

# Über das Enzym der Thymusdrüse. <sup>1)</sup>

Von

**Walter Jones.**

---

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

(Der Redaktion zugegangen am 15. Januar 1904.)

---

In einer Mitteilung, welche vor zwei Jahren erschien, kündigte Kutscher<sup>2)</sup> die Entdeckung eines merkwürdigen Enzyms in der Thymusdrüse an, welches von den hydrolytischen Produkten der Eiweißstoffe nur Lysin und Ammoniak hervorbrachte. Er ließ einen wässerigen Extrakt der Drüse bei Körpertemperatur drei Wochen stehen und untersuchte ihn dann mit Hilfe der bekannten Kosselschen Methode in etwas veränderter Form, aber trotz der sorgfältigsten Anwendung dieses Verfahrens gelang es ihm nur, die zwei oben genannten Substanzen zu isolieren, und er weist besonders auf die Abwesenheit von Tyrosin, Arginin, Asparaginsäure und Glutaminsäure hin. Er konnte jedoch eine Substanz isolieren, deren neutrale Reaktion und Verhalten gegen Silbernitrat und Ammoniak auf Thymin schließen läßt, aber diese Vermutung wird nicht ganz durch die Analyse bestätigt, wie Kutscher selbst sagt, besonders da die Zahlen der Analyse umsomehr von den theoretischen abweichen, je mehr der Körper gereinigt wird.

Indem er die Substanz bei seiner Zusammenfassung ganz übergeht, spricht Kutscher die Meinung aus, daß seine Entdeckung durch eine der folgenden Annahmen erklärt werden muß. 1. Die Drüse enthält ein charakteristisches Enzym, welches besonders Lysin und Ammoniak von den Eiweißkörpern abspaltet. 2. Die Drüse enthält einen charakteristischen Eiweißstoff, welcher nur Lysin und Ammoniak ergibt. 3. Die Drüse

---

<sup>1)</sup> Vorgetragen in der American Physiological Society in Philadelphia am 29. Dez. 1903.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 114.

enthält Trypsin, und diese Erklärung hält Kutscher für die wahrscheinlichste.

Neuerdings hat Araki<sup>1)</sup> gezeigt, daß der Thymus ein Enzym enthält, welches auf die Kernsubstanz der roten Blutkörperchen der Vögel eine lösende Wirkung ausübt und fähig ist,  $\alpha$ -Thymusnucleinsäure, deren Natronsalz gelatiniert, in  $\beta$ -Thymusnucleinsäure überzuführen, deren Natronsalz nicht gelatiniert. Diese beiden Säuren wurden von Kossel<sup>2)</sup> aus dem Thymus isoliert, und später zeigte Neumann,<sup>3)</sup> daß durch Einwirkung warmer Alkalien die eine in die andere übergeführt werden kann.

Die nachstehend beschriebenen Experimente zeigen

1. daß die Thymusdrüse ein lösliches Enzym enthält, welches bei Siedetemperatur schnell zerstört wird und welches den Nucleoproteiden<sup>4)</sup> der Drüse anhängt, wenn diese mit Essigsäure niedergeschlagen und mit Natriumkarbonat gelöst werden. Das Enzym kann deshalb frei von den löslichen Bestandteilen der Drüse erhalten werden und es ergibt sich dadurch eine Methode, welche eine genauere Untersuchung der Zersetzungsprodukte, die sich durch die Einwirkung des Enzyms bilden, besonders in Hinsicht ihrer Entstehung, gestattet, als es mit dem von Kutscher und Araki angewendeten Verfahren möglich war;

2. daß bei Körpertemperatur und in der Konzentration, in der es in der Drüse existiert, das Enzym die Nucleoproteide mit großer Schnelligkeit zersetzt, unter Bildung von Phosphorsäure und Xanthinbasen;

3. daß die Xanthinbasen, die durch den Einfluß des Enzyms entstehen, verschieden sind von den Xanthinbasen, welche durch die Einwirkung kochender Säuren auf Thymusnucleinsäure gebildet werden;

4. daß in entschiedenem Gegensatz zu Trypsin das Enzym in einer sauren Flüssigkeit am wirksamsten ist und leicht durch die Gegenwart von Alkalien bei Körpertemperatur zerstört wird.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXVIII, S. 194.

<sup>2)</sup> Archiv für Physiol., 1894, S. 194.

<sup>3)</sup> Archiv für Physiol., 1898, S. 374, und 1899, Supplementband, S. 552.

