

von Bromwasser bis zur bleibenden Gelbfärbung, Entfernung des überschüssigen Halogens durch Kochen und Titration der abgekühlten Lösung vorgenommen werden.

Das Äthan wird am besten durch Ermittlung der Summe Acetylen plus Äthan bestimmt, indem man mit Hilfe eines bis zu einem bestimmten Druck evakuierten Hahnkolbens von bekanntem Volumen aus dem Gasometer E bzw. E' die Gasmischung abzapft und nun durch Abkühlen auf 0° zu einem ätherdampf-gesättigten Gasmisch übergeht; aus der bekannten Äther-tension bei 0°, dem Volumen des Gefäßes (wobei die beim Evakuieren im Kolben verbliebene Luftmenge zu berücksichtigen ist) und dem bei 0° gemessenen Druck ergibt sich die gesuchte Gasmenge.

Aus den Werten der jodometrischen Titration läßt sich die im Gasometer E bzw. E' aufgefangene Menge Acetylen (red. auf 0° und 760 mm) er-rechnen. Der zugehörige Äthan-Wert (red. auf 0° und 760 mm) ist aus der Summe Äthan plus Acetylen zu entnehmen. Die Differenz zwischen ge-fundenem Acetylen und dem aus dem Vorrat B entnommenen Acetylen-volumen (red. auf 0° und 760 mm) ergibt die im Reaktionsraum D umge-setzte Menge Acetylen.

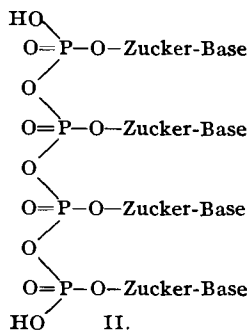
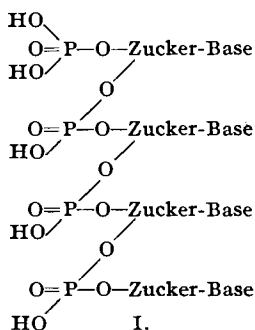
**431. Hellmut Bredereck, Martin Köthnig und Gerhard Lehmann: Zur Konstitution der Polynucleotide: Über die Desaminie-rung der Hefe- und Thymonucleinsäure (Nucleinsäuren, XI. Mittell.\*).**

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

(Eingegangen am 17. November 1938.)

Nachdem durch die Untersuchungen der vergangenen Jahre die Konsti-tution der Nucleoside und Nucleotide im wesentlichen sichergestellt war, ergaben sich für die Konstitution der Polynucleotide, Hefe- und Thy-monucleinsäure, die Fragen nach der Art der Bindung zwischen den einzelnen Nucleotiden sowie nach der Reihenfolge der Nucleotide im großen Molekül des Polynucleotids.

Von Levene und Tipson<sup>1)</sup> war eine esterartige Bindung (I) zwischen den Nucleotiden (von der Phosphorsäure eines Nucleotids zu einem Zucker-hydroxyl des Nachbarnucleotids) angenommen worden. Tannhauser und Mitarbeiter<sup>2)</sup> zogen eine Anhydridbindung (II) zwischen den einzelnen Phosphorsäure-Gruppen in Erwägung.



\*) X. Mittell.: B. 71, 2389 [1938].

1) Journ. biol. Chem. 109, 623 [1935].

2) Tannhauser, „Stoffwechselprobleme“, Berlin 1934; Klein u. Rossi, Ztschr. physiol. Chem. 231, 104 [1935].

Eine weitere Möglichkeit der Verknüpfung war die einer Bindung jeweils von einer Phosphorsäure zur Aminogruppe eines Nachbarnucleotids (N-P-Bindung), Verknüpfungen, die zumindest teilweise in den Polynucleotiden möglich waren. In einer früheren Mitteilung<sup>3)</sup> hatten wir über die Gewinnung der Guanin-uridylsäure bei Hydrolyse der Hefe-Nucleinsäure berichtet und in dieser Verbindung auf Grund des Ausbleibens einer Desaminierung auf eine solche N—P-Bindung (zwischen der Aminogruppe des Guanins und der Phosphorsäuregruppe der Uridylsäure) geschlossen. Dieses Ergebnis schien, falls es sich bei der Guanin-uridylsäure um ein echtes Spaltprodukt der Hefenucleinsäure handelte, auf N—P-Bindungen auch in der Hefenucleinsäure hinzudeuten. Wir haben daher durch Desaminierung der Hefenucleinsäure selbst und Untersuchung des Desaminierungsproduktes geprüft, ob in diesem Polynucleotid N—P-Bindungen anzunehmen sind.

