

Zusammenfassung.

1. Fumarsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure, Oxalessigsäure, Ketoglutarinsäure und Citronensäure können als kräftige Aktivatoren den oxydativen Abbau von Brenztraubensäure, Milchsäure und Glycerophosphorsäure durch zellfreien Rattenleberextrakt katalysieren.

2. Unter bestimmten Versuchsbedingungen findet der oxydative Abbau der Substrate nur bei Gegenwart eines Aktivators statt.

3. Unter anderen Versuchsbedingungen werden die genannten Substrate erst abgebaut, wenn ausser einer Komponente des Citronensäurecyclus *l*-Histidin als Aktivator zugegen ist.

4. Der durch Aminosäure- oder Fumarsäurekatalyse bedingte Abbau von Brenztraubensäure kann sich bis zu den Oxydationsendprodukten, Kohlendioxyd und Wasser, erstrecken.

5. Die Aktivierungseffekte sind in entscheidendem Masse von der Stoffwechsellage des Organs abhängig.

Herrn Prof. *Edlbacher*, der die Anregung zu diesen Untersuchungen gegeben hat, sei auch an dieser Stelle für seine Ratschläge bestens gedankt.

Frl. *Frieda Nebiker* danke ich für die sorgfältige Durchführung der Versuche.

Basel, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

108. Versuche zur Reinigung der Histidase

von **Ch. J. Morel.**

(10. V. 46.)

In der Arbeit von *S. Edlbacher* und *G. Viollier*¹⁾ wurde eine Adsorptionsmethode beschrieben, nach der es gelang, die in der Leber vorkommenden Enzyme Histidase und Urocaninase zu trennen. Das auf diese Weise gewonnene Präparat war nun ohne Wirkung auf die Urocaninsäure, enthielt aber immer noch Arginase. Eine Trennung von letzterer gelang auch durch wiederholte Adsorption mit dem damals verwendeten Bleiphosphat nicht.

In weiteren Untersuchungen haben sich nun fraktionierte Ammoniumsulfatfällungen als ausschliessliches Reinigungsverfahren als ungeeignet erwiesen, weil Ammoniumsalze in hoher Konzentration die Bestimmung der Histidase- und der Arginasespaltprodukte stören, und weil dadurch die Sicherstellung eines arginasefreien Histidasepräparates erschwert ist. Durch Kombination der Adsorptions- und Fällungsmethode gelang es nun aber, diese Schwierigkeit

¹⁾ Z. physiol. Ch. **276**, 108 (1942).

zu überwinden und so ein arginase- und urocaninasefreies Histidasepräparat zu erhalten. Dieses Präparat war ausserdem noch frei von Amylase und Lipase. Es enthielt aber immer noch Katalase.

Die Bereitung eines wirksamen Histidasetrockenpräparates ist bisher nicht gelungen, da die Aktivität der Histidase bei der Fällung mit Aceton oder Alkohol verloren geht. Wird nun aber die Ammoniumsulfatfraktion, welche die Histidase enthält, über P_2O_5 im Vakuum bei 4^0 getrocknet, so behält dieses Präparat die Histidaseaktivität, und es kann bei $0-5^0$ monatelang aufbewahrt werden, ohne merklich an Aktivität zu verlieren. Die eigentümliche Erscheinung der antipodischen Hemmung, die von *S. Etlbacher*¹⁾ das erste Mal am Beispiele des Histidins beschrieben wurde, und die darin besteht, dass die enzymatische Spaltung des natürlichen Antipoden durch einen Überschuss vom gleichzeitig anwesenden unnatürlichen Antipoden stark gehemmt wird, und die *S. Etlbacher* und *O. Wiss* am Beispiel²⁾ der *d*-Aminosäure-oxydase nachweisen konnten, lässt sich auch mit gereinigter Histidase lösung reproduzieren. Sie wird also sicher nicht durch unspezifische Begleitstoffe hervorgerufen, sondern ist eine essentielle Eigenschaft der Histidase. Auch durch grosse Enzymkonzentration liess sich *d*-Histidin nicht abbauen, im Gegensatz zur Arginase, bei der unter diesen Bedingungen *d*-Arginin gespalten wird³⁾. Es sei in diesem Zusammenhang daran erinnert, dass als erster *O. Riesser*⁴⁾ feststellte, dass unter gewissen Bedingungen Leberextrakte nur natürliches *l*-Arginin in Harnstoff und Ornithin spalten. Andererseits fanden *K. Felix* und *K. Morinaka*⁵⁾, dass bei der Durchströmung der überlebenden Leber racemisches Arginin vollkommen zerlegt wird. In Fortsetzung dieser Untersuchungen haben dann *S. Etlbacher* und *A. Zeller*³⁾ gezeigt, dass tierische Leberarginase in hoher Konzentration beide optische Modifikationen des Arginins in Harnstoff und Ornithin zerlegen kann. *A. A. Albanese*, *V. Irby* und *J. E. Frankston*⁶⁾ berichten nun in einer Untersuchung über die Verwertung von *d*-Aminosäuren beim Menschen. In dieser Abhandlung wird nur auf die Arbeit von *O. Riesser* (l. c.) Bezug genommen. In weiteren Untersuchungen über die Verwertung von *d*- und *l*-Aminosäuren durch den tierischen Organismus von *S. Etlbacher* und *K. Schmid*⁷⁾ wird gezeigt, dass in Fortsetzung früherer Untersuchungen von *J. Wohlgemuth*⁸⁾, *Cox* und *Rose*⁹⁾, *Schönheimer* und *Rittenberg*¹⁰⁾, *Todder* und *Berg*¹¹⁾ der Beweis geführt werden konnte,

