

Über die Verteilung der Fermente des Nucleinstoffwechsels.

Von

Walter Jones und C. R. Austrian.

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

(Der Redaktion zugegangen am 25. April 1906.)

Im Jahre 1878 wies Salomon¹⁾ in Muskeln, Pankreas und Leber ein Ferment nach, das Xanthinbasen in Freiheit setzen konnte, und meinte, daß die so gebildeten Basen durch die hydrolytische Wirkung eines Fermentes auf die in den Geweben vorhandenen Nucleinstoffe entstünden. Zwölf Jahre später zeigten E. Salkowski und seine Schüler, daß dieses Ferment in filtrierten, zellfreien, wässerigen Extrakten von Drüsen und Hefe²⁾ vorkam, daß die Wirkung des Ferments durch die Gegenwart von Alkalien verlangsamt wurde und daß das Ferment nicht Trypsin sein konnte, da Trypsin keine ähnliche Wirkung auf Nucleoproteide³⁾ hatte. Vor kurzem fand ferner Iwanoff,⁴⁾ daß mehrere Schimmelpilze (*Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum*) ein Ferment enthalten, das Thymusnucleinsäure rasch hydrolytisch spaltet, wobei Xanthinbasen und Phosphorsäure entstehen; das Ferment konnte nicht Trypsin sein, da es Gelatine nicht verflüssigte. Während also seine Vorgänger klar bewiesen hatten, daß die Xanthinbasen in den Drüsen durch besondere fermentative Wirkung entstünden, fügte Iwanoff der Kette der Beweise das wichtige Glied hinzu, daß die so entstandenen Xanthinbasen der Zersetzung der Nucleinsäure ihren Ursprung verdankten. Er nannte das Ferment daher äußerst folgerichtig «Nuclease».

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. II, S. 65.

²⁾ Schwiening, Virchows Archiv, Bd. CXXXVI, S. 444.

³⁾ Biondi, Virchows Archiv, Bd. CXLIV, S. 373.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 31.

Wenige Monate später entdeckte Jones,¹⁾ daß das Nucleoprotein der Thymusdrüse, von allen anderen Bestandteilen der Drüse befreit, enzymhaltig ist und bei Körpertemperatur unter Bildung von Xanthinbasen und Phosphorsäure sich zersetzt. Es wurde sodann gezeigt, daß diejenige Alkaleszenz, die das Optimum der Trypsinwirkung bildete, sehr schnell das in Frage stehende Ferment zerstörte. In darauffolgenden Mitteilungen zeigten Jones,²⁾ Partridge³⁾ und Winternitz⁴⁾ das Vorkommen der Nuclease in Milz, Nebennieren, Pankreas und Leber an und fanden, vorausgesetzt, daß kein Ferment vorhanden war, das sekundär auf die zunächst gebildeten Xanthinbasen weiter einwirkte (Bedingungen, wie sie bei der Bildung von Guanin während der Selbstverdauung von Schweineleber und -milz gegeben sind), daß die durch Nucleasewirkung entstandenen Xanthinbasen dieselben sind wie die, die durch die Wirkung siedender Mineralsäuren entstehen. Es scheint daher höchst wahrscheinlich, daß Nuclease und siedende Säuren die Nucleine an denselben Stellen angreifen.

Nach den bisher veröffentlichten Tatsachen und nach der großen Menge Originalmaterials, das in unserem Besitze ist, dürfte es scheinen, daß die Nuclease ganz allgemein in den Drüsen der Säugetiere ohne Rücksicht auf die Art verbreitet ist.

Gewöhnlich sind indessen die Xanthinbasen, die aus den Nucleoproteiden durch Nucleasewirkung entstehen, nicht die gleichen, die man in wässrigen Drüsenextrakten findet, die der Selbstverdauung überlassen worden sind, weil in den Drüsen andere Fermente vorkommen, die die zuerst gebildeten Basen weiter umwandeln. So wurden die Aminopurine (Guanin und Adenin) in die entsprechenden Oxypurine (Xanthin und Hypoxanthin) durch wässrige Extrakte von Kalbsthymus,⁵⁾ durch Nebennierenextrakte vom Schaf und Rind⁶⁾ und durch Pankreas-

¹⁾ Proc. of the Amer. Physiol. Soc., 1903.

Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 101.

²⁾ Jones, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 35.

³⁾ Jones und Partridge, Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 343.

⁴⁾ Jones und Winternitz, Diese Zeitschrift, Bd. XLIV, S. 1.

⁵⁾ Jones, loc. cit. Bd. XLI.

⁶⁾ Jones, loc. cit. Bd. XLII.

extrakte¹⁾ vom Schwein und Rind²⁾ verwandelt. Soweit es nur diese Beobachtungen allein anlangt, ist es nicht notwendig, sich eine bestimmte Meinung darüber zu bilden, ob diese Fermente, die die Umwandlung der beiden Aminopurine bewirken, zwei voneinander verschiedene sind oder nicht. Eine solche Notwendigkeit ergab sich erst, als Jones und Winternitz entdeckten, daß bei der Selbstverdauung von Schweinemilz und -leber das zuerst entstandene Adenin in Hypoxanthin verwandelt wurde, während die entsprechende Umwandlung des Guanins in Xanthin ausblieb. Diese zwei Beobachtungen schienen klar und deutlich den von Jones und Winternitz gezogenen Schluß zu beweisen, daß hier zwei verschiedene Fermente in Betracht kommen, die von ihnen «Guanase» und «Adenase» genannt wurden. Es ist uns vollkommen klar, wie jemand, der die auf die Schweinemilz und -leber sich beziehenden Befunde nicht glauben wollte, den Beweis bezweifeln konnte, daß die zwei Fermente voneinander verschieden wären; aber wie einer nur auf der Grundlage eines solchen Zweifels sogar die Identität der beiden Fermente aussprechen konnte, das ist ein Vorgehen, das sich nicht so leicht verstehen läßt.

