

**90. Hellmut Bredereck, Annelise Martini
und Friedrich Richter: Fermentative und chemische Darstellung
der Nucleoside aus Hefenucleinsäure (Nucleinsäuren, XIX. Mittell.*).**

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]
(Eingegangen am 26. März 1941.)

Die fortschreitende Erkenntnis der großen biologischen Bedeutung der Nucleinsäuren und ihrer Derivate machte es wünschenswert, auch die Nucleoside in größerem Maßstab bequem darstellen zu können. Unter ihnen hat neuerdings das Adenosin ein besonderes Interesse gefunden: Adenosin gehört in der Hefe zu einem phosphatübertragenden Co-Enzym-System. Eine Reihe von Cofermenten (z. B. Cozymase = Codehydrase I, Codehydrase II, Alloxazinadenin-dinucleotid, Adenylpyrophosphorsäure, Muskeladenylsäure) enthalten in ihrem Molekül den Bestandteil des Adenosins. Muskeladenylsäure, der 5-Phosphorsäureester des Adenosins, hat, ebenso wie Adenosin selbst, in der Herz- und Kreislauftherapie Verwendung gefunden.

Bis vor kurzem waren die Nucleoside nur sehr schwer und mit geringen Ausbeuten zugänglich gewesen. 1938 berichteten wir über eine fermentative Aufspaltung der Hefenucleinsäure bis zur Stufe der Nucleoside¹⁾. Dabei verwendeten wir Fermentpräparate aus Süßmandeln, Luzernensamen, Erbsen u. a. Solche Präparate besaßen eine polynucleotidatische und nucleotidatische Wirkung, jedoch innerhalb der Versuchszeit keine amidatische und nucleosidatische. Später berichteten Hartmann und Bosshard²⁾ unter Bezugnahme auf unsere Arbeit über die gleiche Spaltung mittels eines Präparates aus Kartoffeln, von ihnen „Kartoffelphosphatase“ genannt.

In all den vorgenannten Präparaten, gleich welchen Ursprungs, wirken bei der Aufspaltung der Hefenucleinsäure die gleichen Fermente, die man, falls man danach sucht, auch noch in anderen Stoffen finden dürfte. Hartmann und Bosshard haben in der Bezeichnung das Kartoffelferment (= Kartoffelphosphatase) unseren Präparaten, die sie als „Emulsin“ bezeichnen, gegenübergestellt. Wir selbst haben für unsere Präparate in der Arbeit über die fermentative Darstellung der Nucleoside¹⁾ den Begriff „Emulsin“ nicht mehr verwendet, will man ihn aber verwenden, so kommt er allen diesen Fermentpräparaten, auch dem Kartoffelferment, zu³⁾. Auch das Kartoffelferment besitzt, wie wir uns überzeugt haben, glykosidatische Eigenschaften — es spaltet z. B. Salicin — und kann daher mit Fug und Recht als „Emulsin“ bezeichnet werden. Entsprechend ihrer Herkunft kann man dann die einzelnen Präparate als Süßmandel-Emulsin, Kartoffel-Emulsin, Luzernen-Emulsin, Erbsen-Emulsin usw. bezeichnen. Wir möchten jedoch vorschlagen, in Zukunft, wenn es sich um nicht glykosidatische Wirkungen dieser Fermentpräparate handelt, den Begriff Emulsin wegzulassen und sie einfach als Süßmandel-, Kartoffel-, Luzernen-Ferment zu bezeichnen.

Mit Hilfe der genannten Fermentpräparate war es uns gelungen, zunächst Guanosin und Adenosin, letzteres als Pikrat, in sehr guter Ausbeute zu erhalten. Während zur Gewinnung des freien Adenosins Adenosinipikrat

*) XVIII. Mittell.: B. **74**, 338 [1941].

¹⁾ H. Bredereck, B. **71**, 408 [1938]; Dtsch. Reichs-Pat. 649994 (C. **1938** I, 127).

²⁾ Helv. chim. Acta **21**, 1554 [1938].

