

# Das proteolytische Enzym der Thymus.

Von  
**Fr. Kutscher.**

## I. Mittheilung.

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 17. October 1901.)

Im Laufe einer Untersuchung über die Thymusnucleinsäure benutzte ich einen Theil der frischen Kalbthymus, die mir zur Gewinnung der Nucleinsäure dienten, um mich darüber zu unterrichten, ob in der Thymus ein proteolytisches Enzym vorhanden und welcher Natur dasselbe ist.<sup>1)</sup>

Die Thymusdrüsen werden zu diesem Zweck zunächst nach der von Kossel und Neumann<sup>2)</sup> gegebenen Vorschrift behandelt. Sie wurden also sorgfältig von fremden Gewebetheilen befreit, darauf gehackt, in dem doppelten Gewicht Wasser aufgeschwemmt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur unter Zugabe von Chloroform<sup>3)</sup> gehalten. Nach dieser Zeit wurde die Flüssigkeit durch Colirtücher abgeseiht. Das trübe Filtrat, das in meinem Versuch 1 Liter betrug und von ca. 500 g präparirter Thymus gewonnen war, wurde in eine Flasche übergefüllt, die wohlverschlossen im Brutschrank bei 37° C. sich selbst überlassen blieb.

Das Aussehen der trüben Flüssigkeit änderte sich jetzt

1) Inzwischen ist von Conradi (Beiträge zur chemischen Physiologie u. Pathologie, Bd. 1, S. 147) kurz erwähnt, dass die Thymus ein proteolytisches Enzym enthält.

2) Berichte der deutschen chem. Gesellschaft, Jahrgang 1894, S. 2215.

3) Siehe Salkowski, Deutsche medicinische Wochenschrift, 1888.

im Verlauf von 48 Stunden wesentlich. Dieselbe war nach dieser Zeit vollkommen klar geworden. Sie hatte einen tief gelben Farbenton angenommen und einen sehr reichlichen körnigen Niederschlag abgeschieden. Die ganze Masse wurde dann noch 3 Wochen bei obengenannter Temperatur weiter digerirt, dabei vertiefte sich der Farbenton der Flüssigkeit. Im Uebrigen trat scheinbar eine weitere Veränderung in derselben nicht ein, namentlich liess sich eine merkliche Abnahme des Niederschlages nicht feststellen. Daher wurde der Versuch abgebrochen und zur Isolirung der einzelnen Verdauungsprodukte geschritten.

Zu diesem Zweck wurde die Verdauungsflüssigkeit durch Filtration von dem Niederschlage getrennt. Das gegen Lackmusschwach sauer reagirende Filtrat wurde aufgeköcht, die dabei sich abscheidenden Flocken durch erneute Filtration entfernt. Nunmehr gab das Filtrat nur noch eine ganz schwache Biuretreaction. Die Flüssigkeit wurde, nachdem sie vorher auf ca. 500 ccm. eingedampft war, mit Barytwasser versetzt. Dabei entwich aus ihr Ammoniak in Masse. Der durch den Baryt erzeugte Niederschlag wurde abgesaugt und in dem Filtrat der überschüssige Baryt durch Kohlensäure abgeschieden. Danach wurde die Flüssigkeit zum dünnen Syrup eingeeengt. Da derselbe auch bei längerem Stehen nur eine geringe, unreinen Leucin gleichende Krystallisation absetzte, wurde er wieder mit ca. 200 ccm. Wasser aufgenommen. Die Flüssigkeit wurde jetzt mit Salpetersäure schwach angesäuert und mit 10%iger Silbernitratlösung ausgefällt. Der reichliche Niederschlag enthielt der Hauptsache nach Chlorsilber, ferner die Silberverbindungen verschiedener Alloxyrbasen, die von mir bisher noch nicht aufgetheilt worden sind. Dem Filtrat dieses Niederschlages wurde 10%ige Silbernitratlösung zugefügt, bis eine Probe in kaltgesättigtem Barytwasser neben weissen organischen Silberverbindungen braunes Silberoxyd fallen liess. Darauf wurde langsam Barytwasser so lange zugegeben, als sich in klar filtrirten Proben durch vorsichtigen Zusatz von ammoniakalischer Silberlösung noch eine deutliche Fällung erzielen liess. Auf diese Weise wurde ein reichlicher Nieder-

schlag erzeugt. Ich will denselben als Niederschlag I, das Filtrat davon als Filtrat I bezeichnen.

### Niederschlag I.

In Niederschlag I müssen, wir können dies aus dem Verhalten der Körper gegen ammoniakalische Silberlösung schliessen, von den bekannten hydrolytischen Spaltungsprodukten der Eiweisskörper das Histidin, weiter Asparaginsäure und Glutaminsäure, von den hydrolytischen Spaltungsprodukten der Nucleinsäure die Reste der Nucleinbasen, weiter Thymin, Uracil und wahrscheinlich auch Cytosin annähernd quantitativ hineingehen. Die oben genannten Körper durfte ich also in Niederschlag I erwarten.

