

FORTSCHRITTE DER CHEMIE ORGANISCHER NATURSTOFFE

EINE SAMMLUNG VON ZUSAMMENFASSENDEN BERICHTEN

HERAUSGEGEBEN VON

A. BUTENANDT · U. WESTPHAL · L. ZECHMEISTER
BERLIN BERLIN PASADENA

VIERTER BAND

BEARBEITET VON

K. BERNHARD · H. LINCKE · I. LÖW · R. PURRMANN · G. SCHRAMM
H. J. TRURNIT · R. TSCHESCHE · TH. WIELAND

MIT 47 ABBILDUNGEN IM TEXT



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1945

ISBN-13: 978-3-7091-7183-7 e-ISBN-13: 978-3-7091-7182-0
DOI: 10.1007/978-3-7091-7182-0

**ALLE RECHTE, INSBESONDERE DAS DER ÜBERSETZUNG
IN FREMDE SPRACHEN, VORBEHALTEN**

COPYRIGHT 1945 BY SPRINGER-VERLAG IN VIENNA

Softcover reprint of the hardcover 1st edition 1945

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Die Chemie der pflanzlichen Herzgifte, Krötengifte, Saponine und Alkaloide der Steroidgruppe. Von RUDOLF TSCHESCHE Berlin	1
I. Einleitung.....	1
II. Die Herzgiftglykone der C ₂₃ -Reihe.....	2
III. Die Herzgiftglykone der C ₂₄ -Reihe.....	6
IV. Die Glykoside.....	8
V. Die Krötengifte.....	12
VI. Die Sapogenine der Steroidgruppe.....	16
VII. Die Alkaloide der Steroidgruppe.....	22
Literaturverzeichnis.....	26
Zur Biochemie der Vitamin B-Gruppe (Pantothensäure und Vitamin B₆). Von THEODOR WIELAND und IRMENTRAUT LÖW, Heidelberg	28
Die Pantothensäure.....	28
I. Entdeckung.....	28
II. Biologische Wirkungen.....	29
III. Konstitution.....	30
IV. Synthesen.....	32
1. Synthesen von β -Alanin und seinen Estern.....	33
2. Synthesen des α -Oxy- β , β -dimethyl- γ -butyrolaktons.....	33
Spaltung des racemischen α -Oxy- β , β -dimethyl- γ -butyrolaktons in die optischen Antipoden.....	34
3. Verknüpfung der Spaltstücke.....	35
Anspaltung der racemischen Pantothensäure.....	37
4. Biologische Synthese.....	37
V. Konstitutionsspezifität.....	38
1. Verbindungen mit unveränderter Laktonkomponente.....	38
2. Verbindungen mit unveränderter β -Alaninkomponente.....	39
3. Verbindungen mit veränderter β -Alanin- und Dioxysäurekomponente.....	42
VI. Nachweis und Bestimmung.....	42
Literaturverzeichnis.....	43
Das Vitamin B ₆	46
I. Einleitung.....	46
II. Physiologie.....	46
III. Verträglichkeit und Abbau im Tierkörper.....	48
IV. Mikroorganismen und Pflanzen.....	48
V. Vorkommen.....	50
VI. Isolierung.....	50
VII. Konstitution und Synthese.....	51
VIII. Eigenschaften.....	54
IX. Nachweis und Bestimmungsmethoden.....	57
1. Biologische Verfahren.....	57
2. Chemische Verfahren.....	58
Literaturverzeichnis.....	60

	Seite
Pterine. Von ROBERT PURRMANN, München	64
I Pterinsynthesen	65
II Eigenschaften und Reaktionen der Derivate des Pteridin	70
III Das Vorkommen der Pterine in der Natur und ihre Gewinnung	76
1 Schmetterlinge	76
2 Andere Insekten	79
3 Wirbeltiere	80
IV Die biologische Bedeutung der Pterine	82
1 Insekten	82
2 Säugetiere	84
Literaturverzeichnis	85
Die Biochemie der Virusarten. Von GERHARD SCHRAMM, Berlin-Dahlem	87
I Einleitung	87
Definition des Virusbegriffes	87
II Biologie der Viren	89
1 Übersicht über die Viruskrankheiten	89
2 Die Entstehung der Viren	92
3. Die Übertragung	93
4 Verhalten des Virus im Wirt	93
5. Die Virusvermehrung	96
6 Die Tumorbildung durch Viren	99
7. Die Veränderlichkeit der Viren	101
III Methoden der Virusforschung	105
1. Biologische Methoden	105
2 Die Reindarstellung der Virusarten	109
a) Chemische Verfahren	109
b) Die Ultrazentrifuge	111
c) Die Elektrophorese	115
3 Die Prüfung auf Einheitlichkeit	116
4. Die physikalisch-chemische Kennzeichnung der Virusarten	118
a) Die elektronenmikroskopische Untersuchung	118
b) Bestimmung des Teilchendurchmessers durch Ultrafiltration	121
c) Bestimmung des Molekulargewichtes mit der Ultrazentrifuge	122
d) Bestimmung der Gestalt der Viren	125
e) Die elektrochemische Charakterisierung der Viren	131
5 Die serologische Charakterisierung der Viren	136
a) Das Antigen	137
b) Der Antikörper	138
c) Die Antigen-Antikörperreaktion	138
d) Feststellung der Verwandtschaft	141
e) Reinheitsprüfung und Nachweis der Viren	141
f) Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung der Viren	143
IV. Chemische Eigenschaften der Viren	144
I. Zusammensetzung und chemisches Verhalten	144
a) Verhalten gegen physikalische Einflüsse	144
b) Verhalten gegen chemische Einwirkungen	145
c) Verhalten gegen Enzyme	148

	Seite
2. Die einzelnen Virusarten	149
a) Das Tabakmosaikvirus (<i>Marmor tabaci</i> var. <i>vulgare</i>)	149
Vorkommen 149 — Darstellung 150. Das Verhalten in Lösung 152	
— Größe und Gestalt 153. Elektrochemische Eigenschaften 153	
Zusammensetzung 154 Struktur des Tabakmosaikvirus 155	
b) Die Varianten des Tabakmosaikvirus	160
Biologische Eigenschaften 161. Serologisches Verhalten 165	
Größe und Gestalt 166. Chemisches Verhalten 166	
c) Die Kartoffelviren	168
Biologie der Kartoffelkrankheiten 168 Das Kartoffel-X-Virus 169	
— Das Kartoffel-Y-Virus 170	
d) Das Tabakringfleckenvirus	170
e) Das Severe-Etch-Virus	171
f) Das Tomaten-Bushy-stunt-Virus	171
g) Das Tabaknekrosevirus	173
h) Die Polyederviren der Insekten	173
j) Das Virus der Maul- und Klauenseuche	175
k) Das Encephalomyelitisvirus der Maus	176
l) Das Virus der Kinderlähmung (Polyomyelitis)	177
m) Das Kaninchenpapillomvirus	178
n) Die Elementarkörper der Vaccine	180
o) Die Bakteriophagen	182
Literaturverzeichnis	183
Biologische Oxydationen. Von KARL BERNHARD und HAROLD LINCKE, Zurich	188
I Einleitung	188
II Die einzelnen oxydativen Prozesse	190
1 Bildung von Hydroxylgruppen	190
a) OH-Gruppen bei aliphatischen Verbindungen	190
b) OH-Gruppen bei aromatischen Verbindungen	191
c) OH-Gruppen an hydrocyclischen Ringen	195
d) OH-Gruppen an heterocyclischen Ringen	197
2 Bildung von Aldehydgruppen	197
3. Bildung von Carbonylgruppen	199
a) Entstehung von Ketonen	199
b) Ketosäuren aus Oxysäuren	200
c) Ketosäuren aus Aminosäuren	202
4. Bildung von Carboxyl-Gruppen	204
a) Durch Desaminierung	204
b) Durch oxydative Aufspaltung von Ringen	210
1 Aromatische Ringe 210 — 2 Hydrocyclische Ringe 211 —	
3. Heterocyclische Ringe 212.	
c) Aus Methylgruppen	214
1. Oxydation am Benzolkern befindlicher CH ₃ -Gruppen 215 —	
2. Methyloxydationen natürlicher Fettsäuren 215 — 3. Methyloxy-	
dationen substituierter Fettsäuren 217.	
α-ständige Gruppen 217, β-ständige Gruppen 218; γ- und ε-ständige	
Gruppen 219	

	Seite
4 Methyloxydationen bei Polyencarbonsäuren	220
5. Methyloxydationen von Sauerstoffderivaten der Terpene	222
v) Aliphatische Terpene	222; β) Methyloxydation cyclischer Terpene
224.	
6. Methyloxydationen bei Steroiden	226
d) Aus OH-Gruppen	227
e) Aus CHO-Gruppen	229
f) Aus CO-Gruppen	230
g) Übrige COOH-Bildungen	231
5 Dehydrierungen	231
a) Entstehung doppelter Bindungen bei aliphatischen Verbindungen	231
b) Dehydrierungen ringförmiger Verbindungen	234
III. Die Oxydation längerer C-Ketten bei bestehender COOH-Gruppe	239
1 Abbau normaler und substituierter Fettsäuren (Monocarbonsäuren)	239
a) Die β -Oxydation	240
b) Multiple alternative Oxydation	246
c) ω -Oxydation	251
2 Abbau verzweigter Fettsäureketten (Monocarbonsäuren)	254
3 Abbau von Dicarbonsäuren	257
a) Allgemeines	257
b) Abbau unverzweigter Dicarbonsäuren	258
c) Abbau verzweigter Dicarbonsäuren	261
d) Abbau cyclischer Dicarbonsäuren	262
4. Abbau der Seitenkette alicyclischer Verbindungen	262
IV. Oxydation der Intermediärprodukte der Hauptnährstoffe: Biologischer Abbau der Brenztraubensäure, Essigsäure und der β -Ketocarbonsäuren	264
1. Der Abbau der Brenztraubensäure über den Citronensäurecyclus	266
a) Bildung und Abbau der Citronensäure nach KNOOP und MARTIUS	266
b) Der Citronensäurecyclus	267
c) Bedeutung des SZENT-GYÖRGYI-Systems für den Citronensäurecyclus	268
d) Abbau der Brenztraubensäure im Herzmuskel	269
e) Abbau der Brenztraubensäure in der Leber	270
1. Bildung von Acetessigsäure aus Brenztraubensäure	270. — 2. Bildung von α -Ketoglutar Säure und der C -Dicarbonsäuren aus BTS in der Leber
272 — 3. Allgemeine Bedeutung und Verlauf der Oxal-essigsäurebildung	275.
f) Abbau der Brenztraubensäure im Gehirn	277
2. Abbau der C ₂ -Körper: Essigsäure, Acetaldehyd und Alkohol (Bildung der Citronensäure aus Essigsäure und Oxalessigsäure)	282
a) Im Warmblütlerorganismus	282
b) Durch Hefe	283
c) Durch Schimmelpilze	286
d) Hemmende Wirkung zweiwertiger Kationen auf den Abbau der Citronensäure	287
e) Bemerkungen zur energetischen Koppelung	287
3. Abbau der β -Ketocarbonsäuren über den Citronensäure-Cyclus. (Bildung der Citronensäure aus β -Ketocarbonsäuren und Oxalessigsäure)	290
a) Abbau der Acetessigsäure in Niere und Herzmuskel	290

	Seite
b) Abbau der β -Ketocarbonsäuren (β -oxydativer Abbau der Fettsäuren)	290
c) Bemerkungen zur Koppelung des Kohlenhydrat- und Fettsäure- abbaus	291
Intermediärprodukte der Citronensäuresynthese	292
a) Beim Abbau der Brenztraubensäure	292
b) Versuche mit signierter Oxalessigsäure und Trideuterioessigsäure zur Klärung des Kondensationsmechanismus	295
c) Zusammenfassende Betrachtungen über den Reaktionsverlauf bei der Citronensäurebildung	298
5. Bemerkungen zu den Einwänden gegen die Theorie des Citronensäure- cyclus	303
6. Allgemeine Bemerkungen zur bakteriellen Gärung	306
7. Die Propionsäuregärung	308
a) Bildung der C_4 -Dicarbonsäuren	309
b) Zur Bildung der C_3 -Körper (Propionsäure, BTS und Milchsäure) .	310
c) Bildung der Essigsäure	315
8. Die Buttersäure- und Butanolgärung	317
9. Abbau der Essigsäure, Citronensäure und Acetessigsäure	318
a) Abbau der Essigsäure	318
b) Abbau der Citronensäure	324
c) Abbau der Acetessigsäure durch <i>B. coli</i>	329
10. Schlußbemerkung	331
Literaturverzeichnis	334

Über monomolekulare Filme an Wassergrenzflächen und über Schichtfilme. Von H. J. TRURNIT, Heidelberg

Namen und Zeichen	347
Einleitung	348
I. H-Filme	352
1. Einfache Erfahrungen an Wasseroberflächen	352
2. Methoden der Schubmessung	354
3. Änderung des Voltapentials	356
4. Das thermodynamische und molekulare Bild der Filme	358
a) Expansive Filme	360
b) Kondensierte Filme	364
c) Gedehte Filme	369
5. Einfluß des Substrates	371
6. Filme von Kettenmolekülen mit Doppelbindung	372
7. Filme von Sterinen und ähnlichen Verbindungen	373
8. Filme von Kohlenhydraten und synthetischen Polymeren	376
9. Filme von anderen Stoffen	377
10. Indicatoröle	377
11. Spreitungsmechanismus, Bewegung in Grenzflächen	378
12. Ultramikroskopische Beobachtung	382
13. Viskosität	382
14. Elektrische Leitfähigkeit	384
15. Verdampfung durch Filme hindurch	384
16. Mischfilme und Wechselwirkung	385
17. Reaktionen der Filme	390

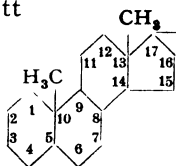
	Seite	
18	Beiträge zu Problemen der Physiologie und Pharmakologie	394
19	Ergebnisse anderer Untersuchungen	398
20	Filme an der Grenze fl/fl	390
21	Filme an der Grenze f/fl	400
II. K-Filme		401
22.	Herstellung und Messung	401
23.	Mechanische Eigenschaften	404
24.	Elektrische Eigenschaften	407
25.	P-Filme (skeleton films)	409
26.	Untersuchungen mit Röntgen- und Elektronenstrahlen	410
	a) Röntgenstrahlen	410
	b) Elektronenstrahlen	412
27.	Restfilme	413
28.	K-Filme als Schutzschichten	413
29.	Wirkung von UV-Licht auf K-Filme	414
30.	Verdampfung von K-Filmen	415
31.	S-Schichten	415
III. Eiweißfilme		415
32.	Untersuchungstechnik	416
33.	Allgemeine Eigenschaften	417
34.	Spreitungsmethoden	418
35.	Das Spreiten	420
36.	Spezielle Eigenschaften	423
	a) F/A - und AV/A -Verhalten	423
	b) Abhängigkeit der Spreitungsfläche vom p_H	427
	c) Spreitungsdauer	432
	d) Dicke der Filme, Molegewichtsbestimmungen	432
	e) Denaturierung	435
	f) Homogenität der Filme	439
	g) Elastizität	440
	h) Kompressibilität	442
	i) Viskosität	442
37.	Spezielle Untersuchungen	444
38.	Mischfilme	445
39.	K-Filme	446
40.	Filme an der Grenze fest/flüssig (S-Schichten)	447
41.	Reaktionen an Filmen	451
42.	Filme an der Grenze fl/fl'	457
43.	Struktur der Filme	458
IV. Ausblick		463
	Literaturverzeichnis	467
Namenverzeichnis		477
Sachverzeichnis		492

Die Chemie der pflanzlichen Herzgifte, Krötengifte, Saponine und Alkaloide der Steroidgruppe.

Von RUDOLF TSCHESCHE, Berlin.

I. Einleitung.

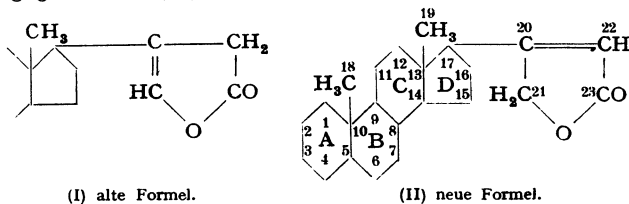
Im Jahre 1936 habe ich in den „Ergebnissen der Physiologie, Biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie (1)“ eine Zusammenfassung aus dem Gebiet der pflanzlichen Herzgiftglykoside, Krötengifte und Saponine der Steroidgruppe (Cholangruppe) gebracht. Die Konstitutionsermittlung dieser Naturstoffe war damals in großen Zügen zum Abschluß gelangt und es hatte sich die chemische Verknüpfung ihrer wichtigsten Vertreter mit den Sterinen und Gallensäuren durchführen lassen. Von dem Steran-Kohlenstoffskelett



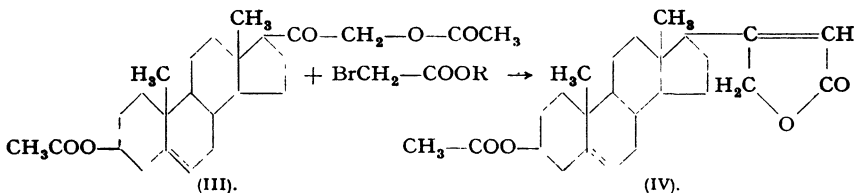
leiten sich diese Verbindungen durch einen spezifischen Aufbau der von C_{17} ausgehenden Seitenkette ab, die in den Herzgiften, Krötengiften und Saponinen jeweils eine andere Anordnung aufweist. Die konstitutionellen Einzelheiten, wie Zahl und Lage der Hydroxylgruppen und Doppelbindungen, sterische Verknüpfung, Anordnung der Zuckergruppen im Molekül und die Beziehungen zwischen Konstitution und Wirkung hatten sich für viele Vertreter befriedigend klären lassen. Seitdem sind einige konstitutionelle Einzelheiten einer geringfügigen Revision unterzogen worden, es ist die Zahl der bekannten Vertreter vergrößert und die Kenntnis der damals noch wenig untersuchten Verbindungen erweitert worden. Ein neuer zusammenfassender Bericht hat daher besonders auf die inzwischen notwendig gewordenen Änderungen einzugehen und daneben das neu gewonnene Tatsachenmaterial zu berücksichtigen.

II. Die Herzgiftaglykone der C₂₃-Reihe.

Bekanntlich sind die pflanzlichen Herzgifte Glykoside, in denen ein Aglykon von meist 23 Kohlenstoffatomen glykosidisch mit Zucker verbunden ist. Das Aglykon enthält das Kohlenstoffgerüst der Sterine und Gallensäuren, und zwar ist die Seitenkette des Cholesterins nach Verkürzung um vier C-Atome in einen ungesättigten Laktoring verwandelt [Formel (I)]. Für die *Lage der Doppelbindung* haben W. A. JACOBS und Mitarbeiter (1) auf Grund chemischer Befunde β,γ -Stellung zur Carboxylgruppe angenommen. Diese Festlegung hat sich auf Grund synthetischer Versuche und durch Vergleich der Ultravioletspektren als unrichtig erwiesen, es ist eine Verlagerung der Doppelbindung in die α,β -Stellung notwendig geworden (II).

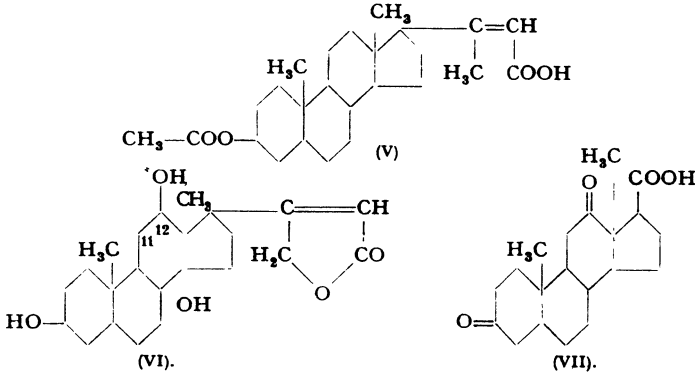


L. RUZICKA und Mitarbeiter (2, 3) haben das Lakton der $\Delta^{5-6, 20-22}$ -3-Acetoxy-21-oxynorcholadiensäure (IV) synthetisch erhalten, indem sie Δ^{5-6} -3,21-Diacetoxypregnenon-20 (III) mit Brom-Essigester und Zink umsetzten. Das neue Lakton enthält den ungesättigten Laktoring der Herzgiftaglykone in der richtigen Weise an das Steroidringsystem geknüpft. Die Feststellung wird erhärtet durch die katalytische Hydrierung, die zu den beiden gesättigten Laktonen führt, die aus Uzarigenin erhalten worden sind. Auf einem ähnlichen Weg sind ELDERFIELD und Mitarbeiter (4) zu demselben Ergebnis gelangt, sie haben ein ungesättigtes Lakton bereitet, dem nur die Hydroxylgruppe und die Doppelbindung im Ringsystem gegenüber dem Lakton von RUZICKA fehlen.



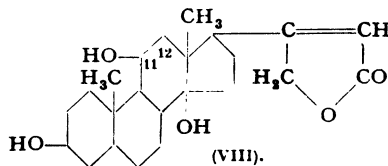
Da bei dem eben beschriebenen Weg eine Verschiebung der Doppelbindung der Seitenkette nicht völlig ausgeschlossen erscheint, wurde von RUZICKA und Mitarbeitern (5) die Synthese noch auf andere Weise verwirklicht. Durch Oxydation der ungesättigten Δ^{20-22} -3-Oxynorcholensäure (V) in Form der Acetylverbindung mit Selendioxyd konnte ebenfalls

ein ungesättigtes Laktone gewonnen werden, dem gegenüber (IV) nur die Doppelbindung im Ring B fehlt. Alle Eigenschaften und Farbenreaktionen der synthetisch gebildeten ungesättigten Laktone stimmen mit denen der natürlich vorkommenden Aglykone überein, auch die UltraviolettabSORption ist identisch. *Die Aglykone sind demnach jetzt als α,β -ungesättigte Laktone zu formulieren.*



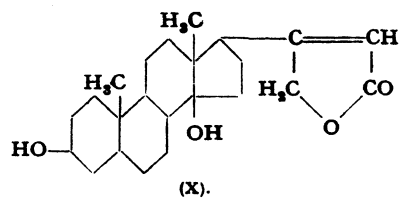
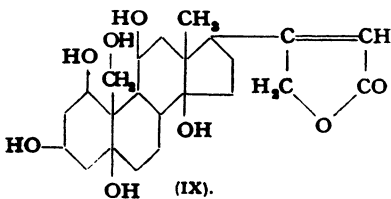
Eine Änderung hat ferner die Formel des *Digoxygenins* $C_{23}H_{34}O_5$ erfahren müssen, in der bisher die OH-Gruppen an C_3 , C_{11} und C_{14} angenommen wurden. Durch einen neuen Abbau von der Seitenkette her konnten STEIGER und REICHSTEIN (6) sowie MASON und HOEHN (7) nachweisen, daß die eine der Hydroxylgruppen nicht an C_{11} , sondern an C_{12} ihren Platz hat (VI). Durch Oxydation des Digoxygeninacetats mit Permanganat stellten die Autoren 3,12-Diketo-ätiocolensäure her (VII). Bei der katalytischen Hydrierung entstand ein Gemisch von Säuren, aus dem 12-*epi*-Ätiocolensäure erhalten werden konnte, die auch aus Desoxycholsäure zugänglich ist.

Von der Verlegung der Hydroxylgruppe im Ring C des Digoxygenins von C_{11} nach C_{12} wird die Konstitution des bisher als isomer angenommenen *Sarmentogenins* nur insofern berührt, als die Annahme einer verschiedenen sterischen Anordnung am C-Atom 9 in beiden Aglykonen überflüssig wird. Sarmentogenin behält daher vorerst seine zweite sekundäre Hydroxylgruppe an C_{11} (VIII); die Gewinnung desselben Dehydrolaktons $C_{23}H_{34}O_2$ aus Digoxygenin und Sarmentogenin ist durch die Ausbildung der Doppelbindung von C_{11} nach C_{12} bei der Wasserabspaltung zu erklären.

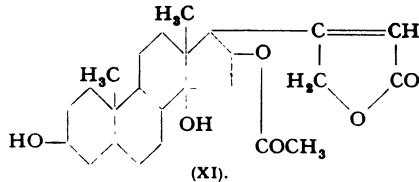


Convallatoxinogenin, das Genin des Convallatoxins ist sehr wahrscheinlich mit Strophanthidin identisch, da das früher durch Spaltung des Glykosids erhaltene Benzoat des Anhydro-convallatoxinogenins sich mit dem Benzoat des Anhydro-strophanthidins als identisch erwiesen hat [FIESER und Mitarbeiter (8)]. Ein besonderes Aglykon Convallatoxinogenin besteht sehr wahrscheinlich nicht.

Einen weiteren Fortschritt hat die Chemie des *Ouabagenins* $C_{23}H_{34}O_8$ (*g*-Strophanthidin) durch die Arbeiten von MANNICH und SIEWERT (9) erfahren. Es gelang zum ersten Male, das Genin selbst aus dem Glykosid Ouabain zu erhalten, während bisher nur eine Anhydroverbindung bekannt war, die auch noch ein C-Atom weniger als das eigentliche Aglykon enthielt. Die mit wäßrigen oder alkoholischen Säuren nur schwierig durchführbare Abspaltung des Zuckers verläuft mit Aceton-Salzsäure sehr leicht und liefert das Ouabagenin in Form einer Acetonverbindung, die in das Genin und Aceton zerlegbar ist. MANNICH bevorzugt jetzt für Ouabagenin die Formel (IX), für deren Aufstellung folgende Überlegungen maßgebend sind: Ouabagenin wird nicht wesentlich von Bleitetraacetat angegriffen, es können also in ihm nicht zwei Hydroxylgruppen in Glykolstellung vorhanden sein. Von den sechs OH-Gruppen sind vier acylierbar, sie sind also primär oder sekundär gebunden. Im Aceton-ouabagenin sind nur noch zwei Hydroxylgruppen veresterbar, zwei acylierbare Hydroxyle sind durch die Acetonbindung geschützt worden. Da in Analogie zu anderen Herzgiften der Zucker sehr wahrscheinlich an eine OH-Gruppe an C_3 geknüpft ist und bei der Aceton-Salzsäure-Spaltung durch Aceton ersetzt wird, wobei gleichzeitig noch eine weitere, vermutlich in 1,3-Stellung zu ihr befindliche acylierbare Hydroxylgruppe für die Acetonbindung verbraucht wird, bleibt als Haftstelle dieser anderen Hydroxylgruppe C_1 übrig. Die Besetzung von C_{14} mit einer tertiären OH-Gruppe wird durch die Gewinnung einer Isoverbindung mit der Laktongruppierung der Seitenkette notwendig. Die CH_2OH -Gruppierung an C_{10} war schon früher wahrscheinlich gemacht worden und wird jetzt weiter durch Dehydrierung mit Platin und Sauerstoff zu einer Aldehydgruppe gestützt. Für die Verlegung der letzten beiden Hydroxyle an C_5 und C_{11} war neben der zu erfüllenden Forderung der Abwesenheit einer Glykolgruppierung im Molekül, diese Stellung von OH-Gruppen in verschiedenen Geninen der Strophanthusarten maß-



gebend. Es wird weiterer Untersuchungen bedürfen, die neue Formel des Ouabagenins zu sichern.

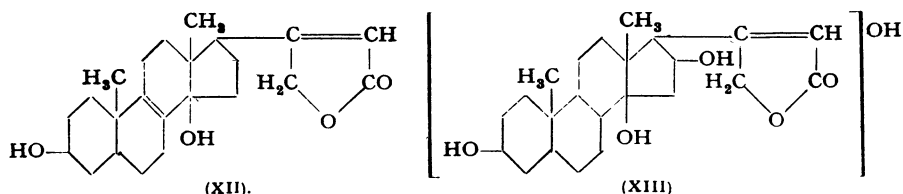


Außer diesen Berichtigungen bei bisher schon bekannten Herzgift-aglykonen sind einige neue Vertreter dieser Stoffklasse bekannt geworden. Im *Cerberin*, dem Herzgift aus *Cerbera Odollam*, fand T. MATSUBARA (10) ein neues Genin, *Cerberigenin* $C_{23}H_{34}O_4$, das bisher aber nur als Anhydroverbindung erhalten werden konnte. Cerberigenin ist isomer mit Uzari-genin, Digitoxigenin und Thevetogenin (X) und enthält sehr wahrscheinlich die beiden Hydroxyle an gleicher Stelle wie die genannten Isomeren. Anhydrocerberigenin liefert eine schwer lösliche Additionsverbindung mit Digitonin, hat also wohl eine sekundäre Hydroxylgruppe an C_3 in β -Konfiguration. Das Glykosid Cerberin gibt mit Alkali eine Isoverbin-dung, so daß eine Hydroxylgruppe an C_{14} zu vermuten ist. Die von MATSUBARA angestellten Versuche, Abwandlungsprodukte zu erhalten, die mit solchen anderer Aglykone identisch sind, haben noch zu keinem Erfolg geführt.

Einige neue Aglykone sind bei der Untersuchung der Herzgifte aus *Nerium oleander* bekannt geworden (11, 12, 13). Das Hauptglykosid *Oleandrin* liefert bei der Spaltung *Oleandrigenin*, das sich als 16-Acetylgi-toxigenin herausstellte (XI). Aus dem Nebenglykosid des Oleandrins, dem *Neriantin* (17), wurde *Neriantogenin* $C_{23}H_{32}O_4$ erhalten, das sich bei der Behandlung mit starker Salzsäure in Dianhydro-gitoxigenin umwandeln ließ. Neriantin ist nicht herzwirksam und hat außer der in der Seitenkette gelegenen eine weitere hydrierbare Doppelbindung im Ringsystem, ver-mutlich von C_{14} ausgehend. Die zweite Hydroxylgruppe befindet sich vielleicht im Ring D, und zwar an C_{16} . Nun ist aber Acetylanhy-dro-oleandrigenin nicht mit Acetyl-neriantogenin identisch, so daß die OH-Gruppe an C_{16} im Neriantogenin möglicherweise sterisch anders angeordnet ist als im Gitoxigenin. Die physiologische Unwirksamkeit des Neriantins wird wahrscheinlich durch das fehlen der OH-Gruppe an C_{14} bedingt.

Ein weiteres Nebenglykosid des Oleandrins, ebenfalls ohne Herz-wirksamkeit, ist das *Adynerin* (11). Bei der Hydrolyse liefert es *Adyneri-genin* $C_{23}H_{32}O_4$, das außer in der Laktontseitenkette auch noch im Kern eine, und zwar sehr schwer hydrierbare Doppelbindung enthält. TSCHESCHE und BOHLE (14, 15) haben aus Acetyl-anhydro-adynerigenin durch

energisches katalytische Hydrierung in Gegenwart von Salzsäure Acetyl-tetrahydro-anhydro-digitoxigenin erhalten und so die Verknüpfung mit einem anderen Genin der Herzgiftgruppe durchgeführt. Für Adynerigenin wird die Formel (XII) bevorzugt, die die schwer hydrierbare Doppelbindung zwischen C₈ und C₉ enthält; auf sie wird auch die Herzwirksamkeit des Adynerins zurückgeführt.



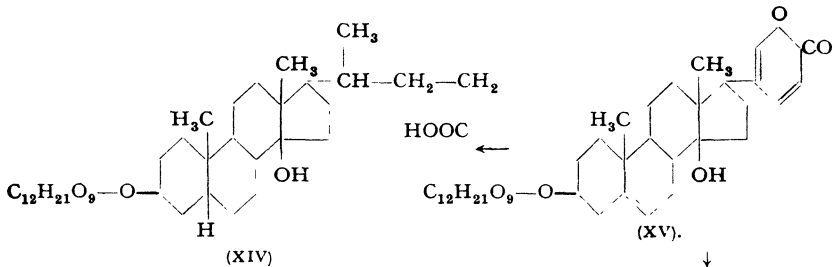
Ein Aglykon der Herzgiftgruppe mit 23 C-Atomen ist auch das *Calotropagenin* C₂₃H₃₄O₆, das in Form einer Anhydroverbindung aus verschiedenen Herzgiften von *Calotropis procera* durch HESSE und Mitarbeiter (16, 17) erhalten wurde. Eine Verknüpfung dieses Aglykons mit einem anderen Vertreter der gleichen Stoffklasse ist bisher nicht erreicht worden. Analogiegründe haben zur Aufstellung der vorläufigen Formel (XIII) geführt.

Mit der Konstitution der *Alloaglykone* haben sich BLOCH und ELDERFIELD (18) befaßt. Bekanntlich finden sich in einigen herzgifteführenden Pflanzen gleichzeitig Enzyme, die eine Isomerisierung der Glykoside im Geninanteil bewirken, wodurch auch die Herzwirksamkeit zum Verschwinden kommt. Durch Vergleich von Strophanthidin und des isomerisierten Allostrophanthidins konnten die Verfasser zeigen, daß Aufhebung der Asymmetriezentren an C₃ und C₅ nicht zu identischen Derivaten führt. Die Isomerisierung muß also an anderer Stelle im Molekül erfolgt sein, es wird vermutet an C₁₄ oder an C₁₇. Da aber schon J. D. LAMB und S. SMITH (19) aus *Emicymarin* und *Alloemicymarin* bei energischer Hydrolyse zwei verschiedene Trianhydrogenine erhalten haben, in denen alle Hydroxylgruppen abgespalten sind und so auch eine Isomerie an C₁₄ aufgehoben sein muß, bleibt die Vermutung einer Isomerisierung an C₁₇ für die Allogeneine die vorerst wahrscheinlichste Formulierung (15).

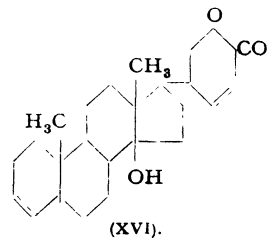
III. Die Herzgiftaglykone der C₂₄-Reihe.

Neben den Herzgiftglykosiden, deren Aglykone 23 C-Atome aufweisen, sind auch einige Vertreter mit 24 C-Atomen bekannt geworden, deren bisher wichtigster Vertreter das *Scillaren-A* ist. Für dessen Genin hatten A. STOLL und Mitarbeiter (20) früher eine Formel aufgestellt, in der als Haftstelle für den Zuckerrest eine Hydroxylgruppe an C-Atom 5 angenommen wurde. Diese Anordnung, gegen die schon früher von mir

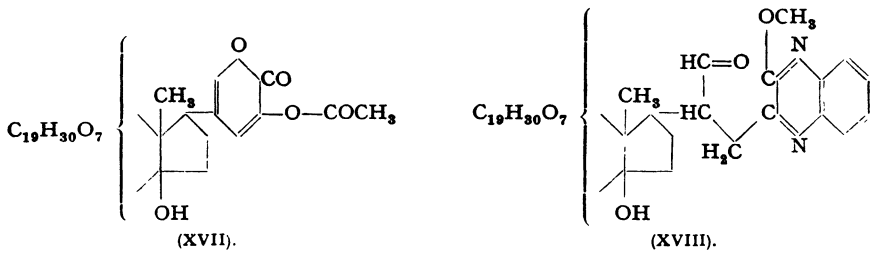
Bedenken geäußert worden sind (1), ist neuerdings von A. STOLL und J. RENZ (21) geändert worden, und zwar dahingehend, daß auch im Scillaren-A der Zucker an eine Hydroxylgruppe an C₃ gebunden ist. Es gelang ihnen, die Formel (XV) für dieses Glykosid auf folgendem Wege zu sichern: Ausgehend vom Glykosid selbst, haben sie durch Hydrierung und Absättigung von drei Doppelbindungen die Hexahydro-desoxy-scillaren-A-säure (XIV) bereitet, die bei der Hydrolyse mit absoluter alkoholischer Salzsäure unter Abspaltung des Zuckers und der an C₁₄ stehenden OH-Gruppe eine ungesättigte Säure ergab, die aber nicht kristallisiert erhalten werden konnte. Bei der Weiterhydrierung entstand ein Gemisch von Säuren, aus denen sich über den Methyl ester *Epi*-allolithocholsäure isolieren ließ. Damit ist bewiesen, daß die den Zucker tragende Hydroxylgruppe am C₃ des Ringsystems sitzt, wie bei allen anderen Aglykonen, und daß sie β -Konfiguration hat. Ferner ist jetzt kein Zweifel mehr möglich, daß das Aglykon des Scillaren-A 24 C-Atome aufweist. Für das aus dem Scillaren-A bei der Hydrolyse entstehende Scillaridin, das gegenüber dem eigentlichen Aglykon eine Hydroxylgruppe verloren hat, ergibt sich nun die Formel (XVI).



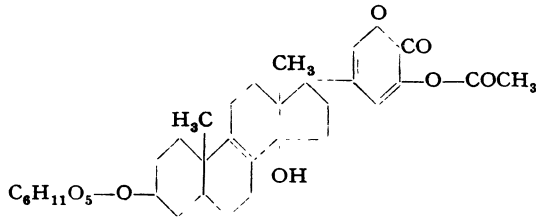
Während das Scillaren-A aus der weißen Meerzwiebel stammt, haben A. STOLL und J. RENZ (22, 23) aus der roten Varietät, die als Rattengift dient, ein neues Glykosid isoliert, das sie *Scillirosid* nennen. Scillirosid hat die Zusammensetzung C₃₂H₄₄O₁₂ und gibt wie Scillaren die LEGALSche Probe nicht. Die Spaltung hat noch nicht zu einem kristallisierten Aglykon geführt. Die bisherige Untersuchung ergibt die Teilformel (XVI), die den gleichen ungesättigten Laktonring wie im Scillaren-A aufweist. Damit ist auch die große Übereinstimmung der Absorptionsspektren von Scillirosid und Scillaren-A in Einklang. Eine neue Besonderheit zeigt das Scillirosid im Auftreten einer acetylierten Enolgruppe im Laktonring, die durch verschiedene Abbaumethoden und besonders



durch die Gewinnung eines Chinoxalinderivats sehr wahrscheinlich gemacht wird (XVIII). Außerdem scheint im Ringsystem noch eine weitere sehr schwer hydrierbare Doppelbindung vorhanden zu sein, für die die Stellungen $\Delta 7-8$, $\Delta 8-9$ und $\Delta 9-11$ in Betracht kommen. Neben der vermutlich an C_3 stehenden Hydroxylgruppe, die die Verknüpfung mit dem Zuckerrest besorgt, ist noch eine weitere OH-Gruppe vorhanden, die an C_{14} sitzend zur Bildung von Isoverbindungen Anlaß gibt, entsprechend dem Verhalten anderer Herzgifte. Schließlich kommt noch eine dritte OH-Gruppe vor, die vermutlich sekundärer Natur ist, aber bisher nicht acyliert werden konnte.



Nachtrag: Nach Abfassung des Manuskriptes erschien von A. STOLL, J. RENZ und A. HELFENSTEIN [Helv. chim. Acta 26, 648 (1943)] eine weitere Arbeit über Scillirosid, in der nachstehende Formel für dieses Herzgift wahrscheinlich gemacht wird:



IV. Die Glykoside.

In die nachfolgende Tabelle 1 sind nur diejenigen Glykoside aufgenommen worden, bei denen gegenüber der Tabelle der 1. Zusammenfassung (1) Änderungen eingetreten sind und solche, die seitdem neu aufgefunden wurden.

In der in Chloroform löslichen Fraktion der Herzgifte von *Adonis vernalis* ist von T. REICHSTEIN und H. ROSENMUND (28) *Cymar* aufgefunden worden. In der Rinde, zum Teil auch in den Blättern und Blüten einiger Arten von *Magnoliaceen* haben R. JARETZKY und W. LIER (29) Herzgifte nachgewiesen. *Convallamarin* aus *Convallaria majalis* ist von W. VOSS und G. VOGT (30) untersucht worden; das Glykosid

Tabelle I.

Nr.	Name	Formel	Herkunft	Nr.	Aglykon, bzw. erhaltenes Spaltprodukt	Formel	Zucker
1	Somalin ²⁴	$C_{30}H_{46}O_7$	<i>Adenium somalense</i>	1	Digitoxigenin	$C_{23}H_{34}O_4$	Cymarose
2	Cerberin ¹⁰	$C_{29}H_{44}O_8$	Samen von <i>Cerbera Odollam</i>	2	Cerberigenin	$C_{23}H_{34}O_4$	Cerberose
3	Oleandrin ^{11, 12, 13}	$C_{32}H_{46}O_9$	Blätter von <i>Nerium oleander</i>	3	Oleandrigenin	$C_{23}H_{32}O_4$ (CH_3-CO)	Oleandrose
4	Desacetyl-oleandrin ¹¹	$C_{30}H_{46}O_8$	Blätter von <i>Nerium oleander</i>	4	Gitoxigenin	$C_{23}H_{34}O_4$	Oleandrose
5	Adynerin ¹¹	$C_{30}H_{44}O_7$	Blätter von <i>Nerium oleander</i>	5	Adynerigenin	$C_{23}H_{32}O_4$	Oleandrose (?)
6	Neriantin ¹⁴	$C_{29}H_{42}O_8$	Blätter von <i>Nerium oleander</i>	6	Neriantogenin	$C_{23}H_{32}O_4$	Glukose
7	Origidin ²⁵	$C_{33}H_{54}O_{13}$	Blätter von <i>Digitalis orientalis</i>	7	Dianhydrodigitoxigenin	$C_{23}H_{30}O_3$	Glukose und ein Zucker $C_6H_{11}O_4$
8	Convallatoxin ⁸	$C_{29}H_{42}O_{10}$	Blätter und Blüten von <i>Convallaria majalis</i>	8	Anhydrostrophanthidin	$C_{23}H_{30}O_5$	Rhamnose
9	Periplocin ²⁶	$C_{38}H_{56}O_{13}$	Stengel und Rinde von <i>Periploca graeca</i>	9	Periplogenin	$C_{23}H_{34}O_5$	Cymarose, Glukose
10	k-Strophanthosid ²⁷ ..	$C_{48}H_{64}O_{19}$	Samen von <i>Strophanthus combéto</i>	10	Strophanthidin	$C_{23}H_{32}O_6$	Cymarose und 2 Mol. Glukose
11	Calotropin ¹⁶	$C_{29}H_{40}O_9$	Blätter	11	Anhydrocalotropagenin	$C_{23}H_{32}O_6$	Methylreduktinsäure
12	Calotoxin ¹⁷	$C_{29}H_{40}O_{10}$	Milchsaft von <i>Calotropis procera</i>	12	Anhydrocalotropagenin	$C_{23}H_{32}O_6$	Oxymethylreduktinsäure
13	Uscharin ¹⁷	$C_{31}H_{41}O_8NS$	Milchsaft	13	Anhydrocalotropagenin	$C_{23}H_{32}O_6$	Isomeres der Methylreduktinsäure (?) ; liefert ferner NH_3 und einen flüchtigen S-haltigen Stoff
14	Scillirosid ^{122, 23}	$C_{32}H_{44}O_{12}$	Rote Varietät von <i>Scilla maritima</i> L	14	Quabagenin	$C_{23}H_{34}O_8$	Rhamndose
15	Quabain ⁹	$C_{20}H_{44}O_{12}$	Samen und Rinde von <i>Strophanthus gratus</i>	15			

ist nicht herzwirksam, über die Zugehörigkeit des Aglykons zur Steroidgruppe ist nichts bekannt. Weiter haben sich die herzwirksamen Alkaloide verschiedener Erythrophleumarten als nicht zur Steroidgruppe zugehörig erwiesen, so geben *Cassain* und *Coumingidin* (31, 32) bei der Selendehydrierung nicht Methylcyclopentenophenanthren, sondern 1,7,8-Trimethylphenanthren.

Einen weiteren Einblick in den Aufbau der herzwirksamen Glykoside haben die enzymatischen Untersuchungen von A. STOLL und J. RENZ (33) gebracht. Sie haben die Wirkungsweise einiger Enzyme, die in herzgifteführenden Pflanzen vorkommen, näher untersucht, wie *Strophanthobiase*, *Scillarenase*, *Digilanidase* und *Digipurpidase*, zugleich mit dem Verhalten von α -Glucosidase aus Hefe und von β -Glucosidase (Emulsin). Die Wirkungsweise dieser Enzyme gegen verschiedene Substrate gibt die folgende Tabelle 2 von A. STOLL wieder.

Tabelle 2

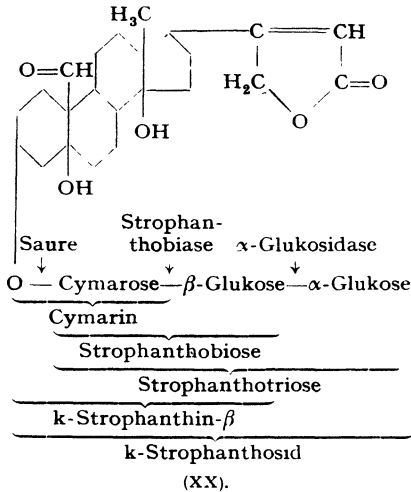
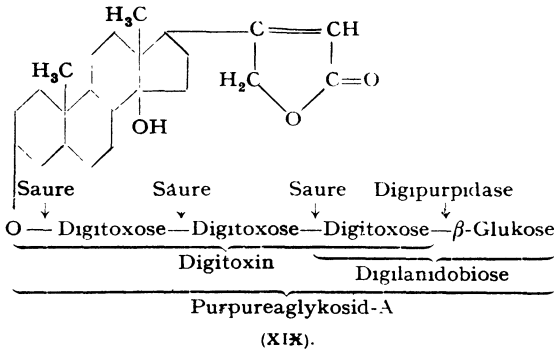
Substrat	Strophanthobiase	Scillarenase	Digilanidase Digi- purpidase	α -Glucosidase	β -Glucosidase
k-Strophanthosid	—	—	—	++	—
k-Strophanthin- β	++	+	+	—	—
Periplocin	++	—	—	—	—
Scillaren-A	+	++	+	—	—
Lanataglykoside A, B und C	—	—	++	—	—
Purpureaglykoside A und B	—	—	++	—	—
Strophanthotriose	—	—	—	++	—
Strophanthobiose	—	—	—	—	+
Digilanidobiose	—	—	—	—	++
Scillabiose	—	—	—	—	++

++ rasche Spaltung, + langsame Spaltung, — keine Spaltung.

Es zeigt sich also, daß die eigentlichen Herzgiftenzyme ihre Wirksamkeit nur so lange entfalten, wie das Aglykon noch an der Zuckerkette haftet. Die abgespaltenen Biosen und Triosen werden nicht mehr angegriffen. Andererseits wirken α - und β -Glucosidasen nicht auf die Glykoside ein, eine Ausnahme bildet nur das k-Strophanthosid bzw. Strophanthotriose, aus dem α -Glucosidase den endständigen Glucoserest abzutrennen vermag. Weiter ist ein Austausch der für die Enzyme spezifischen Glykoside nicht immer möglich.

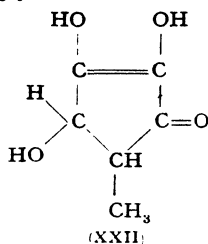
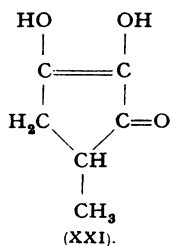
Durch die Einwirkung der Enzyme α -Glucosidase und β -Glucosidase auf die freien Biosen und Triosen konnte die α - bzw. β -glucosidische Verknüpfung der Zucker in der Kette ermittelt werden. Bis auf den endständigen Glucoserest im k-Strophanthosid, der α -glucosidisch gebunden ist, herrscht die β -glucosidische Verknüpfung vor. Wie die Spal-

tung des k-Strophanthin- β durch Strophanthobiase zeigt, ist dieses Enzym auf β -glucosidische Bindungen eingestellt, das gleiche gilt auch für die anderen glykosidspaltenden Enzyme der Herzgiftdrogen. Enzyme, die die Bindung zwischen Aglykon und Zuckerkette lösen, sind bisher nicht aufgefunden worden. Die beiden nachfolgenden Formeln (XIX) und (XX) geben das Verhalten von Purpureaglykosid A und k-Strophanthosid gegen Säuren und Enzyme wieder:



Einen ganz neuen Typ herzwirksamer Verbindungen stellen die Herzgifte *Calotropin*, *Calotoxin* und *Ucharin* aus *Calotropis procera* dar. Im *Calotropin* wird nach HESSE und Mitarbeitern (16, 17) der Zucker durch Methylreduktinsäure (XXI) vertreten, indem ein enolisches Hydroxyl dieser Säure mit der OH-Gruppe an C₃ des Calotropagenins verbunden ist. Im *Calotoxin* ist die Methylreduktinsäure durch Oxymethylreduktinsäure (XXII) ersetzt (in der angegebenen Formel ist die Stellung der

OH-Gruppe willkürlich gewählt). Komplizierter ist das Uscharin gebaut, das auch noch Stickstoff und Schwefel enthält. Bei der Hydrolyse liefert es Ammoniak und eine flüchtige S-haltige Verbindung, die noch nicht identifiziert werden konnte; weiter wird eine der Methylreduktinsäure nahestehende, aber nicht mit ihr identische Verbindung gebildet. Calotoxin und Uscharin enthalten als Aglykon ebenfalls Calotropagenin.



V. Die Krötengifte.

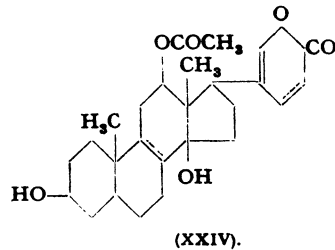
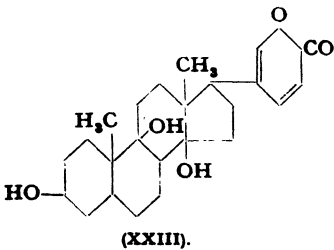
Die den pflanzlichen Herzgiften in der physiologischen Wirkung wie im chemischen Aufbau sehr nahe verwandten Krötengifte haben in den letzten Jahren ebenfalls weitere Untersuchung erfahren. Leider hat sich die Absicht, ein *Bufotalin* oder *Bufagin* mit einem bekannten Steroidderivat zu verknüpfen, bisher nicht verwirklichen lassen. Möglicherweise liegen bei den Krötengiften stereochemisch anders geartete Verhältnisse als bei den anderen Steroiden vor, die eine Überführung in bekannte Derivate erschweren. Von den bekanntgewordenen Geninen der Krötengifte ist die Individualität nur bei einem Teil gesichert; die nachfolgende Tabelle 3 vermittelt eine Übersicht über diese vermutlich einheitlichen Verbindungen.

Tabelle 3

Name	Formel	*Schmelzpunkt	Herkunft	
Bufotalin ³⁴	C ₂₄ H ₃₃ O ₅ (CH ₃ CO)	F. 224°	} <i>Bufo vulgaris</i>	
Bufotalinin ³⁵	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	F. 233°		
Bufotalidin ³⁵	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	F. 228°		
Bufalin ³⁶	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	F. 235—236°		
Cinobufagin ^{37, 38, 40}	C ₂₄ H ₃₁ O ₅ (CH ₃ CO)	F. 212—213°	} aus <i>Ch'an Su</i>	
Cinobufotalidin ⁴¹	C ₂₄ H ₃₄ O ₆	F. 217°		
Cinobufotalin ³⁸	C ₂₄ H ₃₃ O ₆ (CH ₃ CO)	F. 248—249°		
Gamabufotalin ^{39, 46, 49} (Gamabufogenin)	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	F. 262°		
F ₃ -Bufotalin ⁴³	C ₂₄ H ₃₂ O ₅	F. 243—245°		
Pseudodesacetyl- bufotalin ^{42, 44, 45, 47}	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	amorph		
Marinobufagin ⁴⁰	C ₂₄ H ₃₂ O ₅	F. 213°		} <i>Bufo marinus</i>
Arenobufogenin ³⁴	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	F. 252°		
Arenobufagin	C ₂₄ H ₃₃ O ₅ (CH ₃ CO)	F. 220°		} <i>Bufo arenarum</i>
Arenobufagin	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	F. 232°		

Aus der chinesischen Droge *Ch'an Su* oder *Senso* sind bisher sieben verschiedene Krötengifte isoliert worden, die aber nicht alle zugleich von den einzelnen Bearbeitern erhalten werden konnten. So wird von Y. KOBAYASHI (45) Pseudodesacetyl-bufotalin als der Hauptbestandteil des *Senso* bezeichnet, während M. KOTAKE und K. KUWADA (38) diese Verbindung überhaupt nicht auffinden konnten. Die schwierige Trennung der nebeneinander vorkommenden Giftstoffe hat ihre Reinigung sehr erschwert und ist oft erst nach Anwendung der neueren Adsorptionsmethoden möglich geworden. Die Verwirrung auf dem Gebiete der Krötengifte wird weiter durch die bedauerliche Tatsache vermehrt, daß die Bezeichnungweise nicht immer einheitlich ist; so wird derselbe Stoff einmal als Bufagin, dann als Bufotalin oder auch als Bufogenin bezeichnet. Vielleicht sind die Unterschiede in den Ergebnissen am *Ch'an Su* auch in Änderungen der Drogenzusammensetzung zu suchen, zu deren Herstellung vielleicht verschiedene Krötenarten herangezogen werden.

Für das *Pseudo-desacetyl-bufotalin* (früher als Pseudobufotalin bezeichnet) wird jetzt von S. OHNO (47) die Formel (XXIII) aufgestellt. IKAWA (48) hatte sich früher für eine Formulierung entschieden, die einen Laktonfünfring ohne Doppelbindung in der Seitenkette enthält (siehe I. Zusammenfassung); diese Anordnung hat sich nicht bestätigen lassen. S. OHNO hat Acetyl-pseudo-desacetyl-bufotalin mit Kaliumpermanganat oxydiert, analog einem Verfahren von STEIGER und REICHSTEIN (6), mit dessen Hilfe der ungesättigte Laktonfünfring des Digoxygenins direkt zu Derivaten der Ätiocholansäure abgebaut werden kann. Er erhielt so das Derivat einer Ätiocholansäure, die vorläufig als Pseudo-ätiocholansäure bezeichnet wird. Diese enthält noch die Hydroxyle im Ringsystem, so daß ein Vergleich mit Ätio- oder Allo-ätiocholansäure vorerst noch nicht möglich ist. Jedoch zeigt dieser Abbau, daß auch das Pseudo-desacetyl-bufotalin einen ungesättigten Laktonsechsring in der Seitenkette enthält.

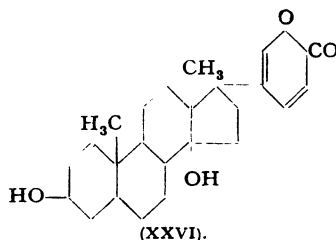
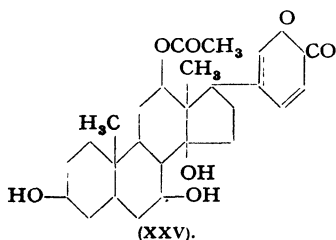


Für einige dieser Krötengifte, so für Cinobufagin und Marinobufagin, ist auf Grund der Ergebnisse der Selendehydrierung das Steroidkohlen-

stoffgerüst und durch Messung der Ultraviolettaborption auch für Gama- und Arenobufogenin der zweifach ungesättigte Laktoring der Seitenkette sicher, dagegen bleiben die Stellung der OH-Gruppen, bzw. die Anordnung einer unter Umständen vorhandenen zusätzlichen Doppelbindung noch ungewiß und bedürfen für ihre Festlegung weiterer experimenteller Sicherungen. Die Unterbringung dieser Gruppen in den erwähnten Krötengiften aus *Ch'an Su* beruht zur Zeit noch auf Analogieschlüssen und Farbreaktionen, die zur Feststellung der Konstitution nicht ausreichend sind.

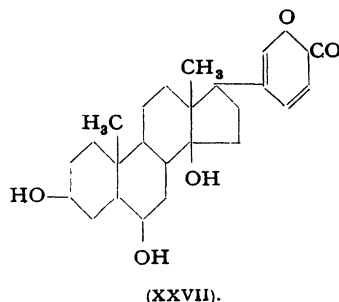
So waren für die Aufstellung der Formel des Cinobufagins durch KOTAKE und KUWADA (39) folgende Argumente maßgebend. Cinobufagin ist zu einer Trioxyverbindung verseifbar, die zu einem Diketon oxydierbar ist. Zwei der Hydroxyle müssen also sekundär gebunden sein. Nun läßt sich aber das durch Abspaltung der Acetylgruppe freigelegte Hydroxyl nicht wieder acylieren, eine Tatsache, die auf eine Hydroxylgruppe an C₁₁ oder C₁₂ hinweist.* Weiter gibt das Cinobufagin die Reaktion nach HAMMARSTEN. Für den positiven Ausfall dieser Farbreaktion ist, wie durch eine größere Anzahl von Beispielen festgestellt wurde, das Vorliegen einer Hydroxylgruppe an C₃ und C₁₂, einer Doppelbindung zwischen C₇—C₈ oder C₈—C₉ oder eine OH-Gruppe an C₇ des Ringsystems notwendig. Da Cinobufagin auch nicht mit Benzopersäure oder Brom reagiert, nimmt KOTAKE die ringständige Doppelbindung zwischen C₈—C₉ an. So ist Formel (XXIV) zur Zeit der einleuchtendste Ausdruck für das Verhalten des Cinobufagins. Bedenken muß die Verlegung der Doppelbindung nach C₈—C₉ erwecken, da sie an dieser Stelle schwer hydrierbar sein müßte, analog wie im Adynerigenin und Scillirosid, sie ist aber leicht durch Wasserstoff abzusättigen.

Dem *Cinobufotalin* wird von KOTAKE und KUWADA (39) die Formel (XXV) gegeben, während das Bufalin nach KOTAKE und KUWADA (36) die Formel (XXVI) haben soll, nach KONDO und OHNO (49) hat *Gamabufogenin* die Formel (XXVII).



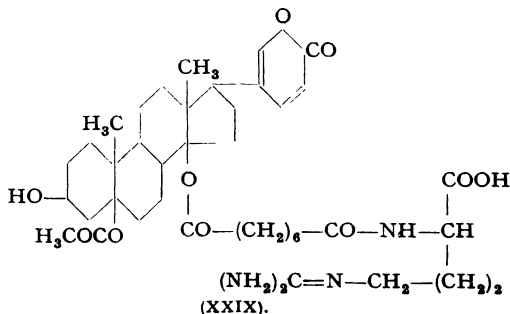
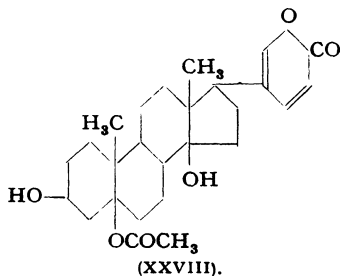
* Die zweite acylierbare OH-Gruppe wird wie in allen anderen Steroiden an C₃ untergebracht.

Wesentlich besser in bezug auf die Einzelheiten der Konstitution fundiert ist das *Bufotalin* der europäischen Kröte, über das H. WIELAND und H. BEHRINGER (34) eine weitere Arbeit veröffentlicht haben. Die in der 1. Zusammenfassung gebrachte Formel ist jetzt dahin geändert worden, daß die bisher an C₉ erscheinende acetylierte tertiäre Hydroxylgruppe an C₅ verlegt worden ist (XXVIII). Weiter wurde die Stellung



der sekundären OH-Gruppe an C₃ im Ring A durch Öffnung dieses Ringes unter Bildung einer Dicarbonsäure gesichert, da aus ihr ein Brenzketon erhalten werden konnte.* Die Aufspaltung des Ringes wurde am Bufotalen (Doppelbindung vermutlich C₃—C₄) durchgeführt, und zwar in der Weise, daß erst mit OsO₄ ein Glykol bereitet wurde, das dann zur Dicarbonsäure aufoxydiert werden konnte.

Für die Stellung der acetylierten OH-Gruppe im Bufotalin sind jetzt folgende Befunde maßgebend: α -Tetrahydrobufotalin läßt sich mit Alkali zu einer Oxysäure aufspalten; dabei wird gleichzeitig die Acetylgruppe verseift. Beim Erhitzen auf 150° liefert die Oxysäure ein Laktone zurück, das bei der vorsichtigen Oxydation nur ein Monoketon ergibt. Die bei der Verseifung freigelegte Hydroxylgruppe muß tertiär gewesen sein, da die oxydierte Gruppe nur das am C₃ stehende OH gewesen sein kann. Da die Stellung C₁₄ schon durch eine tertiäre OH-Gruppe besetzt ist, die zur Bildung von Isogruppierungen Anlaß gibt, bleibt für die acetylierte Hydroxylgruppe nur die Stellung C₅, C₈ oder C₉ übrig. Nun führt aber die Abspaltung dieser OH-Gruppe zur Entstehung einer Doppelbindung, die leicht hydrierbar ist. Da eine Doppelbindung von C₈ oder C₉ ausgehend stets schwer absättigbar sein müßte, bleibt eine Ver-



* Brenzketone geben nur solche Dicarbonsäuren, die durch Aufspaltung des Ringes A entstanden sind.

legung der acetylierten Hydroxylgruppe an C₅ vorerst der beste Ausdruck, um das vorliegende Tatsachenmaterial in Einklang zu bringen.

Bekanntlich kommen neben den Bufaginen oder Bufotalinen in den Krötensekreten noch die sog. *Bufotoxine* vor, in denen erstere mit Suberylarginin verbunden sind. Für die Haftstelle des Suberylargininrestes haben WIELAND und BEHRINGER (34) jetzt die Hydroxylgruppe an C₁₄ ermittelt. Es zeigt sich nämlich, daß Bufotoxin zu einem Keton Bufotoxinon oxydierbar ist, in dem nur die Hydroxylgruppe an C₃ des Bufotalins oxydiert worden sein kann. Diese OH-Gruppe scheidet daher mit Sicherheit jetzt als Haftstelle des Suberylargininrestes aus. Da Bufotoxin nach seinen Eigenschaften auch den zweifach ungesättigten Laktonsechsring enthalten muß, bleibt nur das tertiäre Hydroxyl an C₁₄ als Verknüpfungsort übrig. Dem Bufotoxin kommt daher die Formel (XXIX) zu.

VI. Die Sapogenine der Steroidgruppe.

In der Gruppe der Saponine werden zwei große Klassen von Verbindungen glykosidischer Natur unterschieden, die Saponine der Steroidgruppe und die der Triterpenoide. Nur von der ersteren soll im Rahmen dieser Arbeit berichtet werden. In den letzten Jahren hat ihre Untersuchung so große Fortschritte besonders durch die Arbeiten von MARKER und Mitarbeitern gemacht, daß gewisse konstitutionelle Unsicherheiten, die während der ersten Zusammenfassung (1) noch bestanden, jetzt behoben sind. Auch eine Reihe von neuen Vertretern dieser Stoffklasse ist bekanntgeworden. Bisher werden folgende Aglykone unterschieden:

Mit stabiler Konfiguration der Seitenkette:

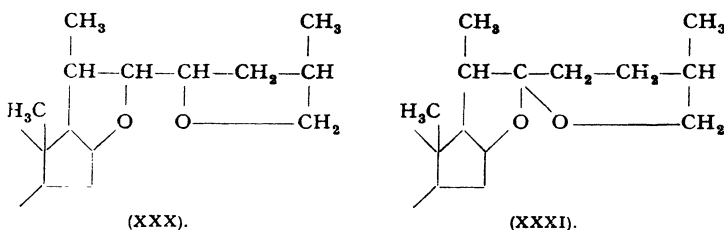
Tigogenin	C ₂₇ H ₄₄ O ₃ , OH an C ₃ (β-Konfig.)	Ring A und B trans
Gitogenin	C ₂₇ H ₄₄ O ₄ , OH „ C ₂ , C ₃ (β)	„ „ „ „ „
Digitogenin	C ₂₇ H ₄₄ O ₅ , OH „ C ₂ , C ₃ , C ₆	„ „ „ „ „
Chlorogenin	C ₂₇ H ₄₄ O ₄ , OH „ C ₃ (β), C ₆	„ „ „ „ „
Liligenin	C ₂₇ H ₄₄ O ₄ , OH „ C ₂ , C ₃ isomer mit Gitogenin	
Diosgenin	C ₂₇ H ₄₂ O ₃ , OH „ C ₃ (β) Doppelbindung C ₅ —C ₆	
Smilagenin	C ₂₇ H ₄₄ O ₃ , OH „ C ₃ (β) Ring A und B cis	

mit labiler Konfiguration der Seitenkette:

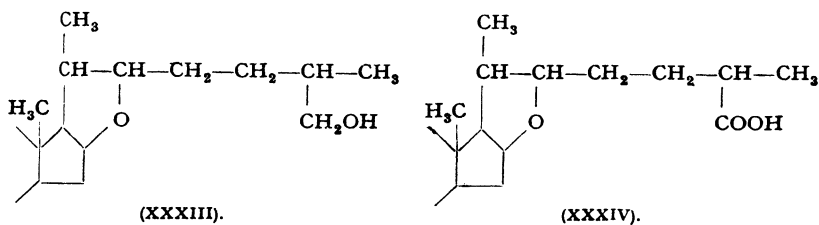
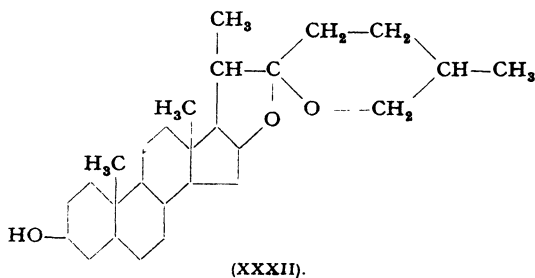
Sarsasapogenin . . . C₂₇H₄₄O₃, OH an C₃ (β) Ring A und B cis.

Wie in der Reihe der Herzgiftaglykone mit 23 C-Atomen eine Verschiebung der Doppelbindung in der Laktonseitenkette aus der β,γ- in die α,β-Stellung notwendig wurde, so hat auch der Aufbau der Seitenkette in den Sapogeninen der Steroidgruppe eine kleine Änderung erfahren müssen. TSCHESCHE und HAGEDORN (50) hatten für die Seitenkette auf Grund des damals noch unvollständigen Tatsachenmaterials die vorläufige Formel (XXX) aufgestellt, die zwei nebeneinanderliegende

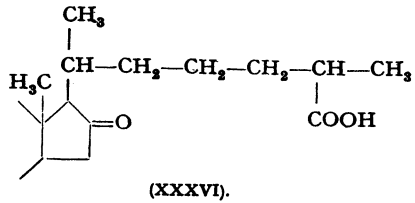
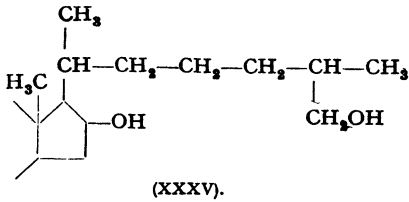
Tetrahydrofuranringe aufweist. Neuere Arbeiten von MARKER und Mitarbeitern (51) zeigen aber, daß diese Formulierung besser durch eine Keto-spiro-acetal-gruppierung wie in Formel (XXXI) ersetzt werden muß. Mit dieser Anordnung sind die neueren Befunde von MARKER und Mitarbeitern zwangloser zu vereinbaren als mit der alten Formel. Nachfolgend sollen diese Ab- und Umbauversuche der Seitenkette am Sarsasapogenin erläutert werden, es verhalten sich die anderen Saponine im allgemeinen entsprechend.



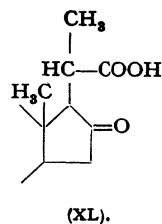
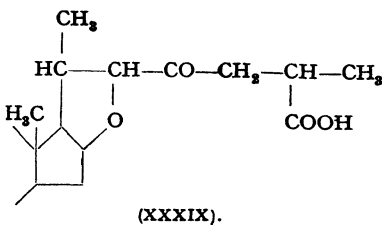
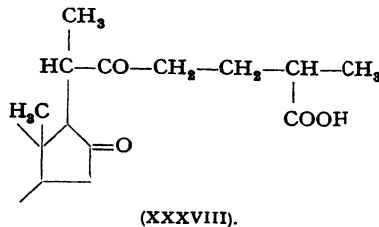
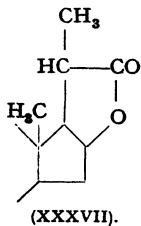
Sarsasapogenin (XXXII) gibt bei der katalytischen Hydrierung Dihydro-sarsasapogenin (52), dem in der Seitenkette die Formulierung (XXXIII) zukommt. Es ist also der endständige hydrierte Pyranring unter Ausbildung einer primären Hydroxylgruppe geöffnet worden. Die Oxydation mit Chromsäureanhydrid liefert eine Säure (XXXIV), die noch die gleiche Anzahl C-Atome wie Sarsasapogenin enthält (51). Bei der Reduktion nach CLEMMENSEN mit amalgamiertem Zink wird im Sarsasapogenin, nicht aber bei der Mehrzahl der anderen Sapogenine der gleichen Gruppe, die Ketogruppe an C₂₂ durch CH₂ ersetzt und Tetrahydro-sarsasapogenin (XXXV) gebildet. Diese Verbindung gibt ein Diacylderivat durch Sub-



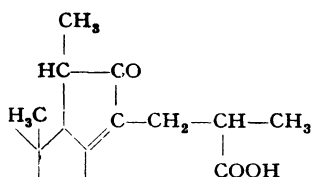
stitution der OH-Gruppen an C₃ und C₂₇, die OH-Gruppe an C₁₆ wird nicht verändert. Die Beobachtung wird durch sterische Behinderung der Hydroxylgruppe gedeutet. Die Oxydation des Tetrahydro-sarsapogenins mit Chromsäure ergibt eine nicht kristallisiert erhaltene Diketosäure, die ein Disemicarbazon liefert (XXXVI).



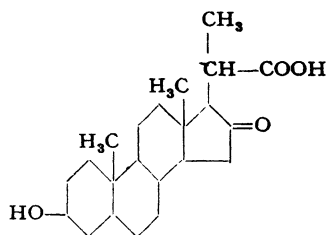
Oxydiert man Sarsapogenin-acetat mit Chromsäure, so erhält man neben dem sog. C₂₂-Lakton (XXXVII) eine Säure mit der gleichen Anzahl C-Atome wie das Ausgangsmaterial, die Sarsapogensäure (XXXVIII) (54). Diese Säure läßt sich durch Weiteroxydation mit Chromsäure nicht nennenswert zu dem C₂₂-Lakton abbauen, wie erwartet werden müßte, wenn ihr die früher (I. Zusammenfassung) diskutierte Formulierung (XXXIX) zukäme, die sich aus der alten Formel mit den beiden Tetrahydrofuranringen ableitet. Dagegen wird in kleiner Menge eine Säure der Formel (XL) gewonnen, die bei der katalytischen Hydrierung C₂₂-Lakton (XXXVII) ergibt. Bei der katalytischen Hydrierung geht die Sarsapogensäure (XXXVIII) durch Neubildung des hydrierten Furanringes in die Anhydro-tetrahydro-sarsapogensäure (XXXIV) über, die schon bei der Oxydation des Dihydro-sarsapogenins erwähnt wurde.



Behandelt man Sarsasapogensäure mit Alkali, so spaltet sie leicht Wasser ab und geht in die Anhydro-sarsasapogensäure (XLI) über, in der zwischen der Carbonylgruppe an C₁₆ und der CH₂-Gruppe an C₂₃ Anhydrierung erfolgt ist. Die Ozonspaltung der neuen Säure ergibt 3-(β)-Oxy-16-keto-bisnorcholansäure (XLII) (55, 56, 57).



(XLI).

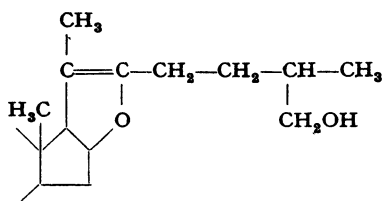


(XLII).

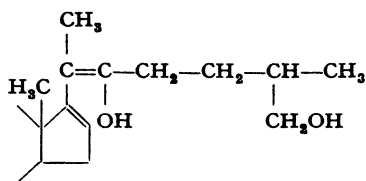
Die Sapogenine nehmen in der Seitenkette leicht ein Bromatom auf, das vermutlich in Nachbarschaft zu der acetalisierten Ketogruppe C₂₂ steht, dabei ist die Substitution an C₂₃ wahrscheinlicher als an C₂₀, da der oxydative Abbau des Bromderivats zu der eben erwähnten 3-(β)-Oxy-16-keto-bisnorcholansäure führt. Würde das Bromatom an C₂₀ seinen Platz haben, sollte eine bromierte Säure beim Abbau entstehen.

Eine weitere interessante Umwandlung erfahren die Sapogenine beim Erhitzen mit Essigsäureanhydrid; sie werden dadurch in die Acetylderivate der sog. *Pseudosapogenine* überführt, denen die Formel (XLIIIa) oder (XLIII b) zuerkannt wird (53, 57, 59). *Pseudosarsasapogenin* reagiert nicht mit Semicarbazid und liefert bei der katalytischen Hydrierung nur ein Dihydroderivat (65), das Dihydroderivat gibt nur eine Diacylverbindung. Weiteren Einblick in die Konstitution der Pseudosapogenine verschafft die Oxydation. Mit Chromsäure wird unter Aufspaltung der Doppelbindung die Verbindung (XLIV) gebildet, die leicht zu Δ^{16,17}-Pregnenolon-3,20 verseifbar ist (XLV), ferner entsteht α-Methylglutarsäure. Pregnanolon-3,20 kann aus dem Dihydro-pseudo-sarsasapogenin durch Oxydation über die Diketosäure (XLVI) gewonnen werden. Die Isolierung von α-Methylglutarsäure ist besonders wichtig, da ihre Entstehung nur mit der neuen MARKERSchen Formulierung der Seitenkette zu erklären ist. Die früher schon von WINDAUS und WILLERDING (60) beobachtete Entstehung dieser Säure beim oxydativen Abbau der Sapogenine der Digitalisgruppe konnte mit der alten Formel bisher nicht befriedigend gedeutet werden. Durch den Abbau der Pseudosapogenine ist weiter ein Übergang von dieser Stoffklasse zu den Sexualhormonen möglich geworden, da von dem erwähnten Pregnenolon ein Weg zum Corpus luteum-Hormon wie zum Androsteron und Testosteron führt (61, 62). Die Verkürzung der Seitenkette konnte von MARKER und Mitarbeitern (63, 64) neuerdings

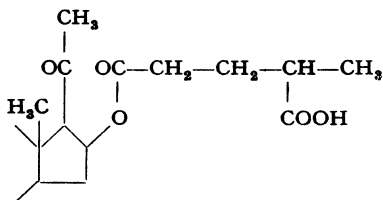
mit den Sapogeninen direkt durchgeführt werden, indem sie aus Sarsasapogenin-acetat mit Wasserstoffsuperoxyd oder Perschwefelsäure zum Pregnantriol-3-(β),16,20 gelangten.



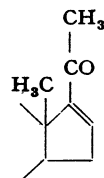
(XLIII a).



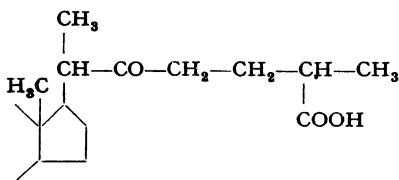
(XLIII b).



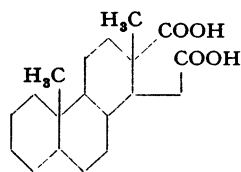
(XLIV).



(XLV).



(XLVI).



(XLVII).

Der von TSCHESCHE und HAGEDORN (*r*) durchgeführte Abbau des *Tigogenins* von der Seitenkette her ist später von ST. N. FARMER und G. S. R. KON (*66*) auch am Sarsasapogenin vorgenommen worden und hat statt zur Allo- α -tiobiliansäure zur α -tiobiliansäure geführt (XLVII), die sich durch eine Isomerie an C-Atom 5 unterscheiden. Ebenso fanden MARKER und Mitarbeiter, daß Tigogenin beim Abbau Allo-Pregnantriol-3-(β),16,20 gibt, während Sarsasapogenin Pregnantriol-3-(β),16,20 liefert. Tigogenin gehört also der Allo-Reihe an mit trans-Verknüpfung der Ringe A und B, während Sarsasapogenin der cis-Reihe zugehört. Bemerkenswert ist ferner, wie die stereochemische Anordnung der Ringe A und B auf das chemische Verhalten der Seitenkette zurückwirkt. Die schon erwähnten Pseudosapogenine lassen sich mit alkoholischer Salzsäure in die ursprünglichen Sapogenine zurückverwandeln, wenn die Ringe A und B trans-Verknüpfung aufweisen. Im anderen Falle, bei cis-Konfiguration, tritt zuerst eine labile Anordnung in der Seitenkette auf, die sich erst bei längerer Einwirkung der Salzsäure in die stabile

Verbindung umwandelt. So gibt Pseudosarsasapogenin mit alkoholischer Salzsäure zuerst Sarsasapogenin, das in Smilagenin übergeht, während Pseudotigogenin sofort das stabile Tigogenin zurückbildet (72).

Daß die Überführung von *Tigogenin*, *Gitogenin* und *Digitogenin* in identische Derivate möglich ist, darüber wurde schon in der 1. Zusammenfassung berichtet. Jetzt haben MARKER und Mitarbeiter (67, 68) *Sarsasapogenin* auf folgendem Wege in Tigogenin verwandelt: Sarsasapogenon mit der Ketogruppe an C₃ gibt mit Brom ein Di-bromderivat, in dem ein Brom in der Seitenkette, das andere an C₄ steht. Mit Pyridin erhält man daraus Brom- $\Delta^{4,5}$ -dehydro-sarsasapogenon, das mit Natrium in Alkohol ein Gemisch epimerer Alkohole gibt, aus dem Digitonin Neotigogenin ausfällt. Dieses hat die labile Konfiguration des Sarsasapogenins in der Seitenkette, aber schon trans-Verknüpfung der Ringe A und B. Bei der Einwirkung alkoholischer Salzsäure wird es in Tigogenin umgelagert. Der gleiche Weg kann auch vom *Smilagenin* aus beschrritten werden und führt dann direkt zum Tigogenin.

Diosgenin ist ein $\Delta^{5,6}$ -Dehydrotigogenin und geht bei der katalytischen Hydrierung in Tigogenin über (70). Die Lage der Doppelbindung wurde von MARKER (69) durch Überführung in Cholesterin sichergestellt. Diosgenin wird durch Reduktion nach CLEMMENSEN in der Seitenkette in Tetrahydrotigogenin überführt, in dem die Doppelbindung zwischen C₅ und C₆ nicht angegriffen worden ist. Anschließend werden die OH-Gruppen durch Brom ersetzt und das Bromderivat mit Kaliumacetat behandelt. Durch Einwirkung von Natrium in Propylalkohol wird auch das letzte Bromatom in der Seitenkette durch Wasserstoff ersetzt. Aus dem Reaktionsprodukt konnte Cholesterin isoliert werden und damit die Lage der Doppelbindung im Diosgenin als an C₅—C₆ festgestellt werden (71).

Chlorogenin, ein 6-Oxytigogenin, ist durch folgende Reaktionen mit Tigogenin und Diosgenin verknüpft worden: Chlorogenon, das Keton des Chlorogenins, gibt bei der Reaktion nach WOLFF-KISHNER Tigogenin, da dabei die Ketogruppe an C₃ nur bis zum Hydroxyl reduziert wird. Oxydiert man Diosgenin mit Chromsäure, so erhält man $\Delta^{4,5}$ -Diosgendion-3,6, das mit Zinkstaub und Essigsäure in 6-Ketotigogenon verwandelt wird. Letztere Verbindung aber ist mit Chlorogenon identisch (73, 74, 75).

Liligenin ist isomer mit Gitogenin und wird durch Spaltung des Saponins von *Lilium rubrum* erhalten, das selbst bisher nicht weiter untersucht worden ist. Es bildet eine Diacylverbindung und gibt ein schwer lösliches Digitonid. Bei der Oxydation gibt es nur saure Produkte, woraus auf eine 2,3- oder 3,4-Stellung der Hydroxyle geschlossen wird. Es unterscheidet sich vom Gitogenin vermutlich entweder durch die Konfiguration an C₅ oder in der Seitenkette (76).

Ob *Smilagenin* als solches in der Natur vorkommt, ist bisher nicht gesichert, da die Möglichkeit besteht, daß es bei der Hydrolyse seines

Glykosids erst aus Sarsasapogenin entsteht Smilagenin enthält bekanntlich gegenüber Sarsasapogenin die stabile Anordnung der Seitenkette (7).

An neuen Glykosiden der Saponingruppe wurden das Saponin aus *Trillium erectum* und aus *Dioscorea Tokoro Makino* näher untersucht. Erstères, das *Trillarín*, ist ein Diglykosid des Diosgenins und läßt sich in das Monoglykosid *Trillin* $C_{33}H_{52}O_8$ überführen, das als Zuckerkomponente Glucose enthält (78, 79). Das Glykosid aus *Dioscorea Tokoro Makino* ist *Dioscin* (80), das bei der Hydrolyse Diosgenin, Glucose und Rhamnose ergibt.

VII. Die Alkaloide der Steroidgruppe.

Neben den Saponinen der Steroidgruppe, die keinen Stickstoff im Molekül enthalten, gibt es eine Gruppe von Glykoalkaloiden, die ihnen sehr nahe verwandt sind. In ihnen sind an das Steroidgerüst des Saponinens ein oder mehrere Stickstoffatome angefügt worden.

Schon in dem I. Fortschrittsbericht (1) ist das Glykoalkaloid *Solanin-t* erwähnt worden, für dessen Aglykon *Solanidin-t* SOLTYS und WALLENFELS (81) sehr wahrscheinlich gemacht haben, daß es das Kohlenstoffgerüst der Steroide enthält. Es gibt bei der Selendehydrierung Methylcyclopenteno-phenanthren. Inzwischen ist von H. ROCHELMEYER (82) auch das *Solanidin-s* der Selendehydrierung unterworfen worden und der gleiche Kohlenwasserstoff erhalten worden. Die alte Formel $C_{18}H_{31}ON$ von ODDO und Mitarbeitern (87) kann nicht richtig gewesen sein. ROCHELMEYER hat neue Bezeichnungen für diese Solanum-alkaloide eingeführt, so ist *Solanin-t* jetzt *Solatunin*, sein Aglykon *Solanidin-t* *Solatubin*, während *Solanin-s* den Namen *Solasonin* erhalten hat und das Aglykon mit *Solasodin* bezeichnet wird. Es kann nicht behauptet werden, daß diese neuen Namen besonders glücklich gewählt wären, da das Verhältnis von Glykosid zu Genin im Namen nicht zum Ausdruck kommt. Es sollen daher die alten und neuen Bezeichnungen vorerst nebeneinander benutzt werden. *Solanin-s* und *Solanin-t* zerfallen bei der Glykosidspaltung in die Genine und drei Moleküle Zucker, die als Glucose, Galaktose und Rhamnose erkannt worden sind und in dieser Reihenfolge an das Aglykon gebunden sind (83, 84). Ein weiteres Solanaceen-alkaloid ist das *Solauricin*, das bei der Hydrolyse *Solauricidin*, $C_{27}H_{43}O_2N$ und ebenfalls Glucose, Galaktose und Rhamnose gibt (89). Ferner ist bekannt das *Solangustin* (88), das ein Glucose-glykosid des *Solangustidin* $C_{27}H_{43}O_2N$ ist. Solangustidin und Solauricidin sind isomer mit Solasodin und behalten sich chemisch außerordentlich ähnlich. Neben diesen Glykoalkaloiden wurden von G. BARGER und H. L. FRÄNKEL-CONRAT (85) in *Solanum pseudocapsicum* zwei weitere Alkaloide der gleichen Gruppe aufgefunden, die aber nicht an Zucker gebunden vorkommen, das *Solano-*

capsin und das *Solanocapsidin*. Letztere Verbindung gibt bei der Selenhydrierung ebenfalls Methylcyclopentenphenanthren. Die nachfolgende Tabelle 4 gibt eine Übersicht über diese Verbindungen.

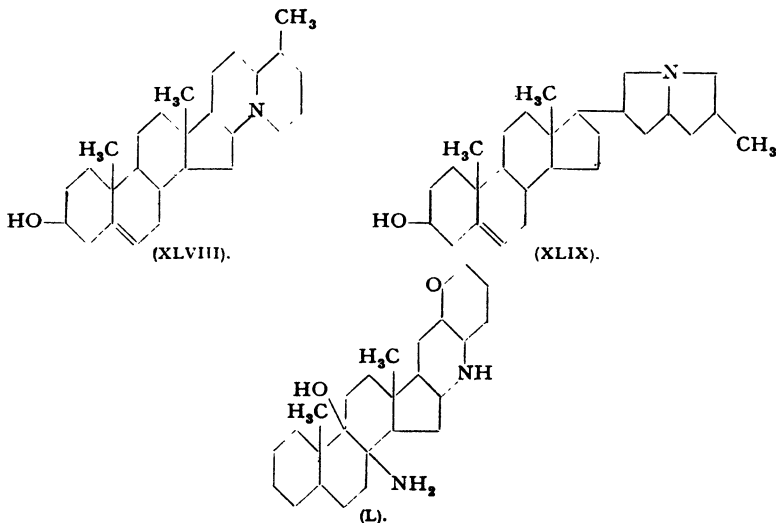
Tabelle 4.

Name	Formel	Aglykon
Solanin-t (Solatunin) aus <i>Solanum tuberosum</i>	$C_{45}H_{75}O_{15}N$	liefert Solanidin-t (Solatubin) $C_{27}H_{43}ON$
Solanin-s (Solasonin) aus <i>Solanum sodomaeum</i> , " " <i>xanthocarpum</i> , " " <i>aviculare</i> (90)	$C_{45}H_{73}O_{16}N$.. Solanidin-s (Solasodin) $C_{27}H_{43}O_2N$
Solangustin (88) aus <i>Solanum angustifolium</i>		.. Solangustidin $C_{27}H_{43}O_2N$
Solauricin (89) aus <i>Solanum auriculatum</i> " " <i>pseudocapsicum</i>	$C_{45}H_{73}O_{16}N$.. Solauricidin $C_{27}H_{43}O_2N$.. Solanocapsin $C_{26}H_{44}O_2N_2$ (') .. Solanocapsidin $C_{26}H_{42}O_4N_2$ (')

In den letzten Jahren sind eine Reihe von Arbeiten von ROCHELMEYER (82) über *Solanidin-s* und *Solanidin-t* erschienen, die zu folgenden Ergebnissen geführt haben: Solanidin-t (Solatubin) gibt mit Digitonin eine schwer lösliche Digitoninverbindung, aus der auf eine sekundäre Hydroxylgruppe an C_3 in β -Konfiguration im Ringsystem geschlossen wird. Sie ist zu einer Ketogruppe oxydierbar, das erhaltene Solatubinon hat die Ultraviolettabsorption eines α, β -ungesättigten Ketons. Die Doppelbindung ist aber erst später in Konjugation zur Ketogruppe gewandert, da die Reduktion nicht mehr zum Ausgangsmaterial zurückführt. Keiner der beiden erhaltenen epimeren Alkohole war mit Solanidin-t identisch. Das Sapogenin dürfte daher die Doppelbindung in 5-6-Stellung wie im Cholesterin enthalten, bei dem ganz entsprechende Verhältnisse seit langem bekannt sind. Die gleiche Gruppierung einer OH-Gruppe an C_3 und einer Doppelbindung C_5-C_6 ist auch im Solanidin-s (Solasodin) enthalten. Die Stellung des zweiten Sauerstoffatoms in diesem Sapogenin ist nicht bekannt.

Ungeklärt ist ferner noch der Aufbau der N-haltigen Seitenkette. Während SOLTYS und WALLENFELS (81) die Formel (XLVIII) für Solanidin-t aufstellen, haben G. T. CLEMO, W. G. McMORGAN und R. RAPER (86) eine Formulierung wie in Formel (XLIX) vorgeschlagen. Dadurch soll die Entstehung von Methylcyclopenteno-phenanthren besser verständlich werden, da das N-haltige Ringsystem mit dem Vierring der Steroide nicht kondensiert ist. Da nach ROCHELMEYER (82) bei der

Zinkstaubdestillation Pyrrolbasen entstehen, dürfte die Formel (XLIX) der bisher beste Ausdruck für den Aufbau des Solanidin-t sein.

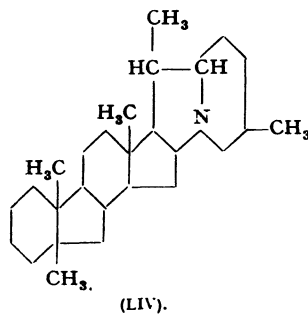
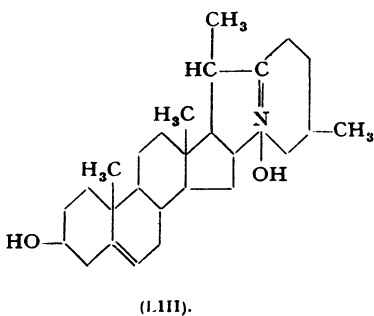
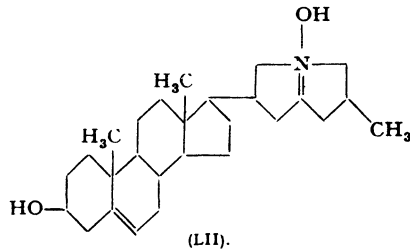
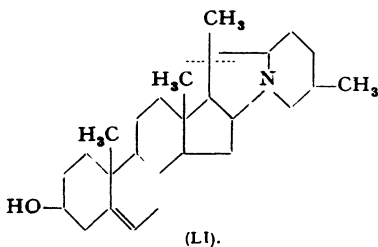


Einen in bezug auf die Stellung der Hydroxylgruppe ganz abweichenden Bau gegenüber allen anderen Steroiden dieser Gruppe zeigt die von BARGER und FRÄNKEL-CONRAT (85) aufgestellte Formel für *Solanocapsin* (L), die wohl noch nicht endgültig sein dürfte. Zur Stützung dieser Formel dienen folgende Beobachtungen: *Solanocapsin* gibt mit salpetriger Säure ein Nitrosoderivat, vermutlich mit der sekundären Aminogruppe der Seitenkette. Gleichzeitig wird die primäre Aminogruppe durch Hydroxyl ersetzt und die tertiäre Hydroxylgruppe an C_9 unter Ausbildung einer Doppelbindung abgespalten. Wird diese Verbindung nun mit Kaliumpermanganat oxydiert, so entsteht eine Säure $C_{15}H_{24}ONH(COOH)_2$, 9 C-Atome sind also gegenüber dem Ausgangsmaterial abgespalten worden. Der Vorgang wird so gedeutet, daß die C-Atome C_8 und C_9 zu Carboxylgruppen geworden sind, während die aboxydierten Kohlenstoffatome die C-Atome C_1-C_7 , C_{10} und C_{18} sein sollen. Die Oxydation soll an einer Doppelbindung C_8-C_9 stattgefunden haben. Während so für die Verhältnisse in den Steroidringen gewisse Unterlagen vorliegen, ist der Aufbau der anderen Ringe rein spekulativ. Es wird weiterer Arbeiten bedürfen, um die Struktur des *Solanocapsins* zu sichern.

Nachtrag: Nach Abfassung des Manuskripts erschien eine Arbeit von V. PRELOG und S. SZPILFOGEL [Helv. chim. Acta 25, 1306 (1942)], in der die Selendehydrierung des *Solanidin-t* erneut untersucht und vor allem die Konstitution der Base aufgeklärt wird, die dabei aus dem stickstoffhaltigen Anteil des Moleküls entsteht. Danach handelt es sich

um 2-Äthyl-5-methylpyridin, dessen Bildung nach den bisherigen Formeln für Solanidin-t schwer verständlich ist. Die beiden Autoren schlagen daher für Solanidin-t eine neue Formel (LI) vor, die auch eine größere Verwandtschaft mit der der Sapogenine aufweist. Sie kann aus ihr leicht durch Ersatz der beiden Sauerstoffatome durch Stickstoff abgeleitet werden.

Für das Solasodin (Solanidin-s) ist von L. H. BRIGGS, R. C. NEWBOLD und N. E. STAGE (91) eine Formel (LII) gewählt worden, nach der das zweite Sauerstoffatom des Moleküls als Hydroxyl einer quartären Ammoniumbase aufgefaßt wird. Die neue Formel (LI) für Solanidin-t nach PRELOG und SZPILFOGEL gestattet auch die Formulierung einer quartären Ammoniumbase, so daß dem Solanidin-s vielleicht ein entsprechendes Formelbild (LIII) zukäme, in dem die Lage der von N ausgehenden Doppelbindung ungewiß bleibt.



Bemerkenswert ist ferner, daß W. A. JACOBS und L. C. CRAIG [J. biol. Chemistry 119, 141 (1937); 120, 447 (1937); 124, 659 (1938); 129, 79 (1939); 143, 427 (1942); und mit G. J. LAVIN: J. biol. Chemistry 141, 51 (1941)] das oben erwähnte 2-Äthyl-5-methylpyridin durch Dehydrierung der Veratralkaloide *Cevin*, *Jervin* und *Protoveratrin* erhielten und für das Kohlenstoffskelett dieser Alkaloide eine Formel (LIV) gewählt haben, die der neuen Formulierung des Solanidin-t außerordentlich ähnlich ist, nur daß in ihr der Ring B der Steroide in einen Fünfring verwandelt ist und die OH-Gruppe im Ring A fehlt. Es bleibt abzuwarten, wie weit sich diese neuen Formeln werden bestätigen lassen.

Literaturverzeichnis.

1. TSCHESCHE, R.: *Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmakol.* 1936, 31.
2. RUZICKA, L., PL. A. PLATTNER u. G. BALLA: *Helv. chim. Acta* 25, 65 (1942).
3. — — u. A. FÜRST: *Helv. chim. Acta* 25, 79 (1942).
4. LINVILLE, R. G., J. FRIED and R. C. ELDERFIELD: *Science (New York) (N. S.)* 94, 284 (1941).
5. RUZICKA, L., PL. A. PLATTNER u. J. POTAKI: *Helv. chim. Acta* 25, 425 (1942).
6. STEIGER, M. u. T. REICHSTEIN: *Helv. chim. Acta* 21, 828 (1938).
7. MASON, H. L. and W. M. HOEHN: *J. Amer. chem. Soc.* 61, 1614 (1939).
8. FIESER, L. F. and R. P. JACOBSEN: *J. Amer. chem. Soc.* 59, 2335 (1937).
9. MANNICH, C. u. G. SIEWERT: *Ber. dtsch. chem. Ges.* 75, 737, 750 (1942).
10. MATSUBARA T.: *Chem. Cbl.* 1938, I, 2887.
11. NEUMANN, W.: *Ber. dtsch. chem. Ges.* 70, 1547 (1937).
12. TSCHESCHE, R.: *Ber. dtsch. chem. Ges.* 70, 1555 (1937).
13. HESSE, G.: *Ber. dtsch. chem. Ges.* 70, 2265 (1937).
14. TSCHESCHE, R., W. NEUMANN u. K. BOHLE: *Ber. dtsch. chem. Ges.* 71, 1927 (1938).
15. — u. K. BOHLE: *Ber. dtsch. chem. Ges.* 71, 654 (1938).
16. HESSE, G. u. T. REICHENEDER: *Liebigs Ann. Chem.* 526, 252 (1936).
17. — — u. H. EYSENBACH: *Liebigs Ann. Chem.* 537, 67 (1938).
18. BLOCK, E. and R. C. ELDERFIELD: *J. org. Chemistry* 4, 289 (1939).
19. LAMB, I. D. and S. SMITH: *J. chem. Soc. (London)* 1936, 442.
20. STOLL, A., A. HOFMANN u. A. HELFENSTEIN: *Helv. chim. Acta* 18, 644 (1935).
21. — u. J. RENZ: *Helv. chim. Acta* 24, 1380 (1941).
22. — — *Helv. chim. Acta* 25, 43 (1942).
23. — — *Helv. chim. Acta* 25, 377 (1942).
24. HARTMANN, M. u. E. SCHLITTLER: *Helv. chim. Acta* 23, 548 (1940).
25. MANNICH, C. u. W. SCHEIDER: *Arch. Pharm., Ber. dtsch. pharm. Ges.* 279, 223 (1941).
26. STOLL, A. u. J. RENZ: *Helv. chim. Acta* 22, 1193 (1939).
27. — — u. W. KREIS: *Helv. chim. Acta* 20, 1484 (1937).
28. REICHSTEIN, T. u. H. ROSENMUND: *Chem. Cbl.* 1940, II, 3364.
29. JARETZKY, R. u. W. LIER: *Chem. Cbl.* 1938, II, 2456.
30. VOSS, W. u. G. VOGT: *Ber. dtsch. chem. Ges.* 69, 2333 (1936).
31. RUZICKA, L. u. G. DALMA: *Helv. chim. Acta* 22, 1516 (1939); 23, 573 (1940).
32. SCHLITTLER E.: *Helv. chim. Acta* 24, Sonder-Nr. 319, 32 E.
33. STOLL, A. u. J. RENZ: *Enzymologia* 7, 362 (1939).
34. WIELAND, H. u. H. BEHRINGER: *Liebigs Ann. Chem.* 549, 289 (1941).
35. — u. Mitarbeiter: *Liebigs Ann. Chem.* 517, 22 (1935); 524, 203 (1936).
36. KOTAKE, M. u. K. KUWADA: *Chem. Cbl.* 1939, II, 1681.
37. KUWADA, K. u. M. KOTAKE: *Chem. Cbl.* 1939, I, 4775.
38. — — *Chem. Cbl.* 1937, II, 1588.
39. KOTAKE, M. u. K. KUWADA: *Chem. Cbl.* 1937, II, 2690.
40. JENSEN, H.: *J. Amer. chem. Soc.* 59, 767 (1937).
41. KONDO, H. u. S. OHNO: *Chem. Cbl.* 1939, II, 1682.
42. — — *Chem. Cbl.* 1938, I, 2939.
43. — — *Chem. Cbl.* 1939, I, 968.
44. — — *Chem. Cbl.* 1939, II, 1681.
45. KOBAYASHI, Y.: *Chem. Cbl.* 1940, I, 3547.
46. KOTAKE, M. u. T. KUBOTA: *Chem. Cbl.* 1938, II, 3823.
47. OHNO, S.: *Chem. Cbl.* 1941, II, 1399.
48. IKAWA, S.: *J. pharmacol. Soc. jap.* 55, 49, 144 (1935).
49. KONDO, H. u. S. OHNO: *Chem. Cbl.* 1940, I, 1997.

