

# **Das Verhalten einiger Nucleinsäuren zu glukosidspaltenden Fermenten.**

Von  
**Helene Tschernorutzky.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität in Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 27. Juli 1912.)

Daß in der echten Nucleinsäure die Alloxurbasen mit der Kohlenhydratgruppe in glukosidartiger Bindung vorkommen, ist zuerst von H. Steudel gelegentlich der Spaltung der echten Nucleinsäure mit Salpetersäure<sup>1)</sup> bewiesen worden. Durch die Einwirkung starker Salpetersäure in der Kälte erhielt er einerseits eine Krystallisation der Nitrate der Nucleinbasen Guanin und Adenin, andererseits eine Kupferoxyd in alkalischer Lösung kräftig reduzierende Flüssigkeit; es mußten also ursprünglich in der Nucleinsäure die Alloxurbasen durch Vermittelung der Aldehyd- resp. Ketongruppe mit dem Kohlenhydrat verknüpft sein. Eine Bestätigung dieser Ansicht ist durch die Untersuchungen an den einfacher gebauten Körpern der Nucleinsäuregruppe, Inosinsäure und Guanylsäure, und durch die Auffindung des Inosins und des Vernins als Spaltungsprodukte derselben geliefert worden.

Es lag nun nahe, die Einwirkung glukosidspaltender Enzyme auf die verschiedenen Nucleinsäuren zu untersuchen; möglicherweise fand sich unter denselben doch das eine oder andere, das das Molekül der Nucleinsäure in analoger Weise angreifen würde wie die Glukoside. Damit wäre die Möglichkeit gegeben, nach Abspaltung der Alloxurbasen auf fermentativem Wege zu demjenigen Komplex zu kommen, der zuerst von A. Kossel<sup>2)</sup> und

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 55, S. 407.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 22, S. 74.

A. Neumann als Thyminsäure beschrieben und später von H. Steudel<sup>1)</sup> und P. Brigl eingehender untersucht worden ist.

Auf Veranlassung von Herrn Professor H. Steudel habe ich nun zunächst die Einwirkung des Emulsins auf die verschiedenen Nucleinsäuren untersucht.

Das Emulsin wurde teils von Merck, teils von Kahlbaum bezogen, ein wesentlicher Unterschied in den beiden Präparaten konnte nicht konstatiert werden. Ob überhaupt eine Einwirkung des Emulsins auf die Nucleinsäure stattfand, wurde durch Verfolgung der optischen Aktivität der Lösungen im Polarisationsapparat bestimmt. Es zeigte sich, daß sowohl das hefenucleinsaure Natron wie auch das Natronsalz der echten Nucleinsäure von Emulsin deutlich angegriffen wurden.

I. Hefenucleinsaures Natron	5,0 g	Die Lösung wurde unter Zugabe von Toluol im ver- schlossenen Kolben im Brutschrank bei 57° auf- bewahrt.
Emulsin	1 g	
Destilliertes Wasser	100 ccm	

Klar filtrierte Proben dieser Lösung zeigten im 10 cm-Rohr folgende Drehungswinkel:

Anfangs	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	6. Tag	8. Tag
+ 5,0°	+ 4,45°	+ 3,68°	+ 3,45°	+ 2,95°	+ 2,62°	+ 1,98°

Eine Lösung von 5 g hefenucleinsaurem Natron in 100 ccm Wasser zeigte während der Zeit die konstante Drehung von + 5,18°.

II. Es wurde eine gleiche Lösung wie zum ersten Versuch bereitet, ferner wurde eine Lösung von 1 g Emulsin in 100 ccm Wasser unter denselben Bedingungen untersucht, drittens eine Lösung von 1 g Emulsin in 100 ccm Wasser, die aufgeköcht war und in der das Ferment abgetötet war, nach Zugabe von 5 g hefenucleinsaurem Natron.

Die Emulsinlösung allein zeigte eine unveränderte Drehung von - 0,18°, die Lösung des hefenucleinsaurem Natrons in

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 70, S. 398.

der gekochten Emulsinlösung konstant  $+ 4,98^\circ$ , eine Lösung von 5 g hefenucleinsaurem Natron in 100 ccm Wasser unverändert  $+ 5,10^\circ$ , dagegen nahm unter der Einwirkung des Fermentes bei Brutschranktemperatur das Drehungsvermögen der Lösung des hefenucleinsaurem Natrons dauernd ab.

