

(Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Die stereochemische Spezifität der Esterasen aus pathologischen menschlichen Lebern.

Von

R. Ammon und W. Geisler.

(Eingegangen am 23. April 1932.)

Bei der durch Schweineleberesterase katalysierten Spaltung von rac. Mandelsäure-Methyl- und Äthylester, der aus einem gleichen Gemisch von l- und d-Ester besteht, konnte bereits Dakin¹ zeigen, daß die Esterase hierbei eine Konfigurationsspezifität aufweist, d. h. eine Modifikation in dem dl-Ester schneller spaltet als die andere. Läßt man nämlich den racemischen Ester unvollständig, d. h. nicht bis zu 100% von dem Ferment in Mandelsäure und den zugehörigen Alkohol spalten, isoliert man die vom Ferment in Freiheit gesetzte Säure und untersucht nun diese im Polarisationsapparat, so ist sie rechtsdrehend. Die Schweineleberesterase hat also bei ihrer Einwirkung auf den dl-Ester einer Modifikation und zwar der d-Form den Vorzug gegeben.

Später wurde gefunden², daß eine große Reihe von Esterasen anderer Herkunft ebenfalls eine solche Konfigurationsspezifität bei Anwendung von Substraten mit asymmetrischem C-Atom zeigen.

Für die Menschenleberesterase wurden speziell folgende Ergebnisse erhalten³. Wird racemischer Mandelsäure-Methyl- oder Äthylester in niedriger Konzentration durch dieses Ferment gespalten, so ist die Menschenleberesterase „linksorientiert“, d. h. die vom Ferment in Freiheit gesetzte Mandelsäure ist linksdrehend, wird die Anfangskonzentration des racemischen Substrats erhöht, so nimmt die Drehung der in Freiheit gesetzten Säure ab. Bei noch höherer Konzentration wird schließlich die Menschenleberesterase „rechtsorientiert“, d. h. der d-Ester wird im Racemat bevorzugt hydrolysiert.

¹ Dakin: J. of Physiol. **30**, 253 (1904); **32**, 199 (1905).

² Sammelreferat s. R. Ammon: Fermentforschg. **11**, 459 (1930).

³ Bamann: Ber. dtsch. chem. Ges. **62**, 1538 (1929) (II. Mitt.). — Bamann u. Laeverenz: Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 394 (1930) (III. Mitt.); Z. physiol. Chem. **193**, 201 (1930) (IV. Mitt.); Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 2939 (V. Mitt.); **64**, 897 (1931) (VI. Mitt.). — Rona u. Ammon: Biochem. Z. **181**, 49 (1927). — Rona, Fischgold u. Ammon: Biochem. Z. **228**, 77 (1930). — Ammon u. Fischgold: Biochem. Z. **234**, 54 (1931). — Fischgold u. Ammon: Biochem. Z. **246**, 463 (1932); **247**, 338 (1932). — Ammon u. Geisler: Biochem. Z. **1932**, im Druck.

Bei den Arbeiten über die stereochemische Spezifität der Menschenleberesterase ist Wert darauf gelegt worden, ein Esterasepräparat aus einer normalen menschlichen Leber zu bereiten. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, Esteraselösung von solchen menschlichen Lebern, die nicht als normal zu bezeichnen sind, darzustellen. Es ist die Frage gestellt, ob die pathologischen Verhältnisse und Veränderungen einen Einfluß auf die stereochemische Spezifität der Menschenleberesterase ausüben.

