

18. Zur Kenntnis der aktiven jodhaltigen Eiweißstoffe der Schilddrüse

von H. Isliker und I. Abelin.

(II. XII. 48.)

Das organisch gebundene Jod der Schilddrüse verteilt sich auf 2 Aminosäuren, die peptidartig im Sekret-Eiweiss, dem Thyreoglobulin, eingebaut sind und die sich nach Hydrolyse voneinander trennen lassen: die bei p_H 5 lösliche Fraktion enthält Dijodtyrosin (ca. 60% des Gesamtjodes), während in den unlöslichen Bestandteilen das Thyroxin angereichert ist¹).

Die Isolierung dieses hochwirksamen Produktes hat das Interesse vom nativen, unangebauten Eiweiss abgelenkt. Die klinischen Erfahrungen indessen, wonach Thyroxin nicht imstande ist, die Wirkung von Schilddrüsenpulver voll zu ersetzen, machen eine Erforschung des Thyroxineiweisses wünschenswert²).

In höherem Masse als beim Thyroxin scheinen solche Unterschiede beim Dijodtyrosin vorzuliegen, dem man lange lediglich die Rolle einer inaktiven Vorstufe des Thyroxins zuschrieb. Erst 1931 gelang der Nachweis³), dass Dijodtyrosin zwar nicht auf den myxödematösen, wohl aber auf den hyperthyreoidisierten Organismus im Sinne einer Besserung wirke. Von dieser gegenüber Thyroxin antagonistischen Wirkung wurde bei der Behandlung der Basedow'schen Krankheit Gebrauch gemacht. In der Folge liess sich zeigen, dass aus Schilddrüsen hergestelltes Dijodtyrosinpepton die Aktivität des reinen Dijodtyrosins sogar übertrifft⁴). — Dieses Verhalten erinnert an die Ergebnisse der Fermentchemie. Für die Fermentwirkung sind 2 Faktoren verantwortlich: der meist niedermolekulare, spezifisch gebaute Co-Fermentanteil entfaltet seine volle Wirksamkeit erst in Verbindung mit einem hochmolekularen eiweissartigen Träger, dem Apo-Ferment. Es besteht kein Grund, warum ein ähnliches Prinzip nicht auch bei hormonartigen Stoffen verwirklicht wäre: das Dijodtyrosin — die spezifische Gruppe — könnte in Analogie dazu als Co-Hormon, das Globulin — die Trägersubstanz — als Apo-Hormon bezeichnet werden.

Über die Natur der im Organismus zur Wirkung gelangenden Formen des Schilddrüsenhormones herrschen unklare Vorstellungen⁵),

¹) *Harington*, Bioch. J. **20**, 293 (1926).

²) *Thompson* und Mitarbeiter, Arch. Intern. Med. **52**, 576 (1934).

³) *Abelin*, Klin. Wschr. **10**, 2205 (1931); Bioch. Z. **286**, 160 (1936).

⁴) *Abelin*, *Rauch*, Diss. Bern (1945).

⁵) *Roche* und *Michel*, Exp. annuels Bioch. Méd. **9**, 166 (1948).

namentlich darüber, ob die ursächlich mit der Schilddrüse in Zusammenhang stehenden Erkrankungen lediglich auf einen Verlust bestimmter Überwachungsmechanismen der Hormonsezernierung oder auch auf eine Änderung der Hormonbeschaffenheit, z. B. der Eiweiss-Komponente, zurückzuführen sind.

Es ist unwahrscheinlich, dass das Thyreoglobulin (Molekulargewicht: 675 000) als solches in die Zelle eindringt und dort zur Wirkung gelangt; möglicherweise wird es vorher durch Gewebsproteasen gespalten; bis zu welchem Grade entzieht sich jedoch unserer Kenntnis. Freies Thyroxin bzw. Dijodtyrosin konnte noch nie im Blut nachgewiesen werden.

Das bisher untersuchte säurelösliche Dijodtyrosinpepton ist ein Gemisch einer beträchtlichen Anzahl von Polypeptiden mit mehr oder weniger hohem Jodgehalt. Dasselbe gilt für die säureunlösliche, thyroxinhaltige Fraktion.

Wir stellten uns bei der Inangriffnahme unserer Arbeit folgende Aufgaben:

1. Die Vollziehung einer schonungsvollen Trennung der beiden Schilddrüsenhormone.

2. Die Isolierung eines möglichst einheitlichen, hochaktiven Dijodtyrosin-Polypeptides aus der „säurelöslichen Fraktion“. Wegleitend hierbei sollte die chemische Analyse und die Prüfung der grundsatzsenkenden Wirkung bei hyperthyreotischen Versuchstieren sein.

3. Die Darstellung eines möglichst einheitlichen Thyroxin-Polypeptides aus der „säureunlöslichen Fraktion“ und die Bestimmung der biologischen Aktivität desselben im Vergleich mit dem völlig abgebauten Produkt, dem kristallisierten Thyroxin, und dem ungebauten Schilddrüsenpulver. Aus den Versuchsdaten sollte abgeleitet werden, ob Thyroxin durch die Bindung an eine Trägersubstanz eine ähnliche Wirkungssteigerung wie Dijodtyrosin erfährt.

I. Gewinnung und Untersuchung der Dijodtyrosinhaltigen Fraktion des Schilddrüsen-eiweisses.

A. Abtrennung und Reinigung der säurelöslichen Anteile des Thyreoproteins.

Die Aufarbeitung der Schilddrüsen zerfällt in folgende Stufen:

1. Die Herstellung eines Auszuges, der alle physiologisch aktiven Komponenten enthält. Da dieselben jodhaltig sind, hat man in der Jodbestimmung¹⁾ ein bequemes Orientierungsmittel zur Hand. In Anpassung an den Globulincharakter des Sekretes dient als Extraktionsflüssigkeit verdünnte Salzlösung.

2. Die Gewinnung des Thyreoglobulins erfolgt durch Ansäuern auf ein p_H von 5,0, worauf das Schilddrüsen-eiweiss nach Zusatz von Natriumsulfat leicht filtrierbar ausflokt²⁾.

¹⁾ Kendall, J. Biol. Chem. **43**, 148 (1920).

²⁾ Harington und Salter, Bioch. J. **24**, 456 (1930).

3. Eine selektive Spaltung des Thyreoglobulins in Dijodtyrosin- und Thyroxin-eiweiss ist bei Anwendung von Säuren oder Basen nicht durchführbar; neben Razemisierung tritt auch an anderen Stellen der Molekel Hydrolyse ein. Die grösste Aussicht auf Erfolg verspricht die Spaltung mit Hilfe proteolytischer Enzyme; Abspaltung von reinem Dijodtyrosin tritt nicht ein: an jodierten Caseinen konnte festgestellt werden, dass die Fermentwirkung von Trypsin mit zunehmendem Jodgehalt des Eiweisses abnimmt¹⁾.

4. Die Trennung der Peptide in einen säureunlöslichen, thyroxinhaltigen und einen säurelöslichen, diiodtyrosinhaltigen Anteil bei p_H 5,0 beruht auf der Verschiedenheit der isoelektrischen Punkte der beiden Fraktionen.

5. Die Isolierung eines einheitlichen Dijodtyrosin-Thyreopeptides. Die meisten Operationen zielen darauf hin, mit Schwermetallfällungen entweder die jodfreien, evtl. jodarmen Fraktionen zu entfernen (Uranylacetat)²⁾, oder die jodreichen Fraktionen zur Abscheidung zu bringen (Silbernitrat, basisches Bleiacetat). Ferner wird die hohe Löslichkeit diiodtyrosin-enthaltender Peptide in n-Butanol zu ihrer Trennung von anderen Eiweissabbauprodukten herangezogen.

1. Herstellung eines Schilddrüsenauszuges. 1 kg frische, von Fett und Bindegewebe befreite Rinderschilddrüsen wurden bei -20^0 eingefroren und in einer Turmixmaschine vermahlen. Die Extraktion erfolgte mit 1 Liter 1-proz. Natriumchloridlösung, deren p_H mit 0,02-proz. Natriumhydroxyd auf 8 eingestellt war. Die Masse wurde nach Zusatz einiger Tropfen Toluol über Nacht in den Eisschrank gestellt, anderntags 2 Stunden geschüttelt, durch Gaze filtriert und der Rückstand erneut extrahiert. Die aus 2 Ansätzen vereinigten Auszüge (4200 cm^3) enthielten 0,398 g J und 24,3 g N, entsprechend 152,1 g Eiweiss. Der Jodgehalt betrug somit 0,26%.