Man muß im Auge behalten, daß die Schlüsse von Jones und Winternitz ursprünglich nicht aus einer Untersuchung gezogen waren, die sich auf die Wirkung von Schweineleber und -milz auf hinzugesetztes Guanin bezog, sondern aus einer solchen, in der die Produkte der Selbstverdauung dieser Drüsen näher erforscht waren, eine Versuchsbedingung, unter der die Guanase, wenn vorhanden, nur ein Minimum von Arbeit zu leisten hat und deshalb ihre größtmögliche Wirksamkeit entfalten kann. Andererseits war das reichliche Vorhandensein von Adenase in den Drüsen durch ihr Vermögen bewiesen, relativ große Mengen von hinzugefügtem Adenin umzubilden. Da sie aber sehr wohl die Unmöglichkeit einsahen, das vollkommene Fehlen eines Fermentes streng zu beweisen, und da sie ihre allgemeinen Schlußfolgerungen so verstanden zu

¹⁾ Jones und Partridge, loc. cit.

²⁾ In einigen Fällen war die Tierart an den zitierten Stellen nicht namhaft gemacht.

sehen wünschten, daß sie nicht im mindesten von dem vollkommenen Fehlen eines der Fermente in den fraglichen Fällen abhängig waren, so schlossen Jones und Winternitz ihre Arbeit folgendermaßen:

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 Levene bei der Drüsenautodigestion erhaltenen Resultaten erklären, in welchen die Digestion mehrere Wochen fortgesetzt wurde.

Freilich stellte Jones später fest, daß Schweinemilz nicht die leiseste Spur von Guanase enthält (und wir werden diese Feststellung in dieser Arbeit bekräftigen), trotzdem wird man bei einer Betrachtung des zitierten Passus erkennen, daß es nicht die Absicht war, als sollte die strenge Formulierung der Tatsachen irgend etwas dem Befunde hinzufügen, daß Guanase und Adenase zwei verschiedene Fermente seien.

Man muß bedauern, daß Jones und Winternitz (denen die Ähnlichkeit der Fermentverteilung im Pankreas des Rindes und des Schweines und in den Nebennieren des Rindes und des Schafes vorschwebte) es nicht für wichtig genug hielten, die Tierspezies zu nennen, mit deren Milz und Leber sie ihre Resultate erhielten — ein Versäumnis, das sich in einer ungünstigen Kritik einiger ihrer Versuchsergebnisse gerächt hat.¹⁾ Die Berücksichtigung der Tierspezies ist aber von fundamentaler

¹⁾ Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 152.

Bedeutung, da Jones¹⁾ in einer neuerlichen Mitteilung gezeigt hat, daß Guanase (ebenso wie Xanthinoxydase) reichlich in der Rindermilz vorkommt, aber in der Schweinemilz nicht nachweisbar ist. Diese Beobachtung ist auch nach Schittenhelm²⁾ jetzt nicht ganz unbegründet, da er zugibt, daß Schweinemilz viel rascher und vollständiger das Adenin als das Guanin umwandelt. Er behauptet indessen, daß Schweinemilz eine geringe Menge guaninzerstörender Wirkung habe, weil bei der Selbstverdauung der Drüse Guanin durch Xanthin ersetzt wird. Nimmt man dies als richtig an, so würde man zu dem merkwürdigen Schluß geführt, daß Jones' ursprüngliche Entdeckung von Guanin unter den Produkten der Selbstverdauung der Schweinemilz ein Irrtum gewesen wäre, ein Irrtum, der uns indessen auf sonderbare Pfade der Wahrheit geführt hat. Wir erlauben uns anderer Meinung zu sein.

Schittenhelm gibt zu, daß die Jones'sche Beobachtung von der Verschiedenheit der Fermente der beiden Milzen richtig ist, aber er kann in dieser Entdeckung nichts besonders Bemerkenswertes finden, da er selbst früher gefunden hatte, daß die Xanthooxydase reichlich in Rindermilz vorhanden ist, der Hundemilz aber fehlt. Nun gründen sich aber diese Folgerungen auf eine einzige Untersuchung, die mit einer Hundemilz angestellt wurde, welche unter einem Konservierungsmittel über anderthalb Jahre gestanden hatte,³⁾ und unsere Absicht ist, zu zeigen, daß frische Hundemilz sowohl Xanthooxydase enthält als auch keinen leicht beobachtbaren Unterschied in bezug auf die in Frage kommenden Fermente gegenüber der Rindermilz zeigt.

Nachdem Schittenhelm ferner die Ansicht zurückgewiesen hat, daß das merkwürdige Verhalten der Schweineleber und Milz nur erklärt werden könnte, indem man die Existenz zweier unabhängiger Amidasen annimmt, gibt er dafür folgende, seiner Ansicht nach richtige Erklärung: Es gibt nur ein Ferment, aber Adenin ist gegen seine Wirkung empfindlicher wie Guanin.

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

2) Schittenhelm, Bd. XLVI, S. 354.

3) Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 355.

Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 151.

