

Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel.

X. Mitteilung.

Die Desamidierung der Triphosphonucleinsäure.

Von

S. J. Thannhauser und P. Sachs.

Aus der II. med. Klinik (F. Müller) München.

(Der Redaktion zugegangen am 7. Dezember 1920.)

Als Triphosphonucleinsäure wurde von dem einen von uns und G. Dorf Müller ein Spaltstück der Hefenucleinsäure beschrieben, das durch milde ammoniakalische Hydrolyse aus der Hefenucleinsäure entsteht. Das Molekül der Triphosphonucleinsäure ist aus drei Mononucleotiden (Guanosin-, Adenosin-, Cytidinphosphorsäure) aufgebaut, die außer durch Phosphorsäureanhydridbindungen noch durch intramolekulare Bindungen, wahrscheinlich von Kohlehydrat zu Kohlehydrat, zusammengehalten werden. Bei der milden ammoniakalischen Hydrolyse werden aus dem Polynucleotidmolekül der Hefenucleinsäure neben der Triphosphonucleinsäure auch Mononucleotide abgespalten. In der Hydrolysenflüssigkeit konnten in größerer Menge Uridinphosphorsäure¹⁾, in kleiner Menge Adenosinphosphorsäure²⁾ und neuerdings auch Guanosin- und Cytidinphosphorsäure³⁾ als Mononucleotide aufgefunden werden. Es sind daher Zweifel⁴⁾ aufgetaucht, ob die mit 6 Molekülen Brucin kristallisierende 6 basische Triphosphonucleinsäure als

¹⁾ S. J. Thannhauser und G. Dorf Müller, Diese Zeitschr. Bd. 95, S. 259; Bd. 100, S. 121.

²⁾ S. J. Thannhauser, Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 157.

³⁾ P. A. Levene, Journ. of Biol. Chem. Bd. 40, S. 171, cit. nach C III. S. 668 (1920); Bd. 39, S. 77, cit. nach C III. S. 669 (1920).

⁴⁾ P. A. Levene, Journ. of Biol. Chem. Bd. 40, S. 415, C III. S. 717 (1920).

