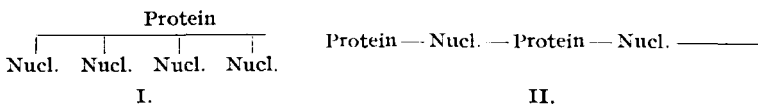


67. Gerhard Schramm: Über die enzymatische Abspaltung der Nucleinsäure aus dem Tabakmosaikvirus.

[Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie, Berlin-Dahlem.]
(Eingegangen am 19. Februar 1941.)

Nach Untersuchungen von T. Caspersson¹⁾ über den Eiweiß-Umsatz der Zelle und nach theoretischen Überlegungen von H. Friedrich-Freksa²⁾ ist es wahrscheinlich, daß für die Vermehrungsfähigkeit eines Proteins das Vorhandensein von Nucleinsäure notwendig ist. Die Virusarten als einfache, selbstreproduzierende Elemente enthalten nach den bisherigen Ergebnissen ausnahmslos Polynucleotide. Die nähere Kenntnis der Bindungsart zwischen Virusprotein und Nucleinsäure ist daher für das Problem der Selbstvermehrung von großer Bedeutung.

Besonders eingehend ist die Nucleinsäure des Tabakmosaikvirus untersucht, die zu 5% in dem Virus enthalten ist (F. C. Bawden und N. W. Pirie³⁾, W. M. Stanley⁴⁾, H. S. Loring⁵⁾). Dergesamte Phosphor des Virus ist als Ribonucleotid gebunden. Die Nucleinsäure kann aus dem Virus durch 5-proz. Natronlauge, Eisessig, 36-proz. Harnstoff oder Dodecylsulfat, abgespalten werden⁶⁾. Bei allen diesen Reaktionen wird aber die Protein-Komponente entweder denaturiert oder in kleinere Bruchstücke mit einem Molekulargewicht von etwa 50000 gespalten. Das Molekulargewicht der abgespaltenen Nucleinsäure beträgt nach Diffusions-Messungen von H. S. Loring⁷⁾ etwa 37000. In ihrer Zusammensetzung ist sie der Hefenucleinsäure sehr ähnlich. Nach Abspaltung der Nucleinsäure mit Alkali aus zwei verschiedenen Virusstämmen (TMn und TM 44) beobachtete Pfankuch⁸⁾ niedermolekulare Bruchstücke, die sich elektrophoretisch gleichartig verhielten. Aus diesem Versuch wurde geschlossen, daß die biologische Verschiedenheit der Virus-Arten hauptsächlich auf Unterschieden in der Art der Nucleinsäure-Komponente beruht. Wie weit die Zerfallsprodukte der Virusproteine hinsichtlich des Molekulargewichts einheitlich sind, ist nicht geprüft worden. Für die Verknüpfung der Nucleinsäure mit dem Protein stellt E. Pfankuch folgende Möglichkeiten zur Diskussion:



Auf Grund der Versuchsergebnisse und nach Überlegungen über die biologische Entstehung des Tabakmosaikvirus wird Formel II für wahrscheinlich gehalten.

Um eine Entscheidung in dem einen oder anderen Sinne zu treffen, ist es notwendig, die Nucleinsäure ohne Zerstörung der Eiweiß-Komponente abzuspalten. Da das Tabakmosaikvirus gegen proteolytische Fermente verhältnismäßig beständig ist, bestand die Hoffnung, dieses Ziel auf enzy-

¹⁾ Naturwiss. **29**, 33 [1941].

²⁾ Naturwiss. **28**, 376 [1940].

³⁾ Proceed. Roy. Soc. [London], Ser. B, **123**, 274 [1937].

⁴⁾ Journ. biol. Chem. **117**, 325 [1937].

⁵⁾ Journ. biol. Chem. **130**, 251 [1939].

⁶⁾ W. M. Stanley, Physic. Rev. **19**, 527 [1939].

⁷⁾ Journ. biol. Chem. **128**, 61 [1939].

