

Mitteilung aus dem Chemischen Institut der Universität Würzburg

Über den Abbau der Thymo-nucleinsäure durch Pankreasferment*)

(Nucleinsäuren, I)

Von **F. G. Fischer, H. Lehmann-Echternacht** und **I. Böttger**

(Eingegangen am 12. Februar 1941)

Die Untersuchung der strukturellen Gesetzmäßigkeiten im Bau tierischer Zellkern-Säuren stößt, wie bei vielen anderen hochmolekularen Naturstoffen, gleich zu Beginn auf eine Schwierigkeit: Auf die ihrer Isolierung in möglichst unverändertem Zustande. Keine der bisher bekannten Methoden bietet dafür Gewähr; ja, es hat den Anschein, als ob die Abtrennung der Nucleinsäuren von den übrigen Zellbestandteilen hydrolytische Vorgänge zur Voraussetzung hätte, welche auch die Säuren selbst angreifen. Es sind Präparate mit recht verschiedenen Eigenschaften, die je nach den Bedingungen der Darstellung erhalten und der weiteren Analyse unterworfen werden.

Die geringsten Veränderungen finden statt, allen Anzeichen nach, beim Herauslösen der Nucleoproteide und Fällen von nucleinsäuren Salzen unter Vermeidung von alkalischen oder sauren Einwirkungen^{1, 2)}. Doch gehen auch hierbei ohne Zweifel hydrolytische Aufspaltungen vor sich, fermentativ beschleunigt im Laufe der vielen Stunden, die dieses Verfahren benötigt. Immerhin haben in dieser Weise dargestellte Nucleinsäurepräparate die höchsten Molekulargewichte. Aus der Viscosität von Lösungen der Natriumsalze und aus ihrer

*) D 20, 1941.

¹⁾ I. Bang, Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. 1, 189; 4, 115 und 362; 5, 317.

²⁾ E. Hammarsten, Biochem. Z. 144, 383 (1924).

Strömungsdoppelbrechung sind für die langgestreckten Moleküle Werte von 500000—1000000 geschätzt worden³⁾.

Die verschiedenen Variationen des Verfahrens von Neumann^{4, 5, 6)} zur Nucleinsäuregewinnung durch alkalischen Aufschluß liefern Präparate von verschiedenem Abbaugrad. Ihr Verhalten in der Ultrazentrifuge deutet auf Teilchen von einheitlichem Molekulargewicht, von 50000 bis zu mindestens 1 oder 2 Millionen⁷⁾.

Wesentlich ist, daß auch die Geschwindigkeit der fermentativen Dephosphorylierung abhängig ist von der Molekülgröße der Präparate: Je stärker abgebaut sie schon sind, desto schneller wird durch Nucleotidasen aus Darmschleimhaut Phosphorsäure abgespalten⁷⁾.

In eigenen Versuchen vor zwei Jahren war festgestellt worden, daß die von W. Klein^{8, 9)} beschriebene Aufspaltung von Thymo-nucleinsäuren zur Gewinnung von Desribo-nucleosiden mit Fermentpräparaten aus Kalbsdünndarm nicht gelingt, wenn schonend dargestellte Nucleinsäuren angewandt werden. Eine schnelle Dephosphorylierung durch die aus Darmschleimhaut erhaltenen Nucleotidasen findet hingegen statt, wenn eine Aufspaltung der Thymo-nucleinsäure durch „Nucleasen“ aus Pankreas oder anderen Organen vorausgeht.

Die Einwirkung solcher „Nucleasen“ auf Thymo-nucleinsäure ist schon der Kosselschen Schule bekannt gewesen^{10, 11)} und später von Feulgen zum Gegenstand verschiedener Untersuchungen gemacht worden¹²⁻¹⁴⁾. Sie ist als Umwandlung der

³⁾ R. Signer, T. Caspersson u. E. Hammarsten, *Nature* **141**, 122 (1938); W. T. Astbury u. F. O. Bell, *Nature* **141**, 747 (1938).

⁴⁾ A. Neumann, *Arch. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt.* **374** (1898); *Suppl.* **552** (1899).

⁵⁾ R. Feulgen, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **90**, 261 (1914).

⁶⁾ P. A. Levene, *J. Biol. Chem.* **53**, 441 (1922).

⁷⁾ G. Schmidt, E. G. Pickels u. P. A. Levene, *J. Biol. Chem.* **127**, 251 (1939).

⁸⁾ W. Klein, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **207**, 125, 202 (1932).

⁹⁾ W. Klein, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **255**, 82 (1938).

¹⁰⁾ T. Araki, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **38**, 84 (1903).

¹¹⁾ F. Sachs, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **46**, 337 (1905).

¹²⁾ R. Feulgen, *Chemie u. Physiologie der Nucleinstoffe*, Berlin 1923.

¹³⁾ R. Feulgen, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **237**, 261 (1935).

¹⁴⁾ R. Feulgen, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **238**, 105 (1935).

gelatinierenden α -Form der thymo-nucleinsäuren Salze in die nicht mehr gelatinierende, aber mit Säuren noch fällbare β -Form beschrieben; über den Verlauf und den Grad des vermutlich hydrolytischen Abbaues fehlten genauere Vorstellungen. Da diese Verflüssigung auch durch Erhitzen der α -thymo-nucleinsäuren Salze in trockenem Zustand oder in wäßriger Lösung, schneller unter der Einwirkung von Alkalien, herbeigeführt wird, tritt sie in mehr oder weniger großem Umfange auch ein bei der Gewinnung der Nucleinsäuren selbst: Daher deren wechselnde Beschaffenheit und die gewaltige Streuung ihrer Teilchengrößen.

