

Ueber die Einwirkung von eiweissverdauenden Fermenten auf die Nucleinstoffe.

Von

Dr. med. P. M. Popoff,
Assistent des Herrn Prof. Sacharjin zu Moskau.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)
(Der Redaction zugegangen am 14. October 1893.)

Bei der Betrachtung der wichtigen Rolle, welche die Nucleinstoffe als Bestandtheile jugendlicher Gewebselemente spielen, drängt sich die Frage auf, ob die Nucleinsäure als solche dem thierischen Organismus zugeführt werden könne, oder ob in allen Fällen, wo neue Gewebe entstehen, diese organische Verbindung aus ihren Elementen aufgebaut werden müsse. Es knüpft sich hieran die praktische Frage, ob man durch Zufuhr dieser organischen Phosphorverbindung dem Organismus irgend welche Vortheile zu bieten vermag.

Der erste Schritt zur Lösung dieser Frage ist das Studium der Einwirkung von Verdauungsflüssigkeiten auf nucleinhaltige organische Theile; werden die organischen Phosphorverbindungen als solche gelöst, so dürfen wir annehmen, dass sie auch in unzersetztem Zustande resorbirt werden können.

Ich habe demgemäss auf Veranlassung von Herrn Prof. A. Kossel einige Untersuchungen über die Löslichkeit des Nucleins in verschiedenen Verdauungsflüssigkeiten angestellt.

Nach den früheren Beobachtungen sollte man annehmen, dass die Nucleinstoffe, welche mit der Nahrung eingeführt

werden, den verdauenden Mitteln einen energischen Widerstand entgegensetzen. Miescher entdeckte das Nuclein in dem Rückstand, welcher bei der Verdauung der Eiterkörperchen durch Pepsinsalzsäure ungelöst bleibt. In Folge dessen wurde die Resistenz der Nucleine gegen dieses Agens vielfach für die Darstellung dieser Substanzen benutzt, z. B. von Hoppe-Seyler, A. Kossel, Geoghegan, v. Jaksch, Lubavin. Da nun durch die neueren Untersuchungen erwiesen ist, dass die verschiedenen Nucleine in ihren Löslichkeitsverhältnissen nicht ganz übereinstimmen, so schien ein erneutes Studium dieser Körper zu Pepsinsalzsäure wünschenswerth. Besonders schien dies wünschenswerth wegen der neuen Gesichtspunkte, die durch die Entdeckung des eigenthümlichen Verhaltens der Nucleinsäure zu Eiweiss (Altmann) in die Chemie der Nucleinstoffe hineingetragen sind.

Ich habe meine Versuche zunächst mit diesen künstlich dargestellten Verbindungen von Nucleinsäuren mit Eiweiss angestellt, um zu ermitteln, ob die Nucleinsäure, wenn sie einem eiweisshaltigen Verdauungsgemisch hinzugefügt wird, als Nuclein in den Niederschlag hineingeht oder ob sie gelöst bleibt. Für diese Versuche diente ein aus Hefe dargestelltes eiweiss- und peptonfreies Nucleinsäurepräparat, welches ich von Herrn Prof. Kossel erhielt.

Es ergab sich Folgendes: wenn man zu einer Lösung von Acidalbumin Pepsinsalzsäure und zugleich Nucleinsäure in wässriger Lösung oder in festem Zustand hinzufügt und den entstehenden Niederschlag nach längerem oder kürzerem Verweilen im Brütöfen abfiltrirt, so befindet sich ein Theil der Nucleinsäure im Niederschlag, ein anderer Theil in Lösung. Der letztere wird als Eiweissverbindung niederschlagen, wenn man die Lösung neutralisirt.

Von grösserer Wichtigkeit als die Versuche mit künstlichen Gemischen sind diejenigen mit nucleinreichen Geweben des Thierkörpers. Ich wählte als Untersuchungsobject die Thymusdrüse, da diese in histologischer Hinsicht als ein mit kernreichen Zellen vollgepfropftes Organ, in chemischer Beziehung als ein nucleinreiches Gewebe betrachtet werden muss.

