

# Die Bedeutung der Phosphatide (Lecithane) für die lebende Zelle.

## II. Mitteilung.)<sup>1)</sup>

Von

**W. Koch.**

(Aus dem Hull Physiological Laboratory, University of Chicago.)

(Der Redaktion zugegangen am 22. Oktober 1909.)

### 1. Der Antagonismus zwischen Natriumchlorid und Calciumchlorid.

Die Fortsetzung des obigen Themas war schon lange meine Absicht, wurde jedoch durch äußere Umstände immer wieder verhindert. Ganz ohne Nachteil war dies nicht, denn wie Porges und Neubauer<sup>2)</sup> in ihrer Arbeit über den gleichen Gegenstand bemerken, fehlten uns bis vor kurzer Zeit die genügenden Kenntnisse der Kolloide. So war es mir damals ganz unmöglich, eine Erklärung für die biologisch so wichtige Beobachtung, daß Natriumchlorid die Fällung des Lecithins durch Calciumchlorid verhindert, zu geben. Der Parallelismus dieser Beobachtung mit den von Loeb<sup>3)</sup> an physiologischem Material gewonnenen Resultaten ist von größtem Interesse. Daß Porges und Neubauer diese meine Beobachtung nicht haben bestätigen können, findet seine Erklärung darin, daß sie mit Merckschem Lecithin, welches aus Eigelb dargestellt, gearbeitet haben. Als ich vor zwei Jahren einmal die Bestätigung meiner Beobachtung mit A. G. F. A.-Lecithin<sup>4)</sup> versuchte, mißlang mir der Versuch ebenfalls. Die Erklärung dieses Mißer-

<sup>1)</sup> W. Koch, Diese Zeitschrift, 1903, Bd. XXXVII, S. 181.

<sup>2)</sup> O. Porges und E. Neubauer, Biochemische Zeitschrift, 1908, Bd. VII, S. 152.

<sup>3)</sup> J. Loeb, American Journal of Physiology, 1902, Bd. VI, S. 411.

<sup>4)</sup> W. Koch, The Journal of Biological Chemistry, 1907, Bd. III, S. 53.

folgs hängt davon ab, daß Eierlecithin einen größeren und weniger stabilen Aggregatzustand besitzt als wie Gehirnlecithin und daher schon von Natriumchlorid ausgeflockt wird. Durch Zusatz von wenig Hydroxyl kann der Aggregatzustand des Eierlecithins so verändert werden, daß Natriumchlorid nicht nur nicht mehr fällend wirkt, sondern sogar die fällende Wirkung des Calciums hemmt. Nach demselben Prinzip kann man durch Zusatz von wenig Säure den Aggregatzustand des Gehirnlecithins so verändern, daß Natriumchlorid eine Ausflockung zustande bringt.

Die Darstellung des Gehirnlecithins ist in einer früheren Arbeit beschrieben.<sup>1)</sup> Die wässrige Emulsion wird durch mechanische Schüttelung und nicht mittels einer Ätherlösung, wie es Porges und Neubauer beschrieben, dargestellt.

### Versuch I.

0,3% kolloidale Lösung von Eierlecithin (A. G. F. A.).  
Konzentration der Lösung an:

	NaCl	NaOH	CaCl <sub>2</sub>	Ausflockung
1.	m/3	—	—	+
2.	m/3	m/300	—	—
3.	—	m/300	m/100	+
4.	m/3	m/300	m/100	—

### Versuch II.

0,3% kolloidale Lösung von Gehirnlecithin.  
Konzentration der Lösung an:

	NaCl	HCl	CaCl <sub>2</sub>	Ausflockung
1.	m/3	—	—	—
2.	—	—	m/100	+
3.	m/3	—	m/100	—
4.	—	m/400	—	—
5.	m/3	m/400	—	+

<sup>1)</sup> W. Koch, Diese Zeitschrift, 1902, Bd. XXXVI, S. 134.

