

Über den Abbau der Nucleinsäure durch Organfermente.

Von

Alfred Schittenhelm und Karl Wiener.

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik in Erlangen.)

(Der Redaktion zugegangen am 10. Januar 1912.)

In mehreren Arbeiten¹⁾ haben wir über gemeinsam mit E. S. London durchgeführte Untersuchungen berichtet, welche die Aufspaltung der Nucleinsäure durch die Fermente des Magendarmkanals zum Gegenstand hatten. Wir haben in diesen schon darauf hingewiesen, daß unsere Vorstellungen vom Abbau der Nucleinsäure, speziell von der Umsetzung der Purinbasen infolge der interessanten Entdeckungen von Levene eine Modifikation erfahren müssen. Der Befund von freiem Guanosin in der Pankreasdrüse und in anderen Organen, den Levene und Jacobs²⁾ erhoben, weist auf den Weg der Aufspaltung der Nucleinsäure bei der Organautolyse hin. Ihr weiterer Befund von der leichten Umwandlung von Adenosin in Inosin und von Guanosin in Xanthosin auf chemischem Wege machte es wahrscheinlich, daß innerhalb der Gewebe der weitere Abbau wenigstens zum Teil einen derartigen Weg nimmt.

Hier liegen inzwischen bereits Untersuchungen von Levene und Medigreceanu³⁾ vor, welche vergleichenderweise die Wirkung der Nuclease einerseits auf die komplexen Nucleinsäuren und andererseits auf ihre höheren Spaltprodukte studierten. Als Fermentquelle dienten ihnen die Preßsäfte von verschiedenen Organen (Leber, Niere, Pankreas, Herzmuskel), der Extrakt der Darmmucosa, Blut und Blutserum, sowie endlich Pawlowsche Verdauungssäfte des normalen Hundes. Sie fanden,

¹⁾ Diese Zeitschrift, 1910, Bd. 70, S. 10; 1911, Bd. 72, S. 459; 1912. vorstehende Arbeit.

²⁾ Biochem. Zeitschrift, 1910, Bd. 27, S. 127.

³⁾ Ber. d. Deutsch. chem. Ges., 1910, Jahrg. 43, S. 3150.

⁴⁾ Journ. of Biol. Chem., 1911, Bd. 9, S. 65, S. 375 und S. 389.

daß die Nuclease kein einheitliches Ferment darstellt, daß man vielmehr unterscheiden muß zwischen einer Nucleinase, welche die komplexen Nucleinsäuren zu Nucleotiden abbaut und überall vorhanden ist, ferner einer Nucleotidase, welche die Spaltung der Nucleotide bewirkt und überall enthalten ist mit Ausnahme des Magen- und Pankreassaftes, und endlich einer Nucleosidase, welche die Nucleoside in Zucker und Base aufspaltet und allen Organsäften mit Ausnahme des Blutes und der Fermente des Magendarmkanals zukommt.

Unsere Versuche mit den Fermenten des Magendarmkanals stehen, wie wir bereits in der vorstehenden Arbeit betonten, durchaus im Einklang mit allen Befunden von Levene und Medigreceanu. Auch wir haben nun unsere Versuche weitergeführt und auf intracelluläre Fermente ausgedehnt.

Durch die Untersuchungen von Araki, Schittenhelm, Sachs u. a. war das ubiquitäre Vorhandensein der Nuclease bewiesen.¹⁾ Die Untersuchungen von Levene und Medigreceanu erweitern diese Feststellungen. Interessant ist besonders ihr Befund, daß die Nuclease aus mehreren Fermenten besteht und daß das Blut die Nuclease im engeren Sinne (Nucleinase) und die Nucleotidase, nicht aber die Nucleosidase enthält. Damit ist die Nucleasentätigkeit geklärt.

