

Über die Wirkung der Nuclease.

Von

P. de la Blanchardière, Ingénieur-Agronome.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 8. August 1913.)

Die Entstehung von Nucleinbasen bei der Autolyse nucleinhaltiger Organe ist schon seit langer Zeit auf eine fermentative Wirkung bezogen worden. Zum Studium dieser Wirkung hat man hauptsächlich zwei Methoden angewandt; erstens die Selbstverdauung der Organe¹⁾ und zweitens die Einwirkung verschiedener Organextrakte oder Sekrete — unter Umständen auch die Einwirkung von Bakterienkulturen — auf möglichst reine Nucleinsubstanzen. Für diese Forschungen eignet sich besonders die gelatinierende Form der Thymusnucleinsäure («a-Nucleinsäure»).

Aus diesen Arbeiten hat sich ergeben, daß gewisse Organextrakte ein Ferment enthalten, welches imstande ist, erstens das a-nucleinsaure Natron zu verflüssigen und zweitens diese Substanz weiter abzubauen, so daß die Purinbasen entstehen können.

Über die Eigenart dieses Ferments hat einige Zeit lang Zweifel geherrscht. Araki,²⁾ welcher zuerst die verflüssigende Wirkung von Organextrakten und von Trypsin und Erepsin auf das a-nucleinsaure Natron untersuchte, schrieb den letzteren Fermenten eine mehrfache Wirkung zu, nämlich erstens die proteolytische Wirkung, zweitens die verflüssigende Wirkung auf a-Nucleinsäure und drittens die weitergehende Zerlegung der letzteren in ihre Bausteine. Gegen diese Auffassung er-

¹⁾ Literatur siehe bei Araki, Diese Zeitschrift, Bd. 38, S. 84 (1903), und bei Sachs, ebenda, Bd. 46, S. 337 (1905).

²⁾ loc. cit.

hoben sich aber alsbald Bedenken. Iwanoff¹⁾ zeigte, daß das Trypsin keine Zersetzung der Nucleinsäure bis zum Auftreten der Phosphorsäure und der Nucleinbasen hervorruft und daß auch das verflüssigende Ferment mit dem proteolytischen Ferment nicht identisch ist. Zu ähnlichen Schlußfolgerungen führten auch die Versuche von Plenge,²⁾ welcher feststellte, daß gewisse Bakterien nur das α -nucleinsaure Natron, aber nicht die Gelatine verflüssigen, während bei anderen die proteolytische Wirkung in den Vordergrund tritt. Nakayama³⁾ sprach die Ansicht aus, daß das Trypsin nicht imstande ist, eine Zersetzung der Nucleinsäure herbeizuführen, wohl aber das Erepsin.

Auch Sachs⁴⁾ gelangte beim Studium des Pankreasextraktes zu dem Ergebnis, daß die Nuclease mit dem proteolytischen Ferment nicht identisch ist. Er stellte die interessante Tatsache fest, daß die Nuclease, welche in solchen Extrakten anfangs sehr wirksam ist, ihr Verflüssigungsvermögen allmählich verliert, was offenbar auf die Zerstörung der Nuclease durch Trypsin zurückzuführen ist. Auch Steudel⁵⁾ hat die Ansicht ausgesprochen, daß die Nucleinsäure verflüssigende Wirkung des Erepsins auf eine Beimengung von Nuclease zu beziehen ist.

Über die Verbreitung der Nuclease ist zu sagen, daß sie in Leber und Milz (Schittenhelm⁶⁾), Thymus (Sachs⁷⁾ und Steudel⁸⁾), Schilddrüse (Juschtschenko⁹⁾), Pankreasextrakt (Sachs), Hundepankreassaft (Abderhalden und Schittenhelm¹⁰⁾), Darm (Araki und Nakayama¹¹⁾) aufge-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 39, S. 31 (1903).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 39, S. 190 (1903).

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 41, S. 348 (1904).

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 46, S. 337 (1905).

⁵⁾ Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. 2, S. 590 (1910).

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 251 (1904).

⁷⁾ loc. cit.

⁸⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 55, S. 407 (1908).

⁹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 31, S. 377 (1911).

¹⁰⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 47, S. 452 (1906).

¹¹⁾ loc. cit.

funden wurde. Im Pflanzenreich kommt sie in Weizenembryonen (Zaleski¹⁾), *Corticellus edodes* (Kikkoji²⁾), einigen Schimmelpilzen (Iwanoff³⁾) und einer großen Anzahl von Bakterien (Plenge,⁴⁾ Schittenhelm und Schröter⁵⁾) vor.

