

Zur Konstitution der Hefenucleinsäure¹

Von GERHARD SCHRAMM, GERNOT BERGOLD und HEINRICH FLAMMERSFELD

Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie, Abteilung Virusforschung, Tübingen

(Z. Naturforschg. 1, 328–336 [1946]; eingegangen am 4. September 1945)

Von Hefenucleinsäuren verschiedenen Ursprungs werden die Diffusionskonstanten und bei einigen auch die Sedimentationskonstanten in der Ultrazentrifuge gemessen. Hieraus werden die Molekulargewichte und die Formkonstanten der Nucleinsäuren ermittelt.

Um die Verknüpfungsart der Mononucleotide in der Hefenucleinsäure festzustellen, wird Hefenucleinsäure mit kristallisierter Ribonuclease gespalten. Bei maximaler Spaltung mit diesem Enzym entsteht nur ein freies Säureäquivalent auf je 4 Phosphoratome. Werden die mit Ribonuclease erhaltenen Spaltstücke mit „Nucleophosphatase“ aus Dünndarmschleimhaut behandelt, so werden die restlichen 3 Säureäquivalente erfaßt, was einer vollständigen Spaltung in freie Mononucleotide entsprechen würde.

Die Diffusionskonstante der mit Ribonuclease erhaltenen Spaltstücke wird gemessen. Es ergibt sich nicht der für ein Tetranucleotid erwartete Wert, sondern der eines Mononucleotids. Das Gemisch der Spaltstücke wird weiterhin elektrophoretisch untersucht.

Zur Deutung der gewonnenen Ergebnisse wird angenommen, daß die Verknüpfung der Mononucleotide untereinander durch Ribonuclease in gleicher Weise gespalten, aber bei einem Teil der entstehenden Mononucleotide die Phosphorsäuregruppe innermolekular verestert wird. Entgegen den bisherigen Anschauungen ergibt sich jedenfalls aus der Spaltung der Hefenucleinsäuren mit Ribonuclease kein Hinweis darauf, daß in ihr besondere Tetranucleotide vorgebildet sind.

Nach den Untersuchungen von Caspers-son² darf man annehmen, daß die Nucleinsäuren eine wesentliche Rolle bei der Eiweißvermehrung spielen. In Übereinstimmung hiermit enthalten alle bisher genauer untersuchten Virusproteine Polynucleotide, die einfachen Virusmoleküle definierter Zusammensetzung *Ribonucleinsäure*, die komplizierteren in der Hauptsache *Desoxyribonucleinsäure*. Um die Virusvermehrung chemisch verstehen und beeinflussen zu können, ist daher eine genaue Kenntnis der Struktur der Polynucleotide, insbesondere der Ribonucleotide vom Typus der Hefenucleinsäure erforderlich. Im Rahmen unserer Untersuchung über die Nucleinsäuren der Virusarten wurden daher zunächst einige Versuche mit Hefenucleinsäure durchgeführt.

Für die Strukturermittlung ist zunächst die einwandfreie Bestimmung des *Molekulargewichtes* von grundlegender Bedeutung. Für die Hefenucleinsäure wurde u. a. die Formel eines

cyclischen Tetranucleotids und für bestimmte Fälle auch die eines offenen Tetranucleotids diskutiert. F.G. Fischer und Mitarbeiter^{3,4} nehmen hingegen auf Grund der von ihnen bestimmten Dialysenkonstanten an, daß die von ihnen untersuchten Präparate aus etwa 30 Mononucleotiden bestehen. Wegen der theoretischen Bedenken, die gegen die Dialysenmethode bestehen, halten die Autoren allerdings eine Nachprüfung ihrer Ergebnisse mit einer einwandfreien Methode für wünschenswert. Wir bestimmten nun das Molekulargewicht der Hefenucleinsäure nach dem von Svedberg angegebenen Verfahren aus der Sedimentationskonstanten in der Ultrazentrifuge und der Diffusionskonstanten, das unabhängig ist von allen Voraussetzungen über die Form und Hydratation der Teilchen.

Nach Svedberg ist

$$M = \frac{R \cdot T \cdot s_{20}}{D_{20} \cdot (1 - V\rho)} \quad (1)$$

(M = Molekulargewicht, R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur, s_{20} = Sedimentationskonstante, D_{20} = Diffusionskonstante, V = spezif. Volumen der gelösten Substanz, ρ = Dichte der Lösung).

¹ Die Arbeit wurde am 20. September 1944 bei der Zeitschrift für physiologische Chemie eingereicht, ist aber dort nicht mehr erschienen.

² T. Caspersson, Naturwiss. 29, 33 [1941].



Es wurden zunächst die Diffusionskonstanten verschiedener Hefenucleinsäurepräparate gemessen, die uns von der Firma Boehringer & Söhne zur Verfügung gestellt wurden. Die Versuche wurden in einer Schieberzelle nach O. Lamm⁵ durchgeführt, und zwar in der von G. Bergold entwickelten Form^{5a}. Die Diffusion wurde refraktometrisch nach der Lammschen Skalenmethode verfolgt. Die für die verschiedenen Hefenucleinsäuren gefundenen Diffusionskonstanten sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Weiterhin sind hier die maximalen Molekulargewichte angegeben, die sich aus der Diffusionskonstanten berechnen lassen, wenn man annimmt, daß die Moleküle die Form starrer

Das spezifische Volumen der als Natriumsalz gelösten Hefenucleinsäure wurde von uns zu 0,594 bestimmt.

