

Über das Vorkommen der Guanase in der Rindermilz und ihr Fehlen in der Milz des Schweines.

Von

Walter Jones.

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Johns Hopkins University.
(Der Redaktion zugegangen am 1. Mai 1905.)

In einer früheren Mitteilung¹⁾ ist gezeigt worden, daß während die meisten andern Drüsen die Fähigkeit haben, die Amidogruppe sowohl vom Guanin wie vom Adenin abzuspalten, wobei Xanthin resp. Hypoxanthin entsteht, die Milz offenbar nur einen dieser Prozesse hervorrufen kann, denn unter den Selbstverdauungsprodukten dieser Drüse erscheint Guanin, doch ist Adenin durch Hypoxanthin ersetzt. Dies Verhalten der Milz läßt sich nur durch die Annahme erklären, daß die Umwandlung der Aminopurinverbindungen in anderen Drüsen auf der Wirksamkeit zweier verschiedener Fermente beruht, von denen eins in der Milz fehlt. Dieses Ferment, dessen Vorhandensein später im Pankreas²⁾ erwiesen wurde, zeigte die Fähigkeit, eingeführtes Guanin in Xanthin überzuführen, und wurde «Guanase» bezeichnet.

Inzwischen erschien die höchst interessante Arbeit von Schittenhelm³⁾ über die Bildung von Harnsäure in Gewebsextrakten. Er zeigte, daß wässerige Infuse verschiedener Organe bei Körpertemperatur unter ausreichender Zufuhr von Luft eine quantitative Umwandlung des Guanins in Harnsäure hervorrufen und daß dies in charakteristischer Weise durch die Milz geschieht. Da es schwer verständlich ist, wie die Milz bei Zufuhr von Luft Guanin in Harnsäure verwandelt

¹⁾ Jones, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 35.

²⁾ Jones und Partridge, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 343.

³⁾ Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 251.

kann, ohne bei Luftabschluß irgend einen Einfluß auf das Guanin auszuüben, schien es von Wichtigkeit, zu wissen, ob Adenin bei Einführung in die Milz in Hypoxanthin verwandelt wird, während doch Guanin hierbei unverändert bleibt. Die experimentellen Resultate rechtfertigten meine frühere Annahme, daß ein wässeriger Milzinfus völlig unfähig ist, Guanin in Xanthin zu verwandeln, die analoge Umwandlung des Adenins aber mit größter Leichtigkeit hervorruft.¹⁾ Das hierbei wirk-same Ferment mußte notwendig verschieden von der «Guanase» sein und erhielt den Namen «Adenase». Diese Abnormalität war offenbar auch Schittenhelm aufgefallen, denn in einer späteren Arbeit zeigte er,²⁾ daß eine verhältnismäßig große Menge von Guanin (0,900 g) nach der Einführung in 600 ccm sehr verdünnten Milzextrakt ohne Zufuhr von Luft innerhalb von 14 Tagen völlig verschwindet: an Stelle davon fand er 0,18 g Harnsäure und 0,77 g Xanthin. Hieraus folgert er dies:

Meine Versuche haben des weiteren ergeben, daß, so zutreffend und wichtig die Untersuchungen Jones' über die Bildung von Xanthin aus Guanin in der Thymusdrüse, dem Pankreas und der Nebenniere sind, seine Beobachtung betreffs der Milz nicht zutrifft, wonach dieselbe eine Ausnahmestellung einnehmen und diese Funktion nicht besitzen soll. . . . Es muß also angenommen werden, daß die Harnsäurebildung, welche auf ganz bestimmte Organe beschränkt ist, durch die Tätigkeit zweier Fermente zustande kommt, eines desamidierenden, welches die Überführung von Guanin in Xanthin und Adenin in Hypoxanthin ermöglicht. Das desamidierende Ferment, welches für Guanin und Adenin jedenfalls dasselbe ist, sodaß eine Einzelbenennung als «Guanase» und «Adenase» nicht nötig erscheint, bis nicht das Gegenteil bewiesen wird, erfreut sich einer weiten Verbreitung im Tierkörper und scheint so ziemlich in jedem Organ vorhanden zu sein.

Da ich an Schittenhelms Befunden keinen Zweifel hegte, andererseits den meinigen traute, schien mir die Ver-

¹⁾ Jones und Partridge, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 1.