<sup>4)</sup> Der Ausdruck «Nucleoproteid» wird in der ganzen Abhandlung im weitesten Sinne gebraucht und soll auch «Nucleohiston» einschließen.

Da die Methode zur Isolierung der Xanthinbasen in all meinen Experimenten die gleiche ist, so soll der folgende Kontrollversuch zeigen, daß die Xanthinbasen weder in der Drüse präformiert sind, noch durch die Behandlung des Materials entstehen. 50 g Thymusdrüse, welche so gut als möglich von fremdem Gewebe gereinigt worden war, wurde fein zerrieben und mit 100 ccm Wasser bei Zimmertemperatur mehrere Stunden digeriert, dann wurden 5 Tropfen 30 %iger Essigsäure hinzugefügt und das ganze zum Siedepunkt erhitzt. Das Koagulum wurde abfiltriert, die Flüssigkeit mit Ammoniak alkalisch gemacht und mit ammoniakalischer Silberlösung behandelt, nachdem das Magnesium-Ammoniumphosphat abfiltriert worden war. Nicht der geringste Niederschlag wurde erzeugt. Der Zusatz einer minimalen Menge einer Lösung von Xanthin in Ammoniak verursachte jedoch sofort einen gelatinösen Niederschlag.

Mit Material, das bei Körpertemperatur digeriert worden ist, sind die Resultate ganz andere. Ein Gemisch von 900 g fein zerteilter Drüse und 1800 ccm Wasser wurde mit 25 ccm Chloroform gut geschüttelt und in einem fest geschlossenen Gefäß fünf Tage bei Körpertemperatur stehen gelassen. Das Material wurde dann mit 1 ccm 20 %iger Essigsäure behandelt, zum Siedepunkt erhitzt und filtriert. Das Filtrat wurde mit Ammoniak alkalisch gemacht und daß der jetzt entstandene kristallinische Niederschlag von Ammonium-Magnesiumphosphat frei von Xanthinbasen war, wurde durch Verdampfen mit Salpetersäure und Behandlung des Rückstandes mit Ätznatron bewiesen. Der Zusatz von ammoniakalischer Silberlösung zu der von den Phosphatkristallen abfiltrierten Flüssigkeit gab unverzüglich einen reichlichen Niederschlag, während dasselbe Reagens gar keinen Niederschlag gab bei einer Flüssigkeit, die ebenso dargestellt worden war, aber aus einem Material, das gekocht worden war, ehe es bei Körpertemperatur digeriert wurde.

Der Silberniederschlag wurde nach dem von Krüger und Salomon<sup>1)</sup> zur Trennung der Xanthinbasen des Harnes angewendeten Verfahren behandelt. Aus der Xanthinfraktion

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 373.

wurden 2,74 g Xanthinnitrat erhalten, von dem ein Teil in die freie Base verwandelt und analysiert wurde.

- I. 0,2071 g Substanz bedurften 9,74 ccm titrierter Schwefelsäure  
(1 ccm = 0,007814 g Stickstoff),  
II. 0,1843 » » » 8,66 ccm derselben Schwefelsäure.

Berechnet für $C_5H_4N_4O_2$ N 36,84	Gefunden	
	I.	II.
	36,75	36,72

Das Filtrat von dem Xanthinnitrat, in welchem man sowohl Guanin als 1-Methyl-Xanthin<sup>1)</sup> erwarten durfte, wurde mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht. Da es keinen Niederschlag gab, ist die Abwesenheit von Guanin bewiesen.<sup>2)</sup> Die ammoniakalische Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbade zu  $\frac{1}{4}$  ihres Volumens eingedampft, bis sich ein schwach gelblicher Niederschlag bildete. Diese Substanz zeigte bei mikroskopischer Untersuchung kristallinische Plättchen, ohne eine Spur von Atlasglanz. Nach dem Auswaschen mit Wasser und Trocknen mit Alkohol und Äther wogen diese Kristalle 0,225 g. Sie wurden in 4 ccm heißer 3,3 %iger Natronlauge aufgelöst und die Lösung in eine abgekühlte Mischung von  $1\frac{1}{2}$  ccm starker Salpetersäure und  $1\frac{1}{2}$  ccm Wasser geschüttet. Beim Abkühlen schied sich 0,220 g kristallinisches Xanthinnitrat aus, welches in die freie Base übergeführt und analysiert wurde.

0,1137 g Substanz erforderten 5,34 ccm der titr. Schwefelsäure  
(1 ccm = 0,007814 g Stickstoff).

