

166. Zur Kenntnis der chemischen Beschaffenheit des Jodthyreoglobulins

von I. Abelin und A. Keller.

(20. IX. 39.)

Die Schilddrüse bildet ein spezifisches jodhaltiges Eiweiss, das den Namen Jodthyreoglobulin trägt. Die wichtigsten jodhaltigen Komponenten dieses Eiweisses, das Thyroxin und das Dijod-tyrosin, sind relativ gut erforscht. Über die Natur des an diese Substanzen gebundenen Eiweisses ist man noch recht ungenügend unterrichtet. Die letzten Jahre brachten allerdings gewisse Fortschritte auf diesem Gebiete. Es konnten vorerst bessere Darstellungsmethoden des Jodthyreoglobulins ausgearbeitet werden (*Barnes, Carlson und Riskin*¹), *Heidelberger und Palmer*²), *Cavett, Rice und McClendon*³) u. a.). Im Anschluss daran wurde es auch möglich, einiges über das Molekulargewicht und die Struktur dieses Schilddrüsenproteins zu erfahren (*Brand, Kassel und Heidelberger*⁴)). Nach den Befunden von *Heidelberger* und Mitarbeitern beträgt das Molekulargewicht des Thyreoglobulins etwa 675 000. Die Molekel besteht wahrscheinlich aus ca. 5760 Aminosäureresten, welche auf 10 „Einheiten“ zu je 576 Aminosäuren verteilt sind. Jede solche „Einheit“ besteht ihrerseits aus 240 Cystein-, 60 Methionin-, 60 Tryptophan-, 110 Tyrosin, 10 Dijod-tyrosin-, 2 Thyroxin- und 80 Glycosaminmolekeln. Eine genauere Kenntnis des Schilddrüsenoglobulins ist um so wichtiger, als ja mehrfacher Grund zur Annahme vorliegt, dass das Thyroxin nicht als Einzelmolekel, sondern als Bestandteil eines Eiweisskomplexes zur Wirkung gelangt. Das Thyroxin erinnert in dieser Beziehung an manche andere Wirkstoffe, bei welchen erst die Vereinigung mit dem Protein die volle Aktivität ermöglicht. Man kann sich dann fragen, ob nicht etwa auch die Art des an das Thyroxin bzw. Dijod-tyrosin gebundenen Schilddrüsen-eiweisses biologisch von Bedeutung ist. Erweist sich die Eiweisskomponente des Jodthyreoglobulins als eine kaum veränderbare Substanz, dann sind die physiologischen Variationen nur auf den jodhaltigen Anteil zurückzuführen. Ist aber das Thyreoglobulin ebenso wie das Serumglobulin⁵), Serumalbumin⁶),

¹) B. O. Barnes, A. J. Carlson und A. M. Riskin, Am. J. Physiol. **98**, 86 (1931).

²) M. Heidelberger und W. W. Palmer, J. Biol. Chem. **101**, 433 (1933); J. Gen. Physiol. **19**, 95 (1935).

³) J. W. Cavett, C. O. Rice und McClendon, J. Biol. Chem. **110**, 673 (1935); **114**, 65 (1936).

⁴) E. Brand, B. Kassel und M. Heidelberger, J. Biol. Chem. **128**, XI (Proc.) (1939).

⁵) S. Sørensen, Compte rendu trav. lab. Carlsberg **15**, 9 (1925).

⁶) L. F. Hewit, Biochem. J. **30**, 2227 (1936); **32**, 26 (1938).

Casein¹⁾ und manche andere Proteine kein einheitlicher Körper, dann muss auch die chemische Natur dieses Schilddrüseneiweisses in Betracht gezogen werden. Einen Beitrag zu diesem Problem liefert die vorliegende Abhandlung.

