet. Da eine solche Säure zu den Paranucleinen in einem ähnlichen Verhältniss stehen würde, wie die Nucleinsäure zum Eiweiss, so würde die Bezeichnung «Paranuclein-

¹⁾ Archiv f. Anatomie u. Physiologie. Physiol. Abth., 1891, S. 184.

säure» für diese hypothetische Säure gerechtfertigt sein. Andeutungen für die Existenz einer derartigen Säure können auch aus den Versuchen von C. Willdenow¹⁾ abgeleitet werden, welche aus dem Paranuclein des Caseins eine eiweissfällende phosphorhaltige Substanz darstellte. Wenn nun auch wirklich die Richtigkeit dieser Vermuthung in einzelnen Fällen erwiesen wird, so ist damit die zweite oben erwähnte Möglichkeit nicht ausgeschlossen. Es ist wohl möglich, dass unter dem Namen «Paranucleine» verschiedenartige Stoffe zusammengefasst werden, deren einer Theil aus Eiweiss und Paranucleinsäure zusammengesetzt ist, während der andere Theil eine directe Verbindung von Eiweiss mit irgend einer Phosphorsäure darstellt. Für die letztere Annahme liegen aber bisher noch keine beachtenswerthen Gründe vor.

Bei unseren Untersuchungen über die Zersetzungsproducte der Nucleinsäure haben wir, wie schon früher²⁾ kurz mitgetheilt, eine Substanz dargestellt, deren Eigenschaften solche sind, wie man sie von der «Paranucleinsäure» voraussetzen müsste. Wir haben diesen Körper deswegen Paranucleinsäure genannt, während wir mit dem Namen «Thyminsäure» ein zweites Spaltungsproduct bezeichneten. Da sich nun bei weiteren Versuchen die Identität dieser beiden Producte herausgestellt hat³⁾, so lassen wir die Bezeichnung «Paranucleinsäure» für das Spaltungsproduct der Thyminsäure ganz fallen und reserviren diese Benennung für die aus Paranucleinen entstehenden Stoffe.

Die Thyminsäure entsteht also, wenn die Nucleinbasen aus der Nucleinsäure abgespalten werden. Hierbei findet keine Bildung anderer Spaltungsproducte und besonders keine Abspaltung von Phosphorsäure statt. Die Kenntniss dieser Thyminsäure kann also in zweifacher Hinsicht wichtig

1) Cl. Willdenow: Zur Kenntniss der peptischen Verdauung des Caseins. Inaug.-Diss., Bern 1893.

2) Berichte der deutsch. chem. Ges., Bd. 26, S. 2754.

3) Die Existenz zweier verschiedener Substanzen wurde dadurch vorgetäuscht, dass die Eiweissfällung durch Thyminsäure in unreiner salzhaltiger Lösung ausbleibt.

sein, erstens da sie als das nächste Abbauprodukt der Nucleinsäure für die Constitution dieser Säure massgebend ist und zweitens da sie möglicherweise identisch sein kann mit der in den Paranucleinen (oder in gewissen Paranucleinen) enthaltenen prosthetischen Gruppe. Die Prüfung dieser letzteren Vermuthung muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. In der vorliegenden Abhandlung wollen wir die Spaltung der Thymusnucleinsäure und die Eigenschaft der hierbei entstehenden Thyminsäure beschreiben, und daran eine Vergleichung der Eigenschaften der Thymusnucleinsäure mit denen der Thyminsäure anschliessen.

I. Spaltung der Thymusnucleinsäure in die Thyminsäure und die Nucleinbasen (Adenin, Guanin und Cytosin).

In einer früheren Mittheilung haben wir die von uns ausgearbeitete Methode zur Gewinnung der Nucleinsäure aus Thymus veröffentlicht¹⁾. Wir haben der auf diese Weise gewonnenen Säure den Namen «Adenylsäure» gegeben, weil wir, gestützt auf frühere Versuche, annahmen, dass bei der Zersetzung derselben nur Adenin und keine anderen Nucleinbasen entstehen. Nachdem die neue Methode uns grössere Mengen Material geliefert hatte, haben wir diese Spaltungsversuche wiederholt und jetzt zeigte sich, dass ausser dem Adenin noch Guanin und eine neuerdings von uns beschriebene Base das «Cytosin» neben der Thyminsäure gebildet wird. Die nach unserem Verfahren aus Thymus dargestellte Säure kann daher nicht als Adenylsäure bezeichnet werden, und wir werden deshalb für sie die Benennung «Thymusnucleinsäure» benutzen.

Die Spaltung der Thymusnucleinsäure durch Wasser wird in folgender Weise bewirkt.