Wie verhalten sich diese Nucleinstoffe gegenüber den Verdauungsfermenten? Werden sie gelöst und resorbirt und verlassen sie als unlösliche und für den Stoffwechsel unnütze Stoffe den Darmkanal?

Es war für die Entscheidung dieser Fragen wichtig, sowohl die Pepsin- wie die Pankreasverdauung bezüglich ihrer Einwirkung auf das Drüsengewebe zu prüfen. —

I.

Eine Thymusdrüse des Kalbes wurde fein zerhackt und in drei ungleiche Theile getheilt.

1. Der erste Theil, bestehend aus $\frac{3}{5}$ des Gewichts der ganzen Masse, wurde mit Pepsinsalzsäure eine Stunde der Verdauung unterworfen, filtrirt und sowohl im Filtrat wie im Rückstand die Phosphorsäure nach dem Veraschen mit Soda und Salpeter bestimmt. Der Rückstand mit Alkohol und Aether extrahirt enthielt 2,56% P (bezogen auf die bei 100 getrocknete Substanz); da das Gewicht des Rückstandes 35,5 gr. betrug, so waren in demselben 0,89 gr. P enthalten. Das Filtrat enthielt im Ganzen 0,243 gr. P. Es war also nicht viel mehr als der vierte Theil des Phosphors der Thymusdrüse in Lösung gegangen.

2. Der zweite Theil, bestehend aus $\frac{1}{5}$ des Gewichts der Thymusdrüse, wurde nach zweistündiger Verdauung in gleicher Weise untersucht. Der Procentgehalt des ungelösten Theils an Phosphor betrug 2,66; es war also durch die fortgesetzte Verdauung der Nuclein- resp. Nucleinsäuregehalt des Rückstandes ein grösserer geworden. Die Gesamtmenge des im Rückstand (6,406 gr. trocken) enthaltenen Phosphors betrug 0,177 gr.

3. Der dritte Theil (ebenfalls $\frac{1}{5}$ der ganzen Drüse) wurde vier Stunden mit Pepsinsalzsäure digerirt. Der Procentgehalt des ungelösten Theils an Phosphor war wiederum gestiegen, er betrug in diesem Falle 2,9; somit war dieser Rückstand durch die fortgesetzte Verdauung noch weiterhin von solchen Stoffen befreit worden, welche keinen oder wenig

Phosphor enthalten; der Nucleïngehalt war also relativ grösser geworden. Die Menge des im Rückstand vorhandenen Phosphors betrug 0,13 gr.

Der erste Verdauungsversuch ergibt, dass etwa der vierte Theil des gesammten Phosphors durch einstündige Verdauung in Lösung gebracht war. Es war für unsere Fragestellung wichtig, zu wissen, wie viel von diesem in Lösung befindlichen Phosphor in Form von Nucleïn resp. Nucleïnsäure und wie viel in Form anderer Verbindungen, z. B. phosphorsaurer Salze, vorhanden sei. Um dies zu erfahren, versuchte ich in den Verdauungslösungen von 2 und 3 eine Bestimmung der Nucleïnphosphorsäure auszuführen. Eine genau gemessene Menge des Filtrates (200 cbem.) wurde mit Gerbsäure versetzt, um die Nucleïne niederzuschlagen, der Niederschlag möglichst sorgfältig ausgewaschen, mit Soda und Salpeter verascht und zur Phosphorbestimmung verarbeitet. Es ergab sich in beiden Fällen 0,002 Phosphor in Form der Nucleïnphosphorsäure. Wenn auch die angewandte Methode für die Bestimmung des Nucleïns durch Fällung mit Gerbsäure und durch Ermittlung des P-Gehaltes im Gerbsäure-Niederschlag in diesem Fall keinen Anspruch auf grosse Genauigkeit machen kann, so ist doch mit Sicherheit festgestellt, dass in diesen Versuchen ein sehr geringer Theil der in den Organen enthaltenen Nucleïnstoffe als solche in Lösung gehen.

