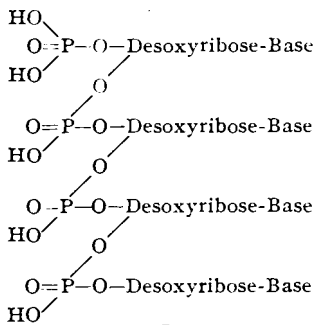


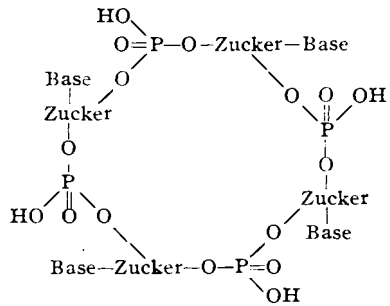
### 153. Hellmut Bredereck und Eva Hoepfner: Über das Tetranucleotid der Hefe- und Thymonucleinsäure\*).

[Aus d. Institut für Organ. Chemie u. Biochemie a. d. Universität Jena.]  
(Eingegangen am 11. August 1942.)

In einer früheren Mitteilung<sup>1)</sup> hatten wir festgestellt, daß die von uns benutzten Präparate der Thymonucleinsäure 5-basische Säuren sind. Dabei ließen wir vorerst die Frage nach der Struktur der nativen Thymonucleinsäure offen. In unserer letzten Mitteilung<sup>2)</sup> hatten wir dann darüber berichtet, daß diese Präparate im wesentlichen das wahre Tetranucleotid der eigentlichen hochmolekularen Thymonucleinsäure darstellten. Durch die Art der Darstellung sowie insbesondere durch die „alkalische Reinigung“ war ein Abbau der Thymonucleinsäure bis zur Stufe des Tetranucleotids erreicht worden. Damit ist jetzt dieses Tetranucleotid (über die inzwischen verbesserte Darstellung berichten wir später) sowohl durch chemischen als auch enzymatischen<sup>3)</sup> Abbau der Thymonucleinsäure zugänglich. Die von uns aufgestellte Konstitution des Tetranucleotids (I) gründete sich auf folgende z. Tl. schon früher von uns erhaltenen Versuchsergebnisse: 1) Die Titration

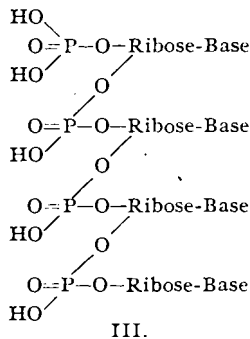


I.



II.

Tetranucleotid der Thymonucleinsäure.



III.

Tetranucleotid der Hefenucleinsäure.

\* Nucleinsäuren, XXI. Mittel.; XX. Mittel.: B. 75, 395 [1942].

<sup>1)</sup> H. Bredereck u. M. Köthnig, B. 72, 121 [1939].

<sup>2)</sup> H. Bredereck u. I. Jochmann, B. 75, 395 [1942].

<sup>3)</sup> F. G. Fischer u. Mitarbb., Journ. prakt. Chem. [2] 158, 79 [1941]; Ztschr. physiol. Chem. 269, 187 [1941].

ergab das Vorliegen einer 5-basischen Säure. Die Bindungen zwischen den einzelnen Nucleotiden müssen daher über die Phosphorsäuregruppen verlaufen. 2) Die Desaminierung<sup>4)</sup> führte unter Erhaltung der Tetranucleotidstruktur zu einem desaminierten Tetranucleotid mit den Basen Xanthin, Hypoxanthin, Uracil und Thymin. N—P-Bindungen liegen mithin nicht vor. 3a) Die Methylierung in schwach alkalischem Mittel mit Dimethylsulfat wurde bereits früher<sup>5)</sup> mit einer Lösung ausgeführt, die im wesentlichen das Tetranucleotid enthielt, ohne daß dabei die Tetranucleotid-Struktur verändert wurde. Als methylierte Basen wurden isoliert: 1.N<sup>6</sup>-Dimethyl-adenin, 1.N<sup>6</sup>-Dimethyl-cytosin und 1-Methyl-thymin. 3b) Die Thyminsäure<sup>6)</sup> hatten wir früher aus einem im wesentlichen das Tetranucleotid darstellenden Produkt gewonnen. Ihre Charakterisierung und Titration als 5-basische Säure bewies ihre Einheitlichkeit. Die jetzt nach der Diffusionsmethode durchgeführte Molekulargewichts-Bestimmung ergab ein Mol.-Gew. 1067 (ber. 992). Aus diesen Versuchsergebnissen folgte, daß im Tetranucleotid auch keine Bindungen zwischen Phosphorsäure- und OH-Gruppen der Basen vorliegen.

