

# Über die Selbstverdauung von Nucleoproteiden.

Von  
**Walter Jones.**

(Aus dem Laboratorium für physiologische Chemie, Johns Hopkins-Universität.  
(Der Redaktion zugegangen am 2. Mai 1904.)

Das Vorkommen von Xanthinbasen unter den Produkten der Selbstverdauung von Geweben ist häufig beobachtet worden und wenn auch die Herkunft dieser Basen allgemein auf die Nucleoproteide zurückgeführt wird, so finden sich doch nur wenige Angaben, die es rechtfertigen, diese Basen mit denen zu identifizieren, welche durch Hydrolyse aus den entsprechenden Nucleoproteiden entstehen. In einigen Fällen waren die durch Hydrolyse gebildeten Basen nur wenig erforscht, in anderen wieder wurden sie nach Gewinnung durch Autolyse nicht identifiziert, da die Forscher offenbar von der sehr natürlichen Voraussetzung ausgingen, daß die in beiden Fällen gebildeten Basen identisch seien.

Im Jahre 1874 unterzog Schützenberger<sup>1)</sup> die Produkte der Selbstverdauung der Bierhefe einer Untersuchung und fand neben anderen Substanzen Xanthin, Hypoxanthin, Guanin und Carnin. Wenn er auch damals nicht imstande war, den Ursprung der Basen festzustellen, so erkannte er in ihnen doch Produkte fermentativer Tätigkeit und sah vor allem ein Anzeichen darin, daß keine Spur von Fäulnis aufgetreten war.

Vier Jahre später machte Salomon<sup>2)</sup> die Beobachtung, daß Leichenblut Xanthin enthalte, während dies im Aderlaßblut fehlte, wodurch er zu Studien über die Selbstverdauung von Organen geführt wurde.<sup>3)</sup> Er fand, daß bei der Digerierung von

<sup>1)</sup> Bull. de la Soc. chim. de Paris (1874), S. 194.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift (1878, Bd. II, S. 65.

<sup>3)</sup> Archiv für Physiologie (1881), S. 361.

Organen bei Zimmertemperatur eine beträchtliche Vermehrung des Hypoxanthins auftrat, das er direkt in Alkohol lösen und mit Silbernitrat fällen konnte. Beim Muskel verdoppelt sich die Zunahme in 24 Stunden und bei Pankreas und Leber ist sie ebenso groß oder größer. Auch zeigte sich beim Kochen der vereinigten Überreste in Salpetersäure eine weitere Zunahme der Basen entsprechend der Differenz zwischen der Gesamtmenge in allen Formen und der direkt freien und in Alkohol löslichen. Salomon schließt sich danach völlig der Ansicht Kossels über die Nucleine an und gibt seiner Auffassung von der Sache folgenden Ausdruck: «Man ist daher genötigt, in der Leber eine Substanz anzunehmen, welche durch die Aktion eines ihr angehörigen, über den Moment des Todes hinaus wirksamen Fermentes, wie auch bei der Spaltung durch Säuren Xanthinkörper abgibt . . . . . und ich halte es ebenfalls für wahrscheinlich, daß die hypoxanthinbildende Substanz das Nuclein ist».

Im Jahre 1885 machte Lehmann<sup>1)</sup> unter Kossels Leitung eine quantitative Schätzung der Menge Xanthinbasen, die sich bildet bei der Einwirkung kochender Mineralsäure, erstens auf frische Hefe, zweitens auf Hefe, die 24 Stunden bei Zimmertemperatur mit Wasser gestanden hatte, und drittens mit Hefe, die 24 Stunden in Wasser mit Körpertemperatur gehalten war, und kam zu dem Schluß, daß im Laufe der Digerierung das Hypoxanthin abnimmt, die Summe von Xanthin und Guanin aber ansteigt. Wenn man dieses Ergebnis dahin verwerten will, daß Guanin an Stelle von Hypoxanthin gebildet sei, so muß angenommen werden, während der Digerierung sei auf irgend eine Weise eine Amidogruppe eingeführt worden, und es würde sich dann in dieser Beziehung die Autodigestion der Hefe, wie noch gezeigt werden soll, auffallend unterscheiden von der verschiedenen tierischer Organe, bei der Amidogruppen sowohl von Purin- wie Pyrimidinderivaten, beinahe in allen Fällen, wo dazu die Möglichkeit vorhanden ist, sich abspalten. Immerhin lassen die Resultate Lehmanns, wie die folgende Tafel, die aus seiner Arbeit entnommen ist, zeigt, noch eine andere Deutung zu.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift 1885, Bd. IX, S. 563.

## Erste Versuchsreihe.

	I	II	III
Hypoxanthin	0,2101	0,2188	0,0212
Guanin	0,0902	0,0140	0,0123
Xanthin	nichts	0,0731	0,1201

## Zweite Versuchsreihe.

	I	II	III
Hypoxanthin	0,1606	0,1736	0,0239
Guanin	nichts	Spuren	nichts
Xanthin	0,0383	0,0509	0,1337

Wenn man von der Inkonstanz absieht, die wahrscheinlich von Fehlern abhängt, die sich bei der Aufteilung so geringer Materialmengen nicht vermeiden lassen, so zeigen beide Versuchsreihen übereinstimmend eine merkliche Zunahme des Xanthins und eine Abnahme des Hypoxanthins, während die zweite Reihe eine Verminderung des Guanins ergibt. Die plausibelste Deutung hierfür ist, daß während der Digestion Xanthin auf Kosten von Hypoxanthin und Guanin gebildet ist, und diese befindet sich in guter Übereinstimmung mit den Resultaten, die in bezug auf die Selbstverdauung von Drüsen angegeben werden sollen.

