

(3) The imidazolidone ring of XIII is a secondary formation, occurring on acidification as in the case of allantoin. Salts, isolated from the alkaline solution after permanganate oxidation of uric acid, contain half of the total nitrogen as primary ureido amido groups. On dissolving XIII in alkaline solutions, the imidazolidone ring is cleaved, and the compound is reconverted into salts of the same open-chain product from which it has been prepared. The infrared spectra of corresponding silver salts, prepared before and after conversion to XIII, could be superimposed.

(4) During alkaline hydrogen peroxide oxidation of uric acid, the intermediary formation of a compound with an absorption maximum between 320 and 350 $\mu\mu$ could be followed spectrophotometrically. This compound is very unstable, and we have not been able to isolate it; but the ultraviolet maximum and the previously reported tracer experiments suggest strongly the α -keto acid formula XIV (β -diureido- β -hydroxy-pyruvic acid).

(5) Microanalytical results of the silver salts mentioned in paragraph 3 are consistent with the structure of a monohydrate of XIV, probably XV (α, α, β -trihydroxy- β -diureido-propionic acid). Analysis and properties of SCHULER and REINDEL's silver salts¹³, believed by these authors to be salts of the BEHREND intermediate II⁴, agree with structure XV as well as II. Their infrared spectra show all the bands of the silver salt spectra mentioned before; some weak additional bands in SCHULER and REINDEL's precipitate from the crude alkaline oxidation mixture of uric acid may be caused by impurities.

Of all the structures attributed in the past to the main degradation products of the alkaline uric acid oxidation (Scheme I), only two were correct, the ones for allantoin (IV) and cyanuric acid (VII). But even in these cases the mechanism of formation was not properly understood. All the other formulas had to be corrected (Scheme II). Oxonic acid and allantoxaidine are dihydroxy-s-triazines (VIII and IX) and are not imidazolidones (V and VI). Uroxanic acid, on the other hand, is an imidazolidone (XIII), not an open-chain compound (III). But, in our belief, the most important new fact is that the intermediates in the degradation are symmetrical open-chain compounds (XIV, XV, X) with the former uric acid position 4 as the central carbon atom. They replace the symmetrical bicyclic compound II, which has been postulated by BEHREND and considered so far to be the key intermediate not only in the alkaline chemical oxidation but also in the enzymatic degradation of uric acid. We believe, therefore, that this new concept of the chemical oxidation of uric acid (Scheme II) will also lead to a new conception of its enzymatic breakdown.

A full account of this work will be presented in *Helvetica Chimica Acta*.

H. BRANDENBERGER¹⁴

*Theodor Kocher Institute, University of Bern*¹⁴, January 15, 1956.

Zusammenfassung

Früher veröffentlichte Arbeiten über die alkalische Oxydation der Harnsäure wurden ergänzt durch eine Untersuchung über die Struktur von Uroxansäure sowie der Zwischenprodukte, die im alkalischen Oxydationsgemisch auftreten. Die Resultate führen zu einer grund-

legend neuen Auffassung über den Mechanismus der Abbaureaktion (Schema II). Uroxansäure ist ein Imidazolidon (XIII) und nicht ein offenketiges Diureid (III); das von BEHREND formulierte Zwischenprodukt II hingegen, dem man bisher in der alkalisch-chemischen sowie auch in der enzymatischen Harnsäureoxydation eine Schlüsselstellung einräumte, muss durch offenketige Verbindungen ersetzt werden (XIV, XV, X), in denen das zentrale C-Atom auf die frühere Harnsäureposition 4 zurückgeführt werden kann.

Nachweis von organspezifischen Antikörpern*

Organspezifische Antigene und Antikörper wurden schon verschiedentlich mit serologischen Methoden nachgewiesen. Früher dienten dazu hauptsächlich Präzipitation, Agglutination und Komplementbindung (HENLE und Mitarbeiter¹, FURTH und KABAT², WITEBSKY und STEINFELD³, WITEBSKY und ZEISSIG⁴, WEIL⁵, LEWIS⁶ u.a.). In letzter Zeit wurden auch radioaktiv markierte Antikörper zum erfolgreichen Nachweis der Organspezifität herangezogen (PRESSMAN⁷, BALE und Mitarbeiter⁸, u.a.). Wir berichten im folgenden kurz über eine neue Methode, mit der es gelingt, organspezifische Antigene bzw. Antikörper zu bestimmen. Mit der gleichen nephelometrischen Methode konnten wir bereits individualspezifische Gewebsantigene bzw. Antikörper erfassen (BOLLAG⁹). Das Nephelometer, das wir verwendeten, wurde von HOIGNÉ, GROSSMANN und STORCK¹⁰ zur Erfassung einer Trübungsreaktion zwischen Allergen und Serum allergischer Patienten konstruiert. Zum Nachweis von organspezifischen Antikörpern wählten wir folgendes System: Sensibilisierung von Kaninchen mittels Organen bzw. mittels eines transplantablen Tumors von Ratten. Da Rattenorgane kein Forssmann-Antigen enthalten, konnten wir Störungen durch den Forssmann-Antikörper umgehen. Um organspezifische Antikörper zu erfassen, wurden mittels des Absättigungsverfahrens die rein speziespezifischen Antikörper eliminiert.