⁸⁾ Biochem. Ztschr. **306**, 125 [1940].

matischem Wege zu erreichen. Es wurden daher Versuche mit einem Nucleotidase-Präparat durchgeführt, das nach den Angaben von W. Klein⁹⁾ aus der Dünndarmschleimhaut des Kalbes gewonnen worden war. Nach Klein hat die in dem Enzym-Extrakt enthaltene Nucleotidase ein Wirkungsoptimum bei p_H 9. Das Enzym wird durch Mg-Ionen aktiviert. Das Ergebnis solcher Spaltungsversuche bei p_H 9 in Gegenwart von Mg-Salz ist in Tafel 1 zusammengefaßt. Die Reaktion wurde durch Bestimmung des an das Virusprotein gebundenen und des freien Phosphats verfolgt.

Tafel 1.

Versuchsansatz: 10 ccm Virus-Lösung (2.54-proz.), 2 ccm Enzym, 2 ccm ι -NH₄/NH₄Cl-Puffer p_H 9, 100 mg Magnesiumacetat. Gesamtvolumen: 15 ccm, Temperatur: 37°. Bei den Kontroll-Ansätzen wurde das Enzym erst unmittelbar vor der Aufarbeitung zugegeben.

Versuch	Versuchsdauer Std.	P gebunden mg	P frei mg	P gesamt mg
Mit Enzym	40	0.842	0.665	1.51
Mit Enzym	96	0.800	0.831	1.63
Ohne Enzym ...	40	0.890	0.442	1.33
Ohne Enzym ...	96	0.950	0.594	1.54

Unter diesen Bedingungen war also keine eindeutige Spaltung zu beobachten außerdem blieb die biologische Wirksamkeit des Virus beträchtlich, wenn auch eine gewisse Inaktivierung unverkennbar war¹⁰⁾. Es wurde daher eine andere Versuchsanordnung gewählt, wie sie von Bredereck¹¹⁾ zum Nachweis der enzymatischen Hydrolyse von Hefe- und Thymonucleinsäure benutzt wurde. Hierbei wird in der Nähe des Neutralpunktes und ohne Mg-Zusatz gearbeitet. Zu Beginn des Versuches wird das Reaktionsgemisch gegen Phenolphthalein neutralisiert und am Ende des Versuches die frei gewordene Säure mit NaOH zurücktitriert.

Tafel 2.

- a) Versuchsansatz: 10 ccm Virus-Lösung (2.54-proz.), 2 ccm Enzym, 0.2 ccm Toluol.
 b) Kontrolle ohne Substrat: 10 ccm H₂O, 2 ccm Enzym, 0.2 ccm Toluol.
 c) Kontrolle ohne Enzym: 10 ccm Virus-Lösung, 2 ccm Puffer p_H 9, 0.2 ccm Toluol.
 Temperatur: 37°, Versuchsdauer: 72 Std.

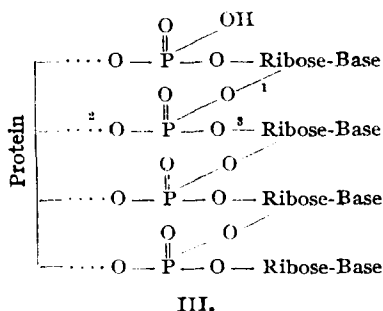
	P gebunden mg	P frei mg	ccm n_{50}^- NaOH	Säure- äquivalent/- Mol. P.
a) Hauptversuch	0	1.930	2.90	
b) Enzym allein	0	0.884	0.41	
		1.046	2.49	1.5
c) Kontrolle ohne Enzym ...	1.012	0.192	---	

⁹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **207**, 125 [1932].

¹⁰⁾ Die mittlere Anzahl der Primärläsionen pro Blatthälfte betrug bei der Kontrolle 21.86 bei dem Versuchsansatz 14.52; Differenz = 7.33 ± 1.23 , Diff./m_{Diff.} = 5.96, $n = 80$.

¹¹⁾ H. Bredereck u. G. Müller, B. **72**, 1429 [1939].