Im Jahre 1888 zeigte Salkowski,<sup>1)</sup> welche Vorzüge die Anwesenheit von Chloroform bei der künstlichen Verdauung bringe, und im folgenden Jahr<sup>2)</sup> veröffentlichte er eine ausführliche Abhandlung über die Selbstverdauung der Hefe, in welcher gezeigt wurde, daß ein wässriger Extrakt von Hefe eine beträchtliche Menge Xanthinbasen enthielt, die direkt mit Silbernitrat und Ammoniak fällbar waren, während ein entsprechender Extrakt sterilisierter Hefe davon frei war. Salkowski versuchte nicht, die Basen zu identifizieren, aber bemerkte am Anfang der Besprechung, daß er sie der Kürze halber Hypoxanthine nennen wolle. — Die folgende Arbeit Salkowskis<sup>3)</sup> über die Selbstverdauung der Leber und des Muskels bringt in Hinsicht der Xanthinbasen nichts Neues zu der schon erwähnten Entdeckung von Salomon hinzu, aber

<sup>1)</sup> Deutsche med. Wochenschr. (1888), Bd. 16.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift (1889), Bd. XIII, S. 506.

<sup>3)</sup> Zeitschr. f. klin. Med. (1890), Suppl., S. 77.

dann erwies Schwiening,<sup>1)</sup> daß dieselben Resultate erzielt werden können an Organextrakten, die durch wiederholte Filtration fast völlig frei von Zellen gemacht waren. Er fügt auch noch die Beobachtung hinzu, daß die Anwesenheit von Alkali der Enzymwirkung hinderlich sei. — Biondi<sup>2)</sup> wiederholte auch die Versuche Salkowskis an der Leber, aber identifizierte die Xanthinbasen nicht. Er erwies, daß das Enzym nicht mit dem Trypsin identisch sei, auf folgende Weise: Eine Portion Leberbrei wurde durch Kochen sterilisiert und mit Pankreaspulver versetzt; nach ausreichender Digerierung konnte nur eine Spur Xanthinbasen gefunden werden, die sich mit Silbernitrat und Ammoniak fällen ließ.

Okerblom<sup>3)</sup> fand unter den Selbstverdauungsprodukten der Nebenniere Xanthin, 1-Methylxanthin, Hypoxanthin, Epiguanin und eine Spur von Adenin. Da nun seither zwei von diesen Basen niemals als hydrolytische Spaltungsprodukte der Nucleoproteide beobachtet wurden, so unternahm der Verfasser mit Whipple<sup>4)</sup> eine Untersuchung des Nucleoproteids dieser Drüse, in der Erwartung, eine Substanz zu finden, die bei der Spaltung 1-Methylxanthin und Epiguanin liefern würde. Zu unserem großen Erstaunen fanden wir zwar Guanin und Adenin, aber keine von den Basen, die Okerblom sonst noch angibt. Ein größerer Unterschied läßt sich gar nicht denken: Okerblom fand ein bedeutendes Überwiegen des Xanthins, aber kein Guanin. Wir fanden vor allem Guanin, aber kein Xanthin. Hahn und Geret<sup>5)</sup> haben ferner den Einfluß mechanischer Einwirkungen auf die Beseitigung der Bedingungen studiert, welche auf die Fällung der Xanthinbasen aus den Produkten der Hefeselbstverdauung von Einfluß sind, haben aber die Basen nicht indentifiziert.

Kutscher<sup>6)</sup> unternahm eine sorgfältige Untersuchung der

---

<sup>1)</sup> Virchows Archiv (1894), Bd. 136, S. 444.

<sup>2)</sup> Virchows Archiv (1896), Bd. 144, S. 373.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift (1898), Bd. XXVIII, S. 60.

<sup>4)</sup> American Journal of Physiology (1902), Bd. 7, S. 423.

<sup>5)</sup> Zeitschr. f. Biol. (1900), Bd. 40, S. 117.

<sup>6)</sup> Diese Zeitschrift (1901), Bd. XXXII, S. 59.

Xanthinbasen, die bei der Selbstverdauung der Hefe entstehen, und bediente sich dabei der von Krüger und Salomon vorgeschlagenen Methode. In der Xanthinfraktion fand er weder Xanthin noch irgend eine Base dieser Fraktion: in der Hypoxanthinfraktion fand er Guanin und Adenin, aber keine nennenswerte Menge von Hypoxanthin. Er meint, daß Xanthin ursprünglich vorgebildet sei und später zersetzt werde, stellt aber nicht die Vermutung auf, daß Guanin oder Adenin auf Kosten des Xanthins gebildet werde. Um jene seine Voraussetzung zu stützen, führt er die Arbeit von Lehmann an, die zeige, wie vorgebildete Xanthinbasen später verschwinden können. In seiner Arbeit bemerkt ferner Kutscher, daß er mit dem Pankreas früher zu denselben Resultaten gekommen sei.<sup>1)</sup> Da Verfasser mit Whipple<sup>2)</sup> Guanin und Adenin, aber kein Xanthin und Hypoxanthin unter den hydrolytischen Produkten des Pankreasnucleoproteids ( $\alpha$ ) von Hammarsten fanden, so ist in dieser Beziehung offenbar kein Unterschied zwischen den Produkten der Autolyse und Hydrolyse.

In einer Untersuchung über die Autolyse der Thymusdrüse hat Kutscher<sup>3)</sup> ein Produkt gefunden, das er als Thymin bezeichnete. Aus der Tatsache, daß er bei der Analyse zu hohem Gehalt an Stickstoff für Thymin fand, schloß er, daß das Material wahrscheinlich etwas Uracil enthalte.

Levene<sup>4)</sup> fand, daß Uracil bei der Pankreasselbstverdauung entsteht, während Thymin beim Kochen der Nucleinsäure dieser Drüse mit Mineralsäure entsteht. Da die Versuche, Thymin unter den Produkten der Autolyse zu finden, mißlingen, so schließt er, daß Uracil an Stelle von Thymin gebildet werde, spricht sich aber nicht darüber aus, ob dies auf die Wirkung von Trypsin oder auf die Anwesenheit eines besonderen Enzyms zurückzuführen sei.

Araki<sup>5)</sup> zeigte, daß der wässrige Extrakt der Thymus-

<sup>1)</sup> Sitzungsberichte der Ges. z. Bef. d. ges. Naturwissenschaften (1900).