Anfangs	1. Tag	2. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag
$+ 4,90^\circ$	$+ 4,0^\circ$	$+ 3,44^\circ$	$+ 2,70^\circ$	$+ 2,36^\circ$	$+ 2,01^\circ$	$+ 1,91^\circ$
	11. Tag	13. Tag	15. Tag	20. Tag	28. Tag	
	$+ 1,07^\circ$	$+ 0,92^\circ$	$+ 0,82^\circ$	$+ 0,50^\circ$	$+ 0,26^\circ$	

Das Natronsalz der echten Nucleinsäure zeigte das gleiche Verhalten, doch erfolgte die Abnahme der Drehung langsamer.

III. Eine Lösung von 2,5 g nucleinsaurem Natron aus Thymus in 100 g Wasser  $+ 1$  g Emulsin lieferte folgende Zahlen:

Anfangs	1. Tag	2. Tag	10. Tag	16. Tag
$+ 1,76^\circ$	$+ 1,60^\circ$	$+ 1,55^\circ$	$+ 1,45^\circ$	$+ 1,20^\circ$

Eine Kontrolllösung mit gekochtem Ferment zeigte unverändert einen Drehungswinkel von  $+ 1,77^\circ$ , eine Lösung von nucleinsaurem Natron in Wasser ebenso  $+ 1,88^\circ$ .

Ich habe ferner versucht, die Einwirkung von Emulsin auf guanylsaures Natron zu bestimmen, die Versuche scheiterten aber vorläufig an der Schwerlöslichkeit der Substanz in Wasser. War wirklich im besten Falle eine Lösung des guanylsauren Natrons nach vielfachem Umfällen der Substanz erreicht, eine Lösung, die tagelang bei Zimmertemperatur unverändert blieb, so gelatinierte sie im Brutschrank während der Einwirkung des Fermentes zu einer undurchsichtigen weißlichen Masse, an der sich keine Drehungsbestimmungen ausführen ließen.

Wegen ihrer Schwerlöslichkeit in Wasser bei neutraler Reaktion konnte auch nicht die Einwirkung des Emulsins auf Inosin und Vernin näher untersucht werden.

In ähnlicher Weise wie Emulsin wirkt auch Myrosin auf Hefenucleinsäure ein.

IV. Eine Lösung von 10 ccm eines 10%igen Senfsamenauszugs, 5 g hefenucleinsauren Natrons und 100 ccm Wasser zeigten folgende Drehungswinkel:

Anfangs	Nach 1 Tag	Nach 2 Tagen	Nach 4 Tagen	Nach 5 Tagen	Nach 7 Tagen	Nach 11 Tagen	Nach 15 Tagen
+ 4,45°	+ 3,97°	+ 3,77°	+ 3,36°	+ 3,28°	+ 2,98°	+ 2,42°	+ 1,86°

Eine Kontrollprobe mit Wasser blieb unverändert, ebenso eine Kontrollprobe mit abgetötetem Ferment.

V. Ein anderer Senfsamenauszug erwies sich gleichfalls wirksam. Es wurden die gleichen Mengenverhältnisse wie bei IV angewandt:

Anfangs	Nach 1 Tag	Nach 2 Tagen	Nach 8 Tagen	Nach 14 Tagen	Nach 25 Tagen	Nach 30 Tagen
+ 4,45°	+ 4,00°	+ 3,65°	+ 3,43°	+ 2,30°	+ 1,60°	+ 1,00°

VI. Dagegen wirkte die in V benutzte Fermentlösung nicht auf das Natronsalz der echten Nucleinsäure ein: eine Lösung von 2,5 g davon in 100 ccm Wasser + 10 ccm 10%iger Senfsamenauszug zeigte während 25 Tagen die gleiche Drehung von + 1,80°.

Da durch diese Versuche ein auffallender Unterschied in dem Verhalten der echten Nucleinsäure gegen Emulsin und Myrosin zutage getreten war, habe ich vergleichsweise hier eine Untersuchung mit Hefepreßsaft angeschlossen. Soviel sich aus den Drehungbestimmungen entnehmen läßt, wird auch von den im Hefepreßsaft enthaltenen Fermenten die echte Nucleinsäure nicht angegriffen.