50. TSCHESCHE, R. u. A. HAGEDORN: Ber. dtsch. chem. Ges. **68**, 1412, 2247, (1935); **69**, 797 (1936).
51. MARKER, R. E. and E. ROHRMANN: J. Amer. chem. Soc. **61**, 846 (1939).
52. — — J. Amer. chem. Soc. **61**, 1516 (1939).
53. — — J. Amer. chem. Soc. **62**, 896 (1940).
54. MARKER, R. E. and E. ROHRMANN: J. Amer. chem. Soc. **61**, 2073 (1940).
55. — — D. L. TURNER and P. R. ULSHAFFER: J. Amer. chem. Soc. **63**, 763 (1941).
56. MARKER, R. E., D. L. TURNER, R. B. WAGNER, P. R. ULSHAFFER, H. M. CROOKS jr. and E. L. WITTLE: J. Amer. chem. Soc. **63**, 774 (1941).
57. — — — — — J. Amer. chem. Soc. **63**, 2274 (1941).
58. — — A. C. SHABICA and P. R. ULSHAFFER: J. Amer. chem. Soc. **63**, 1032 (1941).
59. — E. M. JONES and J. KRUEGER: J. Amer. chem. Soc. **62**, 2532 (1940).
60. WINDAUS, A. u. U. WILLERDING: Z. physiol. Chem. **143**, 33 (1925).
61. MARKER, R. E. and J. KRUEGER: J. Amer. chem. Soc. **62**, 2543 (1940).
62. — — J. Amer. chem. Soc. **62**, 2621, 3003 (1940).
63. — — J. Amer. chem. Soc. **62**, 3349 (1940).
64. — R. B. WAGNER and P. R. ULSHAFFER: J. Amer. chem. Soc. **63**, 772 (1941).
65. — E. ROHRMANN: J. Amer. chem. Soc. **62**, 521 (1940).
66. FARMER, S. N. and G. A. KON: J. chem. Soc. London **1937**, 414.
67. MARKER, R. E., E. ROHRMANN and E. M. JONES: J. Amer. chem. Soc. **62**, 1162 (1940).
68. — — J. Amer. chem. Soc. **62**, 647 (1940).
69. — and D. L. TURNER: J. Amer. chem. Soc. **63**, 767 (1941).
70. TSUKAMOTO, T., Y. UENO, Z. OHTA u. R. TSCHESCHE: Chem. Cbl. **1938**, II, 2753.
71. MARKER, R. E., E. M. JONES, D. L. TURNER and E. ROHRMANN: J. Amer. chem. Soc. **62**, 3006 (1940).
72. — T. TSUKAMOTO and D. L. TURNER: J. Amer. chem. Soc. **62**, 2525 (1940).
73. — E. M. JONES and D. L. TURNER: J. Amer. chem. Soc. **62**, 2537 (1940).
74. — D. L. TURNER and P. R. ULSHAFFER: J. Amer. chem. Soc. **62**, 3009 (1940).
75. — and E. ROHRMANN: J. Amer. chem. Soc. **61**, 3479 (1939).
76. — D. L. TURNER, A. C. SHABICA, E. M. JONES, J. KRUEGER and J. D. SURMATIC: J. Amer. chem. Soc. **62**, 2620 (1940).
77. ASKEW, F. S., S. N. FARMER and G. A. R. KON: J. chem. Soc. (London) **1936**, 1399.
78. MARKER, R. E. and J. KRUEGER: J. Amer. chem. Soc. **62**, 2548 (1940).
79. — — J. Amer. chem. Soc. **62**, 3349 (1940).
80. TSUKAMOTO, T. u. Y. UENO: Chem. Cbl. **1937**, I, 1438.
81. SOLTYS, A. u. K. WALLENFELS: Ber. dtsch. chem. Ges. **69**, 811 (1936).
82. ROCHELMMEYER, A.: Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 226 (1938); Arch. Pharm., Ber. dtsch. pharm. Ges. **274**, 543 (1936); **275**, 336 (1937); **277**, 329, 340 (1939).
83. ZEMPLEN, G.: Ber. dtsch. chem. Ges. **61**, 2294 (1928).
84. SAYED, I. Z. u. D. D. KANGA: Chem. Cbl. **1937**, I, 2181.
85. BARGER, G. and H. L. FRAENKEL-CONRAT: J. chem. Soc. (London) **1936**, 1537.
86. CLEMO, G. R., W. G. McMORGAN and R. RAPER: J. Amer. chem. Soc. **58**, 1296 (1936).
87. ODDO, G. u. G. CAVONNA: Ber. dtsch. chem. Ges. **67**, 446 (1934).
88. TUTIN and CLEWER: J. chem. Soc. (London) **1914**, 565.
89. BELL, R. C., L. H. BRIGGS and J. J. CARROLL: J. chem. Soc. (London) **1942**, 12.
90. — — J. chem. Soc. (London) **1942**, 1.
91. BRIGGS, L. H., R. T. NEWBOLD and N. E. STAGE: J. chem. Soc. (London) **1942**, 3.

(Révision abgeschlossen am 16. März 1944.)

Zur Biochemie der Vitamin B-Gruppe (Pantothensäure und Vitamin B₆).

Von THEODOR WIELAND und IRMENTRAUT LÖW, Heidelberg.

(Mit 3 Abbildungen.)

In den beiden folgenden Abhandlungen wird die Betrachtung der Vitamin B-Faktoren fortgesetzt, die im Band 2 mit einer zusammenfassenden Darstellung über die Flavine und das Vitamin B₂ begonnen wurde.¹

Die Pantothensäure.²

I. Entdeckung.

Die Pantothensäure wurde 1931 von WILLIAMS bei seinen Untersuchungen über die Wuchsstoffe bestimmter Heferassen aufgefunden (1). Er entdeckte, daß ein saurer Stoff (Wanderung im elektrischen Feld) von weitverbreitetem Vorkommen (*παντοθεν* heißt „von überall her“) zum Wachstum gewisser Hefen, z. B. der obergärrigen Hefe „Gebrüder Mayer“ (G. M.), unerläßlich ist (2). Einige Jahre später machten SNELL, STRONG und PETERSON die Beobachtung, daß viele Milchsäure- und Propionsäurebakterien zu ihrem Wachstum einen Faktor benötigten, der gleiche Eigenschaften wie die WILLIAMSSche Pantothensäure aufwies (3). Die Notwendigkeit eines ähnlichen Wuchsstoffes für einen anderen Milchsäurebakterienstamm (*Streptobacterium plantarum* 10 S, *Orla-Jensen*) wurde etwa gleichzeitig von MÖLLER beobachtet (4).

An anderer Stelle war inzwischen die Erforschung der B-Vitamine weitergegangen, welche zum normalen Gedeihen von Küken und Ratten unbedingt nötig sind. Das Fehlen eines Stoffes, der aus saurer Lösung nicht an Fullererde adsorbiert wird (ins Filtrat gelangt) und deshalb auch als „Filtratfaktor“ bezeichnet worden war [JUKES (5)], verursachte bei Küken eine als Hühnerdermatitis bezeichnete Hauterkrankung. Man sprach daher auch vom „Hühner-Antidermatitis-Faktor“ (6). Bei seinem Fehlen wurde an jungen Ratten ein langsames Wachstum beobachtet. Die Hautkrankheit der Hühnchen (7) sowie der Wachstumsstillstand von

¹ H. RUDY: Flavine. Mit besonderer Berücksichtigung des Laktoflavins. Fortschr. Chemie organ. Naturstoffe 2, 61 (1939).

² Von TH. WIELAND, Heidelberg.

filtratfaktorfrei ernährten Ratten (8) ließ sich durch Verfütterung des Calciumsalzes der *Pantothensäure*, das mittlerweile im WILLIAMSSchen Laboratorium in ziemlicher Reinheit aus Säugetierleber gewonnen war (9), beheben. Damit war die Identität aller dieser Faktoren untereinander und mit Pantothensäure erwiesen. Gleichzeitig mit diesen Erkenntnissen mehrten sich die Beobachtungen über die Notwendigkeit von Pantothensäure für verschiedene andere Organismen.

II. Biologische Wirkungen.

SCHWARZ untersuchte in einer exakten Arbeit die quantitativen Beziehungen zwischen Pantothensäuregabe und Wachstum an jungen gewichtskonstanten Ratten (10). Dabei wurde gefunden, daß 1 γ Pantothensäure zur Bildung von 62,5 mg Körpersubstanz Veranlassung gibt, gleichgültig in welchen Einzeldosen und über welche Zeit der Wuchsstoff zugeführt wird, bis eine Gewichtszunahme von 20–30 g erreicht ist. Danach wird der „Wirkungswert“ der Pantothensäure kleiner. Im Durchschnitt beträgt die Gewichtszunahme bei optimaler Pantothensäuredosis (50 γ) etwa 2 g pro Tag (11). Auch für das Wachstum von Hunden ist Pantothensäure notwendig (12). Beim Menschen kann es zu Pantothensäuremangel kommen (13); klinische Erfahrungen sind aber noch kaum gemacht worden. Bei Hühnern, die pantothensäurefrei ernährt werden, sinkt der Prozentsatz der Eier, aus denen Küken schlüpfen, von 60 auf unter 3 ab (14). Gleichzeitig degeneriert das Rückenmark dieser Tiere (15). Bei längerem Pantothensäuremangel kommt es bei schwarzen Ratten zu einer als „*Achromotrichie*“ beschriebenen Krankheit (16). Dabei werden die Haare infolge mangelnder Pigmentierung silbergrau. Durch Fütterung von Pantothensäure bekommen die Tiere wieder ein schwarzes Fell.

Wachstumsstillstand und Achromotrichie sind aber nicht die einzigen Symptome von Pantothensäuremangel bei der Ratte. Es kommt auch zu schweren histologischen Veränderungen der *Nebennierenrinde*, wobei besonders die Lipoide stark vermindert sind (17). Die charakteristischen Nierenblutungen (18) treten nicht auf, wenn in der Kost der Tiere Pantothensäure enthalten ist (19). Außer den höheren Warmblütern scheinen auch Insekten (20) und Protozoen (21) der Pantothensäure als Vitamin zu bedürfen.

Auch für *Pflanzen* hat sich die Pantothensäure als wichtiger Wuchsstoff herausgestellt. Alfalfakeimlinge, die auf sterilem Nährboden gepflanzt sind, wachsen in den ersten Tagen mit Pantothensäure viel schneller als ohne sie (22). Ebenso wird das Wachstum isolierter Erbsenembryonen in künstlicher Nährlösung durch Pantothensäure beschleunigt (23).

Durch ihre wachstumsfördernde Wirkung an *Mikroorganismen* ist die Pantothensäure entdeckt worden. Neben den schon erwähnten Heferassen, von denen einige nur 5×10^{-10} g pro Kubikzentimeter

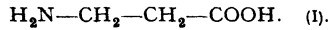
Medium benötigen, und Milchsäure- sowie Propionsäure-Bakterien, braucht auch eine Reihe von anderen Mikroorganismen Pantothensäure: hämolytische *Streptokokken* (24), *Diplococcus pneumoniae* (25), *Clostridium tetani* (26), *Clostridium welchii* (27), bestimmte Stämme von *Corynebact. diphtheriae* (28), einige *Pasteurella*-Arten (29), *Brucella*- (30) und *Proteus morganii*-Stämme (31) sowie *Essigbakterien* (32).

Im WILLIAMSSchen Laboratorium war beobachtet worden, daß Hefe, die mit suboptimaler Pantothensäuredosis herangewachsen war, wesentlich schwächere Gärung zeigte als normale, und daß durch Zusatz von Pantothensäure diese schwache Gärung beschleunigt werden konnte. Versuche mit an Pantothensäure verarmtem Mazerationssaft zeigten dasselbe Verhalten (33). Nach KÖGL steigert Pantothensäure, allerdings erst in ziemlich hohen Dosen, die Gärgeschwindigkeit verschiedener Heferasen (34). HARTELIUS fand, daß Hefe (C. L. 1), die mit optimaler Pantothensäuremenge gewachsen war, einen verminderten Stickstoffgehalt gegenüber pantothensäurearm ernährter aufwies (35). Diese zeigt gegenüber jener in ihrer Nährlösung eine schwache Atmung, die durch Zusatz von (+)-Pantothensäure nach einer Inkubationszeit von 2—3 Stunden in 5 Stunden bis auf das 20fache ansteigt (36). Auch die Atmung von Pflanzengewebe soll durch Pantothensäure erhöht werden, ein Befund, den HILLS später an Bakterien erhoben hat (37). DORFMAN, BERKMAN und KOSER (38) fanden, daß *Proteus morganii* Bakterien, die unter Pantothensäuremangel gezüchtet waren, *Pyruvat* wesentlich langsamer veratmeten als normal ernährte. Durch Zusatz von 20 γ Ca(+)-pantothemat zu 2,0 ccm Zellsuspension stieg die Atmung um 50—100% an, ohne daß sich die Bakterienzahl vermehrt hatte, so daß auf eine coenzymartige Beteiligung der Pantothensäure bei der Pyruvatoxydation durch diese Bakterien geschlossen wird. Eine herabgesetzte Pyruvatatmung zeigt auch die Leber pantothensäurearm ernährter Ratten (38a). Durch Pantothensäure wird ferner die Glykogenspeicherung der Hefe vermehrt [WILLIAMS u. a. (39)].

III. Konstitution.

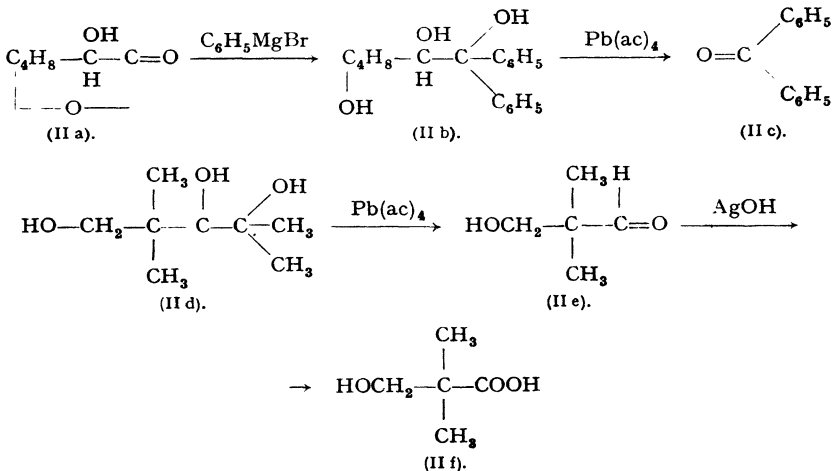
Da weder Pantothensäure noch eines ihrer Derivate trotz zehnjähriger Bearbeitung zur Kristallisation zu bringen war (auch heute ist die freie Säure noch nicht in kristallisierter Form bekannt), mußten wesentliche Erkenntnisse über den Bau des Moleküls an amorphem Material gewonnen werden. Neben der Säurenatur war von Anfang an die leichte Spaltbarkeit durch Kochen mit verdünnten Säuren oder Laugen aufgefallen. Danach sank die biologische Aktivität im Hefetest (G. M.) auf einen kleinen Teil ab, während der Aminostickstoffgehalt des Hydrolyseansatzes zugenommen hatte. Das wenig aktive, NH_2 -haltige Spalt-

produkt konnte 1939 von WILLIAMS und Mitarbeitern (40) als die Aminosäure β -Alanin (I) erkannt werden.

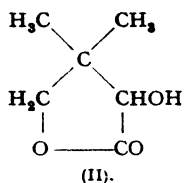


Ein Hinweis hierfür ergab sich schon aus der Tatsache, daß die physiologische Wirksamkeit von β -Alanin mit der verbleibenden schwächeren Aktivität nach Zerstörung der Pantothensäure durch Säuren oder Basen übereinstimmte; hieraus schlossen WILLIAMS und Mitarbeiter, daß aus der Pantothensäure durch hydrolytische Aufspaltung einer Peptidbindung β -Alanin entsteht. Durch Formoltitration ließ sich in der Tat die Bildung einer Aminosäure nachweisen, die quantitativ bestimmt wurde und durch Überführung in die β -Naphthalin-sulfoverbindung als β -Alanin identifiziert wurde.

Das andere, N-freie Spaltstück wurde mit Hilfe eines anderen mikrobiologischen Testes [Wachstum des hämolytischen Streptococcus H 69 D der LANCEFIELD-Gruppe, der nur diese Komponente benötigt und sich daraus, ebenso wie das Essigbakterium von REICHSTEIN (32), Pantothensäure selbst zu bilden vermag] von WOOLLEY (41) und gleichzeitig von WILLIAMS (42) aus größeren Mengen eines alkalischen Hydrolysates von weitgehend gereinigter Pantothensäure angereichert und kristallisiert erhalten. Es besaß die Bruttoformel C₆H₁₀O₃. Durch Titration konnte keine freie Carboxylgruppe nachgewiesen werden; beim Erwärmen wurde jedoch 1 Äquivalent Alkali verbraucht, ein Befund, der auf das Vorliegen einer Laktongruppierung hinwies. Die Stabilitätsverhältnisse deuteten auf ein γ -Lakton hin. Eine Hydroxylgruppe konnte durch die Bildung eines Monoacetats nachgewiesen werden. Die Stellung dieser Oxygruppe wurde durch Überführung des Laktons (II a) in das kristallisierte Dioxy-



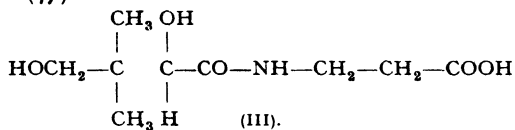
diphenylcarbinol (Hb) mit Hilfe von Phenylmagnesiumbromid nachgewiesen. Die Oxydation dieses Carbinols (IIb) mit Bleitetraacetat lieferte nämlich Benzophenon (IIc), woraus sich die Anwesenheit einer OH-Gruppe in α -Stellung zur Carbonylgruppe der Laktonbrücke ergibt. Der Strukturbeweis wurde vervollständigt durch den Abbau eines Dioxymethylcarbinols (IId, analog IIb), das bei der Einwirkung von Methylmagnesiumjodid auf das Lakton entsteht. Dieses Dimethylcarbinol (IId) lieferte bei der Oxydation mit Bleitetraacetat einen Aldehyd (IIe), der bei der Dehydrierung mit alkalischem Silberhydroxyd in die α , α -Dimethyl- β -oxypropionsäure (IIIf) überging. Die obigen Formelbilder veranschaulichen diese Reaktionen; durch sie wird die Struktur des aus der Pantothenensäure erhaltenen Oxylaktons im Sinne der Formel (II) bewiesen.



Es stellt das linksdrehende Lakton der rechtsdrehenden α , γ -Dioxy- β , β -dimethyl-buttersäure dar [STILLER, KERESZTESY und FINKELSTEIN (43); vgl. MITTERMAIR (43a)].

Auch das Oxylakton II war, allerdings in seiner racemischen Form, schon bekannt und bereits 1904 von GLASER synthetisiert worden (44). Die Entscheidung, welcher sterischen Reihe das linksdrehende (biologisch aktive) Lakton angehört, ist von REICHSTEIN u. a. auf Grund der Drehung des Phenylhydrazons (45) und von PARKE am Amid (46) gefällt worden. Beide Derivate sind stark rechtsdrehend, so daß dem biologisch aktiven Spaltstück nach der HUDSONSchen Regel die d -Konfiguration zukommt.

Im Molekül der natürlichen, rechtsdrehenden Pantothenensäure (III) sind die Spaltstücke I und II säureamidartig miteinander verknüpft. Nach KUHN und WIELAND kann auch eine cyclische Formel in Betracht gezogen werden (47).



IV. Synthesen.

Noch vor der Aufklärung der Konstitution war von WOOLLEY eine Partialsynthese der Pantothenensäure ausgeführt worden (48). Er brachte das bei der alkalischen Spaltung entstandene N-freie Spaltstück nach Acetylierung und Behandlung mit Thionylchlorid mit β -Alanin-äthylester zur Reaktion und erhielt nach Verseifung mit alkoholischer Natronlauge ein stark wirksames Präparat des Hühner-Antidermatitis-Faktors zurück. Auch WILLIAMS war 1939 eine Partialsynthese der Pantothenensäure geglückt, wobei die bei saurer Spaltung erhaltene, noch unbekannt

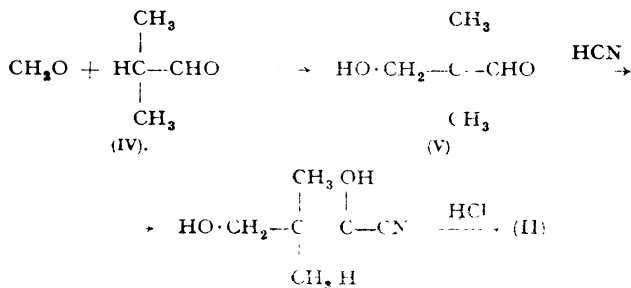
Laktonkomponente mit β -Alaninester umgesetzt und durch Verseifen mit 0,3 n-Sodalösung eine aktive Säure (Wachstum von *Streptobacterium lactis E*) zurückgewonnen wurde (49). Nach der Konstitutionsaufklärung stellten sich einer Totalsynthese keine erheblichen Schwierigkeiten entgegen. Zunächst wurden die beiden Spaltstücke dargestellt, welche dann auf verschiedene Weisen säureamidartig miteinander verknüpft werden konnten.

1. Synthesen von β -Alanin und seinen Estern.

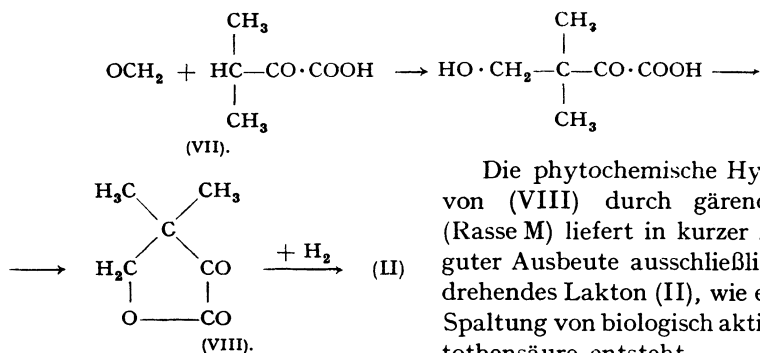
Die klassische Darstellungsweise des β -Alanins durch HOFMANNschen Abbau des Succinimids (50) ist in neuester Zeit durch einfachere Synthesen überholt. Wie RUGGLI und BUSINGER zeigen konnten, liefert die katalytische Hydrierung von cyanessigsäurem Kalium in methyllalkoholischem oder wäßrigem Ammoniak mit RANEY-Nickel bei 90—150 at und 80° die Aminosäure in 75%iger Ausbeute (51). Schon vorher hatte WEYGAND den Ester des β -Alanins durch katalytische Hydrierung von Cyanessigestern in Eisessig-Schwefelsäure mit Platinoxid bei 40 at und 20—30° in 74%iger Ausbeute erhalten (52). Der Methylester entsteht außerdem, wenn man β -Alanin mit ätherischer Diazomethanlösung unter Zusatz von etwas Wasser unter Rühren methyliert [WEINSTOCK und MAY (53)].

2. Synthesen des α -Oxy- β,β -dimethyl- γ -butyrolaktone.

Die Synthese des racemischen Laktone erfolgte in allen Arbeitskreisen im Prinzip nach den Angaben von GLASER, die von KOHN und NEUSTADTER verbessert worden waren (54). Dabei wird aus Isobutyraldehyd (IV) und Formaldehyd mit Hilfe des Kondensationsmittels Kaliumcarbonat der α,α -Dimethyl- β -oxypropionaldehyd (V) bereitet, der dann (als Bisulfitverbindung) mit KCN, besser bei 30—70° als in der Kälte (55), in das Cyanhydrin (VI) übergeführt wird. Die Verseifung von (VI) kann nach GLASER durch Erhitzen mit Salzsäure (44), nach REICHSTEIN (32) sowie CARTER und NEY (56) aber auch in einer Stufe mit der Cyanhydrinbildung durch Calciumchloridlösung erfolgen:



Einen anderen Weg zur Synthese von (II), der vermutlich der Bildung dieses Laktons in der Zelle nahe kommt, beschrieben KUHN und WIELAND (57). Dimethylbrenztraubensäure (VII), die im Organismus aus Valin bei Einwirkung von Aminosäuren-dehydrase entsteht, wird mit Formaldehyd und Pottasche zum Kaliumsalz der α -Keto- β,β -dimethyl- γ -oxybuttersäure kondensiert, die schon beim Ansäuern in der Kälte vollständig in das Ketolaktone (VIII) übergeht. Dieses läßt sich spielend leicht katalytisch zu (II) hydrieren:



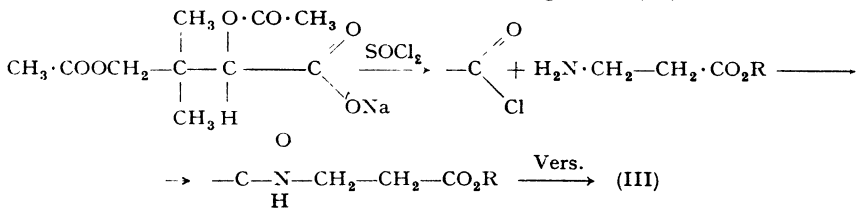
Die phytochemische Hydrierung von (VIII) durch gärende Hefe (Rasse M) liefert in kurzer Zeit und guter Ausbeute ausschließlich linksdrehendes Laktone (II), wie es bei der Spaltung von biologisch aktiver Pantothensäure entsteht.

Spaltung des racemischen α -Oxy- β,β -dimethyl- γ -butyrolaktone in die optischen Antipoden.

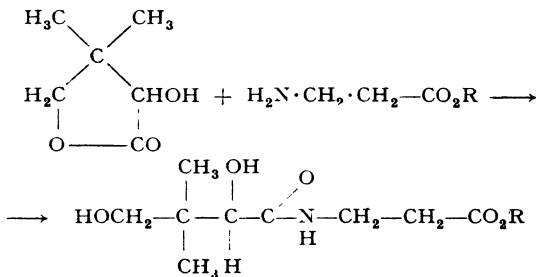
Um vom racemischen Laktone (II) zur linksdrehenden Form zu kommen, bedient man sich der verschiedenen großen Löslichkeiten der Chininsalze der Antipoden [REICHSTEIN (32), KUHN und WIELAND (58), STILLER und Mitarbeiter (59)], von denen das der rechtsdrehenden „natürlichen“ Dioxysäure in Wasser bedeutend schwerer löslich ist und höher schmilzt (Schmelzpt. 189° , $[\alpha]_D^{25} = -130,5^\circ$ in Methanol) als das der Antipoden (Schmelzpt. $176-178^\circ$ $[\alpha]_D^{25} = -146^\circ$ in Methanol). Nach Zerlegung mit Natronlauge und Ausschütteln des Chinins mit Chloroform und Äther werden die Ansätze auf dem Wasserbad mit Säure erwärmt und dann die Laktone mit Äther kontinuierlich extrahiert. Die Reinigung der optisch aktiven Laktone erfolgt durch Vakuumdestillation, wobei sie unter 12 mm bei $125-130^\circ$ übergehen. Sie zeigen den Schmelzpt. $91-92^\circ$ und $[\alpha]_D^{25} = \pm 50^\circ$, während das Racemat bei $56-58^\circ$ schmilzt. Beim 18 stündigen Erhitzen des Na-Salzes der dem biologisch inaktiven (+)-Laktone zugrundeliegenden (-)-Dioxysäure in Wasser auf 150° tritt Racemisierung ein. Danach kann durch Spaltung mit Chinin der biologisch aktive Antipode neuerlich erhalten werden (59). Zur Aufspaltung wurden auch die Methoxyde des Chinins, Chinidins und Cinchonidins empfohlen [MAJOR und FINKELSTEIN (60)].

3. Verknüpfung der Spaltstücke.

Die für die Partialsynthese der Pantothensäure angewandte Methode der Verknüpfung ist von WOOLLEY auch zur Vereinigung der reinen synthetischen Komponenten benutzt worden (61). Dabei wird das Natriumsalz der Dioxysäure mit Essigsäure-anhydrid acetyliert und dann mit Thionylchlorid in das Säurechlorid übergeführt. Mit diesem wird β -Alanin in 2 n-NaOH unter Eiskühlung acyliert. Die Entacetylierung der entstandenen Acetyl-Pantothensäure erfolgt durch einstündiges Stehenlassen mit methanolischer Natronlauge, wonach das amorphe Natriumsalz mit Äther gefällt wird. Eine eingehende Untersuchung des Acetylierungsvorganges beim Laktone und der Eigenschaften der acetylierten Pantothensäure wurde von HARRIS angestellt (62).



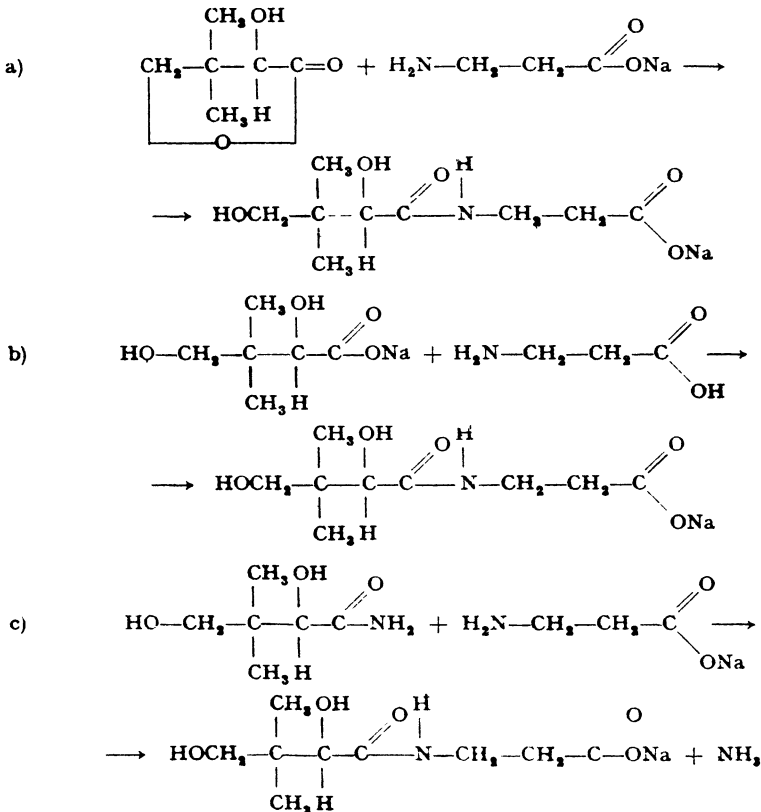
Einfacher verlaufen die Synthesen, die vom Laktone ausgehen und dieses in alkoholischer Lösung mit den stark basischen Estern des β -Alanins aufspalten, wobei die Amidbindung entsteht.

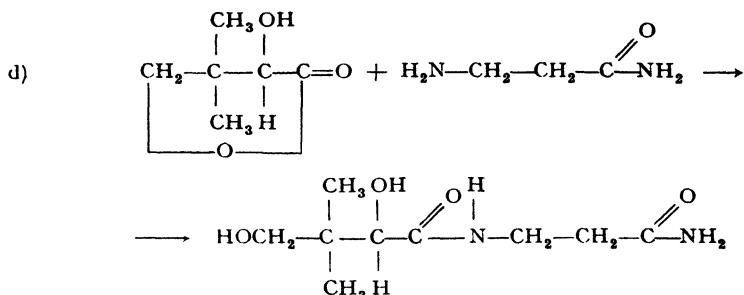


Als Ester kam der Benzylester des β -Alanins zur Verwendung, wobei die Verseifung des gebildeten Pantothensäure-Benzylesters durch katalytische Hydrierung erfolgte [KUHNS und WIELAND (58)], ferner der Methylester. In diesem Falle wird mit verdünnter Lauge bei Zimmertemperatur verseift [REICHSTEIN und GRÜSSNER (32), STILLER und Mitarbeiter (59)].

Noch einfacher ist es, die Laktonekomponente mit dem Natriumsalz des β -Alanins in wässriger [BABCOCK und JUKES (63)] oder alkoholischer Lösung [GÄTZI-FICHTER, REICH und REICHSTEIN (64); PARKE und LAWSON (46)] oder durch trockenes Verschmelzen [WILLIAMS und Mitarbeiter (65)] zu kondensieren (Reaktion a). Bei der Kondensation in

Äthanol oder Isopropanol findet eine so einheitliche Umsetzung statt, daß aus dem Reaktionsansatz mit aktivem Lakton das Natriumsalz der d-(+)-Pantothensäure in 91%iger Ausbeute auskristallisiert. Gleichzeitig hatten auch die Schweizer Autoren die Natriumsalze der Pantothensäureantipoden aus Alkohol mit Aceton oder Äther kristallinisch erhalten (64). Der Schmelzpunkt des Natrium-(+)-Pantothensats liegt bei 122°, die spez. Drehung in wäßriger Lösung bei +27—29°. Das kristallisierte Natriumsalz ist ziemlich hygroskopisch, eine unangenehme Eigenschaft, die dem grobkristallinen Calciumsalz in weit geringerem Maße zukommt. Dieses ist von LEVY, WEIJLARD und STILLER (66) durch Stehenlassen des schon früher beschriebenen mikrokristallinen hygroskopischen Calciumsalzes (59) in 99,5%igem Methanol in Nadeln erhalten worden und schmilzt bei 195—196°. Auch das kristallisierte Benzyl-thiuroniumsalz der rac. Pantothensäure vom Schmelzpt. 135—136° ist von STILLER und Mitarbeitern (59), das der l-Form (Schmelzpt. 145—146°) von den Schweizern (64) beschrieben worden.





Die Reaktionen b, c und d geben noch weitere Möglichkeiten zur Verknüpfung der Komponenten an, wie sie von PARKE (46) und REICHSTEIN (32) vorgeschlagen worden sind (67).

Aufspaltung der racemischen Pantothensäure.

Racemische Pantothensäure besitzt gegenüber der rechtsdrehenden nur die halbe Wirksamkeit. Die Spaltung in die optischen Antipoden gelingt über die kristallisierten Chininsalze (58, 32), wobei die biologisch aktive Form als leicht lösliches Chininsalz vom Schmelzpt. 136° und $[\alpha]_{\text{D}}^{19} = -95^\circ$ (Wasser), der Antipode als schwer lösliches Salz vom Schmelzpt. 183,5° und $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = -121^\circ$ (Wasser) erhalten wird. Durch Anwendung von Cinchonidin erreicht man eine Abscheidung der biologisch aktiven Form als in Aceton schwerer lösliches Salz vom Schmelzpt. 178–179° und $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -62,8^\circ$ (Wasser) [KUHN und WIELAND (68); STILLER und WILEY (69)]. Von den amerikanischen Autoren ist auch das Chinin-methohydroxyd zur Spaltung herangezogen worden, wobei nach fraktionierter Kristallisation mit Alkohol-Äther die wirksame Form in den schwer löslichen Fraktionen angereichert wird.

4. Biologische Synthese.

Über die vermutliche Biogenese der Laktonkomponente ist im Abschnitt IV, 2 berichtet. Die Aminosäure β -Alanin dürfte aus Asparaginsäure durch Decarboxylierung entstehen (70). Bei gewissen Heferassen entfaltet, wie schon erwähnt, β -Alanin eine der Pantothensäure ähnliche Wuchsstoffwirkung, allerdings in höherer Konzentration. Man nimmt an, daß die Aminosäure in der Zelle mit dem Dioxylacton zu Pantothensäure kondensiert wird. Die Vereinigung beider Komponenten unter biologischen Bedingungen gelang mit einem Präparat aus Hefe M, wobei Ammonium-Ionen aktivierend wirken (71).

Auch Versuche von NIELSEN (72) und HARTELIUS (36, 73) sprechen für die Richtigkeit der Annahme, daß die Wuchsstoffwirkung des β -Alanins die einer „Pro-pantothensäure“ ist. Die Atmung sowie auch

das Wachstum von Hefe (C. L. 1) läßt sich nämlich durch die dem β -Alanin strukturell sehr ähnliche β -Aminobuttersäure $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{COOH}$ in 1000 bzw. 10000mal dem Wuchsstoff überlegener Konzentration praktisch aufheben. Dabei scheint der Antagonist bei der Biosynthese der Pantothensäure das β -Alanin zu verdrängen, so daß die Pantothensäurebildung nicht zustande kommt. Demgemäß wird auch die durch fertige Pantothensäure erzielbare Wachstums- und Atmungssteigerung bei derselben Hefe durch β -Aminobuttersäure nicht hintangehalten.

V. Konstitutionsspezifität.

Über die Konstitutionsspezifität der Pantothensäure sind noch nicht genügend systematische Versuche angestellt worden. Es ergibt sich aber aus dem qualitativen Vergleich der biologischen Wirkung von pantothen-säureähnlichen Verbindungen, die in verschiedenen Laboratorien hergestellt worden sind, ein ungefähres Bild von den Atomgruppierungen, die zur biologischen Aktivität unbedingt erforderlich sind. Man kann die bis heute dargestellten Verbindungen in drei Gruppen einteilen: 1. solche, bei denen die Aminosäurekomponente, 2. solche, bei denen die Oxysäurekomponente, und 3. solche, bei denen jede Komponente von der Pantothensäurestruktur abweicht.

1. Verbindungen mit unveränderter Laktonkomponente.

Das α,γ -Dioxy- β,β -dimethyl-butyrolakton wurde mit α -Alanin, β -Aminobuttersäure, Asparaginsäure, Lysin, Leucin und Valin kondensiert (Literatur in der Tabelle). Alle Kondensationsprodukte hatten im Bakterientest keine Wirkung. Auch das Kondensationsprodukt mit Glykokoll wurde dargestellt [KÖGL (35)] und auf gärungsaktivierende Wirkung bei Hefe geprüft, zeigte aber im Gegensatz zu Pantothensäure keinen Effekt. Weiterhin wurde das Lakton mit dem Schwefelanalogen des β -Alanins, Taurin, zur Kondensation gebracht. Die aus dem d-(—)-Lakton gewonnene, als Chininsalz vom Schmelzp. 160—162° kristallisierte Säure zeigte keine Wachstumswirkung an Milchsäurebakterien, sondern wirkte als spezifischer Hemmstoff gegen Pantothensäure in einer Konzentration von 100 γ /ccm (Abb. 1 und 2). Diese Hemmwirkung ließ sich durch Erhöhung der Pantothensäurekonzentration im Wuchsmedium aufheben (Abb. 2). Die vom l-(+)-Lakton abgeleitete Verbindung (Chininsalz: Schmelzp. 179°) zeigte diese spezifische Hemmwirkung fast nicht [KUHN, WIELAND und MÖLLER (74)].

Auch Pantothensäure-ester sind der biologischen Prüfung unterzogen worden. Dabei stellte sich heraus, daß sie am Bakterium unwirksam sind, während der Organismus des Warmblüters zur Esterspaltung befähigt ist und daher auch die Ester als Wuchsstoffe verwenden kann (45).

2. Verbindungen mit unveränderter β -Alaninkomponente.

Dazu gehören unter anderen alle diejenigen Derivate der Pantothensäure, die sich durch Acylierung in der Laktonhälfte von ihr ableiten. Von diesen wurden dargestellt und auf Wuchsstoffwirkung geprüft:

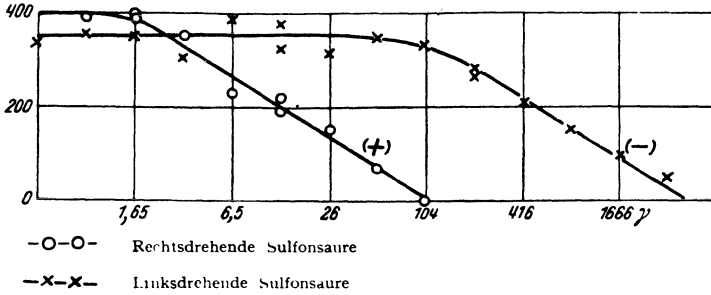


Abb. 1 Hemmung des Wachstums von *Streptobacterium plantarum* durch die rechts- und linksdrehende Sulfonsäure (Nr 25 in Tabelle 1). Ordinaten Ablesung an der Extinktionsskala des LANGE-Photometers (Skalenteile $\times 1000$) Abszissen γ -Sulfonsäure je Kubikzentimeter Nährlösung

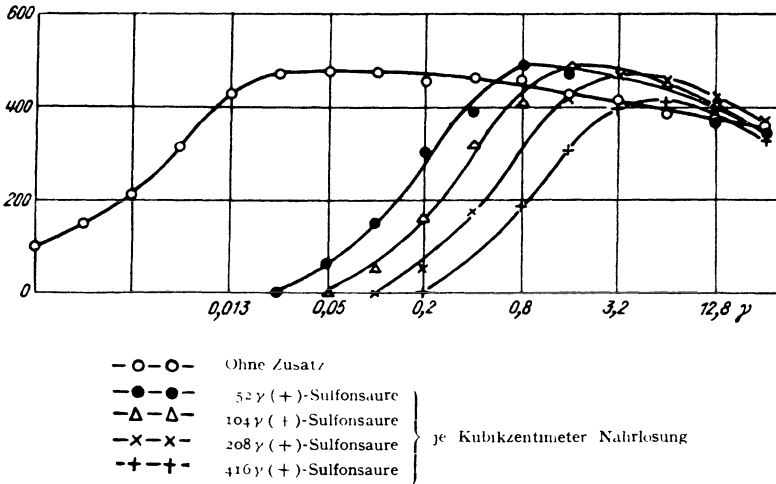


Abb. 2 Aufhebung der Hemmung durch (+)-Pantothensäure Ordinaten Ablesung an der Extinktionsskala des LANGE-Photometers (Skalenteile $\times 1000$) Abszissen γ (+)-Pantothensäure als Bariumsalz je Kubikzentimeter Nährlösung.

γ -Acetylpantothensäure und α -p-Nitrobenzoylpantothensäure (62). Die beiden Derivate sind im Bakterientest vollkommen inaktiv. Der Säugetierorganismus scheint jedoch die Entacetylierung bewerkstelligen zu können, da Acetylpantothensäure bei der Ratte als Wuchsstoff wirksam ist. Weiterhin hat WOOLLEY nach Umsetzung von Pantothensäure mit Phosphoroxchlorid in Pyridin ein amorphes Bariumsalz einer an

Tabelle I. Wirkung von Pantothen säureanalogen auf das Wachstum von Milchsäurebakterien.

Nr.	Aminosäure	Oxysäure	Autoren	Wachstum in Prozent
1	β -Alanin	α, γ -Dioxy- β, β -dimethyl-buttersäure	WOOLLEY (41), MITCHELL (76)	100 (0,02 γ /1 ccm) sehr schwach
2	β -Alanin	α, γ -Dioxy-valeriansäure	REICHSTEIN (32), MITCHELL u. a. (76)	
3	β -Alanin	α, δ -Dioxy-valeriansäure	REICHSTEIN (32), SUBBAROW u. RANE (24)	0
4	β -Alanin	α, γ -Dioxy- α -methylbuttersäure	MITCHELL (76)	1
5	β -Alanin	α, γ -Dioxy- β -methylbuttersäure	MITCHELL (76)	1
6	β -Alanin	α, β, γ -Trioxy-buttersäure	MITCHELL (76)	0
7	β -Alanin	α, γ -Dioxy-buttersäure	MITCHELL (76)	0
8	β -Alanin	α, γ -Dioxy- β -methyl- β -oxymethyl-buttersäure	MITCHELL (76), SNELL u. WILLIAMS (77)	20
9	β -Alanin	γ -Oxy- β, β -dimethyl-buttersäure	BARNETT u. ROBINSON (78)	0
10	β -Alanin	β, δ -Dioxy- γ, γ -dimethyl-valeriansäure	BARNETT u. ROBINSON (78)	0
11	β -Alanin	δ -Oxy- $\gamma, \alpha, \beta, \gamma, \gamma$ -dimethyl-dehydro-valeriansäure	BARNETT u. ROBINSON (78)	0
12	β -Alanin	γ -Oxy-buttersäure	BARNETT u. ROBINSON (78)	0
13	β -Alanin	γ -Oxy-valeriansäure	BARNETT u. ROBINSON (78)	0
14	β -Alanin	β, γ -Dioxy- β -methyl-buttersäure	HOFMANN-LA ROCHE (79)	+
15	β -Alanin	α -Oxo- γ -oxy- β, β -dimethyl-buttersäure	WIELAND u. MÖLLER (unveröffentlicht)	0
16	β -Alanin	α, γ -Dioxy- β -methyl- β -ethyl-buttersäure	WIELAND u. MÖLLER (unveröffentlicht)	mind. 50
17	β -Alanin	α, ϵ -Dioxy-capronsäure	WOOLLEY u. HUTCHINGS (80)	+
18	β -Alanin	α Amino- β, β -dimethyl- γ -oxybuttersäure	WIELAND u. MÖLLER (unveröffentlicht)	+
19	β -Alanin	unbekanntes Lakton $C_7H_{13}O_3$	WIELAND u. MÖLLER (unveröffentlicht)	—
20	β -Alanin	γ -Oxy-propan-sulfonsäure	KUHN u. WIELAND (47)	0
21	β -Alanin	δ -Oxy-butan-sulfonsäure	WIELAND u. MÖLLER (unveröffentlicht)	0
22	β -Alanin	γ -Oxy-isopentan-sulfonsäure	WIELAND u. MÖLLER (unveröffentlicht)	0
23	α -Alanin	α, γ -Dioxy- β, β -dimethyl-buttersäure	WEINSTOCK (81)	0
24	{ Asparagin- säure }	α, γ -Dioxy- β, β -dimethyl-buttersäure	WEINSTOCK (81)	0
25	Lysin	α, γ -Dioxy- β, β -dimethyl-buttersäure	WEINSTOCK (78), BARNETT (81)	0
26	Leucin	α, γ -Dioxy- β, β -dimethyl-buttersäure	KUHN, WIELAND (58), BARNETT, (78)	0
27	Valin	α, γ -Dioxy- β, β -dimethyl-buttersäure	BARNETT (78)	0
28	Taurin	α, γ -Dioxy- β, β -dimethyl-buttersäure	{ SNELL (82), KUHN, WIELAND u. MÖLLER (74), BARNETT (78)	0
29	Taurin	β, δ -Dioxy- γ, γ -dimethyl-valeriansäure	BARNETT (78)	0
30	Taurin	α -Oxo- β, β -dimethyl- γ -oxybuttersäure	BARNETT (78)	0
31	Taurin	γ -Oxy-propan-sulfonsäure	WIELAND u. MÖLLER (unveröffentlicht)	0
32	Taurin	δ -Oxy-butan-sulfonsäure	WIELAND u. MÖLLER (unveröffentlicht)	0
33	Taurin	γ -Oxy-isopentan-sulfonsäure	WIELAND u. MÖLLER (unveröffentlicht)	0

beiden Hydroxylgruppen phosphorylierten Pantothensäure dargestellt, das im Bakterientest auch keinerlei Wirkung hatte (75).

Wenn aus diesen Befunden schon hervorgeht, daß eine freies Hydroxyl in der α -Stellung zur biologischen Wirksamkeit notwendig ist, so wird das mit aller Deutlichkeit klar bei der Durchsicht aller Pantothensäure-Analogen, die durch Kondensation von verschiedenen Laktonen mit β -Alanin dargestellt worden sind. Diese Verbindungen sind u. a. in der Tabelle 1 aufgeführt.

Wie schon erwähnt, zeigt Verbindung Nr. 28 am Milchsäurebakterium eine spezifische, der (+)-Pantothensäure entgegengesetzte Wirkung. Eine solche kommt auch einigen anderen pantothensäureähnlichen Verbindungen zu, doch ist die Hemmungswirkung nicht in allen Fällen und an allen Mikroorganismen durch Pant thensäure aufhebbar. Eine systematische Untersuchung dieser Verhältnisse ist von McILWAIN ausgeführt worden (83).

Tabelle 2 Hemmungswirkung von Pantothensäureanalogen auf das Wachstum verschiedener Bakterien

Verb.- Nr. (Tab. 1)	Hemmung		
	Grad	Art	an
9	schwach	nicht aufhebbar durch Ps.	<i>Bact coli</i>
12	schwach	wie 9	<i>Streptococcus haemolyt</i> , <i>Corynebact diphtheriae</i> , <i>Bact coli</i> , <i>Staphylococc. aureus</i>
		teilweise aufhebbar	<i>Proteus vulgaris</i>
13	schwächer als 12	wie 12	wie 12
28	stark	aufhebbar	Milchsaurebakterien, Propionsaurebakterien, <i>Streptococcus haemolyticus</i> , <i>Diplococcus pneumoniae</i> , <i>Corynebact diphtheriae</i>
29	schwächer als 28	aufhebbar	<i>Streptococcus haemolyticus</i>

Nach IVANOVICS (84) ist auch die Wachstumshemmung, welche einige Bakterien (*Staphylococcus aureus*, *Bact. coli*) durch Salicylat erleiden, durch Pantothensäure aufhebbar. Hierbei soll die Salicylsäure auf die Biosynthese der Pantothensäure in diesen Mikroorganismen hemmend wirken, indem sie die Bildung des Laktons unterbindet.

Man sieht, daß die Anwesenheit der zwei geminalen Methylgruppen für die biologische Aktivität nicht unbedingt erforderlich ist. Eine „Pantothensäure“, deren eine Methylgruppe durch die CH₂OH-Gruppe

ersetzt war, zeigte im Bakterientest und auch im Rattenwachstumsversuch (85) starke Aktivität (Nr. 8 der Tabelle 1). Ebenso zeigte sich, daß die Säure, die man bei Kondensation von α -Oxy- β -methyl- β -äthyl- γ -butyrolakton mit β -Alanin-natrium erhält, bei *Streptobacterium plantarum* mindestens halb so wirksam ist wie Pantothen-säure (Nr. 16). Bemerkenswerterweise ist dasselbe Bakterium nicht imstande, eine α -ständige Ketogruppe in der N-freien Hälfte des Moleküls zur Hydroxylgruppe zu hydrieren, da die Verbindung Nr. 15 unwirksam ist. Ebenso wenig oder nur in ganz geringem Ausmaß vermag es eine α -ständige Aminogruppe gegen Hydroxyl auszutauschen (Nr. 18).

3. Verbindungen mit veränderter β -Alanin- und Dioxysäurekomponente.

Die bis heute synthetisierten Säuren Nr. 29—33 zeigen keine Wachstumswirkung. Wie es nach dem Unvermögen von *Streptobacterium plantarum*, die α -Keto-Gruppe zu hydrieren, vorauszusehen war, wirkt Nr. 30 auch nicht als Hemmstoff.

Die Verbindungen Nr. 20, 21, 22, 31, 32 und 33 wurden als Natriumsalze zum Test gebracht. Ihre Darstellung erfolgte durch Kondensation von β -Alanin-Natrium bzw. Taurin-Natrium in Methanol mit den inneren Anhydriden der Oxy-sulfonsäuren, den sog. *Sultonen*. Alle drei Sultone, das γ -Propan-sulton (Schmelzp. = 31° ; Kp._{12 mm} = 150°), δ -Butan-sulton (Schmelzp. 14° , Kp._{12 mm} = 150°) und γ -Isopentan-sulton (Kp._{12 mm} = 160° , genaue Struktur nicht bekannt) reagieren leicht bei Zimmertemperatur zu den verwendeten Natriumsalzen.

Die Liste der angeführten Verbindungen wird an den verschiedensten Forschungsstätten in Zukunft sicher noch erweitert werden, darf man doch durch systematische Spezifitätsuntersuchungen einen Einblick in den Wirkungsmechanismus der merkwürdig gebauten Pantothen-säure erhoffen.

VI. Nachweis und Bestimmung.

Da Pantothen-säure keine charakteristischen Fällungen oder Farbreaktionen gibt, gründet sich ihr Nachweis ausschließlich auf biologische Methoden. Als einfachste hat sich hier die nephelometrische Bestimmung der durch Zellvermehrung verschiedener Mikroorganismen entstandenen Trübung erwiesen (47, 86, 87), oder die Titration der durch die Milchsäurebakterien nach einer bestimmten Zeit gebildeten Säure (88, 89). Doch behalten nach SCHWARZ (10) auch die zeitraubenden Tierversuche ihren Wert, vor allem bei der Bestimmung des Pantothen-säuregehalts von Materialien, in denen der Wuchsstoff in hochmolekularer Bindung vorliegt, da er, wegen seiner Säure- und Alkalilabilität nicht durch Hydrolyse abgespalten werden kann. Aus der Leber eines frisch geschlachteten

Tieres ist er z. B. praktisch mit Wasser nicht extrahierbar, erst nach längerem Stehen wird er autolytisch abgespalten (90). Eine Diät, auf der junge Ratten nach einiger Zeit wirklich gewichtskonstant werden, ist von SCHWARZ angegeben worden.

Auch die deutliche Vermehrung der Retikulozytenzahl durch Pantothensäure im Blut von Ratten, die pantothensäurefrei ernährt waren, ein Effekt, der allerdings auch anderen Vitaminen zukommt, ist von REICHSTEIN (45) zur Prüfung der Pantothensäurewirkung herangezogen worden.

Literaturverzeichnis.

1. WILLIAMS, R. J. and E. BRADWAY: J Amer. chem. Soc. 53, 783 (1931). — WILLIAMS, R. J. and J. H. TRUESDAIL: J Amer. chem. Soc. 53, 4171 (1931).
2. — C. M. LYMAN, G. H. GOODYEAR, J. H. TRUESDAIL and D. HOLADAY: J. Amer. chem. Soc. 55, 2912 (1933).
3. SNELL, E. E., F. M. STRONG and W. H. PETERSON: Biochem. J. 31, 1789 (1937); J. Amer. chem. Soc. 60, 2825 (1938); J. Bacteriol. 38, 293 (1939). — KRAUSKOPF, E. J., E. E. SNELL and E. MCCOY: Enzymologia 7, 327 (1939).
4. MÖLLER, E. F.: Z. physiol. Chem. 260, 246 (1939)
5. JUKES, T. H. and S. LEPKOVSKY: J. biol. Chemistry 114, 117 (1936). — JUKES, T. H.: ebenda 117, 11 (1937).
6. MICKELSEN, O., H. A. WAISMAN and C. A. ELVEHJEM: J. biol. Chemistry 124, 313 (1938). — WOOLLEY, D. W., H. A. WAISMAN, O. MICKELSEN and C. A. ELVEHJEM: J. biol. Chemistry 125, 715 (1938).
7. JUKES, T. H.: J. Amer. chem. Soc. 61, 975 (1939).
8. SUBBAROW, Y. and G. H. HITCHINGS: J. Amer. chem. Soc. 61, 1615 (1939)
9. WILLIAMS, R. J., J. H. TRUESDAIL, H. H. WEINSTOCK jr., E. ROHRMAN, C. M. LYMAN and C. H. MCBURNEY: J. Amer. chem. Soc. 60, 2719 (1938).
10. SCHWARZ, K.: Z. physiol. Chem. 275, 232 (1942).
11. PFALTZ, H.: Z. Vitaminforsch. 12, 193 (1942).
12. MCKIBBIN, J. M., R. J. MADDEN, S. BLACK and C. A. ELVEHJEM: Amer. J. Physiol. 128, 102 (1939).
13. SPIES, T. D., S. STANBERY, R. J. WILLIAMS, T. H. JUKES and S. H. BABCOCK: J. Amer. med. Assoc. 115, 523 (1940).
14. BAUERNFEIND, J. C. and L. C. NORRIS: Science (New York) 89, 416 (1939).
15. PHILLIPS, P. H. and R. W. ENGEL: J. Nutrit. 18, 227 (1939).
16. CYÖRGY, P. and C. E. POLING: Science (New York) 92, 202 (1940). — UNNA, K. and W. L. SAMPSON: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 45, 309 (1940). — LUNDE, G., H. KRINGSTAD u. E. JANSEN: Naturwiss. 29, 62 (1941). — SCHWARZ, K.: Z. physiol. Chem. 275, 245 (1942). In dieser Arbeit findet sich eine vollständige Literaturzusammenstellung bis 1. I. 1942.
17. MORGAN, A. F. and H. D. SIMMS: Science (New York) 89, 565 (1939); J. Nutrit. 19, 233 (1940). — DAFT, F. S., W. H. SEBRELL, S. H. BABCOCK and T. H. JUKES: Publ. Health Rep. (Am.) 55, 1333 (1940). — AUHAGEN, E.: Medizin und Chemie, Bd. IV, S. 385. Verlag Chemie, 1942.
18. DAFT, F. S. and W. H. SEBRELL: Publ. Health Rep. (Am.) 54, 2247 (1939).
19. SALMON, W. D. and R. W. ENGEL: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 45, 621 (1940).
20. TATUM, E. L.: Proc. nat. Acad. Sci. USA 25, 490 (1939).
21. ELLIOT, A. M.: Biologic. Bull. 68, 82 (1935).
22. MCBURNEY, G. H., W. B. BOLLEN and R. J. WILLIAMS: Proc. nat. Acad. Sci. USA 21, 301 (1935).

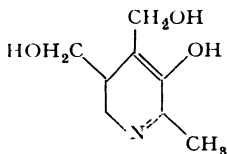
23. BONNER, J. and G. AXTMANN: Proc. nat. Acad. Sci. USA **23**, 453 (1937).
24. SUBBAROW, Y. and L. RANE: J. Amer. chem. Soc. **61**, 1616 (1939). — Mc ILWAIN, H.: Brit. J. exp. Pathol. **20**, 330 (1939). — WOOLLEY D. W. and B. L. HUTCHINGS: J. Bacteriol. **38**, 285 (1939).
25. RANE, L. and Y. SUBBAROW: J. biol. Chemistry **134**, 455 (1940).
26. MUELLER, J. H. and P. A. MILLER: J. biol. Chemistry **140**, 933 (1941).
27. TAMURA, J. T., A. A. TYTELL, M. J. BOYD and M. A. LOGAN: J. Bacteriol. **42**, 148 (1941).
28. MUELLER, J. H. and A. W. KLOTZ: J. Amer. chem. Soc. **60**, 3086 (1938). — EVANS, W. C., W. R. C. HANDLEY and F. C. HAPPOLD: Brit. J. exp. Pathol. **20**, 396 (1939).
29. BERKMAN, S., F. SAUNDERS and S. A. KOSER: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **44**, 68 (1940).
30. KOSER, S. A., B. B. BRESLOVE and A. DORFMAN: J. infect. Diseases **69**, 114 (1941).
31. EVANS, W. C., F. C. HAPPOLD and W. R. C. HANDLEY: Brit. J. exp. Pathol. **20**, 41 (1939). — PELCZAR jr., M. J. and J. R. PORTER: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **43**, 151 (1940); **47**, 3 (1941); J. biol. Chemistry **139**, 111 (1941).
32. REICHSTEIN, T. and A. GRÜSSNER: Helv. chim. Acta **23**, 650 (1940).
33. PRATT, E. F. and R. J. WILLIAMS: J. gen. Physiol. (Am.) **22**, 637 (1939).
34. KÖGL, F. u. W. A. J. BORG: Z. physiol. Chem. **269**, 97 (1941).
35. HARTELIUS, V.: Naturwiss. **30**, 660 (1942).
36. HARTELIUS, V.: Naturwiss. **31**, 139 (1943).
37. HILLS, G. M.: Chem. Industries **60**, 220 (1941).
38. DORFMAN, A., S. BERKMAN and ST. A. KOSER: J. biol. Chemistry **144**, 393 (1942); vgl. auch G. M. HILLS, Biochemic. J. **37**, 418 (1943).
- 38a. PILGRIM, F. J., A. E. AXELROD and C. A. ELVEHJEM: J. biol. Chemistry **145**, 237 (1942).
39. WILLIAMS, R. J., W. A. MOSHER and E. ROHRMAN: Biochemic. J. **30**, 2036 (1936).
40. WEINSTOCK, H. H., H. K. MITCHELL, E. F. PRATT and R. J. WILLIAMS: J. Amer. chem. Soc. **61**, 1421 (1939).
41. WOOLLEY, D. W.: Science (New York) **91**, 245 (1940).
42. WILLIAMS, R. J. and R. T. MAJOR: Science (New York) **91**, 246 (1940).
43. STILLER, E. T., J. C. KERESZTESY and J. FINKELSTEIN: J. Amer. chem. Soc. **62**, 1779 (1940).
- 43a. MITTERMAIR, J.: Angew. Chem. **54**, 51 (1941).
44. GLASER, E.: Mh. Chem. **25**, 46 (1904).
45. GRÜSSNER, A., M. GÄTZI-FICHTER u. T. REICHSTEIN: Helv. chim. Acta **23**, 1276 (1940).
46. PARKE, H. C. and E. J. LAWSON: J. Amer. chem. Soc. **63**, 2869 (1941).
47. KUHN, R. u. TH. WIELAND: Ber. dtsh. chem. Ges. **73**, 962 (1940).
48. WOOLLEY, D. W., H. A. WAISMAN and C. A. ELVEHJEM: J. Amer. chem. Soc. **61**, 977 (1939).
49. WILLIAMS, R. J.: Science (New York) **89**, 486 (1939).
50. HOOGWERFF, M. M. S. u. W. A. VAN DORP: Recueil Trav. chim. Pays-Bas **10**, 5 (1891).
51. RUGGLI, P. u. A. BUSINGER: Helv. chim. Acta **25**, 35 (1942).
52. WEYGAND, F.: Ber. dtsh. chem. Ges. **74**, 256 (1941).
53. WEINSTOCK jr., H. H. and E. L. MAY: J. Amer. chem. Soc. **62**, 3266 (1940).
54. KOHN, M. u. V. NEUSTADTER: Mh. Chem. **39**, 293 (1918).
55. Hoffmann-La Roche & Co: Patent C **1942 I**, 1534.

56. CARTER, H. E. and L. F. NEY: J. Amer. chem. Soc. **63**, 312 (1941).
57. KUHN, R. u. TH. WIELAND: Ber. dtsh. chem. Ges. **75**, 121 (1942).
58. — — Ber. dtsh. chem. Ges. **73**, 971, 1134 (1940).
59. STILLER, E. T., ST. A. HARRIS, J. FINKELSTEIN, J. C. KERESZTESY and K. FOLKERS: J. Amer. chem. Soc. **62**, 1785 (1940).
60. MAJOR R. T. and J. FINKELSTEIN: J. Amer. chem. Soc. **63**, 1368 (1941).
61. WOOLLEY, D. W.: J. Amer. chem. Soc. **62**, 2251 (1940).
62. HARRIS, ST. A., G. A. BOYACK and K. FOLKERS: J. Amer. chem. Soc. **63**, 2662 (1941).
63. BABCOCK, S. H. and T. H. JUKES: J. Amer. chem. Soc. **62**, 1628 (1940).
64. GATZI-FICHTER, M., H. REICH u. T. REICHSTEIN: Helv. chim. Acta **24**, 185 (1941).
65. WILLIAMS, R. J., H. K. MITCHELL, H. H. WEINSTOCK and E. E. SNELL: J. Amer. chem. Soc. **62**, 1784 (1940).
66. LEVY, H., J. WEIJLARD and E. T. STILLER: J. Amer. chem. Soc. **63**, 2846 (1941).
67. Merck & Co. Patent Ver. St. A. C. **1942** II, 2294.
68. KUHN, R. u. TH. WIELAND: Ber. dtsh. chem. Ges. **74**, 218 (1941).
69. STILLER, E. T. and P. F. WILEY: J. Amer. chem. Soc. **63**, 1237 (1941).
70. VIRTANEN, A. L. and T. LAINE: Biochem. J. **33**, 412 (1939).
71. WIELAND, TH. u. E. F. MÖLLER: Z. physiol. Chem. **269**, 227 (1941); **272**, 232 (1942).
72. NIELSEN, N.: Naturwiss. **31**, 146 (1943); NIELSEN, N. u. G. JOHANSEN: ebenda **31**, 235 (1943).
73. HARTELIUS, V.: Naturwiss. **31**, 440 (1943).
74. KUHN, R., TH. WIELAND u. E. F. MÖLLER: Ber. dtsh. chem. Ges. **74**, 1605 (1941).
75. WOOLLEY, D. W.: J. biol. Chemistry **134**, 461 (1940).
76. MITCHELL, H. K., H. H. WEINSTOCK, E. E. SNELL, S. R. STANBERY and R. J. WILLIAMS: J. Amer. chem. Soc. **62**, 1776 (1940).
77. MITCHELL, H. K., E. E. SNELL and R. J. WILLIAMS: J. Amer. chem. Soc. **62**, 1791 (1940).
78. BARNETT, J. W. and F. A. ROBINSON: Biochem. J. **36**, 357 (1942).
79. Hoffmann-La Roche & Co.: Patent C. **1942** II, 2176.
80. WOOLLEY, D. W. and B. L. HUTCHINGS: J. Bacteriol. **38**, 285 (1939); **39**, 287 (1940).
81. WEINSTOCK jr, H. H., E. L. MAY, A. ARNOLD and D. PRICE: J. biol. Chemistry **135**, 343 (1940).
82. SNELL, E. E.: J. biol. Chemistry **139**, 975 (1941); **141**, 121 (1941).
83. McILWAIN, H.: Biochemic. J. **36**, 417 (1942).
84. Ivánovics, G.: Z. physiol. Chem. **276**, 33 (1942).
85. ZSCHIESCHE, E. and H. K. MITCHELL: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **45**, 565 (1940).
86. PENNINGTON, D., E. E. SNELL and R. J. WILLIAMS: J. biol. Chemistry **135**, 213 (1940).
87. NIELSEN, N., V. HARTELIUS u. G. JOHANSEN: Naturwiss. **31**, 550 (1943).
88. STANBERY, S. R., E. E. SNELL and T. D. SPIES: J. biol. Chemistry **135**, 353 (1940).
89. STRONG, F. M., R. E. FEENEY and A. EARLE: Ind. Engng. Chem., Analyt. Edit. **13**, 566 (1940).
90. WILLIAMS, R. J.: Enzymologia **9**, 387 (1940/41)

Das Vitamin B₆.¹

I. Einleitung.

Die pellagraähnliche Dermatitis der Ratte, welche durch Mangelernährung hervorgerufen werden kann, sollte nach GOLDBERGER (1) ein Analogon der menschlichen Pellagra sein. GYÖRGY, KUHN und WAGNER-JAUREGG (2) konnten 1933 zeigen, daß die Antipellagra-Faktoren für Ratte und Mensch nicht identisch sind; nach BIRCH, GYÖRGY und HARRIS (3) sind jene auch von dem „black-tongue-Faktor“, den der Hund benötigt, verschieden. GYÖRGY (4) erkannte, daß der für die Ratte neben Lactoflavin nötige Wirkstoff eine bis dahin unbekannte, wasserlösliche und hitzestabile Komponente der Vitamin B-Gruppe ist. Er nannte den vom Lactoflavin verschiedenen



Antidermatitis- bzw. Antiacrodynie-Faktor erstmals Vitamin B₆. Dieses erwies sich als identisch mit dem Faktor Y von CHICK und COPPING (5) und dem Faktor I von LEPKOVSKY, JUKES und KRAUSE (6). KUHN und WENDT (7) wählten den Namen *Adermin* (= antidermatitisches Vitamin), während GYÖRGY und ECKARDT (8) *Pyridoxin* bevorzugen, da es auch eine durch B₂-Mangel bedingte Rattendermatitis gibt. Seitdem die chemische Konstitution durch Abbau und Synthese sichergestellt ist, meint man mit Vitamin B₆ (*Adermin*, *Pyridoxin*) stets das *2-Methyl-3-oxo-4,5-bis(oxyethyl)-pyridin*.

II. Physiologie.

B₆-Mangelercheinungen wurden zuerst bei der Ratte beobachtet und genau studiert. Es kommt zur Ausbildung einer spezifischen Dermatitis [GYÖRGY (9), ANTOPOL und UNNA (10)], zur Verfettung der Leber [HALLIDAY (11)], zu nervösen Störungen und Wachstumsstillstand. Die Fortpflanzungsfähigkeit der männlichen Tiere ist gestört [EMERSON und EVANS (12)]. Bei lang andauernder B₆-freier Ernährung treten epileptische Anfälle auf [CHICK, EL-SADR und WORDEN (13)]. Will man nicht nur die Dermatitis heilen, sondern auch normales Wachstum der Tiere erzielen, so ist dazu neben dem Vitamin B₆ der sog. „Filtratfaktor“, die Pantothen-säure, erforderlich [KUHN und WENDT (7), SALMON (14), RICHARDSON und HOGAN (15), GYÖRGY und ECKARDT (16)] bzw. der Reiskleiefaktor II von SUPPLEE, BENDER und KAHLBERG (17). Aus neueren Untersuchungen geht hervor, daß die Ratte das Vitamin B₆ zur Umwandlung von Protein in Fett braucht [MCHENRY und GAVIN (18)]. Setzt man die Tiere auf B₆-Mangeldiät, so werden Cholinmangelschäden erst nach

¹ Von IRMENTRAUT LOW, Heidelberg.

B₆-Zulage deutlich [nekrotische Nieren, Fettinfiltration der Leber, GYÖRGY und GOLDBLATT (19)]. Die Anfälligkeit gegenüber *Coccidium-injektion* kann durch B₁- und B₆-Zulagen herabgemindert werden [BECKER (20)]. Besonderes Interesse verdienen die Befunde von QUACKENBUSH, PLATZ und STEENBOCK (21), SCHNEIDER, STEENBOCK und PLATZ (22) und von BIRCH (23), wonach es für die durch B₆-Defizit hervorgerufene Dermatitis zwei voneinander unabhängige Heilfaktoren gibt: einmal das Vitamin B₆, zum anderen ungesättigte Fettsäuren und deren Ester, wie sie im Mais- und Baumwollsamensöl vorkommen, oder Linolsäureester [vgl. auch SALMON (24)]. Die Beobachtung von HALLIDAY (11), daß B₆-Mangeltiere Fette anhäufen, weist ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen dem Vitamin B₆ und dem Fettstoffwechsel hin [siehe auch GAVIN und MCHENRY (25), MACKAY und BARNES (26)].

Seit 1938 weiß man, daß B₆-Ausfallserscheinungen nicht auf die Ratte beschränkt sind. Auch bei höheren Säugetieren, vornehmlich bei Hund und Schwein, gibt es Krankheitsbilder, die auf B₆-Mangel zurückzuführen sind. Zum Unterschied von den Ratten handelt es sich in diesen Fällen nicht um Hautveränderungen, sondern in erster Linie um nervöse Störungen: bei Hund und Schwein treten Epilepsien auf unter gleichzeitiger Ausbildung einer mikrocytären, hypochromen Anämie [FOOTS, HELMER, LEPKOVSKY und JUKES (27), CHICK, MACRAE, MARTIN und MARTIN (28) und WINTROBE, MITCHELL und KOLB (29)]. Eingehende Untersuchungen über die B₆-Mangel-Anämie stammen von STREET, COWGILL und ZIMMERMANN (30), BORSON und METTIER (31) und MCKIBBIN, SCHAEFER, FROST und ELVEHJEM (32). Bei Kaninchen konnte eine Blutungsanämie durch B₆-Zufuhr erheblich gebessert werden [DÖLLKEN (33)]; die experimentelle Typhusanämie soll durch Vitamin B₆ heilbar sein [WOLF und SEIDEL (34)]. Gibt man Kaninchen gleichzeitig Glucose und Vitamin B₆, so wird keine Steigerung des Blutzuckerspiegels beobachtet [OHSHIMA (35)]. Über B₆-Mangelzustände bei Hühnern (langsames Wachstum, Krämpfe, die zum Tode führen können) berichtet JUKES (36).

Auch beim Menschen kennt man B₆-Ausfallserscheinungen. SPIES, BEAN und ASHE (37) konnten in manchen Fällen Pellagrapatienten, die mit Nicotinsäure geheilt worden waren, erst durch B₆-Gaben völlig beschwerdefrei machen. VILTER, SCHIRO und SPIES (38) gelang es, die makrocytäre Anämie bei Pellagrakranken und die perniciöse Anämie durch intravenöse oder perorale Zufuhr von Vitamin B₆ erheblich zu bessern. Gewisse hypochrome Anämien, wie sie nicht selten bei Patienten mit primärem oder sekundärem chronischem Gelenkrheumatismus beobachtet werden, können durch B₆-Zufuhr zum Verschwinden gebracht werden [STEPP, KÜHNAU und SCHRÖDER (39)]. WOLF und SEIDEL (34) konnten zwei Fälle menschlicher Typhusanämie heilen. SMITH und MARTIN (40) berichten von erfolgreicher Behandlung

menschlicher Cheilosis mit Vitamin B₆ in drei von vier Fällen. Nach SURE und FORD jr. (41) soll der Kreatinspiegel des Blutes von 30 auf 40% des Gesamtstickstoffs bei B₆-Mangel ansteigen. BAKER (42) konnte durch tägliche intravenöse Verabfolgung von 50—100 mg Vitamin B₆ nach zwei bis vier Wochen deutliche Besserung bei *Paralysis agitans* erzielen.

III. Verträglichkeit und Abbau im Tierkörper.

Aus verschiedenen Untersuchungen über die Verträglichkeit des Vitamins B₆ geht hervor, daß selbst große Dosen, z. B. 1 g/kg Körpergewicht, gut vertragen werden [UNNA (43), UNNA und ANTOPOL (44)]; per os, subcutan oder intravenös gegeben, ist es bei Maus, Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen und Hund unschädlich, parenteral in großen Dosen aber giftig [HEPDING und MOLL (45)]. Bei überreichlicher Zufuhr, z. B. 50 mg/kg Körpergewicht, wird es im Harn von B₆-Mangel-Ratten zu 50—70% wiedergefunden [SCUDI, KOONES und KERESZTESY (46), vgl. auch SCUDI, UNNA und ANTOPOL (47)]. B₆-Belastungsversuche am Menschen ergaben, daß von 50 mg bei Gesundheit zirka 8%, bei Pellagra, Beri-Beri und Lactoflavinmangel nur 0,5% und bei B₆-Mangelverdacht 0,2% mit dem Harn ausgeschieden werden [SPIES, LADISCH und BEAN (48), FLEXNER und CHASSIN (49)]. Über Abbauprodukte des Vitamins B₆ weiß man bisher nur sehr wenig. SCUDI, BUHS und HOOD (50) fanden im Harn von Mensch, Hund und Ratte neben unverändertem Vitamin B₆ solches, das an der OH-Gruppe in 3-Stellung mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure gepaart war; ein anderer Teil wurde von Mensch und Hund, nicht aber von der Ratte, an der CH₂OH-Gruppe in 4-Stellung verändert und ebenso wie das unveränderte Adermin. mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure gepaart ausgeschieden.

IV. Mikroorganismen und Pflanzen.

Das Vitamin B₆ ist für Milchsäurebakterien ein unentbehrlicher Wachstumsstoff; die optimale Konzentration beträgt 10⁻⁸ g/ccm [MÖLLER (51), MÖLLER, ZIMA, JUNG und MOLL (52) und MÖLLER und SCHWARZ (53)]. Es ist ein Wachstumsfaktor für *Streptococcus haemolyticus* [MCILWAIN (54) und HUTCHINGS und WOOLLEY (55)], ein Zuwachsfaktor für *Staphylococcus albus* [VILTER und SPIES (56)] und für das *Thermobacterium helveticum* [MÖLLER (51), SNELL und PETERSON (57)]. Die Wachstumsstoffwirkung bei Hefen wurde erstmals von MÖLLER (51) an einer untergärigen Heferasse aus Sauerkraut festgestellt; die optimale Konzentration wird schon mit 10⁻⁸ g/ccm erreicht; sie ist also etwa 100mal kleiner als die von den Milchsäurebakterien benötigte. SCHULTZ, ATKIN und FREY (58) und

WILLIAMS, EAKIN und SNELL (59) konnten die Ergebnisse von MÖLLER später für andere Heferassen, BENHAM (60) für *Pityrosporum ovale* und SCHOPFER (61) für *Rodotorula flava* bestätigen. Besonders eindrucksvoll ist die wachstumssteigernde Wirksamkeit des Vitamins B₆ bei gewissen Stämmen von *Ophiostoma ulmi* (BUISMAN) Nannf. [FRIES (62)]. Züchtet man diesen Organismus auf einem synthetischen Medium, welches Glucose, NH₄Cl und andere Nährsalze enthält, so gelingt es allein durch Zusatz von B₆ das Wachstum, welches ohne dieses Vitamin praktisch gleich null ist, derart anzuregen, daß nach 5 Tagen das Myceltrockengewicht von 0,1 mg auf 3,4 mg, bzw. bei Anwesenheit von dem für sich allein nur schwach stimulierend wirkenden Aneurin auf 4,5 mg zunimmt. Es ist dies bisher der einzige Fall, in welchem das Vitamin B₆ als „Solo-Wuchsstoff“ wirkt, denn bei den Milchsäurebakterien und den geprüften Heferassen werden außer B₆ stets noch andere Wuchsstoffe (Pantothensäure, Biotin, Lactoflavin u. a.) benötigt.

Die Fähigkeit von Mikroorganismen, Vitamin B₆ zu synthetisieren, ist für alle diejenigen anzunehmen, die imstande sind, auf B₆-freien synthetischen Nährböden zu wachsen. Für *Ustilago violacea* und *Phycomyces Blakesleeanus* wiesen dies JUNG und SCHOPFER [zit. bei SCHOPFER (61)] indirekt nach; sie erzielten durch Hinzufügen von Vitamin B₆ zum Nährmedium keinerlei Effekt. MCELROY und GOSS (63) wiesen dieses Vitamin in Pansen und Darm von Schafen, die angeblich B₆-frei ernährt worden waren, nach.

Zu überraschenden Ergebnissen kamen neuerdings SNELL, GUIRARD und WILLIAMS (64), als sie einen Bakterientest für Vitamin B₆ mit Hilfe des Milchsäurebakteriums *Streptococcus lactis* R ausarbeiten wollten. Sie fanden, daß in natürlichen pflanzlichen und tierischen Materialien neben Adermin ein B₆-Wirkstoff vorkommt, der im *Streptococcus lactis* R-Test 100—1000mal wirksamer ist als jenes. Dieses „*Pseudopyridoxin*“ ahnelt in seinem Verhalten gegenüber Adsorbentien und Elutionsmitteln, gegenüber Säuren und Basen, bei der Wanderung im elektrischen Feld, sehr dem Adermin. Nach Fütterung von Adermin tritt „*Pseudopyridoxin*“ im Harn auf. Daraus geht hervor, daß es sich um ein Abwandlungsprodukt des Vitamins B₆ handelt. Man ist geneigt anzunehmen, daß das Adermin bei *Streptococcus lactis* nur die Vorstufe des eigentlichen Wirkstoffs darstellt.

Die Frage, ob das Vitamin B₆ auch als ein pflanzlicher Wuchsstoff angesehen werden darf, ist noch nicht einwandfrei entschieden. Nach BONNER und BONNER (65) soll das Wachstum von Cosmos- und Senf-Pflanzen durch B₁, B₆ und Nicotinsäure gefördert werden. Das Adermin wirkt stimulierend auf das Wachstum von *Datura stramonium*, Sonnenblumen, isolierten Karotten und Tomatenwurzeln [BONNER (66)]. Im Gegensatz zu ROBBINS und SCHMIDT (67), DAY (68)

und BONNER und DEVIRIAN (69) verneint später WHITE (70) die wachstumsanregende Wirksamkeit des Vitamins B₆ für Tomatenwurzeln, wenn genügende Mengen Aneurin im Nährmedium vorhanden sind. Die I. G. Farbenindustrie A. G. hat sich das Vitamin B₆ als wurzel- und kalluswachstumsförderndes Mittel bei Stecklingen und Hülsen von Bohnen patentrechtlich schützen lassen (71).

V. Vorkommen.

Das Vitamin B₆ ist sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich weit verbreitet. Besonders reich an ihm sind Hefe, Weizenkeime, Mais, die Leber von Fischen und Warmblütern; in nennenswerten Mengen kommt es in Handelspepton, Kartoffeln, Spinat, Pintobohnen [LANTZ (72)], Salat, Grünkohl, Reis bzw. Reiskleie, weniger in Äpfeln, Birnen, Mehl und Eiern vor. Die in der Literatur zu findenden Mengenangaben, z. B. bei BIRCH, GYÖRGY und HARRIS (3), SCHNEIDER und STEENBOCK (73), LUNDE und KRINGSTAD (74) und LUNDE (75), wurden mit Hilfe biologischer Bestimmungsmethoden gewonnen und weichen zum Teil beträchtlich voneinander ab. Man hat besonders bei den zahlreichen Angaben über die Antiacrodyneaktivitäten von pflanzlichen Fetten, z. B. Weizenkeim-, Sojabohnen-, Baumwollsamensamen- und Leinsamenöl zu beachten, daß ungesättigte Fettsäuren B₆-sparend wirken, indem sie eine von B₆ unabhängige Heilwirkung auf die Rattenacrodyne ausüben (21, 22, 23, 24). Man muß also, streng genommen, zwischen der biologischen Aktivität eines Materials und seinem wahren Gehalt an der chemischen Verbindung Adermin unterscheiden. Solange man keine spezifischen chemischen Methoden zur B₆-Bestimmung benutzt, kann man nichts darüber aussagen, inwieweit sich die Größe der biologischen Aktivität mit der wirklich vorhandenen B₆-Menge deckt. BIRCH und GYÖRGY (76) und KUHN und WENDT (77) haben gefunden, daß das Adermin in tierischen und pflanzlichen Geweben nur zum kleinen Teil in freier Form vorliegt, die Hauptmenge ist hochmolekular an Protein gebunden (Adermin-Protein) und in dieser Form weder dialysierbar noch extrahierbar. Durch Wärmeeinwirkung wird es in prosthetische Gruppe und Eiweißträger gespalten. Man kann auch das natürliche Material vor der Extraktion autolyseren oder mit Papain behandeln.

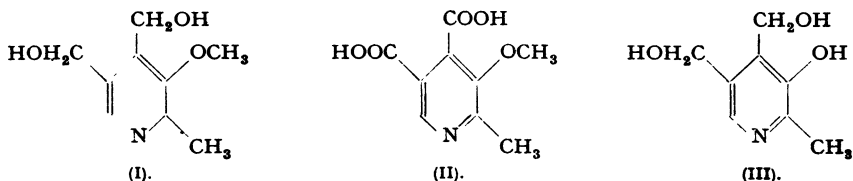
VI. Isolierung.

Die Gewinnung von kristallisiertem Vitamin B₆ gelang im Jahre 1938 fast gleichzeitig mehreren Arbeitskreisen: aus Hefe stellten es KUHN und WENDT (78) sowie GYÖRGY (79) dar, aus Reiskleie KERESZTESY und STEVENS (80), LEPKOVSKY (81) und ICHIBA und MACHI (82), aus Rinds-

leber und Melasse VAN SCHOOR (83). Der erste, welcher kristallisiertes Adermin in Händen hatte, jedoch ohne dessen biologische Bedeutung zu erkennen, war OHDAKE (84), dem bereits 1931 diese Verbindung als Nebenprodukt bei der Isolierung des Vitamins B₁ aus Reiskleie in die Hände gefallen war. Neuere eingehende Vorschriften über die B₆-Darstellung aus Reiskleie geben GREENE (85) und MATUKAWA (86) an. Die Isolierung von B₆-Protein beschreiben KUHN und WENDT (77) [vgl. auch I. G. Farbenindustrie A. G. (87)].

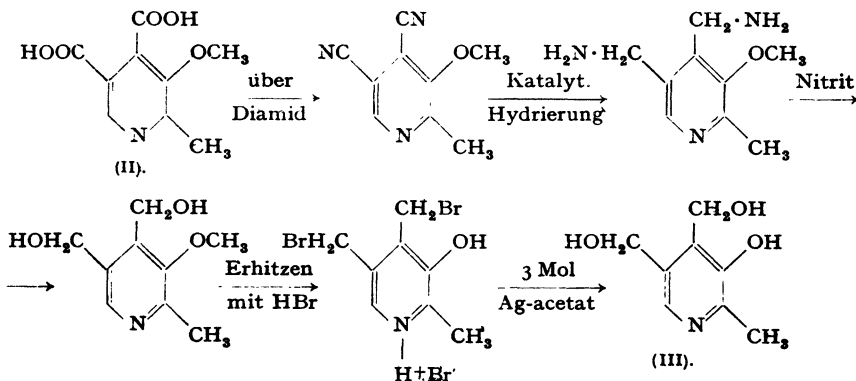
VII. Konstitution und Synthese.

Die Aufklärung der chemischen Konstitution des Adermins erfolgte 1939 kurz hintereinander durch KUHN und Mitarbeiter (88) in Deutschland, durch die Amerikaner STILLER, KERESZTESY und STEVENS (89) und HARRIS, STILLER und FOLKERS (90) und endlich durch die Japaner ICHIBA und MICHI (91). Alle drei Arbeitskreise erhielten durch Oxydation von B₆-O-Methyläther (I) mit Barium- bzw. Kaliumpermanganat eine Methoxy-picolindicarbonsäure; diese hat sich mit der auf synthetischem



Wege gewonnenen Dicarbonsäure (II) als identisch erwiesen. Damit war der chemische Aufbau des Adermins entsprechend (III) auf oxydativem Wege bewiesen.

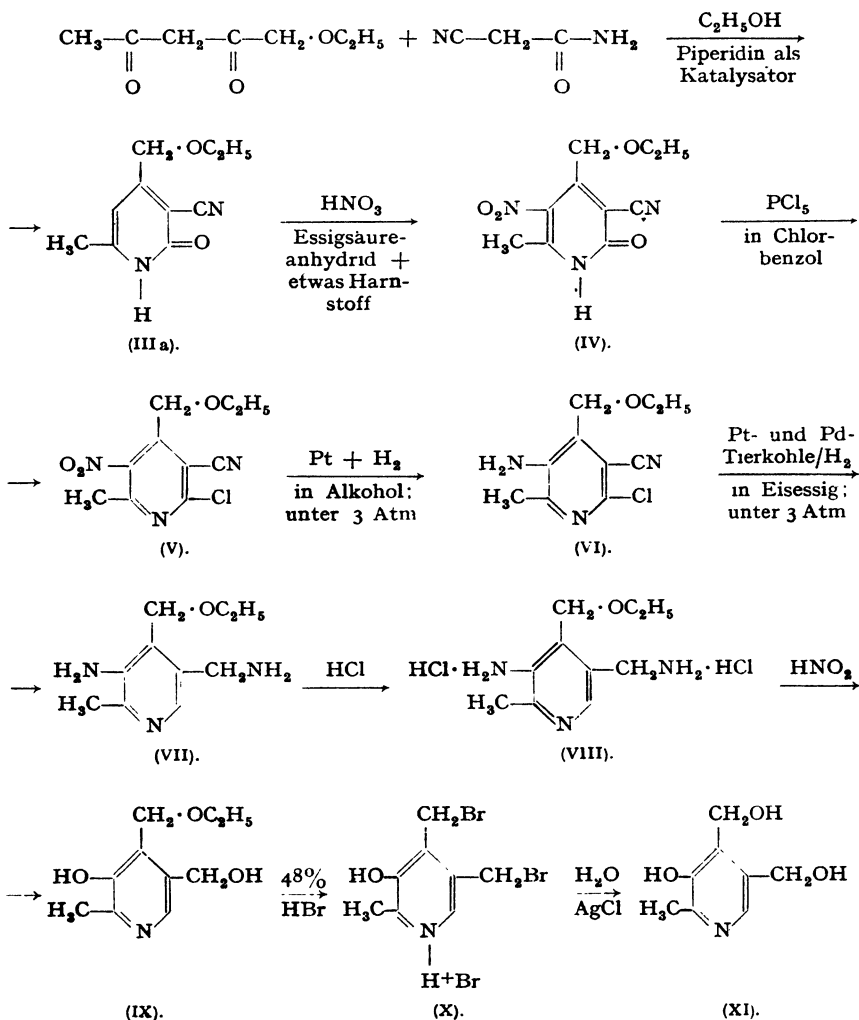
Der endgültige Beweis für die B₆-Formel (III) wurde schließlich durch Synthesen erbracht. KUHN, K. WESTPHAL, WENDT und O. WESTPHAL (92)



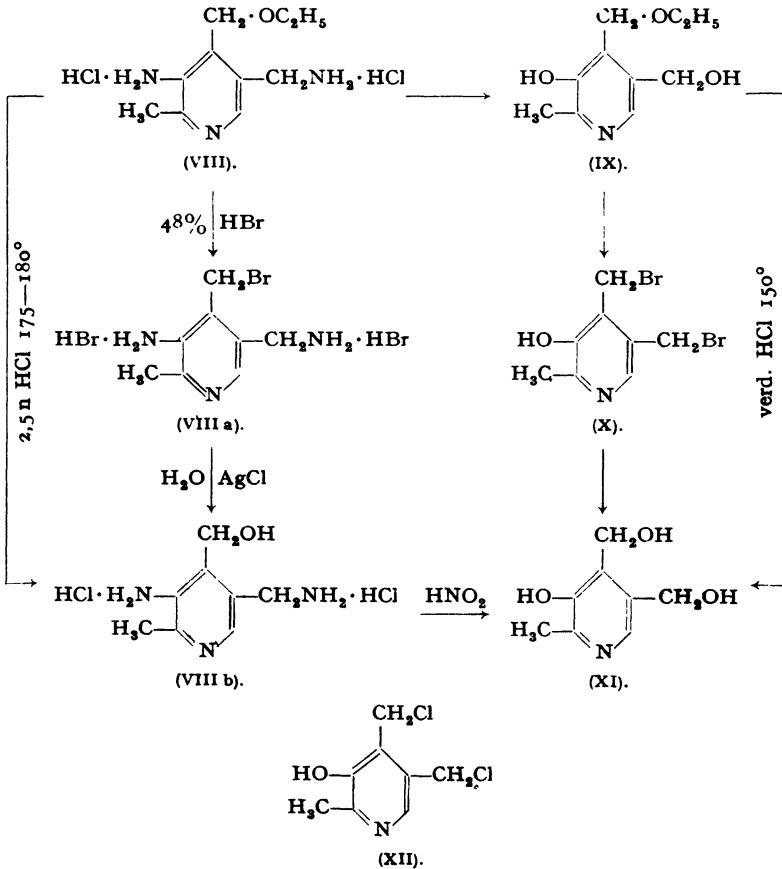
gingen von der 2-Methyl-3-methoxy-pyridin-4,5-dicarbonsäure (II) aus, welche mit dem auf oxydativem Wege aus B₆-O-Methyläther erhaltenen Produkt identisch war. Diese Säure wurde von ihnen aus 3 Methyl-4-methoxy-isochinolin über die Bz-Nitro- und Bz-Aminoverbindung durch Oxydation mit Kaliumpermanganat dargestellt. Der weitere Gang der Synthese ist aus dem Formelschema (S. 51, unten) ersichtlich.

Das synthetische Präparat war in allen Eigenschaften mit dem natürlichen Vitamin B₆ identisch.

HARRIS und FOLKERS (93) schlugen folgenden Weg ein:



Später berichten dieselben Autoren [HARRIS und FOLKERS (94)] über einige Verbesserungen ihrer Synthese: (IX) kann direkt in (XI) übergeführt werden. Die Äthoxygruppe von (IX) wird von verdünnter Salzsäure im Bombenrohr bei 150° gespalten, wodurch die Darstellung und Hydrolyse des Dibromids (X) überflüssig wird. Eine zweite Änderung stellt die Reaktionsfolge (VIII)—(VIII a)—(VIII b)—(XI) dar, die auch entsprechend (VIII)—(VIII b)—(XI) abgekürzt werden kann. Das Oxydiamin (VIII b) läßt sich leichter isolieren und kristallisieren als das 4-Äthoxyderivat (IX). Die Einwirkung von konzentrierter Salzsäure im Bombenrohr bei 132° auf (IX) liefert das Dichlorid (XII), welches dann leicht zum B₆-chlorhydrat hydrolysiert werden kann.



MORII und MAKINO (95) berichteten, daß ihnen die Synthese des Ademin-O-Methyläthers und des O-Äthyläthers geglückt sei. Der Gang

ihrer Synthese entspricht demjenigen, den die Amerikaner gewählt haben.

Die synthetischen Verfahren der Technik sind in zahlreichen Patenten niedergelegt [I. G. Farbenindustrie A. G. (96), E. Merck, Darmstadt (97), Merck u. Co.-Inc. U. S. A. (98), Hoffmann La Roche u. Co. A. G. (99)].

VIII. Eigenschaften.

Das Adermin-hydrochlorid besitzt die Summenformel $C_8H_{11}O_3N \cdot HCl$ (Mol.-Gew. 205,6). Es schmilzt bei $204-205^\circ$ [KUHN und WENDT (77)], $206-208^\circ$ [HARRIS und FOLKERS (93)], $209-210^\circ$ [ICHIBA und MICHl (82)]. Es kristallisiert aus Aceton-Salzsäure in Prismen (77).

Die freie Vitamin B_6 -Base $C_8H_{11}O_3N$ schmilzt bei $159-160^\circ$ und sublimiert in farblosen Kristallen bei $140-145^\circ/10^{-4}$ mm. Sie entsteht aus dem Chlorhydrat mit Natronlauge [STILLER, KERESZTESY und STEVENS (89)] oder Silberacetat [KÜHN und WENDT (88) und ICHIBA und MICHl (100)]. Durch Bestrahlen mit sichtbarem oder noch schneller mit UV-Licht wird die Wirksamkeit von Konzentraten zerstört [GYÖRGY (4)].

Das Spektrum des Adermins ist, wie aus der Abb. 3 hervorgeht, p_H -abhängig. In stark saurer Lösung ($p_H = 2,1$) weist es nur eine einzige

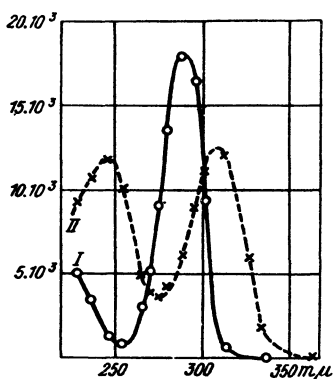


Abb. 3. Adermin-chlorhydrat
 $C_8H_{11}O_3N \cdot HCl$

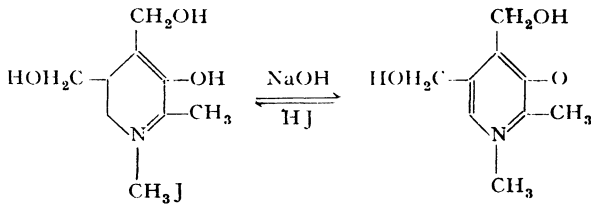
I in $1/10$ Salzsäure, II in $1/10$ Natronlauge.

Bande bei $\lambda_{max} = 291 m\mu$ auf; mit steigendem p_H verschwindet das eine Maximum, dafür werden zwei neue ausgebildet. Bei $p_H = 6,6$ findet man $\lambda_{max} = 255$ und $324 m\mu$. Im alkalischen Gebiet erleiden die beiden Maxima eine leichte Verschiebung nach $\lambda_{max} = 247 m\mu$ und $310 m\mu$ ($p_H = 10,2$) [STILLER, KERESZTESY und STEVENS (89) und HARRIS, WEBB und FOLKERS (101), Abb. 3].

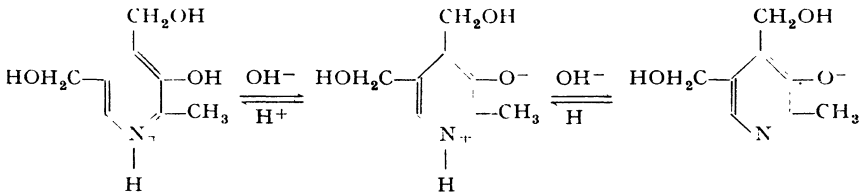
Das UV-Spektrum des N-Methyl-adermin-betains (B_6 -N-Methyläthers) zeigt in Übereinstimmung mit dem des Adermins im sauren Gebiet nur ein Absorptionsmaximum bei $295 m\mu$ ($p_H = 2,1$), im neutralen Gebiet zwei Maxima bei $256 m\mu$ und $330 m\mu$ ($p_H = 6,5$). Der B_6 -O-Methyläther besitzt im p_H -Bereich von 2—10 nur eine einzige Absorptionsbande bei $\lambda_{max} = 280 m\mu$. Es fällt auf, daß das Adermin in absolutem Alkohol im Gegensatz zu seiner neutralen wäßrigen Lösung ebenfalls nur eine Absorptionsbande bei $\lambda_{max} = 290 m\mu$ aufweist.