Für die genaue Bestimmung des Molekulargewichtes nach (1) ist die Messung der Sedimentationskonstanten notwendig, die allerdings wegen der geringen Größe von s_{20} schwierig ist. Nach 6-stdg. Zentrifugieren bei 40 000 Umdrehungen/min in unserer luftgetriebenen Ultrazentrifuge wurde jedoch eine deutliche Sedimentation beobachtet, deren Geschwindigkeit nach der Lammschen Skalenmethode verfolgt werden konnte. Die für die drei Präparate mit dem höchsten Molekulargewicht gefundenen Werte sind in Tab. 1 wiedergegeben. Für die Nucleinsäure C und D ergibt sich somit ein

Substanz	Konz. %	Lösungs- mittel	D_{20}	M_D	s_{20}	M_s	f/f_0
Nucleinsäure N	0,8	0,1-m. NaHCO ₃	27,0	2 090	—	—	—
Nucleinsäure N	0,8	0,01-m. NaCl	27,3	2 030	—	—	—
Nucleinsäure F (Natr. nucleinic.) .	0,8	0,1-m. NaHCO ₃	17,9	7 200	—	—	—
Nucleinsäure A (Handelsware I) .	0,8	0,1-m. NaHCO ₃	15,0	12 200	—	—	—
Nucleinsäure B (Handelsware II) .	0,8	0,1-m. NaHCO ₃	13,6	16 400	—	—	—
Nucleinsäure C (Handelsware III)	0,8	0,1-m. NaHCO ₃	11,6	26 700	2,3	11 800	1,31
Nucleinsäure D (aus Bergin-Hefe)	0,8	0,1-m. NaHCO ₃	11,4	27 700	2,0	10 600	1,41
Nucleinsäure D (aus Bergin-Hefe)	0,4	0,1-m. NaHCO ₃	11,6	26 300	—	—	—
Nucleinsäure E (aus Zellstoffhefe)	0,8	0,1-m. NaHCO ₃	10,2	38 800	1,1	(6 600)	(1,81)

D_{20} = Diffusionskonstante in 10^{-7} cm²/sec., reduziert auf Wasser als Lösungsmittel und 20°

M_D = Molekulargewicht, berechnet aus D_{20} nach (3)

s_{20} = Sedimentationskonstante in Svedberg (10^{-13} cm/sec dyn)

M_s = Molekulargewicht, berechnet aus D_{20} und s_{20} nach (1)

f/f_0 = Reibungsverhältnis

Tab. 1. Molekulargewichte verschiedener Hefenucleinsäuren.

Kugeln haben. In diesem Falle kann aus der Reibung f_s , die die Moleküle bei der Diffusion erfahren, nach dem Stokesschen Gesetz ihr Radius, hieraus das Volumen und schließlich mit Hilfe des spezif. Volumens auch das Molekulargewicht berechnet werden:

$$D_{20} = \frac{RT}{f_0} = \frac{RT}{N 6 \pi \eta r} \quad (2)$$

$$M = \frac{4 N \pi}{3 V} \cdot \left(\frac{RT}{6 \pi \eta N D_{20}} \right)^3 \quad (3)$$

(N = Avogadro'sche Zahl, η = Zähigkeit des Lösungsmittels, r = Molekülradius).

³ F. G. Fischer, J. Böttger u. H. Lehmann-Echternacht, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **271**, 246 [1914].

Molekulargewicht von etwa 11000. Das Präparat E erwies sich als uneinheitlich, so daß die genaue Bestimmung der Sedimentationsgrenze schwierig ist, die für M_s und f/f_0 angegebenen Werte sind daher unsicher. Die höheren Diffusionskonstanten der anderen Präparate zeigen, daß diese zum Teil ein erheblich geringeres Molekulargewicht besitzen. Es ist anzunehmen, daß bei ihrer Herstellung ein mehr oder weniger weitgehender Abbau stattgefunden hat.

⁴ F. G. Fischer, Naturwiss. **30**, 377 [1942].

⁵ O. Lamm, Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsalensis, Ser. IV, **10**, Nr. 6 ([1937].

^{5a} Vergl. G. Bergold, ds. Z. **1**, 100 [1946].

Das tatsächliche Molekulargewicht M_s ist bedeutend niedriger als das aus der Diffusionskonstante berechnete maximale Gewicht. Der molare Reibungskoeffizient f der Nucleinsäure ist also größer als die Reibung kugelförmiger Teilchen gleichen Molekulargewichtes. Die Reibungserhöhung kann darauf zurückgeführt werden, daß das Molekül stark hydratisiert ist oder aber eine längliche ellipsoide Gestalt besitzt. Im letzteren Fall würde sich aus dem Reibungsverhältnis $f/f_0 = 1,4$ ein maximales Achsenverhältnis von 1 : 7 für das ellipsoide Nucleinsäuremolekül ergeben. Die Hefenucleinsäure ist also im Vergleich zur Thymonucleinsäure, die eine ausgesprochen fadenförmige Gestalt mit einem Molekulargewicht von mehreren Millionen besitzt, ein verhältnismäßig kleines kompaktes Molekül.

Bei der Schwierigkeit der Sedimentationsmessung kann über die Einheitlichkeit der untersuchten Präparate keine genaue Aussage gemacht werden. Es scheint jedoch bei den höchstmolekularen Präparaten C und D keine ausgesprochene Polydispersität vorzuliegen. Auffallend ist, daß die aus verschiedenem Ausgangsmaterial gewonnenen Nucleinsäuren in ihrem Molekulargewicht miteinander übereinstimmen und von der gleichen Größe sind wie das aus Tabakmosaikvirus isolierte Polyribonucleotid, dem ein Molekulargewicht von 11 000 zukommen soll⁶. Es scheint demnach, daß diese Molekülgröße durch eine besondere Stabilität ausgezeichnet ist und möglicherweise dem Molekulargewicht der unveränderten, natürlich vorkommenden Polyribonucleotide entspricht.