Unsere Versuche beschäftigen sich zunächst mit der Rindermilz. Sie zeigen, daß aus ihr die Fermente, welche die Nucleasewirkung auf die Nucleinsäure entfalten, durch Ammonsulfatfällung zu isolieren sind, zusammen mit den Purindesaminasen und -Oxydasen, wie es seinerzeit von dem einen von uns angegeben wurde.²⁾ Dabei ergab sich der interessante Befund, daß die Aufspaltung bald unterbrochen wird, wenn die Spaltprodukte sich anhäufen; sobald diese durch gleichzeitige Dialyse entfernt werden, geht die Aufspaltung gleichmäßig bis zum Ende weiter. Die Spaltprodukte entfalten also offenbar eine hemmende Wirkung auf die Tätig-

¹⁾ Eine Zusammenstellung z. B. A. Schittenhelm in Oppenheimers Handbuch der Biochemie. 1908, Bd. IV, S. 491. und bei Brugsch-Schittenhelm, Der Nucleinstoffwechsel und seine Störungen, Jena 1910.

²⁾ Diese Zeitschrift. 1904, Bd. 43, S. 225.

keit dieser Fermentgruppe, ähnlich wie wir es ja bereits von anderen Fermenten kennen, z. B. der Hemmung des Pankreasfermentes durch Anhäufung von Eiweißspaltprodukten. Es ist übrigens zu bemerken, daß die wässerigen Lösungen der isolierten Fermente, wie bereits früher beobachtet wurde, auch nach unseren neuerlichen Erfahrungen nur eine beschränkte Wirkungsdauer haben und also frisch zu benützen sind. Diese Beobachtung von der Hemmung der Nucleasefermentprozesse durch Abbauprodukte erklären frühere Erfahrungen von Schittenhelm,¹⁾ der fand, daß bei Zugabe von thymonucleinsaurem Natrium zu Extrakten von Rinderorganen höchstens $\frac{2}{3}$ (öfter weniger) der in dem angewandten Präparat enthaltenen Purinbasen zu Harnsäure umgesetzt wurden, während freie Aminopurine denselben Extrakten zugesetzt und unter den gleichen Versuchsbedingungen quantitativ in Harnsäure übergeführt wurden. Die hemmenden Stoffe sind also offenbar die höheren Spaltprodukte.

Die Aufspaltung der Nucleinsäure geht nach unseren Beobachtungen über die Nucleoside. Die Umsetzung der Aminopurine in Oxypurine, speziell des Guanins in Xanthin kann auf zwei Wegen vor sich gehen. Entweder wird das Nucleosid zunächst aufgespalten und dann erst wirkt die Desamidase ein, oder aber das Guanosin wird bereits im Nucleosidmolekül desamidiert und dann erst geschieht die Aufspaltung desselben. Daß beide Prozesse in der Rindermilz nebeneinander verlaufen, dafür sprechen auch Beobachtungen von Levene und Medigreceanu und von Jones.²⁾ An weiteren Versuchen verfolgten wir den Einfluß von wässerigem Rindermilzextrakt auf zugesetztes Guanosin mit und ohne Luftdurchleitung. Die Umsetzung des darin enthaltenen Guanins in Xanthin und Harnsäure geht glatt vor sich.

Wir haben ferner Versuche mit der Milz und der Leber vom Schweine angestellt. Sie bedürfen allerdings noch einer weiteren Durcharbeitung, die wir bis jetzt aus äußeren Gründen nicht ausführen konnten. Es geht aus ihnen aber soviel hervor.

¹⁾ Diese Zeitschr. 1904, Bd. 42, S. 253.

²⁾ Journ. of biol. Chem. 1911, Bd. 9.

daß die Schweinemilz das freie Guanosin, wenn es in größerer Menge zugesetzt ist, nur schwer angreift, so daß wir die größte Menge unzersetzt wiederfanden. Zugesezte Thymonucleinsäure wurde besser verarbeitet, wobei freies Guanin und freies Xanthin auftrat. Ähnliche Resultate gaben die Versuche mit Schweineleber. Im Guanosinversuch zeigte sich eine Aufspaltung der größeren Menge des zugegebenen Guanosins unter Auftreten von freiem Guanin, das nicht weiter angegriffen wurde; ein beträchtlicher Teil des Guanosins war ungespalten geblieben (Hemmung?). Xanthin war nur in kleinen Mengen aufgetreten. In einem zweiten Versuch fand sich eine lebhaftere Desamidierung des Guanins. Der Versuch mit Thymonucleinsäure zeigt gleichfalls eine intensive Aufspaltung unter Auftreten von freiem Guanin und weniger Xanthin. In allen Versuchen waren auch kleine Mengen von Xanthin in organischer Bindung vorhanden. Darin liegt ein Fingerzeig dafür, daß die Desamidierung des Guanins zu Xanthin bei diesen Schweineorganen im Guanosinmolekül vor sich geht.