An der Menschenleberesterase selbst zeigten *Bamann* und *Laeverenz*¹, daß ihre Konfigurationsspezifität durch eine besondere Vorbehandlung der Enzympräparate zu beeinflussen ist. Es wird nämlich einmal ein gewöhnliches Aceton-Äther-Trockenpulver einer menschlichen Leber einige Tage im Trockenschrank bei 60—65° gedörrt, das andere Mal wird ein frischer Hackbrei derselben Leber bei schwachalkalischer Reaktion unter Toluol etwa eine Woche einer Autolyse unterworfen. Aus beiden so vorbereiteten Fermentpräparaten wurden Ammoniakauszüge gemacht, die neutralisiert, zentrifugiert und dialysiert wurden. Diese beiden Fermentpräparate wurden zur Spaltung von racemischem Mandelsäure-Äthylester benutzt und mit dem Spaltungsprodukt einer Einwirkung einer gewöhnlich hergestellten Fermentlösung desselben unvorbehandelten Leberpulvers auf Äthylmandelat bei demselben Spaltungsgrad verglichen. Es zeigte sich, daß bei einer Anfangskonzentration von 0,5% und einem Spaltungsgrad von 14—15% das $[\alpha]_D$ der vom Ferment in Freiheit gesetzten Mandelsäure in Richtung und Größe beeinflußt ist. Das $[\alpha]_D$ der Mandelsäure, die durch das unvorbehandelte Fermentpräparat gewonnen wurde, betrug — 2,4°, das Drehungsvermögen der Mandelsäure, die durch den Auszug aus dem gedörrten Pulver erhalten wurde, war + 11,8° und der $[\alpha]_D$ -Wert der Mandelsäure, die sich mittels des Enzyms nach vorangegangener Autolyse gebildet hatte, betrug — 14,8°. Die Verfasser erklären diese Erscheinung damit, daß der Enzymkomplex durch die Vorbehandlung eine Änderung erlitten hat, die sich durch die andere optische Auswahl bemerkbar macht.

Es erschien uns wichtig, zu untersuchen, ob die pathologischen Veränderungen in der Leber nicht auch gewisse Veränderungen am Enzymkomplex erzeugen, die sich durch eine Änderung der Konfigurationspezifität verraten könnten. Wir haben daher aus 4 Lebern von Erwachsenen und 3 Kinderlebern Fermentpräparate hergestellt. Bei den Erwachsenenlebern handelte es sich um folgende Fälle.

1. Stauungscirrhose nach Aortenstenose, männlich, 40 Jahre. Tag der Herstellung des Pulvers 18. 11. 30.
2. Anaemia perniciosa, männlich, 36 Jahre. Tag der Herstellung des Pulvers 3. 10. 30.
3. Akute gelbe Leberatrophie mit Magengeschwür, weiblich, 56 Jahre. Tag der Herstellung des Pulvers 1. 4. 32.

¹ *Bamann u. Laeverenz:* V. Mitt., I. c.

4. Primärer Leberkrebs, männlich, 50 Jahre. Tag der Herstellung des Pulvers 11. 4. 32.

Die kindlichen Lebern stammten von folgenden Fällen.

1. Männliches Neugeborenes, post partum gestorben an Asphyxie. Tag der Herstellung des Pulvers 18. 12. 30.

2. Weibliche Frühgeburt, Tag der Herstellung des Pulvers 31. 3. 32.

3. Totgeburt, männlich. Tag der Herstellung des Pulvers 31. 3. 32.

Es lag uns daran, Menschenlebern zu untersuchen, bei denen einmal das Lebergewebe weitgehend der Stauungsatrophie verfallen war und das Bindegewebe sich reichlich entwickelt hatte. Dann lag es nahe, eine gelbe Leberatrophie zu untersuchen, bei der die sehr starke Schädigung der Leberzellen mit ihrer hydrophischen Schwellung, albuminösen Trübung und ihrem fettigen Zerfall, die weiten Gebiete von vollständig zerstörten Zellen unter Auflösung der Kerne eine Beeinflussung des fermentativen Systems erwarten ließen.

Ferner lag uns daran, eine Leber, die weitgehend von einem primären Leberkrebs, das auf dem Boden einer gelben Leberatrophie entstanden war, durchsetzt worden war, zu verarbeiten.

Die Leber einer Krankheit, die anatomisch so wenig Ausbeute gibt, nämlich eine der perniziösen Anämie, zogen wir ebenfalls in den Kreis unserer Versuche.

Zu den Kinderlebern ist zu bemerken, daß die beiden Lebern der Totgeburten und die Leber der Frühgeburt außer Stauungsblutüberfüllung keine besonderen Veränderungen zeigten. Wir legten trotzdem Wert darauf, auch diese Lebern zu untersuchen, um zu sehen, ob das jugendliche Alter der Lebern einen bemerkenswerten Einfluß auf den Enzymkomplex, insbesondere auf die stereochemische Spezifität der Esterase haben würde.