Wie wir bereits in unserer letzten Mitteilung kurz schilderten, war uns bereits vor längerer Zeit die Isolierung eines Produktes gelungen, das wir als das Tetranucleotid der Hefenucleinsäure ansehen dürfen. Während wir unsere Titrationsversuche an der gereinigten „Thymonucleinsäure“ durchführten, die zu ihrer Charakterisierung als 5-basische Säure führten<sup>1)</sup>, versuchten wir gleichzeitig auch klare Titrationsergebnisse für die Hefenucleinsäure zu erhalten. Makino<sup>7)</sup> hatte auf Grund seiner Titrationsversuche, wonach sowohl Hefe- als auch Thymonucleinsäure eine 4-basische Säure darstellen, eine ringförmige Anordnung der Nucleotide (II) für beide Säuren angenommen, wie es vorher bereits Takahashi<sup>8)</sup> auf Grund seiner Fermentuntersuchungen getan hatte. Unter Berücksichtigung, daß die handelsübliche Hefenucleinsäure z. Tl. als Natriumsalz vorliegt, daß sie außerdem anderweitige Verunreinigungen enthält, erwies sie sich auch in unseren Versuchen in Übereinstimmung mit den Angaben Makinos als 4-basische Säure. Als wir dann mit Hefenucleinsäure-Präparaten verschiedener Firmen zum Zweck einer weiteren Reinigung mehrfach Umfällungen über das Bleisalz (teilweise bis zu 4-mal) vornahmen, erhielten wir Produkte, die bei größerer Wasserlöslichkeit als die ursprüngliche Hefenucleinsäure Titrationswerte von 4.8—5.0 Äquiv. und bei der alkalischen Aufspaltung einen Aciditätszuwachs von etwa 3.2 bis 3 Äquiv. ergaben. Auf 4 der vorhandenen Aciditäten war also etwa eine neue hinzugekommen. Auf Grund dieser Ergebnisse schrieben wir damals<sup>1)</sup>, „daß wir mit unseren Nucleinsäure-Präparaten nicht so klare Ergebnisse wie Makino erzielt haben“. Die Deutung dieser Versuche ließ nur zwei Möglichkeiten zu, wie sie kürzlich erstmals in einer Arbeit von Allen und Eiler<sup>9)</sup> diskutiert wurden: Entweder war durch diese Reinigung eine Aufspaltung der von Takahashi und Makino angenommenen cyclischen

<sup>4)</sup> H. Bredereck, E. Berger u. F. Richter, B. **74**, 338 [1941]; H. Bredereck u. I. Jochmann, B. **75**, 395 [1942]. Die dort versehentlich nicht mit aufgeführten N- und P-Analysen sind im Versuchsteil dieser Arbeit mit aufgeführt.

<sup>5)</sup> H. Bredereck, G. Müller u. E. Berger, B. **73**, 1058 [1940].

<sup>6)</sup> H. Bredereck u. G. Müller, B. **72**, 115 [1939].

<sup>7)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **232**, 229 [1935]; **236**, 201 [1935].

<sup>8)</sup> Journ. Biochemistry **16**, 463 [1932].

<sup>9)</sup> Journ. biol. Chem. **137**, 757 [1941].

Struktur erfolgt oder aber es war ein höhermolekulares Produkt in einzelne Tetranucleotide unter Freilegung einer Acidität aufgespalten worden. Allen und Eiler hatten durch Einwirkung von kryst. Ribonuclease auf Hefenucleinsäure die Freilegung eines Säureäquivalents festgestellt und zur Deutung die beiden vorstehenden Möglichkeiten angeführt. Infolge der größeren Wasserlöslichkeit der neuen etwa 5-basischen Säure neigten wir selbst der zweiten Ansicht zu, zumal wir gleichzeitig die größere Wasserlöslichkeit der desaminierten (über das Bleisalz gereinigten) „Hefenucleinsäure“ und ihre Nichtfällbarkeit durch Salzsäure aus wäbr. Lösung gefunden hatten<sup>10)</sup> (s. u.). In einer früheren Mitteilung<sup>10)</sup> schrieben wir daher in bezug auf das Ausbleiben der Salzsäure-Fällung: „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.“ Eine klare Beweisführung fehlte uns jedoch, zumal infolge der schlechten Ausbeute an mehrfach über das Bleisalz „gereinigter Hefenucleinsäure“ weitere Untersuchungen unterblieben. Die schlechte Ausbeute ist darauf zurückzuführen, daß ein erheblicher Teil der Hefenucleinsäure vermutlich durch das saure Mittel bei der Zerlegung des Bleisalzes weiter aufgespalten wird (wir konnten z. B. Uridylsäure isolieren). Als im vergangenen Jahr von Fischer und Mitarbb.<sup>3)</sup> das durch enzymatischen Abbau der Thymonucleinsäure erhaltene Tetranucleotid mittels der Molekulargewichts-Bestimmung nach der Diffusionsmethode von Brinzinger identifiziert wurde und auch mittels der gleichen Methode der höhermolekulare Aufbau der Hefenucleinsäure gezeigt werden konnte<sup>11)</sup>, haben wir unsere aus der Hefenucleinsäure erhaltene 5-basische Säure nach der gleichen Methode untersucht und in Übereinstimmung zur Titration Werte gefunden, die auf ein Tetranucleotid stimmten. Selbst nur einmal über das Bleisalz umgefällte Präparate enthielten, wie sich aus Molekulargewichts-Bestimmung und Titration ergab, bereits erhebliche Mengen an Tetranucleotid, das daraus dann durch Extrahieren mit Wasser angereichert werden konnte.