Es läßt sich also der Aggregatzustand des Eierlecithins durch Zusatz von  $\text{OH}^-$  dem des Gehirnlecithins näher bringen und umgekehrt der Aggregatzustand des Gehirnlecithins durch Zusatz von  $\text{H}^+$  in der Richtung des Eierlecithins verändern. Daß Lecithinpräparate von verschiedenen Geweben solche Unterschiede zeigen können, ist von dem größten biologischen Interesse. Es handelt sich hier möglicherweise um Salzbildung (sogenannte Lecithinionsalze), was mit dem Mengenverhältnisse ungefähr im Einklang steht. Es verändert also der Organismus das als freie Säure im Ei vorhandene Lecithin bei der Entwicklung des Nervensystems in eine salzartige Verbindung: Veränderungen in der basischen Gruppe (Cholin) der Phosphatide mögen auch hier eine Rolle spielen.

Daß sich die Flockungsgrenze der Kolloide durch Veränderungen des Aggregatzustandes verschieben läßt, ist wohl ziemlich allgemein bekannt und besonders von Mathews betont worden. Den Arbeiten von Mathews<sup>1)</sup> verdanken wir auch die Erklärung der antagonistischen Wirkung von  $\text{NaCl}$  und  $\text{CaCl}_2$ . Diese von Loeb entdeckte Tatsache wurde von ihm als Antagonismus zwischen  $\text{Ca}$  und  $\text{Na}$ , oder vielmehr als eine entgiftende Wirkung des Calciums für  $\text{Na}$  erklärt. Die Bedeutung des Anions entging ihm völlig. Mathews<sup>1)</sup> hat gezeigt, 1. daß die Wirkung der dissoziierten Salze auf lebende Formen, auf biologisch wichtige Reaktionen und auf kolloidale Fällungen einen nicht zu verkennenden Parallismus mit der Fähigkeit ihrer Ionen, sich ihrer elektrischen Ladung zu entledigen, zeigt; 2. daß das gesamte Resultat von dem antagonistischen Einfluß der Anionen auf die Kationen beeinflusst wird.

Es erklärt sich also die sowohl an lebenden Formbestandteilen wie an Gehirnlecithin beobachtete antagonistische Wirkung des Natriumchlorids auf Calciumchlorid dahin, daß die Chlorionen bei einem elektronegativen Kolloid wie dem

<sup>1)</sup> A. P. Mathews, Biological Studies by the Pupils of W. T. Sedgwick. (Festschrift.) Boston 1901, S. 81.

A. P. Mathews, American Journal of Physiology, 1904, Bd. X, S. 291; 1904, Bd. XI, S. 237, 455; 1905, Bd. XII, S. 419; 1905, Bd. XIV, S. 204.

Lecithin auflösend wirken und daher die fällende Wirkung des Calciums aufheben. Handelt es sich nun um ein sehr instabiles Kolloid wie Eierlecithin, so ist die lösende Wirkung des  $\text{Cl}^-$  nicht genügend, um die Fällung durch Na und daher erst recht durch Ca zu verhindern. Da nun die lösende Wirkung der Anionen ebenfalls mit der Fähigkeit, sich ihrer elektrischen Ladungen zu entledigen, zusammenhängt, so läßt sich erwarten, daß z. B. das Jodion, welches ja bekanntlich bedeutend leichter in den Molekularzustand übergeht als das Chlorion, auch eine größere lösende Wirkung entfaltet. Dies haben denn auch Porges und Neubauer am Eierlecithin beobachtet. Jodnatrium fällt daher selbst Eierlecithin nicht und verhindert Fällung von Gehirnlecithin durch Calciumchlorid schon in verdünnter Lösung, wie folgende Zahlen andeuten:

Die Flockung von 0,3 % Lösung von Gehirnlecithin durch  $\text{m}/_{83} \text{CaCl}_2$  wird gehindert durch,

$\text{NaCl } \text{m}/_7$  (Physiologische Salzlösung)

$\text{NaBr } \text{m}/_{33}$ ,  $\text{NaJ } \text{m}/_{50}$ ,  $\text{NaCNS } \text{m}/_{55}$ ,  $\text{NaOH } \text{m}/_{1200}$ .

Ein Vergleich der Fällungsgrenzen des Eierlecithins für verschiedene Kationen mit der Giftigkeit dieser Kationen für Lipasewirkung und Entwicklung von Funduluseiern findet sich in der folgenden Tabelle. Es lassen sich diese Fällungsgrenzen mit viel größerer Genauigkeit bestimmen, als dies Porges und Neubauer getan. Beim Gehirnlecithin liegt die Grenze für Calcium ganz scharf zwischen  $\text{m}/_{135}$  und  $\text{m}/_{143}$ .

