baren, virusspezifischen, biologischen Testen nicht erfaßt werden kann. Spätestens 2 Stdn. p.i. ist die Synthese dieses hypothetischen Matrizen-Komplexes abgeschlossen. Nunmehr beginnt die gleichzeitige Synthese von Virus-RNS und s-Antigen-Protein im Zellkern⁴. An diesem Ribonucleoprotein wird sofort das Protein des Hämagglutinins synthetisiert (vgl. auch Anm.²⁸), das allerdings erst später im Cytoplasma⁴ seine für die biologische Aktivität erforder-

liche Struktur erhält. Der Zusammenbau der beiden Untereinheiten zum infektiösen Viruspartikel erfolgt in unmittelbarer Nähe der Zellmembran²⁹.

Herrn Professor Dr. W. SCHÄFER danken wir für die Unterstützung und Förderung der Arbeit, Fräulein D. KUNERT, Herrn O. HARZER und Herrn W. KRAUS für ihre wertvolle Mithilfe. Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

²⁸ L. HOYLE, J. of Hyg. **50**, 229 [1952].

²⁹ G. HOTZ u. W. SCHÄFER, Z. Naturforschg. **10 b**, 1 [1955].

Säurehydrolyse von Ribonucleinsäure und Desoxyribonucleinsäure

Von W. POLLMANN und G. SCHRAMM

Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen
(Z. Naturforschg. **16 b**, 673—678 [1961]; eingegangen am 28. Juli 1961)

A method for the potentiometric titration of secondary phosphate groups in nucleic acids is described. Ribonucleic acids of yeast and of microsomes contain 5–6% secondary phosphate groups which cannot be removed by dialysis. The potentiometric method was applied to study several enzymatic hydrolyses and the non-enzymatic hydrolysis between pH 2.4–1.8. The rate of hydrolysis for the purines and for the phosphate groups is approximately proportional to the H^+ -concentration. The constants of hydrolysis for ribonucleic acid and for deoxyribonucleic acid were determined. In DNA the depurinisation is 650 times faster than in RNA.

In den Nucleinsäuren kommen zwei Arten von Bindungen vor, die in saurer Lösung leicht hydrolysiert werden: 1. die glykosidische Bindung zwischen den Zuckerresten und den Purinen und 2. die Phosphorsäurediester-Bindung zwischen den einzelnen Zuckerresten. Die Stabilität der glykosidischen Bindung ist abhängig von den benachbarten Substituenten, die Spaltung erfolgt bei den Purinen bedeutend leichter als bei den Pyrimidinen und ist auch von Purin zu Purin etwas verschieden. Die Gründe hierfür wurden kürzlich in einer Arbeit von MICHEEL¹ aufgezeigt. Die Beständigkeit der Glykosid-Bindung ist aber auch von der Art des beteiligten Zuckers abhängig, denn bei der DNS (Desoxyribonucleinsäure) erfolgt die Purinabspaltung viel leichter als bei der RNS (Ribonucleinsäure), so daß aus der DNS Purinreste quantitativ abgespalten werden können, ohne daß hierbei die hochmolekulare Struktur völlig zerstört wird. Diese Hydrolysenprodukte wurden von CHARGAFF als *Apurinsäuren*² bezeichnet. Von FREESE³ wurde gezeigt, daß die Entfernung bestimmter Basen aus der DNS zu Mutationen füh-

ren kann, da bei der nachfolgenden Vermehrung diese Fehlstellen durch andere Basen wieder aufgefüllt werden. Auf der anderen Seite geht aus Untersuchungen an verschiedenen isolierten Nucleinsäuren hervor, daß die Hydrolyse der Phosphatbrücken zu einer Inaktivierung führt. Es ist daher wichtig, genaue Unterlagen dafür zu besitzen, inwieweit eine Spaltung der glykosidischen Bindungen zu den Purinen ohne Kettenabbau möglich ist. Die Möglichkeit zur Herstellung von Apurinsäuren hängt von dem Verhältnis der beiden Reaktionskonstanten ab. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Hydrolysen-Geschwindigkeit der Phosphorsäurediester-Gruppen zu den sekundären Phosphaten und die Hydrolysen-Geschwindigkeit der glykosidischen Bindungen zu den Purinen bei verschiedenen Nucleinsäuren quantitativ bestimmt. Zur Messung der ersten Reaktion arbeiteten wir ein potentiometrisches Titrationsverfahren aus. Die Menge der abgespaltenen Purinreste wurde nach bereits bekannten Verfahren durch Chromatographie und anschließende Extinktionsmessung bestimmt.

