

PHARMAKOLOGISCH WIRKSAME LIPOIDLÖSLICHE SÄUREN IN HIRNEXTRAKTEN: ISOLIERUNG VON LYSOPHOSPHATIDSÄURE UND GANGLIOSID

H. KIRSCHNER und W. VOGT

Pharmakologische Abteilung der Medizinischen Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen

(Received 28 April 1961)

Abstract—The occurrence of pharmacologically active lipid-soluble acids in brain has been investigated. Chloroform extracts from brain of horse, rabbit and guinea pig stimulated smooth muscle preparations. By chromatography of horse brain extracts on silicic acid and on ion exchange resins three active fractions were obtained. From two of these, the active compounds were isolated and identified as lysophosphatidic acid and ganglioside, respectively. The third fraction probably consisted of unsaturated fatty acids

PHARMAKOLOGISCH aktive Phosphatidsäuren und andere saure Phospholipide wurden bislang nur in Darmgewebe—als wirksame Bestandteile von Darmstoffextrakten—nachgewiesen.^{1, 2} Im Hinblick auf die erstmals 1956 geäusserte Vermutung, dass Phosphatidsäuren als Carrier für den Kationentransport durch Zellmembranen funktionieren können,^{2, 3} schien es interessant, nach solchen Stoffen auch in anderen Organen, speziell in funktionell aktiven, zu suchen. Im folgenden wird über die Isolierung von pharmakologisch wirksamer Lysophosphatidsäure und Gangliosid aus Gehirn berichtet.

METHODIK

Extraktion der Gehirne

Die frischen Pferdehirne wurden nach dem von Bligh und Dyer⁴ ursprünglich für Fischfleisch ausgearbeiteten Verfahren mit Chloroform, Methanol und Wasser in einem Ultra-Turrax TP 45/2 homogenisiert. Dabei legten wir einen Wassergehalt des Gewebes von 80% zugrunde und benutzen insgesamt zwei ml Chloroform, zwei ml Methanol und ein ml Wasser je g Frischgewebe. Nach dem Abnutzen des Ansatzes wurde die Chloroformschicht von der Wasser-Methanol-Phase abgetrennt, unter Vakuum einer Wasserstrahlpumpe eingedampft und der Rückstand zur Chromatographie in 200 oder 400 ml Chloroform aufgenommen.

Chromatographie an Kieselgel

Kieselgel (Mallinckrodt) (80 bis 200 g) wurde mit der gleichen Gewichtsmenge Celite gemischt und als Suspension in Chloroform in ein Chromatographierohr von 6 cm ϕ gefüllt. Die Säulen wurden zunächst mit anderen Lipidextrakten beladen, um sie zu "altern",⁵ dann mit Methanol eluiert und mit Chloroform regeneriert. Die Pferdehirnextrakte wurden in Chloroformlösung auf die gealterten Säulen gegeben

und wie früher angegeben mit stufenweise veränderten Chloroform-Methanol-Gemischen eluiert.⁶

Chromatographie an Ionenaustauschern

Wir benutzten als Kationenaustauscher Dowex 50 × 4 (100-mesh) in der H⁺-Form, als Anionenaustauscher *Ecteola*-Cellulose (Schleicher & Schüll) in der OH⁻-Form. Eine Dowex-Säule und eine *Ecteola*-Säule wurden hintereinander geschaltet. Die zu fraktionierenden Extrakte wurden, in Chloroform-Methanol-Wasser (4 : 8 : 1 v/v) gelöst, auf den Kationenaustauscher gegeben und mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch durch beide Säulen getrieben. Dann wurde die *Ecteola*-Säule mit einem linear ansteigenden NaCl-Gradienten (bis 1% NaCl) eluiert. Den Gradienten stellten wir durch kontinuierliches Zufliessenlassen von 700 ml Chloroform-Methanol-13% NaCl-Lösung (4 : 8 : 1 v/v) zu 700 ml des kochsalzfreien Gemisches in einem offenen Mischgefäß her.⁷

Papierchromatographie

Phospholipide wurden auf Formaldehyd-imprägniertem Papier nach der Methode von Hörhammer *et al.*⁸ bei 9° chromatographiert. Das Papier stellte Dr. Wagner, München, freundlicherweise zur Verfügung. Chromatogramme auf unbehandeltem Schleicher und Schüll Papier 2043 b (gewaschen) entwickelten wir bei Raumtemperatur aufsteigend mit Methyläthylketon-Diäthylamin-Wasser (60 : 3 : 20 v/v),⁹ n-Propanolkonz. Ammoniak-Wasser (6 : 3 : 1 v/v)¹⁰ oder Chloroform-Lutidin-Eisessig (4 : 4 : 1 v/v).¹¹ Die je Fleck aufgetragene Substanzmenge betrug meist 100, selten 150 µg.

Phosphat wurde auf dem Papier mit dem Molybdatreagens von Hanes und Isherwood¹⁰ sichtbar gemacht. Aminogruppen färbten wir mit Ninhydrin an, Lipide mit Rhodamin B.¹²

Analytische Methoden

Phosphor bestimmten wir nach Bartlett,¹³ Esterbindungen mit der Hydroxamsäuremethode von Rapport und Alonzo,¹⁴ wobei wir Lysolecithin als Standardsubstanz benutzen. Neuraminsäure wurde nach Böhm *et al.*¹⁵ bestimmt, als Standard diente ein von Professor Klenk freundlicherweise zur Verfügung gestelltes Gangliosid-Präparat. Die Medizinische Klinik der Universität Göttingen führte die flammenfotometrischen Na-Bestimmungen durch.

