

Diese Untersuchungen sind für das Verständnis der physikochemischen Umwandlungen, denen die DNS bei der Zellteilung unterliegt, von Bedeutung. Die beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Polynukleotid-Ketten können ebenso eine Rolle im biologischen Verhalten der RNS spielen. Da es zuverlässige Anzeichen dafür gibt, daß die genetische Information von der DNS zuerst auf RNS übertragen wird, nimmt man an, daß DNS als Matrize für die RNS-Synthese wirkt. Dabei könnten Ribonukleotide im Hohlraum einer zwei-strangigen DNS-Moleköl schrittweise zu einer Polynukleotid-Kette zusammengefügt werden, so daß schließlich eine drei-strangige Helix entsteht. Oder aus einer einstrangigen DNS-Matrize könnte sich eine zwei-strangige DNS-RNS-Helix bilden^{35-37).}

³⁵⁾ G. Stent, Advances in Virus Research 5, 138 [1958].

³⁶⁾ G. Zubay, Nature [London] 182, 1290 [1958].

³⁷⁾ A. Rich, Ann. N.Y. Acad. Sci. 81, 709 [1959].

Die Arbeiten Kornbergs und seiner Mitarbeiter³⁸⁾ haben uns einen tiefen Einblick in die Vorgänge bei der DNS-Reduplikation gegeben, und vielleicht gelingt es in nicht allzu ferner Zukunft, genetisches Material im Reagensglas zu synthetisieren. Da RNS die genetische Substanz einiger Viren ist, können die hier beschriebenen Untersuchungen den Weg ebnen für eine künstliche Synthese biologisch aktiver Virus-RNS und der Viren selbst. Viren stehen an der Schwelle des Lebens, und es scheint, daß sie uns dazu verhelfen können, einige seiner wichtigsten Prinzipien besser zu verstehen.

Übersetzt von Dr. H. Grünwald, Heidelberg

Eingegangen am 18. Januar 1960 [A 25]

³⁸⁾ A. Kornberg, Angew. Chem. 72, 231 [1960].

Die biologische Synthese von Desoxy-ribonucleinsäure (DNS)

Nobel-Vortrag am 11. Dezember 1959*

Von Prof. Dr. ARTHUR KORNBERG

Stanford University, School of Medicine, Stanford, California (USA)

Die enzymatische Reduplikation von Desoxy-ribonucleinsäure (DNS) und die Eigenschaften eines aus *Escherichia coli* gewonnenen, DNS-synthetisierenden Enzyms werden beschrieben. Das Enzym katalysiert die Bildung neuer DNS-Ketten, deren Zusammensetzung durch eine DNS-Matrize bestimmt wird. Dies geschieht, indem sich zwischen den Basen der Matrize und den komplementären Basen der als Substrate dienenden Nucleosid-triphosphate Wasserstoff-Brücken bilden. Komplementäre Basen-Paare sind Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin. Folgende Befunde bilden die experimentelle Grundlage dieser Vorstellungen: 1. Eine ein-strangige Matrize führt zur Bildung zwei-strangiger DNS. — 2. Nucleotide, die Analoga der natürlichen Purin- und Pyrimidin-Basen enthalten, können nur ganz bestimmte, natürliche Nucleotide ersetzen. — 3. Die chemische Zusammensetzung wird redupliziert. — 4. Die Dinucleotid-Sequenzen werden redupliziert, und es entstehen zwei DNS-Stränge mit entgegengesetzter Basen-Sequenz. — 5. Die DNS-Synthese gelingt nur, wenn die Triphosphate aller vier Desoxy-nucleoside (Thymidin, Desoxy-adenosin, -guanosin und -cytidin) sowie etwas DNS anwesend sind.

Die Kenntnisse, die wir in den letzten Jahren durch die Untersuchung der bakteriellen Transformation¹⁾ und der Virus-Infektion von Bakterien-Zellen²⁾ gewonnen haben, sprechen zusammen mit anderen Befunden³⁾ überzeugend dafür, daß Desoxy-ribonucleinsäure (DNS) die genetische Substanz ist. Wir wollen also annehmen, daß DNS nicht nur die Synthese der Proteine und die Entwicklung der Zelle lenkt, sondern daß sie auch diejenige Substanz ist, die identisch vervielfältigt werden muß, damit sich die Nachkommenschaft einer Zelle über viele Generationen wieder in gleicher Weise entwickelt. Wie eine Tonband-Aufnahme enthält die DNS eine Botschaft mit ganz bestimmten Anweisungen, welche Arbeiten getan werden sollen. Und wie von einer Tonband-Aufnahme können von den DNS-Molekülen exakte Kopien hergestellt werden, so daß die in ihnen verborgene Information zu einer anderen Zeit und an einem anderen Ort wieder wirksam werden kann.

* Das liebenswürdige Entgegenkommen des Nobel-Komitees, Stockholm, hat es uns ermöglicht, diesen Nobel-Vortrag, der erst später in den Veröffentlichungen des Nobel-Komitees erscheinen wird, schon jetzt zu bringen.

¹⁾ O. T. Avery, C. M. MacLeod u. M. McCarty, J. exp. Medicine 79, 137 [1944]; R. D. Hotchkiss in W. D. McElroy u. B. Glass: The Chemical Basis of Heredity. Johns Hopkins Press, Baltimore 1957, S. 321.

²⁾ A. D. Hershey, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 18, 135 [1953].

³⁾ G. W. Beadle in W. D. McElroy u. B. Glass: The Chemical Basis of Heredity. Johns Hopkins Press, Baltimore 1957, S. 3.

Sind diese beiden Funktionen — Realisierung der genetischen Information (Protein-Synthese) und ihre Vervielfältigung (Erhaltung der Rasse) — eng miteinander verknüpft oder lassen sie sich trennen? Aus unseren Arbeiten während der letzten fünf Jahre geht hervor, daß man die Reduplikation der DNS untersuchen und durch Zerlegung in enzymatisch katalysierte Reaktions-Schritte wenigstens teilweise verstehen kann, obwohl das Geheimnis der DNS-gesteuerten Protein-Synthese noch in der Zelle verschlossen liegt.