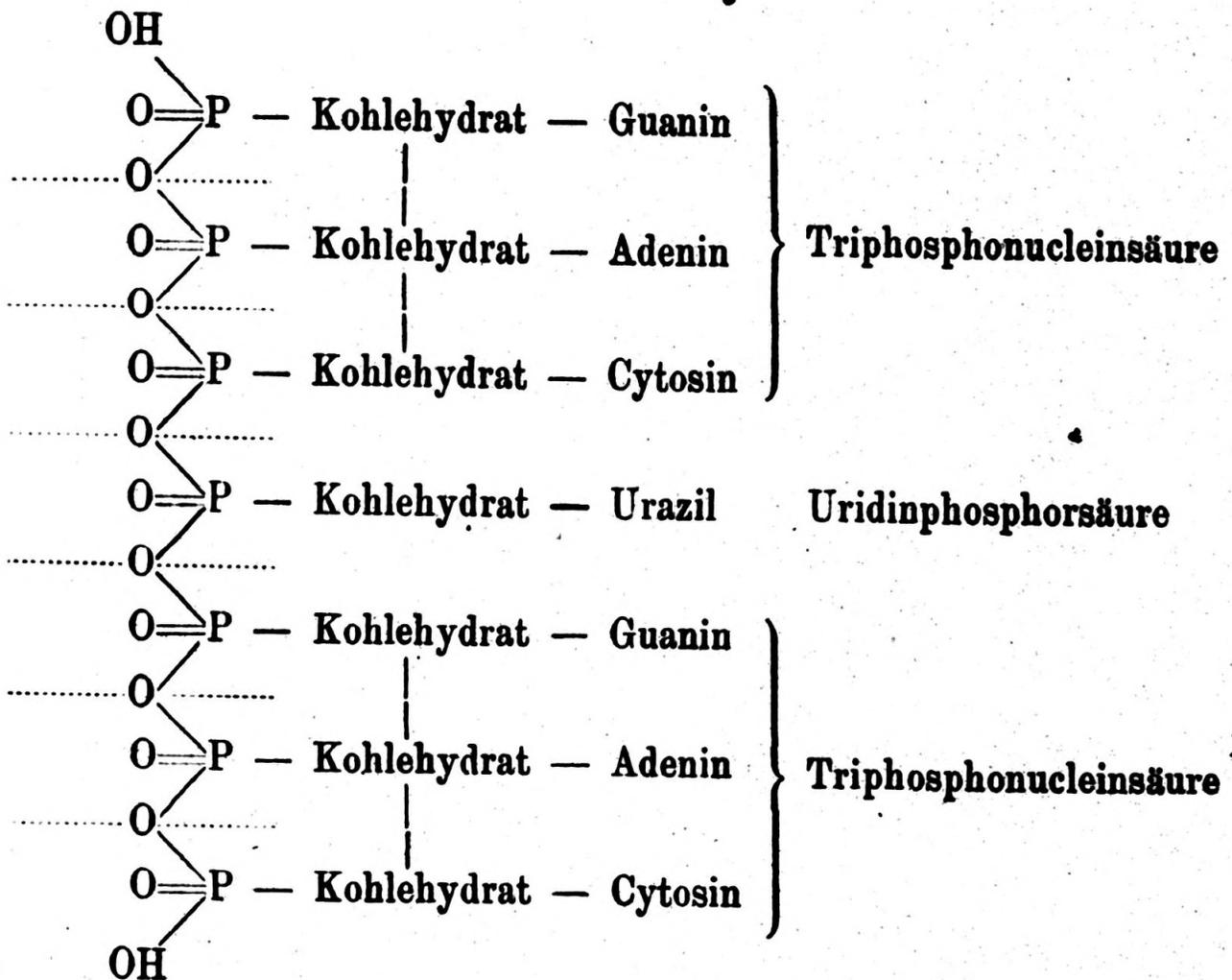
chemisches Individuum anzusprechen sei, oder ob sie ein Gemisch verschiedener Mononucleotide darstelle. Gegen eine solche Annahme spricht bereits der experimentelle Befund, daß nach der milden ammoniakalischen Hydrolyse der Hefenucleinsäure außer der Uridinphosphorsäure nur geringe Mengen der anderen Mononucleotide isoliert werden konnten.

Um nun diesen Einwand gegen die Einheitlichkeit der Triphosphonucleinsäure aufzuklären, haben wir einerseits die aus dem mehrfach umkristallisierten Brucinsalz gewonnene Triphosphonucleinsäure, andererseits das bei der milden ammoniakalischen Hydrolyse entstehende Gemisch von Triphosphonucleinsäure und Mononucleotiden desamidiert. Ist die Triphosphonucleinsäure wirklich ein einheitlicher chemischer Körper, so muß bei diesem Vorgehen aus dem durch die Hydrolyse entstehenden Säuregemisch nach der Desamisierung die gleiche Substanz zu isolieren sein, die bei der Desamidierung der reinen Triphosphonucleinsäure entsteht. Es ist uns gelungen, die gleiche Substanz, die einer Desaminotriphosphonucleinsäure $C_{29}H_{35}N_{10}O_{24}P_3$ entspricht, sowohl durch Desamisierung der aus dem kristallisierten Brucinsalz hergestellten Triphosphonucleinsäure $C_{29}H_{38}N_{13}O_{21}P_3$, wie auch durch Desamidierung des bei der ammoniakalischen Hydrolyse entstehenden Säuregemisches als kristallisiertes Brucinsalz darzustellen und zu analysieren. Durch diesen experimentellen Befund dürfte die Triphosphonucleinsäure als einheitliches chemisches Individuum abermals charakterisiert sein.

Wir haben Versuche ausgeführt, die kristallisierte Adenosinphosphorsäure auf die gleiche Art wie die Triphosphonucleinsäure zu desamidieren und auf diese Weise zu der Hypoxanthosinphosphorsäure (Inosinsäure) zu gelangen. Während das Molekül der Triphosphonucleinsäure den Desamisierungsprozeß in saurer Lösung aushält und nicht auseinanderfällt, gelingt die Desamidierung der Adenosinphosphorsäure in saurer Lösung nicht, ohne gleichzeitig das Mononucleotidmolekül zu hydrolysieren.