Die fotometrischen Messungen erfolgten in einem Unicam S. P. 500 Spektrofotometer.

Milde alkalische Hydrolyse

Phospholipidfraktionen wurden nach Dawson¹⁶ mit NaOH bei 37° behandelt und die resultierenden wasserlöslichen Phosphorsäureester durch zweidimensionale Papierchromatographie unter Benutzung der von Maruo und Benson¹⁷ angegebenen Lösungsmittel charakterisiert.

Pharmakologische Wirksamkeit

Als Mass diente die kontraktionsverstärkende Wirkung am isolierten Kaninchendarm, die wie früher bestimmt wurde.¹⁸ Als Darmstoff-Standard benutzten wir ein Präparat aus Pferdedarm, H₁₃.

Präparate

Für den chromatographischen Vergleich mit der isolierten Lysophosphatidsäure standen uns folgende Präparate zur Verfügung: Lysophosphatidsäure,¹⁸ durch Bromolyse¹⁹ gewonnen; Phosphatidsäure, aus Eilecithin durch Einwirkung von Phospholipase D dargestellt, unter Verwertung der Erfahrungen anderer Autoren.²⁰⁻²² Plasmalogensäurehaltige Phosphatidsäure wurde in gleicher Weise aus Rinderherzlecithin hergestellt. Mono- und Di-Phosphoinositid überliess uns Herr Dr. Wagner, München, freundlicherweise, Gangliosid Herr Professor Klenk, Köln.

ERGEBNISSE

Zunächst hatten wir Hirne von Kaninchen und Meerschweinchen untersucht, die gefriergetrocknet und dann mit Chloroform-Methanol (4 : 1 v/v) im Soxleth extrahiert wurden. Die tief braunen Lipidextrakte überführten wir in Chloroformlösung und fraktionierten sie an Kieselgel (5 g) mit 50 ml Chloroform und je 50 ml folgender Gemische: Chloroform-Methanol (9 : 1 v/v; 4 : 1 v/v; 3 : 2 v/v; 1 : 4 v/v). Die Chloroform-Methanol (9 : 1) Fraktionen enthielten regelmässig ein Maximum darmregender Wirkung, während die Aktivität der übrigen Fraktionen stark wechselte. In der Dissertation von Kirschner²³ sind die Ergebnisse näher beschrieben.

Dieses Extraktionsverfahren schien durch den ausgedehnten Kontakt der Gewebe mit Luft und durch die erhöhte Extraktionstemperatur sekundäre Veränderungen der Lipide zu begünstigen. Deshalb wandten wir die schonender und schneller arbeitende Methode von Bligh und Dyer⁴ an, bei der das frische Gewebe ohne Trocknung kalt extrahiert wird. Zwei Pferdehirne, von 485 und 610 g Gewicht, wurden auf diese Weise aufgearbeitet. Als Beispiel werden im folgenden der Verlauf und die Ergebnisse, die mit dem 610 g schweren Gehirn (Versuch 6) erhalten wurden, beschrieben.

Fraktionierung an Kieselgel

Aus dem Gehirn von Versuch 6 erhielten wir 50 g Rohlipid. Wegen der grossen Menge trennten wir daraus zuerst nach der Methode von Borgström²⁴ die wenig polaren Nicht-Phosphatide chromatographisch ab. Die erhaltene Phospho- und Glycolipidfraktion wog 27,8 g. Die Hälfte davon wurde in 220 ml Chloroform-Methanol (9 : 1 v/v) gelöst und an einer mit je 200 g SiO₂ und Celite gefüllten Säule fraktioniert.

Abb. 1 zeigt, dass zwei Maxima darmregender Wirkung aufraten, ein mit Chloroform-Methanol (9 : 1 v/v) und ein mit (1 : 4 v/v) eluiertes. Der das erste Maximum umfassende Inhalt der Rohre 20 bis 60 wurde vereinigt und als Fraktion "91" weiter bearbeitet. Zur weiteren Untersuchung der mit (1 : 4 v/v) eluierten Wirkstoffe wurden die Rohre 10 bis 35 gesammelt (Fraktion "14"). Fraktion 91 wog 9 g und enthielt 610.000 Darmstoff-Einheiten, Fraktion 14 hatte 0.08 g Lipidmasse mit 214.000 Darmstoff-Einheiten.

Isolierung von Lysophosphatidsäure aus Fraktion 91

(a) *Ionenaustauschchromatographie*

Um die vermutlich sauren Wirkstoffe der Fraktion 91 von anderen Lipiden, die ebenfalls mit Chloroform-Methanol (9:1 v/v) aus Kieselgel-Säulen eluiert werden (z.B. Cholesterinester, Cerebroside) zu trennen, versuchten wir die Ionenaustausch-chromatographie.

