

β -sitostérol pur⁵ tritié en 3 par réduction⁶ de la cétone-3 Δ_5 par NaBH₄ en présence de NaB³H₄, 3 mg ($1,1 \times 10^6$ c/mn) ont été injectés dans l'abdomen de 24 criquets *Locusta migratoria* des deux sexes, pris après la quatrième mue larvaire, et sur une période de trois jours. Ils ont été maintenus en vie 8 jours à 30°C et tués par le froid à - 20°C.

Après extraction des lipides et saponification suivant les méthodes habituelles, les stérols ont été isolés par chromatographie préparative sur couche mince (CCM) d'acide silicique dans le système de solvants pentane-acétate d'éthyle 7 : 3 v/v. Les stérols ($26,4$ mg radioactivité $6,8 \times 10^5$ c/mn) après propionylation⁷ et addition de 2 mg des propionates de fucostérol, desmostérol, méthylène-24 cholestérol, ont été séparés en 4 groupes par CCM sur alumine-AgNO₃ dans le système hexane-acétate d'éthyle 100 : 8 v/v. Le 1^{er} groupe (Rf 0,70) correspond aux propionates de cholestérol, campestérol, β -sitostérol et stigmastérol; le 2^e (Rf 0,40) correspond au propionate de fucostérol; le 3^e (Rf 0,30) correspond au propionate de desmostérol, et le 4^e groupe (Rf 0,18) au propionate de méthylène-24 cholestérol. Chacun de ces groupes de propionates de stérols a ensuite été analysé par chromatographie gaz-liquide (CGL) préparative sur une colonne à 1% de OV 101 de 2 m de longueur et à une température de 245°C. Les différents propionates ont été recueillis à la sortie de l'appareil et leur radioactivité mesurée séparément. Nous avons observé les radioactivités relatives ci-après (par rapport à la sommation des radioactivités recueillies): cholestérol 11,6%; fucostérol 0,5%; desmostérol 0,1%; méthylène-24 cholestérol 0%; stérol probablement en C₂₉ non identifié 0,15%; β -sitostérol 87% (contient le précurseur). La possibilité d'une réintroduction du tritium en 3 après échange est exclue par la constatation que le méthylène-24 cholestérol est totalement dépourvu de radioactivité.

Ces résultats nous permettent de conclure que le β -sitostérol est transformé en cholestérol; le fucostérol et le desmostérol sont des intermédiaires de cette trans-

formation; aucune radioactivité n'a pu être observée dans le méthylène-24 cholestérol ou tout autre stérol en C₂₈; par contre nous avons observé la présence d'un propionate de stérol radioactif qui est séparé au même endroit que le propionate de méthylène-24 cholestérol en CCM (0,15% de la radioactivité) et dont le comportement en CGL (temps de rétention un peu supérieur à ceux des β -sitostérol et fucostérol) indique qu'il peut correspondre à un propionate de stérol en C₂₉. La dégradation du β -sitostérol se ferait donc par le schéma suivant: β -sitostérol → fucostérol (+stérol en C₂₉ non identifié?) → desmostérol → cholestérol. Des expériences parallèles effectuées chez l'abeille *Apis mellifica*⁸ conduisent à des conclusions similaires. Les radioactivités ont été mesurées sur un scintillateur Nuclear Chicago de rendement 50%.

Summary. The locust *Locusta migratoria* L. transforms β -sitosterol into cholesterol. Fucosterol, desmosterol and an unknown sterol (probably in C₂₉) are found to be intermediates, but not 24-methylene cholesterol.

J. P. ALLAIS et M. BARBIER

Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences,
Orsay-91 et Institut de Chimie des Substances Naturelles,
C.N.R.S., Gif-sur-Yvette-91 (France),
30 novembre 1970.

⁵ J. P. ALLAIS et M. BARBIER, Qualitas Pl. Mater. veg. 16, 215 (1968).

⁶ M. DEVYS, A. ALCAIDE et M. BARBIER, Phytochemistry 8, 1441 (1969).

