XXVI.

Aus der II. medicin. Universitätsklinik Berlin und der inneren
Abtheilung des Charlottenburger Krankenhauses Westend.

Ablauf des Nucleinstoffwechsels in der Schweineleber.

Von

Alfred Schittenhelm und Julius Schmid.

Die vergleichende Physiologie des Nucleinstoffwechsels bei verschiedenen Thierarten hat als Resultat gezeitigt, dass bei ganz derselben Versuchsanordnung dieselben Organe bei verschiedenen Thierarten erheblich abweichende chemische Eigenschaften zeigen können.¹⁾ Während es z. B. gelingt, mit Milzextract vom Rinde und Pferde ohne weiteres die quantitative Bildung von Harnsäure aus Purinbasen zu erweisen, ist es nicht gelungen, dieselbe Reaction mit Milzextracten vom Menschen, vom Hunde und vom Schweine zu erhalten. Es gelingt hier nicht, Harnsäure als Reactionsprodukt zu fassen. Wir möchten hier sofort bemerken, dass damit das Fehlen dieses Vorganges nicht erwiesen ist. Der negative Verlauf, dem der positive bei anderen Species gegenübersteht, kann aus anderen äusserlichen Gründen erklärt werden u. a. z. B. aus einer schnelleren Zerstörung der Xanthinoxidase im überlebenden Organ durch andere gleichzeitig vorhandene Fermente oder aber aus einer sofortigen Zersetzung der eben entstandenen Harnsäure durch hochwirksame uricolytische Kräfte. Insbesondere auf die letzte Ursache, welche zweifellos häufig zutreffen dürfte²⁾, muss künftighin besonders geachtet werden.

Weiterhin zeigten sich Differenzen bei der Umwandlung der Aminopurine in Oxypurine. Während es beim Rinde sehr leicht gelingt, die Umwandlung durch Zugabe von Aminopurinen zu Organextracten quantitativ zu verfolgen³⁾, geht derselbe Vorgang bei der gleichen Versuchsanordnung mit Organextracten vom Schweine nicht so glatt von Statten und ähnliches wurde für den Hund und das Kaninchen beobachtet. Jones und Austrian⁴⁾ wollen die schärfsten Unterschiede beobachtet

1) Schittenhelm, A., der Nucleinstoffwechsel und seine Fermente bei Mensch und Thier. Zeitschr. f. physiol. Chem. 1905. Bd. 46. S. 554 u. ff.

2) Schittenhelm und Schmid, Ablauf des Nucleinstoffwechsels in menschlichen Organen. Diese Zeitschr. Vorstehende Arbeit.

3) Schittenhelm, A., Ueber Harnsäurebildung und Harnsäurezersetzung in den Auszügen der Rinderorgane. Zeitschr. f. physiol. Chem. 1905. Bd. 45. S. 121.

4) Jones, W. und Austrian, C. R., Ueber die Vertheilung der Fermente des Nucleinstoffwechsels. Zeitschr. f. physiol. Chem. 1906. Bd. 48. S. 110.

haben. Nach ihnen kann z. B. die Rinderleber Harnsäure sowohl aus Guanin wie aus Adenin bilden, die Schweineleber nur aus Adenin, die Kaninchenleber nur aus Guanin, während die Hundeleber weder aus Guanin noch aus Adenin Harnsäure zu bilden vermag. Jones¹⁾ hatte schon früher für die Schweinemilz die Fähigkeit, Guanin umzusetzen, in Abrede gestellt, eine Behauptung, welche der Nachprüfung nicht standhielt²⁾. Wir haben auch bereits erwiesen, dass die neuerlichen Untersuchungen von Jones und Austrian nicht in vollem Umfange haltbar sind, in dem es uns gelang, mit Kaninchenleber eine Umsetzung von Adenin in Hypoxanthin zu beweisen.³⁾ Wir haben damals bereits auf das Bedenkliche der Jones und Austrian'schen Behauptungen hingewiesen und auf die Konsequenzen, welche ein derartiger Ausfall im Fermenthaushalt gerade in der Leber nach sich ziehen müsste. Wir betonten, dass besonders für das Schwein ein einseitiges Arbeiten der Leber, welches zur Folge haben müsste, dass das Guanin mit dem Blut weggeschafft werden würde an Stätten, wo es umgesetzt oder eliminiert werden könnte, nicht wohl anzunehmen geht, da der Urin des Schweines im normalen Zustande nach Untersuchungen von Bendix und Schittenhelm⁴⁾ so gut wie kein Guanin enthält. Damals schon haben wir mitgeteilt, dass wir nichts unversucht lassen wollen, diesen scheinbaren Defect der Schweineleber aufzuklären und wir sind heute in der Lage, abgeschlossene Untersuchungen darüber zu bringen.

