

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]

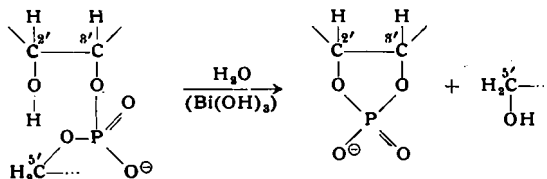
Zur Konstitution der Ribonucleinsäuren aus Hefe

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].

III

Pu 5 3 2

Pu 5 3 2

Py 5 3 2

Py 5 3 2

I

2 3 5 Pu

2 3 5 Pu

2 3 5 Pu

2 3 5 Py

2 3 5 Py_(C)

2 3 5 Pu_(A)

II

Pu 5 3 2

Pu 5 3 2

Py 5 3 2

Py 5 3 2

RNS-Modell

Bild 1