

167. Über die Verwendung von Indigo-disulfonat in der Fermentmethodik

zugleich 8. Mitteilung über den enzymatischen Abbau von Polyaminen¹⁾

von E. Albert Zeller.

(2. XI. 40.)

In der 3. Mitteilung dieser Untersuchungsreihe²⁾ wurde festgestellt, dass Indigo-disulfonat durch die Diamin-Diamin-oxydase-Reaktion (DDR.) entfärbt wird. Es handelt sich um einen oxydativen Vorgang, da die Reaktion bei Abwesenheit von Sauerstoff ausbleibt. Höchst wahrscheinlich ist es derselbe Vorgang, den C. F. Schönbein schon 1856 beschrieben hatte³⁾. Dieser hatte nämlich gefunden, dass Indigo, gelöst in Schwefelsäure, durch Wasserstoffperoxyd bei Gegenwart von roten Blutkörperchen rasch entfärbt wird. Im Falle der Diamin-oxydase (Do.) hatte ich das Auftreten von Wasserstoffperoxyd, das sehr wahrscheinlich durch Autoxydation eines Dihydro-flavins entsteht⁴⁾, durch die Sekundäroxidation von Äthylalkohol und Hämoglobin nachgewiesen⁵⁾. Die Übertragung des Peroxyds auf den zu oxydierenden Körper geschieht mit Hilfe einer peroxydatisch wirksamen Substanz. Nach Keilin und Hartree⁶⁾ spielt die Katalase in dieser Hinsicht eine grosse Rolle. Doch gibt es auch Häminverbindungen nicht enzymatischer Natur mit peroxydatischer Wirkung.

In dieser Indigomethode besitzt man ein denkbar einfaches Verfahren zur Messung von Fermentaktivitäten. Mit der klassischen Thunberg-Methode hat sie das gemeinsam, dass die Entfärbung eines Farbstoffes gemessen wird. Doch hat sie vor dieser eine noch grössere Einfachheit voraus, da es nicht wie bei jener nötig ist, die geringsten Sauerstoffspuren zu entfernen. Die Indigomethode kann man auch dazu verwenden, den Reaktionsverlauf eines Ferments zu studieren, indem man die Entfärbung im Kolorimeter oder Stufenphotometer verfolgt. Sie ist auch besonders gut zu Demonstrationszwecken und didaktischen Aufgaben geeignet, da mit ihr verhältnismässig unanschauliche Begriffe wie Eigenhemmung durch überoptimale Substratkonzentration, Summationseffekt, Konkurrenzeffekte usw. wirklich ad oculos demonstriert werden können.

¹⁾ 7. Mitteilung, E. A. Zeller, Helv. **23**, 1418 (1940).

²⁾ E. A. Zeller, Helv. **21**, 1645 (1938).

³⁾ C. F. Schönbein, Abh. bayer. Akad. Wiss. (II), **8**, 1. Abt. (1856).

⁴⁾ E. A. Zeller, R. Stern und M. Wenk, Helv. **23**, 3 (1940).

⁵⁾ E. A. Zeller, Helv. **21**, 880 (1938).

⁶⁾ Keilin und Hartree, Proc. Roy. Soc. [B] **119**, 141 (1936).

Im Folgenden wird, nachdem zuerst die Methode beschrieben wird, ihre Verwendbarkeit bei der Untersuchung einiger neuer und schon bekannter Reaktionen der Do. dargelegt.

Methodik.

Die Fermentlösungen werden in der gleichen Weise, wie das früher schon beschrieben worden ist¹⁾, aus getrockneter Schweineiere gewonnen. Frische Organe werden mit der fünffachen Menge 2,5-proz. Kochsalzlösung verrieben und nach dem Zentrifugieren die überstehende Lösung verwendet. Alle Fermentlösungen werden gründlich gegen Phosphatpuffer p_H 7,2 dialysiert. Alle Substrate, Hemmungskörper usw. sind im gleichen Puffer gelöst. Die Basen werden ausschliesslich als Hydrochloride benützt. In einem normalen Ansatz werden 2 cm³ Fermentlösung und 0,3 cm³ Indigo-disulfonat (20 mg in 30 cm³ gelöst) verwendet und mit Puffer auf das Volumen von 3 cm³ gebracht. Die Reaktion spielt sich in weiten Reagensgläsern, die mit doppelt durchbohrten Stopfen verschlossen sind, wie sie für die Ammoniakbestimmung nach *Folin* zur Anwendung gelangen, ab. Zu Beginn der Reaktionen werden die Lösungen mit Sauerstoff durchströmt, verschlossen und bei 38° inkubiert. Bei Do.-Versuchen wird ausserdem in jedes Gefäss 1 Tropfen Octylalkohol zur Verhinderung des bakteriellen Wachstums und des Schäumens zugegeben.