Wir werden dagegen zeigen, daß in der Hundeleber die Verhältnisse gerade umgekehrt liegen. Hier wird regelmäßig ein verhältnismäßig großer Betrag hinzugesetzten Guanins unter den verschiedensten Bedingungen und mit erstaunlicher Leichtigkeit in Xanthin verwandelt, während die analoge Umwandlung von Adenin in Hypoxanthin nur durch lange fortgesetzte Selbstverdauung der Drüse, und dann nicht einmal regelmäßig erreicht werden kann. Werden diese Tatsachen zusammen mit der jüngsten Entdeckung Jones' ¹⁾ erwogen, daß in der Schweinemilz keine Bedingungen vorhanden, die die Wirkung der Guanase merklich verzögern können, wenn dies Ferment aus einer anderen Drüse hinzugefügt wird, so wird man gezwungen, Guanase und Adenase als zwei unabhängige Fermente anzusehen, oder wir müßten leugnen, daß überhaupt jemals zwei Fermente als von einander verschieden nachgewiesen wären.

Spitzer ²⁾ und Wiener ³⁾ haben in den Geweben, besonders in der Milz und der Leber des Rindes, die Gegenwart eines Fermentes nachgewiesen, das Xanthin oder Hypoxanthin in Harnsäure überführen kann, vorausgesetzt, daß genügende Mengen von Luft ⁴⁾ zugegen sind. Spitzer fand ferner eine teilweise Umwandlung von Guanin und Adenin in Harnsäure durch Rindermilz und Leber, und Schittenhelm ⁵⁾ zeigte, daß diese Umwandlung quantitativ erfolgte. Dieses Spitzersche Oxydationsferment ist kürzlich von Burian ⁶⁾ einer genauen Untersuchung unterworfen worden und «Xanthooxydase» genannt worden.

Wir haben nun eine ausgedehnte Untersuchung unternommen über die Verteilung der Fermente «Guanase», «Adenase» und «Xanthooxydase» in den Organen verschiedener Säugetiere und haben gefunden, daß zwar jede bisher untersuchte Säugetierart alle drei Fermente enthält, daß aber die Verteilung

¹⁾ Jones, *lpc. cit.* Bd. XLIV.

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

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

⁴⁾ Siehe Horbaczewski, *Monatshefte für Chemie*, 1891, Bd. XII, S. 221.

⁵⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 251.

⁶⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLIII, S. 494.

in den Organen verschieden und für jede Art charakteristisch ist. Wir werden in der vorliegenden Arbeit die Organe des Schweines, des Hundes und des Kaninchens vergleichend untersuchen und wir werden sehen, daß somit die chemische Funktion in Betracht kommt, die anatomische Struktur in viel geringerem Maße ein bestimmter Faktor ist wie die Tiergattung. So sind z. B. die histologischen Kennzeichen der Leber vom Hunde, Schwein, Kaninchen und Rind im wesentlichen gleiche, aber jede dieser 4 Lebern hat ihre besondere charakteristische Verteilung der Fermente. Andererseits sind die anatomischen Charaktere von Hundepankreas und Schweinemilz äußerst verschieden, aber diese zwei Drüsen haben dieselbe Verteilung der Fermente.

Die Organe des Schweines.

Die Milz.

In seinen früheren Untersuchungen hatte Jones unter den Produkten der Selbstverdauung dieses Organes Guanin und Hypoxanthin gefunden, aber weder Xanthin noch Adenin. In einer späteren Reihe von Forschungen teilten Jones und Winternitz eine teilweise Oxydation von Hypoxanthin zu Xanthin mit, wenn die Verdauung über eine lange Zeit fortgesetzt wurde; sie konnten jedoch hinzugefügtes Guanin wieder finden und wiesen nach, daß das Auftreten von Xanthin regelmäßig von einer Verminderung von Hypoxanthin begleitet war und deshalb garnicht mit der Veränderung des Guanins zusammenhing. Trotz einer großen Anzahl von Versuchen mit Extrakten dieser Drüse hat Jones aber nicht die Gegenwart einer Oxydase nachweisen können, sodaß die Existenz eines solchen Fermentes als normaler Bestandteil der Schweinemilz verneint werden muß. Nur in einem einzigen Falle konnte es in Spuren nachgewiesen werden, während sein Fehlen in Dutzenden von Versuchen beobachtet wurde. Von den in Frage kommenden Fermenten enthält die Schweinemilz normalerweise nur Adenase. Natürlicherweise ist es möglich, daß Individuen derselben Art kleine Unterschiede im Vorkommen von Fermenten in ihren Organen zeigen, dafür sprechen verschiedene Resultate, die wir erst kürzlich beobachtet haben. Dies würde das einmalige Vorkommen einer

Spur von Oxydase, wie oben erwähnt, genügend erklären, ebenso wie gewisse Unregelmäßigkeiten, denen wir gelegentlich der Untersuchung von Hundeleber begegnen werden.

