

## Über die Nuclease.

Von

**Fritz Sachs.**

(Aus dem physiologischen Institut in Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. Oktober 1905.)

Bereits im Jahre 1865 stellte Béchamp<sup>(1)</sup> die Tatsache fest, daß, wenn man Hefe unter Vermeidung der Fäulnis der Einwirkung des Wassers aussetzt, Phosphorsäure in Lösung übergeht. Einige Jahre später fand Schützenberger<sup>(2)</sup>, welcher die Béchamp'schen Versuche bestätigte, daß außerdem in dem nach der Digestion erhaltenen wässerigen Auszug eine gummiähnliche Substanz, Leucin, Tyrosin, Xanthin, Guanin und Hypoxanthin (angeblich auch Carnin) auftreten. Schützenberger faßte diesen Vorgang als einen Verdauungsprozeß auf. Während aber die Entstehung des Leucins, Tyrosins usw. leicht aus einer fermentativen Zersetzung von Eiweißsubstanzen erklärt werden konnte, wurde der Ursprung des Sarkins, Guanins, Xanthins und Hypoxanthins erst klar, als durch die Untersuchungen von A. Kossel der genetische Zusammenhang der genannten Purinkörper mit den Nucleinstoffen bekannt wurde.<sup>(3)</sup> Kossel zog den Schluß, daß bei dem genannten Vorgange Nuclein zersetzt wird<sup>(3a)</sup> und bestätigte diese Auffassung durch besondere Versuche. In Hefe, die er unter Wasser bei Körpertemperatur digerieren ließ, konstatierte er eine Verminderung der Menge der Nucleinphosphorsäure und somit eine Zersetzung des Nucleins.<sup>(4)</sup>

Im Jahre 1880 übertrug Salomon<sup>(5)</sup> die Schützenberger'schen Versuche, welche bis dahin nur mit Pflanzenzellen angestellt worden waren, auch auf tierische Organe und fand in Leber und Muskeln, die er 4—24 Stunden bei Zimmertemperatur liegen ließ, eine Abspaltung von Xanthinkörpern.

Salkowski<sup>(6)</sup> machte es durch systematische Anwendung von antiseptischen Mitteln und mit Hilfe von Kontrollversuchen, bei denen nach Erhitzen des Gemisches die entsprechende Wirkung ausblieb, wahrscheinlich, daß die autolytische Zersetzung der Nucleinstoffe durch ein Ferment bedingt sei.

Ähnliche Resultate gewannen dann fernerhin Schwiening<sup>(7)</sup>, Biondi<sup>(8)</sup>, Hahn und Geret<sup>(9)</sup>, Fr. Müller<sup>(10)</sup>, Kutscher<sup>(11)</sup>, welcher letztere neben den bereits von Schützenberger festgestellten Substanzen noch Ammoniak, Histidin, Arginin, Lysin, Asparaginsäure und eine Substanz von der Formel  $C_8H_6N_4O_4$  unter den Produkten dieses Prozesses auffand.

Hahn und Geret erbrachten einen Beweis für die enzymatische Natur der Nucleinzersetzung, indem sie auch bei Digestion des Buchner'schen Hefepreßsaftes Phosphorsäure und die Nucleinbasen als Abbauprodukte nachweisen konnten. Aus dem Umstande, daß sich unter den Spaltungsprodukten nur ganz geringe Spuren von Albumosen und gar keine Peptone fanden, glaubten Hahn und Geret, das in Frage kommende Ferment sowohl vom Pepsin, wie vom Trypsin wohl unterscheiden zu müssen. Ebenso spricht sich Biondi<sup>(8)</sup> für die Existenz eines besonderen proteolytischen Fermentes aus. Kutscher<sup>(11)</sup> hingegen weist darauf hin, daß das proteolytische Enzym der Hefe Hexonbasen, aber kein Indol und Skatol bildet, daß es sich also ebenso wie das tierische Trypsin verhält und nicht etwa wie die proteolytischen Enzyme der Bakterien.

Bereits früher hatte Popoff<sup>(12)</sup> begonnen, die Wirkung von Pepsin und Trypsin auf die Nucleinstoffe zu untersuchen. Nach seinen Befunden gehen bei der Verdauung von Thymusbrei durch Pepsin nur ganz geringe Mengen Nuclein in Lösung, bei der Verdauung durch Pankreatin von Witte aber beträchtliche Mengen, ohne daß das Nucleinsäuremolekül selbst dabei zersprengt wird. Milroy<sup>(13)</sup>, welcher die Untersuchungen Popoffs im Jahre 1896 fortsetzte, fand, daß die aus Thymus, roten Blutkörperchen des Vogelblutes und Pankreas dargestellten Nucleinkörper durch Pepsin und Trypsin in Lösung übergeführt werden, ohne eine wesentliche Spaltung zu erleiden. Denn einerseits war die Menge der abgespaltenen Orthophosphorsäure

stets (bis auf einen Versuch: Trypsinverdauung der Kernsubstanz des Entenblutes, 47%) sehr gering, andererseits ließ sich die Nucleinsäure unter den gelösten Stoffen nachweisen und die Zusammensetzung des unverdauten Restes hatte sich nicht verändert.