Bei den meisten Versuchen wurde der Zeitpunkt der völligen Entfärbung bestimmt. Je aktiver das Ferment ist, desto rascher tritt diese ein. Bei klaren Lösungen kann die Entfärbung mit dem Stufenphotometer verfolgt werden (Filter S 61). Bei trüben und undurchsichtigen Ansätzen dagegen muss zuerst eine Enteiweissung mit Trichloressigsäure vollzogen werden (gleiches Volumen 10-proz. Lösung), bevor photometriert werden kann. Gewöhnlich hatte ich diese Enteiweissung und Messung dann durchgeführt, wenn bei der ersten Probe die Entfärbung eingetreten war. Dann wurde die noch vorhandene Indigomenge der übrigen mit der des Ansatzes ohne Substrat verglichen und in Prozenten angegeben. Diese Behandlung mit Trichloressigsäure kann sich auch dann als nötig erweisen, wenn mit kleinen Indigokonzentrationen und stark gefärbten Organextrakten, wie Leber und Rinderserum, gearbeitet wird, bei welchen eine schwerer zu beurteilende Mischfärbung entsteht.

Um zu erfahren, wie weit sich die Methode zu quantitativen Versuchen eignet, wurde die gleiche Indigomenge zu einer Reihe von verschieden starken Fermentlösungen gegeben und die Entfärbungszeiten gemessen. In Tabelle 1 ist das Resultat eines solchen Versuches wiedergegeben.

¹⁾ E. A. Zeller, B. Schür und S. Staehlin, *Helv.* **22**, 837 (1939); E. A. Zeller, H. Birkhäuser, H. Mistlin und M. Wenk, *Helv.* **22**, 1381 (1939).

Tabelle 1.
Entfärbungszeiten mit verschiedenen Fermentmengen.

| Fermentmenge | Minuten Entfärbungszeit | Entfärbungszeit auf die Enzymmenge 4 umgerechnet |
|--------------|----------------------------|--|
| 4 | 85 | 85 |
| 3 | 110 | 82 |
| 2 | 155 | 77 |
| 1 | 255 | 66 |

Aus der Tabelle geht hervor, dass die Entfärbungszeit recht gut der Fermentkonzentration entspricht. Mit zunehmender Versuchsdauer nehmen die Entfärbungszeiten relativ zur Fermentkonzentration etwas ab. Der Grund ist wohl darin zu suchen, dass bei längerer Dauer sekundäre Oxydationsprozesse (z. B. Autoxydation des bei der DDR. gebildeten Aldehyds) sich bemerkbar machen. — In den Ansätzen, bei denen ein grosser Teil des Indigo entfärbt worden ist, tritt übrigens nach dem Enteiweissen nach einigen Stunden Stehen eine weinrote, allmählich ablassende Farbe auf.

1. Die Hemmung der Diamin-oxydase durch Methyl- und Amylamin.

Wenn die in der vorangehenden Mitteilung entwickelte Vorstellung von der „competitiven“ Hemmung des enzymatischen Abbaus von Diaminen durch Monoamine richtig ist, müssen Methylamin und Amylamin die Do. hemmend beeinflussen können. Mit der Indigomethode kann das leicht gezeigt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2.
Hemmung des enzymatischen Abbaus von Diaminen durch Monoamine.

| Substrat | Entfärbung |
|---|---|
| Cadaverin 0,0033-m. Amylamin 0,013-m. Cad. + Amylamin Ferment allein ¹⁾ | in 100' entfärbt in 100' keine erkennbare Entfärbung in 100' Grünfärbung ²⁾ in 100' keine erkennbare Entfärbung |
| Cadaverin 0,008-m. Methylamin 0,01-m. Cad. + Methylamin | in 160' entfärbt in 160' keine erkennbare Entfärbung in 160' Grünfärbung ²⁾ |
| Cadaverin 0,0067-m. Methylamin 0,02-m. Cad. + Methylamin | in 120' entfärbt in 120' keine erkennbare Entfärbung in 120' grünblau ²⁾ |

¹⁾ Bei den Ansätzen ohne Substrat findet auch nach 24 Stunden keine merkliche Entfärbung statt. Sie werden deshalb in den folgenden Tabellen in der Regel weggelassen.

²⁾ Die verwendeten Diamin-oxydase-Lösungen sind gelb gefärbt. Wenn nur noch wenig Indigo-disulfonat vorhanden ist, entstehen Mischfarben.

Aus diesem Versuch geht ohne weiteres hervor, dass die angewandten Monoamine eine hemmende Wirkung ausüben. Die Konzentration, die dazu nötig ist, ist recht hoch und um das Mehrfache grösser als die des Cadaverins, das allerdings eine verhältnismässig grosse Affinität zur Do. aufweist¹⁾.