Wir müssen hier auf frühere Versuche von Schittenhelm und Schmid¹⁾ zurückgreifen, welche zu heftigen Differenzen mit Jones geführt haben. Jones²⁾ erklärte die Desamidierung von Guanin in der Schweinemilz und Schweineleber für absolut ausgeschlossen, während Schittenhelm und Schmid sie für vorliegend erklärten. Sie stützten sich vornehmlich auf Versuche, in denen sie Thymonucleinsäure zugaben, und auf solche, in denen sie die Umsetzung der in den Organen bereits vorhandenen Nucleine verfolgten. Sie kamen zu dem Schlusse, daß das in organischer (namentlich in körpereigener) Bindung vorhandene Guanin relativ leicht desamidiert wird, während das freie Guanin, wie es Jones angab, wenn überhaupt, nur in ganz geringem Maße umgesetzt würde.

Inzwischen hat nun auch Jones³⁾ ähnliche Beobachtungen gemacht sowohl am Schweineleberextrakt wie auch an den

¹⁾ Zeitschrift für exper. Pathol. u. Ther., 1907, Bd. 4, S. 432. und Diese Zeitschrift, 1905, Bd. 46, S. 354.

²⁾ Diese Zeitschrift, 1905, Bd. 45, S. 84, und 1906, Bd. 48, S. 110.

³⁾ Diese Zeitschrift, 1911, Bd. 73, S. 408.

Extrakten von Hundeorganen. Damit sind die früheren Resultate von Schittenhelm und Schmid bestätigt. Entsprechend den neuen Erkenntnissen, welche den Entdeckungen von Levene entstammen, muß man als Erklärung, wie es schon Jones machte, annehmen, daß die Desamidierung von Guanin in jenen Organen nur vor sich geht, so lange es sich noch in organischer Bindung befindet. Dasselbe gilt in gewissen anderen Organen (z. B. des Hundes) für die Desamidierung von Adenin zu Hypoxanthin. Das führt zur Annahme verschiedener Fermente. Wir brauchen uns darüber nicht zu verbreiten, nachdem Jones bereits ausführlich die Verschiedenheit der Fermente hervorgehoben hat, je nachdem es sich um die Desamidierung von freien oder von gebundenen Purinkörpern handelt. Man muß also neben den Purindesamidasen Nucleosiddesamidasen unterscheiden.

Experimenteller Teil.

Versuch I.

10 g Thymonucleinsäure wurden in 300 ccm Wasser gelöst und hierzu 400 ccm einer Rindermilzfermentlösung zugefügt, die nach den Angaben des einen von uns¹⁾ hergestellt war. Die Flüssigkeit wurde mit Toluol versetzt und vom 1.—18. IX. 11. in den Brutschrank gestellt. Am 9. IX. zeigte es sich, daß in der Lösung schwachsaure Reaktion aufgetreten war. Es wurde deshalb mit verdünnter Natriumcarbonatlösung neutralisiert.

Am 9. und 18. IX. wurden der Flüssigkeit Proben entnommen, eine Gesamtstickstoffbestimmung und eine Bestimmung des Stickstoffgehalts der Bleifractionen vorgenommen. Die Werte sind in Kubikzentimeter $n_{10}^{\text{H}_2\text{SO}_4}$ für 10 ccm angegeben.

	9. IX.	18. IX.
Gesamtstickstoff:	12,2	15,5
I. Bleifällung:	10,1	11,0
II. Bleifällung:	2,1	2,5

¹⁾ Diese Zeitschrift, 1904. Bd. 43. S. 228.

Am 18. IX. waren geringe Mengen von freien Purinbasen mit ammoniakalischer Silberlösung nachzuweisen.

Aus dem Versuch geht hervor, daß eine Fermentwirkung deutlich vorhanden ist, die aber nach kurzer Zeit nicht mehr fortschreitet.