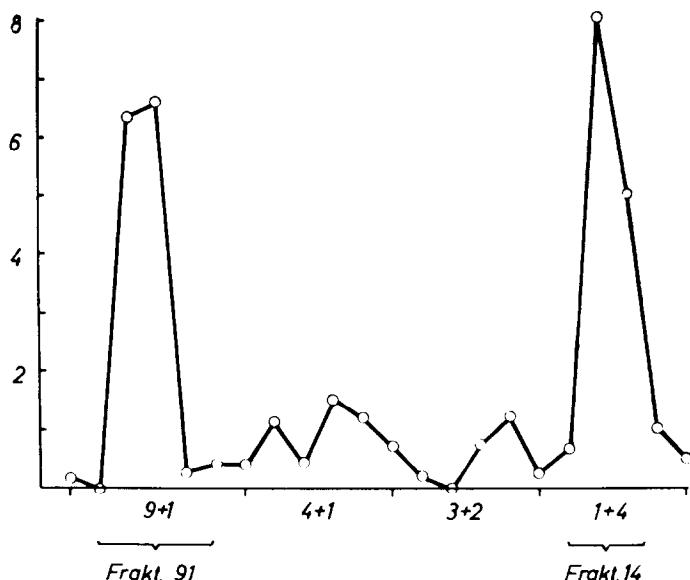


ABB. 1. Chromatographie der Phospho- und Glycolipidfraktion aus Pferdehirn (Versuch 6) an SiO_2 . Elution mit je 1000 ml Chloroform-Methanol (9:1 v/v; 4:1 v/v; 3:2 v/v; 1:4 v/v). Wirkung der erhaltenen Fraktionen am isolierten Kaninchendarm. Proben von je 10 Fraktionen wurden zur biologischen Auswertung zusammengefasst. Die Ordinate gibt die Kontraktionshöhe des Testdarms in cm. an.

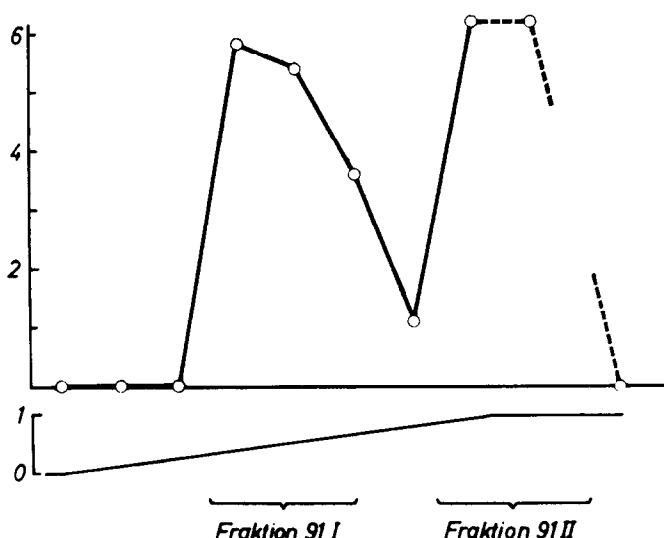


ABB. 2. Ionenaustauschchromatographie von Fraktion 91. Elution der Ecteola-Säule mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0–1% NaCl-Gehalt (Zur Darstellung des Gradienten siehe Methodik). Die aufgefangenen Eluatfraktionen betrugen jeweils 20 ml. Proben von je 10 Fraktionen wurden für die biologische Auswertung zusammengefasst. Oben: Wirkung der Sammelfraktionen am Kaninchendarm. Die Ordinate gibt die Kontraktionshöhe in cm. an. Darunter: Anstieg der NaCl-Konzentration in der Elutionsflüssigkeit in Prozent.

Die sauren Phospholipide werden vom Anionenaustauscher nur dann sicher adsorbiert, wenn ihre sauren Gruppen nicht durch Ca^{2+} oder andere Kationen blockiert sind. Wir schalteten deshalb der Anionenaustauschsäule (*Ecteola*) einen Kationenaustauscher (Dowex 50) vor.

Die Hälfte der Fraktion 91, in 50 ml Chloroform-Methanol-Wasser (4 : 8 : 1 v/v) gelöst, wurde durch eine mit Dowex 50 gefüllte Säule (2 cm ϕ , 25 cm hoch) und eine dahinter geschaltete *Ecteola*-Säule (4 cm ϕ , 70 cm hoch) filtriert und mit insgesamt 1500 ml des gleichen Lösungsmittelgemisches nachgewaschen. Die durchgelaufenen Lösungen und das aus der Dowex-Säule gewonnene Eluat hatten keine darmregende Wirkung und wurden verworfen. Die an die *Ecteola*-Säule adsorbierten sauren Extraktstoffe wurden nun mit einem von 0–1% ansteigenden NaCl-Gradienten und weiter mit 1% NaCl in Chloroform-Methanol-Wasser eluiert. Wie Abb. 2 zeigt, enthielt das Eluat die darmregende Wirkung, in zwei Zonen aufgetrennt.

Fraktion 91 I. Die das erste Maximum enthaltenden Fraktionen 35 bis 60 (520 ml) wurden als Fraktion 91 I vereinigt. Da der hier vorhandene Wirkstoff sich schon mit geringen NaCl-Konzentrationen von der Säule eluieren liess, handelte es sich offenbar um eine schwache Säure. Die wirksame Substanz enthielt keinen Phosphor und lief im Chromatogramm auf Formaldehydpapier fast mit der Lösungsmittelfront. Es dürfte sich um pharmakologisch wirksame Fettsäuren handeln, mit deren Vorhandensein in Chloroform-Methanol-(9 : 1)-Fraktionen von Lipidextrakten zu rechnen ist.⁶