Zur Fällung des Thyreoglobulins wurde unter energischem Rühren tropfenweise 1-n. Schwefelsäure zugesetzt; die Acidität wurde nach Zugabe von 42 g (= 1%) Na_2SO_4 elektrometrisch kontrolliert, da sich das Thyreoglobulin nur bei genauer Einhaltung von p_H 5,0 innert weniger Stunden zu Boden setzt. Der nach Filtration erhaltene feuchte Niederschlag (850 g), der das gesamte im Auszug vorhandene Jod enthielt, wurde in 4 Liter Wasser suspendiert und

2. der Einwirkung von Pepsin unterzogen. Mit 1-n. Salzsäure wurde das p_H auf 1,6 gebracht und die Suspension 2 Tage bei 37^0 belassen. Die Aufspaltung der Peptidbindungen führt zur Freisetzung von Aminogruppen und damit zu einer Verschiebung des p_H gegen den Neutralpunkt; durch Zusatz von Säure wurde dafür gesorgt, dass das Wirkungsoptimum des Pepsins erhalten bleibt. Nach erneutem Pepsinzusatz (0,5%) und weiteren 24 Stunden wurde mit 4-n. Natronlauge ein p_H von 5,0 eingestellt, der auftretende Niederschlag abfiltriert und zur völligen Abtrennung noch gebundener Reste von Dijodtyrosinpepton bei p_H 8 und 37^0

3. der Einwirkung von Trypsin (0,2%) unterworfen. Das p_H -Optimum muss 2mal täglich eingestellt werden, wobei das Hydrolysat jedesmal energisch zu schütteln ist. Nach 48 Stunden erfolgte erneute Zugabe von Trypsin. Da bei längerer Einwirkung Jod aus organischer Bindung freigesetzt wird, muss die Dauer der tryptischen Verdauung auf ein Minimum beschränkt werden. Um den Verlauf der hydrolytischen Spaltung zu überblicken, wurde das Freiwerden der Aminogruppen zeitlich quantitativ verfolgt: in bestimmten Zeitintervallen wurden dem Reaktionsgemisch Proben von 1 cm^3 entnommen und nach der Methode von *Pope* und *Stevens*³⁾ der Amino-Stickstoffgehalt bestimmt.

Eine geringe Abnahme des Amino-N in der Endphase wurde in fast allen Ansätzen beobachtet. Aus dem Diagramm ist ersichtlich, dass der tryptische Abbau praktisch nach 75 Stunden beendet ist. Das Hydrolysat wurde mit 4-n. Schwefelsäure auf p_H 5,0 gebracht, der entstandene Niederschlag nach 12 Stunden filtriert und das Filtrat mit der säurelöslichen Fraktion der Pepsinverdauung vereinigt.

1) *Abelin* und *Tenger*, Diss. Bern (1946).

2) *Harington* und *Randall*, *Bioch. J.* **25**, 1032 (1931).

3) *Pope* und *Stevens*, *Bioch. J.* **33**, 1070 (1939).

Der thyroxinhaltige Rückstand wurde gewaschen und analysiert: 90,1% des Gesamtjodes sind darin in Form von Thyroxin-Jod gebunden.

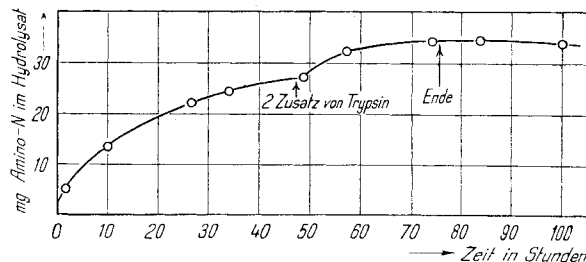


Fig. 1.

Verlauf der Trypsinverdauung.

Die vereinigten Filtrate (Ausgangslösung A) enthalten 0,205 g J in Form von Dijodtyrosin, 8,1 g N und 0,55 g Amino-N, entsprechend einem molaren N/Dijodtyrosin-Verhältnis (2 N/J in Molen) von 714. Diese Zahl gibt angenähert an, wie manche Aminosäure auf eine Molekel Dijodtyrosin zu stehen kommen. Sie wird in unserem Fall etwas zu gross ausfallen, da sie auf der hier nicht zutreffenden Voraussetzung beruht, dass jede Aminosäuren-Molekel nur 1 Atom Stickstoff enthält. Indessen hat sich diese Verhältniszahl für spätere Betrachtungen als nützlich erwiesen, da sie sich bei fortgesetzter Reinigung asymptotisch einem Minimalwert nähert: dem Wert für das reine Peptid.

Zwecks besserer Übersicht soll die nun folgende, immer wieder modifizierte Aufarbeitung der säurelöslichen Bestandteile schematisch wiedergegeben werden (Tab. I).

4. Schwermetallsalzfällungen: Der uranhaltige Rückstand wurde jodfrei gewaschen; ein allfälliger Uranüberschuss kann aus dem Filtrat durch Fällung mit Ammoniak entfernt werden. Aus der Silberfällung lassen sich die diiodtyrosinhaltigen Peptide durch Herauslösen mit 1-n. Salpetersäure vom anorganischen Jod abtrennen. Wegen des hohen Chloridgehaltes wurde in einem aliquoten Teil (Lösung B) die Trennung von den Salzen durch

5. Dialyse bewerkstelligt. Die Verteilung des Jodes, der Polypeptide und der niedermolekularen Eiweissabbauprodukte ist aus der Tabelle 2, S. 120, zu entnehmen.

a) Im Dialyserückstand ist kein anorganisches Jodid mehr vorhanden. Das Jod befindet sich hier in Form von Dijodtyrosinpeptonen.

b) In der wässrigen Phase des mit Butanol ausgeschüttelten Dialysats kann das Jod nur als anorganisches Jodid vorkommen. Die Ninhydrinprobe fällt sehr schwach positiv aus.

c) In der Butanol-Phase muss sämtliches ins Dialysat gewanderte organisch gebundene Jod vorhanden sein, wahrscheinlich in Form niedermolekularer Dijodtyrosinpeptone. (Jodid ist in Butylalkohol schwer löslich.)

Der Dialyserückstand, der die wertvollen Bestandteile enthält, wird wie in Tab. 3, S. 121, beschrieben zum Präparat P_D verarbeitet.

Mit einem Teil der Lösung B wurde geprüft, ob sich das organisch gebundene Jod quantitativ durch

6. kontinuierliche Extraktion mit n-Butylalkohol ausziehen lässt. Wegen des hohen Siedepunktes des n-Butanols ($t_s = 118^\circ$), wurde die Extraktion im Vakuum 2mal 10 Stunden durchgeführt.

Die eingedampfte Butanol-Phase hinterliess einen fast farblosen, stark diiodtyrosinhaltigen Rückstand. Dieser wurde, wie in Tab. 3, S. 121, (rechts) beschrieben, mit Uranacetat und basischem Bleiacetat gereinigt und lieferte das Präparat P_B.

Tabelle 1.

Isolierung eines dijodtyrosinhaltigen Thyreozeptons aus dem Schilddrüseniweiss. Aufarbeitung der Ausgangslösung A (säurelösliche Anteile der Pepsin- und Trypsin-verdauung).