Unsere Molekulargewichtsbestimmungen enthalten keine Voraussetzungen, die experimentell nicht prüfbar sind; sie bestätigen den von F. G. Fischer und Mitarb.³ angenommenen Polymerisationsgrad von etwa 30 für die höchstmolekularen Präparate der Hefenucleinsäure. Die Formel eines offenen oder cyclischen Tetranucleotids ist für diese somit mit Sicherheit ausgeschlossen.

Es bleibt nun die Frage zu klären, wie die einzelnen Mononucleotide in der Hefenucleinsäure miteinander verknüpft sind. Die Konstitution der vier Mononucleotide, aus denen sich die Hefenucleinsäure in äquimolekularem Ver-

hältnis zusammensetzt, ist durch die Arbeiten von Bredereck⁷ und Levene völlig aufgeklärt. Sie sind alle am C_3 der Ribose mit Phosphorsäure verestert, der Zusammentritt zum Polyribonucleotid erfolgt wahrscheinlich derart, daß eines der noch freien Hydroxyle der Phosphorsäure mit dem Hydroxyl am C_5 oder C_2 der Ribose des Nachbarnucleotids verestert ist. Die Bindung an ein Hydroxyl des benachbarten Purin- oder Pyrimidinringes ist unwahrscheinlicher, eine Phosphamid-Bindung mit einer Aminogruppe dieser basischen Reste ist nach den Desaminierungsversuchen von Bredereck und Mitarb.⁸ wenig wahrscheinlich.

Wenn auch die Art der Bindung im einzelnen noch nicht feststeht, so kann doch die Frage experimentell geprüft werden, ob die Verknüpfung der Mononucleotide in der Hefenucleinsäure untereinander stets in gleicher Weise erfolgt, oder ob verschiedene Bindungsarten miteinander abwechseln. Es wird vielfach vermutet, daß jeweils 4 Nucleotide untereinander gleichartig zu einem Tetranucleotid verknüpft sind, hingegen die Bindung der Tetranucleotide untereinander von anderer Art ist. Hierdurch würde das äquimolare Verhältnis der vier verschiedenen Nucleotide eine sehr einfache Erklärung finden. Die stärkste Stütze für die angenommene Tetranucleotidstruktur bilden jedoch die enzymatischen Abbauprobe von F. W. Allen und J. J. Eiler⁹, die an der Hefenucleinsäure mit kristallisierter Ribonuclease durchgeführt wurden. Bei der elektrometrischen Titration der Spaltstücke fanden sie, daß bei der Spaltung auf jeweils vier vorhandene Säuregruppen ein neues Säureäquivalent auftritt. Sie deuteten diesen Befund als Ringöffnung eines cyclischen Tetranucleotids oder als Spaltung eines höheren Polynucleotids zu einem offenen Tetranucleotid entsprechend dem Übergang von I nach II. Die erste Möglichkeit wird bereits durch die von uns durchgeführte Molekulargewichtsbestimmung der Hefenucleinsäure ausgeschlossen. Unsere im folgenden beschriebenen Versuche zeigen, daß auch die zweite Deutung nicht zutrifft.

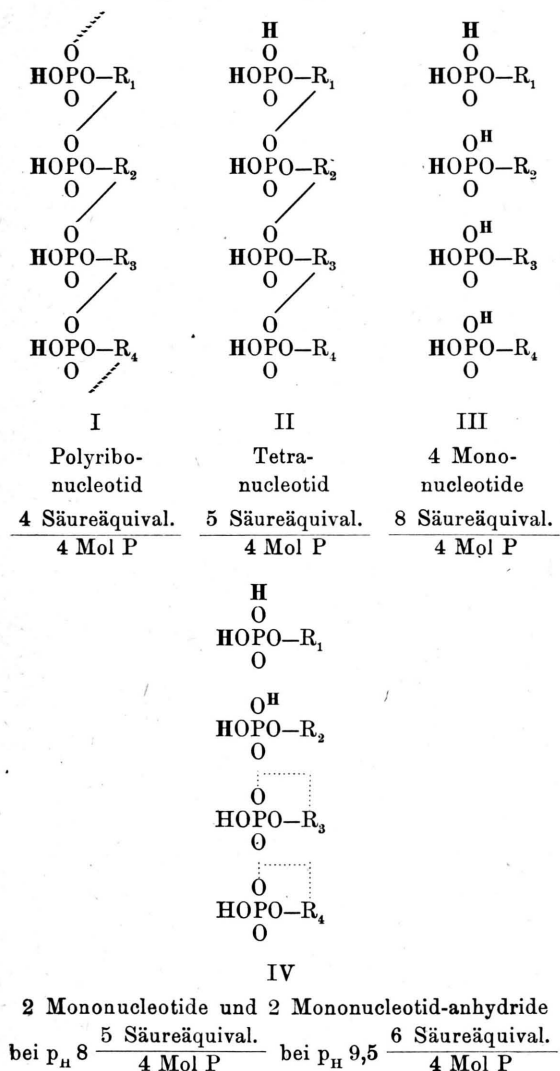
⁶ Zitiert nach Cohen u. Stanley, J. biol. Chemistry **140**, 833 [1941].

⁷ Zusammenfassung bei H. Bredereck, Fortschr. d. Chem. organ. Naturstoffe **I**, 121 [1938].

⁸ H. Bredereck, E. Berger u. F. Richter, Ber. dtsch. chem. Ges. **74**, 338 [1941].

⁹ F. W. Allen u. J. J. Eiler, J. biol. Chemistry **137**, 757 [1941].

