

Über enzymatische Zersetzung der Nucleinsäure.

Von
T. Araki.

(Aus dem physiologischen Institut zu Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 23. März 1903.)

Man kennt eine Reihe physiologischer und pathologischer Bedingungen, die zur Auflösung der Substanz des Zellkerns führen. Eine solche Lösung findet in weitestem Umfang bei der Resorption tierischer Gewebe statt, auch nucleinreiche Zellen oder Zellprodukte wie die männlichen Geschlechtsprodukte können unter normalen Verhältnissen der Auflösung anheimfallen, wie dies von Barfurth¹⁾ an den Testikeln der Bachforelle deutlich gezeigt wurde. Die Lösung der Kerne ist nicht an den Zerfall der ganzen Zelle gebunden, sondern sie kann auch innerhalb des unverändert bleibenden Cytoplasmas erfolgen, wie z. B. bei den Paramäcien während oder nach der Konjugation ein Verschwinden des Hauptkerns, zum Teil auch der Nebenkerne, im Cytoplasma zu beobachten ist. Man wird bei der Betrachtung dieser Vorgänge ohne weiteres zu der Auffassung gedrängt, daß hier ein Enzym im Protoplasma zur Wirkung kommt, welches die Kernsubstanz in ähnlicher Weise löst, wie die peptischen Enzyme das Eiweiß.

Es sind auch in der Tat Vorgänge bekannt, welche die Existenz eines solchen Enzyms beweisen. Eine in dieser Richtung besonders wichtige Beobachtung wurde von Schützenberger²⁾ gemacht. Im Anschluß an ältere Versuche von Béchamp untersuchte dieser Forscher die Produkte, welche sich bilden, wenn Hefezellen in Wasser aufgeschwemmt sich

1) Archiv f. mikr. Anatom., Bd. 27, S. 160.

2) Gährungschemie, 1876. Compt. rend. des séances de l'Académie des sciences, Bd. 78 (1874), S. 493.

selbst überlassen werden. Er fand, daß hierbei eine chemische Zertrümmerung der Zellsubstanz unter Bildung von Leucin, Tyrosin, Guanin, Hypoxanthin und Xanthin stattfindet. Zugleich wird die Reaktion der Lösung durch Phosphorsäure stark sauer.

Béchamp und Schützenberger führten diese Versuche zum Teil in der Weise aus, daß sie nicht anders als durch die Wirkung eines vom Leben der Hefezelle abtrennbaren Enzyms erklärt werden konnten. Sie erhielten diese Umsetzungen nämlich auch dann, wenn sie die Hefe mit kreosot-haltigem Wasser ansetzten, wobei die Hefezellen abgetötet werden.

Daß bei diesen Vorgängen eine Zersetzung von Nuclein stattgefunden haben muß, wurde zuerst von A. Kossel¹⁾ dadurch erwiesen, daß er die Nucleinstoffe als Muttersubstanzen des aus den Hefezellen gebildeten Guanins, Hypoxanthins und Xanthins charakterisierte. Somit war schon durch diese Versuche festgestellt, daß eine enzymatische Zersetzung des Nucleins stattfindet. Bei Versuchen, welche ohne besonderen Zusatz eines Abtötungsmittels angestellt wurden, bestätigte A. Kossel, daß die Selbstgärung zu einer übrigens nicht sehr weitgehenden Abspaltung von Phosphorsäure aus den Nucleinstoffen führt, während doch die Abspaltung der Nucleinbasen eine sehr beträchtliche sein muß. Nach Victor Lehmann²⁾ findet hierbei auch eine teilweise Oxydation dieser Basen statt.

Salkowski³⁾ legte besonderen Wert darauf, bei diesen Versuchen ein Mittel hinzuzufügen, welches nicht allein die Fäulnis ausschließt, sondern auch die Hefezelle abtötet, und bediente sich hierzu des Chloroforms in ähnlicher Weise, wie Schützenberger das Kreosot angewandt hatte. Übrigens ist die Bakterienwirkung auch bei der Selbstgärung ohne Zusatz eines Antiseptikums durch die bei saurer Reaktion stark fäulnishemmende Nucleinsäure ausgeschlossen. Salkowski's⁴⁾ Versuche führten zu den gleichen Resultaten, wie

1) Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 294.

2) Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 563.

3) Zeitschr. f. klinische Medizin, Bd. 17, Suppl. S. 1.

4) a. a. O.

die Schützenbergers, nämlich Abspaltung der Nucleinbasen. Hahn und Geret¹⁾ führten Beobachtungen am Hefepreßsaft aus, welche deutlich demonstrierten, daß das nucleinsäure-spaltende Enzym auch in gelöstem Zustande existiert.

Ebenso wie Salkowski beobachteten auch diese Forscher, daß die Nucleinbasen bei der Autodigestion nicht allein in Lösung gehen, sondern daß sie auch in der Lösung eine langsame Umwandlung erfahren. Sie sind in der Lösung anfangs nicht direkt durch ammoniakalische Silberlösung fällbar, sondern gehen erst allmählich aus der löslichen nicht fällbaren (latenten) in die fällbare (manifeste) Form über. Mit Recht hatte Salkowski aus seinen Versuchen auf eine enzymatische Zersetzung der Nucleinsäure unter Abspaltung der Nucleinbasen geschlossen, doch ist die Zersetzung der Nucleinsäure nicht aus der löslichen «latenten», sondern erst aus der «manifesten» Form der Basen zu schließen. Denn die latente Form kann auch aufgefaßt werden als Lösung der Nucleinsäure, welche die Basen noch in organisch gebundener Form enthält.²⁾

Zu ähnlichen Resultaten führten auch Versuche über die «Autodigestion» tierischer Organe, welche von Salkowski,³⁾ Schwiening,⁴⁾ Biondi,⁵⁾ Kutscher⁶⁾, Fr. Müller⁷⁾ u. a. angestellt wurden. Auch hier ergaben sich eine Reihe von

1) Zeitschrift f. Biologie, Bd. 40, S. 117.

2) Übrigens kann das «Manifestwerden» der Nucleinbasen auch noch in anderer Weise aus einer Zersetzung gelöster Nucleinstoffe erklärt werden. Es ist schon seit längerer Zeit durch die Untersuchungen von Kossel und Neumann (diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 81) bekannt, daß nicht nur die Nucleinsäure selbst, sondern auch ihr Zersetzungsprodukt, die Thyminsäure, imstande ist, die Ausfällung nicht gebundener Nucleinbasen zu verhüten. Wird die in Lösung befindliche Nucleinsäure zerstört, so müssen mithin die Basen «manifest» werden.

3) a. a. O.

4) Virchows Archiv, Bd. 136, S. 444.

5) Virchows Archiv, Bd. 144, S. 373.

6) Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 66 u. Bd. XXXIV, S. 116.

7) Verhandlungen d. naturforschenden Gesellsch. in Basel, Bd. XIII, S. 308 (1904).

Tatsachen, welche auf die Entstehung eines nucleinsäurelösenden Fermentes in tierischen Organen hinweisen.

Ich möchte hier noch erwähnen, daß Emmerich und Loew¹⁾ das Vorkommen von Enzymen in pathogenen Bakterien nachgewiesen haben, welche die Nucleoproteide sowohl der eigenen als auch anderer Bakterienspezies aufzulösen imstande sind. Diese Forscher unterscheiden hiernach «konforme» und «heteroforme» Nucleasen.

Von besonderem Interesse für unsere Fragen sind die Versuche von F. Kutscher an Thymusextrakt.²⁾ Kutscher digerierte Thymusextrakt unter Zusatz von Chloroform bei 38° und erhielt unter anderem eine Substanz, die nach den Untersuchungen von A. Kossel und A. Neumann als Zersetzungsprodukt der Nucleinsäure betrachtet werden muß, nämlich das Thymin. Die Stickstoffbestimmung dieses Präparats führte den Verfasser jedoch zu der Vermutung, daß dem Thymin noch ein weiteres Zersetzungsprodukt der Nucleinsäure, nämlich das Uracil, beigemischt sei. Auch diese Versuche weisen auf eine tiefgreifende enzymatische Zersetzung der Nucleinsäure hin.

