

Über die Säurehydrolyse der Desoxyriboside und Riboside*

Von ADOLF WACKER und LOTHAR TRÄGER

Aus dem Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforschg. **18 b**, 13—16 [1963]; eingegangen am 10. Oktober 1962)

Bei saurer Hydrolyse wird aus den 5-Halogenuracildesoxyribosiden die DR ** etwa 3—4-mal rascher abgespalten als aus TdR oder UdR. CdR wird unter den gleichen Bedingungen 16-fach schneller hydrolysiert. Im Gegensatz dazu ist die Ribose im Cytidin um ein Mehrfaches fester gebunden als im Uridin. Im TdR-Dimeren wird durch die Absättigung der 5.6-Doppelbindung die Stabilität der N-glykosidischen Bindung stark erniedrigt. Aus diesen Befunden ergibt sich ein Hinweis auf die Elektronendichte-Verteilung im Pyrimidinring und damit eine chemische Basis für das mutagene Verhalten verschiedener unnatürlicher Desoxyriboside.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die strahlenchemische Veränderung der Nucleinsäuren¹ durch UV-Licht war es von Interesse, die veränderte Bindungsfestigkeit des Zuckers an die Basen im dimeren TdR näher zu untersuchen. (Wir haben schon früher² darauf hingewiesen, daß die Dimerisierung bzw. die Anlagerung von Wasser an die 5.6-Doppelbindung der Pyrimidine zu einer Veränderung der Elektronendichte-Verteilung im Pyrimidinring führt, die die Basenpaarung der Pyrimidine mit den zugehörigen Purinen in der DNS beeinflussen kann.)

Ergänzend hierzu haben wir noch die Hydrolysegeschwindigkeit anderer Desoxyriboside bestimmt, da derartige Untersuchungen infolge Fehlens geeigneter Trennmethode der freien Basen von den Desoxyribosiden bisher nur in geringem Umfang³ durchgeführt worden sind. Vergleichsweise wurden auch die Riboside bzw. die Ribotide mit in die Experimente einbezogen.

Mit den hierbei erzielten Ergebnissen sollte es möglich sein, nähere Aussagen über die Elektronendichte-Verteilung im Pyrimidinring in Abhängigkeit von den verschiedenen Substituenten an C-4 und C-5 zu machen, woraus sich auch Rückschlüsse auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bei

der Basenpaarung in der α -Helix der DNS ziehen lassen. Damit ergibt sich gleichzeitig eine chemische Basis für das mutagene Verhalten unnatürlicher Desoxyriboside und das des strahlenchemisch gebildeten Dimeren des TdR.

Methodik

Die Menge Desoxyribose wurde mit Hilfe der von WEBB und LEVY⁴ oder von DISCHE⁵ angegebenen Methoden bestimmt.

Die Menge Ribose wurde mit der Methode von MEYBAUM⁶ ermittelt. Papierelektrophorese: Hochspannungselektrophorese Hormuth & Vetter, System Frankfurt. Papier: Macherey & Nagel MN 214.

Trennung von Adenin und Cytosin von den entsprechenden Desoxyribosiden in 0,1-m. Citratpuffer p_H 3,0, 40 V/cm. Trennung von Bromuracil und Fluoruracil von den entsprechenden Desoxyribosiden in 0,2-m. Boratpuffer p_H 8,5, 40 V/cm⁷. Trennung von Uracil von UdR in 0,1-m. Glycinpuffer p_H 11, 35 V/cm.

Mikrobiologischer Test: Die Bestimmung der Desoxyriboside erfolgte im Wuchsstofftest mit *Lactobacillus acidophilus* R 26. Die dimere Verbindung des TdR besitzt keine Wuchsstoffaktivität. Die Kultivierung und das Nährmedium sind an anderer Stelle beschrieben⁸.

Darstellung von TdR-Dimeren⁹: eine eingefrorene 0,5-m. TdR-Lösung wird 30 Min. (Quecksilberniederdruckbrenner NN 30/89 Hanau, Hauptemis-

* Auszugsweise vorgetragen Juni 1961 anlässlich der ERWIN BAUR-Gedächtnisvorlesung II, Gatersleben.