Wir unterwarfen Hefenucleinsäure der Behandlung mit Natriumnitrit/Essigsäure und erhielten ein Produkt, das wir nochmals über das Bleisalz reinigten. Wir haben daraus zunächst nach der Methylalkohol-Salzsäure-Methode<sup>4)</sup> die Purine isoliert. Erhalten wurden Xanthin und Hypoxanthin. Die Prüfung auf Pyrimidine mittels der Hydrolyse mit 25-proz. Schwefelsäure im Bombenrohr<sup>5)</sup> lieferte lediglich Uracil. Wir haben darüber hinaus durch Hydrolyse mit verd. Schwefelsäure<sup>6)</sup> die Pyrimidinnucleotide isoliert und dabei lediglich Uridylsäure (isoliert als Brucinsalz) erhalten. Die Versuche beweisen daher, daß bei der Behandlung mit Nitrit/Essigsäure die Aminogruppen in den Basenbestandteilen desaminiert worden sind. An Stelle der Basen Guanin, Adenin, Cytosin, Uracil liegen in der desaminierten Hefenucleinsäure die entsprechenden desaminierten Basen Xanthin, Hypoxanthin und Uracil (2 Mol.) vor.

Aus dem vorstehenden Ergebnis konnte man schließen, daß in der Hefenucleinsäure die Aminogruppen frei und nicht durch N—P-Bindungen beansprucht sind. Bevor man jedoch diesen Schluß zog, war es notwendig, zu beweisen, daß im Verlauf der Desaminierung keinerlei Aufspaltung der Hefenucleinsäure zu den Nucleotiden erfolgt war, wodurch dann eine Desaminierung ohne weiteres erfolgt wäre. Auffallenderweise gab das Desaminierungsprodukt in wäßriger Lösung keine Fällung mehr mit Salzsäure, eine Reaktion, die sonst auf ein unverändertes Polynucleotid hinweist. Das Ausbleiben dieser Fällung war von Makino<sup>7)</sup> bei fermentativen Versuchen als eine Aufspaltung des Polynucleotids zu den Nucleotiden ausgewertet worden. Wir haben daher durch Titration mit Alkali (gegen Phenolphthalein) die Basizität des Desaminierungsproduktes bestimmt und sodann den im alkalischen Milieu eintretenden Aciditätszuwachs verfolgt. Ein solcher Zuwachs konnte nur bei einer Aufspaltung des Polynucleotids erfolgen. Das Desaminierungsprodukt erwies sich als eine etwa 4-basische Säure. Da wir den Reinheitsgrad des Desaminierungsproduktes nicht bestimmt haben, kann diese Zahl auch etwas höher liegen. Durch Behandlung mit Alkali, das bekanntlich Hefenucleinsäure sehr leicht spaltet, wurde ein

<sup>3)</sup> V. Mittel.: Bredereck u. G. Richter, B. **69**, 1129 [1936].

<sup>4)</sup> Levene, Journ. biol. Chem. **53**, 441 [1922].

<sup>5)</sup> Levene, Ztschr. physiol. Chem. **39**, 4 [1903].

<sup>6)</sup> Levene u. Jacobs, B. **44**, 1027 [1911]; Bredereck u. G. Richter, B. **71**, 718 [1938].

<sup>7)</sup> Journ. Biochem. **22**, 93 [1935].