VII. Eine Lösung von 2,5 g nucleinsauren Natrons aus Thymus in 100 ccm Wasser + 10 ccm Hefepreßsaft zeigte während 26 Tagen unverändert im 10 cm-Rohr ein Drehungsvermögen von + 1,75°.

Daß dagegen in dem gleichen Preßsaft Fermente vorhanden waren, die die Hefenucleinsäure angriffen, ergaben folgende Versuche.

VIII. Eine Lösung von 5 g Hefenucleinsäure Natron in 100 ccm Wasser + 10 ccm Hefepreßsaft nahm dauernd an Drehungsvermögen ab:

Anfangs	Nach 1 Tag	Nach 2 Tagen	Nach 5 Tagen	Nach 8 Tagen	Nach 10 Tagen	Nach 15 Tagen
+ 4,80°	+ 4,60°	+ 4,58°	+ 3,70°	+ 3,42°	+ 3,22°	+ 2,45°

Eine zweite Lösung, in gleicher Weise wie die erste bereitet, gab folgendes Resultat:

Anfangs	Nach 1 Tag	Nach 2 Tagen	Nach 4 Tagen	Nach 6 Tagen	Nach 12 Tagen
+ 4,70°	+ 4,65°	+ 4,60°	+ 4,30°	+ 4,05°	+ 3,55°

Nachdem somit festgestellt war, daß das Emulsin sowohl die Hefenucleinsäure wie auch die echte Nucleinsäure angriff, wurden, um die Natur dieser Veränderung zu untersuchen, größere Portionen der Substanzen der Einwirkung von Emulsin überlassen. Die eigenartigen Unterschiede zwischen Hefenucleinsäure und echter Nucleinsäure gegen Myrosin und Hefepreßsaft ließen die Vermutung aufkommen, daß auch beim Emulsin die Enzymwirkung nicht der speziellen Wirkung des glukosidspaltenden Fermentes «Emulsin» zukam, sondern daß in den käuflichen Präparaten gewisse Mengen von Nucleasen vorhanden waren. Einen Hinweis in dieser Richtung bot das Verhalten der bei Versuch III benutzten Lösung: hier war nämlich nach 16 Tagen in 10 ccm der Lösung 5,72 mg anorganische Phosphorsäure als  $P_2O_5$  berechnet nachweisbar, während in der Kontrollprobe mit gekochtem Ferment nur 0,84 mg  $P_2O_5$  vorhanden waren.

Es wurden also 50 g Hefenucleinsäure Natron in 1000 ccm Wasser gelöst, 10 g Emulsin und reichlich Toluol hinzugesetzt und in wohlverschlossener Flasche im Brutschrank bei 37° gehalten. Die Lösung, die am 14. Mai bereitet war, zeigte im 10 cm-Rohr eine Anfangsdrehung von + 5,0° und nahm allmählich am Drehungsvermögen ab.

5. Juni + 0,43°    14. Juni ± 0°    5. Juli ÷ 0,20°

Am 5. Juli, als eine schwache, aber deutliche Linksdrehung zu konstatieren war, wurde der Versuch abgebrochen; die Lösung enthielt noch reichlich wirksames Emulsin, denn wenige Tropfen der Lösung spalteten rasch und energisch hinzugefügtes Amygdalin.

Es wurde jetzt zunächst bestimmt, wieviel Phosphorsäure aus der Nucleinsäure abgespalten war. Dazu wurde der Gesamtphosphor nach Neumann bestimmt.

5 ccm sättigen 36,6 ccm  $n/2$ -NaOH = 0,02026 g P

5 „ „ 36,3 „  $n/2$ -NaOH = 0,02009 „ P.

In weiteren Portionen wurde die anorganische Phosphorsäure mit Magnesiamixtur gefällt, der Niederschlag in Salpetersäure gelöst und nun die Phosphorsäure als phosphormolybdänsaures Ammoniak bestimmt.

10 ccm = 33,0 ccm  $n/2$ -NaOH = 0,0183 g P.

10 „ = 32,9 „  $n/2$ -NaOH = 0,0182 „ P.

