

# Über die Fermente des Nucleinstoffwechsels.

Von

**Alfred Schittenhelm.**

---

(Aus dem physiologischen Institut der tierärztlichen Hochschule Berlin.  
Direktor: Prof. Dr. Abderhalden.)

(Der Redaktion zugegangen am 18. Juli 1908.)

---

In einer größeren Reihe von Arbeiten habe ich gezeigt, daß die Harnsäurebildung im tierischen Organismus ein Fermentprozeß ist, der sich in den verschiedensten Organen abspielt. Ich konnte dann den Beweis erbringen, daß bei diesem Fermentprozeß mehrere Fermente ineinander arbeiten müssen: eine Nuclease, welche die Purinbasen aus der Nucleinsäure in Freiheit setzt, eine Purindesamidase (nach W. Jones zwei Fermente, die Guanase und die Adenase), welche das Guanin zu Xanthin und das Adenin zu Hypoxanthin umsetzt, endlich eine Xanthinoxydase, welche das Hypoxanthin zu Xanthin und das Xanthin zu Harnsäure oxydiert. Ich erwähne hier als weitere Resultate meiner Untersuchungen, daß es bei Verwendung geeigneter Organe (Rindermilz, Rinderlunge usw.) zu den Versuchen gelingt, die zugesetzte Menge Purinbasen, ob sie in freier Form oder an Nucleinsäure gebunden verwandt werden, quantitativ in Harnsäure überzuführen, daß es ferner gelingt, durch Ausfällen mit Ammonsulfat oder Alkohol die Fermente in wirksamer Form zu isolieren, so daß mit ihnen die Versuche in ebenso exakter Weise vorgenommen werden können, wie mit den Extrakten, und daß endlich einfaches Aufkochen genügt, die Fermente zu zerstören, so daß die zugegebenen Purinbasen bei gleicher Versuchsanordnung unverändert wiedergewonnen werden. Auch andere Faktoren (z. B. längere Aufbewahrung usw.) bewirken eine Abnahme resp. ein Aufhören der Fermentkraft.

In früheren Versuchen hatte ich in Gemeinschaft mit Schröder mich von der an sich schon bekannten Tatsache überzeugt, daß intensive und langdauernde Bakterienwirkung wohl die Aminopurine in Oxypurine umzuwandeln und Nucleinsäure zu spalten vermag, daß aber niemals eine Oxydation zu Harnsäure von den Bakterien herbeigeführt wird. Läßt man aber Fäulnisbakterien auf Harnsäure direkt einwirken, so wird dieselbe mit der Zeit vollkommen zerstört.

Nach allen diesen Beobachtungen, welche den zwingenden Beweis erbrachten, daß die Harnsäurebildung in den Organextrakten einzig und allein auf die Tätigkeit intracellulärer Organfermente zurückgeführt werden kann, sollte man denken, daß kein Zweifel mehr über die Art der Harnsäurebildung im tierischen Organismus bestände. Dennoch hat in jüngster Zeit Cohnheim<sup>1)</sup> geschrieben, daß die Hypothese vom Übergang der Purinbasen in Harnsäure des Beweises entbehre; teils seien die gefundenen Harnsäuremengen so klein gewesen, daß ihr analytischer Nachweis zu wünschen übrig lasse; teils hätten die Versuche so lange ausgedehnt werden müssen, daß die Mitwirkung von Mikroorganismen nicht ausgeschlossen werden könne.