Versuch II.

10 g Thymonucleinsäure wurden in 300 ccm Wasser gelöst und 400 ccm Rindermilzfermentlösung zugefügt. Das Ganze wurde in einen Dialysierschlauch getan und im Brutschrank gegen Wasser dialysiert. Das Wasser wurde täglich gewechselt und die in ihm enthaltene Stickstoffmenge bestimmt. Die Flüssigkeit in- wie außerhalb des Dialysierschlauchs wurde mit Toluol versetzt.

Datum	Menge des Dialysats ccm	ccm H ₂ SO ₄ für 20 ccm	Gesamt-N g	Bemerkungen
12. IX.	1500	1.1	0,1540	P ₂ O ₅ +. In der I. Pb-Fällung kein N
13.	1510	0.5	0,0529	
14.	1280	1.3	0,1165	
15.	1300	1.2	0,1092	
16.	1490	1.7	0,1774	
17.	1470	2.4	0,1764	NH ₃ vorhanden
18.	1430	2.3	0,1645	
19.	1480	1.7	0,1761	
20.	2100	2.0	0,1174	
21.	1360	1.8	0,1715	50 ccm verbrannt

Am 21. IX. wurde die Dialyse unterbrochen. Die Zahlen für diesen Tag gelten für den Inhalt des Dialysierschlauchs. Freie Nucleinsäure konnte weder mit Kupfersulfat noch mit Eisessig nachgewiesen werden. Die I. Bleifällung enthielt keinen Stickstoff mehr; die II. ammoniakalische Bleifällung war sehr stark. Sämtliche Dialysate wurden vereinigt, im Vakuum zur Trockene verdampft und mit Ammoniak aufgenommen. Von den ungelösten Salzen wurde abgenutscht, mit Alkohol gefällt und filtriert. Aus dem Niederschlag konnten 0,02 g Xanthin

isoliert werden. Das Filtrat wurde im Vakuum stark eingengt. Hierbei fielen 0,01 g einer gut krystallisierenden Substanz aus, die nicht identifiziert werden konnte.

Aus dem Filtrat hiervon ließ sich keine krystallisierende Substanz gewinnen. Es wurde deshalb mit 10%iger Salzsäure 2 Stunden am Rückflußkühler erhitzt, eingedämpft und mit Ammoniak aufgenommen, wobei alles in Lösung ging. Beim Einengen schieden sich 0,13 g Xanthin aus.

Der Versuch zeigt, daß die Spaltung der Nucleinsäure gut vor sich geht und bis zum Ende durchgeführt werden kann, wenn die Spaltprodukte durch Dialyse dauernd entfernt werden. Die Umsetzung der Purinbasen geht bis zum Auftreten freier Oxypurine (Xanthin) vor sich, wobei als Zwischenstufe Xanthin in organischer Bindung vorhanden ist, was das Auffinden von Xanthin im Endfiltrat nach dessen Säurehydrolyse erweist.

Versuch III.

Es wurde ein frischer wässriger Rindermilzextrakt hergestellt.

a) 300 ccm von diesem wurden unter Toluolzusatz 8^h unter Luftdurchleiten bei 40° stehen gelassen. Die Purinkörper wurden, wie üblich, nach Enteiweißung mit der Kupferbisulfitmethode isoliert. Es wurden hieraus 0,15 g Harnsäure isoliert.

b) Weiterhin wurden 300 ccm Rindermilzextrakt mit 0,6 g in wenig Normalnatronlauge gelöstem Guanosin¹⁾ 8^h lang bei 40° unter Luftdurchleitung mit Toluol stehen gelassen. Es wurden 0,35 g Harnsäure isoliert.

c) Endlich wurden 300 ccm Rindermilzextrakt mit 0,6 g in wenig Normalnatronlauge gelöstem Guanosin versetzt und mit Toluol unter häufigem Umschütteln 3 Tage im Brutschrank stehen gelassen. Es wurden 0,15 g Xanthin isoliert.

¹⁾ Das Guanosin haben wir uns aus Hefenucleinsäure nach den Leveneschen Angaben hergestellt. Die Darstellung ging glatt und leicht vor sich.