Indem ich diese Versuche nun im hiesigen physiologischen Institut in Angriff genommen habe, glaubte ich zwischen zwei verschiedenartigen Vorgängen scharf unterscheiden zu müssen:

1. Lösung der Nucleinstoffe,
2. hydrolytische Spaltung der gelösten Nucleinstoffe.

Die ersten Versuche, welche ich ausführte, sollten überhaupt die Frage entscheiden, ob in den Geweben ein Enzym vorhanden ist, welches imstande ist, die Nucleinstoffe in ähnlicher Weise in Lösung überzuführen, wie das Pepsin die Eiweißkörper ohne völlige Spaltung in Lösung bringt. Daß ein derartiger Vorgang bei den Nucleinstoffen überhaupt stattfindet, wurde schon im Jahre 1894 durch die unter A. Kossels Leitung angestellten Versuche von Popoff³⁾ er-

1) Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 36, S. 9.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXXIV, S. 116.

3) Diese Zeitschr., 1894, Bd. XVIII, S. 533.

wiesen. Dieser letzte Forscher zeigte, daß das Trypsin die Nucleinstoffe der Thymusdrüse wohl in Lösung überführt, daß aber in der Lösung keine oder wenigstens keine schnelle Zersetzung der Nucleinstoffe stattfindet.

Weitere Versuche wurden sodann im Jahre 1896 von Milroy¹⁾ in A. Kossels Laboratorium angestellt. Milroy zeigte, daß das Nuclein der Thymusdrüse, ferner die Kernsubstanz aus den roten Blutkörperchen des Vogelbluts sowie das nach Hammarstens Vorschrift dargestellte Nucleoproteid der Pankreasdrüse sowohl durch Pepsin, wie durch Trypsin in Lösung übergeführt werden. Besonders leicht erfolgt die Lösung des Pankreas-Nucleoproteids durch Pepsin. In allen diesen Fällen ist in der Verdauungsflüssigkeit eine sehr reichliche Menge organisch gebundener Phosphorsäure nachzuweisen.

Zu den ähnlichen Resultaten gelangte einige Jahre später (1904) auch Umber²⁾ bei seinen Untersuchungen über die Lösung des Pankreas-Nucleoproteids durch Pepsin und Trypsin. —

Ich benutzte zu meinen ersten orientierenden Versuchen die aus den roten Blutkörperchen des Vogelblutes gewonnene Kernsubstanz, welche bekanntlich in Wasser unlöslich ist.

Wirkung einiger Enzyme auf die Kernsubstanz aus den roten Blutkörperchen des Vogelbluts.

Die Kernsubstanz habe ich aus dem Blut von einem Hahn dargestellt, indem ich die in bekannter Weise mit Hilfe einer verdünnten Natriumsulfatlösung isolierten Blutkörperchen in Wasser unter Zusatz von Äther löste und die ungelöst bleibende Kernsubstanz mit Wasser bis zur möglichst vollständigen Entfärbung auswusch.

Für den Versuch mit Trypsin bediente ich mich eines von E. Merck bezogenen Präparates, welches sich bei der Fibrinverdauung als sehr wirksam erwiesen hatte.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 307.

²⁾ Zeitschr. f. klinische Medizin, Bd. 43.

Zur Darstellung des Thymusextrakts wurden reine Thymusdrüsen fein zerhackt, gründlich mit Sand verrieben, mit dem doppelten Volumen Wasser durchgerührt und verschlossen 24 Stunden bei Zimmertemperatur unter Zusatz von Toluöl stehen gelassen. Das Extrakt wurde zunächst ausgepresst und die ausgepresste rötliche Flüssigkeit dann durch Filtrierpapier abfiltriert.