Jeden, der mit den Arbeiten über die Harnsäurebildung vertraut ist, muß es eigentümlich berühren, daß Cohnheim gerade bei der Harnsäurebildung zum Einwurf bakterieller Fehlerquellen kommt, obwohl noch niemals, so viel ich übersehen kann, Harnsäure als Endprodukt bakterieller Zersetzung gefunden wurde, mithin vor Aufstellung jenes Einwurfes zunächst einmal für Cohnheim der Nachweis unbedingt notwendig gewesen wäre, daß Bakterien überhaupt Harnsäure zu bilden vermögen. Diesen Nachweis hat weder er noch sonst jemand erbracht und er wird sich auch wohl schwerlich erbringen lassen; dagegen ist der Nachweis gesichert, daß das Entgegengesetzte der Fall ist, daß nämlich die Bakterien offenbar eine Nuclease und Purindesamidase, aber sicherlich keine Xanthinoxydase besitzen. Der Cohnheimsche Einwurf hängt

---

<sup>1)</sup> Cohnheim, O. Die Physiologie der Verdauung und Ernährung. Urban und Schwarzenberg, Berlin 1908, S. 242 und 247.

also völlig in der Luft und zeigt auch noch, wie wenig er sich vor Abfassung dieses Kapitels seines Buches mit den experimentellen Forschungen vertraut gemacht hat.

Ich möchte hier nur als charakteristisch erwähnen, daß Cohnheim in demselben Buche andere Fermentprozesse, bei denen der Einwand bakterieller Fehlerquellen mehr Berechtigung hätte und in der Tat auch von zuständiger Seite mit Nachdruck gemacht wurde, ruhig als voll bewiesen aufführt, ohne der heftigen Polemik gegen dieselben auch nur mit einem Worte Erwähnung zu tun. Es handelt sich eben hier um seine eigenen Versuche, das glykolytische Ferment der Muskeln und dessen Pankreasaktivator.<sup>1)</sup> So viel über Cohnheims «kritische» Betrachtungsweise!

Ich wende mich nun wieder der Harnsäurebildung zu und werde in der folgenden Versuchsreihe zeigen, mit welcher Schnelligkeit dieselbe vor sich geht.

Zu den Versuchen wurde durchweg der wässrige Auszug von Rindermilz verwandt, weil dieses Organ die einfachsten Verhältnisse bietet, indem es ein ganz hervorragendes Harnsäurebildungsvermögen besitzt, während eine Harnsäurezerstörung nicht nachgewiesen werden kann. Zur Darstellung des Extraktes wurde 1 Teil in der Fleischhackmaschine zerkleinerter Rindermilz, welcher vorher die Kapsel abgezogen worden war, mit 1 $\frac{1}{2}$ —2 Teilen Wasser tüchtig gerührt, ca. 12 Stunden unter Zugabe von Chloroform und Toluol (je ca. 10 g) stehen gelassen, durch Koliertuch gepreßt und nun das Kolat durch Watte und aufgeschwemmtes Filtrierpapier mit Hilfe der Saugpumpe filtriert. Zur abgemessenen Menge Extrakt wurde das Guanin in natronalkalischer Lösung, unter Vermeidung eines Überschusses, nur einmal in salzsaurer Lösung hinzugegeben. Jetzt wurde wieder Toluol und Chloroform zugesetzt, tüchtig geschüttelt und nun das Gemisch im Wasserbad bei 35—37° unter Luftdruchleitung  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 3 und 4 Stunden belassen. Jedesmal wurde sofort nach Unterbrechung des Versuches die Flüssigkeit zur Zerstörung der Fermentwirkung aufgeköcht.

---

<sup>1)</sup> l. c., S. 121 und 148.

Die Isolierung der Purinkörper geschah, wie früher häufig beschrieben, durch Enteiweißung und Fällen der enteiweißten Lösung mit der Natriumbisulfit-Kupfersulfatmethode. Die so erhaltenen Kupferoxydulverbindungen wurden mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat salzsauer auf ca. 10 ccm eingeeengt. Dabei erhält man einen krystallinischen Rückstand und das Filtrat a.

Der krystallinische Rückstand, welcher aus reiner Harnsäure oder aus einem Gemisch von Harnsäure und Xanthin bestand, wurde nach Horbaczewski in konzentrierter Schwefelsäure (0,1 g in 2 ccm) gelöst und die Lösung mit dem 3—4fachen Volumen Wasser verdünnt einen Tag stehen gelassen. Dabei fällt die Harnsäure in reinem Zustand aus, während das Xanthin in Lösung bleibt. Die Harnsäure wurde nun gewogen.