²⁾ Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 228.

schiedenheit unserer Resultate ihre Erklärung in einer von zwei Hypothesen zu finden. Einerseits kann in der Milz eine inaktive Vorstufe der Guanase existieren, welche Schittenhelm bei der Darstellung seiner Extrakte oder auf andere Weise ohne sein Wissen aktiviert hat, andererseits mag Guanase in aktiver Form tatsächlich in der Milz vorkommen und nur durch einen Eingriff zerstört sein, den ich ebenfalls unbewußt bei meiner Arbeit vorgenommen habe. Keine der beiden Annahmen kann jedoch in irgend einer Weise meine frühere Überzeugung erschüttern, nämlich daß die beiden amidspaltenden Fermente nicht identisch sind: denn sei nun eine inaktive Form der Guanase möglich, oder sei die Guanase zerstört, während die Adenase noch wirksam ist, die beiden Fermente müssen verschieden sein.

Beim Versuch, die Bedingungen zu erforschen, unter denen Guanase in der Milz aktiviert wird, gelang es mir, eine Menge Beweismaterial dafür zu erbringen, daß Adenase bei Abwesenheit von Guanase wirksam sein kann, und ich machte eine geringe Abänderung bei der Isolierungsmethode, wodurch man die Überführung von Adenin in Hypoxanthin quantitativ erweisen kann, während sich Guanin unter genau denselben Bedingungen quantitativ wiederfindet. Das Guanin wurde in den wässerigen Milzextrakt unter verschiedenen Bedingungen seitens Temperatur, Säuregehalt und Konzentration hineingegeben: die Menge des Chloroforms, das desinfizieren sollte, wurde variiert. Ferner wurden verschiedene Vorsichtsmaßregeln ergriffen: Der Milzextrakt wurde nämlich dargestellt mit destilliertem Wasser, mit Leitungswasser und Salzlösungen verschiedener Konzentration. Dann wurde das Guanin als Sulfat, Chlorid, als freie Base, in alkalischer und in sehr verdünnter salzsaurer Lösung eingeführt, das Resultat war aber immer dasselbe: Guanin findet sich wieder, während Adenin in Hypoxanthin übergeht. Schließlich kam mir der Gedanke, der große Unterschied zwischen Schittenhelms Resultaten und den meinigen könnte auf der Verschiedenheit der Tierspezies beruhen, von denen die Milzen entnommen wurden, da Schittenhelm ausschließlich mit Rindermilz gearbeitet hatte.

ich aber nur die Milz vom Schwein verwandte. Mein erster Versuch mit Rindermilz überzeugte mich davon, daß dem so sei. Die Rindermilz enthält Guanase in sehr großer Menge; die Schweinemilz aber nicht die leiseste Spur. Guanase und Adenase sind somit verschiedene Fermente.

Wie erwähnt, haben wir ein großes Beweismaterial dafür, daß Adenase unabhängig von Guanase wirksam sein kann. Zwei der überzeugendsten Versuche mögen hier angeführt werden:

1. Ein wässriger Extrakt der Schweinemilz wurde dargestellt aus einer Mischung von fein zerteilter Drüsensubstanz mit dem Sechsfachen ihres Gewichtes kalten, destillierten Wassers und einer ausreichenden Menge Chloroform zur Verhinderung der Fäulnis, wobei man im Laufe von 24 Stunden häufig umschüttelte. Nun wurde die Flüssigkeit durch ein leinenes Tuch gepreßt, so gut als möglich durch Zentrifugieren von festen Partikeln befreit und nach 24stündigem Stehen durch Hinzufügen von Soda die vorhandene Säure neutralisiert. Die Menge der aus 400 ccm eines auf diese Weise herzustellenden Extraktes entstehenden Xanthinbasen ist im Vergleich zur Quantität Xanthinbasen, die bei den Digerierungen verwandt wurden, so gering, daß ihre Vernachlässigung kaum die Resultate beeinflussen kann.

Eine Mischung von salzsaurem Guanin und Adeninsulfat wurde in heißem Wasser suspendiert und mit Hilfe von möglichst wenig Natronlauge in Lösung gebracht. Diese Lösung der Basen wurde nach dem Abkühlen in 400 ccm Schweinemilzextrakt gegossen und die Mischung nach weiterer Hinzufügung von Chloroform in einem gutschließenden Gefäß im Thermostaten bei 38–40° gehalten. Das Guaninchlorhydrat war aus analysenreinem Guanin dargestellt und sechsmal aus 3%iger Salzsäure umkristallisiert. Das Adeninsulfat war aus einem Pikrat gewonnen und fand sich analysenrein. Um es ganz sicher von Spuren Hypoxanthin frei zu machen, wurde es jedoch noch sechsmal aus sehr verdünnter Schwefelsäure umkristallisiert. Die Hinzufügung der Basenlösung veränderte das Aussehen des Milzextraktes nicht.

