

393. Hellmut Bredereck, Gottfried Caro und Friedrich Richter: Über die fermentative Aufspaltung der Hefe- und Thymonucleinsäure (Nucleinsäuren, X. Mittel.*).

[Aus d. Chem. Laborat. d. Universität Leipzig.]

(Eingegangen am 17. Oktober 1938.)

Von Klein¹⁾ wurde festgestellt, daß ein Fermentpräparat aus der Darmschleimhaut des Kalbes bei p_H 9 Hefenucleinsäure wesentlich langsamer als Thymonucleinsäure dephosphoryliert. Dabei wird die Thymonucleinsäure zunächst durch die im Fermentpräparat enthaltene Polynucleotidase (von Klein Thymonucleinsase genannt) in die Mononucleotide gespalten und diese dann durch die gleichfalls vorhandene Nucleotidase unter Phosphorsäureabspaltung in die Nucleoside. Von der Hefenucleinsäure nimmt Klein an, daß ihre Aufspaltung in die Nucleotide nicht durch eine Polynucleotidase, sondern durch das alkalische Milieu von p_H 9 erfolgt. Erst die weitere Abspaltung der Phosphorsäure erfolgt dann durch die Nucleotidase. Eine solche Annahme ist bei der bekannten Labilität der Hefenucleinsäure gegenüber Alkali erlaubt, jedoch nicht zwingend. Ihre Richtigkeit vorausgesetzt, würde sie bedeuten, daß eine spezifisch auf Thymonucleinsäure eingestellte Polynucleotidase existiert, die nur diese, aber nicht Hefenucleinsäure spaltet. Levene und Dillon²⁾ fanden mit einem Acetontrockenpräparat aus Darmfistelsaft (Hund) bei p_H 8.8 eine etwas stärkere Phosphorsäure-Abspaltung aus Hefenucleinsäure als aus Thymonucleinsäure. Auch hier bei p_H 8.8 ist mit einer Eigenaufspaltung der Hefenucleinsäure schon zu rechnen, darüber hinaus hat möglicherweise auch eine Polynucleotidase gewirkt. Für die von Levene³⁾ vertretene Auffassung, daß der Magendarmsaft zwei verschiedene Fermente enthält, eins für die Hefenucleinsäure, das andere für die Thymonucleinsäure, liegen, wie Klein mit Recht betont, keinerlei genügende experimentelle Beweise vor. In einer späteren Arbeit fand Klein⁴⁾ wiederum mit einem Darmschleimhaut-Präparat etwa die gleiche Dephosphorylierungsgeschwindigkeit für Hefe- und Thymonucleinsäure. Ob hier eine Spaltung der Hefenucleinsäure durch eine Polynucleotidase erfolgt, erscheint Klein noch nicht mit Sicherheit bewiesen. Trotzdem zweifelt er nicht an der Existenz eines besonderen, die Hefenucleinsäure spaltenden Ferments.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die bisherigen Untersuchungen keinerlei Beweis dafür erbringen, daß Hefe- und Thymonucleinsäure von ein und derselben Polynucleotidase gespalten werden, ja es ist nicht einmal sicher, wenn auch sehr wahrscheinlich, daß die Hefenucleinsäure überhaupt von einer im alkalischen wirksamen Polynucleotidase gespalten wird.

Wir haben daher zur Klärung der Frage vergleichende Fermentspaltungen an Hefe- und Thymonucleinsäure im sauren Milieu (p_H 4.9 bzw. 5.1) durchgeführt. Hierbei kommt eine der Hauptschwierigkeiten, nämlich die im alkalischen vorhandene Eigenhydrolyse der Hefenucleinsäure, in Wegfall. Als Ferment wählten wir ein Präparat aus Süßmandeln, von dem wir schon früher⁵⁾ zeigen konnten, daß es eine Polynucleotidase und Nucleotidase

*) IX. Mittel.: B. 71, 1013 [1938]. 1) Ztschr. physiol. Chem. 218, 164 [1933].

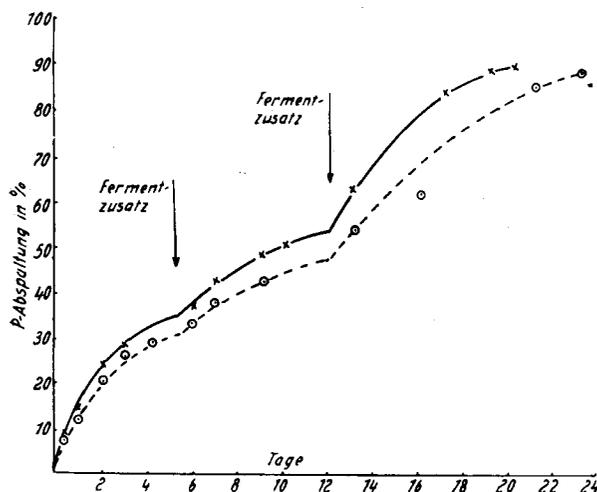
2) Journ. biol. Chem. 88, 753 [1930].

3) Biochem. Handlexikon, Band XIV, 862 [1933].

4) Klein u. Rossi, Ztschr. physiol. Chem. 231, 104 [1935].