Zur Kontrolle wurde die anorganische Phosphorsäure auch nach Stutzer<sup>1)</sup>-Neumann bestimmt. Ich habe dies ausgeführt, ebenso wie die etwas umständliche vorstehende Bestimmung der Phosphorsäure, weil ich nicht von der absoluten Reinheit des auf dem gewöhnlichen Wege gewonnenen Magnesiumpyrophosphates überzeugt war. Es lag der Verdacht vor, daß durch den Zusatz der 10 g Emulsin viel Calcium in die Lösung hineingekommen war.

10 ccm = 33,4 ccm  $n/2$ -NaOH = 0,01848 g P

10 „ = 33,1 „  $n/2$ -NaOH = 0,01832 „ P.

Im Durchschnitt waren also 45% des Phosphors als anorganischer Phosphor während der Digestion abgespalten.

Die gesamte, schwach sauer reagierende Flüssigkeit (sie betrug jetzt noch 920 ccm) wurde nunmehr aufgekocht, und die noch unzersetzte Nucleinsäure aus ihr mit Kupfersulfatlösung entfernt. Aus dem Filtrat wurde das Kupfer mit Schwefelwasserstoff ausgefällt, aus dem neuen Filtrat der überschüssige Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom entfernt und dann die Phosphorsäure durch Zusatz von Baryt niedergeschlagen. Das Filtrat vom Baryumphosphat wurde mit Salpetersäure

<sup>1)</sup> Stutzer, Biochem. Zeitschrift, Bd. 7, S. 471, 1908.

schwach angesäuert und mit Silbernitrat ausgefällt. Die Silbernitratverbindungen der Alloxurbasen wurden durch Digestion mit Ammoniak in die Silberverbindungen übergeführt, diese gut mit Wasser gewaschen und mit Salzsäure zersetzt. Aus dem Filtrat vom Chlorsilber fiel auf Zusatz von Ammoniak ein weißer Niederschlag von Guanin aus, das abgesaugt, in Natronlauge gelöst und mit Essigsäure wieder ausgefällt wurde. Nach dem Trocknen mit Alkohol und Äther betrug seine Menge 1,4402 g.

0,1050 g sättigen 34,2 ccm  $\frac{n}{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 45,7% N (Kjeldahl)

0,1100 „ „ 35,9 „  $\frac{n}{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 45,7% N ( „ )

Berechnet für Guanin 46,3% N.

Das ammoniakalische Filtrat vom Guanin wurde mit Salzsäure angesäuert und mit Natriumpikrat ausgefällt. Der Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen, mit Alkohol und Äther getrocknet, wog 3,42 g und zeigte einen Schmelzpunkt von 282°. Es entsprechen dem Niederschlag 1,27 g Adenin.

Aus dem Filtrate vom Adeninpicrat konnte mit ammoniakalischer Silberlösung noch ein Niederschlag erhalten werden, seine Menge war aber so gering, daß sich eine weitere Verarbeitung nicht lohnte.

Ein zweiter Versuch, der mit hefenucleinsaurem Natron angesetzt worden war, verlief ganz analog. Es waren dieselben Mengenverhältnisse genommen wie beim ersten Versuch. Das Drehungsvermögen sank von + 4,30° (4. Mai) allmählich auf 0°, betrug am 21. Mai ÷ 0,26°, am 5. Juni ÷ 0,40°.

In dieser Lösung waren etwa 70% des Phosphors als anorganischer Phosphor abgespalten worden.

Gesamtphosphor:

5 ccm sättigen 32,8 ccm  $\frac{n}{2}$ -NaOH = 0,01815 g P (Neumann)

5 „ „ 32,6 „  $\frac{n}{2}$ -NaOH = 0,01804 „ P ( „ )

Anorganischer Phosphor:

10 ccm = 0,0934 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> = 0,02607 g P

10 „ = 0,0942 „ Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> = 0,02622 „ P

10 „ = 44,9 ccm  $\frac{n}{2}$ -NaOH = 0,02485 „ P (Stutzer-Neumann)

10 „ = 44,5 „  $\frac{n}{2}$ -NaOH = 0,02463 „ P ( „ )

Auch hier konnten hauptsächlich Guanin und Adenin isoliert werden, daneben in sehr geringen Mengen Xanthin und Hypoxanthin; in diesem Versuch war es aber auch möglich, aus der Cytosinfraktion Uracil zu isolieren. Die Substanz kristallisierte in weißen Nadeln, hatte einen Schmelzpunkt über  $330^{\circ}$  und einen Stickstoffgehalt von 24,4%. Berechnet für Uracil 25,0%.