<sup>2)</sup> l. c.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift (1901), Bd. XXXIV, S. 114.

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift (1903), Bd. XXXVII, S. 527.

<sup>5)</sup> Diese Zeitschrift (1903), Bd. XXXVIII, S. 84.

drüse ein Enzym enthält, das imstande ist,  $\alpha$ -Thymusnucleinsäure in  $\beta$ -Thymusnucleinsäure überzuführen. Dies ist ein rein hydrolytischer Vorgang, denn man kann dasselbe erzielen mit Trypsin und heißen Alkalien.

Reh<sup>1)</sup> fand unter den Produkten der Autolyse der Lymphdrüsen Thymin und eine kleine Menge Uracil, doch keine Xanthinbasen, und hält einen ursächlichen Zusammenhang für möglich zwischen der Anwesenheit der ersteren und dem Fehlen der letzteren.

Iwanoff<sup>2)</sup> fand neuerdings, daß verschiedene Schwämme (*aspergillus niger* und *penicillium glaucum*) ein Enzym enthalten, das das Natriumsalz der Thymusnucleinsäure einer tiefgreifenden Spaltung unterzieht, die zur Bildung von Phosphorsäure und Xanthinbasen führt. Er zeigte, daß das Enzym wahrscheinlich nicht identisch ist mit dem proteolytischen Enzym des Mycels, und gibt ihm den besonderen Namen: «Nuclease». Iwanoff bemerkt, daß die Wichtigkeit seiner Entdeckung sich noch über den in Rede stehenden Fall hinauserstreckt: jede Zelle besitze im Embryonalstadium eine große Menge Nucleoproteid, die in dem Maße aufgespalten werde, wie die Entwicklung fortschreite, und diese Aufspaltung hängt nach Iwanoffs Meinung von einem besonderen Enzym einer «Nuclease» ab. Natürlicherweise ist das zweifellose Vorhandensein eines solchen Enzyms schon überzeugend dargetan worden durch die Arbeit von Jones und Whipple<sup>3)</sup> am Nebennierenextrakt und von Levene<sup>4)</sup> am Pankreas. Das Enzym der Nebennieren bildet Xanthinbasen, welche qualitativ verschieden sind von dem durch Kochen mit Säuren gebildeten. Im Gegensatz dazu hat sich dort, wo hinreichend ausführlich untersucht wurde, herausgestellt, daß die Produkte, die durch proteolytische Enzymwirkung entstehen, dieselben sind, wie die durch Kochen mit Säuren erhaltenen.

<sup>1)</sup> Hofmeisters Beiträge (1903), Bd. 3, S. 569.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift (1903), Bd. XXXIX, S. 31.

<sup>3)</sup> l. c.

<sup>4)</sup> l. c.

Die Arbeit von Schittenhelm und Schröter<sup>1)</sup> bestätigt die allgemein angenommene Ansicht, daß gewisse Xanthinbasen durch die Einwirkung von Fäulnisbakterien in andere übergeführt werden können, und zeigt, daß eine solche Überführung mit Reinkulturen von Kolibazillen möglich ist.

Der Verfasser hat früher gezeigt,<sup>2)</sup> daß bei der Autodigestion der Thymusdrüse Xanthin auf Kosten von Guanin und Adenin gebildet wird, und daß das so gebildete Xanthin von dem Nucleoproteid und von keinem andern Bestandteil der Drüse stammt. Das Nucleoproteid wurde aus der Drüse mit Wasser extrahiert und von löslichen Bestandteilen durch abwechselnde Fällung mit Essigsäure und Lösung in Natriumkarbonat befreit. Die auf diese Weise hergestellte Lösung von Nucleoproteid erwies sich als enzymatisch wirksam und man kam zu denselben Resultaten, ob man nun solch eine Lösung 20 Stunden oder 10 Tage digerierte, woraus sich ergibt, daß das Fehlen von Guanin und Adenin nicht auf einem Verschwinden nach vorheriger Bildung beruht. Wenn man ganz davon absieht, ob sich die speziellen Funktionen des Enzyms auf das ursprüngliche Nucleoproteid, ob an einem Zwischenprodukt oder an den Xanthinbasen selber vollziehen, so ist doch der dabei in Frage stehende chemische Prozeß offenbar. Die Überführung von Guanin in Xanthin kann nur durch Ersatz einer Amidogruppe durch eine Hydroxylgruppe zustande kommen, während die Umwandlung von Adenin in Xanthin die entsprechende chemische Umformung in sich schließt mit dem gleichzeitigen Ersatz eines Hydrogenatoms durch eine Hydroxylgruppe.

In beiden Fällen muß Ammoniak<sup>3)</sup> gebildet werden, während im Falle des Adenins Hypoxanthin als Nebenprodukt entsteht, vorausgesetzt, daß der Ersatz der Amidogruppe zuerst vor sich geht. Es ist von Bedeutung, daß eine beträchtliche Menge Ammoniak gefunden ist und auch eine Spur Hypoxanthin. Die proteolytischen Enzyme bilden kein Produkt, das nicht auch durch die Wirkung kochender Säuren auf die Proteide

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift (1903), Bd. XXXIX, S. 203.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 101.

<sup>3)</sup> Kutscher, l. c.

hervorgerufen werden könnte und zwar, trotzdem reichlich und verschiedenartig Gelegenheit zum Ersatz von Amidogruppen gegeben ist, durch kristallisierende Produkte der Proteolyse. Über die bei der Selbstverdauung der Thymusdrüse gebildeten Pyrimidinderivate.