Das schwefelsaure Filtrat und das salzsauer Filtrat a wurden vereinigt, mit Wasser stark verdünnt (auf 400—500 ccm), mit Natronlauge alkalisch, mit Essigsäure schwach sauer gemacht und wiederum mit Kupfersulfat-Natriumbisulfat gefällt. Die Kupferoxydulverbindungen wurden mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wurde, um auf Guanin zu prüfen, in verdünntem Ammoniak gelöst und stehen gelassen; dabei muß sich das in Ammoniak unlösliche Guanin abscheiden, während das in Ammoniak leicht lösliche Xanthin in Lösung bleibt. Aus dem Filtrat wird durch Einengen auf dem Wasserbad auf 5—10 ccm das Ammoniak ausgetrieben. Das Xanthin scheidet sich schon beim Einengen und endlich beim Stehen in der Kälte vollständig aus. Es wird abgesaugt und gewogen. Die weitere Identifizierung geschah, wie in den früheren Arbeiten angegeben.

#### Vorversuche:

1. 350 ccm Milzextrakt mit 5 ccm Normalnatronlauge ohne Purinzusatz 40 Minuten unter Luftdurchleitung bei 37°. Erhalten eben nachweisbare Spuren von Harnsäure.
2. 350 ccm Milzextrakt mit 5 ccm Normalnatronlauge ohne Purinzusatz 4 Stunden ebenso angesetzt. Erhalten 0,04 g Harnsäure.

## Hauptversuche.

Bei der prozentischen Berechnung wurde in den Versuchen, welche weniger als eine Stunde gingen, von der erhaltenen Harnsäuremenge nichts abgezogen, da in dieser Zeit so gut wie keine Harnsäurebildung im Milzextrakt allein statt hat. Bei den eine Stunde und mehr dauernden Versuchen wurde dagegen 0,04 g Harnsäure als im Milzextrakt spontan gebildet abgezogen.

1. 350 ccm Milzextrakt + 0,3 g in Natronlauge gelösten Guanins 20 Minuten unter Luftdurchleitung bei 37°.

Erhalten 0,06 g Harnsäure und 0,18 g Xanthin; Guanin war nur noch in Spuren nachweisbar.

Es waren also vom zugesetzten Guanin 18,18 % in Harnsäure und 59,4 % in Xanthin umgesetzt.

2. 350 ccm Milzextrakt + 0,3 g in Natronlauge gelösten Guanins 40 Minuten ebenso angesetzt.

Erhalten 0,18 g Harnsäure und 0,1 g Xanthin; Guanin war nicht mehr nachweisbar.

Es waren also 54,5 % als Harnsäure und 32,7 % als Xanthin zurückerhalten.

3. 350 ccm Milzextrakt + 0,35 g salzsauren Guanins in Natronlauge gelöst 40 Minuten ebenso angesetzt.

Erhalten 0,11 g Harnsäure und 0,13 g Xanthin; Guanin nicht mehr nachweisbar.

Es waren also 42,3 % in Harnsäure und 54,2 % in Xanthin umgesetzt.

4. 350 ccm Milzextrakt + 0,35 g salzsauren Guanins in Natronlauge gelöst 1 Stunde ebenso angesetzt.

Erhalten 0,23 g Harnsäure und 0,04 g Xanthin.

Es waren also 73,0 % in Harnsäure und 16,6 % in Xanthin umgesetzt.

5. Dasselbe 1 Stunde.

Erhalten 0,20 g Harnsäure.

Es waren also 61,5 % in Harnsäure umgesetzt.

6. Dasselbe 1½ Stunden.

Erhalten 0,26 g Harnsäure = 84,6 % des zugesetzten Guanins.

7. Dasselbe 2 Stunden.

Erhalten 0,28 g Harnsäure = **92,3** % des zugesetzten Guanins.

8. Dasselbe 3 Stunden.

Erhalten 0,27 g Harnsäure = **88,4** % des zugesetzten Guanins.

