

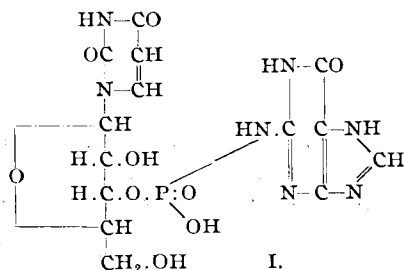
49. Hellmut Bredereck, Eva Berger und Friedrich Richter: Zur Existenz der Guanin-uridylsäure (Nucleinsäuren, XVIII. Mitteil.*).

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]

(Eingegangen am 22. Januar 1941.)

Durch die in den letzten Jahren durchgeführte Konstitutions-Aufklärung der Nucleoside und Nucleotide war die Möglichkeit gegeben, eingehender die Konstitution der eigentlichen Nucleinsäuren, der Polynucleotide, zu erforschen.

Nachdem alle Versuche, aus der Hefenucleinsäure größere Bruchstücke als die Nucleotide zu gewinnen, fehlgeschlagen waren, gelang es uns erstmals 1936, durch saure Hydrolyse der Hefenucleinsäure (Boehringer, Mannheim-Waldhof) die Guanin-uridylsäure (I) zu isolieren¹⁾. Die Einheitlichkeit dieser Verbindung wurde von uns durch zahlreiche Versuche sichergestellt. Damals wurde durch die Ergebnisse der Titration (einbasische Säure) sowie der Desaminierung (es trat keine Desaminierung ein) für die Guanin-uridylsäure die Konstitution I mit einer N-P-Bindung bewiesen. Bei der Bedeutung, die der Guanin-uridylsäure für die Nucleinsäure-Chemie zukam, haben wir diese Versuche in den Jahren 1935/1936 oftmals wiederholt mit gleichem Ergebnis,



wobei der eine von uns (Bredereck) die Versuche selbst mitausgeführt hat. 1939 wurde von Levene und Tipson²⁾ die Frage des Auftretens der Guanin-uridylsäure erneut geprüft mit dem Ergebnis, daß sie eine solche Verbindung nicht isolieren konnten. Was sie in den Händen hatten, waren Gemische aus Nucleosiden und Nucleotiden. Kurze Zeit später berichteten Gulland und Mitarbeiter³⁾, daß ihnen aus Hefenucleinsäure Boehringer, Mannheim-Waldhof, gleichfalls die Isolierung der Guanin-uridylsäure gelungen sei, jedoch nicht aus Hefenucleinsäure British Drug Houses Ltd. Sie bestätigten unsere Konstitutions-Annahme, wobei sie auch eine zusätzliche Reinigung über das Bleisalz vornahmen. In polemischen Auseinandersetzungen zwischen Levene und Gulland beharrt Levene⁴⁾ auf der Ablehnung der Existenz der Guanin-uridylsäure, während Gulland⁵⁾ durch Beibringen weiterer Versuchs-Ergebnisse erneut ihre Existenz und Konstitution betont. Unsere Stellungnahme zur Frage der Guanin-uridylsäure ist die folgende: Wir glauben an das Vorkommen der Guanin-uridylsäure. Die Frage, ob man sie isolieren kann, scheint jedoch von der jeweiligen Natur der Hefenucleinsäure abzuhängen. Wir haben in den Jahren 1938/1939 mit Hefenucleinsäure ver-

*) XVII. Mitteil.: B. **73**, 1124 [1940].

¹⁾ V. Mitteil.: B. **69**, 1129 [1936].

²⁾ Journ. biol. Chem. **127**, 105 [1939].

³⁾ Journ. chem. Soc. London **1939**, 907.

⁴⁾ Tipson u. Levene, Chem. and Ind. **58**, 1010 [1939].

⁵⁾ Chem. and Ind. **59**, 321 [1940].

schiedener Herkunft (Boehringer Mannheim-Waldhof, Boehringer Ingelheim, Ciba) unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Lediglich ein Präparat der Firma Boehringer, Mannheim-Waldhof, lieferte Guanin-uridylsäure. Selbst eine andere Hefenucleinsäure der gleichen Firma, die aus anderer Hefe hergestellt worden war, hatte ein negatives Ergebnis. Da wir, wie im folgenden erläutert werden soll, der Ansicht sind, daß die Guanin-uridylsäure lediglich ein Sekundärprodukt darstellt, dürfte damit ihre Bedeutung hinfällig geworden sein.