Das Thymo-nucleinsäure verflüssigende Ferment aus Schweinepankreas läßt sich mit Wasser aus den entfetteten und getrockneten Drüsen leicht ausziehen und durch eine Reihe von Reinigungsoperationen stark anreichern. Pankreatin oder andere käufliche Pankreaspräparate bieten als Ausgangsmaterial keine Vorzüge, da sie im gleichen Gewicht weniger dieses Ferments enthalten als Trockenpankreas selbst.

Mit der gereinigten Thymo-polynucleotidase können folgende Beobachtungen gemacht werden: 1. Läßt man die Fermentwirkung über die in wenigen Minuten eintretende, auffällige Verflüssigung der Nucleinsäuregallerten hinaus noch einige Stunden vor sich gehen, so entstehen Hydrolysate, die nicht mehr mit Salzsäure fällbar sind. 2. Die Lösungen werden mit fortschreitender Fermenteinwirkung saurer; diese muß also mit einem Freiwerden von Säuregruppen einhergehen, obwohl anorganische Phosphorsäure nicht abgespalten wird. 3. Mit abnehmender Viscosität der Nucleinatlösungen tritt eine starke Zunahme ihrer Leitfähigkeit und ihres osmotischen Druckes ein.

Die Löslichkeitseigenschaften der entstandenen Produkte und ihr Verhalten bei der Dialyse weisen darauf hin, daß die fermentative Hydrolyse tiefgreifend sein muß, daß sie jeweils nur wenige Nucleotide in gegenseitiger Verknüpfung beläßt. Die Anwesenheit von Mono-nucleotiden unter diesen Oligo-nucleotiden¹⁵⁾ läßt sich sicher ausschließen: Bei der Dialyse

¹⁵⁾ Wir schlagen diese Bezeichnung vor, in Anlehnung an die für Saccharide [B. Helferich, E. Böhm u. S. Winkler, Ber. dtsh. chem. Ges. 63, 991 (1930)] und Peptide [B. Helferich u. H. Grünert, Naturwiss. 28, 411 (1940)] ähnlichen Kondensationsgrades empfohlene.

im Cellophanschlauch, unter Bedingungen, die ein schnelles Hinaustreten von Mono-nucleotiden gestatten, findet nur eine sehr langsame Abnahme der Phosphorkonzentration im Innenwasser statt. Weiterhin werden die Oligo-nucleotide in saurem Medium auch aus verdünnten Lösungen durch Molybdat gefällt, während Mono-nucleotide unter gleichen Verhältnissen nicht niedergeschlagen werden.

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Molekülgröße der entstehenden und schließlich am Ende der Hydrolyse vorhandenen Nucleotide sind die dabei wahrnehmbaren Veränderungen, mit einer Ausnahme, wenig geeignet. Die starke Abnahme der Viscosität z. B., die augenblicklich nach Zugabe des Ferments zur Verflüssigung der Gallerte führt und, bei entsprechend gewählten Fermentgaben, schon in 10 Minuten nahezu ihr Ende erreicht haben kann, veranschaulicht zwar sehr eindrucksvoll die Zerkleinerung des kolloiden Moleküls, gestattet aber nicht ohne weiteres ihre Messung. Die innere Reibung der thymo-nucleinsäuren Salze wird schon durch kleine Änderungen in der Konzentration der Wasserstoffionen und anderer Kationen sehr stark beeinflusst^{2, 16)}. Bei der Hydrolyse tritt aber ein Zuwachs an Säuregruppen ein; außerdem nimmt der Umfang der „Kationenpufferung“^{2, 16)} mit der Aufteilung des Moleküls stark ab. Zudem sind die Beziehungen zwischen Molekülgröße und Viscosität bei polyvalenten hochmolekularen Säuren komplexer Natur^{16, 17, 18)}.

Analoge Gründe erschweren auch eine Auswertung der im Laufe der fermentativen Hydrolyse eintretenden Zunahme der Leitfähigkeit und des osmotischen Druckes; zu viele noch unbestimmte Faktoren verändern sich dabei. Die beobachteten Zunahmen der Gefrierpunktserniedrigung z. B. sind etwa so groß, wie es der Hydrolyse eines hochmolekularen Polynucleotids zu Mono-nucleotiden gleichen Dissoziationsgrades entsprechen würde. So weit geht aber die Aufspaltung sicher nicht. Die Ursache für die Größe der Effekte ist, daß die Kationen in der

¹⁶⁾ W. Kern, Z. physik. Chem. Abt. A 181, 249 (1938); 184, 197, 302 (1939).

¹⁷⁾ W. Kern, Z. physik. Chem. Abt. A 181, 283 (1938).

¹⁸⁾ H. G. Bungeberg De Jong u. Ong Sian Gwan, Kolloidchem. Beihefte 31, 89 (1930).

Thymo-nucleinsäure vorwiegend osmotisch unwirksam sind^{2, 16)}, in den niedermolekularen Oligo-nucleotiden aber offenbar wirksam.