Bei der potentiometrischen Titration verbraucht das B_6 -Chlorhydrat

im p_H-Bereich von 3–11,5 zwei Äquivalente Lauge: Neutralisationspunkt des ersten Äquivalents liegt bei p_H = 6,8, Halbneutralisationspunkt bei p_H = 4,72; Neutralisationspunkt des zweiten Äquivalents bei p_H zirka 10–11, Halbneutralisationspunkt bei p_H = 8,96. Das B₆-Jodmethylat verbraucht im p_H-Bereich von 3–11,5 nur ein Äquivalent Lauge. Neutralisationspunkt der Lauge Titration liegt bei p_H = 6,5, Halbneutralisationspunkt bei p_H = 4,92. Die Säuretitration ist die Reversion der Lauge Titration. Das B₆-Jodmethylat geht somit in B₆-N-Methylbetain über.



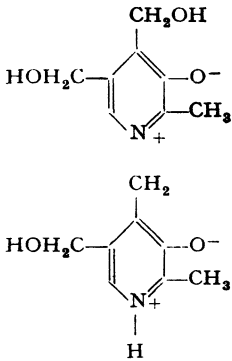
Entsprechend gelten für das Adermin in wässriger Lösung die Gleichgewichte:



Nur in saurer Lösung besitzt das Adermin echte β -Oxyppyridinstruktur. Dieser ist die einzige Absorptionsbande mit dem Maximum bei 291 m μ zuzuordnen, welche der β -Oxyppyridinbande $\lambda_{\max} = 282 \text{ m}\mu$ entspricht. In neutraler Lösung liegt es praktisch zu 100% als Zwitterion vor. In dieser Form besitzt es wie das B₆-N-Methylbetain zwei Absorptionsmaxima. Die geringe Verschiebung dieser beiden Absorptionsmaxima beim Übergang ins alkalische Gebiet ist auf die Ausbildung des Anions mit tertiärem Pyridinstickstoff zurückzuführen. In alkoholischer Lösung existiert das Adermin, wie aus der einzigen Absorptionsbande abzuleiten ist, vorwiegend in der β -Oxyppyridinform. Da aber bei der Methylierung mit Diazomethan sowohl O-Methyl- als auch N-Methyläther erhalten werden, dürfte es, wenn auch nur in verschwindend kleiner Menge, auch in Alkohol als Zwitterion vorhanden sein.

Die Zwitterionstruktur des Adermins in neutraler wässriger Lösung konnte durch dielektrische Messungen von KUHN, HAUSSER und LÖW (102) bestätigt werden $\frac{\Delta \epsilon}{\Delta c} = + 11,5$ (Wasser).

Die Besonderheit des Zwitterions B_6 gegenüber dem Kation in saurer und dem Anion in alkalischer Lösung drückt sich nicht nur im spektralen Verhalten, sondern auch in der chemischen Reaktionsfähigkeit aus. Erhitzt man eine neutrale wäßrige Aderminlösung etwa 15 Minuten lang auf 120° , so „dimerisiert“ sich das Adermin unter Austritt von einem



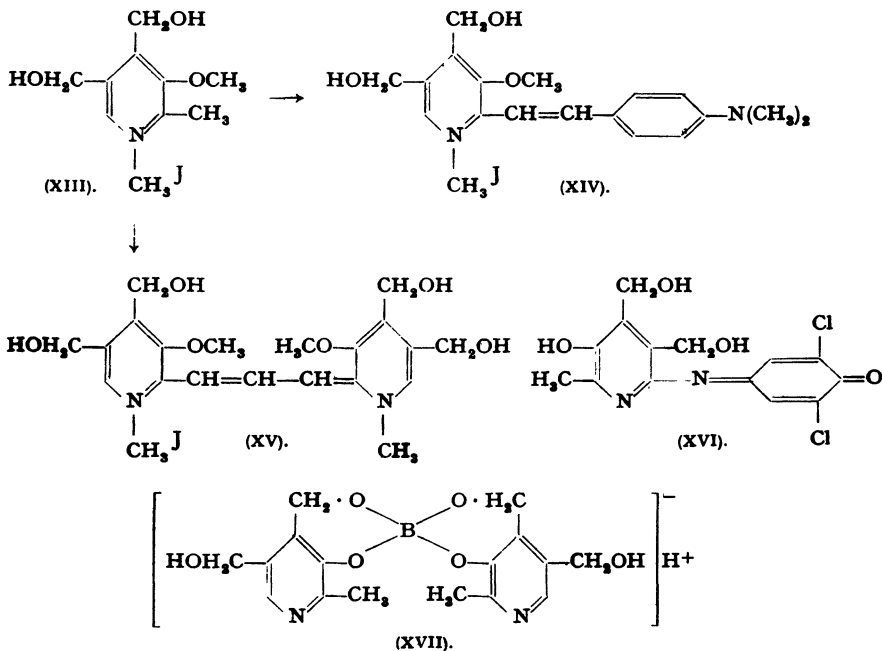
Molekül Wasser zu einer Verbindung $C_{16}H_{20}O_6N_2$, der die nebenstehende Formel zukommt. Dieses Produkt entsteht aber nur beim Erhitzen einer *neutralen* wäßrigen Lösung, in saurer oder alkalischer Lösung ist das Vitamin B_6 beständig [HARRIS (103)]. Weiteres über Abwandlungen des Aderminmoleküls (O- und N-Alkylierung, Acylierung, katalytische Hydrierung) siehe bei HARRIS, WEBB und FOLKERS (101), HARRIS (103, 104), KUHN und WENDT (88), I. G. Farbenindustrie A. G. (105). Die Synthese des 2-Äthyl-3-oxy-4,5-bis-(oxymethyl)-pyridins, das ein Homologes des Adermins ist, welches an Stelle der CH_3 -Gruppe in 2-Stellung einen

C_2H_5 -Rest enthält, wurde analog zur B_6 -Synthese von HARRIS und WILSON (106) durchgeführt.

Das Adermin wird aus saurer Lösung an Fullererde adsorbiert und mit Barytwasser eluiert. Mit Phosphorwolframsäure und Kieselschwefelsäure bildet es ein schwer lösliches Salz. Es ist in Wasser, Alkohol und Butanol leicht löslich, ist optisch inaktiv, gegenüber Säure und Alkali, salpetrige Säure, Äthylnitrat und FEHLINGSche Lösung auch in der Hitze beständig. Ein besonderes Interesse verdienen diejenigen chemischen Reaktionen, die für analytische Zwecke in Frage kommen: Als Derivat des β -Oxypyridins gibt das Adermin mit dem Phenolreagens nach FOLIN-DENIS eine tiefblaue, mit $FeCl_3$ eine rote Farbe. Da die p-Stellung zur phenolischen OH-Gruppe frei ist, kuppelt es mit diazotierter Sulfanilsäure unter Bildung eines roten Azofarbstoffes. Als α -Picolinderivat reagiert es nach der Verätherung der phenolischen OH-Gruppe mit Diazomethan und nach der Überführung dieses O-Methyläthers in die quartäre Pyridiniumverbindung (XIII) (durch Anlagerung von Jodmethyl, Dimethylsulfat oder p-Toluolsulfonsäureester an den Ringstickstoff) mit p-Dimethylamino-benzaldehyd zum gelben Styrylfarbstoff (XIV). Erhitzt man die Pyridiniumverbindung (XIII) kurz mit Chloroform und wäßriger 20%iger Kalilauge, oder versetzt man (XIII) mit einer alkoholischen Lösung von wenig Natrium und fügt Chloroform hinzu, so entsteht der violette Carbopyridincyaninfarbstoff (XV), das Adermin-violett [KUHN und Löw (107)].

Am wichtigsten ist die Indophenolblaureaktion, die das Adermin in schwach alkalischer wäßriger Lösung beim Versetzen mit 2,6-Dichlor

chinonchlorimid liefert [Formel (XVI)] [SCUDI, KOONES und KERESZTESY (46)]. Diese Reaktion findet aber nicht statt, wenn man zum p_H -Einstellen einen Boratpuffer benutzt. SCUDI, BASTEDO und WEBB (108) fanden, daß das Aderminmolekül mit Borsäure einen Komplex bildet, derart, daß sich zwei Moleküle B₆ mit einem Molekül Borsäure entsprechend Formel (XVII) vereinigen. Es genügen bereits 0,001% Borat, um



die Indophenolblaureaktion zu verhindern. Man kann also das Vitamin B₆ in Gegenwart anderer Phenole bestimmen, indem man einmal die Farb-reaktion in Boratpuffer ausführt (p_H etwa 7,5) und somit alle Phenole außer dem Adermin ermittelt. Eine zweite Bestimmung wird in Veronalpuffer durchgeführt. Die Differenz zwischen beiden Werten liefert den gewünschten B₆-Anteil.

IX. Nachweis- und Bestimmungsmethoden.

1. Biologische Verfahren.

Der *kurative Rattentest* stellt die weitaus am häufigsten angewandte Methode zur B₆-Bestimmung dar. Eine Vitamin B₆-Ratteneinheit ist diejenige Menge, die man einem Tier täglich zufüttern muß, um eine völlige Heilung der Rattendermatitis zu erzielen [GYÖRGY (4)]. Dieser

biologischen Einheit entsprechen 7,5 γ kristallisiertes Adermin-chlorhydrat, d. h., man muß etwa 21 Tage lang täglich 7,5 γ B₆-chlorhydrat zufüttern, um die Ausheilung der Acrodynie zu erreichen. In Gegenwart von Pantothensäure wird außerdem das Wachstum wieder normal [KUHN und WENDT (7, 77), GYÖRGY (79), LEPKOVSKY (81), ICHIBA und MICHl (82)].

Eine Modifizierung des kurativen Testes ist die *Stoßtherapie* von MOLL und SCHNITSPAHN (109). Eine einmalige Verabreichung von 100 γ Adermin-chlorhydrat bringt die Rattendermatitis im Laufe von 14 Tagen zum Abheilen. Nach WEIGAND, ECKLER und CHEN (110) [vgl. auch REEDMAN, SAMPSON und UNNA (111)] genügt ein Stoß von 40—60 γ B₆ (Base?), um innerhalb von zwei Wochen die Mehrzahl der Versuchstiere auszuheilen. Die für den kurativen Test und für die Stoßtherapie benötigten Mengen Adermin sind annähernd gleich. Daraus ist zu schließen, daß das Vitamin B₆ im Tierkörper recht gut fixiert wird, vermutlich als B₆-Protein.

Die Angaben von KARRER, LASZT und VERZAR (112), die Hauterscheinungen der Ratten, deren Grundkost von den Vitaminen der B-Gruppe nur Vitamin B₁ und B₂ enthält, könnten durch tägliche Gaben von 200 γ Lactoflavin-5-phosphorsäure in kurzer Zeit völlig geheilt werden, wurden von AUHAGEN und WENDT (113), die ein reines, synthetisches Präparat prüften, nicht bestätigt. Nach v. EULER, MALMBERG, ROBEZNIKS und SCHLENK (114) sollen Ratten, die neben 6 γ Aneurin und 10 γ Lactoflavin auch den an sich unwirksamen Filtratfaktor (Pantothensäure) erhalten, durch 1 mg Cozymase pro Tag ein normales Wachstum gebracht werden können. KUHN und WENDT (77) fanden aber, daß 1,0—1,25 mg Cozymase je Tag keinen Einfluß auf die Rattenacrodynie ausüben, d. h., diese Menge vermochte nicht 10 γ Adermin zu ersetzen.

CONGER und ELVEHJEM (115) bestimmten den Vitamin B₆-Gehalt durch die *Wachstumssteigerung*, die erzielt wird, wenn man B₆-Mangelratten, deren Grundkost Pantothensäure enthält, das Adermin zufüttert (geeignete Menge pro Tag und Tier 2—6 γ).

WILLIAMS, EAKIN und McMAHAN (116) haben einen *Hefewachstumstest* ausgearbeitet. Diese Methode liefert beträchtlich niedrigere B₆-Werte als die von CONGER und ELVEHJEM (115).

2. Chemische Verfahren.

SWAMINATHAN (117) bestimmte den B₆-Gehalt in verschiedenen natürlichen Materialien, indem er entweder den roten Azofarbstoff, der durch Kupplung des Adermins mit diazotierter Sulfanilsäure entsteht, oder die Blaufärbung, die das Vitamin B₆ mit dem Phenolreagens nach FOLIN und CIOCALTEU liefert, gegen eine Standardfarbstofflösung aus reinem Adermin colorimetriert. Da sowohl die Diazo- als auch die Phenol-

blaureaktion ganz allgemein von Phenolen gegeben werden, muß vor der eigentlichen Bestimmung das zu untersuchende Material in geeigneter Weise aufgearbeitet werden, um störende Begleitsubstanzen zu entfernen. Zugesetztes Adermin wurde zu 70—100% wiedergefunden; die untere Nachweisbarkeitsgrenze liegt bei 10 γ Adermin.

Das wichtigste colorimetrische Bestimmungsverfahren ist das von SCUDI, KOONES und KÉRESZTESY (46). Ihm liegt die GIBBSche Indophenolblaureaktion zugrunde. Man nimmt 1 Vol. Veronalpuffer vom $p_H = 7,6$ (aber nicht Boratpuffer), 4 Vol. einer butanolischen Lösung von 2,6-Dichlorchinonchlorimid und gibt beides zu 1 Vol. der Vitaminlösung vom $p_H = 7,0-7,5$. Die sich innerhalb von 45 Minuten ausbildende Blaufärbung $\lambda_{max} = 660 m\mu$ wird photoelektrisch gemessen. Untere Nachweisbarkeitsgrenze liegt bei 2 γ/ccm . Zur Anreicherung wird das Adermin aus der wäßrigen Lösung mit Butanol kontinuierlich extrahiert, an Zeolith quantitativ adsorbiert und mit 10%igem Kaliumchlorid eluiert. Mit Hilfe dieser Methode wurde die Ausscheidung von Adermin im Harn von Mensch, Hund und Ratte studiert [UNNA und ANTOPOL (44), SCUDI, KOONES und KÉRESZTESY (46), SCUDI (118) und SCUDI, UNNA und ANTOPOL (47)].

Tabelle 3. Spezifität der Aderminwirksamkeit bei der Ratte.

	Kurativer Test $\gamma/Tag/Ratte$	Stoßdosis $\gamma/Ratte$	Wirkung	Literatur
Aderminhydrochlorid	7,5—10	100	+	KUHN u. WENDT (78)
Adermin-Base	6—8	—	+	KUHN u. WENDT (78)
4,5-Diacetyl-adermin	10—13	—	+	KUHN u. WENDT (78), MÖLLER (51) (1940)
Adermin-4-methyläther	—	~ 2000	+	UNNA (119)
Adermin-4-äthyläther	—	~ 2000	+	UNNA (119)
Adermin-4-benzyläther	—	2000	+	HARRIS (103)
Adermin-4-butyläther	—	2000	+	HARRIS (103)
Adermin-N-methylbetain	—	2000	—	HARRIS, WEBB u. FOLKERS (101)
Adermin-jodmethylat	—	1500	—	HARRIS, WEBB u. FOLKERS (101)
4-Desoxy-adermin	200	1000	—	MÖLLER, ZIMA, JUNG u. MOLL (52)
4,5-bis-Desoxy-adermin	200	—	—	MÖLLER (51) (1940)
Adermin-Boratkomplex	—	100	+	SCUDI, BASTEDO u. WEBB (108)
„Dimeres“ Adermin	—	4000	+	HARRIS (103)
Äthylhomologes d. Adermins	—	5000	—	HARRIS u. WILSON (106)
Adermin-3-methyläther ¹	~ 5000	—	+	MÖLLER (51) (1940)

¹ Das Präparat enthielt zirka 0,2% Adermin.

Die Tabelle 3 enthält eine Zusammenstellung der biologischen Aktivitäten des Adermins und seiner wichtigsten Derivate. Acetylierung der Oxymethylgruppen hat keine Wirkungsminderung zur Folge, durch Verätherung jedoch wird die biologische Aktivität herabgesetzt, am stärksten durch Alkylierung der phenolischen OH-Gruppe. Ersatz einer oder beider Oxymethylgruppen durch CH_3 - oder NH_2 - hebt die B_6 -Wirksamkeit auf [vgl. auch UNNA (119)].

Über die Spezifität von Adermin bei Milchsäurebakterien [vgl. MÖLLER (51), (1940)].

Literaturverzeichnis.

1. GOLDBERGER, J. and LILLIE: *Publ. Health Rep. (Am.)* **41**, 297, 1025 (1926); **43**, 657, 1385 (1928); **44**, 2769 (1929).
2. GYÖRGY, P., R. KUHN u. TH. WAGNER-JAUREGG: *Klin. Wschr.* **12**, 1241 (1933).
3. BIRCH, T. W., P. GYÖRGY and L. J. HARRIS: *Biochemic. J.* **29**, 2830 (1935).
4. GYÖRGY, P.: *Biochemic. J.* **29**, 741, 760, 767 (1935). Vgl. auch M. HOCHBERG, D. MELNICK, L. SIEGEL and B. S. OSER: *J. biol. Chemistry* **148**, 253 (1943).
5. CHICK, H. and A. M. COPPING: *Biochemic. J.* **24**, 1764 (1933).
6. LEPKOVSKY, S., T. H. JUKES and M. E. KRAUSE: *J. biol. Chemistry* **115**, 557 (1936).
7. KUHN, R. u. G. WENDT: *Z. physiol. Chem.* **256**, 127 (1938). *Ber. dtsh. chem. Ges.* **71**, 780 (1938).
8. GYÖRGY, P. and R. E. ECKARDT: *Nature (London)* **144**, 512 (1939).
9. GYÖRGY, P.: *Nature (London)* **133**, 498 (1934).
10. ANTOPOL, W. and KL. UNNA: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **42**, 126 (1939).
11. HALLIDAY, N.: *J. Nutrit.* **16**, 285 (1938).
12. EMERSON, GL. A. and H. M. EVANS: *Amer. J. Physiol.* **129**, P. 352 (1940).
13. CHICK, H., M. M. EL-SADR and A. N. WORDEN: *Biochemic. J.* **34**, 595 (1940).
14. SALMON, W. D.: *J. biol. Chemistry* **140**, P. 109 (1941).
15. RICHARDSON, L. R. and A. G. HOGAN: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **44**, 583 (1940).
16. GYÖRGY, P. and R. E. ECKARDT: *Biochemic. J.* **34**, 1143 (1940).
17. SUPPLEE, G. C., R. C. BENDER and O. J. KAHLBERG: *J. Nutrit.* **20**, 109 (1940).
18. McHENRY, E. W. and G. GAVIN: *J. biol. Chemistry* **138**, 471 (1941).
19. GYÖRGY, P. and H. GOLDBLATT: *J. exp. Med.* **72**, 1 (1940).
20. BECKER, E. R.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **46**, 494 (1941).
21. QUACKENBUSH, F. W., B. R. PLATZ and H. STEENBOCK: *J. Nutrit.* **17**, 115 (1939).
22. SCHNEIDER, H., H. STEENBOCK and B. R. PLATZ: *J. biol. Chemistry* **132**, 539 (1940).
23. BIRCH, T. W.: *J. biol. Chemistry* **124**, 775 (1938).
24. SALMON, W. D.: *J. biol. Chemistry* **123**, P. 104 (1938).
25. GAVIN, G. and E. W. McHENRY: *J. biol. Chemistry* **132**, 41 (1940). — McHENRY, E. W. and G. GAVIN: *J. biol. Chemistry* **138**, 471 (1941).
26. MACKAY, E. M. and R. H. BARNES: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **46**, 353 (1941).
27. FOUTS, P. J., O. M. HELMER, S. LEPKOVSKY and T. H. JUKES: *J. Nutrit.* **16**, 197 (1938); *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **40**, 4 (1939).
28. CHICK, H., T. F. MACRAE, A. J. P. MARTIN and C. J. MARTIN: *Biochemic. J.* **32**, 2207 (1938).
29. WINTROBE, M. M., D. M. MITCHELL and L. C. KOLB: *J. exp. Med.* **68**, 207 (1938).

30. STREET, H. R., G. R. COWGILL and H. M. ZIMMERMANN: *J. Nutr.* **21**, 275 (1941).
31. BORSON, H. J. and ST. R. METTIER: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **43**, 429 (1940).
32. MCKIBBIN, J. M., A. E. SCHAEFER, D. V. FROST and C. A. ELVEHJEM: *J. biol. Chemistry* **142**, 77 (1942).
33. DÖLLKEN, H.: *Klin. Wschr.* **19**, 220 (1940).
34. WOLF, H. J. u. E. SEIDEL: *Klin. Wschr.* **19**, 1106 (1940).
35. OHSHIMA, M.: *Jap. J. Gastroenterology* **11**, 88 (1939) = *C*: 1940 II 85.
36. JUKES, T. H.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **42**, 180 (1939).
37. SPIES, T. D., W. B. BEAN and W. F. ASHE: *J. Amer. med. Assoc.* **112**, 2414 (1939).
38. VILTER, R. W., H. S. SCHIRO and T. D. SPIES: *Nature (London)* **145**, 388 (1940).
39. STEPP, W., J. KÜHNAU u. H. SCHRÖDER: *Die Vitamine und ihre klinische Anwendung*, S. 142. Stuttgart: Ferd. Enke Verlag, 1939.
40. SMITH, S. G. and D. W. MARTIN: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **43**, 660 (1940).
41. SURE, B. and Z. FORD jr.: *J. biol. Chemistry* **140**, P. 130 (1941).
42. BAKER, A. B.: *J. Amer. med. Assoc.* **116**, 2484 (1941).
43. UNNA, KL.: *Amer. J. Physiol.* **129**, P. 483 (1940); *J. Pharmacol. exp. Therapeut.* **70**, 400 (1940).
44. — and W. ANTOPOL: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **43**, 116 (1940).
45. HEPDING, L. u. TH. MOLL: *Merck's Jber.* **53**, 37 (1940).
46. SCUDI, J. V., H. F. KOONES and J. C. KERESZTESY: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **43**, 118 (1940); *Amer. J. Physiol.* **129**, P. 459 (1940).
47. — KL. UNNA and W. ANTOPOL: *J. biol. Chemistry* **135**, 371 (1940).
48. SPIES, T. D., R. K. LADISCH and W. B. BEAN: *J. Amer. med. Assoc.* **115**, 839 (1940).
49. FLEXNER, J. and M. R. CHASSIN: *J. chir. Invest.* **20**, 313 (1941).
50. SCUDI, J. V., R. P. BUHS and D. B. HOOD: *J. biol. Chemistry* **142**, 323 (1942).
51. MÖLLER, E. F.: *Angew. Chem.* **52**, 466 (1939); *Z. physiol. Chem.* **260**, 246 (1939); **254**, 285 (1938); *Angew. Chem.* **53**, 204 (1940).
52. — O. ZIMA, F. JUNG u. TH. MOLL: *Naturwiss.* **27**, 228 (1939).
53. — u. KL. SCHWARZ: *Ber. dtsh. chem. Ges.* **74**, 1612 (1941).
54. McILWAIN, H.: *Brit. J. exp. Pathol.* **21**, 25 (1940).
55. HUTCHINGS, B. L. and D. W. WOOLLEY: *Science (New York)* **90**, 41 (1939).
56. VILTER, S. P., T. D. SPIES: *Science (New York)* **91**, 200 (1940).
57. SNELL, E. E. and W. H. PETERSON: *J. biol. Chemistry* **128**, P. 94 (1939); *J. Bacteriol.* **39**, 273 (1940).
58. SCHULTZ, A. S., L. ATKIN and CH. N. FREY: *J. Amer. chem. Soc.* **61**, 1931 (1939).
59. WILLIAMS, R. J., R. E. EAKIN and E. E. SNELL: *J. Amer. chem. Soc.* **62**, 1204 (1940). — EAKIN, R. E. and R. J. WILLIAMS: *J. Amer. chem. Soc.* **61**, 1932 (1939).
60. BENHAM, R. W.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **46**, 176 (1941).
61. SCHOPFER, W. H.: *Ergebn. Biol.* **16**, 1 (1939).
62. FRIES, N.: *Naturwiss.* **30**, 685 (1942).
63. McELROY, L. W. and H. GOSS: *J. biol. Chemistry* **130**, 437 (1939).
64. SNELL, E. E., B. M. GUIRARD and R. J. WILLIAMS: *J. biol. Chemistry* **143**, 519 (1942).
65. BONNER, M. and J. BONNER: *Amer. J. Bot.* **27**, 38 (1940).
66. BONNER, J.: *Amer. J. Bot.* **27**, 692 (1940).
67. ROBBINS, W. J.: *Amer. J. Bot.* **28**, 216 (1941); **29**, 241 (1942). — ROBBINS, W. J. and M. B. SCHMIDT: *Amer. J. Bot.* **26**, 149 (1939).

68. DAY, D.: Science (New York) **94**, 408 (1941).
69. BONNER, J. and PH. S. DEVIRIAN: Amer. J. Bot. **26**, 661 (1939).
70. WHITE, PH. R.: Amer. J. Bot. **27**, 811 (1940); vgl. auch Ann. Rev. Biochem. **10**, 491 (1941).
71. I. G. Farbenindustrie Akt.-Ges.: D.R.P. 705098, Kl. 16 (1938).
72. LANTZ, E. M.: J. Home Econ. **32**, 107 (1940).
73. SCHNEIDER, H. and H. STEENBOCK: J. Nutrit. **18**, 99 (1939).
74. LUNDE, G. and H. KRINGSTAD: Biochemic. J. **32**, 708 (1938).
75. — Angew. Chem. **52**, 521 (1939).
76. BIRCH, T. W. and P. GYÖRGY: Biochemic. J. **30**, 304 (1936).
77. KUHN, R. u. G. WENDT: Ber. dtsh. chem. Ges. **71**, 780 (1938).
78. KUHN, R. u. G. WENDT: Ber. dtsh. chem. Ges. **71**, 1118 (1938).
79. GYÖRGY, P.: J. Amer. chem. Soc. **60**, 983 (1938).
80. KERESZTESY, J. C. and J. R. STEVENS: J. Amer. chem. Soc. **60**, 1267 (1938); Proc. Soc. exp. Biol. Med. **38**, 64 (1938).
81. LEPKOVSKY, S.: Science (New York) **87**, 169 (1938); J. biol. Chemistry **124**, 125 (1938).
82. ICHIBA, A. and K. MICHl: Sci. Pap. Inst. phys. chem. Res. **34**, 623 (1938).
83. SCHOOR, A. VAN: Merck's Jber. **52**, 7 (1938).
84. OHDAKE, S.: Bull. agric. chem. Soc. Japan **8**, 11 (1932); zitiert bei P. W. WIARDI: Nature (London) **142**, 1158 (1938); siehe auch A. ICHIBA and K. MICHl: Sci. Pap. Inst. phys. chem. Res. **34**, 1014 (1938).
85. GREENE, R. D.: J. biol. Chemistry **130**, 513 (1939).
86. MATUKAWA, T.: J. pharmac. Soc. Japan **60**, 216 (1940).
87. I. G. Farbenindustrie Akt.-Ges.: D.R.P. 684975, Kl. 30 h (1938).
88. KUHN, R. u. G. WENDT: Ber. dtsh. chem. Ges. **71**, 1534 (1938); **72**, 305 (1939). — KUHN, R., H. ANDERSAG, K. WESTPHAL u. G. WENDT: Ber. dtsh. chem. Ges. **72**, 309 (1939). — KUHN, R., G. WENDT, u. K. WESTPHAL: Ber. dtsh. chem. Ges. **72**, 310 (1939). — KUHN, R. u. G. WENDT: Ber. dtsh. chem. Ges. **72**, 311 (1939).
89. STILLER, E. T., J. C. KERESZTESY and J. R. STEVENS: J. Amer. chem. Soc. **61**, 1237 (1939).
90. HARRIS, ST. A., E. T. STILLER and K. FOLKERS: J. Amer. chem. Soc. **61**, 1242 (1939).
91. ICHIBA, A. and K. MICHl: Sci. Pap. Inst. phys. chem. Res. **35**, 73 (1938); **36**, 1 (1939); **36**, 173 (1939).
92. KUHN, R., K. WESTPHAL, G. WENDT u. O. WESTPHAL: Naturwiss. **27**, 469 (1939).
93. HARRIS, ST. A. and K. FOLKERS: J. Amer. chem. Soc. **61**, 1245 (1939); Science (New York) **89**, 347 (1939).
94. — — J. Amer. chem. Soc. **61**, 3307 (1939).
95. MORI, SH. and K. MAKINO: Enzymologia (Den Haag) **7**, 385 (1939).
96. I. G. Farbenindustrie Akt.-Ges.: D.R.P. 701955 Kl. 12 p (1939); D.R.P. 702830, Kl. 12 p (1939); D.R.P. 704761, Kl. 12 p (1939); D.R.P. 707704, Kl. 12 p (1939); D.R.P. 699555, Kl. 12 p (1939) mit dem Nachtrag A.P. 2250396 (1940) der Winthrop Chem. Co. Inc. New York; D.R.P. 707428, Kl. 12 p (1939); D.R.P. 710396, Kl. 12 p (1939); D.R.P. 719889, Kl. 12 p (1939).
97. E. Merck, Darmstadt: Dän.P. 58703 (1939); D.R.P. 707266, Kl. 12 p (1939).
98. Merck u. Co. Inc. U.S.A.: F.P. 864850 (1939); F.P. 864659 (1940); F.P. 864709 (1940); F.P. 864734 (1940); F.P. 864694 (1940); hierzu Zusatzpatente F.P. 51196 u. F.P. 51197 (1940); F.P. 862416 (1939).

99. Hoffmann-La Roche & Co. Akt.-Ges., Basel: Schwz.P. 216945 (1940); Schwz.P. 217231 (1940); Schwz.P. 217232 (1940); Schwz.P. 217480 (1940); Schwed.P. 104294 (1941).
100. ICHIBA, A. and K. MICHII: Sci. Pap. Inst. physic. chem. Res. **34**, 1014 (1938).
101. HARRIS, ST. A., T. J. WEBB and K. FOLKERS: J. Amer. chem. Soc. **62**, 3198 (1940).
102. KUHN, R., I. HAUSSER u. I. LÖW: unveröffentlicht.
103. HARRIS, ST. A.: J. Amer. chem. Soc. **63**, 3363 (1941).
104. — J. Amer. chem. Soc. **62**, 3203 (1940).
105. I. G. Farbenindustrie Akt.-Ges.: F.P. 857338 (1939).
106. HARRIS, ST. A. and A. N. WILSON: J. Amer. chem. Soc. **63**, 2526 (1941).
107. KUHN, R. u. I. LÖW: Ber. dtsh. chem. Ges. **72**, 1453 (1939).
108. SCUDI, J. V., W. A. BASTEDO and T. J. WEBB: J. biol. Chemistry **136**, 399 (1940).
109. MOLL, TH. u. M. SCHNITTPAHN: Merck's Jber. **52**, 10 (1938).
110. WEIGAND, C. G., CH. R. ECKLER and K. K. CHEN: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **44**, 147 (1940).
111. REEDMAN, E. J., W. L. SAMPSON and KL. UNNA: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **43**, 112 (1940).
112. KARRER, P., L. LASZT u. F. VERZAR: Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere **239**, 644 (1937).
113. AUHAGEN, E. u. G. WENDT: Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere **241**, 220 (1938).
114. EULER, H. V., M. MALMBERG, I. ROBEZNIKES u. F. SCHLENK: Naturwiss. **26**, 45 (1937).
115. CONGER, TH. W. and C. A. ELVEHJEM: J. biol. Chemistry **138**, 555 (1941). — HENDERSON, L. M., H. A. WAISMAN and C. A. ELVEHJEM: J. Nutrit. **21**, 589 (1941).
116. WILLIAMS, R. J., R. E. EAKIN and I. R. MCMAHAN: Univ. Texas Publ. Nr. **4137**, 24 (1941).
117. SWAMINATHAN, M.: Nature (London) **145**, 780 (1940); vgl. auch A. F. BINA, J. M. THOMAS and E. B. BROWN: J. biol. Chemistry **148**, 111 (1943).
118. SCUDI, J. V.: J. biol. Chemistry **139**, 707 (1941).
119. UNNA, KL.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **43**, 122 (1940).

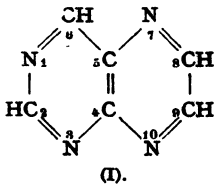
(Revision abgeschlossen am 8. Mai 1944.)

Pterine.

Von ROBERT PURRMANN, München.

(Mit 1 Abbildung.)

Im Jahre 1936 definierten SCHÖPF und BECKER die Pterine als weiße oder farbige, stickstoffreiche, in Chitin eingelagerte Insektenpigmente (1). Damals waren zahlreiche Stoffe vor allem aus den Flügeln der Schmetterlinge isoliert, aber noch keiner in seiner Konstitution aufgeklärt worden. Dennoch wurde angenommen, daß „... sie nicht nur nach ihrem Vorkommen, sondern auch in ihrer chemischen Zusammensetzung eine natürliche Gruppe ...“ bilden. Später fanden sich in den Pieridenpigmenten auch einige Purine in zum Teil beträchtlicher



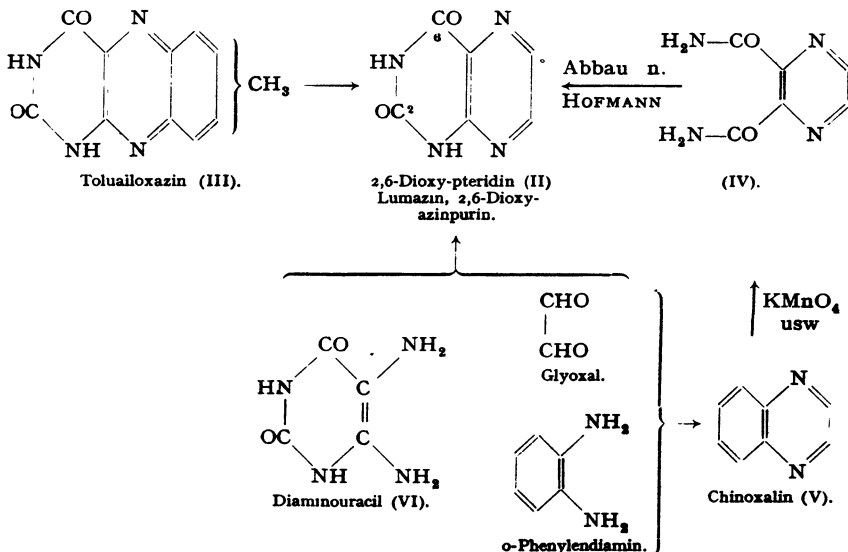
Menge (2, 3, 4), und man verwandte die Bezeichnung Pterine vor allem für die drei alsbald aufgeklärten Pigmentinhaltsstoffe *Leukopterin*, *Xanthopterin* und *Iso-xanthopterin*, die sich von einem für Naturstoffe neuen Gerüst ableiten, für dessen unsubstituierten Grundkörper (I) WIELAND die Bezeichnung *Pteridin* vorgeschlagen hat (5).

Neuerdings ist auch eine aus Fischhäuten isolierte, blau fluoreszierende Substanz als Derivat des Pteridins erkannt und als *Ichthyopterin* beschrieben worden (6), und eines der drei aufgeklärten Pterine, das *Xanthopterin*, ist nach neueren Befunden im Tierreich weit verbreitet; u. a. kommt es auch im menschlichen Harn vor (7), begleitet von einem weiteren, schwefelhaltigen Derivat des Pteridins, dem Urothion (8). So ist der Begriff „Pterine“ vom Namen stickstoffreicher Verbindungen einer bestimmten Provenienz zum Namen einer Naturstoffklasse mit einem bestimmten heterocyclischen Ringsystem geworden. Aber auch diese Definition, an die ich mich im folgenden halten werde, wird sicher zu eng werden, da z. B. die von SCHÖPF und BECKER aus Insekten isolierten und teils gut, teils weniger endgültig charakterisierten Substanzen *Erythropterin*, *Chrysopterin*, *Mesopterin* usw., sowie das bis in die neueste Zeit von HOPKINS in England bearbeitete *Rhodopterin* (9) ihren Namen als Pterine haben, ohne daß es einstweilen erwiesen ist, von welchem Gerüst sie sich ableiten.

I. Pterinsynthesen.

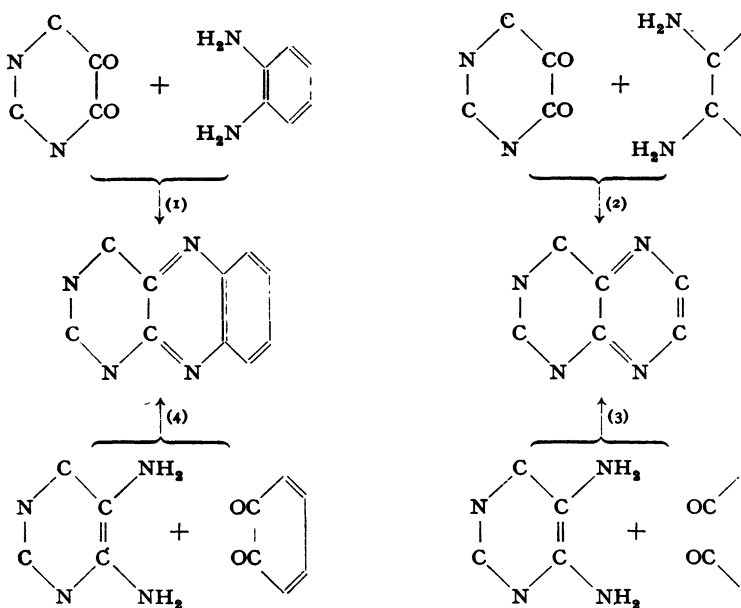
1895 hat HOPKINS (10) als erster die Farbstoffe der Schmetterlinge auf ihre chemische Natur hin untersucht und geglaubt, in der weißen Substanz der Kohlweißlinge Harnsäure und in der gelben der Zitronenfalter eine Vorstufe der Harnsäure erkannt zu haben. Im gleichen Jahr hat KÜHLING das erste Derivat des Pteridins, nämlich (in der neuen Bezeichnung) 2,6-Dioxy-pteridin (II), synthetisch dargestellt (11). Aber erst 45 Jahre später, nachdem in der Zwischenzeit mehrere Vertreter dieser Körperklasse aus systematischem Interesse synthetisiert worden waren, wurde die Beziehung der Schmetterlingsfarbstoffe zu jenen Verbindungen endlich erkannt.

Die aus Alloxanen und o-Phenylendiaminen entstehenden Alloxazine können als „Benzpteridine“ bezeichnet werden, da sie zu dem Gerüst von (I) noch einen Benzolring enthalten. Durch oxydative Aufspaltung dieses dritten Ringes im Tolualloxazin (III) und Brenzung der entstehenden Dicarbonsäure hatte KÜHLING die Verbindung (II) erhalten (11). GABRIEL und SONN kamen 12 Jahre später (12) zu der gleichen Verbindung in besserer Ausbeute durch HOFMANNschen Abbau des Diamids (IV) der Azin-dicarbonsäure, die durch Permanganatoxydation aus Chinoxalin (V) entsteht. Chinoxalin schließlich bildet sich aus o-Phenylendiamin und Glyoxal. Dieser interessante aber umständliche Weg, den Benzolring durch den Pyrimidinring zu ersetzen, ist zu sparen, wenn man gleich statt Phenylendiamin ein o-Diamino-pyrimidin [z. B. (VI)] mit Glyoxal kondensiert.



2,6-Dioxy-4,5-diamino-pyrimidin (Diamino-uracil) (VI), das so mit Glyoxal die Verbindung (II) geben mußte, war bereits 1905 von TRAUBE zu Purinsynthesen dargestellt worden (13), und 1908 wurden von SACHS und MEYERHEIM auch entsprechende Umsetzungen der TRAUBESCHEN o-Diamino-pyrimidine mit α -Dicarbonylverbindungen untersucht [Schema (3)] (14). In glatter Reaktion bildeten sich dabei in wäßriger oder essigsaurer Lösung die Derivate des Pteridins, die die Autoren wegen ihrer Ähnlichkeit mit den Purinen und weil sie einen Azinring

Schemata für Pteridinsynthesen.



enthalten, „Azin-Purine“ nannten. Die beiden nachbarständigen Carboonyle können außer Keton- und Dichlormethylen- auch Carbonsäure- und Estergruppen sein, wobei dann bei der Kondensation mit den o-Diamino-pyrimidinen Oxy-pteridine mit Oxygruppen im Azinring entstehen. Die beiden Aminogruppen in o-Diaminopyrimidinen sind *nicht* gleichartig; bei Umsetzungen mit ungleich substituierten Carbonylen sind daher zwei isomere Reaktionsprodukte zu erwarten. Darauf haben SACHS und MEYERHEIM hingewiesen, ohne eine Entscheidung zu suchen, welches der beiden Isomeren sie im einzelnen erhalten hatten.

Unter den Dicarbonylverbindungen, von denen von SACHS und MEYERHEIM nur aliphatische umgesetzt wurden, fehlte das Glyoxal.

Diese Lücke wurde 1937 von KUHN und COOK ausgefüllt, die im Zusammenhang mit Flavinsynthesen in dieses Gebiet kamen (15). Flavine (Isoalloxazine) und Alloxazine (Benzpteridine) werden aus Alloxanen und (aromatischen) Diaminen gewonnen [Schema (1)]. Die entsprechende Reaktion der Alloxane mit *aliphatischen* α -Diaminen zu bicyclischen Pterinderivaten [Schema (2)] ist nicht durchführbar, sondern man ist auf die oben beschriebene Kondensation von o-Diamino-pyrimidinen mit (aliphatischen) α -Dicarboxylen nach SACHS und MEYERHEIM [Schema (3)] angewiesen. Entsprechend mit der Kondensation von *aromatischen* α -Dicarboxylen (o-Chinonen) mit o-Diamino-pyrimidinen [Schema (4)] einen neuen Zugang zu den Flavinen zu öffnen, haben KUHN und COOK unternommen.

Als Base diente ihnen Diamino-uracil (VI), und die entstehenden Kondensationsprodukte wurden wegen der prachtvollen Fluorescenz ihrer Lösungen als „Lumazine“ zusammengefaßt. Der bicyclische Grundkörper, das *Lumazin* (II), entstand glatt mit Glyoxal [Schema (3)]. Die Umsetzung mit o-Chinonen nach Schema (4) gelang bei *polycyclischen* Chinonen auch noch in der gewünschten Weise. (Dabei wurden mit β -Naphthochinon zwei isomere Benzalloxazine — Naphthlumazine — erhalten; das erste Beispiel eines für Reaktionen mit ungleich substituierten α -Dicarboxylen von SACHS und MEYERHEIM geforderten Isomerenpaares, allerdings ohne Zuordnung der isomeren Substanzen zu den beiden möglichen Formeln.) Die Reaktion des Diamino-uracils mit o-Benzochinon zum *Alloxazin* (Benzlumazin) ist aber nicht gelungen. Damit hatte die Übertragung der Kondensation nach SACHS und MEYERHEIM auf Chinone das wichtigste Ziel nicht erreicht.

Die drei bisher aufgeklärten, in der Natur aufgefundenen Pterine sind das farblose *Leukopterin* (2-Amino-6,8,9-trioxypteridin) (VII), die Haupts substanz in dem Flügelpigment der Kohlweißlinge, das *Xanthopterin* (2-Amino-6,8-dioxypteridin) (VIII), der gelbe Hauptfarbstoff der gelben Pieriden (z. B. des Zitronenfalters), und *Iso-xanthopterin* (2-Amino-6,9-dioxypteridin) (IX), ein farbloser Begleiter des Leukopterins bei Kohlweißlingen. Bei allen dreien ist der Pyrimidinring gleich substituiert, sie unterscheiden sich in der Substitution des Azinringes durch Oxygruppen.

Aus dem vorstehenden Bericht über die synthetischen Arbeiten geht hervor, daß die einzige fruchtbare Methode zur Gewinnung bicyclischer Derivate des Pteridins von den o-Diamino-pyrimidinen ausgeht [Schema (3)], die seit ihrer Darstellung von TRAUBE auch zur Gewinnung von Purinen eine Schlüsselstellung innehaben. Das gegebene Ausgangsmaterial zur Synthese der drei natürlichen Pterine ist somit das von TRAUBE zur Darstellung des *Guanins* eingeführte 2,4,5-Triamino-6-oxy-pyrimidin (X).

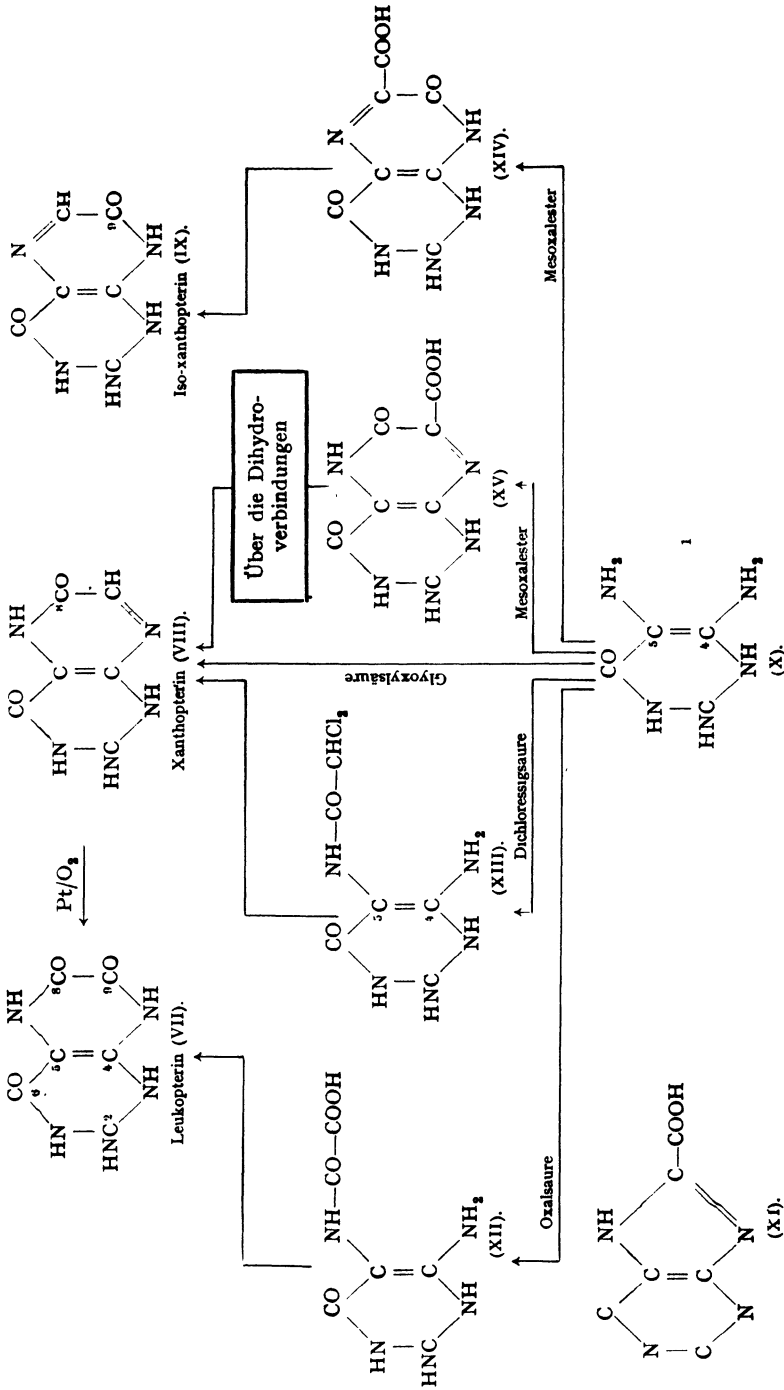
Die *Synthese des Leukopterins* (VII) gelingt ohne Schwierigkeit durch

Schmelzen der Base (X) mit überschüssiger Oxalsäure (16), eine Reaktion, die aus allen bisher geprüften o-Diamino-pyrimidinen die entsprechenden 8,9-Dioxy-pteridine lieferte. Von diesem bis dahin unbekanntem Typ waren die isomeren, schon bekannten Purin-8-carbonsäuren (XI) leicht zu unterscheiden, da sie bei gelindem Erhitzen Kohlendioxyd verlieren, während die 8,9-Dioxy-pteridine bis zu hohen Temperaturen stabil sind. Die Leukopterin-synthese läuft über das Zwischenprodukt (XII), das aus Ansätzen, die nur bis etwa 150° erhitzt worden waren, zu isolieren ist.

So wie im Leukopterin die Oxalsäure die beiden orthoständigen Aminogruppen der Base X zum Azinring zusammenfaßt, so galt es zur *Synthese des Xanthopterins* die Kondensation der Base (X) mit Glyoxylsäure durchzuführen. Das ist KOSCHARA gelungen (17). Die Glyoxylsäure wurde als Bariumsalz der Bisulfitverbindung angewandt, Kondensationsmittel war starke Schwefelsäure. Die Reaktion verläuft in guter Ausbeute und offensichtlich nur in einer Richtung; sie konnte aber nicht beweisen (was die analytischen Arbeiten am Naturstoff auch nicht entschieden hatten), ob die Oxygruppe des Xanthopterins in 8 oder in 9 stehe, ob also (VIII) oder (IX) das richtige Symbol für Xanthopterin sei. Folgende Synthese hat die Formel (VIII) bestätigt: Die Base (X) gibt mit Dichloressigsäure die Dichlor-acetylverbindung (XIII), die mit Silbercarbonat und -acetat zum Xanthopterin (VIII) kondensiert werden kann (18). Die fragliche Oxygruppe steht also in 8, wenn die Dichloressigsäure mit der Aminogruppe in 5 und nicht mit der in 4 reagiert hatte. Daran kann aber kein Zweifel sein: bei allen bisher untersuchten Kondensationen ist, wie besonders TRAUBE gezeigt hat (19), die Aminogruppe 5 der o-Diaminopyrimidine reaktionsfähiger als die in 4.

Das, im Gegensatz zu dem gelben und basischen Xanthopterin, farblose und saure *Iso-xanthopterin* (IX) wurde aus der Carbonsäure (XIV), die sich aus der Base (X) mit Mesoxalester in neutraler Lösung bildet, durch Brenzen gewonnen (20). Die der farblosen Carbonsäure (XIV) isomere gelbe Xanthopterin-carbonsäure (XV) entsteht bei der Kondensation in neutralem Medium in geringer Menge als Nebenprodukt. Sie wird zum Hauptprodukt bei Kondensation in Mineralsäuren, und auch von ihr aus kommt man zu Xanthopterin: als Dihydroverbindung ist sie leicht decarboxylierbar, und das dabei entstehende Dihydro-xanthopterin ist in alkalischer Lösung zum Xanthopterin autoxydabel.

Viele Beispiele machten es zu einer allgemeinen Regel, daß die Kondensation der o-Diamino-pyrimidine mit α -Oxosäuren in neutraler bis essigsaurer Lösung (Bedingungen von SACHS und MEYERHEIM) 9-Oxypteridine und in mineralsaurer Lösung (u. a. Xanthopterin-synthese von KOSCHARA) vorwiegend 8-Oxypteridine ergibt. Das ist von einigem Interesse, weil der Unterschied zwischen solchen 8- und 9-Oxy-Isomeren über Erwarten groß ist (wie schon durch die Bemerkung angedeutet).



¹ Bei der Formulierung der Oxy- und Aminogruppen stehen, wie bei den Purinen, tautomere Formeln zur Wahl. Die benutzte Schreibweise halte ich anderen nicht für überlegen.

daß Xanthopterin basisch und gelb, Isoxanthopterin aber sauer und farblos ist). In dem Abschnitt über die Eigenschaften der Pterine wird das eingehender besprochen werden.

Nach den geschilderten Ergebnissen ist über die Synthesen bicyclischer Derivate des Pteridins zusammenzufassen: die Kondensation von o-Diamino-pyrimidinen mit α -Dicarbonyl-verbindungen hat sich allein als vielseitig und fruchtbar und als den bisherigen Anforderungen gewachsen bewährt.

II. Eigenschaften und Reaktionen der Derivate des Pteridins.

Hier seien nur die charakteristischen Eigenschaften und Reaktionen der bicyclischen Verbindungen besprochen. Die tricyclischen Alloxazine und Flavine heben sich durch den zusätzlichen Benzolkern so stark ab, daß Hinweise auf gelegentliche Beziehungen genügen sollen.

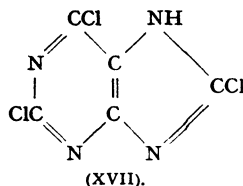
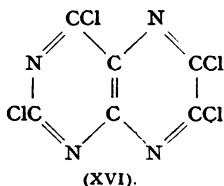
Wie erwähnt, wurden die Ausgangssubstanzen zu den Synthesen der Pterine, die o-Diamino-pyrimidine, von TRAUBE zu Synthesen der Purine eingeführt. In ihnen sind alle Gerüstatome der Purine bis auf eines und der Pterine bis auf zwei enthalten. Dem entspricht, daß die physikalischen Eigenschaften der Vertreter der beiden Körperklassen sehr ähnlich sind. Bei vergleichbaren, d. h. analog substituierten Vertretern sind die Pterine etwas schwerer löslich und etwas schwerer schmelzbar — dies allerdings überhaupt nur bei reichlicher Alkylsubstitution — als die entsprechenden Purine. Aus dieser engen Beziehung erklärt es sich, daß die Unterscheidung des Leukopterins aus Kohlweißlingen von der Harnsäure, mit der HOPKINS sie einst verwechselt hatte, anfänglich beträchtliche Mühe machte (28). Die Murexidprobe als Reaktion auf den Pyrimidinring ist bei Pterinen wie bei Purinen positiv. Bei allen Reaktionen, die an den Substitutionsstellen der Molekeln, besonders am Pyrimidinring, vor sich gehen, reagieren Pteridine und Purine gleichartig:

Leukopterin ist mit Nitrosylschwefelsäure desaminierbar zu Desimino-leukopterin (21) wie Imido-harnsäure zur Harnsäure oder Guanin zum Xanthin.

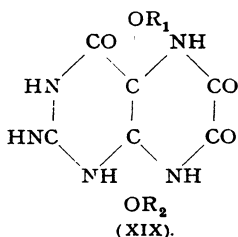
Die Oxygruppe 6 des Leukopterins ist mit Phosphorchloriden durch Chlor ersetzbar und das Chlor ist dann mit Jodwasserstoffsäure nach den Vorschriften der Purinchemie zu eliminieren, wobei 6-Desoxyleukopterin entsteht (22). Beim Desimino-leukopterin konnten von SCHÖPF und REICHERT alle Oxygruppen durch Chlor ersetzt werden (23). Das so gebildete Tetrachlor-pteridin (XVI) ist dem von E. FISCHER aus Harnsäure gewonnenen Trichlorpurin (XVII) gegenüberzustellen.

Leukopterin und Desimino-leukopterin waren wie Purine mit Diazomethan zu methylieren. Die dadurch möglich gewordene Molekulargewichtsbestimmung eines Pterinderivates, eines Trimethyl-leukopterins, bildete den Schlußstein in der Ableitung der Leukopterinformel (24).

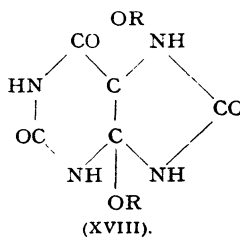
Auch die von BILTZ (26) bei den Purinen eingehend untersuchte Doppelbindung 4—5 reagiert bei den Pteridinen analog. Die den Harn-



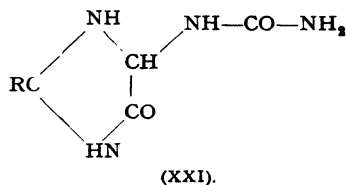
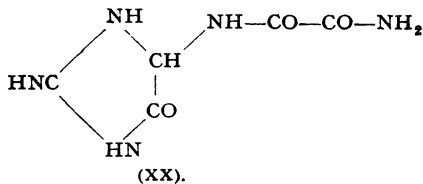
säureglykolen (XVIII) entsprechenden Glykole (XIXa), Glykoläther (XIXb) und -halbäther (XIXc) des Leukopterin und Desimino-leukopterin wurden durch Chlorierung dargestellt (21, 25, 27). Die hydrolytische Umwandlung dieser Verbindungen entspricht der der Puringlykole. Bei milder Alkalieinwirkung gibt Leukopterin-glykol das Oxamid (XX), das in dem Verhältnis zum Allantoin (XXIa) steht, wie das Leukopterin zur Harnsäure [die Verengung des Pyrimidinringes zum Imidazolring ist ein aus der Purinchemie bekannter und vollständig geklärter (32) Vorgang]. Zum Konstitutionsbeweis für das Oxamid (XX) wurde zuerst Ammoniak, dann Oxalsäure abhydrolysiert und die entstandene Spaltbase mit Kaliumcyanat zum Iminoallantoin (XXIb) umgesetzt (25, 29).



- a) $R_1, R_2 = H$
 b) $R_1, R_2 = CH_3$
 c) $R_1 = CH_3$
 $R_2 = H$



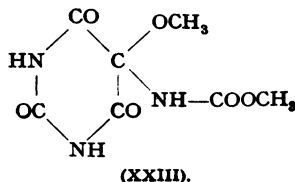
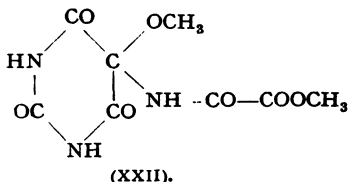
$R = H$ oder CH_3



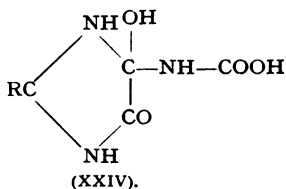
- a) $R = O$
 b) $R = NH$

Eine bei Behandlung des Desimino-leukopterin mit Chlor in Methanol entstehende Verbindung (XXII) (5-Methoxy-uramil-7-oxalsäure-methyl-

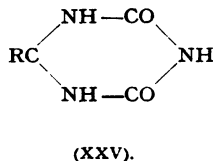
ester) hat sein Analogon im 5-Methoxy-uramil-7-carbonsäure-methyl-ester (XXIII), der sich bei der gleichen Operation aus Xanthin bildet (27).



In eigenartigen Umlagerungen entsteht aus Harnsäure bei alkalischer Hydroperoxyd-oxydation Oxonsäure (XXIV a) und Cyanursäure (XXV a) (30, 31, 40). Bei der Oxydation des Xanthopterin wurde entsprechend Imino-oxonsäure (XXIV b) und Melanurensäure (XXV b) erhalten, die, wie daraufhin festgestellt wurde, auch aus 2-Iminoharnsäure dargestellt werden können (33).



- a) R = O Oxonsäure
b) R = NH



- a) R = O Cyanursäure
b) R = NH Melanurensäure

Hier wurden durch das Hydroperoxyd die beiden C-Atome im Azinring des Pterins getrennt, so daß damit aus Purinen und Pterinen identische Produkte entstehen, was sonst nur bei noch weitergehendem Abbau der Fall ist, so z. B. Oxalyl-guanidin durch energische Oxydation (34), und Glykokoll durch Spaltung mit starker Salzsäure im Rohr (35, 21). Die Spaltung zu Glykokoll und die Oxydation zu Oxalyl-guanidin sind auch zu rohen quantitativen Bestimmungen geeignet und benutzt worden. Während die Entstehung des Glykokolls weniger aussagt, kann die Isolierung des Oxalyl-guanidins unter Umständen eine willkommene Reaktion auf 2-Aminopyrimidinringe in noch aufzuklärenden pterinartigen Stoffen werden.

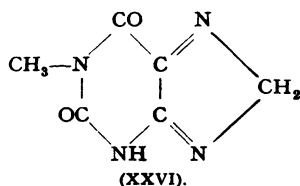
8,9-Dioxy-pteridine sind den entsprechenden Harnsäuren besonders ähnlich, und der (Dioxy-) Azinring tritt kaum in Erscheinung. Dieser Teil der Molekel gewinnt aber an Reaktionsfähigkeit, wenn der Azinring mit nur einer Oxygruppe substituiert ist. Dann können, neben typischen Purinreaktionen, Umsetzungen beobachtet werden, die in der Purinreihe kein Analogon haben. Dabei verhalten sich aber, wie schon angedeutet, 8- und 9-Oxypteridine sehr verschieden. Während sich die 9-Oxypteridine eng an die 8,9-Dioxyverbindungen anschließen, bilden

die 8-Oxyderivate eine Sondergruppe. Das sei im folgenden erläutert, vorzüglich an dem am besten untersuchten Isomerenpaar Xanthopterin-Isoxanthopterin, wobei aber nachgeprüft ist, daß Veränderungen an den übrigen Substitutionsstellen der Molekeln nur geringen Einfluß haben.

Pteridine, die im Azinring nur eine Oxygruppe tragen, sind reversibel hydrierbar, 9-Oxypteridine mit rauchender Jodwasserstoffsäure (22), Xanthopterin — für die 8-Oxypteridine — schon mit Glutathion (36). Die Redoxpotentiale sind noch nicht gemessen, immerhin deutet sich der erhebliche Unterschied in den genannten Reduktionsmitteln an. Wird ein 9-Oxypteridin mit rauchender Jodwasserstoffsäure reduziert und die jodhaltige Lösung dann verdünnt, so reoxydiert das Jod das Dihydropteridin augenblicklich, und das Ausgangsmaterial bildet sich zurück. Diese Redoxreaktion, die bisher bei allen Vertretern beobachtet wurde, weist darauf hin, daß durch die Konstitution als 9-Oxypteridin das Reduktionspotential in engem Bereich gegeben ist.

Die dem Übergang vom Xanthin zur Harnsäure entsprechende Oxydation von 8- oder 9-Oxypteridinen zu 8,9-Dioxypteridinen gelingt in vitro leichter als bei den Purinen.¹ Bei 9-Oxypteridinen wirkt salpetrige Säure, beim Xanthopterin — als Beispiel für 8-Oxypteridine — war Hydroperoxyd erfolgreich (33) und besser noch Dehydrierung mit Platin/Sauerstoff in neutralem Milieu (25). Xanthindehydrase, die den Übergang Xanthin-Harnsäure katalysiert, katalysiert bemerkenswerterweise auch die Dehydrierung des Xanthopterins zum Leukopterin (39). Bisher ist die *Reduktion* des Leukopterins zum Xanthopterin nicht gelungen, auf elektrolytischem Wege wurde dagegen von WIELAND und LIEBIG Iso-xanthopterin erhalten (39).

Xanthopterin ist — im Gegensatz zu 9-Oxypteridinen — fähig, unter Aufhebung des Chromophors Addukte zu bilden. Ein Addukt des Xanthopterins mit einem Mol SO_2 und eines mit einem Mol H_2O_2 wurden isoliert (33). Beide sind wieder leicht in die Komponenten spaltbar. Welcher Art die Anlagerung und an welcher Stelle sie vor sich gegangen ist, ist nicht bekannt, man wird dabei an das *Toxoflavin* (XXVI) erinnert, das sich ähnlich verhält und auch ein ähnliches Absorptionsspektrum aufweist (41). Doch ist bei diesem Giftstoff die Strukturformel durch die Synthese noch endgültig zu beweisen, weshalb dieser Hinweis genügen soll.



¹ Dort z. B. durch Kuppeln der Xanthine mit Diazoniumverbindungen (37, 38), hydrierende Spaltung und Entfernung der in 8 entstandenen Aminogruppe mit salpetriger Säure.

9-Oxy- sind wie 8,9-Dioxy-pteridine farblos, 8-Oxypteridine sind gelb. Dazu seien folgende Absorptionsspektren wiedergegeben:

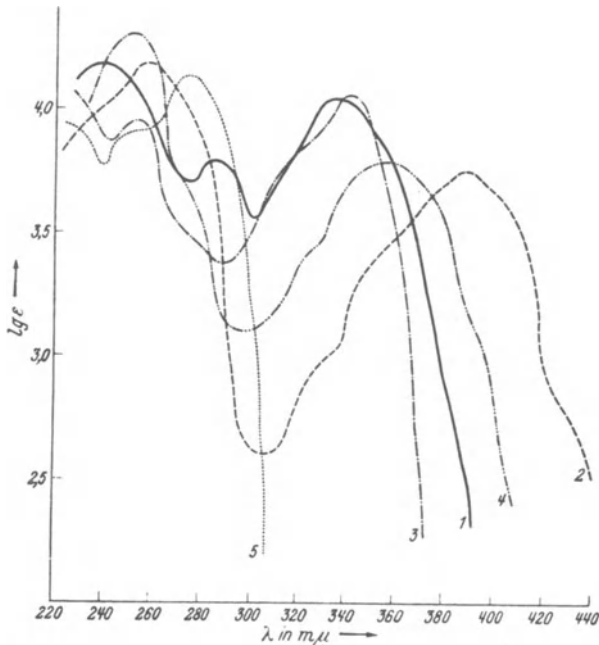


Abb. 1. Absorptionsspektren.

Die Substanzen wurden in $n/10$ NaOH gemessen. Ich verdanke die Aufnahmen der Freundlichkeit von Frl. Dr. F. PRÜCKNER, Techn. Hochschule München.

1 Leukopterin (2-Amino-6,8,9-trioxy-pteridin); 2 Xanthopterin (2-Amino-6,8-dioxy-pteridin); 3 Iso-xanthopterin (2-Amino-6,9-dioxy-pteridin); 4 Imino-lumazin (2-Amino-6-oxy-pteridin); 5 Guanin (2-Amino-6-oxy-purin).

Bei allen Verbindungen ist der Pyrimidinring gleich substituiert. Die langwelligste Bande des Xanthopterins reicht in den sichtbaren Bereich, Xanthopterin ist gelb. Zur Orientierung seien die Bandenspitzen des Lactoflavins, des Toxoflavins, des Urothions und die des Xanthopterins zusammengestellt:

Lactoflavin (43)	265 $m\mu$ $\log \epsilon$ 4,90	365 $m\mu$ $\log \epsilon$ 4,33	445 $m\mu$ $\log \epsilon$ 4,38
Toxoflavin (41)	260 $m\mu$ $\log \epsilon$ 4,15	400—410 $m\mu$ $\log \epsilon$ 3,6	
Urothion (42)	~270 $m\mu$ $\log \epsilon$ 4,8	~400 $m\mu$ $\log \epsilon$ 4,3	
Xanthopterin	260 $m\mu$ $\log \epsilon$ 4,23	389 $m\mu$ $\log \epsilon$ 3,79	

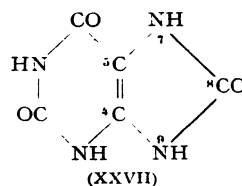
Das Absorptionsspektrum des Urothions gilt als Beweis für seine Pteridinstruktur.

Für Pteridine ist die kräftige Fluoreszenz ihrer Lösungen charakteristisch. Da die Hauptabsorptionsbanden im U.-V. liegen, sind die Leucht-

erscheinungen im Lichte der Quecksilberlampe besonders intensiv. Bei Purinen ist unter diesen Bedingungen nichts zu sehen. Da deren langwelligstes Maximum (die Kurve des Guanins ist als Beispiel abgebildet) aber 50—60 $m\mu$ kurzwelliger liegt, werden sie wohl im U.-V. fluoreszieren.

Die farblosen 9-Oxy-pteridine haben ihren isoelektrischen Punkt etwa bei dem der 8,9-Dioxy-pteridine, die gelben 8-Oxy-pteridine sind viel stärker basisch. Vom Iso-xanthopterin sind Salze mit Säuren unbekannt, Xanthopterin dagegen bildet mit verdünnter Schwefelsäure ein kristallisiertes Sulfat — es geht bei der Aufarbeitung der Schmetterlingspigmente in die „basische“ Fraktion.

Zum Vergleich seien die Verhältnisse bei der Harnsäure (XXVII) dargestellt: Nach BILTZ (26) ist die sauerste Stelle der Harnsäure 9 und die am schwächsten saure (z. B. acetylierbare) 7. Das dazwischen stehende CO (8) wird beide Stellen gleich beeinflussen, der Aciditätsunterschied muß also bei den beiden Aminogruppen der o-Diaminopyrimidine auch feststellbar sein: 5 basischer als 4. Dem entspricht die stets beobachtete größere Reaktionsfähigkeit der basischen Aminogruppe 5 bei Kondensationen sowie z. B. die größere Basizität der 5-Monoaminopyrimidine gegen die 4-Monoaminopyrimidine. Dementsprechend muß bei den Pteridinen 9—10 die stärker saure, 8—7 die schwächer saure Lactam- (oder Lactim-) Gruppierung sein, was mit den Beobachtungen im Einklang steht.



So viel sei über das Verhalten der Abkömmlinge des Pteridins gesagt. Aus der Gesamtgruppe, die den Purinen sehr verwandt ist, heben sich die 8-Oxypteridine durch Eigenschaften, wie Absorptionsspektrum und reversible Hydrierbarkeit, heraus, die denen der Flavine nahestehen.

Die *Konstitutionsaufklärung der hier behandelten Naturstoffe* begann mit dem Leukopterin und dem Xanthopterin. Dabei sind manche anfängliche Irrtümer zu überwinden gewesen, so daß auf eine detaillierte und chronologische Darstellung hier verzichtet sei. Die wichtigsten Reaktionen wurden in diesem Abschnitt beschrieben. Zuerst wurden Kohlweißlinge in großer Menge verarbeitet und deren Leukopterin untersucht. Die Unschmelzbarkeit und Unlöslichkeit und die schlecht stimmenden Analysen dieser Verbindung und ihrer Abkömmlinge ermöglichte die richtige Formulierung der Umsetzungen erst, als mit der Oxydation des Xanthopterins zum Leukopterin die Erkenntnisse an beiden Pterinen gemeinsam verwertet werden konnten und die Analysenfehler, insbesondere der Stickstoffbestimmungen, beim Leukopterin ans Licht kamen. Zur Identifizierung waren DEBYE-SCHERRER-Diagramme sehr wertvoll. Die Molekülgröße — die Zahl der C_6 -Einheiten, die bei chemischen Umsetzungen das Äquivalent waren, pro Mol — wurde erst

nach der Synthese der Pterine mit der physikalischen Molekulargewichtsbestimmung eines Trimethyl-leukopterins durch WIELAND und DECKER streng bewiesen (24). Die Konstitution des Iso-xanthopterins ergab sich aus der Oxydation zum Leukopterin-glykol (XIXa) mit Chlor und zum Desimino-leukopterin mit salpetriger Säure (unter gleichzeitiger Desaminierung) und schließlich aus der geschilderten Synthese.

III. Das Vorkommen der Pterine in der Natur und ihre Gewinnung.

1. Schmetterlinge.

Nach den lange zurückliegenden ersten Arbeiten von HOPKINS über die Pigmentfarbstoffe der Pieriden, haben 1925 WIELAND und SCHÖPF die Untersuchung dieser Substanzen wieder aufgenommen (28, 45). Dabei wurde das Xanthopterin aus Zitronenfaltern und ein Jahr später Leukopterin aus Kohlweißlingen in reiner kristallisierter Form dargestellt. SCHÖPF und BECKER haben später die Farbstoffgemische verschiedener Pieridenpigmente eingehend untersucht und mehrere neue Pterine beschrieben (44), die alle noch näher untersucht werden müssen. In München wurde von WIELAND und Mitarbeitern währenddessen das Iso-xanthopterin neu gefunden und abgeklärt und mehrere Purine aus dem Pigmentgemisch isoliert. Die Tabelle umfaßt die untersuchten Tiere und die nachgewiesenen Substanzen, womöglich mit roh geschätzten Mengen der Pigmentinhaltsstoffe in mg/Tier. Einige Pterinvorkommen in Insekten außerhalb der Pieriden sind der Tabelle 1 angefügt.

Zur Illustrierung der Gewinnung der Schmetterlingspigmente sei das Wesentliche skizziert:

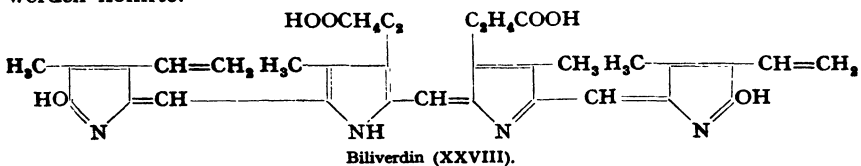
Die von den Leibern getrennten Flügel werden mit Äther entwacht und entfettet und dann, vor der Extraktion mit verdünntem Ammoniak, in dem sich die Pigmente lösen, einer Vorbehandlung unterzogen. Entweder werden die Flügel mit siedendem Spiritus übergossen, der etwas Eisessig enthält, wodurch Eiweiß denaturiert wird, Schmierien in Lösung gehen und die Pterine später bei der Ammoniakbehandlung reiner anfallen, oder sie werden zur Isolierung des *Pterobilin-proteids* (46) mit kaltem Wasser extrahiert, d. h. einige Male durchgeknetet und abgepreßt.

Die Anwesenheit des *Pterobilin-proteids* ist bei manchen Pieriden, z. B. den Kohlweißlingen, schon mit dem bloßen Auge zu erkennen. Die Flügeladern sind grün gefärbt, und die Flügel scheinen grünlich durch. Die gelben Arten zeigen bei Anwesenheit des *Pterobilinproteids* einen Stich ins Grünliche, z. B. Zitronenfalter; ihre Pigmente sind stets rein gelb bis orange. Das Proteid geht mit Wasser aus den Flügeln tiefblau in Lösung und wird zur Gewinnung des *Pterobilins* nach Einengen i. V. und Umfällen mit gesättigter Ammonsulfatlösung mit Methanol in der Zentrifuge behandelt. Die Bindung des *Pterobilins* an das Eiweiß wird dadurch schon gelöst, und der Farbstoff geht in das Methanol. Aus

Tabelle 1.

	Leukopterin	Xantopterin	Isoxanthopterin	Erythropterin	Chrysopterin	Mesopterin	Harnsäure	Hyoxanthin	Xanthin	Isoguanin (Guanopterin)
Lepidoptera										
(pieridae)										
pieris rapae	+	—		—						
pieris napi	0,2	—	+	—			0,015	+		
pieris brassicae ..	+	—	+	—			+	+		
Gonepteryx { ♂	+	0,7		+	+					0,1
rhamni L. { ♀	+	(+)		+		+				
Euchloe				+						
cardamines L. ♂	+	+		+						+
Appias nero F. ...		0,5		+						0,01
Colias edusa F. ...		+		+						
Catopsilia argante	?	0,6		+				0,2		0,08
Catopsilia rurina	?	+		+	+			0,1		+
Catopsilia statira	?	+		?				0,015		+
Appias drusilla Cr.	+									
Hymenoptera										
Vespa crabro	(+)	+								
Vespa germanica	+	+				+				
Vespa vulgaris ...	+	+								
Neuroptera										
Ascalaphus libellu-										
loides Sch. ...		+				+				
Ascalaphus										
macaronius										
Scop.		+				+				
Rhynchota										
Gaena maculata										
Fbr.		+								

Essigester ist WIELAND und TARTTER die Kristallisation gelungen. Pterobilin ist ein blauer Gallenfarbstoff, der dem Biliverdin (XXVIII) isomer ist, bisher aber noch nicht in seiner genauen Struktur festgelegt werden konnte.



Die aus allen bisher verarbeiteten Schmetterlingsarten isolierten Ptero-

bilinkristallisate sind nach den Eigenschaften der freien Substanzen und der Methylester (u. a. DEBYE-SCHERRER-Diagramme) identisch. An Mengen sind etwa zu gewinnen (ohne nennenswerten Verlust bei der Aufarbeitung):

aus 100000 Kohlweißlingen 18 mg,
und aus 100000 *Catopsilia statira*
oder *C. rurina* 240 mg kristallisierte Substanz.

Andere, nahe verwandte Arten, z. B. die orangegelbe *C. argante*, enthalten praktisch kein Pterobilin.

Bei den einstweilen verfügbaren Schmetterlingsmengen ist der interessante Farbstoff kaum mit Aussicht auf Erfolg weiter zu bearbeiten.

Bei den Faltern, die das Pterobilinprotein nicht enthalten, ist der Wasserextraktion die Denaturierung mit siedendem essigsauerm Spiritus vorzuziehen. Beide Operationen werden wiederholt, bis die Lösungen fast farblos sind, wonach das Ablösen der Pterine beginnen kann. Etwa 1 l n/3 Ammoniak, in mehreren Anteilen verwendet, nimmt allen Farbstoff von 50 g Flügeln auf. Übersäuern mit Salzsäure fällt die sauren Inhaltstoffe, Harnsäure, Leukopterin, Isoxanthopterin, Erythropterin usw.; beim Abstumpfen der sauren Mutterlauge fallen Xanthin, Isoguanin, Xanthopterin usw. Zur weiteren Aufteilung der beiden Hälften kann man Fraktionierungen mit verdünnten Säuren und Alkalien benutzen, ferner die Kristallisation charakteristischer Salze, des Natrium- oder Kaliumsalzes des Leukopterins, des Bariumsalzes des Xanthopterins, der Sulfate des Isoguanins und Xanthins u. a. Außer diesen, für Pterine und Purine gleichen Methoden, mögen noch spezifische Pterineigenschaften zur Isolierung dienen, die Bildung des SO_2 -Adduktes des Xanthopterins und, was z. B. zur Trennung des Isoxanthopterins vom Leukopterin sehr zweckmäßig war, die reversible Hydrierung, in diesem Fall des Isoxanthopterins mit rauchender Jodwasserstoffsäure, wobei Dihydro-isoxanthopterin in Lösung geht und so vom ungelöst und unverändert bleibenden Leukopterin abgetrennt werden kann (22).

Zur Anreicherung des Xanthopterins aus Mutterlaugen haben SCHÖPF und BECKER (44, 47) die chromatographische Adsorption an saure Bleicherden eingeführt und zum Nachweis und der Trennung geringer Pterinmengen weitere chromatographische Methoden aus Wasser und Methanol an Bleicherden, Aluminiumoxyd und Bariumsulfat entwickelt.

Besonders zum Nachweis des *Erythropterin*s (44, 47) hat sich die Chromatographie bewährt. Die roten und bei Anwesenheit von Xanthopterin die orangen Farben der Pieriden beruhen auf dem Gehalt der Schuppen an dieser Substanz. Erythropterin ist saurer als Xanthopterin und ent-

hält weniger Stickstoff. Nach SCHÖPF geht es beim Stehen seiner Lösungen in ein dunkles amorphes Produkt über, und diese Empfindlichkeit beeinträchtigt auch die chromatographischen Verfahren, an Aluminiumoxyd z. B. wird es rasch zerstört. Aus methanolischer Salzsäure wird es mit Pyridin in schönen roten Flocken gefällt. Aus verdünnter Salzsäure erhält man es in kleinen Gebilden, die im polarisierten Licht auslöschen. Die Analysenzahlen schwanken aber über Prozente. Über den Aufbau des Erythropterins ist nichts bekannt, es gibt die Murexidprobe nicht, und daher ist wohl an ein anderes Grundgerüst als das des Pteridins zu denken. Für die Frage nach der physiologischen Rolle der Schmetterlingspigmente ist die Lösung dieses Problems von besonderem Interesse.

2. Andere Insekten.

Das Vorkommen der Pterine ist nicht auf Schmetterlinge beschränkt. 1933 haben SCHÖPF und BECKER nachgewiesen (48), daß auch die gelben Flecken der Wespe und die gelbe Farbe ihrer Leibringe durch Pterin-pigmente, die sich im wesentlichen aus Xanthopterin und Leukopterin zusammensetzen, verursacht sind. Um die Untersuchung selten vorkommender Tiere zu ermöglichen, haben diese Autoren Mikromethoden zum Nachweis der wichtigsten Pterine ausgearbeitet (47). Beim Xanthopterin haben es die charakteristische Fluoreszenz und die günstigen Adsorptionseigenschaften, z. B. aus 0,01proz. methanolischer Salzsäure an Aluminiumoxyd, ermöglicht, die noch annähernd quantitativ erfaßbare Menge auf 1γ zu senken auch wenn das Xanthopterin in Gemischen vorliegt: die Breite der gelben, bei U.-V.-Bestrahlung gelbgrün fluoreszierenden Zone im Mikroadsorptionsrohr ist etwa der adsorbierten Xanthopterinmenge proportional. Ein entsprechender Nachweis, etwas weniger empfindlich, ist für Erythropterin brauchbar, für Leukopterin ist dagegen erst später von DECKER eine sehr empfindliche Methode angegeben worden, die die charakteristische Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des Leukopterins von der Alkalikonzentration benutzt und $0,5 \gamma$ zu erfassen gestattet (49).

Nach der Entdeckung der Pterine in Wespen hat es BECKER unternommen, die Ordnungen der Insekten auf das Vorkommen der Pterin-pigmente durchzuprüfen (50). Die morphologische Analyse gab dabei den ersten Hinweis für das Vorhandensein von Pterin-pigmenten, denn Lokalisation, Einlagerung und Optik (polarisationsmikroskopische Betrachtung zeigt den stets kristallinen Charakter der eingelagerten Pterin-körner) sind für Pterin-pigmente typisch. War dieser Hinweis positiv, dann wurde mit dem genannten empfindlichen Xanthopterin-nachweis die Entscheidung getroffen.

Bei Vertretern folgender Ordnungen wurden Pterine gefunden:

- Hymenoptera... bei der Mehrzahl der Familien. Neben Melanin sind die Pterine hier die einzigen Pigmente.
- Lepidoptera bei Pieriden und — wohl nur mangels weiterer Untersuchungen — nur bei dieser Familie.
- Neuroptera nur bei der Gattung *Ascalaphus*.
- Rhynchota nur bei einer einzigen Art, der chinesischen Singzikade (*Gaena maculata* FBR.).

Bei den anderen Ordnungen hat BECKER die Pterine nicht oder jedenfalls nicht sicher nachweisen können.

Es ergibt sich also, daß die Pterine keineswegs allgemeine Insektenfarbstoffe sind, daß ihr Vorkommen aber merkwürdig über das System verstreut ist, denn die vier genannten Ordnungen stehen im System weit auseinander, und auch bei ihnen sind die Pterine meist nur bei einer oder einigen wenigen Familien zu finden, und dort auch stets nur bei Imagines, niemals bei Larven oder Puppen. Diese Befunde erlaubten BECKER, im Verein mit den Ergebnissen seiner umfassenden morphologischen, histologischen und physiologischen Untersuchungen, insbesondere an Wespen, wichtige Schlüsse zu ziehen, die im nächsten Abschnitt besprochen werden sollen.

3. Wirbeltiere.

Mit der Fluorescenz als Test haben HÜTTEL und SPRENGLING ein Derivat des Pteridins aus Fischen isoliert und *Ichthyopterin* genannt (6). Sie stießen darauf bei der Suche nach dem Schreckstoff der Elritzen (*Phoxinus laevis* AG.), einer Substanz, die von frisch verletzten Tieren in das Wasser abgegeben wird und die anderen Elritzen zu rascher Flucht veranlaßt. Zu Beginn der Anreicherung ging der Schreckwirkung eine charakteristische Blaufluorescenz parallel, die etwa dieselbe pH-Abhängigkeit der Fluorescenz zeigte wie das Lactoflavin. Der Träger der Fluorescenz wurde isoliert, scheint aber mit dem Schreckstoff in keiner näheren Beziehung zu stehen. Er ist bei Fischen weit verbreitet, alle nach den Elritzen untersuchten Cypriniden, ferner Salmoniden u. a. enthalten ihn auch, während die Arten mit fehlender oder schwacher Beschuppung (Anguilliden, Siluriden, Gadiden u. a.) in der Haut grün (Lactoflavin?) oder gar nicht fluorescieren. Die Analysenwerte stimmen auf ein Methyltrioxy-pteridin und das Absorptionsspektrum ist mit dem des Isoxanthopterins praktisch identisch. Danach ist es sicher, daß es sich um ein Derivat des 9-Oxy-pteridins handelt, die endgültige Aufklärung der Konstitution steht aber noch aus. Die Konzentration des Ichthyopterins in der frischen Fischhaut ist etwa $1:10^6$.

1936 hat KOSCHARA gleichfalls mit der Fluorescenz als Test *Xantho-*

pterin aus menschlichem Harn isoliert (7).¹ An diese Entdeckung schlossen sich folgende Ergebnisse an: Xanthopterin findet sich im Harn aller bisher untersuchten Säugetiere, dann auch in deren Organen, besonders in der Leber (Konzentration bis 4:10⁶). Außer dem Xanthopterin isolierte KOSCHARA einen weiteren gelben Farbstoff, das *Urothion* (8, 51), das 20% Schwefel enthält und gleichfalls ein Derivat des Pteridins ist, vielleicht sogar mit der gleichen Substitution des Pyrimidinringes wie Xanthopterin, Leukopterin und Iso-xanthopterin.

Während die Pterine auf den Flügeln der Schmetterlinge die Hauptmenge der in verdünntem Ammoniak löslichen Substanzen ausmachen, müssen die Harnpterine von großen Mengen anderer Inhaltsstoffe abgetrennt werden. Dazu sind Adsorptionsverfahren besonders geeignet, die KOSCHARA anlässlich der Isolierung des Xanthopterins allgemein für wäßrige Lösungen methodisch durchentwickelt hat (53).

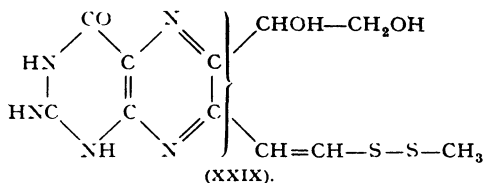
Durch Adsorption des mineral-sauren Harns an Bleicherde und Elution mit wäßrigem Pyridin wird eine Purinfraktion gewonnen, aus der mit Salzsäure die schwerlösliche Harnsaure abgetrennt wird. Die Xanthinbasenfraktion mit dem Xanthopterin wird mit Silber in ammoniakalischer Lösung fraktioniert gefällt. Der xanthopterinreichste Teil — Xanthopterin bildet ein beständiges, gelbes Silber-salz — wird mit Salzsäure zerlegt, die Lösung an Frankonit KL adsorbiert, mit Phosphatpuffer gewaschen und mit Boratpuffer (pH 9,2) eluiert. Die endgültige Reinigung folgt den beim Schmetterlingsfarbstoff geübten Verfahren.

KOSCHARA hat beobachtet, daß neben dem Xanthopterin noch zahlreiche fluoreszierende Verbindungen im Harn enthalten sind, die sich an verschiedenen Stellen der Aufarbeitung bemerkbar machen und deren Isolierung nur eine Frage der Zeit und des Interesses ist. Eine davon, der Schwefel enthält, das *Urothion*, geht seiner endgültigen Aufklärung entgegen. Bei der Anreicherung konnten zwei Reaktionen zu optischen Testen verwandt werden: die empfindlichere ist eine olivgrüne Fluoreszenz (bei U.-V.-Belichtung) nach Permanganatoxydation in mineral-saurer Lösung. In einer Verdünnung von 1:10⁷ ist die Reaktion noch positiv, so daß sie schon in nativem Harn beobachtet werden kann. Die zweite Reaktion ist eine kirschrote Färbung beim Erwärmen mit konzentrierter Schwefelsäure. Beim Verdünnen verschwindet die Farbe und kommt mit weiterer konzentrierter Säure zurück. Diese sog. Thiophenolreaktion gilt als für solche Substanzen charakteristisch, die aromatische HS-Gruppen enthalten oder mit starker Schwefel- oder Überchlorsäure bilden können. Zur Isolierung waren Adsorptionen an Bleicherden und Kohle die wichtigsten Schritte, 45—90 mg reinste Substanz aus 1000 l Harn war die Ausbeute.

Bei der katalytischen Hydrierung wird ein Mol Methylmerkaptan

¹ Der bis zum scharfen Beweis der Identität mit dem Insektenfarbstoff gebrauchte Name „Uropterin“ ist fallengelassen worden.

frei, eine Aminogruppe ist nach VAN SLYKE zu eliminieren (langsam, daher nach KOSCHARAS Ansicht aus einem Guanidinverband), zwei Oxygruppen sind mit Perjodsäure nach MALAPRADE in Formaldehyd und „Urothionaldehyd“ zu spalten, und mit Acetanhydrid in Pyridin sind maximal vier Acetylreste einzuführen. Aus diesen Versuchen, aus den Elementaranalysen, die für die freie Verbindung zu der Formel $C_{11}H_{13}O_3N_5S_2$ führen, und aus dem Absorptionsspektrum, das die beiden charakteristischen Banden des Lactoflavins und des Xanthopterin in etwa den gleichen Lagen hat, schlägt KOSCHARA die Formel (XXIX) für Urothion vor (53).



IV. Die biologische Bedeutung der Pterine.

1. Insekten.

Aus den chemischen Erkenntnissen, die bisher über die Pterine gewonnen wurden, läßt sich über ihre physiologische Bedeutung noch wenig ableiten. Auffällig ist einstweilen nur, daß der Pyrimidinring stets gleich (durch die Aminogruppe in Stellung 2 und die Oxygruppe in Stellung 6) substituiert ist, daß aber das entsprechende Purin, das Guanin, im Gegensatz zu anderen Purinen, nicht mit den Pterinen vergesellschaftet vorkommt; man darf daher annehmen, daß eine Pyrimidinvorstufe, die normalerweise in Guanin übergeht, in besonderen Fällen in Pterine verwandelt und als solche deponiert werden kann. Wir fassen daher die Bildung der Pterine *in vivo* als abgewandelte Guaninsynthesen auf und erblicken in den geschilderten Tatsachen gleichzeitig einen Hinweis darauf, daß die biologische Bildung des Guanins und der Pterine und damit vermutlich auch der anderen Purine vom Pyrimidinring her stattfindet, wie das *in vitro* bisher ausschließlich der Fall ist, und wie das, bisher ohne Anhaltspunkte, auch für Entstehungen *in vivo* angenommen worden ist.

Die biologischen Beobachtungen von ERICH BECKER (50), die im folgenden näher besprochen werden, führen noch zwingender zu der Annahme, daß einer Vorstufe der Pterine eine erhebliche Bedeutung zukommt. Das unregelmäßig über das System der Insekten verstreute Auftreten der Pterine kann mit einer solchen Vorstufe erklärt werden, die bei allen Insekten vorhanden ist, aber nur unter speziellen Bedin-

gungen als Pterine abgelagert wird. BECKER hat folgende spezielle Bedingungen der Pterinablagerung beobachtet:

1. Zeitpunkt der Pterinablagerung:

Die Ablagerung ist beschränkt auf einen engen Zeitabschnitt kurz vor dem Ende oder unmittelbar nach der Metamorphose. Die Melaninzeichnung z. B. ist dann schon fertig ausgebildet. Es wäre demnach denkbar, daß eine Vorstufe der Pterine bei der Metamorphose eine Rolle spielt und nun, nachdem diese abgeschlossen ist, und der Stoffwechsel sich auf die Verhältnisse der Imago umstellt, in unlöslicher Form aus dem weiteren Geschehen ausscheidet. Bei den Pieriden beginnt die Pterineinlagerung 2—3 Tage vor dem Ausschlüpfen, bei Wespen erst nachdem das Tier geschlüpft ist und den Inhalt der MALPIGHISCHEN Gefäße entleert hat.

2. Die physiologischen Bedingungen:

Nur an den Orten *geringer* Stoffwechselintensität lagern sich Pterine ab. Besonders bei Wespen hat dies BECKER eingehend studiert. Dort, wo Gewebe mit regem Stoffwechsel — Muskulatur oder Fettgewebe — an das Integument herantreten, ist das Chitin mit Melanin durchfärbt, und hier finden sich niemals Pterine. Dort aber, wo das Integument von Tracheenblasen unterlegt ist, oder in Duplikaturen des Integuments, werden die Pterine in der Hypodermis abgelagert, und zwar nicht im Chitin, sondern im Plasma der Hypodermis (z. B. der Wespen) oder der Schuppenbildungszellen (bei Schmetterlingen). Als typisches Beispiel für eine pterinführende Integumentduplikatur sei die gelbe hintere Hälfte der Hinterleibsringe der Wespen genannt. Die Hauptfunktion der Hypodermis während der Metamorphose ist die Abscheidung der Chitincuticula. Danach bildet sie sich zurück, und die Pterinablagerung erfolgt in das schon reduzierte Epithel. Auch histologisch ist die Ablagerung der Pterine also die Endphase einer Entwicklung.

BECKER und SCHÖPF (48) ließen die Metamorphose von *Gonepteryx rhamni* unter reinem Sauerstoff verlaufen. Die schlüpfenden Tiere sind dann schwächer und geschädigt, und die Schuppen sind nun zwar in Form und Größe unverändert, aber praktisch *pigmentfrei*.

Wenn die Pterinvorstufe allgemein bei der Metamorphose der Insekten auftritt, so ist nach dem Gesagten anzunehmen, daß sie nur dort als Pterinpigment erscheinen kann, wo besonders geringe Atmungsgröße in bestimmten Bezirken der Imagines ihre Ablagerung erlaubt.

Nach den bisherigen Beobachtungen ist es eine notwendige Bedingung, daß die Stellen, an denen die Vorstufe in Pterine verwandelt und abgelagert wird, nicht in unmittelbarer Beziehung zu tätigem Gewebe stehen, es mag aber wohl sein, daß dazu noch andere, im Insektenreich nicht ubiquitäre Bedingungen kommen. Erst das Zusammentreffen

bestimmter anatomischer und physiologischer Verhältnisse schafft die Voraussetzung zur Bildung der Pterinpigmente. So ist es möglich, das sporadische Auftreten der Pterine im System der Insekten zu verstehen. Die Frage nach der Bedeutung der Pterine in den Insekten ist damit eine Frage nach der Natur und der Rolle ihrer Vorstufe geworden.

Der Metamorphosenstoffwechsel führt in den Pterinpigmenten zu einem Substanzgemisch sehr stickstoffreicher Verbindungen, deren Ablagerung gegen Ende der Metamorphose einer Exkretion gleichzusetzen ist. Die Schuppen der Schmetterlinge beispielsweise sind Chitinmembranen von Zellen, deren letzte Funktion die Bildung und Ablagerung der Pterine ist. Danach verkümmern sie vollständig, und die Schuppen stehen dann nicht mehr in Verbindung mit dem Stoffwechsel der Imago (54). Die Pterine sind also Endprodukte des Metamorphosenstoffwechsels, und ihre Ablagerung entlastet den Organismus von beträchtlichen Stickstoffmengen. In den eigentlichen Exkretionsorganen, den MALPIGHISCHEN Gefäßen, z. B. der Wespen, finden sich jedoch keine Pterine, sondern Harnsäure, und in den Exkrementen frisch geschlüpfter Zitronenfalter (55), Kohlweißlinge oder Kleidermotten (49) sind Pterine ebenfalls, wenn überhaupt, nur in verschwindender Menge vorhanden.

Obwohl die Pterinpigmente viel Purine enthalten, sind ihre Entstehungsbedingungen ganz andere als die der eigentlichen Purindepots, die Harnsäure oder Guanin führen und Orte regen Stoffwechsels sind.

2. Säugetiere.

Im Gegensatz zu den Insekten wurden bei Säugern bisher keine Pterindepots gefunden. Die wichtigsten Vorkommen sind hier die des Xanthopterins und des Urothions im Harn (sowie, anscheinend ebenfalls gelöst, in Leber, Niere usw.), der aber keine nachweisbaren Mengen Leukopterin enthält (49).

Xanthopterin findet sich nicht in pflanzlichem Material (17), und orale Gaben erhöhen den Gehalt des Harns an Xanthopterin nicht. Es muß daher im tierischen Organismus gebildet werden: es ist also kein Vitamin, und daher ist die physiologische Rolle, auch wenn sie relativ bedeutend wäre, schwer zu erkennen und bis heute auch noch nicht erkannt. Seiner Konstitution nach und nach der Lage des Redoxpotentials (bisher nur geschätzt, nicht gemessen), könnte es als Wasserstoffüberträger fungieren.

KOSCHARA und HRUBESCH (56) fanden die Menge des mit dem Harn ausgeschiedenen Xanthopterins bei Krankheiten mit gesteigertem Stickstoffumsatz erhöht. Von TSCHESCHE und WOLF wurde es als anti-anämischer Faktor bei Ratten geprüft (57). Das positive Ergebnis wurde bestritten, nach einer amerikanischen Notiz soll jedoch die durch einseitige Eiweißkost hervorgerufene Anämie von Fischen durch Xantho-

pterin gebessert werden (58). Die pharmakologische Untersuchung mit großen, bis zu toxischen Dosen gab keinen Hinweis auf die normale Funktion des Xanthopterin (59). Die untersuchten Säugetiere bekamen uncharakteristische Schäden am Pankreas und Insuffizienz der Niere. Die Niere staut intravenös gegebenes Xanthopterin, was damit zusammenhängen wird, daß schon unter den normalen Aufgaben der Niere der Durchlaß der Harnsäure die schwerste Aufgabe zu sein scheint.

Für die Art der physiologischen Funktion des Urothions gibt es noch keinen Anhaltspunkt.

Literaturverzeichnis.