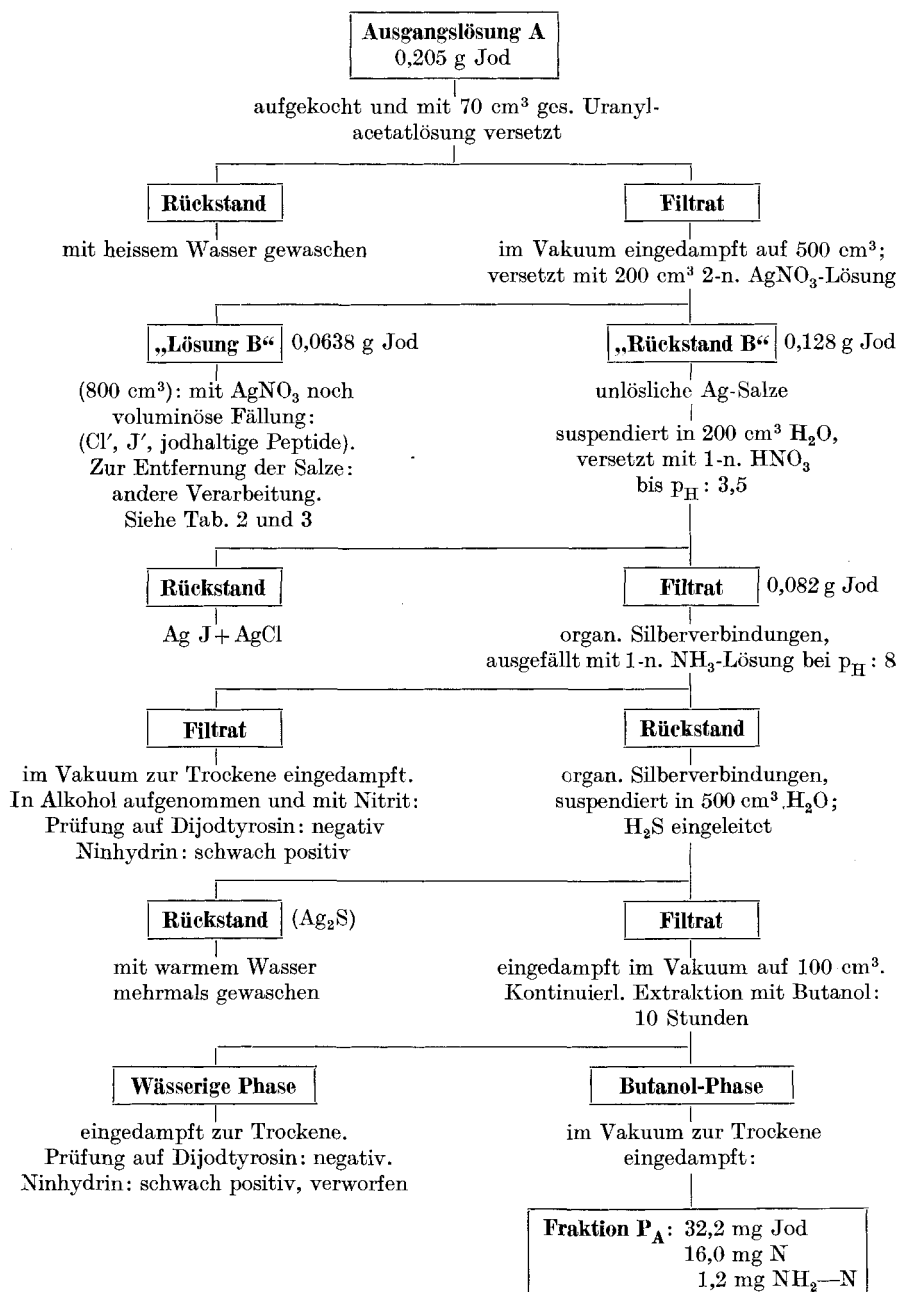
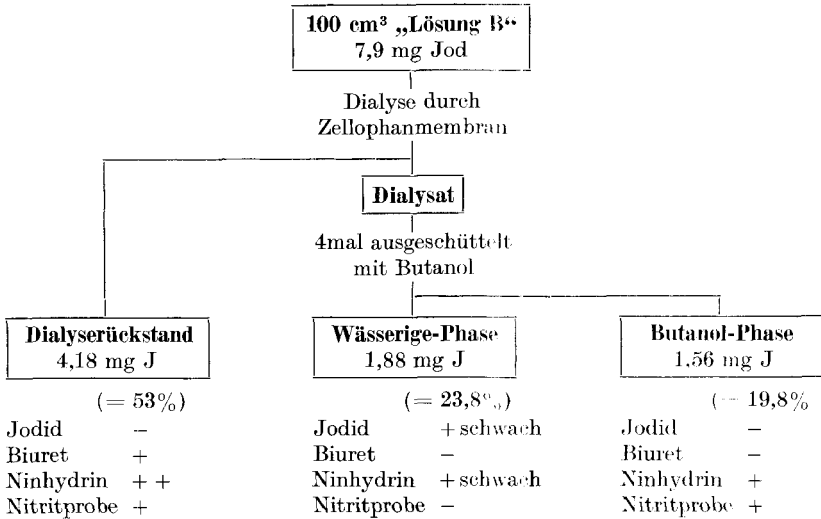


Tabelle 2.

Verarbeitung der „Lösung B“ (800 cm³).
Vorversuche.



7. Extraktionsversuche mit Aceton-Wassermischungen hatten zum Zweck, die Ausbeute an aktivem Material zu erhöhen. Das von *Harington*¹⁾ bei der Reinigung der thyroxinhaltigen Peptide verwendete Verfahren liess sich indessen nicht auf die Dijodtyrosinfraktion übertragen:

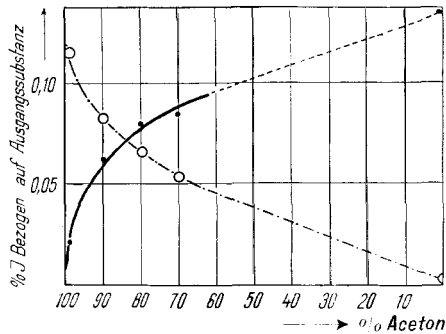


Fig. 2.

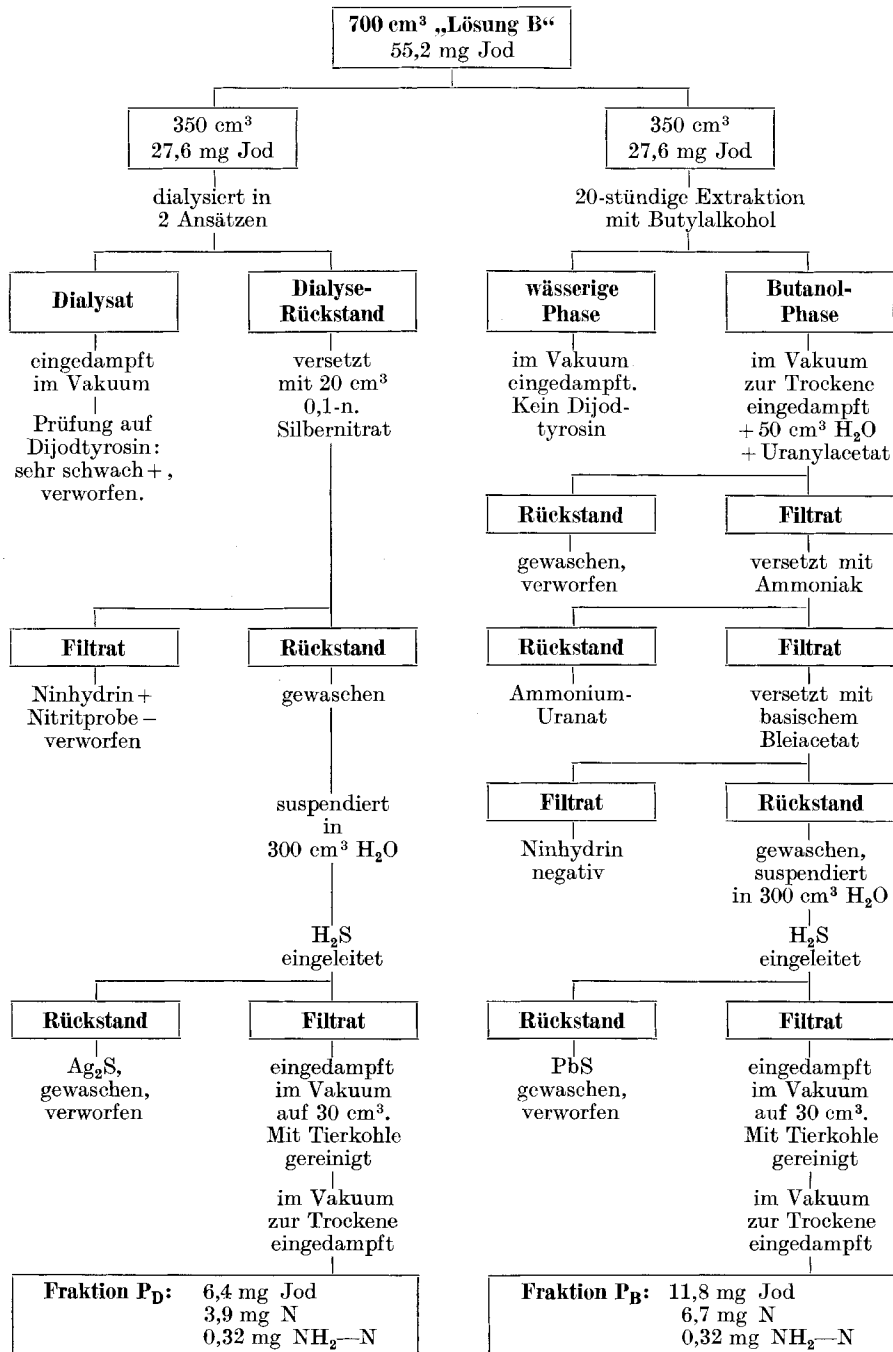
Jodverteilung auf den Auszug (—•—) und
den Rückstand (---○---)
in Abhängigkeit von der Acetonkonzentration.