³⁾ Definition für Emulsin: B. Helferich, Ergebn. Enzymforsch. **7**, 84 [1938]; H. Bredereck, ebenda **7**, 117 [1938].

früher⁴⁾ durch Schwefelsäure zerlegt wurde, haben wir⁵⁾ erstmals basische Substanzen, wie KOH, NH_4OH , Ba(OH)_2 , Diäthylamin, verwendet. Unter diesen zeichnen sich die ersten beiden dadurch aus, daß sie bei der Umsetzung ein sehr schwer lösliches Pikrat geben, nach dessen Absaugen das Filtrat beim Abkühlen zu einem Brei von Adenosin erstarrt. Demgegenüber ist Diäthylaminpikrat leicht löslich und muß erst durch Ausäthern entfernt werden. Wir haben die Zerlegung mit Diäthylamin nicht näher beschrieben, da wir in seiner Verwendung keinen Vorteil sahen. Hartmann und Boss-hard²⁾ haben später ebenfalls Diäthylamin verwendet und glauben, daß es bei unreinen Pikraten bessere Ausbeuten als KOH liefert. Demgegenüber fanden wir in mehreren Versuchen an unreinem Pikrat eine bis zu 10–20% geringere Ausbeute an Adenosin. Wir sehen daher in der Verwendung von Diäthylamin auch bei Rohpikrat keinen Vorteil in der Ausbeute, ganz abgesehen davon, daß das Verfahren langwieriger ist.

Trotz der einfachen Zerlegung des Adenosinpikrats wäre es, schon mit Rücksicht auf die leichtere Gewinnung von Cytidin und Uridin, von Vorteil gewesen, wenn man die Gewinnung des Adenosins über sein Pikrat hätte umgehen können. Versuche in dieser Richtung sind nunmehr erfolgreich gewesen⁶⁾. Nach beendeter Fermentspaltung wurde Guanosin abgesaugt, das Eiweiß durch Aufkochen, die abgespaltene Phosphorsäure durch Baryt, Salze sowie u. U. Verunreinigungen durch Fällung mit Alkohol oder Aceton entfernt. Bemerkenswert dabei ist, daß Adenosin aus der Lösung durch Alkohol nicht gefällt wird, obwohl es selbst in Alkohol unlöslich ist. Aus dem Filtrat der Alkoholfällung konnte Adenosin nach Einengen trotz Anwesenheit von Cytidin und Uridin krystallin erhalten werden. Die Ausbeute beträgt 10–14 g aus 100 g Hefenucleinsäure. Aus dem Adenosinfiltrat konnte Cytidin durch Zugabe von Schwefelsäure direkt als kryst. Sulfat (Ausb. 8–10 g) gewonnen werden, aus dessen Filtrat dann das Uridin. Die Gewinnung des freien Cytidins aus dem Sulfat verläuft glatt.

Im Rahmen unserer Versuche über die Konstitution der Polynucleotide haben wir auch ein einfaches chemisches Aufspaltungsverfahren gefunden⁷⁾. In der Absicht, eine partielle Aufspaltung der Hefenucleinsäure zu erreichen, verwendeten wir zur Hydrolyse wäßriges Pyridin. Kocht man Hefenucleinsäure mit einem Pyridin/Wasser-Gemisch, so werden zunächst nacheinander die Bindungen zwischen den Nucleotiden gelöst⁸⁾, anschließend erfolgt dann die Abspaltung von Phosphorsäure aus den Nucleotiden. Dampft man dann im Vakuum ein, und nimmt mit Wasser auf, so bleibt das kryst. Guanosin ungelöst zurück. Aus dem Filtrat läßt sich dann das Adenosin (ohne über das Pikrat zu arbeiten), anschließend Cytidin und Uridin nach den gleichen Verfahren wie bei der Fermentspaltung gewinnen. Die Ausbeuten sind etwa die gleichen wie bei der Fermentspaltung, zuweilen fanden wir sie sogar ein wenig höher.

Während bisher die Hydrolyse der Hefenucleinsäure mittels Alkalis (Natronlauge) zur Darstellung der Nucleotide diente, fanden wir, daß eine Aufspaltung bis zur Stufe der Nucleoside eintritt, wenn man längere Hydrolysenzeiten wählt. Dabei tritt aber, auch wenn man in sehr verdünnt alkalischem Mittel arbeitet, eine starke Desaminierung auf, so daß man auf diese

⁴⁾ Levene u. Mitarbb., B. 43, 3154 [1910]; 45, 608 [1912].

⁵⁾ H. Brederick, B. 71, 1013 [1938]; Dtsch. Reichs-Pat. 650847 (C. 1938 I, 127).

