

Weitere Untersuchungen über fermentative Harnstoffbildung.

Von

A. Kossel und H. D. Dakin.

I. Über die Arginase.

Wir haben nachgewiesen,¹⁾ daß in der Leber der Säugtiere ein Ferment vorhanden ist, welches das Arginin mit ziemlich großer Geschwindigkeit in Ornithin und Harnstoff zerlegt. Diese «Arginase» kann aus der Lebersubstanz durch Wasser oder verdünnte Essigsäure ausgezogen und aus dieser Lösung durch Ammoniumsulfat, sowie durch Alkohol und Äther gefällt werden.

Für unsere Versuche benutzten wir ein Arginasepulver, welches wir aus Hundeleber dargestellt hatten, indem wir das zerkleinerte und mit Kieselgur verriebene Organ auspreßten, bis etwa 45% der Leber an Preßsaft gewonnen war. Diese Flüssigkeit wurde sodann mit einer Mischung von zwei Volumen Alkohol und einem Volumen Äther gefällt, mit Äther gewaschen und im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet. Auf 200 g Leber erhält man in dieser Weise ungefähr 5 g Arginasepulver, welches nur teilweise in Wasser löslich ist. Dieses Präparat erwies sich nach zwei Monaten noch wirksam, denn 0,1 g dieses Pulvers waren imstande, 2 g Arginin während eines Tages völlig zu zerlegen. Auch in wässriger Lösung scheint die Arginase ziemlich beständig zu sein. Eine filtrierte Lösung dieses Pulvers, welche sechs Wochen bei Zimmertemperatur gestanden hatte und deren Menge 0,01 g des Pulvers entsprach, wurde zu 0,1 g Arginin hinzugefügt und zersetzte innerhalb 6 Stunden ³/₄ dieser Menge.

Die Wirksamkeit der Arginase läßt sich bei solchen Untersuchungen nachweisen, indem man die zu prüfende Substanz in geringer Menge zu einer Argininlösung hinzufügt, einige Stunden im Brutofen digeriert und sodann den Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Bestandteile der

¹⁾ Diese Zeitschrift. Bd. XLI, S. 321.

Lösung feststellt. Da die ursprüngliche Lösung, abgesehen von der geringen Menge der auf Arginase zu prüfenden Substanz, nur das durch Phosphorwolframsäure fällbare Arginin enthält, kann man ohne erheblichen Fehler aus dem im Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlags enthaltenen Stickstoff einen Schluß ziehen auf die Menge des während der Digestion gebildeten Harnstoffs, somit auch auf die Zersetzung des Arginins.

Mit Hilfe dieses Verfahrens haben wir einige Beobachtungen angestellt über das Verhalten der Arginase zu Fällungsmitteln, wobei wir die Methoden benutzten, welche S. G. Hedin zur Gewinnung der proteolytischen Fermente der Milz angegeben hat.¹⁾

250 g zerhackter Rindsleber, die kräftige Arginasewirkung zeigte, wurden 16 Stunden im Brutofen mit 1 Liter 0,2%iger Essigsäure digeriert und filtriert.

A) Das essigsäure Extrakt zeigte kräftige Wirkung, dasselbe wurde in zwei Teile geteilt.

a) Ein Teil wurde mit Ätheralkohol gefällt, filtriert, der Rückstand in Wasser gelöst und nochmals filtriert. Das Filtrat zeigte kräftige Wirkung.

b) Der zweite Teil wurde mit Ammonsulfat gefällt, der Niederschlag durch Dialyse vom Salz befreit; die filtrierte Lösung des Niederschlags wirkt ebenfalls kräftig zersetzend auf Arginin ein.

B) Der in essigsäurehaltigem Wasser unlösliche Rückstand wurde zur Entfernung der Essigsäure mit Wasser ausgewaschen und 16 Stunden mit 5%iger Kochsalzlösung digeriert.

a) Die so bereitete Lösung wurde 20 Stunden der Dialyse unterworfen und erwies sich dann als wirksam. Hedin erhielt aus diesem Extrakt sein in alkalischer Lösung wirksames proteolytisches Ferment, in dem er die Lösung mit 2%iger Essigsäure fällte; wir fanden in dem gleichen Niederschlag jedoch nur zweifelhafte Arginasewirkung.

b) Der zur Entfernung des Kochsalzes mit Wasser ausgewaschene Rückstand enthielt ebenfalls noch Arginase.