Die vorstehend geschilderten Ergebnisse lassen sich nur so erklären, daß durch das saure Mittel bei Zerlegung des Bleisalzes (durch das Bleisulfidfiltrat wurde zur Entfernung von H<sub>2</sub>S noch längere Zeit Luft durchgeleitet) eine Aufspaltung der höhermolekularen Hefenucleinsäure richtiggehend bis zur Stufe des Tetranucleotids erfolgt. Daß diese Erklärung richtig ist, ergibt sich auch aus folgenden Versuchen: Schüttelt man eine Aufschlammung von Hefenucleinsäure in Wasser längere Zeit bei Zimmertemperatur, so geht in dem sauren Mittel ein kleiner Teil in Lösung, der mit Alkohol-Salzsäure wieder ausgefällt werden kann. Durch nochmaliges Schütteln des nicht in Lösung gegangenen Anteils kann wiederum ein kleiner Anteil in Lösung gebracht werden, was sich nun noch mehrfach wiederholen läßt. Die Titrationswerte der aus der Lösung gefällten Produkte lagen zwischen 4.4—5, die gefundenen Molekulargewichte zwischen 1200—1800. Eine noch weitere

<sup>10)</sup> H. Bredereck, M. Köthing u. G. Lehmann, B. **71**, 2615 [1938].

<sup>11)</sup> F. G. Fischer, I. Böttger u. H. Lehmann-Echternacht, Ztschr. physiol. Chem. **271**, 252 [1941]. (Die dort angegebenen Werte konnten wir größenordnungsmäßig bestätigen.)

Anreicherung an Tetranucleotid erreichten wir, wenn wir solche Produkte durch kurzes Verreiben mit Wasser extrahierten.

Da weder die letztgenannte Methode noch das Arbeiten über das Bleisalz bisher eine präparative Methode zur Darstellung des Tetranucleotids darstellten, haben wir nach einem ergiebigeren Verfahren gesucht. Durch verd. Alkali (z. B. durch 2-stdg. Erwärmen mit 2-proz. Natronlauge) wird Hefenucleinsäure leicht zu den Nucleotiden aufgespalten. Nahm man die Alkaliwirkung nun unter wesentlich mildereren Bedingungen vor, so konnte man u. U. hoffen, mindestens teilweise einen Abbau bis zum Tetranucleotid zu erreichen. Nach zahlreichen unter wechselnden Bedingungen von Alkalikonzentration, Temperatur und Zeit durchgeführten Versuchen gelang es uns, die Bedingungen (10 Min. Erwärmen auf 50° in 0.5-proz. NaOH) zu ermitteln, die in guter Ausbeute zum Tetranucleotid führten. Die Titration ergab das Vorliegen einer 5-basischen Säure, nach alkalischer Spaltung wurde ein Aciditätszuwachs von 3 Äquivalenten gefunden. Die C-, H-, N-, P- und Mol.-Gew.-Bestimmungen ergaben auf  $C_{38}H_{49}O_{29}N_{15}P_4$  stimmende Werte.

Ebenso stimmten die für Guanin und Adenin gefundenen Werte mit den berechneten überein, desgl. die mit dem Magnesiumsalz durchgeführten Analysen. Das Tetranucleotid ist etwas in Wasser löslich und wird daraus mit Salzsäure allein nicht wieder gefällt.

Über die Konstitution des Tetranucleotids der Hefenucleinsäure läßt sich folgendes aussagen: 1) Da es eine 5-basische Säure darstellt, müssen die Bindungen über die Phosphorsäuregruppen verlaufen. 2) Wir hatten bereits früher<sup>10)</sup> die Hefenucleinsäure einer Desaminierung unterworfen und dabei die Basen Xanthin, Hypoxanthin und Uracil isoliert. Wenn dieser an der höhermolekularen Hefenucleinsäure durchgeführte Versuch auch, wie aus Angaben von F. G. Fischer<sup>12)</sup> hervorgeht, für die Art der Bindungen zwischen den Tetranucleotiden zu falschen Folgerungen führen kann, so ergibt sich doch daraus für das Tetranucleotid selbst, daß N—P-Bindungen nicht vorliegen. Das reine Tetranucleotid haben wir jetzt nochmals einer Desaminierung unterworfen. Das desaminierte Tetranucleotid erwies sich als 5-basische Säure und enthielt als Basen Xanthin, Hypoxanthin und Uracil. Die N-, P- und Mol.-Gew.-Bestimmung ergab gleichfalls die erwarteten Werte. Somit ist endgültig gezeigt, daß auch in dem Tetranucleotid der Hefenucleinsäure N—P-Bindungen nicht vorliegen. 3) Mit reinem Tetranucleotid haben wir jetzt die Methylierung in schwach alkalischem Mittel mit Dimethylsulfat analog den Bedingungen beim Tetranucleotid der Thymonucleinsäure<sup>6)</sup> durchgeführt. Durch Titration (vor und nach der Hydrolyse) sowie durch Mol.-Gew.-Bestimmung (ber. 1444, gef. 1348) stellten wir fest, daß keine Aufspaltung eingetreten war. Als Basen isolierten wir durch Hydrolyse mit HCl in Methanol 1.N<sup>2</sup>-Dimethyl-guanin (als Pikrat) und 1.N<sup>6</sup>-Dimethyladenin (als Pikrat), durch Erhitzen im Einschlußrohr mit 25-proz. Schwefelsäure auf 175—180° 1.N<sup>6</sup>-Dimethyl-cytosin (als Pikrat). Die Isolierung des wohl zu erwartenden 1-Methyl-uracils steht noch aus. Auf Grund dieser Versuche scheiden auch für das Tetranucleotid der Hefenucleinsäure Bindungen zwischen den Phosphorsäureresten und Oxygruppen an den Basen, vorerst Guanin und Cytosin, aus. Wir glauben jedoch auch, daß eine solche Bindung zum Uracil ausscheidet, was Voraussetzung für die folgenden Darlegungen sein soll. Somit würde dem Tetranucleotid