In seiner letzten Mitteilung gibt Schittenhelm zu, daß Schweinemilz eine Ausnahmestellung unter den Drüsen einnimmt wegen der relativen Leichtigkeit, mit der hier Amidopurine in Oxyपुरine übergehen. Er räumt ein, daß die Umwandlung von Adenin mit großer Leichtigkeit vor sich geht, während Guanin nur sehr schwierig angegriffen wird, behauptet aber, daß trotzdem eine langsame, fermentative Umwandlung des Guanins statthat, da man bei der Selbstverdauung Xanthin, aber kein Guanin findet. Wir würden mit großem Vergnügen dem beitreten (besonders da diese Frage nichts mit unseren allgemeinen Schlüssen zu tun hat) und so die Diskussion beenden, aber zu unserem Bedauern können wir unmöglich solch ein Zugeständnis machen. Es waren in unserem Laboratorium eine Reihe der verschiedensten Organe der Selbstverdauung unterworfen und auf die dabei gebildeten Amidopurine untersucht worden und es war gleichmäßig das Fehlen von Guanin und Adenin gefunden worden, während Xanthin und Hypoxanthin nachgewiesen werden konnten. Als dann auch die Schweinemilz untersucht wurde, fand sich zu unserer großen Überraschung Guanin unter den Reaktionsprodukten. In der Vermutung, daß in die früheren Untersuchungen sich vielleicht ein Fehler eingeschlichen habe, wurden die anderen Organe noch einmal bearbeitet mit besonderer Rücksicht auf das Vorkommen von Guanin, doch konnte dieser Körper nicht gefunden werden, trotzdem Methoden angewandt wurden, die sicherlich seine Gegenwart angezeigt haben würden. Dann wurde die Untersuchung der Schweinemilz wieder aufgenommen und es fand sich wiederum Guanin wie früher. Das Guanin wurde in das salzsaure Salz verwandelt, das charakteristische, makroskopische Nadeln bildet, dieses in die freie Base übergeführt und deren Analysen mitgeteilt. Da die Resultate in Zweifel¹⁾ gezogen waren, so wurden die Untersuchungen des Organes noch einmal wiederholt, aber obwohl die Digestionen unter den ver-

¹⁾ Schittenhelm, Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 152.

schiedensten Bedingungen ausgeführt wurden und kein Mittel unversucht gelassen wurde, die Guanase zu aktivieren, so fehlte doch niemals das Guanin unter den Reaktionsprodukten. ¹⁾ Jones und Winternitz stellten diese Tatsache, daß Guanin während der Selbstverdauung von Schweinemilz nicht angegriffen wird, fest, als sie es fast für sicher hielten, daß sie sich später oder früher gegen die ausgezeichneten und allgemein anerkannten Versuche von Horbaczewski, Spitzer und Wiener wenden müßten. Da das jetzt aber durchaus nicht nötig ist, sind wir nicht geneigt, irgend einen Abstrich an den Schlüssen von Jones und Winternitz zu machen. Unsere Stellung in dieser Frage wird durch die folgenden Versuche vollkommen klargelegt werden.

Vor etwa einem Jahre wurden mehrere fein zerkleinerte Schweinemilzen mit dem 5fachen ihres Gewichtes an Wasser und der nötigen Menge Chloroform in ein verschließbares Gefäß gebracht und bei Zimmertemperatur unter öfterem Umschütteln 18 Stunden stehen gelassen. Dann wurde die Flüssigkeit abgegossen und 4 Liter davon mit mehr Chloroform bei Körpertemperatur im Thermostaten neun Monate lang in gut verschlossenen Flaschen sich selbst überlassen. Die Masse wurde darauf zum Sieden gebracht, tropfenweise mit Essigsäure versetzt, bis sich ein schwerer flockiger Niederschlag gebildet hatte, die klare Flüssigkeit heiß abfiltriert und der Rückstand mit heißem Wasser behandelt, das, mit dem ersten Filtrat vereinigt, auf dem Wasserbade bis auf ungefähr 400 ccm abgedampft wurde. Da eine kleine Probe der Flüssigkeit mit wenig Salzsäure keinen Niederschlag gab, konnte keine irgendwie beträchtliche Menge unzersetzter Nucleinsäure mehr vorhanden sein. Die ganze Masse wurde darauf mit 8 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt, auf die Hälfte eingengt und 30 Minuten lang gekocht, dann nach dem Erkalten stark verdünnt, kräftig alkalisch mit Ammoniak gemacht und es wurden die Xanthinbasen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung vollkommen ausgefällt. Der Silberniederschlag, gut ausgewaschen, wurde mit Salzsäure zersetzt und das saure Filtrat vom Chlorsilber auf dem Wasserbad zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde noch einmal

¹⁾ Jones, loc. cit. Bd. XLIV.

mit Wasser, zum Schluß, um die letzten Reste freier Salzsäure zu entfernen, mit Alkohol abgedampft.¹⁾ Das nunmehr Verbleibende löste sich bei 40° fast augenblicklich vollkommen in Wasser bis auf eine geringe Spur flockiger Substanz, die zu wenig für eine Identifizierung war, aber nicht die empfindliche Farbenreaktion des Xanthins mit Salpetersäure und Natronlauge gab. Nach Neutralisation mit Ammoniak wurde zur Flüssigkeit noch weiter soviel davon zugegeben, daß sie im ganzen 2¹/₂% Ammoniak enthielt. Der dabei entstehende reichliche Niederschlag (der kein Xanthin enthalten konnte) wurde abgetrennt, mit 2¹/₂% Ammoniak gewaschen, in eine Flasche gebracht und 18 Stunden lang mit 2¹/₂% Ammoniak bei 40° digeriert. Das Ungelöste, das nun nur noch Spuren von anderen Nucleinbasen außer Guanin enthalten konnte, wurde abfiltriert, mit 2¹/₂% Ammoniak ausgewaschen und mit heißer 2¹/₂%iger Natronlauge digeriert. Die Lösung wurde von geringen Mengen Phosphaten durch Filtration befreit und dann aus ihr das Guanin durch Zusatz von Essigsäure niedergeschlagen. Der Niederschlag wurde in heißer 5%iger Salzsäure gelöst, die beim Erkalten charakteristische, makroskopische Nadeln von salzsaurem Guanin absetzte. Auf Filtrierpapier an der Luft getrocknet, wog die Ausbeute 0,450 g, nach dem Umkrystallisieren aus heißer 2%iger Salzsäure unter Zusatz von wenig Tierkohle 0,410 g. Diese vollkommen weißen Krystalle wurden in die freie Base übergeführt, die analysiert wurde.