Der Zweck der vorliegenden Arbeit ist der, mit Hilfe neuer Untersuchungsmethoden einige Einzelheiten der verflüssigenden und zersetzenden Wirkung der Nuclease festzustellen und die gegenseitigen Beziehungen der Fermente zu studieren.

Über die Verflüssigung des α -thymusnucleinsauren Natrons.

A. Methodik.

Gewöhnlich ist die verflüssigende Wirkung der Nuclease in folgender Weise untersucht worden: mit einigen Kubikzentimetern der zu untersuchenden Flüssigkeiten übergießt man eine Gallerte, die aus einer 4%igen Lösung von α -thymusnucleinsaurem Natron besteht. Nach einem bestimmten Aufenthalt in dem Brutschrank beobachtet man die Wirkung des Fermentes. Zweckmäßiger erschien es uns, eine weniger konzentrierte Lösung zu benutzen, und die Abnahme der Viscosität der Flüssigkeiten zu messen. Eine solche Methode ist im hiesigen Laboratorium von Spriggs⁶⁾ für die Untersuchung der proteolytischen Wirkung des Pepsins ausgearbeitet worden. Eine Vereinfachung seiner Technik ist in einigen Arbeiten der biologischen Versuchsanstalt in Wien angegeben worden, namentlich in der Arbeit von Schorr.⁷⁾ Sie besteht hauptsächlich darin, daß die Viscositätsmessungen unter dem gewöhnlichen Atmosphärendruck ausgeführt wurden. Bezüglich der Einzelheiten sei auf die Arbeit von Schorr verwiesen. Die Tem-

¹⁾ Ber. d. Deutsch. botan. Ges., Bd. 29, S. 146 (1911).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 51, S. 201 (1907).

³⁾ loc. cit.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 39, S. 190 (1903).

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 39, S. 203 (1903).

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 35, S. 465 (1902).

⁷⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. 37, S. 424 (1911). Siehe auch: Johanne Christiansen, Biochem. Zeitschrift, Bd. 47, S. 226 (1912).

peratur bei den Messungen wurde durch einen Thermostaten auf 35° erhalten. Die Schwankungen waren immer kleiner als $0,1^{\circ}$. Übrigens haben Vorversuche zu dem Ergebnis geführt, daß Schwankungen von $0,2-0,3^{\circ}$, im Verhältnis der Größe der Abnahme der Viscosität, ohne Bedeutung sind.

Bei der oben genannten Temperatur betrug die Durchströmungszeit für Wasser 142 Sekunden.

Es eignen sich am besten für ein solches Viscosimeter 2%ige Lösungen von α -thymusnucleinsaurem Natron. Sie bilden nämlich eine ziemlich viscöse Flüssigkeit, die jedoch, bei gewöhnlicher Temperatur, ganz flüssig bleibt. Man vermeide zu stark viscöse Flüssigkeiten anzuwenden, weil in ihnen das Vorhandensein sehr kleiner, fast unsichtbarer Partikel schwer zu vermeiden ist. Diese genügen, um Unregelmäßigkeiten in den Messungen zu erzeugen.

Das benützte Material war reines α -thymusnucleinsaures Natron, nach den Vorschriften von Neumann¹⁾ dargestellt.

Wenn nichts Näheres angegeben ist, sind die Versuche in folgender Weise ausgeführt worden:

3—5 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit werden zu 25 ccm einer 2%igen Lösung von α -thymusnucleinsaurem Natron hinzugesetzt. Das Gemisch wird in einem Brutschrank bei 35° , in gut verstopften Flaschen, unter Zusatz von etwas Toluol digeriert. Zur Messung der Viscosität entnimmt man 5 ccm der Flüssigkeit, filtriert sie durch ein trockenes Filter und bringt 3 ccm in das Viscosimeter. Man wartet 5 Minuten, bevor man die Messung macht, damit die Flüssigkeit die Temperatur des Thermostaten annimmt.

Es ist zu empfehlen, jedesmal 3 oder 4 Messungen zu machen, um sicher zu sein, daß die beobachtete Zahl konstant bleibt.

Die Vorteile der viscosimetrischen Methode sind folgende:

1. Es ist möglich, die Reaktion fortlaufend zu verfolgen.
2. Da man mit einer Flüssigkeit operiert, greift das Ferment in allen Teilen gleichmäßig an, und so verläuft die Reaktion viel regelmäßiger.

¹⁾ Hoppe-Seyler und Thierfelder, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 8. Aufl., S. 480.

B. Versuche.

Thymus.