¹ F. MICHEEL, A. HESSING, Chem. Ber. **94**, 1814 [1961].

² CH. TAMM, M. E. HODES u. E. CHARGAFF, J. biol. Chemistry **195**, 49 [1952].

³ E. BAUTZ u. E. FREESE, Proc. nat. Acad. Sci. USA **47**, 540 [1961]; E. FREESE, Brookhaven Sympos. **12**, 63 [1959].

Die Potentiometrische Titration

Nach FLETCHER⁴ und anderen liegt der p_K -Wert der primären Phosphatgruppen in den Nucleinsäuren bei 1, der der sekundären bei 6. Diese Gruppen sollten also ohne weiteres nebeneinander titrierbar sein. Nach diesen Autoren ist in dem Umschlagsintervall der sekundären Phosphatgruppen keine Störung durch andere dissoziierende Gruppen zu erwarten. Wir überzeugten uns zunächst durch Modellversuche von der Richtigkeit dieser Annahme. Hierzu wurden Mischungen der vier Nucleotide und der vier Nucleoside in den gleichen Mengenverhältnissen hergestellt, wie sie in der Hefe-RNS vorliegen, und von jeder dieser Mischungen die Titrationskurve mit dem Titrator der Firma Radiometer, Copenhagen, aufgenommen. Das Ergebnis ist in Abb. 1 wiedergegeben. Die Mischungen unterscheiden sich nur durch eine Phosphatgruppe je Mol Nucleosid.

Abb. 1. Titrationskurve des Nucleotid- und Nucleosid-Gemisches bezogen auf 16 mg RNS. Nucleotid-Kurve O—O, Nucleosid-Kurve x—x, Differenz-Kurve x—x—x.

Durch die Differenzbildung zwischen Nucleotid- und Nucleosid-Kurve erhält man den exakten Kurvenverlauf für die Dissoziation der Phosphatgruppen. Die Kurve hat bei den p_H -Werten 4,0 und 8,05 ihre Wendepunkte. Diese lassen sich besonders genau bestimmen, wenn man die Differenzkurve Δp_H : Laugenverbrauch aufträgt. Der Kurvenverlauf zwischen den Wendepunkten entspricht also der Dissoziationskurve der sekundären Phosphatgruppen. Man erkennt weiter, daß zwischen p_H 3 und 4 kaum Lauge verbraucht wird, daß also bei dem gewählten Start-

punkt die Dissoziation der primären Phosphatgruppe bereits vollständig ist. Der Verlauf der Differenzkurve an den Endpunkten bedingt, daß kleine Meßfehler im p_H -Wert das Resultat kaum beeinflussen. Der begrenzende Faktor ist in erster Linie der Bürettenfehler. Er beträgt maximal 0,04 ml n/100-NaOH, was etwa 0,4 mg Mononucleotid entspricht, macht also bei der angewandten Menge von 16 mg maximal 2% aus. Die Methode ist daher für verhältnismäßig kleine Substanzmengen geeignet.

Anschließend wurde eine vergleichende Titration verschiedener hochmolekularer Ribonucleinsäuren aus Hefe- sowie Ratten- bzw. Kalbslebermikrosomen und eines entsprechenden Gemisches aus Nucleosiden durchgeführt. Falls die hochmolekularen Nucleinsäuren nur primäre und keine sekundären Phosphatgruppen enthalten, sollten die Titrationskurven im Bereich p_H 4–8 identisch sein. Bei allen drei Nucleinsäure-Präparaten lag aber die Titrationskurve in dem Intervall p_H 4–8 um 5–6% höher (s. Abb. 2). Aus den in der Ultrazentrifuge bestimmten Mol.-Gew. läßt sich berechnen, daß die Zahl der endständigen, sekundären Phosphatgruppen viel geringer als 5% ist. Alle drei RNS-Präparate haben einen höheren Phosphor-Gehalt als der

Abb. 2. Titrationskurve von Hefe-RNS und des entsprechenden Nucleosid-Gemisches, bezogen auf 16 mg RNS. Hefe-RNS-Kurve O—O, Nucleosid-Kurve x—x, Differenz-Kurve x—x—x.