0,1352 g verbrauchten 8,04 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,007768 g N)
 0,1049 » » 6,21 » » »

Berechnet:

N = 46,36%

Gefunden:

46,19 und 45,99%

Die Flüssigkeit, aus der das Guanin mit Ammoniak ausgefällt war, wurde wieder mit ammoniakalischer Silbernitratlösung behandelt und der Silberniederschlag, wie oben beschrieben, weiter behandelt. Der endliche Rückstand löste sich wiederum spielend in Wasser von 40° und ließ nur eine Spur flockiger Substanz zurück, die zu gering zur Identifizierung war. Da dieser Rückstand jedesmal wieder auftrat, so oft die Operation

¹⁾ Krüger und Salomon, Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 350.

wiederholt wurde, so ist es möglicherweise eine Silberverbindung oder eine Substanz, die von den benutzten Glasgefäßen herrührt. Es ist nur eine Spur und jedenfalls kein Xanthin. Eine kleine Menge der Flüssigkeit, die nur Adenin und Hypoxanthin enthalten konnte, wurde mit Pikrinsäure versetzt, es entstand aber nicht einmal eine Trübung, so daß das Fehlen von Adenin bewiesen war; und es wurde nun das Hypoxanthin in wohlbekannter Weise als Nitrat isoliert, das unter dem Mikroskop vollkommen gleichmäßig in Wetzsteinform erschien.

Die erhaltenen 0,510 g Hypoxanthinnitrat wurden in die freie Base verwandelt und analysiert.

0,0975 g erfordern 5,13 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,007768 g N)

Berechnet:	Gefunden:
N = 41,17%	40,87%

Man kann also nach 9 monatlicher Selbstverdauung von Schweinemilz Guanin finden, während Xanthin fehlt.

Die Leber.

Jones und Winternitz haben bewiesen, daß bei der Selbstverdauung dieses Organes Guanin hinterbleibt, während hinzugefügtes Adenin rasch in Hypoxanthin verwandelt wird, das seinerseits durch eine reichlich vorhandene Oxydase weiter zu Xanthin oxydiert wird. Schittenhelm¹⁾ wiederholt diese Untersuchung und obwohl ihm diese Resultate nicht ganz genügten, schloß er, daß hinzugefügtes Guanin größtenteils unverändert wieder erhalten werden kann. Wir sind nun in der Lage gewesen, die Resultate von Jones und Winternitz zu bestätigen, und können weiter hinzusetzen, daß bei genügendem Zutritt von Luft während der Digestion Xanthin weiter zu Harnsäure oxydiert wird. Schweineleber enthält Adenase und Xanthooxydase, aber keine Guanase und unterscheidet sich von der Milz nur durch das Vorhandensein des Oxydationsfermentes.

Es wird nicht nötig sein, hier die Methode genau zu beschreiben, nach der das Guanin aus der Zersetzungsflüssig-

¹⁾ loc. cit. Bd. XLVI.

keit gewonnen wurde, da sie sich nicht wesentlich von der oben bei der Milz angewandten unterscheidet. Die Digestion wurde ohne Luftzutritt 6 Wochen bei 40° fortgesetzt und das endlich als salzsaures Salz erhaltene Guanin in die freie Base verwandelt und analysiert.

0,1280 g erfordern 7,6 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,007768 g N)

Berechnet:	Gefunden:
N = 46,36%	46,12%

Die Xanthinfraktion wurde nach Horbaczewski's Methode¹⁾ auf Harnsäure mit negativem Resultat untersucht und das erhaltene Xanthin über das Nitrat gereinigt und als freie Base analysiert:

0,1731 g erfordern 8,2 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,007768 g N)

Berechnet:	Gefunden:
N = 36,84%	36,81%

Die Ausbeute von Xanthin und Guanin unterscheidet sich nicht wesentlich von der von Jones und Winternitz angegebenen. Hypoxanthin und Adenin fehlten.

In einem zweiten Versuch wurden 2 l wässrigen Extraktes von Schweineleber (1 : 5) 6 Tage bei 40° gehalten und während der Hälfte der Zeit ein Luftstrom durch die Flüssigkeit geleitet, der vorher eine Waschflasche mit Chloroform durchstrich. Nach der oben beschriebenen Methode behandelt, wurde zum Schluß eine Xanthinfraktion von 0,550 g erhalten. Diese wurde in 10 ccm warmer konzentrierter Schwefelsäure gelöst und mit 40 ccm Wasser verdünnt. Beim Abkühlen erschienen charakteristische Krystalle von Harnsäure, die nach 2 stündigem Stehen abfiltriert, mit verdünnter Schwefelsäure, Alkohol und Äther gewaschen wurden. So wurden 0,260 g erhalten, die die für Harnsäure typische Murexidprobe gaben, umkrystallisiert wurden und folgenden Analysenwert gaben:

0,1001 g erfordern 4,3 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,007768 g N)

Berechnet:	Gefunden:
N = 33,33%	33,36%

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 341.

Das Pankreas.