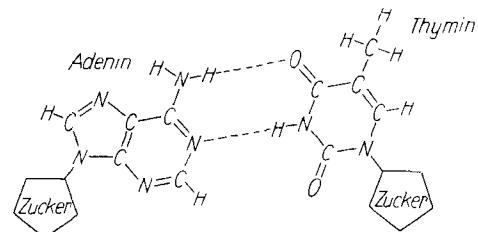
DNS-Struktur

Zunächst seien einige Merkmale der DNS-Struktur beschrieben, die für unsere weiteren Überlegungen wichtig sind. Analysen von DNS-Proben aus den verschiedensten Quellen und in vielen Laboratorien⁴⁾ hatten das bemerkenswerte Ergebnis, daß der Purin-Gehalt stets gleich dem Pyrimidin-Gehalt ist. Unter den Purinen kann das Verhältnis Adenin:Guanin beträchtlich variieren, ebenso unter den Pyrimidinen das Verhältnis Thymin:Cytosin. Aber die Zahl der Basen mit einer Amino-Gruppe in Stellung 6 des Ringes (Adenin, Cytosin) entspricht der Zahl der Basen mit einer Keto-Gruppe in 6-Stellung (Guanin, Thymin). Watson und Crick⁵⁾ leiteten aus diesen Befunden ihre meisterhafte Hypothese über die DNS-Struktur ab. Wie

⁴⁾ E. Chargaff in E. Chargaff u. J. N. Davidson: Nucleic Acids, Academic Press, New York 1955, Bd. I, S. 307-371.

⁵⁾ J. D. Watson u. F. H. C. Crick, Nature [London] 171, 737 [1953]; Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 18, 123 [1953].

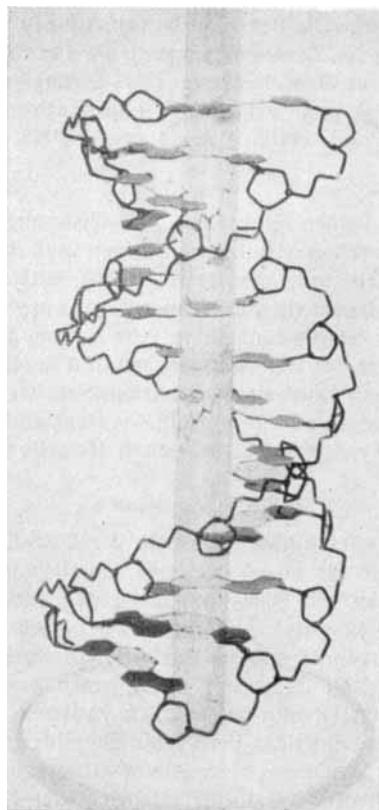
Abb. 1 zeigt, schlugen sie vor, daß die 6-Amino-Gruppe des Adenins bzw. Guanins durch eine Wasserstoff-Brücke mit der 6-Keto-Gruppe des Thymins bzw. Cytosins verknüpft ist, und erklärten so die Äquivalenz der Purin- und Pyrimidin-Basen.



[A24.1]

Abb. 1. Wasserstoff-Brücken zwischen Purin- und Pyrimidin-Basen

rimidin-Gehalte. Auf Grund dieser Überlegungen und nach der von Wilkins und Mitarbeitern⁶⁾ veröffentlichten Röntgenstrukturanalyse nahmen Watson und Crick für DNS eine Struktur an, in der zwei lange, kettenförmige Moleküle spiraling umeinander gewunden sind. Abb. 2 stellt schematisch einen etwa 10 Nucleotid-Einheiten langen Abschnitt einer solchen DNS-Helix dar. Aus physikalischen Messungen ergab sich, daß die durchschnittliche Länge der DNS-Ketten 10000 Nucleotid-Einheiten beträgt. Man erkennt aus Abb. 2, daß die Desoxyribose-Ringe, durch Phosphat-Reste miteinander verknüpft, das Rückgrat der Ketten bilden; die Purin- und Pyrimidin-Ringe sind ebene Strukturen, die im rechten Winkel zur Achse der Spirale stehen. Abb. 3 zeigt ein detaillierteres Modell⁷⁾ und vermittelt eine bessere Vorstellung von der Anordnung der Atome. Die Purin- und Pyrimidin-Basen der einen Kette sind durch die in Abb. 1 gezeigten Wasserstoff-Brücken an-



[A24.2]

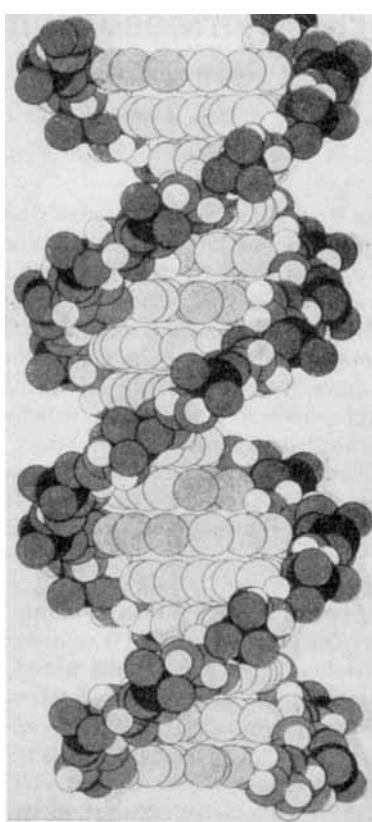
Abb. 2. Doppel-strangige Helix-Struktur der DNS
(Modell von Watson und Crick)

⁶⁾ M. H. F. Wilkins, Biochem. Soc. Symposia 14, 13 [1957].