** Abkürzungen: Desoxyribonucleinsäure (DNS), Desoxyribose (DR), Thymindesoxyribosid (TdR), Uracildesoxyribosid (UdR), Cytosindesoxyribosid (CdR), Adendesoxyribosid (AdR), Guanindesoxyribosid (GdR), 5-Bromuracildesoxyribosid (BrUdR), Trichloressigsäure (TCA).

¹ A. WACKER, H. DELLWEG u. D. WEINBLUM, Naturwissenschaften **47**, 477 [1960].

² A. WACKER, H. DELLWEG u. E. LODEMANN, Angew. Chem. **73**, 64 [1961].

³ W. POLLMANN u. G. SCHRAMM, Z. Naturforschg. **16 b**, 673 [1961]; F. MICHEEL u. A. HEESING, Chem. Ber. **94**, 1814 [1961].

⁴ J. M. WEBB u. H. D. LEVY, J. biol. Chemistry **213**, 107 [1955].

⁵ Z. DISCHE, Z. Mikrochemie **8**, 4 [1930].

⁶ W. MEYBAUM, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **258**, 117 [1939].

⁷ D. HARTMANN, Diplomarbeit, TU Berlin 1957.

⁸ A. WACKER, A. TREBST u. F. WEYGAND, Z. Naturforschg. **11 b**, 7 [1956].

⁹ R. BEUKERS, J. IJLSTRA u. W. BERENDS, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **77**, 729 [1958].

sion 254 m μ) bestrahlt. Danach sinkt die UV-Extinktion der TdR-Lösung bei 267 m μ um etwa 50% ab. Anschließend wird papierchromatographisch im Lösungsmittelsystem n-Butanol/Wasser (86 : 14) vom nicht umgesetzten TdR abgetrennt (R_f -Wert TdR-Dimer 0,10, TdR 0,45). Bei Bestrahlung der wäßrigen Lösung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 m μ wird die dimere Verbindung in das monomere TdR zurückverwandelt. Mit Hilfe der UV-Absorption des TdR wird anschließend der Gehalt an TdR-Dimer in der Ausgangslösung berechnet.

Ergebnisse und Diskussion

Bestimmt man in einem Desoxyribosid die Menge hydrolysierter DR mit einem der gebräuchlichen Farbtteste nach DISCHE⁵ oder WEBB⁴, so erhält man die in Tab. 1 aufgeführten Werte. Wie

Desoxyribosid	Menge Farbstoff	
	Webb	Dische
TdR	1	1
BrUdR	4	2
CdR	16	5
AdR	22	20
GdR	23	20

Tab. 1. Unterschiedliche Mengen Farbstoff, die sich bei der Hydrolyse äquimolekularer Mengen verschiedener Desoxyriboside nach der Methode von WEBB⁴ oder DISCHE⁵ bilden, bezogen auf TdR=1.

daraus hervorgeht, lassen sich die Nucleoside je nach ihrem hydrolytischen Verhalten und ihrer Struktur in verschiedene Gruppen einteilen. Erwartungsgemäß ist die Säurestabilität der Purin-DR-Bindungen weitaus geringer als die der Pyrimidin-DR-Bindungen, eine Tatsache, die für die Darstellung der Apurinsäure verwendet wird¹⁰. Die stabilste Zuckerbindung finden wir im UdR und im TdR. Auffällig ist, daß der Wert von CdR im Vergleich zu TdR sehr hoch liegt und in die Nähe der Werte der Purindesoxyriboside kommt. Daraus könnte man schließen, daß sich Cytosin bei der Hydrolyse wie ein Purin verhält. Dies widerspricht der Tatsache, daß bei der Darstellung der Apurinsäure aus DNS Cytosin, wenn überhaupt, nur wenig abgespalten wird. Daher gehen die aus den Farbtesten ermittelten Relationen nicht mit den tatsächlichen Hydrolysegeschwindigkeiten parallel, was im Falle der Hydrolyse mit 5% Trichloressigsäure sehr deutlich aus Tab. 2 hervorgeht. Aus ihr kann man entneh-

Zeit [min]		0,5	1	900	1260
freie	AdR	32	70	100	100
Base [%]	CdR	0	0	28	40

Tab. 2. Hydrolyse von AdR und CdR mit 5-proz. TCA bei 60° in Abhängigkeit von der Zeit. Zahlenangaben: % Adenin bzw. Cytosin, nach der Hydrolyse elektrophoretisch isoliert und mit Hilfe der UV-Absorption quantitativ bestimmt.

men, daß nach wenigen Min. AdR schon bei 60° vollständig hydrolysiert ist, während dagegen CdR auch nach 900 Min. nur zu etwa 30% aufgespalten ist. Die Purindesoxyriboside werden demnach etwa 2000-mal rascher hydrolysiert als CdR.