Die Versuche beweisen, daß die Fermente der Rindermilz Guanosin aufspalten und das freie Guanin über Xanthin in Harnsäure überführen.

Versuch VI.

Es wurde ein Extrakt aus Schweinemilz hergestellt und 2 Tage gegen fließendes Wasser dialysiert.

a) 100 ccm wurden mit 5 ccm konzentrierter H_2SO_4 versetzt und 6 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Es waren nur Spuren von Purinbasen vorhanden.

b) Zu 300 ccm des Extraktes wurden 1 g Guanosin in 4 ccm n-NaOH gelöst hinzugefügt und das Ganze mit Toluol unter öfterem Umschütteln 24 Stunden im Brutschrank stehen gelassen. Die Flüssigkeit wurde dann unter Zusatz von Essigsäure bei Siedehitze enteiweißt. Das Filtrat von den Eiweißkoagula enthielt keine freien Purinbasen. Die Flüssigkeit wurde hierauf mit 25%iger Bleiacetatlösung unter Vermeidung eines Überschusses gefällt und das Filtrat hiervon solange mit Ammoniak und Bleiacetatlösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr entstand. Der Bleiniederschlag wurde in heißem Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff bei Wasserbadtemperatur zersetzt und das Filtrat im Vakuum zur Trockene verdampft. Der Rückstand wurde mit Ammoniak aufgenommen, vom Ungelösten abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingeeengt. Es wurden 0,57 g einer gelbgefärbten Substanz erhalten, die eine starke Orcinreaktion gab, Guanin enthielt und phosphorsäurefrei war. Es handelte sich also um wiedergewonnenes Guanosin.

c) 100 ccm eines frischen Milzextraktes wurden mit Toluol 3 Tage im Brutschrank stehen gelassen. Es waren darnach nur Spuren von Purinbasen vorhanden.

d) 250 ccm dieses Extraktes wurden mit 5 g thymonucleinsaurem Natrium in 150 ccm Wasser gelöst versetzt und unter Toluolzusatz 3 Tage im Brutschrank stehen gelassen. Es wurde 0,1 g Guanin und 0,18 g Xanthin isoliert. Nach 6stündigem Kochen mit 5%iger konzentrierter Schwefelsäure konnten keine Purinbasen nachgewiesen werden.

Versuch VII.

a) 100 ccm eines Extraktes aus Schweineleber, das 2 Tage gegen fließendes Wasser dialysiert war, wurden mit 5%iger konzentrierter Schwefelsäure 6 Stunden gekocht. Es waren nur Spuren von Purinbasen vorhanden.

b) 300 ccm dieses Extraktes wurden mit 1 g in 4 ccm n-Natronlauge gelösten Guanosins versetzt und 24 Stunden mit Toluol unter öfterem Umschütteln im Brutschrank stehen gelassen. Darnach wurde die Flüssigkeit wie üblich verarbeitet und 0,35 g Guanin und 0,01 g Xanthin isoliert. Nach 6 stündiger Hydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure wurden 0,08 g Guanin und 0,01 g Xanthin erhalten.

c) Ein analoger Versuch wurde mit 500 ccm eines frischen Leberextraktes bei 3tägiger Brutschrankverdauung angesetzt. Es wurden 0,13 g Guanin und 0,13 g Xanthin erhalten. Nach 6stündiger Hydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure wurden noch 0,02 g Guanin und 0,015 g Xanthin isoliert.

d) 200 ccm dieses Leberextraktes enthielten nach dreitägiger Brutschrankverdauung 0,01 g Guanin und 0,01 g Xanthin.

e) 500 ccm des gleichen Extraktes mit 5 g in 150 ccm Wasser gelösten thymonucleinsauren Natriums wurden mit Toluol unter häufigem Umschütteln 3 Tage im Brutschrank stehen gelassen. Es wurden 0,34 g Guanin erhalten. Xanthin war vorhanden. Seine Menge konnte jedoch infolge eines Unfalls nicht festgestellt werden. Nach Hydrolyse wurden noch 0,02 g Guanin und 0,015 Xanthin erhalten.