

Über die Adenase.

Von

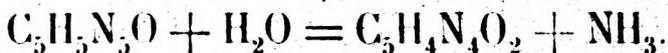
Walter Jones und M. C. Winternitz.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Johns Hopkins-Universität.)

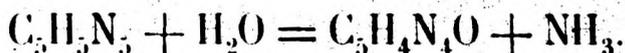
(Der Redaktion zugegangen am 7. Januar 1905.)

In der Absicht, die Unterschiede zu erklären zwischen den Purinderivaten, die sich bei der Selbstverdauung der Drüsen bilden, und denen, die durch Hydrolyse der entsprechenden Nucleoproteide mit Hilfe kochender Mineralsäuren entstehen, haben wir früher die Hypothese¹⁾ aufgestellt, daß die Basen, die sich zuerst bilden, in beiden Fällen dieselben sind, daß sie aber im Falle der Autolyse später unter dem Einfluß besonders in den Drüsen vorhandene Fermente eine Umwandlung erfahren. Von diesem Standpunkte aus schien die Annahme dreier solcher Fermente notwendig.

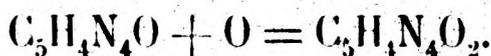
1. Guanase, unter deren Einfluß Guanin in Xanthin verwandelt wird.



2. Adenase, die die analoge Umwandlung des Adenins in Hypoxanthin hervorruft.



3. Oxydase, durch deren Anwesenheit Hypoxanthin zu Xanthin oxydiert wird.



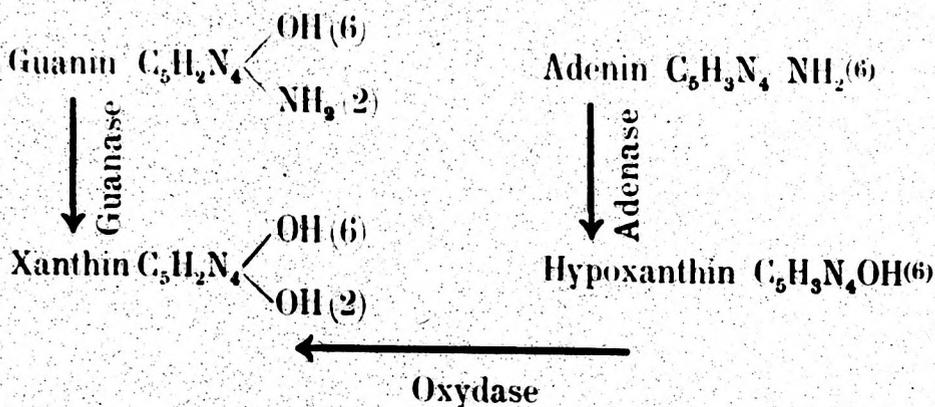
Bei der Selbstverdauung der Thymusdrüse und Nebenniere wird Xanthin fast ganz unter Ausschluß anderer Purinderivate gebildet und muß seinen Ursprung sowohl dem Guanin wie dem Adenin verdanken. Diese beiden Drüsen müssen somit alle drei Fermente enthalten.

Bei der Selbstverdauung des Pankreas wurden Xanthin und Hypoxanthin gebildet, und zwar fast in denselben Rationen,

¹⁾ Jones und Partridge, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 343.

wie Guanin und Adenin bei der hydrolytischen Spaltung von frischem Pankreas mit kochenden Mineralsäuren entstehen. Dies konnten wir bei sieben Versuchen zeigen, wovon jeder 5 Kilo Drüse betraf und die in der Absicht angesetzt waren, Guanin und Adenin für die weiteren Versuche dieser Arbeit zu gewinnen. Folglich konnte man annehmen, daß das Pankreas sowohl Guanase wie Adenase enthielt, Oxydase jedoch wahrscheinlich abwesend, oder nur in außerordentlich geringer Menge vorhanden war. Schließlich zeigten wir tatsächlich, daß Guanin, zu Pankreas hinzugefügt, in Xanthin übergeführt wird.