⁷⁾ M. Feughelman, R. Langridge, W. E. Seeds, A. R. Stokes, H. R. Wilson, C. W. Hooper, M. H. F. Wilkins, R. K. Barclay u. L. D. Hamilton, Nature [London] 175, 834 [1955].

die Pyrimidin- und Purin-Basen der komplementären Kette gebunden. Nach der Röntgenstrukturanalyse ist der Abstand zwischen den beiden Ketten gerade so groß wie die berechnete Länge einer Wasserstoff-Brücke zwischen einem Purin- und einem Pyrimidin-Derivat; er ist für zwei Purine zu groß, für zwei Pyrimidine zu klein. Für den Biologen ist es von größtem Wert, daß diese Struktur zugleich ein Modell für die zelluläre Reduplikation der DNS hergibt. Nimmt man nämlich an, daß sich die beiden Ketten trennen und daß sich zu

jeder eine neue, komplementäre Kette bildet, so erhält man zwei Ketten-Paare, die sowohl untereinander als auch mit der ursprünglichen zwei-strängigen Spirale identisch sind.



[A24.3]

Abb. 3. Molekül-Modell der DNS nach Feughelman et al.⁷⁾

Enzymatische DNS-Reduplikation

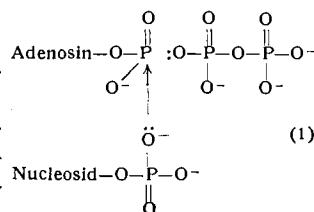
Die von Watson und Crick vorgeschlagene DNS-Struktur gibt nur ein mechanisches Modell der Reduplikation, und wir müssen daher die Frage stellen, wie der chemische Aufbau dieses Riesenmoleküls in der Zelle vor sich geht. Vor etwa 60 Jahren galt die alkoholische Gärung noch als ein Vorgang, der von der lebenden Zelle nicht zu trennen ist. Durch die Entdeckung E. Buchners, daß auch Hefe-Extrakte Zucker vergären können, und durch die Entwicklung der Enzymologie während der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts ist die Gärung schließlich als eine Aufeinanderfolge chemischer Reaktionen erkannt worden. Es ist nur fünf Jahre her, daß man gelegentlich auch die DNS-Synthese für einen nur der lebenden Zelle möglichen Vorgang hielt. Biochemiker sollten sich zwar mit biologischen Oxydations-Reaktionen beschäftigen, aber es galt man-

chem als sicher, daß Experimente am genetischen Apparat nur Unordnung hervorbringen könnten. Solch düstere Voraussagen waren weder damals gerechtfertigt, noch sind sie es heute.

Um das Problem der Nucleinsäure-Biosynthese erfolgreich bearbeiten zu können, war es zunächst erforderlich, die Biosynthese der einfachen Nucleotide und der Nucleotid-Coenzyme zu kennen und methodisch zu beherrschen. Aus diesen Untersuchungen gewannen wir die Überzeugung, daß aktivierte Nucleosid-5'-phosphate die biosynthetischen Bausteine der Nucleinsäuren sind⁸⁾: Bei der Biosynthese der Purine und Pyrimidine bilden sich fast stets die Nucleosid-5'-phosphate⁸⁾. Die freien Basen oder Nucleoside entstehen gewöhnlich nicht, es sei denn unter unnatürlichen Bedingungen. Die 2'- und 3'-Isomeren der Nucleotide kommen in der Zelle zwar vor, aber sie sind wahrscheinlich Abbauprodukte der Nucleinsäuren.

Nucleotid-Coenzyme sind die einfachsten Kondensationsprodukte der Nucleotide. Ihre Biosynthese⁹⁾ besteht in der Kondensation von ATP mit Nicotinamid-mononucleotid (Bildung von Diphospho-pyridin-nucleotid (DPN)), mit Riboflavin-phosphat (Bildung von Flavin-adenin-dinucleotid (FAD)) oder mit Panthethein-phosphat (Bildung einer Coenzym-A-Vorstufe) usw. Ähnliche Mechanismen spielen bei der Aktivierung von Fettsäuren und Aminosäuren eine Rolle, und es ließ sich zeigen, daß auch Uridin-, Cytidin- und Guanosin-Coenzyme aus den Triphosphaten dieser Nucleoside entstehen.

Das Formelschema (1) zeigt, wie sich ein Nucleotid-Coenzym durch den nucleophilen Angriff¹⁰⁾ eines Nucleosid-monophosphates auf den pyrophosphataktivierten Adenylsäure-Rest des ATP bildet.



Unsere Hypothese war, daß die DNS-Biosynthese ganz ähnlich verläuft (Abb. 4). Bausteine sind Desoxynucleosid-5'-triphosphate, die von der 3'-Hydroxyl-Gruppe am wachsenden Ende einer Polynucleotid-Kette angegriffen werden. Dabei spaltet sich Pyrophosphat ab und die Kette wird um ein Glied länger. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen haben diese Hypothese bestätigt.

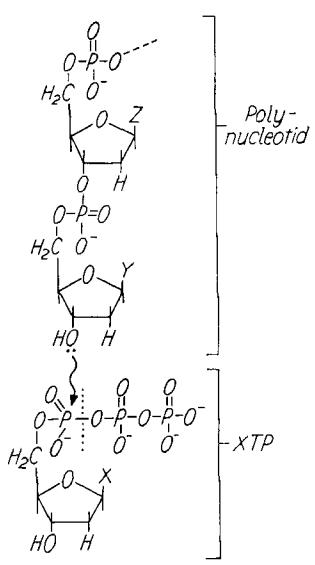


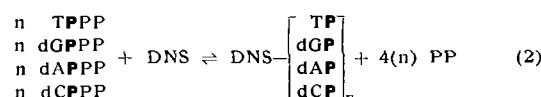
Abb. 4. Mechanismus der Verlängerung einer DNS-Kette

