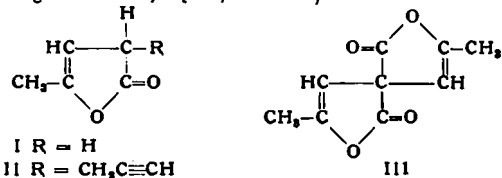


und E. Losow¹⁰) aus Acetylävulinsäure durch trockene Destillation dargestellten α -Angelicalacton (I) identisch erwies (Anisyl-2-angelicalacton, Fp 99,5–100 °C).



Wird Di-propargylmalonsäure entspr. decarboxyliert, so gewinnt man im ersten Falle die Dipropargylessigsäure (Kp₁₁ 125–127 °C, Fp 47 °C), im Falle der raschen Erhitzung auf 210 °C dagegen ein Lacton (Kp, 88–91 °C; n_D²⁰ = 1,476²; Molgew.: 136,1; ber.: C=70,57, H=5,92, O=23,50; gef. C=69,90, H=6,34, O=23,8) mit der wahrscheinlichen Konstitution II. In Gegenwart von Schwermetallsalzen, z. B. Zinkverbindungen, decarboxyliert die Di-propargylmalonsäure schon nach gelindem Erwärmen explosionsartig. Bei vorsichtiger Steuerung der Reaktion gewinnt man neben II (30% Ausbeute) ungefähr in gleicher Menge eine bei Kp, 135–139 °C siedende, aus Alkohol in farblosen Nadeln gut kristallisierende Verbindung (Fp 108–109 °C; ber. Molgew. 180,2; C=59,99, H=4,47, O=35,53; gef. Molgew. 175 (Beckmann); C=59,90, H=4,68, O=35,4). Sie ist in Äther, Chloroform, Methylchlorid und wässrigem Alkali, nicht aber in Wasser löslich, besitzt keine freie Carboxyl-Gruppe und reduziert in der Wärme alkoholische ammoniakalische Silbernitrat-Lösung; ihre Konstitution dürfte wahrscheinlich III entsprechen.

Eingeg. am 26. Mai 1955 [Z 204]

(Auf Wunsch der Autoren erst jetzt publiziert.)

Die Blaufärbung des β -Tetralons

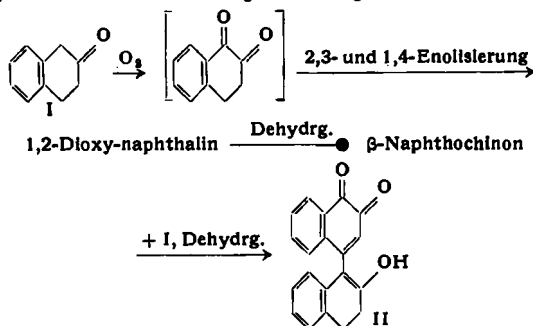
Von Dr.-Ing. H.-W. WANZLICK
und MARIANNE LEHMANN-HORCHLER

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Technischen Universität
Berlin-Charlottenburg

β -Tetralon (I) gibt eine ebenso schöne wie überraschende Farbreaktion: verdünnte Lösungen des Ketons färben sich in Gegenwart von wenig Alkali (unter Luftsauerstoff-Aufnahme) tief indigoblau¹¹. Man macht von dieser einfachen, charakteristischen Farbreaktion Gebrauch, um I (bzw. geeignete I-Derivate) zu erkennen¹².

Nach unseren Untersuchungen ist der blaue (sehr unbeständige) Farbstoff das Alkalisalz einer (ebenfalls unbeständigen) „Säure“, die in Form von leuchtend roten Kristallen in geringer Menge rein erhalten werden konnte. Der Säure kommt die Konstitution II zu, wobei tautomere Formen möglich sind. Die blassen (alkalischen) Lösungen enthalten das entspr. mesomere Anion.

Unsere noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen, über die an anderer Stelle ausführlich berichtet werden soll, lassen erkennen, daß der Farbstoff auf folgendem Wege entstehen dürfte:



Eingeg. am 1. August 1955 [Z 223]

Zum Wirkungsmechanismus der Alkoholdehydrogenase aus Hefe

Von Prof. Dr. K. WALLENFELS
und cand. chem. H. SUND

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.

