

Stoff gab mit Perhydro-pyrocalciferol-acetat vom Schmp. 135° und  $[\alpha]_D^{20}$ : +26.1° keine Depression.

18.2 mg Sbst., 2 ccm Chloroform,  $l = 1$  dm,  $\alpha$ : +0.24°,  $[\alpha]_D^{20}$ : +26.38°.

2.275 mg Sbst.: 6.750 mg CO<sub>2</sub>, 2.370 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>. Ber. C 81.00, H 11.79. Gef. C 80.94, H 11.66.

Beim Verseifen des Acetats mit methylalkohol. Kalilauge wird der entsprechende Alkohol vom Schmp. 129—130° erhalten. Die Drehung beträgt  $[\alpha]_D^{20}$ : +34.6°. Mit Hexahydro-pyro-calciferol vom Schmp. 130° gab das vollständig hydrierte Dehydro-lumisterin keine Depression. Auch die spezifische Drehung beider Stoffe stimmt überein. Perhydro-pyro-calciferol:  $[\alpha]_D^{20}$ : +34.35° (Chloroform).

11.0 mg Sbst., 2 ccm Chloroform,  $l = 1$  dm,  $\alpha$ : +0.195°,  $[\alpha]_D^{20}$ : +34.6°.

„Pinakon“ aus Dehydro-lumisterin.

100 mg reines Dehydro-lumisterin-acetat werden in Alkohol gelöst und mit 90 mg Eosin in Alkohol versetzt. Nach dem Auskochen der Mischung wird das Glas zugeschmolzen und in die Sonne gestellt. Schon nach wenigen Min. fällt ein kristalliner Niederschlag aus, und nach einigen Std. ist die Lösung entfärbt. Das Reaktionsprodukt kann aus Chloroform-Alkohol umkristallisiert werden, es schmilzt bei 183—184°.

4.698 mg Sbst.: 14.260 mg CO<sub>2</sub>, 4.150 mg H<sub>2</sub>O.

C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>. Ber. C 82.69, H 9.73. Gef. C 82.78, H 9.83.

Hrn. Prof. Dr. Windaus bin ich für die Leitung und Unterstützung meiner Versuche zu großem Dank verpflichtet.

Der I.-G. Farbenindustrie-Aktiengesellschaft, Werk Elberfeld, und der Chemischen Fabrik E. Merck, Darmstadt, danke ich für das zur Verfügung gestellte Ergosterin.

## 209. Hellmut Bredereck und Gerd Richter: Nucleinsäuren, V. Mitteil.<sup>1)</sup>: Hydrolytische Spaltungen an Hefe-Nucleinsäure.

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

(Eingegangen am 18. April 1936.)

Nachdem durch die Untersuchungen von Levene<sup>2)</sup> sowie von Bredereck<sup>3)</sup> die Konstitution der 4 Mononucleotide der Hefe-Nucleinsäure, Guanyl-, Adenyl-, Cytidyl- und Uridylsäure, sichergestellt ist, bleiben zur Aufklärung der Konstitution des Gesamt-Hefenucleinsäure-Moleküls die folgenden Fragen zu beantworten: 1) Durch welche Art von Bindung, 2) in welcher Reihenfolge sind die 4 Mononucleotide zum Hefe-Nucleinsäure-Molekül zusammengefügt. Auf Grund von Titrationsversuchen hat man in den letzten Jahren<sup>4)</sup> vorläufige Formeln für Hefe-Nucleinsäure aufgestellt.

<sup>1)</sup> IV. Mitteil., Ztschr. physiol. Chem. **224**, 79 [1934].

<sup>2)</sup> Journ. biol. Chem. **94**, 809, **95**, 705, **97**, 491, **98**, 9 [1932]; **101**, 413 [1933].

<sup>3)</sup> B. **65**, 1830 [1932]; **66**, 198 [1933]; Ztschr. physiol. Chem. **228**, 61, **224**, 79 [1934].

<sup>4)</sup> z. B. Levene u. Tipson, Journ. biol. Chem. **109**, 623 [1935]; Makino, Ztschr. physiol. Chem. **232**, 229 [1935].