In den folgenden Experimenten haben wir die Stärke der N-glykosidischen Bindung bei den verschiedenen Desoxyribosiden in Vergleich gesetzt, einmal zu der extremen Festigkeit beim TdR und zum anderen zur größeren Labilität beim CdR. Es wurde 10 Min., 20 Min. oder 30 Min. mit 5% Trichloressigsäure bei 100° hydrolysiert und die dabei frei werdende Menge DR nach der Methode von WEBB⁴ bestimmt. Wie aus Tab. 3 hervorgeht, sind die Derivate des UdR am stabilsten, die an C-5 mit H (UdR) oder CH₃ (TdR) substituiert sind. Durch die Einführung eines Halogenatoms an C-5 wird die Hydrolysegeschwindigkeit heraufgesetzt. Sie ist beim BrUdR etwa 4-fach höher als bei TdR. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, daß durch die stärkere Elektronegativität des Halogenatoms die Elektronendichte-Verteilung im Pyrimidinring beeinflußt wird. Wird die Ketogruppe an C-4 durch eine Aminogruppe ersetzt (CdR), so wird dadurch die Bindungsfestigkeit der DR ebenfalls verändert. Im Vergleich zu TdR erhöht sich die Hydrolysegeschwindigkeit etwa 16-fach.

Wird die 5.6-Doppelbindung von TdR durch die Bildung des Cyclobutanringes bei der uv-bedingten Dimerisierung aufgehoben, so wirkt sich auch diese Veränderung auf die Bindungsfestigkeit der DR aus. Um die Hydrolysegeschwindigkeit des TdR-Dimeren zu bestimmen, wurde eine mikrobiologische Methode angewandt. In verschiedenen Versuchen fanden wir, daß CdR etwa 1,5-fach rascher hydrolysiert als die dimere Verbindung des TdR. Die Bindungsfestigkeit der DR im TdR-Dimeren liegt demnach zwischen den Werten für die 5-Halogenuracildesoxyriboside und CdR.

Wie aus Tab. 3 deutlich hervorgeht, beeinflussen die Substituenten am Pyrimidinring sehr wesentlich die Bindungsfestigkeit der DR. Dagegen zeigt sich

¹⁰ C. TAMM, M. HODES u. E. CHARGAFF, J. biol. Chemistry **195**, 49 [1952].

Desoxy- riboside	Zeit [min]		
	10	20	30
UdR	—	—	3
TdR	1,8	2,5	4,3
FUdR	—	—	13
CIUdR	—	—	17
BrUdR	8,6	12	16
TdR-Dimer	41*	76*	85*
CdR	66*	85*	91*
	33	42	76
NdR	—	—	96
AdR	—	—	96
GdR	100	100	100

Tab. 3. Unterschiedliche Mengen Farbstoff, die sich in Abhängigkeit von der Zeit bei der Hydrolyse äquimolekularer Mengen verschiedener Desoxyriboside nach der Methode von Webb bilden, bezogen auf GdR = 100. *% Inaktivierung der Wuchsstoffaktivität von TdR-Dimer (nach Umwandlung in die biologisch aktive Form) und CdR bei *Lb. acidophilus* R 26 nach Hydrolyse mit 5-proz. TCA bei 100°. Da TdR-Dimer keine Wuchsstoffaktivität besitzt, wurden die wäßrigen Lösungen mit UV-Licht der Wellenlänge 254 m μ bestrahlt und so zu der wuchsstoffaktiven monomeren Verbindung (TdR) umgewandelt. Abkürzungen: FUdR 5-Fluoruracildesoxyribosid, CIUdR 5-Chloruracildesoxyribosid, NdR Naphthimidazoldesoxyribosid.

bei den Desoxyribosiden des Imidazols dieser auffällige Unterschied nicht. Aus AdR, GdR oder Naphthimidazoldesoxyribosid¹¹ wird etwa die gleiche Menge DR nach Hydrolyse mit 5% Trichloressigsäure bei 100° in 30 Min. freigesetzt.