Zur näheren Kenntnis der entstandenen Oligo-nucleotide wurden daher Molekulargewichtsbestimmungen nach der von H. Brintzinger¹⁹⁾ angegebenen Dialysenmethode ausgeführt. Das Verfahren war zwar bisher meistens nur an Molekülen mit kleinerem Gewicht erprobt, erschien aber auch für den vermuteten Bereich geeignet. Als Vergleichssubstanz diente zuerst ein Gemisch der Ribo-monomucleotide, dann reine Riboguanylsäure. Entgegen den bisher veröffentlichten, mit dieser Methode an anderen Stoffen gesammelten Erfahrung waren die Dialysenkoeffizienten sowohl bei dem Bezugs-monomucleotid wie den Oligo-nucleotiden nicht konstant, sondern nahmen bei fortschreitender Verdünnung stetig zu. Wie im Versuchsteil näher beschrieben, wird durch diese, einstweilen nicht verständliche Erscheinung die Auswertung der Bestimmungen unsicher. Die kleinsten, in einer Versuchsreihe ermittelten MG betragen 1030, die höchsten, in einer anderen Reihe gemessenen, 1730, entsprechend einer Zusammensetzung der Oligo-nucleotide aus durchschnittlich 3,3 bzw. 5,3 Mononucleotiden. Innerhalb der Grenze dieser äußersten Werte, die bei einer Wiederholung der Messungen mit verfeinerter Methode sich wird einengen lassen, müssen die richtigen Werte liegen.

Genauer ließ sich die Bestimmung der Säuregruppen gestalten, die bei der fermentativen Hydrolyse frei gelegt werden. Bei Anwendung dialysierter α -Thymo-nucleinatlösungen und wirksamer, ebenfalls dialysierter Polynucleotidase läßt sich während der Fermentwirkung eine Zunahme der Acidität, z. B. von p_H 7,3 bis 5,8 wahrnehmen. Freie Phosphorsäure wird dabei nicht gebildet.

Titriert man einen hydrolysierten Ansatz mit Lauge bis $p_H \sim 9$ und subtrahiert man die Werte der Kontrollen mit entsprechenden Mengen Nucleinat und hitze-inaktiviertem Ferment, bzw. Ferment allein, dann ergibt sich, daß die Polynucleotidase

¹⁹⁾ Literatur bei H. Brintzinger, Z. physik. Chem. Abt. A 187, 317 (1941).

auf 4 Phosphoratome 1 Säuregruppe freigemacht hat. Dieser Wert wird mit verschiedenen Nucleinsäure- und Fermentpräparaten erhalten, auch bei Versuchen mit größeren Fermentgaben. Ist er erreicht, dann bewirkt eine erneute Zugabe von Ferment keinen Aciditätszuwachs mehr. Es ist daher nicht wahrscheinlich, daß die Hydrolyse etwa infolge einer Hemmung des Ferments durch die gebildeten Oligo-nucleotide bei diesem Wert stehen bleibt; es ist wahrscheinlicher, daß damit die Wirkung der Polynucleotidase erfüllt ist.

Da in den Nucleinsäuren die Anwesenheit einer unbekanntem, säurebildenden Komponente nicht anzunehmen ist, läßt sich folgern, daß beim hydrolytischen Abbau im Durchschnitt auf 4 Nucleotideinheiten zu den 4 vorhandenen Phosphorsäureaciditäten²⁰⁾ eine fünfte hinzukommt.

Das Stehenbleiben der Fermentwirkung gerade bei diesem Säuregruppenzuwachs spricht nicht dafür, daß er nur die Bedeutung eines Durchschnittswertes hätte, d. h. daß Oligo-nucleotide verschiedener Größe entstehen. Es ist vielmehr wahrscheinlicher, daß tatsächlich Tetra-nucleotide gebildet werden. Das wäre der erste experimentelle Hinweis darauf, daß die 4 verschiedenen Tetra-nucleotid-Bestandteile der Thymo-nucleinsäure in periodischer Folge im Säuremolekül angeordnet sind. Wenn bisher in der Literatur der Thymo-nucleinsäuren von ihrer „Tetra-nucleotid-Struktur“ die Rede war, so beruhte das nur auf der Kenntnis ihrer Zusammensetzung aus äquimolaren Mengen der 4 verschiedenen Nucleotide, genauer gesagt, der 4 verschiedenen Basen. Die Größe des Moleküls war damit nicht richtig gekennzeichnet²¹⁾, ebenso wenig wie es bei den Ribo-nucleinsäuren der Fall ist. Der Bezeichnung „Tetra-nucleotid-Struktur“ als Angabe einer Ordnung der einzelnen Nucleotide zu wiederkehrenden Vierergruppen fehlte bisher jegliche Unterlage.

²⁰⁾ H. Steudel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **46**, 332 (1905); P. A. Levene, Nucleic Acids, New York 1931. Andersartige Angaben [Bredereck u. Müller, Ber. dtsh. chem. Ges. **72**, 115, 1429 (1939)] deuten wahrscheinlich auf weitgehend abgebaute Produkte.

²¹⁾ Z. B.: K. Makino, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **232**, 229 (1935); **236**, 201 (1935).

Ein sicheres Kriterium der einheitlichen Molekülgröße der durch die Thymo-polynucleotidase freigelegten Oligo-nucleotide wird sich erst durch systematische Fraktionierung (sei es durch Umfällung, sei es durch Dialyse) und Bestimmung der Molekulargewichte der einzelnen Fraktionen gewinnen lassen.