Unter den Produkten der Selbstverdauung eines wässrigen Aufgusses der Milz fanden sich nach 4¹/₂ bis 5 Tagen Guanin und Hypoxanthin, aber weder Xanthin noch Adenin. Man wird bemerken, daß die Bedingungen hier besondere und die Resultate nicht strikte zu vergleichen sind mit den angegebenen. Nichtsdestoweniger zeigt der Versuch, daß Adenin in Hypoxanthin verwandelt werden kann unter Bedingungen, die eine Überführung von Guanin in Xanthin nicht gestatten. Der wässrige Milzinfus enthält also Adenase, doch keine nennenswerte Menge Guanase, und die beiden Enzyme erweisen sich aller Wahrscheinlichkeit nach als völlig unabhängig voneinander. Diese Beziehungen wie das folgende lassen sich klar in nachstehendem Diagramm ausdrücken. Aus Rücksichten der Bequemlichkeit sind die tautomeren Formeln angewendet:



In dieser Publikation soll nun das folgende gezeigt werden:

1. Guanin wird durch einen wässrigen Milzinfus in absehbarer Zeit nicht verändert, läßt sich jedoch nach der Digestion wiederfinden. Somit enthält die Milz keine nennenswerte Menge Guanase.

2. Bei der Selbstverdauung eines wässrigen Milzinfuses erscheint Hypoxanthin schnell. Bei fortgesetzter Digestion tritt auch Xanthin in geringer Quantität auf und seine Menge steigert sich auf Kosten der des Hypoxanthins, wenn die Digestion noch weiter fortgesetzt wird.

3. Hinzugefügtes Adenin wird durch die Milz völlig in Hypoxanthin verwandelt oder, je nach der Dauer der Einwirkung, in eine Mischung von Hypoxanthin und Xanthin. Somit ist Oxydase in geringer Menge vorhanden und das bei länger dauernder Selbstverdauung der Drüse gebildete Xanthin ist dem Adenin und nicht dem Guanin zuzuschreiben.

4. Bei der Selbstverdauung der Leber findet sich Guanin, eine Spur Hypoxanthin, so gering, daß sie vernachlässigt werden kann, und eine erhebliche Menge Xanthin.

5. Hinzugefügtes Guanin kann aus einer Leberdigestion unverändert wiedergewonnen werden. Somit enthält die Drüse keine beträchtliche Menge Guanase.

6. Adenin, welches man zu einer Leberdigestion hinzufügt, wird schnell in Xanthin umgewandelt. Die Verteilung der Fermente in der Leber ist die gleiche, wie die in der Milz mit Ausnahme des Punktes, daß in der ersteren die Oxydase in erheblicher Konzentration vorhanden ist.

Der Einfluß der Milzfermente auf hinzugefügtes Guanin und Adenin.

Eine große Menge zerriebener und fein verteilter Milz wurde in einem verschlossenen Gefäß mit dem Vier- bis Fünffachen seines Gewichtes Chloroformwassers bei Zimmertemperatur unter häufigem Schütteln 24 Stunden lang belassen. Dann wurden die festen Teile so gut wie möglich mit der Zentrifuge entfernt und die Flüssigkeit bei Körpertemperatur entweder allein oder nach Zusatz von Xanthinbasen, längere oder kürzere Zeit, je nach dem einzelnen Versuch, digeriert. Am Ende der Digestion wurde mit Essigsäure versetzt, zum Kochen erhitzt und die heiße Flüssigkeit schnell von den koagulierten Proteiden abfiltriert. In jedem Falle überzeugte man sich von der Vollständigkeit der

Extraktion durch Behandlung des Rückstandes mit sehr verdünnter Natronlauge; auf diese Weise fanden sich natürlich gelegentlich gewisse Mengen von Guanin bei Versuchen, bei denen eine relativ große Quantität dieser Base in Frage kam, doch kann in den meisten Fällen das ganze Guanin leicht beseitigt werden durch intensives Kochen mit schwacher Essigsäure. Nach dem Abkühlen wurde die Flüssigkeit mit Ammoniak alkalisch gemacht und nach dem Abfiltrieren ¹⁾ von der phosphorsauren Ammoniakmagnesia mit einem Überschuß von ammoniakalischer Silbernitratlösung versetzt. Der Silberniederschlag wurde mit Salzsäure gespalten und nach Behandlung mit Tierkohle mit Hilfe der Methode von Krüger und Schittenhelm wie folgt auf Xanthinbasen untersucht. Die Lösung wurde auf ein kleines Volumen eingedampft, mit Ammoniak neutralisiert und ein Überschuß des Reagens hinzugesetzt, der ausreichte, um die ganze Lösung auf 1% zu bringen. Das Guanin wurde abfiltriert, mit 2%igem Ammoniak digeriert in 3,3%iger Natronlauge aufgelöst und mit Essigsäure gefällt. Darauf wurde die Base gereinigt durch Überführung in ihr schön kristallisierendes Hydrochlorat, welches getrocknet und gewogen werden konnte.

