

Über die Harnsäurebildung und die Harnsäurezersetzung in den Auszügen der Rinderorgane.

Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der Fermente des Nucleinstoffwechsels.

Von

Alfred Schittenhelm.

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik zu Göttingen; Geheimrat Ebstein.)
(Der Redaktion zugegangen am 10. Mai 1905.)

In früheren Mitteilungen¹⁾ konnte ich zeigen, daß aus Rindermilz ein isolierbares Ferment gewonnen werden kann, welches ohne Sauerstoffzufuhr im Thermostaten die Umwandlung von Guanin in Xanthin bewirkt, bei ständiger Sauerstoffzufuhr aber an Stelle des Xanthins Harnsäure liefert, sodaß hierdurch der Beweis erbracht ist, daß der Weg der Harnsäurebildung aus Guanin über das Xanthin führt. Meine weiteren Untersuchungen zeigten dann, daß bei diesem Vorgang offenbar zwei verschiedene Fermente tätig sind, ein hydrolytisch wirkendes, das die NH_3 -Gruppe ablöst, und welches sich einer ausgedehnten Verbreitung im Tierkörper erfreut, und ein oxydierendes Ferment, dessen Existenz auf bestimmte Organe beschränkt zu sein scheint. Zum Teil vorgreifend auf nachstehend mitgeteilte Versuche teilte ich mit, daß das hydrolysierende Ferment in Leber, Lunge, Muskel, Milz, Thymusdrüse und Niere zu finden ist, während die Oxydase nur in der Milz, Leber, Lunge und dem Muskel existiert. Daneben nahm ich in der Milz noch ein weiteres Ferment an, welches die α -Thymonucleinsäure zu spalten vermag. Auch Nucleoproteide werden in allen diesen Organen aufgespalten, was ohne weiteres

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 251 und Bd. XLIII, S. 228.

mit Sicherheit daraus hervorgeht, daß in den Leerversuchen aus den eigensten Nucleoproteiden resp. deren Purinbasen Harnsäure gebildet wird. In Gemeinschaft mit Bendix¹⁾ gelang ferner die Übertragung der Versuche auf den lebenden Organismus. Nach intravenöser Applikation von Guanin konnten wir beim Kaninchen feststellen, daß dasselbe in Harnsäure übergeführt wird, wobei als Zwischenprodukt Xanthin entsteht.

Im Anschluß an die bekannten Untersuchungen Horbaczewskis haben bereits Spitzer²⁾ und Wiener³⁾ gefunden, daß die wässerigen Extrakte der Rinderleber und -Milz bei Sauerstoffzufuhr imstande sind, die Oxypurine (Xanthin und Hypoxanthin) in Harnsäure überzuführen. Spitzer zeigte, daß diese Umsetzung nahezu quantitativ verläuft: in gleicher Weise machte er bereits Versuche mit Aminopurinen (Adenin und Guanin), bei denen ebenfalls eine Harnsäurebildung vor sich ging, ohne daß jedoch, wie bei den Oxypurinen, ein quantitativer Verlauf hätte gefunden werden können. In Verfolgung dieser Versuche konnte ich⁴⁾ mit Hilfe einer kleinen Änderung der Versuchsanordnung, die darauf beruhte, daß ich die Aminopurine in natronalkalischer Lösung anstatt in saurer zugab, den Nachweis erbringen, daß auch die Aminopurine quantitativ in Harnsäure übergehen, bei Verwendung von Extrakten der Milz und der Lunge. Vorgreifend auf nachstehende Versuche teilte ich des ferneren mit, daß auch Leber und Muskel die Umsetzung bewirken, daß dieselben jedoch gleichzeitig eine Harnsäure zerstörende Wirkung entfalten.

Eine sehr erfreuliche Übereinstimmung mit diesen Resultaten brachten die jüngst erschienenen, schönen Arbeiten Burians.⁵⁾ Er konnte aus Rinderleber auf dem Wege eines Chloroformwasserauszuges ein sehr wirksames Extrakt gewinnen, welches eine Oxydase enthielt, die, bei Gegenwart von Sauerstoff, Xanthin und Hypoxanthin rasch

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 365.

²⁾ Arch. f. Physiol., 1899, Bd. LXXVI, S. 192.

³⁾ Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak., 1899, Bd. XLII, S. 373.

⁴⁾ l. c.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 497 u. 532.

in Harnsäure überzuführen vermag. Er zeigte ferner, daß der Verlust an Purinbasenstickstoff größer war, als der Zuwachs an Harnsäurestickstoff, was auf die Fähigkeit des Leberauszuges zurückzuführen ist, Harnsäure in geringer Menge zu zerstören. Ganz ähnliche Verhältnisse finden sich nach Burians weiteren Untersuchungen in den Muskeln, in welchen er ebenfalls in Übereinstimmung mit mir eine Harnsäurebildung und -Zerstörung, nebeneinander hergehend, annimmt. Durchblutungsversuche am überlebenden Muskel führten ihn zu der bemerkenswerten Entdeckung, daß während der Arbeit im Muskel eine beständige Bildung von Hypoxanthin statthat, welches sofort in Harnsäure umgesetzt wird und als solche wenigstens teilweise der weiteren Zerstörung umgehend anheimfällt:

Während aber Burians und meine Untersuchungen in bester Harmonie sich bestätigen und ergänzen, kann das nicht mehr gesagt werden von den Arbeiten W. Jones¹⁾ in Gemeinschaft mit Partridge und Winternitz. Schon früher betonte ich, daß ich mich mit Jones und Partridge insofern in Widerspruch setze, als meine Untersuchungen unzweideutig ergeben, daß in der Milz ein Ferment existiert, welches Guanin in Xanthin überführt, während jene annehmen, daß eine Bildung von Xanthin aus Guanin wohl in der Thymusdrüse, dem Pankreas und der Nebenniere, nicht aber in der Milz vorkomme. Jones hat in Gemeinschaft mit Winternitz soeben eine weitere Mitteilung als Fortsetzung diesbezüglicher Versuche erscheinen lassen. Er kommt darin zu dem Resultat, daß in der Milz sowohl wie in der Leber sich ein Ferment finde, welches Adenin in Hypoxanthin umzuwandeln vermag, während eine analoge Umwandlung des Guanins in Xanthin sich nicht erweisen lasse. Es müsse also der Abbau von Adenin durch ein anderes Ferment verursacht werden, wie der von Guanin, und demnach eine «Adenase» und eine «Guanase», also zwei voneinander verschiedene Fermente, angenommen werden. Daneben finde sich noch eine Oxydase, welche Hypoxanthin in Xanthin um-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 343, u. Bd. XLIV, S. 1.

zuwandeln vermöge. Diese Annahme von Jones und seinen Mitarbeitern von der Verschiedenartigkeit der «Guanase» und «Adenase» stimmt jedoch nicht, wie sich schon aus den nachstehend verzeichneten Untersuchungen, die mit meinen früheren im Einklang stehen, ergibt. Da jedoch der Entscheidung unserer Untersuchungsdifferenzen eine prinzipielle Bedeutung beizumessen ist, so habe ich eingehendere Untersuchungen über die Ursachen derselben angestellt, welche ich in der folgenden Abhandlung gesondert mitteile.

Ich habe inzwischen meine Untersuchungen in alter Weise weitergeführt und auf die verschiedensten Organe ausgedehnt. Dabei machte ich bald die Beobachtung, daß bei gewissen Organen eine bedeutend geringere Menge Harnsäure wiedergefunden wurde, als der verschwundenen Quantität jeweils zugesetzter Purinbasen entsprochen wäre. Im Hinblick auf die schon von früheren Autoren beobachtete Harnsäurezerstörung¹⁾ im tierischen Organismus legte dieser auffallende Befund von vornherein die Annahme nahe, daß der Grund dafür eine weitere Zersetzung der neugebildeten Harnsäure hätte. Genauere Untersuchungen ergaben die Richtigkeit dieser Annahme, und ich habe darüber vorgreifend schon in meiner letzten Mitteilung kurz berichtet. Inzwischen sind nun von Burian²⁾ eingehende Untersuchungen mitgeteilt worden, in welchen eine Harnsäurezerstörung in Leber und Muskel des Rindes sicher festgestellt werden konnte. Meine Resultate stimmen, wie in allen anderen Punkten, auch in diesem mit Burians vorzüglich überein, was mir um so wertvoller zu sein scheint, als wir beide gleichzeitig und vollkommen unabhängig von einander zu ganz denselben Schlüssen kämen. Auf die Details meiner Feststellungen gehe ich bei den einzelnen Organen genauer ein.³⁾

¹⁾ Jakoby, Virch. Arch., Bd. CLVII, S. 261; Wiener, Arch. für experim. Pathol. u. Pharm., Bd. XLII, S. 357; Ascoli, Pflügers Archiv, Bd. LXXII, S. 340; Burian und Schur, Pflügers Archiv, Bd. LXXXVII, S. 306—318 etc.