⁷ J. R. CLAUDE, J. Chromat. 17, 596 (1965).

⁸ J. P. ALLAIS, J. PAIN et M. BARBIER, C. r. Acad. Sci Paris, 272 Ser. D, 877 (1971).

⁹ Nous remercions le CEA pour des subventions ayant facilité l'achat du matériel radioactif. Nous remercions les professeurs E. LEDERER et J. BERGERARD pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Zum Protonentransfer in Modellsystemen für die komplementäre Basenpaarung in Nukleinsäuren

Nach einer Hypothese von LÖWDIN¹ kann ein Protonentransfer in der Desoxyribonukleinsäure über das Wasserstoffbrückensystem der komplementären Basen Adenin-Thymin (A-T) und Guanin-Cytosin (G-C) hinweg mutagene Effekte auslösen, womit der quantenmechanische Tunnel-Effekt als mögliche Ursache der spontanen Cancrogenese und des Alters auftritt. LÖWDIN zitiert infrarotspektroskopische Arbeiten von ZIMMERMANN² am Imidazol als Beweis für das Protonentunneln über intermolekulare Wasserstoffbrücken hinweg. Wegen der ausschließlichen Bedeutung dieses Problems haben wir infrarotspektroskopische Untersuchungen an Modellen der komplementären Basen der DNS, nämlich 1-Methylthymin/9-Methyladenin (A-T-Modell) und 1-Methylcytosin/9-Äthylguanin (G-C-Modell), durchgeführt; die Kristallstrukturen beider Modelle (1:1-Mischkristalle) sind bekannt^{3,4}.

In beiden Fällen weichen die IR-Spektren der 1:1-Komplexe von denen der mechanischen Mischung ab (Figur 1), wie von KYOGOKU et al.⁵ für den Komplex aus 1-Methylthymin und 9-Methyladenin bereits beschrieben wurde. Die NH-Valenzschwingungsbanden (ν_s in der Nomenklatur von PIMENTEL⁶), haben eine komplexe Struktur mit zahlreichen Submaxima. Diese in starken Wasserstoffbrückensystemen oft beobachtbare Feinstruktur kann verschiedene Ursachen haben: 1. Überlagerung der N-H-

Valenzschwingung ν_s mit Vielfachen der Wellenzahl der niedrfrequenten (N-H...N)-Valenzschwingung ν_σ ⁶: $\nu = \nu_s \pm n \nu_\sigma$; $n = 0, 1, 2, \dots$ (Frequenzmodulation)^{7,8}; 2. Protonentunneln in Kombination mit der vorstehend genannten Frequenzmodulation, wodurch zusätzliche Aufspaltung der Submaxima erfolgt²; 3. Aufspaltungen durch nächstnachbarliche Kopplung schwingender Gruppen in Festkörpern⁹; 4. FERMI-Resonanz der breiten ν_s mit Kombinations- oder Oberschwingungen.

Eine Entscheidung darüber, ob Protonentransfer und Frequenzmodulation die Feinstruktur der ν_s verursachen, kann durch Vergleich des bei Raumtemperatur aufgenommenen IR-Spektrums mit dem bei tiefen Temperaturen erzielt werden. Das Abkühlen der Probe bewirkt eine Verfestigung der Wasserstoffbrücke, wodurch die Atomabstände verkürzt werden. Die Kraftkonstante und damit auch die Schwingungsfrequenz von ν_s nehmen dabei kleinere Werte an, während Kraftkonstante und Schwingungsfrequenz von ν_σ beim Abkühlen anwachsen¹⁰. Darüber hinaus nimmt durch die Abstandsverkürzung in der verfestigten Wasserstoffbrücke die Potentialbarriere zwischen den beiden Potentialminima des Protons ab¹¹, die durch den Tunneleffekt verursachten Aufspaltungen von Schwingungstermen würden somit vergrößert¹². Beim Abkühlen sollten folglich alle Submaxima auf der höher-

frequenten Flanke des ν_s -Massivs zu grösseren Wellenzahlen, die auf der niederfrequenten Flanke zu kleineren Wellenzahlen verschoben werden¹³; zusätzlich sollten durch Protonentunneln aufgespaltene zusammengehörende Submaxima auseinanderrücken. Wenn also die beobachteten Submaxima durch Tunneleffekt der Protonen in den untersuchten Basenpaarungsmodellen verursacht würden, müssten beim Abkühlen drastische Verschiebungen der Submaxima auftreten.