In ihnen ist als Verknüpfung zwischen den einzelnen Nucleotiden eine Bindung zwischen der Phosphorsäure-Gruppe eines Nucleotids mit einem Zucker-Hydroxyl des nächsten Nucleotids angenommen. Titrations allein lassen aber einen eindeutigen Schluß auf die Bindungen der Nucleotide untereinander nicht zu und scheiden völlig aus für die Beantwortung der Frage nach der Reihenfolge der einzelnen Nucleotide. Der Weg, der allein zum Ziele führen kann, ist der, daß man versucht, durch vorsichtige Hydrolyse die Hefe-Nucleinsäure, die ja ein „Tetranucleotid“ darstellt, zu Tri- und Dinucleotiden abzubauen und diese kleinen Bruchstücke hinsichtlich ihrer Bindungsverhältnisse aufzuklären.

Durch Hydrolyse der Hefe-Nucleinsäure mittels verd. Schwefelsäure bzw. verd. Alkali oder Ammoniak (unter Druck) werden die Bindungen zwischen den einzelnen Nucleotiden gelöst. Eine partielle Hydrolyse war daher, wenn überhaupt, so nur beim Arbeiten in schwächer saurem bzw. schwächer alkalischem Milieu zu erwarten.

In der vorliegenden Arbeit sind Spaltungsversuche in schwächer saurem Medium beschrieben: Hefe-Nucleinsäure (Boehringer) wurde in Wasser gekocht. Beim Erkalten schied sich eine Substanz aus, aus der nach eingehender Reinigung Guanin-uridylsäure isoliert wurde. Für Vorliegen der Guanin-uridylsäure sprechen die folgenden Ergebnisse:

1) Analysen:

Ber. C 36.75, H 3.53, N 21.44, P 6.79.  
Gef. „ 37.20, 37.11, „ 3.98, 4.10, „ 21.69, „ 6.61.

2) Die Prüfung auf Purine nach der Methode von Levene<sup>5)</sup> — Überführung in die Chlorhydrate durch Einleiten von Chlorwasserstoff in eine methylalkohol. Aufschlammung der zu prüfenden Substanz — zeigt lediglich die Anwesenheit von Guanin an.

3) Die Hydrolyse mit 3.8-proz. Schwefelsäure liefert Guaninsulfat und Uridylsäure, die als Brucinsalz isoliert und identifiziert wurde.

4) Die Hydrolyse mit 3-proz. Natronlauge liefert Guanin und Uridylsäure.

5) Einwirkung von Mandel-Emulsin ( $\beta$ -Glucosidase-Wert 7.5) bei  $p_H$  4.9 führt zur Abscheidung von Guanin. Primär findet dabei, wie aus Untersuchungen von Bredereck und Beuchelt<sup>6)</sup> hervorgeht, Abspaltung der Phosphorsäure aus der Uridylsäure statt. Das dabei freiwerdende Guaninphosphat zerfällt sofort weiter in Guanin und Phosphorsäure.

Daß Guanin-uridylsäure eine Verbindung und kein Gemenge von Guanin und Uridylsäure darstellt, ergibt sich aus folgenden Versuchen:

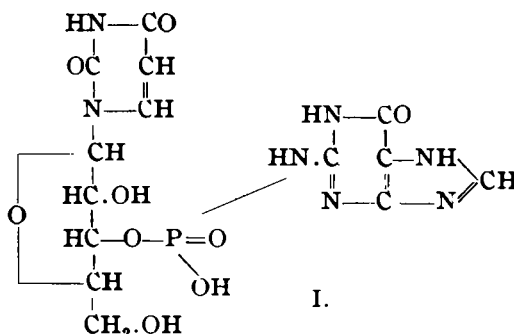
1) Die Substanz ist in Wasser verhältnismäßig gut löslich. Aus einem künstlich bereiteten Gemenge von Guanin und Uridylsäure läßt sich lediglich die Uridylsäure herauslösen. Guanin bleibt ungelöst. Erst bei längerem Kochen der Guanin-uridylsäure in Wasser (bis 20 Stdn.) tritt Hydrolyse unter Abscheidung von Guanin ein. Ebenfalls tritt Hydrolyse durch Stehenlassen in ammoniakalischer Lösung bei Zimmertemperatur ein. 2) Die Verbindung gibt in wäßriger Lösung kein Guaninpikrat. 3) Die Verbindung gibt kein Brucinsalz. Freie Uridylsäure müßte ein Brucinsalz geben.