Methodik. Je 3 Kaninchen wurden mit Gewebsbrei folgender Organe von Ratten sensibilisiert: Herz, Leber, Niere, transplantabler Tumor Uterusepitheliom T 8 (Guérin). Die Homogenate wurden folgendermassen hergestellt: 500 mg Leber, Herz, Niere bzw. Tumor entbluteter Ratten wurden fein zerschnitten und mit je 5 cm³ physiologischer Kochsalzlösung im Potterapparat 2 min homogenisiert. Diese Organsuspension wurde den Kaninchen 2mal wöchentlich subkutan injiziert. Die Blut-

* Die Arbeit wurde mit Hilfe des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt.

¹ W. HENLE und L. A. CHAMBERS, *Science* 92, 313 (1940). – W. HENLE, L. A. CHAMBERS und V. GROUPE, *J. exper. Med.* 74, 495 (1941).

² J. FURTH und E. A. KABAT, *J. exper. Med.* 74, 247 (1941).

³ E. WITEBSKY und J. STEINFELD, *Z. Immunitätsforsch.* 58, 271 (1928).

⁴ E. WITEBSKY und A. ZEISSIG, *Z. Immunitätsforsch.* 76, 266 (1932).

⁵ A. J. WEIL, *Bact. Rev.* 5, 293 (1941).

⁶ J. H. LEWIS, *J. Immunol.* 24, 193 (1933); 41, 397 (1941).

⁷ D. PRESSMAN, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 59, 376 (1955).

⁸ W. F. BALE, J. L. SPAR, R. L. GOODLAND und D. E. WOLFE, *University of Rochester Atomic Energy Project UR-397* (1955).

⁹ W. BOLLAG, *Exper.* 12, 57 (1956).

¹⁰ R. HOIGNÉ, W. GROSSMANN und H. STORCK, *Schweiz. med. Wschr.* 85, 578 (1955).

¹³ W. SCHULER und W. REINDEL, *Z. physiol. Chem.* 208, 248 (1932).

¹⁴ Present address: Nestlé Research Laboratories, Vevey, Switzerland.

entnahmen erfolgten aus den Ohrvenen. Die Technik der Herstellung der wasserklaren Antigenlösung und die nephelometrische Methodik der Reaktion dieser Antigenlösungen mit den im Serum zirkulierenden Antikörpern ist dieselbe wie bereits früher beschrieben (BOLLAG⁹).

Die Seren sämtlicher Kaninchen wurden auf ihre Reaktion mit Herz, Leber, Niere und Tumor von Ratten untersucht. Mit allen Organantigenlösungen wurden Titerbestimmungen durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Absättigung des Serums mit sämtlichen Organextrakten, worauf erneute Titerbestimmungen gegen alle Antigene vorgenommen wurden. Die Absättigung erfolgte derart, dass man 1 Teil Serum mit 4 Teilen Antigen während 1 h bei Zimmertemperatur stehen liess. Das Serum der gegen Rattenorgane sensibilisierten Kaninchen wurde auch auf seine Reaktion gegenüber Herz-, Leber- und Nierenantigenen von Mäusen und Meerschweinchen geprüft.

Tabelle I

Sensibilisierung mit:	Trübungsreaktion mit:			
	Herz	Leber	Niere	Tumor
Herz	1:16	1:4	1:4	neg.
Leber	1:4	1:8	1:4	neg.
Niere	1:4	1:4	1:8	neg.
Tumor	1:8	1:8	1:8	1:16

Antikörpertiter im Serum von Kaninchen, die mit Rattenorganen sensibilisiert wurden.