¹⁾ Z. physiol. Ch. **265**, 61 (1940).

²⁾ Helv. **27**, 1831 (1944) und **28**, 797 (1945).

³⁾ Z. physiol. Ch. **242**, 253 (1936).

⁷⁾ Helv. **28**, 1079 (1945).

⁴⁾ Z. physiol. Ch. **49**, 210 (1906).

⁸⁾ B. **38**, 2064 (1905).

⁵⁾ Z. physiol. Ch. **132**, 152 (1923).

⁹⁾ J. Biol. Chem. **68**, 78 (1926).

⁶⁾ J. Biol. Chem. **160**, 25 (1945).

¹⁰⁾ J. Biol. Chem. **127**, 385 (1939).

¹¹⁾ J. Biol. Chem. **117**, 351 (1935) und **127**, 375 (1939).

dass der tierische Organismus in ausgedehntem Masse die Fähigkeit besitzt, *d*-Aminosäuren zu verwerten. Es ist demnach festzustellen, dass vor *Albanese* zahlreiche andere Forscher den Abbau der *d*-Aminosäuren im tierischen Organismus nachgewiesen haben.

Es wurde nun noch das Verhalten der gereinigten Histidase-lösung im Dialysierversuch untersucht. Auch da konnte kein Unterschied im Verhalten gegenüber dem Rohextrakt gefunden werden. Die gereinigte Histidase behielt während 48-stündiger Dialyse ihre Aktivität. Wie nun eine Arbeit von *A. C. Walker* und *C. L. A. Schmidt*¹⁾ zeigt, fanden diese Autoren bei einer gereinigten Histidase-lösung, die sie auf einem anderen Wege als dem hier beschriebenen darstellten, dasselbe Verhalten und bestätigten somit diese Befunde.

Das folgende Schema gibt eine Übersicht über die Art der Trennung der drei Enzyme:

Rohextrakt	enthält Urocaninase, Arginase, Histidase
	↓ Fällung Ammoniumsulfat
gelöst	in Phosphatpuffer $p_H = 8,0$ enthält Urocaninase, Arginase, Histidase
	↓ 1. Adsorption bei $p_H = 5,3$
eluiert	mit Phosphatpuffer $p_H = 8,0$ enthält Arginase, Histidase
	↓ 2. Adsorption bei $p_H = 5,3$
eluiert	mit Phosphatpuffer $p_H^* = 8,0$ enthält Histidase

Experimenteller Teil.

1. Histidinbestimmung.

Da sich bei den Ammoniumsulfatfällungen keine Ammoniakbestimmungen durchführen liessen, wurde das in den Ansätzen nicht gespaltene Histidin kolorimetrisch nach der von *S. Edlbacher*, *H. Baur*, *H. R. Staehelin* und *A. Zeller*²⁾ angegebenen Methode mit *p*-Chloranilin bestimmt. Dazu wurden die Ansätze 5 Minuten in ein siedendes Wasserbad gebracht, filtriert und vom Filtrat ein aliquoter Teil zur Histidinbestimmung verwendet.

