

Zur Wirkungsweise des esterspaltenden Fermentes (Lipase) der Leber.

Von
R. Magnus.

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 1. Juni 1904.)

C. Schmidt¹⁾ hat in einer im hiesigen Institut ausgeführten Dissertation gezeigt, daß die rasche Entgiftung von Morphinglykolsäureestern, welche starke Krampfgifte sind (Barnes),²⁾ auf ihrer leichten Spaltbarkeit im Körper beruht. Das spaltende Agens fand sich im Lebersaft, wird durch Kochen zerstört und ist aussalzbar. Versuche, das Wirkungsgesetz dieser Spaltung durch Tierversuche festzustellen, führten zu keinem endgültigen Ergebnis, sodaß sich die Aufgabe ergab, das esterspaltende Ferment der Leber in möglichst reiner Form zu gewinnen. Im Verlaufe der Reinigung wurde das Ferment unwirksam. Da es nun gelang, dieses unwirksame Ferment wieder zur Wirkung zu bringen, so soll das Ergebnis hier kurz mitgeteilt werden, wenn auch die Reinigung des Fermentes nicht völlig erzielt wurde.

Als Ausgangsmaterial diente Lebersaft, der aus fein gewiegter und mit Quarzsand zerriebener frischer Rindsleber durch zweimalige Extraktion mit toluolgesättigter 0,9%iger NaCl-Lösung und darauffolgendes Kolieren bzw. Abzentrifugieren gewonnen war. Er wurde unter Toluol aufbewahrt.

Als Wegweiser bei der Isolierung des esterspaltenden Fermentes mußte natürlich, um Täuschungen zu vermeiden, ein schwer spaltbarer Ester benutzt werden, der in fermentfreien Lösungen nicht merklich zersetzt wurde. Als solcher

¹⁾ Inaug.-Diss. Heidelberg, 1901.

²⁾ Arch. f. exper. Path. u. Pharm., Bd. 46, S. 68, 1901.

diente nach dem Vorschlage von Chanoz und Doyon¹⁾ der Salicylsäureamylester. Dieser wurde vorher mit konzentrierter Sodalösung und unter mehrfachem Ausschütteln mit Wasser gereinigt. Es ergab sich in äußerst zahlreichen Kontrollversuchen, daß er in neutralen Lösungen auch bei längerem Aufenthalt im Brutschrank sich nicht in merklichen Mengen zersetzte.

Zum Nachweis der abgespaltenen Salicylsäure diente das Verfahren Salkowskis,²⁾ bei welchem die leichte Löslichkeit in Alkohol und Äther zur Isolierung benutzt wird. Der ungespaltene Ester gelangt bei diesem Verfahren auch nicht in Spuren mit zur Darstellung. Die erhaltenen Salicylsäurekristalle wurden in Wasser gelöst, in welchem mit Eisenchlorid die Violettfärbung hervorgerufen wurde. Zur quantitativen Schätzung wurde, wenn nötig, festgestellt, bei welcher Verdünnung die Eisenchloridreaktion gerade negativ wird. Da aber in fermentfreien neutralen Lösungen eine merkliche Spaltung des Esters nicht eintritt, so genügte die qualitative Probe zur Entscheidung, ob Ferment vorhanden war oder nicht.

Es wurden stets 20 ccm Lebersaft (oder eine entsprechende Menge der gewonnenen Lösungen) mit 1 ccm des Esters und einem Ueberschuß von Toluol bei neutraler Reaktion (Lakmus) 4 Tage im Ostwaldschen Thermostaten bei 37° digeriert, danach aufgeköcht, filtriert (wobei der ungespaltene Ester auf dem Filter bleibt) und auf Salicylsäure verarbeitet.

Wie Chanoz und Doyon fanden, wird der Salicylsäureamylester durch Lebersaft gespalten, während gekochter Lebersaft diese Eigenschaft nicht besitzt. Das wirksame Prinzip läßt sich, wie Schmidt³⁾ am Morphinglykolsäureester feststellte, bei Gangesättigung mit Ammonsulfat aussalzen; bei $\frac{6}{10}$ -Sättigung fällt es unvollkommen aus. Bei Brutschranktemperatur wird es langsam zerstört, sodaß es sich in einem Lebersaft nach 2 Jahren nicht mehr nachweisen ließ, während Wasserstoffsperoxyd noch stürmisch ersetzt wurde.

Mit fraktionierter Aussalzung ließen sich sehr stark wirksame Lösungen nicht erzielen, auch die Alkoholfällung erwies sich als ungeeignet. Dagegen erhielt ich durch Ausfällung mit Uranylacetat nach dem Vorgang von Jacoby⁴⁾ eiweißarme und fermentreiche Lösungen.