<sup>5)</sup> Journ. biol. Chem. **53**, 441 [1922].

<sup>6)</sup> Naturwiss. **24**, 107 1936.

Die Konstitution der Guanin-uridylsäure ergibt sich aus folgendem: Die Titration mit Alkali gegen Phenolphthalein als Indicator zeigt das Vorliegen einer einbasischen Säure an. Die Bindung zwischen Guanin und Uridylsäure erfolgt daher über die Phosphorsäure-Gruppe. Die Desaminierung der Guanin-uridylsäure und anschließende Hydrolyse mit verd. Schwefelsäure liefern Guanin und Uridylsäure. Die  $\text{NH}_2$ -Gruppe des Guanins ist also nicht frei, vielmehr mit der Phosphorsäure-Gruppe der Uridylsäure verbunden. Wäre sie frei gewesen, so hätte man nach Desaminierung und Hydrolyse Xanthin und Uridylsäure erhalten müssen. Xanthin wurde jedoch in keinem Fall gefunden.

Somit ergibt sich für Guanin-uridylsäure Formel I.



Die größere Labilität der Glykosid-Bindung in den Purin-Nucleotiden gegenüber den Pyrimidin-Nucleotiden erklärt die Sprengung der Glykosid-Bindung in der Guanylsäure-Komponente, während sie in der Uridylsäure unangegriffen bleibt.

Für die Konstitution der Hefe-Nucleinsäure folgt daraus, daß Uridyl- und Guanylsäure durch eine P—N-Bindung miteinander verknüpft sind, und weiter, daß die beiden Nucleotide benachbart stehen.

Die weitere Aufarbeitung des Filtrates der Guanin-uridylsäure führte zur Isolierung bzw. Nachweis folgender Substanzen: Guanin, Adenin, Uridylsäure, Cytidylsäure, Ribose und Phosphorsäure. Guanin und Uridylsäure stammen aus der während des Kochens bereits gespaltenen Guanin-uridylsäure.

Die Chemie der Nucleinsäuren ist bisher reich an Irrtümern gewesen. Insbesondere haben sich alle Angaben über Isolierung größerer Bruchstücke, als es die Mononucleotide darstellen, stets als irrtümlich erwiesen. Wenn wir in diesem Fall doch glauben, erstmals ein größeres Bruchstück isoliert zu haben, so gründet sich diese Annahme auf die vorstehend angeführten eingehenden quantitativen und qualitativen Versuche.

Für die Verknüpfung der anderen Nucleotide untereinander im Hefe-Nucleinsäure-Molekül ist möglicherweise mit weiteren P—N-Bindungen zu rechnen. Weiteren Einblick in das komplizierte Molekül gewähren Hydrolysen in schwach alkalischem Medium, die gegenwärtig noch im Gange sind.

Die Durchführung dieser Untersuchungen wurde ermöglicht durch Unterstützung von Seiten der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie des Universitätsbundes an der Universität Leipzig, denen beiden

wir zu großem Dank verpflichtet sind. Die benötigten Mengen Hefe-Nucleinsäure hat uns, wie stets bisher, die Firma C. F. Boehringer (Mannheim-Waldhof) dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

### Beschreibung der Versuche.

Hydrolyse der Hefe-Nucleinsäure mit Wasser.