2. Fraktionierung durch Ammoniumsulfatfällung.

Die Rattenlebern werden mit ca. dem doppelten Gewicht an Quarzsand im Mörser fein verrieben, im Verhältnis 1:4 mit *m*/15 Phosphatpuffer $p_H = 8,0$ versetzt und 10 Minuten zentrifugiert. Die überstehende Suspension ist die zu verwendende Histidase-lösung. Die gesättigte Ammoniumsulfatlösung enthält 4,06 Mol $(NH_4)_2SO_4$ im Liter. Die Histidase-lösung wird nun mit steigenden Mengen Ammoniumsulfatlösung versetzt und 10 Minuten zentrifugiert (Tabelle 1). Diese Fällung wird nun jedesmal mit Phosphatpuffer $p_H = 8,0$ auf das ursprüngliche Volumen gelöst. In jedem Ansatz sind 2 cm³ der aus der Ammoniumsulfatfällung durch Lösen derselben erhaltenen Enzym-lösung, 3 cm³ 0,1-n. Histidinlösung ($C_6H_5O_2N_3 \cdot HCl + 1 H_2O$ in Phosphatpuffer $p_H = 8,0$ gelöst, mit 2-n. NaOH auf $p_H = 8,0$ gebracht) und 15 cm³ Phosphatpuffer $p_H = 8,0$. Jeder Ansatz wird dann noch mit 1 cm³ Toluol überschichtet. Die Expositionszeit im Thermostaten bei 38° war immer 18 Stunden. In der ersten Kolonne der Tabelle 1 ist angegeben, unter welchen Bedingungen die Fällung mit Ammoniumsulfat erhalten wurde. In der 2. Kolonne ist derjenige Teil des Histidins angegeben, der nicht abgebaut worden war.

¹⁾ Arch. Biochem. **5**, 445 (1944).

²⁾ Z. physiol. Ch. **270**, 165 (1941).

Tabelle 1.

Fällung durch Ammoniumsulfat		Restliches Histidin	Abgebautes Histidin in Prozent
Rohextrakt + Ammoniumsulfat Volumen	Volumen		
2	—	19,7 mg	68
2	1	64 mg	0
2	2	37,1 mg	40
2	3	54 mg	13
2	4	64 mg	0

Wie aus diesen Resultaten hervorgeht, findet sich die Histidase im Niederschlag bei $\frac{1}{2}$ - und $\frac{3}{5}$ -Sättigung. Aus dieser Fällung gelingt es auch, ein Trockenpräparat zu erhalten:

Die Rohenzymlösung wird 2:1 mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, 10 Minuten zentrifugiert, und der Niederschlag verworfen. Die überstehende Flüssigkeit wird nun 2:3 (im Verhältnis zur Ausgangslösung) mit Ammoniumsulfatlösung versetzt und wiederum 10 Minuten zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird verworfen und der Niederschlag im Vakuumexsikkator über P_2O_5 im Eisschrank getrocknet. Zur Ermittlung des Ammoniumsulfatgehaltes des Präparates wurde das Ammoniak nach Enteiweissung mit Trichloressigsäure nach *Folin* bestimmt und ergab einen Gehalt an Ammoniumsulfat von 80%. Für die Ansätze wurde das Trockenpräparat entsprechend dem ursprünglichen Volumen in Phosphatpuffer $p_H = 8,0$ gelöst.

Tabelle 2.

Ansätze: 2 cm³ Enzymlösung, 3 cm³ 0,1-n. Histidinlösung,
15 cm³ Phosphatpuffer $p_H = 8,0$.

	Abbau mg Histidin
Rohenzym	40 mg
Trockenpräparat	29 mg
Dauer der Aufbewahrung 7 Tage .	29 mg
Dauer der Aufbewahrung 11 Tage .	27 mg
Dauer der Aufbewahrung 16 Tage .	34 mg
Dauer der Aufbewahrung 23 Tage .	27 mg

Durch diese Methode werden Trockenpräparate erhalten, die nach $3\frac{1}{2}$ Monaten Aufbewahrung bei 0—4° noch wirksam sind.