Theorie entspricht (s. Tab. 2). Dieses Phosphat läßt sich durch Dialyse nicht entfernen. Das Titrationsergebnis ist daher wohl so zu erklären, daß an bestimmten Stellen der Polynucleotidkette zusätzlich Phosphorsäure eingebaut ist. Sekundäre Phosphat-

⁴ W. E. FLETCHER, J. M. GULLAND u. D. O. JORDAN, J. chem. Soc. [London] 1944, 33.

gruppen wurden auch von anderen Autoren⁴⁻⁶ in der RNS festgestellt. Es scheint uns jedoch nicht gerechtfertigt, hieraus den Schluß zu ziehen, daß diese Polynucleotide eine verzweigte Struktur aufweisen.

Die Titrationskurve von Thymus-DNS wurde ebenfalls mit der eines entsprechenden Nucleosid-Gemisches verglichen. Auch hier ergab sich eine kleine Abweichung, die aber nicht der reinen Titrationskurve einer Phosphatgruppe entsprach. Es dürfte wohl hier die puffernde Wirkung der H-Brücken in der Doppelspirale eine Rolle spielen. Sichere Schlüsse auf das Vorhandensein sekundärer Phosphatgruppen lassen sich hier also nicht ziehen. Mit dem Titrationsverfahren kann jedoch auch bei DNS die Zunahme der sekundären Phosphatgruppen bei hydrolytischen Prozessen gut erfaßt werden.

Enzymatische Hydrolyse

Zu Vergleichszwecken wurden zunächst einige enzymatische Hydrolysen ausgeführt. Hierbei wurden die Nucleinsäuren bei konstantem p_H -Wert und 37 °C mit dem entsprechenden Enzym behandelt, zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen und in diesen der Verbrauch an $n/100$ -NaOH zwischen p_H 4,00 und 8,00 bestimmt. Am Schluß des Versuchs wurde jeweils eine vollständige Titrationskurve des Spaltgemisches aufgenommen.

Abb. 3. Spaltung der Hefe-RNS mit Pankreas-Ribonuclease 25,5 mg RNS und 25 γ Ribonuclease in 100 ml H_2O bei p_H 6,5 und 37 °C.

Der zeitliche Verlauf der Hydrolyse von Hefe-RNS mit Pankreas-Ribonuclease ist in Abb. 3 wiedergegeben. Da dieses Enzym nur am 3'-Phosphat der Pyrimidin-Nucleotide angreift, ist theoretisch eine 47-proz. Spaltung zu erwarten. Die in Abb. 3 dargestellte Kurve nähert sich asymptotisch einem Spaltendpunkt von 40 Prozent. Vorübergehend sinkt der Wert der sekundären Phosphatgruppen auf Null.

Dies ist wahrscheinlich durch eine intermediäre Bildung von cyclischem Phosphat zu erklären. Bei dem nach 2 Std. Ribonuclease-Einwirkung erhaltenen Oligonucleotid-Gemisch war der p_K -Wert geringfügig von 5,9, dem Wert von Mononucleotiden, auf 6,0 verschoben.

Auch bei der Spaltung mit Tabakdiesterase war ein anfängliches Absinken der sekundären Phosphatgruppen zu beobachten. Ein Endwert der Spaltung wurde nach etwa 40 Std. erreicht, er betrug 87% des theoretisch zu erwartenden Wertes. Es sind also in der RNS gewisse Bindungen vorhanden, die durch Tabakdiesterase nur langsam angegriffen werden.

Bei der Spaltung von Thymus-DNS mit Desoxyribonuclease wurde nach 10 Std. ein Endwert erreicht, der 22% des vorhandenen Phosphats entspricht. Gemäß der allgemeinen Erfahrung wird nur etwa jede vierte Bindung angegriffen.

Säurehydrolyse

Bei der RNS wurde die Säurehydrolyse der Phosphatgruppen im p_H -Bereich 1,8 – 2,4 untersucht. In Abb. 4 ist die Zunahme der sekundären Phosphatgruppen in logarithmischem Maßstab aufgetragen.

Abb. 4. Säurespaltung der Phosphatbrücken in der Hefe-RNS bei 37 °C. p_H 1,8, $\times$; p_H 2,0, $\circ$; p_H 2,4, Δ .