Auf Grund der Isolierung der Guanin-uridylsäure und ihrer Konstitutions-Aufklärung zogen wir seinerzeit den Schluß, daß in der Hefenucleinsäure Guanyl- und Uridylsäure durch P-N-Bindung miteinander verknüpft sind. Um einen weiteren Beweis für unsere Annahme zu führen, unterwarfen wir die Hefenucleinsäure der Desaminierung mittels Salpetriger Säure⁶⁾. Dabei mußten wir jedoch feststellen, daß unter Aufrechterhaltung der Tetranucleotid-Struktur sämtliche NH_2 -haltigen Basenbestandteile (Guanin, Adenin, Cytosin) desaminiert worden waren. Demgemäß isolierten wir als Basen Xanthin, Hypoxanthin und Uracil. Dieser Versuch brachte den Beweis, daß in der Hefenucleinsäure die Nucleotide nicht durch N-P-Bindungen miteinander verknüpft sind, auch nicht die Guanyl- und Uridylsäure. Wir nehmen daher an, daß die aus gewissen Hefenucleinsäure-Präparaten isolierbare Guanin-uridylsäure ein Sekundärprodukt darstellt. Die Schlüssigkeit der Beweisführung mit Hilfe der Desaminierung wird von Gulland⁵⁾ anerkannt, er glaubt jedoch in der Durchführung der Versuche noch gewisse Lücken zu sehen, die seiner Ansicht nach Einwände gegen unsere Schlußfolgerung zulassen. Was zunächst die Ausbeute an desaminiertem Hefenucleinsäure anbetrifft, so hatten wir bei unseren früheren Versuchen 30% d. Th. erhalten, ohne dabei besondere Sorgfalt auf die Höhe der Ausbeute zu verwenden, da es uns ja in erster Linie auf die Isolierung der desaminierten Basen selbst ankam. Wir haben jetzt den Versuch im Hinblick auf die Ausbeute nochmals wiederholt und nunmehr 47.3% erhalten. Die fehlenden 52.7% sind im Verlauf der Aufarbeitung verloren gegangen, zumal eine Bleisalz-Fällung eingeschaltet war. Den Beweis dafür haben wir dadurch erbracht, daß wir Hefenucleinsäure ohne Zugabe von Nitrit in Gegenwart der gleichen Menge Natriumacetat der gleichen Aufarbeitung unterworfen haben. Die Ausbeute betrug 49.5% d. Theorie. Die analogen Versuche haben wir auch mit der Thymonucleinsäure durchgeführt und dabei an desaminiertem Thymonucleinsäure 49.9% und im Kontrollversuch 48% erhalten. Wir haben mit der desaminierten Hefenucleinsäure nunmehr auch N- und P-Bestimmungen durchgeführt und fanden für N 12.37 (ber. 12.85) und für P 9.15 (ber. 9.48). Aus diesen Zahlen ergibt sich für das Verhältnis N:P 1.35 gegenüber dem berechneten von gleichfalls 1.35. Auch die Basizität der desaminierten Säure haben wir erneut geprüft und fanden unter Berücksichtigung des Reinheitsgrades, wie er sich aus den N- und P-Werten ergibt, eine Äquivalent-Zahl von etwa 4.3⁷⁾. Die entsprechenden Werte für die desaminierte Thymonucleinsäure sind: N 12.28 (ber. 13.36), P 9.69 (ber. 9.86), N:P 1.26 (ber. 1.35). Aus allen diesen Versuchen geht einwandfrei hervor, daß die Hefe- und Thymonucleinsäure vollständig des-

⁶⁾ H. Bredereck, G. Lehmann u. M. Köthnig, B. 71, 2613 [1938].

⁷⁾ Auf genaue Untersuchungen über die Basizität der Hefenucleinsäure werden wir in einer späteren eingehenden Mitteilung zurückkommen.

aminiert worden sind unter Erhaltung der Tetranucleotidstruktur. N-P-Bindungen liegen mithin in der Hefe- und Thyminucleinsäure nicht vor.