Das ursprüngliche Filtrat vom Guanin wurde mit dem bei der Digerierung verwandten Ammoniak vereinigt und deutlich mit Salzsäure sauer gemacht. Die Flüssigkeit wurde darauf zur Trockne eingedampft und das Eindampfen des Trockenrückstandes so oft wiederholt, bis eine Probe auf empfindlichem Lackmuspapier nur eine weinrote Farbe hervorrief. Es folgte Digestion des Rückstandes mit Wasser von 40° und Filtration im Falle des Vorhandenseins von Xanthin. Das Xanthin wurde gewaschen, getrocknet, gewogen und sodann in das Nitrat übergeführt, das auch seinerseits zur Wägung kam. Bei jedem Versuch fand sich gute Übereinstimmung zwischen den Gewichten der freien Base und des Nitrates, unter der Voraussetzung, daß das letztere genau charakterisiert wird durch die Formel $C_3H_4N_4O_2HNO_3$. Das Filtrat vom Xanthin wurde mit einer Lösung von Pikrinsäure behandelt, wobei sich kein deutlicher Niederschlag bildete,

¹⁾ Im Falle des Zusatzes von Guanin wurde diese Filtration unterlassen und in jedem Falle das Präzipitat auf Guanin untersucht.

mit Ausnahme eines Versuches, bei dem eine große Menge Adeninsulfat eingeführt wurde und die Digestion nur von kurzer Dauer gewesen war. In einigen Fällen bildete sich bei Zusatz eines Tropfens Pikrinsäure zu einem Tropfen der Flüssigkeit ein Nebel, doch rief ein Tropfen Pikrinsäure in der zu untersuchenden Flüssigkeit nicht die leiseste Trübung hervor. In jedem Falle wurde die Lösung mit einigen Kubikzentimetern Pikrinsäure behandelt und ein kleines Quantum davon mit Spuren einer äußerst dünnen Adeninsulfatlösung geprüft, und immer erhielten wir dabei sofort den gelben Niederschlag von Adeninpikrat. Somit konnte das Ausbleiben der Pikrinsäurereaktion in den Adeninproben nicht auf Bedingungen zurückgeführt werden, die der Ausfällung von Adeninpikrat ungünstig waren, sondern es beruhte auf der Abwesenheit von Adenin.

Die Flüssigkeit, welche Hypoxanthin enthielt, wurde zwecks Entfernung der Pikrinsäure mit Schwefelsäure und Äther behandelt und dann der Hypoxanthinniederschlag mit Silbernitrat und Ammoniak versetzt. Die Silberverbindung wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, dann wurde nach Abfiltrieren des Silberniederschlages und Entfernung des Schwefelwasserstoffes durch Verdampfen ein Teil der Flüssigkeit wiederum mit Pikrinsäure auf Adenin untersucht, doch stets mit negativem Erfolg. Die Lösung des Hypoxanthin wurde schließlich zur Trockne eingedampft, die freie Base in ihr Nitrat übergeführt und gewogen. Jede Probe zeigte die charakteristischen Wetzsteinkristalle und wies nur eine blaßorange Farbe auf, wenn man sie mit Salpetersäure und Natronlauge der Xanthinprobe unterwarf.

	Milz- infus. ccm	Dauer der Digestion	Guanin	Adenin	Xanthin	Hypo- xanthin- nitrat	Äqui- valente Menge Hypo- xanthin
I.	2000	4 Tage	0,262	Spur	0,00	0,145	0,091
II.	2000	4 "	0,229	"	0,00	0,175	0,110
III.	2000	6 "	0,240	0,00	0,070	0,205	0,128
IV.	2000	9 "	0,265	0,00	0,050	0,225	0,141
V.	2000	10 "	0,210	0,00	0,195	0,055	0,054
VI.	2000	15 "	0,220	0,00	0,188	0,065	0,041

Von den obenstehenden Versuchen wurden die letzten vier mit 400 ccm Flüssigkeit vorgenommen und das Resultat mit 5 multipliziert.