Hydrolysiert man unter den Bedingungen der Orcinmethode⁶ mit halbkonzentrierter HCl Riboside bzw. Ribotide, so findet man ebenfalls einen beträchtlichen Unterschied in der Menge erfassbarer

Uridin	1
Cytidin	0,2
Adenosin	14
Guanosin	14
Uridin-3'-phosphat	0,35
Cytidin-3'-phosphat	0,07
Adenosin-3'-phosphat	14
Guanosin-3'-phosphat	14

Tab. 4. Unterschiedliche Mengen Farbstoff, die sich bei der Hydrolyse äquimolekularer Mengen verschiedener Riboside und Ribotide nach der Methode von Meybaum bilden, bezogen auf Uridin=1. Die papierchromatographische Isolierung der Basen nach Hydrolyse und ihre quantitative Bestimmung mit Hilfe der UV-Absorption ergab die gleichen Relationen.

¹¹ Die Synthese dieser Substanz wurde von Herrn Dipl.-Ing. E. LODEMANN durchgeführt.

¹² O. WESTPHAL u. K. HIMMELSPACH, *Angew. Chem.* **69**, 140 [1957].

Ribose zwischen den Pyrimidin- und Purinverbindungen (Tab. 4) (vgl. hierzu auch l. c.³). Auffällig ist hierbei jedoch die Tatsache, daß im Gegensatz zu den Pyrimidindesoxyribosiden im Cytosinribosid die Ribose um ein Vielfaches stärker gebunden ist als im Uracilribosid. Interessanterweise verstärkt eine Phosphatgruppe in 3'-Stellung der Ribose die N-glykosidische Bindung sowohl bei der Uridylsäure als auch bei der Cytidylsäure beträchtlich. In den Purinribosiden und Purinribotiden ist dagegen die Stabilität der Ribose-Bindung unverändert.

Die zur Bestimmung der DNS verwandten Farbreaktionen nach WEBB oder DISCHE sind in ihrem chemischen Verlauf noch nicht vollständig bekannt¹². Daher bleibt zunächst ungeklärt, ob die bei den Farbtönen gebildete Menge Farbstoff mit der tatsächlich hydrolysierten Menge Desoxyribose exakt in Vergleich gesetzt werden kann. Wir haben daher die in den Tabellen angegebenen und mit dem Webb-Test ermittelten Werte durch die Bestimmung der nach Hydrolyse freigesetzten Menge Base elektrophoretisch, papierchromatographisch oder indirekt mikrobiologisch nachgeprüft und bestätigt gefunden.

Jedoch können, wie die vorstehenden Ergebnisse zeigen, die für die Gehaltsbestimmung der DNS gebräuchlichen Farbtöne nach DISCHE oder WEBB zu Irrtümern führen, wenn z. B. einzelsträngige DNS-Moleküle sich in ihrem Purin/Pyrimidin-Verhältnis stark unterscheiden. Das gleiche gilt auch für die RNS-Bestimmung mit Hilfe von Orcin.

Die verstärkte Hydrolyse der DR bei den Pyrimidindesoxyribosiden durch Bromierung wurde bisher empirisch zum empfindlicheren Nachweis der Desoxyriboside in der Papierchromatographie angewandt¹³. Nach unseren Ergebnissen kann man nun erwarten, daß die durch UV-Licht bewirkte Dimerisierung des TdR und unter besonderen Bedingungen auch des CdR¹⁴ auf dem Papierchromatogramm die Nachweisgrenze der Pyrimidindesoxyriboside erheblich steigert. Ähnliche Effekte wurden auch bei den Pyrimidinribosiden nach Absättigung der 5.6-Doppelbindung durch Behandlung mit Hydrazin beobachtet¹⁵. (In welcher Größe auch die Wasseradditionsprodukte bei den Pyrimidindesoxyribosiden

¹³ J. JONSEN, L. HAAVALDSEN u. S. LALAND, *J. Chromatogr.* [Amsterdam] **1**, 291 [1958].

¹⁴ H. DELLWEG u. A. WACKER, *Z. Naturforschg.*, **17b**, 827 [1962].