Die N-Analyse erwies, dass auch innerhalb der Fraktionen keine Jodanreicherung erzielt werden konnte. Ebenso erfolglos waren

8. Extraktionsversuche mit alkoholischer Kalilauge: Die absolute und relative Jodzunahme im Auszug ist gering.

¹⁾ *Harington* und *Salters*, *Bioch. J.* **24**, 456 (1930).

Tabelle 3.
Aufarbeitung der „Lösung B“ (vgl. Tabelle 1)



Besprechung der Resultate.

Die Ausgangslösung A enthielt	205,0 mg Jod
Davon konnte zurückgewonnen werden in den Endprodukten:	
Präparat P _A (aus Ag-Fällung)	32,2 mg Jod
Präparat P _B (aus Butanolauszug)	11,8 mg Jod
Präparat P _D (aus Dialyserückstand)	6,4 mg Jod
aus Dialysevorversuchen	7,7 mg Jod
Total	<u>58,1 mg Jod</u>

28,4% des Jods der Ausgangslösung A finden sich somit in den Endprodukten wieder, 71,6% gehen verloren. In Tab. 4 sind die Jodausbeuten der 3 Verfahren gesondert wiedergegeben.

Tabelle 4.

Übersicht der Ausbeuten an jodhaltiger Substanz bei den verschiedenen Verfahren.

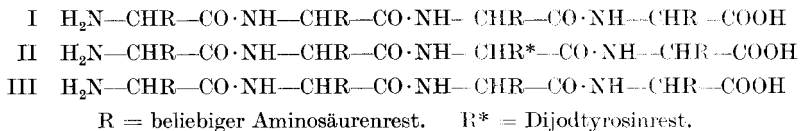
	Ausbeute (bezogen auf J)	Bezogen auf Fraktion	Enthaltend
P _A	25,1%	Rückstand B	128 mg Jod
P _B	42,7%	350 cm ³ Lösung B	27,6 mg Jod
P _D	23,2%	350 cm ³ Lösung B	27,6 mg Jod

Daraus geht hervor:

- a) Die Fällung mit Silbernitrat führt zu hohen Verlusten. In Modellversuchen wurde festgestellt, dass Silbernitrat selbst bei geringer Salpetersäurekonzentration (p_H 4,8) Jod aus dem organischen Molekelverband herauszuspalten vermag.
- b) Die Dialyse führt nicht zur einwandfreien Trennung, da die Membran für niedermolekulare Peptone durchlässig ist (vgl. Tab. 2).
- c) Die Extraktion mit Butanol liefert die besten Resultate.
- d) Die Fällung mit basischem Bleiacetat hat bei Fraktion P_B nur zu geringen Verlusten geführt.

Das wichtigste Kriterium für die Verwendbarkeit einer Isolierungsmethode ist der Reinheitsgrad der erhaltenen Präparate.

Aus der Gegenüberstellung des N/J- und des N/Amino-N-Verhältnisses (in Molen ausgedrückt) lassen sich diesbezüglich weitgehende Schlüsse ziehen: wir gehen nicht weit fehl, wenn wir annehmen, dass sich unser fermentativ abgebautes Pepton vor der Reinigung aus einer Anzahl gleich langer Peptidketten aufbaute, von denen eine oder mehrere Dijodtyrosin enthielten, etwa nach folgendem Schema:



Unter dieser Voraussetzung bleibt das Verhältnis N/Amino-N annähernd konstant, auch wenn wir im Verlauf einer Reinigungsoperation die inaktiven, jodfreien Ketten I und III entfernen. Wir finden tatsächlich experimentell bei der Ausgangslösung A (vgl. S. 119) ungefähr dasselbe Verhältnis wie bei den gereinigten Endprodukten.

Tabelle 5.

Gegenseitiges Mengenverhältnis zwischen Stickstoff und Jod bei den einzelnen dijodtyrosinhaltigen Präparaten.

	$\frac{N}{\text{Amino-N}}$	$\frac{2N}{J}$ (in Molen)
In „Ausgangslösung A“	14,7	714
In P _A	13,6	9,0
In P _B	10,8	10,2
In P _D	12,2	11,0

Anders verhält es sich mit dem molaren N-Dijodtyrosinverhältnis, welches sich aus der Formel

$$2 \frac{(\text{Atomgewicht J}) \cdot g \text{ Stickstoff}}{(\text{Atomgewicht N}) \cdot g \text{ Jod}}$$

berechnen lässt (vgl. S. 118).

Es lässt sich ohne weiteres ableiten, dass sich dieses Verhältnis beim Eliminieren jodfreier Ketten im Verlaufe der Isolierung einem Minimalwerte nähert, der demjenigen des reinen, jodhaltigen Peptides entspricht und grössenordnungsgemäss mit dem Quotient N/Amino-N übereinstimmt.

Wir können hieraus folgern, dass ein Peptid umso reiner ist, je ähnlicher die Quotienten N/Amino-N und $2N/J$ (in Molen) sind. Diese Bedingung ist bei den erhaltenen Präparaten, besonders bei der Fraktion P_B, die mit Butanol gereinigt wurde, weitgehend erfüllt.

Zur Prüfung der physiologischen Aktivität eines Präparates sind mehrere Gramm erforderlich. Für die Darstellung der

9. zur Wertbestimmung verwendeten Präparate P₁ und P₂ (S. 125) ergab sich deshalb die Forderung nach einem grösseren Ansatz (2 kg) und nach Beschränkung auf die leistungsfähigen Verfahren: (Butanol, Bleiacetat).

Damit bei der Verdauung der voluminösen, in 4 Liter suspendierten Thyreoglobulinfällung das Pepsin optimale Wirkung entfalte, müssen grössere Säuremengen zugesetzt werden, die nach der Neutralisation die säurelösliche Fraktion als Salze verunreinigen. Dasselbe gilt für die bei der Trypsinverdauung zugesetzte Natronlauge. Späteres Ausdialysieren führt zu Verlusten.

Die Anwendung eines pflanzlichen Enzymes, des Papains, führte zu einer wesentlichen Vereinfachung: dessen Wirkungsoptimum liegt zwischen p_H 5 und 7. In reinem Zustand wirkt es wie Pepsin als typische Proteinase, d. h. es baut native Proteine zu Polypeptiden ab. Aktivierung mit Blausäure verleiht dem Papain die Eigenschaft einer Polypeptidase, indem es bei demselben p_H Polypeptide zu niedermolekularen Peptiden abbaut. Die Verdauung erfolgte in einer 0,4-proz. Papainlösung¹⁾ bei 40° und p_H 6,0.

Nach 24 Stunden wurde die 2. Phase durch Zusatz von 0,5% Blausäure eingeleitet: 166 cm³ 6-proz. KCN-Lösung wurden mit 1-n. Salzsäure auf Methylrot neutralisiert und zum Hydrolysat gegeben; nach weiteren 18 Stunden war die Aufspaltung beendet.

¹⁾ Papain von Baird und Tallock (London).

Das Filtrat enthielt: 0,521 g J und 21,6 g N, entsprechend einem molaren N/Dijodtyrosinverhältnis von 751; es wurde mit Uranylacetat gereinigt und hierauf direkt der kontinuierlichen Extraktion mit Butanol im Vakuum unterworfen. Nach 10 Stunden wurde die butylalkoholische Phase im Vakuum eingedampft. Sie hinterliess 5 g einer hellen, pulverigen Masse,

enthaltend: 0,148 g J und 0,195 g N }
entsprechend: 0,315 % J und 2,11 % N } P₂

In diesem als P₂ bezeichneten Präparat betrug das Verhältnis 2 N/J (in Molen) 12,9, war also von derselben Grössenordnung wie die im letzten Ansatz gewonnenen Produkte.