Darüber, sowie über die enzymatische Weiterspaltung dieser Nucleotide wird in einer weiteren Arbeit berichtet werden.

Aus den geschilderten Versuchen geht jedenfalls hervor, daß unter der Einwirkung der Polynucleotidase die riesigen, aus flachen Mononucleotid-Einheiten aufgeschichteten Stabmoleküle der Thymo-nucleinsäure, die einige hundertmal länger sind als ihre Dicke beträgt²²⁾, unter Freiwerden von Phosphorsäureaciditäten in Oligo-nucleotidgruppen zerlegt werden; damit ist die Größe von echt gelösten, osmotisch wirkenden, diffundierenden Säuremolekülen erreicht. Wahrscheinlich geht die Wirkung der „Nucleasen“ aus anderen Geweben ebensoweit wie die des untersuchten Ferments aus Pankreas.

Die Umwandlung der α -Form der Nucleinsäuren in die Produkte, die als β -Form beschrieben worden sind^{12, 13, 14)}, ist nicht mit einer so tiefgreifenden Hydrolyse verknüpft gewesen. Es bedarf weiterer Untersuchungen zur Entscheidung der Frage, ob die Wirkung der Polynucleotidase etwa auf mehrere Bestandteile zurückzuführen ist, von denen einer, der die ersten Schritte des Abbaues bewirkt, mit der Feulgenschen „Nucleogelase“ identisch wäre, „welche lediglich die gelatinierende Form der Nucleinsäure in die nichtgelatinierende überführt“ [¹²⁾, S. 274]. Es ist aber sehr wohl möglich, daß die Wirkung der „Nucleogelase“ deshalb bisher nur unvollständig beobachtet werden konnte, weil zu geringe Fermentmengen oder zu bald unwirksam werdende Fermentpräparate angewandt wurden. Die Empfindlichkeit der „Nuclease“ aus Pankreas gegen vergesellschaftete tryptische Fermente ist schon von F. Sachs beschrieben worden¹¹⁾.

Mit der hitzebeständigen, schon krystallisiert dargestellten Polynucleotidase aus Pankreas^{23, 24, 25, 26)}, die Hefe-nuclein-

²²⁾ W. T. Astbury u. F. O. Bell, *Nature* **141**, 747 (1938).

²³⁾ W. Jones, *Am. J. Physiol.* **52**, 203 (1920).

²⁴⁾ R. J. Dubos u. R. H. S. Thompson, *J. Biol. Chem.* **124**, 501 (1938).

²⁵⁾ G. Schmidt u. P. A. Levene, *J. Biol. Chem.* **126**, 423 (1938).

²⁶⁾ M. Kunitz, *Science* **90**, 112 (1939).

säuren hydrolysiert, ist die Thymo-polynucleotidase nicht identisch.

Zwar wirken unsere Präparate auch auf Hefe-nucleinsäure, gleich schnell, ob sie erhitzt oder nicht erhitzt worden sind. Thymo-nucleinsäure wird aber von erhitzten Polynucleotidase-lösungen nicht im geringsten mehr hydrolysiert²⁷⁾. Daraus ergibt sich mit Wahrscheinlichkeit, daß die Oligo-nucleotid-(Tetranucleotid-)einheiten in den Thymo-nucleinsäuren in anderer Weise miteinander verknüpft sind als in den Hefe-nucleinsäuren.

Beschreibung der Versuche

Die Darstellung der Nucleinsäuren aus Kalbsthymus wurde nach Levene⁶⁾ durchgeführt mit der Abänderung, daß der Eisenhydroxydniederschlag in einer Überlaufzentrifuge mit Trommel aus V2A-Stahl abgeschleudert wurde: Dadurch war die langwierige Filtration in der Hitze umgangen und der dabei eintretende, zuweilen recht weitgehende Abbau der Nucleinsäuren vermieden. Die erhaltenen Natriumsalze bildeten noch in 2%-igen Lösungen steife Gallerten. Die Umwandlung in Magnesiumsalze erfolgte durch mehrfache Umfällung mit Magnesiumacetat aus methanolischer Lösung.

Die Darstellung und die Eigenschaften der Polynucleotidase aus Pankreas werden in einer weiteren Arbeit beschrieben.

Alle Phosphorbestimmungen dieser Arbeit wurden nach den Angaben von E. Tschopp und E. Tschopp²⁸⁾ gemacht.

Einwirkung der „Nucleophosphatase“ nach Klein auf Thymo-nucleinsäure und auf vorgespaltene Nucleinsäure

I. 142,2mg thymo-nucleinsaures Ammonium (mit 10,0mg org. geb. P) + 10 ccm H₂O + 1 ccm m-Ammonsulfat + 40 mg MgO. Nach Einstellung auf p_H = 8,5 mit Kohlensäure wurde mit 3 ccm „Nucleophosphatase“-Lösung versetzt, nach Klein aus 2 ccm Glycerinauszug aus Darmschleimhaut dargestellt. Nach 14^h bei 38° waren 9,0 mg P noch org. geb. Spaltung 10%.

II. 1422 mg α-nucleinsaures Ammonium (mit 100 mg P) + 25 ccm H₂O + 3 ccm m-Ammonsulfat-Ammoncarbonatpuffer vom p_H 7,0 + 4 ccm Pankreasextrakt (2 g Schweinepankreas-Trockenpulver mit 16 ccm H₂O

²⁷⁾ Die Unwirksamkeit erhitzter Rib o-polynucleotidase auf Thymo-nucleinsäuren ist schon ²⁴⁾ festgestellt worden.