Fraktion 91 II. Als Fraktion 91 II fassten wir die Lösungen der Rohre 70 bis 95 zusammen (520 ml). Wir entfernten das vorhandene Kochsalz durch Verteilung des eluierten Materials zwischen Butanol und Wasser und gewannen aus der Butanollösung 77 mg einer phosphorhaltigen Substanz. Sie zeigte im Papierchromatogramm einen Fleck, der sich mit Rhodamin und Phosphatreatagens anfärbten ließ, aber mit Ninhydrin nicht reagierte. Die Lage entsprach der von Phosphatidsäure. Wir versuchten daraufhin, die vermutete Phosphatidsäure aus alkoholischer Lösung als Na-Salz zu fällen.²⁰ Da die Substanz mit NaCl aus der Anionenaustauschersäule eluiert worden war, musste sie bereits als Na-Salz vorliegen. 46 mg des Materials wurden in 0,5 ml Chloroform gelöst und mit 4 ml absolutem Alkohol versetzt. Nach zweistündigem Stehen bei –20° wurde der gebildete weisse Niederschlag abzentrifugiert und mit 3 ml Alkohol gewaschen. Wir erhielten 29 mg eines nahezu weissen, hydroskopischen Stoffes, mit folgenden Analysenwerten: C = 53,3%; H = 8,7%; N = 0%; P = 5,63%; Na = 6,88%. Nach Umfällen aus Chloroform mit Alkohol stieg der P-Wert auf 6,0%. Pro Mol Phosphat war eine Esterbindung vorhanden (Ester/P 0,92), Fettaldehyde ließen sich nicht nachweisen. Die Substanz war in Chloroform und Wasser löslich, in Alkohol auch bei Zimmertemperatur unlöslich. In Papierchromatogrammen lief sie einheitlich und hatte den gleichen R_F -Wert wie durch Bromolyse gewonnene Lysophosphatidsäure (Abb. 3). Von Cholinphosphatiden und Kephalinen unterschied sie sich durch das Fehlen von Stickstoff, von Phosphoinositiden durch andere Wanderung im Papierchromatogramm, von Cardiolipin-ähnlichen Polyglycerophosphatiden durch die starke Wirksamkeit und Unlöslichkeit des Na-Salzes in Alkohol. Nach milder alkalischer Hydrolyse¹⁶ wurde kein lipoidlösliches Phosphat mehr gefunden, nur ein wasserlöslicher Phosphatester, der papierchromatographisch von α -Glycerophosphat nicht unterscheidbar war.

Nach den gewonnenen Daten handelte es sich um das Na-Salz einer Lysophosphatidsäure. Auf Grund des gefundenen molaren Na/P-Verhältnisses von 1,65 war ein Gemisch von 35% Mono- und 65% Di-Natriumsalz anzunehmen.

Kaninchendarmpräparate reagierten noch auf Konzentrationen von 4×10^{-8} des Na-Salzes mit Kontraktionsverstärkung und Tonuserhöhung. Am Meerschweinchenileum waren erst 50 fach stärkere Konzentrationen wirksam. Die hohe

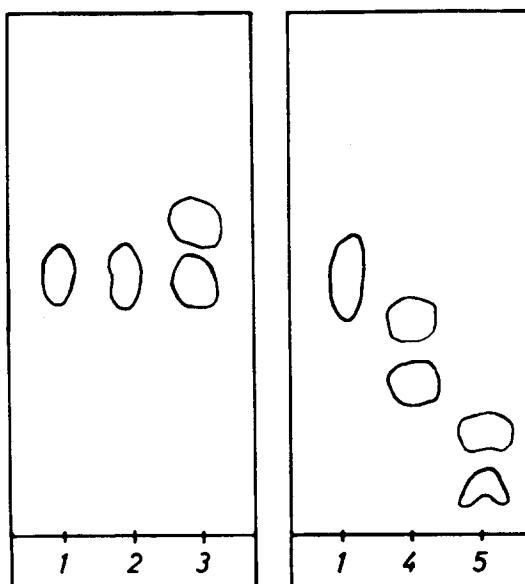


ABB. 3. Papierchromatogramme auf Formaldehydpapier (Hörhammer, Wagner und Richter).

- (1) Aus dem Pferdehirn isolierte Lysophosphatidsäure, Na-Salz.
- (2) Durch Bromolyse gewonnene Lysophosphatidsäure, Na-Salz.
- (3) Darmstoff aus Pferdedarm (H_{13}).
- (4) Monophosphoinositid.
- (5) Diphosphoinositid.

Phosphatfärbung nach Hanes und Isherwood.

Aktivität bestand nur, wenn die Substanz in Wasser oder Kochsalzlösung angewandt wurde. Beim Aufnehmen des Stoffes in Tyrodelösung bildete sich eine Trübung aus, und die Wirkung war um etwa eine Größenordnung geringer. Dies lässt sich durch Ausfällen eines unlöslichen Ca-Salzes erklären. Dass es bei Anwendung von Ca-freien Phosphatidsäurelösungen nicht nachträglich noch in der Tyrodelösung des Organbades zur Ausfällung kommt, liegt vermutlich an der dann wesentlich niedrigeren Endkonzentration.

Im allgemeinen wurden in das 10 ml fassende Organbad 0,05 bis 0,4 ml der zu prüfenden Lösung injiziert, die dabei also 25 bis 200 fach verdünnt wurde. Mit anderen sauren Phospholipiden, die erst wesentlich höher konzentriert wirksam sind, lassen sich durch Steigerung der Konzentration keine entsprechenden Wirkungszunahmen erzielen, vermutlich weil dann auch im Organbad die Substanzen ausfallen.¹⁸

Nach biologischer Standardisierung am isolierten Kaninchendarm entsprach 1 mg Na-Lysophosphatidat 80.000 Darmstoff-Einheiten. Dieser Wert liegt im Bereich der

Wirkungsstärke von zwei früher durch Bromolyse dargestellten Lysophosphatidsäurepräparaten (30.000 bzw. 49.000 Einheiten¹⁸).

