

teils blasiger Strukturen (Abb. 4). Eine Ablösung von Chromatinpartikeln aus den Chromosomen wird nur selten beobachtet.

Es ist uns bisher noch nicht gelungen, die für den geschilderten Effekt, die Chromatinolyse, verantwortlichen Faktoren des Knoblauchextraktes eindeutig festzustellen. Einer dieser Faktoren scheint entweder thermolabil oder leicht flüchtig zu sein, was uns dazu veranlaßte, den Extrakt auf die Anwesenheit verschiedener Fermente zu untersuchen. Es konnte die Anwesenheit einer stark wirksamen Desoxyribonuclease, welche in verschiedener Hinsicht bemerkenswerte Eigenschaften aufwies und in der II. Mitteilung dieser Reihe⁵ beschrieben wird, sowie einer Phosphomonoesterase vom Typus A_{II} nach *Folley* und *Kay*⁶ festgestellt werden. Hingegen scheint der Extrakt keine Proteasen und auch keine Ribonuclease zu enthalten. Ob und wie weit die aufgefundenen Enzyme, insbesondere die Desoxyribonuclease, an der Chromatinolyse mitwirken, konnte bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt werden.

Inhaltsstoffe des Knoblauchs und ihre Wirkungen.

II. Über eine bisher noch unbekannte Desoxyribonuclease.

Von

**W. Frisch-Niggemeyer, K. Keck, Hilka Kaljunen
und O. Hoffmann-Ostenhof.**

(Kurze Mitteilung.)

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 1 Abbildung.

(Eingelangt am 13. Juli 1951. Vorzulegen in der Sitzung am 11. Okt. 1951.)

Wie in der vorhergehenden Arbeit¹ berichtet wurde, gelang es uns, in einem Knoblauchextrakt die Anwesenheit eines Enzyms nachzuweisen, welches imstande ist, Desoxyribonucleinsäure abzubauen. Da diese Desoxyribonuclease Eigenschaften zeigt, welche sie wesentlich von anderen Enzymen der gleichen Wirkung unterscheidet, bringen wir hier eine kurze Beschreibung unserer bisherigen Ergebnisse.

⁵ W. Frisch-Niggemeyer, K. Keck, H. Kaljunen und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **82**, 758 (1951).

⁶ S. J. Folley und H. D. Kay, Ergebn. Enzymforsch. **5**, 159 (1936).

¹ K. Keck, W. Frisch-Niggemeyer, D. Ascher und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **82**, 755 (1951).

Methodik.

Darstellung des Enzympräparates. 20 g geschälte Knoblauchzwiebeln wurden mit 75 ml Wasser versetzt und 1 Min. lang im Waring-Blendor zerkleinert. Sofort darauf wird durch ein grobes Filter abgesaugt. Der erhaltene Extrakt wird zirka 4 Stdn. bei 8° stehen gelassen, wobei sich ein Niederschlag bildet, welcher durch Abzentrifugieren entfernt wird. Die so erhaltene Rohlösung zeigt eine Desoxyribonucleaseaktivität von 6 Einheiten nach *McCarthy*² pro mg mit Trichloressigsäure fällbarem Stickstoff. Das Enzym läßt sich aus der Rohlösung durch fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat (Sättigungsgrad zwischen 0,25 und 0,35) ausfällen, wodurch eine Anreicherung auf 10 Einheiten/mg N erreicht wird. Durch 15 Min. langes Erhitzen auf 55° fallen aus der Lösung des Ammoniumsulfatniederschlages inerte Proteine aus, wodurch eine weitere Anreicherung auf 14 Einheiten/mg N erfolgt.

Substrat. Die für unsere Versuche als Substrat verwendete Desoxyribonucleinsäure wurde aus Kalbsthymus nach einem von uns entwickelten Verfahren hergestellt, welches aber in seinen Grundzügen als eine Modifikation der Arbeitsweise von *Signer* und *Schwander*³ gelten kann.

Messung der Enzymaktivität. Die Aktivitätsmessung erfolgt durch Beobachtung der Viskositätsabnahme in *Ostwald*-Viskosimetern mit einer Durchlaufzeit für Wasser von etwa 100 Sek. bei 30°. 60 mg der als Substrat dienenden Desoxynucleinsäure werden in 15 ml 0,1 molarem Maleinsäurepuffer⁴ gelöst und von dieser Lösung 3,5 ml in das Viskosimeter pipettiert. Nach Zugabe von 1 ml Wasser werden 0,5 ml der Fermentlösung hinzupipettiert und der Viskositätsabfall in entsprechenden Zeitabständen bestimmt. Alle Messungen erfolgen im Thermostaten bei 30°.