Umber<sup>(14)</sup> bestätigte diese Untersuchungen (1901). Er fand bei Experimenten mit dem Nucleoproteid des Pankreas unter den gelösten Stoffen neben beträchtlichen Mengen von Nucleinsäure Pepton und die weiteren Abbauprodukte des eigentlichen Eiweißkomplexes.

Aus allen diesen Versuchen scheint also hervorzugehen, daß die eigentlichen proteolytischen Fermente zwar imstande sind, Nucleinsäure vom Nucleoproteid abzuspalten, nicht aber sie weiter zu zerlegen. Da aber bei den Autodigestionsversuchen sowohl mit Hefe wie mit tierischen Organen Spaltungsprodukte der Nucleinsäure selbst auftreten, so müßte die Selbstverdauung von der Trypsin-, resp. Pepsinverdauung wohl unterschieden werden. Neuerdings ist von Neuberg und Milchner<sup>(15)</sup> als charakteristischer Unterschied die bei der Autolyse auftretende Bildung freier reduzierender Pentose aus den Nucleoproteiden beschrieben worden.

Wenn man nun auch aus früheren Untersuchungen eine fermentative Zersetzung der Nucleinsäure annehmen mußte, so ist es doch das unbestrittene Verdienst von Araki<sup>(16)</sup>, diese zuerst direkt demonstriert zu haben, indem er rein dargestellte Nucleinsäure der Einwirkung des Fermentes aussetzte. Er wählte zu seinen Versuchen die von A. Kossel und A. Neumann<sup>(17)</sup> aus der Thymusdrüse dargestellte  $\alpha$ -Nucleinsäure, deren Alkalisalze in wässriger Lösung beim Erkalten eine gelatinierende Masse bilden.

Araki konnte nun durch Einwirkung von Thymus-, Leber-, Milzextrakt, Trypsin und Erepsin eine Verflüssigung dieser gelatinierenden Masse konstatieren, wobei die  $\alpha$ -Nucleinsäure zunächst in die  $\beta$ -Säure umgewandelt, während bei länger fortgesetzter Digestion auch die letztere weiter zerlegt wurde. Freie Nucleinbasen, sowie anorganischer Phosphor konnten allerdings nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Be-

züglich des Trypsins hebt Araki als interessant hervor, daß die eiweißspaltenden Enzyme im Gegensatz zu den kohlehydrat-spaltenden auch Stoffe von so verschiedenartiger Konstitution, wie die Nucleinsäuren, zu zerlegen imstande sind. Iwanoff<sup>(18)</sup> hingegen hält die von Araki beobachtete Zerspaltung der Nucleinsäure für zu gering und nimmt daher für die Nuclein-zersetzung im Organismus ein spezielles Ferment an. Iwanoff konnte nun aber in dem Mycel verschiedener Schimmelpilze, *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum*, ein Ferment nachweisen, welches die Nucleinsäure bis zur Abspaltung von Phosphorsäure und Nucleinbasen zersetzt, und welches er für nicht identisch mit einem proteolytischen Fermente hält. Eine Stütze für diese Annahme liefern die Versuche von Plenge<sup>(19)</sup>, welche zeigen, daß verschiedene Bakterien die Gallerte des  $\alpha$ -nucleinsäuren Natrons verflüssigen, und zwar nicht nur diejenigen, welche Gelatine verflüssigen, sondern z. B. auch Typhus- und Colibazillus, die Gelatine nicht verflüssigen. Zur entgegengesetzten Auffassung (hinsichtlich der Spezifität eines Nucleinsäure spaltenden Fermentes) kam nach seinen neuerdings erschienenen Untersuchungen Nakayama<sup>(20)</sup>. Dieser Forscher fand, daß das Trypsin nicht imstande ist, eine tiefgreifende Zersetzung der Nucleinsäure herbeizuführen, während aus ihr durch Digestion mit proteolytisch stark wirksamen Erepsinlösungen freie Nucleinbasen, sowie anorganischer Phosphor abgespalten wurden. Aus diesem Befund schließt Nakayama einerseits, daß das Trypsin mit dem Erepsin nicht identisch ist, andererseits, daß zwischen proteolytischen und Nucleinsäure spaltenden Fermenten ein prinzipieller Unterschied nicht zu machen ist. Ich möchte jedoch der letzten Schlußfolgerung nicht durchaus beipflichten, da möglicherweise der Darmsaft neben dem Erepsin ein besonderes auf Nucleinsäure wirksames Ferment, eine «Nuclease»,\*) enthält.

Weiter unten werde ich noch auf einige dieser Ergebnisse einzugehen haben, doch bemerke ich schon jetzt, daß meine Versuche, die alle unabhängig von Nakayama angestellt wurden,

\*) Iwanoff will diese Bezeichnung mit Recht für ein das Nucleinsäuremolekül zerlegendes Ferment vorbehalten wissen.

zu dem gleichen Resultat führten, was die Unwirksamkeit des Trypsins und die Art der fermentativen Spaltung der Nucleinsäure anlangt.