Berechnet für $C_5H_4N_4O_2$ N 36,84	Gefunden
	36,69

Abgesehen von der Analyse zeigt die Schwerlöslichkeit des Nitrats in Salpetersäure zweifellos, daß wir es nicht mit 1-Methyl-Xanthin zu thun haben.

Die saure Flüssigkeit, welche die Basen der Hypoxanthinfraktion enthielt, gab mit Ammoniak einen äußerst geringen flockigen Niederschlag, der keine Xanthinreaktion mit Salpetersäure und Ätznatron ergab. Das Filtrat von diesem Nieder-

<sup>1)</sup> Okerblom, Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 60.

<sup>2)</sup> Daß es ein Beweis ist, wurde an einer Mischung von Xanthin und Guanin gezeigt.

schlag wurde verdampft, um das Ammoniak zu vertreiben, und eine kleine Portion wurde mit einer gesättigten wässerigen Lösung von Pikrinsäure behandelt. Es entstand kein Niederschlag, sondern nur eine Trübung und diese erst auf Zusatz eines großen Überschusses des Reagens. Die Hauptmenge der Flüssigkeit wurde deshalb sogleich mit ammoniakalischem Silbernitrat versetzt, der Silberniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt und der Rückstand bis zur Trockne eingedampft. Das Filtrat von dem Silbersulfid wurde in der nötigen Menge einer heißen Mischung von zehn Teilen starker Salpetersäure und neunzig Teilen Wasser aufgelöst. Beim Abkühlen wurden 0,110 g gut ausgebildete Kristalle in Wetzsteinformen ausgeschieden, welche nur schwache Xanthinreaktion mit Salpetersäure und Natron ergaben. Die Substanz kann nichts anderes als Hypoxanthinnitrat sein.

Wie bekannt, ergibt Thymusnucleinsäure bei Hydrolyse Guanin und Adenin.<sup>1)</sup> Dadurch entsteht natürlich die Frage, ob das durch die Verdauung der Drüse enthaltene Xanthin in irgend einer Weise mit einer Zersetzung der Nucleoproteide der Drüse in Zusammenhang steht. Oder, mit andern Worten, kann nicht in der Drüse, wie Kutscher vermutet, eine besondere Substanz existieren, welche unter dem Einfluß des Enzyms Lysin und Ammoniak gibt, und gleichzeitig Xanthin und Hypoxanthin? Soweit die Xanthinbasen in Betracht kommen, werden die folgenden Resultate die Frage definitiv beantworten. Lysin und die Substanz, die Kutscher als Thymin ansah, werden den Gegenstand einer weiteren Mitteilung bilden.

#### Versuche mit den isolierten Nucleoproteiden.

1 kg präparierter Drüse wurde bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen mit 3<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Liter Wasser, das mit Chloroform gesättigt war. Die trübe Flüssigkeit wurde durch ein Tuch gepreßt und die suspendierten Teilchen so gut als möglich durch Zentrifugieren entfernt. Die Nucleoproteide wurden dann mit Essigsäure ausgefällt und, nachdem die saure

---

<sup>1)</sup> Kossel und Neumann, Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 74.

Flüssigkeit durch Zentrifugieren genau entfernt worden war, in Wasser aufgeschwemmt und durch sorgfältige Beifügung von sehr verdünntem Natriumcarbonat in Lösung gebracht. Eine geringe Menge ungelöster suspendierter Substanz wurde jetzt durch die Zentrifuge entfernt, die Nucleoproteide wurden wieder niedergeschlagen und nach Entfernung der sauren Flüssigkeit durch Zentrifugieren wieder in Wasser aufgeschwemmt und durch Natriumkarbonat in Lösung gebracht. Dieses Verfahren wurde mehrfach wiederholt, bis schließlich eine neutrale opaleszierende Flüssigkeit erhalten wurde, die infolge ihrer Darstellung keinen nennenswerten Betrag von irgend einem Bestandteil der Drüse enthalten konnte, außer den Nucleoproteiden, so daß jedes Produkt der Verdauung einer solchen Lösung (und sowohl die Xanthinbasen als Phosphorsäure wurden erhalten) den Nucleoproteiden zugeschrieben werden muß.

In allen folgenden Experimenten wurde die Fäulnis ausgeschlossen dadurch, daß die Verdauung in geschlossenen Gefäßen bei Gegenwart von Chloroform vorgenommen wurde.

