

Versuche über Wirkung und Vorkommen der Arginase.

Von
S. Edlbacher.

(Aus dem physiologischen Institut in Heidelberg.)
(Der Redaktion zugegangen am 5. Mai 1917.)

Nachdem sich die Formoltitration nach Sørensen als ein bequemes Mittel zum Studium der Arginasewirkung ergeben hat,¹⁾ habe ich den Einfluß verschiedener Salze auf dieses Ferment untersucht.

Es zeigte sich dabei, daß Natriumphosphat auf die Spaltungstätigkeit der Arginase aktivierend wirkt — ob es sich hierbei um eine Beteiligung der Phosphorsäure an dem enzymatischen Prozeß, oder um eine Pufferwirkung handelt, muß noch unentschieden bleiben —, während Calcium- und Magnesiumionen einen verzögernden Einfluß haben. Ebenso sind Alkaliionen ohne Einfluß, sowie das Resultat das gleiche bleibt, wenn Chlorid-, Sulfat- oder Nitrationen zugegen sind. Auch die Gegenwart von Calciumlactat ändert die Reaktionsgeschwindigkeit nicht.

Bei allen Versuchen bediente ich mich eines aus frischer Kalbsleber hergestellten Fermentpulvers, welches mit Hilfe des bei anderen Enzymen schon mehrfach benutzten Aceton-Verfahrens bereitet war.

500 g ganz frische Kalbsleber wurden in der Hackmaschine zerkleinert, mit Kieselgur gut verrieben und in der Buchnerschen Presse bei 300 Atmosphären ausgepreßt. Ich erhielt 200 ccm klaren Preßsaft, der nun unter heftigem Umrühren in dünnem Strahl in 2 Liter Aceton gegossen wurde. Das Ausgeschiedene wurde abgesaugt, mit Aceton gewaschen und im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet. Nach einigen Tagen ließ sich die braunrote, lederartige Masse zu einem feinen Pulver verreiben (Ausbeute 20 g). Zu den in Folge angeführten Versuchen diente eine sog. 1%igen Fermentlösung.

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 95 S. 81 (1915).

1 g Arginasepulver wurde mit 100 ccm destilliertem Wasser zwei Stunden lang geschüttelt und dann filtriert. Auf diese Art glaube ich für jede Versuchsreihe eine ziemlich gleichwertige Fermentlösung erhalten zu haben.

Das Arginasepulver läßt sich bei unverminderter Wirksamkeit monatelang aufbewahren.

Die zu den Versuchen erforderliche Argininlösung wurde wie folgt bereitet:

Reines Arginin-Carbonat wurde mit Salzsäure gegen Azolithmin genau neutralisiert. Zum Vergleich dienten die bekannten Sörensenschen Phosphatmischungen. Diese neutrale Argininchloridlösung wurde nun durch Formoltitrierung einerseits und Kjeldahlbestimmung andererseits genau auf ihren Titer geprüft.

Kjeldahl: 10 ccm Lösung verbrauchten 31,8 ccm $n/10$ - H_2SO_4 .
Gef. = 0,04452 g N in 10 ccm. Daraus berechnet formoltitrierbarer Stickstoff in 1 ccm = 1,113 mg.

Formoltitration:

Probe:	Kontrolle:
10 ccm Argininlösung	10 ccm Wasser
5 » Formol	5 » Formol
<hr/>	
verbraucht: 4,0 ccm $n/5$ -NaOH,	0,1 ccm $n/5$ -NaOH.

Differenz $\frac{0,1}{3,9 \text{ ccm } n/5\text{-NaOH}}$ Somit gefunden formoltitrierbarer Stickstoff 1,092 mg N in 1 ccm = 98,11% des berechneten.

Diese Argininchloridlösung wurde nun bezüglich ihres Verhaltens gegen Froschlebersuspension geprüft, wobei der Wert für «Formol-N» nach 24stündiger Enzymwirkung auf 186,0% stieg.

Allgemeine Methodik der Aktivierungsversuche.

Prinzip der Untersuchungsmethode war das folgende:

Es wurden 4 Erlenmeyersche Kölbchen in der angegebenen Weise beschickt:

I.	II.
5 ccm Argininlösung,	5 ccm Wasser,
5 » 1%ige Fermentlösung,	5 » 1%ige Fermentlösung,
15 » Aktivatorlösung.	15 » Aktivatorlösung.

III.

5 ccm Argininlösung,
5 » 1%ige Fermentlösung,
15 » Wasser.

IV.

5 ccm Wasser,
5 » 1%ige Fermentlösung,
15 » Wasser.

Diese 4 Kölbchen, welche ich als «Tetrade» bezeichnen will, ergaben jemals einen Wert. I und II ergeben den Wert des abgebauten Arginins unter dem Einfluß der zugesetzten Salzlösung, III und IV ergeben den Wert für umgesetztes Arginin ohne besondere Beeinflussung durch Salze nach einer bestimmten Zeit.

Die Differenz zwischen I, II und III, IV ergibt daher naturgemäß die Zunahme, bezw. die Abnahme der Wirkungsintensität des Fermentes.

Es wurden nun zu gleicher Zeit immer eine größere Anzahl solcher «Tetraden» angesetzt, zur gleichen Zeit in den Brutschrank (37°) gebracht und in den in den Tabellen angeführten Zeitintervallen titriert. Außerdem wurden auch Werte bei Zimmertemperatur (18°) ermittelt.

Diese Art der Versuchsanordnung gestattete ein bequemes und sicheres Arbeiten.

Versuche mit Phosphatlösungen.