### I. Wirkt das Trypsin auf die Nucleinsäure ein? \*)

Ich verwandte zu meinen Versuchen eine 4<sup>0</sup>/oige wässrige Lösung von  $\alpha$ -nucleinsaurem Natron, die, in der Wärme flüssig, bei Zimmertemperatur eine vollkommen starre Masse bildete und zu wenigen Kubikzentimetern in Reagenzgläsern abgefüllt war. Das  $\alpha$ -nucleinsaure Natron wurde nach der Vorschrift von Neumann<sup>(21)</sup> hergestellt. Nach etwa eingetretener Verflüssigung wurde immer versucht, noch vorhandene gelatinierende Substanz nachzuweisen. Denn die Verflüssigung allein war ja auch nach physikalischen Gesetzen durch Diffusion möglich, und nur die Unmöglichkeit des Nachweises von gelatinierender Substanz war für eine Zerstörung der  $\alpha$ -Nucleinsäure durch das Ferment beweisend. Es wurde dabei derart verfahren, daß das Versuchsgemenge heiß filtriert und dann mit Alkohol und etwas Natriumacetatlösung versetzt wurde. Durch diese Reagentien wird das  $\alpha$ -nucleinsaure Natron aus der wässrigen Lösung gefällt, und man kann es dann, wenn man es in heißem Wasser löst, nach dem Erkalten der Lösung als gelatinierende Substanz selbst in geringer Menge noch erkennen. Als ich also Grüber'sche Trypsinpräparate, Hammarsten'schen Pankreasextrakt<sup>(22)</sup>, Mays'schen Pankreasextrakt<sup>(23)</sup>, unter Toluol im Thermostaten auf die Gallerte einwirken ließ, konnte ich mich von einer tatsächlich intensiven Verflüssigung, die auf das Ferment zurückzuführen war, nicht überzeugen. Gelatinierende Substanz war immer nachzuweisen, allerdings war schätzungsweise eine Verminderung derselben anzunehmen.

Auch Herr Dr. Steudel war, wie er mir mitteilte, bei Versuchen, die er bereits vorher angestellt hatte, zu der gleichen Ansicht gekommen.

\*) Die diese Frage betreffenden Untersuchungen habe ich in meiner Inauguraldissertation: „Ist die Nuclease mit dem Trypsin identisch?“ Heidelberg 1905, ausführlich auseinandergesetzt. Sie sollen deshalb hier nur kurz wiedergegeben werden.

Eine intensive Wirkung erhielt ich zum ersten Male bei Anwendung von frischem Pankreasbrei. Hier fiel regelmäßig die nach der Verflüssigung angestellte Probe auf Gelatinieren negativ\*) aus. Ebenso verhielt sich ein nach 15stündiger Digestion des Pankreasbreies unter Toluol bei Zimmertemperatur mit Hilfe der Buchner'schen Presse erhaltener Pankreaspreßsaft. Diese Versuche führten dann darauf hin, Pankreasextrakte zu untersuchen, die nach kürzerer Digestionszeit erhalten waren, und sie mit solchen zu vergleichen, die nach längerer Digestionszeit erhalten waren.

Es zeigte sich nun, daß z. B. ein nach 17stündiger Digestion gewonnenes Pankreasextrakt die Wirkung in ausgezeichneter Weise hervorzubringen imstande war, während es nach 92stündiger Digestion diese Fähigkeit fast vollkommen eingebüßt hatte. Gleichzeitig fiel aber auf, daß gerade bei den für Nucleinsäure wirksamen Extrakten, die nach kurzer Digestionszeit erhalten waren, von einer Wirkung auf eine Fibrinflocke kaum eine Andeutung vorhanden war, während sie bei den älteren Digestionsextrakten deutlich hervortrat. Die Nuclease schien also in den Pankreasextrakten zuerst aufzutreten, um dann bei längerer Digestion dem proteolytischen Agens Platz zu machen. Dieser spontane Umschlag konnte auch bei ein und demselben Versuchsgemenge deutlich beobachtet werden. Es wurden zu diesem Zwecke 100 g Pankreas mit 200 ccm Wasser und Toluol angesetzt, in einzelnen Zwischenräumen Proben von dem Extrakt abfiltriert und auf ihre Wirkungsweise auf eine Fibrinflocke, resp. auf das  $\alpha$ -nucleinsaure Natron untersucht. Es sei bemerkt, daß hier sowohl, wie in allen folgenden Versuchen, bei der letzteren Prüfung immer soviel von dem Extrakt zugesetzt wurde, als die Menge der Lösung des  $\alpha$ -nucleinsauren Natrons betrug. Die Tabelle, welche das Ergebnis zeigt, sei der Übersicht halber hier wiedergegeben (s. Seite 343).

