

# Über die bei der Spaltung der Nucleine in Betracht kommenden Fermente mit besonderer Berücksichtigung der Bildung von Hypoxanthin in der Abwesenheit von Adenase.

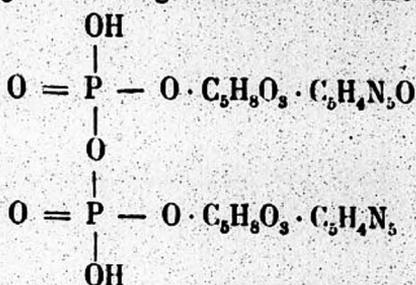
Von

Samuel Amberg und Walter Jones.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Johns Hopkins Universität.)

(Der Redaktion zugegangen am 28. Juni 1911.)

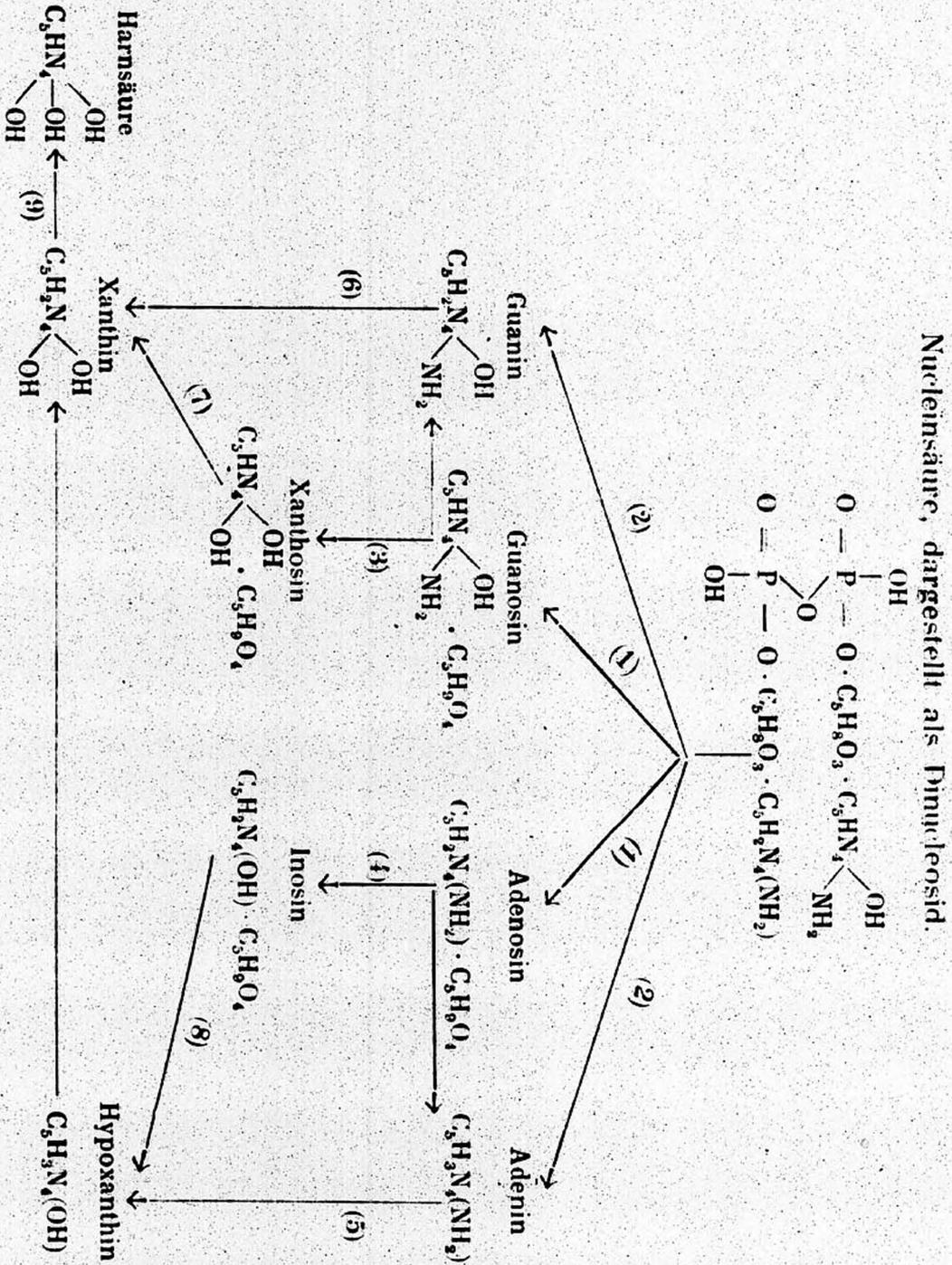
Durch die Untersuchung der bei der Hydrolyse der Nucleinsäuren entstehenden Zwischenprodukte gelang es Levene und Jacobs,<sup>1)</sup> die Konstitution des Nucleinsäuremoleküls festzustellen. Der die Puringruppen umfassende Teil des Moleküls entspricht der folgenden abgekürzten Formel.<sup>2)</sup>