Wie Tafel 2 zeigt, wurde unter diesen Bedingungen eine praktisch 100-proz. Spaltung beobachtet, die durch mehrfache Wiederholung des Versuches bestätigt wurde. Je Mol. abgespaltenes Phosphat wurden hierbei 1.5—2 Säureäquivalente in Freiheit gesetzt. Bei einem Tetranucleotid beobachtete man unter gleichen Bedingungen der enzymatischen Hydrolyse einen Säure-Zuwachs von 0.75 Mol. pro Mol. Phosphor¹¹). Bei hochpolymeren Polynucleotiden könnte dieser Quotient höchstens 1 werden. Es ist daher anzunehmen, daß die Phosphat-Gruppen in dem ursprünglichen Virus-Molekül tertiär gebunden sind. Mit zwei Säure-Gruppen ist der Phosphat-Rest esterartig mit den Nucleosiden verbunden, die dritte Säure-Gruppe, die in den freien Nucleinsäuren gegen Phenolphthalein sauer reagiert, ist wahrscheinlich salzartig an basische Gruppen des Proteins gebunden (III). Die einfachste Annahme über die Wirkungsweise des Enzyms ist folgende: Zuerst wird die mit 1 bezeichnete Bindung gelöst. Hierdurch wird die Bindung des Phosphat-Rests zum Protein (2) gelockert, so daß auch die zweite Säure-Gruppe titrierbar wird. Die Lösung der Bindung 3 hat auf das Titrations-Ergebnis keinen Einfluß, da in der freien Phosphorsäure das dritte Hydroxyl gegen Phenolphthalein nicht mehr sauer reagiert.

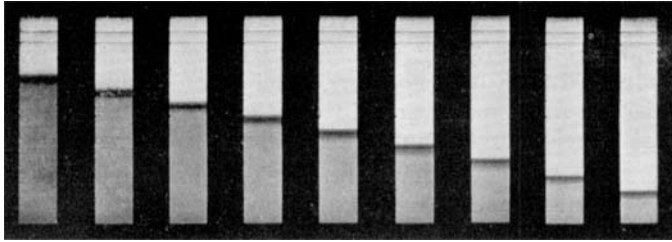


Bei dem hier zur Wirkung kommenden Enzym handelt es sich augenscheinlich um ein von der Kleinschen Nucleotidase verschiedenes Enzym, da unter optimalen Bedingungen für die Nucleotidase keine Spaltung auftritt (Tafel 1).

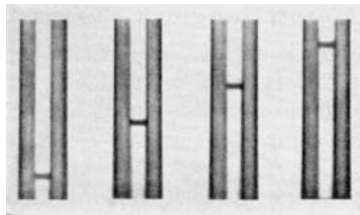
Für die Frage der Bindungsart der Nucleinsäure mit dem Protein ist entscheidend, ob bei der Abspaltung der Nucleinsäure die Protein-Komponente in kleinere Bruchstücke zerfällt, oder ob das ursprüngliche Molekulargewicht des Virus von 23000000 erhalten bleibt. (Die theoretisch zu erwartende Abnahme des Molekulargewichts von 5% durch Entfernung der Nucleinsäure ist mit unserem Verfahren nicht meßbar.) Die Untersuchung in der Ultrazentrifuge zeigte, daß das nucleinsäurefreie Protein hinsichtlich des Molekulargewichts vollkommen einheitlich war. Die Messung der Sedimentations-Konstante des reinen Spaltprodukts (Abbild. 1) und die Sedimentation einer Mischung desselben mit dem Ausgangsstoff ergab keinen Unterschied im Molekulargewicht zwischen dem Virus und dem nucleinsäurefreien Protein. Damit ist also die Verknüpfung der Nucleinsäure mit dem Protein eindeutig im Sinne von I entschieden.

Das Spaltprotein verhielt sich auch bei der Wanderung im elektrischen Feld, die im Tiselius-Apparat verfolgt wurde, vollkommen einheitlich

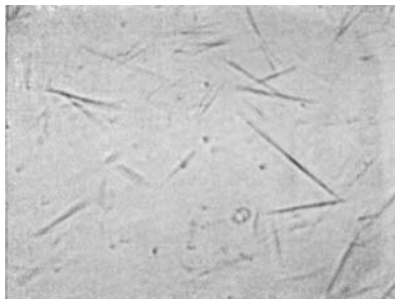
(Abbild. 2). Weiterhin war in $m/100$ -Phosphatpuffer bei p_H 7.45 kein Unterschied in der Wanderungs-Geschwindigkeit gegenüber dem Tabakmosaikvirus festzustellen. Dieses an sich unerwartete Ergebnis ist vielleicht dadurch zu erklären, daß an Stelle der abgespaltenen Nucleinsäure absorbierte



Abbild. 1. Sedimentation des reinen nucleinsäurefreien Proteins Drehzahl 17 000/Min. Zeitraum zwischen den Aufnahmen: 6 Min.