Eigenschaften des DNS-synthetisierenden Enzyms

Wir wollen zunächst das Enzym und seine Entdeckung beschreiben^{8, 11, 12)}. Mischt man die Triphosphate der vier normalerweise in DNS vorkommenden Desoxy-nucleoside mit einem Extrakt aus Thymusdrüsen, Knochenmark oder *Escherichia coli*, so ist insgesamt keine DNS-Synthese zu bemerken. Vielmehr

wird DNS, die man solchen Extrakten zusetzt, abgebaut und wir mußten nach feineren Mitteln suchen, um eine gleichzeitig stattfindende DNS-Synthese nachzuweisen. Wir verwendeten ein ¹⁴C-markiertes Substrat hoher spezifischer Radioaktivität und inkubierten es mit ATP und einem Extrakt aus *E. coli*, einem Organismus, der alle 20 Minuten eine Zellteilung durchmacht. Das erste positive Ergebnis bestand in der Umwandlung eines sehr kleinen Teiles (etwa $5/100000$) des säurelöslichen Substrates in säure-unlösliches Material. Zwar entsprach dies einem Umsatz von nur wenigen μmol , aber es war immerhin etwas. In diesen winzigen Spalt versuchten wir, einen Keil zu treiben, und unser Hammer hieß: Reinigung des Enzyms¹³⁾. Dies war und ist noch immer eine wesentliche Vorarbeit. Unsere besten Präparate sind um einen Faktor von mehreren Tausend ärmer an Protein als die rohen Extrakte, aber sie sind immer noch mit einer oder mehreren der vielen in *E. coli* enthaltenen Nucleasen und Diesterasen verunreinigt. Ähnliche DNS-synthetisierende Enzym-Systeme kommen in tierischen Zellen und in anderen Bakterien-Arten vor¹⁴⁾. Man muß die Reinigung dieser Enzyme abwarten, ehe sie mit dem Präparat aus *Escherichia coli* verglichen werden können.

Gleichung (2)^{14a)} zeigt, welche Voraussetzungen für die DNS-Synthese mit dem gereinigten *E. coli*-Enzym¹⁵⁾ erfüllt sein müssen: die Nucleotide aller vier Basen (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin) müssen anwesend sein, nur die Triphosphate und nur die Verbindungen mit Desoxyribose als Zuckerkomponente sind wirksam. Außerdem ist DNS aus tierischem oder pflanzlichem Gewebe bzw. aus Bakterien oder Viren erforderlich. Die Herkunft dieser DNS ist offenbar gleichgültig, solange ihr Molekulargewicht groß genug ist. DNS wird dann synthetisiert bis eines der Substrate aufgebraucht ist. Die Menge des Produktes ist bis zu mehr als zwanzigmal größer als die dem Ansatz zugefügte DNS-Menge, d. h. das Produkt besteht zu 95% oder mehr aus den als Substrat verwendeten Nucleotiden. Das freiwerdende Pyrophosphat ist mit den umgesetzten Nucleotiden äquimolar.



Läßt man eines der in Gleichung (2) angegebenen Substrate fort, so ist der Umsatz um mehr als den Faktor 10⁴ geringer, und es bedarf besonderer Methoden, um nachzuweisen, daß überhaupt eine Reaktion stattfindet. Fehlt eines der Desoxy-nucleotide, so werden ein paar Nucleotide an die DNS angehängt¹⁶⁾, aber danach hört die Synthese auf. Unsere Untersuchungen lassen vermuten, daß bei dieser „begrenzten Reaktion“ zwei-strangige DNS-Spiralen, in denen ein Strang kürzer ist als der andere, „repariert“ werden, indem – gelenkt durch Wasserstoff-Brücken zwischen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin – der kürzere Strang durch Anhängen einiger Nucleotide verlängert wird.

Enthält ein Ansatz alle vier Nucleosid-triphosphate, nicht aber die notwendige DNS, so findet überhaupt keine

⁸⁾ A. Kornberg in W. D. McElroy u. B. Glass: The Chemical Basis of Heredity. Johns Hopkins Press, Baltimore 1957, S. 579; Rev. mod. Physics 31, 200 [1959].

⁹⁾ A. Kornberg in W. D. McElroy u. B. Glass: Phosphorus Metabolism. Johns Hopkins Press, Baltimore 1951, S. 392; Advances in Enzymol. 18, 191 [1957].

¹⁰⁾ D. E. Koshland Jr. in W. D. McElroy u. B. Glass: The Mechanism of Enzyme Action. Johns Hopkins Press, Baltimore 1954, S. 608.

¹¹⁾ A. Kornberg, I. R. Lehman, E. S. Simms, Feder. Proc. 15, 291 [1956].

¹²⁾ A. Kornberg, Harvey Lectures 53, 83 [1957–1958].

¹³⁾ I. R. Lehman, M. J. Bessman, E. S. Simms u. A. Kornberg, J. biol. Chemistry 233, 163 [1958].

¹⁴⁾ F. J. Bollum u. V. R. Potter, J. Amer. chem. Soc. 79, 3603 [1957]; C. G. Harford u. A. Kornberg, Feder. Proc. 17, 515 [1958]; F. J. Bollum, Feder. Proc. 17, 193 [1958]; 18, 194 [1959].

^{14a)} Ann. des Übers.: Folgende Abkürzungen werden verwendet:
T = Thymidin, dG = Desoxy-guanosin, dA = Desoxy-adenosin,
dC = Desoxy-cytidin. P steht für einen Phosphat-Rest, ATP bedeutet Adenosin-triphosphat.

¹⁵⁾ M. J. Bessman, I. R. Lehman, E. S. Simms u. A. Kornberg, J. biol. Chemistry 233, 171 [1958].

¹⁶⁾ J. Adler, I. R. Lehman, M. J. Bessman, E. S. Simms u. A. Kornberg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 641 [1958].

