

Über den Stoffwechsel des 5-Hydroxymethyl-cytosins bei Bakterien

Von FRIEDRICH WEYGAND, ADOLF WACKER,

ACHIM TREBST und OTTO PAUL SWOBODA

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Technischen Universität, Berlin-Charlottenburg

(Z. Naturforschg. **12 b**, 184—186 [1957]; eingegangen am 4. Dezember 1956)

5-Hydroxymethyl-cytosin-[2-¹⁴C] wird von allen untersuchten Bakterienstämmen in geringer Menge aufgenommen. *Lb. leichmannii* und *Lb. acidophilus* R 26 wandeln das aufgenommene 5-Hydroxymethyl-cytosin-[2-¹⁴C] vollständig in Thymin um, dagegen enthalten *B. coli* B und *B. coli* 1883 Co neben radioaktivem Thymin den größeren Teil der Radioaktivität in Form von 5-Hydroxymethyl-cytosin-[2-¹⁴C]-desoxyribosid.

Kürzlich konnten wir zeigen, daß Bakterien Uracil-[2-¹⁴C] in Cytosin und Thymin umwandeln; dabei ist für die Synthese des Thymins unbedingt Folsäure bzw. Coenzym F notwendig¹. Weiterhin wurde gefunden, daß Formiat-[¹⁴C] den C₁-Baustein der Methylgruppe des Thymins liefern kann¹. Aus diesen Ergebnissen ableitend wurde sodann die Frage diskutiert, ob bei der Biosynthese des Thymins eine 5-Hydroxymethyl-uracil-Verbindung als Intermediärprodukt auftritt.

Nachdem S. S. COHEN² aus dem virusinfizierten *B. coli* B 5-Hydroxymethyl-cytosin-desoxyribosid isolieren konnte, schien es von Interesse zu prüfen, ob 5-Hydroxymethyl-cytosin (HMC) für die Biosynthese des Thymins verwendet werden kann. Wir haben zu diesem Zweck 5-Hydroxymethyl-cytosin-[2-¹⁴C] synthetisiert³ und seinen Stoffwechsel bei verschiedenen Bakterien untersucht.

Methodik

5-Hydroxymethyl-cytosin-[2-¹⁴C]:
Aktivität 1 mC/mMol³

Züchtung der Bakterien

Stämme: *Lactobacillus leichmannii* 313, *Lactobacillus leichmannii* 313 adaptiert, *Lactobacillus leichmannii* 4797, *Lactobacillus acidophilus* R 26, *Lactobacillus plantarum* 10 S, *Enterococcus* Stei, *B. coli* 1883 Co und *B. coli* B. Züchtung, Aufbewahrung der Bakterien sowie Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien sind in früheren Arbeiten beschrieben⁴. *B. coli* B wurde wie *B. coli* 1883 Co gezüchtet. In allen Nährmedien

wurde Uracil weggelassen, bei der Züchtung der beiden *B. coli*-Stämme auch die Purine. Wenn *Lb. leichmannii* 313 mehrere Passagen in einem uracil-freien Nährmedium gezüchtet wird, zeigt er in uracil-freiem Medium ein besseres Wachstum als der Ausgangsstamm. Der so erhaltene Stamm wird im folgenden als *Lb. leichmannii* 313 adaptiert bezeichnet.

Die *Lb. leichmannii*-Stämme wurden in Anwesenheit von 2 my/ml Vitamin B₁₂ gezüchtet, *Lb. acidophilus* R 26 mit 10 γ/ml Adenindesoxyribosid. HMC wurde vom Medium getrennt sterilisiert.

Bestimmung der Radioaktivität

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden 40 mg getrocknete Bakterien in einer Presse zur Herstellung von KBr-Scheibchen für die UR-Spektroskopie in kleine Scheibchen von 1 cm Durchmesser gepreßt und ihre Radioaktivität unter einem Glockenzählrohr FHZ 15 (Friesecke & Hoepfner, 1,6 mg Glimmer/cm²) bestimmt.

