

Das Vorkommen der Arginase im tierischen Organismus und ihr Nachweis mittels der Formoltitration.

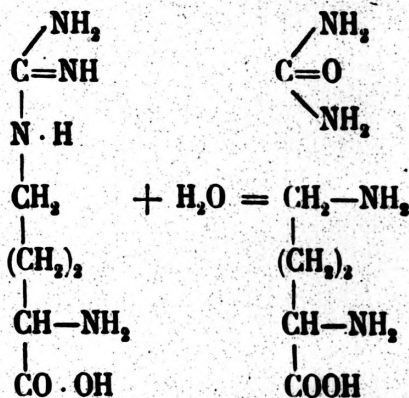
Von
S. Edlbacher.

(Aus dem physiologischen Institut in Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. Juli 1915.)

Die vorliegenden Untersuchungen stellen eine Nachprüfung von Versuchen dar, die von Herrn Dr. A. Clementi auf Anregung und unter Leitung des Herrn Professor A. Kossel ausgeführt wurden und deren Veröffentlichung in dieser Zeitschrift in Aussicht genommen, aber durch die politischen Verhältnisse verhindert wurde.¹⁾

Der Gedanke, der denselben zugrunde liegt, ist folgender: Wie schon Sörensen²⁾ nachgewiesen hat, enthält das Arginin nur ein formoltitrierbares Stickstoffatom. Nun wird durch die Wirkung der Arginase das Arginin nach folgender Gleichung zerlegt:



Arginin + Wasser = Harnstoff + Ornithin.

¹⁾ A. Clementi: Vortrag auf dem Physiologen-Kongreß in Groningen. Sept. 1913 (s. Archives internationales de Physiologie. Vol. XIV, S. 59). Ferner A. Clementi: Rendiconti della R. Accademia dei Lincei 1914. Bd. XXIII, p. 517 u. 612.

²⁾ Sörensen: Biochem. Zeitschr., Bd. 7, S. 85.

Da im Arginin nur das α -N-Atom formoltitrierbar ist und der gebildete Harnstoff keinen formoltitrierbaren Stickstoff besitzt, wohl aber im Ornithin beide Amidogruppen diese Reaktion eingehen, so folgt daraus, daß, wenn man den im Arginin vorhandenen Formolstickstoff mit 100% ansetzt, dieser Wert bei vollkommenem Verlauf obiger Reaktion auf 200% steigen muß.

In der Tat verhält sich auch eine neutrale Lösung von Argininchlorid, deren Titer durch Kjeldahl und Formol-N-Bestimmungen genau festgestellt ist, beim fermentativen Abbau durch Leberarginase nach dieser Art, worüber weiter unten noch berichtet werden soll.

Wir besitzen daher in dieser Methode ein bequemes Mittel, um das Vorkommen der Arginase in den verschiedenen Organen und Organismen zu studieren und zugleich eine Methode, welche es gestattet, die, durch das von Kossel und Dakin¹⁾ ausgearbeitete Verfahren, gewonnenen Resultate zu kontrollieren. Die Ergebnisse, soweit sie bis jetzt ermittelt wurden, sind am Schlusse zusammenfassend dargestellt.

Technisches.

Das zu den Versuchen verwendete Arginin wurde aus Edestin nach der bekannten Methode als Carbonat erhalten und als Chlorid verwendet. Das Carbonat wurde zu diesem Zwecke in Wasser gelöst und mit verdünnter Salzsäure gegen Azolithminpapier genau neutralisiert und zwar unter Zuhilfenahme der Sörensenschen Phosphatmischungen von bekannter H-Ionenkonzentration. In dieser Lösung wurde nun der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl und der Formolstickstoff nach Sörensen ein für allemal ermittelt und diese Stammlösung unter Toluolzusatz im Dunkel und bei niedriger Temperatur aufbewahrt. Sie erwies sich noch nach 4 Wochen als vollkommen fehlerfrei.

15 ccm Argininlösung verbrauchten 42,6 ccm $\frac{n}{10}$ -H₂SO₄
 = 0,05964 g N in 15 ccm
 oder 3,976 mg N • 1 •

¹⁾ Kossel und Dakin, Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 181, 1904.

was einem Wert von 0,994 mg formoltitierbarem N in 1 ccm entspricht. ($\frac{1}{4}$ des Gesamt-N.)