Bei einer Untersuchung der Selbstverdauungsprodukte der Thymusdrüse isolierte Kutscher<sup>1)</sup> eine kristallinische Substanz, deren Eigenschaften völlig mit denen des Thymins korrespondierten, deren Prozentgehalt an Stickstoff aber nicht mit dem theoretisch erforderlichen übereinstimmte. Er schloß daraus, daß seine Substanz zwar Thymin sei, doch mit einigen Beimengungen, die reicher an Stickstoff sind, vielleicht von Uracil. Die Methode, deren sich Kutscher zur Isolation dieser Substanz bediente, ist nicht verschieden von der, die seiner Zeit vom Verfasser in Kossels Laboratorium zur Anwendung gebracht wurde.<sup>2)</sup> Es läßt sich zeigen, daß die Anwendung dieser Methode auf frische Thymusdrüse ein Silberpräzipitat liefert an dem Punkte, wo Thyminsilber auftreten soll. Dieses Präzipitat enthält aber kein Thymin, sondern eine äußerst lösliche, ölige Substanz, die voraussichtlich sehr hinderlich auf die Reindarstellung des Thymins einwirken wird. Dieser Substanz kann man leicht aus dem Wege gehen, wenn man statt des ganzen wässerigen Extraktes der Drüse nur das daraus isolierte Nucleoproteid digeriert.

1000 g feinzerteilter Drüsensubstanz wurden mit 2500 ccm Wasser versetzt und nach Zusatz von Chloroform bei Zimmertemperatur 12 Stunden stehen gelassen. Die Flüssigkeit wurde durch ein Tuch gepreßt und die festen Bestandteile dann so gut wie möglich mit Hilfe der Zentrifuge entfernt. Darauf wurde sie mit Essigsäure behandelt, das ausgefällte Nucleoproteid mit der Zentrifuge isoliert, in Wasser aufgeschwemmt und nach Zusatz von Chloroform bei Zimmertemperatur in einem gutschließenden Gefäß 12 Tage aufbewahrt. Dann wurde zum Kochen erhitzt, von den koagulierten Eiweißkörpern abfiltriert und die Phosphorsäure mit Barythydrat ausgefällt. Nach Ent-

<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift (1900), Bd. XXIX, S. 461.

fernung des Baryumüberschusses mit Kohlensäure dampfte man die Lösung unter vermindertem Druck bis auf ca. 200—250 ccm ein und machte sie mit Salpetersäure schwach sauer. Jetzt entstand ein ausgiebiger, flockiger Niederschlag, der nach Waschen mit Wasser, Trocknen mit Alkohol und Äther 1 g wog und sich als völlig reines Xanthin herausstellte. Das Filtrat vom Xanthin wurde, solange wie sich noch ein Niederschlag bildete, mit Silbernitrat versetzt, und nach der Filtration wurden abermals sukzessive Portionen von Silbernitrat zugesetzt, so lange, bis eine Spur der Flüssigkeit mit Barythydrat einen gelben Niederschlag gab. An diesem Punkte war eine beträchtliche flockige Fällung entstanden, die abfiltriert und auf Thymin untersucht wurde, jedoch mit negativem Erfolge.

Die Flüssigkeit wurde bis zu schwach alkalischer Reaktion mit Baryumhydrat behandelt und der voluminöse, weißflockige Niederschlag mit Hilfe der Zentrifuge abgetrennt und ausgewaschen. Darauf wurde der Niederschlag mit Wasser aufgenommen, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das vom Silbersulfid Abfiltrierte auf dem Wasserbad zu einer kleinen Menge eingedampft. Beim Erkalten fanden sich Kristalle, die aus Bündeln von Nadeln bestanden, die in einem Punkte vereinigt waren, und eine völlig klare Mutterlauge blieb zurück, die leicht abgossen werden konnte. Darauf wurde die Substanz nochmals mit heißem Wasser umkristallisiert, bei 100° getrocknet und analysiert.

0,1847 g Substanz erforderten 5,94 ccm Schwefelsäure von bekanntem Gehalt (1 ccm = 0,007814 N).

Für Thymin berechnet	Für Uracil berechnet	Gefunden
N 22,22%	25,0%	25,13%

Es kann somit kein Zweifel bestehen, daß es sich um Uracil handelt, und zwar ohne Beimengung von Thymin, und da jeder Versuch, Cytosin nachzuweisen, erfolglos blieb, so ist es wahrscheinlich, daß das bei der Autodigestion entstehende Uracil auf Kosten von Thymin und Cytosin gebildet wird, die man ja als hydrolytische Spaltungsprodukte<sup>1)</sup> der Thymus-

<sup>1)</sup> Der Ausdruck «Hydrolytische Spaltungsprodukte» ist in der vorliegenden Arbeit nur in dem beschränkten Sinne zu verstehen, daß man

nucleinsäure erhalten kann, und außerdem ergibt sich, daß das Enzym der Thymusdrüse Wirkungen aufzuweisen imstande ist, die den gewöhnlichen proteolytischen Enzymen nicht zukommen.

### Über die Selbstverdauung der Nebenniere.

Die merkliche Vermehrung von Xanthinbasen, die bei der Selbstverdauung der Nebennieren auftritt, ist von Okerblom im Jahre 1898 zuerst beobachtet worden. Er ließ eine Mischung von 7,8 kg feinzerteilter Drüsensubstanz, Chloroform und Wasser bei Körpertemperatur einige Tage stehen und dampfte nach Koagulierung der Proteide in der Hitze die übrigbleibende Lösung unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen ein. Aus der konzentrierten Flüssigkeit lagerten sich 8 g doppelbrechender, körniger Substanz ab, die frei von Phosphor war und mit Salpetersäure die Xanthinprobe gab. Ohne noch die Fällung mit Silbernitrat und Ammoniak zu versuchen, ging dann Okerblom sogleich an die Analysierung der Substanz nach der Methode von Salomon und Krüger und erhielt folgende Werte:

Xanthin	3,56	
1-Methylxanthin	0,50	
Hypoxanthin	0,15	
Adenin	—	(in Spuren)
Epiguanin	—	(eine geringe Menge)
	4,21	

Da der Verfasser nun gefunden hatte, daß bei der Hydrolyse des Nucleoproteids der Nebenniere mit kochenden Säuren vor allem Guanin und Adenin und nur Spuren von Xanthin entstehen, sah sich der Verfasser veranlaßt, den Versuch von Okerblom zu wiederholen. Im Beginn war gezeigt, daß bei Verwendung frischer Drüsensubstanz keine Spur von Xanthinbasen entsteht.