<sup>12)</sup> Naturwiss. 30, 380 [1942].

der Hefenucleinsäure (III) die analoge Struktur wie dem der Thymonucleinsäure zukommen. Beide unterscheiden sich nun in der Geschwindigkeit der Aufspaltung in die Nucleotide in alkalischer Lösung. Während Hefenucleinsäure bzw. das Tetranucleotid in verd. alkalischer Lösung leicht zu den Nucleotiden aufgespalten wird, erfolgt die entsprechende Aufspaltung beim Tetranucleotid der Thymonucleinsäure erheblich schwerer. Dabei ist die Aufspaltung in die Nucleotide schon mit einer teilweisen Phosphorsäure-Abspaltung verbunden. Wir berichten in anderem Zusammenhang über diese Versuche. Den Unterschied in der Spaltungsgeschwindigkeit glauben wir darauf zurückführen zu können, daß im Tetranucleotid der Thymonucleinsäure die am C-Atom 3 eines Nucleotids sitzende Phosphorsäure mit dem OH am C-Atom 5 des Zuckers des Nachbarnucleotids, im Tetranucleotid der Hefenucleinsäure hingegen mit dem OH am C-Atom 2 verknüpft ist. Für die Hefe- und Thymonucleinsäure wurde eine solche Möglichkeit schon früher von Levene<sup>13)</sup> erörtert.

Unter den geschilderten Versuchsbedingungen gelingt es nunmehr, sowohl Hefe- als auch Thymonucleinsäure durch schwach alkalische Hydrolyse zum Tetranucleotid abzubauen. Der gleiche Abbau ist uns, wie wir oben geschildert haben, für die Hefenucleinsäure auch im sauren Mittel gelungen. Es steht der Versuch noch aus, ob, wie wir glauben, durch schwach saures Mittel, wie man es zur Darstellung der Thyminsäure benutzt, auch die Thymonucleinsäure — wir benutzten früher im wesentlichen das Tetranucleotid — zur Tetranucleotidstufe abgebaut wird, wobei jedoch infolge der Labilität der Purin-Glykosid-Bindungen gleichzeitig die beiden Purine Guanin und Adenin abgespalten werden. Betrachtet man die Tatsache, daß die Thymonucleinsäure im alkalischen Mittel leicht bis zum Tetranucleotid gespalten wird, daß aber dann die weitere Aufspaltung in die Nucleotide viel schwerer erfolgt, so folgt daraus, daß die Bindungen zwischen den Tetranucleotiden anderer Natur sein müssen als die zwischen den Nucleotiden. Diese rein chemischen Befunde stehen in Übereinstimmung mit den enzymatischen. Fischer<sup>3)</sup> und Lehmann-Echternacht<sup>14)</sup> hatten gefunden, daß die Thymonucleinsäure durch eine Polynucleotidase nur bis zur Stufe des Tetranucleotids, diese dann durch eine davon verschiedene Oligonucleotidase in die Nucleotide gespalten werden. Als Bindungen zwischen den Tetranucleotiden kommen zunächst solche zwischen Phosphorsäure- und NH<sub>2</sub>- bzw. OH-Gruppen an Basen in Betracht. In der Hefenucleinsäure sind, zunächst im alkalischen Mittel, die Spaltungsgeschwindigkeiten der Bindungen zwischen den Tetranucleotiden und den Nucleotiden im Tetranucleotid nicht so deutlich verschieden, um daraus ohne weiteres auf eine verschiedene Bindungsart schließen zu können. Immerhin läßt die Tatsache, daß uns doch verhältnismäßig glatt auch die Isolierung dieses Tetranucleotids gelungen ist, die Annahme zu, daß auch hier verschiedene Bindungen vorliegen. Gestützt wird diese Annahme durch die Existenz einer besonderen Ribopolynucleotidase<sup>15)</sup>. Als Bindung zwischen den Tetranucleotiden käme auch hier zunächst eine solche zwischen der Phosphorsäuregruppe und einer NH<sub>2</sub>- bzw. OH-Gruppe

<sup>13)</sup> Journ. biol. Chem. **109**, 623 [1935].

<sup>14)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **269**, 169, 201 [1941].

<sup>15)</sup> R. J. Dubos u. R. H. S. Thompson, Journ. biol. Chem. **124**, 501 [1938]; G. Schmidt u. P. A. Levene, ebenda **126**, 423 [1938]; M. Kunitz, Science [New York] **90**, 112 [1939].

einer Base in Frage. Betrachtet man nun die Bedingungen, unter denen wir sowohl das Tetranucleotid der Hefe- als auch das der Thymonucleinsäure herstellten (für letzteres diente als Ausgangsmaterial die „Roh-Thymonucleinsäure“, die, wie sich aus ihren Eigenschaften ergibt, noch höhermolekularen Charakter besitzt), so zeigt sich, daß sie weitgehend die gleichen sind. Es ist daher vorerst die Annahme erlaubt, daß sowohl in der Hefe- als auch in der Thymonucleinsäure die einzelnen Tetranucleotide durch die gleiche Art der Bindung miteinander verknüpft sind. Weitere Befunde müssen diese Annahme erhärten. Die Verschiedenheit der „alkalischen“ Ribo- und Thymopolynucleotidase braucht nicht gegen eine gleiche Bindung zu sprechen, da es sich hierbei um eine ausgesprochene Substratspezifität handeln kann.