Auf eine eingehendere anatomische Beschreibung der verarbeiteten Lebern möchten wir verzichten. Es handelte sich im wesentlichen um typische Fälle. Ausführliche Beschreibungen sind in den zugehörigen Sektionsprotokollen niedergelegt.

Die sehr frischen Lebern wurden nach den von Willstätter und Mitarbeitern angegebenen Vorschriften verarbeitet. Es wurden Aceton-Äther-Trockenpulver hergestellt, aus denen Extrakte mit $\frac{1}{40}$ normal Ammoniak bereitet wurden (auf je 10 g Leberpulver 150 ccm $\frac{1}{40}$ normal NH_3). Die Ammoniakauszüge wurden nach 2ständigem Stehen im Brutschrank zentrifugiert, mit $\frac{1}{10}$ n-Essigsäure neutralisiert, erneut zentrifugiert und unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt. Zur Kontrolle dienten ferner zwei Fermentpräparate aus normalen menschlichen Lebern, die von Unglücksfällen stammten und die sich bei der Sektion als normal erwiesen. Präparat A entstammte einem Leberpulver, das etwa $1\frac{1}{2}$ Jahre alt war, Präparat B von einem durch Selbstmord Geendeten (19. 2. 32). Außerdem war uns das Verhalten der Esterase aus normalen menschlichen Lebern durch die früheren Arbeiten bekannt¹.

¹ Herrn Prof. Dr. Roeßle, Prof. Dr. Schürmann, Dr. Wagner (Inst. f. gerichtl. Mediz., Berlin), Dr. Hummel (Josephskrankenhaus Berlin) danken wir für die Überlassung der menschlichen Lebern.

Zur Spaltung diente der racemische Mandelsäure-Methylester. Die Verfolgung des Spaltungsverlaufs geschah nach der elektrotitrimetrischen Methode von *Rona* und *Ammon*¹. Das Prinzip dieser Methode ist kurz folgendes. Die Fermentlösung wird elektrometrisch neutralisiert. Danach wird der in den angewandten Konzentrationen in Wasser lösliche dl-Mandelsäure-Methylester hinzugesetzt. Die durch das Ferment entstehende Mandelsäure verrät sich durch die fortlaufend leicht festzustellende Änderung der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung, da in die Flüssigkeit eine Glockenelektrode taucht und ebenfalls ein mit einer Kalomel-elektrode verbundener KCl-Agarheber. Die Ableitungen gehen an einen Potentiometer. Der pH der Untersuchungsflüssigkeit wird unter ständiger potentiometrischer Kontrolle durch Hinzugeben von eingestellter $\frac{1}{10}$ n-Natronlauge konstant gehalten. Das Maß der Natronlauge dient zur Berechnung des Spaltungsgrades. Nach Erreichung eines bestimmten Spaltungsgrades wurde die Untersuchungsflüssigkeit aus der Apparatur genommen und das Ferment durch Aufkochen getötet. Die Aufarbeitung dieser Untersuchungsflüssigkeit zur Isolierung und polarimetrischen Bestimmung der vom Ferment in Freiheit gesetzten Mandelsäure geschah ebenfalls nach dem von *Rona* und *Ammon* angewandten und erprobten Verfahren.

Die Tabelle gibt die Ergebnisse unserer Versuche mit den nötigen Versuchsangaben wieder. Es ist aus Versuch 1 und 2 zu ersehen, daß die Menschenleberesterase unter den angegebenen Bedingungen bei der Spaltung des racemischen Mandelsäure-Methylesters den L-Ester mit größerer Geschwindigkeit hydrolysiert hat als den D-Ester, denn bei Unterbrechung des Spaltungsverlaufs bei 16,6 und 26,6% ist die vom Ferment in Freiheit gesetzte und von uns isolierte Mandelsäure recht stark linksdrehend.