Zu ähnlichen Resultaten führte ein zweiter Versuch mit dem Gewebe der Thymusdrüse. Auch hier waren trotz mehrstündiger Pepsinverdauung nur sehr geringe Mengen von Nucleïn in den Lösungen nachweisbar. Ich fällte grosse Mengen der salzsauren filtrirten Verdauungslösung, welche längere Zeit mit Thymusgewebe digerirt war, durch Gerbsäure aus, konnte aber nicht mehr als Spuren von Nucleïn nachweisen, indem ich den Gerbsäure-Niederschlag veraschte. Auch die Prüfung dieses Niederschlages auf Nucleïnbasen ergab ein negatives Resultat. Meine Versuche über die Einwirkung des Pepsins auf die Nucleïnstoffe stimmen also vollkommen mit den Beobachtungen früherer Forscher (s. auch Bokay¹⁾) überein.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. I, S. 157.

II.

Zu völlig anderen Resultaten führten nun die Verdauungsversuche mit Pankreasextract. Auch bei diesen Untersuchungen richtete sich mein Augenmerk auf die Entscheidung der Fragen: 1. Ob überhaupt Nucleinstoffe durch Pankreasextract in Lösung übergeführt werden und 2. ob dieselben in unzersetztem Zustand in der Lösung nachweisbar sind.

Versuchsreihe A.

Für diese Versuchsreihe diente eine Thymusdrüse, welche 24,4% Trockengewicht und 0,616% P (auf wasserhaltiges Gewebe berechnet) enthielt. Das benutzte Pankreasextract enthielt 2,17% Trockenrückstand, 100 ccm. des Extract enthielten 0,063 gr. P. Auch in dieser Versuchsreihe wurden Versuche mit einstündiger (1), zweistündiger (2) und vierstündiger (3) Verdauung angestellt.

1. 100 gr. fein zerhacktes Thymusgewebe werden bei schwach alkalischer Reaction mit 500 ccm. Pankreasextract unter Zusatz von Thymol eine Stunde im Brütoven digerirt, sodann filtrirt; sobald 30 ccm. des Filtrates abgelaufen sind, werden diese eingedampft, der Rückstand getrocknet, gewogen und zur Phosphorbestimmung mit Soda und Salpeter veraschert. Dieselben ergaben 1,253 gr. feste Bestandtheile, darin 0,036 gr. P. Somit befanden sich in der ganzen Lösung 0,60 gr. P., von denen 0,315 gr. auf den Phosphorgehalt der angewandten Pankreasflüssigkeit zu beziehen sind. Von den in 100 gr. Thymusdrüsen enthaltenen 0,616 gr. P. sind also nach einstündiger Pankreasverdauung bereits 0,285 gr., d. h. fast die Hälfte in Lösung übergeführt. In dieser Lösung ist der Phosphor zum grossen Theil als unveränderte Nucleinphosphorsäure enthalten. Das wird durch folgende Versuche bewiesen.

400 ccm. des Filtrates werden mit Gerbsäure ausgefällt, der Niederschlag wog getrocknet 28,821 gr. Ein Theil des Niederschlags (26,821 gr.) wurde durch Kochen mit Schwefelsäure zerlegt und auf Nucleinbasen verarbeitet, ich erhielt 0,294 gr. einer Mischung von Adenin und Hypoxanthin. Ein

kleiner Theil (2 gr.) des Niederschlages ergab bei der Phosphorbestimmung 0,012 gr. P. Es war somit unzersetzte Nucleinphosphorsäure in der verdauten Lösung nachgewiesen.

2. Nach zweistündiger Verdauung im Brütöfen war die Menge der in Lösung befindlichen Phosphorsäure fast die gleiche, ebenso konnte aus 400 cbem. der Lösung 33,961 gr. eines Gerbsäureniederschlages gewonnen werden. Ein Theil (31,961 gr.) dieses Niederschlages gab 0,229 Mischung von Adenin und Hypoxanthin, ein anderer Theil (2 gr.) gab 0,0108 gr. P. Man hätte erwarten sollen, dass die Menge der in Lösung befindlichen Nucleinstoffe nach zweistündiger Verdauung grösser sei, während sie in diesen Versuchen sich als geringer erweist. Es ist dies ein Versuchsfehler, den ich bisher nicht vermeiden konnte. Die Filtration der Lösungen ist eine langsame, während derselben schreitet die Verdauung fort, somit ist die Angabe der Verdauungszeit bei diesen Versuchen eine illusorische.