Hinsichtlich des Aufbaues des großen Polynucleotidmoleküles der Hefenucleinsäure haben wir die Auffassung ver-

treten, daß die Hefenucleinsäure aus Triphosphonucleinsäure und Uridinphosphorsäure aufgebaut sei, wobei die Triphosphonucleinsäure noch durch intramolekulare Bindungen zusammengehalten wird und die Uridinphosphorsäure lediglich durch Phosphorsäureanhydridbindungen im großen Molekül nach folgendem Schema verankert ist.



Nachdem aber nunmehr außer der Uridinphosphorsäure noch andere Mononucleotide in der ammoniakalischen Hydrolyseflüssigkeit gefunden wurden, ist anzunehmen, daß sowohl Guanosinphosphorsäure wie auch Adenosin- und Cytidinphosphorsäure nicht nur in der intramolekular verketteten Triphosphonucleinsäure im Hefenucleinsäuremolekül präformiert sind, sondern daß diese Säuren in kleinerer Menge mit der Uridinphosphorsäure alternieren, auch als Mononucleotide im großen Molekül vorkommen und wechselseitig mit der Uridinphosphorsäure die Triphosphonucleinsäure durch Phosphorsäureanhydridbindung zum großen Molekül zusammenhalten¹⁾. Diese Vor-

¹⁾ Bei der Darstellung der Pankreasnucleinsäure wurde neben dem Polynucleotid auch ein Mononucleotid (Guanosinphosphorsäure) gefunden. (Bang, Feulgen.) Aus diesem Befunde konnte man auf ähnliche Bindungsverhältnisse auch in tierischen Nucleinsäuren schließen.

stellung ist an dem obenstehenden Modell verständlich, wenn man an Stelle der Uridinphosphorsäure abwechselnd ein anderes Mononucleotid treten läßt.

Experimenteller Teil.

1. Desamidierung der durch milde ammoniakalische Hydrolyse der Hefenucleinsäure entstandenen Rohsäure. (Gemisch von Triphosphonucleinsäure und Mononucleotiden.)

30 g Rohsäure (Darstellung nach Thannhauser und Dorfmueller¹⁾) werden in 150 ccm kaltem Wasser gelöst und mit 12 ccm Eisessig angesäuert. Unter Eiskühlung wird eine Lösung von 12 g Natriumnitrit in ca. 50 ccm Wasser gelöst zugegeben. Das Reaktionsgemisch läßt man 20 Stunden im Eisschrank stehen oder man gibt in der gleichen Zeit die Nitritlösung langsam unter Rühren zu. Die Lösung wird dann mit Bikarbonat neutralisiert, mit 200 ccm Bleiessig (D. A. B.) in der Hitze gefällt. (Man kann auch nach dem Einengen im Vakuum mit ca. 3 l Alkohol fällen und den so entstandenen Niederschlag mit Bleiessig behandeln.) Der Bleiniederschlag wird mit Schwefelwasserstoff behandelt, vom Bleisulfid abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedickt. Sollten beim Einengen geringe Mengen eines flockigen Niederschlages ausfallen, so wird davon abfiltriert. Das Filtrat wird bis zur Sirupkonsistenz im Vakuum eingedickt mit absolutem Alkohol so lange versetzt, bis kein Niederschlag mehr entsteht. Der Niederschlag wird mehrmals mit absolutem Alkohol und Äther auf einer Nutsche gewaschen und getrocknet (16 g). Man löst die Gesamtmenge in der 11fachen Menge (180 ccm) heißem Wasser und gibt 33 g Brucin in 66 ccm heißem 96%igen Alkohol gelöst hinzu. Das zwischen 100—42° ausfallende Kristallinat wird abfiltriert und das Filtrat der weiteren Kristallisation bei Zimmertemperatur überlassen. Nach dem Behandeln des ersten Kristallisates (100—42°) mit Chloroform (Entfernung evtl. ausgefallenen Brucins) wird es mit

¹⁾ S. J. Thannhauser und G. Dorfmueller, Diese Zeitschr. Bd. 100, S. 121.