²⁾ R. Burian, l. c., S. 506 und 543.

³⁾ Über die Isolierung des die Harnsäure zerstörenden Fermentes siehe die folgende Mitteilung «Über das uricolytische Ferment».

Der besseren Übersicht halber behandle ich im folgenden jedes einzelne Organ für sich allein.

Milz.

In erster Linie beschäftigte ich mich wieder mit Milzextrakt und den daraus isolierbaren Fermenten. Nachdem zunächst ein Versuch, mittels der Rosellschen Uranylacetatfällung eine brauchbare purinbasenfreie Fermentlösung zu erhalten, was wegen der einfachen und schnellen Durchführung dieser Methode große Vorzüge gehabt hätte, fehlgeschlagen war, bediente ich mich fernerhin stets der früher angegebenen Gewinnung durch Versetzen des Extraktes mit einer gesättigten Ammonsulfatlösung bis zu einem Sättigungsgrade von 66^o/_o. Es zeigte sich dabei, daß man schlechte oder gar nicht wirksame Lösungen erzielt, wenn man die Milz nur mit geringen Mengen Wasser auszieht oder den Preßsaft zu der Fällung verwendet. Am zweckmäßigsten hat sich stets die ursprüngliche Angabe gezeigt, wonach man die Pulpa von 1—2 Milzen (ca. 500—800 g) mit etwa 2—2¹/₂ Litern Wasser unter Chloroformzusatz 1—2 Stunden mit dem automatischen Rührer durcharbeitet, und dann einen halben Tag kühl oder bei Zimmertemperatur stehen läßt. Dieser so erhaltene wässrige Auszug ist stets gut wirksam, und bei der weiteren Isolierung erzielt man auch meist gut wirksame Fermentlösungen. Ich möchte nicht unterlassen, darauf hinzuweisen, daß die Überlegenheit der wässrigen Auszüge vor den Preßsäften auch bei der Darstellung anderer Fermentlösungen, wie z. B. von Morawitz¹⁾ bei der Thrombokinase beobachtet wurde. Den durch die Ammonsulfatfällung erzeugten Niederschlag filtriere ich spätestens nach 2—3 Stunden ab, suspendiere ihn je nach seiner Menge in 600—1000 ccm Wasser und schüttele die Suspension mit etwas Chloroform einige Zeit durch. Dann muß sie bis zur Ammoniakfreiheit dialysiert werden, was meist 10—14 Tage erfordert. Achtet man nicht gut darauf und ent-

¹⁾ Hofmeisters Beiträge, 1904, Bd. IV, S. 381.

Arch. f. klin. Mediz., 1904, Bd. LXXIX.

hält die gebrauchsfertige Fermentlösung noch mehr oder weniger große Mengen Ammonsulfat, so stört dasselbe sehr wesentlich deren Brauchbarkeit und kann sogar eine völlige Unwirksamkeit zur Folge haben. Ich verzichte darauf, hierfür Beispiele anzuführen, deren ich einige zu meinem Mißvergnügen erfahren habe. Schließlich wird filtriert und das Filtrat zu den weiteren Versuchen benützt.

Die Fermentlösung verliert bei längerem Stehen an Wirksamkeit.

Versuch I. Eine durch Ammonsulfatfällung gewonnene Milzfermentlösung, deren gute Wirksamkeit erwiesen war, blieb im Laboratorium über zwei Monate bei Chloroformzusatz stehen. Nunmehr wurden 300 ccm mit 0,3 g Guanin, in möglichst wenig Normalnatronlauge gelöst, in der gewöhnlichen Weise 3 Tage lang im Wasserbad bei ca. 40° unter Luftdurchleitung digeriert. Es konnten nur 0,08 g Harnsäure isoliert werden, während das Filtrat derselben eine dicke Silberfällung ergab.

Aus dem Versuch geht klar hervor, daß die Haltbarkeit der Fermentlösung eine äußerst begrenzte ist, und ich habe daher in der Folge zu den Versuchen nur frisch bereitete Lösungen benutzt.

Versuche, das Ferment in wirksamer Form als trockenes Pulver zu gewinnen, schlugen leider fehl. Es wurden stets durchaus wirkungslose Endprodukte erhalten, einerlei, ob die Fermentlösung bei entsprechender niedriger Temperatur im Vacuum oder ohne Anwendung desselben eingedunstet wurde.

Um nochmals zu erweisen, daß in der Milz die Fermente tatsächlich so vorkommen, wie ich sie in meiner letzten Mitteilung beschrieben habe, setzte ich nochmals Versuche mit Adenin¹⁾ an: daß Guanin umgesetzt wird, ist nochmals durch

¹⁾ Das Adenin stellte ich mir selbst aus Thymusdrüse als Pikrat dar; aus diesem habe ich nach Entfernung der Pikrinsäure die Base als Sulfat gewonnen und dieselbe daraus durch Ammoniak in Freiheit gesetzt. Das verwandte Guanin ist ein Mercksches Präparat. Vor Anstellung der Versuche überzeugte ich mich von der Reinheit der beiden Körper durch eine Stickstoffanalyse und durch Überführung in ihre charakteristischen Verbindungen.

die in der folgenden Mitteilung aufgeführten Untersuchungen festgestellt.

Versuchsreihe II.

Leerversuch:

a) 400 ccm Milzextrakt gehen 3 Tage lang bei ca. 40° unter ständiger Luftdurchleitung.¹⁾

Erhalten **0,11 g** Harnsäure.

b) 400 ccm Milzextrakt mit **0,3 g** in wenig Normalnatronlauge gelösten Adenins analog angesetzt.

Erhalten **0,33 g** Harnsäure.

0,1254 g Substanz verbrauchten 29,71 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure
Verlangt: 33,33% N; gefunden: 33,25% N.

Demnach sind **62,2%** des zugegebenen Adenins als Harnsäure wiedergefunden. Im Filtrat gab eine Silberfällung nur noch einen ganz geringen Niederschlag. Ich hatte also offenbar bei der Isolierung ziemlich große Verluste, so daß sich das Resultat in Wirklichkeit wohl weit besser stellte.

c) Isoliertes Milzferment (durch Aussalzen mit Ammonsulfat gewonnen) 300 ccm + **0,15 g** in wenig Normalsalzsäure gelösten Adenins analog angesetzt.

Erhalten **0,17 g** Harnsäure.

0,1028 g Substanz verbrauchten 24,45 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure
Gefunden: 33,29% N.

Es waren demnach **91,4%** des zugesetzten Adenins als Harnsäure wiedergefunden.

d) 800 ccm Milzextrakt + **0,8 g** in wenig Normalnatronlauge gelösten Adenins 3 Wochen lang gut verkorkt im Brutschrank. Für Sterilität war durch Zusatz von wenig Thymol in Substanz und von Chloroform gesorgt.

Nach Abbruch des Versuchs wurde die Reaktionsflüssigkeit mit Schwefelsäure ($1 \frac{1}{2} \%$) 5 Stunden am Rückflußkühler

¹⁾ Der Luftstrom muß eine hinreichende Geschwindigkeit haben, da reichlich Sauerstoffzufuhr Vorbedingung zum Gelingen der Versuche ist. Zur Beseitigung des manchmal recht lästigen Schäumens genügt meist der Zusatz eines erbsengroßen Stückes niedrig schmelzenden Paraffins oder einiger Tropfen reinen Öls.

gekocht: danach wurde mit Natronlauge alkalisch gemacht und aus der Lösung im Kochen durch Ansäuern mit Essigsäure das Eiweiß ausgefällt, welches dann abfiltriert und zur möglichsten Vermeidung grober Verluste noch zweimal mit Natronlauge gelöst und mit Essigsäure wieder gefällt wurde. Aus den vereinigten Filtraten wurden die Basen als Kupferoxydulverbindungen isoliert. Nach Zersetzung mit Schwefelwasserstoff wurde das Filtrat zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in ca. 300 ccm verdünnten Ammoniaks aufgekocht und 12 Stunden in der Kälte stehen gelassen. Dabei fiel nichts aus: also kein Guanin vorhanden.

Die Lösung wurde mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt: die Silberverbindungen, nach Abfiltrieren und Auswaschen bis zur NH_3 -Freiheit, wurden durch HCl zerlegt und das Filtrat zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser einige Zeit digeriert und dann einige Stunden in der Kälte stehen gelassen.

Das Ungelöste löst sich alles glatt in verdünntem Ammoniak. Nach Abdampfen des NH_3 und Einengen kam Xanthin in typischer Form heraus.

Menge des gewonnenen Xanthins = **0,51 g**.

Dasselbe wurde über das Nitrat, welches die bekannte Kristallform zeigte, gereinigt.