Es kommt in der folgenden Zusammenstellung mehr auf die Reihenfolge als auf die absoluten Zahlen an, welche ja wohl noch von anderen Faktoren beeinflußt werden. So besteht z. B. wenig Unterschied in der elektrolytischen Lösungstension von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ba}^{++}$  und doch erzeugt  $\text{Ba}^{++}$  eine Ausflockung in bedeutend geringerer Konzentration. Sehr wahrscheinlich hängt dies mit der Zweiwertigkeit des Baryums zusammen. Baryum kann sich daher mit zwei Molekülen Lecithin verbinden und so einen größeren und daher der Ausflockungsgrenze näher liegenden Komplex zustande bringen. Doch kann die Wertigkeit des Kations nur ein Faktor von sekundärer Wichtigkeit sein, denn das einwertige Wasserstoffion flockt

Gruppe	Ion	Elektrolytische Lösungstension in Volt	Ausflockung <sup>1)</sup> von Eierlecithin	Giftigkeit <sup>2)</sup> für Lipase	Giftigkeit für Funduluseier Na = 1
Alkali-Metalle	K	— 2,92	m/3	m/406	0,6
	Na	— 2,54	m/7	m/209	1,0
Erdalkalien	Ba	— 2,54	m/140	m/2 000	1,0
	Sr	— 2,49	m/100	m/2 044	—
	Ca	— 2,28	m/300	—	1,7
	Mg	— 2,26	m/250	m/1 128	1,0
Schwer-Metalle	Pb	+ 0,129	m/800	m/221 562	2 500
	H	+ 0,277	m/500	—	1 500
	Cu	+ 0,606	m/800	m/296 000	7 500
	Hg	+ 1,028	m/15 kein Niederschlag	m/324 000	25 000
	Ag	+ 1,048	m/66	m/3 715 071	50 000

wiederum in bedeutend geringerer Konzentration wie das zweiwertige Baryum. Es kommt also der von Mathews zuerst entdeckte Parallelismus der pharmakologischen Wirkung der Kationen mit ihrer elektrolytischen Lösungstension den Tatsachen am nächsten, obgleich sich noch manche Lücken finden. So bilden z. B.  $Hg^{++}$  und  $Ag^+$  in ihrer Ausflockungsfähigkeit für Lecithin noch eine zu erklärende Ausnahme. Diese Untersuchungen, auch mit anderen Gehirnlipoiden, sollen fortgesetzt werden.

## 2. Die Bedeutung der Phosphatide bei der Membranbildung.

Das Studium der physikalischen Eigenschaften der Phosphatide ist gerade darum von so sonderbarem Interesse, weil sie die einzigen Kolloide sind, die, nachdem man sie aus dem Gewebe isoliert hat, sich wieder in einen kolloidalen Zustand zurückversetzen lassen, welcher einigermaßen Ähnlichkeit hat

<sup>1)</sup> Molekularkonzentration, bei welcher Ausflockung gerade stattfindet.

<sup>2)</sup> Molekularkonzentration, welche Hydrolyse von Äthylbutyrat durch Lipase verhindert.

mit dem Zustande, in welchem sie in den Geweben vorher existierten. Bei den Proteinen würde dies wegen der weitgehenden Veränderungen, welche sie bei der Behandlung erfahren, mit ganz besonderen Schwierigkeiten verbunden sein. Wir kommen immer mehr zu der Erkenntnis, daß die Kolloide die Funktion haben, die chemische Tätigkeit der Zelle durch Membranbildung zu kontrollieren und so an der Differenzierung sowohl in chemischer, wie in morphologischer Hinsicht teilzunehmen. Bei der Differenzierung des Organismus handelt es sich nun erstens um die Bildung von permanenten Gerüstsubstanzen, wie z. B. Knochen oder Hülsen. Zu diesem Zweck bedient sich der Organismus irgend welchen Materials, das ihm gerade zur Verfügung steht, und somit deutet die Beobachtung von Plimmer und Scott,<sup>1)</sup> daß bei der Entwicklung des Hühnerembryos der größte Teil des Lecithinphosphors den für die Knochenbildung nötigen Phosphor liefert, nicht auf eine besondere Funktion des Lecithins.