Aus der wässrigen Phase (200 cm³), in welcher mit der Diazoreaktion noch Dijodtyrosin nachgewiesen werden konnte, wurden die jodhaltigen Bestandteile mit einem gleichen Volumen basischen Bleiacetats (nach Ph. H. V) gefällt, 2 Stunden mit Schwefelwasserstoff zersetzt und vom Bleisulfid abgetrennt. Nach Einengen im Vakuum auf 100 cm³ wurde die Lösung mit einem gleichen Volumen 95-proz. Alkohols versetzt und 2 Tage in den Eisschrank gestellt. Vom entstandenen salzigen Niederschlag wurde abfiltriert und dieselbe Operation nach Einengen des Filtrats wiederholt.

Die filtrierte Peptonflüssigkeit lieferte nach Behandlung mit Tierkohle und Eindampfen im Vakuum einen bräunlichen Rückstand im Gewichte von 15 g.

Dieser enthielt: 0,21 g J und 0,876 g N }
entsprechend: 0,14 % J und 5,86 % N } P₁

In dem als P₁ bezeichneten Präparat, betrug das Verhältnis 2 N/J (in Molen): 76.

10. Chromatographische Analyse von P₁ und P₂. Da die Aktivität der erhaltenen Präparate nicht nur durch ihre spezifische Gruppe, sondern auch weitgehend durch die Beschaffenheit ihrer Trägersubstanz bestimmt wird, ist zu deren Charakterisierung auch eine Analyse der jodfreien Aminosäuren geboten. Für diesen Zweck schien uns das chromatographische Verfahren von *Consden, Gordon und Martin*¹⁾ geeignet, bei welchem an Stelle der üblichen Kolonnen frei herunterhängende Spezialfiltrierpapierstreifen verwendet werden. Aus 0,1 mg des hydrolysierten Präparates werden die Aminosäuren je nach der Grösse ihres Verteilungskoeffizienten zwischen Wasser und einem andern Lösungsmittel (Phenol) verschieden rasch von der beweglichen Phase mitgerissen.

Dieser Prozedur wurden 5 Substanzen unterzogen: Präparat P₁, P₂, die gereinigte, säureunlösliche Thyroxinfraktion, reines Dijodtyrosin, reines Thyroxin und ein „Lauftest“ (Glutaminsäure, Alanin, Valin, Phenylalanin).

Das Thyroxin gibt mit Ninhydrin nur eine äusserst schwache Farbreaktion. Dijodtyrosin wandert relativ langsam und ergibt einen blaugrünen Flecken.

Präparat P₁ enthält neben Dijodtyrosin: Tyrosin +, Tryptophan ++, Glutaminsäure +, Cystein +, Methionin +, Alanin ++, Phenylalanin +.

Präparat P₂ enthält die gleichen Bestandteile in geringerer Konzentration ohne Phenylalanin.

Beide Präparate enthalten daneben Asparaginsäure in Spuren²⁾.

¹⁾ Biochem. J. **38**, 224 (1944).

²⁾ Herrn Dr. H. *Elsaesser* (Organisch-Chemisches Institut, Bern) sei für die Durchführung der Analyse unser Dank ausgesprochen.

B. Biologische Wertbestimmung der gewonnenen dijodtyrosinhaltigen Abbauprodukte des Schilddrüseneiweisses (P_1 und P_2).

1. Prinzip der Methode. Die zuverlässigste Methode zur Prüfung der physiologischen Aktivität von Schilddrüsenpräparaten ist die Messung des Gesamtenergieumsatzes¹⁾ von Versuchstieren.

Da alle Energieentfaltung im Körper sich auf oxydative Prozesse zurückführen lässt, kann aus dem Sauerstoffverbrauch auf den Energieumsatz geschlossen werden (Prinzip der indirekten Calorimetrie).

Durch ein Glasgefäß, in welchem sich das Versuchstier befindet, wird ein wasser- und kohlendäurefreier Luftstrom geleitet. Aus der abgesaugten, mit Ausatemungsluft vermischten Luft wird der Wasserdampf in konzentrierter Schwefelsäure, die Kohlensäure in Natronkalkgefäßen gebunden. Der vom Versuchstier aufgenommene Sauerstoff wird aus der Differenz der ausgeatmeten Oxydationsprodukte (Summe: $CO_2 + H_2O$) und dem Gewichtsverlust des Tieres ermittelt.

Wir verwendeten 10 männliche weiße Ratten, die an die Versuchsbedingungen angewöhnt wurden, worauf von jedem Tier die normalen Mittelwerte des Grundumsatzes (1100–1300 Cal/m² und 24 Stunden), des Körpergewichtes und der Atemfrequenz bestimmt wurden.

2. Die prophylaktische Wirkung. Beim normalen Organismus ist das Dijodtyrosineiweiß inaktiv; es wirkt nur bei der Hyperthyreose grundumsatzsenkend. Aus diesem Grunde müssen die Ratten zuerst mit thyroxinhaltigen Stoffen (*Thyroidea siccata*) hyperthyroidisiert werden, worauf erst die dijodtyrosinhaltigen Präparate auf ihre kurative Wirkung geprüft werden können.

Die Tiere können aber auch vorerst prophylaktisch mit Dijodtyrosinpepton und erst dann mit Schilddrüsenpulver behandelt werden. Man vergleicht den Hyperthyreoseverlauf dieser Tiere mit demjenigen von Kontrolltieren, die keiner Vorbehandlung mit Dijodtyrosinpepton unterzogen wurden.

Den Tieren Nr. 11, 12 und 13 wurden täglich 100 γ , nach 5 Tagen 50 γ Jod in Form von Präparat P_1 per os verabreicht. Die Tiere Nr. 14 und 15 erhielten täglich 50 γ Jod in Form von Präparat P_2 . Am 10. Tage wurde die Vorbehandlung unterbrochen und am 11. Tage bei allen Ratten (inklusive den 5 nicht vorbehandelten Kontrolltieren) die Behandlung mit Schilddrüsenpulver eingeleitet (tägliche Dosis: 0,324 g Thyroid gland: *Wellcome*, London, enthaltend 197 γ Thyroxin).

Fig. 3 zeigt den Verlauf der Hyperthyreose ohne Anwendung vorbeugender Massnahmen. Das oft rasche Abfallen der Kurve nach Erreichen eines Höchstwertes ist als Folge einer Abwehrreaktion zu deuten.

Die vorbehandelten Tiere reagieren zunächst mit einer geringen Grundumsatzsenkung. Die schützende Wirkung des Dijodtyrosinpeptons (P_1) geht deutlich aus Fig. 4 hervor.

¹⁾ *De Quervain* und *Abelin*, Hb. biol. Arbeitsmeth. VIII, 1 (S. 1587).

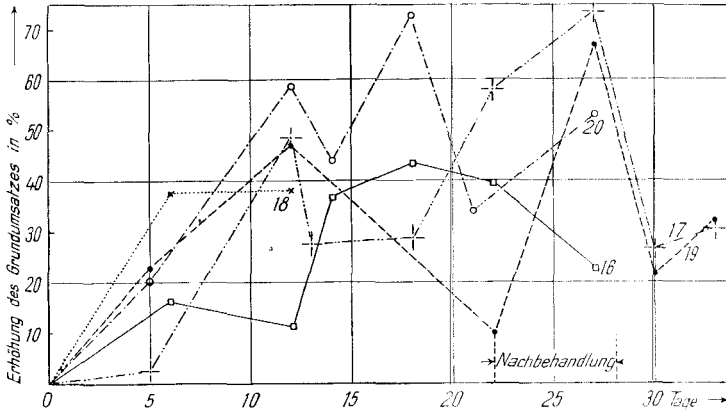


Fig. 3.

Experimentelle Hyperthyreose ohne Vorbehandlung mit diiodtyrosinhalten Substanzen.
Kontrolltiere: Nr. 16—20.

Am 22. Versuchstag: Einsetzen der Nachbehandlung mit täglich 10 γ Jod in Form der Präparate P₁ bzw. P₂.