Säurezuwachs bei der
Spaltung eines Polyribonucleotids



Spaltungsversuche, die mit verschiedenen Mengen von Ribonuclease durchgeführt wurden,

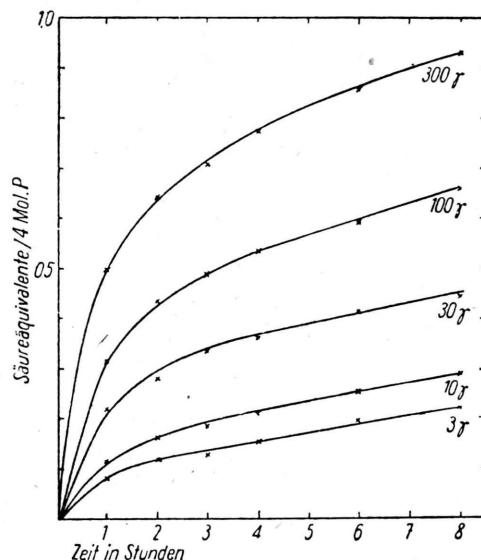


Abb. 1. Verlauf der Spaltung der Hefenucleinsäure mit verschiedenen Mengen Ribonuclease.

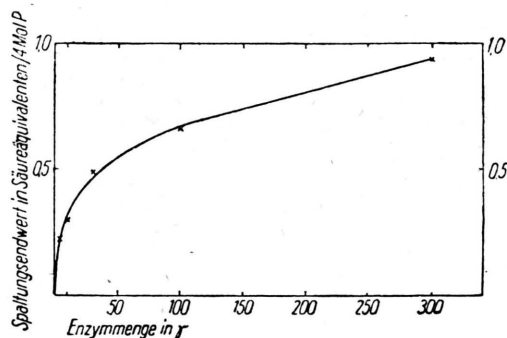


Abb. 2. Endwerte der Spaltung von Hefenucleinsäure mit Ribonuclease.

In früheren Versuchen, die unabhängig von den amerikanischen Autoren durchgeführt wurden, fanden wir ebenfalls, daß bei der Einwirkung von kristallisierter Ribonuclease auf Hefenucleinsäure auf vier Phosphoratome nur ein zusätzliches Säureäquivalent auftritt. Abweichend von den amerikanischen Autoren, die nur die Endprodukte der Spaltung untersuchten, bestimmten wir den Säurezuwachs während der Spaltung, indem wir zu Beginn des Versuches das Reaktionsgemisch gegen Phenolphthalein neutralisierten und dann in bestimmten Zeitabständen die frei gewordene Säure mit Natronlauge zurücktitrierten. Einige derartige

sind in Abb. 1 graphisch dargestellt. Es zeigt sich, daß bei Anwendung von genügend großen Enzymmengen tatsächlich ein Endwert erreicht wird, der einem Säureäquivalent je vier Phosphoratome entspricht. Dies wird besonders deutlich, wenn man die erreichten Endwerte gegen die angewandten Enzymmengen aufträgt (Abb. 2). Weitere Versuche mit wechselnden Mengen von Nucleinsäure, die im Versuchsteil näher beschrieben sind, führten zu dem gleichen Ergebnis. In Übereinstimmung mit Kunitz¹⁰ fanden wir weiter, daß bei der

¹⁰ M. Kunitz, J. gen. Physiol. **24**, 15 [1940].

Spaltung keine freie Phosphorsäure entsteht. Gegenüber Thymonucleinsäure erwies sich die Ribonuclease als völlig unwirksam.

Läßt man auf die mit Ribonuclease erhaltenen Spaltstücke der Hefenucleinsäure ein von Klein¹¹ als „Nucleophosphatase“ bezeichnetes Enzymgemisch aus Dünndarmschleimhaut einwirken, so kann man auch die restlichen drei Säureäquivalente auf vier Phosphoratom e erfassen, die einer vollständigen Spaltung der Hefenucleinsäure entsprechen (s. Formel II u. III). Aus unvorbehandelter Hefenucleinsäure macht die Nucleophosphatase unter Abspaltung von freier Phosphorsäure annähernd vier Säureäquivalente je vier Phosphoratom e frei. Die Spaltung der unveränderten und der mit Ribonuclease behandelten Hefenucleinsäure durch die Nucleophosphatase ist in Abb. 3 graphisch dargestellt. Weitere Versuche, die zur Bestätigung durchgeführt wurden, sind weiter unten beschrieben. Das Auftreten neuer Säureäquivalente bei der Spaltung der mit Ribonuclease erhaltenen Abbauprodukte durch die Nucleophosphatase beweist, daß diese noch zweifach veresterte Phosphorsäure enthalten.

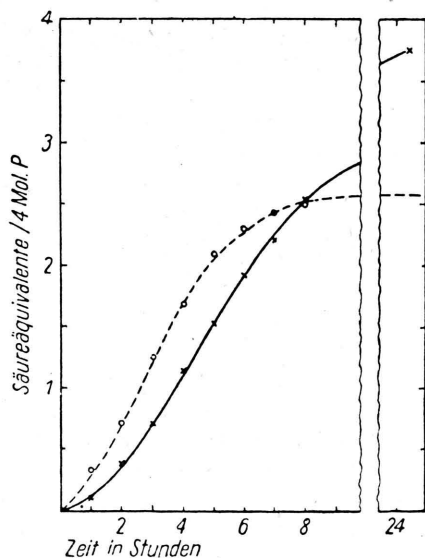


Abb. 3. Hydrolyse der unvorbehandelten und der mit Ribonuclease gespaltenen Hefenucleinsäure durch Nucleophosphatase.

x—x unvorbehandelt

o---o mit Ribonuclease gespalten

¹¹ W. Klein, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 207, 125 [1932].