Angewandte Menge

Guaninchlorhydrat 0,360 g

Adeninsulfat 0,360

Nachdem die Digerierung 8 Tage fortgesetzt, währenddem häufig frische Luft zugelassen war, wurde die Flüssigkeit mit einigen Tropfen Essigsäure und der gleichen Menge Wasser versetzt, zum Kochen erhitzt und heiß filtriert, der Filtrerrückstand wurde verschiedene Male mit Wasser gekocht, dann wurden die vereinigten Filtrate auf ca. 500 ccm eingedampft. Die heiße Flüssigkeit wurde nun solange mit verdünnter Schwefelsäure behandelt, als noch ein Niederschlag entstand. Dieser (den ich bisher noch nicht untersucht habe, der aber sowohl die scharfe Fällung der Xanthinbasen durch Silbernitrat und Ammoniak beeinträchtigt, als auch die folgende Spaltung der Silberfällung mit Salzsäure) wurde abfiltriert, die Flüssigkeit ammoniakalisch gemacht, worauf die Xanthinbasen nach Abfiltrieren von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia mit etwas überschüssigem Silbernitrat in Ammoniak gefällt wurden. Nach Aufschwemmung der Silberfällung in heißem Wasser wurde sie mit Salzsäure gespalten. Das Chlorsilber wurde abfiltriert und die Flüssigkeit über Nacht stehen gelassen, doch erfolgte keine Abscheidung von Harnsäure. Um den größten Teil der freien Säure zu entfernen, wurde jetzt fast zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit Wasser (50—60 ccm) aufgenommen und Ammoniak im Überschub bis zu einem Gehalt von $1\frac{1}{2}\%$ in der ganzen Flüssigkeit hinzugefügt. Das ausgeschiedene Guanin wurde mit $1\frac{1}{2}\%$ iger Ammoniaklösung digeriert, dann filtriert, gewaschen, in Natronlauge gelöst, mit Essigsäure gefällt und in das Chlorhydrat übergeführt.

Wiedergefundenes Guaninchlorhydrat 0,300 g = 83%.

Die ammoniakalischen Filtrate wurden nun weiter mit Silbernitrat in Ammoniak gefällt und die Silberfällung mit Salzsäure gespalten. Die gelbe, saure Flüssigkeit wurde zu wiederholten Malen zur Trockne eingedampft, zuerst mit Wasser, schließlich mit Alkohol. Der voluminöse Rückstand löste sich mit Leichtigkeit in Wasser von 40° , wobei nur eine unbe-

deutende Menge einer stark gefärbten Masse zurückblieb. Sowohl Harnsäure als Xanthin fehlten. Ein Tropfen der wässrigen Lösung gab keinen Hinweis auf Adenin bei Behandlung mit Pikrinsäure, doch erfolgte alsbald ein gelber Niederschlag, wenn nachher eine geringe Menge Adeninsulfat hinzugefügt wurde. Somit fehlte also Adenin. Jetzt wurde die ganze Flüssigkeit mit Silbernitrat in Ammoniak behandelt und die Silberfällung mit Schwefelwasserstoff gespalten. Das Filtrat vom Schwefelsilber (von dem ein Tropfen mit Pikrinsäure keinen Niederschlag gab) wurde zur Trockene eingedampft und der Rückstand aus sehr verdünnter Salpetersäure kristallisieren gelassen. Es zeigten sich die charakteristischen gleichmäßigen Kristalle des Hypoxanthinnitrat, welche nur eine orange-gelbe Farbe aufwiesen, entsprechend der Farbenreaktion mit Salpetersäure und Natronlauge. Es konnte sich nur um reines Hypoxanthinnitrat handeln.

Gefundenes Hypoxanthinnitrat $0,342 \text{ g} = 95\%$ des eingeführten Adenins.

Somit ist Adenin durch den Schweinemilzextrakt vollständig in Hypoxanthin verwandelt, während Guanin in demselben Gefäß und unter genau denselben Bedingungen unverändert bleibt.

