

# Zu den Versuchen von Jones, Partridge und Winternitz über das Fehlen des Guanin zu Xanthin umwandelnden Fermentes in Milz und Leber des Rindes.

Von  
Alfred Schittenhelm.

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

Jones und Partridge<sup>1)</sup> haben den Namen «Guanase» aufgestellt für ein Enzym, welches die Überführung von Guanin in Xanthin zustande bringt. Sie konnten die Anwesenheit dieses Enzyms in der Thymus, der Nebenniere und dem Pankreas feststellen, während es in der Milz fehlen soll. Dagegen findet sich nach ihren Untersuchungen in der Milz ein anderes Enzym, dem sie den Namen «Adenase» geben, weil es Adenin in Hypoxanthin umwandelt: die «Adenase» findet sich außerdem in der Thymus, der Nebenniere und dem Pankreas. Jones und Winternitz<sup>2)</sup> haben die Untersuchungen weitergeführt. Sie haben einerseits das Vorkommen der «Adenase» in der Leber festgestellt, andererseits das Fehlen der «Guanase» für dasselbe Organ und nochmals für die Milz bewiesen. Auf diese Befunde stützt sich ihre Behauptung, daß die «Guanase» und die «Adenase» zwei von einander verschiedene Fermente seien. Sie halten also die Unabhängigkeit der Fermente von einander für erwiesen. Am Schluß ihrer Mitteilung sprechen sie die Ansicht aus, daß ihre Resultate nicht zu der Meinung führen können, daß irgend eines der Fermente in einer der Drüsen völlig fehlte und daß man vielleicht doch durch genügend lange dauernde Digerierungen die Anwesenheit der Guanase in Leber und Milz erweisen könne. Es sei noch erwähnt, daß sie noch weiterhin eine Oxydase annehmen, welche Hypoxanthin in Xanthin umwandelt und welche sich in Leber und Milz, nicht aber im Pankreas vorfindet.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 343. Der Redaktion zugegangen 4. Juli 1904.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 1. Der Redaktion zugegangen 7. Januar 1905.

Jones und seine Mitarbeiter haben, was das Fehlen der «Guanase» in Leber und Milz anbelangt, völlig übersehen, daß von verschiedenen anderen Seiten die Gegenwart derselben für eben diese Organe längst erwiesen ist. Jones und Partridge haben die Untersuchungen von Horbaczewski,<sup>1)</sup> Spitzer,<sup>2)</sup> und Wiener<sup>3)</sup> nicht in den Kreis ihrer Betrachtungen gezogen, wohl deshalb, weil sie annahmen, daß keine weiteren Beziehungen zwischen ihren Untersuchungen und denen der genannten Autoren bestehen; ich werde aber späterhin ausführen, daß die Beziehungen recht enge sind. Jones und Winternitz haben nun aber auch meine Veröffentlichungen<sup>4)</sup> vollkommen unbeachtet gelassen, obwohl sie dieselben Ziele verfolgen und ich, wenigstens was die Umsetzung des Guanins in Milz und Leber anbelangt, zu einem gerade entgegengesetzten Resultate gelangte.

Hätten Jones und seine Mitarbeiter diese Arbeiten, sowie diejenigen der anderen Autoren, gebührend berücksichtigt, so wären sie sicher auf die Tatsache aufmerksam geworden, daß ihre Resultate sich mit den bisherigen Feststellungen nicht vereinen lassen. Spitzer sowohl wie ich konnten feststellen, daß im Milztrakt eine fermentartige Kraft vorhanden ist, welche die Umsetzung von Guanin, sowohl wie von Adenin in Harnsäure auszuführen vermag. Dasselbe haben wir für die Leber bewiesen und auch Burians<sup>5)</sup> und Wieners Untersuchungen stimmen damit überein. Wie aber soll Guanin in Harnsäure umgesetzt werden, wenn die Feststellungen Jones' und seiner Mitarbeiter richtig wären? Auch wir hätten doch dann nicht Harnsäure, sondern Guanin wiederfinden müssen. Da wir aber unzweifelhafte Harnsäure bekamen, so mußte das Guanin entsprechenden Veränderungen unterliegen, wobei Zwischenprodukte

<sup>1)</sup> Monatshefte der Chemie, 1891, Bd. XII, S. 221.