Ich möchte im Hinblick auf die Tabelle hinzufügen, daß das Verschwinden der Nuclease und das Auftreten des Trypsins bei den vielfach angestellten Versuchen nicht immer zu derselben Zeit stattfand, sondern daß sich hierin große Schwan-

\*) D. h. es war keine gelatinierende Substanz nachzuweisen.

kungen zeigten, sodaß ich die vollkommene Trennung der beiden Fermente nicht in meiner Gewalt hatte. Öfters ist sie aber vollkommen gelungen, so z. B. im Falle des in der Tabelle erwähnten Pankreasextraktes, der zuletzt stark proteolytisch wirksam, ohne Wirkung aber auf Nucleinsäure war. In äußerst seltenen Fällen beobachtete ich, daß der Pankreasextrakt trotz lange ausgedehnter Digestion seine Wirkung auf Nucleinsäure nicht einbüßte. Dann wurde aber das Auftreten des proteolytischen Fermentes vermißt. Umgekehrt erhielt ich gelegentlich Pankreasextrakte, die schon nach ganz kurzer Digerierungszeit stark proteolytisch wirksam waren. Hier war dann aber von der verflüssigenden Wirkung auf die Lösung des  $\alpha$ -nucleinsauren Natrons nichts zu merken. Aus allen Versuchen geht also die Regel hervor, daß, je stärker die proteolytische Wirkung des Pankreasextraktes, desto schwächer diejenige auf Nucleinsäure ist, und umgekehrt. Auf Grund dieser Tatsache und mit Rücksicht auf die gelegentlich gelungene vollkommene Isolierung der beiden Wirkungen nehme ich an, daß die Nuclease mit dem Trypsin nicht identisch ist, daß es sich um die Wirkungen zweier verschiedener Fermente handelt.

Dauer der Digerierung	Bis zur Auflösung der Fibrinflocke verflossene Zeit	Bis zur Verflüssigung der Gallerte des $\alpha$ -nucleinsauren Natrons verflossene Zeit
16 Stunden	2—3 Stunden	4—6 Stunden*)
18 Stunden	1 Stunde	4—6 Stunden*)
22 Stunden	$\frac{3}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Stunde	9—10 Stunden**)
25 Stunden	20 Minuten	16—18 Stunden***)
41 Stunden	20 Minuten	Nach 29 Stunden war die Masse noch vollkommen starr.

\*) Probe auf Gelatinieren negativ.

\*\*\*) Hier ließ sich nach 20 Stunden noch gelatinierende Substanz in ganz geringer Menge nachweisen.

\*\*\*) Probe auf Gelatinieren nach 45 Stunden positiv.

Es erklärt sich aber auch der scheinbare Widerspruch meiner Beobachtungen mit den Araki'schen Angaben, da es, wie aus meinen Ausführungen hervorgeht, wohl möglich ist, ein Pankreaspräparat zu erhalten, das die Fähigkeit, sowohl Eiweiß wie auch die Nucleinsäure zu lösen, in hinreichendem Maße besitzt. Nur ist die Wirkung nicht auf ein und dasselbe Ferment, sondern auf eine Beimengung von Nuclease zum Trypsin zurückzuführen.

## II. Einwirkung des Trypsins auf die Nuclease.

Mit den folgenden Experimenten wurde nun nach einer Erklärung gesucht für den Übergang der Nucleasenwirkung in die proteolytische in demselben Pankreasextrakte. Ich dachte mir, daß möglicherweise die Nuclease allmählich durch das sich bildende Trypsin zerstört wird, und in dieser Erwägung stellte ich die folgenden Versuche an:

Es wurden angesetzt 100 g zerriebenes Pankreas mit 200 ccm Wasser und Toluol bei Zimmertemperatur. Nach 4 Tagen wurde die Flüssigkeit von dem Brei abfiltriert. Der so erhaltene wässerige Auszug (A) löste eine ungekochte Fibrinflocke in wenigen Minuten und verflüssigte die Gallerte des  $\alpha$ -nucleinsauren Natrons nicht.

Fünf Stunden, bevor Extrakt A abfiltriert wurde, wurden ebenfalls 100 g Pankreas mit 200 ccm Wasser und Toluol bei Zimmertemperatur angesetzt und der hieraus gewonnene Extrakt (B) nach eben diesen 5 Stunden abfiltriert, sodaß die beiden Filtrate ungefähr zu gleicher Zeit erhalten wurden, A nach 4tägiger, B nach 5stündiger Digerierung. B verflüssigte die Gallerte des nucleinsauren Natrons nach kräftigem Umschütteln in wenigen Minuten (Probe auf Gelatinieren nach 19 Stunden negativ), löste eine Fibrinflocke bei schwach alkalischer Reaktion innerhalb 20 Stunden gar nicht.

Ein Teil von A wurde nun zum Sieden erhitzt, sodaß er seine Wirkung auf die Fibrinflocke vollkommen einbüßte, und dann wurden vereinigt:

I. Der ungekochte Teil von Extrakt A mit der gleichen Menge von Extrakt B (Gemisch I).

II. Der gekochte Teil von Extrakt A mit der gleichen Menge von Extrakt B (Gemisch II).

Diese beiden Gemische wurden in folgender Weise geprüft:

Versuch 1. 17 Stunden nach der Vereinigung wird Gemisch I einigen Kubikzentimetern der Lösung des  $\alpha$ -nucleinsauren Natrons hinzugefügt, und zwar in doppelter Menge, sodaß also von dem nucleasen-



haltigen Extrakt B die der Gallerte gleiche Menge zur Verwendung kommt. In kurzer Zeit ist die Masse verflüssigt. Probe auf Gelatinieren 30 Stunden darauf positiv.

Versuch 2. 17 Stunden nach der Vereinigung wird bei schwach alkalischer Reaktion eine Fibrinflocke der Einwirkung des Gemisches I ausgesetzt. — Nach 15 Minuten ist sie völlig zerfallen.