Die Positionen der Submaxima im Bereich der ν_s im IR-Spektrum des A-T-Modells sind beim Abkühlen nahezu unverändert gegenüber dem IR-Spektrum bei Raumtemperatur (Figur 2). Die Feinstruktur tritt beim Abkühlen

erwartungsgemäss¹¹ deutlicher hervor. Somit ergibt sich kein Anhaltspunkt, als Ursache für die NH-Bandenstruktur Protonentransfer oder Frequenzmodulation anzunehmen. Vielmehr ist analog zum Imidazol¹⁴, Benzimidazol¹⁵ und Purin¹⁶ die Feinstruktur als FERMIResonanz der breiten NH-Valenzschwingungsbande mit Ober- und Kombinationsschwingungen zu deuten.

Die Differenzen im IR-Spektrum des 1:1-Mischkristalls aus 1-Methylcytosin und 9-Äthylguanin (G-C-Modell) gegenüber der mechanischen Mischung beider Komponenten (Figur 1) resultieren aus der Ausbildung der stabilen Wasserstoffbrücken nach dem WATSON-CRICK-Paarungsschema im Komplex⁴, während in den Kristalliten der Mischung Wasserstoffbrücken nur zwischen gleichen Molekülen vorliegen. Beim Abkühlen treten auch hier im NH-Valenzschwingungsbereich keine markanten Frequenz- oder Intensitätsänderungen auf (Figur 3). Somit fehlen auch beim G-C-Modell experimentelle Hinweise auf die Beteiligung von Protonentunneln und Frequenzmodulation am Zustandekommen der Submaxima auf der breiten NH-Bande.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die IR-Spektren der beiden Modelle für die A-T- bzw. G-C-Basenpaarung des DNS keinen Anhaltspunkt für einen Protonentransfer mittels Tunneleffekt liefern. Die Hypothese von LÖWDIN¹ wird dadurch natürlich nicht widerlegt, denn zur Auslösung einer Spontanmutation würde prinzipiell der Protonentransfer in einem einzigen komplementären Basenpaar eines DNS-Moleküls ausreichen, was mit den bisher bekannten physikalischen Messmethoden nicht erfassbar ist. Wohl aber ist eine Protonendelokalisation in Systemen mit derartigen mittelstarken (N-H...N)- oder (N-H...O)-Brücken nach diesen und den zitierten Experimenten¹³⁻¹⁶ höchst unwahrscheinlich.

Summary. By means of IR-spectroscopy, proton transfer processes of base-pairing models of deoxyribonucleic acid (1:1 mixed crystals of 9-methyl adenine and 1-methyl thymine and of 9-ethyl guanine and 1-methyl cytosine) in measurable quantities can be excluded at temperatures between -150 and +30°C.

H. FRITZSCHE

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle
Therapie, Abteilung Biophysikochemie,
DDR-69 Jena (DDR), 29. Oktober 1970.

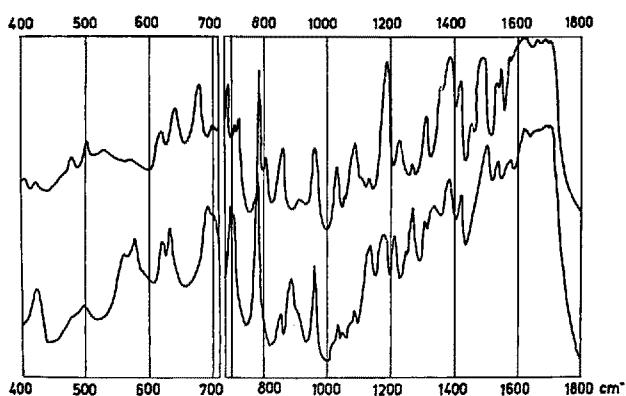


Fig. 1. IR-Spektron des 1:1-Komplexes aus 1-Methylcytosin und 9-Äthylguanin (G-C-Modell) (untere Kurve) und einer äquimolaren mechanischen Mischung der Komponenten (obere Kurve). Präparation: KBr-Pressling.