Es wurde auch versucht, die Ammoniumsulfatfällungen bei verschiedenem p_H durchzuführen. Es zeigte sich aber dabei kein Vorteil, da durch die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration die Histidase geschädigt wird.

3. Adsorption an Bleiphosphat.

Diese durch Ammoniumsulfatfällungen vorgereinigten Histidaselösungen wurden nun der weiteren Reinigung durch Adsorption an Bleiphosphat unterworfen.

Darstellung von Bleiphosphatsuspension¹⁾.

120 g $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ werden in einem grossen Stutzen in ca. 3 Liter destilliertem Wasser gelöst. Unter gutem Rühren werden 300 cm³ Bleiacetat-Lösung (Solutio plumbi

¹⁾ Siehe auch *S. Edbacher* und *G. Viollier*, l. c.

subaceti dupl. off.) zugefügt und mit destilliertem Wasser auf 10 Liter aufgefüllt. Nachdem sich der Niederschlag gesetzt hat, wird das überstehende Wasser abgehebert und mit destilliertem Wasser wieder auf 10 Liter aufgefüllt. Das Auswaschen wird so lange wiederholt, bis einige Tropfen Bleiacetat im Waschwasser keine Trübung mehr verursachen.

Zur Adsorption wird eine Suspension verwendet, die 2 g Bleiphosphat pro 100 cm³ Wasser enthält. Um ihre selektive Adsorptionsfähigkeit zu erhalten, muss diese Suspension nun 4—5 Wochen im Eisschrank stehen bleiben. Nur durch Anwendung dieser gealterten Suspension ist es möglich, eine arginasefreie Histidaselösung zu erhalten. Die Durchführung des Versuches gestaltet sich nun folgendermassen: 26 g Rattenleber werden mit Quarzsand im Mörser verrieben und mit 104 cm³ Phosphatpuffer p_H = 8,0 versetzt. Dann wird 10 Minuten zentrifugiert. Die überstehende Lösung (80 cm³) wird zur Vorreinigung mit 4 g Kaolin versetzt und wieder zentrifugiert. Der überstehende Extrakt ist die zur Verwendung gelangende Histidaselösung (A).

60 cm³ dieses Rohextraktes werden mit 30 cm³ gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt und zentrifugiert. Der Niederschlag wird verworfen und die überstehende Lösung mit 60 cm³ Ammoniumsulfatlösung versetzt, zentrifugiert und die überstehende Lösung verworfen. Der Niederschlag wird in 60 cm³ glasedestilliertem Wasser gelöst (B). 45 cm³ dieser Lösung werden nun, mit 45 cm³ Phosphatpuffer p_H = 5,3 versetzt, an 135 cm³ Bleiphosphatsuspension adsorbiert und zentrifugiert. Der Niederschlag wird mit 45 cm³ Phosphatpuffer p_H = 8,0 drei Stunden im Eisschrank eluiert (Lösung C). 30 cm³ dieser Lösung werden nun mit 30 cm³ m/15 KH₂PO₄-Lösung versetzt und unter stetem Rühren vorsichtig mit 15-proz. Citronensäure auf p_H = 5,3 gebracht. Dann wird mit 90 cm³ Bleiphosphatsuspension adsorbiert, zentrifugiert und der Niederschlag drei Stunden im Eisschrank mit 30 cm³ Phosphatpuffer p_H = 8,0 eluiert. Diese Elution enthält nunmehr nur noch Histidase.

Tabelle 3.

Ansätze:

- 3 cm³ 0,1-n. Histidinlösung + 2 cm³ Enzym + 15 cm³ Phosphatpuffer p_H = 8,0;
- 3 cm³ 0,1-n. Argininlösung + 2 cm³ Enzym + 15 cm³ Glykokollpuffer p_H = 9,4;
- 2 cm³ 0,1-n. Urocaninsäurelösung + 2 cm³ Enzym + 16 cm³ Phosphatpuffer p_H = 8,0.