²⁸⁾ Helv. chim. Acta 15, 792 (1932).

ausgezogen). Nach 16^h bei 38° aufgeköcht und auf 50 ccm aufgefüllt. Davon 5 ccm (10,0 mg P) + 7 ccm H₂O + 40 mg MgO, mit CO₂ auf p_H 8,5 eingestellt + 3 ccm „Nucleophosphatase“-Lösung entsprechend Ansatz I. Nach 14^h bei 38° noch org. geb. P: 0,44 mg. Spaltung 95,6%.

Zunahme der Leitfähigkeit bei der Polynucleotidase-einwirkung

100 ccm einer dialysierten 1%-igen Lösung von thymo-nucleinsaurem Mg + 1 ccm einer Polynucleotidaselösung (20 mg Ferment). 37° Versuchstemperatur. p_H am Beginn der Einwirkung = 8,5. Vor Bestimmung der Leitfähigkeit (Apparat von Ruhstrat, Göttingen, mit Wechselstromgalvanometer) mußten die entnommenen Proben zur Flockung des Fermenteiweißes aufgeköcht werden, da sonst Vergiftung der Elektroden eintrat. Messungen bei 21°. Die Fermentlösung allein hatte keine meßbare Leitfähigkeit.

Zeit in Stunden:	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Widerstand in Ω:	470	340	290	272	260	250

Am Ende des Versuches, der mit geringen Fermentmengen und bei ungünstigem p_H angesetzt wurde, waren noch immer salzsäure-fällbare Polynucleotide vorhanden.

Abnahme der Viscosität bei der Polynucleotidase-einwirkung

Die Viscositätswerte der 1—2%-igen Lösungen von nucleinsauren Salzen unterscheiden sich stark, je nach den Herstellungsbedingungen des Präparates. Sie schwanken auch, wenn die Lösungen nach dem Erhitzen verschieden lange bei der Meßtemperatur gestanden sind. Zuweilen werden auch bei der ersten Messung höhere Werte erhalten als beim nächsten Durchfließen.

10 ccm einer dialysierten, klar zentrifugierten 2%-igen Lösung von thymo-nucleinsaurem Mg wurden mit 10 ccm Wasser und mit 1 ccm salzfrei dialysierter Polynucleotidase-Lösung (5 mg Trockensubstanz) versetzt. Die Messung erfolgte im Ubbelohde-Viscosimeter mit hängendem Kugelniveau (Capillare 0,1002) bei 20,3°.

p_H am Beginn der Fermentwirkung 7,9, am Ende 6,9.

Zeit in Minuten:	2	5	10	14	24	34	51	116
Durchlaufzeit in Sekunden:	74,5	61,5	41	32,8	23	20	17	15

Eine Lösung von 5 mg Ferment in 21 ccm Wasser hat eine Durchlaufzeit von 14,3 Sekunden.

Der Hauptabfall der Viscosität erfolgt schon in den ersten 15 Minuten. Nach 2 Stunden ist sie fast so klein, wie die einer Lösung mit Ferment allein.

Zunahme der Gefrierpunktserniedrigung durch die Einwirkung der Polynucleotidase

Für die Messungen wurden dialysierte Lösungen von thymo-nucleinsaurem Na verwendet, denen zur Aktivierung der ebenfalls durch Dialyse gereinigten Polynucleotidase etwas Magnesiumsalz zugefügt wurde.

Ansatz I. 10 ccm einer etwa 10⁰/₀-igen Lösung von thymo-nucleinsaurem Na + 5 ccm einer etwa 2⁰/₀-igen Lösung von thymo-nucleinsaurem Mg + 5 ccm Polynucleotidaselösung mit etwa 30 mg Ferment. In Ansatz enthalten: 81,5 mg P.

Ansatz II. Wie I, jedoch mit aufgekochtem Ferment.

Beide Ansätze 17,5 Stunden bei 37°.

$$\text{I. } F = - 0,275^{\circ} \quad \text{II. } F = - 0,030^{\circ} \quad A_F = 0,245^{\circ}.$$

Die Fermentlösung ergab weder sofort, noch nach 24 Stunden bei 37° eine meßbare Depression. Unter der Annahme, daß ein nicht dissoziiertes Polynucleotid mit sehr hohem Mol.-Gew. zu nicht dissoziiertem Tetranucleotid hydrolysiert wird, errechnet sich eine Depression von 0,06°.

Verschwinden der Salzsäure-fällbarkeit durch Einwirkung der Polynucleotidase

Durch Bestimmung der P-Menge, die im säurelöslichen Anteil vor und nach Wirkung des Ferments verbleibt, läßt sich der Abbau der Nucleinsäuren zu säure-nichtfällbaren Oligo-nucleotiden quantitativ verfolgen.

I. 5 ccm einer 2⁰/₀-igen Lösung von thymo-nucleinsaurem Mg (mit 7,1 mg P) + 0,5 ccm Fermentlösung (2 mg Ferment). p_H = 7. 17,25 Stunden bei 37°, dann 1 ccm n-HCl zugegeben, zentrifugiert, in einem Teil der klaren Restlösung P bestimmt.