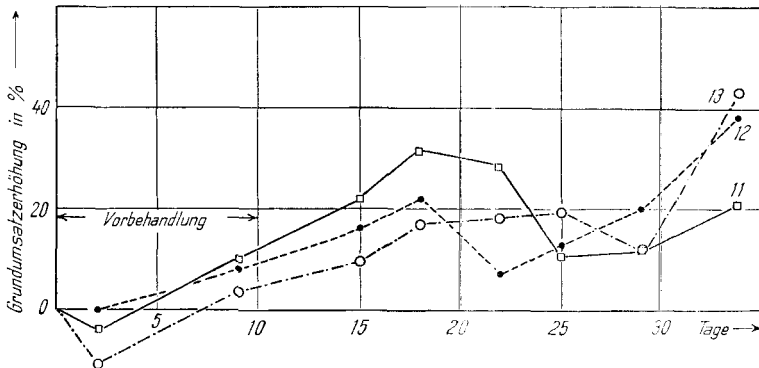


Fig. 4.

Experimentelle Hyperthyreose nach prophylaktischer Behandlung mit dem diiodtyrosinhalten Präparat P₁. Tiere Nr. 11—13.

Die Wirkung des Präparates P₂ (0,315% J) ist zu Beginn etwas schwächer, später aber umso ausgeprägter und nachhaltiger (Fig. 5).

3. Die kurative Wirkung. Ohne die Schilddrüsenzufuhr zu unterbrechen, wurden die Kontrolltiere einer Nachbehandlung mit Diiodtyrosineiweiss unterzogen (tägliche Dosis: 10 γ J in Form von P₁ bzw. P₂). Zwei der am stärksten mitgenommenen Tiere reagierten nach 6 Tagen mit einer Grundumsatzsenkung von durchschnittlich 30%.

Bei Anwendung von reinem Diiodtyrosin sind zur Auslösung einer grundumsatzsenkenden Wirkung 100—200 mg erforderlich, entsprechend einer Jodmenge von 58 550—117 100 γ Jod,

während mit Dijodtyrosinpepton schon 10 γ Jod einen deutlichen Effekt auslösen. Der um einige Zehnerpotenzen stärkere Effekt des letzteren lässt sich nur auf die Koppelung des Co-Hormons mit der Trägersubstanz zurückführen.

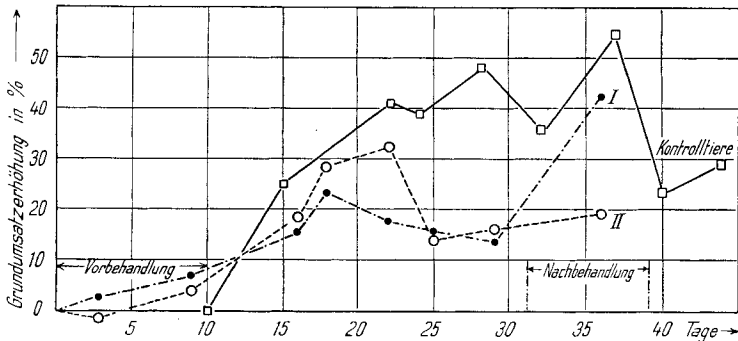


Fig. 5.

Verlauf der experimentellen Hyperthyreose:

Mittelwerte der

- a) Gruppe I Tiere Nr. 11, 12, 13
behandelt mit Präparat P₁ (0,14% J).
- b) Gruppe II Tiere Nr. 14, 15,
behandelt mit Präparat P₂ (0,315% J).
- c) Kontrolltiere: Nr. 16, 17, 18, 19, 20.

Auf Grund unserer Versuchsergebnisse erscheint ein Abbau der Peptone bis zum Dijodtyrosin im Darmkanal unwahrscheinlich. Der Dijodtyrosin-Komplex kann somit als Antigen wirken und Antikörper erzeugen, die — bei der nahen chemischen Verwandtschaft der Haptengruppen Dijodtyrosin und Thyroxin — auch mit Thyroxin-eiweiß reagieren und dessen Wirkung aufheben oder wenigstens beeinträchtigen können¹⁾.

4. Die Wirkung der Präparate auf Froschlarven.

a) Prinzip. Der Impuls zur Metamorphose von Froschlarven, der unter physiologischen Bedingungen von der Schilddrüse ausgeht, kann auch vorzeitig durch Verfütterung von Schilddrüsenpräparaten ausgelöst werden²⁾. Hierbei besteht kein Antagonismus zwischen Thyroxin und Dijodtyrosin: letzteres wirkt — wenn auch viel schwächer — so doch in derselben Richtung wie Thyroxin.

Unsere Versuche verfolgten den Zweck, die Präparate P₁ und P₂ auch in ihrer morphogenetischen Wirkung mit Dijodtyrosin zu vergleichen. Es wurden Verdünnungsreihen hergestellt und an 200 Larven die bis zum Erreichen eines definierten Entwicklungsgrades verflo-

¹⁾ *Abelin und Vuille*, Endokrinologie **2**, 248 (1928); Schw. Med. Wschr. **1943**, 1365.

²⁾ *Gudernatsch*, Arch. Entw.-mech. **34**, 457 (1912).

sene Zeit bestimmt. Für jede Konzentration wurde der Prozentsatz der Tiere mit durchgebrochenen Hinter- bzw. Vorderbeinen in Abhängigkeit von der Zeit graphisch aufgetragen. Liess sich eine der für reines Dijodtyrosin gezeichneten Kurven mit einer Kurve unserer Präparate P_1 oder P_2 zur Deckung bringen, so konnte auf Gleichheit der physiologischen Wirkung geschlossen werden, und aus den Konzentrationen die auf Jod (Dijodtyrosin) bezogene Aktivität errechnet werden.

Tabelle 6.

Vergleich der morphogenetischen Aktivität von dijodtyrosinhaltigem Thyropepton und von Dijodtyrosin.

Präparat	Dieselbe Wirkung entfalten Verdünnungen		Aktivität bezogen auf Dijodtyrosin = 1
	von	von	
Dijodtyrosin: 58,5% Jod . . . 100 cm ³ enthalten	1:20000 2925 γ Jod	1:40000 1462 γ Jod	1
P_1 : 0,14% Jod 100 cm ³ enthalten	1:50000 0,28 γ Jod	1:1000000 0,14 γ Jod	10430
P_2 : 0,315% Jod 100 cm ³ enthalten	1:250000 1,26 γ Jod	1:500000 0,63 γ Jod	2322

Es folgt daraus, dass unser Präparat P_1 (0,14 % Jod) eine ca. 10 000-fach, Präparat P_2 (0,315 % Jod) eine ca. 2300-fach grössere morphogenetische Aktivität aufweist als reines Dijodtyrosin.

II. Gewinnung und Untersuchung der thyroxinhaltigen Fraktion des Schilddrüseneweisses.

Es sollte geprüft werden, ob auch Thyroxin durch Bindung an spezifisches Schilddrüseneweiss eine Wirkungssteigerung erfährt. Bei peroraler Verabreichung nimmt die Aktivität vom Thyroxin zum Mono- zum Dinatriumsalz zu. Die Tatsache, dass die Wasserlöslichkeit dieser Stoffe in der gleichen Reihenfolge zunimmt, spricht für eine weitgehende Abhängigkeit der Aktivität von der Resorption. Dass die Zugehörigkeit der Präparate zur D- oder L-Reihe und deren Löslichkeit für die calorigene Wirkung von Bedeutung ist, steht heute fest. Die Frage aber, ob nach erfolgter Resorption die Aktivität des Thyroxins im Peptidverband auch vom chemischen Gesichtspunkt infolge Anwesenheit einer Trägermasse gegenüber der Wirksamkeit des reinen Co-Hormones erhöht wird, ist noch unentschieden. Zur Lösung dieser Frage müssen die Präparate parenteral zugeführt werden.

A. Abtrennung und Reinigung der säureunlöslichen Anteile des Thyreoproteins.

1. Extraktion, Fällung und Verdauung des Thyreoglobulins erfolgten nach den Angaben in Tab. 7. Da das Fett bei der Trennung zum grössten Teil in die Thyroxinfraktion mitgerissen wird, muss dieses schon im Auszug entfernt werden: nach energischem Schütteln mit Toluol und längerem Stehen gelingt es, eine dicke Fettschicht an der Oberfläche anzusammeln, die sich nach Einfrieren leicht als kompakte Masse abheben lässt. Die dunkelbraun gefärbte, säureunlösliche Fraktion (17,2 g) wurde diiodtyrosinfrei gewaschen. Sie enthielt 0,127 g J in Form von Thyroxin.