0,0742 g sättigen 12,9 ccm  $n_{10}$ -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 24,4% N (Kjeldahl).

Sucht man sich an der Hand der gewonnenen Zahlen ein Bild von dem Reaktionsverlauf zu machen, ein Bild, das natürlich nur annähernd sein und nur als erste Orientierung gelten kann, so ergibt sich folgendes, wenn wir den ersten Versuch unserer Betrachtung zugrunde legen:

Im ganzen sind nur 21,5 g hefenucleinsaures Natron durch die Digestion aufgespalten worden (aus der abgespaltenen Phosphorsäure berechnet<sup>1)</sup>). Wären diese 21,5 g hefenucleinsaures Natron vollständig gespalten, so hätten in der Lösung sich 2,95 g Guanin und 2,64 g Adenin vorfinden müssen. Im Versuch sind aber nur (auf 1000 ccm berechnet) 1,57 g Guanin und 1,38 g Adenin gefunden.

Hieraus ergibt sich, daß die Spaltung der Nucleinsäure nicht auf das im «Emulsin»pulver vorhandene glukosidspaltende Ferment zurückzuführen ist, sondern daß neben diesem noch Enzyme vorhanden sein müssen, die nucleaseartig wirken.

Die Untersuchung einer Digestionsflüssigkeit von nucleinsaurem Natron aus Thymus und Emulsin läßt den gleichen Schluß zu:

Es waren 25 g nucleinsaures Natron aus Thymus mit 10 g Emulsin in 1000 ccm Wasser unter Toluolzusatz 4 Wochen lang bei  $37^{\circ}$  digeriert worden. Die Drehung war im 10 cm-Rohr von  $+ 1,60^{\circ}$  auf  $+ 0,38^{\circ}$  gesunken. Während dieser Zeit waren 37% des Phosphors aus der organischen Bindung herausgelöst.

<sup>1)</sup> Den Berechnungen der Hefenucleinsäure ist die Kowalevskysche Formel zugrunde gelegt: C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>N<sub>13</sub>O<sub>23</sub>P<sub>3</sub> (Diese Zeitschrift, Bd. 69, S. 261, 1010).

Gesamtphosphor:

5 ccm sättigen 15,3 ccm  $n/2$ -NaOH = 0,00847 g P (Neumann)

5 „ „ 15,3 „  $n/2$ -NaOH = 0,00847 „ „ ( „ )

Anorganischer Phosphor:

10 ccm sättigen 11,4 ccm  $n/2$ -NaOH = 0,00631 g P (Stutzer-  
Neumann)

10 „ „ 11,2 „  $n/2$ -NaOH = 0,006199 „ P ( „ )

Die noch bleibenden 910 ccm wurden wie beim ersten Versuch aufgearbeitet und 0,6586 g Guanin und 0,9876 g Adenin-pikrat vom Schmelzpunkt  $279^{\circ}$  = 0,3664 g Adenin erhalten; das sind für 1000 ccm 0,7237 g Guanin und 0,4027 g Adenin.

Berechnet man sich unter Zugrundelegung der Steudelschen<sup>1)</sup> Nucleinsäureformel  $C_{43}H_{57}Na_4N_{15}P_4O_{34} + 9 H_2O$  die den 37% anorganischem Phosphor entsprechenden Mengen Nucleinsäure resp. Guanin und Adenin, so erhält man als verlangte Werte 0,7614 g Guanin und 0,6808 g Adenin.

Thymin und Cytosin konnten aus der entsprechenden Fraktion nicht isoliert werden.

Also auch hier ist durch die Digestion mit dem «Emulsin»-pulver eine erhebliche Abspaltung von Phosphorsäure zustande gekommen. Dieser entspricht die Abspaltung des Guanins, während die Abspaltung des Adenins wesentlich hinter der berechneten zurückgeblieben ist.

Die Pyrimidinkörper scheinen unter den von mir gewählten Versuchsbedingungen am schwersten abgespalten zu werden — erst bei sehr weitgehender Spaltung (70%) der Hefenucleinsäure konnte etwas Uracil aufgefunden werden —. Es wäre damit vielleicht ein Weg gegeben, auch aus der echten Nucleinsäure zu Pyrimidinglukosiden zu kommen.

Die Versuche werden von mir fortgesetzt.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. 77, S. 504.