Aciditätszuwachs von etwa 4 Äquivalenten festgestellt. Daraus geht einwandfrei hervor, daß in dem Desaminierungsprodukt die Polynucleotidstruktur erhalten geblieben ist. Erst bei Behandlung mit Alkali ist erwartungsgemäß eine Aufspaltung zu den Nucleotiden erfolgt. Wie wir das Ausbleiben der Salzsäure-Fällung erklären sollen, wissen wir noch nicht. Möglicherweise kommt sie nur hochmolekularen Formen der Hefenucleinsäure (Polymeren des Tetranucleotids) zu, wobei man bei der Desaminierung bzw. der anschließenden Reinigung eine Depolymerisierung u. U. bis zur wahren Tetranucleotid-Stufe annehmen müßte. Auf alle Fälle zeigt dieser Versuch, daß man das Ausbleiben der Fällung nicht ohne weiteres auf eine Aufspaltung des Polynucleotids in die Nucleotide zurückführen kann.

Auf Grund unserer Versuche ist der eindeutige Beweis geliefert, daß in der Hefenucleinsäure Bindungen zwischen Amino- und Phosphorsäure-Gruppen nicht vorliegen. Wir kommen daher zu der Annahme, daß die früher von uns beschriebene Guanin-uridylsäure wohl ein sekundär bei der Hydrolyse der Hefenucleinsäure entstandenes Produkt darstellt. Für die Art der Bindung zwischen den Nucleotiden in der Hefenucleinsäure bleibt in erster Linie die Annahme einer esterartigen Verknüpfung (I) bestehen. Die von Tannhauser ursprünglich für die Thymonucleinsäure angenommene Anhydridform II ist für die Hefenucleinsäure auf Grund der verschiedentlich durchgeführten Titrations sehr unwahrscheinlich. Auch die Titration der desaminierten Hefenucleinsäure spricht dagegen, wenn wir auch die Äquivalenzzahl 4 nicht als so eindeutig ansehen möchten (s. oben), um darin eine Bestätigung der von Makino<sup>8)</sup> befürworteten ringförmigen Anordnung zu sehen. Zur Klärung letzterer Frage bedarf es noch eingehenderer Versuche.

Die gleiche Desaminierung und anschließende Untersuchung der Spaltprodukte haben wir nun auch bei der Thymonucleinsäure durchgeführt. Aus dem Desaminierungsprodukt konnten wir nach entsprechenden Hydrolysen als Basen Xanthin, Hypoxanthin, Thymin und Uracil isolieren, während in der ursprünglichen Thymonucleinsäure Guanin, Adenin, Thymin und Cytosin vorliegen. Im Gegensatz zur Hefenucleinsäure fiel das Desaminierungsprodukt der Thymonucleinsäure aus wäßriger Lösung mit Salzsäure aus. Bei der Titration mit Alkali (gegen Phenolphthalein) erwies sich das Desaminierungsprodukt als eine etwa 5-basische Säure. Die auf fermentativem Wege durchgeführte Aufspaltung<sup>8)</sup> zeigte einen Aciditätszuwachs von etwa 3 Äquivalenten. Bei der Desaminierung war also keine Aufspaltung der Thymonucleinsäure erfolgt. Somit ist der Beweis geführt, daß auch in der Thymonucleinsäure keine N—P-Bindungen vorliegen. Es bleibt daher auch für die Thymonucleinsäure eine esterartige Verknüpfung als wahrscheinlichste Form der Bindung übrig. Wie wir in einer demnächst erscheinenden Mitteilung zeigen werden, glauben wir die Möglichkeit einer Anhydridform II ausschließen zu können. Dabei werden wir auch auf die von Makino<sup>8)</sup> befürwortete ringförmige Anordnung der Polynucleotide eingehen.

Für ihre Mithilfe bei der Durchführung dieser Untersuchungen danken wir Frl. E. Berger. Von der Deutschen Forschungsgemeinschaft

<sup>8)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **232**, 229 [1935]; **236**, 201 [1935].

sowie der Firma C. F. Boehringer, Mannheim-Waldhof, (von letzterer durch Überlassung der benötigten Hefenucleinsäure) sind wir in dankenswerter Weise unterstützt worden.