30 g fein zerhackter Rinderthymus werden mit 40 ccm Wasser übergossen und nach halbstündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur filtriert. Das Filtrat wird in 2 Kolben, A und B, in folgender Weise verteilt:

A	{	25 ccm einer 2%igen Lösung a-thymusnucleinsaures Natron
	{	3 ccm des oben genannten Extraktes
	{	Toluol
B	{	25 ccm einer 2%igen Lösung a-thymusnucleinsaures Natron
	{	3 ccm des oben genannten, 10 Minuten lang in siedendem Wasser erhitzten Extraktes
	{	Toluol

Zeit (in Stunden)	Durchströmungszeit in Sekunden	
	A (lebend)	B (gekocht)
0	354	390
18	256	390
66	216	403
114	209	400
138	208	403
162	202	392
210	199	—
258	197	387

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß der Verflüssigungsprozeß, am Anfang sehr stark, sich allmählich verringert, entsprechend einer allgemeinen Eigenschaft der Fermentwirkungen.

Leber.

125 g fein zerhackte Leber werden mit 200 ccm Wasser übergossen und im Eisschrank unter Toluol 16 Stunden lang stehen gelassen. Der Versuch wurde im übrigen wie oben ausgeführt.

Zeit in Stunden	Durchströmungszeit in Sekunden	
	A (lebend)	B (gekocht)
0	363	373
20	335	380
44	311	380
68	301	380
116	280	378
260	262	380

Ein zweiter Versuch wurde mit dem gleichen Erfolg ausgeführt.

Glycina hispida.

Bekanntlich enthalten die Samen von *Glycina hispida* (Soja) eine große Anzahl von proteolytischen Fermenten; es schien mir daher interessant, auch eine Prüfung auf Nuclease vorzunehmen.

3 g fein zerriebene Sojasamen werden mit 20 ccm Wasser übergossen und bei gewöhnlicher Temperatur 1 Stunde digeriert, hierauf zentrifugiert und filtriert. Der Versuch wurde im übrigen wie der vorhergehende ausgeführt mit dem einzigen Unterschied, daß 4 ccm des Extrakts anstatt 3 angewandt wurden.

Zeit in Stunden	Durchströmungszeit in Sekunden	
	A (lebend)	B (gekocht)
0	324	324
48	269	329
96	219	324
336	175	321

Demnach ist in den Sojasamen ein Ferment vorhanden, welches die Fähigkeit besitzt, das α -thymusnucleinsäure Natron zu verflüssigen.

Pankreasextrakt (frisch).

30 g frischer fein zerhackter Pankreas werden mit 30 ccm Wasser übergossen und bei gewöhnlicher Temperatur eine

Stunde lang stehen gelassen, im übrigen wurde der Versuch wie oben ausgeführt. Von dem Augenblick, wo die Extrakte in die Flaschen eingefüllt worden sind, bis an die erste Messung sind ungefähr 6 Minuten verlossen.

Zeit in Stunden	Durchströmungszeit in Sekunden	
	A (lebend)	B (gekocht)
0	189,6	348
	179,8	
	170	
	167,5	
	165,4	
	164	
	162,7	
0,30 Min.	161,6	
17	154	348

Der niedrige Wert der ersten Zahl der Reihe A angesichts der entsprechenden in der Reihe B ist durch die große Geschwindigkeit der Reaktion bedingt. Man sieht, daß sie nach einer halben Stunde fast fertig ist und daß die Viscosität der Flüssigkeit am Ende fast gleich derjenigen des Wassers ist.

Zweckmäßiger ist es, folgendermaßen zu operieren: man gießt direkt 3 ccm der 2%igen Lösung von a-thymusnucleinsaurem Natron in das Viscosimeter, mißt die Viscosität, setzt 3 Tropfen des Extrakts hinzu und mißt wieder. So kann man die ganze Abnahme der Viscosität beobachten.

Für den folgenden Versuch wurde das Pankreasextrakt benutzt (36 Stunden lang im Eisschrank aufbewahrt).

Zeit in Stunden	Durchströmungszeit in Sekunden
0	341,5
	327,2
	319,8
12	155

Vor dem Zusatz des Fermentes war die Durchströmungszeit 374 Sekunden.

Pankreassekret (Pulver).

Da es nicht leicht ist, beliebig Pankreassekret zur Verfügung zu haben, haben wir ein mit der Kosselschen Methode¹⁾ durch Austrocknung in der Kälte dargestelltes Hundepankreassekretpulver²⁾ angewandt. Dieses Pulver (vier Monate vor den Versuchen dargestellt) löst sich fast ohne Rückstand in Wasser. Es hat gegen Fibrin eine sehr schwache Wirkung.