<sup>2)</sup> Arch. f. Physiol., 1899, Bd. LXXVI, S. 192.

<sup>3)</sup> Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak., 1899, Bd. XLII, S. 373.

<sup>4)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 251. Der Redaktion zugegangen 27. Juni 1904.

Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 228. Der Redaktion zugegangen 3. Oktober 1904.

<sup>5)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 497.

gebildet werden, welche aber nur das Xanthin und das 2-Amino-6-8-Dioxyypurin sein konnten. Auf diese Überlegungen habe ich meine Untersuchungen aufgebaut und kam tatsächlich zu dem Resultat, daß die Milz Fermente enthält, welche sowohl Guanin wie Adenin in Xanthin (resp. Hypoxanthin-Xanthin) umsetzen und dieses wiederum zu Harnsäure oxydieren. Das Nähere habe ich bereits in vorstehender Mitteilung rekapituliert.

Wie kommen nun Jones und seine Mitarbeiter zu den abweichenden Resultaten? Beim Vergleich der beiden Versuchsanordnungen fällt in erster Linie auf, daß sie die Körper als salzsaure resp. schwefelsaure Salze zusetzten, ich aber in natronalkalischer Lösung. Dieser Umstand könnte wohl zu Differenzen der Resultate Veranlassung geben. Das Guanin ist bekanntlich unlöslich in Wasser und seine Salze sind ebenfalls als schwerlöslich bekannt. Jones und seine Mitarbeiter aber setzten das Guanin entweder als Hydrochlorat oder aber, indem sie die Säure desselben vorher mit Ammoniak neutralisierten, als freie Base zu dem jeweiligen Organgemisch. Es kommt aber bei dieser Versuchsanordnung derselbe Übelstand zur Geltung, welchen auch Burian<sup>1)</sup> bei der Prüfung des Leberextraktes auf seine harnsäurezerstörende Fähigkeit hervorhebt. Setzt man nämlich die umzusetzende schwerlösliche Substanz (in Burians Fall die Harnsäure, in vorliegendem das Guanin) in ungelöstem Zustande zu, so muß sie erst langsam während der Digestion in Lösung gehen, wobei es nie zur völligen Sättigung kommt. Der Verlauf der Reaktion wird also ein sehr protrahierter und man kann sich wohl vorstellen, daß ein nicht unbeträchtlicher Teil des Guanins, insbesondere wenn dasselbe auf dem Boden des Gefäßes liegend in zugesetztes Chloroform eingeschlossen ist, der Einwirkung der Fermente entgeht, sodaß es später unverändert wieder gefunden wird.<sup>2)</sup> Anders verhält sich die Sache beim Adenin, welches als Sulfat

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 506.

<sup>2)</sup> Organbrei bietet scheinbar bessere Lösungsbedingungen für ungelöst zugegebenes Guanin als Organextrakt; durch diese Annahme ließe sich ungezwungen der Umstand erklären, daß bei Verwendung von Pankreasbrei ein positives Resultat erzielt wurde.

zugegeben wurde. Dieses Salz ist sehr leicht löslich und bietet daher den Fermenten von vornherein günstige Angriffsbedingungen. Damit mag zum Teil wenigstens zusammenhängen, daß Jones und seine Mitarbeiter eine Umwandlung des Adenins durch die Fermente leicht konstatieren konnten, während das Guanin unverändert wiedergewonnen wurde.

Die folgenden Versuche sind zur Klärung dieser Verhältnisse angestellt.

### Versuchsreihe I.

a) 400 ccm Milzextrakt <sup>1)</sup> gehen bei ca. 40° unter ständiger Luftdurchleitung drei Tage lang. (Leerversuch).

Erhalten **0,14 g** Harnsäure.

b) 400 ccm Milzextrakt + 0,35 g Guaninchlorhydrat, welches vorher in wenig Normalnatronlauge gelöst worden war, analog angesetzt.

Erhalten **0,4 g** Harnsäure.

0,1738 g Substanz verbrauchten 41,2 ccm  $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Gefunden: 33,19% N.

Demnach waren **98,8%** des zugesetzten Guaninchlorhydrats als Harnsäure wiedergefunden. Im Filtrat gab eine Silberfällung nur noch minimalen Niederschlag.

c) 400 ccm Milzextrakt + 0,35 g Guaninchlorhydrat, welches vorher in dem gerade zur vollkommenen Lösung nötigen Überschuß Normalsalzsäure gelöst war, analog angesetzt.