¹⁾ Journ. de physiol. et de pathol. générale, Bd. II, S. 695, 1900.

²⁾ Virch. Archiv, Bd. 147, S. 1898.

³⁾ Inaug.-Diss. Heidelberg, 1901.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 135, 1900.

Nach der Vorschrift von Rosell¹⁾ werden 100 ccm Lebersaft mit der gleichen Menge gesättigter Uranylacetatlösung ausgefällt, mit gesättigter Lösung von Soda und Natriumphosphat neutralisiert und noch soviel Natriumphosphatlösung zugefügt, bis im Filtrat mit Natriumphosphat kein Niederschlag mehr zu erzielen ist. Darauf wird sofort abfiltriert, der Niederschlag 20 Stunden unter 100 ccm 0,9% NaCl-Lösung stehen gelassen und darauf wieder abfiltriert. Das Filtrat, welches schwach alkalisch reagiert, wird mit $\frac{n}{20}$ H₂SO₄ versetzt, bis eine leichte Trübung auftritt und dann wieder soviel $\frac{n}{20}$ NaOH zugefügt, bis der Trübung gerade anfängt zu verschwinden. Dann reagiert die Flüssigkeit gegen Lakmus neutral und wird unter Toluol aufbewahrt.

So gewonnene Lösungen sind in den meisten Fällen außerordentlich wirksam, unter Umständen quantitativ ebenso wirksam, wie eine entsprechende Menge des Lebersaftes (20 ccm spalten in 4 Tagen bei 37° von 1 ccm Ester soviel, daß die gewonnene Salicylsäure noch in einer Verdünnung 1 : 20000 mit Eisenchlorid nachweisbar ist: das entspricht nach einer approximativen Schätzung ungefähr 0,3 g Salicylsäure).

Der Eiweißgehalt dieser Lösungen ist ein geringer, aber wechselnder. In einer Darstellung, welche stark wirksam war, ließ sich Eiweiß nur in Spuren nachweisen (Biuretprobe unsicher, Kochprobe und Xanthoproteinreaktion ganz minimal, Millons, Adamkiewiczs und Molischs Reaktion negativ). Dagegen habe ich ganz eiweißfreie Lösungen stets unwirksam gefunden. Auch die Versuche einer weiteren Reinigung mit fraktionierter Aussalzung, Alkoholfällung, einer zweiten Uranyl-fällung, Mitreißen auf BaSO₄ ergaben keine anderen Resultate.²⁾

Es wurde deshalb dazu geschritten, die Lösung, welche stets reichlich Toluol enthielt, durch Dialyse wenigstens von den nicht kolloiden Verunreinigungen zu trennen. Das Ergebnis war, daß die fermenthaltigen Flüssigkeiten nach mehrtägiger Dialyse gegen fließendes Wasser stets unwirksam wurden. Sie werden auch nicht wieder wirksam, wenn man sie nach der Dialyse wieder auf einen Gehalt von 0,9% NaCl bringt.

¹⁾ Inaug.-Diss. Strassburg, 1901.

²⁾ Diese Versuche wurden unter Berücksichtigung des unten geschilderten Unwirksamwerdens des Fermentes bei der Reinigung angestellt.

Die alte Wirksamkeit kehrt jedoch sofort zurück, wenn zu der unwirksamen Fermentlösung einige Kubikzentimeter gekochten Lebersaftes gesetzt werden, der für sich allein ebenso völlig unwirksam ist. Statt des gekochten Lebersaftes kann man eine entsprechende Menge einer gekochten Fermentlösung nehmen, welche mit Uranylfällung gewonnen, aber nicht dialysiert worden ist.

Es erhält also eine dialysierte unwirksame Fermentlösung durch Zusatz der für sich ebenfalls unwirksamen nicht dialysierten, aber gekochten Lösung ihre esterspaltende Eigenschaft zurück.

Daraus ist zu folgern, daß bei der Dialyse etwas aus der Fermentlösung verschwindet, was für die Spaltung des Esters durch das Ferment notwendig ist. Diese Hilfssubstanz («Coferment» nach Bertrand¹⁾) läßt sich nun in der Tat, wenn man die Fermentlösung gegen nicht fließendes Wasser dialysiert, in diesem nachweisen: Dialysiert man 100 ccm Fermentlösung gegen ca. 1 l Wasser, das am 2. und 4. Tage gewechselt wird, und engt nun diese 2 l Außenwasser ein, so erhält man eine Flüssigkeit, welche neutralisiert auch nach dem Aufkochen die Fähigkeit besitzt, eine unwirksame dialysierte Fermentlösung wieder wirksam zu machen.