Das Verhalten der Arginase gegenüber Extraktions- und Fällungsmitteln entspricht hiernach weder völlig der Lieno- α -protease noch der Lieno- β -protease von Hedin.

Um die Verbreitung der Arginase in den Organen des Tierkörpers zu untersuchen, machten wir eine Reihe von Versuchen, die in den folgenden Tabellen zusammengestellt sind. Bezüglich der Untersuchungsmethoden und der Beurteilung der Resultate verweisen wir auf unsere früheren Mitteilungen.²⁾

¹⁾ Journal of Physiology, Bd. XXX, S. 155.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 327.

Tafel I.

Versuchsnummer	Bezeichnung des Organs	Gewicht der Organmenge	Volumen der Lösung	Zeitdauer der Einwirkung	Stickstoff in Form von Arginin		Stickstoff des Ornithins	Stickstoff im Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlags	Bemerkungen
					hinzugefügt	wiedergewonnen			
1 a	Niere vom Kalb	25 g	300	3 Tage	0,6825	0,3271	0,1249	0,3080	Ornithin analysiert
1 b					0	0,0099	0,0096	0,0714	
2 a	Schleimhaut des Dünndarms	25 g	400	4 Tage	0,3920	0,2464	0,0728	0,1988	
2 b					0	0,0235	0,0185	0,1008	
3 a	Blut vom Hund	50 ccm	500	3 Tage	0,6825	—	—	0,1029	
3 b					0	—	—	0,0840	
4 a	Nebenniere vom Hund	1 g	50	30 Stunden	0,1138	—	—	0,0136	
4 b					0	—	—	0,0035	
5 a	Thymus vom Kalb	25 g	300	3 Tage	0,6820	0,3800	0,0501	0,2366	Ornithin analysiert
5 b					0	0,0069	0,0088	0,0924	
6 a	Muskeln vom Hund	25 g	200	3 Tage	0,4550	0,3610	0,0385	0,1506	Versuch z. Gewinnung von Ornithin erfolglos
6 b					0	0,0328	0,0201	0,0621	
7 a	Milz vom Hund	10 g	150	28 Stunden	0,2275	—	—	0,0582	
7 b					0	—	—	0,0560	
8 a	Lymphdrüsen vom Rind	40 g	300	3 Tage	0,6820	0,3749	0,0931	0,2968	Stickstoff des Histidins: 0,0164
8 b					0	0,0189	0,0219	0,1106	
9 a	Pankreassekret (aus einer Fistel) Hund	17 ccm	17 ccm	2 Tage	0,0228	—	—	0,0158	Das Sekret löste Fibrin ziemlich schnell
9 b					0	—	—	0,0169	
10 a	Pankreassekret (Fistel)	17,5 ccm	17,5 ccm	2 Tage	0,0228	—	—	0,0112	
10 b					0	—	—	0,0119	
11 a	Pankreassekret (Fistel)	5 ccm	5 ccm	2 Tage	0,0228	—	—	0,0062	
11 b					0	—	—	0,0061	
12 a	Galle	6 g	50 ccm	—	0,2275	—	—	0,0268	
12 b					0	—	—	0,0151	

Das in den Versuchen 5a und 1a erhaltene Ornithin wurde aus dem Phosphorwolframsäureniederschlag dargestellt, in die Phenylcyanatverbindung nach Herzog¹⁾ übergeführt und analysiert.

Gefunden		Berechnet
Niere	Thymus	für $C_{19}H_{20}N_4O_3$
C 64,39%	65,00%	64,77%
H 5,74%	5,68%	5,70%

Tafel II.