Die Berechnung der Ausbeute zeigte überraschenderweise einen reichlich zehnfachen Wirkungsgewinn nach der Ionenaustauschchromatographie. Die Fraktion 91 hatte 610.000 Einheiten, von denen die Hälfte ... 305.000 Einheiten für die Ionenaustauschchromatographie eingesetzt wurde. Aus dem Anionenaustauscher wurden 77 mg Substanz mit dem zweiten Wirkungsmaximum eluiert. Aus 46 mg davon erhielten wir 29 mg Na-Lysophosphatidat mit 80.000 Einheiten/mg. Daraus ergeben sich für das zweite Wirkungsmaximum (Fraktion 91 II) insgesamt 3.900.000 Einheiten, also das 12.8 fache der eingesetzten Menge. Dabei ist noch unberücksichtigt, dass ein Teil der eingesetzten Wirkung auf das erste Wirkungsmaximum des Eluates (Fettsäuren?) fällt.

Ein direkter biologischer Vergleich der eingesetzten mit der aus dem Austauscher wiedergewonnenen Aktivität zeigte allerdings nur eine etwa 5 fache Wirkungszunahme. Ein Teil des errechneten Gewinns beruht demnach wohl auf Standardisierungsfehlern, erklärlich dadurch, dass der Standard und das zu standardisierende Präparat nicht identisch waren und die Standardisierungen der vor und nach Chromatographic erhaltenen Lösungen an verschiedenen Darmpräparaten vorgenommen werden mussten.

Versuche mit einzelnen Ionenaustauschern zeigten, dass der Wirkungsgewinn nach Passieren der Dowex 50-Säule auftrat. Als Erklärung kamen zwei Vorgänge in Frage: (1) Die Phosphatidsäure konnte zunächst an ein Kation gebunden sein, das ihre Wirkung beeinträchtigte (z.B. Calcium Ion), bis es durch die Dowex-Säule entfernt wurde. (2) Durch einen hydrolytischen Prozess beim Kontakt mit dem Austauscherharz konnte die Lysophosphatidsäure aus einem geeigneten, pharmakologisch weniger wirksamen Material erst gebildet worden sein.

(1) Für einen nachhaltigen Einfluss von Ca-Ionen fand sich kein Anhalt. Der flammenfotometrisch bestimmte Ca-Gehalt lag dafür zu niedrig. Die unfractionierten Hirnextrakte übten auf die Wirkung der Lysophosphatidsäure einen deutlichen Hemmefekt aus. Auch er reichte aber zur Erklärung des Wirkungsgewinns nach der Reinigung kaum aus. Besondere, hemmende Fraktionen konnten in den Eluaten nicht sicher nachgewiesen werden.

(2) Am nächstliegenden wäre die Abspaltung einer Fettsäure oder eines Aldehydes aus einer vollsubstituierten (Acetal-)Phosphatidsäure. In beiden Fällen erhielte man eine Lysophosphatidsäure, die wirksamer sein dürfte.¹⁸ Enzymatisch gewonnene Phosphatidsäure- und Plasmalogensäurepräparate, die wir durch Dowex-Säulen filtrierten, liessen aber keine solchen Abspaltungen erkennen. Das Ester/P-Verhältnis nahm nach der Austauscher-Passage nicht ab, freie Fettaldehyde konnten wir im Durchlauf nicht finden. Dass der Austauscher aus einem Lysophosphatid die Base abspalten würde—auch das führte zu einer Lysophosphatidsäure—is wenig wahrscheinlich. Außerdem dürfte die Ausgangsfraktion, die ja mit Chloroform-Methanol (9 : 1) aus einer SiO₂-Säule eluiert worden war, keine Lysophosphatide enthalten. Diese werden erst durch höhere Methanolkonzentrationen eluiert.

(b) *Lösungsmittelfraktionierung*

Wir versuchten nun, Phosphatidsäure unter Umgehung der Ionenaustauschchromatographie direkt aus der Fraktion 91 zu gewinnen. Dadurch hofften wir, eine

Antwort auf die Frage zu erhalten, ob die gefundene Lysophosphatidsäure präformiert oder ein durch die Austauscherbehandlung entstandenes Kunstprodukt war.

Ein nicht mit Ionenaustauschern behandelter Teil der Fraktion 91 (etwa ein Drittel der ganzen Fraktion) wurde im Vakuum eingeengt, in 80 ml absolutem Alkohol aufgenommen und filtriert. Das Filtrat versetzten wir mit alkoholischer Natronlauge bis pH 8,0. Nach mehrstündigem Stehen bei -20° wurde die entstandene Fällung abzentrifugiert, mit Alkohol gewaschen und in 3 ml Chloroform gelöst. Wir fällten die Substanz erneut durch Zufügen von Alkohol (30 ml) in der Kälte. Die erhaltenen 560 mg wurden bei Zimmertemperatur in Alkohol suspendiert und der unlösliche Anteil abgetrennt. Er ergab nach Umlöpfällen 50 mg chloroformlösliche, alkoholunlösliche Substanz mit 1,7% P (Substanz 91 a). Die Alkohollösung wurde danach auf -20° gekühlt. Dabei schieden sich 222 mg Substanz ab (bei Zimmertemperatur in Alkohol löslich) mit 1,3% P (Substanz 91 b). Substanz 91 a enthielt am meisten darmerregende Wirkung, die Mutterlauge der Substanzen am wenigsten.