Formoltitration:

a) Probe: 10 ccm Argininlösung 5 „ Formol + Phenolphthalein <hr/> verbrauchten 4,2 ccm $\frac{n}{s}$ -NaOH minus $\frac{0,6}{3,6}$ „ $\frac{n}{s}$ -NaOH	b) Kontrolle: 10 ccm Wasser 5 „ Formol + Phenolphthalein <hr/> 0,6 ccm $\frac{n}{s}$ -NaOH plus 3,6 „ Wasser.
--	---

Gleiches Stadium in beiden Proben. (Deutlich rot.)

Gefunden: 10,08 mg Formol-N in 10 ccm

„ 101,4% „

Berechnet: 100,0% „

Sörensen¹⁾ fand bei der Titration von Argininchlorid:

99	101	104
99,5	100,5	101
99	100,3	100

In den meisten der untersuchten Fällen wurden 5 g der ganz frischen Organe zunächst grob zerkleinert und dann mit Quarzsand sorgfältigst verrieben; dann wurden 25 ccm destilliertes Wasser zugesetzt, umgeschüttelt und ca. 10 Minuten im Reagierglas absetzen gelassen. Die über dem Bodensatz stehende feine Suspension des Organbreis wurde abgegossen, durchgeschüttelt und nun je 5 ccm in kleine Erlenmeyersche Kölbchen abpipettiert.

Auf diese Art gelangte also auch die Organsubstanz selbst nicht nur ihr wässriger Extrakt zur Reaktion.

In den Fällen, wo von dieser Methode abgewichen wurde, ist dies besonders erwähnt.

Anbei ein Beispiel:

Organ: Kalblebersuspension.

a) Probe: 5 ccm Suspension 5 „ Argininlösung 2 „ Toluol	b) Kontrolle: 5 ccm Suspension 5 „ Wasser 2 „ Toluol.
--	--

6 Stunden im Brutschrank digeriert.

5 ccm Formolmischung²⁾ 5 ccm Formolmischung.

Titration mit $\frac{n}{s}$ -NaOH bis zur starken Rotfärbung.

¹⁾ Sörensen, l. c.

²⁾ 50 ccm Formol + 1 ccm 0,5% Phenolphthalein.

a) Probe:	b) Kontrolle:
verbrauchte $\frac{n}{s}$ -NaOH:	
3,9 ccm	0,6 ccm
0,6 „	
Differenz 3,3 ccm	

Um gleiche Volumen zu erhalten, wurde nun diese Differenz (3,3 ccm) als Wasser zur Kontrolle zugesetzt, was aber in keinem Falle eine Änderung des Farbtones verursachte.

Gefunden: 9,24 mg Formol-N.

In Prozenten:

Gefunden: 185,9%

Berechnet: 200,0%,

also fast vollkommener Abbau. Bei 14stündigem Digerieren stieg der Wert dann auf 196%, über welche Zahl er auch nach 48 Stunden nicht hinausschritt.

Es sind in der folgenden Tabelle die Resultate mit Lebersuspension der verschiedenen untersuchten Tiere zusammengefaßt:

Versuche mit Lebersuspension.

Tierart	Suspension ccm	Arginin- lösung ccm	Ver- brauchte $\frac{n}{s}$ - NaOH ccm	Zeit in Stun- den	Gefunden Formol-N %	Arginase vor- handen oder nicht?	Indikator
Kalb	5	5	3,3	24	185,9	+	Phenolphthalein
Hund	5	5	3,4	24	191,6	+	„
Katze	5	5	3,4	24	191,6	+	„
Ratte	5	5	3,4	18	191,6	+	„
Meerschwein . .	5	5	3,5	20	197,1	+	„
Huhn	5	5	1,8	36	101,4	—	„
Taube	5	5	1,8	36	101,4	—	„
Frosch	5	5	3,4	12	191,6	+	„
Blindschleiche .	5	5	1,8	24	101,4	—	„
Ringelnatter . .	5	5	1,8	24	101,4	—	„

Die angeführten Versuche bestätigen die Beobachtungen von Clementi. Um die sichere Abwesenheit der Arginase in der Vogelleber festzustellen, untersuchte er auch den Preßsaft

von Hühnerleber, der mit der Buchnerschen Presse gewonnen wurde. Er fand auch in diesem Falle keine Wirkung, was sich mit meinen Beobachtungen völlig deckt:

5 ccm Preßsaft verbrauchten 1,8 ccm $\frac{n}{5}$ -NaOH, d. i. = 101,4% Formolstickstoff.