10 kg feinzerteilter Drüsensubstanz wurden mit 35 Liter Wasser vermischt und in 15 Gefäße verteilt. Jedes dieser

---

dabei nur an die Substanzen zu denken hat, welche tatsächlich durch Einwirkung kochender Säuren entstehen. — Die Reaktion zwischen Guanin und Wasser, bei welcher Xanthin und Ammoniak entsteht, ist zwar de facto eine Hydrolyse, kann aber nicht durch die Wirkung kochender Säuren eintreten.

Gefäße wurde nach reichlichem Chloroformzusatz unter gutem Verschlusse in einen Thermostaten von 40° C. gesetzt und einige schon nach 3 Tagen herausgenommen, andere länger, bis zu 14 Tagen, der Digerierung überlassen. Jede Portion wurde dann mit Essigsäure versetzt, zur Koagulation der Proteide erhitzt und filtriert. In einigen Fällen erfolgte nun Behandlung mit Baryumhydrat und nach der Filtration Entfernung des überschüssigen Reagens durch Kohlensäure, in anderen Fällen wurde dies unterlassen. Jede der Flüssigkeiten wurde gesondert unter vermindertem Druck eingedampft und in jedem Falle war das Resultat ganz das gleiche. Das gesamte abgesetzte Material wog nach ausgiebiger Waschung mit Wasser, Alkohol und Äther 9,7 g. Diese Masse wurde sukzessive mit 5%igem Ammoniak solange versetzt, als sich noch etwas löste, und der Niederschlag sorgfältig mit Wasser gewaschen und mit Alkohol und Äther getrocknet; er wog 0,957 g, enthielt nur geringe Mengen organischer Substanz und gab mit Salpetersäure nicht die Xanthinreaktion. Beim Erhitzen auf dem Platinblech schwärzte es sich nur wenig und lieferte Calciumkarbonat. Mit entsprechenden Methoden wurde die Substanz als Calciumoxalat identifiziert.

Die vereinigten Lösungen der Xanthinbasen in Ammoniak wurden nun mit einem leichten Überschuß mit 5%iger ammoniakalischer Silbernitratlösung versetzt, die ausgefällte Silbermenge mit Wasser gewaschen, mit Salzsäure gespalten und nach Abfiltrieren des Chlorsilbers das saure Filtrat nach der Methode von Krüger und Salomon auf Xanthinbasen untersucht.

Die Xanthinfraktion gab 4,73 g Xanthinnitrat, wovon ein Teil in die freie Base übergeführt und analysiert wurde.

I. 0,2101 g Substanz erforderten 9,84 ccm Schwefelsäure von bekanntem Gehalt (1 ccm = 0,007814 N).

II. 0,2039 g Substanz erforderten 9,56 ccm derselben Säure.

Für Xanthin		Gefunden	
berechnet		I	II
N	36,84%	36,60%	36,63%

Das Filtrat vom Xanthinnitrat wurde jetzt mit Ammoniak bis zu alkalischer Reaktion versetzt und da kein Niederschlag

auftrat, war die Abwesenheit von Guanin erwiesen.<sup>1)</sup> Die alkalische Flüssigkeit wurde auf ein kleines Volumen eingedampft, das ausgeschiedene Material abfiltriert und mit Alkohol und Äther gewaschen. Diese Substanz, welche 0,420 g wog, erwies sich unter dem Mikroskop als aus wohlgeformten Platten bestehend, die keine Spur von Seidenglanz hatten.

Sie wurde in dem 15fachen ihres Gewichtes einer 3,3%igen Natriumhydratlösung gelöst und in die entsprechende Menge Salpetersäure hineingegossen. Beim Abkühlen schieden sich 0,394 g kristallinischer Masse aus, die allem Anschein nach Xanthinnitrat waren und nicht als 1-Methylxanthin angesehen werden konnten. Sie wurde in die freie Base übergeführt und analysiert.

0,1427 g Substanz erforderten 6,71 ccm Schwefelsäure von bekanntem Gehalt (1 ccm = 0,007814 N).

Berechnet für Xanthin	Berechnet für 1-Methylxanthin	Gefunden
N 36,84%	33,70%	36,74%

Es besteht kein Zweifel an der Löslichkeit des reinen Xanthinnitrates in reiner Salpetersäure, wie Krüger und Salomon erwiesen haben, wenn man aber unreines oder pigmentiertes Material verwendet, wie man es bei direkter Gewinnung aus den Drüsen erhält, dann kann man eine beträchtliche Portion Xanthin stets in der Mutterlauge der ersten Kristallisation des Nitrates wiederfinden. Wenn man das Xanthin durch nochmaliges Kristallisieren seines Nitrates aus der Salpetersäure gereinigt hat, so enthält die saure Mutterlauge nur noch Spuren der Base. — Die definitive Unterscheidung zwischen Xanthin und 1-Methylxanthin ist gegeben in der relativen Löslichkeit ihrer Nitrates in Salpetersäure. Diese Prüfung ist von Okerblom bei seinen gereinigten Präparaten nicht vorgenommen worden.

Die Hypoxanthinfraktion wurde heiß bis zu alkalischer Reaktion mit Ammoniak versetzt. Sofort trat eine feine

<sup>1)</sup> Bei Anwendung dieses Verfahrens für die Xanthinbasen hat der Verfasser sonst nie die Anwesenheit von Guanin an diesem Punkte vermist, wenn die Base ursprünglich vorhanden war. Indessen hat sich Guanin nicht unter den Basen der Nebennierendrüse weder in der Xanthin- noch in der Hypoxanthinfraktur gefunden.

rötlich-gelbe Trübung auf und beim Erkalten setzten sich an den Seiten und am Boden des Gefäßes glitzernde Kristalle ab. Diese waren schwer und konnten leicht durch Dekantieren von einem flockigen Eisenhydroxydniederschlag getrennt werden. Diese Kristalle sind von Okerblom als Epiguanin aufgefaßt worden, und in der Tat, wenn ursprünglich die Base anwesend gewesen wäre, würde sie sich an dieser Stelle kristallinisch niedergeschlagen haben. — Unter dem Mikroskop aber ergaben sie sich nach Waschen mit Wasser, Alkohol und Äther als ideale Briefkuvertskristalle von Calciumoxalat. Die Substanz gab mit Salpetersäure nicht die Xanthinreaktion, löste sich nicht in kochender 10%iger Essigsäure, wohl aber mit Leichtigkeit in äußerst verdünnter Salzsäure und fiel nach Behandlung mit Ammoniak dann wieder aus. Beim Erhitzen auf dem Platinblech blieben Kristalle in Calciumkarbonat zurück, ohne daß Schwärzung aufgetreten wäre.