### Beschreibung der Versuche.

#### Desaminierung der Hefenucleinsäure.

20 g Hefenucleinsäure (Boehringer, Mannheim-Waldhof) wurden in 40 ccm Wasser aufgeschlämmt und bei 5—10° langsam mit 1-*n.* NaOH gegen Lackmus neutralisiert. Die Lösung versetzte man mit 50 g Natriumnitrit in 90 ccm Wasser und ließ bei Zimmertemperatur langsam 125 ccm Eisessig zutropfen. Nach 6-stdg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurden 2—3 Vol. Alkohol zugegeben, die überstehende Flüssigkeit abgossen, der Niederschlag mit wenig Alkohol versetzt, abgesaugt und mit Alkohol gewaschen. Die Substanz wurde in etwa 350 ccm Wasser gelöst und mit 20-proz. Bleiacetatlösung versetzt, bis keine weitere Fällung mehr entstand. Der Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat des Bleisulfids im Vak. auf etwa 35 ccm eingeeengt und in das 2—3-fache Vol. Alkohol eingerührt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Alkohol und Äther nachgewaschen. Ausb. etwa 6 g.

Zur Titration wurde bei 50°/2 mm über Phosphorperoxyd zur Konstanz getrocknet.

0.6701 g Sbst. verbr. 20.12 ccm  $n_{10}$ -NaOH (Indicator Phenolphthalein), d. entspr. 3.9 Äquivalenten.

Die neutralisierte Lösung wurde sodann mit 15.4 ccm *n*-NaOH versetzt und 2 Stdn. auf dem Wasserbad erwärmt. Zum Zurücktitrieren wurden 13.23 ccm *n*-HCl verbraucht. Bei der alkalischen Hydrolyse wurden demnach 2.17 ccm *n*-NaOH verbraucht, entspr. 4.2 Äquivalenten.

Eine 2. Titration mit einer anderen Probe desaminierter Hefenucleinsäure ergab folgende Werte.

1.0234 g Sbst. verbr. 34.85 ccm  $n_{10}$ -NaOH, d. entspr. 4.4 Äquivalenten.

Nach Hydrolyse unter Zusatz von 7.06 ccm *n*-NaOH wurden zum Zurücktitrieren 4.21 ccm *n*-HCl verbraucht. Demnach wurden bei der alkalischen Hydrolyse 2.85 ccm *n*-NaOH verbraucht, entspr. 3.6 Äquivalenten.

Isolierung der Purine: Durch eine Aufschlammung von 3 g desaminierter Hefenucleinsäure in 30 ccm 95-proz. Methylalkohol wurde 1½ Stdn. bei Zimmertemperatur, sodann noch ½ Stde. bei 0° Chlorwasserstoff geleitet. Der Niederschlag wurde abgesaugt, in etwa 20 ccm Wasser aufgeschlämmt und nach kurzem Umschütteln vom Ungelösten abgesaugt. Der Rückstand erwies sich als Xanthin (Chlorkalkprobe). Das Filtrat wurde mit verd. NaOH kongoneutral gemacht. Dabei fiel kein Guanin aus. Nach Zugabe von gesättigter Pikrinsäurelösung und Animpfen mit Hypoxanthin-pikrat schied sich im Eisschrank Hypoxanthin-pikrat ab.

4.342 mg Sbst.: 0.981 ccm N (21°, 751 mm).

$C_5H_4ON_4$ ,  $C_8H_5O_7N_3 + H_2O$  (383.07). Ber. 25.59. Gef. 25.92.

Isolierung der Pyrimidine: 10 g desaminierte Hefenucleinsäure wurden im Bombenrohr mit 40 ccm 25-proz. Schwefelsäure 2 Stdn. auf 175—180° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die braunschwarze Flüssigkeit zur Entfernung kohlgiger Rückstände filtriert, die Rückstände mit heißem Wasser ausgezogen und das Gesamtfiltrat mittels Barytwassers von Schwefelsäure befreit. Sodann wurde die Lösung im Vak. auf 60 ccm eingeeengt und

nach mehrstündigem Stehenlassen im Eisschrank das ausgefallene Uracil abgesaugt. Es wurde aus Wasser umkrystallisiert, wobei von wenig Ungelöstem abgesaugt wurde. Das erhaltene Uracil zeigte charakteristische Krystallform (federartige Nadelbüschel) und gab mit Bromwasser und Baryt in der Kälte einen intensiv violetten Niederschlag (Uracil-Nachweis). Das Filtrat des Uracils lieferte kein Pikrat, was auf Abwesenheit von Cytosin hindeutet.