Versuchsreihe B.

Man könnte der Versuchsreihe A den Vorwurf machen, dass in der Pankreasflüssigkeit Nuclein vorhanden sei und dass die gefundene Nucleinsäure von diesem herrühre. Ich stellte daher eine zweite Versuchsreihe mit einer Lösung von Pankreatin an, bei welcher dieser Einwand ausgeschlossen war. Ich benutzte Pankreatin von Witte, dessen Lösung (1:1000) nach dem Veraschen nur unwägbare Spuren von Phosphorsäure gab. Die zu diesen Versuchen benutzte Thymusdrüse enthielt 0,62% P (auf feuchtes Gewebe bezogen) und 24,64% Trockensubstanz. Die Versuche wurden ebenso wie in Versuchsreihe A Angestellt:

1. Nach einstündiger Verdauung im Brütöfen enthielt das Filtrat 0,20 gr. P, also etwa ein Drittel des gesammten in der Drüse vorhandenen Phosphors. Die Gesammtmenge des durch Gerbsäure fällbaren Niederschlages betrug 30 gr., die Menge des in dem Gerbsäure-Niederschlag enthaltenen Phosphors 0,10964 gr. Somit war die Hälfte des in Lösung befindlichen Phosphors nachweisbar in dem Nuclein enthalten.

2 Nach zweistündiger Verdauung betrug die Menge des im Filtrat vorhandenen Phosphors 0,25 gr., davon entfallen 0,13 gr. auf Nucleinsäure. An Nucleinbasen wurden aus dem Gerbsäure-Niederschlag 0,098 gr. erhalten.

Wir müssen aus diesen Versuchen schliessen, dass die Lösung der Nucleinstoffe nur in sehr geringer Menge im Magen, in beträchtlicher Masse hingegen im Darm durch die Einwirkung des Pankreassaftes erfolgt. Hierbei werden die Nucleinstoffe als solche in Lösung übergeführt, es ist also anzunehmen, dass sie auch als solche resorbirt werden. Ueber die Intensität dieser Resorption können natürlich die vorliegenden Versuche keinen Aufschluss geben, die Aufklärung dieser Frage muss vielmehr den Stoffwechsel-Versuchen vorbehalten bleiben, welche zur Zeit im hiesigen Laboratorium ausgeführt werden¹⁾. In gleicher Richtung wie die Trypsin-Verdauung dürfte auch die Darmfäulniss auf die Nucleinstoffe einwirken. Wir dürfen annehmen, dass die verschiedenartigen Nucleine unter dem Einfluss der Vorgänge im Darmkanal auch ein verschiedenes Verhalten zeigen. In zarten jugendlichen Geweben wird die Auflösung der Nucleine eine fast vollständige sein, in derberen älteren Producten hingegen widersteht ein Theil dieser Stoffe bekanntlich hartnäckig der Einwirkung alkalischer Lösungsmittel und es ist ferner bekannt, dass die Fäces bedeutende Mengen dieser phosphorhaltigen Producte enthalten. Jedenfalls müssen wir aber aus unseren Versuchen den Schluss ziehen, dass diese wichtigen phosphorhaltigen Baustoffe den resorbirenden Apparaten des Organismus in gelöster Form dargeboten werden und dass alle Bedingungen zu einer Resorption unzersetzter Nucleine gegeben sind.

Zum Schluss sage ich Herrn Prof. A. Kössel meinen wärmsten Dank für seine jederzeit bewiesene liebenswürdige Förderung und Unterstützung. Ebenso danke ich seinem Assistenten Herrn Dr. Krüger.

¹⁾ Siehe diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 508.