0.1092 g Substanz gaben 0.1587 g CO_2 und 0.0290 g H_2O	
Berechnet für $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$:	Gefunden:
39.47% C und 2.63% H.	39.63% C und 2.95% H.

Aus dem Gelösten wurden 0,04 g Adeninpikrat isoliert. Sodann wurden **0,11 g** Hypoxanthinpikrat gewonnen, welches die typische Kristallform (große tafelförmige Kristalle) zeigte.

Im Filtrat davon konnte noch eine geringe Menge Basen als Kupferoxydulverbindung gefällt werden, deren weitere Verarbeitung infolge eines Mißgeschicks vereitelt wurde.

Es waren also gefunden worden **0,51 g** Xanthin, **0,11 g** Hypoxanthinpikrat und **0,04 g** Adeninpikrat.

e) Leerversuch: 800 ccm Milzextrakt, für dessen Darstellung versehentlich 10 Stunden in der Schüttelmaschine ge-

schüttelt wurde, wurden sofort mit Schwefelsäure ($1\frac{1}{2}\%$) 5 Stunden am Rückflußkühler gekocht.

Bei der weiteren Verarbeitung konnten isoliert werden:

- 0.15 g Harnsäure,
- 0.08 » Guanin,
- 0.07 » Adenin (als Pikrat).

Im Schlußfiltrat nur noch minimale Kupferfällung.

Durch alle diese Versuche und unter Hinzuziehung meiner früheren und der in der folgenden Mitteilung beschriebenen ist also einwandfrei erwiesen, daß die Milz ein hydrolytisches Ferment besitzt, welches Guanin in Xanthin und Adenin in Hypoxanthin umwandelt, und zudem eine Oxydase, welche aus Hypoxanthin Xanthin und aus Xanthin Harnsäure zu bilden vermag.

Wie schon bemerkt, setze ich mich mit meinem Befund, daß die Milz imstande ist, Guanin in Xanthin umzusetzen, in Widerspruch zu Jones und seinen Mitarbeitern. Dagegen entspricht mein Befund im Adeninversuch ihren Resultaten. Jones und Winternitz¹⁾ zeigten, daß bei Zugabe von Adeninsulfat zu Milzinfus nach 9tägiger Digestion im Thermostaten Xanthin als Endprodukt vorwiegt und nur noch relativ wenig Hypoxanthin gefunden wurde. Auch in meinem Versuch wird nach 3wöchiger Dauer vorwiegend Xanthin gefunden und es ist damit erwiesen, da die Menge des gefundenen Xanthins im Verhältnis zu der Quantität Harnsäure und Guanin des Leerversuchs viel zu groß ist, um dessen Entstehung auf die in dem Milzextrakt schon vorher vorhandene Basen zurückzuführen, daß der größere Teil des Xanthins seine Herkunft dem zugesetzten Adenin verdankt. Der Weg der Umsetzung geht offenbar mindestens zum größeren Teil über das Hypoxanthin, wofür die Auffindung des letzteren im Adeninversuch spricht. Es scheint also bei der Oxydation vom Hypoxanthin zu Xanthin keineswegs eine derart lebhaftere Sauerstoffzufuhr vonnöten zu sein, wie bei der Oxydation von Xanthin zu Harnsäure. Immerhin bedarf der Versuch mit Adenin der Wiederholung, welche mir zur Zeit wegen Mangels an Adenin nicht möglich war.

¹⁾ l. c.

Der Umstand, daß eine quantitative Ausbeute an Harnsäure erzielt wurde, spricht schon klar gegen die Annahme einer weiteren Zersetzung der Harnsäure in der Milz. Daß diese in der Tat nicht statthat, zeigten mir speziell daraufhin durch Hinzufügen von gelöster Harnsäure zu Milzextrakt angestellte Untersuchungen.

Lunge.

Merkwürdigerweise hat mit diesem Organ bis jetzt noch niemand betreffs seiner Stellung zum Nucleinstoffwechsel experimentiert. Wie ich bereits in meiner ersten Mitteilung zeigen konnte, ist dasselbe analog der Milz imstande, die Purinbasen in Harnsäure umzusetzen. Auch was den Überführungsmodus anbelangt, liegen die Verhältnisse genau wie in der Milz, wie sich aus den folgenden Versuchen klar ergibt:

Versuchsreihe III.

a) 500 cem Lungenextrakt¹⁾ 3 Tage lang bei 40° unter ständiger Sauerstoffzufuhr.

Erhalten **0,06 g** Harnsäure.

Da der frische Lungenextrakt, wie ich mich leicht überzeugen konnte, keine freien, wohl aber gebundene Purinkörper enthält, so ist derselbe kraft seiner Fermente imstande, seine Nucleoproteide zu spalten und aus den frei gewordenen Purinbasen Harnsäure zu bilden.

b) 500 cem Lungenextrakt + **0,2 g** in wenig Normalnatronlauge gelösten Guanins analog angesetzt.

Erhalten **0,255 g** Harnsäure.

0.1488 g Substanz verbrauchten 17.7 cem $\frac{1}{5}$ -Normalschwefelsäure
Gefunden: 33,31% N.

Es waren demnach 87,6% des zugesetzten Guanins als Harnsäure wiedergefunden.

¹⁾ Zur Herstellung des Lungenextrakts wurden 450 g Lungengewebe fein zerhackt und mit Quarzsand zerrieben, sodann mit 3000 cem Wasser und etwas Chloroform wie gewöhnlich weiter verarbeitet.

c) 500 ccm Lungenextrakt + **0,2 g** in wenig NaOH gelösten Adenins analog verarbeitet.

Erhalten **0,25 g** Harnsäure.

0,13 g Substanz verbrauchten 31,0 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Gefunden 33,38% N.

Mithin waren **76,3%** des zugegebenen Adenins als Harnsäure wiedergefunden.

d) 800 ccm Lungenextrakt + **1 g** in ca. **12 ccm** Normalnatronlauge gelösten Guanins unter Chloroformzusatz 14 Tage lang im Thermostaten bei 37—38°.

Nach zweistündigem Kochen mit 16 ccm konzentrierter Schwefelsäure wurden die Basen als Kupferoxydulverbindungen nach der Methode Krüger und Schittenhelm isoliert. Nach Zersetzung mit Schwefelwasserstoff wird das Filtrat eingeeengt und dann, mit Ammoniak versetzt, 24 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Es fällt kein Guanin mehr aus.

Nach Abdampfen des Ammoniaks wird durch Stehenlassen der stark eingeeengten Lösung typisches Xanthin erhalten.

Menge = **0,65 g**.

Das über das Nitrat gereinigte Präparat wird bei 140° getrocknet und der Analyse unterworfen.

0,1599 g Substanz gaben 0,2290 g CO₂ und 0,0407 g H₂O

Berechnet für C₅H₄N₄O₂:

Gefunden:

39,47% C und 2,63% H.

39,06% C und 2,83% H.

Es waren also bei diesem Versuch **64,4%** des zugegebenen Guanins als Xanthin wiedergefunden.

e) 600 g Lungenextrakt + **0,5 g** in wenig Normalnatronlauge gelösten Adenins unter Chloroformzusatz 14 Tage lang im Thermostaten bei 37—38°.

Nachdem das Gemisch mit 2 $\frac{1}{2}$ %iger Schwefelsäure 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht hatte, wurden die Basen mit der Kupferfällung isoliert und, wie mehrfach beschrieben, weiter verarbeitet.

Es wurden isoliert (aus dem Ungelösten) **0,32 g** Xanthin.

0,1335 g Substanz gaben 0,1937 g CO₂ und 0,0334 g H₂O.

Berechnet für C₅H₄N₄O₂:

Gefunden:

39,47% C und 2,63% H.

39,57% C und 2,77% H.

Im Filtrat vom Xanthinnitrat keine Silberfällung mehr. Aus dem in Lösung Gegangenen wurden mit der Kupferfällung die Basen isoliert, die Kupferoxydulverbindungen mit H_2S zerlegt und das Filtrat salzsauer eingedampft. Der Rückstand (etwas über 0,3 g) wurde in ca. 50 ccm Wasser gelöst, von einigen Flocken abfiltriert und die Lösung heiß mit 0,5 g Pikrinsäure in Substanz versetzt. Beim Abkühlen fiel kein Adenin mehr aus. Dagegen kamen alsbald die schönen, tafelförmigen Kristalle des Hypoxanthin pikrats in makroskopisch erkennbarer Form heraus. Nach 12stündigem Stehen im Eisschrank wurden dieselben auf dem Filter gesammelt und mit kaltem Wasser gewaschen. Das Präparat wurde lufttrocken gewogen.

Die Menge des isolierten Hypoxanthin pikrats betrug **0,55 g**.

Aus dem Filtrat konnten durch Einengen noch ca. 0,05 g Hypoxanthin pikrat isoliert werden.