2. Die Barytfällung. Zur Entfernung der während der Hydrolyse entstandenen pigmentierten Bestandteile wurde deren Schwerlöslichkeit in Barytwasser verwertet: eine Probe des Rückstandes von 3 g wurde in 100 cm³ Wasser suspendiert und mit wenig Ammoniak in Lösung gebracht. Nach kurzem Sieden wurden 10 g Bariumhydroxyd (Trihydrat), in 20 cm³ siedendem Wasser gelöst, zugesetzt. Nach Abtrennung vom dunkelgefärbten Niederschlag, wurde das Filtrat angesäuert und durch Zusatz von Natriumacetat auf p_H 5,0 eingestellt; der sich im Laufe von 48 Stunden abscheidende, feinkörnige, fast weisse Niederschlag (0,24 g) enthielt 0,0093 g J, entsprechend 3,88%. Das Peptid hat einen hohen Reinheitsgrad, aber die Ausbeute ist klein: 57,8% J gingen verloren, weshalb ein anderes Verfahren geprüft wird.

3. Extraktion mit Aceton. Durch Extraktion thyroxinhaltiger Abbauprodukte mit 70-proz. Aceton lässt sich der grösste Teil des jodhaltigen Materials ausziehen, während bedeutende Anteile jodfreier Substanz ungelöst bleiben.

Der Rückstand T (Tab. 7), enthaltend noch 0,105 g Jod, wurde 3 mal mit 100 cm³ 70-proz. Aceton behandelt; während der Extraktion wurde das p_H durch Salzsäurezusatz auf 1,6 gehalten. Das Ungelöste gab mit Nitrit keine Thyroxinreaktion mehr und wurde verworfen, während die Filtrate sofort mit 2-n. Natronlauge auf ein p_H von 5,0 gebracht wurden. Das Aceton wurde im Vakuum abdestilliert und die zurückbleibende wässrige Lösung schwach alkalisch gemacht, wobei der ölige, braune Niederschlag in Lösung ging. Zur Entfernung restlichen Fettes wurden 170 cm³ Äther zugegeben und energisch gerührt, währenddem das p_H mit Salzsäure vorsichtig wieder auf 5,0 eingestellt wurde. An der Trennungsfäche Wasser-Äther setzte sich ein bräunlicher Niederschlag an (P₃), der bezogen auf sein Trockengewicht (5,5 g) 1,76% J, 2,4% Thyroxin¹ und 3,85% N enthielt. Hieraus berechnet sich der Thyroxin-Jodgehalt zu 1,57% und das molare N/Thyroxinverhältnis zu 79,2 (vgl. S. 123).

B. Biologische Wertbestimmung des gewonnenen Präparates P₃.

Reines Thyroxin sollte mit einer gleichen Menge Thyroxin in Form von Präparat P₃ in seiner Wirkung auf den Grundumsatz von weissen Ratten verglichen werden. Aus den im theoretischen Teil dargelegten Gründen werden die Präparate intraperitoneal zugeführt.

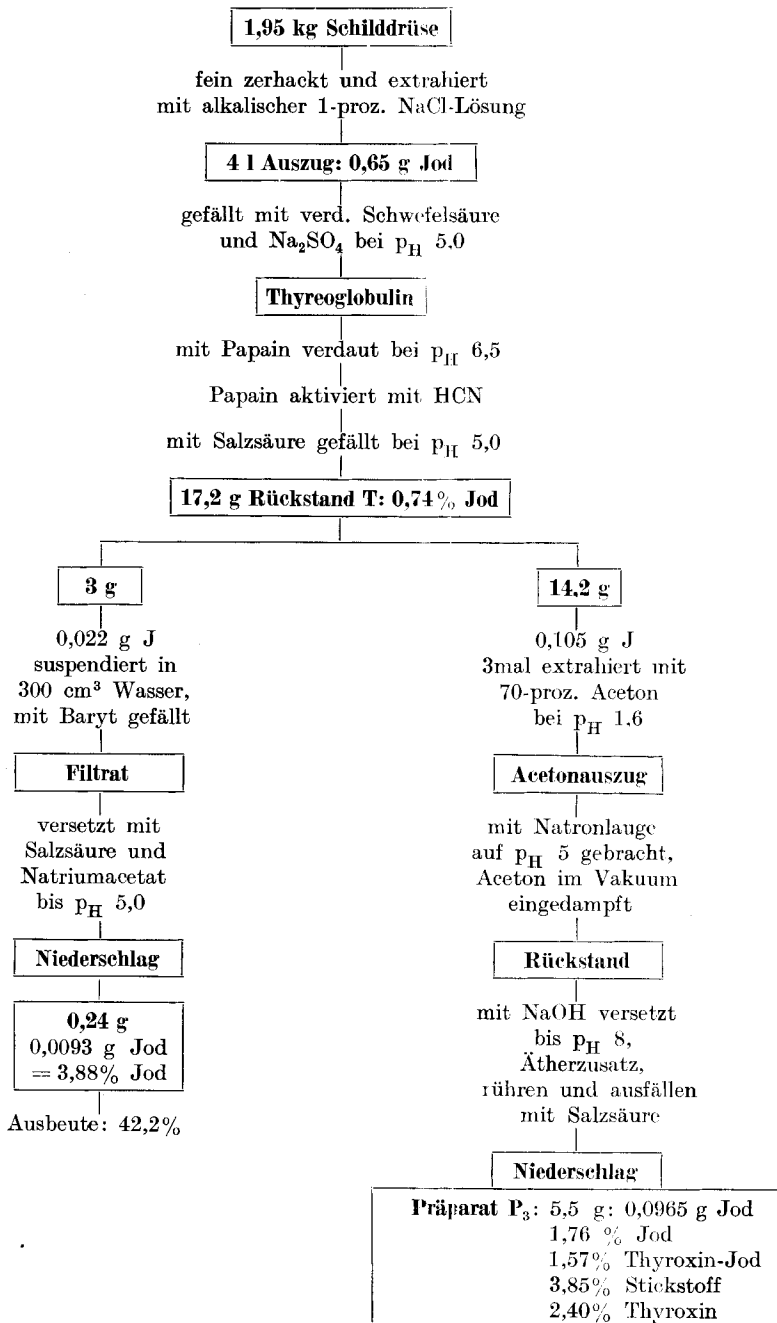
3 Tiere (Gruppe I) erhielten täglich 100 γ Thyroxin, entsprechend 65,4 γ Jod in Form von 0,5 cm³ einer Thyroxinlösung 1 : 5000. (Mononatriumsalz in physiologischer Kochsalzlösung.) 3 weitere Tiere (Gruppe II) erhielten dieselbe Menge Thyroxin in Form einer Lösung von Präparat P₃ (12,5 mg). Nach einer Woche stieg der O₂-Verbrauch der mit P₃ behandelten Tiere auf über 45% und erreichte in der 3. Woche einen Durchschnitt von 79,3% über dem Normalwert. — Weit schwächer reagierte die Gruppe I auf die täglichen Thyroxindosen.

Auf dieselbe Weise wurde die Wirkung der 4 mal schwächeren Dosis geprüft, einer Thyroxindosis, die in freier Form den Stoffwechsel der Versuchstiere (Gruppe III) nicht wesentlich zu beeinflussen vermochte, in Form von Präparat P₃ dagegen schon nach 2 Wochen Grundumsatzsteigerungen von 38,1% bzw. 33,8% hervorrief (Gruppe IV).

¹) Roche und Michel, Bioch. et Biophys. Acta I, 335 (1947).

Tabelle 7.

Isolierung eines thyroxinhaltigen Peptons aus dem Schilddrüseneiweiss.



Besprechung der Resultate.

1. Die um ein Vielfaches stärkere Wirkung des Thyroxinpolypeptides ist in Fig. 6 deutlich ersichtlich. Der im Tierversuch erzeugte Effekt nimmt nicht proportional, sondern annähernd mit der Wurzel aus der angewandten Menge des Präparates zu. Aus der Tatsache, dass die Hyperthyreose der mit 100 γ Thyroxin behandelten Gruppe I (Maximum 37 %) ähnlich verläuft wie diejenige der mit 25 γ Thyroxin in Form von Präparat P₃ behandelten Gruppe IV (Maximum 31,8 %), ergibt sich, dass die Aktivität des Thyroxins durch die Bindung an spezifisches Schilddrüsenpolypeptid auf das 3–4fache gehoben wird. In Anbetracht der parenteralen Einführung kann dem Präparat P₃ keine reine Thyroxinwirkung, sondern nur eine spezifische, durch das Zusammenkommen von Co- und Apohormon bedingte Aktivität zugrunde liegen.