Versuchsnummer	Organ	Arginin		«Ornithin» gebildet	«Harnstoff» gebildet	Arginase:
		hinzu- gefügt	zersetzt			
1	Niere	2,119	1,138	0,5439	0,509	vor- handen
2	Dünndarm- schleimhaut	1,217	0,525	0,256	0,210	vor- handen
3	Blut	2,119	nicht untersucht		0,040	nicht sicher nach- weisbar
4	Nebenniere	0,353	„	„	0,022	ebenso
5	Thymus	2,117	0,9591	0,1948	0,309	vor- handen
6	Muskel	1,413	0,3937	0,0868	0,1896	geringe Wirkung
7	Milz	0,7064	nicht untersucht		0,0047	nicht nach- weisbar
8	Lymphdrüsen	2,118	1,012	0,3359	0,399	vor- handen
9	Pankreassaft	0,071	nicht untersucht			nicht nachweisbar
10	„	0,071	„	„	„	„
11	„	0,071	„	„	„	„
12	Galle	0,7064	„	„	0,025	nicht sicher nach- weisbar

Die im Ornithin gefundene Stickstoffmenge sollte gleich der des Harnstoffs sein und die Hälfte des im zersetzten Arginin enthaltenen Stickstoffs betragen. In Wirklichkeit ist

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIV, S. 525.

jedoch der «Ornithinstickstoff» stets zu niedrig gefunden worden, hauptsächlich wohl infolge einer nachträglichen Umwandlung des Ornithins durch Gewebsfermente. Die Arginase selbst führt nach unseren Beobachtungen eine solche Zersetzung nicht herbei.

Aus diesen und den früheren Versuchen ergibt sich, daß unter den von uns gewählten Bedingungen der Leber die kräftigste Arginasewirkung zukommt: schwächer, aber immer noch sehr deutlich, beobachteten wir diese Wirkung in der Niere, der Thymus und den Lymphdrüsen, etwas geringer in der Darmschleimhaut. Nur schwache oder zweifelhafte Spuren sind im Blut und in den Muskeln nachzuweisen, während in Milz, Nebennieren und im Pankreasfistelsaft bei unseren Versuchen überhaupt keine Wirkung zu beobachten war. Ob das Ausbleiben der Wirkung auf die Abwesenheit des Ferments oder auf sonstige störende Einwirkungen zu beziehen ist, läßt sich aus den bisherigen Untersuchungen noch nicht entnehmen.

II. Über ein durch Fermentwirkung gebildetes Proton.

Wir berichten in diesem Zusammenhang über die Untersuchung eines aus Clupein gewonnenen Protons, weil sich hierbei bemerkenswerte Beziehungen zu den Erscheinungen der fermentativen Harnstoffbildung ergaben. Dies Proton war bei einem früher von uns beschriebenen Versuch gewonnen worden, als wir ein gereinigtes Extrakt der Dünndarmschleimhaut während 18 Monaten mit ungefähr 80 g Clupeinsulfat digeriert hatten.¹⁾ Bei diesem Versuch waren, wie wir schon früher mitgeteilt haben, außer dem Proton entstanden: Arginin, Ornithin, Harnstoff, Amidovaleriansäure und wahrscheinlich noch andere Produkte der Hydrolyse des Clupeins.

Die Reindarstellung des Protons aus diesem Gemisch gelang uns auf Grund unserer Beobachtung, daß dies Clupeinproton, welches wir als « β -Clupeon» bezeichnen wollen, durch Silberoxyd bei Gegenwart von Baryt aus seiner wässerigen Lösung ausgefällt wird. Bei Anwendung des zur Darstellung von Arginin dienenden Silberbarytverfahrens geht das β -Clupeon mit dem Arginin in den Silberniederschlag und ist auf diese

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLI, S. 324.

Weise vom Ornithin, dem Harnstoff und den Monoamidosäuren ohne weiteres zu trennen.

Wir versetzten also die Lösung, welche wir durch Digestion des Clupeins mit dem Extrakt des Dünndarms erhalten hatten, mit Silbersulfat, bei Gegenwart von etwas überschüssiger Schwefelsäure, neutralisierten mit Barytlösung, filtrierten von dem geringen hierbei entstandenen Niederschlag ab und fällten das Filtrat mit überschüssigem Baryt aus. Der reichliche Niederschlag wurde abfiltriert, bei Gegenwart von etwas überschüssiger Schwefelsäure mit Schwefelwasserstoff zerlegt und die Lösung nach Entfernung des Schwefelwasserstoffs mit Alkohol gefällt. Dieser Niederschlag enthält Argininsulfat neben β -Clupeonsulfat, es wurde zur Entfernung der letzten Spuren von Ornithin, Monoamidosäuren usw. in Wasser gelöst und nochmals demselben Fällungsverfahren unterworfen. Die Trennung des β -Clupeons vom Arginin läßt sich auf Grund der Fällbarkeit des Clupeons durch Pikrinsäure bewirken.