Bei nativen, kristallisierten ADH-Präparaten (ADH = Alkoholdehydrogenase; DPN = Diphospho-pyridinnucleotid) beobachtet man sehr unterschiedliche Aktivitäten. Bei der Untersuchung einer größeren Zahl verschiedener Präparate stellten wir fest,

daß bei diesen eine strenge Abhängigkeit der Aktivität von der Zahl der freien SH-Gruppen besteht¹³. Die besten Präparate hatten die Wechsellzahl 28500 bei 36 freien SH-Gruppen pro Molekel (Mol.-Gew. 150000). Trägt man die Aktivität und SH-Zahl in ein Koordinatensystem ein, so lassen sich die erhaltenen Punkte durch eine Gerade verbinden, die bei der SH-Zahl vier durch die Nulllinie der Wirksamkeit geht (Bild 1). ADH aus Hefe enthält 4 Grammatoe Zink pro Mol Protein¹⁴, welche nach unseren Feststellungen an Sulfhydryl-Gruppen gebunden sind. 4 Mol DPN werden durch das Fermentprotein so fest gebunden, daß sie in der Ultrazentrifuge mit ihm absinken¹⁵. Auch die DPN- und Alkohol- bzw. Acetaldehyd-Bindung wird durch SH-Gruppen bewerkstelligt.

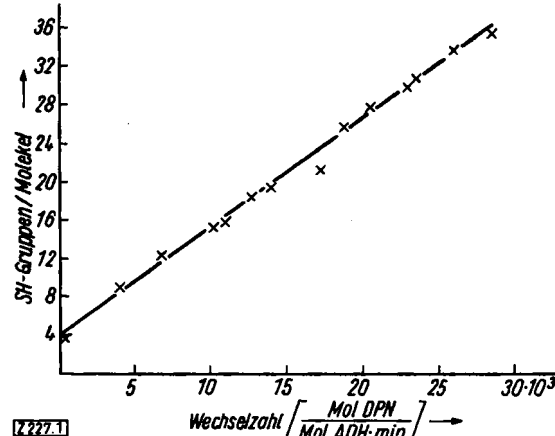


Bild 1

Nach unserer Auffassung dürfte der Mechanismus der Wasserstoff-Übertragung mittels ADH demjenigen der Meerwein-Ponndorf-Reaktion¹⁶ gleichen, wobei in diesem Falle Hydridwasserstoff im Komplex Protein-Zink-Alkohol-DPN seinen Platz wechselt. Die Rolle des Aluminiums bei der Meerwein-Ponndorf-Reaktion wird bei der Wasserstoff-Übertragung Alkohol \rightleftharpoons DPN vom Zink übernommen. Den SH-Gruppen fällt die Aufgabe zu, einerseits Zink zu binden, andererseits die Substrate im richtigen Abstand vom Zink anzuordnen. Je größer die Zahl der freien SH-Gruppen ist, umso wahrscheinlicher ist die Bindung der Substrate in einer für den katalytischen Akt wirksamen Position. Wenn die SH-Zahl auf 4 absinkt, entfällt die Bindungsmöglichkeit für DPN und Alkohol und damit die enzymatische Wirksamkeit.

Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse und ihre Diskussion geben wir in der Biochem. Ztschr.

Eingeg. am 2. August 1955 [Z 227]

Isomere Dihydro-Stufen eines Cozymase-Modells

Von Prof. Dr. K. WALLENFELS
und cand. chem. HANS SCHÜLY

Aus dem Chemischen Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.

In vier Arbeiten der jüngsten Zeit wurde mit verschiedener Methodik nun mehrendgültig nachgewiesen^{17, 18, 19, 20}, daß bei der Reduktion der Pyridinnucleotide sowie der zahlreichen N-substituierten Nicotinsäureamid-Derivate auf enzymatischem Wege oder mittels Dithionit die Hydrierung nicht in 2- oder 6-Stellung, wie P. Karrer und O. Warburg²¹) und verschiedene spätere Bearbeiter annahmen, sondern in 4-Stellung eintritt. Diese Reduktion ist durch das Verschwinden der Absorptionsbande bei 260 m μ

¹³) Die Zahl der SH-Gruppen wurde mit der Methode von P. D. Boyer, J. Amer. chem. Soc. 76, 4331 [1954], bestimmt. Benützte Wellenlänge: 253,7 m μ ; K. Wallenfels u. W. Christian, diese Ztschr. 65, 459 [1953].

¹⁴) B. L. Vallee u. F. L. Hoch, J. Amer. chem. Soc. 77, 821 [1955].

¹⁵) I. E. Hayes u. S. F. Velick, J. biol. Chemistry 207, 225 [1954].