Es wurde der Versuch einer Zerlegung des Jodthyreoglobulins unternommen. In der Literatur findet sich u. W. nur eine einzige hier in Betracht fallende Arbeit von *Blum, Lehmann* und *Leistner*²⁾ über die Gewinnung jodreicherer Produkte aus dem Thyreoglobulin. Durch Benutzung von Fällungen bei verschiedenen Salzkonzentrationen konnten die Autoren den üblichen Jodgehalt des Thyreoglobulins von etwa 0,4—0,5 % auf 0,7 % und in einzelnen Fällen sogar auf 1,2 % steigern. Die jodreicheren Produkte erwiesen sich wirksamer als die entsprechenden jodärmeren. Die hier durchgeführten Experimente zielten nicht auf die Gewinnung eines möglichst jodreichen und aktiven Thyreoglobulins, sondern auf die Auffindung von Methoden einer schonenden Analyse der komplizierten Thyreoglobulinmolekel. Eine Aufspaltung des Jodthyreoglobulins in einzelne ziemlich gut definierbare Gruppen erwies sich tatsächlich als durchführbar, und zwar auf verschiedenen Wegen, die noch weiter verfolgt werden. Hier soll eine dieser Methoden beschrieben werden.

Experimenteller Teil.

Fraktionierung des Jodthyreoglobulins.

Eine Lösung von Jodthyreoglobulin wird bei verschiedenem p_H fraktioniert, wobei Eiweissniederschläge mit verschiedenem Jod- und Thyroxingehalt erhalten werden. Im einzelnen verfährt man wie folgt:

Möglichst sofort nach dem Schlachten herauspräparierte und bei Eisschranktemperatur aufbewahrte Schilddrüsen vom Rind, Schaf oder Schwein werden von Fett und Bindegewebe befreit und fein zerkhackt. Der so gewonnene Gewebsbrei wird mit dem gleichen Volumen einer alkalischen Kochsalzlösung übergossen und 3 Stunden im Schüttelapparat bei Zimmertemperatur extrahiert. Als Extraktionsflüssigkeit benutzt man eine Lösung von 1 % Kochsalz, welche 0,02 % Natronlauge enthält. Man coliert den Auszug durch ein Tuch, presst den Rückstand aus und extrahiert ihn in gleicher Weise nochmals drei Stunden lang. Die vereinigten Filtrate werden mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung versetzt, 24 Stunden stehen gelassen, zentrifugiert und der Thyreoglobulinniederschlag bis zur Befreiung von Ammoniumsulfat dialysiert. Als Konservierungsmittel kann Tricresol benutzt werden. Die im Dialysierschlauch zurückbleibende Lösung wird filtriert und zuerst auf ein $p_H = 6$ gebracht. Beim Stehen scheidet sich ein feinflockiger Niederschlag aus, der abfiltriert wird. Er enthält gewöhnlich 0,20—0,25 % Jod (Fraktion I). Das Filtrat dieser Fällung wird bis zu einem $p_H = 4$ angesäuert. Dabei entsteht erneut eine Eiweissfällung, deren Jodgehalt denjenigen der Fraktion I übersteigt. Er beträgt gewöhnlich etwa 0,4 % (Fraktion II).

¹⁾ *E. Cherbuliez, M. L. Schneider* und *Fr. Meyer*, *Helv.* **15**, 597 (1932); **16**, 600 (1933).

²⁾ *F. Blum, F. A. Lehmann* und *W. Leistner*, *Endocrinologie* **13**, 250 (1933).

Bei einigen Schilddrüsenauszügen ergibt die Fällung bei einem $p_H = 6$ ein Produkt, das bloss 0,1—0,14% Jod enthält (Fraktion III).

Die so erhaltenen Eiweissfällungen sind in Wasser löslich und geben die üblichen Protein- und Jodreaktionen. Zwecks weiterer Reinigung werden die Niederschläge in Wasser bei Zusatz von ganz wenig Natronlauge aufgelöst, wieder bei den entsprechenden p_H gefällt, die Fällungen scharf abzentrifugiert, mit Alkohol oder Aceton denaturiert, gut ausgewaschen und nach dem Trocknen mit Äther oder Petroläther entfettet.