- 1 SCHOPF, C u. E. BECKER: Liebigs Ann Chem. **524**, 52 (1936).
- 2 PURRMANN, R.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **260**, 105 (1939)
- 3 — Liebigs Ann Chem **544**, 182 (1940)
- 4 TARTTER, A. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **266**, 130 (1940).
- 5 SCHOPF, C u. R. REICHERT: Liebigs Ann. Chem. **548**, 82 (1941)
- 6 HÜTTEL, R. u. G. SPRENGLING: Liebigs Ann. Chem. **554**, 69 (1943)
- 7 KOSCHARA, W.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **240**, 127 (1936)
- 8 — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **263**, 78 (1940)
9. HOPKINS, F. G.: Proc. Roy. Soc. (London), Ser B **130**, 359 (1942)
10. — Philos. Trans. Roy. Soc. London, Ser B **186**, 661 (1895)
- 11 KÜHLING, O.: Ber. dtsh. chem. Ges. **28**, 1970 (1895).
12. GABRIEL, S u. A. SONN: Ber. dtsh. chem. Ges. **40**, 4857 (1907)
13. TRAUBE, W.: Ber. dtsh. chem. Ges. **33**, 1371 (1900).
14. SACHS, F. u. G. MEYERHEIM: Ber. dtsh. chem. Ges. **41**, 3957 (1908)
15. KUHN, R. u. A. H. COOK: Ber. dtsh. chem. Ges. **70**, 761 (1937).
- 16 PURRMANN, R.: Liebigs Ann. Chem. **544**, 182 (1940).
17. KOSCHARA, W.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **277**, 159 (1943).
18. PURRMANN, R.: Liebigs Ann. Chem. **546**, 98 (1940)
19. TRAUBE, W.: Liebigs Ann. Chem. **432**, 266 (1923).
- 20 PURRMANN, R.: Liebigs Ann Chem. **548**, 284 (1941)
21. WIELAND, H., H. METZGER, C. SCHÖPF u. M. BÜLOW: Liebigs Ann. Chem. **507**, 226 (1933)
22. —, A. TARTTER u. R. PURRMANN: Liebigs Ann. Chem. **545**, 209 (1940).
23. SCHÖPF, C. u. R. REICHERT: Liebigs Ann Chem. **548**, 82 (1941).
24. WIELAND, H. u. P. DECKER: Liebigs Ann. Chem. **547**, 180 (1941).
25. — u. R. PURRMANN: Liebigs Ann Chem. **544**, 163 (1940).
26. BILTZ, H.: J. prakt. Chem. **145**, 93 (1936)
27. WIELAND, H. u. A. TARTTER: Liebigs Ann. Chem. **543**, 287 (1940)
28. SCHÖPF, C. u. H. WIELAND: Ber. dtsh. chem. Ges. **59**, 2067 (1926).
29. WIELAND, H. u. A. KOTZSCHMAR: Liebigs Ann. Chem. **530**, 152 (1937).
30. MOORE, F. J. u. R. M. THOMAS: J. Amer. chem. Soc. **40**, 1120 (1918)
31. BILTZ, H. u. R. ROBL: Ber. dtsh. chem. Ges. **54**, 2441 (1921).
32. — u. F. MAX: Ber. dtsh. chem. Ges. **54**, 2451 (1921).
33. WIELAND, H. u. R. PURRMANN: Liebigs Ann. Chem. **539**, 179 (1939).
34. SCHÖPF, C. u. A. KOTTLER: Liebigs Ann. Chem. **539**, 128 (1939).
35. —, E. BECKER u. R. REICHERT: Liebigs Ann. Chem. **539**, 156 (1939).
36. KOSCHARA, W.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **250**, 161 (1937).
37. FISCHER, H.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **60**, 69 (1909).
38. SPIES, J. R. u. TH. H. HARRIES JR.: J. Amer. chem. Soc. **61**, 351 (1939).

39. WIELAND, H. u. R. LIEBIG: Liebigs Ann. Chem. **555**, 146 (1944).
40. BILTZ, H. u. H. SCHAUDER: J. prakt. Chem. **106**, 138 (1923).
41. v. VEEN, A. G. u. J. K. BAARS: Recueil Trav. chim. Pays-Bas **57**, 248 (1938).
42. KOSCHARA, W.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **279**, 44 (1943).
43. KUHN, R., P. GYÖRGY u. TH. WAGNER-JAUREGG: Ber. dtsh. chem. Ges. **66**, 1034.
44. SCHÖPF, C. u. E. BECKER: Liebigs Ann. Chem. **524**, 124 (1930).
45. WIELAND, H. u. C. SCHÖPF: Ber. dtsh. chem. Ges. **58**, 2178 (1925).
46. — u. A. TARTTER: Liebigs Ann. Chem. **545**, 197 (1940).
47. BECKER, E. u. C. SCHÖPF: Liebigs Ann. Chem. **524**, 124 (1930).
48. SCHÖPF, C. u. E. BECKER: Liebigs Ann. Chem. **507**, 266 (1933).
49. DECKER, P.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **274**, 223 (1942).
50. BECKER, E.: Z. Morph. Ökol. Tiere **32**, 672 (1936).
51. KOSCHARA, W.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **277**, 284 (1943).
52. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **239**, 89 (1936).
53. Chemie **56**, 195 (1943).
54. SÜFFERT, F.: Biol. Zbl. **57**, 615 (1937).
55. BECKER, E.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **246**, 177 (1937).
56. KOSCHARA, W. u. A. HRUBESCH: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **258**, 39 (1939).
57. TSCHESCHE, R. u. H. J. WOLF: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **244**, I (1930).
58. SIMMONS, R. W. u. E. R. NORRIS: J. biol. Chemistry **140**, 679 (1941).
59. HÖRLEIN, H.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **198**, 258 (1941).

(Revision abgeschlossen am 16 Mai 1944.)

Die Biochemie der Virusarten.

Von **GERHARD SCHRAMM**, Berlin-Dahlem.

(Mit 29 Abbildungen.)

I. Einleitung.

Definition des Virusbegriffes.

Der Virusbegriff ist im Lauf der Entwicklung der Naturwissenschaften verschieden definiert worden. Wir verstehen heute darunter biologische Einheiten, die wegen ihrer geringen Größe feinporige, bakteriendichte Filter zu durchdringen vermögen und die Eigenschaft besitzen, sich in lebenden Zellen, dagegen nicht auf künstlichen Nährböden zu vermehren. Eine befriedigende Abgrenzung gegen andere Krankheitserreger ist zur Zeit noch nicht möglich. So gibt es Mikroorganismen, wie die Erreger der Pneumonie der Rinder und der Agalaktie der Ziegen, die wohl bakteriendichte Filter durchdringen, aber nicht als Virusarten bezeichnet werden, da sie sich auch auf künstlichen Nährböden vermehren. Andere Krankheitserreger, die sich nur in lebenden Zellen vermehren, werden nicht zu den Virusarten gerechnet, da sie nicht filtrierbar sind. Zu dieser letzten Gruppe gehören z. B. die Rickettsien, von denen der Erreger des Fleckfiebers besonders bekannt ist. Es ist möglich, daß darüber hinaus in der Natur noch eine Reihe von Agentien vorkommen, die ebènfalls zu den Viren gehören, über deren Vorhandensein aber bisher noch nichts bekannt geworden ist, da ihnen eine krank machende Wirkung bei Mensch, Tier oder Pflanze fehlt.

Die Existenz eines Virus im heutigen Sinne wurde zuerst von IWANOWSKI 1892 nachgewiesen, als er zeigte, daß der Saft mosaikkranke Tabakpflanzen seine Infektiosität auch nach Filtration durch ein CHAMBERLAND-Filter behielt. Die allgemeine Bedeutung dieses Experiments wurde aber von ihm nicht erkannt, da er die Infektiosität auf einen filtrierbaren, nicht vermehrungsfähigen Giftstoff oder auf Materialfehler der verwendeten Filter zurückführte. Erst nach den Arbeiten von LÖFFLER und FROSCHE (1898) (112) über das Virus der Maul- und Klauen-seuche setzte sich allgemein die Erkenntnis durch, daß es vermehrungsfähige Agentien gibt, die kleiner sind als Bakterien. In der Folgezeit zeigte es sich dann bei vielen Krankheitserregern, daß sie filtrierbar und

nicht auf einem künstlichen Nährboden züchtbar sind und somit unter den oben definierten Virusbegriff fallen.

Der Virusbegriff hat sich somit aus der Arbeitsmethodik der Bakteriologie herausgebildet, ohne daß damit Klarheit über das Wesen der Viren geschaffen wurde. Der Streit der Meinungen über die *Natur der Viren* läuft fast immer auf die Frage hinaus, ob die Viren belebt oder unbelebt sind; dabei ist man sich nicht im klaren, daß mit einer Beantwortung dieser Frage nichts gewonnen ist, da den Bezeichnungen „belebt“ und „unbelebt“ in diesem Grenzgebiet der Biologie und Chemie kein eindeutiger Inhalt mehr zukommt, sondern ein fließender Übergang zwischen belebten und unbelebten stofflichen Gebilden besteht. Die Viren besitzen gewisse Eigenschaften des Lebens, jedoch nicht alle. Es ist daher eine Frage der Definition, ob wir sie auf Grund ihrer biologischen Leistungen als Lebewesen bezeichnen wollen oder nicht. Weiter führt die Frage nach der stofflichen Natur der Viren, da hier eine experimentelle Entscheidung möglich ist. Von besonderer Bedeutung ist die Feststellung, ob die Viren als einheitlich zusammengesetzte Wirkstoffe, also als Moleküle, oder als komplizierte Organismen, die sich aus mehreren Stoffarten zusammensetzen, aufzufassen sind. Ein entscheidender Fortschritt in der Lösung dieses Problems wurde von STANLEY 1935 (198) erzielt. Er zeigte, daß das *Tabakmosaikvirus* in allen seinen Eigenschaften vollkommen mit denen eines definiert zusammengesetzten Eiweißstoffes übereinstimmt. In der darauffolgenden Zeit wurden dann eine große Reihe pflanzlicher und tierischer Virusarten als einheitliche Eiweißstoffe erkannt, so z. B. das in Dodekaedern kristallisierende *Bushy-stunt-Virus* aus Tomaten [BARDEN und PIRIE (10)], das *Kartoffel-X-Virus* [STANLEY und WYCKOFF (201)], das Virus des *Kaninchen-Papilloms* [BEARD und WYCKOFF (14)], das *Maul- und Klauenseuchevirus* [JANSSEN (74)], die Viren der *Polyederkrankheiten* der Insekten [BERGOLD und SCHRAMM (19)] und das *Encephalomyelitisvirus* der Maus [GARD und PEDERSEN (58)]. Es darf hieraus allerdings noch nicht gefolgert werden, daß alle Virusarten einen derartig einfachen Bau aufweisen. Einige Viren von der Art des Pockenvirus weisen eine kompliziertere chemische Struktur auf. Es ist daher möglich, daß ein fließender Übergang besteht zwischen den aus einem Eiweißmolekül bestehenden Virusarten über die komplizierteren großen Viren von der Art der Kuhpocken und Psittakose zu den Rickettsien und schließlich zu den einfachsten Mikroorganismen.

Durch die Erkenntnis der einfachen, stofflichen Natur bestimmter Virusarten ist eine neue Entwicklung der Virusforschung eingeleitet worden; denn bei stöchiometrisch zusammengesetzten chemischen Einheiten ist es grundsätzlich möglich, eine Konstitutionsermittlung im Sinne der organischen Chemie zu betreiben, während ein derartiger Versuch bei einem aus Cytoplasma bestehenden Mikroorganismus sinnlos wäre. Es

soll die Aufgabe der vorliegenden Zusammenfassung sein, zu zeigen, wie die bisher in der Virusforschung angewendeten mikrobiologischen und bakteriologischen Arbeitsweisen durch *chemische Arbeitsmethoden* und *chemische Betrachtungsweisen* erweitert und fortgeführt werden können.

II. Biologie der Viren.

1. Übersicht über die Viruskrankheiten.

Das Bestreben, die ständig wachsende Zahl der Virusarten in ein natürliches System, wie es in der Zoologie und Botanik besteht, einzuordnen, ist bisher wenig erfolgreich gewesen, da genetische Beziehungen zwischen Virusarten zumeist unbekannt sind. Man hat daher versucht, die Viren nach histologischen Merkmalen [LIPSCHÜTZ (111)] oder nach ihrer Größe zu ordnen [RIVERS (158)]. Diese Einteilungen sind jedoch wenig befriedigend und haben sich nicht durchsetzen können. Von RUSKA (165a) wurde neuerdings eine Einteilung nach morphologischen Gesichtspunkten versucht, die allerdings ebenfalls noch auf Schwierigkeiten stößt. Eine Klassifizierung nach chemischen Gesichtspunkten ist zur Zeit noch nicht möglich, da über die Struktur der Virusarten noch zu wenig bekannt ist. Man kann jedoch drei Gruppen von Virusarten unterscheiden, zwischen denen es keine Überschneidungen gibt. Es sind dies 1. die tierpathogenen Virusarten, 2. die pflanzenpathogenen Virusarten und 3. die Bakteriophagen. Innerhalb dieser Gruppen wird die weitere Unterteilung meist nach der Art des befallenen Organismus und nach der Lokalisation des pathologischen Geschehens vorgenommen. Man gelangt auf diese Weise weniger zu einem System der Virusarten als vielmehr der Viruskrankheiten, das aber für praktische Zwecke ausreichend ist [R. DOERR (43)].

Man kennt zur Zeit etwa 100 verschiedene *tierpathogene Virusarten*, von denen einzelne wiederum aus einer Reihe miteinander verwandter Stämme bestehen. Von diesen bilden die Krankheiten der Säugetiere und Vögel den größten Anteil. Über die wichtigsten von ihnen gibt die folgende Tabelle einen Überblick:

Viruskrankheiten der Warmblüter.

1. Krankheiten ohne besondere Lokalisation:

Masern,	Gelbfieber,	Ansteckende Blutarmut
Röteln,	Pappataciefieber,	der Pferde,
(Scharlach), ¹	Rinderpest,	Ektromelie der Maus,
	Schweinepest,	Virus III des Kaninchens,
	Geflügelpest,	Myxomatosis des Kaninchens.

¹ Virusätiologie nicht gesichert.

2. Geschwulstkrankheiten:

Sarkom des Huhns (ROUS),	Warzen,
Leukose des Huhns,	Papillom des Kaninchens (SHOPE).

3. Krankheiten mit vorwiegender Lokalisation in der Haut (Pustel- oder Bläschenbildung):

Pocken des Menschen,	Windpocken,
Pocken der Säugetiere,	Gürtelrose (Zoster),
Pocken der Vögel,	Herpes simplex,
	Maul- und Klauenseuche

4. Krankheiten mit besonderer Lokalisation

im Nervensystem;	im Respirationssystem:	in anderen Organen:	
Spinale Kinderlähmung,	Papageienkrankheit	Lymphogranuloma	} Lymph-
Encephalitis des Menschen,	(Psittakose),	inguinale	
Encephalomyelitis der	Grippe des Menschen,	Mumps,	} Speichel-
Tiere,	Erkältungskrankheiten	Speicheldrüsen-	
BORNASche Krankheit	des Menschen,	virus der Nager	} Haut,
des Pferdes,	Ferkelgrippe,	Moluscum conta-	
Tollwut,	Infektiöse Bronchitis	giosum	
Schweinelähme,	der Pferde,	Trachom,	
Hühnerlähme,	Infektiöse Bronchitis	Schwimmbadkon-	binde-
Hundestaupe.	der Rinder.	junktivitis	haut.

Aber auch bei anderen Wirbeltieren sind Krankheiten bekannt, bei denen ein Virus als Erreger angenommen wird, so z. B. bei verschiedenen *Fischen und Reptilien*

Praktisch bedeutsam sind weiterhin die *Viruskrankheiten der Insekten*. Als Beispiel seien hier die als Faulbrut bezeichnete Krankheit der Bienen und die bei den verschiedensten Raupenarten beobachteten Fölyederkrankheiten genannt. Von diesen sind am besten untersucht die Polyederkrankheit der Seidenraupen („Gelbsucht“ der Seidenraupen), der Nonnenraupen („Wipfelkrankheit“) und der Schwammspinner.

Die Zahl der *pflanzlichen Viruskrankheiten* ist zwei- bis dreimal so groß wie die der tierischen. Unter ihnen bilden die „*Mosaikkrankheiten*“ wohl die wichtigste Gruppe. Diese äußern sich in einer chlorotischen Fleckung, die namentlich an jungen, sich entfaltenden Blättern auftritt und auf einer Verzögerung der Chlorophyllbildung beruht. In diese Gruppe gehören vor allen Dingen die Mosaikkrankheiten der *Solanaceen* (Kartoffel, Tomate, Tabak usw.), ferner das *Curcubitaceen*mosaik, das *Rübenmosaik*, das *Leguminosenmosaik* und die Mosaikkrankheiten der *Graminaceen* (Zuckerrohr, Mais, Weizen usw.). Daneben gibt es noch eine Reihe von *Pflanzenvirosen*, die auch andere Symptome, namentlich Wachstumsstörungen verschiedenster Art, hervorrufen.

Eine systematische Einteilung der pflanzlichen Viruskrankheiten ist noch schwieriger als bei den tierischen; dies liegt einmal an der Vielzahl

der Erreger und zum anderen daran, daß die Symptomausprägung bei den Pflanzen nicht so mannigfaltig und auffällig ist. Diese ist im allgemeinen mehr von den Außenbedingungen wie Temperatur und Licht abhängig, so daß eine Identifizierung verschiedener Virusarten nur durch unmittelbaren Vergleich möglich ist. Die Systematik der pflanzlichen Virusarten ist fernerhin durch die zum Teil recht ausgeprägte Veränderlichkeit der Pflanzenviren erschwert. So kann man beim Tabakmosaik über 50 verschiedene, miteinander verwandte Stämme unterscheiden (75). Beim Kartoffel-X-Virus ist nach KÖHLER (88) die Zahl der möglichen Varianten wahrscheinlich außerordentlich groß.

Diese Schwierigkeiten haben zu einer großen Verwirrung in der Nomenklatur der pflanzlichen Virusarten geführt. So bestehen für das gewöhnliche Tabakmosaikvirus etwa 10—12 verschiedene Bezeichnungen. Von den vorliegenden Vorschlägen ein einheitliches System der pflanzlichen Viren zu schaffen, verdient wohl derjenige von HOLMES (71) die meiste Beachtung. Hiernach werden die Viren ähnlich wie die Organismen mit lateinischen Doppelnamen bezeichnet, von denen der erste die Gattung, der zweite die Art wiedergibt. Nach HOLMES ist z. B. das Tabakmosaikvirus als *Marmor tabaci Variatio vulgare* zu bezeichnen. Die einzelnen Varianten des Tabakmosaikvirus werden dementsprechend als *Marmor tabaci Variatio aucuba*, *deformans*, *flavum* usw. benannt.

Eine Hoffnung auf eine erträgliche Ordnung innerhalb der pflanzlichen Virusarten besteht jedoch nur, wenn die verschiedenen bisher beschriebenen Virusarten unmittelbar unter gleichen Versuchsbedingungen untersucht werden, und neben der biologischen Charakterisierung eine exakte chemische Virusforschung sich durchsetzt.

Die auffällige Erscheinung der plötzlichen Auflösung bestimmter Bakterienkulturen (Bakteriolyse) wurde erstmalig von F. D'HERELLES (1917) als eine parasitäre Erkrankung der Bakterien erkannt. Die Erreger wurden von ihm als *Bakteriophagen* bezeichnet. Sie sind wie die Viren ultrafiltrierbar und vermehren sich nur in Gegenwart lebender Bakterien und nicht auf künstlichen Nährböden. Sie können daher als eine besondere Gattung der phytopathogenen Viren aufgefaßt werden. NORTHROP (132) stellte einen *Staphylokokkenbakteriophagen* in reiner Form dar und zeigte, daß es sich wie bei den Viren um einen Eiweißstoff handelt. Die Bakteriophagen sind in der Natur weit verbreitet. Die Phagen der pathogenen Bakterien finden sich im Kot der Menschen und Tiere sowie in Abwässern. Man kennt aber auch Phagen von Bakterien, die in der Natur frei leben. Ein Versuch der Klassifizierung der Bakteriophagen wurde von HOLMES (71) vorgenommen. Die Phagen werden nach der Art des Bakteriums bezeichnet, in dem die Vermehrung erfolgt (*Staphylokokkus-Bakteriophagen*, *Coli-Bakteriophagen* usw.). Sie sind gewöhnlich am wirksamsten gegen eine bestimmte Bakterienart, weniger

wirksam gegen verwandte und oft völlig unwirksam gegen fernerstehende Arten, so daß auf diese Weise eine Identifizierung möglich ist.

2. Die Entstehung der Viren.

Die Virusforschung hat das Interesse der Allgemeinheit in ähnlichem Maße erregt wie einst die Suche nach dem fehlenden Bindeglied zwischen Tier und Mensch, da vielfach das Virus entstehungsgeschichtlich als ein Übergang von der unbelebten Materie zum lebendigen Organismus aufgefaßt wird. Nach dem heutigen Stand unseres Wissens ist diese Auffassung nicht berechtigt. Das Virus vermehrt sich nur in einer Zelle, seine Bildung setzt also bereits das Vorhandensein eines organisierten Lebewesens voraus. Erst, wenn es gelänge, die Entstehung eines Virusmoleküls aus einfachen organischen Bausteinen außerhalb einer lebendigen Zelle zu beobachten, wäre man vielleicht der Frage nach der Urzeugung einen Schritt näher gekommen. Von mancher Seite ist allerdings das Vorkommen und die Vermehrung virusähnlicher Gebilde in Auszügen von Kompost und ähnlichem Material und in Kloakenwasser beschrieben worden [LAIDLAND und ELFORD (93), G. SEIFFERT (183)]. Jedoch ist die Natur dieser Gebilde noch zu unbekannt, als daß sich bereits irgendwelche Schlüsse aus dieser Beobachtung ziehen lassen. Die Fragestellung, die zur Zeit die Virusforschung beschäftigt, lautet vielmehr: *Ist das Virus durch die Umwandlung eines ursprünglich frei lebenden Wesens zu einem Parasiten entstanden oder ist es als Bestandteil des Wirtsorganismus aufzufassen, der durch einen unbekanntem Reiz eine gewisse Selbständigkeit erlangt hat?* Für die Möglichkeit des *exogenen Ursprungs* spricht die serologische Verschiedenheit der pflanzlichen Virusproteine von dem Eiweiß der Wirtspflanze und die Konstanz des serologischen Charakters auch bei wiederholten Passagen über ungewöhnliche Wirtsorganismen. Da durch den Parasitismus häufig Rückbildungen verursacht werden, wäre die Degeneration eines strukturierten Mikroorganismus auf ein einziges, noch vermehrungsfähiges Molekül immerhin denkbar. Für die *endogene Entstehung* des Virus spricht besonders die Tatsache, daß man Viruskrankheiten ohne Übertragung eines infektiösen Agens durch einen unspezifischen Reiz hervorrufen kann. Es sind eine ganze Reihe derartiger „provozierter“ Viruskrankheiten bekannt. So gelingt es, durch dreimalige Injektion von normalem Kaninchen- und Menschenblut in den Hoden eines Kaninchens die Entstehung eines als *Virus III* bezeichneten Krankheitserregers hervorzurufen. Durch Einpinseln von Teer kann man bei Hühnern Sarkome erzeugen, die zellfrei übertragbar sind (121). Auch Ektromelie [ΚΙΚΥΘΗ (85)] und Herpes können auf völlig unspezifische Reize hin auftreten. Diese Erscheinung kann auf das Offenbarwerden einer bereits latent vorhandenen Infektion zurückgeführt werden, jedoch läßt sich die endogene Entstehung des Virus in einem Teil der Fälle nicht

völlig ausschließen. Wie man sich diese vorzustellen hat, ist noch ungeklärt. Es wäre aber denkbar, daß bestimmte, vermehrungsfähige Zellelemente auf bestimmte Reize hin einen autonomen Charakter bekommen und damit zu einem Virus werden können.

3. Die Übertragung.

Die natürliche Übertragung der Virusarten von einem infizierten auf einen nicht infizierten Wirt erfolgt im allgemeinen auf dem gleichen Wege wie die Verbreitung anderer Infektionsstoffe. Wichtige, natürliche Eintrittspforten sind z. B. die Nasenschleimhäute, der Respirationstrakt sowie kleine Verletzungen der Haut. Ob eine Übertragung der Virusarten durch einen Kontakt mit der unverletzten Oberfläche stattfinden kann, ist sehr fraglich. Hiergegen sprechen besonders die Versuche mit pflanzlichen Virusarten. Man kann Pflanzen mit einer hochaktiven Viruslösung vollständig durchtränken, ohne daß sie infiziert werden. Eine Infektion erfolgt erst, wenn die Pflanze an einer Stelle durch Druck u. a. verletzt wird [CALDWELL (30)]. Einige tierische und viele pflanzliche Virusarten werden durch Insekten (Stechmücken, Blattläuse oder Milben) übertragen. Für das Gelbfieber und die Pferdeencephalitis ist als Überträger die Stechmücke *Aedes aegypti* festgestellt. Es ist sicher, daß sich das Gelbfiebertivirus in der Mücke vermehren kann [L. WITHMAN (215)]. Bei der ausgeprägten Spezifität der Virusarten ist überraschend, daß eine Vermehrung des Gelbfiebertivirus in zwei so verschiedenen Organismen wie der Stechmücke und dem Menschen stattfinden kann. Es ist allerdings noch nicht bekannt, ob das Virus in der Mücke in derselben Form vorliegt wie im menschlichen Körper.

Die Insektenübertragung ist für die Verbreitung gerade der praktisch wichtigsten, pflanzlichen Viruskrankheiten von ausschlaggebender Bedeutung. — Einzelne Pflanzenviren lassen sich auf mechanischem Wege (durch Einreiben in die Blattoberfläche usw.) überhaupt nicht übertragen. Außer durch Insektenstiche kann hier eine Infektion nur durch Aufpfropfung eines kranken Reises erzielt werden.

4. Verhalten des Virus im Wirt.

Die Virusarten sind stets bestimmten Wirtsorganismen angepaßt. Die *Wirtsspezifität* kann mehr oder weniger ausgeprägt sein. So läßt sich das Virus der Kinderlähmung (*Polyomyelitis*) vom Menschen nur auf den Affen, andere Virusarten, wie die Tollwut, auf eine ganze Reihe von Säugetieren (Mensch, Hund, Maus) und auf Vögel übertragen. Zu dieser Wirtsspezifität tritt noch eine *Gewebspezifität*, die als *Tropismus* bezeichnet wird. Es gibt Virusarten, die nur die Haut befallen (*dermotrope* Virusarten), andere, die nur auf Nervengewebe (*neurotrope*) oder nur in bestimmten Organen (*organotrope* Virusarten) sich vermehren. Trotz der besonderen Ansprüche, die das Virus an das Wirtsgewebe stellt, lassen sich aber sehr viele tierpathogene Virusarten auch in Gewebskulturen züchten. Besonders bewährt hat sich das Medium von MAITLAND und MAITLAND (116), die fein zerteilte Hühner- oder Kaninchenniere in Tyrodellösung und frisches Serum benutzen. Einen außerordentlich wichtigen Weg zur Viruszüchtung zeigten zuerst WOODRUFF und GOODPASTURE (217) durch die Kultur von Geflügelpocken, Herpes und Vaccine auf der Chorionallantoismembran des bebrüteten Hühnereies. Es zeigte

sich, daß die Mehrzahl aller tierischen Virusarten sich auf diese Weise züchten lassen.

Durch die Virusvermehrung in den Zellen werden charakteristische *biologische Veränderungen* hervorgerufen; es bilden sich zwei Arten von Einschlüssen, die man als *Elementarkörperchen* und als *Einschlußkörper* bezeichnet. Sie finden sich entweder im Cytoplasma oder im Zellkern und bei einigen Viruskrankheiten auch in beiden.

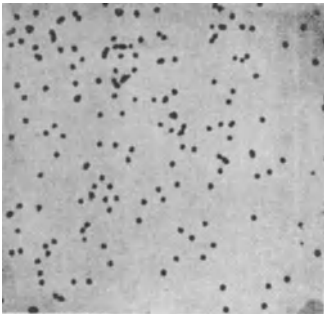


Abb. 1. Elementarkörper der Vaccine mit Victoria-blau gefärbt. Vergr. 850fach. (Nach HERZBERG.)

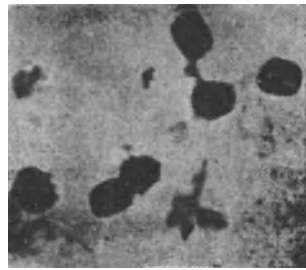


Abb. 2. Elementarkörper der Vaccine. Elektronenoptische Aufnahme. Vergr. 2300fach. (Nach H. RUSKA.)

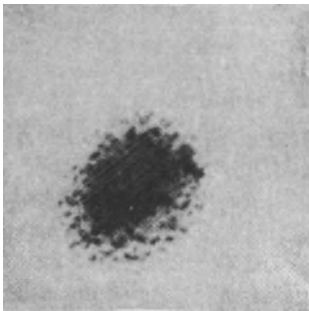


Abb. 3. Einschlußkörper der L. K. Strain mit Victoria-blau gefärbt. Vergr. 1100fach. (Nach HERZBERG.)

Die *Elementarkörperchen* (E. K.) sind kleine Gebilde, die gerade an der lichtmikroskopischen Sichtbarkeitsgrenze liegen. Sie lassen sich durch verschiedene Färbemethoden sichtbar machen und erscheinen dann als rundliche Granula mit einem Durchmesser von 150—250 m μ (Abb. 1). Die E. K. konnten teilweise in hoch gereinigter Form gewonnen werden, so z. B. bei den Kuhpocken (Vaccine) und beim Kaninchenmyxom. Die reinen E. K. besitzen eine hohe Infektiosität und werden

durch die Antikörper des kranken Organismus spezifisch agglutiniert [LEDINGHAM (106)]. Sie gelten daher als Träger der Viruswirksamkeit. Von H. RUSKA (164) wurden verschiedene dieser E. K. elektronenmikroskopisch abgebildet (Abb. 2). Bei dieser starken Vergrößerung erscheinen sie als quaderförmige, eckige Gebilde, die in ihrer Form eine gewisse Ähnlichkeit mit den allerdings weit größeren *kristallinen Einschlüssen* zeigen, die sich in viruskranken Pflanzen und Insekten finden (Abb. 4 bis 6). Bei diesen scheint es sich wenigstens der Hauptmenge nach um kristallisiertes Virusprotein zu

handeln, denn es gelingt die hexagonalen Kristalleinschlüsse in mosaikkranken Tabakblättern durch verschiedene Einflüsse z. B. durch Behand-

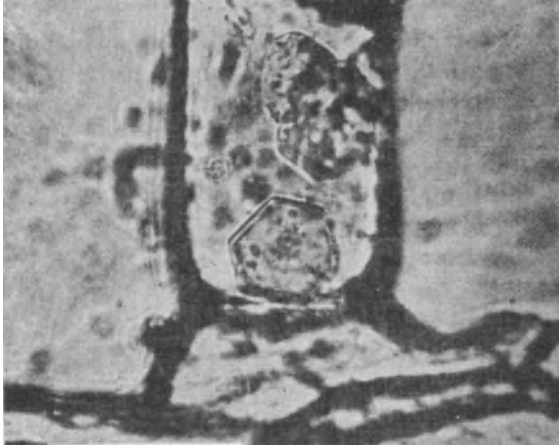


Abb. 4. Hexagonaler Einschuß in einem Härchen eines mosaikkranken Tabakblattes. Vergr. etwa 300fach. (Aufnahme von H. FRIEDRICH-FREKSA.)

lung mit Säure in die gleichen, nadelförmigen Viruskristalle umzuwandeln, wie sie auch bei der chemischen Darstellung des reinen Tabakmosaikvirus

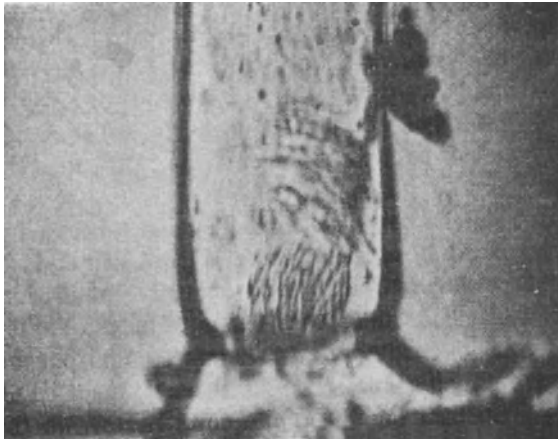


Abb. 5. Derselbe Einschuß nach Umwandlung in Nadelchen. Vergr. etwa 300fach. (Aufnahme von H. FRIEDRICH-FREKSA.)

erhalten werden (Abb. 4 und 5). Umgekehrt soll nach KAUSCHE (79) auch die Umwandlung der Kristallnadeln in hexagonale Kristalle, wie sie in den Pflanzen auftreten, möglich sein. Auch die in viruskranken Insekten

in großen Massen auftretenden Polyeder (Abb. 6) sind nach Untersuchungen von BERGOLD und SCHRAMM (19) Kristallisate eines einheitlichen Virusproteins. Es kann daher noch nicht als erwiesen gelten, ob die E. K. bei tierischen Viruskrankheiten bereits die kleinsten biologischen Einheiten dieser Virusarten darstellen, oder ob es sich hierbei vielleicht auch um einen Verband von Viruseinzelteilchen handelt. Eine derartige Vermutung wird zudem nahegelegt durch Untersuchungen am Kaninchenmyxom [G. SCHRAMM (172)]. Es gelang auf chemischem Wege durch Fällung mit Ammonsulfat aus hochaktiven Lösungen des Myxomvirus ein sehr wirksames Virusprotein abzutrennen, das durch wiederholtes Umfällen weiter gereinigt wurde. Die reinste Proteinfraction erzeugte noch in einer Dosis

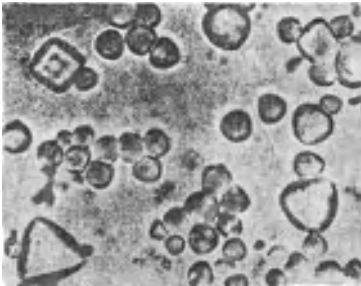


Abb. 6. Polyeder der Nonne. Vergr. 150.000-fach.
(Nach G. BERGOLD)

von 7×10^{-16} g pro Kaninchen ein starkes Myxom. Hieraus errechnet sich ein Maximalmolekulargewicht der infektiösen Substanz zu 420 Millionen, während sich das „Molekulargewicht“ der Elementarkörperchen auf etwa 2300 Millionen schätzen läßt. Danach scheint die kleinste biologische Einheit des Myxomvirus kleiner zu sein als ein E. K.

Bei den *Einschlußkörperchen* handelt es sich um hyaline Massen, in die sich teilweise Granula eingebettet finden (Abb. 3). Die Einschlußkörperchen sind besonders charakteristisch für die Säugetierpocken, wo sie als GUARNERI-Körper bezeichnet werden, bei der Tollwut (NEGRI-Körper) und bei den Geflügelpocken (BOLLINGER-Körper). Besonders genau ist die Entstehung und Bildung der GUARNERI-Körper untersucht worden. Es ist sicher, daß sich diese Einschlußkörperchen wenigstens der Hauptmasse nach aus aggregierten Elementarkörperchen zusammensetzen. Auch bei anderen Einschlußkörpern darf man annehmen, daß sie aus Elementarkörpern bestehen oder doch wenigstens sehr viele Elementarkörper enthalten.

Wird bei einer Krankheit das Auftreten von E. K. oder Einschlußkörpern in den Zellen beobachtet, so spricht dies sehr für eine Virusätiologie dieser Krankheit, jedoch sind diese histologischen Veränderungen nicht entscheidend, da Zelleinschlüsse und abnorme Granula sich auch vielfach in gesunden Organismen finden.

5. Die Virusvermehrung.

Bei der Untersuchung der E. K. beobachtete man häufig hantelförmige Gebilde, die man als Teilungsform der E. K. bezeichnet hat. Derartige Bilder lassen aber keinerlei Schlußfolgerungen über die Ver-

mehrungsweise der Elementarkörper zu, da solche Hantelformen auch durch zufällige Aneinanderreihung von zwei Elementarkörpern zustandekommen können und nähere Einzelheiten bei der Kleinheit dieser Körper nicht zu erkennen sind. Über den eigentlichen Mechanismus der Virusvermehrung wissen wir zur Zeit noch sehr wenig. Untersuchungen von CASPERSSON (32) haben gezeigt, daß für jeden Vermehrungsvorgang in der Zelle die Gegenwart von Nucleinsäure notwendig zu sein scheint. In Übereinstimmung hiermit hat man bei allen bisher untersuchten Virusarten Nucleinsäure aufgefunden.

Über die Art der Bausteine, aus denen die Viren im Organismus entstehen, konnten besonders Versuche mit markierten Elementen Aufschluß geben. Versuche mit Radiophosphor zeigen, daß das Tabakmosaikvirus wahrscheinlich nicht aus den normalen Nucleoproteiden der Tabakpflanze entsteht, sondern die Synthese unmittelbar aus einfacheren Phosphorverbindungen erfolgt [BORN, LANG, SCHRAMM (23)]. Weiterhin darf angenommen werden, daß nicht das ganze Molekül des TM-Virus auf einmal gebildet wird, sondern daß zunächst kleinere Untereinheiten entstehen, die dann sekundär zu dem Gesamtmolekül zusammentreten. Es gelang G. SCHRAMM (173), das TM-Virus in untereinander chemisch und serologisch gleiche, nucleinsäurehaltige Spaltproteine zu zerlegen, die bereits durch eine einfache p_H -Verschiebung zu einem einheitlichen hochmolekularen Protein von der Größe und Gestalt des TM-Virus zusammentreten. Wenn dieses *in vitro* hergestellte Protein auch keine biologische Wirksamkeit besitzt, so zeigt dieser Versuch doch, daß zum mindesten die Größe und Gestalt sowie die serologischen Eigenschaften des TM-Virus bereits durch die Eigenschaften dieser Untereinheiten gegeben sind.

Da der Zusammentritt anscheinend zwangsläufig zu einem Molekül von der Art des TM-Virus erfolgt, darf man derartige Untereinheiten wohl auch als Vorstufen bei der biologischen Synthese des TM-Virus annehmen.

NORTHROP (132) führte als Modell für die Vermehrung der Bakteriophagen die autokatalytische Bildung des Trypsins aus seiner Vorstufe, dem Trypsinogen, an. Dieser Vorgang ist jedoch kaum mit der Virusvermehrung vergleichbar. Bei der Entstehung des Trypsins handelt es sich nicht um eine Synthese, da das Trypsinogen das gleiche Molekulargewicht wie das Trypsin besitzt und eine Vermehrung von Eiweiß hierbei nicht stattfindet. Die serologischen Eigenschaften des entstehenden Trypsins richten sich nach der Art der Vorstufe und nicht nach der Art des katalytisch wirksamen Trypsins. So entsteht aus Schweinetrypsinogen und Hühnertrypsin stets Schweinetrypsin und nicht Hühnertrypsin. Die serologischen Eigenschaften der Viren sind dagegen nach den bisherigen Befunden unabhängig von dem Organismus, in dem sie entstehen.

Es darf angenommen werden, daß die chemischen und energetischen Vorgänge bei der Virusvermehrung grundsätzlich ähnlich verlaufen wie

bei der Vermehrung anderer spezifischer Zellproteine, wie z. B. der Gene, so daß die für die identische Reproduktion im allgemeinen entwickelten Anschauungen auch für die Virusvermehrung gültig sind. Man muß sich vorstellen, daß von dem Virus zunächst ziemlich weitreichende Kräfte ausgehen, die in der Lage sind, mehr oder weniger große Bausteine anzuziehen. Diese müßten dann an der Oberfläche des Virus in einer Weise geordnet werden, daß die Struktur des Virus identisch reproduziert wird. Anschließend müßte dann das fertige neue Teilchen wieder abgestoßen werden, damit der Vermehrungsprozeß wieder von neuem beginnen kann.

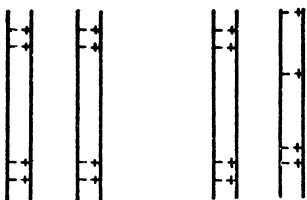


Abb. 7 Gleichartige und ungleichartige Anordnung von gleichsinnig quer zur Längsachse ausgerichteten Dipolen auf zwei parallelen Eiweißfäden. (Nach H. I. FRIEDRICH-FREKSA.)

Es muß also ein fortdauernder Energie- wechsel gefordert werden. Da das Virus als solches keinen Stoffwechsel besitzt, ist anzunehmen, daß die notwendige Energie aus den mit dem Vermehrungsvorgang gekoppelten Reaktionen der lebenden Zelle bezogen wird. Hierdurch wird verständlich, warum die Vermehrung in einem Medium, in dem keinerlei Stoffwechsel stattfindet, nicht möglich ist. Über die Natur der hier zur Wirkung kommenden Kräfte bestehen verschiedene Hypothesen. DEHLINGER (42)

nimmt an, daß für die geordnete Anlagerung der Bausteine ähnliche Kräfte verantwortlich zu machen sind wie beim Aufbau eines Kristalls. Von P. JORDAN (76) wird als Ursache der spezifischen Anziehung eine quantenmechanische Resonanz angenommen, wobei er jedoch darauf hinweist, daß es sich vorderhand in keiner Weise beurteilen läßt, ob die geforderten, sehr weitgehenden Voraussetzungen der Resonanz bei den Eiweißkörpern erfüllt sind.

Von H. FRIEDRICH-FREKSA (55) wurde eine Vorstellung über die identische Verdoppelung biologischer Eiweißstrukturen entwickelt, die den bisher bekannten Tatsachen am besten gerecht wird und vor allen Dingen auch die Mitwirkung der Nucleinsäure bei diesem Vorgang zu deuten vermag. Für die spezifische Struktur eines Eiweißmoleküls ist hiernach das Ladungsmuster maßgeblich, das durch die positiven Ladungen der in jedem Eiweiß vorkommenden Hexonbasen gebildet wird. Durch Anlagerung von Nucleinsäure an diese Hexonbasen entstehen in einem Nucleoproteidfaden quer zur Längsachse Dipolmomente (Abb. 7). Es ist ohne weiteres ersichtlich, daß bei gleicher Anordnung der einzelnen Dipole in zwei Proteidfäden die Dipole einander näher kommen können als bei einer ungleichartigen Anordnung; das bedeutet also, daß bei gleichartiger Anordnung der Ladungen die Anziehungskraft zwischen den Proteidfäden größer ist als bei einer ungleichartigen. Die Wirkung der Nucleinsäure besteht also darin, daß sie sich an die Stellen mit positiver

Ladung anlagert und somit ein Ladungsmuster mit negativen Ladungen abbildet. Diese negativen Stellen können nun ihrerseits wieder als Anlagerungsorte für solche Eiweißbausteine dienen, die Teile des Ladungsmusters der positiven Ladung (Hexonbasen) enthalten. Das Auseinanderweichen der Partner wird an eine Veränderung des Milieus, etwa seiner Wasserstoffionenkonzentration geknüpft sein (27).

Nach FRIEDRICH-FREKSA läßt sich die identische Verdoppelung von Nucleoproteiden mit den Vorgängen vergleichen, die wir von technischen Vervielfältigungsverfahren gewohnt sind. Die Reproduktion geht nie unmittelbar, sondern immer nur auf dem Umweg über etwas Gegensätzliches vor sich. Die Gegensätze erhaben und tief, hell und dunkel, Bild und Spiegelbild, positive und negative Ladungen können zur Formwiederholung führen.

Diese für Eiweißfäden entwickelte Vorstellung läßt sich auch auf die identische Verdoppelung einer durch ein bestimmtes Ladungsmuster gekennzeichneten Fläche übertragen. Falls die Fläche nicht eben, sondern in einer bestimmten Weise gefaltet ist, würde sich eine spezifische Anziehung derjenigen Bausteine ergeben, die infolge ihrer Gestalt sich dieser Faltung am besten anpassen könnten. Zu der Spezifität des Ladungsmusters würde in diesem Falle noch eine räumliche Spezifität hinzutreten, die wiederum bewirkt, daß nur die passenden Bausteine angezogen werden.

6. Die Tumorbildung durch Viren.¹

Durch das vermehrte Auftreten des Virus in der Zelle wird diese unter Umständen so stark geschädigt, daß sie vollständig zugrunde geht und es auf diese Weise zu ausgesprochen degenerativen Prozessen in dem betroffenen Gewebe kommt. In anderen Fällen wird jedoch durch die Erhöhung der Viruskonzentration ein Reiz zu einer vermehrten Zellteilung ausgeübt, so daß es zu einer Geschwulstbildung kommt.

Diese virusbedingten Tumoren können gutartiger Natur sein wie die Warzen und Kondylome bei Menschen und Säugetieren. Sie können aber auch alle Kennzeichen einer bösartigen Krebsgeschwulst aufweisen. Der wichtigste dieser malignen Virustumoren ist das Hühnersarkom, dessen zellfreie Übertragung P. ROUS (1910) (162) gelang. In der Folgezeit wurde dann noch eine Reihe anderer, zellfrei übertragbarer Sarkome beim Huhn aufgefunden, die zum Teil auch auf andere Vögel (Fasanen und Enten) übertragbar sind. Alle diese Geschwülste zeigen die typischen Kennzeichen einer Krebsgeschwulst, wie infiltrierendes Wachstum und Metastasenbildung.

Da die zellfreie Übertragbarkeit und damit die Virusätiologie dieser Geschwülste heute außer Zweifel steht, erhebt sich die Frage, wieweit

¹ Siehe hierzu A. BUTENANDT (29)

auch andere Krebsgeschwülste durch Viren oder virusähnliche Gebilde erzeugt werden können. Gegen eine allgemeine Virusätiologie des Krebses spricht zunächst, daß die zellfreie Übertragung von Carcinomen nicht gelingt. Hierdurch ist aber keineswegs die Virushypothese widerlegt, da es sich bei dem Krebserreger um einen besonders empfindlichen Virus handeln könnte, der nicht in wirksamer Form aus der Zelle isoliert werden kann. Schon das Virus des ROUS-Sarkoms ist recht unbeständig und ist bei Zimmertemperatur nur wenige Stunden haltbar [CLAUDE (36)]. Es wäre denkbar, daß bei anderen Erregern diese Unbeständigkeit noch größer ist. Für die Beteiligung eines Virus an der Krebsentstehung sprechen die Versuche von MCINTOSH (121, 121a) der durch einen unspezifischen Reiz, nämlich durch die Injektion von Teer in die Muskulatur der Hühner Sarkome erzeugen konnte, die zellfrei übertragbar waren, demnach durch ein Virus entstanden sind. Obwohl diese Versuche mit großer Sorgfalt und einem großen Tiermaterial durchgeführt wurden, konnten sie von anderen Untersuchern in dieser Form nicht bestätigt werden, da durch Injektion von Teer und kanzerogenen Kohlenwasserstoffen nur Tumoren erhalten wurden, die zwar größtenteils transplantabel, aber niemals zellfrei übertragbar waren. Jedoch gelang es verschiedentlich, in den mit Teer oder kanzerogenen Stoffen erzeugten Tumoren serologisch ein Antigen nachzuweisen, das dem Virus des ROUS-Sarkoms sehr nahe verwandt war [L. FOULDS (53), C. N. ANDREWES (2)].

Aus diesen Versuchen könnte gefolgert werden, daß durch die Einwirkung des kanzerogenen Kohlenwasserstoffs auf das Hühnergewebe zunächst ein Virus entsteht, das nun seinerseits die Zellen zum ungehemmten Wachstum anregt. Auf diese Weise würde die Krebserzeugung durch kanzerogene Kohlenwasserstoffe und durch Viren auf eine gemeinsame Ursache zurückgeführt. Der direkte oder indirekte Nachweis eines Virus in den Teertumoren ist jedoch kein schlüssiger Beweis dafür, daß dieses Virus durch die Teerpinselung neu entstanden ist, denn es könnte bereits vorhanden gewesen sein. Verschiedene Beobachtungen zeigen, daß in Tumoren sogar Viren vorkommen und durch Passage weiterübertragen werden können, die mit der Entstehung des Tumors gar nichts zu tun haben [z. B. das Pockenvirus (61)]. Es liegt daher der Verdacht nahe, daß durch die Teerpinselung lediglich ein Reiz ausgeübt wird, der für ein bereits vorhandenes Virus günstigere Wachstumsbedingungen schafft. Als Beispiel für einen derartigen Vorgang sei erwähnt, daß das Virus des Kaninchenpapilloms, das bei Cottontail-Kaninchen nur gutartige Warzen auslöst, bei gleichzeitiger Pinselung von Teer bösartige Geschwülste erzeugt, während Teerpinselungen allein unter den gleichen Bedingungen nicht zu Carcinombildung führen (84, 163). Wollte man die Entstehung aller Carcinome auf diese Weise erklären, so müßte man bei der weiten Verbreitung des Krebses allerdings eine sehr weitgehende latente Durch-

seuchung mit carcinombildenden Viren annehmen, die auf die verschiedenartigsten Reize hin zu einer akuten Geschwulstbildung schreiten könnten.

Daß derartige latente Durchseuchungen im Bereich des Möglichen liegen, zeigen Versuche mit krebsanfälligen Mäusestämmen. Es gibt Stämme, bei denen die Anlage zu Mammatumoren durch die Milch auf die Nachkommen übertragen wird (22). Experimentell läßt sich die Übertragung auch durch Organextrakte ausführen. Es liegt nahe, als Überträger der Krebsanfälligkeit einen vermehrungsfähigen, virusähnlichen Wirkstoff anzunehmen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bisher *keine eindeutigen Beweise weder für noch gegen eine allgemeine Virusätiologie des Krebses* erbracht worden sind. Die bisherigen Versuche zeigen aber, daß die weitere Bearbeitung der tumorerzeugenden Viren für die Förderung des Krebsproblems von außerordentlicher Bedeutung sein kann.

7. Die Veränderlichkeit der Viren.

Die biologischen Eigenschaften der einzelnen Virusarten sind recht konstant, sie sind aber nicht absolut unveränderlich. Sie können modifiziert werden, und zwar quantitativ im Sinne der Vermehrung oder Verminderung der Pathogenität oder qualitativ, indem sie sich einem anderen Wirtsorganismus oder einem anderen Gewebe anpassen. Die Untersuchung der *Variabilität* der Virusarten ist von großer theoretischer und praktischer Bedeutung. Es ist noch nicht entschieden, ob die bisher bei den Virusarten beobachteten erblichen Veränderungen als *Mutationen* oder als *Dauermodifikationen* zu bezeichnen sind. Eine eindeutige Entscheidung dieser Alternative wird dadurch erschwert, daß Kreuzungsversuche zwischen Virusarten nicht durchgeführt werden können. Bei dem Auftreten einer neuen Eigenschaft bei einem Virusstamm kann es sich auch um eine *Entmischung* bereits vorhandener verschiedenartiger Varianten handeln. An eine solche Entmischung muß man besonders in den Fällen denken, wo die Änderung nicht sprunghaft, sondern allmählich im Laufe wiederholter Passagen über eine fortlaufende Kette von Wirtsorganismen erfolgt. Eine gewisse Entmischung muß wohl bei jeder durch Passagen erzeugten Umwandlung erwartet werden, da nicht anzunehmen ist, daß alle Virusteilchen sich gleichzeitig umwandeln.

Für die praktische Bekämpfung der Viruskrankheiten ist die Abwandlung der Virusarten besonders im Sinne einer abgeschwachten Aktivität wichtig, da die aktive Immunisierung mit solchen schwach pathogenen Virusarten eine der besten Schutzmaßnahmen gegen Viruseuchen ist. Die Bedingungen, unter denen eine Virusmutation eintritt, sind besonders in den letzten Jahren eingehend untersucht worden. Die Veränderlichkeit ist bei den einzelnen Virusarten verschieden stark ausgeprägt, scheint aber bei allen vorhanden zu sein. Der bisher wichtigste Weg zur

Veränderung der Virusarten ist die dauernde *Fortzucht auf einem ungewöhnlichen Wirtsgewebe*.

Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die von PASTEUR durchgeführte Umwandlung des *Straßenvirus der Tollwut* in das sog. *Virus fixe*, die durch wiederholte Passagen über das Kaninchenhirn erreicht wird. Das *Virus fixe* unterscheidet sich von dem *Straßenvirus* durch folgende Eigenschaften: 1. Die Inkubationszeit ist verkürzt, 2. es treten keine NEGRISCHEN Einschlußkörper im Gehirn auf, 3. die Pathogenität gegenüber den Primaten (Menschen und Affen) ist bei subcutaner Injektion verschwunden. Diese Eigenschaften bleiben konstant erhalten. Eine Rückverwandlung des *Virus fixe* in das *Straßenvirus* konnte bisher nicht beobachtet werden. Es ist allerdings gelungen, durch dauernde Passagen des *Virus fixe* über den Ischiasnerv des Kaninchens, diesem wieder die Fähigkeit zu verleihen, NEGRISCHE Einschlußkörper zu bilden (131), jedoch fehlt diesem Virus die Eigenschaft der Pathogenität gegenüber den Primaten bei subcutaner Injektion. Es kommen in der Natur mehrere Stämme des *Straßenvirus* vor, die sich in ihrer Stabilität unterscheiden LEVADITI, NICOLAU und SCHOEN (108) teilen diese in drei Klassen ein: 1. Stamme mit spontanen Mutationen, bei denen die Umwandlung während der ersten Passage im Kaninchen erscheint und erhalten bleibt, 2. leicht mutierbare Stämme, bei denen die Umwandlung nur nach einer gewissen Zahl von Passagen erfolgt, 3. nicht mutierbare Stämme, die auch nach einer beträchtlichen Zahl von Passagen nicht in *Virus fixe* umgewandelt werden. Bei der Verschiedenheit der Ausgangsstämme ist es nicht verwunderlich, daß auch die *fixen* Virusstämme nicht alle unter sich gleich sind.

Ähnliche Umwandlungen sind an sehr vielen tierischen und pflanzlichen Virusarten erzeugt worden. Statt besonderer Wirtstiere kann hierzu auch die Zucht in besonderen Gewebekulturen oder auf der Eihaut benutzt werden. Oftmals sind die Virusarten für das neue Gewebe zunächst überhaupt nicht pathogen, so daß charakteristische Krankheitssymptome erst nach einer Reihe von blinden Passagen auftreten. Mutationen der Virusarten erfolgen auch in der Natur. So sind z. B. die Kuhpocken (*Vaccine*) als eine auf natürlichem Wege entstandene Mutante der Menschenpocken (*Variola*) aufzufassen. Durch laboratoriumsmäßige Passageumwandlungen hat man aus dem *Vaccinevirus* wiederum eine ganze Reihe verschiedener Varianten gewonnen. Die Stabilität dieser mutierten Stämme ist recht unterschiedlich. Einige von ihnen wandeln sich bereits nach wenigen Passagen wieder in die Ausgangsform zurück. Aus der Labilität dieser Stämme hat man geschlossen, daß es sich wohl nur um Dauermodifikationen handelt. Diese Schlußfolgerung ist jedoch nicht zwangsläufig, da man den Einwand machen kann, daß in diesen Fällen die Ausgangsform noch nicht völlig herausgezüchtet war. Es kann sich aber auch um Rückmutationen handeln, die auch bei höheren Tieren und Pflanzen beobachtet werden und bei diesen Virusstämmen vielleicht besonders begünstigt sind.

Auch bei *pflanzlichen Virusarten* ist eine Umwandlung durch Übertragung auf eine ungewöhnliche Wirtspflanze möglich. So zeigte CARISNER (31), daß das *Curly top*-Virus der Zuckerrübe auf *Chenopodium murale* so abgewandelt wird, daß es bei der Rückübertragung auf die Zuckerrübe nur noch schwache Symptome erzeugt. Diese Veränderung bleibt auch bei wiederholten Passagen von Rübe zu Rübe erhalten. Durch Übertragung auf *Stellaria media* gelang es jedoch später, die Umwandlung wieder rückgängig zu machen und den virulenten Ausgangsstamm wiederzugewinnen [LAKEY (94)]. Bei den Pflanzenviren ist ebenfalls die Mutabilität der einzelnen Virusarten recht unterschiedlich. Eine von BAWDEN (9) angestellte Überlegung zeigt, daß jedoch in keinem Fall die Mutationen so häufig sind daß bei den Viren eine höhere Mutationsrate angenommen zu werden braucht, als sie bei den Genen z. B. von *Drosophila* festgestellt wurde.

Auf die Mutabilität höherer Tiere und Pflanzen haben äußere Einflüsse, wie Wärme, Ernährung und Chemikalien, meist gar keine oder nur eine sehr geringe Wirkung. Eine erhebliche *Erhöhung der Mutationsrate* läßt sich bei ihnen bisher nur durch Strahleneinwirkung erzielen. Nach den bisher vorliegenden experimentellen Ergebnissen, die allerdings noch recht gering sind, verhalten sich die Viren ähnlich. Eine Veränderung eines Virus durch *chemische Reagentien* oder durch *Wärmeeinwirkung*, die sich auch auf die Nachkommen des behandelten Virus überträgt, ist mit Sicherheit noch nicht nachgewiesen. Es gelingt zwar mit verschiedenen Reagentien eine Herabsetzung der Virusaktivität zu erzielen, hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine Mutation, sondern um eine mehr oder weniger vollständige Zerstörung der pathogenen Eigenschaften unter Erhaltung des immunologischen Charakters. Es fehlen bisher noch quantitative Prüfungen der chemisch behandelten Virusarten auf die Zahl der eventuell aufgetretenen Mutationen und der Vergleich der Mutationsrate mit nicht behandelten Kontrollen.

Versuche von KÖHLER (88) deuten darauf hin, daß es durch geeignete *Wärmeeinwirkung* möglich ist, erbliche Änderungen an Virusarten *in vitro* zu erzielen. Dieser konnte nach dem Erwärmen von Kartoffel-X-virus-haltigem Pflanzensaft bis nahe an die Inaktivierungstemperatur veränderte Virusstämme auffinden. Andere Versuche beschäftigen sich mit dem Einfluß der Temperatur auf die Mutabilität der Viren in der lebenden Pflanze. Es ergab sich, daß die Zahl der Mutationen des TM-Virus in infizierten Tabakpflanzen bis zu einer Höchsttemperatur von 32° deutlich mit der Temperatur ansteigt, bei der die Pflanzen kultiviert werden. Bei noch höherer Temperatur sinkt die Mutationsrate wieder [McKINNEY (122), G. MELCHERS (unveröffentlicht)]. Die Zahl der auftretenden Mutationen wird hierbei bestimmt durch die Anzahl der auf den Tabakblättern auftretenden charakteristischen Gelbflecken. Wie durch Abimpfen dieser Gelbflecken auf andere Pflanzen gezeigt werden konnte, rühren sie von abgewandelten Virusstämmen her. Bei den Pflanzenviren, die durch Insekten übertragen werden, z. B. dem *Astern-yellow*-Virus, konnten Mutationen auch dadurch erzielt werden, daß die Insekten, die das Virus enthielten, bei höherer Temperatur gehalten wurden [L. O. KUNKEL (92)]. Als Ursache für das Auftreten dieser Wärmemutationen könnte man in Analogie zu den Passageumwandlungen wieder das ungewöhnliche Wirtsmilieu, das in diesem Falle hinsichtlich der Temperatur von der Norm abweicht, in Betracht ziehen.

Die *Einwirkung von Strahlen*, insbesondere Röntgenstrahlen, auf Virusarten wurde mehrfach untersucht. Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen erfolgte stets eine Inaktivierung, die proportional zur Strahlendosis war (59). Das Auftreten von Mutationen konnte bei Bestrahlungen von chemisch reinen Virusproteinen außerhalb der Pflanze

nicht beobachtet werden. Allerdings ist das Versuchsmaterial noch sehr klein, so daß hieraus keine allgemeinen Schlußfolgerungen gezogen werden können. Dagegen zeigten PFANKUCH, KAUSCHE und STUBBE (149), daß nach der Bestrahlung von lebenden viruskranken Tabakblättern Varianten des TM-Virus auftreten. Später zeigten KAUSCHE und STUBBE (83), daß solche Mutationen auch auftreten, wenn zunächst die gesunden Blätter bestrahlt werden und diese dann nachträglich infiziert werden. Die Strahlenwirkung scheint demnach über die Veränderung des Wirtsgewebes zur Abwandlung des Virus zu führen. Bei nicht bestrahlten Kontrollpflanzen konnten entsprechende Virusvarianten von den Autoren nicht aufgefunden werden. Dieses ist recht überraschend, da auch bei den reinsten Stämmen von den verschiedensten Seiten immer wieder spontane Mutationen aufgefunden worden sind. Es bleiben daher weitere Versuche abzuwarten, ob die Mutationen tatsächlich durch die vorherige Bestrahlung der Pflanzen mit Röntgenstrahlen ausgelöst werden oder ob es sich um die normalen spontanen Mutationen handelt.

Durch die *chemische Untersuchung der Mutanten* und ihren Vergleich mit dem Ausgangsstamm lassen sich Rückschlüsse auf die bei der Mutation der Viren erfolgten chemischen Umwandlungen ziehen. Da die Viren in vieler Hinsicht den Genen ähnlich sind [BUTENANDT (27)], können sie als Modellsubstanzen für die Struktur und die Umwandlung der Gene dienen. Bei diesen selbst sind derartige chemische Untersuchungen nicht möglich, da sie nicht in reiner Form zugänglich sind. Derartige vergleichende Untersuchungen wurden an verschiedenen Stämmen des TM-Virus auf biologischem, chemischem und serologischem Wege durchgeführt. Die Untersuchungen zeigen, daß das *Virus eine Reihe von Wirkungsbereichen enthält, die unabhängig voneinander mutieren können*. Wie bei den Organismen sind bei den Viren auch *Parallelmutationen* möglich, in denen zwei verschiedene Stämme gleichartige Umwandlungen durchmachen, ohne daß hierbei die charakteristischen Stammesunterschiede angetastet werden [MELCHERS (124), SCHRAMM, FRIEDRICH-FREKSA siehe S. 161]. Auf Grund serologischer Untersuchungen an verschiedenen Stämmen des Kartoffel-X-Virus kam SALAMAN (167) ebenfalls zu dem Ergebnis, daß in diesem Virus eine Reihe voneinander unabhängiger Wirkungsbereiche vorkommen. Er konnte zwischen fünf verschiedenen Antigengruppen unterscheiden, die unabhängig voneinander zu den verschiedenen Stämmen kombinieren können. Die chemischen Veränderungen bei der Mutation des TM-Virus äußern sich besonders deutlich im elektrochemischen Verhalten der Mutanten. Sie sind hauptsächlich auf die Veränderung des Proteingerüsts zurückzuführen, während der Nucleinsäuregehalt bei einem einfachen Mutationsschritt anscheinend unverändert bleibt (Näheres siehe S. 167).

III. Methoden der Virusforschung.

1. Biologische Methoden.

Die Grundforderungen, die bei der mikrobiologischen Untersuchung von Krankheitserregern zu beachten sind, wurden von JAKOB HENLE in klassischer Weise formuliert und später von ROBERT KOCH erweitert. Um einen Parasiten als Erreger einer Krankheit gelten lassen zu können, fordert ROBERT KOCH: „Die parasitischen Mikroorganismen in allen Fällen der betreffenden Krankheit aufzufinden, sie ferner in solcher Menge und Verteilung nachzuweisen, daß alle Krankheitserscheinungen dadurch ihre Erklärung finden, und schließlich für jede einzelne Infektionskrankheit einen morphologisch wohl charakterisierten Mikroorganismus als Parasiten festzustellen.“ Es wird also konstanter Nachweis, Isolierung und Charakterisierung des isolierten Organismus verlangt.

Je weiter die Virusforschung fortschritt, desto deutlicher zeigte es sich, daß die bisherigen bakteriologischen Arbeitsmethoden in der Virusforschung nicht ausreichen, um dieser Forderung zu genügen [H. WITTFOGEL 216)]. Der konstante Nachweis ist wegen der Kleinheit der Virusarten meistens unmöglich. Bei einigen Viruskrankheiten lassen sich die Erreger wohl in Form der Elementarkörperchen sichtbar machen, jedoch ist der strenge Nachweis, daß es sich bei diesen Elementarkörperchen um das Virus selbst handelt, auf rein biologischem Wege nicht zu erbringen, sondern erst nach ihrer chemischen Reindarstellung. In der Bakteriologie läßt sich ein einzelner Keim abtrennen und es können eine genügende Anzahl von Nachkommen auf einem künstlichen Nährboden herangezüchtet werden, die dann auf ihre Identität mit dem Krankheitserreger geprüft werden können. Bei den Virusarten dagegen ist die Isolierung eines einzelnen Individuums wegen seiner Unsichtbarkeit häufig unmöglich. Da die Viren nur auf lebendem Gewebe gezüchtet werden können, ist das Auffinden und Charakterisieren selbst mikroskopisch sichtbarer Virusarten sehr schwierig. Sehr störend wirkt sich auch die Möglichkeit aus, daß der neu infizierte Wirtsorganismus auch bei äußerer Gesundheit Virusträger sein kann. Hierdurch können bei der Reinzüchtung Verunreinigungen durch andere Virusarten vorkommen und zu Fehlschlüssen Anlaß geben.

Bei den phytopathologischen Virusarten läßt sich die bakteriologische Methodik der Isolierung und Fortzüchtung eines einzelnen Erregers bis zu einem gewissen Grade nachahmen, wenn es gelingt, geeignete Pflanzen zu finden, bei denen das zu isolierende Virus keine allgemeine Erkrankung, sondern einen *isolierten Einzelherd* hervorruft (Abb. 8). Solche Einzelherde werden wahrscheinlich durch ein einzelnes Virusmolekül hervorgerufen (219). Trennungsversuche mit einer künstlichen Mischung zweier sich nahestehender Virusarten zeigen jedenfalls, daß das gleichzeitige Auf-

treten beider Virusstämme in einem Einzelherd sehr selten vorkommt [G. MELCHERS (unveröffentlicht)]. Versuche mit TM-Virus auf *Nicotiana glutinosa* zeigen, daß die Verbreitung des Virus streng auf diese Einzelherde beschränkt bleibt, und die zwischen den Herden liegenden Blatteile kein Virus enthalten. Durch Ausstechen dieser Einzelherde können daher die Nachkommen eines einzelnen Virus in reiner Form gewonnen und durch weitere Übertragung vermehrt werden.

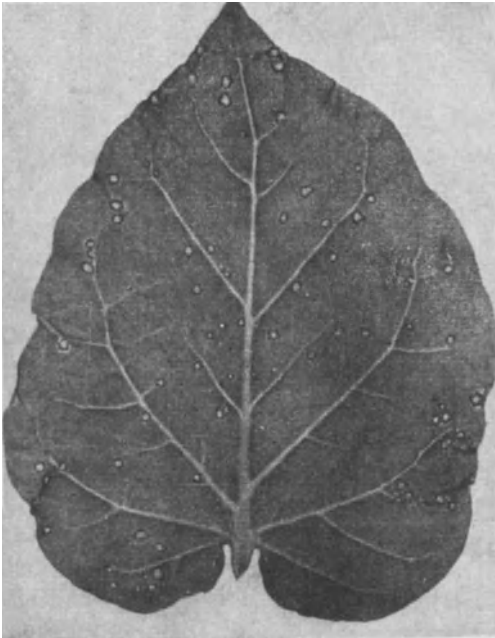


Abb. 8. Einzelherde von Tabakmosaikvirus auf *Nicotiana glutinosa*. (Nach G. MELCHERS.)

Durch solche Einzelherdisolierungen gelingt es, die verschiedenen Varianten des TM-Virus einwandfrei voneinander zu trennen (125).

Eine ähnliche Arbeitsweise läßt sich auch mit tierpathogenen Virusarten durchführen, wenn diese auf der Chorionallantoismembrane des Hühnereies lokalisierte Einzelherde erzeugen. Diese können dann ebenfalls voneinander getrennt weiterverimpft werden. Diese Isolierungsverfahren der Virusforschung sind aber keineswegs so einwandfrei wie das entsprechende bakteriologische Verfahren, da die oben angeführten Bedenken nicht mit Sicherheit ausgeschaltet werden können.

Die geforderte Charakterisierung der Krankheitserreger läßt sich bei den Virusarten mit den üblichen Hilfsmitteln der Mikrobiologie nur unzureichend durchführen. Das Verhalten der Viren bei der Kultur außerhalb eines Wirtes ist wenig charakteristisch. Färberische Unterschiede zwischen den einzelnen Arten, wie sie in der Bakteriologie eine große Rolle spielen, bestehen ebenfalls nicht. Physiologische Merkmale wie Gärfähigkeit u. ä. sind nicht vorhanden, da ein Stoffwechsel bei den Virusarten fehlt. Morphologische Feinheiten lassen sich auf lichtmikroskopischem Wege auch mit Spezialmethoden wie Ultraviolett- und Fluoreszenzmikroskopie nicht erkennen.

Das einzige, allgemein anwendbare biologische Verfahren zur Cha-

rakterisierung der Viren ist die genaue *Beschreibung der Symptomausprägung* in dem Wirtsorganismus. Diese bildet eine wichtige experimentelle Grundlage der Virusforschung. Bei der Feststellung der Krankheitssymptome sollten nach Möglichkeit eine Reihe verschiedener Wirtsorganismen herangezogen werden. Allein die Zahl der empfänglichen Wirte, „das Infektiositätsspektrum“, nach DOERR (43), ist oft wichtig für die Unterscheidung nahestehender Arten. Durch die Heranziehung vieler verschiedener Wirtsorganismen gelingt es manchmal, qualitative Unterschiede aufzufinden, die zur Unterscheidung der verschiedenen Virusarten geeigneter sind als die Angaben über die quantitative Symptomausprägung an einem Wirtsorganismus, die durch äußere Einflüsse stark verändert werden können (125).

Eine wichtige Aufgabe der biologischen Virusforschung ist es weiterhin, die Abhängigkeit der Symptomausprägung von der Virusdosis festzustellen und auf diese Weise eine *quantitative Bestimmung der Virusaktivität* zu ermöglichen. Auf dem Gebiet der tierpathogenen Virusarten wird die Messung der Viruswirksamkeit nahezu ausschließlich durch Bestimmung des *Endpunktes einer Verdünnungsreihe* durchgeführt. Hierzu wird die zu untersuchende Lösung stufenweise so weit verdünnt, daß gerade noch ein bestimmtes charakteristisches Krankheitssymptom auftritt. Meist kann die Wirksamkeit nur sehr roh auf eine Zehnerpotenz genau bestimmt werden. Bei Anspruch auf größere Genauigkeit ist bei dieser Art des Testes ein sehr großes Tiermaterial erforderlich. Die Bearbeitung einer tierischen Viruskrankheit in größerem Stil ist davon abhängig, ob es gelingt, ein billiges Versuchstier zu finden. Unsere Kenntnisse über manche wirtschaftlich wichtigen Tierseuchen, wie z. B. der infektiösen Anämie der Pferde, sind deshalb so gering, weil sie ein allzu kostspieliges Tiermaterial erfordern.

Neben dem Verdünnungstest werden auch Verfahren angewendet, bei denen die Viruswirksamkeit durch die *Anzahl der Einzelherde* bestimmt wird, die bei einer bestimmten Verdünnung bei einem empfänglichen Gewebe erzeugt wird (Chorionallantoismembran des Hühnereies, Hornhaut des Kaninchens bzw. Blattoberfläche). Dieser Test ist erheblich genauer und bequemer, da man graduelle Unterschiede erhält, während es sich bei den Verdünnungstesten meist um eine Alles-oder-Nichts-Reaktion handelt.

Der Einzelherdtest findet ganz besondere Anwendung auf dem Gebiet der pflanzlichen Virusarten. Zur *quantitativen Bestimmung des TM-Virus* wurde von HOLMES (72) ein solcher Test ausgearbeitet, der darauf beruht, daß dieses Virus auf den Blättern bestimmter Pflanzen, wie *Nicotiana glutinosa*, *Phaseolus vulgaris* (Gartenbohne) oder *Datura stramonium* (Stechapfel), lokalisierte Einzelnekrosen erzeugt (Abb. 8). Die Zahl der Nekrosen ist abhängig von der Viruskonzentration. Und zwar ist innerhalb

eines bestimmten Konzentrationsbereiches der Logarithmus der Einzelherde dem Logarithmus der Viruskonzentration proportional [Näheres in der Zusammenfassung von ZIMMER (219)]. Da aber der Proportionalitätsfaktor Schwankungen unterworfen sein kann, wird zum Vergleich stets eine Standardlösung mit ausgewertet, indem auf der einen Blatthälfte die zu prüfende Lösung, auf der anderen eine Vergleichslösung mit bekannter Konzentration mit einem Wattebausch eingerieben wird. Durch diesen verhältnismäßig genauen Test ist die experimentelle Bearbeitung des TM-Virus außerordentlich erleichtert worden.

Die Unzulänglichkeit der üblichen bakteriologischen Methoden in der Virusforschung hat dazu geführt, daß sie schon recht frühzeitig durch *physikalische* und *chemische Untersuchungsmethoden* erweitert wurde. Solange die Viren aber allgemein als kompliziert zusammengesetzte Mikroben galten, konnten hierdurch die grundsätzlichen Schwierigkeiten der Virusforschung nicht überwunden werden. Erst nachdem einzelne Viren als stöchiometrische Verbindungen erkannt worden waren, hatte es Sinn, sie als solche mit den Methoden der organischen Chemie darzustellen und zu charakterisieren.

Unter Heranziehung chemischer Methoden lassen sich bei einer Reihe von Viruskrankheiten „in allen Fällen die Erreger auffinden und in solcher Menge und Verteilung nachweisen, daß alle Krankheitserscheinungen dadurch ihre Erklärung finden“ und somit die KOCHSchen Postulate in der Virusforschung grundsätzlich erfüllen.

Vom chemischen Standpunkt aus kann das Virus als ein Wirkstoff aufgefaßt werden. Es sollte demnach möglich sein, die Methoden, die bei der Erforschung organischer Wirkstoffe so große Erfolge gezeitigt haben, auch auf die Viren anzuwenden. Der klassische Weg, der dabei einzuschlagen ist, wird durch folgende Arbeitsvorgänge gekennzeichnet: 1. Reindarstellung des Wirkstoffes unter Benutzung eines biologischen Testes als Leitfaden, 2. chemische und physikalische Kennzeichnung des reinen Stoffs, 3. Aufklärung der Konstitution.

Die chemische Virusforschung ist ein Teilgebiet der Eiweißchemie. Wir haben es mit Riesenmolekülen zu tun, die im Vergleich zu anderen organischen Substanzen außerordentlich kompliziert zusammengesetzt sind. Zur Durchführung der gestellten Aufgaben müssen daher andere physikalische und chemische Verfahren herangezogen werden als in der Chemie der niedermolekularen Stoffe. Die großen Fortschritte der letzten Jahre in der Methodik der Eiweißchemie ermöglichen jedoch eine exakte und erfolversprechende Untersuchung der Viren, die ihrerseits wieder neue Anregungen für die Weiterentwicklung der Eiweißchemie bieten wird.

2. Die Reindarstellung der Virusarten.

a) Chemische Verfahren.

In den letzten Jahren sind zahlreiche Proteine durch chemische Fällungsmethoden in reiner, kristallisierter Form gewonnen worden. Die hierbei gewonnenen Erfahrungen bilden auch die Grundlage für die Darstellung der Virusarten.¹ Die am häufigsten gebrauchte Fällungsmethode ist das *Aussalzverfahren*, die darauf beruht, daß die Eiweißstoffe in hochkonzentrierten Salzlösungen reversibel ausflocken. Zum Aussalzen wird vorwiegend Ammonsulfat benutzt, da wegen der großen Löslichkeit dieses Salzes hohe Konzentrationen angewendet werden können und außerdem das zweiwertige Sulfation stärker aussalzende Wirkung hat als einwertige Ionen. Weiterhin werden auch Magnesiumsulfat, Natriumsulfat oder Natriumchlorid benutzt. Durch wiederholte Fällung bei verschiedenem p_H gelingt es, Verunreinigungen abzutrennen und einheitliche Eiweißfraktionen darzustellen. Fällungen mit Ammonsulfat finden bei der Darstellung verschiedener, kristallisierter Pflanzenviren Anwendung, z. B. bei dem Tabakmosaikvirus und seinen Verwandten (125, 145, 175, 195), dem Bushy-stunt-Virus der Tomate (10) und dem Kartoffel-X-Virus (11, 145). Auch Bakteriophagen und tierische Virusarten, wie das Virus der Maul- und Klauensuche (70, 73) und das Myxomvirus (172), werden ohne Verlust der Aktivität durch Ammonsulfat ausgefällt.

Die Eiweißstoffe besitzen am isoelektrischen Punkt ein Löslichkeitsminimum. Einige Eiweißstoffe sind sogar am p_H des isoelektrischen Punktes praktisch unlöslich, so daß sie allein durch Einstellung dieser Wasserstoffionenkonzentration aus der Lösung ausgefällt werden. Dieses Verfahren wird als *isoelektrische Fällung* bezeichnet und findet ebenfalls bei der Darstellung von Virusproteinen Verwendung. So sind z. B. die Insektenviren (19), das TM-Virus und das Kartoffel-Y-Virus (siehe S. 170) in der Nähe des isoelektrischen Punktes in einem mehr oder weniger breiten p_H -Gebiet fast vollständig unlöslich. Das Bushy-stunt-Virus zeigt dagegen kein solches Löslichkeitsminimum (10). Es ist zu beachten, daß isoelektrisch ausgefällte Virusproteine oft erst mit sehr extrem sauren oder alkalischen Pufferlösungen wieder in Lösung zu bringen sind.

Im Gegensatz zur Chemie der niedermolekularen Stoffe kann bei den Eiweißstoffen die *Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit* nur in seltenen Fällen zur Reinigung benutzt werden, da man wegen ihrer Wärmeempfindlichkeit nur ein geringes Temperaturintervall zur Verfügung hat. Eine eigenartige Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit wurde beim Bushy-stunt- und beim Tabaknekrosevirus beobachtet. Das amorphe Bushy-stunt-Virus ist bei 0° leichter löslich als bei Zimmertemperatur, während

¹ Eine Zusammenfassung über neuere Methoden der präparativen Eiweißchemie findet sich an anderer Stelle (170).

sich das kristallisierte Virus umgekehrt verhält und auf diese Weise gereinigt werden kann (10, 151).

Die *Unterschiede in der Temperaturempfindlichkeit* der Eiweißstoffe lassen sich oft zur Reinigung benutzen. So können bei der Darstellung des TM-Virus aus dem Tabaksaft störende Eiweißstoffe dadurch entfernt werden, daß man den Saft etwa 10 Minuten auf 70° erwärmt (12). Hierdurch flocken chlorophyllhaltige Verunreinigungen aus, während das Virusprotein in Lösung bleibt. Die gleiche Trennung kann auch durch Einfrieren des Saftes auf -12° durchgeführt werden, wobei ebenfalls die störenden Beimengungen unlöslich werden (125).

Die Eiweißstoffe lassen sich weiterhin durch *Zusatz von organischen, mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln* ausfällen. So kann das Tabakmosaik- (12) oder Tabaknekrosevirus (151) durch Alkohol oder das Maul- und Klauenseuchevirus (70) mit Aceton in der Kälte ohne Wirksamkeitsverlust ausgefällt werden. Dieses Fällungsverfahren ist allerdings oft nicht anwendbar, da durch die organischen Lösungsmittel viele Virusproteine geschädigt werden oder denaturieren.

Die Eiweißstoffe können auch durch *Schwermetallsalze*, wie z. B. Bleiacetat, Silberacetat, oder Basenfällungsmittel, wie Pikrinsäure, Phosphorwolframsäure, Tannin usw., ausgefällt werden. Hierbei wird ebenfalls häufig Denaturierung beobachtet, so daß diese Fällungsmittel nur mit Vorsicht anzuwenden sind. Eine alkalische Bleiacetatfällung wurde von NORTHROP (132) zur Reinigung des Phagenproteins benutzt. Auch STANLEY (195) wandte ursprünglich zur Reinigung des TM-Virus eine Bleifällung an, die aber später wieder verlassen wurde, da sie zu Wirksamkeitsverlusten führt.

Eine andere Gruppe spezieller schwerlöslicher Verbindungen sind die *Präcipitate*, die sich bei der serologischen Reaktion der Virusproteine mit den entsprechenden Antikörpern bilden. Da es sich bei den Präcipitaten um reversible Verbindungen handelt, ist es unter Umständen möglich, die Antikörper aus diesen wieder abzutrennen und auf diese Weise die Virusproteine in reiner Form zu gewinnen. Wegen der Beständigkeit des TM-Virus gegen proteolytische Enzyme kann hier aus der Virus-Antikörperverbindung mit Pepsin der Antikörper abgebaut und entfernt, und so das vollaktive TM-Virus wiedergewonnen werden [BAWDEN und PIRIE (12, 13)].

Es ist vielfach versucht worden, Virusproteine durch *Adsorption* an Aluminiumhydroxyd, aktive Kohle und andere Adsorptionsmittel anzureichern. Diese Verfahren haben bisher wenig Erfolge zu verzeichnen, da es meist nicht gelingt, genügend spezifische Adsorbentien zu finden, aus denen die Virusproteine unzerstört wieder herausgelöst werden können. Außerdem ist hierbei eine starke Verdünnung der virushaltigen Lösung unvermeidlich. Im allgemeinen kann wohl gesagt werden, daß

Adsorptionsverfahren nur zur Entfernung von Verunreinigungen brauchbar sind.

Diese chemischen Fällungsverfahren finden eine wertvolle Ergänzung durch physikalische Trennungsmethoden, von denen wir hier die Ultrazentrifuge und die Elektrophorese näher besprechen.

b) *Die Ultrazentrifuge.*¹

Eines der wichtigsten Forschungsmittel der heutigen Eiweißchemie ist die Ultrazentrifuge. Ihre Entwicklung verdanken wir TH. SVEDBERG und seinen Mitarbeitern, die im Jahre 1923 das erste brauchbare Modell konstruierten. Unter einer Ultrazentrifuge verstehen wir eine schnell umlaufende Zentrifuge, bei der durch eine geeignete optische Vorrichtung die Sedimentation des gelösten Stoffes während der Rotation verfolgt werden kann. Die Anwendung der Ultrazentrifuge hat zu grundlegenden Erkenntnissen in der Chemie der Eiweißstoffe geführt, da es mit ihrer Hilfe möglich ist, die Molekulargewichte der Proteine unabhängig von Form und Hydratation exakt zu bestimmen und die schneller sedimentierenden, hochmolekularen Eiweißstoffe von den langsam sedimentierenden, niedermolekularen Proteinen zu trennen.

Zur Erzeugung der erforderlichen hohen Drehzahl hat sich nach den bisherigen Erfahrungen ein Turbinenantrieb am besten bewährt. Die von SVEDBERG konstruierte Ultrazentrifuge wird durch Ölturbinen angetrieben. Die Drehung erfolgt um eine horizontale, festgelagerte Achse. Mit dieser Konstruktion lassen sich auch mit größeren Rotoren Umdrehungszahlen bis zu 75 000/min erzielen, wobei das in der Meßzelle herrschende Zentrifugalkraftfeld bis auf das nahezu Millionenfache der Erdbeschleunigung ansteigt. Von BEAMES, PICKELS, WYCKOFF und anderen wurde auf dem Prinzip des Luftkreisels von HENRIOT und HUGENARD eine Ultrazentrifuge mit Luftturbinenantrieb entwickelt (171). Der Rotor hängt hier an einer vertikalen, biegsamen Stahlachse, wodurch er sich von selbst ausbalancieren kann. Die Auswuchtung braucht also nicht mit so großer Genauigkeit zu erfolgen wie bei der festgelagerten Ölturbine. Durch Verwendung von Aluminiumrotoren gegenüber den SVEDBERGSchen Stahlrotoren kann die Konstruktion des Gerätes sehr vereinfacht werden, so daß die luftgetriebenen Ultrazentrifugen wesentlich billiger herzustellen und einer allgemeineren Anwendung fähig sind. Mit solchen luftgetriebenen Ultrazentrifugen lassen sich Drehzahlen bis zu 60 000 pro Minute erzeugen.

Eine ähnliche luftgetriebene Ultrazentrifuge wurde auch von G. SCHRAMM (171, 175) gemeinsam mit den Physikalischen Werkstätten in Göttingen gebaut, womit eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgversprechende chemische Virusforschung in Deutschland geschaffen wurde.

¹ Siehe hierzu SVEDBERG und PEDERSEN (205) sowie G. SCHRAMM (171).

Die wesentlichen Grundzüge dieses Gerätes gehen aus der Abb. 9a und 9b hervor. Mit dieser Zentrifuge wurden Drehzahlen bis zu 45 000 pro Minute erreicht, so daß auch niedermolekulare Eiweißstoffe bis zu einem Molgewicht von 20 000 herab erfolgreich untersucht werden konnten.

Für niedere Drehzahlen bis zu 20 000/min können auch Zentrifugen mit elektrischem Antrieb verwendet werden. Elektrisch betriebene Zentrifugen wurden von SVEDBERG insbesondere zur Bestimmung des Sedimentationsgleichgewichtes konstruiert.

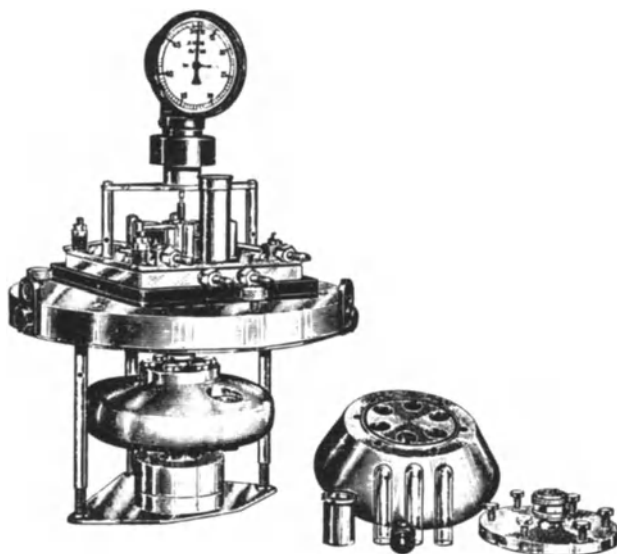


Abb. 9a. Antrieb der Phywe-Ultrazentrifuge mit eingebautem analytischem und danebenliegendem präparativem Rotor.

Die optische Einrichtung der Ultrazentrifuge zur Beobachtung der Sedimentation beruht entweder auf dem Prinzip der Lichtabsorption oder auf refraktometrischen Methoden. Von letzteren zeichnet sich die TÖPLERSche Schlierenmethode durch besondere Einfachheit aus. Hierbei wird der Ort der sedimentierenden Grenz zonen zwischen der Eiweißlösung und dem darüber stehenden reinen Lösungsmittel als dunkle Bande sichtbar (Abb. 10). Zur Untersuchung polydispenser Systeme ist besonders die Skalenmethode geeignet. Mit diesem Verfahren ist es auch möglich, die Konzentration der einzelnen sedimentierenden Stoffe zu bestimmen, was unter Umständen von großer Bedeutung sein kann.

Bei der präparativen Darstellung größerer Eiweißmengen kann auf die optische Beobachtung der Sedimentation verzichtet werden. Für diese präparativen Zwecke ist die luftgetriebene Zentrifuge geeigneter als die Ölturbine. Es können bei der luftgetriebenen Zentrifuge besondere

Rotoren verwendet werden, die es gestatten, größere Flüssigkeitsmengen bis zu 100 ccm zu verarbeiten. Die in Deutschland konstruierte Zentrifuge hat für präparative Zwecke einen Rotor aus Bondur, in dem sich

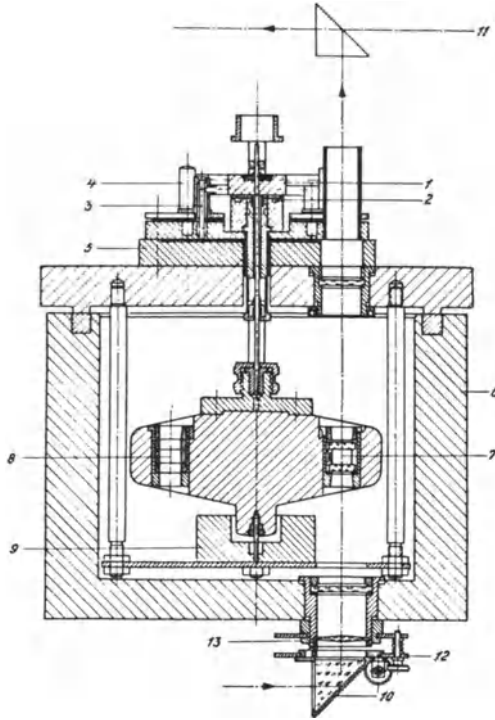


Abb. 9b. Schematischer Querschnitt der Ultrazentrifuge der Physikalischen Werkstätten Göttingen.

Die Turbinenscheibe (1) ist durch eine biegsame Stahlachse mit dem Rotor verbunden, der in einer Vakuumkammer (6) rotiert. Die Turbinenscheibe wird durch einen Luftstrom, der aus den Bohrungen des Hubluftkanals (2) austritt, in der Schwebe gehalten und durch die aus den Treibdüsen (3) austretende Luft in Umdrehung versetzt. Durch die entgegengesetzt gerichteten Bremsdüsen (4) wird die Zentrifuge wieder zum Stehen gebracht. Der Antriebsmechanismus ist durch eine dicke Gummieinlage (5) erschütterungsfrei auf der Deckplatte der Vakuumkammer montiert. Durch eine auf der Unterlage frei bewegliche Dampfungsscheibe (9) werden Präzessionsbewegungen des Rotors sofort gedämpft. In dem Rotor befindet sich die Meßzelle (7), in die die zu untersuchende Lösung eingefüllt wird, und die gleichschwere undurchsichtige Ausgleichszelle (8). Das Licht wird durch das untere Prisma (10) durch die Meßzelle hindurch auf das obere Prisma (11) geworfen und gelangt von hier aus in das Objektiv der Kamera. Bei Verwendung der TÖPLERSchen Schlierenmethode ist bei 13 die Schlierenlinse eingeschaltet. Der Strahlengang wird durch die Justiereinrichtung (12) ausgerichtet.

sechs schräge Bohrungen mit einem Fassungsvermögen von je 15 ccm befinden, so daß insgesamt 90 ccm verarbeitet werden können (Abb. 9a). Mit derartigen Rotoren können Zentrifugalkraftfelder von etwa 100 000—200 000 g erreicht werden, bei einer Drehzahl von 40 000—60 000/min. Zur Darstellung der Virusproteine werden auch kontinuierlich arbeitende, hochtourige Zentrifugen, wie z. B. die Ceba-Zentrifuge, mit Erfolg benutzt. Je-

doch ist es bei diesem kontinuierlichen Betrieb nicht so leicht möglich, die von Fall zu Fall am besten geeigneten Versuchsbedingungen einzuhalten.

Die hochtourige Zentrifugierung wird besonders dann angewendet, wenn es darauf ankommt, Eiweißstoffe, die sich in ihrer Masse voneinander unterscheiden, voneinander zu trennen. Da die Virusproteine im allgemeinen ein sehr hohes Molekulargewicht besitzen, ist es möglich, durch Zentrifugierung diese von den leichteren normalen Gewebsproteinen abzutrennen. Eine derartige spezifische Trennung ist auf chemischem Wege nicht möglich, da keine Beziehung zwischen dem Molekulargewicht der Eiweißstoffe und ihren chemischen Eigenschaften besteht. Durch

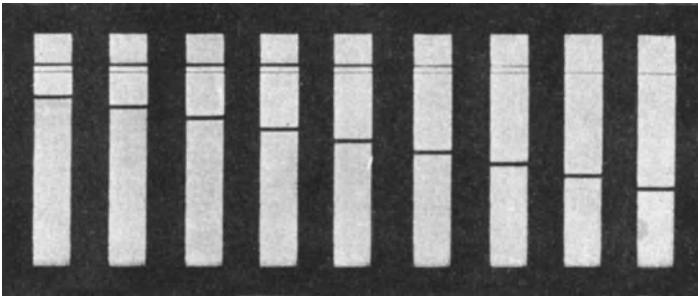


Abb. 10. Sedimentation des Tabakmosaikvirus (TÖPLERSche Schlierenmethode). Proteinkonzentration 0,5%, Drehzahl 17000, Zeitraum zwischen den Aufnahmen 5 Minuten.

Ultrazentrifugierung können auch sehr empfindliche Viren, die eine chemische Fällung nicht vertragen, in reiner Form gewonnen werden. Die Ultrazentrifuge kann daher als unentbehrliches Hilfsmittel zur Reindarstellung der Virusproteine bezeichnet werden und hat bei der Darstellung fast aller Viren Anwendung gefunden. So kann das TM-Virus unmittelbar aus dem Saft der kranken Pflanzen durch $1\frac{1}{2}$ stündiges Zentrifugieren bei einer Drehzahl von 25000/min nahezu quantitativ in reiner Form gewonnen werden. Zur Darstellung größerer Mengen von Virus empfiehlt es sich, vorher das Protein durch Ausfällung mit Ammonsulfat und Wiederaufnehmen in einem kleinen Flüssigkeitsvolumen zu konzentrieren. Nach diesem Verfahren gelang es z. B., das Tomatenmosaikvirus auf einfache Weise in größerer Menge aus Tomatenpflanzen zu gewinnen, während die rein chemische Darstellung in diesem Falle wegen der großen Menge an Begleitsubstanzen sehr umständlich ist (125).

Ganz besonders hat sich die Ultrazentrifuge bei der Darstellung der tierischen Viren bewährt. So gelang es BEARD und WYCKOFF (14) auf diesem Wege das Virus des Kaninchenpapilloms in reiner Form darzustellen. Die Reinigung des Virusproteins erfolgte so, daß das Sediment

aus der hochtourigen Zentrifuge in einer Pufferlösung aufgenommen wurde und in einer gewöhnlichen Laboratoriumszentrifuge ungelöste Proteinflocken entfernt wurden. Die klare Lösung wurde wieder hochtourig zentrifugiert und der ganze Vorgang mehrmals wiederholt. Auf diese Weise lassen sich auch viele andere tierische Viren gewinnen, so z. B. das Maul- und Klauenseuchevirus [JANSSEN (74)], das Virus der Encephalomyelitis der Maus (58) sowie die Elementarkörperchen der Vaccine (38); auch aus dem Kaninchenmyxom konnte so eine infektiöse hochmolekulare Proteinfraction gewonnen werden (172).

c) Die Elektrophorese.¹

Ein anderes wichtiges physikalisches Verfahren zur Darstellung und Untersuchung von Eiweißstoffen ist die Elektrophorese. Sie bildet eine

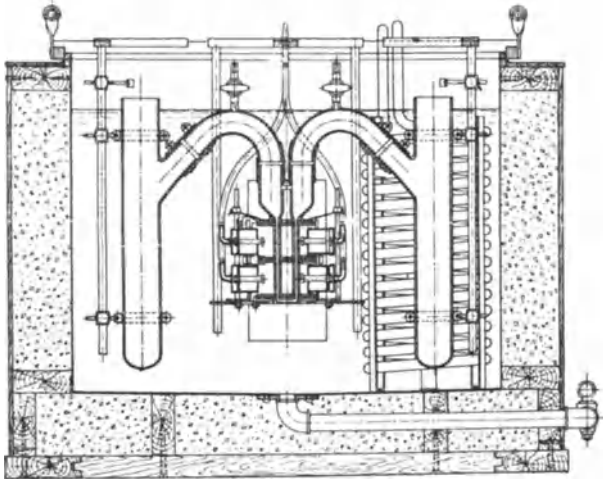


Abb. 11. Elektrophoreseapparat nach TISELIUS. Die Elektroden sind nicht mitgezeichnet.

wertvolle Ergänzung zur Ultrazentrifugierung. Während dort die Trennung und Charakterisierung der Proteine nach ihrer Masse erfolgt, sind hier die elektrischen Eigenschaften des untersuchten Stoffes maßgebend. Viele Proteine, die gleiche Masse besitzen, lassen sich in der Ultrazentrifuge nicht unterscheiden, während sie sich bei der Elektrophorese auf Grund ihres verschiedenen elektrochemischen Verhaltens trennen lassen. Wenn ein Protein sich bei der Ultrazentrifugierung *und* bei der Elektrophorese einheitlich verhält, besteht ein hoher Grad von Wahrscheinlichkeit, daß wir es mit einem reinen Stoff zu tun haben.

¹ Siehe hierzu A. TISELIUS (207) sowie bei (170).

Für analytische und präparative Arbeiten auf dem Eiweißgebiet hat sich besonders der Elektrophoreseapparat von TISELIUS bewährt (207). Bei diesem ist es möglich, mit den gleichen optischen Methoden, wie sie bei der Beobachtung der Sedimentation angewandt werden, die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine messend zu verfolgen und die einzelnen Stoffe voneinander zu trennen, wenn sie genügend weit auseinander gewandert sind (Abb. 12).