Isolierung der Pyrimidinnucleotide: 5 g desaminierte Hefenucleinsäure wurden in 40 ccm 2.5-proz. Schwefelsäure im Ölbad von 110—115° 2 Stdn. am Rückflußkühler erwärmt. Dabei begann nach etwa 15 Min. die Abscheidung einer weißen Substanz. Nach mehrstündigem Stehenlassen im Eisschrank wurde vom Niederschlag, der sich auf Grund der Löslichkeit und des positiven Ausfalls der Chlorkalkprobe als Xanthin erwies, abgesaugt, das Filtrat mittels Baryts schwefelsäurefrei gemacht und mit Bleiacetatlösung versetzt. Die Bleisalze wurden mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat nach Einengen mit alkohol. Brucinlösung versetzt. Das erhaltene Brucinsalz wurde 5-mal aus 35-proz. Alkohol umkrystallisiert. Die vereinten Filtrate wurden wiederum eingeengt und dabei eine 2. Brucinsalzfraction erhalten. Beide erwiesen sich auf Grund ihrer Schwerlöslichkeit sowie ihrer leichten Löslichkeit in Pyridin (das Brucinsalz der Cytidylsäure ist in Pyridin unlöslich) als Brucinsalz der Uridylsäure.

#### Desaminierung der Thymonucleinsäure.

35 g Thymonucleinsäure wurden in 140 ccm Wasser aufgeschlämmt und unter Zerreiben im Mörser mit 2-n. NaOH gegen Lackmus neutralisiert. Dabei trat starke Gallertbildung ein. Hierzu gab man eine Lösung von 84 g Natriumnitrit in 112 ccm Wasser. Zu dem Reaktionsgemisch ließ man in einem 3-l-Stutzen bei Zimmertemperatur 84 ccm Eisessig unter Rühren zutropfen. Nach 12-stdg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurden 2—3 R.-Tle. Alkohol zugegeben, das ausgefallene Desaminierungsprodukt abgesaugt und mit Alkohol gewaschen. Sodann wurde es in etwa 500 ccm Wasser gelöst und durch Zugabe von 25-proz. Bleiacetatlösung das Bleisalz gefällt. Das Bleisalz wurde abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen, in etwa 400 ccm Wasser aufgeschlämmt und nach Zugabe von 100 ccm verd. Ammoniak mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Bleisulfid wurde mit Essigsäure angesäuert und der Schwefelwasserstoff durch einen Kohlensäurestrom entfernt. Die Lösung wurde im Vak. auf etwa 50 ccm eingeengt und in etwa 300 ccm Alkohol eintropfen gelassen. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Ausb. 12 g.

Zur Titration wurde bei 50°/2 mm über Phosphorpentoxyd zur Konstanz getrocknet. 0.7117 g Sbst. verbr. 27.6 ccm  $n_{10}$ -NaOH, d. entspr. 4.9 Äquivalenten.

Eine 2. Titration mit einer anderen Probe desaminierter Thymonucleinsäure ergab folgende Werte:

1.0395 g (in 40 ccm Wasser) verbr. 43.3 ccm  $n_{10}$ -NaOH, d. entspr. 5.2 Äquivalenten.

Mit dieser Lösung wurde nach den Angaben von Makino<sup>9)</sup> eine Fermentspaltung durchgeführt. Zur neutralisierten Lösung wurden 20 ccm ebenfalls gegen Phenolphthalein neutralisierte Fermentlösung (hergestellt aus Kalbs-Dünndarm nach Klein<sup>9)</sup>) gegeben

<sup>9)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **207**, 125 [1932].

und der Ansatz 48 Stdn. bei 37° aufbewahrt. Parallel dazu wurden 20 ccm Fermentlösung mit 83 ccm Wasser aufbewahrt.