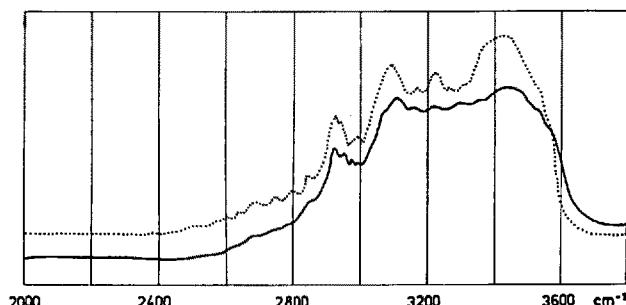


Fig. 2. IR-Spektron des 1:1-Komplexes aus 1-Methylthymin und 9-Methyladenin (A-T-Modell) im NH-Valenzschwingungsbereich bei +25°C (ausgezogene Linie) und bei -150°C (punktzierte Linie).

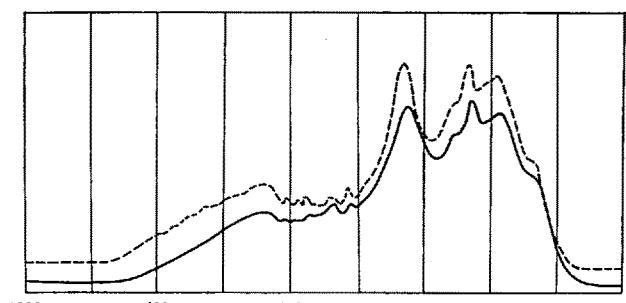


Fig. 3. IR-Spektron des 1:1-Komplexes aus 1-Methylcytosin und 9-Äthylguanin (G-C-Modell) im NH-Valenzschwingungsbereich bei +30°C (ausgezogene Linie) und bei -150°C (punktzierte Linie).

- 1 P. O. LÖWDIN, Rev. mod. Phys. 35, 724 (1963).
- 2 H. ZIMMERMANN, Z. Elektrochem. 65, 821 (1961).
- 3 K. HOOGSTEEN, Acta crystallogr. 12, 822 (1959).
- 4 E. J. O'BRIEN, J. molec. Biol. 7, 107 (1963).
- 5 Y. KYOGOKU, S. HIGUCHI und M. TSUBOI, Spectrochim. Acta 23A, 969 (1967).
- 6 G. C. PIMENTEL und A. L. McCLELLAN, *The Hydrogen Bond* (Freeman and Co., San Francisco und London 1960).
- 7 M. I. BATUEV, Zh. fiz. Khim. 23, 1399 (1949).
- 8 M. V. VOLKENSHTEIN, M. A. ELYASHEVICH und B. L. STEPANOV, Zh. fiz. Khim. 24, 1158 (1950).
- 9 R. J. JAKOBSEN, Y. MIKAWA und Z. W. BRASCH, Nature, Lond. 215, 1071 (1967).
- 10 R. J. JAKOBSEN und J. W. BRASCH, Spectrochim. Acta 21, 1753 (1965).
- 11 R. BLINC und D. HADŽI, *Hydrogen Bonding* (Ed. D. HADŽI; Pergamon Press, London 1959), p. 147.
- 12 R. L. SOMORJAI und D. F. HORNING, J. chem. Phys. 36, 1980 (1962).
- 13 A. NOVAK und A. LAUTIE, Nature, Lond. 216, 1202 (1967).
- 14 A. M. BELLOCQ, C. PERCHARD, A. NOVAK und M. L. JOSIEN, J. Chim. Phys. 62, 1334 (1965).
- 15 H. FRITZSCHE, unveröffentlichte Messungen.