¹⁶) R. B. Woodward, N. L. Wendler u. F. I. Brutschy, J. Amer. chem. Soc. 67, 1425 [1945]. A. Lüttringhaus, diese Ztschr. 62, 87 [1950]; 63, 244 [1951]. W. von E. Doering u. T. C. Aschner, J. Amer. chem. Soc. 75, 393 [1953].

¹⁷) M. Pullman, A. San Pietro u. S. P. Colowick, J. biol. Chemistry 205, 129 [1954].

¹⁸) G. W. Rafter u. S. P. Colowick, ebenda 209, 773 [1954].

¹⁹) D. Mautzerall u. F. H. Westheimer, J. Amer. chem. Soc. 77, 2261 [1955].

²⁰) F. A. Loewus, B. Vennesland u. D. L. Harris, ebenda 77, 3391 [1955].

²¹) P. Karrer, G. Schwarzenbach, F. Benz u. U. Solmsen, Helv. chim. Acta, 19, 811 [1936]. P. Karrer u. O. Warburg, Biochem. Ztschr. 285, 297 [1936]. P. Karrer u. Mitarb., Helv. chim. Acta 19, 1028 [1937]; 20, 55, 72, 622 [1937]; 21, 223, 1147 [1938]; 29, 1152 [1946]; 32, 960 [1949].

¹⁰) Liebigs Ann. Chem. 319, 180 [1901].

¹¹) F. Straus u. A. Rohrbacher, Ber. dtsch. chem. Ges. 54, 46 [1921].

¹²) Vgl. etwa C. A. Grob u. W. Jundt, Helv. chim. Acta 31, 1694 [1948].

oder deren Absinken (bei den Dinucleotiden) und durch das Auftreten eines neuen Maximums bei längeren Wellenlängen (340 bis 360 mμ) charakterisiert. Ganz entsprechend verhält sich ein von uns benutztes Modell, das Bromid des 1-(2,6-Dichlorbenzyl)-nicotinsäureamids²²⁾ bei der Reduktion mit Dithionit.

Demgegenüber haben wir bei der Reduktion dieser Verbindung mit NaBH₄ ein Dihydro-Derivat erhalten, das das charakteristische langwellige UV-Absorptionsband in gleicher Höhe wie das Dithionit-Produkt besitzt, daneben aber noch ein zweites Maximum im kurzwelligen UV aufweist (λ_{max} = 286 mμ). In Kristallform und Beständigkeit unterscheiden sich die beiden Verbindungen, stimmen dagegen in der Elementaranalyse, im Verhalten bei der katalytischen Hydrierung sowie bei der Oxydation mittels des Radikals von Goldschmidt, des Diphenyl-pikryl-hydrazyls, weitgehend überein²³⁾. Beide Dihydro-Körper werden hierbei unter Verbrauch der gleichen Menge von Radikal dehydriert und in Gegenwart von HBr wird das Bromid des 1-(2,6-Dichlorbenzyl)-nicotinsäureamids nahezu quantitativ zurückgebildet. Da für das Dithionit-Produkt die Reduktion in 4-Stellung feststeht, kommt für das Reduktionsprodukt mit Natriumborhydrid nur die 2- oder 6-Stellung in Frage. Damit dürfte zum ersten Mal ein reduziertes Cozymase-Modell mit der Konstitution der „alten“ DPNH-Formel erhalten worden sein. Zwischen der 2- und der 6-Hydrierung müssen erst weitere Versuche entscheiden. Auch andere Cozymase-Modelle, die so wie DPN einen Säurerest tragen²⁴⁾, zeigen ein entspr. Verhalten und bestätigen allem Anschein nach die Erfahrung, daß Dithionit in γ-Stellung, NaBH₄ in α-Stellung hydriert. Dagegen erhielt J. Panouse²⁵⁾ bei der Reduktion des Bromids von N-Tetraacetyl-glucosyl-nicotinsäureamid ein Dihydro-Produkt, das nach Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt mit dem von Karrer²⁶⁾ erhaltenen Dithionit-Produkt identisch war.