2. Konkurrenzversuche und Summationseffekt.

Wenn zu einer Diamin-oxydase-Lösung, die schon durch ein Substrat gesättigt ist, noch ein weiteres hinzugefügt wird, so wird die Entfärbungszeit nicht entsprechend kürzer, weil ja schon alle aktiven Gruppen des Enzyms durch Substrat besetzt sind. Wenn das eine der beiden Substrate eine wesentlich langsamere Abbau-geschwindigkeit hat, so kommt es sogar vor, dass die Entfärbungszeit bei Anwesenheit beider Substrate grösser ist, als wenn jedes Substrat allein zum Ferment gegeben wird (Versuch 3). Dieses Ergebnis entspricht genau der in der vorangehenden Mitteilung ausführlich diskutierten Hemmung der Do. durch überoptimale Substratkonzentration.

Tabelle 3.
Konkurrenzversuch zwischen Histamin und Putrescin.

| Substrat | Indigo-Entfärbung nach 250 Minuten | Prozent Entfärbung nach 250 Minuten |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Histamin 0,0017-m. | vollständig | 100 |
| Putrescin 0,0067-m. | blau | 59 |
| Histamin + Putrescin | grüngelb | 98 |
| Ferment allein | blau | 0 |

In der vorangehenden Mitteilung (l. c.) wurde gezeigt, dass Kaliumcyanid die Eigenhemmung der Do. durch überoptimale Substratkonzentration verstärkt und umgekehrt. Dieser Summationseffekt kann auch mit der Indigomethode leicht zur Darstellung gebracht werden (Tabelle 4).

Tabelle 4.
Verstärkung der Cyanidhemmung der Do. durch grosse Substratkonzentration.

| Substrat | Entfärbung |
|-----------------------------|--------------------|
| Cadaverin 0,0017-m. | nach 125' entfärbt |
| „ 0,0033-m. | „ 125' „ |
| „ 0,0017-m. + KCN 0,0033-m. | „ 420' „ |
| „ 0,0033-m. + „ „ | „ 420' noch blau |

¹⁾ E. A. Zeller, B. Schür und S. Staehlin, l. c.

Obwohl durch die höhere Cadaverin-Konzentration das Indigo-disulfonat sogar eine Spur rascher als durch die kleinere zur Entfärbung gebracht wird, ist die Hemmung durch Kaliumcyanid bei der grössern Cadaverin-Konzentration wesentlich grösser.

3. Die Hemmung der Diamin-oxydase durch Cholin.

Histamin hemmt die Cholin-esterase¹⁾. Da Cholin ein Monoamin ist, müsste es umgekehrt die Do. hemmen. Die Affinität des Cholins zur Do. ist aber sehr klein, so dass eine Hemmung des Cadaverin-Abbaus kaum gefunden wird. Erwartungsgemäss liess sich aber eine Beeinflussung des Putrescins mit seiner geringen Affinität²⁾ zeigen. Aus dem Versuch Tabelle 5 geht überdies hervor, dass in dem System Do./Putrescin/Cholin der Summationseffekt auftritt, dass also dieser, wie es von vornherein wahrscheinlich war, nicht ausschliesslich nur beim Kaliumcyanid sich findet. Die ausführliche Besprechung des Effekts findet sich in der vorangehenden Mitteilung.

Tabelle 5.
Hemmung der Do. durch Cholin.

| Substrat | Entfärbung nach 275' | Hemmung |
|--|----------------------|---------|
| Ferment allein | 0% | |
| Putrescin 0,0017-m. | 63% | |
| „ 0,0033-m. | 86% | |
| „ 0,01-m. | 100% | |
| Putrescin 0,0017-m. + Cholin 0,0133-m. . . | 62% | 2% |
| „ 0,0033-m. + „ „ . . | 68% | 21% |
| „ 0,01-m. + „ „ . . | 35% | 59% |

4. Die Hemmung der Diamin-oxydase durch Semicarbazid.

Es kommt nicht bei jedem Hemmungsversuch zum Summationseffekt. Wenn Affinität und Konzentration entsprechend gross sind, kann das Substrat mit zunehmender Konzentration den hemmenden Körper von der aktiven Gruppe des Ferments verdrängen, so dass es zu einer typischen Konkurrenzerscheinung kommt. Als Beispiel sei ein Versuch mit Semicarbazid angeführt (Tabelle 6).

1 γ Semicarbazid pro 1 cm³ übt noch eine deutlich hemmende Wirkung auf die Do. aus.

¹⁾ Wense, Fermentforsch. **15**, 291 (1937).
²⁾ E. A. Zeller, B. Schär und S. Staehlin, l. c.