Der Apparat (Abb. 11) besteht aus einem U-Rohr, das sich aus mehreren gegeneinander seitlich verschiebbaren Kammern zusammensetzt. Die untere Hälfte des U-Rohres wird mit der Proteinlösung gefüllt und diese dann durch seitliche Verschiebung von den übrigen Teilen des U-Rohrs getrennt. Dann werden die oberen Teile des U-Rohrs und die Elektrodengefäße mit der gleichen Pufferlösung, in der das Protein gelöst wurde, gefüllt. Nachdem der Apparat die Temperatur des Thermostaten angenommen hat, wird die untere Kammer mit Hilfe einer Druckluftvorrichtung wieder zurückgeschoben und auf diese Weise die Pufferlösung störungsfrei mit der Proteinlösung unterschichtet. Nach dem Anlegen der Spannung kann nun die Wanderung der einzelnen Proteinkomponenten beobachtet werden (Abb. 12). Zur präparativen Trennung einzelner Eiweißstoffe wird die Elektrophorese mit Hilfe einer Kompensationseinrichtung so geleitet, daß der eine Stoff sich in dem einen, bzw. in dem oberen Teil des einen Schenkels, die übrigen Begleitstoffe sich aber in dem anderen Schenkel des U-Rohres befinden. Durch seitliche Verschiebung der Kammern wird nun die gesuchte Komponente von der übrigen Lösung abgetrennt. Es ist auf diese Weise möglich, auch Stoffe zu trennen, die nur einen geringen Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen. Wenn jedoch die erforderlichen Versuchszeiten allzu groß werden, kann eine eindeutige Trennung nicht mehr durchgeführt werden, da die Grenzonen durch den Einfluß der Diffusion zu unscharf werden.



Abb. 12. Wanderung des Tabakmosaikvirus im anodischen Schenkel des TISELIUS-Apparats (TÖPLERSche Schlierenmethode). Feldstärke 5 V/cm. Zeitraum zwischen den Aufnahmen 10 Minuten. PH 7,0.

Die Elektrophorese hat sich bei der Darstellung von Eiweißstoffen sehr bewährt. In der Viruschemie ist sie jedoch für präparative Zwecke nur wenig benutzt worden, da die Reindarstellung der Virusarten bisher auch mit anderen, zum Teil einfacheren Mitteln gelungen ist. Die Bedeutung der Elektrophorese für die Virusforschung liegt bisher vorwiegend auf analytischem Gebiet. Hierauf soll in anderem Zusammenhang näher eingegangen werden (siehe S. 131).

3. Die Prüfung auf Einheitlichkeit.

Wegen der eingangs betonten grundsätzlichen Bedeutung der Einheitlichkeit der Viren ist es eine wichtige Aufgabe der Viruschemie, diese für jedes neu dargestellte Virus sicherzustellen. Eines der überzeugendsten Argumente für die Einheitlichkeit eines Virus ist die *Kristallisierbarkeit*. Das Bestreben des Chemikers wird daher vor allem darauf hinausgehen, das Virus in kristallisierter Form zu erhalten. Doch ist der Übergang in

den kristallisierten Zustand als solcher allein nicht für die Reinheit beweisend, da die Proteine wegen ihrer großen, mit polaren Gruppen besetzten Oberfläche leicht andere Stoffe adsorbieren und außerdem Mischkristalle mit anderen Eiweißstoffen bilden können. Umgekehrt kann aber auch ein nicht kristallisierter Eiweißstoff nicht ohne weiteres als einheitlich bezeichnet werden, da eine besondere Oberfläche oder Form des Moleküls trotz der Einheitlichkeit eine Kristallisation unmöglich machen kann. Aus diesem Grunde muß die *Einheitlichkeit eines Proteins auch im gelösten Zustand* geprüft werden. Hierfür scheiden solche Methoden aus, die lediglich einen statistischen Mittelwert der Zusammensetzung liefern, wie z. B. osmotische und viskosimetrische Messungen. Geeignet sind dagegen solche Verfahren, bei denen die Moleküle unter dem Einfluß einer Kraft (Schwerkraft, Diffusion oder elektrisches Feld) durch die Lösung hindurchbewegt werden. Hierbei können genaue Aussagen über die Eigenschaftsverteilung innerhalb der untersuchten Substanzmenge gemacht werden.

Die Einheitlichkeit eines Proteins kann weiterhin aus seiner *Löslichkeit* erschlossen werden. Nach der GIBBSschen Phasenregel muß bei einem Einkomponentensystem die Löslichkeit unabhängig von der Menge des vorhandenen Bodenkörpers sein. Die Gültigkeit der Phasenregel bei Eiweißstoffen wurde bereits von SÖRENSEN (189) am Eialbumin bewiesen und später besonders von NORTHROP (91) und seiner Schule zur Prüfung der Reinheit von Eiweißstoffen herangezogen. Bei einem reinen Eiweißstoff ist weiterhin die Löslichkeit umgekehrt proportional der zugesetzten Salzmenge. Durch Ermittlung dieser linearen Abhängigkeit kann also ebenfalls die Einheitlichkeit festgestellt werden.

Bei der Anwendung dieser Prüfungsmethoden auf verschiedene Viren hat sich ergeben, daß diese in ihrer Homogenität in keiner Weise anderen Eiweißstoffen nachstehen. Dies gilt nicht nur für kristallisierte, pflanzliche Virusarten, wie z. B. das TM-Virus und das in Dodekaedern kristallisierende Bushy-stunt-Virus der Tomaten (10), sondern auch für die nicht kristallisierten tierischen Virusarten, wie z. B. das Kaninchenpapillom (14, 128), die Insektenviren (19) und das Virus der Maul- und Klauenseuche (74).

Trotzdem werden von mancher Seite heute noch Bedenken gegen die Auffassung der einfachen stofflichen Natur der Viren geltend gemacht. Diese Zweifel richten sich aber meistens nicht gegen die *Einheitlichkeit* der gewonnenen Proteine, sondern gegen die Identität dieser Proteine mit dem Virus. Die biologische Wirksamkeit der dargestellten Proteine soll hiernach auf einer, mit physikalisch-chemischen Methoden nicht mehr nachweisbaren Verunreinigung mit dem eigentlichen Virus beruhen. Diese Einwände sind aber in einer Reihe von Fällen besonders beim TM-Virus überzeugend widerlegt worden. Das dargestellte Protein ist noch

in so hoher Verdünnung wirksam, daß ein als Verunreinigung vorhandenes Virus ohne weiteres nachweisbar sein müßte. Außerdem läßt sich durch eine entsprechende Versuchsanordnung zeigen, daß der Träger der Viruswirksamkeit in allen Eigenschaften mit den dargestellten Proteinen übereinstimmt, z. B. im Molekulargewicht, in der p_H -Beständigkeit, im Absorptionsspektrum und im chemischen Verhalten. Für die Identität des Proteins mit dem Virus spricht weiterhin, daß nach der Infektion verschiedener Wirtsorganismen stets das gleiche Virusprotein isoliert wird.

4. Die physikalisch-chemische Kennzeichnung der Virusarten.

Durch den Beweis der Einheitlichkeit des dargestellten Virusproteins und seiner Identität mit dem Krankheitserreger sind die wichtigsten Voraussetzungen für die eindeutige Charakterisierung des Virus geschaffen. Diese kann sich auf die verschiedensten Eigenschaften des Proteins erstrecken. In dem folgenden Abschnitt sollen zunächst eine Reihe physikalisch-chemischer Methoden besprochen werden, mit denen Größe und Gestalt der Viren ermittelt werden können, sodann soll auf Untersuchung der elektrochemischen Eigenschaften näher eingegangen werden.

a) Die elektronenmikroskopische Untersuchung.¹

Über die Gestalt und Größe der Viren kann das Lichtmikroskop nur sehr unvollkommene Auskunft geben. Die mikroskopische Auflösungsgrenze im sichtbaren Licht liegt bei biologischen Objekten selbst unter günstigen Bedingungen nicht unter 250—200 $m\mu$. Durch Verwendung von ultraviolettem Licht kann diese Grenze auf etwa 100 $m\mu$ herabgesetzt werden. Hieraus folgt, daß die größeren Virusarten, insbesondere die Elementarkörperchen, wohl noch als einzelne Teilchen sichtbar gemacht, aber genaue Aufschlüsse über ihre Form und Begrenzung nicht erhalten werden können. Eine wesentliche Bereicherung der Methodik der Virusforschung bedeutet daher die Entwicklung des Elektronenmikroskops. Beim Elektronenmikroskop liegt die Auflösungsgrenze bei etwa bei 1 $m\mu$, doch läßt sich diese hohe Auflösung bei biologischen Objekten nicht in vollem Maße ausnutzen, da sich wegen der geringen Massendichte kleine Teilchen nicht mehr scharf abzeichnen.

Das Elektronenmikroskop hat bei der Untersuchung der Viren bereits sehr weitgehend Anwendung gefunden. Als erstes Virus wurde das Tabakmosaikvirus von KAUSCHE, PFANKUCH und RUSKA (82) unmittelbar sichtbar gemacht. In Übereinstimmung mit den physikalisch-chemischen Befunden zeigte sich, daß es eine stäbchenförmige Gestalt

¹ Siehe hierzu v. BORRIES und RUSKA (24) und M. v. ARDENNE (4).

besitzt (Abb. 13). Später wurde dann eine ganze Reihe anderer Viren elektronenmikroskopisch abgebildet. Eine ähnliche, langgestreckte Gestalt wie das Tabakmosaikvirus besitzen das X- und Y-Virus der Kartoffel (Abb. 14) und das Polyomyelitisvirus (208). Das Maul- und Klauenseuchevirus scheint hingegen eine kugelförmige Gestalt zu haben (6).

Bei elektronenmikroskopischen Abbildungen muß berücksichtigt werden, daß die Aufnahme im Hochvakuum erfolgt, die Objekte also nur im trockenen Zustand untersucht werden können. Die meisten Viren zeigen beim Auftrocknen an der Luft einen Aktivitätsverlust, woraus gefolgert werden kann, daß dieser Trocknungsprozeß Veränderungen am Virusmolekül hervorruft. Wenn man eine größere Anzahl Moleküle des TM-Virus elektronenmikroskopisch ausmißt, so zeigt sich, daß die Länge der Virusstäbchen nicht einheitlich ist. Die gefundene Inhomogenität der aufgetrockneten Moleküle ist größer als nach den Ultrazentrifugenergebnissen am gelösten Virus zu erwarten ist. Die Verschiedenheit der Teilchenlänge ist im wesentlichen auf zwei Ursachen zurückzuführen: 1. Die stäbchenförmigen Virusmoleküle lagern sich besonders bei höherer Konzentration linear aneinander, so daß fadenförmige Gebilde verschiedener Länge entstehen.

2. Die Aggregate verschiedener Länge zerbrechen beim Auftrocknen leicht zu verschiedenen langen Bruchstücken. Die Elektronenstrahlung selbst scheint hingegen unter normalen Bedingungen keine allzu tief greifende Wirkung auf biologische Eiweißstrukturen zu haben. So konnten M. v. ARDENNE und H. FRIEDRICH-



Abb. 13. Elektronenmikroskopische Abbildung des Tabakmosaikvirus, Vergr. 40000fach. (Aufnahme von H. FRIEDRICH-FREKSA.)

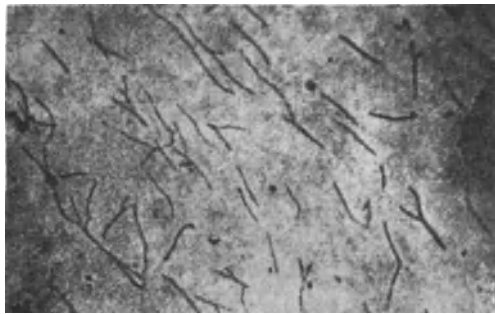


Abb. 14. Kartoffel-X-Virus nach G. A. KAUSCHE. Vergr. 20000fach.

FREKSA (5) zeigen, daß nach der elektronenmikroskopischen Abbildung von Bakteriensporen diese nicht vollständig zerstört sind, sondern z. T. sogar ihre Keimfähigkeit behalten haben.

Die Abbildung der getrockneten Virusmoleküle läßt daher keine unmittelbaren Rückschlüsse auf die Dimensionen des gelösten Moleküls zu. Unveröffentlichte Untersuchungen von H. FRIEDRICH-FREKSA zeigen, daß die Art der Größenverteilung stark von den Bedingungen der Auftrocknung abhängt. Für das Tabakmosaikvirus ergibt sich bei gewöhnlicher Auftrocknung in der Luft eine ziemlich komplizierte Größenverteilung mit einem Mittelwert der Teilchenlänge von $190\text{ m}\mu$. Bei schonender Auftrocknung des eingefrorenen Tropfens bei tiefer Temperatur erhält man eine wesentlich einfachere Verteilung mit einem ausgesprochenen Häufigkeitsmaximum der Teilchenlänge bei $250\text{ m}\mu$. Dieser Wert scheint daher der wahren Teilchenlänge am nächsten zu kommen. Wegen der Abhängigkeit der Größenverteilung von den Versuchsbedingungen weichen die von den einzelnen Arbeitskreisen gefundenen Mittelwerte voneinander ab. Von KAUSCHE (143) wurde ein Häufigkeitsmaximum bei $300\text{--}320\text{ m}\mu$, von STANLEY (199) bei $290\text{ m}\mu$ gefunden. Die Dicke der Virusstäbchen wurde von KAUSCHE und Mitarbeitern (82) in Übereinstimmung zu den Röntgenuntersuchungen auf elektronenmikroskopischen Abbildungen zu $15\text{ m}\mu$ bestimmt. Aus der Länge und dem Durchmesser sowie dem spezifischen Gewicht der Virusteilchen ergibt sich für diese ein Molekulargewicht von 40 Millionen, was mit dem in der Ultrazentrifuge ermittelten von 46 Millionen gut übereinstimmt. Einige Virusarten, wie z. B. das von V. ARDENNE und PYL (6) aufgenommene Maul- und Klauenseuchevirus geben bei der elektronenmikroskopischen Aufnahme nur ganz verschwommene Abbildungen, so daß hier eine Größenbestimmung sehr erschwert ist. Diese Erscheinung wird auf das Verfließen der Teilchen auf der Folie zurückgeführt. Durch geeignete Fixierung z. B. mit Osmiumtetroxyddampf scheint es möglich zu sein, dieses Zerfließen zu verhindern.

Das Elektronenmikroskop kann zum unmittelbaren Nachweis der Viren im kranken Organismus angewendet werden. So ist es z. B. möglich, das TM-Virus unmittelbar im unbehandelten Saft kranker Tabakpflanzen nachzuweisen (125). Dies ist nur möglich, weil dieses Virus eine sehr charakteristische, stäbchenförmige Gestalt besitzt, und ähnliche stäbchenförmige Gebilde in der gesunden Tabakpflanze nicht vorkommen. Wäre das TM-Virus kugelförmig, so wäre es ein hoffnungsloses Unternehmen, dieses zwischen den zahlreichen, mehr oder weniger kugelförmigen Gebilden des normalen Pflanzensaftes aufzufinden. Die Schwierigkeiten der Differenzierung biologischer Strukturen sind in der Elektronenmikroskopie noch erheblich größer als beim Lichtmikroskop, da charakteristische Färbungen und Unterschiede in der Lichtbrechung

fehlen und zumeist nur die äußeren Umrisse zu erkennen sind. Die Zuordnung der auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennbaren Gebilde zu den entsprechenden biologischen Begriffen läßt sich nur dann in eindeutiger Weise treffen, wenn sie vorher mit anderen Methoden sichergestellt ist.

Das Elektronenmikroskop ist ein außerordentlich wertvolles, zusätzliches Hilfsmittel der Virusforschung, mit dem ein unmittelbares, anschauliches Bild der untersuchten Viren gewonnen werden kann. Jedoch folgt aus dem Gesagten, daß sichere Rückschlüsse auf die Größe und Gestalt der Viren nur gewonnen werden können, wenn daneben eine physikalisch-chemische Kennzeichnung des gelösten Virusproteins durchgeführt wird.

b) Bestimmung des Teilchendurchmessers durch Ultrafiltration.

Eine der am häufigsten angewendeten Methoden zur Größenbestimmung gelöster Viren ist die Ultrafiltration. Diese Methode wurde 1907 von BECHOLD zur Untersuchung verschiedener kolloidaler Systeme entwickelt, und hat danach in der Virusforschung sehr weitgehend Anwendung gefunden. Als Filter werden Kollodiummembranen benutzt. Die Porosität der Filter wird durch Verwendung verschiedenartiger Lösungsmittel für das Kollodium oder durch die Verdampfungszeit des Lösungsmittels variiert. Die Herstellung von Filtern abgestufter Porosität wurde besonders von ELFORD (47) ausgebaut. Er benutzte hierzu eine Lösung von Nitrocellulose in einer Mischung von Äther, Äthylalkohol und Amylalkohol. Bei Verwendung dieses Gemisches ist die mittlere Porenweite der Filter linear abhängig von der zugesetzten Menge an Essigsäure bzw. Wasser. Die auf diese Weise hergestellten Filter zeichnen sich durch eine gleichmäßige Porenweite aus und werden von ELFORD als Gradokollfilter bezeichnet.

Zur Bestimmung der Teilchengröße werden die Filter zunächst mit der Bläschenmethode hinsichtlich ihrer maximalen Porenweite und mit dem Durchflußverfahren auf ihre mittlere Porenweite vermessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind allerdings mit Vorsicht zu bewerten, da sie auf theoretischen Voraussetzungen beruhen, deren Gültigkeit mindestens bei geringer Porenweite noch strittig ist. Liegen die erhaltenen Werte für die mittlere und die maximale Porenweite nahe beieinander, so spricht dieses für eine relativ große Einheitlichkeit der Porenweite. Diese ist für die Bewertung der mit Hilfe der Ultrafiltration erhaltenen Ergebnisse sehr wesentlich.

Durch Verwendung verschiedener Filter wird die Grenzporosität ermittelt, bei der das Virus gerade noch filtrierbar ist. Der Filtrationsendpunkt wird durch den biologischen Test des Filtrats bestimmt. Die Beziehung zwischen der Grenzporosität und dem Durchmesser der gerade noch zurückgehaltenen Teilchen ist recht verwickelt und läßt sich nur empirisch bestimmen. Bei kleinen Porenweiten ist das Verhältnis

Grenzporenweite: Teilchendurchmesser $0,33$ und wird erst bei Porenweiten über $1\text{ m}\mu$ gleich 1 (49).

Die Membranen sind keineswegs ideale Siebe. Die Länge der Kanäle, durch die die Filtration erfolgt, ist mindestens tausendmal so groß wie ihr Durchmesser. Hierdurch werden Störungen durch Adsorptionserscheinungen und mechanische Verstopfungen verursacht. Die Ergebnisse der Ultrafiltration sind daher abhängig von der Art der filtrierten Lösung, von dem benutzten Filtrationsdruck und der Durchflußgeschwindigkeit. Besondere Wirkungen üben in der Lösung enthaltene, oberflächenaktive Stoffe aus. So wird z. B. das Maul- und Klauenseuchevirus in einer Phosphat-Kochsalz-Lösung bei einer mittleren Porenweite von $60\text{ m}\mu$ vollständig zurückgehalten; wird das Virus dagegen in einer Fleischbrühe bestimmter Zusammensetzung gelöst, so ist es noch bis zu einer Porenweite von $25\text{ m}\mu$ filtrierbar (56). Bei nicht-kugelförmigen Teilchen, z. B. dem TM-Virus, werden bei der Ultrafiltration besonders widerspruchsvolle Ergebnisse erhalten (187).

Der Vorteil der Ultrafiltration liegt darin, daß es ohne vorherige Reindarstellung und bei einer geringen Viruskonzentration gelingt, den Durchmesser der Viren wenigstens angenähert zu ermitteln. Eine exakte Größenbestimmung oder eine Differenzierung nahe verwandter Virusarten ist dagegen auf diesem Wege nicht möglich.

c) Bestimmung des Molekulargewichtes mit der Ultrazentrifuge.

In der Chemie der niedermolekularen Stoffe wird das Molekulargewicht gelöster Teilchen am häufigsten durch Methoden bestimmt, die auf der Dampfdruckerniedrigung des Lösungsmittels (Schmelzpunkt-erniedrigung, Siedepunkterhöhung) oder der Messung des osmotischen Druckes beruhen. Wegen der Größe der Eiweißmoleküle können diese Verfahren in der Proteinchemie nicht angewendet werden. Exakte Messungen des osmotischen Druckes können bei Eiweißstoffen nur bis zu einem Molekulargewicht von etwa $500\,000$ durchgeführt werden. Da die Viren oft ein sehr viel höheres Molekulargewicht haben, muß es hier auf einem anderen Wege bestimmt werden. Die beste Methode hierzu ist die Ultrazentrifugierung. Diese bietet gegenüber den anderen Verfahren noch den Vorteil, daß auch der Dispersitätsgrad beurteilt werden kann und in einem Gemisch verschiedener Molekülarten die Molekulargewichte der einzelnen Komponenten unabhängig voneinander bestimmt werden können.

Für die Ultrazentrifugierung ist es notwendig, die Viren weitgehend zu konzentrieren und, wenn möglich, in reiner Form darzustellen. Im allgemeinen ist zur Untersuchung in der Ultrazentrifuge etwa $0,5\text{ ccm}$ einer mindestens $0,1\%$ igen Lösung des entsprechenden Virusproteins notwendig. Da diese Voraussetzung sich oft nicht erfüllen läßt, hat man versucht, auch in Rohlösungen unbekannter Viruskonzentration unter Verzicht auf eine optische Beobachtung die Sedimentationskonstante wenigstens größenordnungsmäßig zu bestimmen. Versuche in dieser

Richtung wurden besonders von BECHHOLD (15), SCHLESINGER (168) und ELFORD (48) angestellt. Die Konzentrationsverteilung im Zentrifugalfeld muß in diesem Fall mit Hilfe des biologischen Testes bestimmt werden; da dieser aber meist nur auf eine Zehnerpotenz genau ist, kann bei dieser indirekten Bestimmung der Sedimentationskonstante keine große Genauigkeit erreicht werden.

Nachdem es gelungen ist, Viren in reiner Form darzustellen, können ihre Molekulargewichte wie bei anderen Eiweißstoffen exakt bestimmt werden. Dies kann auf zwei voneinander unabhängigen Wegen erfolgen, erstens durch die Bestimmung des *Sedimentationsgleichgewichtes* und zweitens durch Bestimmung der *Sedimentationskonstanten* und *Diffusionskonstanten* (204, 205). Bei dem ersten Verfahren wird bei niedrigen Drehzahlen zentrifugiert, so daß sich ein Gleichgewicht zwischen der Sedimentation und der entgegengesetzt wirkenden Diffusion einstellt. Es bildet sich auf diese Weise eine „Atmosphäre“, wobei die Konzentration des Stoffes am Zellboden am größten ist und nach der Drehachse hin allmählich abnimmt. Durch Bestimmung der Konzentration c_2 und c_1 an zwei Punkten im Abstand x_2 und x_1 von der Rotationsachse kann dann das Molekulargewicht nach folgender Formel berechnet werden:

$$M = \frac{2 R T \ln \frac{c_2}{c_1}}{(1 - V \varrho) \omega^2 (x_2^2 - x_1^2)} \quad (1)$$

R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur, V = partielles spezifisches Volumen der gelösten Substanz, ϱ = Dichte der Lösung, ω = Winkelgeschwindigkeit.

Bei den hochmolekularen Virusarten, insbesondere den nicht-kugelförmigen, ist die Diffusionsgeschwindigkeit sehr gering, so daß die Einstellung des Gleichgewichtes nur sehr langsam erfolgt bzw. das Konzentrationsgefälle nach Einstellung des Gleichgewichtes sich nur auf eine sehr geringe Schichthöhe erstreckt. Hierdurch wird die Genauigkeit beeinträchtigt. Diese Schwierigkeiten sind jedoch nicht grundsätzlicher Art, so daß hiermit die Molekulargewichte, insbesondere der kleineren Virusarten, mit großer Sicherheit erfaßt werden können. Eine Anwendung fand diese Methode z. B. bei der Molekulargewichtsbestimmung des TM-Virus (50) und des Bushy-stunt-Virus (120).

Bei der zweiten Methode der Molekulargewichtsbestimmung wird zunächst die *Sedimentationskonstante* bestimmt. Diese wird mit s_{20} bezeichnet und ist die auf die Einheit der Kraft bezogene Senkgeschwindigkeit der Teilchen in Wasser von 20° als Lösungsmittel. Sie wird in 10^{-13} cm/sec⁻¹/dyn⁻¹ angegeben. s_{20} läßt sich ohne Schwierigkeiten mit einer Genauigkeit von 2–3% bestimmen und ist um so bequemer zu messen, je größer die Teilchen sind. Die Sedimentationskonstante ist daher von größtem Wert zur Kennzeichnung der ver-

schiedenen Virusarten. Um Fehler durch die elektrische Aufladung der Teilchen zu vermeiden, muß s_{20} stets in salzhaltigen Lösungen gemessen werden. Eine Ionenstärke von 0,2 ist hierbei als ausreichend zu betrachten. Bei Teilchen, die stark von der Kugelform abweichen, ist eine Abhängigkeit von s_{20} von der Konzentration zu beobachten, die auf eine gegenseitige Störung der Teilchen bei der Sedimentation zurückgeführt wird. Vielleicht sind hierbei die von LANGMUIR (97) und LEVINE (109) theoretisch gedeuteten (siehe S. 152) Kräfte wirksam, die sich aus der Wechselwirkung mit der umgebenden Ionenatmosphäre ergeben. Eine Abhängigkeit vom p_H läßt sich dagegen im allgemeinen nicht feststellen, es sei denn, daß Dissoziationen oder Assoziationen stattfinden. Diese geben sich durch das Auftreten neuer Komponenten mit abweichenden Sedimentationskonstanten zu erkennen. So konnte z. B. am Tabakmosaikvirus gezeigt werden, daß dieses unter bestimmten Bedingungen reversibel zu dimeren oder höheren Aggregaten assoziiert (148, 175). Diese Aggregate können durch Dialyse oder p_H -Veränderung wieder aufgelöst werden, so daß man wieder monodisperse Teilchen vom einfachen Molekulargewicht erhält.

Die *Senkungsgeschwindigkeit* eines Teilchens ergibt sich aus dem Verhältnis der auf das Teilchen wirkenden Zentrifugalkraft abzüglich des Auftriebes in der Lösung und der entgegengesetzt wirkenden Reibungskraft f :

$$s_{20} = \frac{M(1 - V_e)}{f} \quad (2)$$

M = Molekulargewicht, f = Reibungskonstante pro Mol.

Für verdünnte Lösungen gilt nun $f = \frac{RT}{D}$, wobei R = Gaskonstante ($8,313 \times 10^7$), T = absolute Temperatur und D = Diffusionskonstante ist.

Nehmen wir die bei der freien Diffusion geltende molare Reibungskonstante als auch bei der Sedimentation gültig an, so ergibt sich nach SVEDBERG folgender Ausdruck für das Molekulargewicht:

$$M = \frac{RT s_{20}}{D_{20}(1 - V_e)} \quad (3)$$

Es ist demnach also möglich, aus s_{20} das Molekulargewicht der Teilchen zu berechnen, wenn die Diffusionskonstante bekannt ist.

Zur Bestimmung der Diffusionskonstanten bei Eiweißstoffen hat sich die Methode von O. LAMM (95, 153) am besten bewährt, da hierbei nur geringe Substanzmengen erforderlich sind. Die Methode beruht darauf, daß die zu untersuchende Proteinlösung durch eine geeignete Vorrichtung mit einer Pufferlösung störungsfrei überschichtet wird und dann auf optischem Wege die zeitliche Veränderung des Konzentrationsgefälles bestimmt wird. Durch die Auswertung der auf diese Weise erhaltenen Konzentrations-

verteilungskurven kann dann einerseits die Diffusionskonstante und andererseits eine etwa vorhandene Uneinheitlichkeit ermittelt werden.

Die Diffusionsgeschwindigkeit der Viren ist entsprechend ihrer Größe sehr klein. Dies gilt besonders für die langgestreckten Viren, die eine verhältnismäßig große Oberfläche und Reibung haben. Störend macht sich weiterhin die Neigung zur Aggregatbildung bemerkbar. In nicht zu hohen Konzentrationen würden jedoch bei einer Reihe von Viren [Bushy-stunt-Virus (120), Kaninchenpapillom (127)] einwandfreie Meßergebnisse erhalten (siehe Tab. 3). Die Angaben über die Diffusionskonstante des TM-Virus sind jedoch noch nicht genügend gesichert, da die Werte konzentrationsabhängig sind und sich bereits bei Konzentrationen über 0,5% Anomalien ergeben (129), sie bedürfen daher einer genaueren Nachprüfung. Man hat deshalb gerade bei diesem Virus sich bemüht, das Molekulargewicht ohne Zuhilfenahme der Diffusionskonstanten zu ermitteln. Aus Gleichung (2) ergibt sich ohne weiteres, daß hierzu jede andere Methode brauchbar ist, die uns einen Wert für die Reibungskonstante f liefert. Die Reibung hängt nun in erster Linie von der Gestalt des Teilchens ab. Für kugelförmige Teilchen ist sie nach dem STOKESchen Gesetz einwandfrei zu berechnen, bei diesen ist

$$f_0 = 6 \pi \eta r \cdot \frac{dx}{dt} \quad (4)$$

r = Durchmesser der Teilchen, η = Viskosität des Lösungsmittels,

$\frac{dx}{dt}$ = Geschwindigkeit der Teilchen.

Für langgestreckte oder sonst von der Kugelform abweichende Teilchen ist die Berechnung von f sehr viel schwieriger, da bei diesen die theoretischen Grundlagen zur Berechnung von f aus der Gestalt der Teilchen recht unsicher sind.

Im folgenden Abschnitt soll auf die verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden eingegangen werden, mit denen man die Gestalt eines Proteinmoleküls ermitteln kann. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ermöglichen uns in vielen Fällen eine genaue Berechnung von f und können somit zur Bestimmung des Molekulargewichtes aus der Sedimentationskonstanten herangezogen werden.

d) Bestimmung der Gestalt der Viren.

Wie bereits ausgeführt wurde, ist in besonderen Fällen die direkte Ausmessung eines Virus auf elektronenmikroskopischem Wege möglich, jedoch ist dieses Verfahren stets mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, da hierbei eine Änderung in der Gestalt der Teilchen nicht ausgeschlossen ist. Es ist daher wichtig, daß auch auf indirektem Wege Aufschlüsse über die Gestalt der Viren gewonnen werden können. Neben den Ergebnissen der Ultrazentrifugierung sind hierfür besonders die *Viskosität*, die

Strömungsdoppelbrechung, das Verhalten im *elektrischen Wechselfeld*, die *Dickenmessung von Oberflächenfilmen* und *Röntgenuntersuchungen* herangezogen worden.

Aus dem in der Ultrazentrifuge ermittelten Molekulargewicht und der Sedimentationskonstanten kann die Reibungskraft berechnet werden, die auf das Teilchen bei der Sedimentation wirkt. Das Verhältnis dieser Reibungskraft f zu der Reibung einer kompakten Kugel f_0 gibt uns ein Maß für die Abweichung des nicht hydratisierten Teilchens von der Kugelform. Für die meisten Eiweißstoffe ist dieses Verhältnis f/f_0 , das auch als *Reibungsfaktor* oder *Dissymmetriefaktor* bezeichnet wird, nur wenig größer als 1; diese sind also annähernd kugelförmige Gebilde. Worauf die Abweichung von der Kugelform beruht, bleibt unbestimmt und kann aus der Ultrazentrifugierung allein nicht ermittelt werden. Sie kann hervorgerufen sein durch Hydratation des Teilchens, durch Rauigkeiten der Oberfläche, durch eine besonders lockere Struktur oder aber durch eine längliche Gestalt.

Es bestehen verschiedene theoretische Ansätze (26, 57, 64, 139), um aus dem Reibungsverhältnis f/f_0 die Gestalt der Teilchen zu berechnen. Das Nebeneinander dieser verschiedenen Theorien zeigt, daß keine von ihnen auf völlig gesicherter Basis steht. Weiterhin gehen alle Ansätze von der Annahme aus, daß die Abweichung des Reibungsverhältnisses von 1 lediglich auf einer ellipsoiden Gestalt beruht, und die anderen Einflüsse, wie Hydratation usw. hiergegen zu vernachlässigen sind. Aus verschiedenen Untersuchungen ergibt sich aber, daß die Hydratation der Proteine recht erheblich ist und zu einer Erhöhung des Reibungsverhältnisses beiträgt.

So berechnete PERUTZ (140) mit Hilfe röntgenographischer Daten, daß im Falle des Insulins ($f/f_0 = 1,13$), Laktoglobins ($f/f_0 = 1,2$) und des Pferdehämoglobins ($f/f_0 = 1,24$) die Abweichung des Reibungsfaktors von 1 allein durch eine Hydratation der gelösten, kugelförmigen Moleküle erklärt werden kann, die der Hydratation im Kristall entspricht. Hiernach ist für die Reibung die Hydratation von viel stärker ausschlaggebender Bedeutung als die asymmetrische Gestalt. Die Berechnung der Teilchengestalt aus f/f_0 hat aber trotzdem einen gewissen Wert, da sie mit einiger Sicherheit gestattet, den überhaupt möglichen Höchstwert der Längserstreckung abzuschätzen, der dann noch durch Berücksichtigung der Hydratation korrigiert werden kann.

Die Schwierigkeiten, die sich der physikalisch-chemischen Bestimmung der Gestalt von Eiweißstoffen bieten, sind geringer als bei anderen hochpolymeren Substanzen. Dies beruht darauf, daß die Abweichung von der Kugelform meist nicht sehr erheblich ist und die Proteine verhältnismäßig starre Gebilde sind, die theoretischen Überlegungen leichter zugänglich sind als die leichtverformbaren Fadenmoleküle, wie wir sie z. B.

bei der Cellulose finden. Dies zeigt sich auch bei der Untersuchung der *Viskosität* der Eiweißstoffe.

Ohne auf die Theorie der Viskosität im einzelnen einzugehen, kann festgestellt werden, daß als idealer Grenzfall folgender Ausdruck sowohl theoretisch als auch experimentell gesichert ist:

$$\eta_{\text{spez.}} = 2,5 \varphi \quad (5)$$

$$\eta_{\text{spez.}} = \eta_{\text{rel.}} - 1; \quad \eta_{\text{rel.}} = \frac{\text{Viskosität der Lösung}}{\text{Viskosität des Lösungsmittel}}$$

$$\varphi = \text{spez. Gesamtvolumen der suspendierten Teilchen.}$$

Dieses Gesetz gilt unter der Voraussetzung, daß 1. die Moleküle groß sind gegen die freie Weglänge der Moleküle des Lösungsmittels und klein gegen die Abmessungen der Apparatur, 2. die Moleküle starre Kugeln sind, 3. die Konzentration so niedrig ist, daß die gegenseitige Störung der Teilchen zu vernachlässigen ist und 4. die Strömung so langsam ist, daß keine Turbulenz auftritt. Da in der Gleichung die Zahl und die Gestalt der Teilchen nicht enthalten ist, kann bei solchen idealen Lösungen viskosimetrisch nichts über den Durchmesser der Teilchen ausgesagt werden. Rückschlüsse auf die Größe und Gestalt der Teilchen lassen sich nur aus den Abweichungen von dem idealen Verhalten ziehen. Die Erfahrung zeigt, daß die Zähigkeit der Lösungen hochmolekularer Substanzen tatsächlich kein ideales Verhalten zeigt, sondern von der Art des gelösten Stoffes abhängig ist. Aber auch bei der Untersuchung eines einzelnen Stoffes ergeben sich Abweichungen vom idealen Verhalten, da durchweg keine lineare Abhängigkeit der Viskosität von der Konzentration besteht und die Viskosität außerdem bei niedrigen Schubspannungen stark ansteigt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wird daher vorgeschlagen, die Viskosität auf unendlich verdünnte Lösungen und unendlich kleine Schubspannungen zu extrapolieren.

Von POLSON (152) wurde die Viskosität zahlreicher Eiweißstoffe bei verschiedenen Konzentrationen gemessen. Es zeigte sich, daß aus den bei verschiedenen Konzentrationen gefundenen Zähigkeiten auf einfache Weise die Zähigkeit bei $c = 0$ berechnet werden kann und diese dann stets eine bestimmte, für den betreffenden Eiweißstoff charakteristische Größe annimmt. Dieser Berechnung wird folgender Ausdruck zugrunde gelegt:

$$\eta_{\text{rel. } c=0} = 1 + \frac{\ln \eta_c}{c} \quad (6)$$

η_c = relative Viskosität bei Konzentration c ; c = Konzentration in g/100 ccm.

Diese Art der Extrapolation hat sich auch bei anderen Hochpolymeren Substanzen bewährt, so daß der Ausdruck $[\eta] = \eta_{\text{spez. } c=0} = \frac{\ln \eta_c}{c}$ auch als *Eigenviskosität* bezeichnet wird. POLSON (152) fand nun, daß

die Eigenzähigkeit von Proteinen, die nicht allzu sehr von der Kugelform abweichen (Achsenverhältnis kleiner als 10 : 1), sich sehr befriedigend durch folgende Gleichung¹ wiedergeben läßt:

$$[\eta] = 4,0G + 0,0989 (b/a)^2. \quad (7)$$

G = Partialvolumen der gelösten Substanz in 100 ccm Lösung; b/a = Achsenverhältnis.

Das in diese Gleichung eingesetzte Achsenverhältnis wurde hierbei aus den mit der Ultrazentrifuge ermittelten Werten von f/f_0 nach den Gleichungen von HERZOG, ILLIG und KUDAR (64) und von PERRIN (139) berechnet. Die Gültigkeit der Gleichung (7) von POLSON zeigt, daß das Reibungsverhältnis f/f_0 aus Viskositätsbestimmungen einwandfrei ermittelt werden kann, wenn der Wert nicht über 1,6 liegt. Dies ist von besonderer Bedeutung, da nun durch Kombination von Sedimentations- und Viskositätsmessungen das Molekulargewicht von Eiweißstoffen bestimmt werden kann. Es folgt hieraus jedoch nicht, daß die ermittelten Achsenverhältnisse wirklich reell sind. Es ist anzunehmen, daß diese nur einen oberen Grenzwert darstellen und das wirkliche Achsenverhältnis kleiner ist. Durch die Hydratation wird die Reibung und damit das scheinbare Achsenverhältnis der nicht hydratisierten Moleküle wesentlich heraufgesetzt.

Viskositätsbestimmungen wurden bereits durchgeführt an verschiedenen, chemisch reinen Viren. Es soll hier nur auf die Untersuchung

Tabelle 1. Berechnung von $[\eta]$ für TM-Virus nach Viskositätsmessungen von LAUFFER (99).

Konz. g/100 ccm	$\frac{\eta}{\eta_0}$	$\ln \frac{\eta}{\eta_0}$	$\frac{\ln \frac{\eta}{\eta_0}}{c}$
0,0099	1,0059	0,00588	0,594
0,0296	1,0165	0,0163	0,552
0,0458	1,0272	0,0267	0,583
0,0495	1,0278	0,0274	0,554
0,0420	1,0542	0,0527	0,573
0,0988	1,0566	0,0550	0,557
0,920	1,6009	0,470	0,511
		Mittel ...	0,566

des TM-Virus (54, 99) näher eingegangen werden. Aus den von LAUFFER (99) im Kapillarkapillarmeter gemessenen Werten berechnet sich die Eigenviskosität bei einer bestimmten Durchflußgeschwindigkeit zu 0,566 (siehe Tab. 1).

Die Viskosität des TM-Virus ist nun stark von der Durchflußgeschwindigkeit abhängig. ROBINSON (159) gelang es, die Viskosität bis zu sehr nied-

¹ POLSON weist darauf hin, daß seine Gleichung mit der von KUHN (90) für starre Ellipsoide theoretisch abgeleiteten Viskositätsformel übereinstimmt, wenn man annimmt, daß durch die Hydratation das Volumen der gelösten Teilchen um das 1,6fache zunimmt.

rigen Schubspannungen zu messen, so daß hierdurch eine Extrapolation auf den O-Wert möglich wurde. Die von ihm gefundenen Werte sind aber unsicher, da in den untersuchten Präparaten eine Aggregation zu beobachten war. Wird der aus den LAUFFERSchen Messungen resultierende Wert für $[\eta]$ in die Formel (7) von POLSON (siehe S. 128) eingesetzt, so ergibt sich ein scheinbares Achsenverhältnis des TM-Virus von 27. Dieser Wert liegt höher als nach der elektronenoptischen Vermessung zu erwarten ist. Für diese Diskrepanz ist wohl in erster Linie die Hydratation des Virus verantwortlich zu machen. Dem Achsenverhältnis 27 entspricht ein Reibungsfaktor f/f_0 von 2,2, woraus sich mit Hilfe der Sedimentationskonstanten ein Molekulargewicht von $40 \cdot 10^6$ für das TM-Virus errechnet. Dieser Wert stimmt befriedigend mit dem aus der Sedimentationskonstanten und der Diffusionskonstanten bestimmten Wert von $46 \cdot 10^6$ überein. Die Übereinstimmung würde wahrscheinlich noch besser sein, wenn $[\eta]$ auf unendlich kleine Schubspannung extrapoliert wird.

Bei der Strukturermittlung hochmolekularer Substanzen haben *Untersuchungen mit Röntgenstrahlen* hervorragende Dienste geleistet. Sie geben Auskunft über bestimmte regelmäßig sich wiederholende Abstände innerhalb eines Kristalls oder eines anderen geordneten Zustandes der Moleküle. Unter bestimmten Voraussetzungen ist es möglich, die zwischenmolekularen Abstände von den innermolekularen Netzebenenabständen zu unterscheiden und damit den *Moleküldurchmesser* zu ermitteln. So zeigte die PATTERSON-Analyse der Röntgendiagramme von Insulinkristallen, daß die relative Lage bestimmter Massenpunkte im hydratisierten und wasserfreien Kristall unverändert bleibt, während andere Netzebenenabstände sich bei der Wasseraufnahme verändern (140). Hieraus kann geschlossen werden, daß die ersteren innermolekularen, die letzteren hingegen zwischenmolekularen Abständen entsprechen. Auf diese Weise konnte die Elementarzelle des Insulinkristalls mit dem Insulinmolekül identifiziert werden. Auch bei dem TM-Virus findet sich ein Netzebenenabstand, der stark von dem Wassergehalt des untersuchten Präparats abhängig ist; er steigt von 152 Å im trockenen Zustand bis auf 450 Å in einer 13%igen Lösung des TM-Virus an. Der Wert von 152 Å darf daher als Durchmesser des nicht-hydratisierten Virusmoleküls angenommen werden.

Neben der Streuung der Röntgenstrahlen, die durch die Molekül-anordnung bedingt wird, gibt es noch eine bei kleinsten Winkeln auftretende Streuung, die durch die äußere Begrenzung der Teilchen verursacht wird. Von KRATKY und SEKORA (89) wurde gezeigt, daß diese *Kleinwinkelstreuung* zur Bestimmung der Form und Größe gelöster Teilchen von kolloidalen Dimensionen benutzt werden kann. Bisher wurden die Messungen nur bei einem Eiweißstoff, dem Chymotrypsin, durch-

geführt. Der gefundene Durchmesser dieses Kugelmoleküls stimmt mit den Erwartungen gut überein. Zweifellos liegt hier eine wichtige Methode vor, die auch zur Größenbestimmung der Viren benutzt werden kann.

Die bisher besprochenen Verfahren sind in ihren Grundlagen bereits sehr weitgehend durchgearbeitet und gestatten verhältnismäßig sichere Schlußfolgerungen. Daneben gibt es eine Reihe von speziellen Verfahren zur Größenbestimmung der Virusproteine, deren Ergebnisse jedoch bis jetzt einer quantitativen Auswertung Schwierigkeiten bereiten.

Die *Strömungsdoppelbrechung* des TM-Virus wurde von MEHL (123) näher untersucht. Er schätzt den Rotationsdiffusionskoeffizienten des Virus zu 25 bei einer Temperatur von 2°. Hieraus berechnet er eine Länge von 610 m μ für das Virus. Von ROBINSON (159) wurde eine Methode angegeben, um gleichzeitig die Strömungsdoppelbrechung, die mittlere Orientierung und die Viskosität einer Lösung von asymmetrischen Teilchen zu messen. Bei Berücksichtigung aller dieser Faktoren schätzt er das Achsenverhältnis des TM-Virus auf 80 : 1. SNELLMANN und BJÖRNSTAHL (188) wiesen in eingehenden Untersuchungen auf die zahlreichen Fehlerquellen hin, die bei der Messung der Strömungsdoppelbrechung bestehen und durch deren Nichtbeachtung viele Messungen illusorisch sind. Auch die theoretischen Grundlagen der Berechnung der Molekülgröße aus der Strömungsdoppelbrechung sind noch nicht völlig geklärt, so daß keine Übereinstimmung zwischen den von den verschiedenen Autoren entwickelten Ansätzen besteht. [Zur Theorie der Strömungsdoppelbrechung siehe PETERLIN und STUART (141) und SNELLMANN und BJÖRNSTAHL (188).] Die auf diesem Wege gewonnenen Molekülkonstanten des TM-Virus sind daher nur als Näherungswerte aufzufassen.

Entsprechend seiner langgestreckten Gestalt zeigt das TM-Virus einen deutlichen *KERR-Effekt*. Durch eine Orientierung der Virusteilchen parallel zum elektrischen Wechselfeld wird eine positive Doppelbrechung hervorgerufen (100). Es ist jedoch schwer, hieraus quantitative Aussagen über die Gestalt des Virus zu gewinnen. Auch die Berechnung des Dipolmoments aus dem dielektrischen Verhalten des Virus ist nicht möglich. Durch die starke Wechselwirkung mit dem Wasser werden die Verhältnisse so unübersichtlich, daß es selbst bei viel einfacheren Eiweißstoffen nicht möglich ist, hinsichtlich des Dipolmoments zu sicheren Schlußfolgerungen zu gelangen (7).

Alle Eiweißstoffe zeigen einen mehr oder weniger ausgesprochenen *TYNDALL-Effekt*, indem beim Durchtritt des Lichts durch die Eiweißlösung stets ein gewisser Betrag seitlich gestreut wird. Nach PUTZEYS und BROSTEAUX (154) ist das gestreute Licht proportional dem Molvolumen der gelösten Substanzen. Durch Bestimmung der Intensität des gestreuten Lichts könnte also auf einfache Weise die Größe der Viren bestimmt werden.

Viele Eiweißstoffe spreiten sich an Grenzflächen zu *monomolekularen Schichten*. Durch Ausmessen der Dicke solcher Eiweißschichten läßt sich ebenfalls der Durchmesser der Moleküle bestimmen. BERGOLD und BRILL (17) untersuchten das Verhalten von Insektenvirus auf der Wasseroberfläche und fanden, daß dieses Protein sich ausgezeichnet spreiten läßt. Es ergab sich eine Abhängigkeit der Größe der gespreiteten Fläche vom p_H der Wasserunterlage, wobei ein Maximum der eingenommenen Fläche in der Nähe des isoelektrischen Punktes auftrat. Wegen dieser p_H -Abhängigkeit der Proteinschichtdicke ließ sich kein eindeutiger Wert für den Moleküldurchmesser angeben. Die gemessenen Dicken schwankten zwischen 6 und 125 Å. Das TM-Virus läßt sich an der Grenzfläche Wasser-Luft nur schlecht spreiten (179), jedoch gelang es LANGMUIR und SCHÄFER (98), das Virus auf einer Unterlage von Eialbumin zu spreiten. Aus der interferometrisch gemessenen Schichtdicke ergab sich der Durchmesser des Virus zu 12,5 $m\mu$. Der Wert steht in recht befriedigender Übereinstimmung mit dem röntgenographisch gemessenen Wert von 15,2 $m\mu$. Von TRURNIT und BERGOLD (211) wurde ein sehr elegantes Verfahren zur interferometrischen Dickenmessung adsorbierter Eiweißschichten ausgearbeitet. Neben anderen Eiweißstoffen wurden auch Virusproteine der Insekten untersucht. Auf einer mit Thoriumionen behandelten Barium-Stearat-Unterlage ergab sich für diese eine Schichtdicke von 18,3 Å. Die gefundenen Werte sind von der Voraussetzung abhängig, daß eine vollständige Bedeckung der untersuchten Oberfläche mit dem Protein stattgefunden hat. Wie weit dies zutrifft, bedarf noch einer näheren Prüfung.

Dieser Überblick zeigt, daß eine große Reihe voneinander unabhängiger Verfahren zur Bestimmung der Größe und Gestalt der Viren herangezogen werden können. Keines der Verfahren hat bisher zu einer umfassenden und sicheren Aussage geführt. Es ist jedoch anzunehmen, daß im Laufe der weiteren Entwicklung dieses Ziel auf dem einen oder anderen Wege erreicht wird. Dies wäre nicht nur für die Virusforschung von großem Gewinn; ein in seinen Dimensionen genau bekanntes Virusmolekül wäre umgekehrt auch ein sehr geeignetes Modell, um die verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden und ihre theoretische Auswertung experimentell auf ihre Brauchbarkeit zu prüfen.

e) Die elektrochemische Charakterisierung der Viren.

Für das Verhalten der Proteine im gelösten Zustand ist ihre elektrische Ladung von ausschlaggebender Bedeutung. Diese wird in erster Linie durch die Anzahl und den Dissoziationsgrad der in dem Protein enthaltenen positiven und negativen Gruppen bestimmt. Daneben ist die Aufladung durch adsorbierte Ionen bei den Eiweißstoffen nur von untergeordneter Bedeutung.

Da das elektrochemische Verhalten auch nahe verwandter Virusarten

sehr verschieden sein kann, ist durch elektrochemische Untersuchungen oft eine Differenzierung möglich, wo andere Methoden versagen. Die elektrische Ladung eines Proteins kann auf verschiedene Weise bestimmt werden. Die wichtigsten Methoden sind: 1. Die Bestimmung des Bindungsvermögens für Säuren und Basen, 2. die Messung des Membranpotentials und 3. die Elektrophorese.

Bei dem ersten Verfahren wird das Protein in eine Lösung bekannter Wasserstoffionenkonzentration gebracht und die Anzahl der durch das Protein „weggefangenen“ Wasserstoffionen aus der p_H -Änderung der Lösung berechnet. [Siehe hierzu J. LICHTENSTEIN (110).]

Die Messung des *Membranpotentials* beruht auf folgender Erscheinung: Befindet sich eine Proteinlösung in einer für den Eiweißstoff nicht durchlässigen Zelle, die von außen von einer Elektrolytlösung, z. B. Salzsäure, umgeben ist, so stellt sich zwischen den Ionenkonzentrationen ein Gleichgewicht (DONNAN-Gleichgewicht) ein, das von der Ladung des anwesenden Proteins abhängig ist. Der Unterschied in der Ionenkonzentration der Innen- und Außenflüssigkeit kann potentiometrisch gemessen und hieraus die Ladung des Proteins berechnet werden. Diese Methode erlaubt also, die Ladung der Proteine bei verschiedenen p_H -Werten auch in Gegenwart von verschiedenen Salzen zu bestimmen, was bei dem ersten Verfahren nicht möglich ist, da hierbei die Ladungsveränderung, die durch Vereinigung des Proteins mit anderen Ionen als den H^+ - und OH^- -Ionen mit erfaßt wird. [Siehe hierzu ADAIR und ADAIR (1).]

Ein Nachteil dieser beiden Methoden ist die Unmöglichkeit, hierbei die Einheitlichkeit der untersuchten Proteine zu prüfen. Ihre Anwendung ist daher nur sinnvoll bei reinen Eiweißstoffen. Bei der *Elektrophorese* dagegen ist eine gleichzeitige Charakterisierung verschiedener Komponenten eines Stoffgemisches und die Beurteilung ihrer Einheitlichkeit möglich, da die Wanderung im elektrischen Feld im allgemeinen unabhängig ist von der Art der vorhandenen Proteinkomponenten. Allerdings können aus den gemessenen Wanderungsgeschwindigkeiten keine unmittelbaren Schlüsse auf die Ladung oder die Größe der Moleküle gezogen werden. Jedoch sind in letzter Zeit erfolgversprechende Versuche gemacht worden, die theoretischen Grundlagen der Elektrophorese von Eiweißstoffen näher aufzuklären. Die ideale Beweglichkeit u_i ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$u_i = \frac{F \cdot Z \cdot 3 \cdot 10^{-9}}{f \cdot 3 \cdot 10^{-2}} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-2} \text{ sec}^{-1} \quad (8)$$

F = FARADAY-Konstante, Z = Valenz des Protein-Ions, f = molekularer Reibungskoeffizient.

Zur Prüfung dieser Gleichung wurde von TISELIUS (209) die Valenz des Eialbumins durch Messung des Membranpotentials bestimmt. Der molare Reibungskoeffizient f wurde aus der Diffusionskon-

stanten berechnet. Es zeigte sich, daß die experimentell bestimmte Beweglichkeit bei höherer Ionenkonzentration der Lösung kleiner war als nach dieser Gleichung zu erwarten war. Der hemmende Einfluß der entgegengesetzt geladenen Ionenatmosphäre, die das Protein umgibt, ließ sich aus der DEBYE-HÜCKELschen Theorie berechnen, wobei die aus der Sedimentation und der Kristalldichte ermittelten Werte für den Durchmesser des Ions und seiner Hydrat-

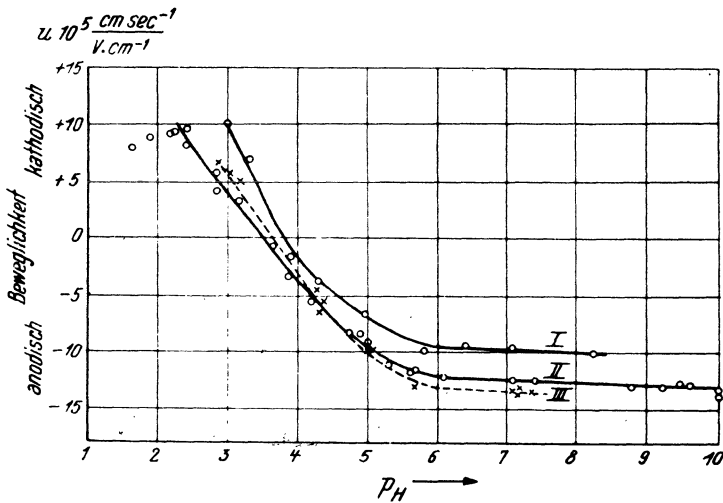


Abb. 15. p_H -Abhängigkeit der Beweglichkeit des Tabakmosaikvirus (*vulgare*) und der Mutanten *flavum* und *tenue*.

I = *flavum*, II = *vulgare*, III = *tenue*.

hülle zugrunde gelegt wurden. Die auf diese Weise ermittelten Beweglichkeiten stehen in ausgezeichneter Übereinstimmung mit den experimentell gefundenen Werten.

Nach diesen beim Eialbumin gefundenen Erkenntnissen müßte es möglich sein, aus der Beweglichkeit der Virusproteine ihre Ladung oder bei Kenntnis der Ladung auch den Reibungsfaktor in der betreffenden Lösung zu berechnen. Es wird jedoch schwierig sein, aus elektrophoretischen Messungen Aufschluß über die Größe der Proteine zu erhalten. Versuche an verschiedenen Eiweißstoffen zeigen, daß ihre Wanderungsgeschwindigkeit sich kaum ändert, wenn diese Eiweißstoffe an Kolloidium oder andere grobe Partikel adsorbiert werden. Dies beruht darauf, daß sich bei der Vereinigung mehrerer kleiner Teilchen zu einem großen das Verhältnis von Ladung zu Reibung, und damit nach der obenstehenden Gleichung (8) auch die Wanderungsgeschwindigkeit meistens annähernd gleichbleibt. Entsprechende Beobachtungen liegen auch bei

den Elementarkörpern der Vaccine vor (186). Auch bei diesen wird die Wanderungsgeschwindigkeit durch Adsorption an Kollodium oder Glaspartikeln nur wenig geändert.

Die p_H -Abhängigkeit der Beweglichkeit hat einen für das einzelne Virus charakteristischen Verlauf. Dieser wird durch die Art und Menge der sauren und basischen Aminosäuren bestimmt, die in dem betreffenden Virusprotein enthalten sind. Wenn das vorliegende experimentelle Tat-

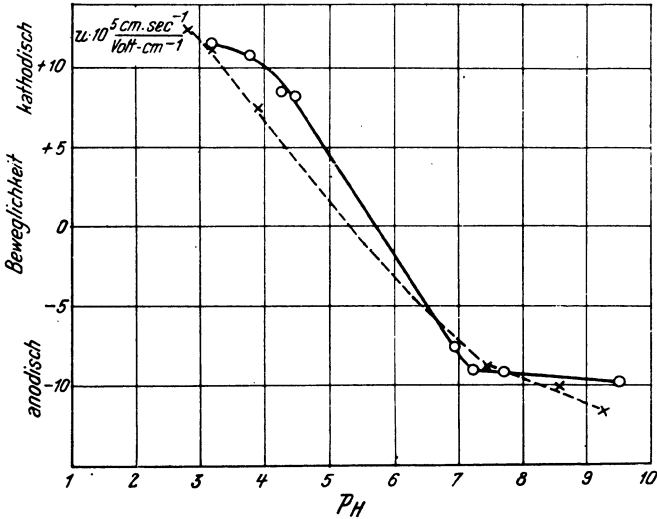


Abb. 16. p_H -Abhängigkeit der Beweglichkeit des Schwammspinner-Polyedervirus und des Seidenraupen-Polyedervirus.

-o-o-o- = Schwammspinner-Protein, = Seidenraupen-Protein.

sachenmaterial größer geworden ist, wird es möglich sein, aus diesen Beweglichkeitskurven auch Rückschlüsse auf die analytische Zusammensetzung der Proteine zu ziehen. Die bisherigen Ergebnisse der elektrophoretischen Charakterisierung der Virusarten sollen im folgenden an einigen Beispielen erläutert werden.

Besonders eingehende Versuche liegen über das *elektrophoretische Verhalten verschiedener Mutanten des TM-Virus* vor [SCHRAMM und REBENBURG (177)]. Obwohl diese Stämme in ihrem chemischen, physikalischen und serologischen Verhalten einander sehr ähnlich sind, konnten sie elektrophoretisch eindeutig unterschieden werden (Abb. 15). So ist bei der Mutante *flavum* die Beweglichkeitskurve annähernd parallel zu der Beweglichkeitskurve des TM-Virus (*vulgare*) in das alkalische Gebiet verschoben. Der isoelektrische Punkt ist dementsprechend höher und liegt bei p_H 3.7 gegenüber dem isoelektrischen Punkt von 3,5 des Ausgangs-

stammes. Hieraus kann geschlossen werden, daß der *flavum*-Stamm mehr basische bzw. weniger saure Gruppen enthält als das TM-Virus. Die geringere anodische Wanderungsgeschwindigkeit der Mutante beruht nicht auf einem Mindergehalt an Nucleinsäure. Es muß daher gefolgert werden, daß bei der Mutation des *vulgare*-Virus zum *flavum*-Stamm auch Veränderungen im Proteinanteil des Virus vor sich gegangen sind. Der Stamm *Dahlemense* unterscheidet sich vom TM-Virus in ganz anderer

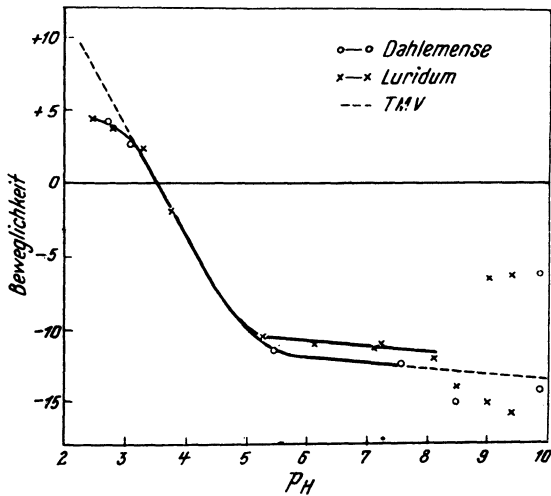


Abb. 17. pH-Abhängigkeit der Beweglichkeit der Variante *Dahlemense* und seiner Mutante *luridum* im Vergleich zum Tabakmosaikvirus. (Oberhalb pH 9 erfolgt ein Zerfall in eine langsam wandernde und eine schnell wandernde Komponente.)

Weise (Abb. 17). Die Beweglichkeitskurve stimmt hier im alkalischen, neutralen und sauren Gebiet bis pH 3 vollkommen mit der des TM-Virus überein, unterscheidet sich jedoch unterhalb von pH 3 deutlich von ihr. Es ist interessant, daß dieses Unterscheidungsmerkmal unverändert erhalten bleibt, wenn der Dahlemense-Stamm eine der Vulgare-Flavum-Mutation parallele Umwandlung zu einem Gelbstamm (*luridum*) durchmacht, die sich deutlich im alkalischen Teil der Beweglichkeitskurve bemerkbar macht. Man kann hieraus schließen, daß die in der Beweglichkeitskurve sich abzeichnenden biologischen Wirkgruppen unabhängig voneinander mutieren können. In manchen Fällen genügt zur Unterscheidung verschiedener Varianten des TM-Virus bereits die Messung der Wanderungsgeschwindigkeit bei einem einzigen pH-Wert. So stellten PFANKUCH, KAUSCHE und STUBBE (149) erhebliche Unterschiede fest bei den von ihnen isolierten Virusstämmen durch Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeit bei pH 7. Auch bei der Differenzierung verwandter Virusarten

der Polyederkrankheiten der Seidenraupe, des Schwammspinners und der Nonne hat sich die elektrophoretische Methode sehr bewährt (Abb. 16).

Die Elektrophorese ist auch ein wertvolles Hilfsmittel, zum Studium solcher chemischer Umsetzungen an den Viren, die zu einer Veränderung der Valenz führen. Wird z. B. im TM-Virus die freie NH_2 -Gruppe des Lysins acetyliert, so erhält man ein elektrochemisch einheitliches Acetyl-derivat des Virus, das entsprechend seiner verminderten positiven Ladung eine größere Wanderungsgeschwindigkeit in Richtung zur Anode besitzt als das Ausgangsmaterial (175) (Abb. 18).

PFANKUCH (142) fand, daß bei der alkalischen Zersetzung in Natronlauge oder Pyridin aus zwei biologisch und elektrophoretisch *verschiedenen* Virusstämmen des TM-Virus Bruchstücke entstehen, die sich bei der Mischelektrophorese *gleichartig*



Abb. 18. Mischung des acetylierten und des nicht-acetylierten Tabakmosaikvirus im elektrischen Feld bei pH 7. Obere Bande Acetylprodukt, untere Bande normales Tabakmosaikvirus.

verhielten. Aus diesem Befund wurde gefolgert, daß die beiden untersuchten Stämme sich im wesentlichen in der Art und der Zusammensetzung der abgespaltenen Nucleinsäure unterscheiden, nicht aber im Proteinanteil. Dieser Schluß ist aber nicht ganz sicher, da es sich bei diesen Spaltprodukten um denaturierte Eiweißstoffe handelt, die stark zur gegenseitigen Aggregation neigen (101).

Bei elektrophoretischen Untersuchungen des TM-Virus wurde oberhalb pH 9 ein Zerfall in elektrochemisch verschiedene Spaltprodukte beobachtet (Abb. 17) [G. SCHRAMM (173)].

Mit der luftgetriebenen Ultrazentrifuge gelang es, ein niedermolekulares Nucleoproteid und ein niedermolekulares, nucleinsäurefreies Protein von dem unveränderten Ausgangsmaterial abzutrennen. Diese beiden Spaltproteine besitzen das gleiche Molekulargewicht, zeigen aber einen großen Unterschied in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit bei pH 9. Der Gehalt an Nucleinsäure bewirkt eine Erhöhung der Geschwindigkeit in Richtung zur Anode um 60%. Durch präparative Anwendung des Elektrophoreseapparats von TISELIUS gelang eine einwandfreie Abtrennung des nucleinsäurehaltigen Spaltproteins von dem nucleinsäurefreien. Diese Versuche zeigen besonders deutlich, welche großen Vorteile die Elektrophorese bei der Untersuchung chemischer Reaktionen an den Viren gegenüber anderen analytischen Verfahren besitzt.

5. Die serologische Charakterisierung der Viren.

Die bisher beschriebenen Untersuchungsmethoden sind in ihrer Anwendung nicht auf die Eiweißstoffe beschränkt, sondern können sinngemäß auch auf andere Stoffe angewendet werden. In der Eiweißchemie besitzen wir aber noch eine besondere Forschungsmethode, die auf der

Eigenschaft der Proteine beruht, im Warmblüterorganismus spezifische Antikörper zu erzeugen. Diese Antikörper reagieren am vollständigsten mit dem homologen Antigen, durch das sie gebildet wurden, weniger vollständig mit einem verwandten, heterologen Antigen und gar nicht mit einem fremden. Hierdurch ist in der Proteinchemie eine zusätzliche Möglichkeit gegeben, die vollständige oder teilweise strukturelle Übereinstimmung zwischen zwei Stoffen festzustellen.

a) *Das Antigen (117).*

Die Eigenschaft, als Antigen zu wirken, kommt von allen bisher untersuchten Stoffen wahrscheinlich nur den Proteinen und vielleicht einigen hochpolymeren Kohlenhydraten zu. Abbauprodukte der Eiweißstoffe, wie z. B. die Gelatine, besitzen nicht mehr die Fähigkeit, Antikörper zu bilden. Es gibt eine Reihe von Stoffen, die an sich keine Antigene sind, jedoch durch Bindung an Eiweiß die Fähigkeit erlangen, Antikörper zu erzeugen, die spezifisch gegen diese in das Protein eingetretenen Wirkgruppen gerichtet sind. Diese Stoffe werden als *Haptene* bezeichnet. Durch den künstlichen Einbau solcher Haptene in Eiweißstoffe ist es gelungen, in die Gesetzmäßigkeiten, die die *Spezifität der Antigene* bestimmen, näheren Einblick zu gewinnen. Es zeigte sich, daß für die Spezifität sowohl die räumliche Ausdehnung und Stellung des eingetretenen Haptens als auch seine polaren Eigenschaften maßgebend sind. Stoffe, die in kristallisiertem Zustand Isomorphie zeigen und sich im Kristallgitter gegenseitig ersetzen können, erzeugen auch gleiche Antikörper. So zeigten ERLÉNMEYER und BERGER (51), daß der Phosphorsäure- und Arsensäurerest als Wirkgruppen immunologisch äquivalent sind und verschieden von der entsprechenden Stibinsäure. Hiermit steht die Isomorphie der Salze von H_3PO_4 und H_3AsO_4 und die Verschiedenheit von den Salzen der H_3SbO_4 in guter Übereinstimmung. Ebenso wurde gefunden, daß die CH_3 -, Cl-, Br- und I-Gruppe, die eine annähernd gleiche Raumerfüllung besitzen, serologisch sehr ähnlich sind. Die Bedeutung der *Ladung* der eingetretenen Wirkgruppe geht besonders deutlich daraus hervor, daß die freie COO^- -Gruppe trotz ihrer ähnlichen Raumerfüllung wie die CH_3 -Gruppe serologisch vollkommen von dieser verschieden ist, während die veresterte Carboxylgruppe $COOR$ sich serologisch ähnlich wie die CH_3 -Gruppe verhält (96). Eine vollständige serologische Übereinstimmung zwischen zwei Antigenen ergibt sich also nur, wenn alle determinanten Gruppen in ihrer räumlichen Ausdehnung, ihrer Ladung und ihrer sterischen Anordnung übereinstimmen. So können Eiweißstoffe, die in der Art und Reihenfolge der Aminosäuren einander gleich sind, serologisch noch unterschieden werden, wenn sie in der Faltung der Polypeptidkette verschieden sind. Diese für die Proteine charakteristische Art der räumlichen Isomerie läßt sich kaum mit anderen Methoden nachweisen.

b) Der Antikörper.

Es besteht heute kein Zweifel mehr darüber, daß die *Antikörper* wohldefinierte Eiweißkörper sind. Es ist in mehreren Fällen gelungen, Antikörper als einheitliche Proteine auf chemischem Wege darzustellen. So konnte NORTHROP (133) den Antikörper gegen das Diphtherietoxin aus Pferdeserum in kristallisierter Form gewinnen. Nach ihrer analytischen Zusammensetzung und ihrem physikalisch-chemischen Verhalten sind die Antikörper als modifizierte Serumglobuline anzusehen. Nach PAULING (136) unterscheiden sich die Antikörper von den normalen Globulinen nur durch die Art der Faltung der Polypeptidkette, nicht aber in der Zusammensetzung und Reihenfolge der Aminosäuren. PAULING und CAMPBELL (137) konnten in einem grundlegenden Experiment die Richtigkeit dieser Anschauung beweisen. Es gelang ihnen, Antikörper außerhalb des tierischen Organismus darzustellen, indem sie normales Serumglobulin von Rindern und andere Eiweißstoffe in Gegenwart von Antigenen zu spezifischen Antikörpern umprägten. Wird Serumglobulin längere Zeit auf 57° gehalten oder durch chemische Zusätze an die Grenze seiner Stabilität gebracht, so beginnt sich die charakteristische Faltung in diesem Eiweißstoff aufzulösen und unter dem Einfluß des Antigens eine diesem komplementäre Faltung anzunehmen. Diese künstlich gewonnenen Antikörper geben nach ihrer Reinigung spezifische Fällungen mit dem homologen Antigen.

Das Molekulargewicht der Antikörper ist unabhängig von der Art des verwendeten Antigens und richtet sich nur nach dem Organismus, in dem sie entstehen. Bei Pferden, Schweinen und Rindern haben die Antikörper ein Molekulargewicht von 930000 und sind elektrophoretisch verschieden von den normalen Serumkomponenten. Bei anderen Tieren (Kaninchen, Affen) und beim Menschen haben die Antikörper ein Molekulargewicht von 160000 und unterscheiden sich nicht von den γ -Globulinen dieser Seren (77, 78). Im Serum dieser Tiere gibt sich ihr Vorhandensein dadurch zu erkennen, daß die γ -Globulinfraktion um den Betrag des Antikörpers vermehrt ist.

c) Die Antigen-Antikörperreaktion.

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis eines Antikörpers können verschiedene Verfahren verwendet werden. Von diesen ist die *Präzipitinreaktion* die einfachste und am besten untersucht. Nach Zugabe des Antigens zu dem Antiserum bildet sich bei geeigneten Konzentrationsverhältnissen ein schwer löslicher Niederschlag, der aus einer Verbindung des Antigens mit dem Antikörper besteht. Die Menge und Zusammensetzung des Präcipitats ist abhängig von der Ausgangskonzentration der Komponenten. Man unterscheidet zwischen dem Antikörperüberschußgebiet, dem Äquivalenzgebiet, in dem etwa gleiche Mengen

Antikörper und Antigen vorliegen, und dem Antigenüberschußgebiet, in dem das Präcipitat wieder löslich wird. Einige Präcipitate, z. B. vom Diphtherietoxin, sind ausnahmsweise auch bei Antikörperüberschuß löslich. Die Abhängigkeit der Präcipitatabildung von der Menge der reagierenden Komponenten wird durch eine Gleichung von HEIDELBERGER und KENDALL (63) quantitativ wiedergegeben:

$$\text{Antikörper-N}_{\text{präcipit.}} = 2 R \cdot AN = \frac{R^2}{KN_{gs}} (AN)^2 \quad (9)$$

KN_{gs} = gesamte, in dem Serumvolumen vorhandene Menge Antikörperstickstoff,
 R = Verhältnis Antikörper-N : Antigen-N in der Äquivalenzzone, AN = zugegebene Menge Antigenstickstoff.

Mit dieser Gleichung ist es möglich, den Antikörpergehalt des Serums aus zwei Analysen des Präcipitats zu berechnen.

Ist das Antigenmolekül in einem größeren Komplex, z. B. einer Bakterienoberfläche, eingebaut, so findet ebenfalls eine Flockungsreaktion statt, die in diesem Falle als *Agglutination* bezeichnet wird. Wegen der größeren Masse des Antigens ist sie leichter zu beobachten als die Präcipitinreaktion.

Falls bei stark getrübbten Lösungen oder aus anderen Gründen Flockungsreaktionen nicht anwendbar sind, kann statt dessen die *Komplementbindungsreaktion* herangezogen werden. Das Komplement besteht aus einer Gruppe zum Teil hitzelabiler Stoffe, die zwischen 50 und 60° zerstört werden und sich im frischen Normalserum fast aller Tiefe finden. Bei der Bindung des Antigens an den Antikörper wird das Komplement verbraucht. Diese Reaktion kann also durch die Abnahme des Komplementgehaltes in dem Antiserum verfolgt werden. Zur Bestimmung des Komplementgehaltes verfährt man folgendermaßen: Wird ein Tier mit Blutkörperchen einer anderen Tierart immunisiert, so bildet es gegen diese Antikörper, die imstande sind, die fremden Blutkörperchen zu agglutinieren oder aufzulösen. Da eine Auflösung nur in Gegenwart von Komplement stattfindet, läßt sich der Hämolysegrad als Maß für den Komplementgehalt einer Lösung verwenden.

Manche gegen ein bestimmtes Antigen immunisierte Tiere (besonders geeignet ist das Meerschweinchen) zeigen nach Injektion dieses Antigens eine allgemeine Schockreaktion. Diese Erscheinung wird als *Anaphylaxie* bezeichnet. Der anaphylaktische Schock ist auf die Wirkung bestimmter Stoffe, hauptsächlich des Histamins, zurückzuführen, die sich als Folgeerscheinung der Antigen-Antikörperreaktion im Organismus bilden.¹ Der anaphylaktische Schock läßt sich auch an einem einzelnen, isolierten Organ nachweisen. Er ist eine sehr empfindliche Reaktion zum Nachweis geringer Antigenmengen.

¹ Eine zusammenfassende Darstellung der anaphylaktischen Erscheinungen findet sich bei DRAGSTEDT (45).

Die Verbindung eines biologisch wirksamen Antigens mit dem Antikörper kann den Verlust der Wirksamkeit zur Folge haben. So kann ein im Organismus vorhandener Virusantikörper dadurch nachgewiesen werden, daß man Mischungen des Virus mit steigenden Mengen des Antiserums im Tierversuch auswertet und die Grenze bestimmt, bei der gerade die Wirkung des Virus neutralisiert wird. Die *Neutralisation* folgt den gleichen Gesetzmäßigkeiten wie die Flockungsreaktionen. Sie ist wie diese bis zu einem gewissen Grade umkehrbar, indem man durch geeignete Trennungsvorgänge aus den neutralisierten Mischungen wieder aktives Virus gewinnen kann. Für die Neutralisation der Viruswirksamkeit durch den Antikörper ist die Anwesenheit von Komplement nicht notwendig.

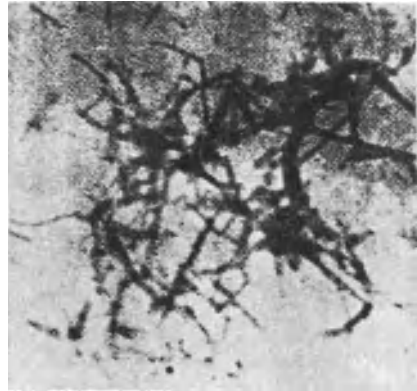


Abb. 19.

a) Tabakmosaikvirus mit Osmiumsäure fixiert. b) Präcipitat des Tabakmosaikvirus mit einem Überschuß von Schweineantikörpern. (Nach SCHRAMM u. FREKSA.)

Von diesen verschiedenen Nachweisverfahren ist für quantitative, immunchemische Untersuchungen die Präcipitinreaktion besonders geeignet. Am Beispiel des TM-Virus konnte gezeigt werden [SCHRAMM und FREKSA (1974)], daß die Präcipitinreaktion dieses Virus mit Schweineantikörper (Molekulargewicht 930000) und Kaninchenantikörper (Molekulargewicht 160000) der oben angegebenen Gleichung von HEIDELBERGER und KENDALL folgt. Aus den bekannten Dimensionen des TM-Virus und des jeweiligen Antikörpers läßt sich berechnen, daß bei großem Antikörperüberschuß das Virus in jedem Fall nahezu vollständig mit Antikörpern bedeckt ist. Hieraus folgt, daß die Höchstzahl der gebundenen Antikörper nicht durch die Anzahl der reaktionsfähigen Anlagerungsstellen des Virus, sondern durch die räumliche Abmessung des Virus bedingt ist. Die elektronenmikroskopische Untersuchung dieser Präcipitate des TM-Virus ergab, daß es sich um ein lockeres Netzwerk der langgestreckten Virusmoleküle handelt, die an einzelnen Punkten durch die

Antikörper verknüpft sind (Abb. 19 b). Die durch die Anlagerung des großen Schweineantikörpers verursachte Verdickung der Virusmoleküle konnte auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgemessen werden (Abb. 19 a und b).

d) Feststellung der Verwandtschaft.

Die Präcipitinreaktion ist auch besonders geeignet, um die *Verwandtschaft der Virusarten* mit anderen Proteinen und untereinander festzustellen. Um den Grad der strukturellen und chemischen Übereinstimmung festzustellen, genügt es nicht, zu zeigen, daß eine Virusart auch mit dem durch eine andere erzeugten heterologen Antikörper reagiert, sondern es sind quantitative Angaben über die Menge des mit dem heterologen Antikörper erzeugten Präcipitats erforderlich. Eine weitere Vergleichsmöglichkeit ergibt sich daraus, daß man ein Virus zunächst mit dem heterologen Antiserum reagieren läßt, bis dieses an Antikörpern erschöpft ist, und dann das homologe Virus hinzufügt. Bei Verschiedenheit der beiden Virusarten wird nochmals ein Präcipitat auftreten, das durch Antikörper gebildet ist, die nur mit dem homologen Antikörper reagieren können.

Auf dem Gebiet der phytopathogenen Viren sind namentlich durch CHESTER (33) die ersten Anfänge einer systematischen Verwandtschaftslehre auf serologischer Grundlage geschaffen worden. Es zeigt sich, daß Viren, die biologisch bisher nicht miteinander verglichen werden konnten, da keine Pflanze existiert, in der sich beide Arten vermehren können, nahe miteinander verwandt sein können, wie z. B. das TM-Virus und die Gurkenmosaikviren 3 und 4. Andere Viren, die sich zufällig auf derselben Pflanze vermehren, erwiesen sich als serologisch völlig verschieden, wie z. B. TM-Virus, Tabaknekrosevirus und Tabakringfleckenvirus.

Die serologische Methode allein wird jedoch nicht genügen, um die sichere Einordnung und Charakterisierung eines Virus durchzuführen. So gibt es biologisch verschiedene Stämme des TM-Virus, die serologisch untereinander kaum zu unterscheiden sind. Von anderen Viren ist es wiederum nicht möglich, Antiserum zu erhalten. Dies mag daran liegen, daß die zur Immunisierung verwendeten Extrakte nicht genug Virus enthielten; es kann aber auch sein, daß diese empfindlichen Viren bei der Körpertemperatur des zur Immunisierung verwendeten Tieres zerstört werden. Es wird daher notwendig sein, die serologischen Befunde durch physikalisch-chemische Untersuchungen zu ergänzen und zu unterbauen.

e) Reinheitsprüfung und Nachweis der Viren.

Auf serologischem Wege ließ sich bisher keine Verwandtschaft der Virusproteine mit den normalen Proteinen des Wirtes feststellen. Hierdurch ist die Möglichkeit gegeben, geringe Mengen normalen Proteins in

Viruspräparaten nachzuweisen und diese serologisch auf ihre Reinheit zu prüfen.

Von größerer praktischer Bedeutung ist aber das entgegengesetzte Problem, nämlich der Nachweis geringer Virusmengen in Mischung mit den normalen Proteinen des Wirtsorganismus. Bei verschiedenen Viruskrankheiten, insbesondere den latent verlaufenden, ist die Diagnose sehr schwierig. Hier könnten serologische Nachweismethoden eine große Hilfe bedeuten. Um für diesen Zweck Antiseren mit genügend hohem Antikörpergehalt zu erhalten, muß zunächst das Virus angereichert werden, da nur mit größeren Virusmengen genügend viel Antikörper erzeugt werden. Es ist daher eine wichtige Aufgabe der chemischen Virusforschung, geeignete Verfahren zur Anreicherung der Viren aus dem Organismus auszuarbeiten. Es wird hierbei nicht immer gelingen, die normalen Gewebeproteine vollständig abzutrennen, so daß bei der Immunisierung auch Antikörper gegen normales Protein miterzeugt werden. Diese den Nachweis störenden Antikörper können jedoch leicht durch Zugabe von normalem Protein ausgefällt werden, so daß man ein spezifisches Reagens für das Virusprotein erhält. Derartige Antiseren würden für die menschliche und tierische Medizin von größtem Wert sein, um äußerlich gesunde Virusausscheider von virusfreien Individuen zu unterscheiden. Auch für pflanzliche Virusarten sind serologische Nachweisverfahren sehr wichtig. Bei den Viruskrankheiten der Kartoffel haben bisher alle physikalisch-chemischen Nachweismethoden versagt. Die biologischen Methoden des Virusnachweises sind für Massenuntersuchungen zu umständlich. Es sind daher von verschiedenen Seiten mit Erfolg serologische Nachweisreaktionen für Kartoffelviren ausgearbeitet worden. Von CHESTER (34) wird ein Verfahren angegeben, das wegen seiner Einfachheit unmittelbar auf dem Feld an der kranken Pflanze durchgeführt werden kann. Bei dieser Feldmethode wird der chloroplastenhaltige Preßsaft der verdächtigen Pflanzen ohne vorherige Klärung mit dem Antiserum versetzt. Wie KAUSCHE auch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen belegen konnte, adsorbieren die Chloroplasten sehr viel Virus; bei Zugabe des Antiserums erfolgt sodann eine Agglutination der virushaltigen großen Chloroplasten, die viel leichter beobachtet werden kann als die Ausflockung der submikroskopischen Virusmoleküle. Nach STAPP (202) soll jedoch diese Methode besonders in der Hand von Ungeübten leicht zu Fehldiagnosen Anlaß geben. Sie soll außerdem beim Nachweis von Y- und A-Virus in der Kartoffel gänzlich versagen. STAPP (202) gelang es, mit den angereicherten Viren der Kartoffel gegen X-, Y- und A-Virus Antiseren zu erhalten. Die Präcipitinreaktion wird von ihm nach einer Mikromethode unter dem Mikroskop in dem vorher geklärten Pflanzensaft beobachtet.

f) Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung der Viren.

Aus dem serologischen Verhalten der Viren können oftmals Rückschlüsse auf ihre Zusammensetzung gezogen werden. Hierzu ist allerdings zu bedenken, daß auch völlig reine, einheitliche Eiweißstoffe eine Schar verschiedener Antikörper erzeugen. Da jeder Eiweißstoff eine Reihe verschiedener antigener Wirkgruppen enthält, die räumlich voneinander getrennt sind, können die Antikörper je nach dem Bezirk des Moleküls, der für ihren Aufbau maßgebend war; unter sich verschieden sein. Bei chemisch reinen Antigenen werden allerdings die erzeugten Antikörper in den meisten Merkmalen übereinstimmen und die Unterschiede nur geringfügig sein. Dagegen werden von Gebilden, die aus einer Reihe völlig verschiedener Antigene zusammengesetzt sind, wie etwa den Bakterien, verschiedene Gruppen einander sehr unähnlicher Antikörper erzeugt. Es läßt sich also auf serologischem Wege unterscheiden, wie weit ein Virus als eine Einheit oder als ein Komplex verschiedener Verbindungen aufzufassen ist. Einige tierische Virusarten scheinen nach den bisherigen serologischen Ergebnissen komplexer Natur zu sein. Am besten ist in dieser Hinsicht das Pockenvirus untersucht. Durch Ultrazentrifugierung oder Ultrafiltration läßt sich von den Elementarkörpern der Vaccine eine leicht lösliche Substanz abtrennen, die spezifisch antigene Wirksamkeit, aber keine Virusaktivität besitzt (38). Diese als LS-Antigen bezeichnete Substanz ist nicht imstande, alle Antikörper, die durch virulente Elementarkörper erzeugt werden, zu fällen. Umgekehrt gewährt auch die Immunisierung mit dem LS-Antigen keinen Schutz gegen die Infektion mit Elementarkörpern. Diese enthalten also mindestens zwei in ihren antigenen Eigenschaften verschiedene Stoffe. Wie Untersuchungen von CRAIGIE und WISHART (39) und PARKER und RIVERS (134a) zeigten, setzt sich das LS-Antigen seinerseits wieder aus einem hitzestabilen, kohlehydrathaltigen Protein (S) und einem hitzelabilen Protein (L) zusammen. Da derselbe lösliche LS-Stoff nach Infektion mit Vaccinevirus in den verschiedensten Tieren (Kaninchen, Meerschweinchen, Mäusen und Rindern) gebildet wird, kann dieser LS-Proteinkomplex kein normaler Bestandteil der Tiere sein, sondern muß in ursächlichem Zusammenhang mit dem Virus stehen. Vielleicht handelt es sich um ein Abbauprodukt des Virus. Ähnliche, leicht abtrennbare Antigene wurden auch bei Myxomatosis, Papageienkrankheit, Influenza und Gelbfieber beobachtet. Bei anderen reinen Virusarten, z. B. dem Kaninchenpapillom, konnte dagegen gezeigt werden, daß sie ein einheitliches Protein darstellen; die antigenen Eigenschaften sind hier streng an das hochmolekulare Virusprotein geknüpft.

IV. Chemische Eigenschaften der Viren.

1. Zusammensetzung und chemisches Verhalten.

Alle bisher genau untersuchten Virusarten enthalten außer den Aminosäuren des Proteinanteiles noch Nucleinsäure. Diese kann ein Ribonucleotid von der Art der Hefenucleinsäure oder ein Desoxyribonucleotid wie die Thymonucleinsäure sein. Die Anwesenheit von Nucleinsäure gibt sich durch die charakteristische Absorption im ultravioletten Licht bei $260\text{ m}\mu$ sowie den Phosphor- und den entsprechenden Pentosegehalt zu erkennen. Der Nucleinsäuregehalt der Viren ist verschieden und liegt zwischen 4 und 40%. Das von NORTHROP (132) dargestellte Phagenprotein enthält mehr Phosphor als der Nucleinsäure entspricht. In einigen Viren kommen außer der Nucleinsäure noch Kohlenhydrate vor. Bei den EK der Vaccine (siehe S. 180) und bei der aktiven Proteinfraction des ROUS-Sarkoms (36) wurden daneben auch noch Lipide aufgefunden. Es ist allerdings besonders im letzteren Fall nicht leicht zu entscheiden, ob diese Verbindungen wesentliche Bestandteile des Virus sind oder aus dem umgebenden Gewebe stammen.

Bei keinem der rein dargestellten Viren konnte bisher ein Stoffwechsel oder auch nur eine enzymatische Aktivität irgendwelcher Art in vitro nachgewiesen werden. Genauer untersucht sind z. B. das TM-Virus (191), das Bushy-stunt-Virus (10) und die Insektenviren (46). Auch bei den Elementarkörpern der Vaccine ließ sich weder ein Sauerstoffverbrauch unter aeroben Bedingungen noch eine Glykolyse unter anaeroben Bedingungen noch eine stimulierende Wirkung auf den Stoffwechsel anderer Zellen nachweisen [PARKER und SMYTHE (135)]. MCFARLANE und SALAMAN (118) fanden hingegen bei gereinigten EK eine Phosphatase- und Katalaseaktivität, die sie als Eigenschaft der EK ansehen.

a) Verhalten gegen physikalische Einflüsse.

Physikalische Einflüsse wie Licht, Temperatur und hoher Druck haben auf die Viren die gleiche Wirkung wie auf andere Eiweißstoffe. Am TM-Virus wurde gezeigt, daß ultraviolettes Licht im Gebiet der Nucleinsäureabsorption photochemisch besonders wirksam ist. Es ist daher anzunehmen, daß die Lichtinaktivierung auch an dem Nucleinsäureanteil des Moleküls erfolgen kann. Das Verhalten der Viren gegen *höhere Temperaturen* ist recht unterschiedlich. Bei einigen Virusarten sind die Inaktivierungstemperaturen erstaunlich hoch. So wird z. B. das TM-Virus erst bei 94° inaktiviert. Das Kaninchenpapillom und einzelne Bakteriophagen vertragen Temperaturen bis zu 65° . Andere Virusarten wieder, wie z. B. das des ROUS-Sarkoms, das Pferdeencephalomyelitis- oder das Tabakringfleckenvirus (192) verlieren ihre Wirksamkeit bereits bei Zimmertemperatur nach einigen Stunden. Die Unterschiede in der Temperatur-

empfindlichkeit werden auch zur Charakterisierung der Viren, insbesondere der pflanzlichen Virusarten, herangezogen. Die Inaktivierungstemperatur ist von der Art der Begleitstoffe abhängig. Als Standardmethode zu ihrer Bestimmung wird bei den Pflanzenviren zehn Minuten langes Erhitzen im ungereinigten Preßsaft angewendet. Gegen tiefe Temperaturen sind die Virusarten im allgemeinen sehr beständig. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen wird von den meisten Virusarten unverändert ertragen; andere werden hierdurch inaktiv. Die meisten Virusarten sind gegen Trocknung sehr empfindlich und verlieren hierbei an Wirksamkeit, doch bleibt ein Rest von Aktivität bei den getrockneten Viren oft jahrelang erhalten. So konnte z. B. das TM-Virus in getrockneten Tabakblättern noch nach

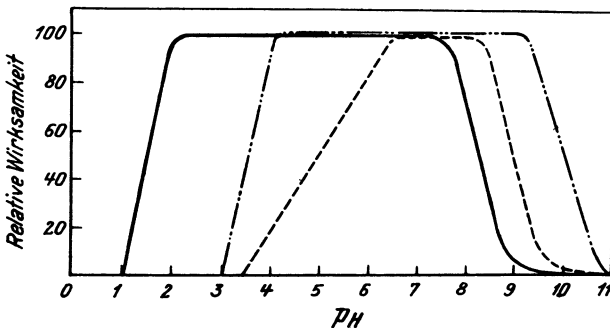


Abb. 20. pH-Beständigkeit des Tabakmosaikvirus, des Kartoffel-X-Virus (latent mosaic of potato) und des Ringfleckenvirus (ring spot Virus).

Tabakmosaikvirus, Kartoffel-X-Virus, ----- Ringfleckenvirus.

52 Jahren in wirksamer Form nachgewiesen werden. Dieses Virus zeichnet sich allerdings durch eine ganz besondere Beständigkeit aus. Auch im Pflanzensaft gelöst, kann es nach 28jähriger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur noch Aktivität besitzen (1a). Die beste Art der Trocknung ist der Wasserentzug bei tiefer Temperatur und bei vermindertem Druck in gefrorenem Zustand. Auf diese Weise können zahlreiche Viren ohne Wirksamkeitsverlust getrocknet und in diesem Zustand lange Zeit unverändert aufbewahrt werden. Im Laboratoriumsbetrieb können Viruspräparate oft am einfachsten in konzentrierten Ammonsulfatlösungen im Eisschrank aufbewahrt werden.

b) Verhalten gegen chemische Einwirkungen.

Durch *chemische Einwirkungen*, die Eiweißstoffe zerstören, werden auch die Virusarten stets inaktiviert; so z. B. durch Stoffe, die eine Denaturierung oder einen Zerfall des Eiweißmoleküls hervorrufen, Oxydationsmittel und extreme Wasserstoffionenkonzentratione

Die p_H -Stabilität der Virusarten ist sehr verschieden. Das Kaninchenpapillom ist zwischen 3,3 und 7, das Rous-Sarkom zwischen 4 und 12 beständig. Die p_H -Beständigkeit einiger pflanzlicher Virusarten ist aus Abb. 20 zu erschen. Bei einigen Virusarten wurden zwei Maxima der p_H -Stabilität gefunden, so z. B. beim Maul- und Klauenseuchevirus. Eine befriedigende Erklärung dieser Erscheinung ist bisher noch nicht gefunden. PVL (155) nimmt an, daß es sich hier um zwei verschiedene Formen des Virus handelt. Es bleibt abzuwarten, wie weit diese Erscheinung auch bei dem chemisch reinen Virus beobachtet werden kann. Vielleicht wird das Minimum der Wirksamkeit, das bei p_H 6 liegt, durch die Unlöslichkeit des Virus bei diesem p_H verursacht. Denn es ist anzunehmen, daß der isoelektrische Punkt des Virus wie bei den meisten anderen Eiweißstoffen in diesem p_H -Bereich liegt. Auch beim TM-Virus wurden von KAUSCHE (80) in höher konzentrierten Lösungen zwei Maxima der p_H -Stabilität gefunden, die ebenfalls durch die Unlöslichkeit des Virus in dem dazwischenliegenden Gebiet erklärt werden.

Für nahezu alle Virusarten ist die große Beständigkeit gegen Glycerin charakteristisch, sie sind meist jahrelang in Glycerin oder verdünnten Glycerinlösungen haltbar. Viele pflanzliche und tierische Virusarten, wie z. B. das Virus der Kinderlähmung, das Pockenvirus und das Virus der Schweinelähme, lassen sich ohne Wirksamkeitsverlust mit Äther und anderen Lipoidlösungsmitteln extrahieren. Hieraus geht hervor, daß die Virusarten im Gegensatz zu den meisten Mikroorganismen anscheinend keine lipoidhaltige Membran besitzen. In demselben Sinne sprechen auch Untersuchungen in stark hypertonischen Lösungen. Es läßt sich hierbei keine nennenswerte Quellung oder Schrumpfung der Viren feststellen (119).

Die Einwirkung chemischer Reagenzien auf die Viren wurde bisher meist in unreinen Lösungen unbekannter Viruskonzentration untersucht, so daß über Einzelheiten der sich hier abspielenden chemischen Vorgänge nichts ausgesagt werden kann. Aufschlußreicher sind Versuche mit *reinen Viren* unter definierten Bedingungen. Von besonderer praktischer Bedeutung ist die *Umsetzung mit Formaldehyd*, da Formaldehyd das am häufigsten benutzte Reagens zur Herstellung von Vaccinen für Impfzwecke ist. Auch das TM-Virus wird durch Formaldehyd inaktiviert. ROSS und STANLEY (161) fanden, daß hierbei die freien Aminogruppen des Virus verschwinden. Gleichzeitig wird aber auch die Zahl der mit FOLINS Phenolreagenz nachweisbaren Gruppen verringert. Vermutlich handelt es sich hier um eine Addition des Formaldehyds an die primären Aminogruppen und an den Indolring des Tryptophans. STANLEY (161) konnte zeigen, daß aus der inaktiven Formaldehydverbindung durch Dialyse bei p_H 3 wieder aktives Virus entsteht, wenn die Reaktion des Virus mit dem Aldehyd nicht zu weit getrieben wurde; bei langer Einwirkung entsteht ein nicht mehr reaktivierbares Produkt. Eine solche

reversible Inaktivierung durch Formaldehyd wurde von SCHULTZ und GEBHARDT (178) auch beim Staphylococcusbakteriophage beobachtet. Die Reaktivierung gelang schon durch Verdünnung der inaktiven Lösung. Die Blockierung der freien Aminogruppen allein hat beim TM-Virus keinen Einfluß auf die Wirksamkeit. Dies geht aus Versuchen von SCHRAMM und MÜLLER (175) hervor, die durch die Einwirkung von Keten die im Virus enthaltenen freien Aminogruppen acetylieren konnten, ohne daß die Vermehrungsfähigkeit des Virus hierbei verschwindet. Das Acetylderivat des Virus hat dasselbe Molekulargewicht wie dieses und ist hinsichtlich seiner Masse und Ladung einheitlich. Es unterscheidet sich von dem nicht-umgesetzten Virus durch sein Verhalten im elektrischen Feld, da es entsprechend seiner verminderten positiven Ladung eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode besitzt (Abb. 18). Werden mit dem acetylierten Virus Tabakpflanzen infiziert und die Nachkommen dieses Acetylderivats untersucht, so findet man bei diesen wieder freie Aminogruppen in gleicher Anzahl wie beim normalen Virus. Bei längerer Keteneinwirkung werden auch die phenolischen Hydroxylgruppen acetyliert, wobei die Wirksamkeit fast vollständig zum Verschwinden gebracht werden kann. Zu entsprechenden Ergebnissen führte auch die Umsetzung mit Phenylisocyanat; solange nur die Aminogruppen in Reaktion treten, bleibt das Virus vermehrungsfähig, bei höherer Phenylisocyanatkonzentration erhält man wieder unwirksame Derivate. Aus diesen Versuchen, die später auch von anderer Seite bestätigt wurden (126), ergibt sich, daß freie Aminogruppen im TM-Virus für die Fähigkeit zur Vermehrung nicht notwendig sind. Hingegen scheint die phenolische Hydroxylgruppe des Tyrosins hierfür von größerer Bedeutung zu sein. Aus Spezifitätsuntersuchungen mit Haptenen ist bekannt, daß das Tyrosin eine stark determinante Gruppe bei der Bildung der Antikörper ist. Es ist daher verständlich, daß sie auch eine entscheidende Rolle bei der identischen Reduplikation des Virus spielt.

Gegen milde oxydierende Einflüsse ist das TM-Virus ziemlich unempfindlich. Die im Virus enthaltenen Sulfhydrylgruppen des Cysteins können mit Jod bis zur Sulfonstufe oxydiert werden, ohne daß hierbei die Wirksamkeit verloren geht [ANSON und STANLEY (3)]. Bei höherer Jodkonzentration erfolgt eine Substitution im Tyrosinrest. In Übereinstimmung mit den eben geschilderten Befunden verschwindet hierdurch wieder die Vermehrungsfähigkeit. Andere Viren sind gegen Oxydation durch Luftsauerstoff recht empfindlich. So wird das Herpesvirus durch Stehen an der Luft unwirksam, kann aber durch Zugabe von Cystein reaktiviert werden (138, 220). Die leichte Reaktivierbarkeit durch Cystein spricht dafür, daß die Inaktivierung durch Oxydation der Sulfhydrylgruppe zur Disulfidbindung erfolgt ist, mithin also bei diesem Virus die Sulfhydrylgruppe für den Vermehrungsvorgang notwendig ist. In

anderen Fällen gelang eine Reaktivierung oxydierter Viren durch Natriumsulfid. Bei sauerstoffempfindlichen Viren empfiehlt es sich daher, die Aufarbeitung unter Zusatz derartiger Reduktionsmittel vorzunehmen (8). Durch starke Oxydationsmittel, wie z. B. H_2O_2 oder salpetrige Säure, werden wohl alle Viren irreversibel inaktiviert. Bei den kristallisierten Viren bleibt die Kristallisationsfähigkeit trotz der Inaktivierung bestehen.