Ist somit die Frage nach der Art der Verknüpfung zwischen den Nucleotiden im Sinne einer esterartigen Verknüpfung gelöst, so bleibt offen, in welcher Reihenfolge die Nucleotide im Molekül der Hefenucleinsäure angeordnet sind. Wenn wir im folgenden unsere Versuche in dieser Richtung kurz mitteilen, so sind wir uns bewußt, daß sie noch keine völlig befriedigende Lösung der Fragestellung bedeuten⁸⁾. Unsere Überlegungen waren die folgenden: Im alkalischen Mittel tritt mit steigendem p_H eine Beschleunigung der Aufspaltung der Hefenucleinsäure in die Nucleotide ein. Durch Arbeiten in ganz schwach alkalischem Mittel hofften wir eine teilweise Aufspaltung zu erreichen, u. U. unter Isolierung eines Trinucleotids bzw. eines Dinucleotids und gleichzeitiger Identifizierung der abgespaltenen Nucleotide. Wir führten Spaltungen der Hefenucleinsäure in wäßrigem Pyridin bei Wasserbadtemperatur durch, und zwar so lange, bis eine Probe bei Zusatz von Salzsäure keine Fällung unveränderter Hefenucleinsäure mehr gab. Die Tatsache, daß diese Zeit bei verschiedenen Hefenucleinsäure-Präparaten zwischen 10 und 15 Stdn. lag, zeigt wieder einmal die Verschiedenheit der einzelnen Präparate. Nach Aufarbeitung solcher Spaltungsansätze über das Bleisalz gelang es uns in zahlreichen Fällen nach Zugabe von Brucin, guanylsaures Brucin, das als solches einwandfrei identifiziert wurde, zu isolieren. Bei solchen Ansätzen konnten wir dann nach Entfernung des Brucins ein Trinucleotid, bestehend aus Adenyl-, Cytidyl- und Uridylsäure, isolieren. Durch Analyse, Titration, Bestimmung der Drehung, Prüfung auf Abwesenheit von Guanin und quantitative Adenin-Bestimmung wurde die Einheitlichkeit des Trinucleotids⁹⁾ sichergestellt. Dieses Trinucleotid haben wir einer erneuten Pyridin/Wasser-Hydrolyse unterworfen. Wenn es uns auch nicht gelang, ein Dinucleotid zu isolieren, so konnten wir doch zeigen, daß zu Beginn der Hydrolyse fast nur Adenylsäure abgespalten wird, die wir als Brucinsalz isolierten und als solches bei gleichzeitiger Adenin-Bestimmung identifizierten. Erst bei weiterer Spaltung trat zunehmend neben Adenylsäure auch Cytidyl- und Uridylsäure auf. Für die Reihenfolge der Nucleotide beweisen diese Versuche folgendes: 1) In der Hefenucleinsäure muß die Guanylsäure endständig stehen, 2) im Trinucleotid muß die Adenylsäure endständig stehen. Als wir früher noch an die Primärexistenz der Guanin-uridylsäure glaubten, wäre die Reihenfolge der Nucleotide in der Hefenucleinsäure damit sichergestellt gewesen: Guanylsäure—Uridylsäure—Cytidylsäure—Adenylsäure.

Wenn wir auch heute noch dieser Reihenfolge den Vorzug geben, so ergeben sich jetzt noch die drei folgenden Möglichkeiten:

Guanylsäure—Adenylsäure—Uridylsäure—Cytidylsäure,
Guanylsäure—Adenylsäure—Cytidylsäure—Uridylsäure,
Guanylsäure—Cytidylsäure—Uridylsäure—Adenylsäure.

Leider ließen sich die vorstehend geschilderten Versuche nicht mit allen Hefenucleinsäure-Präparaten durchführen⁸⁾. In zahlreichen Fällen wurden nach der 1. Hydrolyse neben Guanylsäure, wenn auch weniger, die Brucin-

⁸⁾ Wir verzichten vorerst auf eine Wiedergabe der Versuchsergebnisse. Näheres darüber s. F. Richter, Dissertat. Leipzig 1937 (D 15).