Aufarbeitung der Bakterien

Die Nucleinsäure aus kleineren Mengen Bakterien wurde durch 10-stdg. Extraktion mit einer 10-proz. Kochsalzlösung im verschlossenen Rohr bei 95° und anschließender Dialyse der von den Bakterien abzentrifugierten Lösung gewonnen. Zur Isolierung der Pyrimidine wurde die so aus 60 mg Bakterien erhaltene Nucleinsäure-Lösung eingeengt, mit 3 ml konz. Ameisensäure versetzt und 2 Stdn. im Bombenrohr auf 170° erhitzt. Nach dem Abdampfen der Ameisensäure wurde in wenig Wasser aufgenommen und die Purine und Pyrimidine papierchromatographisch in n-Butanol/Wasser gesättigt und in Isopropanol/konz. HCl/Wasser (170 : 41 : 39) aufgetrennt. HMC wurde in den folgenden Systemen chromatographiert:

¹ F. WEYGAND, A. WACKER, A. TREBST u. O. P. SWOBODA, Z. Naturforschg. **9 b**, 764 [1954].

² S. S. COHEN, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. **18**, 221 [1953].

³ F. WEYGAND u. O. P. SWOBODA, Z. Naturforschg. **11 b**, 369 [1956].

⁴ A. WACKER, A. TREBST u. F. WEYGAND, Z. Naturforschg. **11 b**, 7 [1956]; *Lb. plantarum* 10 S wurde in dem gleichen Nährmedium wie *Lb. leichmannii* 313 gezüchtet, jedoch ohne Vitamin B₁₂; F. WEYGAND, A. WACKER, A. TREBST u. O. P. SWOBODA, Z. Naturforschg. **9 b**, 764 [1954], in dem in dieser Arbeit angegebenen Nährmedium A wurden *Enterococcus* Stei, *B. coli* 1883 Co u. *B. coli* B gezüchtet.

n-Butanol/Wasser/konz. NH_3 (86 : 13 : 1), R_f -Wert 0,2; Methanol/2-n. NH_3 (70 : 30), R_f -Wert 0,43; 80% Äthanol + 0,5% Acetat-Puffer p_H 3,5, R_f -Wert 0,55.

Zur Isolierung der Desoxyriboside wurde die aus den Bakterien gewonnene Nucleinsäure (von 4 l Kulturmedium bei *Lb. leichmannii* 313, bzw. 1 l bei *B. coli* 1883 Co) enzymatisch mit einem Ferment aus Kälberdarm⁵ und kristallisierter Desoxyribonuclease (GEA Kopenhagen) gespalten. Nach dem Eindampfen der Lösung wurden die Desoxyriboside mit Äthanol extrahiert und nach Abdampfen des Alkohols die wäßrige Lösung der Desoxyriboside durch Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex 2 x 8, 200–400 mesh, in der Formiatform und Elution mit 0,2-proz. Ameisensäure getrennt.

Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität wurde das so gewonnene Thymidin nochmals papierchromatographisch gereinigt.

Ergebnisse

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, nahmen alle untersuchten Bakterien HMC auf. Die aufgenommene Menge war unterschiedlich. Die *Lb. leichmannii*-Stämme nahmen am meisten auf, gefolgt von *Enterococcus* Stei. Eine geringere Radioaktivität, d. h. geringere HMC-Aufnahme, zeigten *Lb. acidophilus* R 26, *Lb. plantarum* 10 S und die beiden *B. coli*-Stämme.

Stamm	Im Nährmedium vorhandene Menge 5-Hydroxymethylcytosin-[2- ^{14}C] [$\mu\text{g/ml}$]	Radioaktivität von 40 mg Bakterien [Imp./min]
<i>Lb. leichmannii</i> 313	10	185
<i>Lb. leichmannii</i> 313 adaptiert	10	215
<i>Lb. leichmannii</i> 4797	10	96
<i>Lb. acidophilus</i> R 26	10	22
<i>Lb. plantarum</i> 10 S	10	16
<i>Enterococcus</i> Stei	10	45
<i>B. coli</i> 1883 Co	10	20
	20	35
<i>B. coli</i> B	20	45

Tab. 1. Radioaktivität der mit 5-Hydroxymethylcytosin-[2- ^{14}C] gewachsenen Bakterien.