I. Das uricolytische Ferment der Schweineleber.

Schon durch frühere Untersuchungen⁵⁾ ist es wahrscheinlich gemacht, dass die Schweineleber ein uricolytisches Ferment besitzt.

Versuch 1. 250 g Leberbrei + 250 ccm Wasser + 0,4 g in wenig Normalnatronlauge gelöster Harnsäure wurden mit Toluol und Chloroform im Brutschrank bei 37° unter häufigem Umschütteln 6 Tage lang belassen. Aus der enteweißten Flüssigkeit werden die Purinkörper, wie üblich, mit der Kupfermethode gefällt. Es wurde keine Harnsäure wiedergefunden.

Es ist also klar, dass die Leber des Schweines ein wirksames uricolytisches Ferment enthält.

II. Das die Aminopurine desamidirende Ferment der Schweineleber.

Zum Nachweis des desamidirenden Fermentes stellten wir zunächst unsere Versuche so an, dass wir das Guanin als solches oder in α -thymonucleinsaurem Natrium gebunden zu Leberbrei zugeben.

1) Jones, Ueber das Vorkommen der Guanase in der Rindermilz und ihr Fehlen in der Milz des Schweines. Zeitschr. f. physiol. Chem. 1905. Bd. 45. S. 84.

2) Schittenhelm, A., Der Nucleinstoffwechsel und seine Fermente bei Mensch und Thier. Zeitschr. f. physiol. Chem. 1905. Bd. 46. S. 354.

3) Schittenhelm, A. und Schmid, J., Ueber die Fermente des Nucleinstoffwechsels. Zeitschr. f. physiol. Chem. 1906. Bd. 50. S. 30.

4) Schittenhelm l. c. S. 368.

5) Schittenhelm, l. c. S. 368.

Versuch 2. Dieser Versuch sollte zunächst zeigen, ob in der Schweineleber freie Purinbasen vorkommen. 500 g Leberbrei wurden in siedendes Wasser eingetragen, stark natronalkalisch gemacht, nach kurzer Zeit mit Essigsäure schwach angesäuert und filtriert. Diese Procedur wurde noch 2 Mal wiederholt. Die vereinigten Filtrate wurden mit der Kupferfällung auf Purinbasen untersucht.

Gefunden wurden Spuren von Guanin und Adenin; daneben war Xanthin und Hypoxanthin, zusammen 0,07 g vorhanden. Es sind also nur **sehr wenig freie Purinkörper in der Leber** zu finden.

Versuch 3. 500 g Leberbrei + 500 ccm Wasser + 0,5 g in wenig Normalnatronlauge gelösten Guanins werden mit Toluol und Chloroform 7 Tage lang bei 37° unter Luftdurchleitung digerirt. Darnach wie Versuch 1 verarbeitet.

Gefunden wurden 0,41 g Guanin, 0,257 g Adeninpicrat vom S. P. 281°, 0,133 g Hypoxanthinpicrat und **0,133 g Xanthin**.

Die Analyse des Hypoxanthins und Xanthins geschah mit dem im nächsten Versuch gefundenen zusammen.

Versuch 4. 500 g Leberbrei + 10 g in 500 ccm Wasser gelösten α -thymonucleinsäuren Natrium werden mit Toluol und Chloroform 7 Tage lang unter Luftdurchleitung bei 37° digerirt. Darnach wie Versuch 1 verarbeitet.

Gefunden wurden 0,53 g Guanin, 0,80 g Adeninpicrat vom S. P. 281°, 0,85 g Hypoxanthinpicrat in charakteristischer Krystallform, **0,11 g Xanthin**.