Versuch A.

20 g feucht gewogene Kernsubstanz wurde mit 2 g Trypsin und 20 cem 0,5 %iger Sodalösung unter Zusatz von Toluol im Brütöfen digeriert, dessen Temperatur meist 37 ° betrug. Nach 24-stündiger Digestion war die Kernsubstanz bis auf einen kleinen Rest gelöst, der zwischen Toluolschicht und wässriger Lösung schwamm.

Versuch B.

23 g feuchte Kernsubstanz wurden mit 20 cem Thymusextrakt, dessen Phosphorgehalt 0,11 % betrug, und 10 cem 0,5 %iger Sodalösung versetzt und in gleicher Weise behandelt, wie bei Versuch A. Nach 6-tägiger Digestion wurde die ungelöste Masse abfiltriert und 10 cem des Filtrats zur Phosphorbestimmung verwendet; es wurden gefunden: 0,020 g P. Somit befanden sich in dem ganzen 31 cem betragenden Filtrat 0,062 g P, von denen 0,022 g auf den Phosphorgehalt des zugefügten Thymusextrakts zu beziehen sind. Es sind also aus der Kernsubstanz bei 6-tägiger Digestion mit Thymusextrakt 0,040 g P abgespalten.

Versuch C (Kontrollversuch).

28 g Kernsubstanz wurden mit 30 cem 0,5 %iger Sodalösung versetzt und bei Gegenwart von Toluol im Brütöfen digeriert. Nach 6-tägiger Digestion war die Kernsubstanz stark aufgequollen, aber es zeigte sich keine sonstige Veränderung; auch ließ sich im Filtrat von der Kernsubstanz keine Spur vom Phosphor nachweisen.

Aus den obigen Versuchen geht mit Sicherheit hervor.

daß die Kernsubstanz aus den roten Blutkörperchen des Vogelbluts durch das Trypsin ziemlich schnell gelöst wird, daß aber auch in dem Thymusextrakt ein Enzym vorhanden ist, welches den Zellkern langsam aufzulösen vermag.

Enzymatische Lösung der Thymusnucleinsäure.

Im Jahre 1893 teilte A. Kossel¹⁾ die prinzipiell wichtige Tatsache mit, daß aus der Thymusdrüse zwei Formen der Nucleinsäure erhalten werden können. A. Kossel und A. Neumann hatten nämlich bei ihren Untersuchungen über die Thymusnucleinsäuren beobachtet, daß die eine dieser Nucleinsäuren schwerer löslich ist und daß ihre Alkalisalze beim Erkalten der wässerigen Lösung eine gelatinierende Masse bilden. Einige Jahre später machte A. Neumann²⁾ weitere Angaben über diese Säuren, die er als a- und b-Nucleinsäuren bezeichnete, und stellte fest, daß die gelatinierende a-Säure durch die Einwirkung von Alkalien in der Wärme in die nicht gelatinierende b-Säure übergeht.

Wenn die Thymusnucleinsäure durch Enzym in ähnlicher Weise angegriffen wird, wie die Kernsubstanz aus den roten Blutkörperchen, so muß sich dies zunächst durch die Umwandlung der gelatinierenden in die nicht gelatinierende Form, durch eine Verflüssigung der gelatinösen Masse zu erkennen geben. Die oben erwähnten Versuche Popoffs scheinen schon darauf hinzudeuten, daß ein solcher Übergang aus einer schwer löslichen Form der Thymusnucleinsäure in eine leichter lösliche stattfindet, sie sind jedoch nicht völlig beweisend, auch nicht in Bezug auf den Ursprung des diese Umwandlung bewirkenden Enzyms. Denn nachdem Kutscher die Zersetzungsprodukte der Nucleinsäure in der Lösung des autolysierten Thymusextrakts gefunden hat, könnte man daran denken, daß auch die von Popoff beobachtete Einwirkung nicht ganz auf das Pankreas-

1) Archiv f. Physiol. u. Anatomie, physiol. Abt., 1894, S. 195.