Für die Unterstützung der vorliegenden Untersuchung sind wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft zu großem Dank verpflichtet. Der Firma C. F. Boehringer, Mannheim-Waldhof, danken wir für die Überlassung der Hefenucleinsäure, Fr. I. Jochmann für die Durchführung zahlreicher Analysen.

### Beschreibung der Versuche

Desaminiertes Tetranucleotid der Thymonucleinsäure.

(Bearbeitet von Ingeborg Jochmann.) •

3.332 mg Sbst.: 0.383 ccm  $N_2$  (22°, 740 mm). — 0.1144 g Sbst.: 11.12 mg P.  
 $C_{38}H_{48}O_{28}N_{12}P_4$  (1256). Ber. N 13.36, P 9.86. Gef. N 12.95, P 9.72.

Es sei noch erwähnt, daß wir bei der Aufarbeitung auf Pyrimidinbasen entsprechend unseren früheren Versuchen<sup>10)</sup> auch hier lediglich Thymin und Uracil fanden.

#### Thyminsäure.

(Molekulargewichts-Bestimmung und Titration.)

(Bearbeitet von Ingeborg Jochmann.)

Für Titration und Molekulargewichts-Bestimmung wurde eine nach früherer Vorschrift<sup>6)</sup> aus dem Bariumsalz bereitete wäßr. Lösung verwendet:

Titration: 0.2648, 0.1254 g Sbst. (ermittelt durch Rückstands-Bestimmung der Lösung) verbr. 13.24, 6.42 ccm  $n/10$ -NaOH  $\approx$  5.0, 5.1 (4.96), (5.13) Äquivalent.

Mol.-Gew.-Bestimmung: Sie wurde entsprechend den früheren Angaben<sup>2)</sup> durchgeführt.

Bestimmung von  $\lambda_s$   
 (Muskeladenylsäure, Mol.-Gew. 346)

$C_0$	9.356	$C_{150}$	5.804	$\lambda = 3.18$
$C_0$	9.356	$C_{350}$	2.984	$\lambda = 3.26$
$C_{150}$	5.804	$C_{350}$	2.984	$\lambda = 3.32$

Mittelwert =  $\lambda_s = 3.25$

Bestimmung von  $\lambda_x$   
 (Thyminsäure, Mol.-Gew. 992)

$C_0$	11.153	$C_{380}$	6.029	$\lambda = 1.70$
$C_0$	11.153	$C_{480}$	4.697	$\lambda = 1.80$
$C_{380}$	6.029	$C_{480}$	4.697	$\lambda = 2.07$

Mittelwert  $\lambda_x = 1.85$

Als Teilchengröße berechnet sich daraus ein Wert von 1067 (ber. 992).

#### Tetranucleotid der Hefenucleinsäure.

Reinigung der Hefenucleinsäure: 50 g Hefenucleinsäure (Boehringer, Mannheim-Waldhof) werden in 200 ccm Wasser aufgeschlämmt und durch Zugabe von 45 ccm 2-n. NaOH in Lösung gebracht ( $p_H$  6.1). Die Lösung wird mit 300 ccm Wasser verdünnt und unter Rühren langsam mit

25-proz. Bleiacetat-Lösung (etwa 250 ccm) versetzt, bis bei weiterer Zugabe kein Niederschlag mehr entsteht. Das Bleisalz wird abgesaugt, mit Wasser mehrfach ausgewaschen und in 600 ccm Wasser aufgeschlämmt. Nach Zugabe von 40 ccm konz. Ammoniak-Lösung wird  $H_2S$  eingeleitet ( $p_{H^+}$  8.2), das Bleisulfid über Kieselgur abgesaugt und durch das Filtrat zur Entfernung von überschüssigem  $H_2S$  Luft durchgeleitet. Die Lösung wird sodann mit Eisessig neutralisiert, über Nacht im Eisschrank aufbewahrt und dann langsam unter Rühren mit 1600 ccm Alkohol, der 20 ccm Salzsäure (d 1.19) enthält, versetzt. Der Niederschlag wird abgesaugt, 2-mal im Mörser mit 70-proz. Alkohol, dem 1% Salzsäure (d 1.19) zugesetzt ist, darauf noch 2-mal mit 96-proz. Alkohol verrieben. Auf der Nutsche wird mit Alkohol und Äther bis zur Cl-Freiheit ausgewaschen. Ausbeute nach Trocknen im Exsiccator 33 g. Zur weiteren Reinigung wird nochmals in 200 ccm Wasser aufgeschlämmt, mit 2-n. NaOH gegen Lackmus neutralisiert, über Kieselgur filtriert, auf 400 ccm mit Wasser verdünnt und mit 800 ccm Alkohol-Salzsäure (10 ccm Salzsäure, d 1.19) unter Rühren versetzt. Abgesaugt und ausgewaschen wie oben. Ausb. 30 g.