Der Kurvenverlauf entspricht einer monomolekularen Reaktion. In der Tab. 1 sind die bei verschiedenen p_H -Werten gefundenen Hydrolysekonstanten zusammengestellt. Man erkennt, daß die Hydrolysegeschwindigkeiten der H^+ -Konzentration annähernd proportional sind. Bemerkenswert ist, daß die Phosphatgruppen bei der DNS etwa gleich schnell hydrolysiert werden wie bei der RNS.

In den gleichen Ansätzen, in denen die Phosphathydrolyse gemessen wurde, wurde auch die Abspal-

⁵ L. F. CAVALIERI, S. E. KERR u. A. ANGELOS, J. Amer. chem. Soc. 73, 2567 [1951].

⁶ J. E. BACHER u. F. W. ALLAN, J. biol. Chemistry 184, 511 [1950].

p_H	RNS				DNS	
	K_{Phosphat} in 10^{-6} min^{-1}	$K_{\text{Ph}}/(\text{H}^{\oplus})$ in 10^{-3}	K_{Purin} in 10^{-6} min^{-1}	$K_{\text{Purin}}/(\text{H}^{\oplus})$ in 10^{-4}	K_{Phosphat} in 10^{-6} min^{-1}	K_{Purin} in 10^{-6} min^{-1}
2,4	6,4	1,6	1,2	3,0	6,6	780
2,0	12,7	1,3	2,7	2,7	—	—
1,8	15,8	1,1	3,2	3,2	—	—

Tab. 1. Hydrolysenkonstanten der Kettenspaltung K_{Phosphat} und der Purinabspaltung K_{Purin} bei der RNS und DNS, gemessen bei 37°C .

Abb. 5. Basenabspaltung bei Hefe-RNS, 37°C , p_H 1,80
Adenin $\times$; Guanin $\circ$.

Abb. 6. Basenabspaltung bei Hefe-RNS, 37°C , p_H 2,40
Adenin $\times$; Guanin $\circ$.

tung der Basen verfolgt. Zwei Beispiele sind in Abb. 5 und 6 wiedergegeben. Die Abspaltung des Guanins erfolgt bei p_H 1,8 etwa doppelt so schnell wie die des Adenins. Bei p_H 2,4 ist dies anfangs ebenso, doch sinkt später die Hydrolyse-Geschwindigkeit des Guanins auf den Wert des Adenins. In Tab. 1 sind die mittleren Hydrolysen-Geschwindigkeiten der Purinreste bei verschiedenem p_H -Wert angegeben; auch die Spaltung der Glykosidbindung erfolgt also etwa proportional der $\text{H}^{\oplus}$ -Konzentration. Bei der DNS wurden Adenin und Guanin mit derselben Geschwindigkeit abgespalten, doch sind

hier die Hydrolysen-Geschwindigkeiten der Purinreste 650-mal höher als bei der RNS (s. Tab. 1).

Besprechung der Ergebnisse

Da sowohl die Phosphatspaltung als auch die Glykosid-Spaltung annähernd der $\text{H}^{\oplus}$ -Konzentration proportional ist, ist die Ausbeute an Apurinsäuren unabhängig vom p_H -Wert. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeiten von der Protonenkonzentration spricht dafür, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Anlagerung eines Protons ist. Sie wird um so langsamer erfolgen, je elektronenärmer der Angriffsort ist. Es ist daher verständlich, daß die elektronen-anziehende OH-Gruppe im C2' einen stabilisierenden Einfluß auf die Glykosidbindung ausübt. Bei der DNS gelingt also die Darstellung von Apurinsäure sehr viel leichter als bei RNS. Trotzdem besteht auch hier eine Möglichkeit, intakte Moleküle zu erhalten, die einen Purinrest verloren haben. Der Anteil der Ketten, die nach der Zeit t noch keine Phosphatspaltung, jedoch eine Purinspaltung, erlitten haben, ist

$$M_{\text{Apurinsäure}} = e^{-N_1 \alpha t} (1 - e^{-N_2 \beta t}) \quad (1)$$

N_1 = Zahl der Phosphatbrücken = Zahl der Ketten-glieder; $\alpha = k_{\text{Phosphat}}$; $\beta = k_{\text{Purin}}$; N_2 = Zahl der Purinreste.