2) Archiv f. Physiol. u. Anatomie, physiol. Abt., 1898, S. 374 und 1899, Supplbd., S. 552.

trypsin, sondern mindestens zum Teil auf das in dem Thymusgewebe gebildete Enzym zu beziehen sei.

Meine Versuche wurden mit α -Nucleinsäure aus Thymusgewebe angestellt, welche nach dem Verfahren von Neumann¹⁾ gewonnen war. In den meisten Fällen verwendete ich das Natriumsalz.

A. Einwirkung des Trypsins auf α -Nucleinsäure.

Die ersten 3 Versuche wurden angestellt mit Rücksicht auf die Frage, welches die für die Enzymwirkung günstigste Reaktion ist.

Probe a. Für diesen Versuch benutzte ich 2 Kubikzentimeter einer gelatinierten Lösung von α -nucleinsaurem Natron, welche eine solche Konsistenz hatte, daß das Reagensglas umgekehrt werden konnte, ohne daß etwas ausfloß. Ich fügte 2 ccm essigsäurehaltigen Wassers hinzu, in welchem 0,2 g Trypsin gelöst war. Die Masse wurde im Brütoven unter Zusatz von Toluol digeriert und durch Schütteln gut gemischt. Auch nach 96 Stunden war keine Verflüssigung der Gallerte zu beobachten.

Probe b. 2 ccm der gleichen Gallerte von α -nucleinsaurem Natron wurden mit 0,2 g Trypsin ohne Säurezusatz am gleichen Tage wie Probe a angesetzt, mit Toluol unter zeitweisem Schütteln im Brütoven digeriert. Nach 48 Stunden war die Masse dickflüssig. Nach 72 Stunden völlige Verflüssigung.

Probe c. Wie in den vorhergehenden Versuchen 2 ccm Gallerte des nucleinsauren Natrons, 0,2 g Trypsin, jedoch diesmal unter Zusatz von 2 ccm 0,5% iger Sodalösung. Der Beginn der Verflüssigung war hier nach 48 Stunden zu beobachten. Nach 72 Stunden fast vollständige Verflüssigung, einen Tag später war alles verflüssigt.

Diese Versuche wurden nun noch vielfach mit gleichem Resultate wiederholt. Ich verzichte auf die Beschreibung der einzelnen Versuche und bemerke nur, daß stets nach 48 Stunden

1) a. a. O.

der Beginn der Einwirkung zu beobachten war, daß die Verflüssigung nach 4—6 Tagen vollendet war und daß die Lösung alle Reaktionen der b-Nucleinsäure zeigte: die Lösung war fällbar durch Salzsäure, gab mit Wittepepton in saurer Lösung einen weißen Niederschlag und wurde durch Gerbsäure bei Gegenwart von Natriumacetat gefällt.

An diese Versuche knüpft sich die Frage, ob die Wirkung des Trypsins bei der Überführung der a-Nucleinsäure in die b-Form stehen bleibt. Hierüber kann eine Entscheidung in doppelter Weise getroffen werden, entweder durch den Nachweis der Abspaltung von Nucleinbasen oder von Phosphorsäure. Zunächst versuchte ich in den durch das Trypsin verflüssigten Massen¹⁾ den Nachweis des Adenins: Ich fällte die Flüssigkeit mit verdünnter Schwefelsäure, solange ein Niederschlag entstand, aber unter Vermeidung großen Überschusses, filtrierte, setzte zu dem Filtrat kalt gesättigtes Barytwasser bis zur schwach alkalischen Reaktion hinzu und ließ bis zum nächsten Tage stehen. Der Niederschlag wurde jetzt abfiltriert, in geringem Überschuß heißer Schwefelsäure gelöst und wieder filtriert. Die filtrierte und eingeeengte Lösung, aus der sich kein Guaninsulfat abgeschieden hatte, wurde in die 1¹/₂-fache Menge Alkohol hineingegossen und bis zum nächsten Tage stehen gelassen. Hierbei entstand ein spärlicher Niederschlag, der keine Ähnlichkeit mit dem thyminsauren Baryt hatte. Ich filtrierte die Lösung durch ein Faltenfilter, engte sie ein, fällte zunächst den Baryt durch Schwefelsäure, filtrierte wieder und versetzte das Filtrat mit einer ammoniakalischen Silberlösung.