⁹⁾ Die in der Dissertat. v. F. Richter mitgeteilten Desaminierungsversuche am Trinucleotid führten bei späterer Wiederholung zu einer Desaminierung.

salze der anderen Nucleotide gefunden. Inzwischen sind Versuche im Gang, die auf anderem Wege eine Lösung dieser Fragestellung zum Ziel haben.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Untersuchungen. Der Firma C. F. Boehringer, Mannheim-Waldhof, sind wir für die Überlassung von Hefenucleinsäure zu Dank verpflichtet.

Beschreibung der Versuche.

Desaminierung der Hefenucleinsäure.

20 g Hefenucleinsäure wurden in 40 ccm Wasser aufgeschlämmt und unter Rühren bei 5—10° langsam gegen Lackmus neutralisiert. Die Lösung wurde mit 50 g Natriumnitrit in 90 ccm Wasser versetzt, dann wurden 125 ccm Eisessig unter Rühren bei Zimmertemperatur zugetropft. Nach 6-stdg. Stehenlassen wurden 2—3 Vol. Alkohol zugegeben, die überstehende Flüssigkeit vom Niederschlag abgossen, der Rückstand mit wenig Alkohol versetzt, verrieben, abgesaugt und mit Alkohol gewaschen. Die Substanz wurde in 550 ccm Wasser gelöst und unter Rühren mit einer 25-proz. Bleiacetat-Lösung versetzt, bis bei weiterer Zugabe kein Niederschlag mehr entstand. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Wasser ausgewaschen, in etwa 500 ccm Wasser aufgeschlämmt und mit H_2S zerlegt. Das Bleisulfid-Filtrat wurde im Vak. bei 30° auf etwa 35 ccm eingengt und in das 3-fache Vol. Alkohol eingerührt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Alkohol und Äther nachgewaschen. Ausb. 9.5 g = 47.3% d. Theorie. Die Substanz wurde bei 56°/2 mm über Phosphorpentoxyd getrocknet.

2.970 mg Sbst.: 0.326 ccm N_2 (22°, 754 mm). — 0.184 g Sbst.: 16.86 γ P/ccm (colorimetrisch nach T. Teorell).

$C_{28}H_{42}N_{12}O_{20}P_4$ (1307). Ber. N 12.85, P 9.48, N : P 1.35.

Gef. „ 12.37, „ 9.15, „ 1.35.

Titration. 0.4153 g Sbst.: 12.99 ccm n_{10} -NaOH = 4.08 Äquiv., unter Berücksichtigung des Reinheitsgrades (N- und P-Wert) = 4.3 Äquiv.

Analog dem vorstehend beschriebenen Ansatz wurde ein 2. Ansatz durchgeführt nur mit dem Unterschied, daß anstatt 50 g Natriumnitrit 60 g Natriumacetat und statt 125 ccm nur 81 ccm Eisessig verwendet wurden. Ausb. 9.9 g = 49.5% d. Theorie.

Desaminierung der Thymonucleinsäure.

15 g gereinigte Thymonucleinsäure wurden in 60 ccm Wasser aufgeschlämmt und unter Zerreiben im Mörser mit 2-n. Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert. Nach Zugabe von 36 g Natriumnitrit in 48 ccm Wasser wurden in einem 3-l-Stutzen 36 ccm Eisessig bei Zimmertemperatur unter Rühren zugetropft. Nach 12-stdg. Stehenlassen wurden 3 Vol. Alkohol zugegeben, der Niederschlag abgesaugt und mit Alkohol gewaschen. Das Produkt wurde in 420 ccm Wasser gelöst, durch Zugabe von 25-proz. Bleiacetat-Lösung das Bleisalz gefällt, die Fällung abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen, in 200 ccm Wasser aufgeschlämmt und nach Zugabe von 50 ccm verd. Ammoniak mit H_2S zerlegt. Das Bleisulfid-Filtrat wurde mit Essigsäure angesäuert und der Schwefelwasserstoff durch einen CO_2 -Strom entfernt. Sodann wurde die Lösung im Vak. bei 30° auf etwa 25 ccm eingengt und unter Rühren in 150 ccm Alkohol eingetropt. Der Niederschlag wurde

abgesaugt und mit Alkohol und Äther gewaschen. Ausb. 10 g. Da z. Tl. noch das Ammoniumsalz vorlag, wurde das Produkt in 250 ccm Wasser gelöst; es wurden 5 ccm konz. Salzsäure zugegeben, sodann unter Rühren in dünnem Strahl 500 ccm absol. Alkohol. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Ausb. 7.5 g = 49.9% d. Theorie. Die Substanz wurde bei 56°/2 mm über Phosphorpentoxyd getrocknet.