Darstellung der Guanin-uridylsäure: 100 g Hefe-Nucleinsäure (Boehringer) werden in 600 ccm. Wasser unter häufigem Umschwenken auf dem Wasserbade gelöst (etwa 1 Stde.). Von wenigen ccm einer öligen Flüssigkeit wird abgessogen und die Lösung  $2\frac{1}{2}$  Stdn. am Rückflußkühler gekocht. Die klare, gelbbraune Flüssigkeit läßt man bei Zimmertemperatur erkalten und stellt sie noch 1 Stde. in Eiswasser. Der Niederschlag wird abgesaugt und 3-mal mit Eiswasser ausgewaschen. Ausbeute an trockner Substanz 12 g. Zweckmäßig verarbeitet man die noch feuchte Substanz weiter, indem man sie mit 70 ccm Wasser gut verreibt und die Aufschlammung zu 55 ccm Wasser von 90° gibt. Die gesamte Flüssigkeitsmenge wird auf 80° erwärmt, dann läßt man auf 50° abkühlen und saugt von ungelöster bzw. wieder ausgefallener Substanz ab. Das Filtrat wird 1 Stde. in Eiswasser aufbewahrt, die dabei ausgefallene Guanin-uridylsäure abgesaugt, mit Eiswasser ausgewaschen, in 15 ccm Wasser verrieben und zu 15 ccm Wasser von 98° gegeben. Die Lösung wird noch kurz weiter erwärmt, bis sich fast alles gelöst hat, und dann auf 55° erkalten gelassen. Durch eine vorgewärmte Nutsche wird abgesaugt und das Filtrat 1 Stde. in Eiswasser aufbewahrt. Zur Analysenreinheit wird die ausgefallene Substanz (1.75 g) noch ein 3. Mal umgefällt: Dazu wird sie in 5 ccm Wasser von 95° gelöst; sobald beim Abkühlen die Abscheidung beginnt, wird durch eine vorgewärmte Nutsche abgesaugt und das Filtrat 1 Stde. in Eiswasser aufbewahrt. Die ausgefallene Substanz wird abgesaugt, 2-mal mit Eiswasser, dann zum Trocknen mit Alkohol und Äther gewaschen. Ausbeute 0.3 g.

Zur Analyse wird bei 100° und 2 mm über Phosphorpentoxyd getrocknet. Die Substanz ist hygroskopisch und schwer verbrennlich.

5.285 mg Sbst.: 7.210 mg CO<sub>2</sub>, 1.880 mg H<sub>2</sub>O. — 5.130 mg Sbst.: 6.980 mg CO<sub>2</sub>, 1.880 mg H<sub>2</sub>O. — 3.628 mg Sbst.: 0.677 ccm N (18°, 753 mm). — 4.139 mg Sbst.: 18.83 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>[PO<sub>4</sub>(MoO<sub>3</sub>)<sub>12</sub>].

C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>9</sub>N<sub>7</sub>P (457.2). Ber. C 36.75, H 3.53, N 21.44, P 6.79.

Gef. „ 37.20, 37.11, „ 3.98, 4.10, „ 21.69, „ 6.61.

Titration (Indicator: Phenolphthalein):

0.2001 g Sbst. in 120 ccm Wasser: 5.22 ccm NaOH (0.0874-n.); ber. 5.01 ccm.

0.1916 g „ „ 120 ccm „ : 4.95 ccm „ (0.0874-n.); „ 4.80 ccm.

3-mal umgefällte Guanin-uridylsäure ist verhältnismäßig gut in kaltem Wasser löslich. Die wäbr. Lösung gibt mit wäbr. Pikrinsäure-Lösung keine Fällung von Guanin-pikrat, mit alkohol. Brucin-Lösung erfolgt keine Abscheidung von uridylsaurem Brucin. Bei 20-stdg. Kochen einer wäbr. Lösung (0.3 g in 40 ccm Wasser) scheiden sich 0.08 g Guanin ab. Im Filtrat läßt sich Uridylsäure als Brucinsalz nachweisen. Eine Lösung von Guanin-uridylsäure in verd. Ammoniak scheidet nach mehrstdg. Aufbewahren bei Zimmertemperatur Guanin ab.

Versuche mit Guanin-uridylsäure.

1) Saure Hydrolyse: 1 g Substanz wird in 10 ccm 3.8-proz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 Stdn. im Ölbad von 105—110° erwärmt. Beim Abkühlen der Lösung

scheidet sich der größte Teil des Guanins als Sulfat ab. Der Rest wird aus der Lösung durch Zugabe von Silberoxyd entfernt. Die weitere Aufarbeitung folgt den Angaben von Levene<sup>7)</sup>. An uridylsaurem Brucin wurden 0.2 g erhalten. Schmp. der einmal aus 35-proz. Alkohol umkrystallisierten Substanz 182—191°.