Bei einer zweiten Art von Strukturelementen, den mehr permanenten Membranen, spielen diese Phosphatide schon mehr eine spezifische Rolle. Ich will dies an einem Beispiel illustrieren, welches mir bei meinen Arbeiten über das Gehirn aufgefallen ist. Die Arbeiten von Flechsig deuten ganz unzweideutig darauf hin, daß bei der physiologischen Differenzierung des Gehirns den markhaltigen Fasern eine Hauptrolle zukommt. Die chemische Untersuchung der Marksubstanz, wie sie sich z. B. im corpus callosum findet, ist daher von Interesse. In der folgenden Zusammenstellung ist das Corpus callosum mit dem ganzen Gehirn eines Erwachsenen und dem eines neugeborenen Kindes, welches die wenigsten markhaltigen Fasern enthält, verglichen.

Es vermehren sich also bei der Entwicklung der markhaltigen Fasern die Lipoide (Phosphatide, Cerebrin,<sup>2)</sup> Cholesterin und Lipoidschwefel). Die Annahme scheint daher berechtigt, daß die Markscheiden hauptsächlich aus Lipoiden bestehen. Über die

<sup>1)</sup> A. Plimmer and F. H. Scott, Journal of Physiology, 1909, Bd. XXXVIII, S. 247.

<sup>2)</sup> K. Raske, Diese Zeitschrift, 1886, Bd. X, S. 343.

## In Prozent der Trockensubstanz.

	Ganzes Gehirn (Kind)	Ganzes Gehirn (Erwachsen)	Corpus callosum
Proteine . . . .	46,6	37,1	27,1
Extraktivstoffe .	12,0	6,7	3,9
Asche . . . . .	8,3	4,1	2,4
Phosphatide . .	24,2	27,3	31,0
Cerebrine . . . .	6,9	13,6	18,0
Lipoidschwefel .	0,1	0,3	0,5
Cholesterin . . .	1,8	10,9	17,1

Natur des Lipoidschwefels habe ich schon an anderer Stelle berichtet.<sup>1)</sup> Seine Rolle läßt sich ungefähr wie folgt denken: Es verbindet sich die während des Stoffwechsels gebildete Schwefelsäure in esterartiger Verbindung mit einem Kohlenhydratkomplex, wahrscheinlich Cerebrin; dieser stark saure Komplex bildet dann mit den mehrbasischen Phosphatiden eine Niederschlagsmembran. Durch das Neurokeratin und Cholesterin wird dann die Festigkeit dieser Membran in mechanischer Weise vermehrt. Der Aggregatzustand der Phosphatide in dieser Membran ist so wenig stabil, daß sie schon von einer nicht sehr konzentrierten Salzlösung ausgeflockt werden. Interessant ist der folgende Versuch:

Graue Rindensubstanz, mechanisch so gut wie möglich von weißer Substanz befreit, und corpus callosum werden mit siedendem Alkohol und dann Äther extrahiert. Die Extrakte verdunstet in Äther gelöst, die klare Lösung von dem unlöslichen Teil abdekantiert und mit Aceton niedergeschlagen. Der Niederschlag im Vakuum getrocknet, mit Wasser emulgiert und die Ausflockungsgrenzen bestimmt.

	CaCl <sub>2</sub>	NaCl
Corpus callosum	m/290	m/5
Cortex	m/170	Keine Ausflockung bei 2 m.

<sup>1)</sup> W. Koch, Diese Zeitschrift, 1907, Bd. LIII, S. 496.

Es liegt also die Ausflockungsgrenze für die Phosphatide des corpus callosum dem einer physiologischen Natriumchloridlösung 0,9% (m/6 bis m/7) sehr nahe. Diese Beobachtung läßt sich mit dem von Macallum mit seinem Silbernitratreagens für den Achsenzylinder gefundenen hohen Chlorgehalt in Zusammenhang bringen. Das mit dem Chlor verbundene Kation, wahrscheinlich Natrium, kann in die umgebenden Gewebe nicht eindringen, da es mit den in der Markscheide anwesenden Phosphatiden eine Niederschlags- oder semipermeable Membran bildet. Ob der Inhalt des Achsenzylinders flüssig ist oder nicht, ist noch nicht einwandsfrei entschieden, jedenfalls ermöglicht eine derartige Membran die Isolierung eines flüssigen Inhalts und spielt so bei der physiologischen Differenzierung des Nervensystems eine Rolle.

