

**68. Hellmüt Bredereck: Nucleinsäuren, VI. Mitteil.<sup>1)</sup>: Darstellung der Nucleoside durch enzymatische Hydrolyse der Hefenucleinsäure; zugleich ein Beitrag zur Darstellung der *d*-Ribose.**

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

(Vorgetragen in d. Sitzung d. Deutschen Chemischen Gesellschaft am 10. Jan. 1938; eingegangen am 14. Januar 1938.)

P. A. Levene und W. A. Jacobs<sup>2)</sup> gelang es 1910, die Hefenucleinsäure durch  $3\frac{1}{2}$ -stdg. ammoniakalische Hydrolyse im Autoklaven bei 175—180° (Außentemperatur) zu den Nucleosiden aufzuspalten. Damit waren die Nucleoside zum ersten Male zugänglich geworden. Sehr geringe Ausbeuten, langwierige und komplizierte Aufarbeitungsmethoden machten jedoch die Nucleoside zu den kostbaren und seltenen Substanzen der organischen Chemie. Mit der fortschreitenden Erkenntnis der großen biologischen Bedeutung der Nucleinsäuren und ihrer Derivate war es sehr erwünscht, die Nucleoside, sei es für direkte Anwendung, sei es als Ausgangsmaterial für weitere Umwandlungen, in größerem Maßstab bequem zugänglich zu machen.

Versuche, Hefenucleinsäure auf chemischem Wege durch mildere Methoden aufzuspalten, wurden von Levene<sup>3)</sup> durchgeführt: ammoniakalische Hydrolyse im Autoklaven bei tieferer Temperatur (115°) führte jedoch nur zu den Nucleotiden. Zu den gleichen Stoffen führten auch unter verschiedensten Bedingungen durchgeführte Spaltungen im alkalischen Milieu<sup>4)</sup>. Somit war es bisher auf rein chemischem Wege nicht möglich, Nucleoside befriedigend darzustellen.

Im Rahmen fermentchemischer Untersuchungen an Hefenucleinsäure ist verschiedentlich die Entstehung von Nucleosiden beschrieben worden<sup>5)</sup>. In allen diesen Fällen war jedoch die Ausbeute an Nucleosiden nur gering, z. Tl. wurden auch nicht die in der Hefenucleinsäure vorgebildeten Nucleoside erhalten, sondern deren Desaminierungsprodukte. Diese Ergebnisse erklären sich wie folgt: Zur Darstellung der in der Hefenucleinsäure vorgebildeten Nucleoside bedarf es der Anwesenheit einer Polynucleotidase — sie spaltet die Hefenucleinsäure bis zur Stufe der Nucleotide — und einer Nucleotidase, die weiter die gebildeten Nucleotide zu den Nucleosiden aufspaltet. Die bisher verwendeten Fermentpräparate enthielten neben den Polynucleotidasen und Nucleotidasen gleichzeitig auch Nucleosidasen bzw. Amidasen. Durch die Nucleosidasen wurde die Glykosidbindung zwischen Base und Ribose gelöst, durch die Amidasen wurden NH<sub>2</sub>-Gruppen im Basenanteil abgespalten. Auf diesen Gehalt an Nucleosidasen bzw. Amidasen dürfte im wesentlichen die geringe Ausbeute an Nucleosiden zurückzuführen sein, wobei unzureichende Aufarbeitungsmethoden auch noch eine Rolle spielen werden.

In früheren Untersuchungen<sup>6)</sup> hatten wir festgestellt, daß Fermentpräparate aus Süßmandeln die Eigenschaft haben, die Nucleotide zu den entsprechenden Nucleosiden aufzuspalten. Diese Präparate besaßen daher eine nucleotidatische, jedoch keine nucleosidatische und ami-

<sup>1)</sup> V. Mitteil.: B. **69**, 1129 [1936].

<sup>2)</sup> B. **43**, 3154 [1910]; Levene u. La Forge, B. **45**, 608 [1912].

<sup>3)</sup> Journ. biol. Chem. **33**, 425 [1918]; **40**, 415 [1919].

<sup>4)</sup> Steudel u. Peiser, Ztschr. physiol. Chem. **114**, 201 [1921]; **120**, 292 [1922].

<sup>5)</sup> Jono, C. **1932** II, 552; Tsuji, Ztschr. physiol. Chem. **87**, 379 [1913]; F. Bielschowski, ebenda **190**, 15 [1930]; Bielschowski u. Klemperer, ebenda **211**, 69 [1932].