Die beiden gefällten Präparate waren papierchromatographisch uneinheitlich. Neben Flecken saurer Phospholipide, die wie Phosphatidsäure lagen, waren Spuren von ninhydrinpositivem Material und P-freie Lipide (Cerebroside?) zu erkennen. Proben der beiden Präparate wurden milde alkalisch hydrolysiert¹⁶ und die wasserlöslichen Phosphatester durch zweidimensionale Papierchromatographie¹⁷ charakterisiert. Das Hydrolysat von 91 a liess im Chromatogramm einen Fleck von Glycerophosphat erkennen (Abb.4). Er deckte sich mit authentischem α -Glycerophosphat im Mischchromatogramm. Dicht hinter diesem Fleck fand sich ein weiterer, der nach der von Maruo und Benson¹⁷ gezeigten Abbildung als Glycerophosphorylglycerin (GPG) anzusprechen war. Im Chromatogramm von Substanz 91 b zeigten sich die gleichen Flecken, der für GPG angesehene war hier relativ stärker. Daneben enthielten beide Hydrolysate noch geringere Mengen von 3 anderen P-Estern, von denen einer ähnlich wie Glycerophosphoryl-Inositol lag. Ein dem Hydrolyseprodukt von Cardiolipin entsprechender Fleck wurde nicht beobachtet. Die papierchromatographische Analyse der Hydrolysate ergab mithin, dass die Substanzen 91 a und b zum grossen Teil aus Phosphatidsäure und vermutlich Phosphatidylglycerin bzw. deren Lysoproducten bestanden.

Nachweis von Gangliosid in Fraktion 14

Unter einer grösseren Anzahl von sauren Lipiden fand sich in früheren Untersuchungen⁶ nur eines, das aus SiO₂-Säulen mit Chloroform-Methanol (1 : 4) eluiert wird und darmerregende Wirkung zeigt: Gangliosid. In der Tat gab 1 mg der in Fraktion 14 enthaltenen Substanz eine positive Reaktion auf Neuraminsäure, liess also ein Gangliosid vermuten. Wir versuchten seine Isolierung.

405 ml des Extraktes wurden im Vakuum eingedampft. Es blieben 76 mg Rückstand, die in 5 ml Chloroform-Methanol (4 : 1) aufgenommen wurden. Nach Abtrennung von 2,1 mg unlöslichen Materials wurde die bei Zimmertemperatur klare Lösung auf -20° abgekühlt, worauf sich ein Niederschlag abschied. Er wurde in einer Kühlzentrifuge als auf der Lösung schwimmende Scheibe abgetrennt und mit wenig Aceton gewaschen. Nach Trocknung erhielten wir 33 mg einer weissen Substanz, die sich in Wasser und Chloroform-Methanol-Gemischen klar löste. Die Gangliosidbestimmung durch Neuraminsäure-Reaktion ergab einen Gehalt von 115%, bezogen auf ein als Standard benutztes Gangliosid-Präparat von Professor Klenk. Die Substanz enthielt noch 1,1% P, der aber papierchromatographisch vom Gangliosid

getrennt werden konnte. Das Papierchromatogramm im Lösungsmittelsystem Tetrahydrofuran-Äther-Wasser (60 : 15 : 10) zeigte zwei mit Rhodamin und mit Bial-Reagens violett anfärbbare Flecken (R_F 0,04 (schwach) und 0,13 (stärker)) entsprechend Gangliosid I und II.¹² Die Substanz entsprach in der biologischen Wirkung rund 1000 Darmstoff-Einheiten/mg. Die bei der Darstellung des Präparates angefallenen Nebenfraktionen—Mutterlauge und bei Zimmertemperatur unlösliches—hatten sehr viel weniger Wirkung und Neuraminsäuregehalt, auf Trockengewicht bezogen. Danach beruhte die Darmwirkung der Fraktion 14 auf dem darin gefundenen Gangliosid.

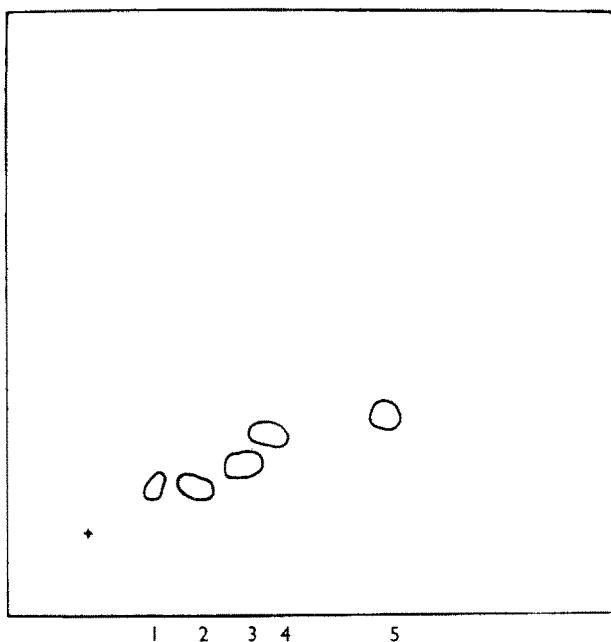


ABB. 4. Zweidimensionales Chromatogramm der wasserlöslichen Hydrolyseprodukte von Substanz 91 a (siehe Text). Waagerechter Lauf: Phenol-Wasser (100 : 40 ml). Senkrechter Lauf: Butanol-Propionsäure-Wasser (142:71:100). P-Färbung nach Hanes und Isherwood. (1) Glycerophosphoryl Inosit. ? (2) ? (3) Vermutlich Glycerophosphoryl-glycerin. (4) Glycerophosphat (stärkster Fleck). (5) ? (sehr schwacher Fleck).