Versuch 3. 17 Stunden nach der Vereinigung wird Gemisch II der Gallerte des nucleinsauren Natrons in doppelter Menge zugefügt. — Nach ca. 1 Stunde ist die Masse dünnflüssig. Probe auf Gelatinieren 30 Stunden darauf negativ.

Versuch 4 (Kontrollversuch). 17 Stunden nach der Vereinigung Extrakt B in gleicher Menge zu nucleinsaurem Natron. Lösung in wenigen Minuten. Probe auf Gelatinieren nach 30 Stunden negativ.

Aus diesen Versuchen ersieht man, daß in dem Falle, wo die wirksame Trypsinlösung 17 Stunden auf den nucleasehaltigen Saft eingewirkt hatte, eine Schwächung der Nucleasewirkung eingetreten ist, während dies dort, wo das Trypsin vorher durch Kochen zerstört worden war, nicht der Fall ist. Noch deutlicher trat dies in den folgenden Versuchen hervor, wo dieselben Gemische, aber erst 41 Stunden nach der Vereinigung, untersucht wurden:

Versuch 1a. Gemisch I zur Gallerte des nucleinsauren Natrons in gleicher Menge. — Nach 72 Stunden ist die Masse starr.

Versuch 2a. Fibrinflocke bei schwach alkalischer Reaktion der Einwirkung von Gemisch I ausgesetzt. — Nach 30 Minuten ist sie vollständig aufgelöst.

Versuch 3a. Gemisch II zur Gallerte des nucleinsauren Natrons in gleicher Menge. — In kurzer Zeit ist Verflüssigung eingetreten. Probe auf Gelatinieren 50 Stunden darauf negativ.

Versuch 4a (Kontrollversuch). Zur Gallerte des nucleinsauren Natrons Extrakt B, und zwar von dem Extrakt nur die Hälfte der Menge der Gallerte, die andere Hälfte wird durch Wasser ersetzt. — Die Masse ist bald verflüssigt. Probe auf Gelatinieren 50 Stunden darauf negativ.

In den folgenden Versuchen wurde der nucleasehaltige Saft auf andere Weise gewonnen als bisher. Und zwar kam es darauf an, ihn möglichst schnell zu erhalten, da die Nuclease im frischen Pankreas, wie sich herausgestellt hatte, am wirksamsten ist. Das Verfahren war folgendes: Der Pankreasbrei wurde mit Sand zerrieben, mit der Handpresse gepreßt, der ausgepreßte Saft mit einer gewissen Menge Wasser verdünnt und filtriert. Mit dem so erhaltenen Saft, der im folgenden

stets gemeint ist, wenn schlechthin von Pankreasextrakt gesprochen wird, wurden die vorhergehenden Versuche in entsprechender Weise wiederholt. Unbedeutende Änderungen der Versuchsanordnung sind dabei vorgekommen. Z. B. ließ ich die beiden Extrakte A und B längere Zeit (2–3 Tage) aufeinander einwirken. Regelmäßig verflüssigte Gemisch II die gelatinierende Masse vollständig, und die Probe auf Gelatinieren fiel nachher negativ aus, während Gemisch I die Masse entweder gar nicht verflüssigte, oder nach eingetretener Verflüssigung die Probe auf Gelatinieren doch positiv ausfiel. Auffallend war, daß Extrakt B meist sich weniger wirksam auf die Nucleinsäure erwies, als Gemisch II, sodaß bei Versuchen mit der ersten Flüssigkeit sich gelatinierende Substanz nachweisen ließ, während dies bei solchen mit der zweiten nicht mehr möglich war. Wie ist das zu erklären? Ich glaube, es liegt daran, daß bei dem Erhitzen von Extrakt A die natürlich auch in diesem, wenn auch nur in geringer Menge noch vorhandene Nuclease nicht mitzerstört worden und mithin bei der Vereinigung mit Extrakt B diesem zugefügt ist. Es würde dann das Extrakt B geringere Mengen von Nuclease enthalten als Gemisch II. Ich wurde zu dieser Annahme geführt durch den gelegentlichen Befund, daß bei Erhitzen auf 75° der Pankreasextrakt die Gallerte vollständig verflüssigte (Probe auf Gelatinieren fiel negativ aus), während die Fibrinflocke von demselben Extrakt nach 17 Stunden noch nicht gelöst war. Eine feste Norm ließ sich hierfür aber nicht aufstellen. Besonders sprechen aber einige andere Befunde, welche später erwähnt werden, für eine hohe Resistenz der Nuclease gegen Wärme. Hingegen wird, wie ich aus den soeben besprochenen Versuchsreihen schließen zu dürfen glaube, die Nuclease durch das Trypsin zerstört, und ist der Wechsel in der Wirkung der Pankreasauszüge auf diese Weise zu erklären.

### III. Einwirkung von Säure und Alkali auf die Nuclease.

Es wurde nun des weiteren das Verhalten von Säure und Alkali zur Nuclease untersucht. Ich wählte für diesen

Zweck Essigsäure und Natriumcarbonatlösung. Vorher sei bemerkt, daß die Reaktion des frisch gewonnenen Pankreasextraktes stets schwach sauer ist.