Der nach diesem Verfahren erhaltene Niederschlag war ganz außerordentlich spärlich und konnte nicht zur Identifizierung des Adenins dienen. Die Menge der bei 4 tägiger Digestion abgespaltenen Nucleinbasen konnte also nur eine sehr geringe sein.

1) Eine Gallerte, welche aus 2 g a-nucleinsaurem Natron und 20 cem Wasser bestand, wurde mit 2 g Trypsin und 20 cem Wasser durchgemischt und bei Gegenwart von Toluol im Brütöfen stehen gelassen. Die vollständige Verflüssigung erfolgte erst nach 4 tägiger Digestion.

Zu dem gleichen Ergebnis führte der folgende Versuch, bei welchem die Abspaltung von Phosphorsäure festgestellt werden sollte.

Eine Gallerte, welche mit 2 g a-nucleinsauren Natrons und 20 ccm Wasser bereitet war, wurde mit 2 g Trypsin und 20 ccm Wasser durchgemischt und unter Zusatz von Toluol im Brüt-ofen digeriert. Nach 4tägiger Digestion war die gelatinöse Masse vollständig verflüssigt. Zur Ausfällung der b-Nucleinsäure wurde sie jetzt mit dem gleichen Volumen Wasser und 1 g Natriumacetat versetzt und sodann Gerbsäure¹⁾ hinzugefügt, solange noch die Entstehung eines Niederschlags zu beobachten war. Die von der voluminösen Fällung abfiltrierte Flüssigkeit, welche die aus Nucleinsäure abgespaltene Phosphorsäure enthalten mußte, wurde eingedampft und zur Phosphorbestimmung mit Soda und Salpeter verascht; es wurden gefunden: 0,003 g P.

Somit war festgestellt, daß auch die Abspaltung von Phosphorsäure nur einen sehr geringen Umfang erreicht haben konnte.

Alle Versuche zeigen übereinstimmend, daß die Thymus-nucleinsäure, die Säure a, durch 4- bis 6tägige Trypsindigestion bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion in eine leichter lösliche Verbindung, nämlich b-Nucleinsäure übergeführt wird.

Somit ist der Beweis dafür erbracht, daß das Trypsin spaltend auf die Säure a einwirkt, und daß bei dieser Spaltung die Säure b resp. Nucleothyminsäure als Zwischenprodukte auftreten, welche nur bei lang dauernder Trypsindigestion in grösserem Maßstabe weiter zerlegt werden.

B. Versuche mit Thymusextrakt.

Das zu diesen Versuchen benutzte Thymusextrakt war in der oben beschriebenen Weise gewonnen.

Versuch I.

Eine Gallerte, welche aus 0,5 g a-nucleinsauren Natrons

¹⁾ Thymusnucleinsäuren werden durch Gerbsäure allein nicht ausgefällt, wohl aber bei Gegenwart von Natriumacetat.

und 5 ccm Wasser bestand, wurde mit 5 ccm Thymusextrakt durchgemischt und unter Zusatz von Toluol und Chloroform im Brütöfen digeriert: die erste Veränderung der gut durchgeschüttelten Masse war nach 48 Stunden bemerkbar. Nach 72 Stunden war ein Teil verflüssigt, so daß in der flüssigen Masse klumpige Reste des gallertigen Produkts herumschwammen. Nach 144 Stunden war die Lösung der Klumpen vollendet.

Der Versuch wurde mit gleichem Erfolg wiederholt.

Die gleiche Einwirkung des Thymusenzym zeigt sich auch in Bezug auf die noch in der Thymus enthaltene α -Nucleinsäure.