Eingeg. am 2. August 1955 [Z 226]

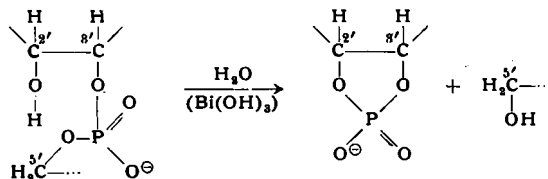
Zur Konstitution der Ribonucleinsäuren aus Hefe

Von Prof. Dr. K. DIMROTH, Dr. H. WITZEL, Dipl.-Chem. G. NEUBAUER und Dr. D. MATHEKA

Aus dem Chemischen Institut der Universität Marburg-Lahn

Durch etwa zweistündiges Kochen einer Heferibonucleinsäure mit einer wässrigen Suspension von Wismuthydroxyd bei einem p_H von 7 oder weniger, wird die Nucleinsäure zum größten Teil hydrolytisch gespalten. Man erhält ein Gemisch von niedermolekularen Bestandteilen, in dem Verbindungen mit mehreren Nucleobasen, wie z. B. Di- oder Oligonucleotide überwiegen. Durch fraktionierende Fällung mit organischen Lösungsmitteln und durch Chromatographie an Ionenaustauscherkolonnen läßt sich eine weitgehende Trennung erzielen, die durch Feintrennungen an kleinen Austauschersäulen, Papierchromatographie und vor allem Papierelektrophorese bei hohen Spannungen und bei verschiedenem p_H beendet wird.

Es gelang uns, nicht nur eine große Zahl von Dinucleosidphosphaten, Dinucleotiden und höheren Spaltprodukten präparativ analysenrein zu gewinnen und in ihrer Konstitution zu klären, sondern auch einen tieferen Einblick in den Verlauf der Wismuthydrolyse zu erhalten. Bei sehr kurz dauernder Hydrolyse werden in neutralem Milieu cyclische Phosphorsäureester gebildet, wobei also unter gleichzeitiger Abtrennung des an C_{5'}-gebundenen alkoholischen Restes eine Ester-Bindung zwischen den benachbarten Hydroxyl-Gruppen entsteht:



Diese cyclischen Ester, welche sich elektrophoretisch und papierchromatographisch leicht nachweisen lassen, wurden bei längerer Hydrolyse zu einem 2',3'-Phosphatgemisch gespalten.

²²⁾ K. Ellegast, Dissertat. Freiburg 1955. Prof. Dr. F. Kröhnke, der uns zuerst auf diese Verbindung u. ihre angenehmen Löslichkeitseigenschaften aufmerksam machte, sind wir sehr zu Dank verpflichtet.

²³⁾ Das mit NaBH₄ erhaltene Reduktionsprodukt reagiert offenbar schnell mit Oxydationsmitteln. In welchem Zusammenhang dieses Verhalten mit dem Redox-Potential steht, wird noch untersucht.

²⁴⁾ K. Wallenfels u. H. Schüly, unveröffentl.

²⁵⁾ J. J. Panouse, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 233, 260 [1951].

²⁶⁾ P. Karrer, B. H. Ringier, J. Büchi, H. Fritzsche u. U. Soimssen, Helv. chim. Acta 20, 55 [1937].

In stärker saurem Milieu führt die Wismuthydrolyse unter Verseifung des primären Phosphorsäureesters der Dinucleotide zu Dinucleosidphosphaten. Insgesamt sollten 16 verschiedene Dinucleotide bzw. Dinucleosidphosphate auftreten können, wenn die Nucleinsäuren aus willkürlich aneinanderhaftenden Mononucleotid-Resten bestehen. Hierbei ist von der Isomerie an den C-Atomen 2' und 3' abgesehen, eine Isomerie, welche die Eigenschaften der Verbindungen nur relativ wenig ändert und wahrscheinlich erst durch die verschiedenartige Spaltung der cyclischen Phosphate im Verlauf der Hydrolyse entsteht. Zur Kennzeichnung der Isomeren seien folgende Abkürzungen benutzt: Für Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil die Buchstaben A, G, C, U, für die Phosphorsäure P. Das vor P stehende Nucleosid soll stets an C_{5'} (oder C_{3'}) verestert, das ihm folgende an C_{5'} verestert sein. Die 16 möglichen Kombinationen sind dann:

A-P-A	G-P-A	C-P-A	U-P-A
A-P-G	G-P-G	C-P-G	U-P-G
A-P-C	G-P-C	C-P-C	U-P-C
A-P-U	G-P-U	C-P-U	U-P-U

Wir haben alle diese Verbindungen auffinden können mit Ausnahme der drei: C-P-G, U-P-A, U-P-G, für deren Existenz wir keinen Anhaltspunkt gefunden haben. Ähnlich liegen die Verhältnisse in der Reihe der Dinucleotide A-P-A-P usw., worauf hier jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