Reaktion statt. Warum? Wirkt die DNS als Starter ähnlich wie Polysaccharide bei der Glykogen-Synthese oder steuert sie als Matrize die Synthese so, daß exakte Kopien von ihr entstehen? — Wir haben gute Gründe anzunehmen, daß letzteres der Fall ist, und offenbar ist es die Fähigkeit der DNS, durch Wasserstoff-Brücken die als Substrate dienenden Nucleotide in bestimmter Reihenfolge zu binden, die ihre Anwesenheit erforderlich macht.

Das von uns untersuchte Enzym besitzt also die bisher einmalige Eigenschaft, eine Verbindung zu synthetisieren, deren Zusammensetzung von einer Matrize bestimmt wird. Es verbindet Purin- oder Pyrimidin-Derivate in der Reihenfolge, die durch Wasserstoffbrücken-Bindung mit den komplementären Basen der Matrize vorgegeben ist (Abb. 5). Für diese These gibt es fünf Beweise.

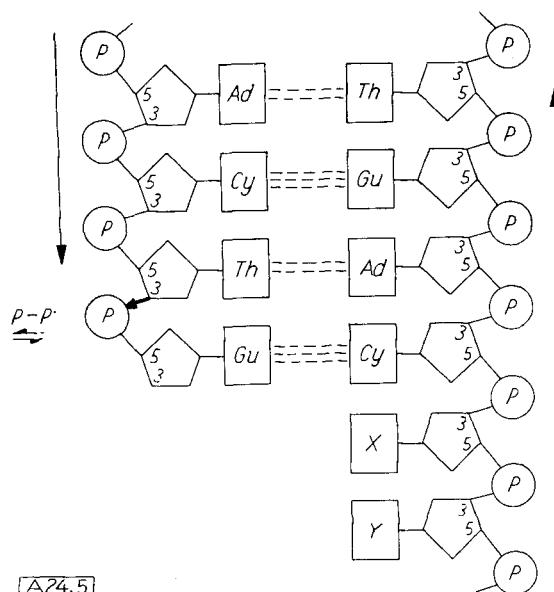


Abb. 5. Mechanismus der enzymatischen DNS-Reduplikation. Es bedeuten: Ad = Adenin, Cy = Cytosin, Th = Thymin, Gu = Guanin

1. Physikalische Eigenschaften enzymatisch synthetisierter DNS

Es sei zunächst noch einmal daran erinnert, daß die enzymatisch synthetisierte DNS zu 90–95 % aus den als Substrat verwendeten Nucleotiden besteht. Zusammen mit H. K. Schachman fanden wir, daß dieses enzymatische Produkt von hochmolekularer, doppel-strangig gebauter, natürlicher DNS nicht zu unterscheiden ist¹⁷⁾. Seine Sedimentationskonstante beträgt etwa 25 S, seine reduzierte Viscosität ist 40 dl/g. Auf Grund dieser Werte muß es die Gestalt eines langen, starren Stabes und ein Molekulargewicht von etwa 6 Millionen haben. Beim Erhitzen wird aus dem Stab eine kompakte, wahllos geknäuelte Struktur. Man darf annehmen, daß dabei die Wasserstoff-Brücken, welche die beiden Stränge in der Helix zusammenhalten, „schmelzen“, und dies zeigt sich in den charakteristischen Änderungen der viscosimetrischen und optischen Eigenschaften des Moleküls. Ähnliche Ergebnisse erhält man bei der Spaltung des Moleküls mit Pankreas-Desoxyribonuclease. In jedem Fall ist enzymatisch synthetisierte DNS von natürlicher DNS nicht zu unterscheiden, und beide besitzen wahrscheinlich die gleiche, durch Wasserstoff-Brücken stabilisierte Struktur.

Sollte man annehmen, daß die wirr verknäuelten Ketten erhitzter DNS die DNS-Synthese starten können? — Wohl nicht; ausgehend von täglicher Erfahrung (verknäuelter

Bindfaden) würde man die Reduplikation einer solchen Matrize für ziemlich hoffnungslos halten. Tatsächlich ist erhitzte DNS aber ein ausgezeichneter Starter, die verknäuelte, nicht-viscose, ein-strangige Substanz führt zur Synthese hochviscoser, doppel-strangiger DNS¹⁸⁾. Sinsheimer isolierte aus dem sehr kleinen Virus $\Phi X 174$ DNS, die offenbar ein-strangig ist¹⁹⁾. Sie erwies sich wie erhitze DNS als ein vorzüglicher Starter, und wir verwenden sie zur Zeit²⁰), um durch Sedimentationsversuche zu zeigen, daß sie während der enzymatischen Synthese allmählich in eine zwei-strangige Helix umgewandelt wird.

Wir können die physikalischen Aspekte der DNS-Reduplikation hier nicht in allen Einzelheiten diskutieren, aber es sei doch erwähnt, daß bei Verwendung von hochgereinigten Enzym-Präparaten ein-strangige DNS nicht nur ein geeigneter Starter, sondern überhaupt die einzige aktive Form ist. Natürliche, doppel-strangige DNS verhält sich in solchen Fällen inert, es sei denn, man erhitzt sie oder behandelt sie etwas mit Desoxyribonuclease. Ähnliche Beobachtungen hat Bollum mit einem gereinigten Enzym aus Kalbsthymus gemacht²¹⁾.