Es folgen nun Versuche mit Suspensionen von verschiedenen Organen.

Tier	Organ	Argininlösung ccm	Verbrauchte $\frac{n}{5}$ -NaOH ccm	Zeit in Stunden	Gefunden Formol-N %	Arginase vorhanden oder nicht?	Indikator
Kalb	Thymus	5	1,8	48	101,4	—	Phenolphthalein
»	Niere	5	1,8	48	101,4	—	
Hund	Milz	5	1,9	36	107,0	—	»
»	Niere	5	1,7	36	95,7	—	»
Katze	»	5	1,8	36	101,4	—	»
»	Milz	5	1,8	24	101,4	—	»
»	Hoden	5	1,7	24	95,7	—	»
»	Gehirn	5	1,8	24	101,4	—	»
»	Darmschleimhaut	5	1,8	36	101,4	—	»
Meerschwein	Niere	5	1,8	24	101,4	—	»
»	Milz	5	1,9	24	107,0	—	»
Huhn	Niere	5	1,8	48	101,4	—	»
Taube	»	5	1,8	36	101,4	—	»
Ringelnatter	»	5	1,7	36	95,7	—	»

Es konnte also in keinem der untersuchten Fälle Arginase nachgewiesen werden, im Gegensatz zu Clementi, der ihre Gegenwart in der Vogelniere gefunden haben will.

Es folgen nun einige Versuche mit Organpreßsäften, welche mit der Buchnerschen Presse dargestellt wurden:

Und zwar:

Vom Hund: Milz, Niere.

Von der Katze: Milz, Niere und Darmschleimhaut.

In keinem Falle war Arginase nachweisbar und die erhaltenen Prozentzahlen schwanken nur zwischen 95 und 102% Formolstickstoff.

Da möglicherweise das Blut einen Einfluß auf die Tätigkeit des Fermentes ausübt, wurde eine Katze dadurch vollkommen entblutet, daß sie mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült wurde und diese ganz blutfreien Organe geprüft. Es kamen zur Untersuchung:

Leber, Niere, Milz, Hoden, Darmschleimhaut und Gehirn.

Es erwies sich die Gegenwart nur in der Leber (192%), während alle andern Organe negatives Resultat zeigten.

Serum von Hund und Katze enthalten ebenfalls keine Arginase.

Auch zeigte es sich, daß ein Zusatz von Serum zu den verschiedenen blutfreien Organsuspensionen keinen aktivierenden Einfluß ausübt, Versuche, auf deren ausführliche Beschreibung wegen des negativen Resultates verzichtet werden soll.

Zusammenfassung.

1. Die Sörensensche Formoltitration ist ein bequemes und äußerst zuverlässiges Mittel zum Nachweis der Arginase.

Es ist für die meisten Zwecke dem älteren von A. Kossel und H. D. Dakin angegebenen Verfahren vorzuziehen.

2. Soweit meine Untersuchungen reichten, kommt die Arginase in keinem andern Organe als in der Leber vor; sie fehlt jedoch in der Leber der Vögel und Reptilien, wie auch Clementi beobachtet hat. Die von Clementi hervorgehobene Beziehung zur Harnstoffbildung in der Leber wird daher bestätigt.

3. Die Gegenwart dieses Fermentes in den Nieren der Vögel konnte ich im Gegensatze zu Clementi nicht bestätigen.

4. Kossel und Dakin fanden die Arginase mittels ihres gewichtsanalytischen Verfahrens¹⁾ in Niere, Thymus und Darmschleimhaut. Diese Resultate sind dahin zu berichtigen, daß es durch die Formoltitration nicht gelingt, in diesen Organen Arginasewirkung nachzuweisen.

5. Die Versuchsergebnisse sind die gleichen, einerlei ob man mit bluthaltigen oder blutfreien Organen arbeitet.

¹⁾ Kossel und Dakin, Diese Zeitschrift, Bd. 42, S. 184.

6. Durch Zusatz von Serum ist es mir nicht gelungen, in unwirksamen Organsuspensionen und Preßsäften Arginase-wirkung zu aktivieren.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor A. Kossel für die Anregung zu obigen Versuchen und für seine Ratschläge an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.