2.895 mg Sbst.: 0.315 N (22°, 741 mm). — 0.1559 g Sbst.: 15.11 γ P/ccm (colorimetrisch nach T. Teorell).

$C_{30}H_{49}N_{12}O_{28}P_4$ (1257). Ber. N 13.36, P 9.86, N:P 1.35.

Gef. „ 12.28, „ 9.69, „ 1.26.

Titration. 0.3791 g Sbst.: 12.75 ccm n_{10} -NaOH = 4.23 Äquiv., unter Berücksichtigung des Reinheitsgrades (N- und P-Wert) = 4.4 Äquiv.

Analog dem vorstehend beschriebenen Ansatz wurde ein 2. Ansatz durchgeführt mit dem Unterschied, daß anstatt 36 g Natriumnitrit 43 g Natriumacetat und statt 36 ccm Eisessig nur 9 ccm Eisessig verwendet wurden. Ausb. 7.2 g = 48% d. Theorie.

50. Werner Rathje: Zur Kenntnis der Phosphate, II. Mitteil.*): Die neutralen und basischen Phosphate der Erdalkalimetalle.

[Aus d. Institut für Pflanzenernährungslehre u. Bodenbiologie d. Universität Berlin.]
(Eingegangen am 27. Januar 1941.)

In zahlreichen Literaturstellen werden den tertiären Phosphaten der Erdalkalimetalle die verschiedenartigsten Formeln zugesprochen, die zwischen der Bruttozusammensetzung $2\frac{1}{2}MeO \cdot P_2O_5$ bis $4MeO \cdot P_2O_5$ schwanken, und es ist (außer bei Calcium) bisher nicht geklärt, ob Verbindungen der einfachsten möglichen Formel $Me_3(PO_4)_2$ oder anderer Zusammensetzung, z. B. des Hydroxylapatits $3Me_3(PO_4)_2 \cdot Me(OH)_2$, vorkommen. Der Grund für die Unklarheiten über diese einfachen anorganischen Salze ist wohl darin zu suchen, daß aus wäßriger Lösung je nach Temperatur, Säuregrad und Schnelligkeit der Fällung leicht andere Stoffe und Lösungsbegleiter mitgerissen werden, so daß keine einheitlichen Produkte entstehen. Weiterhin bereitet eine genügend genaue quantitative Analyse, die zur Sicherstellung einer bestimmten Formel dienen könnte, oft große Schwierigkeiten. Nachdem in einer früheren Veröffentlichung*) Versuche zur Reindarstellung des Calciumhydroxylapatits beschrieben worden sind, soll in vorliegender Arbeit untersucht werden, ob neutrale oder basische Erdalkaliphosphate bei Gegenwart von Wasser existenzfähig sind. Mit Hilfe eines „Verfahrens der acidimetrischen Ausfällung“ konnten die Schwierigkeiten der Reindarstellung und der quantitativen Analyse in einfacher Weise behoben werden.

Aus der großen Zahl der Veröffentlichungen über tertiäre Erdalkaliphosphate seien nur einige bemerkenswerte Arbeiten erwähnt.

Magnesiumphosphat: R. Klement¹⁾ beschreibt, daß er durch Hydrolyse von sekundärem Magnesiumphosphat mit Tyrode-Lösung bei 37° Trimagnesiumphosphat, $Mg_3(PO_4)_2$, mit Wasser „Hydroxylbobbierit“, $Mg_3(PO_4)_2 \cdot \frac{1}{3}Mg(OH)_2$ und mit 0.01-n. Natronlauge ein basisches Magnesiumphosphat, $Mg_3(PO_4)_2 \cdot Mg(OH)_2 + 9H_2O$, erhalten habe.

*) I. Mitteil.: Bodenkunde u. Pflanzenernähr. **12**, 121 [1938].

1) Ztschr. anorgan. allgem. Chem. **228**, 232 [1936].