Versuch II.

Der folgende Versuch wurde in der Weise angestellt, daß frische Thymusdrüsen zerhackt und in zwei ungleiche Portionen A und B geteilt wurden.

Portion A bestand aus 50 g feuchten Gewebes; sie wurde mit dem doppelten Volumen Wasser versetzt und unter Zusatz von Toluol und Chloroform im Brütöfen stehen gelassen. Nach 6tägiger Digestion wurde die digerierte Masse in der Weise verarbeitet, daß man die gelatinierende Säure hätte erhalten müssen. Ich erhielt 0,7 g Natriumsalz, welches aber selbst in 5% iger Lösung keine gelatinöse Erstarrung zeigte, welches aber im übrigen die Reaktion der Nucleinsäure darbot.

Portion B wurde ohne vorherige Digestion auf α -Säure verarbeitet. 32 g dieser Portion lieferten 0,88 g Natriumsalz, welches aus α -Nucleinsäure bestand.

Versuch III.

Dieser Versuch wurde in der gleichen Weise angestellt wie Versuch II. 306 g Thymusgewebe lieferten nach 8tägiger Digestion 4,02 g β -Nucleinsäure oder Gemenge von derselben und Nucleothyminsäure, während die zweite ohne vorherige Autolyse verarbeitete Portion, deren Gewicht 100 g betrug, 2,29 g der α -Säure ergab. Im ersteren Falle betrug die Ausbeute 1,3% , im zweiten Falle fast 2,3% des feuchten Gewebes.

Wir sind hiernach zu der Annahme berechtigt

daß der Thymusauszug ein Enzym enthält, welches die Fähigkeit besitzt, die a-Nucleinsäure in die b-Säure umzuwandeln und bei lange fortgesetzter Digestion die letztere weiter zu zerlegen.

C. Versuche mit dem Erepsin.

O. Cohnheim¹⁾ hat aus der Schleimhaut des Dünndarms vom Hunde und von der Katze ein Enzym dargestellt, welches Pepton in abiurete Spaltungsprodukte zu zerlegen vermag. Dieses von O. Cohnheim als Erepsin bezeichnete Enzym unterscheidet sich hinsichtlich seiner Wirkung auf die ursprünglichen Eiweißkörper bekanntlich vom Trypsin. Es erschien nun von Interesse, zu prüfen, wie sich das Erepsin gegen Thymusnucleinsäure verhält. Durch die Freundlichkeit des Herrn Dr. Cohnheim bin ich in den Besitz einer alkalischen Lösung von Erepsin gelangt, wofür ich ihm meinen besten Dank ausspreche.

Versuch I.

Eine Gallerte, welche aus 0,5 g a-sauren Natrons und 5 cem Wasser bestand, wurde mit 5 cem Erepsinlösung durchgemischt und unter Zusatz von Toluol und Chloroform im Brütoven digeriert. Nach 48 Stunden war ein Teil der Gallerte verflüssigt, nach 72 Stunden war die Lösung eine vollständige. Die verflüssigte Masse gab alle Reaktionen von Nucleinsäure.

Versuch II.

Ebenso wie bei dem Thymusgewebe läßt sich an der Darmschleimhaut der Einfluß der darin enthaltenen Enzyme auf die Nucleinsäure des Gewebes selbst nachweisen. Nachdem ich mich davon überzeugt hatte, daß die Darmschleimhaut eine Nucleinsäure enthält, welche in ihren Eigenschaften große Ähnlichkeit mit der a-Säure des Thymusgewebes hat (siehe die folgende Abhandlung), verarbeitete ich eine grössere Portion Rindsdarm in folgender Weise:

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 149 u. Bd. XXXIII, S. 126.

Der so frisch als möglich vom Schlachthause geholte Dünndarm wurde aufgeschlitzt, gründlich mit Wasser abgespült und die Schleimhaut mit einem scharfkantigen Glasstück abgeschabt. Die abgeschabte Schleimhaut wurde möglichst fein zerhackt und in zwei ungleiche Teile 1 und 2 geteilt.