Spaltung der Hefenucleinsäure: 30 g gereinigte Hefenucleinsäure wurden in 150 ccm Wasser aufgeschlämmt und mit 2-n. NaOH neutralisiert. Die neutrale Lösung wurde auf 600 ccm verdünnt, auf 50° erwärmt, mit 36 ccm auf 50° vorgewärmter 2-n. NaOH versetzt und 10 Min. bei 50° gehalten. Danach wurde schnell abgekühlt, mit Essigsäure neutralisiert und mit 1200 ccm Alkohol-Salzsäure (12 ccm Salzsäure, d 1.19) unter Rühren versetzt. Die Fällung wurde abgesaugt und mit Alkohol steigender Konzentration (60-, 80- und 96-proz.) sodann mit Äther ausgewaschen. Ausb. 11 g. Die Titrationswerte lagen zwischen 4.6—5.0. Zur weiteren Reinigung wurde das Produkt 4-mal mit je 100 ccm Wasser im Mörser verrieben, die Lösung über Kieselgur abgesaugt (zur völligen Klärung) und mit 800 ccm Alkohol-Salzsäure (1%, d 1.19) unter Rühren versetzt. Die Fällung wurde abgesaugt und mit 96-proz. Alkohol und anschließend Äther bis zur Chlor-Freiheit gewaschen. Ausb. 3 g. Mit diesem Produkt wurden die folgenden Analysen gemacht. Nachdem sie bereits durchgeführt waren, gelang eine entscheidende Verbesserung der Ausbeute durch geringe Abänderungen der vorstehenden Vorschrift. Verbesserte Darstellung s. u.

Zur Analyse wurde bei 100°/2 mm über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Titration: 0.0936, 0.0694 g Sbst. verbr. 3.63, 2.63 ccm  $n_{10}$ -NaOH  $\approx$  5.1, 4.9 (5.05), (4.94) Äquivalent; nach alkal. Hydrolyse (2 Stdn. auf dem Wasserbad) verbr. 0.2 ccm  $n$ -NaOH (2 ccm  $n_{10}$ ), 0.16 ccm  $n$ -NaOH (1.6 ccm  $n_{10}$ )  $\approx$  2.8, 3.0 (2.78) Äquivalent.

2.983 mg Sbst.: 3.902 mg  $CO_2$ , 1.049 mg  $H_2O$ . — 2.979 mg Sbst.: 0.429 ccm  $N_2$  (22°, 748 mm). — 52.9 mg Sbst.: 4.826 mg P.

$C_{38}H_{49}O_{29}N_{15}P_4$  (1304). Ber. C 34.97, H 3.76, N 16.1, P 9.52.  
Gef. „ 35.68, „ 3.93, „ 16.3, „ 9.12.

Bestimmung der Purinbasen: Die Bestimmung von Guanin und Adenin wurde nach Levene<sup>10)</sup> durchgeführt: 0.2605 g Sbst. ergaben 0.0814 g Hydrochloride, daraus 0.0311 g Guanin und 0.0752 g Adeninpikrat. Ber. 0.0302 g Guanin und 0.0763 g Adeninpikrat.

<sup>10)</sup> Journ. biol. Chem. **53**, 441 [1922].

## Mol.-Gew.-Bestimmung.

Bestimmung von $\lambda_s$ (Muskeladenylsäure)			Bestimmung von $\lambda_x$ (Tetranucleotid)				
$C_0$	7.870	$C_{150}$ 4.990	$\lambda = 3.03$	$C_0$	7.555	$C_{150}$ 5.899	$\lambda = 1.65$
$C_0$	7.870	$C_{300}$ 3.152	$\lambda = 3.06$	$C_0$	7.555	$C_{300}$ 3.548	$\lambda = 1.67$
$C_{150}$	4.990	$C_{300}$ 3.152	$\lambda = 3.17$	$C_{150}$	5.899	$C_{300}$ 3.548	$\lambda = 1.69$
Mittelwert $\lambda_s = 3.08$				Mittelwert $\lambda_x = 1.67$			

Als Teilchengröße berechnet sich daraus ein Wert von 1177.

Das Tetranucleotid ist in Wasser etwas löslich und wird daraus mit Salzsäure nicht wieder gefällt.

Magnesiumsalz: 2 g Tetranucleotid werden in 15 ccm Wasser mit 0.32 g NaOH in 5 ccm Wasser versetzt, mit Essigsäure gegen Lackmus neutralisiert, 0.4 g Ammoniumacetat und 0.6 g Magnesiumacetat in 10 ccm Wasser zugegeben und die klare Lösung in 150 ccm Methanol eingerührt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Methanol, sodann mit einem Methanol-Äther-Gemisch, schließlich mit Äther gewaschen. Ausb. 2 g. Zur Reinigung wird noch 2-mal durch Lösen in Wasser und Fällen mit dem gleichen Volumen Methanol umgefällt. Auswaschen wie oben. Ausb. 1 g.

Zur Analyse wurde bei 78°/2 mm über Phosphorpentoxyd getrocknet.

P- und Mg-Bestimmung: 32.7 mg Sbst. wurden nach Teorell<sup>17)</sup> aufgeschlossen, auf ein bestimmtes Vol. aufgefüllt und in 1 ccm der P-Gehalt colorimetrisch bestimmt. Gef. 2.9 mg P = 8.9%. Zur restlichen Lösung wurden 2 ccm einer eingestellten Phosphat-Lösung (1.86 mg P) und 2 ccm konz. Ammoniak-Lösung gegeben. Nach 2 Stdn. wurde der Niederschlag von  $MgNH_4PO_4$  abzentrifugiert, mit verd. Ammoniak-Lösung nochmals ausgewaschen, darauf in 5-proz. Trichloressigsäure gelöst und P colorimetrisch bestimmt. Gef. 1.50 mg P  $\approx$  1.175 mg Mg = 3.60%. Zur Kontrolle wurde noch eine P-Bestimmung der Filtrate durchgeführt. Sie enthielten 3.25 mg P. Da vor der Fällung des  $MgNH_4PO_4$  der P-Gehalt 4.76 mg betrug, waren 1.51 mg P im  $MgNH_4PO_4 \approx$  1.185 mg Mg = 3.62%.