Um sie zu isoliren, wurde Niederschlag I abgesaugt, mit Wasser gewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Schwefelsilber wurde nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der dadurch erzielte Niederschlag war nur gering. Er musste der Hauptsache nach aus Histidin, weiter aus Nucleinbasen bestehen, doch gestattete die kleine Menge der aus ihm darstellbaren Substanzen keine endgültige Feststellung derselben.

Das Filtrat von der Phosphorwolframfällung wurde durch Baryt von Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure, durch Schwefelsäure vom überschüssigen Baryt genau befreit. Nachdem es eingeeengt war, erstarrte es bis auf den letzten Tropfen zu einer gleichmässig erscheinenden Krystallmasse. Die abgetrennten Krystalle reagirten gegen Lackmus neutral. Im Reagensglas erhitzt, schmolzen sie zunächst. Die geschmolzene Masse bräunte sich und sublimirte beim weiteren Erhitzen zum grössten Theil. Diese Reactionen der Krystalle, sowie ihr Verhalten gegen ammoniakalische Silberlösung sprachen für Thymin, doch bestätigte die Analyse diese Voraussetzung nicht völlig. Denn 0,1352 g Substanz sättigten, nach Kjeldahl behandelt, 22,6 ccm.  $\frac{1}{10}$  N-Oxalsäure.

Für  $C_5H_6N_2O_2$

Berechnet: N = 22,22%

Gefunden: N = 23,40%

Auch durch vielfache Umkrystallisation und andere Reinigungsversuche liess sich dieser Stickstoffwerth nicht herabdrücken, da schliesslich 0,1034 g 17,8 cem.  $\frac{1}{10}$ N-Oxalsäure absättigten. Das entspricht 24,10% Stickstoff. Es musste also dem Thymin eine stickstoffreichere Substanz, vielleicht Uracil, beigemischt sein. Die Ausbeute an dem eben geschilderten Körper hatte ca. 0,6 g betragen.

Asparaginsäure und Glutaminsäure, die ich ebenfalls in Niederschlag I erwartete, liessen sich darin nicht nachweisen.

### Filtrat I.

Das Filtrat von Niederschlag I wurde mit Baryt gesättigt. Es blieb dabei zunächst vollkommen klar, nur etwas reducirtes Silber schied sich allmählich aus demselben ab. Um Filtrat I weiter zu verarbeiten, wurde daher durch Schwefelsäure der Baryt, durch Salzsäure das Silber niedergeschlagen. Chlorsilber und schwefelsaurer Baryt wurden abfiltrirt, das Filtrat mit Phosphorwolframsäure gefällt. Den Phosphorwolframsäure-niederschlag verarbeitete ich dann nach der Methode Kossel's auf Lysin. Ich erhielt schliesslich 3,5 g eines Pikrates, das der Analyse nach Lysinpikrat war.

0,2392 g gaben bei der Verbrennung 0,337 g Kohlensäure und 0,0994 g Wasser.

Für  $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot C_6H_3N_3O_7$

Berechnet:

C = 38,40%

H = 4,53%

Gefunden:

C = 38,43%

H = 4,65%

Die Selbstverdauung der Thymus hatte demnach das überraschende Resultat ergeben, dass von den bekannten hydrolytischen Spaltungsprodukten der Eiweisskörper eigentlich nur zwei auftreten, nämlich Ammoniak und Lysin. Ob sich auch Histidin und Leucin bilden, muss ich noch zweifelhaft lassen. Dagegen glaube ich mit Bestimmtheit sagen zu können, dass Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Tyrosin vollständig fehlen.

Es fragt sich nun, wie ist dieser eigenartige Befund zu erklären? Die Zahl der zu erwägenden Möglichkeiten ist eine

geringe. Wir müssen entweder annehmen, dass in der Thymus ein bisher unbekanntes Enzym vorhanden ist, das die Eiweisskörper in der Hauptsache unter Bildung von Ammoniak und Lysin spaltet, oder aber, dass ein tryptisches Enzym wirkt, das jedoch nur im vorliegenden Falle einen eigenartigen Eiweisskörper, der lediglich Lysin und Ammoniak zu liefern vermag, angreifen kann. Oder, und diese Voraussetzung scheint mir die wahrscheinlichste, man muss annehmen, die Thymus enthält Trypsin, das bei der Selbstverdauung der Thymus in gewöhnlicher Weise zur Wirkung kommt. Von den entstehenden bekannten Spaltungsprodukten werden dann jedoch die meisten durch bisher nicht näher studierte Prozesse weiter verändert. Welche dieser Annahmen die richtige ist, werden nähere Versuche ergeben.