Die eben erwähnten Autoren zeigten, daß durch Abspaltung der Phosphorsäure von der Nucleinsäure zwei Nucleoside resultieren, Guanosin und Adenosin. Guanosin besteht aus Guanin und d-Ribose. Bei der hydrolytischen Spaltung durch Säuren entsteht freies Guanin. Adenosin besteht aus Adenin und d-Ribose. Seine hydrolytische Spaltung durch Säuren führt zu freiem Adenin. Durch Einwirkung salpetriger Säure konnten diese beiden Amidonucleoside in die entsprechenden Oxynucleoside Xanthosin und Inosin verwandelt werden. Die Beziehungen dieser verschiedenen Substanzen zueinander und zur Harnsäure ist im folgenden Schema dargestellt.

<sup>1)</sup> B. B., Bd. 41, 42, 43.

<sup>2)</sup> B. B., Bd. 42, S. 2703.



Die Untersuchung der Wirkung von Drüsenextrakten auf Nucleinsäure ergab nun, daß die Fermentspaltung der Nucleinsäure die im Schema mit Pfeilen angedeuteten Pfade verfolgt. Damit soll jedoch nicht gesagt sein, daß alle die durch die Pfeile markierten Fermente sich in jeder einzelnen Drüse vorfinden müssen. Im Gegenteil jede einzelne Drüse scheint sich

durch die in ihr enthaltenen Fermente zu charakterisieren. Zum Beispiel Schweinepankreas zerlegt Nucleinsäure unter Bildung von Guanotin, das nicht weiter geändert wird. Das gleichzeitig entstehende Adenotin wird zu Inotin als Endprodukt umgewandelt.<sup>1)</sup> Weiterhin erhält man durch Einwirkung von Schweineleberextrakt auf Nucleinsäure znnächst Xanthotin<sup>2)</sup> (offenbar durch Desamidierung von Guanotin); aus dem dann bei fortgesetzter Digestion durch Hydrolyse freies Xanthin hervorgeht.

Von den in unserem Schema angedeuteten Fermenten sind die bis jetzt folgenden demonstriert worden.

- |                          |                                |
|--------------------------|--------------------------------|
| 1. Phosphonuclease       | 6. Guanase <sup>4)</sup>       |
| 2. Purinnuclease         | 7. Xanthosinhydrolase          |
| 3. Guanotindesamidase    | 8. Inotinhydrolase             |
| 4. Adenotindesamidase    | 9. Xanthooxydase <sup>5)</sup> |
| 5. Adenase <sup>3)</sup> |                                |

Die mitzuteilenden Versuche bringen den Beweis von der Existenz zweier unabhängiger Nucleasen, die an verschiedenen Stellen der Nucleinsäure ihren Angriffspunkt finden. Das eine dieser Fermente die « Purinnuclease » führt zur Abspaltung der Purinbasen, während das andere, die « Phosphonuclease », Phosphorsäure abspaltet, aber die Purinbasen nicht aus ihrer Verbindung mit dem Kohlenhydrat befreit.