0,15 g Pankreassaftpulver, die 2,5 ccm frischen Pankreassekrets entsprechen, werden in 5 ccm Wasser gelöst. In die Flaschen, die wie gewöhnlich vorbereitet worden sind, werden je 2,5 ccm dieser Lösung eingebracht und zwar in A die ungekochte, in B die 10 Minuten in siedendem Wasser erhitze Lösung.

Zeit in Stunden	Durchströmungszeit in Sekunden	
	A (lebend)	B (gekocht)
0	251,8	327
	225	330
	212,3	333
	201,6	336,2
	196,2	
	193,7	
0,30 Min.	185	
	182,8	
16	153	378

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß das Pankreassekret eine sehr starke Verflüssigungsfähigkeit besitzt, was übrigens schon von Abderhalden und Schittenhelm³⁾ erwähnt worden ist.

Die Zunahme der Viscosität bei den Kontrollversuchen scheint in den ersten Stunden konstant zu sein (siehe vorige Tabellen). Beim Pankreassekret ist sie besonders ausgeprägt.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 84, S. 354 (1913).

²⁾ Das Sekret war durch Sekretinreizung aus einer temporären Pankreasfistel gewonnen.

³⁾ loc. cit.

Wenn die Flüssigkeiten aktiv sind, so scheint diese Zunahme von einer stärkeren Abnahme verdeckt zu werden.

Einwirkung verschiedener Substanzen auf das Verflüssigungsvermögen des Pankreassaftes.

1. Versuch.

Für den ersten Versuch wurden die folgenden Lösungen in Reagenzgläsern angesetzt:

a) 0,075 Pankreassekretpulver (aus 1,25 ccm Pankreassekret) + 2,5 ccm Wasser;

b) 0,075 Pankreassekretpulver + 1,3 Wasser + 1,2 Erepsin;

c) 0,075 Pankreassekretpulver + 1,3 Wasser + 1,2 Thymusextrakt (inaktiv);

d) 0,075 Pankreassekretpulver + 1,3 Wasser + 1,2 Leberextrakt (aktiv).

Das Erepsin besaß kein Verflüssigungsvermögen (siehe unten); das Thymusextrakt war aus einem Thymuspulver dargestellt, das am Anfang aktiv, allmählich aber inaktiv geworden war. Das Leberextrakt war nach den oben erwähnten Vorschriften dargestellt worden.

Diese Flüssigkeiten blieben 2 Stunden 30 Min. in dem Brutschrank bei 35° stehen, sodann wurden sie in die wie gewöhnlich vorbereiteten, 25 ccm 2%iges a-thymusnucleinsaures Natron enthaltenden Kolben A, B, C, D, eingefüllt.

Zeit in Stunden	Durchströmungszeit in Sekunden			
	A Pankreas- sekret	B Pankreassekret + Erepsin	C Pankreassekret + Thymus	D Pankreassekret + Leber
0	331,9	297	322,4	247,5
0.20 Min.	310	221	240,6	180,8
17	228	161	178	159
65	183	155	161	159

Aus dieser Tabelle geht hervor:

1. Daß beim Digerieren in wässriger Lösung die Wirksamkeit des Pankreassekretes gelitten hat. Nach den Sachsschen

Ergebnissen¹⁾ ist anzunehmen, daß das Trypsin die Nuclease geschädigt hat.

2. Daß die Nuclease gegen diese zerstörende Wirkung, ungefähr in derselben Weise, von den verschiedenen hinzugefügten aktiven oder inaktiven Eiweißlösungen geschützt worden ist. Es liegt nahe, anzunehmen, daß es sich um eine Adsorption des Trypsins handelt, wie Hedin²⁾ sie beim Serumalbumin und bei der Knochenkohle beobachtet hat.

2. Versuch (Eieralbumin).

Das Eierklar eines frischen Eies wird mit der dreifachen Menge Wasser versetzt, dann filtriert. Die Lösungen werden sodann in folgender Weise vorbereitet:

A. 0,070 Pankreassekretpulver + 2,5 ccm Wasser.

B. 0,070 Pankreassekretpulver + 1 ccm Wasser + 1,5 ccm Eieralbumin.

Die Lösungen bleiben im Brutschrank bei 35° 15 Stunden stehen und werden dann in die entsprechenden vorbereiteten Kolben eingefüllt.

Zeit in Stunden	Durchströmungszeit in Sekunden	
	A. Pankreassekret	B. Pankreassekret + Eieralbumin
0	314	316,2
0,30 Min.	336	303,8
3	355	266
20	357	190,8
68	343	167

Hier, wo die Wirkung der Wärme länger gedauert hat, ist die Nuclease in A. fast vollständig zerstört, hingegen ist sie in B. gut geschützt worden.