DISKUSSION

Die Ergebnisse bestätigen unsere Vermutung, dass pharmakologisch wirksame saure Lipide in Gehirn vorkommen. Wir konnten Lysophosphatidsäure und Gangliosid als Wirkstoffe identifizieren.

Dawson²⁵ zeigte durch den Nachweis des entsprechenden Hydrolyseproduktes (Glycerophosphat) zuerst, dass Phosphatidsäuren in tierischem Gewebe vorhanden sind. Direkt wurden sie erstmals in Darmextrakten nachgewiesen,¹ später in Gehirn,²⁶ Leber²⁷ und Erythrozytenschatten.²⁸ Phosphatidsäuren treten nur in geringen Mengen auf, neuerdings wird ihr natürliches Vorkommen sogar wieder in Frage gestellt und für möglich gehalten, dass sie erst während der Fraktionierung entstünden bzw. Gemische von "verdorbenen" Phosphatiden darstellen.²⁹ An der Identität der von

uns isolierten Lysophosphatidsäure kann auf Grund der analytischen Daten kein Zweifel bestehen, aber es ist zu vermuten, dass sie nicht in der gefundenen Menge präformiert im Hirngewebe vorgelegen hat. Der nach Ionenaustauschchromatographie gefundene erhebliche Wirkungsgewinn kann wohl nur teilweise durch Elimination von hemmenden Substanzen erklärt werden. Andererseits fanden wir durch die Analyse der Spaltprodukte nach milder alkalischer Hydrolyse, dass auch der nicht mit Ionenaustauschern in Berührung gekommene Hirnextrakt eine Phosphatidsäure enthielt. Es handelt sich also nicht nur um ein Kunstprodukt.

Bei dieser indirekten Methode lässt sich nicht entscheiden, ob eine vollsubstituierte oder eine Lyso-Phosphatidsäure vorlag. Da wir beim Durchlauf von Phosphatidsäuren durch Dowex 50 keine Abspaltung von Fettsäuren oder -aldehyden beobachteten, möchten wir annehmen, dass der Hirnextrakt bereits Lysophosphatidsäure enthielt.

Zum Teil muss der beobachtete Wirkungsgewinn vielleicht so erklärt werden, dass infolge des Kontaktes mit Dowex 50 Phosphatidsäure neu gebildet wurde. Am wahrscheinlichsten ist u.E. die Abspaltung von Glycerin aus Phosphatidylglycerin.

Polyglycerophosphatide sind in einer Reihe von Geweben vorhanden,²⁹⁻³⁴ auch im Gehirn.³² Sie scheinen vorwiegend die Cardiolipinstruktur zu besitzen (Di-phosphatidylglycerin³⁵). Aber auch das zunächst in Pflanzen nachgewiesene Phosphatidylglycerin wurde in tierischen Organen gefunden.^{17, 36} Phosphatidylglycerin dürfte wie sein deacyliertes Produkt Glycerophosphorylglycerin säurelabil sein, sofern es sich um eine α -Lysoverbindung handelt, d.h. die beiden dem Phosphatrest benachbarten Glycerin-OH-Gruppen frei sind (vergl. 36). Es könnte dann durch Dowex 50 angegriffen werden.

In der zweiten pharmakologisch wirksamen Lipidfraktion identifizierten wir Gangliosid als Wirkstoff. Neben einer strukturellen Bedeutung sind in den letzten Jahren zunehmend Hinweise für eine funktionelle Rolle dieses sauren Glycolipids gefunden worden. Offensichtlich ist Gangliosid in den Zellmembranen vorhanden, es spielt als Rezeptorsubstanz für Toxine eine Rolle.³⁷⁻⁴⁰ Bogoch und Bogoch⁴¹ fanden eine erregende Wirkung auf das Herz der Muschel *Venus mercenaria* und vermuteten eine Funktion der Ganglioside für Transportvorgänge. Unsere Ergebnisse sind hierfür vielleicht ein weiterer Anhaltspunkt.

Neben Phosphatidsäure und Gangliosid erhielten wir noch eine dritte darmregende Fraktion, die vermutlich aus ungesättigten Fettsäuren bestand. Diese Stoffklasse wurde bisher pharmakologisch unter den gleichen Aspekten betrachtet wie die sauren Phospholipide, d.h. für ihre Wirkung wie für ihre mögliche Funktion wurden saure Natur und Lipoidlöslichkeit als die bedeutendsten Faktoren angesehen (vergl. Übersicht 42). Es scheint aber, dass für ungesättigte Fettsäuren ganz andere Wirkungsbedingungen gelten. Über diese Untersuchungen wird später berichtet werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde untersucht, ob pharmakologisch wirksame saure Phospholipide im Gehirn vorkommen. Chloroformextrakte aus Gehirn von Pferden, Kaninchen und Meerschweinchen zeigten eine erregende Wirkung auf glatte Muskulatur. Durch Chromatographie an Kieselgel und an Ionenaustauschern wurden drei wirksame Fraktionen gewonnen. Aus zwei dieser Fraktionen konnten die Wirkstoffe isoliert und als Lysophosphatidsäure und Gangliosid identifiziert werden. Bei der dritten Fraktion handelt es sich vermutlich um ungesättigte Fettsäuren.