Diese Funktion hat ein Maximum bei

$$t = \ln \frac{N_1 \alpha + N_2 \beta}{N_1 \alpha} : N_2 \beta.$$

Für die RNS aus Tabakmosaikvirus gelten folgende Werte $N_1 = 6400$, $N_2 = 3200$. Bei einem p_H von 2,4 und 37°C ist dann $t_{\text{max}} = 25$ Minuten. Durch Einsetzen dieser Zahl in Gl. (1) erhält man den maximalen Anteil an Apurinsäuren zu $M_A = 3,6$ Prozent. Zu diesem Zeitpunkt ist die Zahl der noch vollkommen intakten Moleküle, die weder Phosphat- noch Purinspaltung erlitten haben, 33% und die Zahl der bereits gespaltenen Moleküle 63 Prozent.

Bei der DNS verkürzt sich $t_{\max}$ infolge der schnelleren Purinspaltung und des höheren Mol.-Gew. natürlich erheblich. Es ist hier verhältnismäßig leicht, Ketten zu erhalten, die mehrere Purinreste verloren haben, ohne daß sie zerbrochen sind. Auf die Wiedergabe einer Berechnung wird hier verzichtet. Es wird interessant sein zu prüfen, wieweit derartige Apurinsäuren in ihrer genetischen Funktion verändert sind. Von SCHRAMM, GRÖTSCH und POLLMANN⁷ wurde weiterhin ein Verfahren gefunden, um die entstandenen Fehlstellen durch andersartige Basen wieder aufzufüllen. Es können also nach der Nomenklatur von Freese verschiedene Transitionen (Ersatz eines Purins durch ein anderes Purin) und Transversionen (Ersatz eines Purins durch ein Pyrimidin) durchgeführt werden.

Material und Methoden

Darstellung der Nucleinsäuren

Die RNS aus Bäckerhefe wurde in Anlehnung an die Vorschrift von CHESTERFIELD⁸ mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat und mehrfacher NaCl-Fällung hergestellt. Die Mikrosomen-RNS aus Ratten- bzw. Kalbsleber wurde aus der durch differentielle Zentrifugation der Leberhomogenate⁹ gewonnenen Mikrosomenfraktion isoliert. Hierzu wurde die Phenol-Extraktionsmethode von SCHUSTER, SCHRAMM und ZILLIG¹⁰ und anschließende Äthanol-fällung angewandt. Die Darstellung der DNS erfolgte nach ZAMENHOF¹¹ aus frischen Kalbsthymusdrüsen mit Natriumcitratpuffer sowie NaCl- und Äthanol-fällungen.

	Hefe-RNS	Mikrosomen-RNS	Thymus-DNS
DNS-Gehalt	0,5%	0,27%	—
Protein-Gehalt	1%	1%	1%
Phosphor	8,2%	9,7%	9,8%
Stickstoff	13,4%	16,6%	18,6%
Atom. N/P	3,6	3,8	4,1
Viskosität $[\eta]$ 0,02 -m-Phosphat pH 7	65	103	ca. 10 ³
Sedimentations- konstante in S	4,5–5S	28; 17 S	—
Molekulargewicht	65000	1,7 · 10 ⁶ 0,6	6 · 10 ⁶

Tab. 2. Charakterisierung der Nucleinsäure-Präparate.

Reinheitsprüfung der Nucleinsäuren

Zur Bestimmung des DNS-Gehalts in den RNS-Präparationen benützten wir die Methode nach DISCHE¹³ mittels Diphenylamin. Der Proteingehalt wurde nach der verfeinerten Biuret-Reaktion nach MARKHAM¹⁴ bestimmt. Die Viskositätsmessungen erfolgten im Ostwald-Kapillar-Viskosimeter bei 20,0 °C. Durch Messungen an Verdünnungsreihen konnte auf die Viskositätszahl $[\eta]_{c \rightarrow 0}$ extrapoliert werden. Die Eigenschaften der verschiedenen Präparate sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Potentiometrische Titration

Die vorliegenden Titrationen wurden mit dem Autotitrator der Firma Radiometer, pH -Genauigkeit 0,02 Einheiten, durchgeführt. Titriert wurde bei 20,0 °C unter magnetischem Rühren und Stickstoff mit $n/100$ -NaOH aus einer Feinbürette mit einer Ablesegenauigkeit von 0,02 Milliliter. Die Eichung erfolgte jeweils mit Standard-Acetat-Puffer von pH 4,62. Für die vollständigen Titrationskurven wurde der Verbrauch an $n/100$ -NaOH in pH -Intervallen von 0,5 Einheiten gemessen. Bei den Spaltungsversuchen wurde die Probe auf pH 4 gebracht und der Gesamtverbrauch zwischen pH 4,0 und 8,0 bestimmt.