Erhalten **0,39 g** Harnsäure.

0,1582 g Substanz verbrauchten 36,9 ccm  $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure

Gefunden: 33,29% N.

Demnach waren **95,1%** des zugesetzten Guaninchlorhydrats als Harnsäure wiedergefunden. Im Filtrat gab eine Silberfällung nur noch minimalen Niederschlag.

d) 400 ccm Milzextrakt + 0,35 g Guaninchlorhydrat, welches vorher in Wasser aufgeschwemmt und mit Ammoniak sorgfältig neutralisiert wurde, analog angesetzt.

---

<sup>1)</sup> Die Extrakte wurden auf die in meinen früheren Arbeiten genauer beschriebene Weise hergestellt. Ich mache auch auf den Umstand aufmerksam, daß meine Milzextrakte mit viel größeren Mengen Wasser im Verhältnis zur angewandten Menge Milzpulpa hergestellt wurden, wie die von Jones und Winternitz.

Erhalten **0,38 g** Harnsäure.

0,15 g Substanz verbrauchten 35,5 ccm  $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure  
Gefunden: 33,13% N.

Im Filtrat wurde mit ammoniakalischer Silberlösung ein Niederschlag erzeugt, dessen Stickstoff 6,7 ccm  $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure entsprach.

Es waren also **91,2%** des zugesetzten Guaninchlorhydrates als Harnsäure wiedergefunden.

e) Derselbe Versuch in derselben Weise angesetzt.

Erhalten **0,37 g** Harnsäure.

0,1194 g Substanz verbrauchten 28,3 ccm  $\frac{1}{10}$ -Normal-HCl  
Gefunden: 33,18% N.

Im Filtrat fanden sich noch Purinbasenreste (Silberfällung), deren Stickstoff 12,5 ccm  $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure entsprach.

Es waren also **87,5%** des zugesetzten Guaninchlorhydrates als Harnsäure wiedergefunden.

f) 300 ccm Milzextrakt + 0,35 g Guaninchlorhydrat, welches in Wasser aufgeschwemmt zugesetzt wurde, analog angesetzt.

Erhalten **0,34 g** Harnsäure

Gefunden: 33,31% N.

Im Filtrat wurde mittels der Silberfällung eine Restbasenmenge erhalten, deren Stickstoffgehalt 15,6 ccm  $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure entsprach.

Es waren also **79,9%** des zugesetzten Guaninchlorhydrats als Harnsäure wiedergefunden.

g) Derselbe Versuch wiederholt.

Erhalten **0,25 g** Harnsäure

Gefunden: 33,38% N.

Es waren demnach **41,8%** des zugesetzten Guaninchlorhydrats als Harnsäure wiedergefunden.

Aus den Versuchen geht klar hervor, daß das gelöst zugegebene Guanin durch Milzextrakt bei Zuleitung von Sauerstoff quantitativ in Harnsäure umgewandelt wird, einerlei ob zur Lösung Natronlauge oder Salzsäure benutzt wurde. Die Wirkung der dabei in Betracht kommenden Fermente wird also durch kleinere Mengen Säure

oder Alkali in ihrer Gesamtheit nicht beeinflußt. Die Umsetzung verläuft aber weniger vollständig, wenn das Guanin in ungelöster Form zugegeben wird, wenn sie auch, wenigstens in dem größeren Teil der Versuche, trotzdem eine ganz ausgiebige war. Man muß dabei jedenfalls als förderndes Agens in Betracht ziehen, daß durch die mechanische Bewegung, welche in der Reaktionsflüssigkeit durch die Luftdurchleitung beständig hervorgerufen wurde, die Lösungsbedingungen wesentlich verbessert werden. Jedenfalls kann es gar keinem Zweifel unterliegen, daß das Guanin, wie es auch zugesetzt werden mag, vom Milzextrakt resp. dessen Fermenten zu Harnsäure umgesetzt wird, und die notwendige Folgerung davon ist, daß derselbe auch eine „Guanase“ enthalten muß und sogar, im Hinblick auf den quantitativen Verlauf der Reaktion, eine sehr wirksame.