Über dieses Organ haben Jones und Partridge eine besondere Mitteilung gemacht, in der sie schrieben, daß durch die Selbstverdauung wässriger Extrakte Xanthin und Hypoxanthin entstehen, aber weder Guanin noch Adenin, und daß zugesetztes Guanin langsam in Xanthin verwandelt wird. Vergleicht man die Mengen Xanthin und Hypoxanthin, die bei der Selbstverdauung des Organes erhalten werden, mit dem Quantum Guanin und Adenin, das bei der Hydrolyse des Nucleoproteids mit siedenden Säuren entsteht, so ergibt sich daraus die Abwesenheit eines oxydierenden Fermentes, das beträchtliche Mengen von Hypoxanthin in Xanthin bei der Selbstverdauung hätte verwandeln können. Die in der erwähnten Abhandlung beschriebenen Resultate hatten sie mit Organen vom Schwein erhalten, die in gleicher Weise mit Organen vom Rinde gewonnenen Resultate hatten sie nicht der Mühe für wert gehalten zu veröffentlichen. Nun hat aber in der Folge Schenck¹⁾ Guanin, aber kein Xanthin unter den Produkten der Selbstverdauung von Rinds- und Schweinepankreas gefunden und wir entnehmen aus seiner Beschreibung, daß er die Drüsen beider Tierarten vor der Digestion vereinigte. Kurz nach der Schenckschen Veröffentlichung hat W. W. Duke in diesem Laboratorium eine Reihe von Versuchen ausgeführt, um zu finden, ob durch Mischung der beiden Drüsen eine Wirkung der Guanase verhindert werden könnte. Aber seine Resultate waren ganz eindeutig, einerlei, in welchem Verhältnis er die beiden Drüsen vereinigte: in kürzere Zeit dauernden Versuchen (2—3 Tage) fand sich eine kleine Menge Guanin neben viel Xanthin, wurde die Digestion aber 8—12 Tage fortgesetzt, so verschwand das Guanin vollkommen und das Xanthin war dementsprechend vermehrt.

Unsere Versuche, Harnsäure bei der Selbstverdauung dieses Organes unter Luftdurchleitung zu gewinnen, sind erfolglos geblieben. Schweinepankreas enthält also Guanase und Adenase, aber keine Xanthooxydase. Es unterscheidet

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

sich von der Milz durch die Gegenwart der Guanase und von der Leber sowohl durch das Vorkommen der Guanase als auch das Fehlen der Xanthooxydase.

Die Versuchung liegt natürlich nahe, über die Guanin-
gicht der Schweine Hypothesen aufzustellen auf Grund des Fehlens der Guanase in Milz und Leber, wir haben aber davon Abstand genommen, weil Guanase im Pankreas vorkommt. Der Schweineorganismus enthält dieselben Fermente wie die anderen Organismen, nur ihre Verteilung in den einzelnen Organen ist anders.

Die Organe des Hundes.

Die Milz.

Mit diesem Organe wurde bisher nur ein Versuch angestellt. Schittenhelm hat gefunden, daß beide Amidopurine in Oxypurine verwandelt waren, konnte aber keine Oxydation von Xanthin zu Harnsäure feststellen. Er benutzt diesen Versuch¹⁾ als Beispiel, um zu zeigen, daß dasselbe Organ bei verschiedenen Arten verschiedene Fermente enthalten könne, denn während hier die Milz keine Xanthooxydase enthielt, wäre sie reichlich in der Rindermilz vorhanden. Aber Schittenhelm hat die Versuchsbedingungen nicht so gewählt, daß die Xanthooxydase in den beiden Milzen die gleiche Gelegenheit zur Wirkung hatte, wie aus dem folgenden Zitat²⁾ ersichtlich ist: «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 g 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.»

Unsere Experimente unterscheiden sich von diesem Schittenhelmschen dadurch, daß wir frische Milz von eben getöteten

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 355.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLV, S. 151.

Hunden nahmen und Luft durch die Digestionsflüssigkeit leiteten. Unsere Resultate lehren, daß Hundemilz fähig ist, sowohl Guanin wie Adenin in Harnsäure überzuführen. Zwei Versuche aus einer großen Reihe mögen hier angeführt werden:

I. 400 ccm wässerigen Milzextraktes (1:5) werden mit 0,400 g salzsaurem Guanin versetzt, das in der nötigen Menge Natronlauge gelöst war, und bei Körpertemperatur 6 Tage gehalten und die Hälfte der Zeit Luft durchgeleitet, die durch eine Waschflasche mit Chloroform strich. Chloroform wurde von Zeit zu Zeit zur Verdauungsflüssigkeit hinzugesetzt. Die Lösung wurde dann nach einer kombinierten Methode von Krüger-Salomon und Horbaczewski, wie oben beschrieben, untersucht und es wurden zum Schluß gefunden 0,120 g Harnsäure, die die charakteristische Krystallform hatten und typische Murexidreaktion gaben. Guanin war vollkommen verschwunden und von Xanthin wurde nur eine kleine Menge wiedergefunden. Die Harnsäure wurde mit folgendem Resultat analysiert:

0,1031 g erfordern 4,4 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,007768 g N)	
Verlangt:	Gefunden:
N = 33,33%	33,15%

II. 250 ccm desselben wässerigen Extraktes von Hundemilz wurden mit 0,250 g Adeninsulfat versetzt, die in der erforderlichen Menge Natronlauge gelöst waren. Behandlung und Verarbeitung wie oben. Das Adenin war vollkommen verschwunden, dafür wurde eine geringe Menge Xanthin erhalten und 0,110 g Harnsäure, die durch Krystallform, Murexidprobe und Analyse identifiziert wurde.

0,0941 g erfordern 4,0 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,007768 g N)	
Verlangt:	Gefunden:
N = 33,33%	33,01%

Die normale Hundemilz enthält Guanase, Adenase und Xanthooxydase und unterscheidet sich hierin nicht von der Rindermilz.

Das Pankreas.