5) Bredereck, B. 71, 408 [1938].

enthält. Der Verlauf der Spaltung wurde durch Bestimmung der abgespaltenen Phosphorsäure verfolgt. Dabei wurden zwei Versuchsreihen (Abbild. 1 u. 2) durchgeführt, die sich darin unterscheiden, daß sowohl das Substrat als auch das Ferment verschiedenen Darstellungen entstammen. Im Ansatz I (pH 4.9) war die Substrat - Anfangskonzentration 3.0%, im Ansatz II (pH 5.1) 2.4%.



Abbild. 1. Anfangskonzentration des Substrats 3.0%.

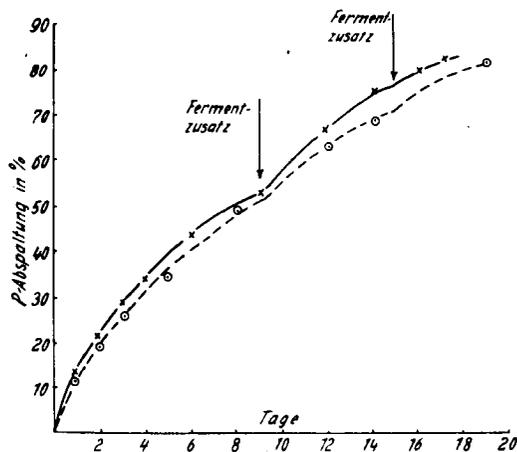
spricht daher nichts gegen die Annahme, daß Hefe- und Thymonucleinsäure von ein und derselben „sauren“ Polynucleotidase gespalten werden. Diese Schlußfolgerung scheint berechtigt, da man etwa die gleiche Dephosphorylierungsgeschwindigkeit für die durch die Wirkung der Polynucleotidase freiwerdenden Rib- und Desoxyribo-nucleotide erwarten darf.

Hinsichtlich der Konstitution der Polynucleotide erlauben diese im sauren Milieu durchgeführten Fermentspaltungen die Annahme, daß in beiden Polynucleotiden die Art der Bindung zwischen den Nucleotiden die gleiche ist.

Die vorliegende Untersuchung wurde in dankenswerter Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Der Firma C. F. Boehringer & Soehne G. m. b. H., Mannheim-Waldhof, danken wir für die Überlassung der Hefenucleinsäure.

Beschreibung der Versuche.

I) 5.0 g Hefenucleinsäure wurden in 28 ccm Wasser aufgeschlämmt und mit 2-n. Natronlauge gegen Lackmus neutralisiert. Zur klaren Lösung wurden 45 ccm Fermentlösung (1%), wie sie früher⁵⁾ beschrieben wurde, zugegeben und mit Acetatpuffer (pH 4.9) auf 166 ccm Gesamtvolumen auf-



Abbild. 2. Anfangskonzentration des Substrats 2.4%.

gefüllt. Die Lösung wurde, mit wenig Toluol versetzt, bei 37° aufbewahrt. Am 5. und 12. Tag wurden erneut je 45 ccm Emulsinlösung zugegeben. Nach den unten angegebenen Zeitabständen wurden die Proben entnommen, und zwar bis einschließlich des 12. Tages je 10 ccm, für die weiteren Bestimmungen je 15 ccm. In den entnommenen Proben wurde nach Entfernen des Eiweißes die anorganische Phosphorsäure als Magnesiumammoniumphosphat gefällt und nach Überführung in das Molybdat $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$ zur Wägung gebracht.

Analog erfolgte der Ansatz mit Thymonucleinsäure.

Dauer der Spaltung in Tagen	Hefenucleinsäure pro Probe g	Menge Molybdat g	Spaltung in %	Thymonucleinsäure pro Probe g	Menge Molybdat g	Spaltung in %
0.5	0.300	0.1552	9.0	0.300	0.1292	7.2
1	0.300	0.2481	14.4	0.300	0.1939	10.8
2	0.300	0.4141	24.0	0.300	0.3671	20.4
3	0.300	0.4897	28.3	0.300	0.4752	26.5
4	—	—	—	0.300	0.5160	28.7
6	0.217	0.4650	37.2	0.217	0.4153	32.0
7	0.217	0.5347	42.8	0.217	0.4791	36.9
9	0.217	0.6061	48.5	0.217	0.5405	41.6
10	0.217	0.6439	51.5	—	—	—
13	0.237	0.8648	63.3	0.237	0.7490	52.8
16	—	—	—	0.237	0.8702	61.3
17	0.237	1.1494	84.2	—	—	—
19	0.237	1.2169	89.1	—	—	—
20	0.237	1.2310	90.1	—	—	—
21	—	—	—	0.237	1.2002	84.6
23	—	—	—	0.237	1.2289	86.6

II) Bei diesem Ansatz war die Anfangskonzentration des Substrats 2.4%, das p_{H} der Lsg. 5.1. Die weitere Fermentzugabe erfolgt am 9. und 15. Tage. Die weitere Durchführung erfolgte analog dem 1. Ansatz. Aufgeführt seien nur Dauer und Proz. der Spaltung.

Dauer der Spaltung in Tagen	Spaltung in %	
	Hefenucleinsäure	Thymonucleinsäure
1	13.4	10.7
2	21.6	17.6
3	28.4	24.5
4	33.4	—
5	—	33.8
6	42.7	—
8	—	48.8
9	52.0	—
12	67.6	62.6
14	75.2	67.6
16	80.2	—
17	83.0	—
19	—	81.6