2. Verwendung unnatürlicher Purine und Pyrimidine

Aus den vielen Berichten über den Einbau von Bromuracil²²⁾, Aza-guanin²³⁾ und anderen Analoga in die DNS von Bakterien und Viren läßt sich schließen, daß die DNS-Struktur begrenzte Variationen in der Struktur der Purin- und Pyrimidin-Basen verträgt, so lange deren Fähigkeit, Wasserstoff-Brücken zu bilden, nicht beeinträchtigt wird. So können Desoxyuridin-triphosphat und 5-Brom-desoxyuridin-triphosphat als Ersatz für Thymidin-triphosphat dienen, nicht aber als Ersatz für Desoxyadenosin-, Desoxyguanosin- oder Desoxycytidin-triphosphat. 5-Methyl- und 5-Brom-cytosin können Cytosin spezifisch ersetzen²⁴⁾, Hypoxanthin ist nur statt Guanin verwendbar. Alle diese Befunde lassen sich am besten durch die Bildung von Wasserstoff-Brücken erklären, wie sie zwischen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin bestehen.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß man in der DNS von *E. coli*-Bakteriophagen der geradzahligen T-Serie Hydroxymethyl-cytosin an Stelle von Cytosin findet²⁵⁾. Jenes ist also ein natürlich vorkommendes Cytosin-Analogon. Die DNS solcher Phagen enthält äquivalente Mengen Hydroxymethyl-cytosin (HMC) und Guanin neben — wie üblich — äquivalenten Mengen Adenin und Thymin. Interessant ist weiterhin, daß in der DNS der T2-, T4- und T6-Phagen Glucose an die Hydroxymethyl-Gruppe des HMC gebunden ist, so daß für jeden Phagen-Typ ein charakteristisches Verhältnis HMC:Glucose entsteht^{26–28)}. Allerdings enthalten im T2- und T6-Phagen nicht alle Hydroxymethylcytosin-Reste Glucose²⁷⁾. Die Synthese dieser DNS scheint mit der einfachen Hypothese

- ¹⁸⁾ I. R. Lehman, Ann. N.Y. Acad. Sci. 81, 745 [1959].
- ¹⁹⁾ R. L. Sinsheimer, J. Mol. Biol. 1, 43 [1959].
- ²⁰⁾ I. R. Lehman, R. L. Sinsheimer u. A. Kornberg, unveröffentl.
- ²¹⁾ F. J. Bollum, J. biol. Chemistry 234, 2733 [1959].
- ²²⁾ F. Weygand, A. Wacker u. H. Dellweg, Z. Naturforsch. 7b, 19 [1952]; D. B. Dunn u. J. D. Smith, Nature [London] 174, 305 [1954]; S. Zamenhof u. G. Griboff, Nature [London] 174, 306 [1954].
- ²³⁾ M. R. Heinrich, V. C. Dewey, R. E. Parks jr. u. G. W. Kidder, J. biol. Chemistry 197, 199 [1952].
- ²⁴⁾ M. J. Bessman, I. R. Lehman, J. Adler, S. B. Zimmerman, E. S. Simms u. A. Kornberg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 633 [1958].
- ²⁵⁾ G. R. Wyatt u. S. S. Cohen, Biochem. J. 55, 774 [1953].
- ²⁶⁾ R. L. Sinsheimer, Science [Washington] 120, 551 [1954]; E. Volkin, J. Amer. chem. Soc. 76, 5892 [1954].
- ²⁷⁾ R. L. Sinsheimer, Proc. nat. Acad. Sci. USA 42, 502 [1956]; M. A. Jesaitis, J. exp. Medicine 106, 233 [1957]; Feder. Proc. 17, 250 [1958].
- ²⁸⁾ G. Streisinger u. J. Weigle, Proc. nat. Acad. Sci. USA 42, 504 [1956].

¹⁷⁾ H. K. Schachman, I. R. Lehman, M. J. Bessman, J. Adler, E. S. Simms u. A. Kornberg, Feder. Proc. 17, 304 [1958].

der Basen-Paarung unvereinbar zu sein. Insbesondere ergeben sich zwei Fragen. Erstens: wie wird der Einbau von Cytosin in die Phagen-DNS verhindert, da *E. coli*-Zellen unter normalen Bedingungen Desoxycytidin-triphosphat enthalten und es auch zur DNS-Synthese verwenden? Zweitens: wie hat man das konstante Glucose:HMC-Verhältnis zu erklären, falls sowohl mit Glucose substituiertes als auch nicht-substituiertes Hydroxymethyl-cytosin als Substrat bei der DNS-Synthese dient? — Wir konnten kürzlich zeigen, daß die Polymerase-Reaktion auch in den virus-infizierten Zellen durch die Basen-Paarung über Wasserstoff-Brücken bestimmt wird, daß aber die Synthese der spezifischen Phagen-DNS durch einige neue Enzyme unterstützt wird, welche die Zelle nach der Infektion mit dem Virus bildet^{29, 30}. Unter diesen neuen Enzymen ist eines, das Desoxycytidintriphosphat spaltet und damit für die DNS-Synthese unbrauchbar macht³⁰. Ein anderes Enzym überträgt Glucose von Uridin-diphosphat-glucose direkt und spezifisch auf bestimmte Hydroxymethyl-cytosin-Reste in der DNS³⁰.

3. Chemische Zusammensetzung enzymatisch synthetisierter DNS

Wir wollen zwei Fragen stellen: besteht im enzymatisch synthetisierten Produkt die gleiche Äquivalenz zwischen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin, die für natürliche DNS so charakteristisch ist? Zweitens: beeinflußt und bestimmt die Zusammensetzung der als Starter verwendeten natürlichen DNS die Zusammensetzung des Produktes?