Hinzugesetztes Guanin kann man größtenteils nach der Digestion des wässerigen Extraktes des Organes wiederfinden, dagegen wird Adenin unter denselben Bedingungen in Hypo-

xanthin verwandelt. Bisher haben wir noch nicht das vollkommene Fehlen der Guanase durch eine Untersuchung der Produkte der Selbstverdauung bewiesen, ebenso wenig haben wir Versuche mit Luftdurchleitung gemacht; da aber Hypoxanthin durch die Xanthooxydase immer in Xanthin verwandelt wird, auch ohne Luftdurchleitung, so ist der vorläufige Schluß wohl erlaubt, daß das Pankreas vom Hunde Adenase enthält, aber weder Guanase noch Xanthooxydase.

Die Leber.

Die Untersuchung dieses Organes ist von ganz besonderem Interesse, da sie in direkter Beziehung steht zur Frage, ob es wirklich zwei verschiedene Fermente «Guanase» und «Adenase» gibt; oder richtiger steht sie in Beziehung zu gewissen Einwürfen, die gegen die Annahme der Individualität der beiden Fermente gemacht sind. Schittenhelm¹⁾ behauptet, daß die leichte Umwandlung des Adenins durch Schweinemilz (während Guanin widerstandsfähiger ist) daher kommt, nicht weil hier die Guanase fehlt, sondern weil die eine Base gegen das Ferment empfindlicher ist wie die andere; er setzt also notwendigerweise voraus, daß Adenin empfindlicher ist als Guanin. Die folgenden Versuche würden ihn aber ebenso klar zu dem Schlusse führen, daß Guanin empfindlicher ist als Adenin.

I. 400 ccm wässerigen Extraktes von Hundeleber (1 : 5) werden mit 0,350 g salzsauren Guanins versetzt, gelöst in der nötigen Menge Natronlauge, genügend Chloroform hinzugefügt, um Fäulnis zu verhüten, und das Ganze 5 Tage lang in einer wohlverschlossenen Flasche bei 40° gehalten. Untersuchung der Produkte wie gewöhnlich. Das Guanin war verschwunden und das endlich erhaltene Xanthin, 0,170 g, gab folgenden Analysenwert:

0,1081 g erfordern 5,1 ccm Schwefelsäure	
Verlangt :	Gefunden :
N = 36,84%	36,64%

In der Hypoxanthinfraktion wurde mit Pikrinsäure ein gelber Niederschlag erhalten, der bei 270—274° schmolz. Es

¹⁾ loc. cit. Bd. XLVI.

war also nicht genügend Adenase vorhanden gewesen, um die geringe Menge Adenin aus der Drüse zu zersetzen, während die Guanase selbst das in beträchtlicher Menge hinzugesetzte Guanin verwandelt hatte.

II. 400 ccm vom selben Extrakt wie in I werden mit 0,350 g Adeninsulfat, gelöst in der ausreichenden Menge Natronlauge, versetzt und wie in I behandelt. Guanin wurde natürlich nicht gefunden, dagegen in der Xanthinfraktion eine kleine Menge Substanz, die die typische Farbenreaktion für Xanthin gab. Die Hypoxanthinfraktion gab mit Pikrinsäure einen reichlichen gelben Niederschlag von Adeninpikrat, der trocken 0,500 g wog und bei 279—282° schmolz. Aus dem Filtrate vom Adeninpikrat wurde die Pikrinsäure mit Schwefelsäure und Äther entfernt und das nun erhaltene Filtrat, mit Ammoniak alkalisch gemacht, gab mit ammoniakalischer Silbernitratlösung keinen Niederschlag mehr, enthielt also auch kein Adenin mehr.

III. Um jeden Einfluß zu verhüten, den die Alkaleszenz der Lösung etwa ausüben konnte, wurden die beiden Versuche wiederholt mit dem Unterschiede, daß die Basen als Chlorid resp. als Sulfat eingeführt wurden ohne Zusatz von Alkali. Der Versuch mit Guaninchlorhydrat gab dasselbe Resultat wie I, desgleichen entsprach der Versuch mit Adeninsulfat dem Versuch Nr. II, nur gab nach der Entfernung des Adenins mit Pikrinsäure die von der Pikrinsäure wieder befreite Flüssigkeit noch einen geringen Niederschlag mit Silbernitrat und Ammoniak.

IV. Diese Versuche wurden angesetzt wie Nr. I und II, nur wurde das Alkali durch den äquivalenten Betrag an Salzsäure ersetzt. Die Resultate waren aber durchaus dieselben wie oben beschrieben, Guanin wurde prompt in Xanthin umgewandelt, Adenin konnte größtenteils unverändert wiedergewonnen werden.

V. Endlich wurden noch zwei Versuche gemacht wie in Nr. III, aber im selben Gefäß, also unter möglichst gleichen Bedingungen. Resultate wie in III.

Alle Xanthinfraktionen dieser fünf Versuche wurden vereinigt, über das Nitrat gereinigt und als freie Base analysiert.

0,1314 g erfordern 6,2 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,007768 g N)

Verlangt:	Gefunden:
N = 36,84%	36,65%

Ebenso wurde sämtliches Adeninpicrat der 5 Versuche vereint, in das Sulfat übergeführt, einmal aus 1% H_2SO_4 umkrystallisiert und analysiert.