Das von uns erhaltene β -Clupeon war mit dem von A. Kossel und M. Goto untersuchten, durch Hydrolyse mit wässriger Schwefelsäure dargestellten Clupeon (α -Clupeon) nicht identisch. Dies ergab sich aus der quantitativen Bestimmung des Arginins. Im β -Clupeon waren nur 69,7% des Gesamtstickstoffs als Arginin abzuspalten, während M. Goto in dem α -Clupeon 80% des ganzen Stickstoffs als Arginin wiedergefunden hatte. Hieraus ergab sich weiter, daß die Arginingruppe des Clupeins ein Angriffspunkt der Fermentwirkung gewesen war. Dies wurde durch folgenden Versuch genauer festgestellt.

Ungefähr 15 g β -Clupeonsulfat wurden der Spaltung durch siedende verdünnte Schwefelsäure in mehrfach beschriebener Weise unterworfen und das Arginin durch Silbersulfat und Baryt entfernt. Die von dem Silberbarytniederschlag abfiltrierte Flüssigkeit gab mit Phosphorwolframsäure einen reichlichen Niederschlag, welcher abgetrennt und durch Baryt zerlegt wurde. Das in diesem Niederschlag enthaltene Spaltungsprodukt erwies sich als Ornithin. Dasselbe wurde in die Phenylcyanatverbindung übergeführt und letztere durch Kochen mit Salzsäure in das Anhydrid verwandelt. Die Substanz schmolz nach vier-

maligem Umkristallisieren aus Alkohol bei 192—193° und dieser Schmelzpunkt änderte sich bei weiterem Umkristallisieren nicht. Die Analyse ergab folgendes:

Gefunden	Berechnet für $C_{15}H_{20}N_4O_3$
C 64.40%	64.75%
H 5.77%	5.70%

Das Clupein liefert bei gleicher Spaltungsweise kein Ornithin. Es ergab sich dies schon aus den früheren Untersuchungen von A. Kossel, wir haben aber zum Überfluß noch einen besonderen Versuch in der gleichen Weise mit Clupein angestellt, indem wir 15 g Clupeinsulfat der Spaltung mit Schwefelsäure unterwarfen und das Arginin als Silberverbindung ausfällten. Verdünnt man das Filtrat vom Silberbarytniederschlag soweit, daß die Pyrrolidincarbonsäure nicht mehr mit Phosphorwolframsäure gefällt wird, so bleibt die angesäuerte Lösung auf Zusatz von Phosphorwolframsäure klar oder es bilden sich nur Spuren eines Niederschlags. Ornithin ist also unter den Spaltungsprodukten des ursprünglichen Clupeins nicht nachweisbar, es findet sich nur dann, wenn das Clupein unter dem Einfluß des Darmferments eine Veränderung erlitten hat.

Das Ergebnis unserer Versuche ist also folgendes: Im Körper der Säugetiere findet sich ein Ferment, welches imstande ist, einfache Eiweißkörper an einer oder mehreren Argininsgruppen anzugreifen. Hierbei wird die harnstoffbildende Gruppe des Arginins entweder als Harnstoff herausgelöst oder in einer noch nicht bekannten Weise umgewandelt. Der Ornithinrest bleibt mit dem übrigen Teil des Eiweißmoleküls in Zusammenhang und wird beim nachträglichen Kochen mit Säuren als Ornithin abgespalten. Diese Veränderung war in unserem Versuch nur bei einem Teil der im Clupein gebundenen Argininsgruppen eingetreten.

Aus diesen Beobachtungen ergeben sich Anregungen zu neuen Untersuchungen über die Harnstoffbildung im tierischen Organismus. Wir sind damit beschäftigt, die Frage zu prüfen, ob die komplizierteren Eiweißkörper die gleiche Veränderung erleiden können wie die einfacheren und ob das Ferment den Harnstoff als solchen abspaltet.

Die Natur und Wirkungsweise dieses Ferments ist noch unbekannt. Von der Vermutung ausgehend, daß die Arginase bei dieser Umwandlung eine Rolle spielt, haben wir einige Versuche angestellt, aber keine Einwirkung der Arginase auf Clupein oder Clupeon nachweisen können.