Das Hypoxanthin pikrat wurde in ca. 60 ccm Wasser unter Zusatz von 2 ccm HNO_3 gelöst, die Lösung durch Ausschütteln mit Benzol von Pikrinsäure befreit, filtriert und stark eingengt. Dabei schied sich das Hypoxanthinnitrat in tadellosen wetzsteinförmigen Kristallen ab.

0,1775 g Substanz gaben 0,1328 g CO_2 und 0,0557 g H_2O	
Berechnet für $C_5H_4N_4O \cdot HNO_3 + H_2O$:	Gefunden:
27,64% C und 3,22% H.	28,01% C und 3,48% H.

Es waren also in diesem Versuch an Stelle des zugesetzten Adenins gefunden worden: **0,32 g** Xanthin und **0,213 g** Hypoxanthin. Berechnet man die Menge beider Basen zusammen auf Adenin, so entspricht sie 0,495 g Adenin. Dabei ist allerdings noch in Rechnung zu ziehen, daß das Lungenextrakt an sich schon geringe Mengen von Basen enthält, welche jedoch, wie ein orientierender Versuch ergab, weniger als 0,1 g beträgt.¹⁾

Der Versuch steht in sehr guter Übereinstimmung mit den oben angeführten Adenin-Milzextraktversuchen (Versuchs-

¹⁾ In 600 ccm Lungenextrakt waren 0,039 g Basenstickstoff enthalten. Derselbe war also überaus basenarm.

reihe II; d), nur daß er, da die Isolierung der Basen glatt und ohne Störung vor sich ging, erheblich quantitativere Verhältnisse und damit auch eine klarere Übersicht über den Verlauf der Reaktion gibt. Das Adenin verschwindet total und findet sich in Form von Hypoxanthin und Xanthin wieder. Es wird also durch das hydrolytische Ferment in Hypoxanthin übergeführt und dieses wiederum durch die Oxydase zum Teil sofort zu Xanthin oxydiert. Es findet also dieselbe Umsetzung statt, wie sie inzwischen Jones und Winternitz für die Leber-, Milz- etc. Extrakte beschreiben.

Daß das Hypoxanthin zum Teil durch die Oxydase in Xanthin übergeführt wird, wahrscheinlich in dem Maße, als in der Versuchsflüssigkeit reaktionsfähiger Sauerstoff zur Verfügung steht, geht aus dem folgenden Versuch klar hervor. Dabei ist zu bemerken, daß auf diese Weise keine Harnsäure entsteht, welche jedoch sofort, wenn auch in relativ kleinen Mengen, gebildet wird, wenn durch häufiges Umschütteln die Flüssigkeit mit dem Sauerstoff der Luft in engere Beziehung gebracht wird.

f) 350 ccm Lungenextrakt + 0,5 g in wenig Normalnatronlauge gelösten Hypoxanthins wurden 10 Tage lang über Chloroform im Brutschrank gehalten.

Die Isolierung geschah wie gewöhnlich.

Es wurden 0,2 g Xanthin gefunden.

0,118 g Substanz verbrauchten 30,8 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Berechnet für $C_5H_4N_4O_2$:

36,84% N.

Gefunden:

36,54% N.

Aus dem Xanthinfiltrat konnten durch entsprechende Behandlung mit der berechneten Menge Pikrinsäure

0,76 g typisches Hypoxanthin-pikrat

isoliert werden. Dieselben gaben ins Nitrat verwandelt die verlangten Kristallformen.

Es waren also an Stelle der 0,5 g Hypoxanthin **0,2 g** Xanthin und **0,27 g** Hypoxanthin wiedergefunden worden.

Ebenso wie das Adenin unterliegt auch das Guanin der Einwirkung des hydrolytischen Fermentes und es entsteht Xanthin.

Endlich wird bewiesen, daß Adenin und Guanin quanti-

tativ in Harnsäure umgesetzt werden, wobei als Zwischenstufen Hypoxanthin und Xanthin auftreten.

Es kann also keinem Zweifel mehr unterliegen, daß die Lunge ganz dieselben Fermente enthält wie die Milz und damit dieselben Umsetzungen hervorzubringen vermag. Sie spielt also sicher eine nicht zu unterschätzende Rolle im Nucleinstoffwechsel.

Eine harnsäurezerstörende Tätigkeit liegt der Lunge in erheblicherem Maße, schon nach der Quantität der wiedergefundenen Harnsäure zu schließen, jedenfalls nicht ob. Versuche, bei welchen in Natronlauge gelöste Harnsäure frischem Lungenextrakt zugesetzt war, ergaben ebenfalls nach dieser Richtung ein negatives Resultat.

Leber.

Der Vollständigkeit halber teile ich auch einige Versuche über die Harnsäurebildung der Leber mit, obwohl dieselbe ja von allen, welche bisher darüber Versuche angestellt haben, anerkannt worden ist. Sodann beschäftige ich mich mit den bei der Harnsäurebildung auftretenden Zwischenprodukten. Nachdem Jones und Winternitz erwiesen haben, daß Adenin durch die Fermente des Leberextraktes in Hypoxanthin umgesetzt wird, erübrigte sich für mich die Anstellung diesbezüglicher Versuche um so mehr, als diese Beobachtung im Einklang steht mit der von Spitzer und mir gefundenen Tatsache des Übergangs von Adenin in Harnsäure bei Gegenwart der Leberfermente. Anders aber steht es mit der Umwandlung des Guanins, die Jones und Winternitz für die Leber ebenso bestreiten, wie für die Milz. Da aber aus Guanin im Leberextrakt Harnsäure gebildet wird, so ergab sich von selbst die Notwendigkeit der Nachprüfung, welche dann auch zum Resultat hatte, daß bei zweckmäßiger Versuchsanordnung das Guanin ohne weiteres in Xanthin umgesetzt wurde. Auch hier finden sich also ein hydrolytisches und ein oxydierendes Ferment.

Der Umwandlungsprozeß macht aber nicht wie in der Lunge und Milz bei der Harnsäure Halt, sondern geht noch weiter, indem die neugebildete Harnsäure wenigstens zum Teil

zersetzt wird. Ich habe auf diesen Punkt schon in meiner letzten Mitteilung aufmerksam gemacht. Inzwischen sind von Burian unwiderlegliche Beweise dafür erbracht worden, welche in meinen folgenden Versuchsergebnissen eine absolute Bestätigung erhalten. Die Fähigkeit der Rinderleber, Harnsäure zu zerstören, ist also unzweifelhaft bewiesen und es steht diese Beobachtung im Einklang mit dem durch zahlreiche Autoren¹⁾ festgestellten Harnsäurezerstörungsvermögen der Hundeleber.

Versuchsreihe III.

a) 400 ccm Leberextrakt gehen 3 Tage bei 40° unter ständiger Luftzufuhr.

Erhalten **0,02 g** Harnsäure.

Im Filtrat keine Silberfällung mehr.

b) 400 ccm Leberextrakt + **0,3 g** in wenig Normalnatronlauge gelösten Guanins analog angesetzt.

Erhalten **0,141 g** Harnsäure.

0,0869 g Substanz verbrauchten 20,55 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure
Gefunden: 33,11% N.

Im Filtrat der Harnsäure, welchem auch das zweite nach der Horbaczewskischen Umfällung erhaltene Filtrat zugegeben war, wurde eine Silberfällung vorgenommen und deren Stickstoffgehalt bestimmt.

Verbraucht wurden 16,7 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure.

Berechnet man die im Filtrat erhaltene Stickstoffmenge auf Guanin (= 0,054 g) und zählt die als Harnsäure wiedergefundene Menge (= 0,109 g) hinzu, so erhält man 0,163 g Guanin. Verloren gingen also **0,137 g** resp. **45,7%** des zugesetzten Guanins, mithin eine Menge, welche nicht aus den bei der Isolierung an sich unvermeidlichen Verlusten erklärt werden kann, da sie doch entschieden zu groß ist. Es lag daher sofort der Verdacht nahe, daß die neugebildete Harnsäure zum Teil wieder zerstört wird, um so mehr, als auch die in dem Leerversuch gefundene Menge im Hinblick auf die

¹⁾ Ausführliche Literaturangabe s. bei Burian, l. c. S. 506. und in der folgenden Mitteilung über das uricolytische Ferment.

in der angewandten Quantität Leberextrakt vorhandenen Nuclein-
substanzen eine auffallend niedrige war, namentlich auch im
Vergleich zu den mit Lunge- und Milzextrakt erhaltenen Werten.
Der Verdacht, daß es sich um eine Harnsäurezerstörung ¹⁾ han-
delte, wurde durch folgenden Versuch zur Gewißheit.

c) 400 ccm Leberextrakt + **0,3 g** in wenig Normal-
natronlauge gelöster Harnsäure analog angesetzt.

Gefunden: **0,122 g** Harnsäure.

Im Filtrat wurde durch ammoniakalische Silberlösung kein
Niederschlag mehr hervorgerufen.