Dies konnte zunächst als Bestätigung der von Allen und Eiler⁹ angenommenen Tetranucleotidstruktur angesehen werden. Es war daher für uns sehr überraschend, als sich bei der Messung der Diffusionsgeschwindigkeit der mit Ribonuclease erhaltenen Spaltprodukte herausstellte, daß es sich hierbei keinesfalls um ein Tetranucleotid oder um ein Gemisch verschiedener Oligonucleotide mit dem mittleren Molekulargewicht eines Tetranucleotids handeln konnte. Die genaue Analyse der nach der Lammschen Skalenmethode gemessenen Diffusionskurve zeigte vielmehr, daß die Spaltstücke eine nahezu einheitliche Molekülgröße aufweisen und eine Diffusionskonstante besitzen, die dem eines Mononucleotids entspricht, wie der Vergleich mit der ebenfalls gemessenen Diffusionskonstante der Hefeadenylsäure einwandfrei zeigt (Tab. 2).

Präparat	Lösungsmittel	D ₂₀
Hefeadenylsäure . . .	0,1-m. NaHCO ₃	39,1
Spaltprodukt aus Hefenucleinsäure D	0,1-m. NaHCO ₃	37,5
Spaltprodukt aus Hefenucleinsäure D	0,1-m. NaHCO ₃	35,9

Tab. 2. Diffusionskonstanten der Hefeadenylsäure und der mit Ribonuclease aus Hefenucleinsäure gewonnenen Spaltstücke.

Zur Aufklärung dieses überraschenden Befundes wurde das mit Ribonuclease erhaltene Gemisch der Spaltstücke im Elektrophoreseapparat nach Tiselius auf ihr Verhalten im elektrischen Feld untersucht. Hierbei zeigte sich, daß durch die Spaltung mit Ribonuclease aus der vorher einheitlich zur Anode wandernden Hefenucleinsäure zwei verschiedene Fraktionen entstehen. Etwa die Hälfte des Spaltungsgemisches ist bei p_H 7 unbeweglich und besitzt bei p_H 9,5 nur eine so geringe Wanderungsgeschwindigkeit, daß eine quantitative Bestimmung unmöglich war. Diese Fraktion muß demnach sehr schwache Säuren umfassen. Die andere Hälfte der Spaltungsprodukte besitzt eine Beweglichkeit in Richtung zur Anode, die etwa der des Ausgangsmaterials entspricht, aber doch deutlich vermindert ist (Tab. 3).

Präparat	Puffer	p _H	Beweglichkeit 10 ⁵ cm sec. ⁻¹ V cm ⁻¹
Hefenucleinsäure D	m/50 - Glykokoll	9,60	— 21,1
Spaltprodukt aus			
Hefenucleinsäure D	m/50 - Glykokoll	9,50	— 14,3
Hefeadenylsäure . .	m/50 - Glykokoll	9,59	— 13,9
Hefenucleinsäure D	m/100 -		
	Phosphat	7,13	— 17,7
Hefenucleinsäure N	m/100 -		
	Phosphat	6,95	— 15,7
Spaltprodukt aus			
Hefenucleinsäure N	m/100 -		
	Phosphat	7,30	— 13,5

Tab. 3. Elektrophoretische Beweglichkeit verschiedener Hefenucleinsäuren und ihrer Spaltprodukte.

Während z. B. die hochpolymere Nucleinsäure D (Molekulargewicht ca. 11000) bei p_H 9,6 eine Beweglichkeit von — 21,1 cm²/Volt/sek besitzt, zeigt das Spaltprodukt aus dieser Hefenucleinsäure bei etwa dem gleichen p_H eine Wanderungsgeschwindigkeit von — 14,3. Diese Beweglichkeit stimmt mit der der Hefeadenylsäure von — 13,9 überein. Die Spaltung der Nucleinsäure N, die einen niederen Polymerisationsgrad und eine etwas geringere Beweglichkeit als die Nucleinsäure D besitzt, führte zu dem gleichen Ergebnis, indem bei p_H 7 wieder eine neutrale Fraktion und eine Fraktion mit der Wanderungsgeschwindigkeit der Adenylsäure auftraten.

Es ist überraschend, daß das Mononucleotid eine geringere Beweglichkeit besitzt als die hochpolymere Hefenucleinsäure, denn es besitzt je Grundeinheit zwei negative Ladungen, während das Polynucleotid nur eine je Grundeinheit aufweist. Da für die Beweglichkeit das Verhältnis Ladung : Reibung maßgeblich ist, muß angenommen werden, daß durch die mit der Spaltung verbundene Oberflächenvergrößerung die Reibung so stark erhöht wird, daß hierdurch der Ladungszuwachs überkompensiert wird. Für den hohen Reibungskoeffizient der Mononucleotide spricht auch die in Tab. 2 wiedergegebene verhältnismäßig geringe Diffusionskonstante. Dieser Vorstellung entsprechend nimmt die Hefenucleinsäure N wegen ihres mittleren Polymerisationsgrades auch hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit eine Mittelstellung zwischen der hochpolymeren Hefenucleinsäure D und dem Mononucleotid ein.

Aus den elektrophoretischen Versuchen geht also hervor, daß bei der Einwirkung der Ribonuclease auf Hefenucleinsäure neben Spalt-

stücken die in ihrer Beweglichkeit und Molekülgröße Mononucleotiden entsprechen, auch Teilchen entstehen, die zwar nach den Diffusionsmessungen das gleiche Molekulargewicht wie die Mononucleotide besitzen, aber im Gegensatz zu diesen nur sehr schwache Säuren sind. Das Vorhandensein dieser bei p_H 7 undissoziierten Nucleotide wurde noch weiter gesichert, indem in einem besonderen Versuch elektrophoretisch eine kleine Menge der „neutralen Fraktion“ abgetrennt wurde und in ihr das Vorhandensein von Nucleotiden mit Hilfe des charakteristischen Ultraviolettpektrums qualitativ nachgewiesen wurde.