Die Bestimmung des Gesamtjods nach *Kendall*¹⁾ und des Thyroxinjods nach *Blau*²⁾ ergab bei den einzelnen Fraktionen folgendes Resultat:

	Gesamtjod- gehalt	Thyroxinjod in % des Gesamt- jodgehaltes
Fraktion I	0,28%	21,19%
Fraktion II	0,41%	19,80%
Fraktion III	0,14%	19,54%

Beachtenswert bei diesen Zahlen ist erstens, das gegenseitige Verhältnis des Gesamtjodgehaltes der einzelnen Fraktionen. Benutzt man den Jodgehalt der Fraktion III (0,14%) als Vergleichseinheit, so enthält die Fraktion I die doppelte und die Fraktion II die dreifache Menge davon. Im Gegensatz zu den schwankenden Gesamtjodwerten ist der prozentuelle Thyroxinjod-Gehalt der einzelnen Fraktionen auffallend übereinstimmend und schwankt nur innerhalb relativ enger Grenzen. So weisen die Fraktion II mit dem höchsten und die Fraktion III mit dem niedrigsten Jodwert praktisch den gleichen prozentuellen Thyroxinjod-Gehalt auf (19,80 und 19,54%). Der Thyroxinjod-Gehalt des Thyreoglobulins beträgt gewöhnlich ebenfalls 20—25% des Gesamtjods. Die Eiweissjodierung scheint allgemein so zu verlaufen, dass etwa $\frac{1}{5}$ bis höchstens $\frac{1}{4}$ der gesamten aufgenommenen Jodmenge der Thyroxinbildung dient.

Bei der biologischen Prüfung der gewonnenen drei Substanzen wurden zwei Fragen verfolgt. Erstens, der Zusammenhang zwischen dem Jodgehalt und der Wirksamkeit der einzelnen Fraktionen. Zweitens, die Möglichkeit eines physiologischen Zusammenwirkens der einzelnen Jodbestandteile in der Gesamtmolekel des Thyreoglobulins.

ad 1) Die vergleichende Prüfung der biologischen Aktivität der drei Fraktionen erfolgte im Grundumsatzversuch an der Ratte. Jede der drei Substanzen wurde an je zwei Ratten verfüttert, die dargereichten Gesamtjodmengen waren in allen Versuchen ganz gleich. Die Wirkung der Fraktionen II und III stimmt praktisch gut miteinander überein. Die Fraktion I wirkte dagegen bedeutend

¹⁾ E. C. Kendall, Am. Soc. **34**, 894 (1912).

²⁾ N. T. Blau, J. Biol. Chem. **102**, 269 (1933); **110**, 351 (1935).

stärker und rascher. Eine direkte strenge Beziehung zwischen Wirksamkeit und Jodmenge liess sich somit nicht feststellen (vgl. Fig. 1). Analoge Erfahrungen wurden auch bei der Verfütterung von Schilddrüsengewebe gemacht, wo der Jodgehalt keinen zuverlässigen Massstab des physiologischen bzw. therapeutischen Effektes darstellt.

ad 2) An Hand eines Gemisches aus den Substanzen I und II wurde die Frage geprüft, ob sich etwa die einzelnen Fraktionen in ihrer Wirkung gegenseitig unterstützen. Die benutzte Mischung bestand aus drei Teilen der Fraktion II mit vier Teilen der Fraktion I; der Jodgehalt derselben betrug 0,33%. Wie Fig. 1 zeigt, wirken 50 mg dieser Kombination schneller und stärker als die gleiche Menge der Fraktion II mit ihrem höheren Jodgehalt von 0,41%. Die Tiere dieser Versuchsreihe verloren durchschnittlich im Laufe von 14 Tagen 29 g ihres Körpergewichtes. Die mit den Fraktionen I oder II behandelten Ratten verloren im gleichen Zeitabschnitt 11 bzw. 13 g. Die Mischung aus den Fraktionen I und II bewirkte ferner eine durchschnittliche Erhöhung der Atemfrequenz pro Minute von 88 auf 126; die Fraktionen I bzw. II steigerten dagegen die Atemfrequenz im Durchschnitt von 84 auf 97 pro Minute.

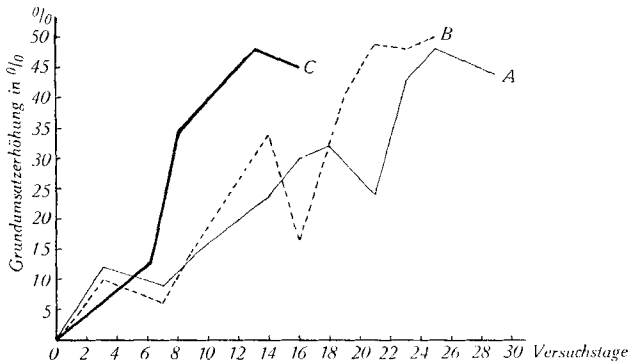


Fig. 1.