Nach 48 Stdn. wurde in beiden Ansätzen der Aciditätszuwachs bestimmt: Hauptversuch 6.8 ccm  $n_{10}$ -NaOH, Kontrollversuch 0.9 ccm  $n_{10}$ -NaOH. Somit ergibt sich ein wirklicher Aciditätszuwachs von 5.9 ccm  $n_{10}$ -NaOH.

Sodann wurden beide Ansätze mit je 5 ccm 20-proz. Trichloressigsäure enteiweißt und die abgespaltene Phosphorsäure durch Fällen als Ammoniummagnesiumphosphat und Überführen in Phosphorammonmolybdat bestimmt.

Hauptversuch: 1.9883 g Molybdat, Kontrollvers.: 0.1547 g Molybdat.

Es verbleiben somit für die Spaltung des Substrats 1.8336 g Molybdat, entspr. 0.0266 g P. Bei 100-proz. Spaltung ergäbe sich ein Wert P von 0.1027 g P. 0.0266 g P entspr. somit einer 25.9-proz. Spaltung.

Der Aciditätszuwachs von 5.9 ccm entspricht einer 25.9-proz. Aufspaltung.

Somit entsprechen einer 100-proz. Aufspaltung 22.8 ccm  $n_{10}$ -NaOH entspr. 2.8 Äquivalenten.

Isolierung der Purine: Die Hydrolyse mit Chlorwasserstoff-Methanol wurde analog wie bei der desaminierten Hefenucleinsäure durchgeführt. Das erhaltene Xanthin wurde durch die Xanthinprobe, Chlorkalkprobe und das charakteristische Nitrat identifiziert. Das erhaltene Hypoxanthin-pikrat wurde analysiert:

3.374 mg Sbst.: 0.743 ccm N (20°, 756 mm).

$C_5H_4ON_4, C_8H_5O, N_3 + H_2O$  (383.07). Ber. 25.59. Gef. 25.52.

Isolierung der Pyrimidine: Die Spaltung mit 25-proz. Schwefelsäure wurde mit 9 g desaminiertes Thymonucleinsäure analog wie bei der desaminierten Hefenucleinsäure durchgeführt. Nach Entfernen der kohligen Rückstände wurde die Schwefel- und Phosphorsäure durch Zugabe von Barytlösung entfernt. Dabei wurde ein Überschuß an Baryt zugegeben, um vorhandenes Ammoniak möglichst vollständig zu entfernen. Die Niederschläge der Bariumsals wurden gut ausgewaschen und das Gesamtfiltrat im Vak. auf etwa 70 ccm eingengt. Aus der Lösung wurde nun das überschüssige Barium mit Schwefelsäure entfernt. Aus dem Filtrat kristallisierte im Eisschrank Thymin aus, das durch Sublimation gereinigt wurde. Schmp. 309° (Thymin: 321°).

3.479 mg Sbst.: 0.678 ccm N (21°, 746 mm).

$C_5H_8O_2N_2$  (126.05). Ber. 22.21. Gef. 22.26.

Die Mutterlauge des Thymins wurde auf etwa 20 ccm eingengt. Nach Stehenlassen über Nacht im Eisschrank schieden sich 0.3 g Uracil ab, das mit wenig Thymin verunreinigt war. Durch mehrmaliges Umkrystallisieren aus Wasser ließ sich das Thymin abtrennen. Dabei schied sich jeweils beim Abkühlen auf Zimmertemperatur das Thymin ab, während sich aus der Mutterlauge im Eisschrank Uracil abschied. Die Identifizierung des Uracils erfolgte analog wie bei der Desaminierung der Hefenucleinsäure.

3.614 mg Sbst.: 0.780 ccm N (21°, 748 mm).

$C_4H_4O_2N_2$  (112.0). Ber. N 25.00. Gef. N 24.15.

Aus der Mutterlauge des Uracils wurde bei Zugabe von Pikrinsäure Ammonium-pikrat erhalten. Cytosin-pikrat konnte niemals isoliert werden.