Das Hypoxanthinpicrat von Versuch 2 und 3 wurde ins Nitrat umgesetzt und aus diesem Hypoxanthin rein dargestellt.

0,123 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl 36,1 ccm Normalsalzsäure.

Verlangt für $C_5H_4N_4O_2$

36,17 pCt. N

Gefunden:

36,09 pCt. N

Die vereinigten Xanthine wurden über das Nitrat gereinigt und als reines Xanthin analysirt.

0,0974 g Substanz gaben 30,2 ccm N; T. = 18°; B. = 769 mm.

Verlangt für $C_5H_4N_4O_2$:

36,84 pCt. N

Gefunden:

36,29 pCt. N

Es waren also in beiden Versuchen Umsetzungen der Aminopurine vor sich gegangen und zwar am ausgiebigeren die Umsetzung des Adenins in Hypoxanthin, während die Umsetzung des Guanins in Xanthin zwar sicher vorhanden war, aber doch nur in kleinem Maass statt hatte.

Wir suchten nun alles, was die Fermentreaction stören könnte, auszuschalten und den Versuch mehr den natürlichen Verhältnissen anzupassen, indem wir an Stelle der Zugabe von Purinkörpern die Wirkung beobachteten, welche auf die in dem Nucleoproteid der Leber selbst enthaltenen bei der Digestion ausgeübt wurde. Zunächst überzeugten wir uns, dass überhaupt eine solche statt hatte.

Versuch 5. 150 g Leberbrei wurden in 1 Liter 5proc. Schwefelsäure 5 Stunden lang über freier Flamme gekocht. Das Reaktionsgemisch wurde mit Natronlauge alkalisch gemacht, mit Essigsäure in der Hitze angesäuert und filtrirt. Der Eiweissniederschlag wurde noch zwei Mal in schwacher Natronlauge gelöst, gefällt und filtrirt. Aus den vereinigten Filtraten wurden die Purinbasen mit der Kupferfällung ausgefällt, der Niederschlag mit heissem Wasser genau gewaschen und mit Schwefelwasserstoff heiss unter Zugabe von etwas Schwefelsäure, um Guanin in Lösung zu halten, zerlegt. Die vom Schwefelkupfer abfiltrirte Flüssigkeit wurde zur Vertreibung des über-

schüssigen Schwefelwasserstoffs eingeengt. Darnach wurde die Kupferfällung genau so wiederholt, wieder mit Schwefelwasserstoff zerlegt und eingeengt. Diese Lösung wurde auf 200 ccm aufgefüllt. In 50 ccm wurde eine Kupferfällung gemacht und der Stickstoffgehalt derselben mittelst Kjeldahl ermittelt.

Verbraucht wurden 45 ccm Normalsalzsäure.

Es war also in 150 ccm frischer Schweineleber **0,252 g Purinbasenstickstoff** enthalten.

Versuch 6. 150 g Leberbrei + 500 ccm Wasser, welches während des Versuchs immer wieder ersetzt wurde, wurden mit Toluol und Chloroform 2 Tage unter Luftdurchleitung bei 37° gehalten. Darnach wurde das Versuchsobject genau so verarbeitet wie Versuch 4.

Von der auf 250 ccm aufgefüllten Endsölung wurden 50 ccm auf den Gehalt an Purinbasen untersucht.

Verbraucht wurden 15,55 ccm $\frac{1}{10}$ Normalsalzsäure.

Nach 2 tägiger Autodigestion unter Luftdurchleitung war also nur mehr **0,109 g Purinbasenstickstoff** in 150 g Schweineleber enthalten.

Versuch 7. 150 g Leberbrei genau so angesetzt wie Versuch 5 und ebenso digerirt. Nur wurde der Versuch 6 Tage lang durchgeführt. Die Verarbeitung geschah ganz analog der von Versuch 4 und 5. Von der auf 300 ccm aufgefüllten Endlösung wurden 50 ccm auf den Gehalt an Purinbasen untersucht. Verbraucht wurden 7,6 ccm $\frac{1}{10}$ Normalsalzsäure.