Zur Anwendung gelangte eine Lösung, die durch eine Mischung von gleichen Teilen der beiden von Sörensen angegebenen Lösungen erhalten wurde und also vollkommen neutral war.

Tabelle.¹⁾

1. Versuch bei 18°.

Zeit Stunden	Formol-N mit Phosphat %	Formol-N ohne Phosphat %	Differenz
1/2	115,7	110,6	5,1
1	130,8	120,7	10,1
2	145,9	130,8	15,1
3	151,0	139,2	11,8
5	161,0	155,9	5,1
7	171,1	171,1	0,0

¹⁾ Vgl. hierzu diese Zeitschr., Bd. 95, S. 82, 1915.

Es ergibt sich daraus eine erhebliche Steigerung der Arginasewirkung, die nach ca. 2 Stunden ein Maximum erreicht.

Tabelle II.

2. Versuch bei 37°.

Zeit Minuten	Formol-N mit Phosphat ‰	Formol-N ohne Phosphat ‰	Differenz
30	125,8	120,7	5,1
60	155,9	145,9	10,0
90	166,1	155,9	10,2
120	171,1	161,0	10,1
280	185,7	181,1	4,6

Naturgemäß ist die Reaktionsgeschwindigkeit bei erhöhter Temperatur größer und das Maximum der Aktivierung wird nach 90 Minuten erreicht.

Versuche mit Calciumsalzlösungen.

Als aktivierende Lösung wurde eine $n/15$ -Calciumchloridlösung angewendet.

Tabelle III.

3. Versuch (37°).

Zeit Stunden	Formol-N mit CaCl_2 ‰	Formol-N ohne CaCl_2 ‰	Differenz
$\frac{1}{2}$	110,6	120,7	10,1
1	125,7	145,9	20,2
$1\frac{1}{2}$	140,9	161,0	20,1
5	161,0	185,7	24,7

Aus diesen Zahlen ergibt sich die überraschende Tatsache, daß Calciumchlorid eine bedeutende Hemmung ausübt, eine Erscheinung, welche auch die Lösungen von Calciumnitrat, Ca-Sulfat und Magnesiumsulfat zeigen.

Die Versuche, die ich in dieser Richtung anstellte, waren den eben beschriebenen vollkommen analog. Es ergaben sich Differenzen von ca. 20% Formolstickstoff nach einer Einwirkungszeit von 2—3 Stunden.

Daß die hemmende Wirkung den Erdalkalitionen zugeschrieben werden muß und nicht etwa den Chlorid-, Sulfat- oder Nitrationen, geht daraus hervor, daß Zusatz von Natriumchlorid, Kaliumsulfat keinerlei aktivierende oder hemmende Wirkung zeigen, wie auch eine Lösung von Calciumlactat ohne Einfluß ist.

Zusammenfassung.

Zusammenfassend können wir daher sagen, daß Phosphationen auf die Arginase aktivierend, Erdalkalitionen aber hemmend auf ihre Wirkung sind.

Versuche zur Darstellung eines Co-Fermentes.

Die zahlreichen Versuche, um noch in anderer Weise die Abhängigkeit der Arginasewirkung von Aktivatoren oder «Cofermenten», die in der Lebersubstanz vorhanden sind, darzutun, verliefen negativ. So wurde z. B. Leberpreßsaft längere Zeit hindurch dialysiert, um festzustellen, ob dadurch die Fermentlösung inaktiviert würde; tatsächlich aber zeigte sich dabei keine Änderung ihrer Wirksamkeit.

Abwesenheit der Arginase in Hefe und in Sojabohnen.

K. Shiga¹⁾ untersuchte die Wirkung von Hefe auf Arginin und fand dabei durch eine gewichtsanalytische Bestimmung, daß die ganze angewandte Argininmenge in der bekannten Weise gespalten worden war.

Ohne die Richtigkeit der von ihm angegebenen Tatsachen zu bezweifeln, haben aber zahlreiche in dieser Richtung angestellte Versuche ergeben, daß sowohl in Hefe als in der Sojabohne **keine** Arginase vorhanden ist.

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. 42, S. 505, 1904.

Insofern nicht bei den Versuchen Shigas eine bakterielle Zersetzung des Arginins anzunehmen ist, bleiben die Resultate seiner Untersuchungen ungeklärt, denn die Arginasewirkung ist durch die Formoltitration mit großer Genauigkeit zu verfolgen.

Vorkommen im fötalen Organismus.

Da die Arginase bis jetzt nur in der Leber nachgewiesen werden konnte, aber, soweit unsere Kenntnis reicht, in der Leber der Reptilien und Vögel fehlt, lag es nahe, den embryonalen Organismus daraufhin zu prüfen.

Es wurden dazu ganz frische menschliche Embryonen untersucht und die folgende Tabelle gibt darüber Aufschluß.

Alter	Geschlecht	Zeit nach d. Abortus	Leber	Niere	Dünndarm
4 Monate	männlich	1 Stunde	+	—	—
5 „	„	1 „	+	—	—
6 $\frac{1}{2}$ „	weiblich	2 „	+	—	—
7 „	männlich	$\frac{1}{2}$ „	+	—	—

Auch hier erweist sich wieder nur die Leber als arginasehaltiges Organ.

Versuche mit Guanidinessigsäure und Guanidinpropionsäure.

Um die Frage der Spezifität der Arginasewirkung zu untersuchen, ließ ich Arginaselösung auf Lösungen von Guanidinessigsäure und Guanidinpropionsäure einwirken. Beide Verbindungen enthalten den Guanidinkomplex in analoger Weise wie das Arginin.

Es zeigte sich jedoch keine Abspaltung von Harnstoff, bzw. keine Zunahme des Formolstickstoffes.

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