750 ccm Wasser ausgekocht. Der hierbei hinterbleibende Rückstand erwies sich nach seinem Schmelzpunkt und seiner Schwerlöslichkeit in Wasser als Uridinphosphorsäure. Aus der wäßrigen Lösung kristallisiert beim Abkühlen ein Brucinsalz, das nach mehrmaligem Umkristallisieren den Schmelzpunkt 189/90° beibehält (Brucinsalz I). Aus der Mutterlauge von Brucinsalz I fällt nach weiterem Abkühlen ein Brucinsalz aus, das nach wiederholtem Umkristallisieren den Schmelzpunkt 194/95° zeigt (Brucinsalz II). Die Analysen ergeben, daß Brucinsalz I und II identisch sind und mit den für eine Desaminotriphosphonucleinsäure berechneten Zahlen übereinstimmen.

S. P. 188/89°	0,1533 g Subst.,	0,3365 g CO ₂ ,	0,0843 g H ₂ O		
	0,1425 g ..	11,3 ccm N	Temp. 13°	B 750 mm	
S. P. 194/95°	0,1490 g ..	0,3271 g CO ₂ ,	0,0793 g H ₂ O		
	0,1419 g ..	11,4 ccm N	Temp. 12°	B 757 mm	

Berechnet für C ₂₉ H ₃₃ N ₁₀ O ₂₄ P ₃ (C ₂₃ H ₂₉ N ₂ O ₄) ₆			
Ber.:	C 59,57	H 5,67	N 9,16
I.	59,86	6,15	9,32
II.	59,87	5,95	9,56

Beim Stehen der Mutterlauge des bei 100—42 ausfallenden Kristallisates fällt noch weiteres Brucinsalz aus, das ein Gemisch des Brucinsalzes der Desaminotriphosphonucleinsäure und wahrscheinlich von Brucinsalzen desamidierter Mononucleotide sein dürfte. Dieses Brucinsalzgemisch soll noch weiter untersucht werden.

2. Desamidierung der reinen Triphosphonucleinsäure.

50 g Triphosphonucleinsäurebrucinsalz, Schmelzpunkt 205°, werden nach der früher gegebenen Vorschrift mit Ammoniak zersetzt und über das Bleisalz die freie Säure hergestellt. Die Desamidierung wird nach der obenstehenden Vorschrift ausgeführt. Die desamidierte Säure wird, wie oben angegeben, über das Bleisalz gereinigt, das Filtrat des Bleisulfids wird, zum Sirup eingengt, mit der entsprechenden Menge heißen Wassers aufgenommen und mit 24 g Brucin in 50 ccm heißem Alkohol versetzt. Das ausfallende Brucinsalz zeigt nach mehr-

maligem Umkristallisieren den Schmelzpunkt 185° . Obgleich dieser Schmelzpunkt nur einige Grad von dem Schmelzpunkt des Brucinsalzes I und II verschieden ist, stimmen die Analysen mit beiden Substanzen überein.

0,1579 g Subst.	Gef. : 0,3442 g CO_2	0,0845 g H_2O
0,1626 g „	12,3 ccm Vol. N	Temp. 16° B 765 mm
0,1900 g „	0,0186 $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$	

Berechnet für $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{O}_{24}\text{P}_3(\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4)_6$

Ber.:	C 59,57	H 5,67	N 9,16	P 2,67
	C 59,45	H 5,99	N 8,99	P 2,73

3. Desamidierung der Adenosinphosphorsäure¹⁾.

Bei wiederholten Versuchen, kristallisierte Adenosinphosphorsäure unter den gleichen Bedingungen wie die Triphosphonucleinsäure zu desamidieren, wurde die Adenosinphosphorsäure in ihre Bausteine hydrolytisch aufgespalten. Bei zwei Versuchen kristallisierte direkt aus der desamidierten Lösung eine Substanz aus, die in ihrer Kristallform (große rechteckige Prismen) von der Kristallform der Adenosinphosphorsäure (feine zugespitzte Nadeln) verschieden scheinen. Die Analyse und die Bestimmung der optischen Aktivität ergab aber Werte, die vollständig auf Adenosinphosphorsäure stimmten. Eine Desamisierung ohne Zersetzung der Adenosinphosphorsäure konnte auf die angegebene Weise nicht durchgeführt werden.

¹⁾ S. J. Thannhauser, Diese Zeitschr. Bd. 107, S. 157.