Die Flüssigkeit, von welcher das Calciumoxalat abgeschieden war, wurde vom Eisenhydroxyd abfiltriert und aus einer kleinen Menge das Ammoniak durch Kochen entfernt. Da diese Probe mit Pikrinsäure nur eine leichte Trübung gab und zwar erst nach Hinzufügung einer großen Quantität des Reagens, wurde die Hauptmenge der ammoniakalischen Flüssigkeit mit einem Überschuß ammoniakalischer Silberlösung behandelt, und der Silberniederschlag von Hypoxanthin wurde auf die übliche Weise in Hypoxanthinnitrat übergeführt. Auf diese Weise wurden 0,180 g einer Substanz erhalten, die überall die Wetzsteinformen aufwies und beim Verdampfen mit Salpetersäure und Behandeln mit Natriumhydrat nur eine Andeutung rötlich-gelber Farbe darbot. Diese Kristalle können also nichts anderes sein, als Hypoxanthinnitrat.

Der vierte Teil der Mutterlauge, aus welcher sich ursprünglich die rohen Xanthinbasen abgeschieden hatten, wurde mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt, so daß die gesamte Flüssigkeit 20% Säure enthielt, und am Rückflußkühler 80 Stunden gekocht. Darauf folgte Behandlung mit Baryumhydroxyd, Filtration und Beseitigung des überschüssigen Baryts durch Kohlensäure. Die Lösung wurde mit Schwefelsäure angesäuert

auf dem Wasserbade eingeengt und der Farbstoff so gut wie möglich mit Tierkohle beseitigt. Der Zusatz von Ammoniak und Silbernitrat rief einen spärlichen dunklen Niederschlag hervor, welcher auf Guanin und Adenin besonders untersucht wurde, jedoch mit negativem Erfolge.

Somit liefert die Autodigestion der Nebenniere Xanthin, eine kleine Menge Hypoxanthin und vielleicht auch eine Spur Adenin, aber weder Guanin noch Epiguanin noch 1-Methylxanthin. Es haben sich demnach die Resultate von Okerblom, soweit sie dazu dienen, qualitative Unterschiede zu zeigen zwischen den autolytischen und hydrolytischen Produkten des Nebennierennucleoproteids, bestätigt.

#### Über die Autodigestion des Nebennieren-nucleoproteids.

Die Anwendung von Silbernitrat zum Zwecke der direkten Isolierung der Xanthinbasen, die bei der Autodigestion der Nebenniere entstehen, ist nicht am Platze, wegen des Epinephrinhydrates, welches eine unmittelbar reduzierende Wirkung auf dieses Reagens ausübt, und zwar unter Bildung eines voluminösen, intensiv gefärbten Niederschlages: wenn man aber in der schon für die Thymusdrüse beschriebenen Weise das Nucleoproteid isoliert, so kann man ein Präparat desselben erhalten, das frei von Epinephrinhydrat und dessen gefärbten Spaltungsprodukten ist; dieses ist enzymatisch wirksam und liefert bei Körpertemperatur in saurer Flüssigkeit Xanthinbasen. Es wurde nun ein Versuch mit 1000 g Drüsensubstanz gemacht und der Niederschlag von Xanthinbasen direkt mit Silbernitrat und Ammoniak hervorgerufen, genau auf dieselbe Weise, wie bei der Thymusdrüse. Die aus der Drüse durch Extraktion gewonnene Menge Nucleoproteid war gering, entsprechend seiner schwachen Löslichkeit in Wasser, aber die Anwendung von Natriumkarbonat schien nicht angezeigt, weil man ja weiß, daß dies auf das Enzym der Thymusdrüse zerstörend einwirkt. Die Menge der erhaltenen Xanthinbasen war deshalb auch entsprechend gering. Nichtsdestoweniger wurden von 1 kg Drüse 100 mg Xanthinitrat gewonnen, was genügend ist, um zu zeigen, daß das

bei den früheren Versuchen erhaltene Xanthin vom Nucleoproteid her stammt. Somit läßt sich konstatieren, daß in der Nebenniere ein Enzym vorhanden ist, welches die charakteristische Wirkung des entsprechenden Enzyms in der Thymusdrüse ausübt, daß es nämlich das Nucleoproteid der Drüse zersetzt unter Bildung von Xanthinbasen, die qualitativ verschieden sind von denjenigen, welche durch Hydrolyse der Nucleoproteide mit kochenden Säuren entstehen.

Über die länger ausgedehnte Autolyse der Nebenniere.