Anerkennungen—Herrn Professor Klenk, Köln danken wir für die freundliche Überlassung des Gangliosid-Präparates, Herrn Dr. Wagner, München, für Formaldehydpapier. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft stellte das Unicam-Spektrophotometer zur Verfügung. Für den Fortgang der Untersuchungen war uns die bewährte Mitarbeit von Fr. R. Enke eine grosse Hilfe.

LITERATUR

1. W. VOGT, *J. Physiol.* **137**, 154 (1957).
2. W. VOGT, *Arzneimittelforschung* **8**, 253 (1958).
3. W. VOGT, *Nature, Lond.* **179**, 300 (1957).
4. E. G. BLIGH und W. J. DYER, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911 (1959).
5. G. M. GRAY und M. G. MACFARLANE, *Biochem. J.* **70**, 409 (1958).
6. W. VOGT, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **240**, 196 (1960).
7. C. W. PARR, *Biochem. J.* **56**, xxvii (1954).
8. L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und G. RICHTER, *Biochem. Zs.* **331**, 155 (1959).
9. W. VOGT, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **227**, 224 (1955).
10. C. S. HANES und F. A. ISHERWOOD, *Nature, Lond.* **164**, 1107 (1949).
11. G. ROUSER, G. V. MARINETTI, R. F. WITTER, J. F. BERRY und E. STOTZ, *J. Biol. Chem.* **233**, 485 (1956).
12. U. BEISS und O. ARMBRUSTER, *Z. Naturf.* **13b**, 79 (1958).
13. G. R. BARTLETT, *J. Biol. Chem.* **234**, 466 (1959).
14. M. M. RAPPORT und N. ALONZO, *J. Biol. Chem.* **217**, 193 (1955).
15. P. BÖHM, ST. DAUBER und L. BAUMFISTER, *Klin. Wschr.* **32**, 289 (1954).
16. R. M. C. DAWSON, *Biochem. J.* **75**, 45 (1960).
17. B. MARUO und A. A. BENSON, *J. Biol. Chem.* **234**, 254 (1959).
18. W. VOGT, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **240**, 134 (1960).
19. G. V. MARINETTI, K. TEMPLE und E. STOTZ, *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 3159 (1959).
20. M. KATES, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **33**, 575 (1955); sowie persönliche Mitteilungen.
21. F. M. DAVIDSON und C. LONG, *Biochem. J.* **69**, 458 (1958).
22. H. WEISS, H. E. SPIEGEL und E. TIRUS, *Nature, Lond.* **183**, 1393 (1959); persönliche Mitteilungen von Dr. Weiss.
23. H. Kirschner, Dissertation Göttingen (1960).
24. B. BORGSTRÖM, *Acta Physiol. Scand.* **25**, 101 (1952).
25. R. M. C. DAWSON, *Biochim. et Biophys. Acta* **14**, 374 (1954).
26. L. E. HOKIN und M. R. HOKIN, *J. Biol. Chem.* **233**, 800 (1958).
27. G. HÜBSCHER und B. CLARK, *Biochim. et Biophys. Acta* **41**, 45 (1960).
28. R. M. C. DAWSON, N. HEMMINGTON und D. B. LINDSAY, *Biochem. J.* **77**, 226 (1960).
29. M. G. MACFARLANE, *Biochem. J.* **78**, 44 (1961).
30. M. C. PANGBORN, *J. Biol. Chem.* **168**, 351 (1947).
31. J. M. MCKIBBIN und W. E. TAYLOR, *J. Biol. Chem.* **196**, 427 (1952).
32. G. V. MARINETTI, J. ERBLAND, M. ALBRECHT und E. STOTZ, *Biochim. et Biophys. Acta* **26**, 130 (1957).
33. G. S. GETZ und W. BARTLEY, *Nature, Lond.* **184**, 1229 (1959).
34. M. FAURE, M. J. MORFEC-COULON, J. MARÉCHAL et L. LeBORGNE, *Bull. Soc. Chim. Biol. Paris* **41**, 101 (1959).
35. M. G. MACFARLANE, *Nature, Lond.* **182**, 946 (1958).
36. A. A. BENSON und B. MARUO, *Biochim. et Biophys. Acta* **27**, 189 (1958).
37. S. BOGOCH, *Virology* **4**, 458 (1957).
38. S. BOGOCH, P. LYNCH und A. S. LEVINE, *Virology* **7**, 161 (1959).
39. R. KUHN, H. EGGE, R. BROSSMER, A. GAUHE, P. KLESSE, W. LOCHINGER, E. RÖHM, H. TRISCHMANN und D. TSCHAMPEL, *Angew. Chemie* **72**, 805 (1960).
40. E. KLENK und G. UHLENBRUCK, *Z. Physiol. Chem.* **319**, 151 (1960).
41. S. BOGOCH und E. S. BOGOCH, *Nature, Lond.* **183**, 53 (1959).
42. W. VOGT, *Pharm. Rev.* **10**, 407 (1958).