¹⁵ N. ISHIHARA, *Analyt. Biochem.* [New York] **3**, 186 [1962].

nach UV-Bestrahlung eine Stabilitätsänderung der Base-Zucker-Bindung hervorrufen, läßt sich nach dieser Methode nicht nachweisen, da der Zerfall der Wasseradditionsprodukte zu den Ausgangsnucleosiden schneller verläuft als die Abspaltung der DR.)

Versuche, die verstärkte Hydrolyse der DR in der TdR-Dimeren dazu benutzen, um wie bei der Apurinsäure auch die dimerisierten Thymin-Moleküle aus der DNS spezifisch abzuspalten, führten bisher noch zu keinem eindeutigen Ergebnis¹⁶. Wir stellten fest, daß in der uv-bestrahlten DNS dimerisierte Thymin-Moleküle durch Hydrolyse entfernt werden, wobei es sich aber bisher nicht vermeiden ließ, daß auch unverändertes Thymin mithydrolysiert wurde. Der Unterschied in der Hydrolysegeschwindigkeit von TdR-Dimeren mit 11 gegenüber einigen Tausend bei den Purindesoxyribosiden reicht vermutlich nicht aus, um vorzugsweise neben den Purinen auch die dimeren Moleküle des TdR abzuspalten, worüber an anderer Stelle ausführlicher berichtet werden soll.

Untersuchungen der letzten Jahre machen wahrscheinlich, daß der Sauerstoff an C-4 des Pyrimidinringes im Uracil und Thymin in der Ketoform, dagegen die Aminogruppe an C-4 im Pyrimidinring des Cytosins oder im Adenin in der Aminoform vorliegt¹⁷. Diese Gruppierungen sind für die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen in der Doppelspirale der DNS von großer Wichtigkeit. Wird daher durch einen Substituenten im Uracil-Molekül die Ausbildung der Ketogruppe an C-4 beeinträchtigt (Verschiebung in Richtung Enolform), so muß sich dies auch bei der Ausbildung der Wasserstoffbrücke bzw. bei der Basenpaarung mit dem Adenin bei der Verdoppelung der DNS auswirken.

Wie unsere Ergebnisse zeigen, wird durch den Ersatz der Ketogruppe durch eine Aminogruppe die *N*-glykosidische Bindung erheblich abgeschwächt. Einen ähnlich großen Einfluß finden wir nur noch bei der Absättigung der 5.6-Doppelbindung im Pyrimidinring nach Dimerisierung. Die Stabilität der *N*-glykosidischen Bindung gibt damit indirekt auch Aufschluß über die Elektronendichte-Verteilung im Pyrimidinring. Die Einführung eines Br-Atoms an C-5 des Uracils, die meßbar die Säurestabilität von BrUdR verändert, muß daher auch die Struktur der Ketogruppe beeinflussen, wie dies auch von anderer Seite theoretisch gefordert wurde¹⁸. Die um das 4-fache erhöhte Hydrolysegeschwindigkeit des BrUdR gegenüber dem Wert von 16 des CdR bezogen auf TdR = 1, zeigt jedoch, daß Bromuracil überwiegend bei der Basenpaarung sich wie Thymin verhält und nicht wie Cytosin. Beim Thymin-Dimeren dürfte dagegen die Tendenz, sich mit Guanin zu paaren, anstatt mit Adenin, stärker als beim Bromuracil vorhanden sein, worauf die 11-fache Hydrolysegeschwindigkeit hinweist. Damit haben wir erstmals durch chemische Befunde eine Erklärung für die Möglichkeit der falschen Basenpaarung beim Einbau von Bromuracil an Stelle von Thymin oder bei der durch UV-Licht bewirkten Dimerisierung des Thymins in der DNS gegeben.

Wir danken Fräulein ANDREA GERSTENBERGER und Fräulein RUTH LORENZ für fleißige und geschickte Hilfe bei den Versuchen, dem Verband der Chemischen Industrie — Fonds der Chemie — für finanzielle Unterstützung.

¹⁶ H. DELLWEG, unveröffentlichte Ergebnisse.

¹⁷ H. T. MILES, Chem. and Ind. 1958, 591.

¹⁸ M. MESELSON, in: E. FREESE, J. molecular Biol. 1, 87 [1959].