Aus der Nucleinsäure der zu unseren Versuchen verwendeten Bakterien konnten wir bisher kein HMC isolieren. Es war daher wichtig zu wissen, auf welche Verbindung (oder Verbindungen) die Radioaktivität zurückzuführen war. Um dies zu ermitteln, wurden die Bakterien nach verschiedenen Methoden aufgearbeitet.

⁵ W. KLEIN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **255**, 82 [1938].

Zunächst untersuchten wir die Radioaktivität der Pyrimidine. Hierzu wurde die extrahierte Nucleinsäure mit Ameisensäure gespalten² und die Purine und Pyrimidine papierchromatographisch getrennt. Es zeigte sich, daß *Lb. leichmannii* 313 und 4797 sowie *Lb. acidophilus* R 26 nur eine radioaktive Verbindung, nämlich Thymin enthielten, während in *B. coli* 1883 Co und *B. coli* B außer Thymin noch eine zweite radioaktive Substanz vorhanden war. Auf den Papierchromatogrammen der gespaltenen Nucleinsäuren aus den *B. coli*-Stämmen zeigte die Stelle, an der sich die zweite radioaktive Verbindung befand, die weitaus größere Radioaktivität. Diese zweite Verbindung war nach ihrem R_f -Wert in verschiedenen Lösungsmittel-Systemen HMC. (Die zur Chromatographie benutzten Systeme sind unter Methodik angegeben.)

Bei der Spaltung der isolierten Nucleinsäuren mit einem Ferment aus Kälberdarm⁵ und kristallisierter Desoxyribonuclease erhielten wir Desoxyriboside und Riboside, deren Radioaktivität wir untersuchten. Aus der gespaltenen Nucleinsäure von *Lb. leichmannii* 313 konnten wir durch Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex 2 wiederum nur eine radioaktive Verbindung isolieren, die nach ihrem papierchromatographischen, spektroskopischen und mikrobiologischen Verhalten Thymindesoxyribosid ist. Ein Vergleich der spezifischen Aktivität mit dem eingesetzten HMC-[2- ^{14}C] (= 100%) ergab, daß ungefähr 2,2% des Thymins aus HMC gebildet werden.

Bei *B. coli* 1883 Co erhielten wir nach enzymatischer Spaltung der Nucleinsäure und anschließender papierchromatographischer Trennung zwei radioaktive Verbindungen. Eine davon war Thymindesoxyribosid, das nur zu 0,2% aus HMC gebildet wird (bezogen auf die Radioaktivität des eingesetzten HMC = 100%). Die andere radioaktive Verbindung war nach ihrem R_f -Wert in Äthanol/Acetatpuffer p_H 3,5, HMC-Desoxyribosid². Die isolierte Menge HMC-Desoxyribosid war aber so gering, daß sich die Verbindung auf dem Papierchromatogramm nur durch ihre Radioaktivität nachweisen ließ.

Diskussion

Aus den Versuchen ergibt sich, daß *Lb. leichmannii* und *Lb. acidophilus* R 26 HMC in Thymin umwandeln, dagegen nicht in Uracil und Cytosin. HMC-Desoxyribosid ließ sich in diesen Bakterien nicht nachweisen. Ein anderes Bild zeigt *B. coli*. Die

Aufnahme von HMC ist wie bei den Milchsäurebakterien gering. Jedoch wandeln beide Stämme den kleineren Teil des aufgenommenen HMC in Thymin um. Die größere Menge enthalten sie in Form von HMC-Desoxyribosid. Eine Umwandlung in Uracil und Cytosin findet ebenfalls nicht statt.