9. Dasselbe 4 Stunden.

Erhalten 0,29 g Harnsäure = **96,1** % des zugesetzten Guanins.

10. 350 ccm Milzextrakt + 0,35 g salzsauren Guanins in Salzsäure gelöst ebenso angesetzt, 4 Stunden.

Erhalten 0,24 g Harnsäure = **76,9** % des zugesetzten Guanins.

Aus den vereinigten Filtraten der Harnsäure von Versuch 5—10 wurde 0,15 g Xanthin isoliert. Guanin konnte nicht mehr nachgewiesen werden.

Analytischer Beleg der aus den verschiedenen Versuchen vereinigten Harnsäure- und Xanthinpräparate:

1. Harnsäure: 0,1565 g Substanz verbrauchen nach Kjeldahl 37,3 ccm  $\frac{1}{10}$  Normal-Oxalsäure.

Verlangt: 33,33 % N.

Gefunden: 33,37 % N.

2. Xanthin: 0,1210 g Substanz verbrauchen 31,8 ccm  $\frac{1}{10}$  Normal-Oxalsäure.

Verlangt: 36,84 % N.

Gefunden: 36,78 % N.

Die Fähigkeit, Harnsäure zu bilden und Aminopurine zu desamidieren, verliert der Extrakt sofort durch kurzes Aufkochen, wie der folgende Versuch zeigt:

11. 350 ccm Milzextrakt, kurz aufgeköcht, + 0,35 g Guaninchlorhydrat in wenig Natronlauge gelöst 4 Stunden wie oben angesetzt.

Wieder erhalten 0,33 g Guaninchlorhydrat. Keine Harnsäure, kein Xanthin.

Um endlich zu zeigen, daß Bakterienwirkung nicht imstande ist, eine ähnliche Wirkung hervorzubringen, wurde aufgeköchter und mit Guanin beschickter Milzextrakt mit einer

Aufschwemmung von frischen Rinderfaeces beschickt und genau so angesetzt und verarbeitet, wie die übrigen Versuche.

12. 350 ccm Milzextrakt, kurz aufgeköcht, + 0,35 g salzsauren Guanins in wenig Natronlauge gelöst und mit einer Aufschwemmung von frischen Rinderfaeces versetzt gehen 4 Stunden unter Luftdurchleitung bei 37°.

Erhalten 0,34 g Guaninchlorhydrat. Keine Harnsäure, kein Xanthin.

Die Versuche zeigen also klar, daß die Desamidierung und die Oxydation zu Harnsäure sofort beim Beginn des Versuches einsetzen und die Umsetzung in Harnsäure quantitativ in kürzester Zeit verläuft, so daß die Reaktion nach Verlauf von 1—2 Stunden bereits vollkommen beendet ist. Sie lassen keinen Zweifel darüber, daß es sich hier um einen **Fermentprozeß** handelt und daß die Fehlerquelle der Bakterienwirkung nicht im geringsten in Betracht zu ziehen ist. Dabei ist interessant, daß die Desamidierung offenbar noch wesentlich schneller verläuft als die Oxydation.

Die Resultate bestätigen also vollauf das von mir entworfene Bild des durch verschiedene Fermente bewirkten stufenweisen Abbaues der Nucleinsäure bis zur Harnsäure. Die erhaltenen Resultate stellen die Frucht einer großen Reihe sehr langwieriger und mühsamer Arbeiten, die sich durch Jahre hindurch zogen, dar. Sie sind von vornherein durch zahlreiche Kontrollversuche beständig gesichert worden.

Müßte also an und für sich schon Einspruch gegen eine Beurteilung dieser Versuchsreihe ohne irgend welche experimentelle Basis in einer Fachzeitschrift erhoben werden, so muß um so energischer Verwahrung dagegen eingelegt werden, daß ohne jede Begründung diese eingehend bewiesenen Anschauungen in einem für das breite Publikum bestimmten, gewissermaßen populären Buche als unhaltbar hingestellt werden!

---