3. Versuch (Knochenkohle).

Die Versuchslösungen waren folgende:

A. 0,070 Pankreassekretpulver + 2,5 ccm Wasser.

B. 0,070 Pankreassekretpulver + 2,5 ccm Wasser + Knochenkohle.

¹⁾ Sachs, loc. cit., Bd. 52, S. 412 (1907).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 50, S. 497 (1906/1907); auch: Ergebnisse der Physiologie, Bd. 9, S. 432 (1910).

Die Lösungen blieben im Brutschrank bei 35° 15 Stunden stehen, dann wurde B. filtriert und die beiden Lösungen in die entsprechenden Kolben eingefüllt.

Zeit in Stunden	Durchströmungszeit in Sekunden	
	A. Pankreassekret	B. Pankreassekret + Kohle
0	326,8	323,5
0,30 Min.	338,5	271,8
48	320	160

Ein zweiter Versuch hatte denselben Erfolg.

4. Versuch (Glycerin).

Die Versuchsflüssigkeiten waren folgende:

a. 0,070 Pankreassekretpulver + 2,5 ccm Wasser.

b. 0,070 Pankreassekretpulver + 5 ccm Glycerin.

Die beiden Lösungen blieben 18 Stunden in dem Brutschrank stehen, dann wurde b. abgesaugt und a. und b. in die entsprechenden Kolben eingefüllt.

Zeit in Stunden	Durchströmungszeit in Sekunden	
	A. Pankreassekret	B. Pankreassekret + Glycerin
0	297	415
0,30 Min.	304	375
24	299	262
72	256	254

Von 254 Sekunden an nimmt die Viscosität in B. nicht mehr ab: es ist die eigene Viscosität des Glycerins. Aus diesem Versuch geht hervor:

1. Daß die Nuclease in Glycerin löslich ist.

2. Daß Glycerin auch die Nuclease gegen Trypsin schützt.

Diese Ergebnisse bestätigen zunächst die von Hedin näher untersuchte Erscheinung, daß das Trypsin von Tierkohle und von Kolloiden adsorbiert werden kann. Zugleich zeigen sie aber auch den Unterschied in dem Verhalten der Nuclease: letztere zeigte unter diesen Versuchsbedingungen keine oder eine viel geringere Adsorptionsfähigkeit.

Auf Grund dieser Tatsachen hofften wir in dem Pankreas-extrakt die Nuclease vom Trypsin trennen zu können. So sind die folgenden Versuche unternommen worden. Dieselben führten zwar nicht zur Gewinnung einer trypsinfreien Nuclease aus dem Pankreasextrakt, lieferten jedoch in anderer Hinsicht bemerkenswerte Ergebnisse.

1. Versuch. 250 g Pankreas wurden mit Quarzsand zerrieben und mit 200 ccm Wasser übergossen. Die Mischung blieb eine Stunde bei gewöhnlicher Temperatur stehen und wurde dann koliert. Hierauf wurde sie mit 125 g Knochenkohle versetzt und in den Eisschrank gebracht.

Nach 15 Stunden wurde eine Probe entnommen und filtriert. Ich erhielt eine ganz klare Flüssigkeit, die ein starkes Verflüssigungsvermögen für a-thymusnucleinsaures Natron besaß und eine Flocke Fibrin in 3 Stunden auflöste.

Nach 24 Stunden wurde eine zweite Probe entnommen. Dieselbe besaß ein schwächeres Verflüssigungsvermögen für a-thymusnucleinsaures Natron, löste aber die Fibrinflocke in kürzerer Zeit.

Nach 48 Stunden war die Wirkung auf a-thymusnucleinsaures Natron verschwunden. Die Flüssigkeit löste aber die Fibrinflocke leicht.

Diese Tatsachen stehen mit den von Sachs¹⁾ beobachteten, völlig im Einklang.

2. Versuch. Dieselbe Versuchsanordnung. Da nach Hedin die Temperatur einen bedeutenden Einfluß auf die Adsorption des Trypsins ausübt, wurde diesmal der mit Knochenkohle versetzte Pankreasextrakt 16 Stunden im Brutschrank digeriert. Das Verflüssigungsvermögen für a-nucleinsaures Natron war verschwunden, die proteolytische Wirkung hingegen war erhalten geblieben.

3. Versuch. 250 g fein zerhacktes Pankreas wurden mit 200 ccm Wasser eine Stunde lang digeriert, dann koliert, das Extrakt sodann mit 20 g Knochenkohle versetzt.

Man ließ 15 Stunden im Eisschrank stehen und filtrierte die Flüssigkeit. Dieselbe besaß sowohl verflüssigende Wirkung

¹⁾ loc. cit.

für a-thymusnucleinsaures Natron wie auch Lösungsvermögen für Fibrin.