II. Der eben beschriebene Versuch ist hinlänglich überzeugend, und so erschien es zwecklos, Guanin in den Milzextrakt einzuführen, in der Erwartung, daß es verschwinden würde, da doch die Milz nicht imstande ist, die nur relativ kleine Menge Guanin ihres eigenen Nucleoproteids umzuwandeln. Ein Schweinemilzextrakt wurde aus 1500 g Drüsen-substanz und 3800 g destilliertem Wasser hergestellt, die abgepreßte Flüssigkeit in zwei gleiche Portionen geteilt und bei $38-40^\circ$ der Autodigestion überlassen. Der eine Teil wurde nach 8 Tagen weiter verarbeitet, der andere 52 Tage bei 40° stehen gelassen. Jede Portion wurde auf Guanin untersucht; um jedoch genau vergleichbare Versuchsergebnisse zu erhalten, wurden immer gleiche Mengen Filtrat angewandt, wobei auf den Rest von Filtrat und Niederschlag verzichtet wurde, damit durch ungenügendes Auswaschen kein Irrtum entstehen konnte.

Guaninchlorhydrat nach	8tägiger Digestion	0,155 g
»	52 »	0,140 g.

Somit kann innerhalb von 44 Tagen eine relativ große Menge Schweinemilzextrakt keine irgendwie erhebliche Verminderung der Guaninmenge hervorrufen.

Bei der Rindermilz liegt die Sache völlig anders. Ein aus 2800 g dieser Drüse und dem Fünffachen seines Gewichtes an Wasser hergestellter Extrakt wurde 9 Tage lang bei einer Temperatur von 38—40° der Selbstverdauung überlassen, worauf die Produkte auf die oben schon beschriebene Weise auf Xanthinbasen untersucht wurden. Es konnte keine Spur von Guanin, Adenin oder Hypoxanthin gefunden werden. Die Xanthinfraktion wurde erst mit kaltem, dann mit kochendem Wasser säurefrei gewaschen, aber das Waschwasser gab bei der Behandlung mit Silbernitrat und Ammoniak nur einen Nebel und keinen deutlich abgetrennten Niederschlag. Die Xanthinfraktion wurde deshalb mit der Horbaczewskischen Methode auf Harnsäure und Xanthin untersucht und es ergaben sich schließlich 0,8 g Xanthin und 0,250 g Harnsäure. Ich war also imstande, die Schittenhelmsche Beobachtung zu bestätigen, daß durch einen Extrakt von Rindermilz ohne Zulassung von Luft eingeführtes Guanin und Adenin schnell in eine Mischung von Xanthin und Harnsäure verwandelt werden. Somit steht die Rindermilz in einem deutlichen Gegensatz zur Milz des Schweins nicht nur durch ihren Gehalt an Guanase, sondern auch durch die erhebliche Menge Oxydase, welche Hypoxanthin in Xanthin und Harnsäure umwandelt.

In einer neuerschienenen Mitteilung konstatiert Schenck,¹⁾ daß eine Mischung der Pankreasextrakte vom Schwein und Rinde Adenase, aber keine Guanase liefert. Dies brachte mich auf den Gedanken, daß möglicherweise die Schweinemilz nicht allein keine Guanase enthalte, sondern sogar einen die Guanase hemmenden Körper. Versuche erwiesen jedoch, daß dem nicht so ist. Eine Mischung von 200 ccm Rindermilzextrakt und 400 ccm Schweinemilzextrakt mit 0,500 g Guaninchlorhydrat wurde 14 Tage lang bei 38° gehalten. Aus den Produkten

¹⁾ Schenck, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 406.

wurde 0.160 g Harnsäure und 0.150 g Xanthin isoliert: das Guanin war völlig verschwunden.

Die Beobachtungen von Schenck sind in verschiedener Beziehung von großem Interesse. Seine Resultate zeigen, daß gewisse Bedingungen, die man zurzeit nicht näher beschreiben kann, die Wirksamkeit der Guanase im Pankreas verhindern können. Während ich immer übereinstimmende Resultate in bezug auf die Pankreasfermente hatte, ergab sich in der Schweinemilz das erratische Auftreten der Oxydase oft hinreichend deutlich. Ursprünglich war als Resultat einer Reihe von Versuchen festgestellt worden, daß die Schweinemilz kein Ferment enthält, das Hypoxanthin in Xanthin überführen könnte; jedoch gelegentlich (und besonders nach Einführung von Adenin und nachdem die Digestion besonders lange gedauert hatte) war zweifellos eine teilweise Umwandlung des Hypoxanthins in Xanthin eingetreten. Doch kann man in der großen Mehrzahl der Fälle kein Xanthin finden.

Es ist kaum nötig, hinzuzufügen, daß die Resultate von Schenck einen unabhängigen Beweis für den Hauptinhalt dieser Arbeit liefern, daß nämlich Guanase und Adenase zwei verschiedene Fermente sind.