Wie sind nun diese verschiedenen enzymatischen und physikalisch-chemischen Befunde zusammenfassend zu deuten? Diffusionsmessungen und das elektrophoretische Verhalten des Spaltungsgemisches zeigen, daß nur Spaltstücke von der Größe von Mononucleotiden entstehen. Jedoch kann nicht bei allen Produkten die primäre und sekundäre Säuregruppe der Phosphorsäure in freier Form vorliegen, da sonst bei der Spaltung mit Ribonuclease auf je vier Phosphoratom vier zusätzliche Säureäquivalente auftreten müssen (s. Formel III). Da nur ein Zuwachs von einem Säureäquivalent gefunden wird, müssen drei Äquivalente bei der Spaltung verschwunden sein. Die wahrscheinlichste Deutung erscheint uns, daß bei je zwei der entstehenden vier Nucleotide (entweder den Purin- oder Pyrimidinverbindungen) eine innermolekulare Veresterung der Phosphorsäure erfolgt ist, wodurch die Dissoziationskonstante der noch frei gebliebenen primären Säuregruppe der Phosphorsäure bei diesen innermolekularen Estern soweit herabgesetzt wird, daß diese Ester selbst bei p_H 9,5 nur eine geringe elektrophoretische Beweglichkeit besitzen, und die frei gebliebene Säuregruppe bei der Titration gegen Phenolphthalein (Umschlagpunkt p_H 8) jeweils nur zur Hälfte erfaßt wird (Formel IV). Hierdurch erfährt das Defizit von zweimal 1½ Säureäquivalenten gegenüber dem Endwert, der bei der Spaltung in freie Mononucleotide zu erwarten wäre, eine befriedigende Erklärung. Diese fehlenden drei Säureäquivalente treten erst in Erscheinung, wenn durch die Einwirkung der Nucleophosphatase auf das Spaltungsgemisch die gesamte Phosphorsäure aus den Nucleotiden abgespal-

ten wird. Auch die von Allen und Eiler⁹ veröffentlichte Titrationskurve steht mit unserer Vorstellung in Übereinstimmung; aus dieser ist zu erkennen, daß bei der Spaltung tatsächlich zwei und nicht ein zusätzliches Säureäquivalent zu beobachten ist, wenn man als Titrationspunkt nicht pH 7,9, sondern pH 9,5 wählt. Eine endgültige Entscheidung über die Richtigkeit unserer Vorstellung wird sich aber erst nach der chemischen Reindarstellung der Spaltstücke treffen lassen. Dies ist jedoch zur Zeit nicht durchführbar, da die Herstellung genügender Mengen von kristallisierter Ribonuclease aus äußeren Umständen auf Schwierigkeiten stößt.

Nach Abschluß dieser Untersuchungen wurde uns eine Arbeit von Loring und Carpenter¹² zugänglich, aus der hervorgeht, daß diese Autoren aus dem mit Ribonuclease erhaltenen Spaltungsgemisch der Hefenucleinsäure kleine Mengen der vier verschiedenen Mononucleotide isolieren konnten. Hierdurch erfahren unsere Versuchsergebnisse eine wertvolle Stütze. Es gelang den Autoren jedoch nicht, eine befriedigende Deutung dieses Ergebnisses zu finden. Um den geringen Säurezuwachs bei der enzymatischen Hydrolyse zu erklären, nehmen sie an, daß eine unvollständige Spaltung der Hefenucleinsäure zu einem Nucleotidgemisch verschiedenen Polymerisationsgrades stattgefunden hat. Diese Möglichkeit ist jedoch nach unseren Versuchen ausgeschlossen.

Aus unseren auf verschiedene Weise gewonnenen Ergebnissen geht übereinstimmend hervor, daß bei der Spaltung der Hefenucleinsäure durch Ribonuclease nur Teilchen von der Größe von Mononucleotiden entstehen. Es muß demnach angenommen werden, daß alle Verknüpfungen der Mononucleotide untereinander durch das Enzym in gleicher Weise gespalten werden. Im Gegensatz zu der bisherigen Vorstellung ergibt also der Abbau mit Ribonuclease keinerlei Hinweis darauf, daß in der Hefenucleinsäure besondere Tetranucleotide vorgebildet sind. Dies Ergebnis stimmt mit den Befunden von F. G. Fischer¹³ überein, der aus dem Verhalten der Hefenucleinsäure bei der Hydrolyse mit Säure oder Alkali ebenfalls auf eine Gleichartigkeit der Verknüpfung der Mono-

nucleotide untereinander schließt. Die Struktur der Hefenucleinsäure entspricht also der anderer hochpolymerer Naturstoffe, wie z. B. der Cellulose und Stärke, bei denen ebenfalls eine große Anzahl gleichartiger Bausteine durch gleiche Bindungen untereinander verknüpft sind.

Beschreibung der Versuche

1. Versuche mit Ribonuclease

Die kristallisierte Ribonuclease wurde nach der Vorschrift von Kunitz aus Rinderpankreas hergestellt. Das Enzym wurde entweder in halbtrockenem ammoniumsulfathaltigem Zustand oder in $n/100$ -Salzsäure aufbewahrt. In dieser Lösung ist das Enzym bei 0° unverändert haltbar.

Versuchsansatz: Die neutrale Hefenucleinsäurelösung wurde mit der Enzymlösung versetzt und nach Zugabe von einem Tropfen alkoholischer Phenolphthaleinlösung mit $n/100$ -Natronlauge bis zur schwachen Rosafärbung versetzt. Das Endvolumen des Ansatzes betrug 3 ccm. Die Spaltung wurde bei 37° durchgeführt. In bestimmten Zeitabständen wurde zunächst die Kontrolle auf schwach rosa, und dann der Versuchsansatz auf den gleichen Farbton wie die Kontrolle titriert. Der geringe Eigenverbrauch der Hefenucleinsäure ohne Enzym ist bei den im folgenden angeführten Werten bereits in Abzug gebracht. Das Enzym allein verbrauchte keine Natronlauge.