Viele Drüsenextrakte zerlegen Nucleinsäure mit der Bildung von Phosphorsäure und Purinbasen. Unsere Annahme von der unabhängigen Existenz der beiden eben erwähnten Nucleasen gründet sich hauptsächlich darauf, daß die Hundeleber zwar Phosphorsäure aus der Nucleinsäure abspaltet, aber nicht Adenin. Denn wäre letzteres der Fall, so müßte sich das so gebildete Adenin als Endprodukt auffinden lassen, da diese Drüse durchaus unfähig ist, Adenin irgendwie weiter zu ändern. Unter

<sup>1)</sup> W. Jones. Journal. Biol. Chem. Bd. 9, S. 169.

<sup>2)</sup> Ibid.

<sup>3)</sup> Jones und Winternitz. Diese Zeitschrift, Bd. 44, S. 1.

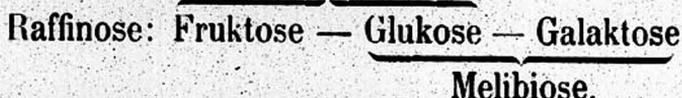
<sup>4)</sup> Jones und Partridge, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 343. — Jones, Ibid., Bd. 45, S. 83.

<sup>5)</sup> Spitzer, Archiv f. Physiol., Bd. 76, S. 192.

den durch die Wirkung von Hundeleberextrakt auf Nucleinsäure erzeugten Produkten findet sich nun nie eine Spur von Adenin.

Die Existenz zweier voneinander unabhängiger Nucleasen, die die Nucleinsäure an zwei verschiedenen Stellen angreifen, findet eine Analogie in dem Verhalten der Raffinose<sup>1)</sup> und des Leucyl-glycyl-alanins<sup>2)</sup> zu hydrolytischen Fermenten. Hefeninvertase zerlegt Raffinose in Fruktose und Melibiose, während Emulsin Sukrose und Gelaktose entstehen läßt.

### Sukrose



Leucyl-glycyl-alanin der Einwirkung von Trypsin unterworfen, gibt Leucyl-glycin und mit Hefe Glycyl-alanin.

Des weiteren haben unsere weiter unten mitgeteilten Versuche ergeben, daß die Wirkung von Hundeleberextrakt auf Nucleinsäure zur Bildung von Hypoxanthin führt. Da nun Hundeleberextrakt freies Adenin nicht in Hypoxanthin überzuführen vermag, so muß dieses Hypoxanthin auf dem Wege über Adenosin und Inosin entstanden sein, und damit ist die Existenz der «Inosinhydrolase» sichergestellt.

### Experimenteller Teil.

Die Versuchsanordnung sowie die analytischen Methoden sind schon früher beschrieben worden.<sup>3)</sup>

#### Experiment I.

Wässriger Hundeleberextrakt (1 : 3)	400 ccm
Guaninchlorid	600 mg
i. e. Guanin	400 „
Digestion vier Tage bei 40°.	

Am Ende der Digestion konnte man krystallinische, dem Guaninchlorid ähnliche Nadeln am Boden des Gefäßes sehen,

<sup>1)</sup> Neuberg, Biochem. Zeitschrift, Bd. III, S. 519.

<sup>2)</sup> Abderhalden u. Koelker, Diese Zeitschrift, Bd. 54, S. 363, Bd. 55, S. 425.

<sup>3)</sup> Jones, Journal Biolog. Chem., Bd. 9, l. c. S. 169. — Ibid. S. 129.

die sich jedoch als Xanthin erwiesen. Demnach war Guanin in Xanthin übergeführt worden, obwohl es nicht in Lösung ging.

Xanthin	Gefunden: 362 mg
Guanin	0

#### Experiment II.

Wässriger Hundeleberextrakt	400 ccm
Guaninchlorid in NaOH	600
Digestion drei Tage bei 40°.	

Xanthin	Gefunden: 348 mg
Guanin	0

#### Experiment III.

Wässriger Hundeleberextrakt	400 ccm
Guaninchlorid (leicht alkalisch mit 4% NaHO)	600 mg
Digestion fünf Tage bei 40°.	