Eine Inaktivierung der Viren kann auch durch Adsorption von Fremdstoffen an die Virusoberfläche erfolgen. So gibt das TM-Virus mit kristallisierten Eiweißstoffen, wie Trypsinogen, Trypsin und Ribonuclease (114), sowie reinem Papain und Clupein (12) unwirksame Komplexverbindungen, aus denen aber das aktive Virus durch geeignete Trennungsvorgänge wiedergewonnen werden kann. Die Inaktivierung ist wohl darauf zurückzuführen, daß sich zwischen den meist basischen Eiweißstoffen (isoelektrischer Punkt > 7) und dem TM-Virus (isoelektrischer Punkt = 3,5) unlösliche Salze bilden. Von KAUSCHE (81) wurde die Adsorption von Goldsol an verschiedene Virusproteine untersucht. Die hierbei auftretenden Unterschiede können zur Differenzierung verschiedener Virusarten benutzt werden. Die Adsorption verschiedener Farbstoffe und anderer Verbindungen an das TM-Virus wurde besonders von PFANKUCH (143, 144) untersucht. Wenn auf physikalischem oder chemischem Wege eine solche Adsorption festzustellen war, war diese auch stets von einer Inaktivierung begleitet. Viele dieser Reaktionen sind umkehrbar. So kann aus den unlöslichen Adsorptionsverbindungen des TM-Virus mit Invertseifen durch Dialyse wieder aktives Virus gewonnen werden (144). Ein entsprechendes Verhalten wurde auch dem Desinfektionsmittel Zephthol gegenüber beobachtet.

Bei der Denaturierung, bei der bekanntlich die charakteristische Faltung der Polypeptidkette in den Eiweißstoffen zerstört wird, zerfällt das TM-Virus unter Abspaltung der Nucleinsäure in kleinere Bruchstücke. Neben den bekannten Denaturierungsmitteln wie Sulfosalicylsäure, Trichloressigsäure und starkem Alkali wirkt beim TM-Virus auch Dodecylsulfat bei pH 8 (190) und Harnstoff (200) in diesem Sinne. Der Verlauf der Hitzedenaturierung wurde von LAUFFER und PRICE (103) untersucht. Dabei wurde gefunden, daß dieser Vorgang zwischen 67 und 76° in $0,1$ m Phosphatpuffer bei pH 7,5 als Reaktion erster Ordnung verläuft, die molare Aktivierungsenergie wurde zu 153000 Kalorien berechnet. Auch durch hohen Druck (6000 — 8000 atü) wird eine Spaltung und Denaturierung des Virus bewirkt (102).

c) Verhalten gegen Enzyme.

Die meisten Virusarten scheinen gegen *proteolytische Enzyme* recht beständig zu sein. Von besonderem Interesse sind Versuche, die mit reinen Viren und reinen Enzymen durchgeführt wurden. Das TM-Virus

wird vom kristallisierten Trypsin nicht gespalten und durch reines Pepsin nur sehr langsam inaktiviert. BAWDEN und PIRIE (12) beobachteten keine Inaktivierung bei Einwirkung von Trypsin, Pepsin, Papain, Pankreatin und eines Autolysates aus Niere. Eine schnelle Hydrolyse tritt erst ein, wenn das Protein vorher denaturiert wird. Die Elementarkörper der Vaccine werden durch kristallisierte Enzyme, wie Trypsin, Chymotrypsin, Carboxydipeptidase, Katherpsin und Ficin, nicht merklich angegriffen. Papain ruft dagegen innerhalb kurzer Zeit eine völlige Inaktivierung des Virus unter Bildung freier Aminogruppen hervor. Auch durch Pepsin werden die Elementarkörper angegriffen (67).

Durch die *Nuclease* des Kälberdünndarms wird das Tabakmosaikvirus unter Bildung freier Säuregruppen inaktiviert [G. SCHRAMM (169)]. Die Nucleinsäure wird jedoch hierbei nicht, wie ursprünglich angenommen, aus dem Virusprotein entfernt, sondern die Bindung an das Protein wird nur gelockert, so daß sie bei der nachfolgenden Behandlung mit Trichloroessigsäure leichter abgespalten wird als bei dem enzymatisch nicht behandelten Virus. Trotz der Hydrolyse der Nucleinsäure bleibt das Molekulargewicht des Virus unverändert. Eine teilweise Inaktivierung wurde auch bei der Einwirkung einer pflanzlichen Phosphatase auf das TM-Virus beobachtet (146). Durch *Ribonuclease* aus Pankreas soll keine Hydrolyse der Virusnucleinsäure erfolgen. Bei Zugabe des Enzyms erfolgt eine momentane Inaktivierung des Virus, durch Adsorption des Enzymproteins. Aus dieser unwirksamen Komplexverbindung kann durch Verdünnen oder Ultrazentrifugierung das aktive Virus wieder gewonnen werden (114). Auch die Elementarkörper der Vaccine werden durch kristallisierte Ribonuclease nicht angegriffen (67).

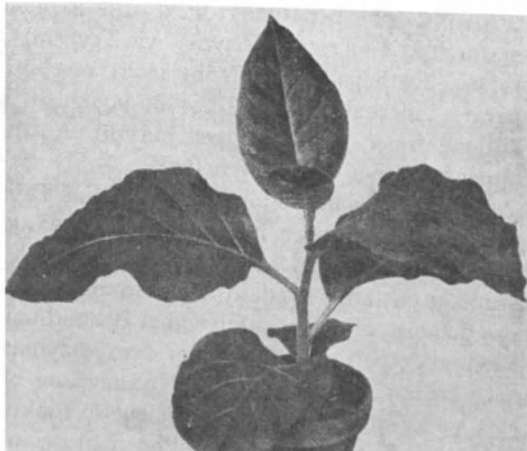
2. Die einzelnen Virusarten.

In diesem Abschnitt sollen die chemischen Eigenschaften derjenigen Viren besprochen werden, die bisher in chemisch reiner Form isoliert und genauer untersucht sind. Hierbei wird mit der Besprechung des TM-Virus begonnen, da es das bisher am besten untersuchte Virus ist und somit als Modell für alle weiteren Betrachtungen dienen kann.

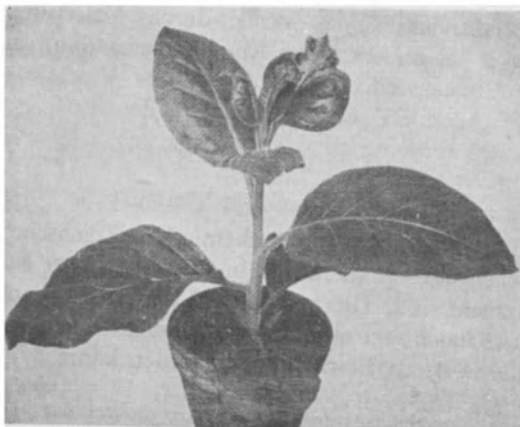
a) Das Tabakmosaikvirus (*Marmor tabaci* var. *vulgare*).

Vorkommen. Das TM-Virus ist in der ganzen Welt verbreitet und tritt in der Natur hauptsächlich in *Solanaceen* auf. Im Laboratorium konnte es jedoch auf 27 verschiedene Pflanzenfamilien übertragen werden, es besitzt also eine sehr geringe Wirtsspezifität. Bei den meisten Tabakrassen erzeugt das Virus eine allgemeine Erkrankung, die sich in einer mosaikartigen, Hellgrün-dunkelgrün-Fleckung und starken Deformationen der Blätter äußert (Abb. 21 a und b). Auf *Phaseolus vulgaris* (Gartenbohne) und auf *Nicotiana glutinosa* (Abb. 8) erzeugt das Virus beim Auftragen auf die

Blätter nur lokale Nekrosen und keine allgemeine Erkrankung. Die Zahl der durch eine Viruslösung erzeugten Lokalnekrosen gilt als Maß für die biologische Wirksamkeit eines Viruspräparats (siehe S. 107). Das TM-



a)



b)

Abb. 21. Symptome des Tabakmosaikvirus auf türkischem Tabak (*samsun*). (Aufnahmen von G. MELCHERS.)

a) Gesunde Kontrollpflanze, b) gleichalte kranke Pflanze.

Virus ist sehr infektiös, es erzeugt noch in Verdünnungen bis zu 10^{-14} g/ccm eine Infektion.

Darstellung. Das TM-Virus ist das bisher am leichtesten zugängliche Virusprotein. Wie aus der folgenden Tabelle hervorgeht, ist der Gehalt

kranker Pflanzen an TM-Virusprotein um eine Zehnerpotenz höher als bei anderen Viruskrankheiten. Bis zu 90% der löslichen Proteine des Pflanzensaftes können aus TM-Virus bestehen.

Tabelle 2.

Virus	Wirt	Virusmenge in 1 kg Pflanzen- material Gramm
Tabakmosaikvirus:		
(<i>Marmor tabaci</i> var. <i>vulgare</i>)	Tabak	2,0
(„ „ „ <i>tenuis</i>)	„	1,3
(„ „ „ <i>flavum</i>)	„	0,4
(„ „ „ subsp. <i>Dahlemense</i>)	„	2,0
(„ „ „ <i>lividum</i>)	„	1,3
Gurkenvirus 3 (<i>Marmor astrictum</i> var. <i>chlorogenum</i>)	Gurke	0,3
Gurkenvirus 4 (<i>Marmor astrictum</i> var. <i>aucuba</i>)	„	0,3
Kartoffel-X-Virus (<i>Marmor dubium</i>)	Tabak	0,1
Kartoffel-Y-Virus (<i>Marmor cucumeris</i> var. <i>Ypsilon</i>) ..	„	0,030
Tomaten-bushy-stunt-Virus (<i>Marmor dodekahedron</i>) ..	Tomate	0,050
Tabaknekrosevirus (<i>Marmor letale</i>)	Tabak	0,040
Severe-etch-Virus (<i>Marmor crudens</i> var. <i>severum</i>) ..	„	0,007
Tabakringfleckenvirus (<i>Annulus tabaci</i>)	„	0,007

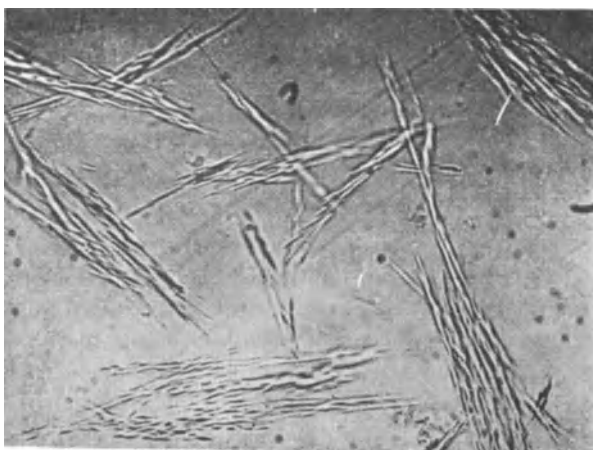


Abb. 22. Parakristalline Nadeln von Tabakmosaikvirus. Vergr. etwa 500fach.

Die Darstellung des reinen TM-Virus erfolgt durch Fällung mit Ammonsulfat und hochtouriges Zentrifugieren. Die von den verschiedenen Autoren gegebenen Vorschriften stimmen im wesentlichen überein [STANLEY (195), BAWDEN und PIRIE (12, 13), PFANKUCH und KAUSCHE (145), G. SCHRAMM und H. MÜLLER (175)]. Aus dem rohen Pflanzensaft werden

zunächst chlorophyllhaltige Proteine durch Erwärmen auf 70°, Einfrieren, Durchleiten von CO₂ oder Schütteln mit Chloroform entfernt. Der geklärte Saft wird mit Ammonsulfat bei p_H 7 gefällt und das ausgefallene Virusprotein durch weitere Umfällungen gereinigt. Dunkle, wahrscheinlich kohlehydrathaltige Beimengungen werden am besten vom Virus abgetrennt, indem man dieses bei 25000 Touren anderthalb Stunden lang zentrifugiert. Durch vorsichtigen Ammonsulfatzusatz bei p_H 4,5 erhält man schließlich das Protein in Form von parakristallinen Nadeln (Abb. 22).

Das Verhalten in Lösung.¹ Infolge seiner langgestreckten Gestalt zeigt das TM-Virus in Lösung starke *Strömungsdoppelbrechung*. Bei einsetzender Kristallisation tritt in der Viruslösung beim Umschütteln oder Rühren ein charakteristischer, seidenartiger Glanz auf, der ebenfalls durch starke Strömungsdoppelbrechung verursacht wird. In Lösungen, die mehr als 1,8% Virus enthalten, bildet sich eine flüssig kristalline Bodenschicht aus, die stark doppelbrechend ist. In unreinen Lösungen beginnt die Ausbildung der Bodenschicht erst bei höheren Viruskonzentrationen. Röntgenuntersuchungen zeigen, daß die Virusteilchen in dieser Bodenschicht eine äußerst regelmäßige Verteilung, wie in einem Kristall, annehmen [BERNAL und FANKUCHEN (20)]. Die stäbchenförmigen Moleküle sind streng parallel zueinander ausgerichtet. So beträgt die Abweichung vom Parallelismus z. B. in einer 36%igen kristallinen Flüssigkeit höchstens 45'. Die Abstände zwischen den Teilchen sind vollkommen regelmäßig und in salzfreien Lösungen nur von der Konzentration abhängig, und zwar ist der Abstand zwischen den Teilchen

$$R \text{ (in } \text{Å}) = 1650/\sqrt{N}$$

$N = g$ trockenes Virus in 100 ccm Flüssigkeit.

In wäßriger Lösung wurden Abstände von 173–500 Å beobachtet; im trockenen Gel sinkt der Abstand bis auf den Durchmesser des Virusteilchens (152 Å). Interessanterweise werden Zwischenwerte zwischen 152 und 173 Å niemals beobachtet; in wäßriger Lösung scheint demnach die Hydrathülle nicht unter einen gewissen Mindestbetrag sinken zu können. Läßt man das trockene Gel in einer Salzlösung quellen, so stellt sich ein Gleichgewicht ein, das von der Salzkonzentration und dem p_H abhängig ist. Die Quellung ist am isoelektrischen Punkt am geringsten. Hier beträgt der zwischenmolekulare Abstand 185 Å. In starken Salzlösungen sinkt der Abstand auf 173 Å. Die Natur der zwischenmolekularen Kräfte, die zwischen den Teilchen auf verhältnismäßig große Entfernung hin wirken, wurde von LANGMUIR (97) und LEVINE (109) theoretisch gedeutet. Sie beruht auf der Wechselwirkung der gelösten,

¹ Eine Zusammenfassung über die Kolloidchemie des Tabakmosaikvirus siehe (104a).

polaren Teilchen mit der entgegengesetzt geladenen Ionenatmosphäre. Nur bei zylindrischen Teilchen wie dem TM-Virus ist diese Kraft so ausgeprägt, daß sich eine stabile Gleichgewichtslage ergibt. Durch die gleiche Kraft werden die Virusteilchen auch in den parakristallinen Nadeln streng parallel ausgerichtet. Bei diesen Nadeln handelt es sich also nicht um echte Kristalle, da nur quer zur Längsrichtung eine strenge Ordnung der Teilchen vorliegt.

Größe und Gestalt. Die verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Größe und Gestalt des TM-Virus sind in einem vorhergehenden Abschnitt dargestellt (siehe S. 118). Die charakteristischen Konstanten des TM-Virus sind in der folgenden Tabelle im Vergleich zu einigen anderen Pflanzenviren zusammengefaßt:

Tabelle 3.

Virusart	s_{20}		D_{20}	Gestalt	Dimension $n\mu$	Mol.-Gew.
	monomere Form	polymere Form				
TM und verwandte Stämme	175	200—235	0,3	stb.	$15,2 \times 250$	$40—46 \times 10^6$
Kartoffel-X	113	130	—	„	—	—
Tabak-Ringflecken..	115	—	—	kg.	19×19	$3,4 \times 10^6$
Bushy-stunt	133	—	1,15	„	$27,4 \times 27,4$	7,6 bis $10,6 \times 10^6$
Tabaknekrose	130	—	—	„	—	$7,4 \times 10^6$

s_{20} = Sedimentationskonstante; D_{20} = Diffusionskonstante; stb. = stäbchenförmig; kg. = kugelförmig.

Die Sedimentationskonstante und die Diffusionskonstante sind konzentrationsabhängig; die in der Tabelle angegebenen Werte beziehen sich auf eine 0,5%ige Lösung. Werden beide Werte auf $c = 0$ extrapoliert, so ergibt sich aus diesen Werten nach der (S. 124) angegebenen Methode ein Molekulargewicht von 46 Millionen. Als spezifisches Gewicht des Virus ist hierbei der Wert von 1,35 zugrunde gelegt (12). Aus elektronenmikroskopischen Daten ergibt sich ein Molgewicht zu $40 \cdot 10^6$ (siehe S. 120); aus s_{20} und Viskositätsmessungen ein Wert von ebenfalls $40 \cdot 10^6$ (siehe S. 129). Der Durchmesser des Virusstäbchens ist röntgenographisch ermittelt (siehe S. 129), während für die Längenangabe elektronenmikroskopische Angaben zugrunde gelegt sind (siehe S. 120).

Elektrochemische Eigenschaften. Die vollständige p_H -Abhängigkeit der Beweglichkeit des TM-Virus im elektrischen Feld ist auf S. 133 wiedergegeben. Der isoelektrische Punkt liegt hiernach bei p_H 3,50 in m/100 Acetatpuffer. Wie nach der DEBYESchen Theorie zu erwarten ist, ist die Beweglichkeit nicht nur vom p_H , sondern auch von der Salzkonzen-

tration der Lösung abhängig. So ist z. B. die Beweglichkeit bei pH 6,9 in Phosphatpuffer von 0,1 ionaler Konzentration — $8,9 \text{ cm}^2/\text{sec}^{-1}/V^{-1}$, bei 0,01 ionaler Konzentration — $13 \text{ cm}^2/\text{sec}^{-1}/V^{-1}$.

Zusammensetzung. Für das Tabakmosaikvirus und einige andere Pflanzenviren ergibt sich folgende Bruttozusammensetzung:

Tabelle 4.

Virusart	C	H	N	S	P	Asche	Kohlenhydrat
	in Prozent						
TM	50	7,3	16,5	0,2—0,4	0,56	2	2,5
Kartoffel-X	49	7,4	16,4	—	0,45	2,2	2,7
Bushy-stunt	48,5	7,7	16,1	0,6	1,4	3	5,5
Tabaknekrose	45	6,5	16,3	1,6	1,65	7	6,5

Tabelle 5. Zusammensetzung des TM-Virus.

Komponente	Gehalt in Prozent
Amino-N (als NH_3)	2,4
Alanin	1,9
Arginin	9,0
Asparaginsäure	2,6
Cystein	0,7
Glutaminsäure	5,3
Glykokoll	0,0
Histidin	0,0
Leucin	6,1
Lysin	0—0,2
Methionin	0,0
Phenylalanin	6,0
Prolin	4,6
Serin	6,4
Threonin	5,3
Tyrosin	3,9
Tryptophan	4,5
Valin	3,9
Nucleinsäure	5,8
Summe ...	68,4

Sie stimmt also vollkommen mit der eines Eiweißstoffes überein. Eine gewisse Unsicherheit der Zusammensetzung ergibt sich wegen der Unschärfe des Trockengewichtes und durch den Aschegehalt, der im wesentlichen durch den Phosphatgehalt bedingt wird.

Die Aminosäurezusammensetzung des Tabakmosaikvirus wurde besonders von Röss (160) untersucht. Es ergaben sich etwa folgende Mengen an den einzelnen Aminosäuren (Tabelle 5).

Der im Virus enthaltene Schwefel liegt vollständig in Form von SH-Gruppen des Cysteins vor (3). Da bisher nur 68% der gesamten Aminosäuren gefaßt sind, werden weitere Untersuchungen nötig sein, um die

genaue Zusammensetzung festzulegen. Die bisher untersuchten Aminosäuren des Tabakmosaikvirus besitzen die sterisch normale l-Konfiguration [SCHRAMM und MÜLLER (176)]. Wie aus den chemischen Untersuchungen (siehe S. 146) hervorgeht, sind nicht alle Einzelbestandteile des Virus von gleicher Bedeutung für seine biologische Funktion. So können die Aminogruppen des Lysins und die Sulfhydrylgruppen des Cysteins abgewandelt werden, ohne daß die biologische Wirksamkeit ver-

schwindet. Von besonderer biologischer Bedeutung scheint das Tyrosin zu sein, da jede Änderung an dieser Aminosäure zum Verlust der Wirksamkeit führt.

Die Literaturangaben über den Phosphorgehalt des Virus stimmen nicht völlig überein. KNIGHT und STANLEY (86) finden einen Wert von 0,56%, PFANKUCH von 0,48%. Diese Abweichungen beruhen wohl darauf, daß das Virusprotein anorganisches Phosphat hartnäckig adsorbiert, wie dies besonders bei den Versuchen mit radioaktivem Phosphor deutlich wurde (23). Das Kohlenhydrat-Phosphor-Verhältnis im Virus entspricht dem der Hefenucleinsäure. Bei der Abspaltung der Nucleinsäure durch Alkali findet sich der Phosphor vollständig in der abgespaltenen Nucleinsäure wieder, so daß der Phosphor sicherlich vollständig in der Nucleotidform vorliegt. In Übereinstimmung mit diesen chemischen Befunden zeigten Versuche mit Radiophosphor, daß der Virusphosphor nicht gegen anorganisches Phosphat austauschbar ist, so daß ein Einbau von Radiophosphat nur auf physiologischem Wege möglich ist, wenn viruskranke Pflanzen auf einer Nährlösung von Radiophosphat aufgezogen werden. Bei der Virussynthese in der Pflanze kann das Phosphat nicht durch Arsenat ersetzt werden (23).

Auf Grund der Phosphorbestimmung errechnet sich ein Nucleinsäuregehalt des Virus von 4—5,8%. Die Nucleinsäure des TM-Virus ist ein Polyribonucleotid, das in seiner Zusammensetzung der Hefenucleinsäure sehr ähnlich ist. Als basische Komponenten enthält sie: Guanin, Adenin, Cytosin und Uridylsäure. Letztere soll sich etwas von der aus Hefenucleinsäure isolierten Uridylsäure unterscheiden (113). Nach älteren Angaben von LORING (113) besitzt die Virusnucleinsäure in 0,5 m Boratpuffer bei p_H 7,7 eine Diffusionskonstante von 0,10 cm^2/Tag , woraus sich bei Annahme einer Kugelgestalt des Moleküls ein Molekulargewicht von 37000 ergeben würde. Nach neueren Angaben kommt der Virusnucleinsäure ein Molekulargewicht von 11000 zu (37).

Struktur des Tabakmosaikvirus. Das Nucleoprotein mit der Sedimentationskonstanten $s_{20, 0,5\%} = 175$ ist die kleinste Einheit, die die biologischen Eigenschaften des TM-Virus zeigt. Dieses Teilchen ist auch im chemischen Sinne eine Einheit. Aus der Tatsache, daß bei der Acetylierung der freien Aminogruppen des Virus das Molekulargewicht erhalten bleibt, hat STAUDINGER (203) den Schluß gezogen, daß alle Atome durch Hauptvalenzen miteinander verbunden sind, es sich also um ein Makromolekül im Sinne STAUDINGERS handelt. Die näheren Untersuchungen zeigen, daß das Virus eine außerordentlich regelmäßige kristallähnliche Struktur besitzt. Diese hohe innere Ordnung scheint für die Zuordnung des Virusteilchens zu den Makromolekülen noch entscheidender zu sein, als das von STAUDINGER (203) angezogene Kriterium der Verknüpfungsart der Atome.

Die große Zahl der Einzelbausteine macht zur Zeit eine vollständige

Konstitutionsaufklärung, d. h. die Festlegung der Verknüpfung und räumlichen Anordnung sämtlicher Atome unmöglich. Jedoch ergibt sich aus den bisherigen Versuchen schon jetzt ein recht anschauliches Bild vom Aufbau des Virusmoleküls.

Besonderes Interesse im Hinblick auf die biologische Aktivität des Virus beansprucht die Bindung und räumliche Anordnung der *Nucleinsäure* in dem Virusmolekül. Da sich die Nucleinsäure enzymatisch spalten läßt, ohne daß das Proteinmolekül in Bruchstücke zerfällt, ist anzunehmen, daß sie nicht in die Polypeptidkette eingebaut, sondern an der Oberfläche des Eiweißgerüsts angeordnet ist (169). Da auch die enzymatisch gespaltene Nucleinsäure noch verhältnismäßig fest an dem Protein haftet, darf man folgern, daß außer der salzartigen Bindung zwischen dem Phosphorsäurerest und basischen Gruppen des Proteins noch andere Bindungen, etwa zwischen basischen Gruppen der Purinkerne und entsprechenden Gruppen des Proteins, bestehen. Für eine solche zweifache Bindungsart sprechen auch noch weitere Gründe, die weiter unten angeführt werden.

Über die räumliche Anordnung der Nucleinsäure in dem Virusmolekül ergaben Untersuchungen mit polarisiertem, ultraviolettem Licht näheren Aufschluß (28). Werden die stäbchenförmigen Virusteilchen durch Strömung ausgerichtet, so zeigt sich, daß die charakteristische Absorption der Purinringe der Nucleinsäure bei $265\text{ m}\mu$ nur deutlich hervortritt, wenn der elektrische Vektor des Lichts senkrecht zur Längsachse des Virus schwingt (Abb. 23). Es ist nun bekannt, daß aromatische Ringsysteme in diesem Wellenlängenbereich nur Licht absorbieren, das parallel zur Ringebene schwingt. Man muß also aus den Versuchsergebnissen den Schluß ziehen, daß die Pyridinringebenen der Nucleinsäure einander parallel und senkrecht zur langen Achse des Virus stehen. Dies ist aber nur möglich, wenn die fadenförmigen Nucleinsäuremoleküle parallel zur Virusachse ausgerichtet sind. Die Versuche mit polarisiertem, ultraviolettem Licht zeigen weiterhin, daß die Absorptionsbande des Indolringes des Tryptophans bei $288\text{ m}\mu$ ebenfalls nur zutage tritt, wenn der elektrische Vektor des Lichts senkrecht zur Virusachse schwingt. Das Proteingerüst des Virus zeigt also ebenfalls einen sehr regelmäßigen Aufbau, der so beschaffen ist, daß die Indolringebenen des Tryptophans einander parallel und senkrecht zur Virusachse stehen.

Die große Regelmäßigkeit im Aufbau des TM-Virus ergibt sich auch aus Strukturuntersuchungen mit Röntgenstrahlen, die von BERNAL und FANKUCHEN (20) an orientierten Viruspräparaten durchgeführt wurden. Das Fehlen starker Reflexe im Äquator zeigt zunächst, daß das Virus nicht aus einem Bündel langer Fasern bestehen kann. Die sehr starken Reflexe senkrecht zur Achse zeigen vielmehr eine Art Schichtstruktur an (Abb. 24). Aus der näheren Analyse der Röntgenaufnahme ergibt sich,

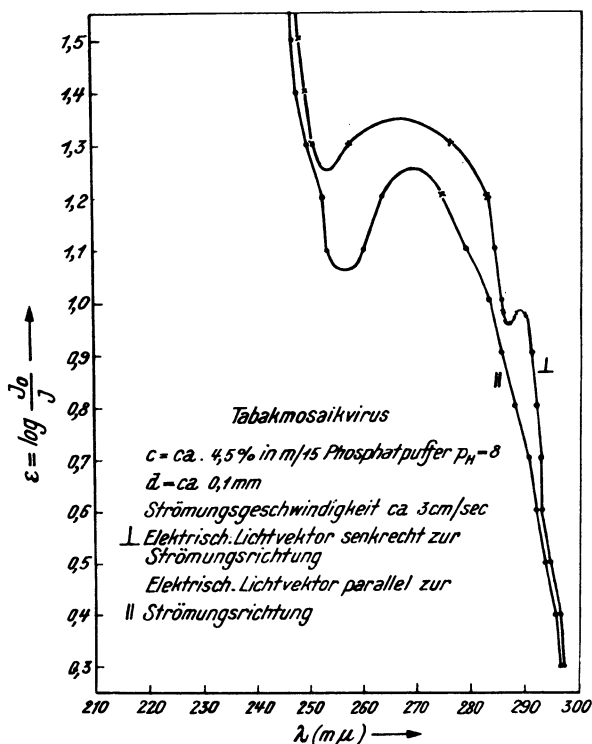


Abb. 23. Ultravioletabsorption des durch Strömung ausgerichteten Tabakmosaikvirus. (Nach BUTENANDT, FRIEDRICH-FREKSA, HARTWIG und SCHEIBE.)

daß das Virus aus Elementarzellen rhomboedrischer Gestalt mit einer Dimension von $68 \times 87 \text{ \AA}$ aufgebaut ist. Aus dem Volumen der Elementarzelle und ihrem spezifischen Gewicht berechnet sich für diese ein Molekulargewicht von 370000. Es ist anzunehmen, daß jeweils drei rhomboedrische Elementarzellen eine hexagonale Scheibe von 68 \AA Dicke und einem Durchmesser von 152 \AA bilden (Abb. 24). Etwa 37 solcher Scheiben wie Geldstücke in einer Geldrolle übereinander gelegt, würden dann die Gesamtlänge des Virusmoleküls von etwa $250 \text{ m}\mu$ ergeben.

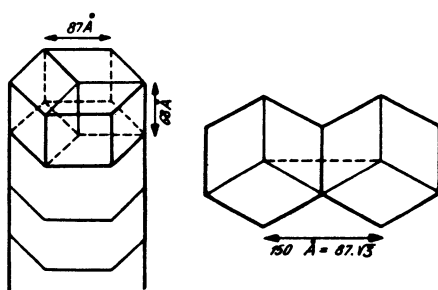


Abb. 24. Struktur des Tabakmosaikvirus nach den Röntgenuntersuchungen von BERNAL und FANKÜCHEN.

Ein weiterer Einblick in die Struktur des Virus konnte auf chemischem

Wege durch einen unter milden Bedingungen durchgeführten Abbau gewonnen werden (173). Das TM-Virus ist im alkalischen Gebiet unterhalb p_H 9 lange Zeit beständig, bei höherem p_H tritt ein Zerfall in niedermolekulare Bruchstücke ein. Von G. SCHRAMM (173) wurden nun diese knapp außerhalb der p_H -Stabilitätsgrenze auftretenden Spaltprodukte in reiner Form isoliert und näher untersucht. Durch Elektrophorese und Ultrazentrifugierung gelang es, ein niedermolekulares Nucleoprotein und ein niedermolekulares, nucleinsäurefreies Protein von unverändertem Ausgangsmaterial abzutrennen. Die charakteristischen Konstanten des Spaltproduktes im Vergleich zum Ausgangsmaterial sind in folgender Tabelle wiedergegeben:

Tabelle 6.

Bezeichnung	1. TM-Virus	2. Nucleinsäurehaltiges Spaltprodukt	3. Nucleinsäure- freies Spaltprodukt
Sedimentationskonstante	175	8,7	8,7
Diffusionskonstante (qcm/sec)	$\sim 0,3 \times 10^{-7}$	—	$2,2 \times 10^{-7}$
Molekulargewicht	$4,6 \times 10^7$	$3,6 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$
Beweglichkeit bei p_H 9 ¹ (qcm/sec V)	$— 13 \times 10^{-5}$	$\sim — 13 \times 10^{-5}$	$— 5,3 \times 10^{-5}$
Biologische Aktivität in Prozent der Standardlösung ²	100%	< 1%	< 1%

Danach beträgt das Molekulargewicht der Spaltprodukte nur $1/130$ von dem des TM-Virus. *Ihrer Größe nach stimmen sie mit der röntgenographisch ermittelten Elementarzelle des Virus überein.* Beide Arten der Spaltproteine sind hinsichtlich ihrer Masse und Ladung völlig einheitlich. Infolge der Abspaltung der Nucleinsäure besitzt das nucleinsäurefreie Spaltprotein eine um 60% geringere elektrophoretische Beweglichkeit als das gleich große Nucleoprotein und das TM-Virus. Beide Spaltkomponenten sind biologisch inaktiv. Durch längeres Stehen bei p_H 9 wird das niedermolekulare Nucleoprotein weiter in freie Nucleinsäure und freies Protein gespalten. Hieraus darf man den Schluß ziehen, daß das Virus bei der Alkalisplaltung zunächst in das niedermolekulare Nucleoprotein zerlegt wird, das dann unter den Reaktionsbedingungen weiter in Protein und Nucleinsäure zerfällt. Durch Einwirkung stärkeren Alkalis wird das niedermolekulare, nucleinsäurefreie Spaltprotein denaturiert, wobei es zu sekundären Aggregaten zusammentritt, die je nach den Versuchsbedingungen ein verschiedenes Molekulargewicht besitzen. Derartige Aggregate können auch unmittelbar aus dem TM-Virus bei Behandlung mit starkem Alkali erhalten werden [PFANKUCH (142), M. LAUFFER (101)].

¹ Gemessen in m/100-Glykokoll/NaOH bei 0°.

² Die Aktivitätsbestimmungen wurden von G. MELCHERS im Einzelherdtest auf *Nicotiana glutinosa* durchgeführt.

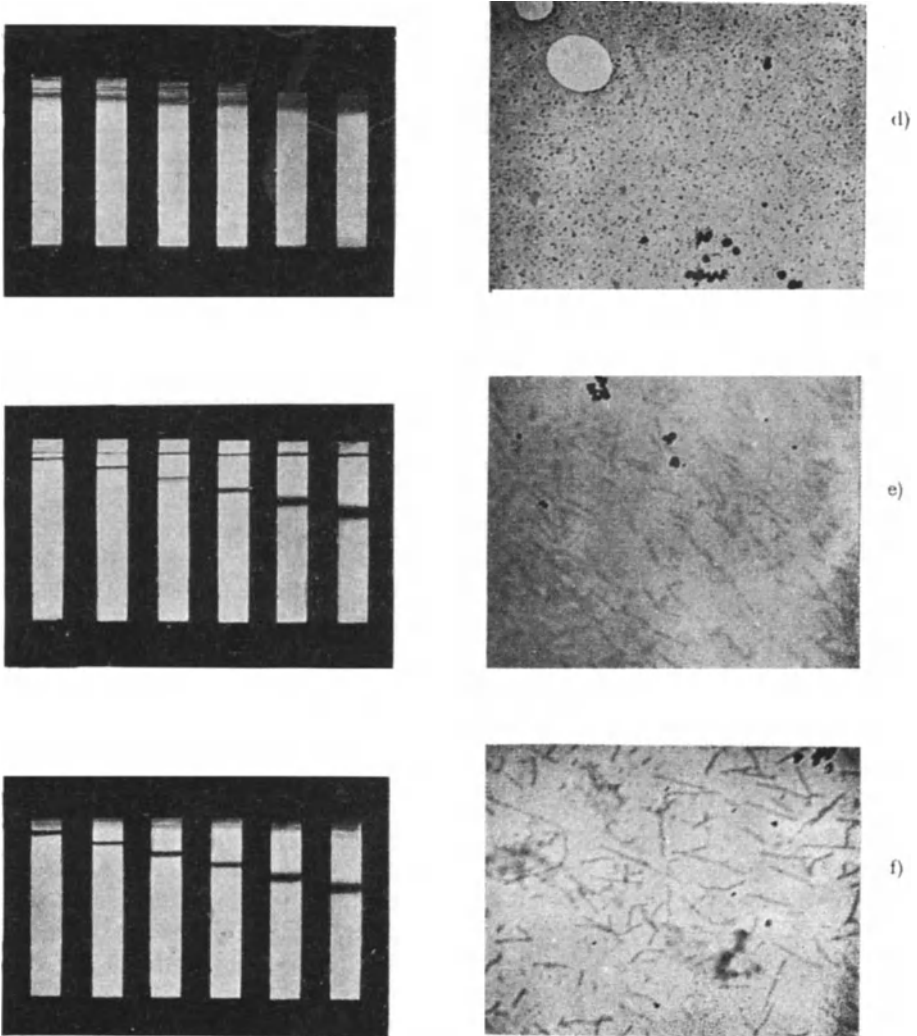


Abb. 25. Rückbildung des hochmolekularen Proteins aus den Spaltproteinen des Tabakmosaikvirus. Vergrößerungen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 25 d bis f) $\times 40000$. Zur Erleichterung der Scharfeinstellung wurde bei den Aufnahmen etwas Goldsol zugegeben (tiefschwarze Partikel).

- a) Sedimentation des Spaltproteins. Zeitraum zwischen den Aufnahmen 5 Minuten. Drehzahl 26000/Minute. b) Sedimentation des rückgebildeten hochmolekularen Proteins bei pH 5,8. Zeitraum zwischen den Aufnahmen 5 Minuten, Drehzahl 18000/Minute. c) Sedimentation des normalen Tabakmosaikvirus bei pH 5,8. Zeitraum zwischen den Aufnahmen 5 Minuten, Drehzahl 18000/Minute. d) Niedermolekulares Spaltprotein bei pH 9. e) Rückgebildetes hochmolekulares Protein bei pH 5,8. f) Tabakmosaikvirus bei pH 5,8.

Sie unterscheiden sich auch in ihren elektrochemischen Eigenschaften und ihrer verminderten serologischen Aktivität deutlich von den unter milden Bedingungen erhaltenen einheitlichen Spaltproteinen.

Bei der näheren Untersuchung der unter milden Bedingungen erhaltenen Spaltprodukte zeigte es sich, daß diese im sauren Gebiet bei einem p_H von etwa 5 wieder zu einem hochmolekularen Protein von der gleichen Gestalt und Größe wie das ursprüngliche Virus zusammenzutreten. Die Rückbildung kann sowohl aus dem niedermolekularen Nucleoproteid als auch aus dem nucleinsäurefreien Protein erfolgen. Das synthetische, hochmolekulare Protein zeigt in der Ultrazentrifuge die gleiche Einheitlichkeit und die gleiche Sedimentationskonstante wie das Virus, zeigt in Lösung eine starke Strömungsdoppelbrechung und kristallisiert bei Zugabe von Ammonsulfat in den gleichen parakristallinen Nadeln wie das TM-Virus. Elektronenmikroskopische Abbildungen des rückgebildeten Proteins zeigen, daß es sich wieder um ein stäbchenförmiges Teilchen handelt, von der gleichen Gestalt wie das Virus (Abb. 25). Das rückgebildete hochmolekulare Nucleoproteid zeigt jedoch keine biologische Wirksamkeit.

Die von FRIEDRICH-FREKSA und G. SCHRAMM (unveröffentlicht) durchgeführte serologische Untersuchung der Spaltprodukte zeigte, daß ihre antigene Struktur gegenüber dem TM-Virus nicht verändert ist. Infolge ihrer größeren Oberfläche binden sie sogar mehr Antikörper als das Virus selbst. Sie sind in ihren antigenen Eigenschaften unter sich vollkommen gleich, d. h. die verschiedenen im TM-Virus festgestellten Antigenwirkgruppen verteilen sich nicht auf verschiedene Bruchstücke, sondern sind bereits gemeinsam in einem niedermolekularen Teilchen enthalten. Nach diesen Ergebnissen muß das TM-Virus als eine energetisch begünstigte Anordnung von Untereinheiten aufgefaßt werden, die hinsichtlich der Masse, der Ladung und der antigenen Struktur gleich sind. Da die Zahl dieser Untereinheiten größenordnungsmäßig mit der Anzahl der im Virus enthaltenen Nucleinsäuremoleküle übereinstimmt und außerdem die Isolierung der nucleinsäurehaltigen Spaltstücke gelungen ist, ist anzunehmen, daß jede Untereinheit ein Molekül Nucleinsäure enthält.

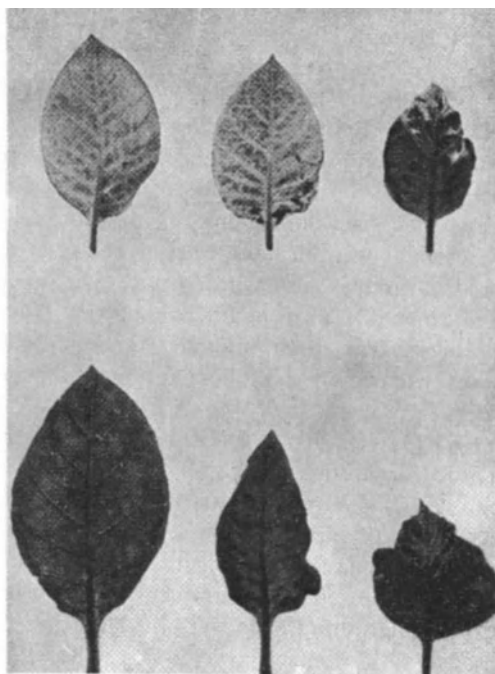
Da auch das nucleinsäurefreie Protein wieder zu dem hochmolekularen stäbchenförmigen Protein zusammentritt, ergibt sich in Übereinstimmung mit den enzymatischen Befunden, daß die Nucleinsäure für den Zusammenhalt der Untereinheiten untereinander nicht verantwortlich zu machen ist. Der Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit zwischen dem nucleinsäurefreien Protein und dem nucleinsäurehaltigen Spaltprotein bzw. TM-Virus zeigt, daß in diesem die Nucleinsäure in ionisierbarer Form, also nicht etwa esterartig gebunden ist. Da trotzdem die Wanderung der Nucleinsäure und des Proteins im elektrischen Feld nicht unabhängig voneinander erfolgt, ist anzunehmen, daß zwischen Nuclein-

säure und Protein außer der heteropolaren Salzbindung noch eine andere Verknüpfungsart besteht.

b) *Die Varianten des Tabakmosaikvirus.*

Es sind eine große Reihe von Virusarten bekannt, die in ihren biologischen, chemischen und serologischen Eigenschaften mit dem TM-Virus nahe verwandt sind. Zum Teil handelt es sich hierbei um Mutanten, deren Entstehung aus dem gewöhnlichen *vulgare*-Stamm experimentell im Laboratorium verfolgt werden konnte, zum Teil aber auch um Stämme, die aus Freilandkulturen isoliert wurden und über deren genetischen Zusammenhang mit dem TM-Virus nichts bekannt ist. Die nähere chemische Untersuchung dieser Varianten und ihr Vergleich mit dem Ausgangsstamm erscheint wichtig im Hinblick auf das allgemeine Problem der Variabilität der Virusarten.

Biologische Eigenschaften. Die Zahl der biologisch charakterisierten Mutanten ist außerordentlich groß. So wurden allein von JENSEN (75) über 50 Stämme des TM-Virus aus den spontan auftretenden Gelbflecken mosaikkranker Tabakpflanzen isoliert. Jedoch sind bisher nur wenige von ihnen chemisch genauer untersucht, so daß sich eine vollständige Aufzählung in dem vorliegenden Zusammenhang erübrigt. Die biologische Unterscheidung erfolgt durch das verschiedenartige Symptombild, das auf verschiedenen Testpflanzen, wie z. B. Tabak, Tomate, *Nicotiana silvestris* und *Nicotiana glutinosa*, hervorgerufen wird. Weiterhin treten Unterschiede auf in der Leichtigkeit, mit der sie übertragen werden können, und in der Geschwindigkeit, mit der sie sich von der Eintrittspforte aus in den Pflanzen ausbreiten. Eine besonders auffällige Änderung der biologischen Eigenschaften tritt bei der Mutation zu den Gelbstämmen auf. Diese erzeugen nicht mehr ein Hellgrün-Dunkelgrün-Mosaik, sondern eine ausgesprochene gelbe, fast weiße Fleckung auf dem grünen Untergrund der Blattfläche (Abb. 26). Derartige Gelbstämme werden in der angelsächsischen Literatur als *Aucubamosaikviren* bezeichnet. Es handelt sich hier zum Teil um Mutanten, zum Teil um aus dem Freiland isolierte Varianten. Derartige Gelbstämme wurden auch von KAUSCHE und PFANKUCH als Mutanten des TM-Virus isoliert und als TM 35, 44, 46, 56, 58, 88 usw. bezeichnet. Von MELCHERS (124) und SCHRAMM (177) wurde besonders eine als Var. *flavum* bezeichnete Gelbmutante untersucht. Die Gelbstämme sind für die Tabakpflanzen stark pathogen und bewirken eine meist sehr ausgeprägte Wachstumshemmung (Abb. 27). Trotz der verstärkten Pathogenität ist die Vermehrungsrate dieser Gelbstämme kleiner als die der Grünstämme (siehe Tab. 2). Die starke Schädigung der Pflanze wird wahrscheinlich durch die Hemmung der Chlorophyllsynthese hervorgerufen. Bei anderen Mutanten ist die Pathogenität gegenüber dem Ausgangsstamm abgeschwächt; so z. B. bei dem von MELCHERS (124) und



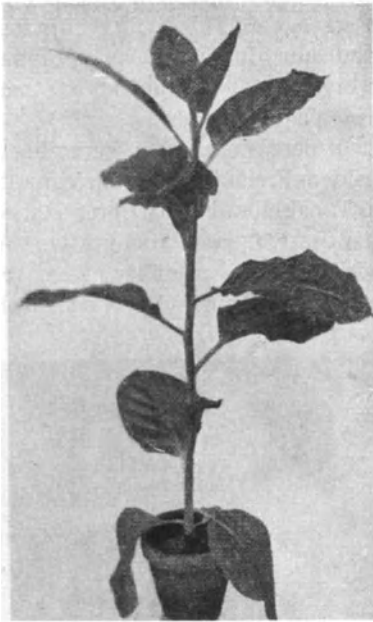
b)



c)

Abb. 26.
Abb. 26.

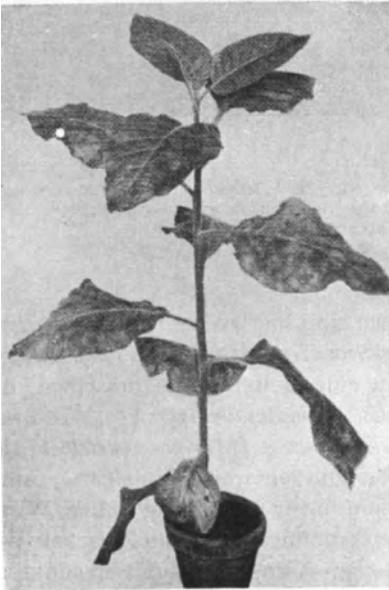
a) Gleichaltrige Blätter von türkischem Tabak (*samsun*). Obere Reihe infiziert mit Gelbstamm *flavum*, untere Reihe mit *vulgare*. (Nach G. MELCHERS.) b) *Samsun*-Tabak infiziert mit *vulgare*. (Nach G. MELCHERS.) c) Kontrollpflanze. Zur gleichen Zeit wie b) mit *flavum* infiziert. (Nach G. MELCHERS.)



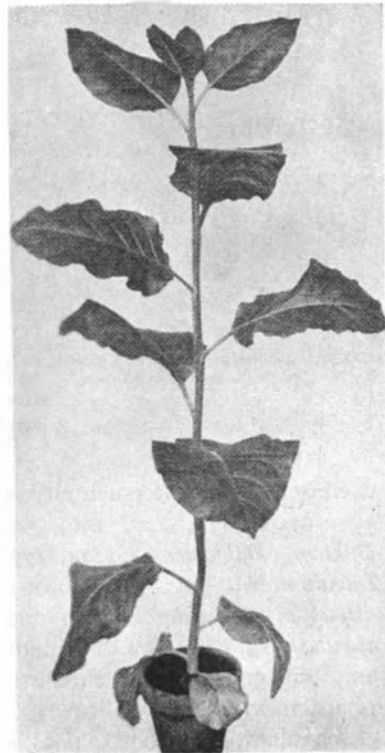
a)



b)



d)



c)

Abb. 27. Gleichaltrige Tabakpflanzen. (Nach G. MELCHERS.) Aus den Abbildungen ist die stärkere Wachstumshemmung bei den Gelbstämmen gegenüber den entsprechenden Grünstämmen deutlich zu ersehen.

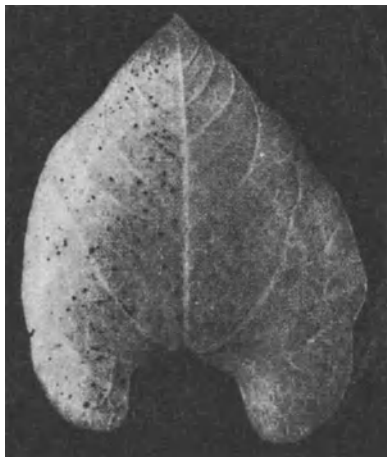
a) Mit *vulgare*, b) mit *flavum*, c) mit *Daklemense*, d) mit *luridum* infiziert.

SCHRAMM (177) näher untersuchten *tenue*-Stamm und dem von STANLEY (197) isolierten „*masked-strain*“. Dieser erzeugt auf Tabak überhaupt keine sichtbaren Symptome mehr und kann nur durch die auf *Nicotiana glutinosa* bzw. *Nicotiana rustica* hervorgerufenen Lokalnekrosen nachgewiesen werden.

In dem biologischen Verhalten der aus dem Freiland isolierten Varianten des Tabakmosaikvirus treten stärkere quantitative und qualitative Abweichungen gegenüber dem *vulgare*-Stamm auf. Von den bisher



a)



b)

Abb. 28. Qualitative biologische Unterschiede zwischen *vulgare* und *Dahlemense*. Bei beiden Blättern ist jeweils die linke Blatthälfte mit *vulgare*, die rechte Hälfte mit *Dahlemense*-Virus infiziert.
(Nach G. MELCHERS.)

a) Blatt von Java-Tabak, b) Blatt von *Phaseolus vulgaris* „Golden Cluster Wax“.

chemisch näher untersuchten Varianten sind hier zu nennen das *Aucubamosaikvirus* (12, 147, 196), das *Enationvirus* (12), das *Tomatenvirus Dahlem (Dahlemense)* (124, 177) und eine Gelbmutante desselben, das *Luridumvirus* (124, 177), sowie das *Gurkenmosaikvirus 3* (13) (*Marmor astrictum* var. *chlorogenum*) und *Gurkenvirus 4* (*Marmor astrictum* var. *aucuba*) (13, 87). Von diesen stehen die Gurkenviren dem *vulgare*-Stamm am fernsten. Sie vermehren sich nicht mehr auf den gleichen Wirtspflanzen wie das TM-Virus, so daß ein unmittelbarer biologischer Vergleich nicht möglich ist. Das *Dahlemense*-Virus ruft auf Samsuntabak ein grünes, etwas schwächeres Mosaik als das *vulgare*-Virus hervor. Im

Gegensatz zu dem *vulgare*-Stamm erzeugt es auf *Phaseolus* keine Lokalnekrosen, wohl aber auf Javatabak und auf *Nicotiana silvestris*, wo das *vulgare*-Virus eine allgemeine Erkrankung verursacht (Abb. 28a und b). Es kann auf diese Weise experimentell neben dem TM-Virus nachgewiesen werden. Die *Luridum*-Mutante unterscheidet sich vom *Dahlemense*-Virus in gleicher Weise wie das *flavum*- vom *vulgare*-Virus, erzeugt also auf türkischem Tabak ein gelbes Mosaik statt des grünen (Abb. 26 und 27 d). Es besitzt jedoch noch die typischen *Dahlemense*-Eigenschaften, nämlich auf Javatabak und *Nicotiana silvestris* Lokalnekrosen zu erzeugen.

Serologisches Verhalten. Die Verwandtschaft dieser Stämme mit dem TM-Virus wird eindeutig durch die serologischen Befunde bewiesen. Bei den durch eine einfache Mutation entstandenen Stämmen sind die serologischen Unterschiede gegenüber der Ausgangsform oft so gering, daß sie nur durch eine genaue quantitative Untersuchung festgestellt werden können. Ein solcher quantitativer Vergleich wurde von FRIEDRICH-FREKSA (unveröffentlicht) zwischen *vulgare* und der Gelbmutante *flavum* und zwischen *Dahlemense* und seiner Gelbmutante *luridum* durchgeführt. Es zeigte sich, daß in beiden Fällen die Mutanten im wesentlichen qualitativ gleiche Antigengruppen enthalten, daß jedoch die Zahl der vorhandenen Gruppen bei den Gelbstämmen vermindert ist. Es ergibt sich hierdurch die merkwürdige Erscheinung, daß der bei der Immunisierung mit der Gelbmutante gebildete Antikörper mit dem heterologen Ausgangsstamm vollständiger reagiert als mit der Mutante selbst.

Zwischen den Freilandvarianten und dem *vulgare*-Stamm sind die Unterschiede in der Antigenstruktur meist erheblich größer. Es finden sich stets qualitative Unterschiede, indem in den Varianten antigene Gruppen auftreten, die in dem TM-Virus nicht enthalten sind, bzw. fehlen bei den Varianten Gruppen, die in dem *vulgare* enthalten sind. Dies geht besonders deutlich aus Untersuchungen von BAWDEN und PIRIE (12, 13) hervor, die einen quantitativen serologischen Vergleich zwischen TM-Virus, einer Aucubamosaikvariante und Enationvirus durchführten. Wenn jede Antigengruppe durch einen Buchstaben wiedergegeben wird, so lassen sich die Unterschiede zwischen diesen Viren am einfachsten durch folgende Formel ausdrücken:

Tabakmosaik	$w, x, —, —;$
Aucubamosaik	$w, x, y, —;$
Enation	$w, —, y, z.$

Besonders groß sind die serologischen Unterschiede zwischen TM-Virus und den Gurkenviren, die nur noch wenige antigene Gruppen gemeinsam haben. Quantitative Untersuchungen von FRIEDRICH-FREKSA (unveröffentlicht) zeigten, daß das *Dahlemense*-Virus und das *vulgare*-Virus 80%

aller antigenen Gruppen gemeinsam haben und nur 20% von diesen untereinander verschieden sind. Bei der Gelbmutation dieser Stämme bleibt dieser Unterschied erhalten. Die Mutation erfolgt in dem Antigenanteil, der beiden Viren gemeinsam ist.

Größe und Gestalt. Bei der Mutation des TM-Virus treten in der Größe und Gestalt des Moleküls keine wesentlichen Änderungen auf. Bei Sedimentationsversuchen in der Ultrazentrifuge konnte bisher kein eindeutiger Unterschied der Mutanten gegenüber dem *vulgare*-Stamm festgestellt werden. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt das *Dahlemense*-Virus einen etwas kleineren Mittelwert der Länge als das *vulgare*-Virus (125). Ein Rückschluß auf den tatsächlichen Längenunterschied der beiden Viren ist jedoch nicht mit Sicherheit möglich (siehe S. 120). Die Röntgenuntersuchungen von BERNAL und FANKUCHEN (20) zeigen, daß die Mutanten den gleichen Durchmesser quer zur Längsachse des stäbchenförmigen Moleküls besitzen. Nur bei den Gurkenviren, die ja auch biologisch und serologisch stärkere Abweichungen zeigen, ergab sich ein etwas kleinerer Wert von 146 Å gegenüber 152 Å beim normalen TM-Virus. Bei den einzelnen Varianten ergaben sich jedoch gewisse Unterschiede in der relativen Intensität der Reflexe. Die Intensität der einzelnen Reflexe ist allerdings bereits bei dem Ausgangsstamm etwas von dem Alter und der Darstellungsart des Präparats abhängig. Diese Schwankungen werden von BERNAL und FANKUCHEN (20) durch eine verschiedenartige Hydratation des Moleküls erklärt und können daher wohl nicht als charakteristische Unterschiede der einzelnen Mutanten angesehen werden. Die innermolekularen Netzebenenabstände sind bei den verschiedenen Stämmen die gleichen.

Chemisches Verhalten. Im chemischen Verhalten zeigen die verschiedenen Varianten nur geringe Unterschiede. Sie kristallisieren alle wie das *vulgare*-Virus in parakristallinen Nadeln und verhalten sich in Lösung ähnlich wie dieses. Eine vergleichende Untersuchung verschiedener Varianten hinsichtlich ihres Gehaltes an aromatischen Aminosäuren und an Phosphor wurde von KNIGHT und STANLEY (86) durchgeführt.

Tabelle 7. Aromatische Aminosäuren und Phosphor in den verschiedenen Stämmen des TM-Virus (in Prozent).

Virus	Tyrosin	Tryptophan	Phenylalanin	Phosphor
Tabakmosaik	3,8	4,5	6,0	0,56
<i>Yellow aucuba</i>	3,9	4,2	6,3	0,52
<i>Green aucuba</i>	3,9	4,2	6,1	0,54
HOLMES Ribgrass	6,4	3,5	4,3	0,53
HOLMES' masked	3,9	4,3	6,1	0,54
J 14 D 1	3,8	4,4	6,1	0,55
Gurkenvirus 4	3,8	1,4	10,2	0,54
Gurkenvirus 3	4,0	1,5	10,0	0,56

Die Mutanten enthalten hiernach alle die gleiche Phosphormenge. Bei der Mutation scheint hiernach keine wesentliche Änderung des Nucleinsäuregehaltes stattzufinden. Die Veränderung in der Aminosäurezusammensetzung ist bei den Gurkenviren am größten. Diese weichen auch in ihrer übrigen chemischen Zusammensetzung stärker ab. So ist beim Gurkenvirus 4 der S-Gehalt viermal so groß wie beim normalen TM-Virus. Die Schwefelatome liegen außerdem nicht wie bei diesem in der SH-Form vor (87). Auch der als *Ribgrass* bezeichnete Stamm, der auch serologisch dem TM-Virus ferner steht, zeigt deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Aminosäuren. PFANKUCH u. Mitarb. (149) fanden bei ihrem Gelbstamm TM 88 15% weniger Phosphor als beim normalen TM-Virus. Beide Stämme ergaben bei der Natronlaugespaltung nucleinsäurefreie Bruchstücke, die sich elektrophoretisch nicht trennen lassen. Er schließt hieraus, daß durch die Mutation in diesem Fall hauptsächlich eine Veränderung im Nucleinsäureanteil erfolgt ist. Von G. SCHRAMM (177) wurde bei den Gelbstämmen *flavum* und *luridum* durch Messung der Ultraviolettaborption der gleiche Nucleinsäuregehalt wie bei den Ausgangsstämmen festgestellt. Man muß daher annehmen, daß bei den Mutationen vorwiegend das Protein verändert wird, jedoch Veränderungen im Nucleinsäureanteil nicht ausgeschlossen sind.

Eine eindeutige Unterscheidung der verschiedenen Varianten des TM-Virus ist auf elektrochemischem Wege möglich, da bei der Mutation sehr erhebliche Unterschiede in der elektrophoretischen Beweglichkeit auftreten. So fanden PFANKUCH, KAUSCHE und STUBBE (149), daß die von ihnen isolierten Gelbvarianten bei pH 7 erheblich langsamer zur Anode wandern als der Ausgangsstamm. Ein genauer Vergleich verschiedener Varianten hinsichtlich der pH-Abhängigkeit der Beweglichkeit wurde von G. SCHRAMM und L. REBENSBURG (177) durchgeführt. Es zeigte sich daß bei der Mutation des *vulgare*- bzw. des *Dahlemense*-Virus zu den entsprechenden Gelbstämmen jeweils die Beweglichkeit in Richtung zur Anode im pH-Gebiet zwischen 6 und 8 vermindert wird, während der charakteristische Unterschied zwischen den beiden Ausgangsstämmen (*vulgare* und *Dahlemense*), der im sauren Gebiet der Beweglichkeitskurve liegt, bei der Mutation nicht verändert wird (Abb. 15 und 17). Es ergibt sich also in Übereinstimmung mit den serologischen und biologischen Befunden, daß es sich bei der Mutation dieser Grünstämmen zu den entsprechenden Gelbstämmen um eine gleichartige Erscheinung handelt, die der Parallelmutation bei höheren Organismen gleichzusetzen ist. Da bei dieser Parallelmutation die charakteristischen Unterschiede zwischen *vulgare* und *Dahlemense* unbeeinflusst bleiben, darf man den Schluß ziehen, daß diese Viren eine Reihe von selbständigen Wirkgruppen enthalten, die unabhängig voneinander mutieren können.

c) Die Kartoffelviren.

Biologie der Kartoffelkrankheiten. Die Viruskrankheiten der Kartoffeln haben wohl von allen pflanzlichen Viruskrankheiten in Deutschland die größte wirtschaftliche Bedeutung. Die von verschiedenen Virusarten erzeugten Krankheiten werden unter dem Namen „Kartoffelabbau“ zusammengefaßt.

Man unterscheidet zwischen den folgenden, miteinander serologisch nicht verwandten Virusarten:

1. Das Kartoffel-X-Virus (*Marmor dubium*) besteht aus einer großen Anzahl miteinander verwandter Stämme, denen allen gemeinsam ist, daß sie auf den Blättern des *Tabaks* hellgrüne oder bräunlichweiße Ringmuster hervorrufen. Die Ausbildung der Ringmuster ist nicht selten gestört, und zwar besonders dann, wenn das X-Virus mit einem anderen Virus der X-Gruppe oder einem anderen Kartoffelvirus vermischt ist. Die meisten *Kartoffelsorten* sind gegen die Infektion mit X-Virus wenig empfindlich; sie zeigen auf dem Felde eine fast normale Entwicklung und zeigen höchstens eine schwache Mosaikfleckung. Das X-Virus verträgt zehnminutenlanges Erhitzen bei 60° und wird durch die Pfirsichblattlaus (*Mycus persicae*) nicht übertragen.

2. Das Kartoffel-Y-Virus (*Marmor cucumeris* var. *Ypsilon*) verursacht am Tabak als Anfangssymptom eine Aufhellung der Blattnerven, als Folgesymptom eine unregelmäßige, manchmal perlartige Fleckung, jedoch keine Absterberscheinungen; auf Kartoffeln erzeugt es sehr schwere Symptome. Bei fast allen Sorten treten auf der Blattunterseite schwarze Flecken abgestorbenen Gewebes auf, die vielfach den Nerven folgen und dann die Form von Strichen haben. Das Virus wird daher auch als *Strichelvirus* bezeichnet. Die Strichelnekrosen können von den Blattrippen auf den Blattstiel und den Stengel übergreifen; es kommt auf diese Weise zu den Erscheinungen des Blattschwundes, indem die unteren Blätter am Stengel heruntersinken und absterben. Weiterhin zeigen die befallenen Pflanzen vielfach abweichende Wuchsformen, und bei Sorten mit härterem Laub beobachtet man auch stärkere Kräuselerscheinungen. Das Y-Virus wird im Saft durch zehnminutenlanges Erhitzen bei 60° inaktiviert; es kann durch die Pfirsichblattlaus (*Mycus persicae*) oder durch mechanisches Einreiben auf die Blattfläche übertragen werden.

3. Das Kartoffel-A-Virus (*Marmor solani*) entwickelt am Tabak ähnliche Erscheinungen wie das Y-Virus, jedoch in sehr abgeschwächter Form. Auf Kartoffeln ruft es nur schwache bzw. gar keine sichtbaren Krankheitserscheinungen hervor. Bei einigen Sorten erzeugt es ein lebhaftes, mit leichter Blattwellung oder Kräuselung einhergehendes Mosaik. Das A-Virus wird durch zehnminutenlanges Erhitzen bei 60° abgetötet; es ist ebenfalls durch *Mycus persicae* und auf mechanischem Wege übertragbar.

4. Das Kartoffel-Z-Virus (*Marmor anglicae*) ist in Deutschland verhältnismäßig selten und erzeugt an Kartoffelpflanzen ein starkes, allerdings nur vorüber-

gehendes Einrollen der Blätter. Es kann durch den ausgepreßten Saft nicht übertragen werden, sondern nur durch Pflanzung. Das übertragende Insekt ist nicht bekannt.

5. Das Kartoffel-Blattrollvirus (*Corium solani*) erzeugt auf fast allen Kartoffelsorten eine bösartige Krankheit, die sich durch Wuchsstockung, gelbliche Verfärbung des Laubes und durch Einwärtsrollen oder Falten der Blätter äußert. Das Blattrollvirus ist durch ausgepreßten Saft nicht übertragbar. Es wird hauptsächlich durch *Mycus persicae* übertragen.

Da diese Virusarten nicht miteinander verwandt sind, können sie gleichzeitig in Kartoffelpflanzen auftreten und zu Mischinfektionen Anlaß geben, die oft sehr viel schwerere Krankheitssymptome erzeugen als die einzelnen reinen Virusarten.

In chemischer Hinsicht sind von diesen Kartoffelviren nur das X- und das Y-Virus näher untersucht, so daß auch nur diese näher besprochen werden.

Das Kartoffel-X-Virus wurde von verschiedenen Autoren aus infizierten Tabakpflanzen in reiner Form dargestellt (11, 115, 145, 201). Die Darstellung ist etwas schwieriger als beim TM-Virus, da das X-Virus nur in etwa zehnmal geringerer Konzentration im Tabaksaft vorliegt als das TM-Virus (Tabelle 2). Außerdem ist es gegen chemische Einflüsse empfindlicher als das TM-Virus. BAWDEN (9) gibt an, daß es durch wiederholte Ammonsulfatlösungen oft unlöslich wird. Es behält seine Wirksamkeit nur in einem p_H -Bereich von 4—9,5, ist also gegen Säuren erheblich unbeständiger als das TM-Virus (Abb. 20), auch der Temperaturinaktivierungspunkt (75°) liegt tiefer als bei diesem. Wegen der Empfindlichkeit des Virus empfiehlt sich die Reindarstellung mit Hilfe der Ultrazentrifuge (115, 201). Wie bei den Lösungen des TM-Virus setzt sich in konzentrierten X-Viruslösungen eine stark doppelbrechende Bodenschicht ab. Die Ordnung der Einzelteilchen in dieser Bodenschicht ist jedoch nicht so groß wie ein TM-Virus. Es ist auch noch nicht gelungen, das Kartoffelvirus in kristalliner oder parakristalliner Form zu erhalten.

In Übereinstimmung mit der Strömungsdoppelbrechung der X-Viruslösungen ergaben elektronenmikroskopische Aufnahmen von KAUSCHE, daß das X-Virus eine stäbchenförmige Gestalt besitzt (Abb. 14). Wegen der kleineren Sedimentationskonstante $s_{20} = 113$ ist anzunehmen, daß die Moleküle kürzer sind als die des TM-Virus; genauere Untersuchungen liegen jedoch nicht vor. Da in den Lösungen des X-Virus keine regelmäßige Anordnung vorhanden ist, läßt sich hier nicht wie beim TM-Virus der Durchmesser der Einzelteilchen röntgenographisch bestimmen.

Der Nucleinsäuregehalt des X-Virus ist etwa der gleiche wie beim TM Virus (Tabelle 4); es handelt sich ebenfalls um ein Ribonucleotid. Wie aus den zahlreichen Röntgeninterferenzen hervorgeht, zeigt das X-Virus eine sehr große Regelmäßigkeit in seinem inneren Aufbau. Die Anordnung der Einzelatome in dem Molekül ist jedoch verschieden von der des TM-

Virus. Die Untersuchungen sind bisher noch nicht so eingehend durchgeführt, daß bereits ein Bild über die innermolekulare Struktur des X-Virus gegeben werden kann (20).

Die Mutanten des Kartoffel-X-Virus wurden besonders von KÖHLER (88) in biologischer Hinsicht untersucht. Serologische Untersuchungen an verschiedenen X-Stämmen wurden von SALAMAN (167) durchgeführt.

Das Kartoffel-Y-Virus ist in kranken Tabakpflanzen ebenfalls nur in geringer Konzentration enthalten (Tabelle 2). BAWDEN (9) gibt den Gehalt mit 2 mg/kg Pflanzenmaterial an. MELCHERS und SCHRAMM (unveröffentlicht) konnten aus *Nicotiana tabacum* etwa 30 mg reines Y-Virus pro Kilogramm Ausgangsmaterial isolieren. Es zeigte sich, daß eine Extraktion aus den Pflanzen nur mit stärker salzhaltigen Lösungen möglich ist. Die weitere Reinigung geschah durch Ammonsulfatfällung und durch Ultrazentrifugierung. Die Sedimentationskonstante wurde in 0,5%iger Lösung zu $s_{20} = 130$ bestimmt. Auch das Y-Virus ist stäbchenförmig; nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind die Stäbchen kürzer als beim TM-Virus, was mit der geringeren Sedimentationskonstante gut übereinstimmt. Eine Kristallisation des Y-Virus ist bisher nicht gelungen. Die elektrochemischen Eigenschaften des Y-Virus sind sehr verschieden von denen des TM-Virus. Der isoelektrische Punkt scheint oberhalb von 7 zu liegen; unterhalb p_H 7 ist das Y-Virus unlöslich und kann nach dem Ausfallen erst wieder mit stark alkalischen Pufferlösungen in Lösung gebracht werden.

d) Das Tabakringfleckenvirus

(*Annulus tabaci* var. *virginiense*) (105, 102, 201).

Das Ringfleckenvirus erzeugt auf Tabak ringartige, nekrotische Primärläsionen, denen sekundäre nekrotische Ringe auf den jüngeren Blättern folgen. Auf *Vigna sinensis* (COWPEA) erzeugt es lokale Nekrosen, die für die quantitative Auswertung des Virus benutzt werden können. Das Virus wurde in Form eines einheitlichen Proteins von STANLEY und WYCKOFF (201) dargestellt. Es ist sehr unbeständig und kann daher nur mit Hilfe der Ultrazentrifugierung in befriedigender Weise gewonnen werden. Es wurden etwa 5—10 mg reines Virus aus 1 kg Tabakpflanzen erhalten. Da das Virus bereits in 24 Stunden bei Zimmertemperatur teilweise und nach 6 Tagen bei Zimmertemperatur vollständig inaktiviert ist, muß die Aufarbeitung schnell und bei möglichst tiefer Temperatur vorgenommen werden. Das p_H -Stabilitätsgebiet liegt zwischen 6 und 9 (Abb. 20). Die optimalen Bedingungen für die Aufbewahrung des Virus sind 0,01 m Phosphatpuffer vom p_H 7 und eine Temperatur von 4°. Durch Cysteinenzusatz wird die Beständigkeit des Virus nur wenig erhöht. Durch Einfrieren der salzfreien Viruslösung wird das Virus denaturiert und inaktiviert. In Gegenwart von Elektrolyten, pflanzlichen Pigmenten oder

Fleischbrühe ist es gegen Einfrieren etwas beständiger. Entgegen der ursprünglichen Ansicht (104) zeigt die Lösung des Ringfleckenvirus keine Strömungsdoppelbrechung (192); auch die relative Viskosität ist gering. Es scheint sich demnach um ein kugelförmiges Molekül zu handeln. Aus der Sedimentationskonstanten $s_{20} = 115$ berechnet sich bei einer Dichte des Virus von 1,57 und der Annahme einer Kugelform ein Molekulargewicht von $3,4 \cdot 10^6$ und ein Durchmesser von 19μ . Dieser Wert stimmt mit dem durch Ultrafiltration ermittelten Wert überein, der zwischen 16 und 21μ liegt.

Hinsichtlich seiner chemischen Zusammensetzung ist der außerordentlich hohe Nucleinsäuregehalt bemerkenswert, der über 40% des Gesamtmoleküls ausmacht (105, 192).

e) *Das Severe-Etch-Virus (Marmor crudens var. severum).*

Das Virus erzeugt auf Tabak eine hellgelbe Sprekelung mit ausgesprochen nekrotischen Ätzfiguren. Es wird durch den ausgepreßten Saft übertragen. Serologisch zeigt es keine Verwandtschaft mit den bisher besprochenen Virusarten. Eine Methode zur quantitativen Bestimmung ist nicht bekannt. Das Virus wurde von WYCKOFF und STANLEY (201) als einheitliches Protein isoliert. Zu seiner Darstellung diente ebenfalls die Ultrazentrifuge. Die Sedimentationskonstante wurde zu $s_{20} = 170$ bestimmt. Über die Gestalt des Virus ist nichts bekannt.

f) *Das Tomaten-Bushy-stunt-Virus (Marmor dodekahedron).*

Das Virus erzeugt auf Tomaten primär ringförmige oder fleckenförmige Nekrosen; auf einigen Sorten fehlt dieses Symptom. Junge Pflanzen können durch Ausbreitung der Nekrosen abgetötet werden. Bei älteren Pflanzen wird das Wachstum gehemmt, so daß eine buschige Zwergform entsteht. Auf *White Burley*-Tabak und auf *Vigna sinensis* erzeugt es primäre Lokalläsionen. Es wird durch ausgepreßten Saft übertragen. Durch zehn Minuten langes Erwärmen bei 80° wird es inaktiviert. Es ist serologisch nicht mit einem der bekannten Viren verwandt.

Das Bushy-stunt-Virus wurde von BAWDEN und PIRIE (10) in Form isotroper, rhombischer Dodekaeder kristallisiert erhalten (Abb. 2 a). Die Darstellung erfolgt durch Fällung mit Ammonsulfat; die endgültige Reinigung und Kristallisation gelang dadurch, daß das amorphe Virusprotein bei 0° leichter löslich ist als bei Zimmertemperatur. Läßt man die bei Zimmertemperatur mit Ammonsulfat bis zur Fällungsgrenze versetzte Viruslösung bei 0° 48 Stunden stehen, so geht das amorph ausgefällte Virus in Lösung und es scheiden sich gut ausgebildete Viruskristalle ab (Abb. 29). Die Reindarstellung kann auch mit der Ultrazentrifuge erfolgen, wodurch eine Inaktivierung des Virus während der Aufarbeitung vermieden wird (193).

Das Bushy-stunt-Virusmolekül besitzt eine kugelförmige Gestalt. Dementsprechend zeigt die Lösung keine Strömungsdoppelbrechung. Die Größe des Virus wurde auf verschiedenen Wegen sehr genau bestimmt. Aus dem Sedimentationsgleichgewicht (siehe S. 123) ergab sich ein Molekulargewicht von 7,6 Millionen (120). Aus der Sedimentationskonstante und der Diffusionskonstante berechnet sich das Molekulargewicht zu 10,6 Millionen (127). Der Dissymmetriefaktor f/f_0 ergibt sich zu 1,27. Das Molekül weicht also nur sehr geringfügig von der kompakten Kugel-

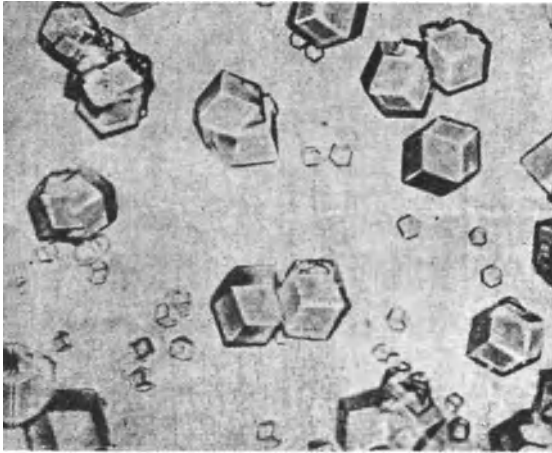


Abb. 29. Kristalle des Bushy-Stunt-Virus. (Nach BAWDEN.)

form ab. Unter Annahme einer kompakten Kugelform läßt sich aus der Sedimentationskonstanten der Durchmesser des Virus zu $27,4 \text{ m}\mu$ und das Molekulargewicht zu 8,8 Millionen berechnen (120). Dieses stimmt also sehr gut mit dem experimentell gefundenen Wert überein. Zur Erklärung des Dissymmetriefaktors muß man annehmen, daß das kugelförmige Molekül in der Lösung zu 77% hydratisiert ist. Dieser Wert erscheint recht plausibel, denn nach BAWDEN und PIRIE (10) enthält schon das Viruskristallisat 55% Kristallwasser. Die dritte Methode zur Bestimmung des Molekulargewichtes ergibt sich aus der Röntgenanalyse der Viruskristalle. BERNAL und FANKUCHEN (20) fanden hierbei einen Durchmesser der Elementarzellen von $39,4 \text{ m}\mu$ für den feuchten Kristall. Aus diesem Wert und der Dichte von 1,286 für den feuchten Kristall berechnet sich das Molekulargewicht für das hydratisierte Molekül zu $24 \cdot 10^6$. Nach Abzug des analytisch bestimmten Kristallwassergehaltes (10) ergibt sich hiernach ein Molekulargewicht von $10,8 \cdot 10^6$ für das nicht-hydratisierte Virusmolekül. Die Röntgenuntersuchungen zeigen weiter, daß die innere Struktur des Virus eine große Regelmäßigkeit aufweist, die der eines

Kristalles entspricht. Die Gitteranordnung der Kristalle entspricht der von kugelförmigen Teilchen.

Das Bushy-stunt-Virus verhält sich elektrophoretisch völlig einheitlich (127). Der isoelektrische Punkt liegt bei $pH\ 4,11$ (120). Im Gegensatz zu den anderen Virusarten ist es bei diesem pH löslich. Hinsichtlich seiner chemischen Zusammensetzung (siehe Tabelle 4) ist der relativ hohe Gehalt an Nucleinsäure von 14% bemerkenswert. Diese läßt sich mit 5% Natronlauge aus dem Protein abspalten. Sie ist ein Polyribonucleotid, das große Ähnlichkeit mit der Hefenucleinsäure zeigt (Zusammensetzung: 35,71% C, 3,87% H, 15,45% N, 9,07% P) (193).

g) *Das Tabaknekrosevirus (Marmor letale).*

Das Virus erzeugt auf Tabak nur nekrotische Primärläsionen. Die Infektion der Tabakpflanzen kann vom Boden aus durch die Wurzel erfolgen. Hierbei wird die äußere Erscheinung der Pflanze wenig in Mitleidenschaft gezogen, wenn auch zuweilen die älteren Blätter nekrotisch werden und absterben. Die Übertragung kann durch den Preßsaft erfolgen. Ein Insektenüberträger ist nicht bekannt. Der Inaktivierungspunkt liegt bei 90° . Das Virus ist recht beständig und hält sich in getrockneten Blättern monatelang.

Die Darstellung des reinen, kristallisierten Virusproteins erfolgte durch PIRIE und Mitarbeiter (151). Es kristallisiert in dünnen, rhombischen Plättchen. Die Darstellung erfolgte durch fraktionierte Fällung mit Alkohol und Kristallisation aus Ammonsulfatlösungen in ähnlicher Weise wie beim Bushy-stunt-Virus. Die Sedimentationskonstante wurde zu $s_{20} = 130$ bestimmt. Wahrscheinlich handelt es sich auch hier um ein annähernd kugelförmiges Molekül. Der Phosphor- und Kohlenhydratgehalt ist im Vergleich mit dem des TM-Virus ebenfalls sehr hoch und entspricht etwa dem des Bushy-stunt-Virus (Tabelle 4).

h) *Die Polyederviren der Insekten.*

Die Larvenstadien vieler Insektenarten werden von einer Viruskrankheit befallen, die nach ihrem charakteristischen Symptom als „Polyederkrankheit“ bezeichnet wird. Am besten untersucht sind die Polyederkrankheit der Seidenraupe, des Schwammspinners und der Nonne. Ein Überblick über die bei anderen Insekten beobachteten Polyederkrankheiten befindet sich bei BERGOLD (16). Die Erkrankung der Seidenraupe tritt seuchenhaft auf und bildet eine Gefahr für die Aufzucht. Auf Grund der hierbei auftretenden äußeren Krankheitssymptome wird die Seuche auch als „Fettsucht“ oder „Gelbsucht“ der Seidenraupe bezeichnet. Die gewaltigen Massenauftritte der Forstschädlinge Schwammspinner und Nonne finden fast stets durch das Ausbrechen der Polyederkrankheiten ihr Ende.

Bei den kranken Raupen treten in den Kernen der befallenen Zellen ungeheure Mengen 1—15 μ große polyederartige Gebilde auf. Diese Polyeder sind Eiweißkristalle. Die Kristallnatur ergibt sich aus der oft sehr regelmäßigen Begrenzung (Abb. 6) und wird durch röntgenographische Untersuchungen einwandfrei bewiesen. Über den Zusammenhang dieser Polyeder mit der Ätiologie der Krankheit war man sich lange im unklaren. Wegen ihrer Unlöslichkeit sind die reinen Polyeder bei subcutaner Injektion nicht infektiös. BERGOLD und SCHRAMM (19) zeigten, daß bei der Auflösung der Polyeder in schwachem Alkali zwischen p_H 9—11 ein völlig einheitlicher Eiweißstoff entsteht, der noch in außerordentlich hoher Verdünnung subcutan und peroral wirksam ist. Das Protein aus den Nonnenpolyedern erwies sich z. B. per os noch in einer Dosis von $2,5 \cdot 10^{-15}$ g je Raupe als infektiös. Neben der Höhe der Viruswirksamkeit sprechen besonders Zentrifugierungs- und Ultrafiltrationsversuche für die Identität des aufgelösten Polyederproteins mit den entsprechenden Insektenviren. Sie zeigen, daß die infektiöse Einheit die gleiche Größe besitzt wie das Protein.

Der Zerfall der Polyeder zu einem einheitlichen Virusprotein beweist, daß die Polyeder selbst als kristallisierte Viren aufzufassen sind. Neben dem kristallisierten Virus findet sich in den kranken Raupen auch gelöstes Virus, das durch Ultrafiltration von den kristallisierten Polyedern abgetrennt werden kann. Die Reindarstellung dieser Viren erfolgt durch Auflösung der gewaschenen Polyeder. Die Rekrystallisation des gelösten Proteins ist bisher noch nicht gelungen.

Das Virus der Seidenraupe, des Schwammspinners und der Nonne stimmen nach Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge in ihrer Größe überein. Die Sedimentationskonstante beträgt bei allen Viren $s_{20} = 10$ (18, 19). Hieraus berechnet sich bei Annahme einer kugelförmigen Molekülgestalt ein Molekulargewicht von 200 000—300 000 und ein Moleküldurchmesser von 8—10 $m\mu$. Dieser Wert stimmt mit den Ultrafiltrationsversuchen gut überein. Sie zeigen, daß die Viren noch Filter mit einer mittleren Porenweite von 20 $m\mu$ durchdringen können. Da das Verhältnis der Grenz-porenweite zum Teilchendurchmesser bei dieser Porenweite etwa 0,44 beträgt, muß das Virus einen kleineren Durchmesser als 10 $m\mu$ haben. Die Polyederviren stellen daher die kleinsten bisher bekannten Virusarten dar.

Die Polyederviren sind auch in elektrochemischer Hinsicht völlig einheitlich. Trotz ihrer nahen Verwandtschaft, die auch serologisch nachgewiesen ist, lassen sie sich durch ihr Verhalten bei der Elektrophorese unterscheiden (Abb. 16). Der isoelektrische Punkt des Schwammspinnerproteins liegt bei p_H 5,7; beim Nonnen- und Seidenraupenprotein liegt er etwas niedriger, etwa zwischen 5,3 und 5,6 (Abb. 16). In einem p_H -Bereich zwischen 4 und 7, in der Nähe des isoelektrischen Punktes, sind die Proteine völlig unlöslich; bei der Annäherung an diesen Bereich neigen auch die ge-

lösten Virusproteine zur Aggregation, so daß man dann in der Ultrazentrifuge höher aggregierte Produkte nachweisen kann. In stärker alkalischer Lösung zerfallen die Polyederproteine in niedermolekulare Spaltproteine. Der Zusammensetzung nach handelt es sich bei den Polyederviren um Nucleoproteide. Dies geht vor allem aus dem Absorptionsspektrum hervor, das die typische Absorptionsbande der Nucleinsäure zeigt. Aus der geringen Höhe des Absorptionsmaximums und dem geringen Phosphorgehalt ergibt sich jedoch, daß der Nucleinsäuregehalt sehr klein ist (19). DUSPIVA und BERGOLD (46) untersuchten die enzymatische Aktivität des gelösten Polyedervirus. Es ließ sich keine Phosphatase- oder Dipeptidasewirkung feststellen.

i) Das Virus der Maul- und Klauenseuche.

Das Virus der Maul- und Klauenseuche erzeugt bei Zweihufern eine fieberhafte, hochkontagiöse Krankheit, die mit der Entwicklung charakteristischer Blasen (Aphten) an den unbchaarten Stellen der Epidermis und auf den mit Plattenepithel versehenen Schleimhäuten des Verdauungstraktus einhergeht. Das Virus kann auch auf andere Haustiere, z. B. Ziegen und Schweine, sowie auf das Meerschweinchen übertragen werden; jedoch ist das Rind das weitaus empfindlichste Tier. Es kann auch auf den Menschen übertragen werden, doch sind spontane Infektionen sehr selten, da hierfür neben einer großen Virulenz des Virus noch besondere, infektionsfördernde Momente notwendig sind. Das Virus findet sich hauptsächlich in den Aphten, läßt sich aber auch im Blut und den Organen nachweisen.

Das Virus ist gegen Wärme ziemlich empfindlich, aber recht widerstandsfähig gegen Kälte. Nach PYL und KLENK (157) ist das Virus am haltbarsten bei p_H 6,8 in $m/15$ Phosphatpuffer und 13 Vol.-% Glycerin. Die ersten Versuche zur Anreicherung des Maul- und Klauenseuchevirus wurden von PYL (156) durchgeführt. Durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd bei p_H 9,2 bzw. Kaolin bei p_H 7,6 und nachfolgende Elution gelang ihm eine erhebliche Anreicherung und Reinigung des Virus.

Die Reindarstellung des Virus und seine Charakterisierung als einheitliches Protein erfolgte durch JANSSEN (74). Als Ausgangsmaterial wurde der Inhalt der Hautbläschen erkrankter Schweine benutzt. Durch abwechselndes hochtouriges Zentrifugieren in der luftgetriebenen Ultrazentrifuge bei 27000 Touren pro Minute (5000fache Erdschwere) und niedertourige Zentrifugierung bei 3000 Touren pro Minute wurde ein einheitliches Protein mit einer Sedimentationskonstante von $s_{20} = 17$ erhalten, das nahezu die Gesamtaktivität des Ausgangsmaterials enthielt. Die Viruskonzentration der Blasenlymphe ist verhältnismäßig hoch. Nach vorläufigen Berechnungen enthält 1 ccm Lymphe etwa 1 mg Virusprotein. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen von v. ARDENNE und

PYL (6) scheint das Maul- und Klauenseuchevirus eine annähernd kugelförmige Gestalt zu besitzen. Unter dieser Annahme würde sich aus der Sedimentationskonstante ein Molekulargewicht von etwa 400000 errechnen. Mit diesem verhältnismäßig geringen Molekulargewicht stimmen die Filtrationsexperimente überein, nach denen das Virusprotein einen Durchmesser von etwa 10 m μ besitzt. Das Virus der Maul- und Klauenseuche läßt sich auch durch Fällung mit Salzen oder organischen Lösungsmitteln anreichern. Die auf chemischem Wege von JANSSEN (73) dargestellten Präparate zeigen jedoch eine starke Aggregation. Analytisch wurde in den Präparaten Phosphor und Kohlenhydrat nachgewiesen, so daß es sich wohl um ein Nucleoprotein handelt.

k) Das Encephalomyelitisvirus der Maus.

Das Encephalomyelitisvirus der Maus (THEILERSches Virus) ist ein neurotropes Virus, das in seinem Verhalten dem Virus der menschlichen Kinderlähmung sehr nahesteht. Es findet sich hauptsächlich im Rückenmark, läßt sich aber auch im Darm junger, äußerlich gesunder Mäuse nachweisen. GARD und PETERSEN (58) gelang es, dieses Virus in Form eines einheitlichen Proteins aus dem Gehirn erkrankter Mäuse darzustellen. Zur Reindarstellung müssen aus dem Gehirnextrakt zunächst die in großen Mengen vorhandenen Lipide durch Extraktion mit Äther entfernt werden. Die weitere Anreicherung erfolgte durch Fällung mit Ammonsulfat, Wiederaufnahme des Niederschlages in destilliertem Wasser und Konzentrierung der Lösung durch Ultrafiltration. Zur endgültigen Reinigung wurde die Ultrazentrifugierung benutzt. Das dargestellte Eiweiß enthielt 30—50% der ursprünglichen Aktivität. Dies entspricht einer Erhöhung der Aktivität um das Tausendfache pro Volumeneinheit. Das zunächst dargestellte Konzentrat enthielt drei Eiweißkomponenten mit den Sedimentationskonstanten 40, 160 und 210. Die Konzentration der drei Komponenten war etwa gleich und entsprach 0,5 mg pro 100 g Mäusegehirn. In normalen Mäusehirnen, die in gleicher Weise aufgearbeitet wurden, waren nur die Komponenten mit $s_{20} = 40$ und 210, jedoch keine Spur der mittleren Komponente mit $s_{20} = 160$ vorhanden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die mittlere Komponente, die nur in dem aktiven Material vorhanden war, das Virusprotein darstellt. Dies wird auch noch dadurch gestützt, das sich für den Träger der Viruswirksamkeit ebenfalls eine Sedimentationskonstante von $s_{20} = 160$ —170 ergibt, wenn man die Sedimentation nicht optisch, sondern durch Aktivitätsbestimmungen verfolgt. An einem praktisch reinen Viruspräparat wurde eine Bestimmung der Diffusionskonstante durchgeführt, die einen Wert von 0,27 bis $0,33 \cdot 10^{-7}$ ergab. Aus der Diffusionskonstante und der Sedimentationskonstante berechnet sich ein Molekulargewicht von 52 Millionen. Der Dissymmetriefaktor $///_0$ entspricht einem stäbchenförmigen Molekül

mit einem Achsenverhältnis von 47:1. Die stäbchenförmige Gestalt des Encephalomyelitisvirus der Maus wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von TISELIUS und GARD (208) bestätigt. Auf den elektronenmikroskopischen Bildern der Virusproteine finden sich stäbchenförmige Moleküle, die in langen Fäden aggregiert sind. Die Fäden erinnern in ihrem Aussehen an die Aggregate des TM-Virus, sind jedoch viel biegsamer. Der Durchmesser beträgt etwa $15\text{ m}\mu$ und entspricht somit etwa dem TM-Virus.

Interessanterweise finden sich ähnliche fadenförmige Gebilde auch in dem Darm äußerlich gesunder Mäuse. TISELIUS und GARD (208) konnten aus dem Kot gesunder Tiere einen Eiweißstoff isolieren, der aus einer einzigen, allerdings nicht völlig homogenen Komponente bestand. Die Sedimentationsgeschwindigkeit hing stark von der Konzentration ab, so daß sie nicht mit Sicherheit bestimmt werden konnte. Die Diffusionskonstante wurde zu $D_{20} = 0,20 \cdot 10^{-7}$ bestimmt. Der Stoff erwies sich im Tierversuch als aktiv. Ein gleichartiges Protein, das jedoch keine biologische Wirksamkeit aufwies, wurde aus dem Kot alter Mäuse (ein Jahr und älter) sowie aus dem Kot von wilden grauen Ratten gewonnen. Bei weißen Ratten oder Meerschweinchen konnte keine derartige Komponente aufgefunden werden. Auf den elektronenmikroskopischen Abbildungen zeigen die aus Kot isolierten aktiven oder inaktiven Proteine eine ähnliche Gestalt wie das aus dem Gehirn isolierte Neurovirus; serologisch ergab sich jedoch keine Verwandtschaft zwischen dem Darmvirus und dem Neurovirus.

1) *Das Virus der Kinderlähmung (Polyomyelitis).*

Die Polyomyelitis tritt teils einzeln, teils epidemisch auf. Sie kann nach fieberhaften Anfangssymptomen unter Umständen zu verschiedenartigen Lähmungserscheinungen führen. Diese schweren Fälle sind aber verhältnismäßig selten, sehr häufig klingt die Krankheit bereits in dem fieberhaften Frühstadium ab, ohne Schäden zu hinterlassen. Das Polyomyelitisvirus ist außer für den Menschen nur für den Affen pathogen. Für die biologische Auswertung ist man also ausschließlich auf dieses kostspielige und schwer zu haltende Versuchstier angewiesen. Im kranken Organismus findet sich das Virus hauptsächlich im Gehirn und im verlängerten Mark, kann aber auch im Nasenrachenraum und im Darm nachgewiesen werden.

Das Virus der Polyomyelitis ist gegen Wärme ziemlich empfindlich. Bei Aufbewahrung bei Zimmertemperatur geht seine Virulenz allmählich verloren. Durch halbstündiges Erwärmen auf 50° wird das Virus zumeist zerstört. Durch Abkühlung wird das Virus nicht geschädigt, sondern kann in gefrorenem Zustand lange Zeit unverändert aufbewahrt werden.

Es sind verschiedentlich Versuche unternommen worden, das Polyomyelitisvirus aus Rückenmarkssuspensionen in konzentrierter Form zu

gewinnen. CLARK, SCHINDLER und ROBERTS (35) zeigten, daß das Virus sich durch Halbsättigung mit Ammonsulfat ausfällen läßt. Von SABIN (166) wurden Versuche unternommen, das Virus durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd zu reinigen. Aus dem Adsorbat lassen sich mit primärem Phosphat unwirksame Bestandteile entfernen, während mit sekundärem Phosphat das Virus wieder eluiert werden kann. BROWN und KOLMER (25) erhielten durch Ammonsulfatfällung und Fällung mit verdünnter Essigsäure ein infektiöses Protein, dessen Reinheit jedoch nicht näher untersucht wurde.

TISELIUS und GARD (208) erhielten aus dem Gehirn und Rückenmark an Polyomyelitis verstorbener Menschen in minimalen Mengen (etwa 0,05 mg) eine Substanz, die eine Sedimentationskonstante von der gleichen Größenordnung wie das von ihnen isolierte Mäusevirus aufwies. Jedoch könnte der genaue Wert wegen der geringen Materialmenge nicht bestimmt werden. Nach intercerebraler Impfung auf Affen rief das Präparat typische Polyomyelitis hervor. Auch aus menschlichem Kot wurde eine Substanz gewonnen, die im wesentlichen der aus Mäusekot ähnelt. Auch dieses Präparat erwies sich bei der Impfung auf Affen aktiv. Das aus Kot gewonnene Protein ist mit den auf gleiche Weise gewonnenen Mäuse- und Rattenpräparaten serologisch nahe verwandt. Diese erzeugen in Antihumanserum ein gleichartiges Präcipitat wie das homologe menschliche Antigen und umgekehrt. Die aus Nervenmaterial gewonnenen Präparate geben jedoch keine Fällung mit Antiseren gegen die aus Kot gewonnenen Substanzen. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt das Darmvirus des Menschen ebenfalls eine fadenförmige Struktur.

Wegen der Schwierigkeit der Gewinnung und der quantitativen biologischen Auswertung steht die Chemie des Polyomyelitisvirus erst in ihren Anfängen. Die nahe Verwandtschaft mit dem besser untersuchten Mäuse-Encephalomyelitisvirus spricht dafür, daß es diesem auch in chemischer Hinsicht nahesteht, und wie dieses ein stäbchenförmiges Molekül ist.

m) Das Kaninchenpapillomvirus.

Bei nordamerikanischen Cottontail-Kaninchen ist ein gutartiges, aber sehr ansteckendes Hautpapillom verbreitet. An fast allen Körperteilen treten bei dieser Krankheit etwa 2 cm hohe, stark verhornte, meist einzeln stehende Warzen auf, die häufig von selbst abfallen oder sich spontan zurückbilden. SHOPE (182) zeigte 1933, daß die Warzen durch zellfreie Ultrafiltrate auf Tiere derselben Gattung übertragbar sind, also durch ein Virus ausgelöst werden. Nach SHOPE und anderen Beobachtern sind auch Hauskaninchen für das Papillomvirus empfänglich. Die Papillome werden hier erheblich größer und sind gefäßreicher. Sie können sich im Laufe der Entwicklung bei den Hauskaninchen in Carcinome umwandeln,

die auch zur Bildung von Metastasen führen. Bei Cottontail-Kaninchen kommt solche carcinomartige Entartung nur in ganz seltenen Ausnahmefällen vor. Das Hauskaninchenpapillom läßt sich in der Regel nicht zellfrei weiterübertragen, auch kann aus diesem kein Virusprotein isoliert werden.

Worauf die Inaktivität des Virus in den Hauskaninchenpapillomen beruht, ist noch unsicher. In dem Hauskaninchenpapillom scheint ein spezifisches Enzym vorzukommen, welches das Virus hydrolysiert (21). Versuche zur Aktivierung des Virus in den unwirksamen Papillomextrakten des Hauskaninchens waren gelegentlich erfolgreich, bedürfen jedoch einer näheren Nachprüfung (40). Auch die Provokation des Virus in gesunden Hauskaninchen durch unspezifische Reize hat sich bei weiteren Versuchen nicht bestätigen lassen.