Es waren also 59% der zugesetzten Harnsäure zerstört
worden.

d) 400 ccm Leberextrakt + **0,2 g** in wenig Normal-
natronlauge gelösten Adenins analog angesetzt.

Gefunden: **0,08 g** Harnsäure.

Im Filtrat wurde eine Silberfällung gemacht, deren Stick-
stoffgehalt 46,2 ccm ¹ 10-Normalsalzsäure entsprach. Auf Adenin
berechnet macht es 0,12 g Adenin. In diesem Versuch war
also offenbar die Fermentlösung keine sehr wirksame: vor
allem war die Harnsäurezerstörung sehr unbedeutend.

e) 800 g Leberextrakt + **1,0 g** in Normalnatronlauge
gelösten Guanins werden unter Zusatz von Chloroform vom
15. XI. bis 1. XII. 04 im Thermostaten bei 37—38° verkorkt
belassen.

Wie gewöhnlich nach Aufschluß durch Kochen mit
Schwefelsäure verarbeitet. Es fand sich kein Guanin mehr.

¹⁾ Selbstverständlich wurden von allen diesen Versuchen mehr-
fache Kontrollversuche angestellt, welche alle ein übereinstimmendes
Resultat ergaben, wenn auch die jeweils erhaltenen Werte beträchtlich
voneinander abwichen, je nachdem in der angewandten Fermentlösung
das eine oder andere Ferment in größerer Wirksamkeit sich fand. —
Daß die beobachtete Harnsäurezerstörung nicht eine reine Alkaliwirkung
ist, das zeigen ja deutlich die zahlreichen Versuche mit Lunge, Milz etc.,
wo die Harnsäure ebenso quantitativ gefunden wurde, wie bei den eben-
falls angestellten Versuchen mit Harnsäure beschickter und analog be-
handelter Organextrakte, welche jedoch vorher einer Temperatur von
100° ausgesetzt worden waren.

Dagegen konnte **0,71 g** Xanthin isoliert werden, welches, über das Nitrat gereinigt, zur Analyse kam.

0,1837 g Substanz gaben 0,2659 g CO₂ und 0,0487 g H₂O

Verlangt für C₅H₄N₄O₂:
39,47% C und 2,63% H.

Gefunden:
39,48% C und 2,94% H.

f) 750 ccm Leberextrakt + **1,0 g** in ca. **12 ccm** Normalnatronlauge gelösten Guanins vom 10. XII. 04 bis 20. I. 05 im Thermostaten.

Es wurde wiederum kein Guanin gefunden, wohl aber **0,75 g** Xanthin.

Die Leber spielt also eine sehr wichtige Rolle im Purinstoffwechsel, indem sie, wie die Milz und die Lungen, aus zugeführten Purinbasen Harnsäure zu bilden vermag unter Einhaltung des für jene festgestellten Übergangsmodus. Dazu kommt aber als weitere wichtige Funktion die Harnsäurezerstörung.

Muskel.

Nach Burians eingehenden Versuchen erübrigt sich eigentlich, auf die Tätigkeit des Muskels näher einzugehen, da danach dessen Fähigkeit, Harnsäure zu bilden und zu zerstören, welche ja auch von mir bereits in meiner früheren Mitteilung betont wurde,¹⁾ absolut sicher festgestellt ist. Burian hat bekanntlich als neue Tatsache gefunden, daß im Muskel fortwährend eine Neubildung von Purinbasen vor sich geht; die neugebildeten Basen werden im ruhenden Muskel zu Harnsäure übergeführt, welche ihrerseits zum Teil sofort wieder zerstört wird; im arbeitenden Muskel verlassen sie zumeist unverändert denselben.

Meine Untersuchungen sollen nun das Verhalten des Muskelextraktes gegenüber zugeführten Purinbasen klarlegen und die Art deren Abbaus in demselben.

¹⁾ Auch Wiener (Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm., Bd. XLII, S. 388) machte bereits Versuche über die harnsäurezerstörende Fähigkeit des Rindermuskels mit positivem Erfolge.

Versuchsreihe V.

a) 500 ccm Muskelextrakt gehen 3 Tage unter Chloroformzusatz bei ca. 40° unter ständiger Luftdurchleitung.

Gefunden: Spuren von Harnsäure.

Im Filtrat keine Basenfällung mehr.

b) 500 ccm Muskelextrakt + 0,2 g Harnsäure, in wenig Normalnatronlauge gelöst, ebenso angesetzt.

Wiedergefunden 0,09 g Harnsäure. N-Gehalt 33,31%.

Es waren demnach 55% der zugesetzten Harnsäure zerstört. Im Filtrat keine Silberfällung mehr.

c) 500 ccm Muskelextrakt + 0,2 g Guanin, in wenig Normalnatronlauge gelöst, ebenso angesetzt.

Gefunden: Spuren von Harnsäure.

Im Filtrat Silberfällung. Der Stickstoffgehalt der Basensilberverbindungen entsprach 8,9 ccm $1/5$ -Normalsalzsäure = 0,0249 g Basenstickstoff. Es entspricht derselbe 0,054 g Guanin.

Es waren also 73% des zugesetzten Guanins in Harnsäure umgesetzt und wieder zerstört worden.¹⁾

d) 800 ccm Muskelextrakt + 0,8 g in wenig Normalnatronlauge gelösten Guanins bleiben über Chloroform 14 Tage lang im Thermostaten bei $37-38^{\circ}$ ohne Luftdurchleitung.

Hernach wird die Versuchsflüssigkeit mit Schwefelsäure (16 ccm) versetzt, 4 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die mit der Kupferfällung gefällten und daraus wie gewöhnlich isolierten Basen werden in verdünntem Ammoniak in der Wärme digeriert, wobei sich alles löst. Nach 12stündigem Stehen im Eisschrank war nichts ausgefallen. Demnach war kein Guanin

mehr vorhanden.

¹⁾ Der Prozeß ging in Wirklichkeit noch viel intensiver vor sich, wenn man bedenkt, daß im Muskelextrakt an sich schon Basen vorhanden sind. Die Quantität derselben (gefunden nach Aufschluß durch 2% H_2SO_4 und zweimal wiederholte Fällung) betrug für den vorliegenden Fall 0,047 g Basenstickstoff in 500 ccm. Dieselben sind offenbar mit-umgesetzt worden. Auch beim Muskel unterliegt, wie mehrere Versuche ergaben, die Wirksamkeit der einzelnen Extrakte sehr großen Schwankungen. Manchmal scheint die Harnsäurebildung minimal zu sein.

Nach Abdampfen des Ammoniaks wird die Lösung salzsauer eingedampft. Der mehrmals mit Alkohol zur Vertreibung überschüssiger Salzsäure abgedampfte Rückstand wird mit ca. 200 ccm Wasser einige Zeit bei 50–60° digeriert und wiederum 12 Stunden in der Kälte stehen gelassen.

1. Ungelöstes in ca. 12 ccm Normalnatronlauge gelöst, mit Tierkohle entfärbt und heiß in 15 ccm kalter 50%iger Salpetersäure unter beständigem Umrühren einfiltriert. Nach längerem Stehen hatten sich

0,8 g Xanthinnitrat

in typischer Kristallform abgeschieden. In freies Xanthin verwandelt und bei 150° getrocknet, wurde folgende Analyse angestellt:

0,1203 g Substanz verbrauchten 31,4 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Berechnet: 36,84% N

Gefunden: 36,54% „

Im Filtrat nur noch geringe Silberfällung, bei deren Verarbeitung noch 0,055 g Xanthin gefunden wurde.

2. Gelöstes: Nochmals mit der Kupferfällung behandelt. Die gewonnenen salzsauren Basen ins Pikrat verwandelt. Dabei fand sich

kein Adenin.

Dagegen hatte sich nach 12stündigem Stehen eine Menge von **0,37 g** Hypoxanthin-pikrat in typischer Kristallform abgeschieden. Ins Nitrat verwandelt erhielt ich die schönen wetzsteinartigen Kristalle des Hypoxanthinnitrats. Zur Elementaranalyse reichte das Material nicht aus; das Hypoxanthin ist jedoch durch die charakteristischen Kristallformen genügend gekennzeichnet.

Ich hatte demnach an Stelle der 0,8 g Guanin wiedergefunden **0,63 g** Xanthin und **0,134 g** Hypoxanthin.

Es ist also nicht zweifelhaft, daß im Muskel alle Fermente enthalten sind, wie in der Leber, und daß in demselben sowohl die Umwandlung der Amino-purine zu Oxypurinen und dieser zu Harnsäure vor sich geht, als auch eine Zerstörung der neugebildeten

Harnsäure.¹⁾ Auch dem Muskel kommt somit zweifellos eine große Rolle im Purinstoffwechsel zu.

Darm.