$[\alpha]_D^{20} = -0.45^{\circ} \times 1.8393/0.0306 \times 0.5 \times 0.98 = -55.2^{\circ}$  (in Pyridin); nach Levene<sup>8)</sup>:  
 $[\alpha]_D^{21} = -55.9^{\circ}$  (in Pyridin).

2) Alkalische Hydrolyse: 1 g Substanz wird in 5 ccm 3-proz. Natronlauge 2 Stdn. auf dem Wasserbade erwärmt. Dabei fällt schon ein Teil des Guanins aus, dessen Abscheidung durch Neutralisation mit Essigsäure und Stehenlassen über Nacht vervollständigt wird. Das Guanin wird abzentrifugiert und mit Wasser ausgewaschen. Ausbeute 0.3 g. Das Filtrat der Guanin-Fällung wird mit 25-proz. Bleiacetat-Lösung versetzt, das Bleisalz mit H<sub>2</sub>S zerlegt und das Brucinsalz der Uridylsäure hergestellt. Ausbeute 0.4 g.

$[\alpha]_D^{20} = -0.46^{\circ} \times 1.8503/0.0307 \times 0.5 \times 0.98 = -56.6^{\circ}$  (in Pyridin).

3) Fermentative Hydrolyse: 0.4 g Substanz in 5 ccm Wasser werden mit 2 ccm kalter *n*-NaOH versetzt. Zu der noch schwach sauer reagierenden Lösung werden 11 ccm Acetatpuffer-Lösung (p<sub>H</sub> = 4.9), 2 ccm einer 1-proz. Mandel-Emulsin-Lösung (β-Glucosidase-Wert 7.5) und einige Tropfen Toluol zugegeben. Nach 2-tägigem Aufbewahren bei 37° wird das Guanin abzentrifugiert und als solches identifiziert. Im Filtrat läßt sich freie Phosphorsäure nachweisen. Unter gleichen Bedingungen zeigt sich im Parallelversuch ohne Emulsin keine Abscheidung von Guanin und Phosphorsäure.

4) Prüfung auf Purine: 0.2 g Substanz werden in 2 ccm 95-proz. Methylalkohol aufgeschlämmt. Durch die Aufschlammung wird 2 Stdn. trockner Chlorwasserstoff durchgeleitet. Die Guanin-uridyssäure geht zunächst in Lösung, dann fällt Guanin-Chlorhydrat aus. Nach Stehenlassen über Nacht wird das Chlorhydrat abgesaugt, mit 95-proz. Methylalkohol, der mit Chlorwasserstoff gesättigt ist, ausgewaschen, anschließend noch mit absol. Alkohol und Äther. Das Chlorhydrat wird in 3 ccm Wasser gelöst und mit Natronlauge versetzt, bis die Lösung kongo-neutral ist. Dabei fällt das gesamte Guanin aus. Das Filtrat gibt mit Pikrinsäure keine oder höchstens eine schleierartige Trübung von Adeninpikrat. Guanin-uridyssäure mit einem Gehalt von etwa 3% Adenin gibt noch einen dicken Niederschlag von Adeninpikrat.

5) Desaminierungsversuch: 1.5 g Substanz werden in 15 ccm Wasser aufgeschlämmt, 3 g Natriumnitrit zugegeben und unter Schütteln tropfenweise mit 3.6 ccm Eisessig versetzt. Das Reaktionsgemisch wird unter öfterem Umschütteln 1 Stde. in Eiswasser, dann noch kurze Zeit bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die fast klare Lösung wird filtriert und das Filtrat unter Schütteln mit 50 ccm Alkohol versetzt. 0.5 g der Fällung, die noch Natriumacetat enthält, werden der Prüfung auf Purine unterworfen (s. unter 4). Ausbeute: 0.11 g Guanin. Die schwefelsaure Hydrolyse (s. unter 1) der Alkohol-Fällung liefert Guaninsulfat und Uridylsäure, die als Brucinsalz isoliert und identifiziert wurde:  $[\alpha]_D^{20} = -56.6^{\circ}$  (in Pyridin).

7) B. 44, 1027 [1911].

8) Journ. biol. Chem. 106, 122 [1934].