Aus den Papillomen von Cottontail-Kaninchen erhielten BEARD und WYCKOFF (14) durch abwechselndes hochtouriges und niedertouriges Zentrifugieren einen einheitlichen, hochmolekularen Eiweißstoff, dessen Identität mit dem Virus sichergestellt wurde. Nach Versuchen von NEURATH u. a. (128) beträgt die Ausbeute 200 mg reines Virusprotein aus 400 g Warzenmaterial. Das Protein erzeugte noch in einer Dosis von 10^{-8} g Papillome bei den Kaninchen. In der Ultrazentrifuge sedimentiert das Protein mit einer scharfen Grenzzone. Die Sedimentationskonstante wurde zu $s_{20} = 280$ bestimmt. Auch bei der Diffusion verhält es sich völlig einheitlich. In konzentrierten Lösungen ergeben sich Störungen durch die gegenseitige Beeinflussung der Teilchen, in verdünnten Lösungen unterhalb 0,2% erhält man eine ideale Diffusionskurve, aus der sich die Diffusionskonstante zu $0,58 \cdot 10^{-7}$ ergibt. Das spezifische Volumen von 0,754 stimmt mit dem eines normalen Eiweißkörpers überein. Aus der Sedimentationskonstante und der Diffusionskonstante berechnet sich das Molekulargewicht zu 47 Millionen. Die Dissymmetriekonstante f/f_0 beträgt 1,49. Das Papillomvirus scheint demnach nicht allzu sehr von der Kugelform abzuweichen. Seine Lösung zeigt keine Strömungsdoppelbrechung. Für die relative Viskosität des Proteins ergab sich eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration bis herauf zu einer 0,8%igen Lösung. Dies spricht ebenfalls dafür, daß es sich um ein annähernd kugelförmiges Proteinmolekül handelt.

Elektrophoreseversuche im TISELIUS-Apparat zeigen, daß das Protein auch in elektrochemischer Hinsicht völlig einheitlich ist. Bei p_H 3,78 in einer 0,1 ionalen Pufferlösung wurde die Beweglichkeit in Richtung zur Kathode zu $+3,7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec} \cdot V^{-1}$ bestimmt. Von SHARP u. a. (180) wurde die p_H -Beweglichkeitskurve im p_H -Gebiet von 3,7—7,8 im TISELIUS-Apparat gemessen. Der isoelektrische Punkt liegt hiernach bei p_H 5,0. In der Nähe des isoelektrischen Punktes ist das Protein unlöslich.

n) Die Elementarkörper der Vaccine.

Das Vaccinevirus (Kuhpockenvirus) ist eine Variante der Variola (Menschenpocken). Es ruft beim Menschen keine allgemeine Pocken-erkrankung, sondern nur lokalisierte Erscheinungen hervor, die aber zu einer festen Immunität führen. Hierauf beruht die allgemeine Pocken-schutzimpfung von JENNER. Das Virus findet sich hauptsächlich in den Pockenpusteln, tritt aber auch im Blut und den inneren Organen auf, ohne hier besondere Veränderungen zu erzeugen. Die biologische Auswertung des Virus erfolgt im Verdünnungstest meist am Kaninchen.

Als einzige Träger der Viruswirksamkeit gelten die in dem erkrankten Hautgewebe auftretenden Elementarkörper, die zuerst von PASCHEN durch eine geeignete Färbung sichtbar gemacht und als Erreger der Pocken erkannt wurden (Abb. 1 und 3). Die Elementarkörper werden daher auch als PASCHEN-Körper bezeichnet. Bei der leichten Verwechslungsmöglichkeit mit anderen Granula wurde zunächst die Entdeckung von PASCHEN wenig beachtet und fand erst allgemeine Anerkennung, nachdem die Elementarkörper in reiner Form dargestellt worden waren und ihre Spezifität durch die Agglutination mit Vaccineantiserum und ihre hohe Wirksamkeit nachgewiesen war (106).

Zur Darstellung der Elementarkörper eignen sich am besten die Methoden von CRAIGIE (38) sowie von PARKER und RIVERS (134). Durch Zentrifugierung des Gewebeextrakts bei etwa 12000 Touren, Wiederaufnehmen des Niederschlages in 0,004 m Citrat-Phosphat-Puffer vom pH 7, und Entfernung unlöslicher Bestandteile durch gewöhnliche Zentrifugierung erhält man eine Lösung der Elementarkörper, die durch Wiederholung des Prozesses noch weiter gereinigt werden kann. Bei den reinsten Präparaten entspricht die Grenzdosis der Wirksamkeit dem Gewicht von zwei bis drei PASCHEN-Körpern. Aus der Dosisabhängigkeit der Wirksamkeit kann man schließen, daß für die Infektion nur ein einziger Elementarkörper erforderlich ist (219).

Nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen von H. RUSKA (164) (Abb. 2) besitzen die Elementarkörper eine verhältnismäßig einheitliche, quaderförmige Gestalt mit einer Dimension von etwa $170 \times 250 \mu\mu$. Nach Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge ergibt sich für diese ebenfalls eine recht einheitliche Größe, die jedoch nicht mit der Einheitlichkeit eines reinen Proteins zu vergleichen ist. Ihr mittlerer Durchmesser berechnet sich aus der Sedimentationskonstante $s_{20} = 5000$ zu etwa 236 bis 252 $\mu\mu$, ihr Teilchengewicht zu etwa 2,3 Milliarden (119, 150, 186).

Die reinen Elementarkörper zeigen eine relativ große Konstanz in ihren serologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften. Sie bestehen aus Eiweiß (82%), Thymonucleinsäure (4—8%), ätherlöslichen Lipoiden (6,5—10%) und Kohlenhydrat. Der Phosphor (0,4—0,8%) liegt wahrscheinlich vollkommen in Form von Thymonucleinsäure vor (119, 184).

Die Anwesenheit von Ribonucleinsäure läßt sich jedoch nicht ausschließen. Die Elementarkörper weisen einen Kupfergehalt von 0,05% auf, der auf keine Weise von dem Virus abgetrennt werden kann, während künstliche Zusätze an Kupferionen leicht entfernt werden können (68). Die Emissionsspektralanalyse zeigt, daß das Virus außer Kupfer keine andere Metallkomponente enthält. Mit Hilfe chromatographischer Verfahren konnte unter Zerstörung der Elementarkörper ein im Ultraviolett fluoreszierender Bestandteil isoliert werden, der mit Hilfe des spezifischen Apoferments der d-Aminosäureoxydase als Flavin-Adenin-Dinucleotid identifiziert werden konnte (69). Sorgfältige spektroskopische Untersuchungen zeigten, daß die Elementarkörper weder Cytochrome noch Cytochromoxydase enthalten (68).

Bei vorsichtiger Behandlung mit verdünnter Natronlauge zerfallen die Elementarkörper in ein Nucleoprotein und ein Protein, das als Antigen S bezeichnet wird. Dieses Protein bildet mengenmäßig einen sehr beträchtlichen Anteil der Elementarkörper (184). Es ist hitzestabil und gibt positive Reaktionen auf Glukosamin und Glukuronsäure (134a), es enthält nach Absorptionsmessungen aromatische Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, und weist einen für Proteine charakteristischen N-Gehalt von 16,5% auf. Der Gehalt an Kohlenhydraten kann daher nicht sehr groß sein. Für die Eiweißnatur des Stoffs spricht auch, daß bei der Einwirkung von Pepsin die serologische Aktivität verschwindet. Das S-Antigen kommt im Organismus stets als Begleiter der Elementarkörper vor. Es ist hierbei an ein hitzelabiles Protein, das Antigen L, gebunden. Es kann von diesem nicht mit Hilfe spezifischer, serologischer Präzipitinreaktionen getrennt werden, da der reine S-Antikörper stets den gesamten LS-Komplex ausfällt. Über die chemische Zusammensetzung des L-Proteins ist noch nichts Näheres bekannt. Es stammt wahrscheinlich ebenfalls aus den Elementarkörpern.

Die Elementarkörper besitzen also eine wesentlich kompliziertere Zusammensetzung als die bisher beschriebenen kleinen Virusarten. Es läßt sich jedoch nicht ausschließen, daß die Elementarkörper als Verband kleinerer infektiöser Einheiten aufzufassen sind (siehe S. 96). Gegenüber den Mikroorganismen scheint jedoch der Aufbau der Elementarkörper noch relativ einfach. Elektronenmikroskopische Aufnahmen sprechen dafür, daß die Elementarkörper eine gewisse innere Struktur aufweisen (60). Jedoch besitzen die Elementarkörper keine Membran von der Art, wie wir sie bei Einzellern finden. Sie können getrocknet, mit Äther oder Benzol extrahiert und ohne Wirksamkeitsverlust mit dem gleichen Grad von Einheitlichkeit wie vor der Behandlung gelöst werden. Bei dieser Extraktion werden 8—10% Lipide extrahiert. Bei der Behandlung mit Alkohol und Äther werden weitere Lipide herausgelöst, hierbei verlieren aber die Elementarkörper ihre Wirksamkeit und die Lösung wird in-

homogen. Die Elementarkörper sind in der Lösung stark hydratisiert. Nach sorgfältigen Versuchen von MCFARLANE u. a. (1919) kann das hydratisierte Teilchen das 7—8fache Volumen des trockenen besitzen. Diese Hydratation ist unabhängig von dem osmotischen Druck der Lösung, die Hydrathülle sedimentiert in der Ultrazentrifuge nicht mit den Elementarkörpern; diese Wassermenge kann also nicht in einer Membran enthalten sein, sondern muß die Elementarkörper von außen umgeben.

o) Die Bakteriophagen.

Die Wirkung der Phagen auf die Bakterien besteht in einer Auflösung, die sich mikroskopisch oder in der Kultur verfolgen läßt. In dicken Plattenkulturen bilden sich aufgehellte Flecken, die oft scharf unrandet sind. Die Zahl dieser auch als *tasches vierges* bezeichneten Löcher kann als quantitatives Maß für die Wirksamkeit eines Phagenpräparats benutzt werden. Ein anderer Test beruht auf der Bestimmung der Phagenmenge, die in einer bestimmten Zeit unter Standardbedingungen eine gewisse Bakterienmenge auflöst.

NORTHROP (1932) gelang es 1936, einen Staphylococcenphagen auf chemischem Wege in Form eines Nucleoproteids darzustellen. Ausgehend von 200 Liter einer Staphylococcenkultur in Hefewasser erhielt er ohne wesentlichen Verlust an Wirksamkeit etwa 60 mg reines Protein, das, bezogen auf die Menge des Ausgangsmaterials etwa die hundertfache Wirksamkeit besaß. 10^{-16} g N dieses reinen Phagen genügten, um eine Bakteriolyse hervorzurufen. Für die Reinheit des dargestellten Proteins spricht die Unabhängigkeit seiner Löslichkeit von der Menge des vorhandenen Bodenkörpers. Die Identität des dargestellten Proteins mit dem Phagen wurde von NORTHROP durch eine Reihe sorgfältiger Untersuchungen sichergestellt.

Die Molekülgröße des Phagenproteins konnte nicht genau bestimmt werden, da das Protein augenscheinlich sehr zu Aggregation neigt und damit das Teilchengewicht stark von der Konzentration abhängig ist. Auf Grund von Diffusionsmessungen berechnet sich ein Teilchengewicht von 400 000 (Konzentration 0,001 mg Protein/ccm) bis 300 Millionen (Konzentration 0,1 mg Protein/ccm). Die Sedimentationskonstante konnte von WYCKOFF (1928) nur in der konzentrierteren Lösung bestimmt werden. Er fand $s_{20} = 650$, was etwa einem Molekulargewicht von 300 Millionen entspricht. Der Durchmesser der Teilchen würde hiernach zwischen 10 und 90 $m\mu$ liegen. Für das Phagenprotein ergab sich folgende Analyse: C 41%, H 4,3%, N 14,3%, P 4,8%, Asche 3,0%, Glukose 3,5%. Dem Absorptionsspektrum nach handelt es sich um ein Nucleoprotein. Die Analyse zeigt, daß es mehr P enthält als der Nucleinsäure entspricht. Auf die Struktur des Phagenproteins lassen sich aus den bisherigen Untersuchungen noch keine Schlüsse ziehen. Von H. RUSKA (1965) wurden

elektronenmikroskopisch in durch Bakteriophagen aufgelösten Bakterienkulturen eigenartige Körper nachgewiesen, die sich in normalen Kulturen nicht finden; er bezeichnete sie als „d'Herellen“ und nimmt an, daß sie wahrscheinlich mit den Bakteriophagen identisch sind. Sie zeigen geometrisch ziemlich komplizierte Formen, neben kugeligen und stäbchenförmigen Teilchen findet er auch keulenförmige Gebilde etwa von der Gestalt eines Spermatozoon. Falls die Identität der d'Herellen mit den Bakteriophagen sich sichern läßt, müßte demnach für diese ein verhältnismäßig komplizierter Aufbau angenommen werden.

Literaturverzeichnis.

1. ADAIR u. ADAIR: *Biochemie*, J. **38**, 199, 1230 (1934).
- 1a. ALLARD, H. A.: *Science (New York)* **95**, 479 (1942).
2. ANDREWES, C. H.: *J. Pathol. Bacteriology* **43**, 23 (1936).
3. ANSON, M. L. u. W. M. STANLEY: *J. gen. Physiol.* **24**, 679 (1941).
4. ARDENNE, M. v.: *Elektronenübermikroskopie*. Berlin: Springer, 1940.
5. — u. H. FRIEDRICH-FREKSA: *Naturwiss.* **29**, 523 (1941).
6. — u. G. PYL: *Naturwiss.* **28**, 531 (1940).
7. ARRHENIUS, S.: *Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis*, Ser. IV, **12**, Nr. 5 (1940); *Physik. Z.* **40**, 534 (1939).
8. BALD, J. G. u. G. SAMUEL: *Ann. appl. Biol.* **21**, 179 (1934).
9. BAWDEN, F. C.: *Plant Viruses and Virus Diseases*. Leiden (Holland), 1939.
10. — u. N. W. PIRIE: *Brit. J. exp. Pathol.* **19**, 251 (1938).
11. — — *Brit. J. exp. Pathol.* **19**, 66 (1938).
12. — — *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. B **123**, 274 (1937).
13. — — *Brit. J. exp. Pathol.* **18**, 275 (1937).
14. BEARD, J. W. u. R. W. G. WYCKOFF: *Science (New York)* **85**, 201 (1937).
15. BECHOLD, H. u. M. SCHLESINGER: *Biochem. Z.* **236**, 387 (1931).
16. BERGOLD, G.: *Biol. Zbl.* **63**, 1 (1943).
17. — u. R. BRILL: *Kolloid-Z.* **99**, 1 (1942).
18. — u. J. HENGSTENBERG: *Kolloid-Z.* **98**, 304 (1942).
19. — u. G. SCHRAMM: *Biol. Zbl.* **62**, 105 (1942).
20. BERNAL, J. D. u. J. FANKUCHEN: *J. gen. Physiol.* **25**, 111, 147 (1941).
21. BERNHEIM, F., M. L. C. BERNHEIM, A. R. TAYLOR, D. BEARD, D. G. SHARP u. J. W. BEARD: *Science (New York)* **95**, 230 (1942).
22. BITTNER, J. J.: *Amer. J. Cancer* **30**, 530 (1937); **35**, 90 (1939); **36**, 44 (1939).
23. BORN, H. J., A. LANG u. G. SCHRAMM: *Arch. Virusforsch.* **2**, 461 (1943).
24. BORRIES, B. v. u. E. RUSKA: *Erg. exakt. Naturwiss.* **19**, 237 (1940).
25. BROWN, H. u. J. A. KOLMER: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **37**, 137 (1937).
26. BURGERS, J. M.: *Kon. nederl. Akad. Wetensch., Verh. Eerste Sektie, D I* **16**, 113 (1938).
27. BUTENANDT, A.: *Ber. dtsh. chem. Ges.* **75 A**, 193 (1943).
28. —, H. FRIEDRICH-FREKSA, ST. HARTWIG u. G. SCHEIBE: *Z. physiol. Chem.* **274**, 276 (1942).
29. — *Angew. Chem.* **53**, 345 (1940).
30. CALDWELL, J.: *Ann. appl. Biol.* **18**, 279 (1931); **19**, 144 (1932).
31. CARNSNER, E.: *Phytopathologie* **15**, 745 (1925).
32. CASPERSSON, T.: *Naturwiss.* **29**, 33 (1941).
33. CHESTER, K. S.: *Phytopathologie* **24**, 1180 (1934).
34. — *Phytopathologie* **26**, 778, 949 (1936).

35. CLARK, P. F., J. SCHINDLER u. D. J. ROBERTS: *J. Bacteriol.* **20**, 213 (1930).
36. CLAUDE, A.: *Science (New York)* **87**, 467 (1938).
37. COHEN, S. S. u. W. M. STANLEY: *J. biol. Chemistry* **140**, 833 (1941).
38. CRAIGIE, J.: *Brit. J. exp. Pathol.* **13**, 259 (1932).
39. — u. F. O. WISHART: *J. exp. Medicine* **64**, 803, 819 (1936).
40. DANNEEL, R.: *Biol. Zbl.* **61**, 441 (1941).
42. DEHLINGER, K.: *Naturwiss.* **23**, 558 (1935); **25**, 138 (1937).
43. DOERR, R.: *Handb. Virusforsch.*, 1. Aufl. Wien, 1939.
45. DRAGSTEDT, C. A.: *Physiol. Rev.* **21**, 563 (1941).
46. DUSPIVA, F. u. G. BERGOLD: *Naturwiss.* **30**, 604 (1942).
47. ELFORD, W. J.: *J. Pathol. Bacteriology* **34**, 505 (1931).
48. — *Brit. J. exp. Pathol.* **17**, 399 (1936).
49. — *im Handb. Virusforsch.*, 1. Aufl., S. 128. Wien: Springer, 1939.
50. ERIKSON-QUENSEL, I. B. u. T. SVEDBERG: *J. Amer. chem. Soc.* **58**, 1863 (1936).
51. ERELMMEYER, H. u. E. BERGER: *Biochem. Z.* **255**, 429 (1932).
53. FOULDS, L.: *Amer. J. Cancer* **31**, 404 (1937).
54. FRAMPTON u. NEURATH: *Science (New York)* **87**, 468 (1939).
55. FRIEDRICH-FREKSA, H.: *Naturwiss.* **28**, 376 (1940).
56. GALLOWAY, J. A. u. W. J. ELFORD: *Brit. J. exp. Pathol.* **12**, 407 (1931).
57. GANS, R.: *Ann. Phys.* **86**, 652 (1928).
58. GARD, S. u. K. O. PEDERSEN: *Science (New York)* **94**, 493 (1941).
59. GOWEN, J. W. u. W. C. PRICE: *Science (New York)* **84**, 536 (1936).
60. GREEN, R. H., T. F. ANDERSON u. J. E. SMADEL: *J. exp. Medicine* **75**, 651 (1942).
61. GYE, W. E.: *Arch. exp. Path.* **190**, 92 (1938).
63. HEIDELBERGER, M. u. F. E. KENDALL: *J. exp. Medicine* **61**, 563 (1935).
64. HERZOG, R. O., R. ILLING u. H. KUDAR: *Z. physik. Chem., Abt. A* **167**, 330 (1933).
65. HOAGLAND, C. L., J. E. SMADEL, G. I. LAVIN u. T. M. RIVERS: *J. exp. Medicine* **72**, 139 (1940).
66. — — u. T. M. RIVERS: *J. exp. Medicine* **71**, 737 (1940).
67. —, S. M. WARD, J. E. SMADEL u. T. M. RIVERS: *J. exp. Medicine* **72**, 685 (1941).
68. — — — — *J. exp. Medicine* **74**, 69 (1941).
69. — — — — *J. exp. Medicine* **74**, 133 (1941).
70. HOBBOHM, K. O.: *Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I, Orig.* **146**, 139 (1940).
71. HOLMES, F. O.: *Handbook of Phytopathogenic Viruses*. Mineapolis, 1939.
72. — *Bot. Gaz.* **87**, 39 (1929).
73. JANSEN, L. W.: *Z. Hyg.* **119**, 558 (1937).
74. — *Naturwiss.* **29**, 102 (1941).
75. JENSEN, J. H.: *Phytopathology* **23**, 964 (1933); **26**, 266 (1936); **27**, 69 (1937).
76. JORDAN, P.: *Naturwiss.* **29**, 89 (1941).
77. KABAT, E. A.: *J. exp. Medicine* **69**, 103 (1939).
78. — u. K. O. PEDERSEN: *Science (New York)* **87**, 372 (1938).
79. KAUSCHE, G. A.: *Naturwiss.* **27**, 77 (1939).
80. — *Naturwiss.* **28**, 61 (1940).
81. — *Biol. Zbl.* **59**, 194 (1939).
82. —, E. PFANKUCH u. H. RUSKA: *Naturwiss.* **27**, 292 (1939).
83. — u. H. STUBBE: *Naturwiss.* **28**, 824 (1940).
84. KIDD, J. G. u. P. ROUS: *J. exp. Medicine* **68**, 529 (1938).
85. KIKUTH, W. u. R. GÖNNERT: *Arch. Virusforsch.* **1**, 295 (1940).

86. KNIGHT C. A. u. W. M. STANLEY: J. biol. Chemistry **141**, 39 (1941).
87. — — J. biol. Chemistry **141**, 29 (1941).
88. KÖHLER, E.: Arch. Virusforsch. **1**, 46 (1939).
89. KRATKY, O. u. A. SEKORA: Naturwiss. **31**, 46 (1943).
90. KUHN, W.: Kolloid-Z. **62**, 280 (1933).
91. KUNITZ, M. u. J. H. NORTHROP: J. gen. Physiol. **16**, 267 (1932); **18**, 433 (1935).
92. KUNKEL, L. O.: Amer. J. Bot. **24**, 316 (1937).
93. LAIDLAW, P. u. W. J. ELFORD: Proc. Roy. Soc. (London, Ser. B) **120**, 292 (1936).
94. LAKEY, C. F.: J. agric. Res. **44**, 755 (1932).
95. LAMM, O. u. A. G. POLSON: Biochemic. J. **30**, 528 (1936).
96. LANDSTEINER, K. u. J. VAN DER SCHEER: J. exp. Medicine **45**, 1045 (1927)
97. LANGMUIR, I.: J. chem. Physics **6**, 873 (1938).
98. — u. SCHÄFER: J. Amer. Chem. Soc. **59**, 1406 (1937).
99. LAUFFER, M. A.: J. biol. Chemistry **126**, 443 (1928).
100. — J. Amer. Chem. Soc. **61**, 2412 (1939).
101. — J. biol. Chemistry **144**, 411 (1942).
102. — u. R. B. DOW: J. biol. Chemistry **140**, 509 (1941).
103. — u. W. C. PRICE: J. biol. Chemistry **133**, 1 (1940).
104. — u. W. M. STANLEY: J. biol. Chemistry **123**, 507 (1938).
- 104a. — — Kolloid. Z. **91**, 62 (1940).
105. LAVIN, G. J., H. S. LORING u. W. M. STANLEY: J. biol. Chemistry **130**, 259 (1939).
106. LEDINGHAM, J. C.: J. Pathol. Bacteriology **35**, 140 (1932); Lancet **1931** II, 525.
108. LEVADITI, C., S. NICOLAU u. R. SCHOEN: Ann. Inst. Pasteur **40**, 973 (1926).
109. LEVINE, S.: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **170**, 145, 165 (1939).
110. LICHTENSTEIN, I.: Biochem. Z. **303**, 13 (1939)
111. LIPSCHÜTZ, B.: Handb. d. path. Mikroorg., 3. Aufl., Bd. VIII/1, S. 371 (1930).
112. LÖFFLER, F. u. FROSCH: Dtsch. med. Wschr. **1898**, 80.
113. LORING, H. S.: J. biol. Chemistry **130**, 251 (1939).
114. — J. gen. Physiol. **25**, 497 (1942).
115. — u. R. W. G. WYCKOFF: J. biol. Chemistry **121**, 255 (1937).
116. MAITLAND u. MAITLAND: Lancet **1928**, 596.
117. MARRACK, J. R.: The Chemistry of Antigens and Antibodies. Report 230 of the Medical Research Council, His Majesty's Stationary Office. London, 1938.
118. MAC FARLANE, M. C. u. M. H. SALAMAN: Brit. J. exp. Pathol. **19**, 184 (1933).
119. MCFARLANE, A. S., M. C. MCFARLANE, R. C. AMIES u. G. H. EAGLES: Brit. J. exp. Pathol. **20**, 485 (1939).
120. — u. R. A. KECKWICK: Biochemic. J. **32**, 1607 (1938).
121. McINTOSH, J.: Brit. J. exp. Pathol. **14**, 422 (1933).
- 121a. — u. F. R. SELBIE: Brit. J. exp. Pathol. **20**, 49 (1939).
122. MCKINNEY, H. H.: J. Hered. (Am.) **28**, 51 (1937).
123. MEHL, J. W.: Cold Spring Harbor Sympos. Quantitat. Biol. **6**, 218 (1938).
124. MELCHERS, G.: Naturwiss. **30**, 48 (1942).
125. —, G. SCHRAMM, H. TRURNIT u. H. FRIEDRICH-FREKSA: Biol. Zbl. **60**, 524 (1940).
126. MILLER, G. L. u. W. M. STANLEY: Science (New York) **93**, 428 (1941).
127. NEURATH, H. u. G. R. COOPER: J. biol. Chemistry **135**, 455 (1940).
128. — —, D. G. SHARP, A. R. TAYLOR, D. BEARD u. J. W. BEARD: J. biol. Chemistry **140**, 293 (1941).
129. — u. A. M. SAUM: J. biol. Chemistry **126**, 435 (1938).
131. NICOLAU S. u. L. KOPCOWSKA: C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées **119**, 140 (1935).

132. NORTHROP, J. H.: *J. gen. Physiol.* **21**, 335 (1938).
133. — *J. gen. Physiol.* **25**, 465 (1942).
134. PARKER, R. F. u. T. M. RIVERS: *J. exp. Medicine* **62**, 65 (1935).
134a. — — *J. exp. Medicine* **65**, 243 (1937).
135. — u. C. V. SMYTHE: *J. exp. Medicine* **65**, 109 (1937).
136. PAULING, L.: *J. Amer. chem. Soc.* **62**, 2643 (1940).
137. — u. D. H. CAMPBELL: *Science (New York)* **94**, 440 (1942).
138. PERDAU, J. R.: *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B* **109**, 304 (1931).
139. PERRIN, F.: *J. Physique Radium* **7**, 1 (1936).
140. PERUTZ, M. F.: *Zit. nach I. CROWFOOT, Chem. Reviews* **28**, 215 (1940).
141. PETERLIN, A. u. H. A. STUART: *Z. Physik* **112**, 1 (1939).
142. PFANKUCH, E.: *Biochem. Z.* **306**, 125 (1940).
143. — Vortragsreferat *Die Chemie* **56**, 77 (1943).
144. — *Biochem. Z.* **312**, 72 (1942).
145. — u. G. A. KAUSCHE: *Biochem. Z.* **299**, 334 (1938).
146. — — *Biochem. Z.* **301**, 223 (1939).
147. — — *Biochem. Z.* **302**, 77 (1939).
148. — — *Biochem. Z.* **306**, 68 (1940).
149. — — u. H. STUBBE: *Biochem. Z.* **304**, 238 (1940).
150. PICKELS, E. G. u. J. E. SMADEL: *J. exp. Medicine* **68**, 583 (1938).
151. PIRIE, N. W., K. M. SMITH, E. T. C. SPOONER u. W. D. MACCLEMMENT: *Parasitology* **30**, 543 (1938).
152. POLSON, A. G.: *Kolloid-Z.* **88**, 51 (1939).
153. POLSON, A. G.: *Kolloid-Z.* **83**, 172 (1938).
154. PUTZEYS, P. u. J. BROSTEAUX: *Trans. Faraday Soc.* **31**, 1314 (1935).
155. PYL, G.: *Z. Physiol. Chem.* **244**, 209 (1936).
156. — *Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh. I, Ref.* **102**, 284 (1931).
157. — u. L. KLENK: *Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh. I, Orig.* **128**, 161 (1933).
158. RIVERS, TH. M.: *J. Amer. med. Assoc.* **107**, 206 (1930).
159. ROBINSON, J. R.: *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A* **170**, 519 (1939).
160. ROSS, A. F.: *J. biol. Chemistry* **142**, 685 (1942).
161. — u. W. M. STANLEY: *J. gen. Physiol.* **22**, 165 (1938).
162. ROUS, P.: *J. exp. Medicine* **12**, 696 (1910); **13**, 397 (1911).
163. — u. J. G. KIDD: *J. exp. Medicine* **67**, 399 (1938).
164. RUSKA, H.: *Dtsch. med. Wschr.* **1941**, 281.
165. — *Arch. Virusforsch.* **2**, 345 (1942).
165a. — *Arch. Virusforsch.* **2**, 480 (1943).
166. SABIN, A. B.: *J. exp. Medicine* **56**, 307 (1932).
167. SALAMAN, M. H.: *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B* **229**, 137 (1938).
168. SCHLESINGER, M.: *Z. Hyg.* **114**, 161 (1932).
169. SCHRAMM, G.: *Ber. dtsch. chem. Ges.* **74**, 532 (1941).
170. — *Angew. Chem.* **54**, 7 (1941).
171. — *Kolloid-Z.* **97**, 106 (1941).
172. — *Naturwiss.* **27**, 149 (1939).
173. — *Naturwiss.* **31**, 94 (1943).
174. — u. H. FRIEDRICH-FREKSA: *Z. physiol. Chem.* **270**, 833 (1941).
175. — u. H. MÜLLER: *Z. physiol. Chem.* **266**, 43 (1940).
176. — — *Naturwiss.* **28**, 223 (1940).
176a. — — *Z. physiol. Chem.* **274**, 267 (1942).
177. — u. L. REBENBURG: *Naturwiss.* **30**, 48 (1942).
178. SCHULTZ E. W. u. L. P. GEBHARDT: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **32**, 1111 (1935).

179. SEASTONE, C. V.: J. gen. Physiol. **21**, 621 (1938).
 180. SHARP, D. G., A. R. TAYLOR, D. BEARD u. J. W. BEARD: J. biol. Chemistry **142**, 193 (1942).
 181. SHEDLOWSKY, TH. u. J. E. SMADEL: J. exp. Medicine **72**, 511 (1940).
 182. SHOPE, R. E.: J. exp. Medicine **58**, 607 (1933).
 183. SEIFFERT, G.: Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **139**, 337 (1937); **140**, 168 (1937).
 184. SMADEL, J. E., G. I. LAVIN u. R. J. DUBOS: J. exp. Medicine **71**, 373 (1940).
 185. —, E. G. PICKELS u. TH. SHEDLOWSKY: J. exp. Medicine **68**, 607 (1938).
 186. SMADEL, J. E., E. G. PICKELS, TH. SHEDLOWSKY u. T. M. RIVERS: J. exp. Medicine **72**, 523 (1940).
 187. SMITH, K. M. u. D. MACCLEMENT: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B **125**, 295 (1938).
 188. SNELLMANN, O. u. Y. BJÖRNSTAHL: Kolloid-Beihefte **52**, 403 (1941).
 189. SÖRENSEN, S. P. L. u. M. HÖYRUP: C. R. Lab. Carlsberg **12**, 213 (1917).
 190. SREENIVASAYA, M. u. N. W. PIRIE: Biochemic. J. **32**, 1707 (1938).
 191. STANLEY, W. M.: Arch. Virusforsch. **2**, 319 (1942).
 192. — J. biol. Chemistry **129**, 405 (1939).
 193. — J. biol. Chemistry **135**, 437 (1940).
 195. — Ergebn. Physiol. **39**, 294 (1937).
 196. — J. biol. Chemistry **117**, 325 (1937); **126**, 125 (1938).
 197. — Amer. J. Bot. **24**, 59 (1937).
 198. — Science (New York) **81**, 644 (1935).
 199. — u. J. F. ANDERSON: J. biol. Chemistry **139**, 325 (1941).
 200. — u. M. A. LAUFFER: Science (New York) **89**, 345 (1939).
 201. — u. R. W. G. WYCKOFF: Science (New York) **85**, 181 (1937).
 202. STAPP, C.: Vortragsreferat Die Chemie **56**, 77 (1943). J. Landw. **89**, 161 (1943).
 203. STAUDINGER, H.: Organische Kolloid-Chemie. Braunschweig, 1941.
 204. SVEDBERG, T.: Kolloid-Z. **85**, 119 (1938).
 205. — u. K. O. PEDERSEN: Die Ultrazentrifuge. Dresden: Verlag Steinkopff, 1940.
 207. TISELIUS, A.: Kolloid-Z. **85**, 129 (1938).
 208. — u. S. GARD: Naturwiss. **30**, 728 (1942).
 209. — u. H. SVENSON: Trans. Faraday Soc. **36**, 16 (1940).
 211. TRURNIT, H. u. G. BERGOLD: Kolloid-Z. **100**, 177 (1942).
 215. WITHMAN, L.: J. exp. Medicine **66**, 133 (1937).
 216. WITTFOGEL, H.: Arch. wiss. u. prakt. Tierheilk. **77**, 119 (1941).
 217. WOODRUFF, A. M. u. E. W. GOODPASTURE: Amer. Path. **7**, 209 (1931).
 218. WYCKOFF R. W. G.: J. gen. Physiol. **21**, 367 (1938).
 219. ZIMMER, K. G.: Biol. Zbl. **63**, 142 (1943).
 220. ZINSSER, H. u. C. V. SEASTONE: J. Immunol. (Amer.) **18**, 1 (1930).

(Revision abgeschlossen am 16. Mai 1944.)

Biologische Oxydationen.

Von **KARL BERNHARD** und **HAROLD LINCKE**, Zürich.
(Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Zürich.)

I. Einleitung.

Biologische Oxydationen sind summarisch betrachtet Energiegewinnungsprozesse der Zelle durch Verbrennung der Hauptnährstoffe zu Kohlensäure und Wasser. Sie verlaufen unter

1. Sauerstoffeintritt in das Molekül (Aufnahme von Wasser und nachfolgende Dehydrierung);
2. Wasserstoffentzug;
3. Elektronenabgabe.

Die Katalysatoren der Oxydoreduktionen, die Redoxasen, waren auch in den letzten Jahren Gegenstand umfassender Untersuchungen. Neuere Übersichten und Zusammenstellungen dieser Forschungen auch vom energetischen Standpunkt aus, brachten die von WURMSER, BERTHO, SONDERHOFF, GREEN und KEILIN, LIPMANN, MICHAELIS und SMYTHE, DIXON, STERN, BARRON, BALL bearbeiteten Artikel über Biological Oxidations and Reductions in den „Annual Review of Biochemistry“ (1), ferner Darstellungen von GREEN (2) und KALCKAR (3). Desgleichen sei auf die „Ergebnisse der Enzymforschung“ hingewiesen.

Weder Fette noch Kohlenhydrate oder Eiweiß verbrennen bekanntlich direkt zu Kohlensäure und Wasser: der Abbau ist vielmehr ein stufenweiser. Vielfach sind die Intermediärprodukte und die Abbaumechanismen bekannt oder auf Grund von Modellversuchen wahrscheinlich gemacht.

Die experimentellen Methoden, welche Einblick in das Stoffwechselfgeschehen ermöglichen, sind innerhalb gewisser Grenzen variabel. Sie beruhen auf der Verfolgung des Schicksals körpereigener oder körperfremder Verbindungen (sog. Modellschubstanzen) im gesunden oder pathologisch veränderten Gesamtorganismus oder einzelner Teile desselben. Versuche an überlebenden Organen, die künstlich durchströmt werden, oder an Gewebsschnitten nach der universell verbreiteten Methode von

WARBURG haben vor allem zur Aufklärung zahlreicher Einzelreaktionen beigetragen.

Die Begriffe „*körpervertraut*“ und „*körperfremd*“ haben in den letzten Jahren im Hinblick auf die Auffindung zahlreicher neuer Verbindungen in biologischem Material sichtliche Wandlungen erfahren. Man wird als körperfremd zweckmäßig nur solche Substanzen bezeichnen, die bis anhin als Bestandteile der Nahrung oder tierischer bzw. pflanzlicher Organismen selbst nicht nachgewiesen wurden.

Von fundamentaler Bedeutung erweist sich die von HEVESY (4) einerseits, SCHOENHEIMER und RITTENBERG (5) andererseits begründete *Isotopentechnik*, welche unter völlig biologischen Bedingungen bei kritischer Anwendung endgültige Beweise ermöglicht.

Bei der Prüfung einer chemischen Verbindung auf ihr Verhalten im Tier- oder Pflanzenkörper ist ferner folgendes zu berücksichtigen. Einmal muß das Substrat als solches die Möglichkeit haben (oder im Organismus durch geeignete Veränderung erhalten) an den *Ort der Verbrennung zu gelangen*. Diese Bedingung ist im wesentlichen von den physikalischen Eigenschaften der gewählten Verbindung abhängig und eine Frage der Permeabilität. Zweitens muß eine Verbindung von den *vorhandenen Enzymen angegriffen* werden können, eine Voraussetzung, die vor allem die chemischen Eigenschaften des Substrates tangiert.

Wir haben in diesen Ausführungen experimentelle Befunde der letzten 12 Jahre über oxydative Veränderungen bekannter Substrate im Tierkörper oder durch Bakterien *nach chemischen Gesichtspunkten dargestellt*. Es ist begreiflich, daß solchen Einteilungen in gewissen Fällen die wünschenswerte Übersichtlichkeit fehlen kann. Gleichwohl ziehen wir unsere Dispositionen, wie sie aus der Inhaltsangabe hervorgehen, den üblichen Gliederungen in Kohlenhydrate, Fette und Eiweißstoffe vor und halten sie für die Aufzeigung gewisser Zusammenhänge für geeigneter.

Bei der außerordentlichen Vielseitigkeit des Gebietes war eine gewisse Abgrenzung notwendig. Unsere Darstellungen betreffen vor allem biologische Oxydationen, die durch Isolierung oder hinreichende Charakterisierung der Zwischen- und Endprodukte gesichert sind und die Fähigkeit des pflanzlichen oder tierischen Organismus zum Abbau definierter Substrate beweisen. Untersuchungen über Gasstoffwechsel haben wir nicht berücksichtigt, auch nicht reinen Valenzwechsel, also z. B. die Umwandlung des zweiwertigen zum sechswertigen Schwefel, da über den Verlauf solcher Prozesse offenbar noch nichts Endgültiges auszusagen ist. Die Oxydation der Schwermetalle ($\text{Fe II} \rightarrow \text{Fe III}$) gehört in das Gebiet der fermentativen Oxydoreduktion.

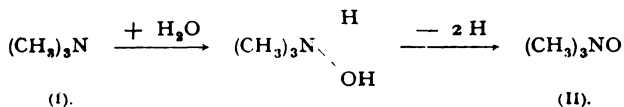
Eine lückenlose Berücksichtigung der Literatur war in Anbetracht des großen Umfangs nicht beabsichtigt und auch nicht möglich, da die neuesten amerikanischen Zeitschriften unzugänglich sind.

II. Die einzelnen oxydativen Prozesse.

I. Bildung von Hydroxylgruppen.

Eine direkte Einführung von Sauerstoff in chemische Verbindungen wird bekanntlich *in vivo* nicht beobachtet. Die Entstehung von Oxyfettsäuren durch Autoxydation ungesättigter Fettsäuren ist ein Vorgang, der im Tierkörper nicht eintritt und auch für Mikroorganismen und Pflanzen nicht nachgewiesen ist.

Das Auftreten der *Hydroxylgruppe* als erste Stufe einer oxydativen Veränderung unter biologischen Bedingungen beruht auf einer Wasseranlagerung (z. B. an Doppelbindungen, Aldehydgruppen usw.). Einen Sonderfall stellt wohl das Verhalten des *Trimethylamins* (I) dar, das, wie LINTZEL (6) zeigte, von Menschen *per os* aufgenommen, weitgehend als *Trimethylaminoxid* (II) im Harn ausgeschieden wird. Auch bei



Hunden und Kaninchen ist das der Fall (7) und ebenso nach MÜLLER und IMMENDÖRFER (8) bei Meerschweinchen und Ratten. Es ist anzunehmen, daß einer Wasseranlagerung eine Dehydrierung folgt. Zu Breien und Auszügen von Organen, wie Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas, Nieren usw., zugesetztes Trimethylamin wurde indessen nicht oxydiert. Umgekehrt vermochte Leber Trimethylaminoxid in Bestätigung von Befunden ACKERMANN'S und Mitarbeiter zu reduzieren. Bei Durchströmung einer Hundeleber erschien der Hauptteil des Trimethylaminoxids aber unverändert, ein deutliches Beispiel für das oft verschiedene Verhalten von Organbrei und überlebendem Organ *in toto*.

a) OH-Gruppen bei aliphatischen Verbindungen.

Die Bildung von *Oxysäuren* als Intermediärprodukte des Abbaues aliphatischer Säuren kann in den wenigsten Fällen direkt bewiesen werden, indem die Oxydation nicht auf dieser Stufe haltmacht. Über das Auftreten von β -Oxybuttersäure und von *Ketonkörpern* überhaupt unter verschiedensten Bedingungen berichten zahlreiche Arbeiten, auf die wir nicht einzeln eingehen können (vgl. auch S. 243 und 246). Die Entstehung von β -Oxybuttersäure nach Fütterung von α,β - und β,γ -Deuterio-buttersäure an Ratten zeigte MOREHOUSE (9) durch Isolierung von *Deuterio- β -Oxybuttersäure* als Ag-Salz aus dem Harn.

ROSE und Mitarbeiter (10) isolierten aus Eiweißhydrolysaten eine neue, lebensnotwendige Aminosäure, die α -Amino- β -oxy-buttersäure, welche als *d(-)Threonin* bezeichnet wurde.

FISCHER und BIELIG (11) fanden nach Fütterung von 18 g Benzalacetone $C_6H_5-CH=CH-CO-CH_3$ an Kaninchen im Harn neben β -Phenäthyl-methyl-carbinol geringe Mengen eines Dioxy-phenylbutans von der wahrscheinlichen Formel des 2,4-Dioxy-4-phenylbutans $C_6H_5-CHOH-CH_2-CHOH-CH_3$. Neben der Reduktion des Carbonyls erfolgte eine Wasseranlagerung an die Doppelbindung oder, was die Autoren auch für möglich halten, eine β -Oxydation der Methylen-gruppe nach erfolgter Hydrierung der Doppelbindung.

Nach Verfütterung von γ -Äthyl-octansäure erhielt KEIL (12) aus dem Harn der Hunde eine Säure $C_8H_{14}O_3$, welche vielleicht eine α -Äthyl- β -oxy-hexan-säure darstellt.

d-Milchsäure aus d-Alanin bekam MATSUOKA (13) bei der Durchströmung des in Ringerlösung befindlichen Hundemagens mit defibriertem Blute, dem d-Alanin zugesetzt wurde. Die Oxysäure konnte sowohl aus dem Magensaft (Mageninhalt) als auch aus der Durchströmungsflüssigkeit isoliert werden. l-Leucin gab unter denselben Bedingungen α -Oxybuttersäure, Acetessigsäure und Aceton (14).

b) OH-Gruppen bei aromatischen Verbindungen.

FOSTER und GUTMANN (15) erhielten nach Fütterung von Dijodotyrosin an Kaninchen 3,5-Dijodo-4-oxyphenylmilchsäure, und zwar lagen etwa 18% der verabreichten Jodmenge in dieser Form vor.

1932 beschrieb MEDES (16) eine als Tyrosinosis bezeichnete, bis anhin noch nicht bekannte Störung des Tyrosinstoffwechsels, bei welcher im Harn des Kranken täglich etwa 1,6 g p-Oxy-phenylbrenztraubensäure enthalten waren. Der Patient, ein 49jähriger Mann, welcher wegen einer Myasthenia gravis in klinische Behandlung gelangte, schied bei Mehrangebot an Tyrosin, sei es in Form von Eiweiß oder der Aminosäure selbst, neben Tyrosin l-p-Oxyphenylmilchsäure und l-3:4-Dioxyphenylalanin aus. Nach Gaben von Phenylalanin war die Ausscheidung von p-Oxyphenylbrenztraubensäure vermehrt, wurde letztere aufgenommen, so erschien ein großer Teil unverändert neben l-p-Oxyphenylmilchsäure. Bei dieser Tyrosinosis handelt es sich um eine sehr seltene Erkrankung, BLATHERWICK (17) fand anlässlich der Untersuchung von 26000 Harnproben keinen einzigen solchen Fall.

p-Oxy-phenylmilchsäure soll aus Tyrosin auch durch *Bact. coli* gebildet werden (18).

Phenylmilchsäure wurde von FÖLLING (19) neben Phenylbrenztraubensäure im Harn von Patienten mit Imbecillitas phenylpyruvica (siehe S. 208) vermutet und kürzlich von ZELLER (20) aus dem Harn solcher Kranker isoliert. Da eine bakterielle Genese auszuschließen war, kann unter pathologischen Bedingungen im Stoffwechsel gebildete (—) α -Oxy- β -phenyl-propionsäure zur Ausscheidung gelangen.

Die „Phenolisierung“ aromatischer Verbindungen im Tierkörper ist verhältnismäßig häufig zu beobachten. Sie leitet offenbar die oxydative Ringsprengung ein.

Der Nachweis von *Tyrosin* in mit dl-Phenylalanin versetztem Perfusionsblut nach Durchströmung der Leber und die Beobachtung, daß Phenylalanin aber nicht Tyrosin zu den lebensnotwendigen Aminosäuren gehört, berechtigen zur Annahme, der Tierkörper sei zur Umwandlung von *Phenylalanin* in *p-Oxyphenylalanin* befähigt. MOSS und SCHOENHEIMER (21) isolierten aus den Gewebsproteinen junger und ausgewachsener Ratten nach Verfütterung von mit Deuterium signiertem dl-Phenylalanin schweren Wasserstoff enthaltendes Tyrosin und bewiesen damit endgültig die Fähigkeit des Tierkörpers, Tyrosin aus Phenylalanin zu bilden. Diese Umwandlung fand selbst dann statt, wenn die Tiere bei eiweißreicher Nahrung neben dem Deuterio-phenylalanin zusätzlich Tyrosin fraßen. Zu analogen Resultaten führten Versuche mit Deuterio-*phenylmilchsäure*, welche gleichfalls in Tyrosin übergeht (22).

Als normaler Bestandteil vieler Harnes gilt *p-Oxy-phenyllessigsäure*, die von EMMRICH (23) erneut aus Tagesmengen menschlichen Harnes zu 10—20 mg erhalten wurde.

Die Bildung der *Homogentisinsäure* oder 2,5-Dioxy-phenyl-essigsäure beobachteten PAPAGEORGE und LEWIS (24) nach länger dauernder Fütterung von täglich 300 mg *l-Phenylalanin* pro 100 g Körpergewicht an weiße Ratten. Die Verbindung wurde als Dibenzoyl-homogentisinamid aus dem Harn gewonnen und auch von diesen Autoren als normales Stoffwechselprodukt des Phenylalaninabbaues betrachtet. Homogentisinsäureausscheidungen sahen BUTTS und Mitarbeiter (25) an Ratten nach Fütterung von 28,6 g dl-Phenylalanin pro Quadratmeter Körperoberfläche. Erhielten Meerschweinchen bei einer Vitamin-C-Mangel-Diät täglich 0,5 g oder mehr *l-Tyrosin*, so trat im Harn neben Homogentisinsäure und *p-Oxy-phenylbrenztraubensäure* auch *p-Oxy-phenylmilchsäure* auf (26). Es genügten 10 mg Ascorbinsäure pro Tag, um diese Ausscheidungen zu verhindern. Von der *d-Iso-ascorbinsäure* waren erst 200 mg in diesem Sinne wirksam. Später wurde mitgeteilt (27), auch *d-Tyrosin* rufe bei C-Mangel Alkaptonurie hervor. Eingehende Untersuchungen über Alkaptonurie bei weißen Ratten veröffentlichten CLOSS und BRAATEN (28). Danach beeinflussen Menge und Konzentration des in Natronlauge, Natriumcarbonat oder Natriumhydrogencarbonat gelösten *l-Phenylalanins* sowohl Intensität als Dauer der Alkaptonurie. Letztere tritt auch nach Zufuhr solcher Phenylalaninmengen auf, die zur Entstehung von Phenylbrenztraubensäure im Harn noch nicht ausreichen. Etwa 2 Stunden nach subcutaner Injektion von *l-Phenylalanin* als Na-Salz kann die Alkaptonurie nachgewiesen werden und erreicht sehr rasch maximale Werte. Sie kann plötzlich wieder aufhören. Eine experimentelle,

meist nur wenige Stunden dauernde Alkaptonurie vermochte LANYAR (29) auch bei weißen Mäusen hervorzurufen, welche während mehrerer Wochen täglich *l*-Tyrosin oder *l*-Phenylalanin erhielten. Einmalige subcutane Injektionen von 0,2 g *l*-Phenylalanin, ferner längere Zeit gegebenes *dl*-Tyrosin oder *d*-Phenylalanin, ließen keine Homogentisinsäure im Harn auftreten.

In einem Fall von infantiler Alkaptonurie wurden täglich 1,76—2,51 g Homogentisinsäure im Harn gefunden (30). Eine sonst gesunde 38jährige Alkaptonurikerin (31) schied bei gleichmäßiger Nahrung per os aufgenommenes *l*-Phenylalanin und *l*-Tyrosin annähernd quantitativ, *d*-Phenylalanin zu 40—45% und *dl*-Tyrosin zu 68% als Homogentisinsäure aus. Daraus geht hervor, daß *d*- und *l*-Phenylalanin die Alkaptonurie verschieden beeinflussen, was mit den heute anzunehmenden verschiedenen Abbauwegen für Aminosäuren der Links- und Rechtsreihe im Einklang steht.

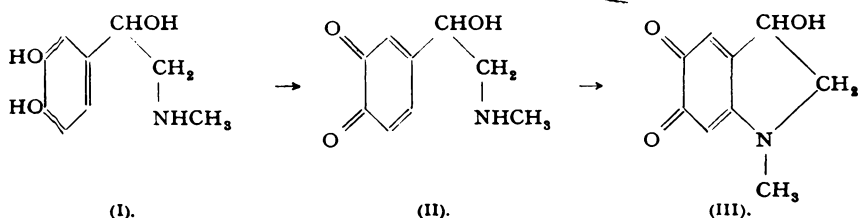
Die Bildung von *l*-3:4-Dioxyphenylalanin (Dopa) aus Tyrosin durch Einwirkung von Tyrosinasepräparaten verschiedener Herkunft studierten EVANS und RAPER (32). Zugabe von 5:6-Dioxy-dihydroindol- α -carbonsäure, einem Zwischenprodukt der Tyrosinase-Tyrosin-Reaktion, erhöht die Dopabildung. Dopaanreicherung kann ferner durch Ascorbinsäure bewirkt werden.

Eine weitere Isolierung des *l*-3:4-Dioxyphenylalanins aus pflanzlichem Material (Samen von *Mucuna pruriens*) gelang DAMODARAN und RAMASWAMY (33).

Die oft diskutierte Möglichkeit, daß Tyrosin die Muttersubstanz des *Adrenalins* ist und über Tyramin oder Dioxyphenylamin in das Brenzkatechinderivat übergeht (34), ist bis jetzt nicht bewiesen.

Eine kurze Übersicht des Tyrosinstoffwechsels gibt RAPER (35).

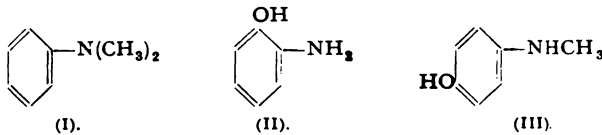
Nach Zugaben von *Adrenalin* (I) in geringer Konzentration zum rekonstruierten System der Milchsäure- und Äpfelsäuredehydrogenasen aus Herzmuskel beobachteten GREEN und RICHTER (36) eine sehr beträchtliche Sauerstoffaufnahme und die Entstehung eines gefärbten Oxydationsprodukts, das isoliert und als *Adrenochrom* oder *N*-Methyl-2,3-dihydro-3-oxyindol-5,6-chinon (III) identifiziert wurde. Es ist anzunehmen, die Oxydation verlaufe über das *o*-Chinon (II):



Ein Stoffwechselprodukt der *Salicylsäure* fand LUTWAK-MANN (37). Der Rattenharn enthielt nach Salicylatfütterung *Gentisinsäure* (2,5-Dioxybenzoesäure).

Nach Gaben von 17 g *Benzal-methyl-äthylketon* $C_6H_5CH=CH-CO-CH_2-CH_3$ an Kaninchen erhielten FISCHER und BIELIG (11) u. a. 0,12 g *p-Oxy-β-phen-äthyl-äthylketon*, $HO-C_6H_4-CH_2-CH_2-CO-CH_2-CH_3$. Aus *Cinnamal-aceton*, $C_6H_5-CH=CH-CH=CH-CO-CH_3$, das sich als feine wäßrige Suspension selbst in Dosen von 5 g täglich ohne Schädigungen geben ließ, bildeten sich im Kaninchenorganismus die beiden Phenole *6-(p-Oxyphenyl)-hexen-(5)-ol-(2)*, $HO-C_6H_4-CH=CH-CH_2-CH_2-CHOH-CH_3$ und *6-(p-Oxyphenyl)-hexen-(5)-on-(2)*, $HO-C_6H_4-CH=CH-CH_2-CH_2-CO-CH_3$.

Dimethylanilin (I) und *Dimethylanilinoxid*, $C_6H_5 \cdot N(CH_3)_2O$, werden vom Hund teilweise zu *o-Aminophenol* (II) umgewandelt (38). Zwei Kaninchen, welche innerhalb von 5 Tagen 15,2 g Dimethylanilin in Olivenöl gelöst subcutan injiziert erhielten, schieden im Harn *p-Mono-*

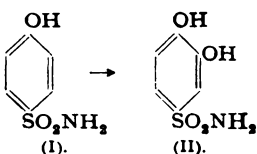


methylaminophenol (III) aus (als Methylaminophenol-oxalat isoliert 15,5 g) (39). Neben der Demethylierung findet Einführung einer Hydroxylgruppe statt.

Kaninchen führen *Crotonsäure-anilid* in einer Ausbeute von 14% in *N-Crotonyl-p-aminophenol*, $H_3C-CH=CH-CO-NHC_6H_4-OH$ über (40).

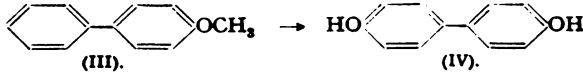
Als Ursache gewisser toxischer Effekte der *Sulfanilamide* werden vielfach deren Abbauprodukte betrachtet. Nach Fütterung von *Sulfo-pyridin* (41) wurde aus dem Hundeharn *Mono-oxy-sulfo-pyridin* und dessen Glucuronsäurederivat isoliert. Aus dem Harn mit *Sulfanilamid* behandelter Patienten gelang JAMES (42) neben *p-N-Acetyloxy-amino-benzolsulfonamid* $(NH_2)SO_2-C_6H_4-N(OH)-COCH_3$ und *p-Oxy-amino-benzol-sulfonsäure*, $H_2SO_3-C_6H_4-NHOH$ die Gewinnung von *p-Amino-phenol* $HO-C_6H_4-NH_2$. Gleichzeitige Bestimmungen der Ester-Schwefelsäure und der Glucuronsäure ließen annehmen, die Ausscheidung der genannten Verbindungen erfolge auch in gepaarter Form.

WILLIAMS (43) fand nach Fütterung von *p-Oxy-benzol-sulfonamid* (I) an Kaninchen *1,2-Dioxy-benzol-4-sulfonamid* (II), welches als Methyl-



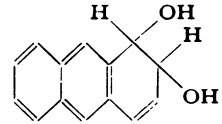
derivat, *Veratrol-4-sulfondimethylamid*, aus dem Harn isoliert wurde. Die Ausbeute betrug etwa 1% der verfütterten Sulfonamidmenge, dürfte aber auf 4–5% geschätzt werden.

STROUD (44) erhielt aus dem Harn von zwei Kaninchen, denen in Sesamöl gelöst 3 g *4-Methoxy-diphenyl* (III) injiziert wurden, durch Entmethylierung und Oxydation 30 mg reines *4,4'-Dioxy-diphenyl* (IV).



β -Naphthylamin, in Mengen von 800 mg pro Tag gefüttert, wird von Hunden zu *2-Amino-1-naphthol* oxydiert und mit Schwefelsäure gepaart ausgeschieden (45).

Die cancerogenen Eigenschaften vieler polycyclischer aromatischer Verbindungen ließen notwendigerweise die Frage nach deren Verhalten im Stoffwechselgeschehen aufkommen. BOYLAND und LEVI (46) verabreichten ein Futter, das 4 Teile *Anthracen* enthielt, und fanden im Harn von Kaninchen rechtsdrehendes, im Harn von Ratten aber linksdrehendes *1,2-Dioxy-1,2-dihydroanthracen*. Später gelang (47) die Isolierung von rechtsdrehender *1,2-Dioxy-1,2-dihydro-anthracen-1-glucuronsäure* aus Kaninchenharn. Bekamen Kaninchen, Ratten oder Mäuse subcutane Injektionen von 2–10 ccm einer Lösung von 500 mg *1,2,5,6-Dibenzanthracen* in 100 ccm Olivenöl, so enthielten die Extrakte aus Harn und Faeces Substanzen von phenolischem Charakter (48). Nach Injektion von *3,4-Benzpyren* an Mäuse (z. B. 60 mg in 1%iger Lösung in Olivenöl) wird mit dem Harn und den Faeces neben etwa 1% unverändertem Ausgangsmaterial ein fluoreszierendes Derivat mit phenolischer Hydroxylgruppe, ein *Mono-oxy-benzpyren* ausgeschieden (49), das BERENBLUM, CROWFOOT, HOLIDAY und SCHOENTAL (481) als *8-Oxy-3,4-benzpyren* identifizierten. Ferner wurde in den Faeces *3,4-Benzpyren-5,8-chinon* aufgefunden. Weitere Untersuchungen von WEIGERT und MOTTRAM (482) ergaben auf Grund der Fluoreszenzchromatographie, daß die Umwandlung des Kohlenwasserstoffs nicht direkt, sondern über mindestens drei Zwischenstufen zum *8-Oxy-3,4-benzpyren* führt. Diese Befunde sind im Zusammenhang mit der Deutung der krebserregenden Wirkung über intermediäre Chinonbildung nach R. KUHN (50) beachtenswert.

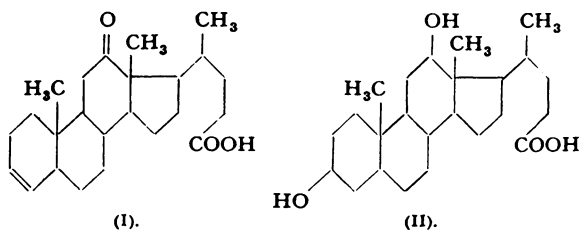


c) OH-Gruppen an hydrocyclischen Ringen.

Dekahydro-naphthalin (51) gab im Stoffwechsel des Hundes nach Gaben von 244 mg/kg/die 37,7 (roh) bzw. 29,9% (rein) *Dekahydro-naphthol*. *Cis-trans-β-Dekahydro-naphthol* (318 mg/kg/die) erschien zu 33,0 bzw. 26,1% unverändert im Harn, der kleine Mengen höher und tiefer schmelzender Kristalle enthielt, deren Zusammensetzung einem *Dekahydro-dioxy-naphthalin* entsprach. Sie waren mit den bekannten Dekalindien nicht identisch. Nach Fütterung von 30 g *Tetralin* an einen Hund

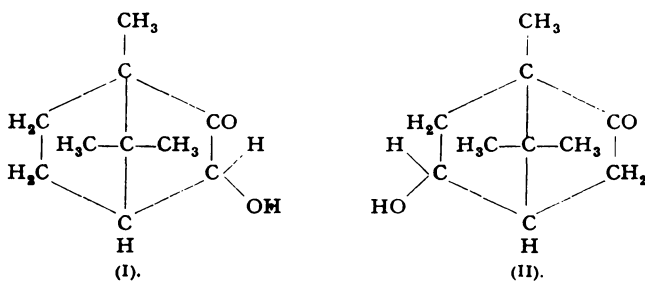
(272 mg/kg/die) fanden sich im Harn 15,5 g einer öligen Flüssigkeit, die ein Gemisch von *Di-* und *Tetrahydro-naphthol* darstellte.

Viel diskutiert wurde die Entstehung von OH-Gruppen am Steran-Gerüst. Einen diesbezüglichen experimentellen Beweis glaubt MORI (52) erbracht zu haben. Nach intravenöser Injektion von *12-Keto-3-cholensäure* (I) an Kaninchen wurden aus 60,5 l Harn 3,1 g ungepaarte *Desoxycholsäure* (II) isoliert, die etwa 10% der verabreichten Menge *12-Keto-3-*

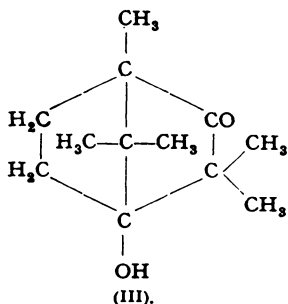


cholensäure entsprechen. Es wird angenommen, daß jedenfalls ein Teil davon aus letzterer entstanden sei. Mit der häufigen Bildung von OH-Gruppen aus Ketogruppen durch Hydrierung haben wir uns in diesem Zusammenhang nicht zu befassen (53).

Oxydative Veränderungen des *Camphers* im Tierkörper werden noch unter dem Gesichtspunkte der Methyloxydationen zu betrachten



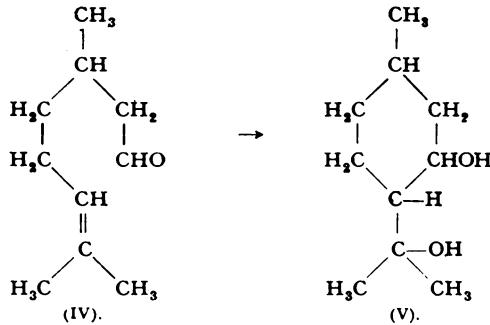
sein. Nach Fütterung von Campher an Hunde fanden ASAHINA und ISHIDATE (54) im Harn der Tiere *3-Oxy-campher* (I) und *5-Oxy-campher* (II)



teilweise an Glucuronsäure gepaart, während REINARTZ und MEESEN (55) nach Gaben von *Dimethylcampher* an Hunde neben anderen Oxydationsprodukten *4-Oxy-dimethyl-campher* (III) isolierten.

Interessant ist die von KUHN und Löw (56) gezeigte Cyclisierung des *Citronellals* (IV) zu

p-Menthan-3,8-diol (V), welche bereits bei Säurekonzentrationen von 0,5% HCl und Temperaturen von 37° verläuft, also unter Bedingungen, die im Magen vorhanden sind und die Ausscheidung von *p*-Menthan-3,8-diol-*d*-glucuronsäure durch Kaninchen nach Citronellalfütterung begreiflich machen.



d) OH-Gruppen an heterocyclischen Ringen.

1,2,3,4-Tetrahydro-chinolin wird vom Hund unter gleichzeitiger Dehydrierung in das 2-Oxy-chinolin übergeführt (57) (vgl. S. 238).

Für die Entstehung der seit langem bekannten Kynurensäure aus Tryptophan haben KOTAKE und Mitarbeiter (58) als erstes Intermediärprodukt das α -Oxy-tryptophan angenommen, eine Aminosäure, welche WIELAND und WITKOP (59) aus einem Hydrolysat des Knollenblätterpilzgiftes Phalloidin isolierten. Der Übergang zur Kynurensäure wird noch zu betrachten sein (vgl. S. 207).

2. Bildung von Aldehydgruppen.

Die Entstehung von Aldehyden als Intermediärprodukte des Stoffwechsels ist für die Glykolyse oder Glykogenolyse durch den Nachweis der Glycerinaldehyd-phosphorsäure gesichert. Auch die alkoholische Gärung führt über diese Triose. Zu einer Anreicherung von Aldehyden kommt es im Organismus aber nicht.

Acetaldehyd soll nur in Spuren im Blute vorkommen. Für die Bestimmung der flüchtigen Blutaldehyde, die nach Verabreichung gewisser Pharmaca vermehrt auftreten können, geben DUPILLE und LACHAUX (60) ein Verfahren an, sind sich aber im klaren, daß auch andere flüchtige, reduzierende Substanzen, die der Fällung mit Quecksilberchlorid entgegen, mitbestimmt werden.

Das Auftreten des Acetaldehyds als Intermediärprodukt der CO₂-Assimilation ist nach neueren Untersuchungen sehr unwahrscheinlich. Eine Aldehydgruppe am Kohlenstoffatom 3 enthält das β -Chlorophyll (STOLL).

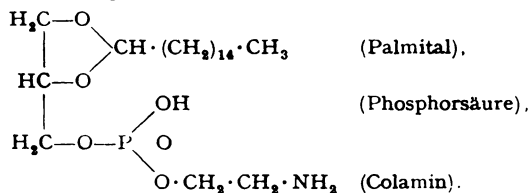
Primäre Amine können oxydativ desaminiert werden, wobei als

Reaktionsprodukte *Aldehyde* und Ammoniak, bzw. niedere Amine auftreten. BLASCHKO, RICHTER und SCHLOSSMANN (61) bebrüteten eine Reihe von Aminen mit Extrakten aus Lebergewebe und fanden z. B. in Leber, Niere und Darm von Meerschweinchen, Ratten und Kaninchen ein Enzym, das die Oxydation von *Adrenalin* katalysiert. RICHTER (62) untersuchte die Einwirkung von Enzympräparaten aus Leber und Darm von Meerschweinchen auf verschiedene Amine. Zur Isolierung entstehen der Aldehyde wurde Semicarbacid zum Reaktionsgemisch gegeben. Bei der Oxydation von *Benzylamin*, *Phenyläthylamin*, *Tyramin*, *Adrenalin*, *iso-Amylamin* und *n-Amylamin* konnten *Benzaldehyd*, *Phenylacetaldehyd*, *Oxyphenylacetaldehyd*, *Dioxy-phenyl-oxyacetaldehyd*, *Isovaleraldehyd* und *Valeraldehyd* als Dinitrophenylhydrazone nachgewiesen werden. Dinitrophenylhydrazone bildeten sich auch mit den Reaktionsprodukten von *dl-Arterenol* (β -[3,4-Dioxyphenyl-äthanolamin]), *Epinin* (β -[3,4-Dioxyphenyl-äthylmethylamin]), *Hordenin* (β -[p-Oxyphenyl-äthyl-dimethylamin]), *Alkamin*, *l-p-Sympatol* und *Isobutylamin*. In einzelnen Fällen wurde die Aldehydmenge quantitativ bestimmt. Die Ausbeuten waren nur gering. Weitere Untersuchungen galten der Spezifität der Aminoxydasen. BLASCHKO, RICHTER und SCHLOSSMANN (63) prüften den Abbau von 66 verschiedenen Aminen durch Leber-, Darm- und Nierenschnitte in der WARBURGSchen Apparatur. PUGH und QUASTEL (64) ließen Gehirn-, Leber- und Nierengewebe von Ratten und Meerschweinchen auf aliphatische Amine, wie *Methyl-*, *Äthyl-*, *Propyl-* und *Butylamin*, ferner auf *Tyramin*, *Indoläthylamin*, *Phenyläthylamin*, *Mezcalin*, *Histamin* und *Benzedrin* einwirken. Die sich bildenden Aldehyde wurden in vielen Fällen mit Bisulfit abgefangen und jodometrisch bestimmt.

Die Bildung von Aldehyden aus primären Alkoholen durch die Alkohol-Dehydrogenasen von *Fusarium lini* Bolley zeigte GOEPFERT (65). *n-Propylalkohol* ergab *Propionaldehyd*, identifiziert durch positive SCHIFFSche und TOLLENSche Reaktion und als Dimedon-Derivat; *n-Butylalkohol* lieferte *Butylaldehyd*, der mit den genannten Reaktionen und als 2,4-Dinitrophenylhydrazon nachgewiesen wurde. Die Mengen waren auch hier nur sehr gering.

Den Nachweis von *Propionaldehyd* (mit Dimethyldihydroresorcin oder durch Abfangen mit Ca-Sulfit) bei der Glyceringärung in Gegenwart von Hefeextrakt und *Propionbacterium arabinosum* erbrachten WOOD und WERKMAN (66). Getötete Essigsäurebakterien (*Bact. Pasteurianum*) vermögen *Methylalkohol* zu *Formaldehyd* zu dehydrieren (67). Die Alkoholdehydrase aus Leber verwandelt Alkohol in Aldehyd, der dismutativ in die entsprechende Säure übergehen kann. Propylalkohol wird nach REICHEL und KÖHLE (68) durch sehr aktive Fermentpräparate aus Pferde- oder Schweineleber zu Propionaldehyd, der mit Bisulfit abgefangen wurde, dehydriert.

Bedeutungsvoll entwickelten sich die Beobachtungen FEULGENS über das Vorkommen *lipoider Aldehyde*. Sie führten zur Auffindung einer neuen Körperklasse, der Gruppe der *Acetalphosphatide*. FEULGEN und BERSIN (69) identifizierten das Plasmal als Gemisch höherer, den bekannten Fettsäuren entsprechender Aldehyde, indem Plasmal-thiosemicarbazon, nach Spaltung und Oxydation der Aldehyde, Palmitin- und Stearinsäure gab. Die Gewinnung von Plasmalogen aus Rinder- und Pferdemuskeln, wobei die quantitative Plasmalreaktion nach FEULGEN und GRÜNBERG (70) gute Dienste leistete, gelang nur nach Verseifung der Phosphatide, so daß vielleicht (wenn auch wenig wahrscheinlich) vorerst ein sekundäres Spaltprodukt des Plasmalogen erhalten wurde. Solche kristallisierte Produkte enthielten die Aldehyde *Palmital* und *Stearal*. Dem α -*Palmital-Plasmalogen* kommt folgende Struktur zu:



Fettaldehyde, wie Palmital und Stearal, sind damit als Komponenten natürlich vorkommender Lipide (Acetalphosphatide) nachgewiesen, der Tierkörper ist zu ihrer Bildung befähigt.

3. Bildung von Carbonylgruppen.

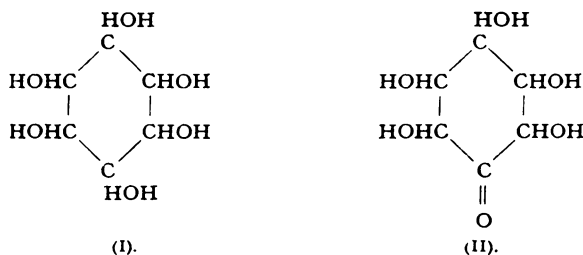
a) Entstehung von Ketonen.

Die Dehydrierung von Isopropylalkohol zu *Aceton* durch getötete Essigsäurebakterien (*Bact. Pasteurianum*) erfolgt nach MÜLLER (71) sowohl mit Sauerstoff als mit Chinon als Akzeptor.

Die bereits 1898 von BERTRAND beobachtete fermentative Bildung von *Dioxyaceton* aus Glycerin gelingt nach HERMANN und NEUSCHUL (72) mit *Bact. gluconicum*, *xylum*, *xylinooides*, *orleanense* und *aceti*, welche in Hefewasser gelöstes Glycerin zu 65, 90, 15,5, 90 und 96% in das Keton überführen. Neuerdings haben VIRTANEN und NORDLUND (73) diese Reaktion nach quantitativen Aspekten verfolgt, desgleichen auch NEUBERG und HOFMANN (74), welche ein Verfahren zur präparativen Gewinnung von kristallisiertem Dioxyaceton aus Glycerin mit *Acetobacter suboxydans* beschrieben. Die Ausbeuten betragen dabei 77% der Theorie. UNDERKOFER und FULMER (75) erhielten, ausgehend von 6%igen Glycerinlösungen, bis 90% Dioxyaceton, davon 80% in reiner kristallisierter Form.

Verschiedene Essigsäurebakterien sind zur Bildung von *Ketosen* aus *Polyalkoholen* befähigt. *Erythrit* gibt *Erythrose*, *Mannit* *Lävulose* (76) und *Sorbit* *Sorbose* (72). Die Gewinnung von *Sorbose* aus *Sorbit* durch

Bact. xylinum studierten erneut SCHLUBACH und VORWERK (77). Durch Erhöhung des Essigsäuregehaltes der Nährlösung auf 0,5% ließen sich Fremdinfectionen vermeiden und Ausbeuten an roher Sorbose von 50—75%, bezogen auf den eingesetzten Sorbit, erhalten. Entsprechende Ausbeuten fanden MAURER und SCHIEDT (78) und BÖESEKEN und LEFFERS (79) mit *Bact. xylinum*, *Bact. xylinoides* und *Bact. gluconicum*. BERNHAUER und GÖRLICH (80) erhielten bei der Umwandlung von Sorbit zu Sorbose mit *Bact. gluconicum* Ausbeuten von 70—80%. Ausgehend von einer 35%igen Sorbitlösung, ergaben sich mit *Acetobacter suboxydans* bis zu 80% Sorbose (81), bei Verwendung einer 15%igen Lösung bis zu 93% der Theorie (82). ENKLEWITZ und LASKER (83) wiesen nach, daß die in zahlreichen Fällen von Pentosurie auftretende *l*-Xyloketose nach Aufnahme von *d*-Glucuronsäure stark vermehrt ist. Glucuronsäure wäre demnach eine Ausgangssubstanz für die *l*-Xyloketose. KLUYVER und BOEZAARDT (84) erhielten aus 10,5 g *Meso-Inosit* (I) durch 10tägige Einwirkung von *A. suboxydans* 8 g *Inosose* (II):



Im Zusammenhang mit der sog. Ketonranzigkeit der Fette sich bildende *Methylketone* wurden vielfach nachzuweisen versucht. Nach THALER und GEIST (85) entstehen mit *Penicillium glaucum* aus Fettsäuren niederen und mittleren Molekulargewichtes (Buttersäure bis Myristinsäure) entsprechende Methylketone, desgleichen auch aus β -Oxybutter-, β -Oxycapron-, β -Oxycaprin- und β -Oxymyristinsäure (86). Isolierungen und Identifizierungen wurden nicht durchgeführt, die sehr geringen sich bildenden Mengen scheinen dies zu erschweren. Die Autoren beschränken sich daher (87) auf die quantitative Erfassung der Methylketone durch kolorimetrische Auswertung der Salicylaldehyd-Reaktion, welche für Methylketone als spezifisch bezeichnet wird.

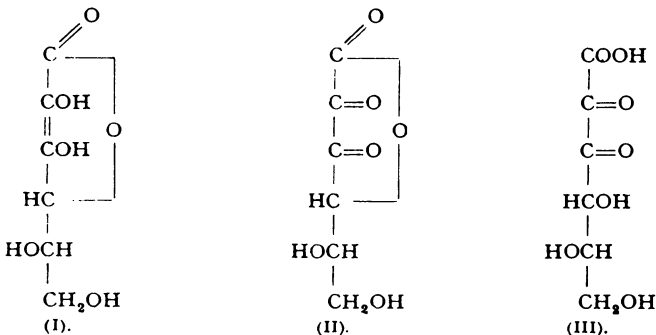
b) Ketosäuren aus Oxysäuren.

Milchsäure kann durch *Bact. xylinum* in *Brenztraubensäure* umgewandelt werden (88). Die Oxydation von *l*(+)-Milchsäure zu *Brenztraubensäure* mit Milchsäure-dehydrogenase aus Herzmuskulatur des Schweines untersuchten GREEN und BROSTEAUX (89). Die entstehende Ketosäure wurde als 2,4-Dinitrophenylhydrazin-derivat isoliert. *d*(-)-Lac-

tat, Lactamid und Iso-serin wurden nicht angegriffen. Dieselben Enzympräparate enthalten auch die β -Oxybuttersäure-dehydrogenase, welche *l*- β -Oxybuttersäure zu Acetessigsäure dehydriert (90). Die Reaktion benötigt als Co-Enzym Diphosphopyridinium-nucleotid und ist reversibel, was HOFF-JÖRGENSEN (91) bestätigte. α - und γ -Oxybuttersäure, ferner β -Oxypropionsäure wurden nicht angegriffen. LANG (92) gewann nach HOFF-JÖRGENSEN (91) aus Schweineherzen Fermentextrakte, mit denen er die Dehydrierung von *d,l*- β -Oxybutter-, *d,l*- β -Oxyvalerian-, *d,l*- β -Oxycapron-, *d,l*- β -Oxyönanth-, *d,l*- β -Oxycapryl- und *d,l*-Oxypelargonsäure in der WARBURG-Apparatur verfolgte. Auf Grund der Sauerstoffaufnahme wurden alle untersuchten Homologen etwa im gleichen Ausmaß durch das noch stark unreine Enzympräparat dehydriert. Die Dehydrierung der *dl*-Erythro-dioxybuttersäure mit einem Fermentpräparat aus Schweineherz führt wahrscheinlich zu Diketobuttersäure oder α -Keto- β -oxybuttersäure (93).

BERNHAEUER und GÖRLICH (94) fanden bei der Einwirkung von *Bact. gluconicum* auf Calciumgluconat neben der bereits wiederholt erhaltenen *d*-5-Keto-gluconsäure auch *d*-2-Keto-gluconsäure. Sie wurde als gut kristallisierendes K-Salz isoliert und mit Hilfe des Methylesters und Chinoxaldinderivates identifiziert. Weitere Untersuchungen ergaben (95), daß eine Reihe verschiedener Essigsäurebakterien zur Bildung der 2-Ketogluconsäure befähigt ist, die z. B. aus gluconsaurem Calcium mit *A. suboxydans* bis zu 60% d. Th. erhalten wird.

PENNEY und ZILVA (96) fanden in Versuchen an Meerschweinchen, daß *l*-Ascorbinsäure (I) über *Dehydro-l*-ascorbinsäure (II) in 2:3-Diketogulonsäure (III), identifiziert mit Dinitrophenylhydrazin, umgewandelt



wird. Vitamin-C-arm ernährten Tieren intramuskulär injizierte Dehydro-l-ascorbinsäure wurde innerhalb von 24 Stunden zu 25% als Diketogulonsäure im Harn ausgeschieden, zum Teil auch zu Ascorbinsäure reduziert. Per os aufgenommene Dehydroascorbinsäure wird bereits im Dünndarm in Diketogulonsäure übergeführt. Letztere erscheint nach

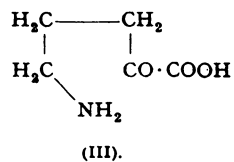
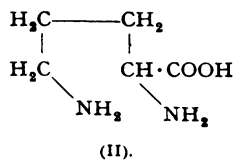
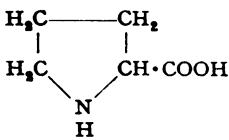
Injektion zum Teil unverändert. Die Umwandlung der Diketogulonsäure in Ascorbinsäure im Tierkörper ist wenig wahrscheinlich.

c) *Ketosäuren aus Aminosäuren.*

Die von NEUBAUER und KNOOP gefundene oxydative Desaminierung der Aminosäuren findet nach KREBS (97) nicht nur in der Leber, sondern meist viel rascher auch in der Niere statt. Durch Vergiftung mit Blausäure oder arseniger Säure gelang es, den weiteren Abbau der Ketosäuren aufzuhalten und sie z. B. als 2,4-Dinitro-phenylhydrazone zu isolieren, ohne die Desaminierung wesentlich zu hemmen. Unter solchen Bedingungen wurden aus z. B. 400 mg dl-Alanin mit 100,6 mg Nierenschnitten 84,7 mg Hydrazon der *Brenztraubensäure* erhalten. Mit Gewebsextrakten aus Rattennieren entstanden aus *dl-Aminobuttersäure* α -*Ketobuttersäure*, aus *dl-Valin* *Dimethylbrenztraubensäure*, aus *dl-Leucin* α -*Keto-isocaproensäure* und aus *dl-Phenylalanin* *Phenylbrenztraubensäure*. Dem Nierengewebe zugefügte Glutamin- und Asparaginsäure geben α -*Ketoglutar-*bzw. *Oxalessigsäure* und *Brenztraubensäure* (98). In vielen Fällen wurden die optisch unnatürlichen Formen rascher abgebaut als die natürlichen. BERNHEIM und Mitarbeiter (99) gewannen aus Niere ein gereinigtes Fermentpräparat und desaminierten damit die unnatürlichen Formen der Aminosäuren Alanin, Valin, Serin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin usw., wobei die entstehenden Ketosäuren als Phenylhydrazone isoliert oder als Bisulfitverbindung durch Jodtitration ermittelt wurden. α -*Keto- γ -methiobuttersäure* als Desaminierungsprodukt haben WAELSCH und BOREK (100) bei der Einwirkung von Nieren- und Leberschnitten auf *dl-Methionin* isoliert,

Nach KREBS (101) erfolgt die Desaminierung optischer Antipoden durch verschiedene, als l-Aminosäure-desaminase und d-Aminosäure-desaminase bezeichnete Enzyme. Erstere ist an die Zellstruktur gebunden und wird durch Octylalkohol und Cyanid vergiftet. WARBURG und CHRISTIAN (102) konnten zeigen, daß die d-Aminosäure-desaminase oder d-Aminosäureoxydase, welche spezifisch auf d-Alanin, d-Prolin, d-Methionin, d-Leucin, d-Isoleucin und d-Phenylalanin eingestellt ist, aus einem Protein und einem dialysierbaren Co-Ferment besteht, welches letzteres isoliert und als Alloxazin-adenin-dinucleotid identifiziert wurde (103).

Die d-Aminosäureoxydase greift (104) das d(+)-Prolin (I) und das d(-)-Ornithin (II) unter Bildung von α -*Keto- δ -aminovaleriansäure* (III) an:

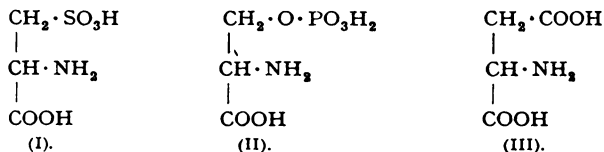


α -Amino- δ -oxy-valeriansäure geht nach Versuchen von NEBER (105) in der Niere in α -Keto- δ -oxy-valeriansäure über.

FELIX und ZORN (106) fanden merkliche Unterschiede bezüglich der Geschwindigkeit, mit welcher verschiedene α -Aminosäuren durch Nierenextrakte (also d-Aminosäureoxydase) desaminiert werden. Aus Untersuchungen von KARRER und FRANK (107) folgt, daß das gereinigte Ferment, dargestellt aus Lactoflavin-adenin-nucleotid und aus Hammelnierengewonnenem Apoferment, nicht alle d-Aminosäuren, welche Antipoden der Eiweiß-Aminosäuren sind, zu desaminieren vermag. Im Hinblick auf die in der Folge viel diskutierte Beobachtung von KÖGL und ERXLBEN (108) über das Vorkommen von Aminosäuren der d-Reihe im Protein maligner Tumoren haben U. WESTPHAL (109) und U. WESTPHAL und LANG (110) in Extrakten aus Leber und Nieren tumorkranker Ratten (Walker-Carcinom) herabgesetzte d-Aminosäureoxydase-Wirksamkeit festgestellt, welche nicht durch Verschiedenheiten im Laktoflavin Gehalt, sondern durch die Anwesenheit des Carcinomgewebes bedingt ist (111). Diese Erniedrigung ist jedoch nicht spezifisch an die Gegenwart des Tumorgewebes gebunden; sie findet sich auch bei trächtigen Ratten, nicht aber bei Ratten mit chemisch induzierten Geschwülsten (U. WESTPHAL, private Mitteilung).

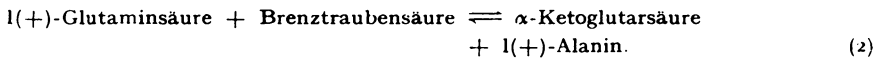
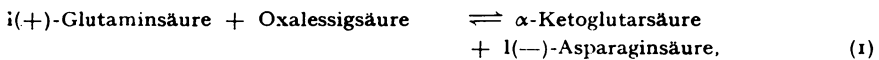
In viel stärkerem Maße bestehen aber für die natürlichen Aminosäuren Verschiedenheiten des enzymatischen Abbaues. Eine große Zahl von ihnen wird durch die KREBSSche l-Aminosäure-desaminase nicht angegriffen vielmehr nur durch spezifische Fermente abgebaut. Nach EDLBACHER und GRAUER (112) ist der Abbau des l-Alanins an die Zellstruktur gebunden und erfolgt am intensivsten in Organschnitten von Ratten-, Meerschweinchen- und Schweinenieren. Pro Mol entstehenden Ammoniaks kann unter geeigneten Bedingungen annähernd 1 Mol gebildete Brenztraubensäure festgestellt werden, deren Nachweis kolorimetrisch und präparativ als 2,4-Dinitro-phenylhydrazon erbracht wurde. Die Desaminierung der l(+)-Glutaminsäure zur α -Ketoglutarinsäure erfolgt, wie namentlich Versuche von EULER und seiner Schule zeigten, durch eine in vielen tierischen Geweben, ferner in Hefe und Bakterien vorkommende Glutaminsäuredehydrase, welche je nach ihrem Ursprung die Co-Dehydrase I oder II benötigt. Nach WEIL-MALHERBE (113) wird im Gehirn nur l(+)-Glutaminsäure oxydativ desaminiert. Extrakte greifen indessen nur die d(-)-Glutaminsäure an. Die Reversibilität der dehydrierenden Desaminierung der l(+)-Glutaminsäure zeigten vor allem EULER und Mitarbeiter (114). Die zentrale Stellung, die der α -Ketoglutarinsäure bei den Umaminierungen zukommt, geht aus den wichtigen Untersuchungen von BRAUNSTEIN und KRITZMANN hervor (115), welche nachwiesen, daß in der Muskulatur und auch in anderen Geweben, wie Leber, Niere, Gehirn und Herzmuskel (116), Glutaminsäure und Brenztraubensäure

durch Umaminierung Alanin und α -Ketoglutar säure bilden. Aus α -Ketoglutar säure und Alanin entstehen umgekehrt mit großer Geschwindigkeit Brenztraubensäure und Glutaminsäure. Die Fermente der Umaminierung werden von BRAUNSTEIN als Aminopherasen bezeichnet (117). Sie sind mit den l- und d-Aminosäureoxydasen nicht identisch, aber vielleicht nahe verwandt. Bis jetzt werden zwei verschiedene Enzyme unterschieden: die Glutamico-aminopherase, welche die Umsetzungen der α -Ketoglutar- und Glutaminsäure steuert und als Trockenpulver aus Muskulatur erhalten wurde, das beim geeigneten Aufbewahren seine Aktivität nicht wesentlich einbüßt, ferner die weniger stabile Aspartico-aminopherase. Sie soll ein thermostabiles Co-Ferment benötigen und katalysiert die Umaminierungen, welche die Asparagin- und die Oxal essigsäure einschließen. Die Aminogruppe der Glutaminsäure kann, wenn auch mit geringerer Geschwindigkeit, auf α -Ketobuttersäure, Dimethyl- und Methyläthylbrenztraubensäure, Oxal essigsäure und Phenylbrenztraubensäure übergehen. Auch die rückläufige Übertragung des α -Aminostickstoffes der meisten natürlich vorkommenden Aminosäuren auf die α -Ketoglutar säure ist möglich. Indessen wird die α -Amino- gruppe der Glutaminsäure oder Asparaginsäure auf Ketone, Oxyketone und Aldehyde, ferner auf β - und γ -Ketosäuren nicht übertragen. Zwischen α -Amino-monocarbonsäuren und α -Keto-monocarbonsäuren findet keine direkte intermolekulare —NH_2 -Übertragung statt. Anfänglich wurde angenommen, die Umaminierungen fänden nur statt, wenn der eine der Reaktionspartner zwei endständige COOH-Gruppen aufweise, d. h. die Donatoraminosäure oder die Akzeptorketosäure eine Dicarbonsäure darstellt. Es zeigt sich indessen, daß auch ein anderes elektronegatives Radikal an Stelle der zweiten endständigen COOH-Gruppe den Anforderungen genügt. Cysteinsäure (I) und Phosphoserin (II), welche wie die Asparaginsäure (III) in β -Stellung ein zweites Säureradikal haben, geben mit Muskelgewebe gleichfalls Alanin, und zwar in Mengen, die sowohl der Abnahme dieser NH_2 -Donatoren als auch der Milchsäure äquivalent sind. Untersuchungen von COHEN (118) mit Fermentextrakten aus Taubenbrustmuskulatur zeigen indessen, daß an den Umaminierungen



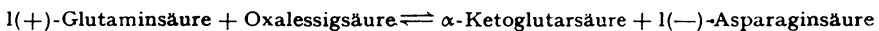
im Sinne BRAUNSTEINS nur wenige Aminosäuren teilnehmen. Von 21 verschiedenen α -Aminosäuren erwiesen sich in Gegenwart von α -Ketoglutar säure die l(-)-Asparaginsäure und das l(+)-Alanin am besten zur Bildung von Glutaminsäure befähigt, dl- α -Aminobuttersäure und

l(+)-Valin viel weniger, die übrigen α -Aminosäuren überhaupt nicht. Von den geprüften Ketosäuren veranlaßten Brenztraubensäure und Oxal-essigsäure am raschesten den anaeroben Abbau der Glutaminsäure, α -Ketobutter- und Mesoxalsäure wirkten nur viel langsamer, Ketovalerian-, Ketohehexan-, Acetessig- und Lävulinsäure gar nicht. Für das Ferment der Umaminierung wird die Bezeichnung Transaminase (oder Transaminasen) vorgeschlagen (119). Gereinigte Fermentpräparate aus Taubenbrustmuskel oder Taubenherzmuskel katalysieren folgende umkehrbare Reaktionen:

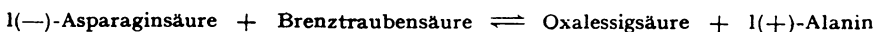


l(-)-Cysteinsäure (I) gibt mit α -Ketoglutarsäure β -Sulfobrenztraubensäure und l(+)-Glutaminsäure, ferner mit Oxallessigsäure β -Sulfobrenztraubensäure und l(-)-Asparaginsäure. Die Reversibilität dieser beiden Reaktionen ist indessen experimentell nicht bewiesen. Ferner ist das Ferment zur Umaminierung zwischen l(-)-Asparaginsäure und Brenztraubensäure, bzw. zwischen Oxallessigsäure und l(+)-Alanin nicht fähig. Aminosäuren der d-Reihe und Glutathion reagieren mit Transaminase nicht. Auch BRAUNSTEIN (120) weist darauf hin, daß bei den von ihm studierten Umaminierungsversuchen nur die natürlichen l-Formen der Aminosäuren als NH_2 -Donatoren reagieren und die als Reaktionsprodukte auftretenden neuen Aminosäuren gleichfalls der l-Reihe angehören.

Von den genannten Umsetzungen [Gleichungen (1) und (2)] verläuft Reaktion (1):



in allen untersuchten Geweben (Herzmuskel, Skeletmuskel, Gehirn, Leber, Niere, Testes, Lunge und Milz) am raschesten, mit Herzmuskulatur wurden Transaminationsquotienten von 425 gemessen, für die rückläufige Reaktion im selben Gewebe aber nur etwa die Hälfte oder ein Drittel dieses Wertes gefunden. Die Reaktionen nach Gleichung (2), ferner die Umaminierung:

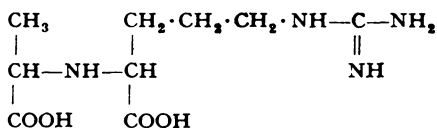


verlaufen hingegen, verglichen mit Reaktion (1), sehr langsam und in einem merklichen Ausmaß überhaupt nur in der Leber. Glutamin- und Oxallessigsäure dürften daher als wichtigste Substrate der Umaminierung gelten (121).

Daß auch im lebenden Organismus, d. h. unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich Desaminierungs- und Reaminierungsvorgänge

stattfinden, bewiesen SCHOENHEIMER und seine Mitarbeiter in grundlegenden Versuchen mit Hilfe des schweren Stickstoffisotopen als Indicator (122). Nach Fütterung von ^{15}N -haltigen Aminosäuren an Ratten läßt sich der schwere Stickstoff in den Aminogruppen aus den Gewebsproteinen isolierter Aminosäuren nachweisen. Wird z. B. signiertes *d*-Tyrosin, *l*(—)-Leucin, Glykokoll oder ^{15}N -haltiges Ammoniak (als Ammonicitrat) gegeben, so findet sich das schwere N-Isotope im Stickstoff der Aminogruppen des Glykokolls, Tyrosins, Leucins, Prolins, Histidins, Arginins und besonders der Glutamin- und Asparaginsäure angereichert. Aber auch das *d*(+)-Leucin kann den Aminostickstoff für viele andere Aminosäuren im Organismus liefern (123). Die biologische Desaminierung des Lysins ist indessen nicht reversibel (124).

Der Reaktionsmechanismus der Umaminierungen ist noch nicht mit Sicherheit geklärt, soll aber in Analogie zu den Befunden von HERBST und ENGEL (125) über die SCHIFFSchen Basen verlaufen, wofür auch die von KNOOP und MARTIUS (126) gezeigte Synthese des Octopins spricht. Untersuchungen von KARRER, KOENIG und LEGLER (127) brachten Beweise, daß solche Umaminierungen auch durch primäre Hydrierung und anschließende Dehydrierung SCHIFFScher Basen sich vollziehen können. Octopin (I), eine natürlich vorkommende α,α' -Imino-dicarbon-



(I).

säure, wird durch Leberbrei ebenso rasch dehydriert wie *l*(+)-Alanin und *l*(—)-Asparaginsäure.

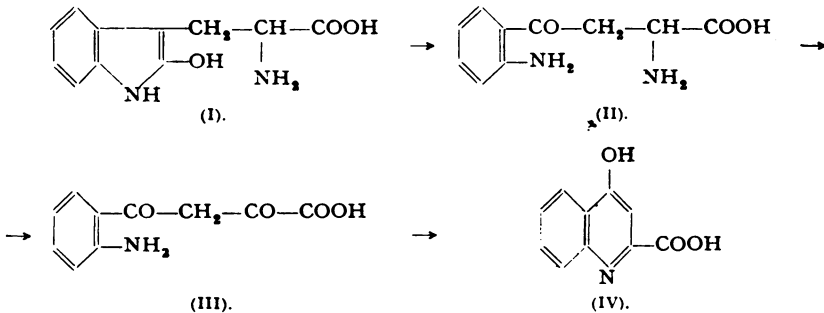
Vielen Ketosäuren kommt somit im Stoffwechsel eine fundamentale Bedeutung zu: in zahlreichen Fällen ist nicht die Aminosäure, sondern die entsprechende α -Ketosäure (oder eventuell die α -Oxysäure) als lebensnotwendig zu bezeichnen, welche in Anwesenheit geeigneter NH_3 -Donatoren aminiert werden kann. Fütterungsversuche haben dies vielfach bestätigt. Indolbrenztraubensäure kann Tryptophan, Phenylbrenztraubensäure Phenylalanin, α -Keto-isocaproensäure Leucin ersetzen usw. (128).

Auch *sterische Umwandlungen* von Aminosäuren verlaufen im Tierkörper über die entsprechenden *Ketosäuren*. Für den Übergang von *d*-Phenylaminobuttersäure zur *l*-Phenylaminobuttersäure erbrachten DU VIGNEAUD, SCHOENHEIMER und Mitarbeiter (129) durch Signierungen mit Deuterium und schwerem Stickstoff diesbezügliche Beweise. Die Umwandlung des Leucins von der *d*- in die natürliche Form studierten SCHOENHEIMER und Mitarbeiter (130) an Ratten durch Fütterung von ^{15}N - und *D*-haltigem *d*(+)-Leucin. Das aus dem Muskelprotein isolierte

l(-)-Leucin wies einen merklichen Gehalt an kohlenstoffgebundenem Deuterium auf, während schwerer Stickstoff praktisch nicht mehr vorhanden war. Die Inversion verlief zweifellos über die Ketosäure.

Für eine Anzahl Aminosäuren sind besondere Abbaumechanismen bekannt. Insofern dabei keine Ketosäuren als Intermediärprodukte nachgewiesen wurden, ist die Oxydation solcher Verbindungen in anderen Abschnitten dieser Arbeit erwähnt.

Der Abbau des *Tryptophans* zur *Kynurensäure* (IV) verläuft im Tierkörper nach KOTAKE (58) über das *Kynurenin* (II) als Intermediärprodukt. Diese Aminosäure, welche im Harn von Kaninchen nach Gaben von l-Tryptophan durch oxydative Spaltung des Pyrrolrings über das α -Oxytryptophan (I) auftritt, ist als Gen-abhängiger Baustoff für die Pigmente der Ommochromgruppe bei Insekten von physiologischer Bedeutung (KÜHN, BECKER, BUTENANDT, DANNEEL). Ihre Konstitution haben kürzlich BUTENANDT und Mitarbeiter (131) durch Synthese aufgeklärt. Kynurenin ist eine o-Amino-phenacyl-amino-essigsäure (II). Die Kynurensäure entsteht daraus durch Desaminierung zur o-Aminobenzoyl-brenztraubensäure (III), anschließenden Wasserentzug und Ringschluß:



Die Kynurensäurebildung als Endprodukt des Tryptophanstoffwechsels wurde von JACKSON (132) bei zahlreichen Carnivoren studiert. Nach Tryptophanfütterung schieden Hyänen, Steppenwölfe, Wölfe, Füchse und Dachse, nicht aber Leoparde, Zibete, Bären, Waschbären und Seelöwen Kynurensäure aus. Bei Hunden wird auch in der Galle Kynurensäure ausgeschieden, was bei Kaninchen nicht oder nur in geringem Maße der Fall ist (133). Über die Entstehung von Kynurensäure im Kaninchen- und Rattenorganismus aus weiteren *Indolderivaten* liegen Untersuchungen von BERG und Mitarbeitern vor (134). Während Verabreichung von Indolpropionsäure, Methyltryptophan, Benzoyltryptophan, α -Oximino- β -3-indolpropionsäure, β -3-Indolacrylsäure und l- β -3-Indolmilchsäure nicht zur Ausscheidung von Kynurensäure bei Kaninchen führten, trat diese

nach Gaben von *Tryptophan-äthylesterchlorhydrat*, *dl-β-3-Indolmilchsäure* und *β-3-Indolbrenztraubensäure*, ferner nach solchen von *Amid*, *Äthylamid*, *Diäthylamid*, *Anilid* und *N-Äthylanilid* des Tryptophans an Kaninchen auf (135). Es ist für den Abbau offenbar gleichgültig, ob ein primäres, sekundäres oder tertiäres Amid des Tryptophans vorliegt. KYU-SUI (136) zeigte den Abbau des *Abrins* oder *l-N-Methyl-tryptophans* durch Kaninchen zu Kynurensäure (19,8—25,4%) und Kynurenin (4,2—5,9%). Sowohl Kynurenin als Tryptophan geben bei der Spaltung durch *Bact. subtilis* neben Anthranilsäure auch Kynurensäure (137).