Nach diesen Versuchen mit isotopen-markiertem HMC ergibt sich, daß HMC kein normales Zwischenprodukt bei der Biosynthese des Thymins ist. Dies liegt sicherlich nicht daran, daß die in 6-Stellung befindliche NH_2 -Gruppe nicht gegen eine OH-Gruppe ersetzt werden könnte. — Wie schon früher beim Thymin gefunden wurde, kann auch HMC nicht in Cytosin und Uracil verwandelt werden¹. Die Einführung eines C_1 -Bausteines in 5-Stellung des Pyrimidinringes scheint also ein irreversibler Vorgang zu sein, was mit der Sonderstellung des Thymins zusammenhängen dürfte. Wie schon S. S. COHEN fand², kann auch Thymin nicht in HMC umgewandelt werden.

Der Befund, daß *B. coli* B nur in geringer Menge HMC enthält und auch nur Spuren seines Thymins

aus HMC synthetisiert, ist interessant. S. S. COHEN entdeckte, daß Bakteriophagen (Stämme T2, T4, T6) diesen Stamm zur Bildung von HMC induzieren². Die Phagen enthalten in ihrer Desoxyribonucleinsäure an Stelle von Cytosindesoxyribosid HMC-Desoxyribosid. Von grundsätzlicher Bedeutung ist dabei die Frage, ob HMC nicht doch in Spuren normalerweise in diesem Bakterium enthalten ist und die Phagen lediglich eine Mengenverschiebung der vorhandenen Pyrimidinbasen bewirken. Wäre dagegen HMC kein normaler Bestandteil der Bakterienzellen, so würde dies zeigen, daß Phagen auch Verbindungen enthalten können, die nicht in dem Wirt vorhanden sind. Der beachtliche Unterschied zwischen *B. coli* B, *B. coli* 1883 Co und den Milchsäurebakterien liegt in dem HMC-Desoxyribosid-Gehalt der *B. coli*-Stämme. Dies deutet darauf hin, daß in den normalen Zellen von *B. coli* B HMC in Spuren vorhanden ist.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der chemischen Industrie, Fonds der Chemie, danken wir bestens für die Unterstützung dieser Arbeit.

Über das optische Verhalten von Desoxyribonucleinsäure-Histon-Kombinaten

VON OLAF KLAMERTH

Aus dem Institut für Virusforschung, Heidelberg

(Z. Naturforschg. 12 b, 186—189 [1957]; eingegangen am 5. September 1956)

The extinction of varying mixtures of desoxyribonucleic acid (DNA) and original histon at 260 μ does not show an increase in proportion to the increase in the amount of histon added to the basic, constant DNA concentration, but is characterized by two points of inflexion. The composition of the DNA-histon mixture at the first of these points reveals the N/P quotient (3,7—3,9) characteristic of natural DNA-histons, i. e. a ratio of one basic N atom to 1,5 P atoms. The second point (N/P ratio 8,5—9,5) marks the limit of histon-binding capacity of the complex. Such recombinations of DNA and histon are only incompletely degraded enzymatically by desoxyribonuclease. The rate of degradation is inversely proportional to the histon concentration.

Bei der noch nicht geklärten Frage nach dem Aufbau nativer Desoxyribonucleoproteide (DNP) war es von Interesse festzustellen, ob Rekombinate von Desoxyribonucleinsäure (DNS) mit abgespaltenem Histon in ihrer Zusammensetzung Gesetzmäßigkeiten unterliegen. Untersuchungen an DNS-Protamin-Komplexen sind kürzlich von ALEXANDER¹, an DNS-

Histon-Addukten von CHARGAFF und Mitarbb² durchgeführt worden. Nach ALEXANDER verläuft die Bildung solcher Kombinate nicht nach stöchiometrischen Verhältnissen, sondern ist abhängig vom Verdünnungsgrad der Komponenten und führt zu Gebilden von wechselnder Zusammensetzung. Auf die Ähnlichkeit des Verhaltens der bei großer Verdün-

¹ P. ALEXANDER, Nature [London] 169, 226 [1952] sowie Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 10, 595 [1953].

² C. F. CRAMPTON, R. LIPSHITZ u. E. CHARGAFF, J. biol. Chemistry 206, 499 [1954]. Weitere Literatur in E. CHARGAFF u. J. N. DAVIDSON in „The Nucleic Acids“, Vol. I, Kap. X, S. 307 ff., Academic Press Inc., New York 1955.