### Versuche mit Essigsäure.

Versuch 1. Zur Lösung des  $\alpha$ -nucleinsauren Natrons wird die gleiche Menge verdünnter Essigsäure hinzugefügt. — Nach wenigen Minuten ist die Masse dünnflüssig. Probe auf Gelatinieren 48 Stunden darauf stark positiv.

Versuch 2. Ein Pankreasextrakt von guter Nucleasenwirkung wird stark mit Essigsäure angesäuert, der Lösung des nucleinsauren Natrons in gleicher Menge zugefügt. — Masse nach wenigen Minuten dünnflüssig. Probe auf Gelatinieren nach 24 Stunden positiv.

Versuch 3. Der mit Essigsäure stark angesäuerte Pankreasextrakt wird zunächst 24 Stunden stehen gelassen, dann mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung ungefähr neutral gemacht und so in gleicher Menge der Gallerte der Nucleinsäure zugesetzt. — Nach wenigen Minuten ist die Masse dünnflüssig. Probe auf Gelatinieren nach 24 Stunden negativ.

Diese Versuche sagen aus, daß Essigsäure die Wirkung der Nuclease verhindert, ohne eine Zerstörung des Fermentes herbeizuführen.

### Versuche mit Natriumcarbonatlösung.

Versuch 1. Zunächst wurde auch  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung allein der Gallerte zugesetzt. Hier war nichts von einer Verflüssigung zu konstatieren. Im Gegenteil, das Natriumcarbonat begünstigt eher die Gelatinierbarkeit.

Versuch 2. Pankreasextrakt von guter Nucleasenwirkung wird mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung alkalisch gemacht und dann in gleicher Menge der Lösung des nucleinsauren Natrons zugefügt. — Nach 66 Stunden ist die Masse noch starr.

Versuch 3. Der mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung alkalisch gemachte Pankreasextrakt wird im Eisschrank aufbewahrt, nach 19 Stunden mit Essigsäure neutralisiert und unserer Gallerte in gleicher Menge zugesetzt. — Die Masse bleibt starr.

Versuch 4 (Kontrollversuch). Derselbe Pankreasextrakt allein (ohne Zusatz von Reagentien) zu nucleinsaurem Natron zugesetzt, verflüssigt die Masse. Probe auf Gelatinieren negativ.

Versuch 5. Pankreasextrakt mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung alkalisch gemacht, sofort darauf mit Essigsäure neutralisiert und dem nucleinsauren Natron in gleicher Menge zugefügt. — Die Masse ist bald dünnflüssig. Probe auf Gelatinieren 72 Stunden darauf negativ.

Versuch 6. Pankreasextrakt mit einem neutralen Gemisch von Essigsäure und Natriumcarbonat versetzt und im Eisschrank aufgestellt. Nach 19 Stunden zu nucleinsaurem Natron in gleicher Menge. — Es tritt bald Verflüssigung ein. Probe auf Gelatinieren 48 Stunden darauf negativ.

Versuch 7. Ein Trockenpräparat der Nuclease (von guter Wirkung), dessen Herstellungsverfahren später beschrieben werden wird, wird in Wasser gelöst, mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  alkalisch gemacht, so stehen gelassen und nach 24 Stunden mit Essigsäure schwach angesäuert. Darauf in gleicher Menge dem nucleinsauren Natron zugefügt. Nach 96 Stunden ist die Masse noch starr.

Wir schließen aus diesen Versuchen, daß Natriumcarbonat sowohl die Wirkung der Nuclease verhindert, als auch bei längerer Einwirkung eine Zerstörung des Fermentes herbeiführt.

In einem Versuche, wo ein gut wirksamer, frischer Pankreasextrakt mit Natriumcarbonat neutralisiert wurde, war eine deutliche Schwächung der Wirkung auf Nucleinsäure zu konstatieren.

Mithin ist schwach saure Reaktion, wie sie sich auch im frischen Pankreasextrakt findet, für die Wirkung der Nuclease am günstigsten, vielleicht überhaupt erforderlich.

#### IV. Darstellung eines Trockenpräparates.

Es sei nun kurz das Verfahren zur Gewinnung des vorhin erwähnten Trockenpräparates geschildert:

570 g Pankreas wurden mit Sand und Kieselguhr zerrieben und mit der Buchner'schen Presse gepreßt. Der gewonnene Saft (100 ccm) wurde sofort mit Ammonsulfat bis zur Sättigung versetzt, der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit Alkohol und Äther getrocknet.

Das Filtrat war ohne Wirkung auf Nucleinsäure. Der getrocknete Niederschlag verflüssigte, in destilliertem Wasser gelöst, nucleinsaures Natron vollkommen in einigen Stunden (Probe auf Gelatinieren fiel nachher negativ aus) und löste eine Fibrinflocke bei schwach alkalischer Reaktion innerhalb 2 Stunden gar nicht, nach 19 Stunden allerdings vollkommen. Das Pulver hatte seine Wirkung zur Zeit der letzten Prüfung (2 Monate nach Herstellung) noch bewahrt.

Gelegentlich einiger Fällungsversuche wurde festgestellt, daß die Nuclease nicht dialysierbar ist.