Die Zahlen der Tabelle 1 beantworten beide Fragen³¹. Die verschiedenen Produkte wurden unter identischen Versuchsbedingungen erhalten, lediglich die als Starter dienende DNS stammte jedesmal aus einer anderen Quelle. Aus der Tabelle geht hervor, daß synthetische DNS Adenin

DNS	A	T	G	C	$\frac{A+G}{T+C}$	$\frac{A+T}{G+C}$
<i>M. phlei</i>	0,65	0,66	1,35	1,34	1,01	0,49
	0,66	0,65	1,34	1,37	0,99	0,48
<i>E. coli</i>	1,00	0,97	0,98	1,05	0,98	0,97
	1,04	1,00	0,97	0,98	1,01	1,02
Kalbsthymus	1,14	1,05	0,90	0,85	1,05	1,25
	1,12	1,08	0,85	0,85	1,02	1,29
Bakteriophage T 2	1,31	1,32	0,67	0,70	0,98	1,92
	1,33	1,29	0,69	0,70	1,02	1,90
A-T-Copolymer	1,99	1,93	<0,05	<0,05	1,03	>40

Tabelle 1. Chemische Zusammensetzung enzymatisch synthetisierter DNS in Abhängigkeit vom Starter

und Thymin bzw. Guanin und Cytosin in äquivalenten Mengen enthält, daß in jedem Fall Purin- und Pyrimidin-Gehalt identisch sind, d. h. $(A+G):(T+C) = 1$. Man erkennt weiterhin, daß der Quotient $(A+T):(G+C)$, der für jede als Starter verwendete DNS-Sorte einen charakteristischen Wert besitzt, im Synthese-Produkt sehr genau wiederkehrt, womit auch die zweite Frage positiv beantwortet ist. Ob man diese Messungen mit Hilfe von Isotopen ausführt, nachdem der DNS-Gehalt im Reaktionsgemisch um 1% gestiegen ist, oder ob man wartet, bis sich die DNS um 1000% vermehrt hat — das Ergebnis ist stets das glei-

²⁹⁾ J. G. Flaks u. S. S. Cohen, *J. biol. Chemistry* 234, 150 [1959]; J. G. Flaks, J. Lichtenstein u. S. S. Cohen, *J. biol. Chemistry* 234, 1507 [1959].

³⁰⁾ A. Kornberg, S. B. Zimmerman, S. R. Kornberg u. J. Josse, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 45, 772 [1959].

³¹⁾ I. R. Lehman, S. B. Zimmerman, J. Adler, M. J. Bessman, E. S. Simms u. A. Kornberg, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 44, 1191 [1958].

che. Es ändert sich auch nicht, wenn man das molare Verhältnis der Substrate in weiten Grenzen variiert. In der letzten Zeile der Tabelle 1 ist eine neuartige „DNS“ beschrieben, die unter hier nicht näher zu erörternden Bedingungen entsteht^{18, 32}). Es genügt zu sagen, daß sich mit sehr großer Verzögerung ein Copolymer aus Desoxyadenylsäure und Thymidylsäure bildet, das die Größe und physikalischen Eigenschaften natürlicher DNS aufweist und beide Nucleotide in streng abwechselnder Reihenfolge enthält. Verwendet man diese seltene Form eines DNS-ähnlichen Polymeren als Starter, so beginnt sofort die Synthese eines neuen A-T-Polymeren, das — obwohl alle vier Nucleosid-triphosphate als Substrate anwesend sind — keine Spur von Guanin oder Cytosin enthält. Man kommt also um die Folgerung nicht herum, daß bei der enzymatischen DNS-Synthese die Basen-Zusammensetzung des Starter-Moleküls redupliziert wird und daß hierbei Wasserstoff-Brücken zwischen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin die entscheidende Rolle spielen.

4. Enzymatische Reduplikation der Nucleotid-Sequenz

Es wurde bereits erwähnt, daß DNS aller Wahrscheinlichkeit nach Träger der genetischen Informationen ist. Die vier Nucleotide bilden ein aus vier Buchstaben bestehendes Alphabet; ihre Reihenfolge bestimmt den Inhalt der Information. Diese Reihenfolge ist heute noch unbekannt. Was Sanger und anderen bei Proteinen bereits gelungen ist, bleibt bei den Nucleinsäuren noch zu tun. Das Problem ist zwar schwieriger, aber es ist nicht unlösbar.

Unsere Versuche, Nucleotid-Sequenzen zu bestimmen³³, werden im einzelnen anderswo veröffentlicht, hier sei nur eine Zusammenfassung gegeben. Wir synthetisierten DNS enzymatisch aus den vier Desoxynucleosid-triphosphaten, von denen eines mit ^{32}P markiert war. Die radioaktiven

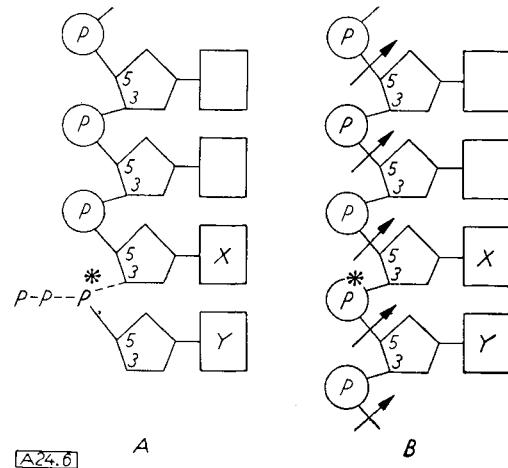


Abb. 6. Verfahren zur Bestimmung der Häufigkeit von Dinucleotid-Sequenzen in DNS. A: Synthese mit Polymerase, B: Abbau mit Micrococccen-DNAse und Milz-Diesterase

Phosphat-Reste befanden sich direkt am C-Atom 5 der Desoxyribose und wurden daher zur Brücke zwischen den markierten Nucleotiden und den ihnen in der Polynucleotid-Kette vorangehenden (Abb. 6 A). Nachdem sich etwa 10^{16} Diester-Bindungen gebildet hatten, isolierten wir die DNS und bauten sie enzymatisch quantitativ zu Desoxynucleosid-3'-phosphaten ab. Wie Abb. 6 B zeigt, befinden sich die ^{32}P -Phosphat-Reste jetzt an C-3' derjenigen Nucleotide, mit denen das markierte Substrat bei der Synthese reagiert

³²⁾ C. M. Radding, J. Adler u. H. K. Schachman, *Feder. Proc.* [1960], im Druck.