<sup>6)</sup> Bredereck u. Beuchelt, Naturwiss. **24**, 106 [1936]; Bredereck, Beuchelt u. Richter, Ztschr. physiol. Chem. **244**, 102 [1936].

datischen Eigenschaften. Inzwischen konnten wir feststellen, daß auch Präparate aus Luzernensamen und gekeimten Erbsen die gleichen Eigenschaften besitzen.

Die Einwirkung solcher Fermentpräparate auf Hefenucleinsäure führte zu einer Aufspaltung bis zur Stufe der Nucleoside<sup>7)</sup>. In den Präparaten lag mithin auch eine Polynucleotidase vor. Sie schienen daher bei Anwesenheit von Polynucleotidase und Nucleotidase und gleichzeitigem Fehlen von Nucleosidasen und Amidasen geeignet zur präparativen Darstellung der in der Hefenucleinsäure vorgebildeten Nucleoside. Diese Erwartung konnte durch die Versuche vollauf bestätigt werden: Bei  $p_H$  etwa 4.5—5.0 ließ sich die Aufspaltung so glatt durchführen, daß aus dem Spaltungsansatz das Guanosin praktisch quantitativ und krystallin ausfiel, während aus dem Filtrat durch Zugabe von Pikrinsäure Adenosin ebenfalls in sehr guter Ausbeute als Pikrat gefällt werden konnte. Die weitere Aufarbeitung zu Cytidin und Uridin, die bisher nach der Methode von Levene<sup>2)</sup> durchgeführt wurde, ist hinsichtlich der Verbesserung der Ausbeuten gegenwärtig noch Gegenstand von Untersuchungen. Aus 1 kg Hefenucleinsäure wurden erhalten etwa 180 g Guanosin und 350—450 g Adenosinpicrat (die Ausbeute schwankt je nach Reinheit des Pikrats). Über eine einfache Zerlegung des Adenosinpicrats zum freien Adenosin werden wir demnächst berichten. Die fermentative Aufspaltung zu den Nucleosiden läßt sich noch dadurch beschleunigen, daß man die Hefenucleinsäure mit Alkali zu den Nucleotiden aufspaltet und das Nucleotid-Gemisch nach Einstellen auf das günstige  $p_H$  (4.5—5.0) der weiteren fermentativen Spaltung unterwirft.

Durch die vorgenannte Methode sind nunmehr die Nucleoside, insbesondere Guanosin und Adenosin, auf bequeme Art und Weise und mit sehr guter Ausbeute zugänglich geworden. Dieses Ergebnis zieht noch weitere Folgerungen nach sich: Die *d*-Ribose ist heute eines der biologisch wichtigsten Kohlehydrate. Demgegenüber war sie bisher nur auf äußerst umständlichem Wege zugänglich: Die beiden synthetischen Methoden sind durch die beiden folgenden Reaktionsfolgen gekennzeichnet: 1)<sup>8)</sup> Gluconsaures Calcium → *d*-Arabinose → Aceto-brom-arabinose → Diacetyl-*d*-arabinal → *d*-Arabinal → *d*-Ribose. 2)<sup>9)</sup> *d*-Arabinose → *d*-arabonsaures Calcium → *d*-ribonsaures Cadmium → *d*-Ribonsäurelacton → *d*-Ribose. Durch die leichte Zugänglichkeit von Guanosin und Adenosin ist die *d*-Ribose nunmehr ein leicht zugänglicher Zucker geworden. In beiden Purin-nucleosiden läßt sich die Glykosidbindung bereits durch Kochen mit  $n_{/20}$ -Schwefelsäure spalten<sup>10)</sup>. Aber auch durch Kochen mit verd. Ameisensäure oder Essigsäure kann man die Glykosidbindung lösen; dabei fällt beim Guanosin während des Kochens das Guanin bereits aus, so daß man aus dem Filtrat direkt die *d*-Ribose gewinnen kann.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Bereitstellung von Mitteln, der Firma C. F. Boehringer, Mannheim-Waldhof, für die Überlassung der benötigten Hefenucleinsäure.

<sup>7)</sup> Über die dabei wirksamen Fermente werden wir an anderer Stelle berichten; s. auch Bredereck, „Ergebnisse der Enzymforschung“, Bd. VII, S. 105.