2.757 mg Sbst.: 0.351 ccm  $N_2$  (22°, 749 mm).

$C_{38}H_{45}O_{23}N_{15}P_4Mg_2$  (1348). Ber. N 15.58, P 9.2, Mg 3.6. Gef. N 14.52, P 8.9, Mg 3.6.

Bestimmung der Purinbasen: 0.1358 g Sbst.: 0.436 g Hydrochloride, 0.0153 g Guanin, 0.0382 g Adeninpicrat. Ber. 0.0152 g Guanin, 0.0385 g Adeninpicrat.

Mol.-Gew.-Bestimmung: Muskeladenylsäure  $\lambda_s = 3.08$  (Mittelwert).

## Mg-Salz

$C_0$	4.578	$C_{150}$ 3.576	$\lambda = 1.64$
$C_0$	4.578	$C_{300}$ 2.825	$\lambda = 1.60$
$C_{150}$	3.576	$C_{300}$ 2.825	$\lambda = 1.56$

Mittelwert  $\lambda_x = 1.60$

Daraus berechnet sich eine Teilchengröße von 1282.

Verbesserte Darstellung des Tetranucleotids: Reinigung und Spaltung (ausgehend von 50 g Hefenucleinsäure) wurden bis zum Versetzen mit 1200 ccm Alkohol-Salzsäure wie oben durchgeführt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, im Mörser zunächst 2-mal mit 70-proz. Alkohol, der 1% Salzsäure (d 1.19) enthielt, sodann 2-mal mit 96-proz. Alkohol verrieben, schließlich auf der Nutsche mit absol. Alkohol und Äther chlorfrei gewaschen. Ausb. 24 g (Titration: 4.6 Äquiv.). Das Produkt wurde 7-mal mit je 100 ccm Wasser im Mörser verrieben (etwa 5 Min.), die Lösung über

<sup>17)</sup> Biochem. Ztschr. **230**, 1 [1931]; **232**, 485 [1931].



Kieselgur filtriert, und mit 1400 ccm Alkohol-Salzsäure (1%, d 1.19) gefällt und, wie vorstehend beschrieben, ausgewaschen. Ausb. 9 g. (Titration: 5.0 (4.95) Äquiv., Zuwachs nach Hydrolyse 2.9 (2.93) Äquiv.). Der beim Verreiben mit Wasser verbliebene Rückstand wurde in 50 ccm Wasser aufgeschlämmt, durch Neutralisation mit 2-n. NaOH in Lösung gebracht, auf 200 ccm aufgefüllt und, wie oben beschrieben, mit 13 ccm 2-n. NaOH 10 Min. auf 50° erwärmt. Die Lösung wurde wie oben auf Tetranucleotid verarbeitet. Ausb. 10 g. Titration: 4.9 (4.85) Äquiv., Zuwachs nach Hydrolyse 3.10 Äquivalent. Gesamtausbeute aus 30 g gereinigter Hefenucleinsäure demnach 19 g.

#### Desaminierung des Tetranucleotids der Hefenucleinsäure.

4 g Tetranucleotid wurden entsprechend den früheren Angaben<sup>4)10)</sup> für Hefenucleinsäure desaminiert. Nach 6-stdg. Stehenlassen wurden 3 Vol. Alkohol-Salzsäure (1%, d 1.19) zugegeben, der Niederschlag abgesaugt, im Mörser mit 80-proz. Alkohol verrieben, sodann auf der Nutsche mit 96-proz. Alkohol und Äther gewaschen. Es wurde noch 2-mal durch Lösen in 8 ccm Wasser und Einrühren in 75 ccm Alkohol-Salzsäure (1%, d 1.19) umgefällt. Auswaschen wie vorstehend beschrieben. Ausb. 3.1 g. Zur Analyse wurde über Phosphorperoxyd bei 100°/2 mm getrocknet.

Titrationen: 5.3, 5.2 Äquivalent, Zuwachs nach Hydrolyse 2.7, 2.8 (2.75) Äquivalent.

N- und P-Bestimmung: 3.530 mg Sbst.: 0.416 ccm N<sub>2</sub> (22°, 745 mm). — 0.0863 g Sbst.: 8.263 mg P.

C<sub>38</sub>H<sub>46</sub>O<sub>32</sub>N<sub>12</sub>P<sub>4</sub> (1307). Ber. N 12.85, P 9.49. Gef. N 13.37, P 9.57.

Mol.-Gew.-Bestimmung: Muskeladenylsäure  $\lambda_s = 3.08$  (Mittelwert).

Desaminiertes Tetranucleotid			
C <sub>0</sub>	7.396	C <sub>300</sub>	4.352 $\lambda = 1.77$
C <sub>0</sub>	7.396	C <sub>453</sub>	3.385 $\lambda = 1.73$
C <sub>300</sub>	4.352	C <sub>453</sub>	3.385 $\lambda = 1.64$
Mittelwert $\lambda_s = 1.71$			

Daraus berechnet sich eine Teilchengröße von 1121.