In der Restlösung 1,25 mg P = 97⁰/₀.

II. Gleicher Ansatz wie I, jedoch Säurezugabe vor Fermentzugabe (zur Verhinderung einer Fermentwirkung) und sofortige P-Bestimmung. In der Restlösung 1,2⁰/₀ P.

III. Gleicher Ansatz wie I, jedoch mit aufgekochtem Ferment gestanden. In der Restlösung nach HCl-Fällung: 2⁰/₀ P.

Die Thymo-polynucleotidase wird also durch Erhitzen völlig inaktiviert. Hefe-nucleinsäure wird von den angewandten Polynucleotidase-Präparaten ebenfalls zu säurelöslichen Nucleotiden hydrolysiert; diese Wirkung wird jedoch in gleicher Weise auch von aufgekochten Fermentlösungen hervorgebracht.

IV. 5 ccm einer Lösung von Magnesium-ribo-nucleinat (etwa 2%-ig, mit 5,7 mg P) + 0,5 ccm Ferment (1,3 mg Trockensubstanz).

V. Gleicher Ansatz wie IV, jedoch mit erhitztem Ferment.

VI. Gleicher Ansatz wie IV, jedoch ohne Ferment.

Die drei Ansätze wurden nach 1 Stunde bei 37° (p_H zu Beginn = 7,0) mit je 0,5 ccm 2n-HCl versetzt und abzentrifugiert. In den Restlösungen waren vorhanden:

IV: 4,12 mg P = 72,3%. V: 4,07 mg P = 71,5%. VI: 0,99 mg P = 17,3%.

Eigenschaften der Oligo-nucleotide

Um die Hydrolyse der Thymo-nucleinsäure mit Sicherheit möglichst vollständig durchzuführen, wurden größere Mengen an gereinigter Polynucleotidase und längere Zeiten verwandt als zum Verschwinden der Salzsäure-Fällbarkeit gerade erforderlich. Nach dem Abtrennen des Fermenteiweiß und anderen Reinigungsoperationen, die in einer weiteren Arbeit mitgeteilt werden sollen, wurden die Natrium- und Magnesiumsalze der Oligo-nucleotide als rein weiße Pulver erhalten, die im gleichen Gewicht Wasser noch löslich sind. Diese konzentrierten Lösungen sind zwar dickflüssig, aber nicht im geringsten gallertig. Beim Fällen der Nucleotide aus den 20%-igen Lösungen ihrer Salze mit Salzsäure werden sie nur zu etwa $\frac{1}{3}$ als Öl abgeschieden, das bei weiterer Salzsäure-Zugabe völlig in Lösung geht. Für die β -Nucleinsäure gibt Feulgen¹³⁾ solche Konzentrationsverhältnisse an, um sie aus ihrem Salz frei zu machen und zu gewinnen.

Beispiel: 1 g Mg-oligo-nucleotid (mit 81,2 mg P) in 4 ccm H₂O wurden bei 0° mit 1 ccm 5 n-HCl versetzt und sofort zentrifugiert. 2,5 Minuten nach dem Ansäuern trennte man 5,2 ccm Restlösung ab, die 51,5 mg P enthielt. Das abzentrifugierte Öl löst sich auf Zugabe von weiteren 4 ccm H₂O + 1 ccm 5 n-HCl bei 0° fast völlig auf. In der klar zentrifugierten Lösung: 28,6 mg P.

In Wasser von 5° bilden freie Oligo-nucleotide etwa 1%-ige Lösungen, wobei wahrscheinlich schon Zersetzung eintritt.

Mit Molybdat in Mineralsaurer oder auch essigsaurer Lösung werden die Oligo-nucleotide auch in starker Verdünnung gefällt, ebenso wie die Thymo- und Hefe-nucleinsäuren selbst. Daraufhin geprüfte Mononucleotide (alle Ribo-nucleotide, Desriboguanylsäure, Muskel-adenylsäure) werden hingegen durch Molybdat nicht gefällt.

Die dargestellten Magnesiumsalze enthielten 8,2—8,5% P. Eine Guanin- und Adeninbestimmung ergab, daß beide Purine zu je 1 Mol pro 4 Atome Phosphor noch im Molekül vorhanden sind.

Kupfer-, Silber-, Cadmium-, Quecksilber-, Blei- und Wismutsalze sind nahezu so schwer löslich wie bei der α -Thymonucleinsäure. Cobalt (2)-, Nickel (2)- und Chrom (3)-Salze sind hingegen bei den Oligo-nucleotiden viel leichter löslich, noch mehr Zink- und Mangan (2)-Salze. Bei der Prüfung von Lösungen des α -thymo-nucleinsauren Natriums und des Mg-Salzes der Oligo-nucleotide (je 5 ccm, beide Lösungen 0,1%ig in bezug auf P und 0,1 n-essigsauer) tritt bei der letzteren nach Zugabe von 2 ccm 1 m-Kobalt-, Nickel- und Chrom-Salzlösungen nur Trübung auf; mit Zink- und Mangansalzen bleibt die Lösung völlig klar. α -Thymo-nucleinsäure wird unter diesen Bedingungen größtenteils gefällt.