Das Filtrat wurde von neuem mit Knochenkohle versetzt und 3 Stunden im Brutschrank belassen. Auch jetzt war sowohl Verflüssigungsvermögen für a-thymusnucleinsaures Natron wie Lösungsvermögen für Fibrin vorhanden.

Das Filtrat wurde noch zweimal mit Knochenkohle versetzt, die Flüssigkeit zunächst 15 Stunden im Eisschrank, sodann 4 Stunden bei Bluttemperatur gehalten. Zum Schluß war das Verflüssigungsvermögen für a-thymusnucleinsaures Natron verschwunden, während das Lösungsvermögen für Trypsin noch erhalten war.

Diese Versuche zeigen, daß das Pankreasextrakt sich anders verhält, wie man nach den Ergebnissen am Pankreassekret hätte erwarten können. Die nächstliegende Annahme ist wohl die, daß die proteolytischen Fermente des Pankreasgewebes nicht in derselben Weise absorbierbar sind, wie die des Sekretes. In dieser Hinsicht sind schon früher Unterschiede festgestellt worden, z. B. fand Hedin, daß die β -Protease der Rindermilz durch Tierkohle weniger leicht adsorbiert wird, wie die α -Protease.¹⁾ Doch ist es nicht ausgeschlossen, daß auch die Gegenwart der Proteinstoffe hier einen Einfluß ausübt.²⁾

Über die fermentative Aufspaltung der Nucleinsäure.

(Zersetzung der Nucleinsäure).

Nachdem durch alle bisherigen Beobachtungen festgestellt ist, daß die Nuclease nicht mit dem Trypsin oder anderen proteolytischen Fermenten identifiziert werden kann, erhebt sich die Frage, ob es in sich einheitlich ist oder ob es notwendig ist, eine a-Nuclease, welche die a-Nucleinsäure verflüssigt, von einer b-Nuclease, welche die weitere Aufspaltung herbeiführt, zu unterscheiden. Gehen beide Wirkungen immer parallel? Diese Fragestellung lag den folgenden Versuchen zugrunde.

¹⁾ The Biochemical Journal, Bd. 2, S. 112.

²⁾ Siehe auch Jahnson-Blohm, Diese Zeitschrift, Bd. 82, S. 178 (1912).

A. Methodik.

Um die Zersetzung der Nucleinsäure zu verfolgen, bediente ich mich eines Verfahrens, welches darauf beruht, daß die Nucleinsäure durch Kupfersalze quantitativ gefällt wird, daß hingegen ihre hauptsächlichsten Zersetzungsprodukte (Purin- und Pyrimidinbasen) hierbei unter 100° nicht niedergeschlagen werden. Fällt man also in einer Flüssigkeit, welche Nucleinsäure gleichzeitig mit ihren Zersetzungsprodukten enthält, die Nucleinsäure als nucleinsaures Kupfer und filtriert, so wird die Bestimmung des gesamten Stickstoffs im Filtrat eine Vorstellung von der Zersetzung der Nucleinsäure geben. Eine solche Methode kann natürlich nur als eine empirische betrachtet werden, weil man, im besten Fall, den Stickstoff nur in einem Gemisch bestimmt, und weil außer den Endprodukten der Zersetzung (Purin und Pyrimidinbasen) noch Zwischenstufen vorhanden sein können, über deren Verhalten zu Kupfersalzen wenig bekannt ist.

Einige Vorversuche zur Prüfung dieses Verfahrens zeigten, daß in einem Gemisch von Guanin und nucleinsaurem Natron das Guanin nach der Kupferfällung immer quantitativ in das Filtrat geht.

Das benützte Material war das a-thymusnucleinsaure Natron und daneben, um eine andere Nucleinsäure zu prüfen, das hefenucleinsaure Natron.

Mit letzterer z. B. sind die Versuche in folgender Weise ausgeführt worden.

1 g Hefenucleinsäure (Boehringer und Söhne) wird in einer schwachen Natronlauge gelöst. Nachdem man sich von der Neutralität der Flüssigkeit überzeugt hat, setzt man 5 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit hinzu und füllt bis 50 ccm auf. Man bringt sodann die mit Toluol versetzte Flüssigkeit in den Brutschrank bei 35°.

Um die Zersetzung festzustellen, entnimmt man 10 ccm, säuert mit Essigsäure an, fällt mit Kupfersulfat und erhitzt kurze Zeit auf dem Wasserbad. Die Fällung ballt sich zusammen. Man läßt abkühlen, filtriert ab, wäscht auf dem Filter

und bestimmt in dem Filtrat den gesamten Stickstoff nach Kjeldahl.