0,1268 g verloren bei 110° 0,0112 g

0,1016 g gaben 0,0586 g $BaSO_4$

0,1723 g erfordern 7,7 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,007768 g N)

Verlangt:	Gefunden:
H_2O = 8,91%	8,83%
H_2SO_4 = 24,25%	24,29%
N = 34,65%	34,71%

Wenn man diese fünf Versuche ansieht, kann man wohl den Schluß ziehen, daß Guanase in der Hundeleber reichlich vorhanden ist und Adenase fehlt. Dem ist auch wirklich so und das gelegentliche Vorkommen einer kleinen Menge Adenase kann nur durch protrahierte Selbstverdauung wässriger Extrakte gezeigt werden. Unser in dieser Richtung günstigster Versuch ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben. Wir gingen von 2000 ccm Wasserextrakt aus (1 : 5) und entnahmen zu den angegebenen Zeiten je 400 ccm.

Volumen	Dauer der Digestion	Adenin	Niederschlag mit ammoniak. Silber in der Hypoxanthinfraktion
400	5 Tage	vorhanden	keiner
400	7 >	>	ganz gering
400	9 >	zweifelhaft	beträchtlich
400	11 >	>	>

Alle Hypoxanthinsilberniederschläge vereint, wurden auf die freie Base verarbeitet und diese ins Nitrat verwandelt; so wurden 0,025 g erhalten, die die charakteristische Krystallform zeigten und nur eine Andeutung von Farbe bei der Behandlung mit Salpetersäure und Natronlauge gaben. Es war also unzweifelhaft Hypoxanthin.

Da zahlreiche Versuche, die eine Überführung von Xanthin in Harnsäure erweisen sollten, resultatlos verliefen, so müssen wir den Schluß ziehen, daß die Hundeleber zwar reichlich Guanase enthält, nur eine Spur von Adenase, aber keine Xanthooxydase.

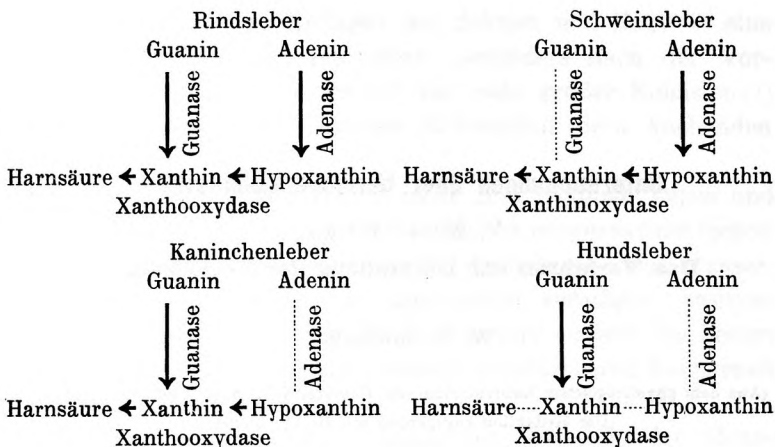
Die Organe des Kaninchens.

Die Leber.

Eine Untersuchung dieses Organes ist aus zwei Gründen von Interesse: erstens liefert es ein schlagendes Beispiel für das Vorkommen von Guanase beim Fehlen von Adenase und es ist das einzig bekannte Beispiel der Gegenwart von Xanthooxydase, während Adenase nicht vorhanden ist, und zweitens zeigt es eine andere Fermentverteilung wie die Lebern der anderen untersuchten Tierarten. Es wäre zwecklos, hier noch einmal die genaue Angabe sämtlicher Methoden zu wiederholen, die sich übrigens im wesentlichen mit den vorherbeschriebenen decken, wir teilen also kurz unsere Resultate mit:

Eingeführtes Adenin kann fast quantitativ wiedergefunden werden, während Guanin schnell und vollständig in Harnsäure verwandelt wird. In Anbetracht der äußerst reichlichen Menge von Xanthooxydase ist es etwas gewagt, das gänzliche Fehlen der Adenase zu leugnen, da, falls ein wenig Hypoxanthin gebildet würde, dieses sofort zu Harnsäure oxydiert werden würde. Merkwürdigerweise geht bei diesem Organ die Umwandlung des Guanins in Harnsäure ebenso rasch vor sich ohne Luftzutritt wie mit Luftdurchleitung und außerdem auch bei Zimmertemperatur mit beträchtlicher Geschwindigkeit. Soweit unsere Versuche sich also erstrecken, enthält Kaninchenleber Xanthooxydase und Guanase, aber keine Adenase.

Die auffallenden Unterschiede in der Fermentverteilung der Leber der vier bisher untersuchten Tierarten sind in der folgenden Zeichnung graphisch dargestellt; die ausgezogenen Linien bezeichnen die Gegenwart eines Fermentes, die punktierten das Fehlen oder nur spurenhafes Vorkommen.



Es kann also die Rindsleber Harnsäure sowohl aus Guanin wie aus Adenin bilden, die Schweinsleber nur aus Adenin, die Kaninchenleber nur aus Guanin, während die Hundeleber weder aus Guanin noch aus Adenin Harnsäure bilden kann.

Während die hier beschriebenen Resultate meistens auf oft wiederholten Versuchen beruhen und wahrscheinlich keine wesentlichen Änderungen mehr erfahren werden, ist es vielleicht möglich, daß andere Forscher auf diesem Gebiete nicht in jedem einzelnen Falle zu demselben Resultate kommen werden. Möglicherweise wird der eine vergeblich ein Ferment nachzuweisen suchen, das wir in Spuren gefunden haben, der andere geringe Mengen eines Fermentes finden, dessen Fehlen wir konstatiert haben; dies wird um so eher geschehen können, als Differenzen in einer großen Reihe von Versuchsergebnissen vieler einzelner Forscher darauf hindeuten scheinen, daß selbst bei den einzelnen Individuen derselben Art geringe Unterschiede in der Fermentverteilung vorkommen können.