Bestimmung des Molekulargewichts der Oligo-nucleotide durch Dialyse

Die Messung des Dialysenkoeffizienten erfolgt nach der von Brintzinger¹⁹⁾ angegebenen Methode, in der Ausführung von Jander und Spandau²⁰⁾ für Ionen von großem Molekulargewicht. Als Bezugssubstanz mit bekanntem Molekulargewicht M_s für die Ermittlung von M_x nach der Beziehung

$$\lambda_x \cdot \sqrt{M_x} = \lambda_s \cdot \sqrt{M_s}$$

dient tertiäres guanylsaures Natrium³⁰⁾ (mit 5,69% P). Die Apparatur entspricht der von Brintzinger verwendeten.

Versuchstemperatur 27°. Die Rührung wird von Synchronmotoren betrieben (Innenlösung: 100 U/Min.; Außenlösung: 120 U/Min.). Als

¹⁹⁾ Z. physik. Chem. Abt. A 185, 325 (1939); 187, 13 (1940).

³⁰⁾ H. Steudel u. E. Peiser, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 120, 292 (1922).

Außenlösung dienen 18,0 Liter einer 5,64%-igen Natriumnitratlösung (reinst, Merck). Die Zelle hat einen Durchmesser von 52 mm und wird mit 50 ccm Nucleotidlösung beschickt. Die Oberflächen von Innen- und Außenlösung müssen in genau gleicher Höhe liegen. Als Membran dient ein Ultracellafilter (Membranfilter-Ges., Göttingen) mit einem durchschnittlichen Porenradius von 500 ÅE. Vor den Bestimmungen befand sich die Membran zur „Gewöhnung“ schon 5 Tage in der Lösung. Die Nucleotide werden in solcher Menge in eine 5,64%-ige NaNO_3 -Lösung gebracht, daß diese dann 0,02–0,04%-ig an organisch gebundenem P ist. Vor dem Einfüllen in die Zelle befreit man von etwaigen Trübungen durch Zentrifugieren (15 000 U/Min.). 0,5–1 Stunde nach dem Einpipettieren der auf 27° vorgewärmten Lösung werden zur Bestimmung des Anfangswertes 2-mal je 1 ccm entnommen und 2 ccm Natriumnitratlösung nachgefüllt. In gleicher Weise werden nach geeigneten Zeiten weitere Doppelproben entnommen, wobei das Flüssigkeitsvolumen stets auf 50 ccm ergänzt wird.

Die P-Bestimmungen erfolgen nach Veraschung der Proben mit Schwefelsäure-Wasserstoffsperoxyd colorimetrisch nach der Vorschrift von E. Tschopp und E. Tschopp²⁸). Die durch Zusatz von Nitratlösung bei jeder Probeentnahme eingetretene Verdünnung muß natürlich bei der Berechnung berücksichtigt werden. Konzentrationsangaben c in mg P pro 50 ccm; Dialysendauer t in Minuten;

$$\lambda = \frac{2,803}{t} \times \log \cdot \frac{C_0}{C_t} .$$

Bestimmung von λ , (Riboguanylsäureion: $M = 361$)

	C_0	C_t	t	$\lambda \cdot 10^3$
I	18,80	13,84	107'	2,86
II	13,28	7,18	187'	3,28

Bestimmung von λ_x (Desribo-Oligonucleotid)

I	21,50	14,52	233'	1,69
II	13,98	9,68	199'	1,85
III	9,30	3,36	535'	1,91

Die λ -Werte zeigen sowohl in den Bestimmungen mit Guanylsäure wie mit den Oligo-nucleotiden einen Gang, für den keine Erklärung gegeben werden kann. Die regelmäßige Zunahme der Werte mit abnehmender Konzentration der Innenlösung kann nicht etwa auf ihre abnehmende Viscosität zurückgeführt werden; denn in den betreffenden Konzentrationsbereichen haben die Lösungen der Nucleotide mit dem starken Natriumnitratgehalt nur unmeßbare Viscositätsunterschiede, wie besonders festgestellt wurde. Vor Erkenntnis der Ursachen des beobachteten Ganges läßt sich daher nicht angeben, welche

Werte vergleichbar sind. Willkürlich und sicher nicht streng zutreffend ist außerdem die Annahme, daß die Guanylsäure und die Oligo-nucleotide als vollkommen dissoziierte Ionen diffundieren. Aus den λ_s - und λ_x -Mittelwerten errechnet sich $M_x = 1030$, aus den Werten bei gleicher Verdünnung (auf P bezogen, $\lambda_s = 3,28$; $\lambda_x = 1,86$) $M_x = 1120$. Berechnet für ein Tetranucleotid-Ion aus den vier verschiedenen Mono-nucleotiden $M = 1249$. Es ergaben sich also für die Oligo-nucleotide Molekulargewichte, die einer Zusammensetzung aus durchschnittlich 3,3, bzw. 3,6 Mononucleotiden (mit einem mittleren Mol.-Gew. von 327) entsprechen.

In einer Vorversuchsreihe unter etwas anderen Bedingungen, mit einem anderen Oligo-nucleotidpräparat und einem Gemisch der Mono-nucleotide aus Hefe-nucleinsäuren als Bezugssubstanz, wurden Werte erhalten von $\lambda_s = 3,55 \cdot 10^{-3}$ und $\lambda_x = 1,45 \cdot 10^{-3}$. Daraus errechnet sich ein durchschnittlicher Kondensationsgrad von 5,3 Mono-nucleotiden.