⁶⁾ Dtsch. Reichs-Pat. angemeldet. ⁷⁾ Dtsch. Reichs-Pat. 693416 (C. 1940 II, 2682).

⁸⁾ H. Brederick, E. Berger u. F. Richter, B. 74, 338 [1941].

Weise keine brauchbare Ausbeute der in der Hefenucleinsäure vorliegenden Nucleoside erhält.

Durch die geschilderten Verfahren sind nunmehr die Nucleoside bequem und in guter Ausbeute zugänglich geworden. Damit ist zugleich ein einfaches Darstellungsverfahren für *d*-Ribose verbunden, die man z. B. aus Guanosin durch Hydrolyse leicht erhält⁹⁾. Andererseits stehen die Nucleoside für die Synthese von Nucleotiden zur Verfügung, wovon wir bereits bei der Synthese der Muskeladenylsäure¹⁰⁾, der Cytidylsäure¹⁰⁾ und Uridylsäure¹¹⁾ Gebrauch gemacht haben.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Unterstützung des Chem.-pharm. Werkes Dr. G. Henning, Berlin-Tempelhof, durchgeführt.

Beschreibung der Versuche.

Darstellung der Nucleoside.

a) Fermentatives Verfahren.

100 g Hefenucleinsäure werden in 150 ccm Wasser aufgeschlämmt, mit 2-n. Natronlauge (110 ccm) gegen Lackmus neutralisiert, sodann nach Zugabe von 250 ccm *n*-Natronlauge 2 Stdn. auf dem Wasserbad erwärmt. Nach Abkühlen werden 22 ccm Eisessig in 300 ccm Wasser und 500 ccm Fermentlösung sowie einige Tropfen Toluol zugegeben. Zur Herstellung der Fermentlösung werden 10 g Süßmandelferment¹⁾ in 500 ccm Wasser aufgeschlämmt, etwa 1 Tag in den Eisschrank gestellt, sodann filtriert. Der Spaltungsansatz wird bei 37° aufbewahrt, bis sich das kristalline Guanosin abgesetzt hat (etwa 10–14 Tage). Zur völligen Abscheidung des Guanosins wird noch 1 Tag im Eisschrank aufbewahrt, sodann abgesaugt. Ausb. 20–25 g. Das Guanosin wird aus Wasser in Gegenwart von wenig Tierkohle umkristallisiert.

Das Guanosin-Filtrat wird zur Entfernung von Eiweiß kurz aufgekocht, das ausgeflockte Eiweiß abgesaugt, sodann mit heißer konz. Barytlösung die Phosphorsäure als Bariumphosphat gefällt, das durch Zerreiben mit Wasser im Mörtel gut ausgewaschen wird. Die vereinten Filtrate werden mit 22 g konz. Schwefelsäure, entsprechend 90% der im Ansatz als Natriumacetat vorhandenen Menge NaOH, versetzt, darauf unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft, wobei zuletzt die Vorlage zur möglichst vollständigen Entfernung der Essigsäure mit festem KOH beschickt wird. Der Rückstand wird in 80 ccm Wasser gelöst; durch Zugabe von etwa 300 ccm Alkohol werden Natriumsulfat und Verunreinigungen gefällt. Die alkohol. Lösung wird von der Fällung abgegossen, diese nochmals in 40 ccm Wasser gelöst und nochmals mit etwa 250 ccm Alkohol gefällt. Die vereinigten alkohol. Filtrate werden im Vak. auf 70 ccm eingeeengt (u. U. neutralisiert) und nach Animpfen im Eisschrank aufbewahrt. Das im Verlauf einiger Tage auskristallisierte Adenosin wird abgesaugt. Ausb. 10–14 g. Das Produkt ist meistens genügend rein, u. U. kann es aus wenig Wasser umkristallisiert werden.

Das Adenosin-Filtrat wird im Vak. auf die Hälfte eingeeengt, sodann mit so viel Alkohol versetzt, daß nichts mehr ausfällt (400–600 ccm). Zur Vervollständigung der Fällung wird noch über Nacht im Eisschrank aufbewahrt,

⁹⁾ H. Bredereck, B. **71**, 408 [1938]; H. Bredereck, M. Köthnig u. E. Berger, B. **73**, 956 [1940].

¹⁰⁾ H. Bredereck, E. Berger u. J. Ehrenberg, B. **73**, 269 [1940].