Es wurden zunächst einige Versuche mit 30 mg Hefenucleinsäure N, die nicht weiter gereinigt wurde, durchgeführt. Der Verlauf der Spaltung mit verschiedenen Enzymmengen sowie die hierbei erzielten Endwerte sind in Abb. 1 und 2 graphisch dargestellt. Es ist auffallend, daß mit geringen Enzymmengen die Spaltung sehr unvollständig ist. Worauf dies beruht, ist noch ungeklärt, es scheint sich jedoch nicht um eine Hemmung durch die bei der Spaltung entstandenen Nucleotide zu handeln, da ein vor der Spaltung zugefügtes Gemisch verschiedener Nucleotide ohne Einfluß auf den Verlauf der Spaltung war.

In der Tab. 4 sind die Spaltungsendwerte angegeben, die mit verschiedenen Mengen der hochmolekularen Hefenucleinsäure D sowie mit kurzfristig und lange dialysierter Hefenucleinsäure N durchgeführt wurde. Die Versuche zeigen, daß mit allen Präparaten annähernd der gleiche Endwert erreicht wird, indem etwa ein Mol. Säure auf je vier Mol. Phosphor bei der Spaltung entsteht. Es zeigt sich, daß auch kleine Hefenucleinsäuremengen unter den Versuchsbedingungen vollständig gespalten werden. Das hochmolekulare Produkt ergibt, wie theoretisch zu erwarten, etwas höhere Endwerte als die kurz dialysierte Hefenucleinsäure N. Wird diese aber längere Zeit dialysiert, so werden etwa dieselben Endwerte wie

¹² H. S. Loring u. F. H. Carpenter, J. biol. Chemistry 150, 381 [1943].

¹³ F. G. Fischer, Chemie 56, 329 [1943]; Vortragsreferat.

bei dem hochmolekularen Präparat gefunden. Bei der Dialyse gehen etwa $\frac{3}{4}$ des niedermolekularen Präparates verloren. Es ist wohl anzunehmen, daß der höhere Spaltungsgrad nach der Dialyse auf einer Anreicherung an hochpolymerer Hefenucleinsäure beruht.

verschiedener Mengen von Hefenucleinsäure mit der Phosphatase zeigt Tab. 5.

Die Spaltung verläuft bei geringerer Nucleinsäurekonzentration unvollständiger als bei höherer, wenn auch die Versuchszeiten entsprechend zunehmen. Der höchste erreichte Endwert beträgt

Vers. Nr.	Präparat	Vorbehandlung	Angew. Menge mg	Zeitdauer der Spaltung Std.	Endwert in Mol. H/4 Mol. P
1	Hefenucleinsäure D	nicht dialysiert	20	7	0,85
2	Hefenucleinsäure D	nicht dialysiert	10	7	0,94
3	Hefenucleinsäure D	nicht dialysiert	5	7	1,39
4	Hefenucleinsäure N	4 Tage dialysiert	20	8	0,77
5	Hefenucleinsäure N	4 Tage dialysiert	10	8	0,77
6	Hefenucleinsäure N	4 Tage dialysiert	5	8	0,75
7	Hefenucleinsäure N	4 Tage dialysiert	2,5	8	0,99
8	Hefenucleinsäure N	12 Tage dialysiert	20	8	1,20
9	Hefenucleinsäure N	12 Tage dialysiert	10	8	0,97
10	Hefenucleinsäure N	12 Tage dialysiert	5	8	0,92
11	Hefenucleinsäure N	12 Tage dialysiert	3,5	8	1,0

Tab. 4. Säurezuwachs bei der Spaltung von Hefenucleinsäure mit Ribonuclease.

2. Versuche mit Nucleophosphatase

Das Enzymgemisch wurde nach der Vorschrift von W. Klein¹¹ durch Extraktion von Kälberdünndarm mit Glycerin gewonnen. Es wurde ohne weitere Reinigung für die Versuche verwendet.

a) Versuche mit unvorbehandelter Hefenucleinsäure N

Versuchsansatz: Die dialysierte Hefenucleinsäurelösung wurde mit 0,5 ccm der Glycerinlösung der Nucleophosphatase, einem Tropfen Toluol und Phenolphthalein und wie oben mit $n/100$ -Natronlauge bis zur schwachen Rosafärbung versetzt. Das Anfangsvolumen des Ansatzes betrug 3 ccm, die Temperatur 37°. Zur Kontrolle wurde eine gleiche Lösung ohne Substrat und eine zweite Kontrolle nur mit der Enzymlösung angesetzt. Der Eigenverbrauch der Hefenucleinsäure und der Enzymlösung ist bei den in Tab. 5 angeführten Werten bereits in Abzug gebracht. Wegen der Eigenfärbung der Enzymlösung läßt sich die Titration nicht so genau ausführen wie bei den Versuchen mit der kristallisierten Ribonuclease. Den Verlauf der Spaltung

3,7 Säureäquivalente je 4 Mol. Phosphor. Der Spaltungsverlauf ist mit 10 mg Hefenucleinsäure in Abb. 3 graphisch dargestellt. Die Kurve besitzt eine charakteristische, nach unten durchgebogene Form, die bei allen Versuchen mit Nucleophosphatase beobachtet wurde. Es folgt hieraus, daß die Spaltungsgeschwindigkeit während des Versuches zunächst zunimmt. Dies ist wahrscheinlich so zu erklären, daß die Zwischenprodukte schneller von dem Enzymgemisch gespalten werden als der Ausgangsstoff, was durchaus verständlich ist, da hier wohl mehrere Enzyme nacheinander zur Wirkung kommen.

b) Hydrolyse der mit Ribonuclease gespaltenen Hefenucleinsäure durch Nucleophosphatase

Die Versuche wurden in gleicher Weise wie unter a) durchgeführt. Als Substrat wurden die Endprodukte der mit Ribonuclease gespaltenen Hefenucleinsäure N aus Versuch 4–6 der Tab. 4 benutzt. Das Ergebnis der Spaltung ist aus Tab. 6 ersichtlich.