Abbild. 2. Wanderung des nucleinfreien Proteins im elektrischen Feld. $m/100$ -Phosphatpuffer, p_H 7.45, Zeitraum zwischen den Aufnahmen etwa 15 Min.



Abbild. 3. Krystallnadeln des nucleinsäurefreien Proteins. Vergrößerung etwa 600-fach.

Phosphat-Ionen treten, und so der Verlust an negativen Ladungen wieder wett gemacht wird. Wieweit diese Vorstellung richtig ist, soll durch weitere Versuche geprüft werden. Im Zusammenhang mit diesen physikalischen Untersuchungen ist von besonderer Bedeutung, daß das abgespaltene Protein in derselben Weise wie das Virus krystallisiert (Abbild. 3). Die ursprüng-

liche Struktur des Proteins scheint also in vollem Umfange erhalten geblieben zu sein. Demgegenüber zeigte die biologische Prüfung im Einzelherd-Test auf *Nicotina glutinosa*, die von G. Melchers im Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie ausgeführt wurde, daß nach Abspaltung der Nucleinsäure die biologische Wirksamkeit praktisch vollständig verschwunden ist¹²⁾. Hierdurch wird also für das TM-Virus die Notwendigkeit der Nucleinsäure für den Vermehrungsvorgang bestätigt.

Die serologische Prüfung des abgespaltenen Proteins wurde von H. Friedrich-Frekza durchgeführt. Bei der Präzipitin-Reaktion mit einem Kaninchen-Antiserum war kein deutlicher Unterschied im Verhalten des nucleinsäurefreien Proteins und des Tabakmosaikvirus festzustellen.

Die Versuche wurden unter Mitarbeit von Fräulein L. Rebensburg und Fräulein K. Krause ausgeführt.

Hrn. Prof. Butenandt danke ich für die Förderung und Hrn. Prof. Hörlein (I. G. Farbenindustrie A.-G., Werk Elberfeld) für die Unterstützung der Arbeit.

Beschreibung der Versuche.

1) Herstellung des Enzyms⁹⁾.

Als Ausgangsmaterial diente die Dünndarm-Schleimhaut des Kalbes. Die beiden ersten Meter des Darmes vom Magen weg wurden mit Wasser durchgespült und die Schleimhaut mit einem Spatel ausgeschabt. Wir erhielten 50 g Organbrei, der mit 250 ccm 87-proz. Glycerin versetzt und gut durchgeschüttelt wurde. Dann wurden 2.5 ccm 10-proz. Natronlauge zugegeben und die Lösung 2 Tage unter häufigem Durchschütteln bei Zimmertemperatur stehengelassen. Zur Befreiung von ungelösten Muskelfetzen wurde dann der Extrakt durch ein Sieb gegossen und mit 3 ccm Toluol versetzt. Der fertige Extrakt wurde im Eisschrank aufbewahrt.

2) Ausführung der Phosphat-Bestimmungen.

Als Substrat für die Spaltung wurde ein durch Ammonsulfat-Fällung dargestelltes krystallisiertes Virusprotein benutzt, das durch Ultrazentrifugierung gereinigt war. Um anorganisches Phosphat möglichst zu entfernen, wurde die Lösung längere Zeit gegen Ammoniak-Puffer vom p_{H} 8 dialysiert.

Nach Beendigung des Versuches wurden die Ansätze auf 25 ccm aufgefüllt, ein Teil der Lösung für die physikalischen Untersuchungen benutzt und in einem anderen Teil das gebundene und freie Phosphat bestimmt. Dies geschah auf folgendem Wege: 20 ccm der Versuchs-Lösung wurden mit 10 ccm einer 30-proz. Lösung von Trichloressigsäure versetzt, das ausgefällte Protein abfiltriert und mit Wasser, das etwas Trichloressigsäure enthält, ausgewaschen. Das Protein und das Filtrat wurden für sich mit konz. Schwefelsäure und einigen Tropfen Salpetersäure verascht und die Phosphorsäure in der üblichen Weise mit Ammonmolybdat gefällt und zur Wägung gebracht.

¹²⁾ Die mittlere Anzahl der Primärläsionen pro Blatthälfte betrug bei der Kontrolle 14.1, bei dem Versuchsansatz 0.4; Differenz = 13.7 ± 1.7 , Diff./ m_{Hlf} = 8.1, $n = 50$.