Prüfung des Enzympräparats auf die etwaige Anwesenheit eines Cofaktors oder aktivierenden Ions durch Dialyse. 5 ml der Enzymrohlösung werden 24 Stdn. gegen fließendes Leitungswasser in Cellophanschläuchen dialysiert und ebenso lange werden 5 ml Wasser gegen 75 ml Fermentrohlösung bei 8° dialysiert. Eine Mischung von gleichen Teilen dialysierter Rohlösung und destilliertem Wasser verursachte genau den gleichen Abfall der Viskosität der Substratlösung wie eine Mischung von gleichen Teilen Fermentrohlösung und gegen Rohlösung dialysiertem Wasser.

Ergebnisse und Diskussion.

Die Desoxyribonuclease des Knoblauchs unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von den bisher näher untersuchten Enzymen der gleichen Wirkungsweise, nämlich dem aus Pankreas² und demjenigen aus Hefe⁵. Während diese beiden Fermente für ihre Aktivität die Anwesenheit von Mg^{++} benötigen, scheint dies beim Knoblauchenzym nicht der Fall zu sein. Dialyse inaktiviert das Ferment nicht und die Zugabe von Zitrat oder Fluorid hat keinen hemmenden Einfluß auf die Wirksamkeit.

² *M. McCarthy*, J. gen. Physiol. **29**, 123 (1946).

³ *R. Signer* und *H. Schwander*, Helv. chim. Acta **33**, 1521 (1950).

⁴ *G. Smits*, Biochim. biophys. Acta **1**, 280 (1947).

⁵ *S. Zamenhof* und *E. Chargaff*, J. biol. Chemistry **180**, 727 (1949).

Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei pH 6,5 (Abb. 1), während dasjenige des Pankreasferments bei etwa 7,4 und dasjenige des Hefeferments bei 6,0 gelegen ist.

Während Arsenat und, wie bereits erwähnt, Citrat und Fluorid keine Hemmwirkung ausüben, zeigt Jodessigsäure eine schwache derartige Wirkung. Cystein aktiviert in 10^{-2} molarer Konzentration deutlich. Eine starke Aktivierung verursachen auch — analog wie beim Enzym

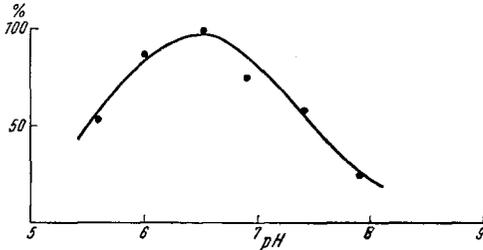


Abb. 1. Abhängigkeit der Aktivität der Desoxyribonuclease aus Knoblauchsaff von der Wasserstoffionenkonzentration. Ordinate stellt die Aktivität in Prozenten der Maximalaktivität dar.

aus Pankreas⁶ — die Hexonbasen; ebenso wie dort erweist sich Histidin in 10^{-2} molarer Konzentration etwas mehr als doppelt so wirksam wie Lysin und Arginin.

Das Ferment zeigt eine bemerkenswerte Thermostabilität. 15 Min. Erhitzen auf 55° verringert die Aktivität überhaupt nicht; auch durch gleichlanges

Erwärmen auf 75° oder einmaliges kurzes Aufkochen wird die Wirksamkeit nicht völlig zerstört.

Versuche, ein gleichartiges Ferment aus *Allium cepa* (Speisezwiebel) in analoger Art herzustellen, verliefen bisher negativ.

Die Existenz pflanzlicher Desoxyribonucleasen wurde erstmalig von Greenstein und Jenrette⁷ nachgewiesen; die Forscher fanden Fermente dieser Wirksamkeit in Keimlingen von Mais, Weizen, Kürbis, Sonnenblumen und Limabohnen. Eine Charakterisierung dieser Enzyme scheint aber nicht erfolgt zu sein, so daß wir nicht feststellen können, ob unser Knoblauchenzym dem Typus der pflanzlichen Desoxyribonucleasen entspricht.

⁶ W. Frisch-Niggemeyer und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. 81, 607 (1950).

⁷ J. P. Greenstein und W. V. Jenrette, J. nat. Cancer Inst. 2, 301 (1941).