³³⁾ J. Josse u. A. Kornberg, *Feder. Proc.* [1960], im Druck.

hat. Der ^{32}P -Gehalt der durch Papier-Elektrophorese isolierten Desoxynucleosid-3'-phosphate ist also ein Maß dafür, wie häufig das markierte Substrat mit jedem der vier Nucleotide während der Synthese verknüpft worden ist. Wiederholt man dieses Verfahren dreimal und markiert jedesmal ein anderes Nucleotid, so erfährt man die relative Häufigkeit aller 16 möglichen Dinucleotid-Sequenzen in einer DNS-Kette.

Wir haben diese Untersuchungen bisher mit Starter-DNS aus sechs verschiedenen, natürlichen Quellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind:

1. In jedem Fall enthält das Produkt alle 16 möglichen Dinucleotid-Sequenzen.
2. Das Häufigkeits-Verhältnis dieser Nucleotid-Sequenzen hat in jedem Fall einen anderen, reproduzierbaren Wert und kann nicht aus der Basen-Zusammensetzung der DNS vorausberechnet werden.
3. Bei der Synthese lagern sich die Basen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin paarweise aneinander.
4. Aus den Häufigkeits-Verhältnissen geht außerdem hervor, daß bei der enzymatischen Reduplikation zwei DNS-Stränge mit entgegengesetzter Basen-Sequenz entstehen, wie dies nach dem von Watson und Crick vorgeschlagenen DNS-Modell zu erwarten ist.

Durch eine Erweiterung solcher Untersuchungen sollte es möglich sein, in allen DNS-Proben, die sich enzyma-

tisch reduplizieren lassen, das Häufigkeits-Verhältnis der Dinucleotide festzustellen und so einige Anhaltspunkte zur Entzifferung des DNS-Code zu erhalten. Leider kann man so die Häufigkeit der möglichen Trinucleotide nicht ermitteln, aber wir hoffen, daß durch Verbesserung der enzymatischen Analyse-Methoden und der chromatographischen Technik zur Isolierung der Abbauprodukte auch in dieser Richtung Fortschritte möglich sein werden.

5. Alle vier Triphosphate und DNS sind zur DNS-Synthese nötig

Wir haben bereits erwähnt, daß alle vier Desoxynucleosid-triphosphate und DNS anwesend sein müssen, wenn eine DNS-Synthese stattfinden soll. Wir können dieses Erfordernis jetzt als einen weiteren Beweis für die Existenz von Wasserstoff-Brücken anschen. Fehlt die DNS, so ist keine Matrize für die Bildung von Wasserstoff-Brücken vorhanden. Fehlt eines der vier Nucleosid-triphosphate, so hört die Synthese frühzeitig und abrupt auf, weil es für eine Base der Matrize keinen Partner zur Bildung der Wasserstoff-Brücke mehr gibt.

An dieser Stelle möchte ich den Herren J. Adler, M. J. Bessman, J. Josse, I. R. Lehman und E. S. Simms und Frau S. Kornberg meinen herzlichsten Dank für ihre Beiträge abstellen.

Übersetzt von Dr. H. Grünwald, Heidelberg

Eingegangen am 27. Januar 1960 [A 24]

Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie III

2. Darstellung von Estern, Amiden und Anhydriden der Phosphorsäure

Von Prof. Dr. F. CRAMER

Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Darmstadt

Es wird über bekannte Phosphorylierungsmethoden referiert. Außerdem werden folgende neue Reaktionen beschrieben: Darstellung von Pyrophosphaten mit Isocyanat über die Carbamylphosphate; Reaktionen von Ketenacylalen zu unsymmetrischen Pyrophosphaten; Trichloracetonitril als Veresterungsmittel für Phosphorsäuren und die Darstellung von Geranylphosphat und Farnesylphosphat; Darstellung und Reaktionsweisen von Imidazoliden der Phosphorsäure.

1. Einleitung
2. Verwendung von Säurechloriden, klassische Verfahren
3. Ester mit geschützten Gruppen
4. Selektive Entfernung schützender Gruppen
5. Phosphonester, Michaelis-Arbusow-Reaktion
6. Enolphosphate, Perkow-Reaktion
7. Amide und Guanide der Phosphorsäure
8. Probleme der Pyrophosphat- und Phosphorsäure-diester-Synthese

9. Carbodiimid-Methode
10. Carbamylphosphate
11. Reaktionen von Amidophosphorsäuren
12. Ketenacylate der Phosphorsäure
13. Imidoylphosphate, Trichloracetonitril-Methode
14. Imidazolidine der Phosphorsäure
15. Arbeitsvorschriften

1. Einleitung

Die Chemie der organischen Phosphorverbindungen hat sich im letzten Jahrzehnt außerordentlich rasch entwickelt, die theoretische und praktische Bedeutung der Phosphorylierungsmethoden ist erheblich gewachsen. Hierfür gibt es mehrere Gründe: Viele wichtige Naturstoffe und Coenzyme sind Ester oder Anhydride der Phosphorsäure. Die Synthese dieser empfindlichen Verbindungen erfordert sehr spezifische und schonende Phosphorylierungsmethoden. Die Nucleinsäure ist ein Polyester der Phosphorsäure; Phosphorsäure-Derivate spielen bei biologischen Synthesen und Energieumwandlungsvorgängen eine entscheidende Rolle. Viele Ester und Anhydride

der Phosphorsäure sind überdies wirksame Insektizide. Die Zusammenfassung kann sich bei der Fülle des Materials nur auf eine Auswahl aus den Arbeiten seit etwa 1950 beziehen; die Monographien von Kosolapoff¹⁾ und Schrader²⁾ können als Leitfaden durch die frühere Literatur dienen. Über die physikalischen Grundlagen dieser Verbindungsklasse unterrichtet die Monographie von van Wazer³⁾.

¹⁾ G. M. Kosolapoff: *Organophosphorus Compounds*, J. Wiley and Sons, New York 1950.

²⁾ G. Schrader: *Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphor-Verbindungen*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1952.

³⁾ J. R. van Wazer: *Phosphorus*, Bd. I, Interscience Publ. New York 1958.