Angewandte Menge mg	Säurezuwachs in Mol H/4 Mol P nach								
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	24,5 h
2,44	0,345	1,22	1,88	3,02	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13
4,88	0,226	0,875	1,42	2,24	2,78	3,23	3,42	3,47	3,47
9,76	0,113	0,398	0,702	1,14	1,52	1,93	2,23	2,52	3,74

Tab. 5. Spaltung von Hefenucleinsäure N (9 Tage dialysiert) mit Nucleophosphatase.

Angewandte Menge mg	Säurezuwachs in Mol H/4 Mol P nach							
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
5	0,434	1,04	1,65	1,99	2,12	2,19	2,19	2,19
10	0,317	0,732	1,260	1,700	2,10	2,31	2,42	2,53

Tab. 6. Spaltung von mit 300 γ Ribonuclease vorbehandelter Hefenucleinsäure (12 Tage dialysiert) mit Nucleophosphatase.

Die durch Ribonuclease gespaltene Nucleinsäure wird also durch die Nucleophosphatase weiterhin hydrolysiert. Erwartungsgemäß liegt der Endwert um ein Säureäquivalent je 4 Mol. Phosphor tiefer als bei der unvorbehandelten Hefenucleinsäure. Wie aus Abb. 3 ersichtlich, ist auch bei der vorbehandelten Hefenucleinsäure der charakteristische Verlauf der Spaltungskurve erhalten geblieben, wenn auch die Spaltung schneller verläuft als bei dem unvorbehandelten Produkt. Die Summe der mit Ribonuclease und Nucleophosphatase frei gewordenen Säureäquivalente ist gleich dem Endwert der direkten Spaltung der unvorbehandelten Hefenucleinsäure mit Nucleophosphatase.

3. Bestimmung des spezifischen Volumens der Hefenucleinsäure

Die Bestimmung wurde pyknometrisch mit der hochmolekularen Hefenucleinsäure D ausgeführt, die in der gerade zur Neutralisation notwendigen Menge Natronlauge gelöst wurde. In einer 7,5-proz. Lösung, die mit 0,3-n. Natronlauge hergestellt wurde, ergab sich ein partielles spezif. Volumen für das Natriumsalz der Hefenucleinsäure von 0,595, in einer 3-proz. Lösung (Na-Konzentration 0,1-n.) ein solches von 0,593. Mittelwert: 0,594 für das spezif. Volumen bzw. 1,68 für das spezif. Gewicht.

4. Bestimmung der Diffusionskonstanten

Zur Bestimmung der Diffusionskonstanten wurden die Hefenucleinsäuren in 0,1-n. Natriumbicarbonat aufgelöst und in der Diffusionszelle mit der gleichen Salzlösung überschichtet.

Zur Untersuchung der Spaltprodukte wurde folgendermaßen verfahren: 10 mg Hefenucleinsäure wurde mit Ribonuclease bei 37° gespalten, wobei die Lösung wie oben in bestimmten Zeitabständen mit $n/100$ -NaOH neutralisiert wurde. Nachdem der Endpunkt der Spaltung erreicht war, wurde mit 0,25 ccm 1-n. Natriumbicarbonatlösung auf 2,5 ccm

aufgefüllt. Die Diffusion wurde dann gegen eine Bicarbonatlösung durchgeführt, deren Na-Konzentration mit dem Versuchsansatz übereinstimmte und außerdem wie dieser einen Tropfen Phenolphthalein enthielt. Durch Einleiten von CO₂ wurde das pH des Versuchsansatzes dem der überschichteten Lösung angeglichen.

Bei einigen Vorversuchen wurde die Diffusion gegen Wasser durchgeführt. Hierbei ergab sich für die Spaltprodukte aus Hefenucleinsäure N und D ein Wert von 46,8 und 42,7. Die Werte sind höher als die Diffusionskonstante von Adenylsäure ($D_{20} = 39,1$), was bedeuten würde, daß die Spaltprodukte ein kleineres Molekulargewicht als die Hefadenylsäure haben. Der höhere Wert dürfte auf das Diffusionspotential zurückzuführen sein, das sich in diesem Fall durch die ungleiche Na-Ionenkonzentration der beiden Lösungen ausbildet.

Bei unvollständiger Spaltung mit Ribonuclease ergibt sich erwartungsgemäß für das Spaltungsgemisch eine Diffusionskonstante, die zwischen der des Ausgangsmaterials und der der Adenylsäure liegt. Künstliche Mischungen von Nucleinsäuren mit verschiedenem Polymerisationsgrad ergeben ebenfalls eine mittlere Diffusionskonstante, wie es auch bei Mischungen von Eiweißstoffen mit verschiedenem Molekulargewicht beobachtet wurde¹⁴.

Bei vollständiger Spaltung ergibt die Analyse der Diffusionskurven eine nahezu einheitliche Diffusionskonstante für die gesamten Spaltstücke. Es kann sich hierbei nicht um die mittlere Diffusionskonstante eines zum Teil aus höheren Polynucleotiden bestehenden Gemisches handeln, da dies zu der Folgerung führen würde, daß auch Spaltstücke entstehen, die kleiner sind als ein Mononucleotid. Hierfür liegen keinerlei Anhaltspunkte vor.

Über die Art der Berechnung von D_{20} aus den gemessenen Diffusionskurven vergl. G. Bergold^{5a}, a. a. O.

¹⁴ S. Brohult, Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsalensis, Ser. IV, 12, Nr. 4 [1940].