Es besitzt also das «Coferment» die Eigenschaft:

1. Durch Uranylacetat mit den Eiweißkörpern niederschlagen zu werden und nachher wieder in Lösung zu geben,
2. kochbeständig zu sein und
3. durch Pergamentschlauch zu dialysieren.

Weiter ließ sich feststellen, daß sie

4. in absolutem Alkohol löslich ist (wenn sie vorher zur Trockne gebracht wurde) und
5. in Äther sich nicht löst (also kein fettartiger Körper ist),
6. ist sie durch neutrales essigsaures Blei nicht fällbar und wird
7. durch Veraschen zerstört.²⁾

¹⁾ Compt. rend., Bd. 124. S. 1032, 1897.

²⁾ Diese Zerstörung beim Veraschen scheint dafür zu sprechen, daß das «Coferment» nicht wie bei der Laccase (Bertrand a. a. O.) Mangan oder ein anderer glühbeständiger anorganischer Körper sein kann.

100 ccm Lebersaft werden mit Uranylacetat ausgefällt und eine wirksame Fermentlösung dargestellt. Diese Lösung wird zuerst gegen 2 mal gewechseltes stehendes Wasser 4 Tage lang, dann ebensolange gegen fließendes Wasser dialysiert, bis die Fermentlösung unwirksam geworden ist (A). — Das Außenwasser der ersten 4 Tage wird vereinigt, zur Trockne gedampft, mit absolutem Alkohol erschöpft. Der Alkohol wird völlig verjagt und der Rückstand von Alkohol nun mit Äther behandelt. Das in Äther unlösliche wird in Wasser gelöst und genau neutralisiert (B). — A und B erweisen sich jedes allein völlig unwirksam zur Esterspaltung. Vereint setzen sie soviel Salicylsäure in Freiheit, daß bei einer Verdünnung 1:16000 mit Eisenchlorid gerade noch Violettfärbung sichtbar ist.

Tastversuche nach bekannteren Substanzen blieben negativ: Leucin, Tyrosin, Glykokoll, Lecithin und Bilirubin¹⁾ besaßen nicht die Fähigkeit, das unwirksame Ferment wieder wirksam zu machen.

Wir haben hier also den Fall vor uns, daß wir aus der Leber eine wirksame esterspaltende Fermentlösung darstellen können, welche sich durch einfache Dialyse in 2 Komponenten zerlegen läßt: ein nicht dialysierendes, durch Kochen zerstörbares Ferment und ein dialysierendes kochbeständiges «Coferment», welche jedes für sich völlig unwirksam sind und erst bei der Wiedervereinigung die Fähigkeit der Esterspaltung zurückerlangen.²⁾

Welches die Wirksamkeit des Cofermentes und der genauere Verlauf dieses fermentativen Verseifungsprozesses sind, bleibt natürlich solange im unklaren, als über die chemische Natur des «Cofermentes» nichts Näheres bekannt ist.

Soviel kann man jedenfalls sagen, daß es sehr unwahrscheinlich ist, daß etwa durch das «Coferment» ein Zymogen in das Ferment umgewandelt wird, wie z. B. bei der Wirkung

¹⁾ Das verwendete Bilirubin verdanke ich der Liebenswürdigkeit von Herrn Prof. Kossel.

²⁾ Soeben haben Achard und Clerc (C. R. Soc. biol., 1904, S. 812) auf der Suche nach Analogien mit der Hämolyse festgestellt, daß die Spaltung von Monobutyryl durch ein Gemisch von normalem Serum und von Serum, das eine Stunde lang auf 60–62° erhitzt ist, etwa um ein Drittel größer ist, als der Summe der Einzelwirkungen entspricht. Es scheint, daß es sich dabei um ein ähnliches Zusammenwirken zweier Substanzen handelt.

der Enterokinase. Denn die Trennung der beiden Substanzen wurde ja aus einem Lebersaft vorgenommen, in der das Ferment schon in wirksamer Form vorhanden war.

Gründe dafür, daß es sich um Beziehungen, wie zwischen Immunkörper und Complement handelt, ließen sich ebenfalls vorläufig nicht beibringen. Es spricht die leichte Trennbarkeit durch einfaches Dialysieren dagegen.

Nachdem aber in letzter Zeit sich die Beobachtungen gemehrt haben, nach welchen bei Fermentwirkungen im Körper 2 Substanzen eine Rolle spielen (Enterokinase (Pawlow), Einfluß des Pankreas auf die Glykolyse der Muskeln (Cohnheim), Blutgerinnung u. a.) dürfte auch dieser Fall Interesse beanspruchen, in welchem aus ein und demselben Organ ein Ferment und ein davon verschiedener, die Fermentreaktion erst ermöglichender Körper gewonnen wurden.

Meinem Kollegen Jacoby sage ich auch an dieser Stelle für vielfachen guten Rat meinen besten Dank.