<sup>8)</sup> Gehrke u. Aichner, B. **60**, 918 [1927]; R. Kuhn, F. Weygand u. R. Ströbele, B. **68**, 1769 [1935]; P. Karrer, B. Becker, F. Benz, P. Frei, H. Salomon u. K. Schöpp, Helv. chim. Acta **18**, 1435 [1935].

<sup>9)</sup> E. Fischer u. O. Piloty, B. **24**, 4216 [1891]; van Eckenstein u. Blanksma, C. **1913** II, 1562; M. Steiger, Helv. chim. Acta **19**, 189 [1936].

<sup>10)</sup> Levene, Journ. biol. Chem. **108**, 420 [1935].

### Beschreibung der Versuche.

(Mitbearbeitet von Frä. G. Rothe.)

Darstellung des Fermentes<sup>11)</sup>.

1 kg fein gepulverter Süßmandel-Preßkuchen (Fa. Schimmel & Co., Miltitz bei Leipzig) wird mit einer Lösung von 50 g kryst. Zinksulfat in 4.5 l Wasser angerührt, nach 4—5-stdg. Aufbewahren bei 0° durch Nesseltuch abgepreßt, und das Filtrat langsam mit einer Lösung von 1.4 g Tannin in 1/2 l Wasser versetzt. Vom Niederschlag, der nur wenig Ferment enthält, wird durch Dekantieren bzw. Zentrifugieren getrennt und die Flüssigkeit mit einer Lösung von 15 g Tannin in 1/2 l Wasser langsam gefällt. Der ausgefallene Niederschlag wird abzentrifugiert und durch mehrfaches Verrühren mit Aceton praktisch vollständig von mitgefallenem Tannin gereinigt. Ausb. etwa 20 g.

Fermentpräparate, die aus Süßmandel-Preßkuchen anderer Herkunft bereitet werden, sind vorher zweckmäßig in einem kleinen Spaltungsversuch an Hefenucleinsäure zu prüfen.

Ein von uns geprüftes käufliches Emulsin (Merck) ließ sich, insbesondere bei Verwendung einer etwas größeren Fermentmenge, wie unten angegeben, gleichfalls zur Spaltung verwenden.

### Darstellung der Nucleoside durch fermentative Spaltung der Hefenucleinsäure<sup>12)</sup>.

30 g Hefenucleinsäure in 110 ccm Wasser werden mit 2-n. Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert. 2.5 g Ferment werden in 250 ccm Wasser aufgeschlämmt und nach mehrstündigem Stehenlassen im Eisschrank filtriert. Die filtrierte Fermentlösung wird zur klaren Hefenucleinsäurelösung gegeben und mit Acetatpuffer (p<sub>H</sub> 4.9) auf 1000 ccm aufgefüllt. Die mit einigen Tropfen Toluol versetzte Lösung wird im Brutschrank bei 37° aufbewahrt. Nach etwa 8 Tagen werden weitere 250 ccm Fermentlösung zugegeben. Nach insgesamt etwa 14 Tagen beginnt die Ausscheidung des krystallinen Guanosins, die nach einigen Tagen beendet ist. Zur Vervollständigung der Abscheidung wird noch 1 Tag im Eisschrank aufbewahrt. Ausb. 5.5 g. Zur vollkommenen Reinigung wird das Guanosin aus Wasser in Gegenwart von wenig Tierkohle umkrystallisiert.

Das Filtrat des Guanosins wird kurz aufgekocht und das ausgefallene Eiweiß abgesaugt. Durch Zugabe von Barytwasser wird die Phosphorsäure entfernt und das Filtrat des Bariumphosphats wieder auf das ursprüngliche Volumen im Vak. bei 30—35° eingedampft. Zur auf etwa 50° erwärmten Lösung werden unter Schütteln 20 g Pikrinsäure gegeben, die sich in kurzer Zeit lösen. Beim Erkalten und Aufbewahren im Eisschrank scheidet sich das Adenosinpikrat aus. Ausb. etwa 15 g. Aus dem Filtrat des Adenosinpikrats lassen sich nach Entfernung der Pikrinsäure Cytidin und Uridin nach den Angaben von Levene<sup>2)</sup> gewinnen. Die Gewinnung des Cytidins und Uridins ist hinsichtlich der Vereinfachung der Aufarbeitung und Verbesserung der Ausbeute z. Zt. noch Gegenstand der Untersuchung. Es soll später darüber berichtet werden.