Die Fähigkeit der Phosphatide, darartige Niederschlagsmembranen zu bilden, spielt gewiß bei der chemischen Tätigkeit der Zelle eine Rolle. Es scheint vom rein chemischen Standpunkte aus betrachtet die Annahme berechtigt, daß, wenn eine chemische Substanz oder deren Ionen mit einem in einer Membran anwesenden Kolloid einen Niederschlag bilden, diese Membran für diese chemische Substanz oder deren Ion undurchlässig wird.<sup>1)</sup> Irgend eine andere chemische Substanz, welche diese Niederschlagsbildung verhindert, hat dann die entgegengesetzte Wirkung und kann der den Niederschlag bildenden Substanz sogar den Durchgang ermöglichen. R. Lillie<sup>2)</sup> hat nun gezeigt, daß die Permeabilität der Zellmembran einen Einfluß auf die chemische Tätigkeit der Zelle ausüben kann. Er nimmt an, daß bei Reizung der Zelle die Permeabilität der Zellmembran für CO<sub>2</sub> erhöht wird. Als Folge hiervon wird die chemische Tätigkeit der Zelle vergrößert. Wird nun andererseits die Permeabilität der Zellmembran für CO<sub>2</sub> verringert, so sammelt sich CO<sub>2</sub> in der Zelle an und die Reaktionen, welche CO<sub>2</sub> als Endprodukt haben, werden verlangsamt. Über die Natur der in der Membran vorhandenen Substanzen, oder der Faktoren,

<sup>1)</sup> F. Hofmeister, Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 1889, Bd. XXV, S. 1.

<sup>2)</sup> R. Lillie, American Journal of Physiology, 1909, Bd. XXIV, S. 14.

welche die Permeabilität beeinflussen, gibt er keinen Aufschluß. Es schien daher von Interesse, das Verhalten des Lecithins in dieser Richtung etwas eingehender zu prüfen.

Eine 0,3%ige Gehirnlecithinemulsion in physiologischer Kochsalzlösung ( $m/7$  NaCl) erfordert  $m/76$   $\text{CaCl}_2$  zur Ausflockung.<sup>1)</sup> Durch Halbsättigung der Lösung mit  $\text{CO}_2$  oder Zusatz von ganz geringen Mengen Schwefelsäure ( $m/5000$ — $m/10000$ ) kann diese Ausflockungsgrenze bis zu  $m/92$   $\text{CaCl}_2$  verschoben werden. Nimmt man an, daß der Calciumgehalt der Gewebe ungefähr 0,04% (gleich  $m/100$ ), so sehen wir, daß es sich bei diesen Reaktionen um Mengen Calcium handelt, welche den in den Geweben gefundenen nahe liegen.  $\text{CO}_3$  und  $\text{SO}_4$  sind normale Stoffwechselprodukte der Zelle und obgleich hier die saure oder vielmehr Wasserstoffionenkonzentration viel höher ist, wie man bei der bekannten Neutralität des Protoplasmas annehmen kann, so braucht die in den Geweben vorhandene Gesamtmenge nicht so groß zu sein als wie im Reagenzglasversuch. Lillie hat nämlich gezeigt, daß es sich nur um die Wirkung auf eine Stelle der Membran zu handeln braucht, um Veränderungen in der Permeabilität der ganzen Membran zu erzeugen. Es ist auch die Möglichkeit vorhanden, daß die Anionen  $\text{CO}_3$  und  $\text{SO}_4$  auf in der Membran vorhandene elektropositive Kolloide wirken können. (Lecithin ist elektronegativ.)