Xanthin	Gefunden: 372 mg
Guanin	0

#### Experiment IV.

Wässriger Extrakt der blutlosen Hundeleber	400 ccm
Guaninchlorid in NaOH	600 mg
Digestion acht Tage bei 40°.	

Xanthin	Gefunden: 340 mg
Guanin	0

Diese vier Experimente zeigen, daß wässrige Extrakte der Hundeleber Guanin unter verschiedenen Bedingungen prompt und vollständig desamidieren. Die vier folgenden Experimente zeigen, daß mit einer ähnlichen Variation der Versuchsbedingungen Adenin nicht verändert, sondern nach prolongierter Digestion wieder erhalten wird.

#### Experiment V.

Wässriger Hundeleberextrakt	400 ccm
Adeninsulfat	600 mg
i. e. Adenin	400
Digestion acht Tage bei 40°.	

Adenin	Gefunden (berechnet aus dem Pikrat): 328 mg
Hypoxanthin	(offenbar von der Drüse): Spur.

## Experiment VI.

Wässriger Hundeleberextrakt	400 ccm
Adeninsulfat in NaOH	600 mg

Digestion neun Tage bei 40°.

Adenin	Gefunden (berechnet aus dem Pikrat):	321 mg
Hypoxanthin	» (von der Drüse):	Spur.

## Experiment VII.

Wässriger Hundeleberextrakt	400 ccm
Adeninsulfat neutralisiert mit NaOH	600 mg

Digestion zwölf Tage bei 40°.

Adenin	Gefunden (berechnet vom Pikrat):	312 mg
Hypoxanthin	» (von der Drüse):	Spur.

## Experiment VIII.

Wässriger Extrakt der blutlosen Hundeleber	400 ccm
Adeninsulfat in NaOH	600 mg.

Digestion zwölf Tage bei 40°.

Adenin	Gefunden (berechnet vom Pikrat):	334 mg
Hypoxanthin	» (von der Drüse):	Spur.

## Experiment IX.

Ein wässriger Extrakt einer blutlosen Hundeleber wurde digeriert und zu verschiedenen Zeiten wurden Portionen davon genommen, durch Erhitzen koaguliert. 100 ccm des Filtrats wurden zur Bestimmung der Phosphorsäure, die als



gewogen wurde, verwendet.<sup>1)</sup>

Dauer der Digestion	$\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
17 Stunden bei 20°	42 mg
1 Tag » 40°	90 »
2 Tage » 40°	138 »
3 » » 40°	150 »
11 » » 40°	142 »
17 » » 40°	145 »

<sup>1)</sup> Methode siehe Jones, loc. cit. Journ. Biol. Chem.

## Experiment X.

2160 ccm eines wässerigen Extraktes von Hundeleber wurden mit 15 g des Natriumsalzes von Thymusnucleinsäure versetzt und bei 40° digeriert. Das Nucleinsäuresalz enthielt 23% Asche. 10 g der Nucleinsäure gaben nach Hydrolyse mit Schwefelsäure 597 mg Adenin (berechnet vom Pikrat) und 566 mg Guanin. 1 g gab 415 mg  $MgNH_4PO_4 \cdot 6 H_2O$ . Diese Werte wurden zur Feststellung der angegebenen berechneten Mengen benützt.

Nach siebentägiger Verdauung bei 40° wurde ein Teil der Mischung erhitzt und filtriert und 100 ccm des Filtrats zur Bestimmung der Phosphorsäure verwendet.

$MgNH_4PO_4 \cdot 6 H_2O$  von Thymusnucleinsäure

Berechnet: 374 mg                      Gefunden: 370 mg

Gefunden in toto:                      515 mg

Davon ab für Drüse (siehe Exp. IX): 145 ,

Von Nucleinsäure: 370 mg.

## Experiment XI.

Wie X, Dauer der Verdauung 12 Tage bei 40°.

$MgNH_4PO_4 \cdot 6 H_2O$  von Nucleinsäure

Berechnet: 374 mg                      Gefunden: 360 mg

Gefunden in toto:                      505 mg

Davon ab für Drüse: 145 ,

Von Nucleinsäure: 360 mg.