Nach 6 tägiger Autodigestion unter Luftdurchleitung war demnach nur noch **0,064 g Purinbasenstickstoff** in 150 g Schweineleber enthalten.

Versuch 8. 150 g Leberbrei genau so angesetzt wie Versuch 5 und 6. Der Versuch wurde 7 Tage lang durchgeführt. Die Verarbeitung geschah ganz analog der von Versuch 4—6.

Es konnten überhaupt **keine Purinbasen** mit der Kupferfällung mehr nachgewiesen werden.

Die Versuche verliefen so klar und eindeutig, dass gar kein Zweifel darüber bestehen kann, dass bei der Autodigestion unter Luftdurchleitung die in dem Lebernucleoproteid festgelegten Purinbasen durch die Nuclease freigemacht und sofort in statu nascendi weiter umgesetzt werden. Dabei bleiben sie nicht etwa als Oxypurine zurück, sondern diese werden sofort weiterumgesetzt, so dass das Resultat ein Verschwinden der Purinkörper aus der Reaktionsflüssigkeit ist. Nachdem wir bereits gesehen haben, dass die Schweineleber eine wirksames uricolytisches Ferment besitzt, dürfte analog dem Verhalten anderer Organe der Weg der Umsetzung der Oxypurine in der Schweineleber über die Harnsäure führen, welche ihrerseits wieder in statu nascendi sofort der Einwirkung des uricolytischen Fermentes unterliegt. Immerhin muss man daran denken, ob nicht etwa die Oxypurine auch direkt, ohne den Weg über die Harnsäure zu machen, abgebaut werden. Nach allem, was wir jetzt über den Ablauf des Nucleinstoffwechsels wissen, ist dieser Weg jedoch wohl kaum anzunehmen.

Aus den Versuchen ging also klar und deutlich hervor, dass die der Schweineleber eigenen Aminopurine umgesetzt werden. Es war nun zunächst die Aufgabe, zu eruiiren, welche Purinkörper der Schweineleber eigenthümlich sind und ob sich darunter Guanin befindet.

Versuch 9. 500 g frischer Leberbrei wurden mit 2 Liter 5 proc. Schwefelsäure durch 6stündiges Kochen am Rückflusskühler hydrolysiert. Darnach geschah die Isolierung und Trennung der Purinkörper wie gewöhnlich. Es wurden gefunden 0,75 g Guanin, 1,9 g Adeninpicrat (S. P. 281^o), 0,32 g salzsaures Hypoxanthin und 0,11 g Xanthin.

Es war also, wie zu erwarten war, reichlich Guanin in dem Nucleoproteid der Schweineleber neben viel Adenin enthalten und damit ist eigentlich bereits der Beweis erbracht, dass in den Versuchen 5—7 beide Aminopurine in gleicher Weise umgesetzt wurden. Trotzdem unternahmen wir zur definitiven Klärung noch weitere Versuche.

Versuch 10. 500 g Leberbrei + 500 ccm Wasser werden mit Toluol und Chloroform bei 37^o unter Luftdurchleitung 7 Tage lang der Autodigestion überlassen. Darnach wurde das Gemenge durch 6stündiges Kochen mit 5 proc. Schwefelsäure aufgeschlossen und nach Entfernung des Eiweisses die Purinbasen mit der Kupferfällung isoliert; die letztere wurde zur Reinigung der Producte wiederholt. Die weitere Trennung der Basen geschah durch Combinirung der Methode von Krüger und Salomon und Krüger und Schittenhelm.

Es fanden sich 0,26 g Guanin, 0,18 g Adeninpicrat, **0,54 g Hypoxanthinpicrat und 0,36 g Xanthin.**

Versuch 11. 500 g Leberbrei genau wie Versuch 9 angesetzt und verarbeitet.

Es fanden sich 0,1 g Guanin, geringe Mengen Adeninpicrates, **0,23 g Hypoxanthinpicrat und 0,07 g Xanthin.**

Versuch 12. 500 g Leberbrei genau wie 9 und 10.