Das zum Zwecke der Isolierung der Xanthinbasen in den beschriebenen Fällen verwandte Material bestand aus Fraktionen, welche verschieden lange, von 3 bis zu 14 Tagen digeriert waren. Bei keinem dieser Versuche war die Anwesenheit von Leucin augenscheinlich. Nach Entfernung der Proteide wurden die Flüssigkeiten unter vermindertem Druck eingedampft und das abgeschiedene Material als Xanthinbasen und Calciumoxalat angesprochen. Bei einem Versuch, bei dem 600 g Drüsensubstanz verwandt waren, ließ man die Digerierung sogar 4 Monate vor sich gehen. Das Material wurde zur Entfernung der Proteide erhitzt, mit Baryumhydroxyd behandelt und die Flüssigkeit nach Entfernung des überschüssigen Baryts durch Kohlensäure unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingedampft, worauf eine voluminöse Kristallisation von Leucin erfolgte. Die Substanz wurde nach Reinigung des Bleisalzes und Kristallisation aus 50%igem Alkohol gewogen und ergab eine Menge von 1,5 g. Die Materialmenge, welche bei den Versuchen mit kurzer Digestionszeit verwandt wurde, würde deshalb mindestens 24 g Leucin geliefert haben (wenn die Digerierung länger fortgesetzt worden wäre). Dieser Versuch ist nicht angeführt worden, um die Anwesenheit eines proteolytischen Enzyms in der Drüse zu erweisen. Wenn die Wirkung von 10%iger Säure bei Siedetemperatur in einer Stunde die Proteide unter Bildung von Leucin zerspaltet, warum sollte nicht bei 40° in einem Zeitraum von 4 Monaten 0,1%ige Säure denselben Erfolg haben? Der Zweck des Versuches ist, zu zeigen, daß das Fehlen von Leucin bei den

Digerierungen kürzerer Dauer nicht abhängt von dem Mangel an Material in der Drüse, durch dessen Hydrolyse ja das Leucin ansteigen kann, sondern von der Abwesenheit eines proteolytischen Enzyms, zum mindesten in einer Konzentration, die Leucin schon zu bilden vermag in einer Zeit, während der die Spaltung zu Xanthinbasen vor sich geht. Somit ist der Schluß gerechtfertigt, daß die Bildung von Xanthin bei der Selbstverdauung dieser Drüse nicht auf der Wirkung des weitverbreiteten proteolytischen Enzyms, sondern aller Wahrscheinlichkeit nach abhängt von der Anwesenheit eines Enzyms, dessen spezielle Wirkung in der Spaltung des Nucleoproteids besteht. Da die Haupteigenschaft dieses Enzyms auch dementsprechend der Thymusdrüse zukommt, so scheint die Annahme erlaubt, daß das letztere zu dem ersteren in naher Beziehung steht, wenn nicht mit ihm identisch ist.

#### Über die Autodigestion der Milz.

Während der Schluß, zu dem wir im letzten Abschnitt gekommen sind, hinreichend begründet ist durch schon klargelegte Tatsachen, so wird der Beweis für die spezifische Wirkung der Nucleasen beträchtlich gestützt durch das Studium des Enzyms der Milz. Die hydrolytischen Produkte der Nucleinsäure dieser Drüse sind sorgfältig von Levene<sup>1)</sup> untersucht worden, der sowohl Guanin wie Adenin, aber weder Xanthin noch Hypoxanthin fand. Von vornherein hätte man der Analogie nach annehmen sollen, daß bei der Autodigestion Xanthin und Hypoxanthin, aber weder Guanin noch Adenin gebildet würden. Dies ist indessen nicht der Fall. Guanin ist gerade so viel gebildet, wie bei der Hydrolyse, aber an Stelle von Adenin tritt Hypoxanthin auf. Von Xanthin fand sich keine Spur. Diese Resultate sind in weiten Grenzen unabhängig von der Dauer der Digestion und können deshalb nicht auf das Verschwinden ursprünglich gebildeter Xanthinbasen zurückgeführt werden. Der Schluß ist ganz augenscheinlich. Das Enzym ist eben unfähig, einen Ersatz der Amidogruppe hervorzurufen, der eine

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift (1903), Bd. XXXVIII, S. 404.

Bildung von Xanthin aus Guanin veranlassen würde; noch auch kann es die zur Bildung von Xanthin aus Adenin notwendige Oxydation einleiten. Das Enzym, dem zwar zwei Funktionen der Fermente der Thymus- und Nebennierendrüse fehlen, ist aber ausgezeichnet durch die Fähigkeit, dort, wo man Adenin erwarten sollte, Hypoxanthin zu bilden.

Drei Kilo fein verteilter Milz wurden mit 8 Liter chloroformhaltigem Wasser 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Flüssigkeit wurde durch ein Tuch gepreßt, mit der Zentrifuge die suspendierten Partikel entfernt und nach Hinzufügen von genügend Chloroform der Extrakt bei 40° C. 5 Tage lang im Thermostaten stehen gelassen. Darauf wurde Essigsäure zugefügt und die Koagulation der Proteide durch Hitze vorgenommen. Die Flüssigkeit wurde mit Ammoniak alkalisch gemacht und nach Abfiltrieren des niedergeschlagenen Ammoniummagnesiumphosphates wurde sie mit ammoniakalischer Silbernitratlösung versetzt. Der Silberniederschlag wurde dem Prozeß von Krüger und Salomon unterworfen.

Ein Kontrollpräparat erwies, daß die frische Drüse keine Xanthinbasen enthält, die nach Entfernung der Proteide durch ammoniakalische Silbernitratlösung entfernt werden konnten.

Die Xanthinfraktion wurde mit dem 15fachen ihres Gewichtes mit Natriumhydroxyd versetzt und der entsprechenden Menge Salpetersäure gesättigt. Während die Flüssigkeit noch heiß war, bildete sich ein spärlicher, flockiger, brauner, amorpher Niederschlag. Dieser erwies sich mit Hilfe der Salpetersäurereaktion frei von Xanthin. Die saure Lösung wurde jetzt mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und das auf diese Weise ausgefällte Guanin mit dem in der Hypoxanthinfraktion gefundenen vereinigt. Das Filtrat vom Guanin bildete einen äußerst spärlichen Niederschlag mit Silbernitrat und Ammoniak. Xanthin war also nicht anwesend.

Die Hypoxanthinfraktion gab mit Ammoniak einen profusen Niederschlag. Dieser wurde nacheinander mit sehr verdünntem Ammoniak, Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und in heißer, 5%iger Salzsäure gelöst. Beim Erkalten schieden sich unverkennbare, federartige Nadeln von salzsaurem

Guanin ab. Das Material, welches 1,8 g wog, wurde in die freie Base übergeführt und analysiert.