Daß in der Milz in der Tat ein Ferment existiert, welches Guanin in Xanthin umwandelt, habe ich schon in meiner früheren Mitteilung durch mannigfache Versuche erwiesen und es gelang mir sogar ohne weiteres, mittels der fraktionierten Sättigung durch Ammonsulfat einen Weg zu finden, auf dem das Ferment, wenn auch nicht in reinem Zustand, so doch in einer relativ einfach zusammengesetzten wässerigen Lösung in wirksamer Form isoliert werden kann. Obwohl eigentlich aus den vorstehenden Versuchen über die Harnsäurebildung schon sicher hervorgeht, daß auch bei der Versuchsanordnung von Jones und seinen Mitarbeitern, also bei Zugabe des Guanins in Form des Hydrochlorates, eine Umsetzung in Xanthin erfolgen muß, so habe ich doch, um jeden Zweifel zu beheben, den folgenden Versuch angesetzt. Ich stelle demselben einen weiteren Versuch gegenüber, in welchem das Guanin nach meiner Art in natronalkalischer Lösung zugegeben wurde, damit man sieht, ob und wie sehr der quantitative Verlauf abhängig ist von der Form, in der das Guanin zugegeben wird.

#### Versuchsreihe II.

a) 400 g Milzextrakt wurden mit **0,45 g** in Wasser aufgeschwemmten Guaninchlorhydrats, dessen Säure vor dem

Zusetzen mit Ammoniak neutralisiert wurde, unter Chloroformzusatz neun Tage lang im Thermostaten bei 37° C. der Autodigestion überlassen.

Am 9. Tag wurde die ganze Menge nach Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure, so daß die Konzentration etwa 2½% betrug, 3 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht, hernach mit Natronlauge neutralisiert, siedend mit Essigsäure angesäuert und sofort vom ausgefallenen Eiweiß abfiltriert. Der Eiweißniederschlag wurde noch zweimal in Wasser suspendiert, mit NaOH gelöst und mit Essigsäure gefällt. Aus den vereinigten Filtraten wurden mit der Kupfersulfatbisulfitmethode die Basen gefällt. Die Kupferoxydulverbindungen wurden mit H<sub>2</sub>S zerlegt und das Filtrat zur Trockene eingedampft. Der Trockenrückstand wurde mit verdünntem Ammoniak aufgeköcht und kurze Zeit bei 60—70° digeriert. Nach 24stündigem Stehen im Eisschrank fiel ein geringer flockiger Niederschlag aus, welcher aber keine Purinbasen enthielt.

Es war also kein Guanin mehr vorhanden.

Vom ammoniakalischen Filtrat wurde das Ammoniak abgedunstet und darauf die Lösung auf 5—10 ccm eingengt. Dabei kam Xanthin in typischen Krusten heraus.

Nach einigen Stunden wurde abfiltriert (Filtrat A) und das gewonnene Präparat auf bekannte Art ins Nitrat verwandelt. Es wurden

### 0,33 g Xanthinnitrat

gewonnen. Die Substanz zeigte vorzüglich ausgebildete typische Kristallform (Filtrat B). Zur Analyse wurde es ins freie Xanthin verwandelt und mit wenig Tierkohle gereinigt.

0,1022 g Substanz verbrauchten 26,8 ccm 1/10-Normalsalzsäure

Gefunden: 36,71% N

Verlaugt: 36,84% > .

Filtrat A und B werden vereinigt, neutralisiert und mit ammoniakalischer Silberlösung versetzt. Die Silberverbindungen der Basen werden in Wasser suspendiert, mit HCl in der Wärme zerlegt und das Filtrat des Chlorsilbers zur Trockene eingedampft. Nach Entfernung der überschüssigen Salzsäure durch Abdampfen mit Alkohol wurde der Rückstand in wenig

verdünntem Ammoniak gelöst und 24 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Dabei kam es zu keiner Ausfällung.

Also wiederum kein Guanin.

Die Flüssigkeit wurde nunmehr auf 5—10 ccm, nach Vertreiben des Ammoniaks, eingeengt. Nach mehrlägigem Stehen hatten sich noch **0,06 g** einer Substanz ausgeschieden, welche sich leicht in Ammoniak löste. Dieselbe wurde durch die Xanthinproben und durch das charakteristische salpetersaure Salz als Xanthin identifiziert.