Man erwärmt auf einem Wasserbade 500 ccm. Wasser in einem Becherglase. Wenn die Wasserbadtemperatur erreicht ist, so gibt man 10 gr. Thymusnucleinsäure in der Weise hinzu, dass Nichts an den Wandungen des Gefässes hängen bleibt, erhitzt etwa 10 Minuten unter Umrühren weiter-

¹⁾ Ber. der deutschen chemischen Gesellsch., Bd. 27, S. 2215.

hin auf dem Wasserbade und giesst die trübe Flüssigkeit durch ein Faltenfilter.

Man prüft nun das Filtrat, indem man eine Probe desselben im Reagensglase mit 1 Tropfen Salzsäure versetzt. Es darf kein Niederschlag von Nucleinsäure entstehen, sonst hat man zu kurze Zeit erhitzt und muss die Flüssigkeit für einige Minuten aufs Wasserbad zurückbringen. Darauf fügt man zu der Probe Barytwasser im Ueberschuss, es darf sich kein Baryumphosphat abscheiden, sonst hat man zu lange erhitzt und ein Theil der Thyminsäure ist unter Abspaltung von Phosphorsäure weiter zerlegt worden. Man setzt zu dem Filtrat kalt gesättigtes Barytwasser bis zur bleibend schwach alkalischen Reaction hinzu und lässt bis zum nächsten Tage stehen. Die Flüssigkeit trübt sich langsam und scheidet sämtliches Guanin (vermischt mit Baryumcarbonat) ab, während Adenin, Cytosin und Thyminsäure in Lösung bleiben. Man filtrirt den Niederschlag ab und löst ihn in geringem Ueberschuss heisser verdünnter Schwefelsäure. Aus der filtrirten und eingeengten Lösung krystallisirt das Guaninsulfat heraus, welches in Wasser gelöst und durch Ammoniaklösung in die freie Base übergeführt wird. Diese ergab bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl folgende Werthe:

Gefunden: 46,17% N Berechnet für $C_5H_5N_5O$: 46,35.

Die Ausbeute an Guanin betrug 0,6 gr. Guanin aus 10 gr. Nucleinsäure.

Die vom Guanin abfiltrirte Lösung, welche Adenin, Cytosin und thyminsauren Baryt enthält, wird in die 1 $\frac{1}{2}$ fache Menge Alkohol hineingegossen.

Entsteht kein Niederschlag, sondern nur eine milchige Trübung, so fügt man einige Tropfen einer wässrigen Lösung von Chlorbaryum hinzu. Man lässt bis zum nächsten Tage stehen, damit das durch das Erhitzen auf dem Wasserbade abgespaltene Adenin und Cytosin vollständig in den Alkohol hineingehen. Der thyminsaure Baryt hat sich in etwas klebrigen Massen am Boden des Gefässes abgeschieden. Die Lösung wird abgegossen und kann sodann durch ein Faltenfilter klar abfiltrirt werden. Die Flüssigkeit wird eingedampft,

es bleibt Adenin und Cytosin neben Barytsalzen zurück. Man fällt zunächst den Baryt durch H_2SO_4 , sodann das Adenin mit ammoniakalischer Silberlösung in der Wärme völlig heraus. Nach dem Filtriren trübt sich die Anfangs klare Flüssigkeit, wenn sie die genügende Concentration besitzt und es scheidet sich Cytosinsilber ab, welches leicht in krystallisirtem Zustand dargestellt werden kann. Das Cytosin kann aus dieser Silberverbindung in Freiheit gesetzt und leicht an seinen früher beschriebenen Eigenschaften¹⁾ erkannt werden.

Das Adenin wurde durch Behandlung der Silberverbindung mit heisser verdünnter Salzsäure in das Chlorhydrat übergeführt, die vom Chlorsilber abfiltrirte Lösung zur Trockne verdunstet, die Menge des zurückbleibenden Chlorhydrates betrug 1,5 gr., dies entspricht 1,2 gr. Adenin aus 10 gr. Nucleinsäure. Das Chlorhydrat wurde nun in das Sulfat übergeführt, eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl erwies die vollkommene Reinheit des Präparats.

Gefunden:

35,32 % N.

Berechnet

für $(C_5H_5N_5)_2H_2SO_4 + 2H_2O$:

35,53 % N.

Die abgeschiedenen klebrigen Massen des thyminsauren Baryts werden im Gefäss mit Alkohol ausgewaschen und sodann in etwa 200 ccm. Wasser gelöst. Diese Lösung giesst man in die 3fache Menge Alkohol und fügt nöthigenfalls etwas Chlorbaryum hinzu, um eine vollständige Abscheidung des Niederschlages zu bewirken. Man wiederholt dies Umlösen so lange, bis man eine rein weisse pulverige Fällung erhält.