Ver- such Nr.	Anfangs- konzentration des Esters		Fer- ment- menge	Ge- samt- volu- men	Fermentart	Spalt- ungs- dauer in Minu- ten	Spalt- ungs- grad in %	$[\alpha]_D^{25}$ der vom Ferment in Freiheit ge- setzten und isolierten Mandelsäure
	in Molarität	in %						
1	0,0301	0,5	10	100	Normal A	62	26,6	-38,8°
2	0,0301	0,5	14	200	Normal B	40	16,6	-51,55°
3	0,0301	0,5	7	100	Normal B	46	26,6	-50,1°
4	0,181	3,0	7	100	Normal B	236	16,6	+ 7,67°
5	0,0301	0,5	10	100	Perniziöse Anämie	165	26,6	-27,8°
6	0,0301	0,5	20	100	Cirrhose	178	26,6	-32,7°
7	0,0301	0,5	40	200	Akute gelbe Leberatrophie	52	16,6	-42,3°
8	0,181	3,0	10	50	Desgl.	219	16,6	+ 10,35°
9	0,0301	0,5	30 und 100	100	Kinderleber- Asphyxie	Keine	Spaltung feststell- bar	
10	0,0301	0,5	50	100	Totgeburt	114	16,6	-58,5°
11	0,0301	0,5	50	100	Frühgeburt	183	16,6	-33,5°
12	0,0301	0,5	40	200	Primäres Lebercarcinom	290	16,6	-44,0°

Wird die Substratkonzentration von 0,5% auf 3% erhöht, so tritt die von *Bamann* zuerst entdeckte Tatsache auf, daß die Menschen-

¹ *Rona u. Ammon*: I. c. s. a. *Rona*, Fermentmethoden. Berlin: Julius Springer 1931.

leberesterase jetzt den d-Ester bevorzugt spaltet, denn die isolierte Mandelsäure, die vom Enzym aus dem d,l-Ester in Freiheit gesetzt worden ist, ist rechtsdrehend¹ (vgl. Versuch 4).

Aus den Versuchen 5, 6, 7, 10, 11 und 12 ist ersichtlich, daß das spezifische Drehungsvermögen der Mandelsäure, die durch Spaltung aus dem racemischen Mandelsäure-Methylester mit Hilfe der einzelnen Esterasen gebildet wurde, in Richtung und annähernd in Größe übereinstimmt mit dem $[\alpha]_D$ -Wert der Mandelsäure, die bei der Esterhydrolyse mittels der Esterasen aus normalen menschlichen Lebern erhalten wurden. Versuch 8 zeigt, daß die Esterase einer pathologischen Leber auch den d-Ester schneller spaltet, wenn die Ausgangssubstratkonzentration auf das 6fache erhöht wird. Sie verhält sich genau so wie die Esterase aus einer normalen menschlichen Leber (vgl. Versuch 4).

Die pathologischen Vorgänge, die sich in den Lebern abgespielt haben, soweit bis jetzt untersucht, haben demnach keinen Einfluß auf die zum Enzymkomplex gehörenden Beimengungen. Soweit die Esterasen in den pathologischen Lebern vorhanden sind — sie scheinen in ihrer Menge herabgesetzt zu sein —, das gilt besonders für die fetalen Lebern, zeigen sie das gleiche optische Auswahlvermögen wie es von den Esterasenpräparaten von normalen menschlichen Lebern her bekannt ist. Versuch 9 zeigt, daß das unter denselben Bedingungen hergestellte Enzympräparat keine nachzuweisende Wirkung auf den Mandelsäure-Methylester hatte.

Zusammenfassung.

Esteraselösungen, die aus menschlichen pathologischen Lebern gewonnen wurden, zeigen das gleiche optisch auswählende Verhalten gegenüber racemischem Mandelsäure-Methylester, wie es für die Menschenleberesterasepräparate aus normalen Lebern her bekannt ist. Die pathologischen Vorgänge, die sich in den einzelnen Lebern abgespielt haben, scheinen lediglich die „Fermentmenge“ herabzusetzen.

¹ Bamann: II. Mitt. I. c. — Rona, Fischgold u. Ammon: I. c. — Ammon u. Fischgold: I. c. — Fischgold u. Ammon: Biochem. Z. 247, 338 (1932). Ferner Ammon u. Geisler: Biochem. Z. 1932, mit größerem experimentellen Material über diese Frage.