Kurve A. Wirkung der Jodthyreoglobulinfraktion II auf den Grundumsatz von Ratten. Tägliche Eingabe von 50 mg dieser Substanz, entsprechend 205 γ Jod. Mittelwerte von 2 Versuchsserien.

Kurve B. Wirkung der Thyreoglobulinfraktion III auf den Grundumsatz von Ratten. Tägliche Eingabe von 150 mg dieser Substanz entsprechend 210 γ Jod. Mittelwerte von 2 Versuchsserien.

Kurve C. Wirkung der Mischung der Fraktionen I und II auf den Grundumsatz von Ratten. Tägliche Eingabe von 50 mg dieser Mischung entsprechend 168 γ Jod, davon 96 γ Jod als Fraktion I und 72 γ Jod als Fraktion II. Mittelwerte von 2 Versuchsserien. Trotz geringerer Jodzufuhr wirkt diese Kombination stärker und schneller als die Einzelfraktionen des Jodthyreoglobulins.

Wie bei den einzelnen Fraktionen (s. Fig. 1), richtet sich auch bei den Kombinationen derselben die physiologische Aktivität nicht

nach dem absoluten Jodgehalt. Die Wirkung des Jodthyreoglobulins lässt sich nicht als eine blosse Summe der physiologischen Effekte seiner jodhaltigen Einzelbestandteile auffassen. Die bekannten wechsellvollen Wirkungen der einzelnen Schilddrüsenproben bei gleichem Jod- und sogar bei gleichem Thyroxingehalt könnten unter diesem Gesichtspunkte ihre teilweise Erklärung finden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Jodthyreoglobulin genau so wie viele andere Proteine kein einheitlicher Eiweissstoff ist. Das globulinartige Schilddrüsen-eiweiss liess sich bis jetzt in drei getrennte Fraktionen zerlegen. Jede derselben enthält organisch gebundenes Jod; dessen Menge wechselt aber von Fraktion zu Fraktion. Jede der bis jetzt untersuchten Fraktionen enthält auch Thyroxin. Das in Form von Thyroxin gebundene Jod macht in allen Fällen rund 20% des Gesamtjods aus.

Die einzelnen gewonnenen Thyreoglobulinfraktionen sind biologisch aktiv, doch nicht in gleichem Ausmasse. Der Grad der bewirkten Grundumsatzerhöhung geht dem Jod- bzw. Thyroxingehalte nicht streng parallel. Die Natur des mit dem Thyroxin vereinigten Eiweisses scheint physiologisch ebenfalls von Bedeutung zu sein.

Universität Bern, Physiologisches Institut.

167. Beitrag zur chromatographischen Methode in der anorganischen Chemie

von H. Erlenmeyer und H. Dahn.

(29. IX. 39.)

Die Trennung anorganischer Kationen und Anionen auf chromatographischem Weg ist zuerst von *G. M. Schwab* und seinen Mitarbeitern¹⁾ beschrieben worden. Als Adsorptionsmittel kamen hauptsächlich Aluminiumoxydpräparate zur Verwendung und, wo es nötig war, wurden die adsorbierten Ionen durch weitere Reagentien entwickelt, d. h. in farbige Verbindungen übergeführt.

Im Folgenden wollen wir über einige Versuche berichten, aus denen hervorgeht, dass 8-Oxychinolin als Adsorbens gleichfalls die Möglichkeit zur chromatographischen Trennung von Ionen bietet. Als Adsorptionsgefässe wurden kleine 5–8 cm lange Rohre mit 0,3 cm innerer Weite benützt. Auf einem am unteren Ende angebrachten Wattebausch wurde das Adsorptionsmittel unter Schütteln

¹⁾ *G. M. Schwab* und *K. Jockers*, *Z. angew. Ch.* **50**, 546, 691 (1937); *G. M. Schwab* und *G. Dattler*, *Z. angew. Ch.* **51**, 709 (1938); *G. M. Schwab*, *Physikal. Methoden der analytischen Chemie III*, S. 60 (1939).