B. Versuche.

Thymus (hefenucleinsaures Natron).

Die Kolben A und B wurden wie oben vorbereitet. A wurde mit 5 ccm des nicht erhitzten Thymusextrakts versetzt, B mit 5 ccm des 10 Minuten in kochendem Wasser erhitzten Extraktes. Das benützte Thymusextrakt ist dasselbe, welches bei dem oben beschriebenen Verflüssigungsversuch angewandt worden war.

Hefenucleinsaures Natron.

Zeit in Tagen	N durch Kupfer unfällbar		Differenzen	
	A (lebend)	B (gekocht)	A	B
0	0,006	0,006	—	—
5	0,015	0,007	0,009	0,001
8	0,018	0,007	0,004	0,000
14	0,023	0,01	0,005	0,003

Unter dem Wort «Differenz» ist für jede Probe der Unterschied zwischen den Zahlen zweier aufeinander folgender Bestimmungen zu verstehen.

Die Zunahme der Zahlen, auch bei dem gekochten Ferment, ist wahrscheinlich auf die Gegenwart einer Substanz, die das hefenucleinsaure Kupfer löst, zu beziehen. Die Annahme, daß das Ferment nicht vollständig zerstört worden ist, ist nicht ausgeschlossen, wohl aber sehr unwahrscheinlich, wenn man bedenkt, daß die verflüssigende Wirkung völlig verloren gegangen ist (siehe oben).

Leber (hefenucleinsaures Natron).

Für diesen Versuch diente das gleiche Extrakt, welches auch bei dem oben beschriebenen Verflüssigungsversuch angewandt worden war.

Wenn man das Leberextrakt erhitzt, um das Ferment abzutöten, bildet sich ein Koagulum. Dieses wurde durch

Dekantation abgetrennt und mit Wasser nachgewaschen. So ist die geringere Zahl des Stickstoffs in B, am Anfang, erklärbar.

Hefenucleinsaures Natron.

Zeit in Tagen	N durch Kupfer unfällbar		Differenzen	
	A (lebend)	B (gekocht)	A	B
0	0,008	0,006	—	—
3	0,017	0,008	0,009	0,002
7	0,022	0,01	0,005	0,002
17	0,023	0,014	0,001	0,004

Die Zersetzung findet auch hier statt.

Glycina hispida.

1. Versuch (hefenucleinsaures Natron).

Die Extrakte wurden in derselben Weise dargestellt, wie für die Verflüssigungsversuche.

Hefenucleinsaures Natron.

Zeit in Tagen	N durch Kupfer unfällbar		Differenzen	
	A (lebend)	B (gekocht)	A	B
0	0,006	0,006	—	—
6	0,013	0,013	0,007	0,007
11	0,016	0,014	0,003	0,001

2. Versuch (hefenucleinsaures Natron).

Dieselbe Ausführung.

Zeit in Tagen	N durch Kupfer unfällbar		Differenzen	
	A (lebend)	B (gekocht)	A	B
0	0,004	0,006	—	—
4	0,011	0,012	0,007	0,006
8	0,016	0,014	0,005	0,002
12	0,02	0,016	0,004	0,002

Aus diesen Tabellen geht hervor:

1. Daß die Zunahme des durch Kupfer nicht fällbaren Stickstoffs auch in B sehr stark ist, wie schon oben hervorgehoben ist.

2. Daß die Zersetzung nur gering ist, obwohl die verflüssigende Wirkung von *Glycina hispida* ziemlich stark ist.

3. Versuch (a-thymusnucleinsaures Natron).

Dieselbe Ausführung. Die Hefenucleinsäure wird durch 1 g a-thymusnucleinsaures Natron ersetzt.

a-thymusnucleinsaures Natron.

Zeit in Tagen	N durch Kupfer unfällbar		Differenzen	
	A (lebend)	B (gekocht)	A	B
0	0,002	0,002	—	—
7	0,003	0,003	0,001	0,001
12	0,004	0,003	0,001	0,000
21	0,006	0,003	0,002	0,000

Es fällt sofort auf, wie gering die Aufspaltung der a-Thymusnucleinsäure, angesichts derjenigen der Hefethymusnucleinsäure erscheint. Dies wurde schon von Steudel¹⁾ bemerkt: «Die Überführung der Nucleinsäure», sagt er nämlich, «läßt sich mit Hilfe der Nuclease offenbar leicht bewerkstelligen, eine gänzliche Aufspaltung scheint aber nur schwer zu erreichen zu sein.»

Pankreasextrakt (a-thymusnucleinsaures Natron).

Dieselbe Ausführung. In jeder Flasche ist 1 g a-thymusnucleinsaures Natron angewandt worden.

a-thymusnucleinsaures Natron.