Es fanden sich 0,3 g Guanin, Spuren von Adenin, **0,2 g Hypoxanthin und 0,3 g Xanthin.**

Das Hypoxanthin von den Versuchen 10, 11 und 12 wurde in das Nitrat umgewandelt und als solches analysiert:

0,1231 g Substanz gaben 0,1239 g CO₂ und 0,0386 g H₂O.

Verlangt für C₅H₄N₄O · HNO₃ + H₂O:

27,64 pCt. C und 3,22 pCt. H.

Gefunden:

27,45 pCt. C und 3,48 pCt. H.

Das Xanthin aus den Versuchen 9, 10 und 11 wurde über das Nitrat gereinigt und als freies Xanthin analysiert:

0,1356 g Substanz gaben 0,1943 g CO₂ und 0,0343 g H₂O.

0,134 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl 35,8 ccm $\frac{1}{10}$ Normal-Salzsäure.

Verlangt für C₅H₄N₄O₂:

39,47 pCt. C

2,63 pCt. H

36,84 pCt. N

Gefunden:

39,34 pCt. C

2,81 pCt. H

36,54 pCt. N

Die Versuche hatten das erwartete Ergebniss. Es wurden neben einer starken Abnahme des Guanin und Adeningehaltes der Leber als Uebergangsproducte Hypoxanthin und Xanthin gefunden und damit unterliegt es keinem Zweifel mehr, dass die Schweineleber ein desamidirendes Ferment besitzt, welches beide Aminopurine in gleicher Weise in Oxypurine umzusetzen vermag. Allerdings geht dieser Vorgang je nach der Versuchsanordnung mehr oder weniger einseitig und intensiv vor sich und man muss aus den Versuchen die Lehre ziehen, dass, da die Fermente offenbar ziemlich empfindlich sind, die Vorgänge nicht oft und vielseitig genug geprüft werden können, ehe

sie als Facta genommen werden dürfen. Durch diese Versuche ist ferner erwiesen, dass offenbar der Einfluss der Fermente auf die in körpereigener Bindung vorhandenen Purinkörper ein intensiver ist, als wenn dieselben frei oder als Nucleinsäure zugegeben werden.

Jedenfalls aber stimmt die Ansicht von Jones und Austrian nicht, dass eine gewisse Thierspecies einen charakteristischen Unterschied bietet in ihrer Vertheilung der Nucleinfermente auf die Organe und auch die immer wieder proclamirte Ansicht, als handle es sich um eine „Guanase“ und eine „Adenase“, also um zwei getrennte und ganz verschiedene Fermente, von denen das eine das Guanin, das andere das Adenin bearbeitet, ist durch die Versuche wieder stark ins Wanken gekommen. Genau so wie es sich bei der Kaninchenleber und bei der Schweineleber nur um Eigenarten der Versuchsanordnung handelt, wenn man das Guanin oder das Adenin wieder unangegriffen zurückerhält, so wird es auch bei der Hundeleber sein. Wir halten es nicht für nothwendig, besondere Versuche dafür anzusetzen, nachdem es für die Hundemilz¹⁾ bereits erwiesen ist, dass die Umsetzung der Aminopurine in Oxypurine in gleicher Weise in ihr vor sich geht. Es bestehen also wohl vielleicht quantitative Differenzen in Bezug auf die Wirksamkeit des desamidirenden Fermentes bei einzelnen Thierspecies, aber keineswegs einseitige Ausfallerscheinungen.

Im übrigen kann die Schweineleber nach vorstehenden Untersuchungen als ein Paradigma für den Ablauf des Nucleinstoffwechsels im thierischen Organismus gelten, welches in anschaulicher Weise zeigt, wie sich die einzelnen Fermente des Nucleinstoffwechsels, die Nuclease, die Purindesamidase, die Xanthinoxydase und das uricolytische Ferment in die Hände arbeiten. Man findet dasselbe Bild überall wieder, ob man nun die Leber des Rindes, des Kaninchens, des Schweines oder des Menschen zu den Versuchen verwendet.

1) Schittenhelm, A., Ueber die Harnsäurebildung und die Harnsäurezersetzung in den Auszügen der Rinderorgane. Zeitschr. f. physiol. Chem. 1905. Bd. 55. S. 151.