Resultate. 3-4 Wochen nach Beginn der Sensibilisierung wurde die Trübungsreaktion zwischen Serum und Organantigen positiv. Die Reaktion mit dem Antigen des zur Sensibilisierung verwendeten Organs wurde jeweils zuerst positiv und blieb auch am längsten positiv. Zur Zeit des höchsten Titeranstieges konnten Antikörper meist auch gegen alle nicht zur Sensibilisierung gebrauchten Organe nachgewiesen werden. Die höchsten Titer wurden immer mit demjenigen Organantigen erreicht, mit dem das Kaninchen sensibilisiert wurde. In der Tabelle I sind 4 Beispiele angegeben.

Tabelle II. Sensibilisierung mit Tumor

	Trübungsreaktion mit:			
	Tumor	Herz	Leber	Niere
Vor Absättigung	1:16	1:8	1:8	1:8
Nach Absättigung mit:				
Tumor	neg.	neg.	neg.	neg.
Herz	1:4	neg.	neg.	neg.
Leber	1:4	neg.	neg.	neg.
Niere	1:4	neg.	neg.	neg.

Antikörpertiter im Serum eines Kaninchens, das mit einem Rattentumor, dem transplantablen Uterus-Epitheliom T8, sensibilisiert wurde. Vor und nach Absättigung des Serums mit verschiedenen Rattenorganantigenen.

Aus der Tabelle geht deutlich hervor, dass spezies-spezifische Antikörper vorhanden sind, die mit allen Rattenorganen reagieren. Eine merkwürdige Ausnahme bildete das Tumorantigen, das nicht mit Anti-Herz-, Anti-Leber- oder Anti-Nieren-Seren reagierte. Die hohen Titer, die mit dem zur Sensibilisierung verwendeten

Tabelle III. Sensibilisierung mit Herz

	Trübungsreaktion mit:		
	Herz	Leber	Niere
Vor Absättigung	1:16	1:4	1:4
Nach Absättigung mit:			
Herz	neg.		
Leber	1:4	neg.	
Niere	1:4	neg.	neg.

Antikörpertiter im Serum eines Kaninchens, das mit Rattenherz sensibilisiert wurde. Vor und nach Absättigung des Serums mit verschiedenen Rattenorganantigenen.

Organ erreicht wurden, liessen zusätzliche organspezifische Antikörper vermuten. Die Resultate nach Absättigung der Seren mit den verschiedenen Organantigenen erlaubten die Feststellung, dass neben rein spezies-spezifischen noch organspezifische Antikörper vorhanden waren. In Tabelle II und III sind 2 solche Beispiele angegeben.

Nach Absättigung mit dem sensibilisierenden Organ werden alle Reaktionen negativ, da sowohl spezies-spezifische wie organspezifische Antikörper absorbiert werden. Nach Absättigung mit einem nicht zur Sensibilisierung verwendeten Organ bleibt einzig die Trübungsreaktion mit dem Antigen des sensibilisierenden Organs positiv. Dies war regelmässig bei Herz, Leber, Niere und Tumor zu beobachten. Diese nachgewiesenen organspezifischen Antikörper scheinen sehr spezifisch zu sein, da sie untereinander - wenigstens bei den von uns untersuchten Organen und dem Tumor - keine gekreuzten Reaktionen ergeben. Um die Frage abzuklären, ob die mit unserer Methode nachgewiesenen organspezifischen Antikörper spezies-gebunden oder spezies-unabhängig sind, wurden die Seren der mit Rattenorganen sensibilisierten Kaninchen auch auf ihre Reaktion mit den entsprechenden Organantigenen von Mäusen und Meerschweinchen geprüft. Die organspezifischen Antikörper reagierten in keinem Falle mit den Organen dieser verwandten Nagetiere. Die organspezifischen Antikörper sind nach unseren bisherigen Untersuchungen artgebunden. Es handelt sich um eine organspezifische Komponente eines speziespezifischen Antikörpers.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit der von uns angewandten Methode in den beschriebenen Experimenten einerseits reine speziespezifische Antikörper und andererseits organspezifische, jedoch spezies-gebundene Antikörper nachgewiesen werden konnten.

W. BOLLAG

Medizinische Universitätsklinik Zürich, 20. März 1956.

Summary

Using a new nephelometric method, species-specific and organ-specific antibodies have been demonstrated. By means of the absorption technic organ-specific components of species-specific antibodies of high specificity have been determined in the serum of rabbits sensitized with various rat organs (heart, liver, kidney, tumor).