<sup>11)</sup> Helferich, Winkler, Gootz, Peters u. Günther, Ztschr. physiol. Chem. **208**, 91 [1932].

<sup>12)</sup> Geschützt durch Dtsch. Reichs-Pat.; Auslandspatente angemeldet.

Beschränkt man sich lediglich auf die Darstellung von Guanosin und Adenosin, so ist es nicht notwendig, die Phosphorsäure zu entfernen, vielmehr kann man nach Entfernung des Eiweiß sofort Pikrinsäure zusetzen.

Die Darstellung der Nucleoside läßt sich beschleunigen, indem man die Hefenucleinsäure mit Alkali zu den Nucleotiden vorspaltet und das Nucleotid-Gemisch der Fermenteinwirkung unterwirft:

100 g Hefenucleinsäure werden in 200 ccm Wasser aufgeschlämmt und auf dem Wasserbade mit 2-n. Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert. Zur klaren Lösung werden 11.7 g NaOH, gelöst in wenig Wasser, gegeben und die gesamte Lösung 2 Stdn. auf dem Wasserbade erwärmt. Zur auf 40° abgekühlten Lösung werden 524 ccm 40° warme verd. Essigsäure (24 ccm Eisessig und 500 ccm Wasser) und sodann 500 ccm filtrierte Fermentlösung (10 g Ferment in 500 ccm Wasser) gegeben und der Ansatz, mit einigen Tropfen Toluol versetzt, bei 37° unter täglichem Umschütteln aufbewahrt. Nach 6—12 Tagen, je nach Reinheit des Fermentes, ist die Abscheidung des Guanosins beendet. Ausb. etwa 20 g. Die weitere Aufarbeitung zum Adenosinpikrat ist die gleiche wie oben. Ausb. an Adenosinpikrat: 45—50 g.

#### Darstellung der *d*-Ribose.

a)<sup>10</sup>) 10 g Guanosin werden in 400 ccm 0.1-n. Schwefelsäure gelöst und 2 Stdn. am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung wird zur Abscheidung von Guaninsulfat im Eisschrank aufbewahrt, sodann das Filtrat mit reiner Barytlösung neutralisiert. Nach Entfernen des Bariumsulfats wird die Lösung unter vermindertem Druck eingedampft (40°). Der Rückstand wird in Alkohol/Benzol gelöst und die Lösung wieder eingedampft. Der Rückstand wird mit Alkohol aufgenommen und absol. Äther zugegeben. Vom Niederschlag wird abgesaugt und das Filtrat unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wird in wenig Alkohol aufgenommen. Beim Stehenlassen im Eisschrank kristallisiert die *d*-Ribose aus. Ausb. 3.2 g. Die Substanz wird nochmals aus wenig Alkohol umkristallisiert.

b) Zur Spaltung mit organischen Säuren (Ameisensäure, Essigsäure) werden 15 g Guanosin mit 90 ccm 4-proz. Ameisensäure etwa 15 Stdn. am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Erkalten wird vom ausgefallenen Guanin abgesaugt und das Filtrat nach Einengen wie vorstehend aufgearbeitet.

### 69. Hans von Euler und Erwin Bauer: Umwandlung von Codehydrase I in Codehydrase II.

[Aus d. Biochem. Institut d. Universität Stockholm.]  
(Eingegangen am 28. Dezember 1937.)

Das Co-Enzym der alkoholischen Gärung, die Cozymase<sup>1)</sup>, ist, wie schon vor 10 Jahren von Euler und Nilsson<sup>2)</sup> gezeigt wurde, als Coredoxase oder Codehydrase eine unentbehrliche Komponente vieler enzymatischer Oxydo-Reduktions- bzw. Dehydrierungs-Systeme. Durch weitere Versuche aus diesem Institut<sup>3)</sup> konnte dann der Nachweis erbracht werden, daß die Cozymase als Wasserstoffüberträger wirkt, indem sie selbst Wasserstoff

<sup>1)</sup> Euler u. Myrbäck, Ztschr. physiol. Chem. **131**, 180 [1923].

<sup>2)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **162**, 264 [1927].

<sup>3)</sup> Euler, Adler u. Hellström, Svensk Kem. Tidskr. **47**, 290 [1935].