Messung der Purin-Abspaltung

Zu bestimmten Zeitabständen entnommene Proben wurden gefriergetrocknet, in 2 ml Wasser aufgenommen und in zwei Parallelbestimmungen das freigesetzte Adenin und Guanin auf Whatman Nr. 1-Papier chromatographisch abgetrennt. Wir benützten hierbei eine Mischung von *n*-Butanol, Äthylenglykol und Wasser im Verhältnis 4 : 1 : 1. Die hochmolekularen Nucleinsäuren und die Oligonucleotide wandern in diesem System nicht. Der R_f -Wert für Adenin betrug 0,52, für Guanin 0,23 und schwankte nicht mehr als um 0,02 Einheiten. Die im Ultraviolett-Licht gut sichtbaren Flecken wurden ausgeschnitten und mit $n/10$ -HCl 45 Min. bei 45 °C eluiert. Die Konzentration wurde bei pH 2,0 aus der Extinktion bei 260 $m\mu$ bestimmt. Hierbei wurden folgende Extinktionswerte zugrunde gelegt: Adenin je 1 mMol/l 13,0; Guanin 8,0.

Hydrolyse der Nucleinsäuren

Zu den Ansätzen wurden jeweils einige Tropfen Chloroform hinzugegeben, um eventuelles Wachstum von Mikroorganismen und damit erhöhten Nucleinsäureabbau zu verhindern. Die Tests auf Mikroorganismen in den Ansätzen mit Agar-Agar-Platten verliefen stets negativ. Auch die Kontrollversuche auf Nucleasen bei pH 7 erbrachten keinen nennenswerten Abbau der Nucleinsäuren.

⁷ G. SCHRAMM, H. GRÖTSCH u. W. POLLMANN, Angew. Chem., im Druck.

⁸ A. M. CHESTERFIELD, K. C. SMITH u. F. W. ALLAN, J. biol. Chemistry **216**, 185 [1955].

⁹ J. W. LITTLEFIELD, E. B. KELLER, J. GROSS u. P. C. ZAMECNIK, J. biol. Chemistry **271**, 111 [1955].

¹⁰ H. SCHUSTER, G. SCHRAMM u. W. ZILLIG, Z. Naturforschg. **11b**, 339 [1956].

¹¹ W. FRISCH-NIGGEMEYER u. K. K. REDDI, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **26**, 40 [1957].

¹² S. ZAMENHOF, Methods in Enzymology III, S. 698.

¹³ Z. DISCHE, Z. Mikrochem. **8**, 4 [1930].

¹⁴ R. MARKHAM u. J. D. SMITH, Biochem. J. **46**, 509 [1950].

Enzyme

Als Pankreas-Ribonuclease diente ein 5-fach umkristallisiertes Präparat der Firma Pentex, Illinois. Die Tabakdiesterase wurde nach der Methode von

FRISCH-NIGGEMEYER und REDDI¹¹ von Herrn Dipl.-Chemiker Süss hergestellt, wofür wir ihm vielmals danken. Als Desoxyribonuclease verwandten wir ein Präparat von Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey.

Leuchtbakterien als Ausgangsprodukt für Isocitratase

Von A. F. KREMMETER, H. J. SCHLIEP und F. BUKATSCH

Aus dem Botanischen Institut (Direktor Prof. Dr. phil. L. BRAUNER)
und dem Strahlenbiologischen Institut der Universität München (Direktor Prof. Dr. med. O. HUG)

(Z. Naturforschg. **16 b**, 678—680 [1961]; eingegangen am 14. Juli 1961)

Die beschriebene Isolierung von Leuchtbakterien-Isocitratase und die methodisch einfache Züchtung von *Photobacterium fischeri* in submerser Kultur erlauben die Darstellung von Isocitratase im großen Ausmaß. Mit Hilfe der isoelektrischen Fällung eines wäßrigen Extraktes aus Acetontrockenpulver und anschließender Ammonsulfat-Fraktionierung läßt sich bei 2,05-m. Ammonsulfat-Konzentration Isocitratase aus Leuchtbakterien gewinnen. Das unter N₂-Atmosphäre einige Tage stabile Ferment konnte 30-fach angereichert werden.