Im Filtrat dieses Xanthinrestes war mit ammoniakalischer Silberlösung keine Fällung mehr zu erzeugen.

Es waren also an Stelle der 0,45 g Guaninchlorhydrat **0,293 g** Xanthin gefunden worden. Bemerkenswerterweise war von dem zugegebenen Guanin auch nicht die Spur mehr wiedergefunden worden.

b) 400 ccm Milzextrakt wurden mit **0,4 g** in ca. **6 ccm** Normalnatronlauge gelösten Guanins versetzt und unter Chloroformzusatz 9 Tage lang bei  $37^{\circ}$  C. im Thermostaten gehalten.

Am 9. Tag wurde ebenso verfahren, wie bei Versuch a. Auch hier fand sich kein Guanin wieder.

Dagegen konnten

### **0,58 Xanthinnitrat**

isoliert werden, welches typische Kristallform zeigte. Es wurde zur Analyse ins freie Xanthin verwandelt und bei  $140^{\circ}$  getrocknet.

0,114 g Substanz verbrauchten 29,7 ccm  $\frac{1}{10}$ -Normalsalzsäure  
Gefunden: 36,48% N.

Aus den Filtraten wurde nochmals **0,07 g** Xanthin isoliert, welches bei Umwandlung ins Nitrat typische Kristallform zeigte.

Es blieb im Restfiltrat nur noch eine ganz geringe Basenmenge, welche die weitere Verarbeitung nicht lohnte.

Es waren also im ganzen **0,48 g** Xanthin wiedergewonnen worden.

Ich fand also in beiden Versuchen, einerlei ob ich das Guanin als Aufschwemmung seines Hydrochlorates oder als natronalkalische Lösung zugab, kein Guanin wieder, an Stelle desselben aber Xanthin. Das Resultat stimmt sehr gut zusammen mit den Ergebnissen der

Versuchsreihe I. Daß Jones und seine Mitarbeiter zu einem entgegengesetzten Resultat kamen, muß also unbedingt an ihrer Versuchsanordnung oder an der Isolierung der Substanzen gelegen haben. Ein guter Teil ihres Mißerfolgs mag jedenfalls in der Zugabe ungelöster Ausgangsmaterialien seine Ursache haben, besonders in den Versuchen, deren Dauer weniger als 9 Tage betrug.

Aus meinen Versuchen geht also klar hervor, daß die vermeintliche Beobachtung von Jones und seinen Mitarbeitern von dem Fehlen der «Guanase» in der Milz eine irrtümliche ist. Nachdem Burian und ich zeigen konnten, daß die Leber aus Purinbasen Harnsäure zu bilden vermag, und nachdem ich in der vorstehenden Mitteilung den experimentellen Beweis erbrachte, daß die Leber ebenso wie alle anderen bisher untersuchten Organe imstande ist, das Guanin in Xanthin umzuwandeln, bedarf es keiner weiteren Versuche mehr, um zu zeigen, daß Jones und seine Mitarbeiter auch bei diesem Organ mit ihrer Behauptung des Fehlens der «Guanase» einen Irrtum begingen. Es ist klar, daß die Ursache ihrer negativen Befunde ganz dieselbe ist, wie bei den Milzversuchen.

Der Umstand, daß in allen den Organen, in welchen eine Harnsäurebildung konstatiert werden konnte, sowohl Guanin wie Adenin in Harnsäure umgesetzt werden, bestätigt meine schon früher aufgestellte Behauptung von der Gleichartigkeit des Fermentes, welches auf die beiden Körper einwirkt: dieselbe wird noch mehr gestützt dadurch, daß auch das isolierte Ferment ohne weiteres beide Körper quantitativ umzuwandeln vermag. Es bedarf also eines hydrolytischen (desamidierenden) Fermentes und einer Oxydase zur Umwandlung der Aminopurine in Harnsäure. Nachdem meine Annahme somit eine feste experimentelle Grundlage erfahren hat, ist nach meiner Ansicht absolut sicher gestellt, daß es einer Einzelbenennung des Fermentes als «Guanase» und «Adenase», wie es Jones und seine Mitarbeiter wollen, nicht bedarf.

<sup>1)</sup> Siehe hierzu auch meine Ausführungen in der vorhergehenden Arbeit S. 149.