Meines Wissens ist der Darm zu derartigen Versuchen noch nie benutzt worden. Und doch scheint mir gerade die Stellung des Darmkanals gegenüber den Purinkörpern von weittragender Wichtigkeit zu sein, da doch vielleicht in ihm schon Umwandlungen der Nahrungspurine, vor ihrem Eintritt in Blut und Gewebe, vor sich gehen können. Wie eigentlich schon vorauszusehen war, ergaben denn auch meine Untersuchungen positive Resultate.

Ich will nicht unerwähnt lassen, daß mein erster Versuch, Darmextrakt auf die harnsäurebildende Fähigkeit hin zu untersuchen, ein negatives Resultat lieferte. Ich habe daher bei der Wiederholung des Versuches der Bereitung des Extraktes besondere Sorgfalt gewidmet.

Ich verwandte zu dessen Herstellung 2 kg Rinderdarm (Dünndarm), welche aufs peinlichste von anhaftenden Speisen und Kotresten gereinigt wurden. Sodann präparierte ich sorgfältig alles Fett und Mesenterium ab, wobei ich gleichzeitig den größten Teil der Darmserosa, welche sich leicht abziehen ließ, mit entfernte. Die auf diese Weise in reinstem Zustand erhaltene Darmwand wurde nunmehr fein zerkleinert, mit 2500 ccm Wasser und 15 ccm Chloroform zusammengebracht und zwei Stunden mit dem automatischen Rührer durchgearbeitet. Danach blieb das Ganze 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurde wie gewöhnlich koliert und filtriert.

Versuchsreihe VI.

a) Leerversuch: 400 ccm Darmextrakt gehen 3 Tage unter Chloroformzusatz bei ca. 40° unter ständiger Luftdurchleitung

Danach war mit der Kupferfällung kein Niederschlag zu erhalten.

¹⁾ Vergl. dazu Burian, Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 539 und Wiener, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak., Bd. XLII, S. 375.

b) 400 ccm Darmextrakt + **0,2 g Guanin**, in wenig Normalnatronlauge gelöst, analog angesetzt.

Erhalten: **0,14 g Harnsäure**. Stickstoffgehalt = 33,11%.

Im Filtrat Silberfällung. Der N-Gehalt der Basensilberverbindungen entsprach 18,5 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure = 0,026 g Basenstickstoff. Auf Guanin berechnet gibt derselbe 0,056 g Guanin.

Es waren also **63%** des zugegebenen Guanins in Harnsäure umgesetzt worden.¹⁾ Eine Harnsäurezerstörung scheint nicht stattzuhaben.

c) 800 ccm Darmextrakt + **0,8 g Guanin**, in ca. 10 ccm Normalnatronlauge gelöst, wurden mit Chloroform versetzt, 12 Tage lang im Thermostaten bei 37° aufbewahrt.

Das Gemisch wurde nunmehr mit Schwefelsäure versetzt, sodaß der Gehalt **2½%** entsprach, und danach 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die weitere Verarbeitung geschah wie gewöhnlich.

Es fand sich keine Spur von Guanin mehr.

Das Ammoniak wurde abgedampft und die Flüssigkeit auf ein kleines Volumen eingeeengt. Dabei schied sich Xanthin in großen Krusten ab.

Gesamtmenge des gewonnenen Xanthins = **0,8 g**.

Im Filtrat war nur noch minimale Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung.

Das Xanthin wurde zur Analyse in natronalkalischer Lösung mit Tierkohle entfärbt, ins Nitrat verwandelt und aus diesem, welches in typischen Kristallen zum Vorschein kam, mit Ammoniak frei gemacht. Das durch Einengen gewonnene Xanthin wurde, wie gewöhnlich, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und bei 140° getrocknet.

1. 0,1102 g Substanz verbrauchten 28,7 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

2. 0,12 „ „ „ 31,5 „ „

Für $C_5H_4N_4O_2$ berechnet: 36,84% N

gefunden: 1. 36,47% „

2. 36,75% „

¹⁾ Bei einem zweiten analog angesetzten Versuch wurden 0,12 g Harnsäure gefunden.

Es fand sich somit in diesem Versuch das zugegebene Guanin nahezu quantitativ als Xanthin wieder.

Die Versuche haben also den Beweis dafür erbracht, daß der Darm sich in seinen Funktionen den Purinkörpern gegenüber sämtlichen bisher untersuchten Organen anschließt. Auch er enthält das hydrolytische Ferment, das aus Guanin Xanthin darstellt. Versuche mit Adenin konnten leider bisher wegen Mangels an diesem Körper nicht angestellt werden: in Analogie mit den andern Organen ist jedoch daran nicht zu zweifeln, daß auch das Adenin in Hypoxanthin übergeführt wird.

Der Darm enthält aber zudem die Oxydase und kann zweifellos Harnsäure bilden. Ich muß daher eine entgegengesetzte Angabe,¹⁾ welche ich an anderer Stelle gemacht habe und die sich auf meinen ersten vergeblichen Versuch stützte, korrigieren. Es tritt sonach der Darm in die Reihe der Organe, welche Harnsäurebildner sind, und es ist diese Beobachtung sicher von erheblicher Wichtigkeit, wenn man die zentrale Stellung des Darms im menschlichen Stoffwechsel berücksichtigt.

Niere.

Daß die Niere harnsäurezerstörende Fähigkeiten besitzt, ist durch die Untersuchungen von Wiener, welche ich in vollem Umfang bestätigen konnte, bereits festgestellt. Dagegen ist die Frage noch eine offene, ob sie auch imstande ist, Harnsäure zu bilden. Die folgenden Versuche sollen darüber Aufschluß geben:

Versuchsreihe VII.

a) 400 ccm Nierenextrakt²⁾ gehen 3 Tage lang unter ständiger Luftdurchleitung bei ca. 40°.

¹⁾ Deutsch. Arch. f. klin. Medizin, Bd. LXXXI., S. 423.

²⁾ 450 g fein zerkleinerte Niere + 2000 g H₂O + 10 ccm Chloroform werden 2 Stunden gerührt und dann einen halben Tag bei Zimmertemperatur stehen gelassen; hernach wird koliert und filtriert. 400 ccm davon enthalten 0,05 g Basenstickstoff (nach Aufschluß durch Kochen mit H₂SO₄ und nachheriger, zweimal wiederholter Basenfällung erhalten).

Die Verarbeitung auf Purinkörper ergab ein vollkommen negatives Resultat.

b) 400 ccm Nierenextrakt + 0,2 g in wenig Normalnatronlauge gelöster Harnsäure ebenso angesetzt.

Es wurde keine Spur von Harnsäure wiedergefunden.

c) 400 ccm Nierenextrakt + 0,2 g in wenig Normalnatronlauge gelösten Guanins ebenso angesetzt.

Auf Purinkörper verarbeitet findet sich keine Spur davon.

Versuchsreihe VIII.

Die folgenden 3 Versuche sind der Sicherheit wegen nochmals mit Guanin angesetzt. Die Darstellung des Extraktes war folgende: Zwei Rindernieren wurden mit der Fleischhackmischung fein zerkleinert, der erhaltene Brei mit Kieselgur aufs sorgfältigste zerrieben, nunmehr das Ganze mit zwei Liter Wasser unter Zugabe von 15 ccm Chloroform suspendiert und zwei Stunden mit dem automatischen Rührer bearbeitet. Darauf blieb die Suspension ca. 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Jetzt wurde koliert und filtriert und mit dem noch etwa trüben Filtrat die Versuche angesetzt.

Vor Verarbeitung auf Harnsäure und Basen wurde nach Beendigung der Versuche jede einzelne Versuchsflüssigkeit durch Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure auf 2% gebracht und so 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Dann quantitative Bestimmung nach der Krüger-Schittenhelmschen Methode.

a) Leerversuch: 400 ccm Nierenextrakt wurden mit 4 ccm Normalnatronlauge versetzt, 3 Tage unter ständiger Luftdurchleitung und Chloroformzugabe bei ca. 40° gehalten.

Gefunden: keine Harnsäure.

Basenstickstoff = 0,009 g.

b) 400 ccm Nierenextrakt + 0,3 g in ca. 4 ccm Normalnatronlauge gelösten Guanins ebenso angesetzt.

Gefunden: keine Harnsäure.

Basenstickstoff = 0,038 g.

Nach Abzug der im Leerversuch erhaltenen Basenstickstoffmenge wurden auf Guanin berechnet 0,063 g wiedergefunden.

Es waren also nur noch **21%** des zugesetzten Guanins zurückgewonnen.

c) 400 ccm + **0,3 g** in ca. 4 ccm Normalnatronlauge gelösten Guanins ebenso angesetzt.

Gefunden: Spuren von Harnsäure.

Basenstickstoff = 0,027 g.

Nach Abzug der im Leerversuch erhaltenen Basenstickstoffmenge wurden auf Guanin berechnet 0,038 g wiedergefunden. Es waren also nur noch **12,7%** des zugegebenen Guanins zurückgewonnen.