¹¹⁾ H. Bredereck u. E. Berger, B. **73**, 1124 [1940].

dann die Fällung in Gegenwart von etwas Tierkohle abgesaugt. Der darauf bei Zugabe von 0,5 ccm konz. Schwefelsäure entstehende Niederschlag wird verworfen, die Lösung auf dem Wasserbad fast zum Sieden erhitzt und vorsichtig 2 ccm konz. Schwefelsäure zugegeben. Das in wenigen Minuten vollständig auskristallisierte Cytidinsulfat wird heiß abgesaugt. Ausb. 8—10 g. Es wird aus Wasser/Alkohol umkristallisiert. Zur Darstellung des freien Cytidins wird das Sulfat in wenig Wasser gelöst, mit der ber. Menge Baryt versetzt, vom Bariumsulfat abfiltriert, die Lösung Ba- und SO_4 -frei gemacht und im Vak. bei etwa 40° eingengt. Bei reinem Ausgangsmaterial beginnt beim Einengen die Abscheidung des Cytidins, die dann durch Zugabe von Alkohol vervollständigt wird. Andernfalls läßt man im Exsiccator die Lösung eindunsten und verreibt bei gleichzeitigem Animpfen den Rückstand mit Alkohol. Ausb. 4 g. Umkristallisiert wird aus 90-proz. Alkohol.

Das Cytidinsulfat-Filtrat wird zur Gewinnung des Uridins im Vak. bei etwa 30° eingengt, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, u. U. überschüssige Schwefelsäure mit Baryt entfernt, wiederum eingengt und mit 80 ccm 96-proz. Alkohol aufgenommen. In diese Lösung leitet man $\frac{1}{2}$ Stde. einen lebhaften Strom Chlorwasserstoff ein, anschließend noch $\frac{1}{4}$ Stde. unter Kühlen der Lösung mit Eiswasser. Die dabei ausfallenden Stoffe werden abgesaugt, das Filtrat im Vak. etwa auf die Hälfte eingedampft, die dabei ausgefallenen Verunreinigungen wiederum abgesaugt, schließlich die Lösung mit Alkohol verdünnt und durch Zugabe von alkohol. Natronlauge die Hauptmenge der Salzsäure als Kochsalz ausgefällt. Das Kochsalz-Filtrat wird etwas eingengt, mit Wasser wieder auf das ursprüngliche Volumen gebracht und durch Zugabe von 100 ccm 25-proz. Bleiacetat-Lösung und Barytlauge (ein Überschuß ist zu vermeiden) das Blei-Bariumsalz des Uridins ausgefällt. Die Fällung wird sorgfältig ausgewaschen, in Wasser aufgeschlämmt und mit verd. Schwefelsäure zerlegt, so daß die Lösung frei von Ba und SO_4 ist. Das restliche Pb wird mit H_2S entfernt und das Filtrat zum Sirup eingengt. Er wird mit etwa 70 ccm Alkohol heiß aufgenommen und auf dem Wasserbad auf etwa die Hälfte eingengt. Beim Animpfen und Reiben mit dem Glasstab beginnt die Abscheidung von Uridin, die durch Abkühlen vervollständigt wird. Sollte sich beim Abkühlen ein Teil des Uridins als Sirup abscheiden, so gibt man einige Tropfen Wasser hinzu. Ausb. 2—3 g.

b) Chemisches Verfahren.

100 g Hefenucleinsäure werden in 300 ccm Wasser und 300 ccm Pyridin gelöst und $4\frac{1}{2}$ Tage unter Rückfluß gekocht. Sodann wird im Vak. bei 30 — 40° fast zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 150 ccm Wasser aufgenommen und über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Das abgeschiedene Guanosin wird abzentrifugiert und mit Wasser ausgewaschen. Ausb. 20—25 g.

Das Guanosin-Filtrat wird zur Entfernung der Phosphorsäure mit Barytlösung gefällt und das Bariumphosphat-Filtrat, das einen kleinen Überschuß an Baryt enthalten soll, im Vak. zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 80 ccm Wasser aufgenommen, und durch Zugabe von etwa 300 ccm Alkohol werden alle Verunreinigungen ausgefällt. Die weitere Aufarbeitung des Ansatzes auf Adenosin, Cytidin und Uridin verläuft ebenso wie bei dem fermentativen Verfahren. Die Ausbeute an Nucleosiden ist die gleiche wie bei diesem, zuweilen auch ein wenig höher.