Exposition:

Histidin und Urocaninsäure 16 Std. bei 38°;

Arginin 2 Std. bei 38°, dann Bestimmung des gebildeten Harnstoffes nach *Folin*,

Lösung	Histidin abgebaut	Verbrauch cm ³ 0,02-n. H ₂ SO ₄ , Leerwerte abgezogen	
		Urocaninsäure	Arginin
A	42,5 mg	9 cm ³	17,5 cm ³
B	32,5 mg	—	—
C	18 mg	1,1 cm ³	10,5 cm ³
D	17,5 mg	0,3 cm ³	0,15 cm ³

Ausser der p-Chloranilin-Methode wurde noch die für Histidin spezifische Bestimmungsmethode nach *R. Kapeller-Adler* in der von *K. Schmid* angegebenen Modifikation¹⁾ angewendet. Bei der Durchführung zeigte sich, dass die Enteiweissung der Versuchslösungen durch einfaches Kochen nicht genügt. Es wurde deshalb die Enteiweissung in der folgenden Weise durchgeführt: Die Spaltungsansätze werden 5 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt und filtriert. Vom Filtrat werden 10 cm³ in ein weites Reagenzglas gegeben und 2 cm³ der *Schenk'schen* Lösung zur Enteiweissung zugefügt (2-proz. HCl- und 5-proz. HgCl₂-Lösung, gleiche Volumina gemischt). Die Ansätze bleiben zwei Stunden

¹⁾ *Helv.* **29**, 226 (1946).

stehen. Dann wird in jede Röhre 2 Minuten lang Schwefelwasserstoff eingeleitet und darauf 15 Minuten lang Luft durchgesaugt, abfiltriert und zur Histidinbestimmung ein aliquoter Teil des Filtrates verwendet und zwar so viel, dass ungefähr 0,9—1,5 mg Histidin darin enthalten sind. Die Lösung wird in ein graduiertes 10-cm³-Reagenzglas gebracht und mit folgender Lösung auf 3 cm³ aufgefüllt: 500 cm³ Phosphatpuffer $p_H = 8,0$ werden mit 100 cm³ der *Schenk'schen* Lösung versetzt und so lange H₂S eingeleitet, bis alles Quecksilber gefällt ist (ca. 10 Minuten). Dann wird zur Verdrängung des Schwefelwasserstoffs eine Stunde lang Luft durchgesaugt und abfiltriert. Der weitere Gang der Bestimmung wird nach der von *K. Schmid* (l. c.) angegebenen Weise durchgeführt, mit dem einzigen Unterschied, dass die Röhren zur Entwicklung der Farbe 10 Minuten im Wasserbad von 80—85° erhitzt werden.

Tabelle 4.

Ansätze:

2 cm³ Enzymlösung (letzte Reinigungsstufe) + 3 cm³ 0,1-n. Histidin + 15 cm³ Phosphatpuffer $p_H = 8,0$.

Exposition: 16 Stunden bei 38°.

Menge des abgebauten Histidins in Milligramm: ¹⁾			
Bestimmung mit p-Chloranilin	Bestimmung nach <i>Kapeller-Adler</i>	Soda- <i>Folin</i> 1 Äquiv. NH ₃	Laugen- <i>Folin</i> 2 Äquiv. NH ₃
13	14	11	11,8

In diesen wie auch in vielen weiteren Versuchen zeigte sich dabei eine Übereinstimmung aller 4 Bestimmungsmethoden. Es wurde nun noch weiter das Verhalten der gereinigten Histidase bei der Dialyse untersucht. Dialysiert wurde im Cellophan-schlauch gegen Wasser und Phosphatpuffer $p_H = 8,0$ bei 4°. Die Aussenflüssigkeit wurde in 24 Stunden zweimal gewechselt. Die Ausgangslösung wurde gleich lang bei 4° aufbewahrt.

Tabelle 5.

Ansätze:

3 cm³ Enzymlösung + 3 cm³ 0,1-n. Histidin + 14 cm³ Phosphatpuffer $p_H = 8,0$.

Exposition: 16 Std. bei 38°.