Nach allen diesen Versuchen war es so gut wie sicher, daß die Niere wohl Harnsäure zu bilden imstande ist, dieselbe aber sofort wieder der weiteren Zerstörung¹⁾ anheimfällt, wodurch ihre Auffindung unmöglich gemacht ist. Da jedoch nicht absolut ausgeschlossen schien, daß das Guanin in der Niere zerstört wird, ohne daß vorher Harnsäure entsteht, so setzte ich einen Versuch mit Guanin im Thermostaten an, nachdem ich mich überzeugt hatte, daß die Harnsäurezerstörung durch Nierenextrakt ebenda auch vor sich geht.

d) 300 ccm Nierenextrakt + **0,3 g** in Normalnatronlauge gelöster Harnsäure bleiben mit Chloroform versetzt 14 Tage lang im Thermostaten bei 37—38°.

Es wurde keine Harnsäure wiedergefunden.

e) 300 ccm Nierenextrakt + **0,2 g** in wenig Normalnatronlauge gelösten Guanins bleiben 4 Wochen im Brutschrank bei 37—38°.

Nach Aufschluß durch Kochen mit H_2SO_4 wurden 0,15 g typisches Xanthin (identifiziert durchs Nitrat, welches die verlangte Kristallform zeigte) isoliert.

Im Filtrat konnten mit der Silberfällung noch Basen isoliert werden, deren Stickstoffgehalt = 0,029 g betrug.

¹⁾ Bei einigen der Versuche konnte nach Eindampfen in salzsaurer Lösung und ca. 1stündigem Stehen bei Zimmertemperatur in der minimalen Ausscheidung eine Substanz konstatiert werden, welche die Murexidprobe gab. Es handelt sich da jedenfalls um Spuren der intermediären Harnsäure.

Berechnet man beides zusammen auf Guanin, so erhält man 0.212 g Guanin.

Der Versuch¹⁾ beweist, daß in der Niere, wie ich schon in meiner letzten Mitteilung ausführte, Guanin in Xanthin übergeführt wird, daß aber eine Zerstörung des Guanins resp. Xanthins, ohne daß dieselben vorher in Harnsäure umgewandelt werden, nicht statthat.

Der folgende Versuch illustrierte nochmals die Fähigkeit der Niere, Guanin in Xanthin überzuführen.

f) 800 ccm Nierenextrakt + 1,0 g in Normalnatronlauge gelösten Guanins werden unter Chloroform 8 Tage lang im Brutschrank gehalten.

Nach Kochen mit verdünnter Schwefelsäure wie gewöhnlich behandelt.

Gefunden: **0,05 g Guanin.**

Im Guaninfiltrat, über das Xanthinnitrat gereinigt.

Gefunden: **0,81 g Xanthin:**

Analyse:

0.15 g Substanz verbrauchten 39.3 ccm $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Gefunden: 36.68 % N.

Es waren also an Stelle der 1,0 g Guanin gefunden worden **0.05 g Guanin** und **0,81 g Xanthin.**

Auch die Niere reiht sich also den übrigen Organen an, was die Umsetzung der Aminopurine und die Harnsäurebildung anbelangt. Sie hat aber zugleich auch eine äußerst lebhaft harnsäurezerstörende Fähigkeit. Über die Isolierung des harnsäurezerstörenden Fermentes berichte ich gesondert.

Thymus.

Daß die Thymusdrüsensubstanz Fermente enthält, welche die Aminopurine in Oxypurine umwandelt, bedarf keiner weiteren

¹⁾ Ein zweiter Versuch wurde ebenso angesetzt, nur wurde der Nierenextrakt vorher eine halbe Stunde im Autoklaven auf 100° erhitzt gehalten. Es fand sich beim Abbruch des Versuches nach Ablauf von 4 Wochen 0,276 g Guanin, wovon 0,145 g als Guaninchlorhydrat direkt, der Rest als Silberfällung aus dem Filtrat desselben gewonnen wurde.

Versuche mehr, nachdem Jones¹⁾ das Auftreten von massenhaftem Xanthin bei der Selbstverdauung der Thymusnucleoproteide erwies. Auch meine schon in meiner letzten Mitteilung angeführten Untersuchungen kamen zu demselben Resultat. Dagegen fehlen noch eingehendere Untersuchungen über die Harnsäurebildung resp. Zerstörung in diesem Organ.²⁾

Meine darauf hinielenden Versuche, welche genau so angesetzt waren wie die sämtlichen derartigen Versuche, kamen zu einem negativen Resultat.

Knochenmark.

Ich führe meinen Versuch, welchen ich mit einem wässrigen Auszug von 100 g rotem Knochenmark (Kälberknochen) angestellt habe, der Vollständigkeit wegen an, wobei ich jedoch sofort bemerke, daß eine Wiederholung desselben unbedingt notwendig erscheint. Ich habe dieselbe bis dahin unterlassen, weil es in Göttingen überaus schwer hält, rotes Knochenmark (gelbes, welches leicht zu beschaffen ist, dürfte als im wesentlichen aus Fett bestehend ungeeignet sein) in größerer Menge zu erhalten.

Versuchsreihe IX.

a) 400 ccm Extrakt + 0,2 g in Normalnatronlauge gelösten Guanins wie immer unter ständiger Luftdurchleitung 3 Tage angesetzt.

Es fanden sich Spuren eines die Murexidprobe gebenden Körpers.

b) 400 ccm Extrakt + 0,2 g in Normalnatronlauge gelöster Harnsäure.

Wiedergefunden 0,144 g Harnsäure.

Die Versuche beweisen nichts Sicheres; doch scheint immerhin die Möglichkeit vorzuliegen, daß das Knochenmark eine Rolle im Harnsäurestoffwechsel spielt.

Resümiere ich nun nochmals die Hauptresultate meiner Versuche, so ergibt sich aus ihnen, daß die Milz, die Lunge,

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

²⁾ Wiener, l. c. S. 392, hat auch für die Thymusdrüse ein geringes Bildungsvermögen von Harnsäure gefunden.

die Leber, der Darm, der Muskel und die Niere des Rindes die Fähigkeit besitzen, die Purinbasen in Harnsäure umzusetzen, und daß die Niere, der Muskel und die Leber die neugebildete Harnsäure weiter zu zerlegen vermögen, während diese Fähigkeit der Milz und der Lunge abgeht.

Der Weg, welcher bei der Umsetzung der Purinbasen in Harnsäure eingeschlagen wird, ist am genauesten und vollständigsten festgestellt für die Milz und die Lunge. Insbesondere die letztere hat sich als äußerst geeignet für diese Versuche erwiesen, da aus ihr auf relativ einfache Weise hoch wirksame Extrakte gewonnen werden können, welche äußerst arm an Purinkörpern sind. Es hat sich denn gefunden, daß das Guanin zuerst in Xanthin umgesetzt wird, welches dann seinerseits zu Harnsäure oxydiert wird. Das Adenin wird in Hypoxanthin umgewandelt und dieses wiederum sofort zum Teil zu Xanthin oxydiert. Setzt man die Versuche unter günstigen Oxydationsbedingungen an, also unter ständiger Sauerstoffzufuhr, so geht die Umsetzung Adenin — Hypoxanthin — Xanthin — Harnsäure glatt und quantitativ vor sich. Diese Reaktionen kommen in allen fünf Organen gleichmäßig zustande, nur haben sich die Extrakte der Milz, Lunge und Niere als etwas wirksamer erwiesen, wie die der Leber und des Muskels. Fürs rote Knochenmark ist es einigermaßen wahrscheinlich gemacht, daß auch ihm diese Funktionen zukommen und für die Thymus¹⁾ ist es sicher, daß wenigstens eine Umsetzung der Aminopurine in Oxypurine nach obigem Schema vor sich geht, wenn auch vielleicht die höchste Oxydationsstufe, die Harnsäure, nicht erreicht wird. Immerhin müssen für die Thymus nach dieser Richtung weitere Versuche erst die Entscheidung bringen. Bemerkenswert ist, daß ich bei meinen Versuchen weder auf das 6-Amino-2-8-Dioxypurin noch auf das 2-Amino-6-8-Dioxypurin gestoßen bin. Nikolaier²⁾

¹⁾ Der Thymusdrüse gleichzustellen ist in ihrer Wirkung auf die Aminopurine das Pankreas (vergl. die Untersuchungen von Kutscher, Jones und Mitarbeiter, Schenk u. a.).

²⁾ Zeitschrift f. klin. Medizin, Bd. XLV, S. 359.

hat bekanntlich nach subkutaner Einverleibung von Adenin an Ratten 6-Amino-2-8-Dioxypurin aus deren Nieren isolieren können. Der Umstand, daß ich kein positives Resultat nach dieser Richtung gefunden habe, erklärt sich vielleicht aus der Tatsache, daß ich die Organe einer anderen Tierart zu meinen Versuchen benutzte. Es ist ja mannigfach beobachtet, daß wesentliche Unterschiede bestehen im Abbau der Purinkörper bei verschiedenen Tiergattungen (Salkowski, Krüger, Burian und Schür u. a.).