### V. Verbreitung der Nuclease.

Die vorstehend beschriebenen Versuche wurden, wie schon erwähnt, mit einem aus Rindspankreas dargestellten Präparat ausgeführt. Außerdem fand ich dies Enzym in Bestätigung der Araki'schen Angabe in der Kalbsthymus, fernerhin im Hundepankreas (auch bei neugeborenen Tieren), mit Wahrscheinlichkeit in der Kalbsniere, hingegen nicht im Rindsmuskel und im Rinderblut. Auch das Pepsin (Grübler) erwies sich frei von einer entsprechenden Wirkung. Leider hatte ich keine Gelegenheit, das Pankreassekret auf seinen Gehalt an Nuclease zu prüfen, was natürlich von großer Wichtigkeit wäre. Es ist aber wohl zu vermuten, daß das Ergebnis negativ ausgefallen wäre.

### VI. Tritt eine Spaltung der Nucleinsäure unter der Wirkung der Nuclease des Pankreas ein?

Nakayama schließt aus seinen oben zitierten Versuchen, daß unter der Wirkung des Erepsins eine Spaltung der Nucleinsäure eintritt. Bezüglich der Phosphorsäure erscheint dies Ergebnis einwandfrei, denn die gefundenen Werte der abgespaltenen Phosphorsäure sind sehr hohe. Nicht so überzeugend ist aber meines Erachtens die Bildung freier Nucleinbasen nachgewiesen. Hierzu scheint mir die Darstellung eines krystallisierenden Salzes dieser Basen und die Prüfung der angewandten Fermentlösung auf präformierte oder abgespaltene Basen erforderlich. Ferner habe ich bei meinen Versuchen mit der Nuclease des Pankreas das Eindampfen der Lösung vor der Silberfällung vermieden. Auch bei Innehaltung dieser Cautelen war das Ergebnis dasselbe wie das Nakayamas.

Mein Verfahren gestaltete sich folgendermaßen: Nachdem die Lösung des  $\alpha$ -nucleinsauren Natrons etwa 2–3 Tage lang der Wirkung der zu untersuchenden Flüssigkeiten ausgesetzt worden war, wurde das Gemisch filtriert und das Filtrat zur Beseitigung etwa noch vorhandener Nucleinsäure mit Schwefelsäure versetzt, da die gelöste Nucleinsäure nach den Beobachtungen von A. Kossel<sup>(24)</sup> die später vorzunehmende Ausfällung der Basen mit ammoniakalischer Silberlösung hindern mußte.

Der dabei etwa ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, darauf wurden aus dem Filtrat die Purinbasen mit Quecksilbersulfatlösung<sup>(25)</sup> gefällt. Der so entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, in Wasser aufgeschwemmt und unter Zusatz von etwas Salzsäure mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Dann wurde wiederum filtriert und das Filtrat durch Durchleiten von Luft vom Schwefelwasserstoff befreit. Nun wurde es mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, der entstandene Silberniederschlag abfiltriert, gut ausgewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und unter Zusatz von Salzsäure in der Wärme zersetzt. Das Chlor-silber wurde abfiltriert, durch das Filtrat noch einige Blasen Schwefelwasserstoff geleitet und dann wiederum filtriert. Das letzte Filtrat wurde zwecks Abscheidung von Krystallen (salzsaure Purinbasen) eingedampft. Die etwa ausgeschiedenen Krystalle wurden samt dem Rückstand in salzsäurehaltigem Wasser gelöst, die Lösung filtriert und wiederum bis zum völligen Auskrystallisieren eingedampft. Die Krystalle wurden mit Alkohol und Äther getrocknet und gewogen.\*)

In dieser Weise wurden die Gemische von folgenden Versuchen bearbeitet:

Versuch 1. 50 ccm Pankreasextrakt werden unter Toluol angesetzt mit 50 ccm einer 4%igen Lösung des  $\alpha$ -nucleinsauren Natrons. Das Resultat der nach 2—3 Tagen vorgenommenen Verarbeitung war:  
Gewicht der Krystalle: 0,1456 g.

Versuch 2. 50 ccm Pankreasextrakt, welches 5 Minuten lang gekocht worden war, werden unter Toluol angesetzt mit 50 ccm der 4%igen Lösung des  $\alpha$ -nucleinsauren Natrons. Verarbeitung ebenfalls nach 2—3 Tagen. Hier wurde, bevor das erstemal filtriert wurde, etwas erwärmt, da die Masse noch etwas dickflüssig war.

Gewicht der gewonnenen Krystalle: 0,1026 g.

Versuch 3. 50 ccm Wasser unter Toluol angesetzt mit 50 ccm der 4%igen Lösung von  $\alpha$ -nucleinsaurem Natron. Verarbeitung nach 2—3 Tagen; auch hier wird vor dem Filtrieren etwas erwärmt.

Gewicht der gewonnenen Krystalle: 0,0190 g.

Versuch 4. 50 ccm Pankreasextrakt, der 5 Minuten lang gekocht war, blieben allein, vor der Verarbeitung 2—3 Tage unter Toluol bei

\*) In sämtlichen Fällen, in denen überhaupt Krystalle erhalten wurden, prüfte ich dieselben mit Hilfe der von Burian als charakteristisch für die freien Nucleinbasen angegebenen Diazoreaktion<sup>(26)</sup> in der Pauly'schen Modifikation.<sup>(27)</sup> Die Reaktion fiel stets positiv aus.