Probe 1. 294 g zerhackte Darmschleimhaut wurden mit dem doppelten Volumen Wasser versetzt und unter Zusatz von Toluol und Chloroform im Brütöfen digeriert. Nach etwa 4-tägiger Digestion wurde die digerierte Masse auf die a-Nucleinsäure verarbeitet. Es wurden gefunden: 0,39 g freie Säure. Diese Säure verhielt sich wie die Säure b aus Thymusgewebe.

Probe 2. Zur Kontrolle wurden 430 g zerhackte Schleimhaut ohne vorherige Digestion auf die a-Nucleinsäure verarbeitet. Ich erhielt 2,7 g freie Säure, welche in ihren Eigenschaften eine bedeutende Ähnlichkeit mit der Säure a aus der Thymus aufwies.

Aus den Versuchen ergibt sich, daß das Erepsin eine nucleinsäurespaltende Wirkung hat. Es ist ferner erwiesen, daß bei der Autodigestion der Schleimhaut eine Umwandlung der darin enthaltenen a-Nucleinsäure eintritt, indem aus ihr die leichter lösliche b-Säure gebildet wird. Bei langdauernder Digestion erleidet auch der Gehalt der Darmschleimhaut an Gesamt-Nucleinsäure eine erhebliche Abnahme. Ob das Enzym, welches die Umwandlung der Nucleinsäure in der Darmschleimhaut des Rindes bewirkt, identisch ist mit dem Erepsin und welche Produkte bei der enzymatischen Spaltung der Darmnucleinsäure auftreten, muß durch weitere Untersuchungen festgestellt werden.

Weiterhin stellte ich einige Versuche über das Verhalten der Thymusnucleinsäure gegen Leber- und Milzextrakt (beide Organe von Rindern) an und kam zum Schluß, daß ein nucleinspaltendes Enzym auch in diesen beiden Auszügen vorhanden ist. Leider gelang es mir nicht, Klarheit über die Natur der dabei aufgetretenen Spaltungsprodukte zu gewinnen.

Die geschilderten Versuche zeigen unzweideutig, daß das Trypsin und ebenso gewisse Organextrakte die Lösung der

Kernsubstanz und der Thymusnucleinsäure bewirken, und daß dabei die letztere eine Spaltung erfährt. Es ist von besonderem Interesse, daß in der Nucleingruppe dieselbe Erscheinung zu Tage tritt wie in der Eiweiß- und Kohlehydratgruppe: in den Geweben als genuiner Zustand eine unlösliche oder colloidale Substanz, welche durch Enzyme in einen leichter löslichen Stoff umgewandelt und offenbar auch in kleinere Atomgruppen zerlegt wird. Somit kann die a-Säure den ursprünglichen Eiweißkörpern, die b-Säure den Albumosen analog gesetzt werden.

Man muß aus meinen Versuchen schließen, daß eine Lösung der Substanz des Zellkerns nicht immer mit einer völligen Zerspaltung Hand in Hand zu gehen braucht. Ebenso wie die Eiweißkörper existieren auch die Nucleinsäuren in einer leichter löslichen und deshalb im Gewebe mobileren Form und die Auflösung der Kernsubstanz durch Enzym besteht in vielen Fällen nur in Überführung in diese lösliche Form, wobei das komplizierte chemische Gefüge der Nucleinsäure im wesentlichen erhalten bleibt.

Gegenüber der Beschränkung auf bestimmt konstituierte Verbindungen, welche die kohlehydrat-spaltenden Enzyme zeigen, ist es interessant, daß die eiweißspaltenden Enzyme auch Stoffe von so verschiedenartiger Konstitution, wie die Nucleinsäuren, umzuwandeln imstande sind.

Herrn Professor Kossel für die mannigfachen Anregungen zu dieser Arbeit und die überaus liebenswürdige Unterstützung meinen aufrichtigen Dank zu sagen, ist mir eine angenehme Pflicht.