## Experiment XII.

690 ccm der Mischung beschrieben in X wurden zur Bestimmung der Purinbasen verwendet. Verdauung sieben Tage bei 40°.

Adenin                      Gefunden: 0

Guanin                      ,                      0.

Xanthin von Nucleinsäure

Berechnet: 271 mg                      Gefunden: 257 mg

Xanthin                      Gefunden in toto: 338 mg

Davon ab Xanthin von Drüsenextrakt: 81 ,

Xanthin von Nucleinsäure: 257 mg.

## Hypoxanthin von Nucleinsäure

Berechnet: 286 mg	Gefunden: 286 mg
Hypoxanthin	Gefunden in toto (vom Nitrat berechnet): 367 mg
Davon ab Hypoxanthin von Drüsenextrakt:	81 »
Hypoxanthin von Nucleinsäure: 286 mg.	

## Experiment XIII.

Wie XII. Die Verdauungsprodukte wurden mit Schwefelsäure gekocht und dann die Purinbasen bestimmt.

Adenin	Gefunden: 0
Guanin	» 0
Xanthin	» 340 mg
Hypoxanthin	» 361 »

Die Übereinstimmung der Resultate von XII und XIII zeigt, daß die Nucleoside der Einwirkung von Extrakten der blutlosen Hundeleber unterliegen, im frappanten Gegensatz zu ihrem Verhalten gegenüber dem Schweinepankreas.

## Experiment XIV.

Hundeleberextrakt 1000 ccm mit 14 g Natriumnucleats versetzt. Digestion 10 Tage bei 40°. 640 ccm des gekochten und filtrierten Produktes zur Bestimmung der Purinbasen verwendet.

Adenin	Gefunden: 0
Guanin	» 0.

## Xanthin von Nucleinsäure

Berechnet: 507 mg	Gefunden: 436 mg
Xanthin	Gefunden in toto: 510 mg
Davon ab Xanthin von Drüsenextrakt:	74 »
Xanthin von Nucleinsäure: 436 mg.	

## Hypoxanthin von Nucleinsäure

Berechnet: 534 mg	Gefunden: 529 mg
Hypoxanthin	Gefunden in toto: 603 mg
Davon ab Hypoxanthin von Drüsenextrakt:	74 »
Hypoxanthin von Nucleinsäure: 529 mg.	

Es ist somit festgestellt, daß Hundeleberextrakt Hypoxanthin quantitativ von Thymusnucleinsäure

abspaltet, während er unfähig ist, Adenin in Hypoxanthin umzuwandeln.

Die von uns gebrauchte Nomenklatur ist die von Levene und seinen Mitarbeitern, die mit Pflanzennucleinsäuren arbeiteten, eingeführt. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die Nucleoside der Pflanzen- und Tiernucleinsäuren gewisse Verschiedenheiten bieten. Jedoch scheinen diese Unterschiede mit Bezug auf die hier diskutierten Fermente nicht in Betracht zu kommen, da die beschriebenen Resultate auch mit Pflanzennucleinsäure erhalten werden. Der folgende Versuch zeigte, daß die Wirkung von Hundeleberextrakt auf Hefenucleinsäure zur Bildung von Hypoxanthin ohne die intermediäre Bildung von Adenin führt.

#### Experiment XV.

Hundeleberextrakt 1000 ccm mit 15 g Mercks Hefenucleinsäure versetzt. Digestion 6 Tage bei 40°:

Adenin Gefunden: 0

Guanin „ 0.

In 100 ccm Extrakt  $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$  Gefunden: 0,995 g

Davon ab für Drüse: 0,145

Von 1,5 g Nucleinsäure: 0,85 g.

Von 580 ccm Extrakt Xanthin: 0,55 g

Davon ab für Drüse: 0,067

Von 8,7 g Nucleinsäure: 0,483 g

Von 580 ccm Extrakt Hypoxanthin als Nitrat: 0,58 g

Davon ab für Drüse: 0,067

Von 8,7 g Nucleinsäure: 0,513 g.