Während man bei fermentativen Hydrolysen, wie sie vor allem mit Ribonuclease ausgeführt werden¹⁻³⁾, solange man die Spezifität der Fermente nicht genau kennt, keine Aussage darüber machen kann, ob das Fehlen bestimmter Kombinationen unter den Hydrolyseprodukten dadurch bedingt ist, daß diese Kombinationen von vornherein nicht in den Nucleinsäuren vorkommen oder dadurch, daß sie in bevorzugter spezifischer Weise fermentativ gelöst werden, dürfte man bei rein chemischen Hydrolysen wie der unsrigen kaum mit einer solchen Spezifität des Angriffs rechnen können. Es scheint uns unwahrscheinlich, daß die Diphosphorsäureester-Bindung zwischen Uridylsäure und Adenosin bzw. Guanidin und zwischen Cytidylsäure und Guanidin wesentlich leichter als die der übrigen Derivate verseifbar ist. Wir glauben daher, daß in den Nucleinsäuren des von uns untersuchten Typus normalerweise Phosphat-Bindungen zwischen dem C_{5'} (C_{3'}) der Uridylsäure und dem C_{5'} der Adenyl- und Guanylsäure sowie zwischen dem C_{5'} (C_{3'}) der Cytidylsäure und dem C_{5'} der Guanylsäure nicht vorkommen. Verknüpfungen dieser Art konnten auch durch andere Autoren weder bei der fermentativen noch bei der chemischen Hydrolyse mit HCl⁴⁾ gefunden werden.

Überträgt man das gewonnene Bild auf die Vorstellung vom strukturellen Bau der Ribonucleinsäure, so würde dies besagen, daß in der Polynucleotid-Kette nach einem Uridin- kein Purinnucleotid, nach einem Cytidin- kein Guanosinnucleotid in der normalen 3'-5'-Verknüpfung folgen kann.

Ein Aufbau der Nucleinsäure-Molekel, bei dem durch eine 3'-3'-Bindung zwischen zwei Pyrimidin-ribosiden eine Inversion der Kette und damit der Anbau weiterer Purine ermöglicht wird, ist deswegen unwahrscheinlich, weil sonst bei der Hydrolyse mit Natronlauge Nucleoside entstehen müßten. Diese wurden aber nicht gefunden.

Eine Inversion ist aber auch in der Art möglich, daß ein Pyrimidinnucleosid einer normalen Polynucleotid-Kette (also mit 3'-5'-Phosphat-Bindungen) nochmals an C_{3'} einen Phosphat-Rest trägt, der an C_{5'} oder C_{3'} eines Pyrimidinnucleosides einer neuen Kette angreift. Diese Form der Verzweigung wurde bereits von Brown und Todd⁵⁾ diskutiert und von Cohn und Volkin⁶⁾ gefordert. Sie hatten gefunden, daß bei Einwirkung einer Schlangengiftdiesterase auf eine Ribonucleinsäure, deren endständige primären Phosphat-Reste entfernt waren, immer noch 20 % der Pyrimidine in Form von Nucleosid-diphosphaten auftreten. Andererseits erhielten sie dabei auch den gleichen Prozentsatz an Purinnucleosiden. Hiernach müßten also 20 % aller Pyrimidin-Bindungen als Verzweigungen mit solchen Inversionen vorliegen, an denen 40 % der Gesamtpyrimidine beteiligt sind.

Da wir nun auf Grund unserer Ergebnisse annehmen müssen, daß keine Pyrimidine (mit Ausnahme der Gruppierung C-P-A) in die Purin-Kette eingestreut sein können, ergibt sich die Notwendigkeit, daß die restlichen 60 % an Pyrimidinen in der Hauptsache zwischen die Inversionsstellen und dem Beginn der Purin-Kette eingebaut sein müssen. Die von Volkin und Cohn⁶⁾ gefundenen Purinnucleoside zeigen weiterhin, daß nach jeder Inversion sich an das Pyrimidin wenigstens ein Purinnucleotid anschließen muß.

¹⁾ G. Schmidt u. a., J. biol. Chemistry 192, 715 [1951].

²⁾ Markham u. Smith, Biochemic. J. 52, 552, 558, 565 [1952].

³⁾ Volkin u. Cohn, J. biol. Chemistry 205, 767 [1953].

⁴⁾ Merrifield u. Woolley, ebenda 197, 521 [1952].

⁵⁾ Brown u. Todd, J. chem. Soc. [London] 1952, 52.

⁶⁾ Volkin u. Cohn, J. biol. Chemistry 203, 319 [1953].