II. Eigenschaften und Zusammensetzung des thyminsauren Baryts.

Der durch Alkohol gefällte thyminsaure Baryt enthält Wasser, welches derselbe beim Erhitzen auf 100° langsam verliert. Er ist in Wasser leicht löslich. Im wasserfreien Zustand ist das Salz äusserst hygroskopisch, wodurch die Analyse sehr erschwert wird. Die Substanz zieht selbst

¹⁾ Ber. d. dtsh. chem. Ges., Bd. 27, S. 2219.

im Exsiccator mit Chlorcalcium Wasser an. Eine grössere Anzahl Analysen ergab schwankende Zahlen, welche hauptsächlich auf den wechselnden Wassergehalt zurückzuführen sind, im Wesentlichen aber ein constantes Verhältniss der einzelnen Bestandtheile erkennen liessen. Nach mehreren Versuchen gelang es, zwei verschiedene Präparate zu analysiren, welche übereinstimmende Zahlen ergaben.

Präparat I.

1. 0,1955 gr. Substanz erforderten 9 cbem. $\frac{1}{10}$ Norm.-Säure.
2. 0,4390 » » ergaben 0,161 gr. BaSO_4 und 0,150 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$.
3. 0,2055 » » » 0,223 gr. CO_2 und 0,072 gr. H_2O .

Präparat II.

1. 0,265 gr. Substanz erforderten 12,25 cbem. $\frac{1}{10}$ Norm.-Säure.
2. 0,4825 » » ergaben 0,173 gr. BaSO_4 und 0,166 gr. $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$.
3. 0,202 » » » 0,2185 gr. CO_2 und 0,068 gr. H_2O .

Diese Resultate führen zu der Formel $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{P}_2\text{O}_{12}\text{Ba}$.

	Gefunden:		Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{P}_2\text{O}_{12}\text{Ba}$:
	I.	II.	
C	29,58	29,50	29,63
H	3,89	3,74	3,56
N	6,44	6,47	6,48
P	9,54	9,61	9,57
Ba	21,56	21,09 21,01	21,13

III. Vergleichung der Eigenschaften der Thymusnucleinsäure mit denen der Thyminsäure.

1. Thyminsäure ist in kaltem Wasser leicht löslich, Nucleinsäure ist schwer löslich.

2. Thyminsäure wird durch Mineralsäuren aus ihrer wässrigen Lösung nicht herausgefällt, Nucleinsäure wird gefällt.

3. Nucleinsäure und Thyminsäure geben in essigsaurer Lösung mit Eiweiss- oder Propeptonlösung eine Fällung. Der Niederschlag mit Nucleinsäure ist in Salzsäure schwer löslich oder unlöslich, während die durch Thyminsäure erzeugte Fällung von Salzsäure und den Lösungen vieler Salze leicht gelöst wird.

Die Auffindung der Thyminsäure könnte zu der Vermuthung führen, dass die Bindung der Nucleinbasen in der

Nucleinsäure eine salzartige sei, dass also die Nucleinsäure ein saures Salz der Thyminsäure und der Nucleinbasen sei. Man kann diese Annahme nicht etwa dadurch widerlegen, dass man zu einer Lösung von Nucleinsäure ammoniakalische Silberlösung oder wässrige Quecksilberchloridlösung hinzufügt und nachweist, dass durch diese Reagentien kein Niederschlag hervorgerufen werden kann. Diese Nichtfällbarkeit der Nucleinbasen durch Metallsalze kann nicht als Beweis gegen ihre salzartige Bindung angeführt werden, denn die Thyminsäure, der man eine geringe Menge von Nucleinbasen hinzugefügt hat, verhält sich ebenso. Nucleinsäure und Thyminsäure verhindern bis zu einem gewissen Grade die Ausfällung der Basen durch Metallsalze.

Indessen kann man durch eine andere Reaction mit Sicherheit feststellen, dass die Nucleinsäure keine salzartig gebundenen Nucleinbasen enthält. Man löst die Nucleinsäure in klarem Barytwasser in der Kälte auf, fällt den nucleinsäuren Baryt mit Alkohol, filtrirt den Alkohol ab und dunstet ein. In dem Filtrat lässt sich keine Spur der Nucleinbasen nachweisen, weder durch Quecksilberchlorid, noch durch ammoniakalische Silberlösung.

Stellt man die gleiche Reaction mit thyminsaurem Adenin oder Guanin an, oder auch mit einer Lösung von Nucleinsäure, aus der man vorher durch Erhitzen mit Wasser die Basen in Freiheit gesetzt hat, so gelingt der Nachweis der Basen leicht und sicher.

Dies Verfahren bietet also eine Möglichkeit, geringe Spuren von Nucleinbasen, welche in freiem Zustande oder als Salze den Nucleinsäuren beigemischt sind, zu erkennen.

Die Nucleinbasen sind demnach, wie schon früher hervorgehoben, in organischer und nicht in salzartiger Bindung in der Nucleinsäure enthalten. Beim Erhitzen der freien Nucleinsäure mit Wasser spalten sie sich ab. Die Nucleinsäure ist also eine gepaarte Verbindung, deren Salze ziemlich beständig sind, die aber als freie Säure, ähnlich wie die Phenolschwefelsäure Baumann's, sehr leicht der Zersetzung anheimfällt.