Isocitratase, ein von CAMPBELL¹ in *Pseudomonas aeruginosa* gefundenes Enzym, wurde im Rahmen des „By-pass“ von KORNBERG² und Mitarbb. näher untersucht. 1960 konnten KREMMETER und BUKATSCH^{3,4} den Glyoxylsäurezyklus auch in *Photobacterium fischeri* nachweisen; im Gegensatz zu *Pseudomonas* findet sich die Leuchtbakterien-Isocitratase auch in Kulturen, die in acetatfreiem Medium gezogen wurden; das Enzym ist also nicht ausschließlich Substrat induziert. Es benötigt neben Mg²⁺-Ionen Cystein als Aktivator. In der vorliegenden Arbeit wird ein relativ unkompliziertes Anreicherungsverfahren der Isocitratase beschrieben, die sich aus Leuchtbakterien leicht in großen Mengen darstellen läßt.

Methodik

Photobact. fischeri wurde in 20-l-Ansätzen* gezüchtet und aus der 60 Stdn. nach Inkubation durch Abzentrifugieren gewonnenen Bakterienmasse ein Acetontrockenpulver⁵ hergestellt.

Nach mechanischer Aufbereitung der 25-proz. wäßrigen Suspension des Pulvers im Zellhomogenisator von

MERKENSCHLAGER⁶ wurde der Eiweißextrakt bei ca. 25 000 g in der Kälte klarzentrifugiert und durch Zusatz von *n*/10-HCl im Bereich von pH 4,5—4,8 gefällt³. Zugabe von festem (NH₄)₂SO₄ in die Lösung des aufgenommenen isoelektrischen Präzipitates lieferte Unterfraktionen bei 33-, 50-, 65-, 71- und 100-proz. Sättigung der Lösung. Diese Bereiche hatten sich bereits während der Anreicherung der Bakterien-Luciferase für die Röntgenbestrahlung isolierter Fermente als günstig erwiesen (SCHLIEP⁷), die eine Fortsetzung der reaktionskinetischen Untersuchungen⁸ an intakten Bakterien darstellen. Die einzelnen Ammonsulfatfällungen wurden niedertourig abzentrifugiert und unter gutem Rühren in 0,02-m. Kalium-Phosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen. In allen Arbeitsgängen diente N₂ als Schutzgas. Die Bestimmung der Eiweißkonzentrationen erfolgte mit der von FRANK und KOECHER⁹ modifizierten Weichselbaum-Biuret-Methode.

Die reversible Aldolspaltung des Isocitrats zu Succinat und Glyoxylat in Gegenwart des Enzyms wurde mit dem Spektralphotometer PMQ II (Zeiss) nach dem Verfahren von DIXON und KORNBERG¹⁰ bestimmt (Messung der zunehmenden optischen Dichte bei 324 mμ in Abhängigkeit von der Menge des entstehenden Glyoxylsäurephenylhydrazons). In Abänderung der angegebenen Methode lief die Reaktion bei pH 7,4 ab, da in diesem Bereich ein erhöhter Umsatz erzielt wird⁴; außerdem setzten wir statt 6,0 nur 2,0 μMole Cystein ein, nach-

¹ J. J. R. CAMPBELL, R. A. SMITH a. B. A. EAGLES, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **11**, 594 [1953].

² H. L. KORNBERG, Fourth International Congress of Biochemistry, **13**, 251 [1958].

³ A. F. KREMMETER u. F. BUKATSCH, Naturwissenschaften **47**, 500 [1960].

⁴ A. F. KREMMETER u. F. BUKATSCH, im Druck.

* Das verwendete Kulturmedium hatte folgende Zusammensetzung: 30,0 g NaCl, 2,6 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 2,1 g KH₂PO₄, 0,5 g (NH₄)₂HPO₄, 0,1 g MgSO₄, 1,0 g Pepton, 6 ml Glycerin und dest. Wasser ad 1000 ml.

⁵ B. L. STREHLER a. M. J. CORMIER, Arch. Biochem. Biophysics **47**, 16 [1953].

⁶ M. MERKENSCHLAGER, K. SCHLOSSMANN u. W. KURZ, Biochem. Z. **329**, 332 [1957].

⁷ H. J. SCHLIEP, in Vorbereitung.

⁸ D. HARDER u. O. HUG, Strahlentherapie **106**, 245 [1958].

⁹ H. FRANK u. P. H. KOEHLER, Dtsch. Arch. klin. Med. **197**, 181 [1950].

¹⁰ G. H. DIXON a. H. L. KORNBERG, Biochem. J. **72**, 3 [1959].