Zeit in Tagen	N durch Kupfer unfällbar		Differenzen	
	A (lebend)	B (gekocht)	A	B
0	0,003	0,003	—	—
1	0,005	0,003	0,002	0,000
5	0,005	0,003	0,000	0,000
11	0,007	0,004	0,002	0,001

Es hat in A eine Zersetzung stattgefunden. Um darzutun, wie langsam sie verläuft, sei hier hervorgehoben, daß, wenn man für die Nucleinsäure die Steudelsche Formel annimmt,

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 55, S. 409 (1908).

die Menge Stickstoff, die durch Kupfer unfällbar geworden ist, nur die 7,9% des Gesamtstickstoffs der Nucleinsäure beträgt.

Pankreassekret (a-thymusnucleinsaures Natron).

Dieselbe Ausführung. In jeder Flasche ist 1 g a-thymusnucleinsaures Natron und 0,075 g Pankreassekretpulver angewandt worden.

a-thymusnucleinsaures Natron.

Zeit in Tagen	N durch Kupfer unfällbar		Differenzen	
	A (lebend)	B (gekocht)	A	B
0	0,002	0,002	—	—
4	0,015	0,002	0,013	0,000
6	0,019	0,002	0,004	0,000

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die Menge des durch Kupfer nicht fällbaren Stickstoffs bei der Einwirkung von Pankreassekret viel schneller als mit Pankreasextrakt zunimmt, d. h. daß eine viel stärkere Zersetzung der Nucleinsäure stattfindet. Die Tatsache, daß Abderhalden und Schittenhelm,¹⁾ nach der Verdauung des a-thymusnucleinsauren Natrons mit Pankreassaft, die Purinbasen nicht direkt nachweisen konnten, steht mit unseren Beobachtungen nicht in Widerspruch. Es ist sehr leicht möglich, daß ein Abbau der Nucleinsäure erfolgt, daß dieser aber nicht bis zu der Bildung der Nucleinbasen vorschreitet, sondern bei einer durch Kupfersalz nicht fällbaren Zwischenstufe stehen bleibt. Übrigens haben diese Forscher beobachtet, daß die Konstitution der Substanz nach Digestion mit Pankreassaft scheinbar geändert worden war.

Jedenfalls ergibt sich die interessante Tatsache, daß Pankreasextrakt und Pankreassekret, die beide eine sehr energische verflüssigende Wirkung ausüben, sich betreffs der Zersetzung ganz verschieden verhalten. Diese Tatsache, und die Versuche über *Glycina hispida* zeigen, daß sehr oft die verflüssigende und die zersetzende Wirkung nicht parallel verlaufen.

¹⁾ loc. cit.

Schlüsse.

1. Die viscosimetrische Methode eignet sich, um die allmähliche Verflüssigung des a-thymusnucleinsauren Natrons zu verfolgen. Es ist so möglich, die Nuclease in den Flüssigkeiten nachzuweisen und ihre Energie einigermaßen zu bestimmen.

2. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen wurde festgestellt, daß die Nuclease von Leber, Thymus und Pankreas fähig ist, die Verflüssigung des a-thymusnucleinsauren Natrons herbeizuführen. In den Samen von *Glycina hispida* wurde die Nuclease nachgewiesen. Im Pankreas ist ihre Wirksamkeit besonders groß.

3. Die Nuclease ist in Glycerin löslich. Sie zeigt, wenigstens im Pankreassekret, eine geringere Affinität für die Kolloide als Trypsin. Die Kolloide und die Tierkohle sind somit imstande, die Nuclease vor der Trypsinwirkung zu schützen.

4. Obwohl die Hefenucleinsäure nicht dieselbe Konstitution wie die Thymusnucleinsäure besitzt, wird sie ebenfalls von den Fermenten der Thymus und der Leber abgebaut.

5. Betreffs der Zersetzung der Nucleinsäure verhalten sich Pankreasextrakt und Pankreassekret ganz verschieden.

6. Aus vergleichenden Versuchen über die verflüssigenden und zersetzenden Wirkungen der Nuclease geht hervor, daß diese beiden Wirkungen nicht immer parallel verlaufen.

Diese Tatsache ist entweder auf zwei verschiedene wirksame Gruppen eines und desselben Fermentmoleküls oder auf zwei verschiedene Nucleasen (a- und b-Nuclease) zu beziehen.

Schließlich ist es mir eine angenehme Pflicht Herrn Professor A. Kossel für die Anregung zu diesen Untersuchungen, sowie für seine vielfältigen Ratschläge, mit denen er mich dabei unterstützte, an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank auszusprechen.