Versuch	Bestimmung mit p-Chloranilin	Laugen- <i>Folin</i>
Ausgangslösung	16 mg	13,6 mg
24 Std. bei 4° aufbewahrt	10,4 mg	11,5 mg
24 Std. gegen Puffer $p_H = 8,0$ dialysiert	10,4 mg	10,6 mg
24 Std. gegen Wasser dialysiert	11,4 mg	11,5 mg
48 Std. bei 4° aufbewahrt	10,4 mg	9,9 mg
48 Std. gegen Puffer $p_H = 8,0$ dialysiert	8,8 mg	8,4 mg
48 Std. gegen Wasser dialysiert	10,0 mg	9,9 mg

¹⁾ Bezüglich des Unterschieds in der Bestimmungsmethode bei Soda-, bzw. Laugen-*Folin* sei daran erinnert, dass beim Histidinspaltungsprodukt der Histidase beim Alkalisieren mit Na₂CO₃ ein Äquivalent und beim Alkalisieren mit NaOH 2 Äquivalente Ammoniak zur Bestimmung gelangen²⁾.

In der Tabelle sind alle Werte zum besseren Vergleich auf mg Histidinhydrochlorid + 1 H₂O umgerechnet.

²⁾ *S. Edlbacher, H. Baur, H. R. Staehelin, Z. physiol. Ch. 270, 158 (1941).*

Es zeigte sich dabei, wie aus dem Vergleich mit der Arbeit von *S. Edlbacher* und *J. Kraus*¹⁾ hervorgeht, kein Unterschied im Verhalten der reinen Histidase gegenüber demjenigen des Rohextraktes. In früheren Arbeiten von *S. Edlbacher* und seinen Mitarbeitern (l. c.) wurde gezeigt, dass der enzymatische Abbau von *l*-Histidin durch Histidase durch *d*-Histidin gehemmt werden kann. Es war nun zu untersuchen, ob die gereinigte Histidase ebenfalls noch die Erscheinung der „antipodischen Hemmung“ zeigte. Wie aus dem folgenden Versuch hervorgeht, ist dies auch der Fall.

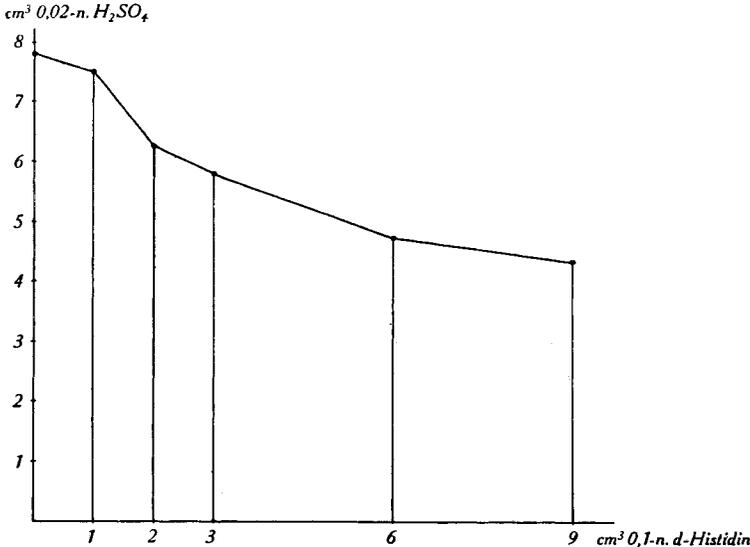


Fig. 1.

Hemmung durch *d*-Histidin.

Ansätze: 3 cm³ Enzym + 3 cm³ 0,1-n. *l*-Histidin + steigende Mengen *d*-Histidin, mit Phosphatpuffer $p_H = 8,0$ auf ein Volumen von 20 cm³ gebracht. Exposition: 18^h bei 38°.

Zusammenfassung.

1. Durch Fällung mit Ammoniumsulfat und zweimalige Adsorption an Bleiphosphat lässt sich ein Histidase-Präparat darstellen, welches Urocaninsäure und Arginin nicht mehr spaltet.

2. Histidase, Urocaninase und Arginase können dementsprechend als verschiedene Enzymindividuen angesprochen werden.

3. Die gereinigte Histidase verhält sich bei der Dialyse und gegenüber der antipodischen Hemmung gleich wie die ungereinigte Histidase.

Die Anregung zu dieser Untersuchung verdanke ich Herrn Prof. Dr. *S. Edlbacher*, dem ich auch an dieser Stelle für seine Unterstützung meinen herzlichsten Dank aussprechen möchte.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.

¹⁾ Z. physiol. Ch. **191**, 225 (1930).