Durch die Bildung dieser Niederschlagsmembran wird nun der Austritt des  $\text{CO}_3$  und  $\text{SO}_4$  aus der Zelle verhindert und die damit zusammenhängenden chemischen Reaktionen verlangsamt. Die Fortsetzung der chemischen Tätigkeit der Zelle wird nun dadurch ermöglicht, daß unter diesen Umständen, nämlich bei verminderten Oxydationen, die hydrolytischen und desamidierenden Reaktionen in den Vordergrund treten und sich Ammoniak bildet. Es ist daher die Beobachtung von Interesse, daß  $m/1100$   $\text{NH}_3$  (0,0015%) genügt, um die Ausflockung von Gehirnlecithin durch  $m/83$   $\text{CaCl}_2$  zu verhindern. Das  $\text{NH}_3$  steht also der Zelle zur Verfügung zur Vergrößerung der Permeabilität der Membran und

<sup>1)</sup> Als Ausflockungsgrenze wird die Konzentration angenommen, welche in 24 Stunden eine deutliche Absetzung eines Niederschlags und nicht nur eine Trübung zeigt.

ermöglicht so den Austritt von  $\text{CO}_2$  und  $\text{SO}_4$  und die Fortsetzung der chemischen Tätigkeit der Zelle. Daß es sich bei der chemischen Tätigkeit der Zelle um derartige periodische Erscheinungen handeln kann, geht aus den Arbeiten von Bredig, Weinmeyer,<sup>1)</sup> Wilke<sup>2)</sup> und Autropoff<sup>3)</sup> hervor. Nimmt man an, daß diese Perioden nur sehr kurze Dauer haben, so braucht man keine größere Wasserstoff  $\text{H}^+$ - oder Hydroxyl  $\text{OH}^-$ -Konzentration anzunehmen, als mit der Neutralität des Protoplasmas vereinbart werden kann. Interessant ist hier ferner die Beobachtung, daß Zellprodukte wie Harnstoff, denen der Aus- und Eintritt in die Zelle zu jeder Zeit freisteht, auf diese Ausflockungsreaktionen gar keinen Einfluß ausüben.

Die Ausdehnung dieser Beobachtungen auf das Problem der Hämolyse scheint besonders vielversprechend. Da die Phosphatide aus verschiedenen Geweben Unterschiede aufweisen, wird beabsichtigt, diese Arbeiten mit aus roten Blutkörperchen gewonnenen Phosphatiden zu unternehmen. Versuche mit Gehirnlecithin deuten darauf hin, daß hämolytisch wirkende Körper die Fähigkeit haben, die Ausflockung des Lecithins mit Calcium, also einem elektropositiven Komplex, zu verhindern. Ausflockung von 0,3% iger Gehirnlecithinemulsion durch:  $m/83$   $\text{CaCl}_2$  (in Abwesenheit von  $\text{NaCl}$ ) wird verhindert durch:  $m/40$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $m/50$   $\text{NaJ}$ ,  $m/1100$   $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $m/1200$   $\text{NaOH}$  und 0,026% ige Lösung gallensaurer Salze.

Geringe Mengen Chloroform (0,25%) verhindern ebenfalls die Ausflockung. Destilliertes Wasser bringt die Ausflockung wieder in Lösung.

### Zusammenfassung.

Es lassen sich an kolloidalen Lösungen von Phosphatiden Reaktionen ausführen, welche denen an physiologischem Material

<sup>1)</sup> Bredig und Weinmeyer; Zeitschrift f. physikalische Chemie, 1903, Bd. XLII, S. 601.

<sup>2)</sup> Bredig und Wilke, Biochemische Zeitschrift, 1908, Bd. XI, S. 67.  
Bredig, Biochemische Zeitschrift, 1907, Bd. VI, S. 322.

<sup>3)</sup> Autropoff, Zeitschrift für physikalische Chemie, 1908, Bd. LXII, S. 513.

beobachteten sowohl qualitativ wie quantitativ sehr ähnlich sind. Sowohl Kohlensäure als wie Ammoniak beeinflussen Lecithin-emulsion in bedeutend geringerer Konzentration, wie sich aus ihrer Wasserstoffion- oder Hydroxylionkonzentration resp. erwarten läßt. Es spielen also die Phosphatide sowohl in der morphologischen als chemischen Differenzierung der Zelle eine hervorragende Rolle, indem sie befähigt sind, Niederschlagsmembranen zu bilden, welche man sich als überall im Protoplasma verteilt denken kann.