I. 0,1638 g der Substanz erforderten 9,70 ccm Schwefelsäure von bekanntem Gehalt (1 ccm = 0,007814 N).

II. 0,1849 g Substanz erforderten 10,91 ccm derselben Substanz.

Für Guanin berechnet	Gefunden	
	I	II
N 46,36%	46,28%	46,11%

Das Filtrat vom Guanin wurde zur Vertreibung des Ammoniaks erhitzt und mit Pikrinsäure behandelt. Ein kleines Quantum intensiv gefärbten Materials fiel aus und zwar nur nach Anwendung einer großen Menge des Reagens. Der Niederschlag hatte keinen bestimmten Schmelzpunkt und war in kochendem Wasser unlöslich. Es konnte sich also nicht um Adeninpikrat handeln. Bei einem anderen Versuche, wo zur Beseitigung von Farbstoff Tierkohle angewandt war, wie Krüger und Salomon empfehlen, wurde an diesem Punkte mit Pikrinsäure kein Niederschlag gebildet. Die Pikrinsäure wurde aus der Flüssigkeit mit Schwefelsäure und Äther entfernt und das Hypoxanthin auf gewöhnliche Weise isoliert. Schließlich bekam man 0,830 g farblosen Materials, das in homogenen Massen vorzüglich ausgebildeter Wetzsteinformen kristallisierte, die nur schwache Xanthinreaktion gaben. Somit konnte es sich nur um Hypoxanthinnitrat handeln.

### Über die bei der Autodigestion der Milz entstehenden Pyrimidinderivate.

Die bei der Behandlung der Nucleinsäure dieser Drüse mit kochenden Säuren entstehenden Pyrimidinderivate sind von Levene<sup>1)</sup> untersucht worden. Aus 140 g Nucleinsäure bekam er 15 g Thymin und 6 g Cytosinpikrat.

Der Verfasser fand keine dieser Substanzen unter den autolytischen Produkten der Milz, sondern nur Uracil.

3 Kilo fein verteilter Drüse wurden 12 Tage bei 40° mit 6 l chloroformhaltigem Wasser in verschlossenen Gefäßen gehalten. Das Material wurde dann mit wenigen Tropfen Essig-

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift (1903). Bd. XXXIX, S. 135.

säure versetzt, zum Kochen erhitzt und von dem koagulierten Proteid abfiltriert. Jetzt wurde Baryumhydrat zugesetzt und nach dem Filtrieren der Überschuß durch Kohlensäure beseitigt, dann die Lösung unter vermindertem Druck eingedampft und genau so, wie bei der Thymusdrüse, die konzentrierte Flüssigkeit mit Silbernitrat und Baryumhydroxyd auf Pyrimidinkörper untersucht. Schließlich bekam man 1,25 g Substanz, welche aus heißem Wasser in Nadelbüscheln auskristallisierten. Dieses Material wurde bei 110° getrocknet und analysiert.

0,2291 g Substanz erforderten 7,33 ccm Schwefelsäure von bekanntem Gehalt (1 ccm = 0,007814 N).

0,1926 g Substanz erforderten 6,20 ccm derselben Säure.

Für Thymin		Für Uracil		Gefunden	
berechnet		berechnet		I	II
N	22,22%	25,00%		25,00%	25,15%

Die Mutterlaugen wurden vereinigt, mit Tierkohle entfärbt und auf ein äußerst kleines Volumen eingeeengt. Beim Erkalten setzte sich ein verhältnismäßig geringes Quantum Material ab. Dieses wurde einmal aus heißem Wasser umkristallisiert und analysiert.

0,0926 g Substanz erforderten 2,93 ccm Schwefelsäure von bekanntem Gehalt (N = 24,72%).

Alle Versuche, die Anwesenheit von Cytosin zu erweisen, schlugen fehl.

### Schlußfolgerung.

Das Nucleoproteid der Thymusdrüse läßt bei der Selbstverdauung Xanthin und eine geringe Menge Hypoxanthin neben Uracil entstehen, aber weder Guanin, noch Adenin, noch Thymin, wiewohl die letzten drei Substanzen durch die Wirkung von Mineralsäuren auf Thymasnucleinsäure entstehen. Bei der Selbstverdauung der Nebenniere findet man Xanthin und eine kleine Menge Hypoxanthin, während die Hydrolyse des Nucleoproteids der Drüse mit kochenden Säuren Guanin und Adenin liefert. In diesem Falle geht die Autolyse ohne die Bildung einer irgend nennenswerten Menge Leucin vor sich, wiewohl ein Überfluß von Leucin bildenden Materials zur Verfügung steht.

Bei der Selbstverdauung der Milz bildet sich Guanin ebensogut, wie bei der Hydrolyse der Nucleinsäure. Andererseits tritt hier Hypoxanthin bei der Autolyse auf, während man Adenin erwarten möchte, und Uracil findet sich statt Thymin und Cytosin, die bei der Hydrolyse der Nucleinsäure gebildet werden.

Es ist verständlich, daß bei der Hydrolyse der Nucleinsäure unter dem Einfluß verschiedener hydrolytischer Agentien die Spaltung in jedem Falle an einer anderen Stelle des Moleküls erfolgt und so verschiedene Produkte entstehen läßt. Doch spricht in unserem Falle die Wahrscheinlichkeit gegen eine solche Annahme, und die in dieser Arbeit behandelten Erscheinungen lassen sich am besten so auffassen, daß die in Rede stehenden Enzyme die hydrolytische Wirkung kochender Säuren haben und außerdem die Entfernung von Amidogruppen, Oxydation und Aufspaltung von Kohlensäure veranlassen können. Es ist interessant, daß diese drei Wirkungen von den gewöhnlichen Fäulnisbakterien ausgeübt werden, wie bei der Bildung von Paroxyphenylpropionsäure, Paracresol und Phenol aus Tyrosin: bei der Bildung von Putrescein aus  $\alpha$ - $\delta$ -Diamidovalérian-säure und bei der Bildung einer Menge von Fäulnisprodukten aus den Proteiden, die alle zurückgeführt werden können auf eine geringe Anzahl hydrolytischer Produkte.