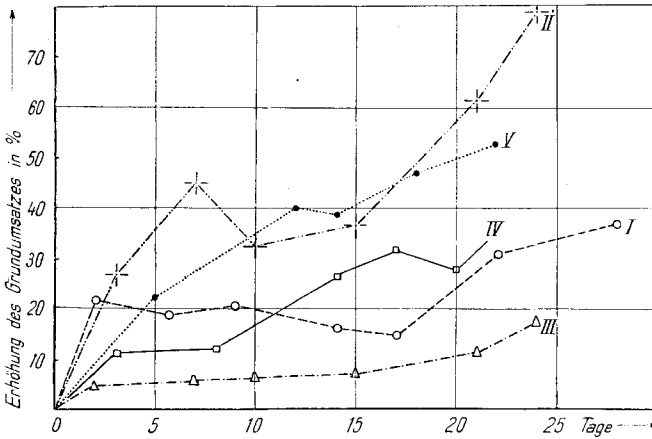


Fig. 6.

Vergleich der durch Thyroxin bzw. Thyroxinpeptid erzeugten experimentellen Hyperthyreose.

Mittelwerte von Gruppe:

I: täglich 100 γ Thyroxin (Roche)	(65,4 γ J)
III: „ 25 γ „ („)	(16,3 γ J)
II: „ 100 γ „ in Form von P ₃	(65,4 γ J)
IV: „ 25 γ „ in Form von P ₃	(16,3 γ J)
V: „ 200 γ „ in Form von Thyroidea siccata	(644 γ J)

(Vgl. Fig. 3, S. 126 Kontrolltiere Nr. 16–20.)

2. Von Interesse ist ein Vergleich der Wirkung von Thyroxinpolypeptid und Thyreoglobulin. Letzteres wurde bei der Wertbestimmung der Präparate P₁ und P₂ zur Hyperthyreoidisierung der Ratten verwendet (S. 126). (Kontrolltiere 16–20.) Die tägliche Jodzufuhr betrug in jenen Versuchen 644 γ , die Thyroxindosis 200 γ ; die entsprechenden Mengen bei der P₃-Behandlung waren: 65,4 γ Jod und 100 γ Thyroxin.

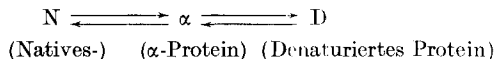
Trotz der fast 10 mal höheren Jod- und der doppelten Thyroxin-dosierung wirkt das Schilddrüsenpulver, wie aus Fig. 6 hervorgeht, weniger stark als P_3 . Seine gleichsam gedämpfte Wirkung kann auf das Dijodtyrosineiweiss zurückgeführt werden, dessen Jodgehalt 60% des Gesamtjodes der Tabletten ausmacht. — Die Thyreoglobulinwirkung ist demnach als Resultierende zweier Antagonisten zu betrachten, wobei die Aktivität der Thyroxinkomponente überwiegt. Hieraus darf nicht geschlossen werden, dass Thyreoglobulin eine Mischung oder lockere Verbindung zweier Hormone darstelle. Die Frage nach der chemischen Einheitlichkeit des Schilddrüsen-eiweisses wurde in einer späteren Arbeit geprüft:

Es zeigte sich hierbei, dass sorgfältig präpariertes Thyreoglobulin bei p_H -Werten von 6,0, 6,5, 7,0, 7,45 durch Elektrophorese nicht zerlegbar ist.

Dagegen traten oberhalb p_H 8 drei Gradienten auf, die sich chemisch (Gesamt-, Thyroxin-Jod) und biologisch (Kaulquappenmethode) nicht voneinander unterscheiden liessen. Die Komponenten konnten identifiziert werden als

	Beweglichkeit p_H 8,5, Temp.: 3,5 ⁰)
Natives Thyreoglobulin	$8,22 \cdot 10^{-5}$ cm ² sec ⁻¹ Volt ⁻¹
Denaturiertes Thyreoglobulin	$7,73 \cdot 10^{-5}$ „ „ „
„ α “-Thyreoglobulin	$3,82 \cdot 10^{-5}$ „ „ „

Letzteres stellt ein labiles Intermediärprodukt zwischen nativem und denaturiertem Thyreoglobulin dar. *Lundgren*¹⁾ wies die Existenz solcher α -Proteine bei Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge nach; sie zeichnen sich durch sehr kleine Sedimentationskonstanten aus. Das Gleichgewicht



wird bei alkalischer Reaktion nach rechts verschoben.

Dieselben Komponenten liessen sich erkennen, als versucht wurde, Thyreoglobulin durch kurze Einwirkung von Fermenten (30 Minuten) selektiv zu spalten. Es scheint, dass die Fermentwirkung primär in einer Denaturierung besteht, worauf erst die Hydrolyse an den durch die Aufrollung der Molekel freigelegten Stellen einsetzt. Dijodtyrosin- und Thyroxinpeptid lassen sich durch Elektrophorese erst nach 3-stündiger Verdauung (Papain: p_H 6,5) voneinander trennen.

Das einheitliche Verhalten des Thyreoglobulins zwischen p_H 6 und 8 lässt sich zunächst nicht vereinbaren mit den Befunden, wonach Thyreoglobulin durch fraktionierte Fällung²⁾ und Absorption³⁾ in Komponenten verschiedenen Jodgehalts zerlegt werden kann. Die Tatsache, dass die elektrophoretische Beweglichkeit eines Eiweissstoffes durch Jodierung nicht verändert wird⁴⁾, erklärt diesen Gegensatz.

¹⁾ *Lundgren*, J. Physic, Chem. **43**, 989 (1939).

²⁾ *Abelin* und *Keller*, Helv. **22**, 1365 (1939).

³⁾ *Rivière*, *Gautron* und *Thély*, C. r. **224**, 423 (1947).

⁴⁾ *Herriot*, J. Gen. Physiol. **25**, 185 (1942).

In Anlehnung an die heutigen Auffassungen über die Biosynthese des Thyroxins¹⁾ können wir deshalb behaupten, dass wir im Schilddrüsenhormon ein einheitliches in verschiedenen Stufen der Jodierung sich befindendes Globulin vor uns haben.

Zusammenfassung.

1. Es wird die Isolierung eines diiodtyrosinhaltigen und eines thyroxinhaltigen Polypeptids aus dem Schilddrüsen-eiweiss auf fermentativem Wege beschrieben.

2. In ihrem natürlichen Verband mit den anderen Aminosäuren wirken sowohl Diiodtyrosin wie Thyroxin bedeutend stärker als für sich allein.

Die grundumsatzsteigernde Wirkung der untersuchten Schilddrüsen-substanzen nimmt in folgender Reihe zu: Thyroxin, Thyreoglobulin, Thyroxinpolypeptid.

Die morphogenetische Aktivität des Diiodtyrosins bei der Kaulquappenmetamorphose erfährt durch dessen natürliche Bindung an die Aminosäuren des Thyreoproteins je nach Darstellung der Präparate eine 2300- bis 10000-fache Steigerung.

Diese Befunde erinnern an die Ergebnisse der Fermentchemie, wonach der spezifische Co-Fermentanteil erst durch die Vereinigung mit dem eiweissartigen Apo-Ferment die volle Aktivität erlangt.

3. Es wurde ferner die Frage des Zusammenwirkens der beiden jodhaltigen Fraktionen des Schilddrüsen-eiweisses — der diiodtyrosin- und der thyroxinhaltigen Komponente — untersucht. Das Diiodtyrosin-Polypeptid scheint im Sinne eines Regulators des Thyroxineinflusses zu wirken. Die Vergiftungserscheinungen nach Zufuhr von Thyroxin konnten durch eine vorangehende und gleichzeitige Zufuhr von Diiodtyrosin-Polypeptid abgeschwächt und die Grundumsatzerhöhungen herabgesetzt werden.

Die physiologische Wirkung des nativen Thyreoglobulins darf als Resultante des Diiodtyrosin- und des Thyroxineffektes aufgefasst werden.

4. Die beiden jodhaltigen Hormone sind im Thyreoglobulin zu einem einheitlichen Komplex zusammengefasst, der sich durch die Elektrophorese bei p_H -Werten zwischen 6,0 und 7,45 nicht zerlegen lässt.

Medizinisch-Chemisches Institut der Universität Bern.

¹⁾ Roche und Michel, Exp. annuels Bioch. Méd. **9**, 166 (1948).