Das Guanin bleibt praktisch während der ganzen Zeit konstant. Adenin verschwindet bei der Digestion bald und während im allgemeinen Xanthin in den letzten Perioden überwiegt, ist Hypoxanthin in den früheren Perioden mehr vorhanden, bis die Umwandlung der Basen nach 10 Tagen tatsächlich ihr Ende erreicht hat.

VII.					
Milzinfus 400 ccm	Gua-	Ade-	Xan-	Hypo-	Summe
Guaninhydrochlorat 0,312	nin	nin	thin	xanthin-	von
Äquivalente Menge Guanin 0,211				nitrat	Xanthin
Dauer der Digestion 8 Tage					und Hypo-
					xanthin
	0,230	0,00	0,010	0,042	0,036
Kontrolle nach 9 Tagen . . .	0,053				0,038
Wiedergefundenes Guanin . .	0,177	= 78 %.			

VIII.					
Milzinfus 400 ccm	Gua-	Xan-	Ade-	Hypo-	Summe
Guanin 0,395	nin	thin	nin	xanthin-	von
Dauer der Digestion 9 Tage				nitrat	Xanthin
					und Hypo-
					xanthin
	0,378	0,012	0,00	0,036	0,034
Kontrolle nach 9 Tagen . . .	0,053				0,038
Wiedergefundenes Guanin . .	0,325	= 82 %.			

Die Differenz zwischen der hinzugefügten und wiedergefundene Menge Guanin bei diesen beiden Versuchen beruht auf einem Verlust an Material und nicht etwa auf einer Überführung der Basen in Xanthin, da ja die Summe von Xanthin und Hypoxanthin nicht größer geworden ist.

IX.					
Milzinfus 400 ccm	Gua-	Ade-	Xan-	Hypo-	Summe
Adeninsulfat 0,390	nin	nin-	thin	xanthin-	von
Entsprechende Menge Adenin 0,260		pikrat		nitrat	Xanthin
Dauer der Digestion 6 Tage					und Hypo-
					xanthin
	0,052	0,010	0,080	0,190	0,199
Kontrolle nach 6 Tagen					0,040
				62 %	= 0,159

X.

Milzinfus 400 ccm Adeninsulfat 0,418 Entsprechende Menge Adenin 0,279 Dauer der Digestion 9 Tage	Gua- nin	Ade- nin- pikrat	Xan- thin	Hypo- xanthin- nitrat	Summe von Xanthin und Hypo- xanthin
	0,043	0,00	0,180	0,78	0,229
Kontrolle nach 9 Tagen					0,038
				69 %	= 0,191

XI.

Milzinfus 400 ccm Adeninsulfat 0,477 Entsprechende Menge Adenin 0,318 Dauer der Digestion 9 Tage	Gua- nin	Ade- nin- pikrat	Xan- thin	Hypo- xanthin- nitrat	Summe von Xanthin und Hypo- xanthin
	0,048	0,00	0,226	0,075	0,301
Kontrolle nach 9 Tagen					0,038
				82 %	= 0,263

Diese drei Versuche erweisen hinlänglich die Anwesenheit eines Fermentes in der Milz, das Adenin in Hypoxanthin umzuwandeln vermag, und da das Ferment seine Wirksamkeit ausübt ohne das Vorhandensein von Bedingungen, die eine analoge Umwandlung des Guanins in Xanthin verursachen können, so ist sicher das Ferment unabhängig von der Guanase und somit als Adenase zu bezeichnen.

Das Vorkommen eines Fermentes, das Adenin zerlegen kann, jedoch ohne jeden Einfluß auf einen so nahe verwandten Körper wie das Guanin bleibt, ist von mehr als kasueller Wichtigkeit und legt die Möglichkeit nahe, daß eine solche selektive Eigenschaft der Enzyme verbreiteter ist, als man im allgemeinen annimmt.

Über den Einfluß der Fermente der Leber auf hinzugefügtes Guanin und Adenin.

In allen folgenden Versuchen wurde eine Mischung des ganzen Organs mit 2½ bis 3 Teilen Wasser verarbeitet und es fanden genau dieselben Methoden der Digestion und Isolierung der Produkte Anwendung, wie in der Arbeit über die Milz. Bei keinem Versuche konnten wir die Anwesenheit von Adenin

konstatieren. Hypoxanthin scheint immer gebildet zu werden, aber in sehr kleinen Mengen; die Quantität, die wir erhielten, reichte für eine befriedigende Identifizierung nicht aus, und aus verschiedenen Gründen sind wir geneigt, zu glauben, daß es sich um Xanthin handelte, das an einem besonderen Punkte unvollkommen isoliert war, denn die Volumina der Flüssigkeiten waren notwendigerweise sehr große und unter solchen Umständen konnte man eine Spur Xanthin in der Hypoxanthinfraktion schon erwarten.