Daraus, daß die Harnsäurebildung und die Harnsäurezerstörung keineswegs Hand in Hand gehen, vielmehr die letztere auf ganz bestimmte Organe beschränkt erscheint, während die erstere fast durchweg anzutreffen war, geht schon hervor, daß es sich dabei um zwei völlig getrennte Fermente handelt. Mit noch größerer Sicherheit ergibt es sich daraus, daß die Isolierung der bei diesen Umsetzungen tätigen Fermente auf ganz verschiedene Weise bewerkstelligt werden muß.

Die bei der Umsetzung der Aminopurine in Harnsäure tätigen Fermente können, wie meine Versuche mit der Milz beweisen, mit der von Jakoby¹⁾ angegebenen Aussalzung durch Ammonsulfat isoliert werden, während eine harnsäurezerstörende Fermentlösung, wie meine in der folgenden Arbeit mitgeteilten Versuche beweisen, aus der Niere durch die Rosellsche Isoliermethode, nicht aber durch die Jakobysche erhalten werden kann. Das harnsäurezerstörende Ferment ist also jedenfalls ein besonderes Ferment, welches mit den harnsäurebildenden nichts zu tun hat, und ich möchte vorschlagen, demselben der Kürze halber in Analogie zur Glykolyse die Bezeichnung urikolytisches Ferment (Uricolyse) zu geben.

Die Harnsäurebildung geht in zahlreicheren Organen vor sich, als die Harnsäurezerstörung. Es hat sich gefunden, daß auch in Organen, in welchen meine ersten Versuche ein scheinbar negatives Resultat erzielt hatten (Darm, Niere), eine ausgiebige Harnsäurebildung statthat. Meine Untersuchungen ergaben nun die wichtige Tatsache, daß bei einer Ver-

¹⁾ Diese Zeitschrift, 1900, Bd. XXX, S. 135.

suchs-anordnung ohne Sauerstoffzufuhr nur eine Umwandlung der Aminopurine (Adenin und Guanin) in die Oxypurine (Hypoxanthin und Xanthin) statthat, während aber bei lebhafter Sauerstoffzufuhr eine Oxydation der Oxypurine zu Harnsäure glatt durchgeführt wird. Dieser Umstand, zusammengenommen mit der Beobachtung, daß eine Oxydation zu Harnsäure in der Thymus scheinbar nicht geschieht, obwohl die Aminopurine in Oxypurine umgesetzt werden, führt zu der notwendigen Folgerung, wie ich schon in meiner letzten Mitteilung ausgeführt habe, daß zwei verschiedene Fermente angenommen werden müssen, nämlich eines, welches Adenin in Hypoxanthin und Guanin in Xanthin umsetzt, und eines, welches die Oxypurine zu Harnsäure oxydiert. Das letztere ist schon allgemein anerkannt und Burian hat vorgeschlagen, dasselbe Xanthinoxydase zu benennen, eine Bezeichnung, welcher ich absolut beipflichte. Das erstere, also dasjenige Ferment, welches die Aminopurine in Oxypurine umwandelt, hat zu Differenzen zwischen Jones und mir geführt. In der nächstfolgenden Mitteilung beschäftige ich mich eingehender mit denselben und bringe die Beweise dafür, daß die Annahme von Jones, wonach es sich dabei um zwei verschiedene Fermente handeln soll, eine «Guanase» und eine «Adenase», als hinfällig zu betrachten ist. Vielmehr handelt es sich um ein und dasselbe Ferment, welches hydrolytisch (desamidierend) wirkt. Ob dieses Ferment ein ganz spezifisches ist und nur auf die Aminopurine einwirkt, oder ob es in gleicher Weise auch noch zahlreiche andere Körper beeinflusst, kann m. E. vorläufig wenigstens nicht sicher entschieden werden. Ich halte daher eine «Taufe» dieses Fermentes für absolut überflüssig.

Es gestaltet sich also der Vorgang derart, daß zunächst das hydrolytische Ferment Adenin und Guanin zu Hypoxanthin und Xanthin umwandelt; darnach setzt die Xanthinoxydase ein und setzt das Hypoxanthin in Xanthin und das Xanthin in Harnsäure um. Als drittes kommt dazu das uricolytische Ferment und bewirkt eine weitere Zerstörung der Harn-

säure, als deren teilweise Endprodukte Glykokoll¹⁾ (Wiener) und Harnstoff (Ascoli u. a.) anzusehen sind.

Die Xanthinoxidase vermag bereits bei Gegenwart von wenig Sauerstoff zu wirken, was aus der teilweisen Umwandlung des Hypoxanthins zu Xanthin im Lungenextrakt hervorgeht. Bemerkenswerterweise wird unter diesen Umständen aber so gut wie keine Harnsäure gebildet. Es bietet also offenbar C₅ im Purinkern ganz erheblich größere Schwierigkeiten für die Oxydation wie C₂, und es bedarf einer recht lebhaften Sauerstoffzufuhr, um die Oxydation auch an C₈ zustande zu bringen.

Es bliebe noch eine auffallende Erscheinung zu erklären, nämlich diejenige, daß die bei der Autolyse ganzer Organe gefundenen Resultate sich nicht in allen Punkten decken mit den Ergebnissen meiner systematischen Fermentversuche. Ich bin nun der Ansicht, daß die Autolyse ganzer Organe keine geeignete Versuchsanordnung ist, um derartige Verhältnisse genau zu studieren. Es entstehen dabei zahllose, vor allem auch saure, Produkte, welche einerseits dazu geeignet sind, die Fermentreaktionen in ihrer Intensität zu stören oder vielleicht zu modifizieren; andererseits aber könnte durch die Änderung der Reaktion etc. auch eine Ausfällung gewisser schwer löslicher Substanzen, wie z. B. des Guanins, hervorgerufen werden, welche eintritt, sobald dasselbe durch die «Nuclease» in Freiheit gesetzt ist, und dadurch veranlaßt, daß das ungelöste Guanin weiteren Fermenteinflüssen entzogen wird. Auf solche Weise ließen sich die widersprechenden Versuche erklären, welche z. B. bei der Pankreasautolyse erhoben wurden. Dabei hat Schenk²⁾ Guanin und Hypoxanthin, aber kein Adenin und Xanthin gefunden; Levene³⁾ dagegen gewann unter denselben Bedingungen vorwiegend Xanthin und Hypoxanthin und konnte Guanin nur noch in geringer Menge, Adenin nicht mehr nach-

¹⁾ Auch mir gelang es inzwischen, Glykokoll als Zersetzungsprodukt der Harnsäure nachzuweisen, worüber ich später berichten werde.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 408.

³⁾ The American Journal of Physiology, Vol. XII, p. 276.

weisen und Jones und Partridge¹⁾ endlich stellten fest, daß im Pankreas ein Enzym besteht, welches Guanin in Xanthin umwandelt. Im ganzen also kann man wohl die autolytischen Befunde als eine Bestätigung meiner Versuche auffassen, da ja vorwiegend Oxypurine als Endprodukt festzustellen waren. Es muß jedoch gleichzeitig in Anbetracht der differierenden Resultate als sicher angenommen werden, daß die Autolyse ganzer Organe nicht geeignet ist, die Wirkung der Fermente auf die Nucleinsubstanzen klar zu veranschaulichen.

Ich möchte übrigens hierzu kurz erwähnen, daß auch ich eine gewisse Analogie der Autolyse mit meinen Fermentversuchen festzustellen vermochte.

Versuchsreihe X.

Eine steril eingelegte Hundemilz wurde über ein halbes Jahr lang der Autolyse im Eisschrank unterworfen und dann ca. 1 Jahr unter Alkohol aufgehoben.

Das Endprodukt wurde nunmehr fein zerkleinert, durch Kochen mit 2%iger Schwefelsäure, wie üblich, aufgeschlossen und die Purinbasen, wie oftmals beschrieben, isoliert.

Es wurden gefunden 0,18 g Xanthin und 0,12 Hypoxanthin. Adenin und Guanin konnten nicht aufgefunden werden.

Es waren also in diesem Versuch Oxypurine als Endprodukte gefunden worden, ganz analog den Befunden bei meinen Fermentversuchen mit Rindermilz.

Ich unterlasse es, an dieser Stelle näher darauf einzugehen, inwiefern meine Resultate für die Pathologie des Stoffwechsels und insbesondere der Gicht von Wichtigkeit sind. Es bleibt ja auch noch abzuwarten, welchen Umfang die von Burian neuentdeckte synthetische Bildung von Purinbasen im Muskel anzunehmen imstande ist.

¹⁾ l. c.