Tabelle 6.
Hemmung der Do. durch Semicarbazid.

| Substrat | Entfärbung |
|---|-------------------------------------|
| Cadaverin 0,0033 | 180' |
| „ 0,0133 | 180' |
| „ 0,0033 + Semicarbazid 0,000,003,3 . . | nach 180' grün |
| „ 0,0133 + „ „ | „ 180' blau |
| „ 0,0033 + „ 0,00001 | „ weniger als 16 Std. Entfärbung |
| „ 0,0133 + „ „ | „ 16 Std. grün |

5. Die Bestimmung kleiner Diamin-oxydase-Konzentrationen.

Während die Resultate der bisher mitgeteilten Versuche auch mit den bisher verwendeten Methoden gewonnen werden könnten, bedeutet die Indigomethode bei der Bestimmung kleiner Do.-Konzentrationen einen deutlichen Fortschritt. Es kommt nicht selten vor, dass in diesen Fällen die Bestimmung des gebildeten Ammoniaks oder des verbrauchten Sauerstoffs versagt, weil die Werte der Ansätze ohne Substrat grösser sind als die mit Substrat. Das kann auch dann der Fall sein, wenn Diamine sicher abgebaut worden sind. Bei der Indigomethode dagegen kommt es fast nie zu einer Entfärbung, wenn kein Substrat zugegen ist. Bei den üblichen Do.-Präparaten und im Serum kommt es auch nach mehreren Tagen Inkubation zu keiner merklichen Entfärbung. Auch dort, wo, wie etwa bei Leberbrei, eine merkliche Abnahme der Farbtintensität auftritt, findet sich bei den Ansätzen mit und ohne Substrat ein merklicher Unterschied, sofern überhaupt ein Diaminabbau stattfindet. Die Indigomethode hat sich deshalb sehr gut zur Messung der Do. des Serums bewährt. Da dieser Nachweis der Do. im Serum für die chemische Schwangerschaftsdiagnose¹⁾ benützt werden kann (vgl. auch nachstehende Arbeit), wird sie an anderer Stelle ausführlicher beschrieben werden²⁾. Als Beispiel sei hier lediglich die Bestimmung der Do. in der Leber gravidier und nicht gravidier Ratten angeführt (Tabelle 7).

Während also in der aus der Leber gravidier Tiere gewonnenen Fermentlösung die Intensität der Farbe um fast die Hälfte gegenüber dem Minuswert abgenommen hat, ist bei der Leber nicht gravidier Tiere die Intensität des substratfreien Ansatzes sogar etwas grösser als die des substrathaltigen.

¹⁾ E. A. Zeller und H. Birkhäuser, 1. Mitteilung zur Methodik der chemischen Schwangerschaftsbestimmung, Schweiz. med. Wschr. **70**, 975 (1940).

²⁾ E. A. Zeller, 4. Mitteilung zur Methodik der chemischen Schwangerschaftsbestimmung, Schweiz. med. Wschr. **70** (1940) im Druck.

Tabelle 7.

Do.-Gehalt in der Leber gravider und nicht gravider Ratten.
Nach 21 Std. Inkubation Enteiweissung mit Trichloressigsäure und Messung der Ex-
tinktion mit Filter S 61. Schichtdicke 2 cm.

| | Extinktion |
|---------------------------------|------------|
| Leber gravides Tier | 0,495 |
| „ „ „ + Cadaverin | 0,268 |
| „ nicht gravides Tier | 0,347 |
| „ „ „ „ + Cadaverin | 0,432 |

6. Die Entfärbung des Indigo-disulfonats durch andere Fermente.

Indigo-disulfonat wird nicht nur durch die Do., sondern auch durch die Monoamin-oxydase, durch die Aminosäure-oxydase und die Cholin-oxydase entfärbt. Erwartungsgemäss fand bei der Cholin-esterase keine Farbveränderung statt, da es sich bei dieser um einen hydrolytischen und nicht um einen oxydativen Vorgang handelt. Die mit der Indigomethode an andern Fermenten gewonnenen Erfahrungen sollen später mitgeteilt werden.

Zusammenfassung.

Indigo-disulfonat wird durch den enzymatischen Abbau von Diaminen oxydativ entfärbt. Diese Reaktion kann zur denkbar einfachsten Messung der Diamin-oxydase benützt werden. Es werden mehrere mit andern Methoden gewonnene Ergebnisse auch mit dieser Methode bestätigt. Dazu wurde neu gefunden, dass Methylamin, Amylamin und Cholin die Do. hemmen. Mit Cholin und Putrescin lässt sich der Summationseffekt nachweisen. In der Leber gravider Albinoratten ist der Do.-Gehalt gegenüber der Leber nicht gravider Tiere deutlich erhöht.

Physiologisch-chemisches Institut
der Universität Basel.