	Leber g	Dauer der Digestion	Guanin	Adenin	Xanthin	Hypo- xanthin- nitrat
I.	1000	4 Tage	0,340	Spur(?)	0,84	0,020
II.	1000	6 "	0,316	0,00	0,990	0,028
III.	1000	20 "	0,315	0,00	1,060	0,025
IV.	1000	29 "	0,326	0,00	1,043	0,031

Das Guanin bleibt praktisch konstant, so wie bei der Selbstverdauung der Milz. Die Resultate deuten klar auf die Abwesenheit von Guanase sowie auf die Anwesenheit von Adenase und Oxydase in starker Konzentration hin. Zur Zeit der Abfassung einer früheren Abhandlung¹⁾ schrieben wir, im Besitze der Versuchsergebnisse I und II, das Zunehmen des Xanthins und das Abnehmen des Adenins der Anwesenheit von Guanase zu und bemerkten in einer Fußnote, die Anwesenheit von Guanase in der Leber solle noch erwiesen werden. Indessen belehrten uns die Versuche III und IV, daß dies nicht der Fall ist, und der folgende Versuch wird zeigen, daß die Leber keine erhebliche Menge Guanase enthält.

V.

Leber 200 g					Hypo- xanthin
Guaninhydrochlorat 0,160	Guanin	Xanthin	Adenin		
Entsprechende Menge Guanin 0,108	0,164	0,026	0,00		0,00
Dauer der Digestion 10 Tage					
Kontrolle nach 6 Tagen	0,063	0,020			
	0,101	= 93 %			

¹⁾ Jones und Partridge, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 347.

Die folgenden Versuche zeigen, daß die Leber Adenin in Xanthin überführt, zweifellos vermöge einer gleichzeitigen Wirkung von Adenase und Oxydase.

VI.

	Guanin	Adenin	Xanthin
Leber 330 g			
Adeninsulfat 0,320			
Entsprechende Menge Adenin 0,213	0,090	0,00	0,552
Dauer der Digestion 18 Tage			
Kontrolle nach 18 Tagen . . .	0,102		0,353
		93 % =	0,199

VII.

	Guanin	Adenin	Xanthin
Leber 330 g			
Adeninsulfat 0,365			
Entsprechende Menge Adenin 0,243	0,104	0,00	0,571
Dauer der Digestion 18 Tage			
Kontrolle nach 18 Tagen . . .	0,102		0,353
		90 % =	0,218

Somit enthält die Leber Adenase und Oxydase, aber keine nennenswerte Menge Guanase.

Wir haben zu zeigen versucht, daß Guanase, Adenase und Oxydase drei voneinander verschiedene Fermente sind, und Bedingungen angeführt, die der Wirkung eines oder zweier von diesen Fermenten besonders günstig sind, unter denen aber das dritte aufhört, irgend einen bemerkenswerten Erfolg zu haben. Während somit die Unabhängigkeit der Fermente voneinander erwiesen ist, können unsere Resultate natürlich nicht zu der Meinung führen, daß irgend eines der Fermente in einer der Drüsen völlig fehlte, oder daß man nicht vielleicht doch durch genügend lange dauernde Digerierungen die Anwesenheit von Oxydase im Pankreas und von Guanase in Leber und Milz erweisen könnte. Diese Annahme würde in der Tat einige der unerheblichen Differenzen zwischen unsern und den neuerdings von Levene¹⁾ bei der Drüsenautodigestion erhaltenen Resultaten erklären, in welchen die Digestion mehrere Wochen fortgesetzt wurde.

¹⁾ American Journal of Physiol., Bd. XII, S. 277.

Shiga¹⁾ hat die Anwesenheit von Guanase in der Hefe erwiesen. Levene hält unsere vorige Arbeit für mit seinen neuen Beobachtungen koinzidierend und erhebt Anspruch auf einige dieser Entdeckungen. Jedenfalls glauben wir, daß die in dieser Arbeit niedergelegten weiteren Aufklärungen die anfangs aufgestellte Hypothese völlig rechtfertigen.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 502.