Zimmertemperatur stehen. Hier war der Quecksilbersulfatniederschlag so außerordentlich spärlich, daß diese Portion nicht weiter untersucht wurde.

Versuch 5. 50 ccm 4%iger Lösung von nucleinsaurem Natron wurden unter Toluol angesetzt mit 50 ccm verdünnter Essigsäure. Bei der nach 2–3 Tagen vorgenommenen Verarbeitung war der Silberniederschlag so gering, daß auch diese Portion nicht weiter untersucht wurde.

Die erhaltenen Krystalle konnten nach ihrem Verhalten zu Ammoniak sowie aus ihren Krystallformen\*) im wesentlichen mit salzsaurem Guanin identifiziert werden.

In einer anderen entsprechenden Versuchsreihe waren angesetzt worden: 1. 125 ccm Pankreasextrakt mit 125 ccm der 4%igen Lösung des nucleinsauren Natrons. 2. 125 ccm desselben Pankreasextraktes, der aber auf etwa 80° erhitzt war, mit der gleichen Menge der Lösung des nucleinsauren Natrons und 3. 125 ccm desselben nicht erhitzten Pankreasextraktes für sich allein unter Toluol. Nach entsprechender Verarbeitung ergab sich:

Im ersten Falle

Gewicht der Krystalle 0,5860 g.

Im zweiten Falle

Gewicht der Krystalle 0.1971 g.

Im dritten Falle waren nur Andeutungen (unwägbare Spuren) von Krystallen zu erkennen.

Die Versuche beweisen, daß also eine Abspaltung von Nucleinbasen stattgefunden hat, welche mit Sicherheit auf die Wirkung des Fermentes zu beziehen ist. Denn die Menge der nachweisbaren Basen war in den Fällen, wo der Pankreasextrakt durch Essigsäure oder Wasser ersetzt wurde, oder wo der Pankreasextrakt für sich allein untersucht wurde, äußerst gering und nicht zu vergleichen mit derjenigen, welche nach Einwirkung von Pankreasextrakt auf Nucleinsäure festgestellt wurde. Auffallend ist, daß auch dort, wo der Pankreasextrakt vorher erhitzt war, bemerkenswerte Mengen von Basen nachgewiesen werden konnten. Allerdings waren diese ja immer geringer, als in den Fällen, wo das Erhitzen unterlassen worden war. Immerhin mußte man hier den größten

---

\*) cf. A. Kossel in «Behrens, Kossel, Schiefferdecker: Das Mikroskop». Braunschweig bei H. Bruhn. 1889, S. 280.

Teil der Wirkung auf den zugesetzten Pankreasextrakt (nicht etwa auf das Wasser oder die saure Reaktion) und somit auf das Ferment beziehen. Und dies ist wohl angängig, da ja auch andere Fermente bereits bekannt sind, die durch Wärme nicht zerstört werden. Die Abspaltung von Nucleinbasen aus der Nucleinsäure durch die Nuclease des Pankreas wäre somit erwiesen.

Am Schlusse der vorliegenden Arbeit spreche ich Herrn Prof. Dr. Kossel für die Anregung zu diesen Untersuchungen, sowie die entgegenkommendste Unterstützung, die er mir bei ihrer Ausführung zuteil werden ließ, den wärmsten Dank aus. Ebenso danke ich Herrn Privatdozenten Dr. Steudel nochmals für seine wertvollen Ratschläge bestens.

### Literatur.

1. Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences 1865. Bulletin de la Société chimique de Paris, XXI.
2. Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences 1871.
3. Diese Zeitschrift, Bd. IV und V.
- 3a. A. Kossel, Die Nucleine und ihre Spaltungsprodukte, S. 19. Straßburg 1881.
4. Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 14.
5. Archiv f. Anat. u. Phys., Physiol. Abt. 1881, S. 361.
6. Diese Zeitschrift, Bd. XIII, S. 506.  
Zeitschrift für klin. Med., Bd. XVII, Suppl.  
Centralbl. für die med. Wissensch., 1889, Nr. 13.
7. Virchows Archiv, Bd. CXXXVI, S. 444.
8. „ „ „ CXLIV, S. 373.
9. Zeitschrift für Biol., Bd. XI, S. 117.
10. Verhandlungen der Naturforsch.-Ges. in Basel, Bd. XIII, S. 308.
11. Diese Zeitschrift, Bd. XXXII und XXXIV.
12. „ „ „ XVIII.
13. „ „ „ XXII.
14. Zeitschrift für klin. Med., Bd. XLIII.
15. Berl. klin. Wochenschr., 1904, Nr. 41.
16. Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 84.
17. Archiv für Phys. u. Anat., Phys. Abt., 1894, S. 195.
18. Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX.
19. „ „ „ XXXIX.
20. „ „ „ XLI.
21. Archiv für Anat. u. Phys., Physiol. Abt., 1898, S. 374; 1899, Suppl. S. 552.



22. Hammarsten, Lehrbuch der physiologischen Chemie. Dritte Auflage, S. 265.
23. Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII.
24. » » » XXII, S. 81.
25. » » » XXXVIII, S. 39.
26. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. XXXVII, 1, S. 696.
27. Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 516.