Isolierung der Purine: Die Spaltung des desaminierten Tetranucleotids wurde entsprechend den früheren Angaben<sup>10)</sup> zur Isolierung der Purine und Pyrimidine aus der desaminierten Hefenucleinsäure durchgeführt. Isoliert wurden Xanthin (identifiziert durch Chlorkalkprobe), Hypoxanthin als Pikrat (identifiziert durch Schmelz- und Mischschmelzpunkt) sowie Uracil (identifiziert durch Schmelz- und Mischschmelzpunkt).

#### Methylierung des Tetranucleotids der Hefenucleinsäure.

(Bearbeitet von Annelise Martini.)

5 g Tetranucleotid in 50 ccm Wasser wurden (durch Verreiben im Mörser) mit 2-n. NaOH gegen Lackmus neutralisiert. Unter Rühren in einem Dreihalskolben wurden zu der Lösung bei etwa 35° 7 ccm Dimethylsulfat und 8 ccm 33-proz. NaOH so zugetropft, daß das p<sub>H</sub> der Lösung zwischen 8.0—8.5 blieb. Nach etwa 2 Stdn. war die Methylierung beendet. Das Reaktionsgemisch wurde nach Neutralisation mit Essigsäure im Vak. bei 30° auf 35 ccm eingengt, mit Essigsäure angesäuert und mit 350 ccm absol.

Alkohol gefällt. Nach Stehenlassen über Nacht bei Zimmertemperatur wurde die alkohol. Lösung von der schmierigen Fällung abgegossen, diese in 15 ccm Wasser gelöst und wiederum mit Alkohol (im Mörser) gefällt. Nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit wurde die Fällung mit Alkohol-Aceton (1:1) verrieben und abgesaugt. Ausb. 2 g. Das Natriumsalz wurde in 10 ccm Wasser gelöst, 1 ccm Salzsäure (d 1.19) zugegeben und mit 50 ccm absol. Alkohol gefällt. Nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit wurde die Fällung wieder in 10 ccm Wasser gelöst und mit 50 ccm Alkohol, die 1 ccm Salzsäure enthielten, langsam gefällt. Die jetzt flockige Fällung wurde abgesaugt und mit Alkohol und Äther gewaschen. Zur Analyse wurde bei 100°/2 mm über Phosphorpentoxyd getrocknet.

N- und P-Bestimmung: 3.988 mg Sbst.: 0.498 ccm  $N_2$  (22°, 745 mm). — 28.2 mg Sbst.: 2.375 mg P.

$C_{48}H_{69}O_{29}N_{15}P_4$  (1444). Ber. N 14.5, P 8.58. Gef. N 14.16, P 8.42.

Für die Summenformel ist ein Gehalt von 10  $CH_3$ -Gruppen zu Grunde gelegt. Diese Zahl ergibt sich aus *O*- und *N*-Methyl-Bestimmungen sowie Titrationen vor und nach der Hydrolyse. Darüber sowie über die Stellung insbesondere der *O*-Methyl-Gruppen soll in anderem Zusammenhang später berichtet werden.

Mol.-Gew.-Bestimmung: Muskeladenylsäure  $\lambda_s = 3.08$  (Mittelwert).

Methyliertes Tetranucleotid

$C_0$	3.997	$C_{150}$	3.176	$\lambda = 1.53$
$C_0$	3.997	$C_{300}$	2.500	$\lambda = 1.56$
$C_{150}$	3.176	$C_{300}$	2.500	$\lambda = 1.59$

Mittelwert = 1.56

Daraus ergibt sich eine Teilchengröße von 1348.

Isolierung der methylierten Basen: a) 2 g methyliertes Tetranucleotid wurden in 10 ccm 96-proz. Methanol aufgeschlämmt und unter schwachem Erwärmen am Rückflußkühler  $1\frac{1}{2}$  Stdn., sodann bei Eiskühlung noch  $\frac{1}{2}$  Stde. Chlorwasserstoff durchgeleitet. Nach Stehenlassen über Nacht bei Zimmertemperatur wurde der Niederschlag abgesaugt, mit wenig kaltem HCl-gesättigten 95-proz. Methanol ausgewaschen, in wenig Wasser gelöst und Pikrinsäure-Lösung zugegeben. Es fiel nach Stehenlassen 1.*N*<sup>6</sup>-Dimethyl-adenin-pikrat aus, das als solches durch Schmelz- und Mischschmelzpunkt mit früher<sup>5)</sup> bereits gewonnenem Pikrat identifiziert wurde (Schmp. 236°). Das Filtrat des Dimethyladenin-hydrochlorids wurde im Exsiccator stark eingengt, nochmals mit Methanol aufgenommen und wieder eingengt. Dabei schieden sich Krystalle ab, die auf Ton abgepreßt, in wenig Wasser gelöst und mit Pikrinsäure-Lösung versetzt wurden. Das ausgefallene Pikrat erwies sich durch Schmelz- und Mischschmelzpunkt (Schmp. 214°) als identisch mit dem früher<sup>5)</sup> dargestellten Dimethylguanin-pikrat.

b) Durch hydrolytische Spaltung mit Schwefelsäure entsprechend den früheren Angaben<sup>5)</sup> wurde 1.*N*<sup>6</sup>-Dimethyl-cytosin als Pikrat isoliert, das als solches durch Schmelz- und Mischschmelzpunkt mit dem früher<sup>5)</sup> beschriebenen Produkt identifiziert wurde (Schmp. 222°).