Ein Teil der Nucleoproteidlösung wurde mit Essigsäure schwach angesäuert und fünf Minuten gekocht. Nach acht-tägiger Verdauung bei Körpertemperatur wurde mehr Essigsäure zugesetzt, zum Siedepunkt erhitzt und filtriert. Das Filtrat gab keinen Niederschlag mit Ammoniak und Silbernitrat und auch nicht mit Ammoniak und Magnesiumsulfat.

Ein zweiter Teil der Nucleoproteidlösung wurde deutlich alkalisch gemacht mit Natriumcarbonat und vier Tage bei Körpertemperatur digeriert. Da die Abwesenheit der Xanthinbasen durch die oben beschriebene Methode gezeigt werden konnte, so wurde die Flüssigkeit mit Essigsäure schwach angesäuert und die Verdauung eine Woche lang fortgesetzt. Das Material wurde dann mit Essigsäure versetzt und zum Kochen erhitzt. Die filtrierte Flüssigkeit gab nur eine Trübung mit Silbernitrat und Ammoniak. Dies ist ein Beweis, daß die Wirkungsfähigkeit des Enzyms nicht nur durch die Gegenwart von Alkalien aufgehoben wird, sondern auch daß sie nach Entfernung des Alkalis nicht wiederhergestellt wird. Die Untätigkeit des Enzyms in einer schwach alkalischen Flüssigkeit erklärt wahr-

scheinlich die gänzliche Abwesenheit der Xanthinbasen in der frischen Drüse.

Der Hauptteil der Nucleoproteidlösung wurde mit Essigsäure schwach angesäuert und bei Körpertemperatur in den Thermostaten gestellt. Nach fünfzehn Stunden konnte die Anwesenheit von Xanthinbasen sicher gezeigt werden und nach einer Woche wurde ein reichlicher Niederschlag erzielt durch Zusatz von Ammoniak und Silbernitrat zu einem Teil der Flüssigkeit, aus dem man die Proteide durch Zusatz von Essigsäure und Erhitzen entfernt hatte. Das ganze Material wurde deshalb mit Essigsäure versetzt, zum Kochen erhitzt und nach der Filtration mit Ammoniak alkalisch gemacht. Ein kleiner Teil dieser Flüssigkeit wurde mit Magnesiumsulfat versetzt. Es entstand ein Niederschlag, welcher unter dem Mikroskop die für Magnesium-Ammoniumphosphat charakteristische Form zeigte und auch auf andere Art genügend identifiziert wurde.

Der Rest der ammoniakalischen Flüssigkeit wurde mit einer Lösung von ammoniakalischem Silbernitrat versetzt und der gelatinöse Niederschlag auf Xanthinbasen untersucht. Die Resultate wichen nicht im geringsten von denen mit der ganzen Drüse erzielten ab. Die Abwesenheit von Guanin und Adenin wurde gezeigt und es wurden schließlich 1,75 g Xanthinnitrat und 0,070 g Hypoxanthinnitrat erhalten. Eine Portion des Xanthinnitrats wurde in die freie Base verwandelt und analysiert.

I. 0,2143 g Substanz erforderten 10,09 ccm der titrierten Schwefelsäure  
(1 ccm = 0,007814 g Stickstoff),  
II. 0,2033 » » » 9,54 ccm Schwefelsäure.

Berechnet	Gefunden	
für $C_5H_4N_4O_2$	I.	II.
N 36,84	36,79	36,67

Hier zeigte es sich auch, daß das Filtrat vom Xanthinnitrat noch Xanthin enthielt, wovon 0,110 g wiedererlangt, in der oben beschriebenen Art durch Kristallisation von Salpetersäure gereinigt, wieder in die freie Base übergeführt und analysiert wurden.

0,0831 g Substanz erforderten 3,90 ccm Schwefelsäure  
(1 ccm = 0,007814 g Stickstoff).

Berechnet für $C_5H_4N_4O_2$	Gefunden
N 36,84	36,67

Wenn wir in Betracht ziehen, das aus 10 g Thymusnucleinsäure, die ungefähr 500 g feuchter Drüse entspricht, Kossel und Neumann 0,600 g Guanin und 1,200 g Adenin erhielten, so ist es offenbar, daß das Xanthin, welches durch das Enzym gebildet wird, seinen Ursprung nicht nur den Gruppen in den Nucleoproteiden, welche bei Hydrolyse Guanin geben, verdankt, sondern auch denjenigen, welche Adenin geben. Es scheint deswegen, daß dem Enzym die Funktion zugeschrieben werden muß, sowohl die Amidogruppen als die Wasserstoffatome durch Hydroxylgruppen zu ersetzen.

---