Bestimmung der bei der Polynucleotidase-einwirkung freiwerdenden sauren Gruppen

Die Polynucleotidase war durch 14-stündige Dialyse gegen fließendes destilliertes Wasser weitgehend von Ionen befreit (Membran: Cellophan 300).

Die Lösung des thymo-nucleinsauren Natriums (4 g in 200 ccm Wasser) war ebenfalls dialysiert worden, von der dabei aufgetretenen Flockung auf der Zentrifuge (15000 U/Min.) abgetrennt, mit 10 ccm n-Magnesiumsulfatlösung versetzt, mit n/10-NaOH auf p_H 7,55 eingestellt und dann für Ansatz I und II hälftig geteilt.

Ansatz I. Lösung des nucleinsauren Natriums + Fermentlösung (mit 100 mg Trockensubstanz) auf 250 ccm aufgefüllt.

Ansatz II. Gleicher Ansatz, jedoch mit aufgekochter Fermentlösung.

Ansatz III. Fermentlösung wie in I + 5 ccm n-Magnesiumsulfatlösung, durch Zusatz von n/10-NaOH auf p_H 7,62 gebracht, ebenfalls auf 250 ccm aufgefüllt.

Es wurden sowohl die auftretenden p_H -Verschiebungen gemessen wie die freiwerdenden sauren Gruppen durch Titration mit Natronlauge bestimmt.

Die p_H -Werte der bei 38° gehaltenen Ansätze (gemessen mittels eines Lautenschlägerschen Ionometers) betragen nach t Minuten:

	$t = 0'$	6'	15'	960'
In I	(7,30)*	6,78	6,34	5,83
„ II	7,30	—	—	7,40
„ III	7,62	—	—	7,36

*) Dieser Wert kann nach der Mischung von Ferment- und Salzlösung infolge des sofort einsetzenden Abbaus nicht direkt gemessen werden; er muß aber gleich dem in Ansatz II sein.

Nach 960' fanden wir für je 20 ccm der Ansätze folgenden Verbrauch $n/10$ -NaOH bis zum Umschlag von Phenolphthalein (Mikrobürette, Lupenablesung); angegeben sind Durchschnittswerte aus je 5 Titrationen mit Abweichungen von höchstens 3%:

Ansatz I: 1,214 ccm; II: 0,268 ccm; III: 0,134 ccm (bei $t = 0$ 0,062 ccm).

Durch Abbau der Nucleinsäuren und Selbstverdauung des Fermentes waren Aciditäten entstanden entspr. 1,214—0,268 = 0,946 ccm $n/10$ -NaOH. Auf die Selbstverdauung entfielen 0,139—0,062 = 0,072 ccm.

Im Ansatz I waren also

$$\frac{250}{20} (0,946 - 0,072) \cdot 10^{-1} = 1,09 \text{ Milliäquivalent}$$

saure Gruppen freigeworden. Da in dem Ansatz 133,6 mg = 4,33 Millimol P vorlagen, sind auf 4 Millimol P 1,01 Milliäquivalent saure Gruppen aufgetreten.

Prüfung auf eine weitere Einwirkung der Polynucleotidase

82 ccm Ansatz I (enthält 43,7 mg P) mit $n/10$ -NaOH genau neutralisiert, aufgeköcht, vom geflockten Fermenteiweiß abzentrifugiert, mit $n/10$ -NaOH auf $p_H = 7,40$ eingestellt, 2-mal 40 ccm von der auf 95 ccm angewachsenen Lösung abgeteilt und jeden Teil mit 18,4 mg Nucleinsäurephosphor auf 50 ccm aufgefüllt.

Ansatz Ia: 40 ccm dieser vorgespaltene Nucleinsäurelösung + 5 ccm frische Polynucleotidaselösung (13 mg Trockensubstanz).

Ansatz Ib: wie Ia, jedoch Fermentlösung aufgeköcht.

	$t = 0$	17 ^h
Ia. p_H	7,31	7,21
Ib.	7,29	7,36

Je 10 ccm nach 17^h verbrauchten an $n/10$ -NaOH (Mittel aus 3 Titrationen):

Ia: 0,170 ccm; Ib: 0,162 ccm. Der Differenzwert liegt innerhalb der Fehlergrenze.

Die erneute Einwirkung der Polynucleotidase auf die im Ansatz I vorgespaltene Nucleinsäure machte also keine weiteren Säuregruppen frei.

Es sei als weiteres Beispiel noch eine Versuchsreihe angegeben, die unter ähnlichen Bedingungen, jedoch mit einem anderen Ferment- und Thymonucleinatpräparat durchgeführt wurde: I enthielt gleiche Mengen nucleinsaures Mg wie II, jedoch die doppelte Menge Ferment. III und IV waren die Kontrollen zu I und II, mit aufgekochtem Ferment. V enthielt nur Fermentlösung.

Nach 11 Stunden bei 38° ergab die Titration mit Phenolphthalein als Indicator nach Abzug der Kontrollwerte:

In I waren 1,09 Säureäquivalent pro 4 P freigeworden.

„ II „ 0,87 „ „ 4 „ „ .

Ansatz II wurde nach dem Aufkochen, Abtrennen vom Eiweiß und Einstellung auf $p_H = 7,10$ erneut mit einer gleichen Menge frischer Polynucleotidase 12 Stunden behandelt. Dadurch stieg der Wert der im ganzen freigewordenen Aciditäten nur auf 0,96 Äquivalent pro 4 P.