Aus *l-Phenylalanin* kann durch verschiedene Mikroorganismen *Phenylbrenztraubensäure* entstehen, besonders durch solche des Typus *Bacillus proteus* und *Morgan-Bacillus* (138). Das Auftreten von Phenylbrenztraubensäure im Harn von Kaninchen nach Fütterung von Phenylalanin wurde von KOTAKE beobachtet und von SHAMBAUGH und Mitarbeitern (139) nach Gaben von 0,91 g pro Kilogramm Körpergewicht bestätigt. Auch CHANDLER und LEWIS (140) erhielten nach oraler Verabreichung von 2,0 g Phenylalanin an 3 kg schwere Kaninchen Phenylbrenztraubensäure, wobei die Ausbeute nach *dl-Phenylalanin* größer war als nach *l-Phenylalanin*. Phenylbrenztraubensäure im Harn weißer Ratten bei oft gleichzeitiger Alkaptonurie fanden FÖLLING und CLOSS (141) und CLOSS und BRAATEN (28) nach subcutaner Injektion von Phenylalanin als Na-Salz (z. B. 330 mg *l-Phenylalanin* pro 100 g Körpergewicht). Vitamin-B₁-arme Tiere reagieren zum Unterschiede normaler Kontrollen schon nach kleineren Gaben mit einer Phenylketonurie (142). Auch skorbutische Meerschweinchen scheiden nach Phenylalanin oder Phenylbrenztraubensäure vermehrt Phenylbrenztraubensäure und Homogentisinsäure aus (vgl. S. 192). Durch Fütterung von Ascorbinsäure läßt sich diese Ausscheidung beheben (143).

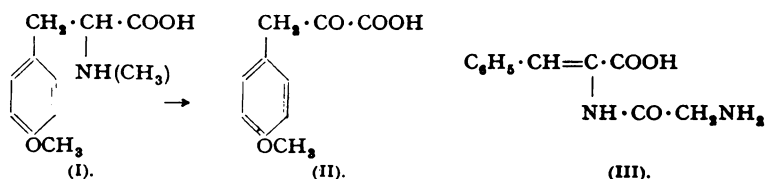
1934 stellte FÖLLING (19) Phenylbrenztraubensäure im Harn schwachsinniger Kinder fest. Diese Stoffwechselanomalie wurde von anderer Seite, z. B. PENROSE (144) und JERVIS (145) bestätigt und in der Folge als *Imbecillitas phenylpyruvica*, *Oligophrenia phenylpyruvica* oder *Phenylketonurie* bezeichnet. JERVIS (145) fand unter 8043 Insassen einer psychiatrischen Klinik 42 mit *Oligophrenia phenylpyruvica* behaftet. Die Phenylbrenztraubensäure war im Liquor nicht nachweisbar. PENROSE und QUASTEL (146) sahen bei einem Patienten eine Ausscheidung von 1—1,5 g Phenylbrenztraubensäure während 24 Stunden, was einer unvollständigen Verbrennung von mindestens der Hälfte des im Nahrungseiweiß enthaltenen Phenylalanins entspricht. Bei Phenylketonurie führt die Aufnahme von *dl*-, *l*- und *d*-Phenylalanin in etwa demselben Ausmaße zur Ketosäure, während bei gesunden Individuen nur mit der *d*- oder *dl*-Form geringfügige Phenylbrenztraubensäuremengen im Harn entstehen. Bei diesen Kranken wird indessen zusätzliches Phenylalanin

nicht quantitativ in Phenylbrenztraubensäure umgewandelt. Von den Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Phenylserin, Dioxyphenylalanin, Alanin, Leucin, Cystin, Valin und Glycin verursachte nur die zuerst genannte nach Verabreichung an zwei Kranke vermehrte Phenylbrenztraubensäureausscheidung. Die d-Form gab höhere Ausbeuten als die l-Form (147). Die Erkrankung soll auf einer Hemmung des Phenylalaninabbaues auf der Stufe der Phenylbrenztraubensäure beruhen. JERVIS und Mitarbeiter (148) beobachteten bei Oligophrenia phenylpyruvica nach Verabreichung von Phenylbrenztraubensäure und Phenylalanin eine Steigerung des Blut-Phenylalanin-Gehaltes. Die Aminierung der Ketosäure ist also offenbar ebenfalls nicht beeinträchtigt, die Stoffwechselstörung beruht eher auf der Unfähigkeit des Körpers zur rationellen Ausnutzung der Phenylbrenztraubensäure. Letztere wurde von diesen Autoren übrigens auch im Liquor der Patienten nachgewiesen.

Nach FELIX und Mitarbeitern (149) verbraucht *l*(-)-Phenylalanin bei der Oxydation durch Leber und Nierenbrei 1 Atom Sauerstoff. Ammoniak wird in wesentlichem Ausmaße nicht frei, auch bildet sich keine Ketosäure. LANG und U. WESTPHAL (150) gelang der Nachweis einer *l*(-)-Phenylalaninoxidase, d. h. eines in Ratten- und Hundeleber vorhandenen, in Lösung übergehenden Fermentes, das *l*(-)-Phenylalanin angreift. *l*(-)-Tyrosin wird durch Leberbrei unter Bildung von 1 Mol Acetessigsäure, 1 Mol Alanin und 1 oder 2 Mol Kohlensäure abgebaut. Acetessigsäure und Kohlensäure sollen aus dem Benzolring entstehen (151).

Kaninchen, denen 8 und 10 g. *dl*-*O,N*-Dimethyltyrosin (I) subcutan injiziert wurden, schieden 0,6 und 0,9 g *p*-Methoxyphenyl-brenztraubensäure (II) aus (152).

BERGMANN und SCHLEICH (153) beobachteten die Spaltung des Glycyl-dehydro-phenylalanins (III) zu Phenylbrenztraubensäure, Ammoniak und Glycin durch Nierenextrakte.

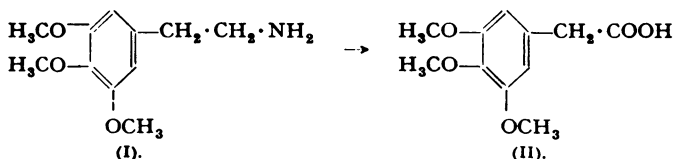


4. Bildung von Carboxyl-Gruppen.

a) Durch Desaminierung.

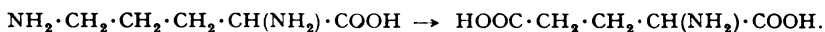
Die bereits 1910 bei der Leberdurchströmung mit Tyramin von EWINS und LAIDLAW nachgewiesene *p*-Oxy-phenylessigsäure wurde erneut von BERNHEIM (154) bei der oxydativen Desaminierung von Tyramin mit

Fermentextrakten aus Meerschweinchenleber isoliert. Wie bereits erwähnt (vgl. S. 198), verläuft dieser Abbau über den Aldehyd, aus dem die Säure wohl durch Dismutation entsteht. *Mescalol* oder 3,4,5-Trimethoxyphenyläthylamin (I) wird nach SLOTTA und MÜLLER (155) von Kaninchen und Hunden zu Trimethoxyphenyllessigsäure (II) oxydiert. Erstere



schieden nach Gaben von 400 mg pro Tag (sie vertragen 800 mg ohne Vergiftungserscheinungen zu zeigen) 140 mg der Säure aus, bei Hunden traten nach 400 mg bereits Rauschsymptome auf. Die Ausbeuten an Trimethoxyphenyllessigsäure waren etwa gleich, d. h. 100—150 mg. Letztere ließ sich an Kaninchen verfüttert zu etwa 60, an Hunde zu etwa 50% unverändert auffinden. Die Oxydation von Mezcalin zu Trimethoxyphenyllessigsäure gelingt nach BERNHEIM (156) auch mit einem Extrakt aus Kaninchenleber. Präparate aus Ratten- und Meerschweinchenleber waren weniger wirksam, solche aus Ratten- und Meerschweinchenniere und Katzen- und Hundeleber und -niere unwirksam. Alle Extrakte enthielten aktive Tyraminoxidase, welche Mezcalin jedoch nicht angreift.

Die Entstehung von *Glutaminsäure* aus Ornithin bewiesen SCHOENHEIMER und Mitarbeiter (157) durch Fütterung von Deuterio-ornithin an ausgewachsene Mäuse. Aus den Gewebsproteinen isolierte Glutaminsäure enthielt Deuterium, sie verdankte also ihre Entstehung zum Teil dem aufgenommenen Ornithin:



b) Durch oxydative Aufspaltung von Ringen.

1. *Aromatische Ringe.* Seit JAFFÉ nach fortgesetzter Fütterung von täglich 2—3 g Benzol an Hunde und Kaninchen aus dem Harn der Versuchstiere etwa 0,3% *Muconsäure*, $\text{HOOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, gewann und damit die Oxydation des Benzolringes im Tierkörper für bewiesen betrachtete, haben sich verschiedene Autoren erneut mit dem Stoffwechsel des Benzols befaßt (158). Nach BOESECKEN und SLOOF (159) müßte aus Benzol in Analogie zur Oxydation von o-Benzochinon die cis-cis-Muconsäure entstehen, während JAFFÉ aus dem Harn die trans-trans-Form erhielt. Es wurde daher angenommen, letztere bilde sich aus anderen Quellen, z. B. aus Galaktose. DRUMMOND und FINAR (160) beobachteten jedoch, daß dem Harn zugesetzte cis-cis-Muconsäure bei Kaninchen, denen Benzol verfüttert wurde, in die trans-trans-Form über-

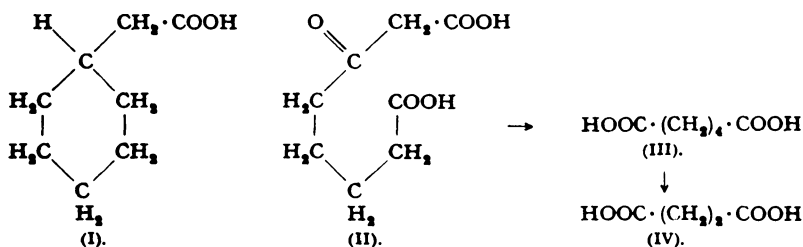
ging. Nach Benzol oder gleichzeitigen Benzol- und cis-cis-Muconsäuregaben konnten nur kleine Anteile an trans-trans-Säure isoliert werden. BERNHARD und GRESSLY (161) injizierten Kaninchen ein Gemisch von C_6H_6 und C_6D_6 und erhielten eine geringe Menge Muconsäure, deren Herkunft aus dem verabreichten Benzol auf Grund ihres Gehaltes an schwerem Wasserstoff feststand. Die Oxydation des Benzolringes zu Muconsäure ist damit bewiesen. Daß der Reaktion innerhalb des Eiweißstoffwechsels eine Bedeutung zukommt, ist vorläufig noch nicht entschieden. Wenn intermediär entstehende Muconsäure im Tierkörper leichter abgebaut wird als zugeführte, würden die nach Benzolgaben im Harn nachweisbaren Mengen lediglich einen kleinen Anteil der sich wirklich bildenden Muconsäure darstellen. Der Benzolring gilt als schwer verbrennlich, wofür die als Endprodukte des Abbaues aromatischer Aminosäuren betrachteten Verbindungen, wie Hippursäure, Phenole usw., sprechen. CHANDLER und LEWIS (140), welche sich mit dem Stoffwechsel des Phenylalanins und der Brenztraubensäure bei Kaninchen befaßten, gelangten gleichfalls zu dieser Ansicht. Hingegen soll die als Phenylketonurie bezeichnete Stoffwechselstörung nach PENROSE und QUASTEL (146) auf einer herabgesetzten Fähigkeit des Organismus zur Oxydation oder Spaltung des Benzolringes der Phenylbrenztraubensäure beruhen, wobei also vorausgesetzt wird, daß beim Gesunden letztere Möglichkeit vorhanden ist. Nach FELIX und ZORN (151) bilden sich aus dem Benzolring des l(-)-Tyrosins mit Leberbrei Acetessigsäure und Kohlensäure (vgl. S. 209).

2. *Hydrocyclische Ringe.* Inosit gibt durch Einwirkung von *Bact. gluconicum* oder *Penicillium griseoflavum* geringe Mengen *Essigsäure* neben etwas *Oxalsäure* (162).

Hydrocyclische Verbindungen verhalten sich im Stoffwechsel meist völlig verschieden von den entsprechenden aromatischen (163). Nach intraperitonealer Injektion von *Cyclohexan* und *Cyclohexen* an Kaninchen soll nach TORBOLI (164) *Adipinsäure* auftreten. Ein Kaninchen, welches 495 mg, und ein Hund, der 280 mg *Cyclohexan* pro Kilogramm Körpergewicht und Tag erhielt, schieden keine *Adipinsäure* im Harn aus (165). *Cyclohexanol*, $C_6H_{11}OH$ konnte nach Einspritzungen öligler Lösungen an einen Hund nicht mehr aufgefunden werden. Es ist anzunehmen, es verbrenne völlig (166). Dasselbe trifft für *Methyl-*, *o-Dimethyl-* und *p-Dimethyl-cyclohexan* zu. Abbauprodukte wurden nicht angetroffen; durch Öffnung des Ringes sich bildende Säuren dürften rasch weiter abgebaut werden.

Cyclohexyl-essigsäure $C_6H_{11} \cdot CH_2 \cdot COOH$ (I) wird nicht wie die Phenylessigsäure unverändert bzw. gepaart ausgeschieden, sondern weitgehend abgebaut. Nach subcutaner Injektion von 13 g als Na-Salz an einen Hund (95,5 mg/kg/die) fanden sich nur zirka 3% unverändert

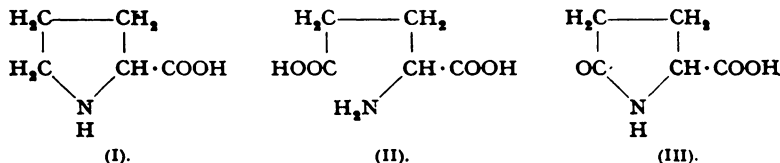
im Harn vor. Hingegen konnten 414 mg *Bernsteinsäure* (IV) isoliert werden, Mengen, die normalerweise nicht im Harn vorkommen. Möglicherweise entstand diese Bernsteinsäure als Abbauprodukt der Cyclohexyl-essigsäure über β -Keto-korksäure (II) und Adipinsäure (III) durch 2malige β -Oxydation (166):



o-, *m*- und *p*-Hexahydro-aminobenzoessäure verbrennen, an Hunde verfüttert (80 mg/kg/die), weitgehend (167). Nach *Hexahydro-m-aminobenzoessäure*-Gaben (80 mg/kg/die) enthielt der Harn im Mittel 126,5 mg *Oxalsäure*, also weit über der Norm liegende Mengen. Erhöhung der Harn-Oxalsäure trat auch beim Versuch mit der *o*-Säure ein (zirka 75 mg *Oxalsäure* pro Tag), nicht aber nach Fütterung der *p*-Verbindung. Da die renale Oxalsäureausscheidung der Versuchstiere bei normaler Ernährung täglich nur etwa 20 mg betrug, könnte die beobachtete Vermehrung durch die verfütterten Säuren bedingt sein, wenn deren Oxydation bis zur Stufe der Oxalsäure führt.

Auch *Cyclohexyl-buttersäure* und *Cyclohexyl-decansäure*, an Hunde injiziert bzw. verfüttert (83 und 100 mg/kg/die), verbrennen völlig (165). Nach *Cyclohexylbuttersäure* betrug die tägliche Oxalsäuremenge im Harn 56 mg, war also gleichfalls deutlich erhöht.

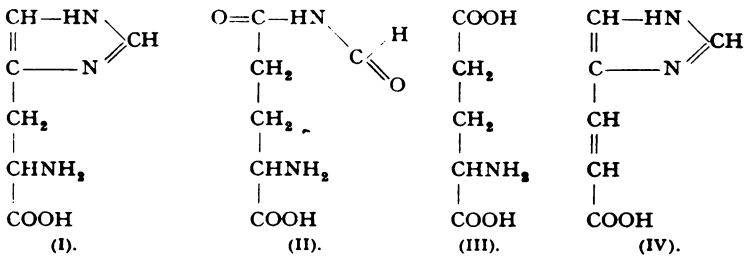
3. *Heterocyclische Ringe*. Die Oxydation des *l*(-)-*Prolins* (I) durch Nierenschnitte führt nach WEIL-MALHERBE und KREBS (168) zu *Glutaminsäure* (II) und schließlich zu α -Ketoglutarsäure. Die Reaktion scheint nicht über die Pyrrolidon-carbonsäure (III) zu verlaufen, deren *l*-Form



von Meerschweinchenniere nicht abgebaut wird. Nach NEBER (105) handelt es sich auch nicht um eine hydrolytische, über die α -Amino- δ -oxyvaleriansäure als Intermediärprodukt führende Spaltung, sondern um eine direkte oxydative Aufspaltung des Ringes zu Glutaminsäure.

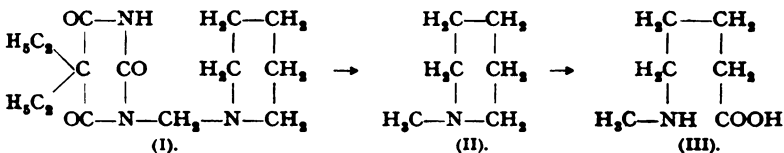
Aus racemischem Prolin wird in der Niere gleichfalls Glutaminsäure gebildet.

EDLBACHER (169) fand in der Leber ein Enzym, die Histidase, welches *Histidin* (I) unter Ammoniakbildung zerlegt. Es handelt sich um eine hydrolytische Spaltung des Imidazolringes, welche zu *l(+)-Glutaminsäure* (III) führt (170) Befunde, welche ABDERHALDEN (171) bestätigte. Intermediärprodukte dieses Abbaues konnten nicht gefaßt werden; die Deutung des Reaktionsmechanismus steht daher noch offen. EDLBACHER denkt an einen möglichen Verlauf über Formylglutamin (II):



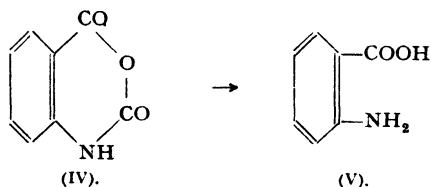
Neben der Histidase entdeckten KOTAKE und Mitarbeiter (172) in der Leber die gleichfalls das Histidin angreifende Urocaninase, welche die längst bekannte, im Harn von Hunden angetroffene *Urocaninsäure* oder Imidazykacrylsäure (IV) liefert. Letztere ist indessen kein Intermediärprodukt des Histidinabbaues durch Histidase; nach EDLBACHER und VIOLLIER (173) tritt die hydrolytische Histidinspaltung auch in Abwesenheit der Urocaninase ein. Es bestehen daher zwei Abbaumöglichkeiten für das Histidin, die hydrolytische Öffnung des Imidazolringes durch die Histidase — offenbar der Hauptweg — und die α -Desaminierung mit anschließender Spaltung der entstandenen Urocaninsäure. Diese gibt mit Leberextrakt gleichfalls *l-Glutaminsäure* (174). Histidin ist übrigens ein normaler Harnbestandteil (175) und soll bei der Schwangerschaft vermehrt ausgeschieden werden (176).

Zum Studium des Verhaltens des *Piperidins* im Tierkörper verfütterte STEUDEL (177) an Stelle der stark giftigen Base ein Kondensationsprodukt von Methylpiperidin und Veronal, das *N-Methyl-hexahydropyridin-propan-2-diäthyl-1,3-dicarbonsäureureid* (I), an Hunde. Aus dem Harn konnte eine geringe Menge δ -*Methylaminovaleriansäure* (III) isoliert werden. Es ist anzunehmen, das verfütterte Kondensationsprodukt er-



gebe im Tierkörper Methylpiperidin (II), das seinerseits durch oxydative Spaltung in Methylaminovaleriansäure übergeht. Vielleicht gelangt nur ein Teil derselben zur Ausscheidung, während die Hauptmenge weiter verbrennt.

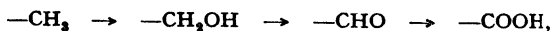
Isatosäureanhydrid (IV). in wäßriger Suspension an Kaninchen in Mengen von 2,0—3,0 g per os gegeben, wurde teilweise in *Anthranihsäure* (V) umgewandelt. Nach insgesamt 30 g enthielt der Harn 2,8 g oder 11,1% d. Th. *o*-Amino-benzoessäure (V) (178).



c) Aus Methylgruppen.

Unter *Methyloxydation* (179) verstehen wir die Umwandlung von CH_3 - in COOH -Gruppen, wie sie für Methylgruppen am Benzolkern schon lange bekannt ist. *Toluol* und zahlreiche Homologe desselben werden im Tierkörper methyloxydiert, *n*-Propyl- und *n*-Amyl-benzol geben *Benzoessäure*, *n*-Butyl- und *n*-Hexyl-benzol *Phenyllessigsäure*. Zusammenfassende Darstellungen dieser älteren Arbeiten von JAFFÉ, THOMAS, THIERFELDER, KLENK, KNOOP usw. geben FROMHERZ (180), ferner FLASCHENTRÄGER und BERNHARD (181).

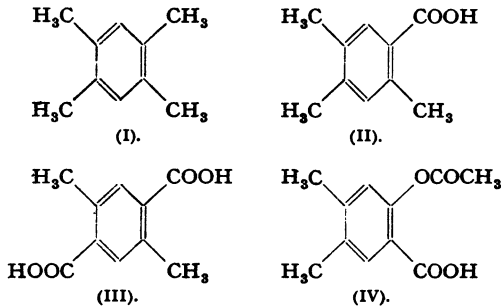
Die Oxydation der Methylgruppe zur COOH -Gruppe im Tierkörper ist folgendermaßen formulierbar:



wobei das Auftreten dieser Zwischenstufen in einigen Fällen beobachtet werden konnte. Der Begriff der Methyloxydation soll hier daher erweitert und allgemein für die oxydative Veränderung der CH_3 -Gruppen verwendet werden.

Die Umwandlungen von $-\text{CH}_2\text{OH}$ zu $-\text{CHO}$ und von $-\text{CHO}$ zu $-\text{COOH}$ denken sich R. KUHN und KÖHLER (179) im Sinne der Dehydrierungstheorie WIELANDS, unabhängig von den schwermetallhaltigen Enzymen erfolgend. Sie würden durch spezifische Dehydrasen eingeleitet, wie sie WARBURG für das System Hexosephosphorsäure \rightarrow Phosphohexonsäure und EULER für dasjenige Äthylalkohol \rightarrow Acetaldehyd nachwiesen. Die erste Stufe, $-\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_2\text{—OH}$ erfordert einen anderen Mechanismus und läßt sich, wie KUHN schon bemerkte, möglicherweise nach WARBURG durch Einführung über häminartige Enzyme aktivierten Sauerstoffs erklären.

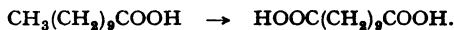
1. *Oxydation am Benzolkern befindlicher CH₃-Gruppen.* Während Methylbenzol von Hunden in Benzoe- bzw. Hippursäure übergeführt wird, erfährt *Methylcyclohexan* keine Methyloxydation; es verschwindet, in Mengen von 200 und 290 mg/kg/die in Olivenöl gelöst verabreicht, völlig. Entstehende Hexahydrobenzoesäure hätte Benzoesäure gegeben; die oxydative Ringsprengung gelingt hier offenbar leichter als die Methyloxydation (166). Nach Fütterung von 35 g *p*-Xylol an Kaninchen fanden R. KUHN und J. LÖW (182) 10 g *p*-Toluylsäure, aber keine *Terephthalsäure*. Ein Beweis für die gleichzeitige Oxydation von zwei am Ring befindlichen Methylgruppen, welcher mit Ausnahme der Befunde über das Verhalten des Dimethylcamphers vereinzelt dasteht, konnte nach Gaben von 25 g *Durol* (2,3,5,6-Tetramethyl-benzol) (I) erbracht werden. Aus dem Harn gelang die Isolierung von 7 g *Durylsäure* (II) neben 400 mg *Dimethyl-terephthalsäure* (III). Die *4,5-Dimethyl-2-acetylsalicylsäure* (IV) lieferte keine Dicarbonsäuren, sie wurde verseift als *Dimethyl-salicylsäure* im Harn aufgefunden.



o- und *p*-*Dimethyl-cyclohexan* verhielten sich von den entsprechenden aromatischen Verbindungen verschieden und verbrannten völlig (166).

2. *Methyloxydationen natürlicher Fettsäuren.* Umwandlungen von Methyl- in Carboxylgruppen wurden von VERKADE und Mitarbeitern (183) auch für den Stoffwechsel gewisser *Fette* nachgewiesen und als *ω*-*Oxydation* bezeichnet.

Nach Verabreichung von 100 g *Triundecylin* an gesunde Versuchspersonen konnten aus dem Harn 2,4—4,3 g *Nonandicarbonsäure* isoliert werden:



Von weiteren als Triglyceride geprüften Fettsäuren mit 7—13 C-Atomen (184) wirkten außer *Undecylsäure* lediglich *Caprin*-, *Pelargon*- und *Caprylsäure* diacidogen. Hinsichtlich der Ausbeute an entsprechenden Dicarbonsäuren stand die *Undecylsäure* an erster Stelle, dann folgte *Caprinsäure*, während *Pelargon*- und *Caprylsäure* nur noch sehr geringe

Mengen lieferten. *Kokosfett* führte, obwohl caprylsäurehaltig, nicht zu Diacidurie. Nach Aufnahme von *Triundecylin* enthielt der Harn außer der Nonandicarbonsäure noch *Azelain-* und *Pimelinsäure*, beim *Tricaprin*-versuch neben *Sebacin-* wenig *Kork-* und *Adipinsäure*. Die durch Methyloxydation gebildeten Dicarbonsäuren werden daher zum Teil durch einsetzende β -Oxydation weiter abgebaut. Gemischte Glyceride, z. B. α -*Lauro-* β,γ -*diundecylin* in Mengen von 36 g aufgenommen, ergaben im Harn 0,47 g Undecandisäure, aber keine Dodecan-disäure.

Die Methyloxydation von Fettsäuren wurde von FLASCHENTRÄGER und BERNHARD (185) an Hunden nachgewiesen, welche pro Tag und pro Kilogramm Körpergewicht rund 700 mg *Capron-*, *Oenanth-*, *Capryl-*, *Pelargon-*, *Caprin-*, *Undecyl-*, *Laurin-*, *Myristin-*, *Palmitin-* oder *Stearin-säure* erhielten. Nur nach Fütterung der Säuren mit 8—10 C-Atomen gelang der Nachweis geringer Mengen entsprechender Dicarbonsäuren, und zwar lag das Maximum mit 0,85% bei der *Caprylsäure*, bei der *Pelargon-* wurden 0,23 und bei der *Caprinsäure* 0,12% gefunden. Die *Methyl-* oder *Äthylester* verhielten sich wie die Fettsäuren selbst. *Kokosfett* und *Kochfett* (aus zirka 80% *Kokosfett* und 20% eingesottener Butter bestehend) in Mengen von 5 g pro Tag und Kilogramm Körpergewicht während 10 Tagen verfüttert, ergaben im Harn 597 und 286 mg rohe Dicarbonsäuren, bzw. 224 und 80 mg *Korksäure* und 20 und 26 mg *Sebacinsäure*. Analoge Mengen *Butter* verbrannten ohne Dicarbonsäurebildung. In Selbstversuchen wirkten 1,32 und 1,36 g *Kokosfett* pro Tag und Kilogramm Körpergewicht, während 7—8 Tagen aufgenommen, nicht diacidogen. VERKADE und Mitarbeiter (186) haben diese Befunde durch Gaben von *Triheptylin*, *Tricaprylin*, *Trinonylin* und *Tricaprin* an Hunde bestätigt, nach *Tricaprylin* konnten in zwei Versuchen 0,16 bzw. 0,11 g *Korksäure* isoliert werden.

Es ergibt sich demnach, daß der Mensch Fettsäuren mit 8—11 C-Atomen (in sehr geringem Maße auch noch die Laurinsäure) in die entsprechenden Dicarbonsäuren umzuwandeln vermag, während diese Fähigkeit für den Hund auf die Säuren mit 8—10 C-Atomen beschränkt bleibt.

Tabelle 1.

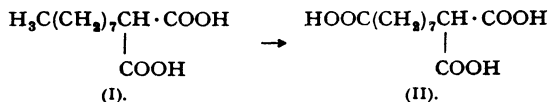
C Zahl	Fettsäure	% Dicarbonsäuren	
		Mensch	Hund
6	Capronsäure	—	0
7	Heptylsäure	0	0
8	Caprylsäure	0,10—0,16	0,40—0,85
9	Nonylsäure	0,37—0,59	0,10—0,23
10	Caprinsäure	0,40—2,00	0,05—0,12
11	Undecylsäure	1,00—5,85	0
12	Laurinsäure	Spuren	0

Eine Gegenüberstellung (vgl. Tabelle 1, S. 216) zeigt, daß das Maximum der Dicarbonsäurebildung beim Menschen nach Undecylsäure auftritt und im Mittel zirka 3% beträgt, beim Hund aber nach *Caprylsäure* beobachtet wird und bei etwa 1% liegt.

3. *Methyloxydationen substituierter Fettsäuren.* Ein methyloxydativer Abbau von Fettsäureketten in vivo kann nach Blockierung der β -Oxydation durch Einführung α - oder β -ständiger Substituenten in gewissen Fällen erleichtert oder ermöglicht werden. Veresterung der COOH-Gruppe oder Verwendung der Amide an Stelle der freien Carbonsäuren führt wohl bei *Polyencarbonsäuren*, nicht aber bei gewöhnlichen Fettsäuren, zu einer ausgeprägten Methyloxydation

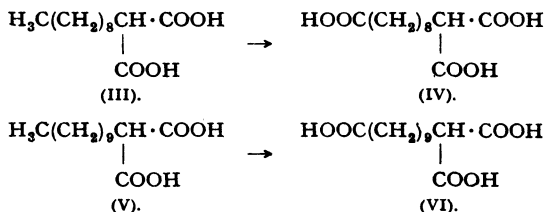
Capronsäure-, Laurinsäure- und Palmitinsäure-amid in Mengen von 2—4 g pro Tag an Kaninchen verfüttert, waren im Harn nicht mehr aufzufinden, der auch keine Dicarbonsäuren enthielt (182). Wahrscheinlich werden diese Amidbindungen leicht gespalten (187, 320). Analog verhielten sich *Laurinsäure-anilid*, *Laurinsäure-N-methyl-anilid* und *Caprinyldl-alanin*. Ein sekundäres oder tertiäres N-Atom in der Amidgruppe bedingt also keine bessere Blockierung; es ist anzunehmen, die Hydrolyse der Amidbindung verlaufe rascher und leichter als die Oxydation der Methylgruppe. Auch die Amide einfach ungesättigter aliphatischer Carbonsäuren ohne Seitenketten verhalten sich nach KUHN und LÖW (182) in diesem Sinne; weder nach Fütterung von α,β -*Hexensäure-amid* $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}_2$, β,γ -*Hexensäure-amid* $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$ oder *Octadien-3,5-säureamid* $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CONH}_2$ ließen sich Dicarbonsäuren auffinden. Es ist darauf hinzuweisen, daß die Amidbindung sich keineswegs nur im Sinne der Blockierung der COOH-Gruppe auswirkt, vielmehr auch Permeabilität und Acidität der erwähnten Säuren beeinflussen kann.

α -ständige Gruppen. Von *alkylsubstituierten Malonsäuren*, welche als Natriumsalze leicht löslich sind und von Hunden ohne jegliche Schädigungen ertragen werden, gelangt nach Versuchen von BERNHARD (188) *n-Octylmalonsäure* (I) zu 6,9% unverändert in den Harn, wird aber daneben zu 3,25% (roh 3,95%) als α -*Carboxy-sebacinsäure* (II) ausgeschieden.



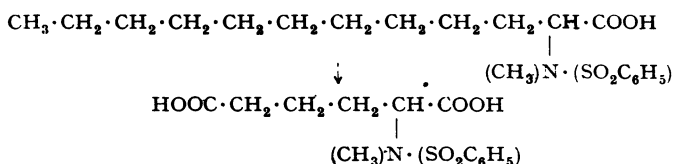
Ebenfalls methyloxydiert, und zwar auf Grund der Ausbeute in bereits beträchtlichem Ausmaße, wird die *n-Nonyl-malonsäure* (III), welche 8,84% α -*Carboxynonandicarbonsäure-1,9* (IV) (Rohausbeute 18,35%) lieferte. Nach Gaben von *n-Decyl-malonsäure* (V) entstanden 2,11 bzw.

3,27% (roh) α -Carboxy-decandicarbonsäure-1,10 (VI). Dagegen konnten nach Fütterung von *n*-Undecyl-, *n*-Tetradecyl- und *n*-Cetyl-malonsäure keine Ab-



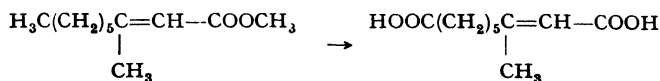
bauprodukte beobachtet werden. Diese Verbindungen dürften völlig verbrennen. Wenn man sich den Malonsäurerest wegdenkt, sind es wieder die Ketten mit 8, 9 und 10 C-Atomen, welche methyloxydiert werden, wobei die Ausbeute an Tricarbonsäuren in allen Fällen bedeutend höher ist als diejenige an Dicarbonsäure nach Fettfütterung. Die pro Tag und Kilogramm Körpergewicht verabreichten Malonsäuremengen (85 bis 100 mg) waren dabei um das 6—10fache geringer als die Fettsäuregaben.

Bereits 1934 bewiesen FLASCHENTRÄGER und Mitarbeiter (189) die Methyloxydation der Fettsäurekette unter anschließender β -Oxydation am Beispiele der *N*-Benzolsulfonyl-*N*-methyl- α -aminolaurinsäure, welche vom Hunde zu kleinen Mengen *N*-Benzolsulfonyl-*N*-methyl- α -amino-adipinsäure abgebaut wird:

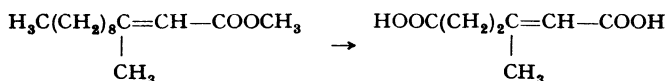


Letztere erscheint nach Verfütterung nahezu quantitativ (88%) im Harn, der β -oxydative Abbau von der neu geschaffenen COOH-Gruppe aus geht also nicht weiter. Die *N*-Benzolsulfonyl-*N*-methyl- α -amino-capronsäure erfährt hingegen keine Methyloxydation, sie tritt unverändert im Harn auf (190). Auch *N*-Benzolsulfonyl-*N*-methyl-*l*-asparaginsäure und *N*-Benzolsulfonyl-*N*-methyl-*d*-glutaminsäure (191) werden nicht abgebaut, wenn sie in Mengen von 50 und 64 mg pro Kilogramm Körpergewicht und Tag gefüttert werden. Sie lassen sich zu 77 und 82% im Harn auffinden.

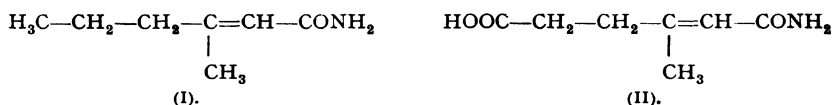
β -ständige Gruppen. KUHN, KÖHLER und KÖHLER (179) gelang nach Verfütterung von 45 g β -Methyl- β -*n*-hexylacrylsäure-methylester an Kaninchen aus dem Harn die Isolierung von 22% (roh) bzw. 6% (rein) 2-Methyl-hepten-(1,2)-1,7-dicarbonsäure:



β-Methyl-β-n-nonyl-acrylsäuremethylester in Mengen von insgesamt 45 g an Kaninchen gefüttert, gab 2,62 g 2-Methyl-buten-(1,2)-1,4-dicarbon-säure:

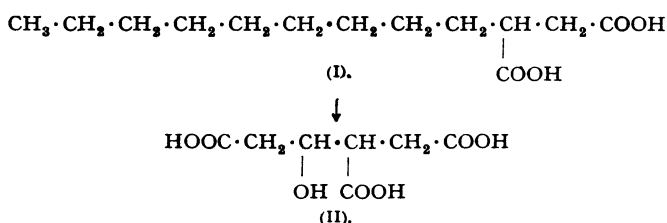


der ω-Oxydation folgte wie im Falle der *N*-Benzolsulfonyl-*N*-methyl-amino-laurinsäure eine dreimalige β-Oxydation. 2-Methyl-hexen-(1,2)-1,6-dicarbon-säure, C₉H₁₄O₄ als Produkt der ω- und zweimaligen β-Oxydation konnte nicht aufgefunden werden. Hingegen geht β-Methyl-β-propyl-acrylsäure-amid (I) in das 1-Amid der 2-Methyl-buten-(1,2)-1,4-dicarbon-säure (II) über. Die Ausbeute betrug 13% (182):



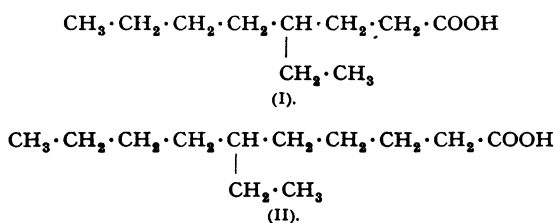
Durch Verlängerung der C-Kette wird die Ausbeute an Dicarbon-säuren immer ungünstiger.

BERNHARD und LINCKE (192) isolierten aus dem Harn von Hunden, denen z. B. 122 oder 82 mg β-Carboxy-laurinsäure (I) gefüttert wurden, in einer Rohausbeute von 16% β-Carboxy-γ-oxy-adipinsäure (II). Nach

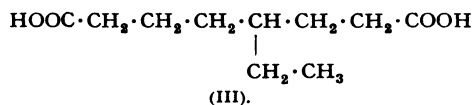


Methyloxydation und anschließender dreimaliger β-Oxydation bildet sich am γ-C-Atom, welches sich gleichzeitig zu zwei Carboxylgruppen in β-Stellung befindet, eine Hydroxylgruppe.

γ- und ε-ständige Gruppen. Eine erhebliche Steigerung der Ausscheidung saurer Stoffwechselprodukte im Harn beobachtete KEIL (193) nach Fütterung von γ-Äthyl-octansäure (I) und ε-Äthyl-decansäure (II)



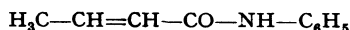
als Triglyceride. Die Aufarbeitung der Extrakte (12) ließ γ -Äthyl-korksäure (III) sowohl nach Fütterung des γ -Äthyl-octensäuretriglycerids



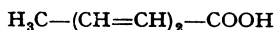
als der ε -Äthyl-decansäure auffinden. Neben der Methyloxydation trat im letzteren Falle ein β -oxydativer Abbau von der bereits vorhandenen COOH-Gruppe aus ein.

4. *Methyloxydationen bei Polyencarbonsäuren.* Hoch ungesättigte Fettsäuren, die *aliphatischen Polyen-carbonsäuren* $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{COOH}$, deren Verbrennungsgeschwindigkeit durch die konjugierten Doppelbindungen herabgesetzt ist, zeigen bei einer gewissen Kettenlänge ähnlich den gewöhnlichen Fettsäuren eine Tendenz zur ω -Oxydation, die durch Veresterung der Carboxylgruppe oder viel besser noch durch Bildung der *Amide*, *Methylamide* oder *Anilide* sehr deutlich hervortritt. Damit wird die ω -Oxydation so stark begünstigt, daß der Tierversuch, wie R. KUHN, KÖHLER und KÖHLER (40) bewiesen, eine ausgezeichnete Möglichkeit zur Synthese sonst schwer zugänglicher *Polyen- ω,ω -dicarbonsäuren*, $\text{HOOC}-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{COOH}$, darstellt, zumal die Isolierung der gebildeten Verbindungen aus dem Harn verhältnismäßig leicht gelingt. In den meisten Fällen scheiden sie sich nach Ansäuern und Abkühlen des Harns bereits kristallinisch aus.

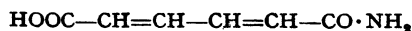
Das Anfangsglied in der homologen Reihe, die *Crotonsäure*, als giftig wirkendes Amid oder besser verträgliches Anilid



verfüttert, wird noch nicht methyloxydiert. *Sorbinsäure*



geht in einer Ausbeute von 0,1—0,2% in *trans-trans-Muconsäure* über. Kaninchen im Gewichte von 3,32—3,38 kg erhielten täglich 2mal 5 g. Nach Gaben des Methylesters bildete sich keine Muconsäure, hingegen führte *Sorbinsäure-äthylester* zu einer Steigerung der Ausbeute auf 0,5%. *Sorbinsäure-amid* verursachte in wäßriger Suspension in Mengen von 3 g verabreicht exitus, bei langsamer Gewöhnung wurden eintretende Lähmungserscheinungen der Extremitäten überwunden und der Versuch ohne Schaden überstanden. Aus dem Harn konnte in einer Ausbeute von 32% die noch unbekannt *Mucon-amidsäure*



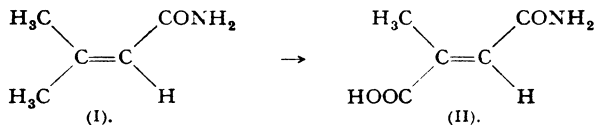
erhalten werden. *Sorbinsäure-methylamid* bewirkte in Mengen von 2,5—3,0 g gleichfalls Lähmungen der hinteren Extremitäten und ver-

größerte Atmungsfrequenz bei kleinem Atemvolumen. Später traten totale Lähmungen und Bewußtlosigkeit ein. Die ω -Oxydation verlief hier noch ergiebiger, indem 44% reine *Mucon-methyl-amidsäure* $\text{HOOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{CH}_3$ auftraten. *Sorbinsäureanilid* ertragen die Tiere ohne besondere Wirkungen; es ging bis zu 36% d. Th. in *Mucon-anilidsäure* $\text{HOOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot\text{C}_6\text{H}_5$ über. Auch β -*Methyl-sorbinsäure-amid* wirkte giftig und wurde zu 62% d. Th. in β -*Methyl-mucon-amidsäure* $\text{HOOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CO}\cdot\text{NH}_2$ umgewandelt.

Als Natriumsalz verabreichte *Octatriensäure* wird nicht ω -oxydiert; das Amid gab verfüttert 42% d. Th. an *Hexatrien-2,4,6-dicarbon-1,6-amidsäure-1*, woraus durch Verseifung die *Hexatrien-1,6-dicarbonsäure* $\text{HOOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ erhalten wurde. Nach Aufnahme einer Gesamtmenge von 14 g Amid in Dosen von 2mal 2 g pro Tag, ging das Tier ein. Von der auch als Na-Salz fast unlöslichen *Decatetraensäure* wurden im Kaninchenharn weder Ausgangssubstanz noch Intermediärprodukte erhalten. Das in Wasser suspendierte, in Mengen von 2mal 1 g pro Tag gegebene *Decatetraensäure-amid* ging, ohne Störungen zu verursachen, zu 20% in die *Octatetraen-2,4,6,8-dicarbon-1,8-amidsäure-1*, $\text{HOOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CONH}_2$ über.

Die Ausbeuten an Dicarbonsäuren betragen demnach für die Amide aus Polyen-carbonsäuren bei 4-C-Atomen (*Crotonsäure-amid*) 0%, bei 6-C-Atomen (*Sorbinsäure-amid*) 32%, 8-C-Atomen (*Octatriensäure-amid*) 42% und bei 10-C-Atomen (*Decatetraensäure-amid*) 20% d. Th. Das Maximum liegt bei der Kette mit 8-C-Atomen in Analogie zu den Befunden über die Methyloxydation der Fettsäuren im Organismus des Hundes. Der starke Abfall von der Trien- zu der Tetraensäure dürfte durch die zunehmende Verringerung der Löslichkeit und damit bedingte verschlechterte Resorption beeinflußt werden.

Von weiteren ungesättigten Säuren lieferte das Amid der β,β -*Dimethylacryl-säure* (I), ohne Störungen zu bewirken, zu 43% die *Mesacon- α -amidsäure* (II)

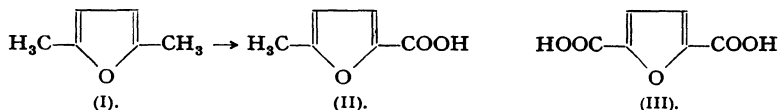


Die von ANSCHUTZ festgelegte Konstitution dieser Verbindung erfuhr durch den Tierversuch ihre Bestätigung. Die Methylgruppe kann nur in Nachbarschaft zur freien Carboxylgruppe stehen.

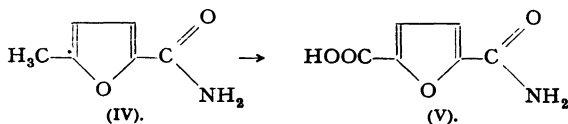
Der tierische Organismus beschränkt sich offenbar auf die Methyloxydation des zur Carbonamidgruppe trans-ständigen Methyls, denn die

Bildung von *Citraconsäure* (cis-Form) neben der *Mesaconsäure* (trans-Form) wurde nicht beobachtet. Analoge Verhältnisse liegen bei der Bildung von π -*Oxy-campher* vor, wo von den beiden Methylen an der Brücke nur das zur Carbonylgruppe trans-ständige angegriffen wird (siehe S. 225). Es darf daher angenommen werden, daß auch im Falle der *Hildebrandt-säure* (vgl. S. 223) die trans-Form vorliegt.

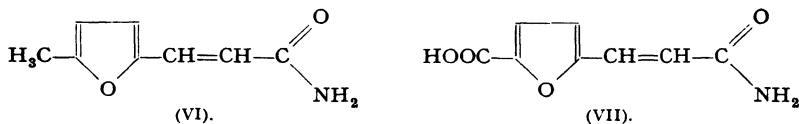
Auch für den *Furanring*, von dem bekannt ist (194), daß er jedenfalls in optischer Hinsicht einem aliphatischen System von zwei konjugierten Doppelbindungen gleichwertig ist, konnten R. KUHN und Mitarbeiter ein den Polyensäuren analoges Abbauverhalten im Tierkörper zeigen. Nach Fütterung von 20 g *2,5-Dimethyl-furan* (I) enthielt der Harn 5 g *5-Methyl-brenzschleimsäure* (II), hingegen keine *Furan-2,5-dicarbonssäure* (III) (182), welche in kleinen Mengen normaler Bestandteil des mensch-



lichen Harns ist (195). Das *5-Methyl-brenzschleimsäure-amid* (IV) (2—4 g pro Tag) lieferte in einer Ausbeute von 32% die *Furan-dicarbon-(2,5)-amidsäure-2* (V), während das pharmakologisch wirksame β -[*5-Methyl-*

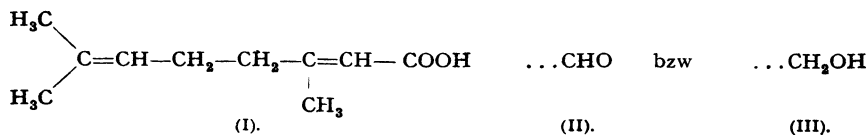


furyl-(2)]-acryl-säure-amid (VI) 83% d. Th. *Furan-acryl-amid-(2)-carbon-säure-(5)* gab (VII) (40).

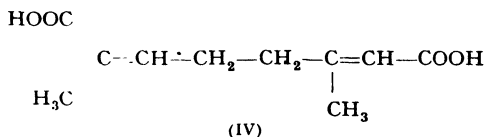


5. *Methyloxydationen von Sauerstoffderivaten der Terpene*. Für den Abbau der *Terpene* im Tierkörper ist die Methyloxydation ohne Zweifel von Bedeutung. Es ist in den letzten Jahren eine Reihe von Beispielen bekannt geworden.

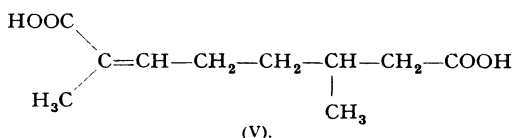
α) *Aliphatische Terpene*. Die nach Fütterung von *Geranium-säure* (I), *Citral* (II) oder *Geraniol* (III) von HILDEBRANDT erstmalig aus



dem Harn isolierte Dicarbonsäure wurde nach täglichen Injektionen von 2—4 g Citral an Hunde von KUHN und LIVADA (196) in guter Ausbeute erhalten und durch Abbau und Synthese als optisch inaktive *1,5-Dimethylhexadien-(1,5)-1,6-dicarbonsäure* $C_{10}H_{14}O_4$ (IV) identifiziert (179).



Demnach wird nicht, wie HILDEBRANDT annahm, die β -ständige, sondern eine der endständigen Methylgruppen oxydiert. Kaninchen liefern nach Fütterung von reinem Geraniol an Dicarbonsäure 25—30% d. Th. Der ω -oxydative Abbau wird wohl begünstigt durch die C-Zahl der Verbindung, die hier 10 beträgt und damit in den Bereich jener Fettsäuren fällt, welche Tendenz zu ω -Oxydation zeigen. Ferner wird der β -oxydative Abbau durch die β -ständige Methylgruppe blockiert. Neben der HILDEBRANDT-Säure gelang die Isolierung einer bei 103° schmelzenden, optisch aktiven Carbonsäure, der die Formel einer *1,5-Dimethylhexen-(1)-1,6-dicarbonsäure* (V) zukommt. Sie entsteht aus dem Geraniol durch gleichzeitige ω -Oxydation, asymmetrische Hydrierung und Oxydation der Alkoholgruppe:

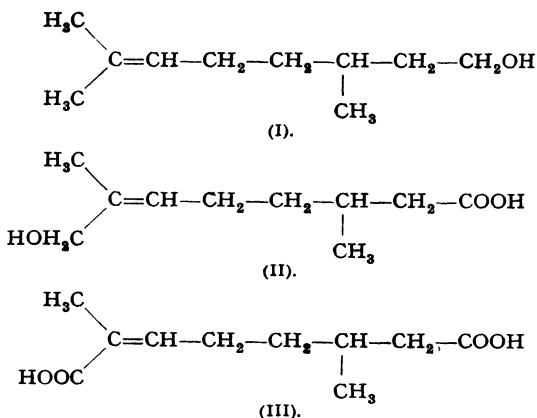


Beide Dicarbonsäuren haben KUHN und Mitarbeiter auch nach Gaben von Citral und Geraniumsäure an Kaninchen erhalten. Bei der Geraniumsäure betrug das Verhältnis inaktive : aktive Dicarbonsäure im Harn etwa 1:0,6, beim Geraniol 1:2; 55 g davon lieferten 6,9 g inaktive Dicarbonsäure und 12,3 g optisch aktive Dihydrosäure. Es ist anzunehmen, die Hydrierung beginne bereits an Zwischenprodukten oder den Ausgangssubstanzen selbst. FISCHER und BIELIG (II) haben diese Befunde bestätigt, indem sie nach intramuskulärer Injektion von insgesamt 17,3 g Geraniol an Kaninchen 3,0 g HILDEBRANDT-Säure und 1,5 g Dihydro-HILDEBRANDT-Säure erhielten. Die Gesamtausbeuten an Dicarbonsäuren waren bei diesen Injektionsversuchen somit niedriger als bei den Fütterungen, was wohl durch das geringere Angebot und die Art der Applikation bedingt ist.

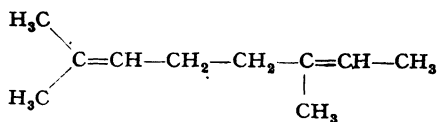
Dank der Einfachheit und Ergiebigkeit besitzt diese biologische Gewinnung der Dicarbonsäuren, wie KUHN hervorhebt, einen großen Vorzug gegenüber den synthetischen Verfahren. Die Ausbeuten sind

dabei am günstigsten, wenn große Mengen Geraniol pro Tier (z. B. 10 g) auf einmal gegeben werden. Kleine Dosen auf große Zeitintervalle verteilt, ermöglichen eine Verschiebung in der Richtung der völligen Verbrennung.

Vom *Citronellal* (siehe S. 196) verschieden verhielt sich der Alkohol, das *Citronellol* (I). FISCHER und BIELIG (II), welche 29,6 g an Kaninchen verfütterten, erhielten neben einer kleinen Menge unveränderten Materials 9,7 g einer Säurefraktion, die sich in eine flüssige Monocarbonsäure und eine feste Dicarbonsäure zerlegen ließ. Beide Säuren waren rechtsdrehend und wiesen noch eine Doppelbindung, wie das Ausgangsmaterial, auf. Die Dicarbonsäure (III) schmolz tiefer als die Dihydro-HILDEBRANDT-Säure aus Geraniol, besaß aber auf Grund der Abbauergebnisse dieselbe Konstitution. Es wird angenommen, sie stelle ein racemisches Gemisch dar, das weniger des rechtsdrehenden Antipoden enthält als die Dihydro-säure aus Geraniol. Die Monocarbonsäure konnte als (*2,6*)-*Dimethylhepten-(2)-1-oxy-7-mono-carbonsäure* (II) identifiziert werden, also als Intermediärprodukt der Dicarbonsäurebildung durch Methyloxydation.



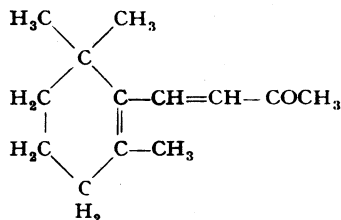
Der Grundkohlenwasserstoff dieser Verbindungen, das Terpen *2,6-Dimethyl-octadien-(2,6)* oder *Dihydro-myrcen*, ergab, an Kaninchen ver-



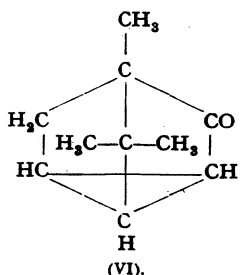
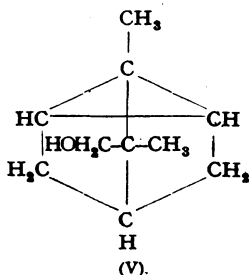
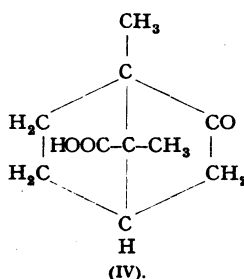
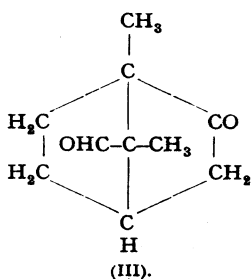
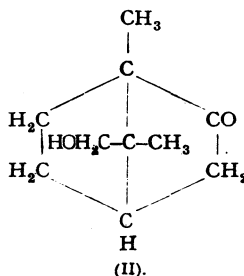
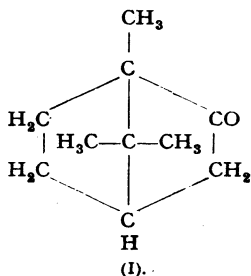
abreicht, in guter Ausbeute durch zweifache Methyloxydation die inaktive Dicarbonsäure $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$; die optisch aktive Dihydrosäure war nicht auffindbar (179).

β) Methyloxydation cyclischer Terpene. Stoffwechselversuche mit β -*Jonon* (197) führten nach Fütterung von insgesamt 85 g

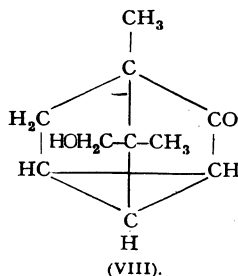
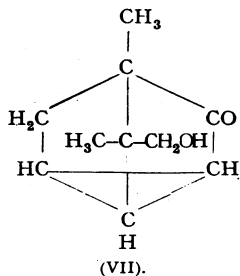
an Kaninchen zur Auffindung von 42% harnpflichtiger Substanzen, von denen 60—65% sauerstoffreichere Anteile darstellen und sich als Gemenge von *Oxy-β-jonol*, *Oxy-dihydro-β-jonol*, *Oxy-β-jonon* und *Oxy-dihydro-β-jonon* erwiesen. Es konnte indessen nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob im Jonon die am Ring allein stehende oder eine der beiden geminalen Methylgruppen angegriffen wurden.



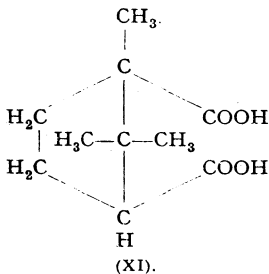
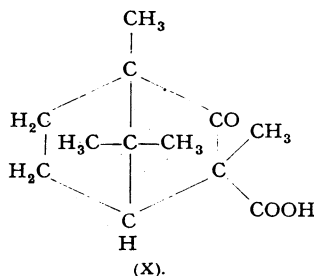
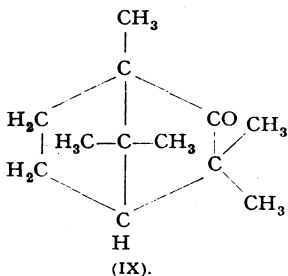
ASAHINA und ISHIDATE (198) verfütterten z. B. 12 Hunden insgesamt 60 g *Campher* (I) und injizierten ferner 2 Tieren 25 g in Olivenöl gelösten *Campher* intraperitoneal. Aus den Harnen gelang die Isolierung von *trans-π*- und *cis-π-Oxy-campher* (II), von *trans-π-Oxo-campher* (III) und von *trans-π-Campher-carbonsäure* (IV), also aller Zwischenprodukte des



oxydativen Abbaues der Methylgruppe. Ferner konnte *Teresantol* (V) unter den Abbauprodukten des Camphers nachgewiesen werden. REINARTZ, ZANKE und FAUST (199) erhielten beim Verfüttern von *Cyclo-camphanon* (VI) π -*Oxy-cyclo-camphanon* (VII) (VIII). Versuche von REINARTZ und



MEESSEN (55) erbrachten den Beweis, daß im *Dimethyl-campher* (IX) die Methylene am C-Atom 3 am leichtesten oxydiert werden. Bei der Aufarbeitung des durch Bleiacetatfällung des Harns erhaltenen Niederschlages mit Chromsäure wurden neben *3-Methyl-campher-mono-carbon-*



säure (X) auch *Camphersäure* (XI) und *Camphersäure-anhydrid* erhalten. Die *Camphersäure* hat sich nach Ansicht der Verfasser bei der Chromsäurebehandlung aus im Tierkörper entstandenem *Dioxy-dimethyl-campher* gebildet.

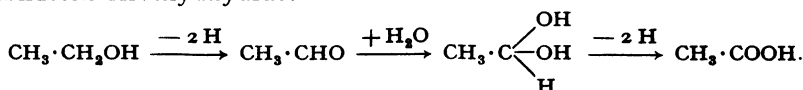
6. Methyloxydationen bei Steroiden.

Untersuchungen von U. WESTPHAL (200) bewiesen die Fähigkeit des

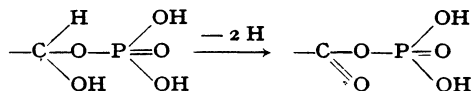
Kaninchenorganismus zur Umwandlung von *Progesteron* und auch von *Desoxycorticosteron* zu *Pregnandiol*. Wahrscheinlich verläuft der Übergang $-\text{CH}_2-\text{OH}$ zu $-\text{CH}_3$ auch in umgekehrter Richtung. Man darf daher auch für Methylgruppen in Seitenketten steroider Wirkstoffe die Möglichkeit eines methyloxydativen Abbaus annehmen.

d) Aus OH-Gruppen.

Die Oxydation von Äthylalkohol zu Essigsäure ist bereits 1913 von WIELAND als ausschließliche Dehydrierung erkannt worden. Der Dehydrierung des Alkohols zum Aldehyd folgt Wasserstoffentzug aus dem gebildeten Aldehydhydrat:



Nach WIELAND benötigt die Oxydation der Carbonyl- zur Carboxylgruppe die Aufnahme oder den Eintritt von Wasser in das Molekül, laut neueren enzymatischen Untersuchungen (3) wird nicht Wasser, sondern Phosphat bei der biologischen Carbonyloxydation angelagert:



Wesentlich daran ist, daß die Änderung der freien Energie bei dieser Reaktion bedeutend kleiner ist als bei der Dehydrierung des Aldehydhydrats. Die Reaktion verläuft daher umkehrbar in Analogie zur Spaltung von Polyhexosen in der Zelle (Glykolyse). Der Phosphatrest wird in einer ebenfalls beinahe thermoneutralen Reaktion auf die Adenosindiphosphorsäure übertragen.

Nach KREHAN (201) ist die Oxydation des Alkohols zu Essigsäure in nahezu zuckerfreien, asparaginhaltigen Nährlösungen durch *Bact. acetigenoideum* stark abhängig von zugesetzten Salzen. Durch Variationen der Anionen (PO_4''' , Cl' , SO_4'') und Kationen ($\text{Mg}^{..}$, $\text{Ca}^{..}$, K^{\cdot} , Na^{\cdot}) gelingt es, die Essigsäurebildung entweder zu unterbinden oder auf die Höhe der theoretisch möglichen Menge zu steigern.

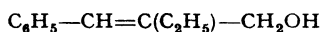
JANKE und KROPACSY (202) widmeten der Essigsäurebildung durch *Bact. ascendens* unter Anwendung verfeinerter Methoden erneute Untersuchungen, wobei neben dem Sauerstoffverbrauch gleichzeitig die Alkohol- und Essigsäurekonzentrationen gemessen wurden. NORD und Mitarbeiter (203) bewiesen die Dehydrierung von Äthylalkohol zu Essigsäure mit *Fusarium lini* BOLLEY. Ausgedehnte Versuche über Essigsäure- und Propionsäurebildung aus Äthyl- und Propylalkohol durch verschiedenste Essigsäurebakterien (*Bact. gluconicum*, *xylinum*, *xylinoides*, *orleanense*, *aceti*, *Pasteurianum*, *acetosum*, *rancens*, *ascendens*, *vini acetati*, *Kützingianum*) veröffentlichten HERMANN und NEUSCHUL (72). Die Oxydation weiterer primärer Alkohole zu den entsprechenden Säuren durch Mikroorganismen wurde von verschiedenen Autoren bestätigt.

Äthylalkohol verbrennt im Tierkörper selbst in großen Dosen gegeben völlig. BERNHARD (204) verabreichte an Kaninchen oral mit einem Ge-

misch von *Hexa-Deuterio-äthylalkohol* $\text{CD}_3 \cdot \text{CD}_2 \cdot \text{OD}$ und absolutem Äthanol gleichzeitig 4-Amino-benzolsulfonsäure-(I)-amid. Das im Harn auftretende Acetyl-sulfonamid war deuteriumhaltig. Unter Verwendung des schweren Wasserstoffs als Indicator und der in vivo erfolgenden Acetylierung als „Abfangverfahren“ wurde somit die im Tierkörper erfolgende Bildung von Essigsäure aus Alkohol bewiesen. Untersuchungen über die Oxydation von Äthylalkohol durch Gewebsschnitte von Ratten- und Taubenorganen liegen von LEROIR und MUÑOZ (205) vor. Mehr als die Hälfte des der Leber angebotenen Äthanol wurde auf Grund der Titrations in Essigsäure übergeführt, eine Anhäufung von Acetaldehyd fand nicht statt.

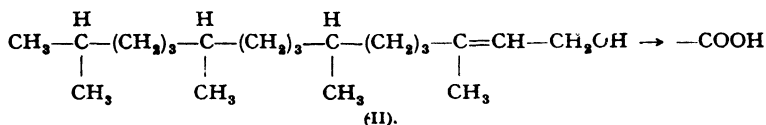
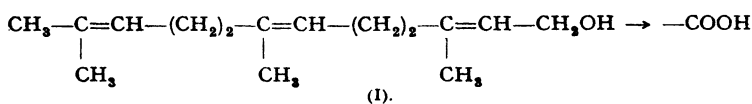
Auch *höhere aliphatische Alkohole* können im Tierkörper in *Fettsäuren* mit gleicher C-Zahl umgewandelt werden. STETTEN und SCHOENHEIMER (206) fütterten Ratten mit einer normalen Diät *Deuterio-cetyl-* und *Deuterio-octadecylalkohol*. Die Aufarbeitung der Tiere ließ in den Körperfetten *Deuterio-palmitin-* und *Deuterio-Stearinsäure* auffinden. Die Dehydrierung erwies sich als auch im entgegengesetzten Sinne verlaufend, indem nach Fütterung von Deuterio-Palmitinsäure die höheren aliphatischen Alkohole, welche mit den Faeces ausgeschieden werden, auf Grund ihres D-Gehaltes zum Teil aus der zugeführten Palmitinsäure stammten.

Zimtalkohol $\text{C}_6\text{H}_5\text{—CH=CH—CH}_2\text{OH}$ gibt, Kaninchen verabreicht, im Harn eine Säurefraktion, welche zu 35% aus Benzoesäure und zu 65% aus *Zimtsäure* besteht. Analog wird α -Äthylzimtalkohol



zur α -Äthylzimtsäure oxydiert (I).

Bei den zu den aliphatischen Terpenderivaten gehörenden Alkoholen *Geraniol* und *Citronellol* erfährt die alkoholische Gruppe im Tierkörper (Kaninchen) eine glatte Umwandlung zum Carboxyl, Befunde, auf die wir im Zusammenhang mit den Methoxydationen hinwiesen. Die höheren Homologen, *Farnesol* (I) und *Phytol* (II), haben FISCHER und BIELIG (II) in Gesamtmengen von 6,8 bzw. 6,7 g Kaninchen intramuskular injiziert und im Harn die Anwesenheit der entsprechenden Säuren, *Farnesen-* und *Phytensäure*, wahrscheinlich gemacht:



Die Vorstufen der *Glucuronsäure* im Tierkörper sind noch nicht bekannt. QUICK, welcher in früheren Arbeiten für ihre Entstehung aus *Kohlenhydraten* und glucoplastischen Aminosäuren eintrat, zeigte, daß der Mensch stündlich nahezu 1 g *Glucuronsäure* zu Paarungszwecken bereitstellen kann (207), und wies ferner einen stimulierenden Einfluß des Insulins auf die *Glucuronsäure*bildung, gemessen an der Ausscheidung des *Glucuronsäure-Benzoesäure-Konjugationsprodukts*, nach (208). Er sieht darin einen weiteren Hinweis für die wahrscheinliche Synthese aus *Glucose*. Als Organ dafür soll in erster Linie die Leber in Frage kommen (209). LIPSCHITZ und BUEDING (210) zeigten die Bildung von *Glucuronsäure* in Leberschnitten bei Gegenwart von Borneol, Menthol oder Phenol. Nach MILLER und CONNER (211) soll sich die *Glucuronsäure* aus in hinreichender Menge im Gastro-Intestinal-Tractus zur Verfügung stehendem *Mucin* bilden. Diesbezügliche Versuche an Hunden (212) konnten von anderen Autoren nicht bestätigt werden (213). Aus dem Harn von Kaninchen, welche insgesamt 60 g *Tyrosinhydantoin* aufnahmen, isolierten ICHIHARA und TAMURA (214) 9 g Kaliumsalz der *Tyrosinhydantoin-glucuronsäure*. In Übereinstimmung mit QUICK scheiden Menschen 80% vom aufgenommenen Borneol als *Borneolglucuronid* aus (215). Die *Glucuronsäure* kann in den Paarungsprodukten verschieden gebunden sein, entweder glucosidartig oder esterartig. Das Paarungsprodukt mit *Benzoesäure* im Hundeharn ist *Benzoylglucuronsäure* (216). Kaninchen und Meerschweinchen scheiden nach Phenolphthaleininjektionen *Phenolphthalein-mono- β -glucuronid* aus (217). Auch *iso-Menthol* (218), *d-Neomenthol* (219) und *Zimtsäure* (220) erscheinen nach Fütterung an Kaninchen an *Glucuronsäure* gepaart im Harn. Dasselbe trifft für das *Naphthalin* zu. Der *Naphthylglucuronsäure* kommt wahrscheinlich α -Pyranosestruktur zu (221). WILLIAMS (222) isolierte aus Kaninchenharn *o*-, *m*- und *p*-*Amino-phenylglucuronid*, *2-Sulfonamido-4-amino-* und *4-Sulfonamido-2-amino-phenylglucuronid* nach Fütterung der entsprechenden Aminophenole. α - und β -*Phenylglucosid* gehen im Kaninchenorganismus nicht in die entsprechenden *Glucuronide* über, sie werden vielmehr hydrolysiert, worauf sich das Phenol an Schwefelsäure paart (223). Methoden zur Bestimmung der *Glucuronsäure* im Harn beschrieben EVELYN und Mitarbeiter (224) und MOZOLOWSKI (225). KAPP (226) teilte ein Mikroverfahren zur Bestimmung von *Glucuronsäure* in Mengen von 10—40 γ im Harn und zur Ermittlung der *Galacturonsäure* (Harne mit 7—30 γ) mit. Es beruht auf der colorimetrischen Auswertung der mit Naphthoresorcin entstehenden Färbungen.

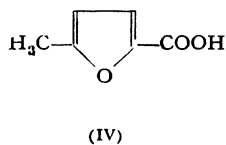
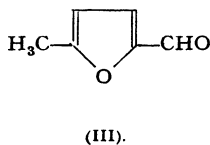
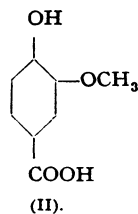
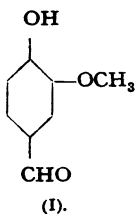
e) Aus CHO-Gruppen.

Die Bildung von *d-Gluconsäure* aus *d-Glucose* durch Essigsäurebakterien (*Bacterium gluconicum* HERMANN) wurde eingehend von HERMANN und

NEUSCHUL (227) studiert, welche auch ein technisches Verfahren dafür angaben (228). Bei Glucosekonzentrationen von 20% sind die Ausbeuten an Gluconsäure nach 30 Tagen fast quantitativ. Durch das gleiche Bacterium wird *Mannose* in 60—70%iger Ausbeute innerhalb von 14 Tagen zu *Mannonsäure* oxydiert (229). Nach TAKAHASHI und ASAI (230) entsteht mit Essigsäurebakterien aus *Galactose* *Galactonsäure*.

Die Bildung der *Essigsäure* aus *Brenztraubensäure* durch *Propionsäurebacterium* (231) ist insofern in diesem Zusammenhang zu erwähnen, als die Decarboxylierung wahrscheinlich zum Aldehyd führt, der seinerseits zu Essigsäure oxydiert wird.

Auch der Tierkörper vermag leicht Aldehydgruppen in Carboxyle umzuwandeln. Zu den bekannten Befunden fügen sich neue Beobachtungen. REICHEL und BERCZELY (232) stellten aus Pferde- und Hammelleber nach BATTELLI und STERN Trockenpräparate her, welche aus 2 Mol *Acetaldehyd* 1 Mol *Essigsäure* bilden. In weiteren Versuchen wurde die Gewinnung aktiver Aldehydrasepräparate aus Leber verbessert (233). Schnitten von Rattenlebern zugefügte Aldehyde, wie *Acet-*, *Propyl-*, *Butyl-*, *n-Valeryl-* und *Isovalerylaldehyd*, werden auf Grund aus Hydrogencarbonat entwickelter Kohlensäure in die entsprechenden *Säuren* übergeführt. Für *Hexyl-*, *Heptyl-* und *Octylaldehyd* ist das nicht der Fall (234). An Kaninchen verfüttertes *Vanillin* (I) wird nach SAMMONS und WILLIAMS (235) zu 69% als *Vanillinsäure* (II) ausgeschieden, wovon 44% in freier Form, 25% an Glucuron- oder Schwefelsäure gepaart vorliegen. Aus 20 g *5-Methyl-furfurol* (III) bilden sich im Kaninchenorganismus 10,8 g *5-Methyl-brenzschleimsäure* (IV) (182).



f) Aus CO-Gruppen.

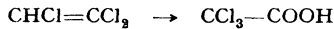
Übergänge von Carbonyl- in Carboxylgruppen erfolgen bei den α -Keto-carbonsäuren durch Decarboxylierung und Dehydrierung, bei den β -Keto-carbonsäuren durch Säurespaltung. Da die Decarboxylierung der Brenztraubensäure in Hefe über den Aldehyd verlaufen dürfte, handelt es sich hier um eine COOH-Bildung aus einer CHO-Gruppe. Im Tierkörper scheint diese Decarboxylierung mit Hilfe der Carboxylase II und vielleicht weiteren Fermenten nicht analog zu verlaufen. Es ist indessen Sicheres darüber noch nicht bekannt.

Bei der Bebrütung von *Acetessigsäure* mit Kaninchenmuskulatur wies LEHNINGER (236) kleine Mengen *Essigsäure* nach. Reinkulturen von *Escherichia coli* bilden unter anaeroben Bedingungen große Mengen von Essigsäure aus der Acetessigsäure (siehe auch S. 300 und 330). Auf die Acetessigsäurespaltung und die Decarboxylierung der α -Ketoglutaräure zu Bernsteinsäure wird später noch eingegangen.

Über das Stoffwechselverhalten *höherer α -Keto-carbonsäuren* liegen keine experimentellen Befunde vor.

g) Übrige COOH-Bildungen.

Einen nicht leicht erklärbaren Befund erbrachten BARRETT und JOHNSTON (237), indem sie aus dem Harn von Hunden, die *Trichloräthylendämpfen* bis zu völliger Narkose ausgesetzt waren, *Trichloressigsäure* isolierten:

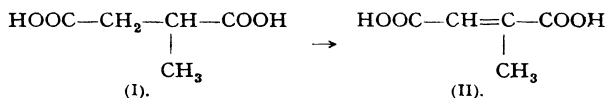


Auch beim Menschen findet dieser Übergang wahrscheinlich statt.

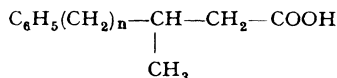
5. Dehydrierungen.

a) Entstehung doppelter Bindungen bei aliphatischen Verbindungen.

Dehydrierung gesättigter Fettsäuren wurden einerseits als mögliche Entstehungsursache ungesättigter Säuren, andererseits als erste Veränderung bei der Fettsäureverbrennung diskutiert. Als erster Schritt des β -oxydativen Abbaus wird nach DAKIN die Bildung einer Doppelbindung in α - β -Stellung angenommen. EMMRICH (238) isolierte z. B. *Mesaconsäure* (II) nach Fütterung von *d,l*- α -Methylbernsteinsäure (I):



Ungesättigte Säuren sollen sich auch nach Verfütterung von ω -Phenyl- β -alkyl-fettsäuren,



ergeben, ohne daß indessen darüber Näheres bekannt wurde (239).

Der Übergang *gesättigter* höherer in *ungesättigte Fettsäuren* im Tierkörper ist durch Untersuchungen von SCHOENHEIMER und Mitarbeitern unter Anwendung von Deuterium als Indicator sichergestellt. Nach Fütterung D-haltiger gesättigter Fettsäuren an Mäuse enthielten die aus dem Fettdepot der Tiere sorgfältig abgetrennten, ungesättigten Säuren schweren Wasserstoff (240). STETTFN und SCHOENHEIMER (241) verabreichten Ratten mit Deuterium signierte *Palmitinsäure*. Bei der Auf-

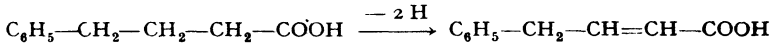
arbeitung der Depottfette erhielten sie durch Bleisalzfallung die flüssigen Säuren und trennten über die Tetra- und Hexabromide die höher ungesättigten davon ab. Das Gemisch der in Petroläther löslichen, bromierten Säuren wurde debromiert und anschließend mit Wasserstoff hydriert. Die Destillation der Methylester führte zu reiner Stearin- und Palmitinsäure, welche D-haltig waren. Es folgt daraus, daß die Palmitinsäure im Rattenorganismus zu *Palmitoleinsäure* dehydriert wird und ferner durch Verlängerung der Kette Stearinsäure gibt, die ihrerseits in Ölsäure übergehen kann. Der indirekten Methode der Abtrennung von Öl- und Palmitoleinsäure wäre vielleicht deren Isolierung, z. B. als Phenylphenacyl-ester, vorzuziehen. FISCHER und BIELIG (11) fanden, daß die Hydrierung von Doppelbindungen auf solche in α - β -Stellung zu Carbonyl-, Carboxyl- oder Hydroxylgruppen beschränkt bleibt und möchten den von SCHOENHEIMER und Mitarbeitern gezeigten Übergang gesättigter in ungesättigte und ungesättigter in gesättigte Säuren nicht als einfache Anlagerungen bzw. Abspaltungen von Wasserstoff, vielmehr als Ergebnis komplizierterer Auf- und Abbaureaktionen betrachten.

Der Nachweis von Fettsäuredehydrogenasen und die Gewinnung wirksamer Extrakte aus tierischem Gewebe ist QUAGLIARELLO, MAZZA, YOSII, LANG, ANNAU und SHAPIRO und WERTHEIMER gelungen. Ganz kürzlich hat MAZZA (242) über den Stand dieser Forschungen berichtet. Nach LANG (243) enthalten Leber und Muskeln eine Dehydrogenase, welche vor allem höhere *gesättigte Fettsäuren*, Ölsäure indessen nur schwer, angreift. Das Ferment bedarf einer Codehydrase (244), als welche sich Hefeadenylsäure am wirksamsten erwies. Als Endprodukt der Dehydrierung von Stearinsäure durch das Enzympräparat wird die Ölsäure bezeichnet (245), indem aus dem Ozonisierungsgemisch Azelinaldehydsäure isoliert wurde. Hingegen konnten α , β -ungesättigte Säuren nicht aufgefunden werden; die Reaktion nach ZETZSCHE und RÖTTGER war negativ. Eine Fettsäuredehydrogenase, deren Aktivität von der Gegenwart von Adenylsäure und anorganischem Phosphat abhängig ist, fanden SHAPIRO und WERTHEIMER (246) in Extrakten aus Fettgewebe, Leber, Muskel, Herz und Testes von Ratten. Das p_H -Optimum wird zu 8,0 angegeben; die Wirkung ist am günstigsten auf höhere Fettsäuren und nimmt mit Verkürzung der C-Kette ab. Neutralfett scheint nicht, Bernsteinsäure in analogem Ausmaß wie Stearin- und Palmitinsäure angegriffen zu werden. Sauerstoff hemmt das Ferment.

MAZZA hält die Befunde LANGS hinsichtlich der Adenylsäure als Coferment für nicht beweisend und beobachtete ferner, daß Extrakte, die prinzipiell analog denen LANGS erhalten wurden, auch die Ölsäure dehydrieren. Das Auftreten α , β -ungesättigter Säuren wird auf Grund der Absorptionsbanden des Dehydrierungsprodukts wahrscheinlich gemacht, welche sehr ähnlich denjenigen einer $\Delta\alpha$, β -Octadecensäure und

stark verschieden von denen der Ölsäure sind. Auch in der Isolierung des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der Azelinaldehydsäure will MAZZA keinen endgültigen Beweis für die Entstehung der Ölsäure erblicken, da das erhaltene Derivat anscheinend unrein war und die Isolierung der Pelargon-säure nicht erfolgte.

Daß eine Ddehydrierung in α,β -Stellung stattfinden kann, bewies MAZZA (247) durch Einwirkung von Leberextrakten auf die Natriumsalze der γ -Phenyl-butter- und γ -Phenyl- β -oxybuttersäure. Die Sauerstoffaufnahme war gegenüber der Norm stark vermehrt zum Unterschied des Verhaltens der γ -Phenyl-croton-, γ -Phenyl-isocroton- und γ -Phenyl- α -oxybuttersäure, welche keine Beeinflussung des Sauerstoffverbrauches oder der Kohlensäurebildung bewirkten. Aus der γ -Phenyl-buttersäure konnte durch Leberextrakte γ -Phenyl-crotonsäure erhalten werden:



GLASER (248) versuchte die Bildung ungesättigter Säuren durch überlebende Schnitte von Kaninchen- und Rattenleber, und Schnitten von Rattenniere und -milz aus Capron-, Capryl-, Nonyl-, Caprin- und Myristin-säure nachzuweisen. Nach zweistündigem Schütteln dieser Verbindungen mit den Geweben in Hydrogencarbonatlösung war auf Grund der Jodzähl der Ätherextrakte eine Desaturation nicht eingetreten, auch entstanden keine nachweisbaren Mengen flüchtiger Säuren. In analogen Versuchsanordnungen prüfte er das Verhalten von Dicarbonsäuren: Hexadecandicarbonsäure, Sebacin-, Azelain-, Kork-, Adipin- und Glutarsäure wurden als Kalisalze auch nach Zusätzen von Cozymase nicht angegriffen. Es konnten für diese Verbindungen Dehydrierungen wie für die Bernsteinsäure nach THUNBERG nicht bewiesen werden. Indessen wirkte die „Fettsäuredehydrogenase“ auf Distearin und Palmitinsäureäthylester.

Ein Enzym, welches im THUNBERG-Versuch Lecithin dehydriert, soll ferner nach ANNAU (249) in der Rinderleber vorhanden sein und durch Hypoxanthin oder Xanthin aktiviert werden. Es ist auch zur Dehydrierung der Palmitin- und Stearin-, nicht aber der Ölsäure, fähig.

Die Befunde von TANGL und BEREND (250) über die Bildung von zwei- und dreifach ungesättigten Fettsäuren durch Einwirkung von Pankreas-saft und Galle auf Emulsionen von Tristearin und Triolein sind fragwürdig.

Bekanntlich kommt gewissen höher ungesättigten Fettsäuren Wirkstoffcharakter zu; die sog. *essentiellen Fettsäuren* (BURR and BURR), wie *Linol-* und *Linolensäure*, vermag der Tierkörper nicht aufzubauen. Versuche über Fettbildung aus Kohlenhydraten bei Ratte und Maus mit Deuterium als Indicator ergeben für Linol- und Linolensäure im Gegensatz zum Verhalten der übrigen Fettsäuren keine D-Aufnahme; sie werden also im Organismus nicht synthetisiert (251).

Über die Wirksamkeit der Fettsäuredehydrogenasen läßt sich demnach noch nichts Endgültiges aussagen. Die Entstehung α,β -ungesättigter Säuren als erster Schritt des β -oxydativen Abbaus ist weiter zu prüfen. Auch muß die Möglichkeit einer Wanderung der Doppelbindung in Betracht gezogen werden, wengleich für solche Vorgänge im Tierkörper vorläufig nur vereinzelte experimentelle Beweise vorhanden sind. Jedenfalls scheint sich die Tätigkeit der Dehydrogenasen nach den Untersuchungen von MAZZA nicht auf die Bildung von Ölsäure aus Stearin- und Palmitolein- aus Palmitinsäure zu beschränken. Darüber dürfte Gewißheit bestehen, daß höher ungesättigte Säuren, wie Linol- und Linolensäure, unter den Dehydrierungsprodukten fehlen.

b) *Dehydrierungen ringförmiger Verbindungen.*

Die nahen chemischen Beziehungen zwischen den das Steran als Grundgerüst aufweisenden Sterinen, Gallensäuren, Sexualhormonen und gewissen cancerogen wirkenden polycyclischen Kohlenwasserstoffen ließen an die Möglichkeit des Überganges hydrierter in dehydrierte Ringsysteme *in vivo* denken. BUTENANDT und KUDSZUS (252) erörterten bereits 1935 die durch Dehydrierung mögliche Entstehung von Östron aus Cholesterin über *Dehydroandrosteron*. DIRSCHERL und HANUSCH (253) stellten sich die Bildung von *Equilenin* aus *Equilin* im Stutenorganismus durch eine Dehydrogenase vor.

Eine Aromatisierung des *Cyclohexanringes* bewies BERNHARD (254) durch Verfütterung (137 mg/kg/die) oder Injektion (82 mg/kg/die) von *Hexahydro-benzoessäure* an einen jungen Hund, welche zu 58,9 bzw. 44,8% als *Benzoessäure* ausgeschieden wird. Eingehende Untersuchungen ergaben die Abhängigkeit dieser Dehydrierung vom Vorhandensein oder der Entstehung einer am Ring befindlichen freien Carboxylgruppe und ihrer Stellung zu gewissen anderen Substituenten: eine o-ständige Methylgruppe verhindert die Dehydrierung.

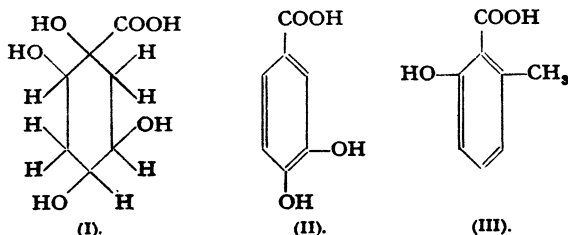
N-Methyl-hexahydro-benzamid, $C_6H_{11}-CONHCH_3$ (70 mg/kg/die subcutan), *N,N-Dimethyl-hexahydro-benzamid*, $C_6H_{11}-CON(CH_3)_2$ (69 mg/kg/die subcutan) und *Hexahydro-hippursäure*, $C_6H_{11}-CONH-CH_2COOH$ (82 mg/kg/die) gehen im Tierkörper in Ausbeuten von 39,9, 28,5 und 44,5% d. Th. in *Benzoessäure* über, während *Hexahydro-benzoylsarkosin*, $C_6H_{11}CON(CH_3)-CH_2COOH$ (84 mg/kg/die subcutan) und *Hexahydro-benzoylalanin*, $C_6H_{11}CONH-CH(CH_3)-COOH$ (65 mg/kg/die subcutan) unverändert auftreten (31,9 und 58,9%). Die ringständige COOH-Gruppe wird nicht frei, da die Spaltung der Amidbindung und damit auch die Dehydrierung ausbleibt.

ω *Cyclohexyl*-substituierte Fettsäuren mit ungerader C-Zahl der Kette ergeben durch β -oxydativen Abbau intermediär *Hexahydro-benzoessäure* und damit wieder *Benzoessäure*, was durch das Verhalten der *Cyclohexyl*-

propion- und *Cyclohexyl-valeriansäure* bewiesen wurde; solche mit gradzahliger C-Zahl der Seitenkette verbrennen. Nach subcutaner Injektion von 114 mg *Cyclohexyl-propionsäure* pro Kilogramm Körpergewicht und Tag konnten aus dem Hundeharn 44,6% d. Th. an reiner *Benzoessäure* isoliert werden, die entsprechende *Valeriansäure* (165) lieferte per os oder subcutan, in Mengen von 83 bzw. 98 mg/kg/die gegeben, 62,2 und 38,1% *Benzoessäure*. *Cyclohexyl- α -aminobuttersäure* (91 mg/kg/die per os) wird teilweise acetyliert, daneben aber über die *Cyclohexyl-propionsäure* zu 35,5% als *Benzoessäure* ausgeschieden.

Eine meta-ständige Methylgruppe verhindert die Dehydrierung nicht. *Hexahydro-m-toluylsäure* in täglichen Mengen von 86,5 mg pro Kilogramm Körpergewicht verfüttert, ging zu 36,6% in *m-Toluylsäure* über. *Hexahydro-p-toluylsäure* verbrennt weitgehend, daneben erfolgte Ausscheidung offenbar partiell dehydrierter Säuren, deren Trennung nicht gelang (254). Von der *Hexahydro-o-toluylsäure* wurde die cis-Form (flüssige oder cis-2-Methyl-cyclohexancarbonsäure) nach subcutaner Einspritzung von 75 mg/kg/die zu 42,1%, die trans-Säure nach Fütterung (77 mg/kg/die) zu 73,2%, nach subcutaner Injektion (78,5 mg/kg) zu 58,3% wieder aufgefunden. Für die *l-Chinasäure* oder Cyclohexan-1,3,4,6-tetrol-1-carbonsäure (I) konnte keine Dehydrierung bewiesen werden; sie erscheint nach Fütterung zu 50%, nach subcutaner Injektion größtenteils im Harn der Hunde.

Die Bildung von *Protocatechusäure* (II) aus *Chinasäure* (I) durch Einwirkung von Mikroorganismen wurde erneut bestätigt. BERNHAUER und WAELSCH (255) fanden von 28 verschiedenen Stämmen von *Aspergillus niger* drei dazu befähigt, BERNHAUER und GÖRLICH (162) erhielten aus 400 ccm einer 2%igen Chinasäurelösung mit *Bact. gluconicum* 0,2 g *Protocatechusäure*, aus 250 ccm Lösung mit *Penicillium griseofulvum* 0,1 g. Auch *Bact. xylinoides* ist zu *Protocatechusäure*-bildung befähigt. Ob die 3,4-Dioxy-benzoessäure tatsächlich durch Dehydrierung und Dehydratisierung aus der Chinasäure entsteht, kann nicht mit Sicherheit angenommen werden. Vielleicht handelt es sich um eine synthetische Leistung der Bakterien, haben doch ANSLOW und RAISTRICK (256) die Entstehung von 6-Oxy-2-methyl-benzoessäure (III) in Kulturen von *Penicillium griseofulvum* mit Glucose als C-Quelle gezeigt. Durch Ein-



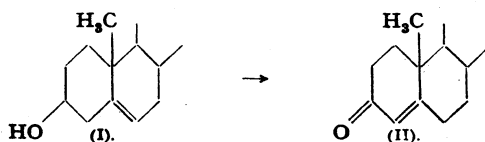
wirkung von *Bact. gluconicum* oder *Pen. griseofulvum* auf *Inosit* entstanden keine aromatischen Substanzen (162).

Nachdem feststand, daß die Dehydrierung des Cyclohexanringes nicht generell, sondern nur in bestimmten Fällen stattfindet und anzunehmen war, die Aromatisierung verlaufe stufenweise, prüften GRUNDMANN und LÖW (257) partiell ungesättigte Derivate des Cyclohexans und fütterten an Kaninchen teilweise hydrierte *o*-Toluylsäuren in Mengen von 7—10 g im Verlaufe von 4—6 Tagen. Von 24 g $\Delta^{4,6}$ -Dihydro-*o*-toluylsäure wurden 4,5 g oder 20% d. Th. zu *o*-Toluylsäure dehydriert und 6,5 g unverändert ausgeschieden. Die *cis*- Δ^5 -Tetrahydro-*o*-toluylsäure in Mengen von total 24 g gegeben, gelangte zu einem Viertel unverändert in den Harn, welcher 0,8 g Δ^6 -Tetrahydro-*o*-toluylsäure enthielt. Die Doppelbindung wurde demnach in Konjugation zur Carboxylgruppe im Organismus verschoben, ein Vorgang, der in vitro durch Kochen mit Natronlauge leicht gelingt. Dehydrierung konnte nicht nachgewiesen werden. Die *cis*-Hexahydro-*o*-toluylsäure erschien in Bestätigung der Befunde BERNHARDS zu 43% unverändert. Dehydriert wurde auch das $\Delta^{4,6}$ -Dihydro-*o*-toluylsäureamid, indem nach Gaben von 21 g 0,8 g *o*-Toluylsäureamid gewonnen wurden. Aus 20 g Δ^6 -Tetrahydro-*o*-toluylsäureamid entstanden 0,5 g einer Verbindung, die laut Analyse ein Dihydro-*o*-toluylsäureamid darstellt, aus Materialmangel aber nicht identifiziert wurde.

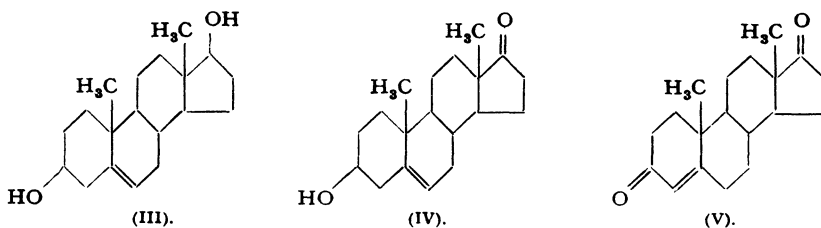
Hydrierte Naphthoesäuren verbrennen im Tierkörper zum Teil weitgehend, zum Teil völlig. Dekahydro- α -naphthoesäure konnte nach subcutaner Injektion (114 mg/kg/die) zu 49,7% roh bzw. 39,7% rein, Dekahydro- β -naphthoesäure (115 mg/kg/die) nur zu 16,6% aus dem Hundeharn unverändert erhalten werden. Die β -ständige COOH-Gruppe begünstigt den Abbau, was auch aus dem Verhalten der Tetrahydrosäuren hervorgeht. Inaktive Tetrahydro-(1,2,3,4)-naphthalin-carbonsäure-(1) erschien nach Einspritzungen von 97,5 mg pro Tag und Kilogramm Körpergewicht zu 38,4% im Harn, die *dl*-ac-Tetrahydro- β -naphthoesäure (111 mg/kg/die) überhaupt nicht mehr. Abbauprodukte konnten bei diesen Verbindungen nicht gefaßt und Dehydrierungen nicht bewiesen werden (51).

Im Tierkörper stattfindende Dehydrierungen des Sterans sind, wie erwähnt, sehr wahrscheinlich, bis jetzt aber mit Sicherheit nicht nachgewiesen. Indessen liegen Beobachtungen über Dehydrierungen solcher Verbindungen durch Mikroorganismen vor.

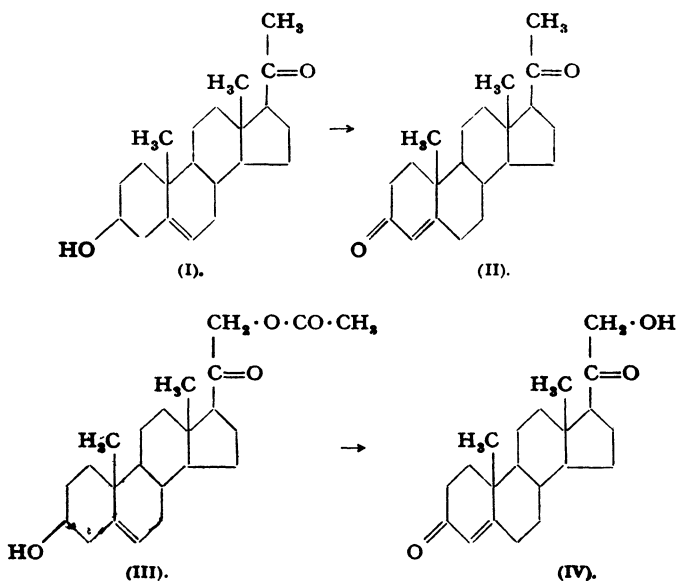
Die Entstehung von Cholestenon (II) aus Cholesterin (I) als Intermediärprodukt der Koprosterinbildung (258) ist eine mit gleichzeitiger



Verschiebung der Doppelbindung verlaufende Dehydrierung eines sekundären Alkohols zum Keton, die offenbar an die Anwesenheit einer bestimmten Darmflora gebunden und parenteral noch nicht nachgewiesen ist. VERCELLONE und MAMOLI (259) fanden, daß in Pufferlösung suspendierte und bei 32° längere Zeit mit Sauerstoff geschüttelte, „verarmte“ Hefe zugesetztes *Androstendiol* (III) und *Dehydro-androsteron* (IV) in *Androstendion* (V) überführt. Weitere Versuche ließen die Vermutung



aufkommen, die beobachteten Dehydrierungen seien durch eine bakterielle Infektion der verwendeten Hefe bedingt. Aus den Hefepreparaten gezüchtete, aerobe Bakterien erwiesen sich tatsächlich befähigt, die Umwandlung von *Dehydroandrosteron* zu Δ^4 -*Androstendion* in vorzüglicher Ausbeute durchzuführen (260). Mit demselben Bakteriengemisch gelang MAMOLI (261) auch die Dehydrierung von *Pregnenolon* (I) zum *Corpus luteum-Hormon Progesteron* (II) und von *Methyl-androstendiol* zu *Methyltestosteron* (262). Der aus dem Hefegemisch isolierte Bakterienstamm



schien auf Grund seiner Eigenschaften mit *Corynebacterium helvolum* L. übereinzustimmen (263); später wurde er gesondert als *Corynebacterium Mediolanum* bezeichnet (264). Damit konnte bei der Einwirkung auf *21-Acetoxy- Δ^5 -pregnenol-(3)-on(20)* (III) durch Dehydrierung und gleichzeitige Verseifung (ohne daß die freiwerdende alkoholische Gruppe ebenfalls in eine Ketogruppe überging) *Desoxy-corticosteron* (IV) erhalten werden.

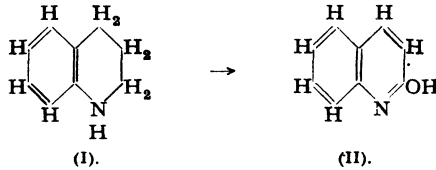
Schließlich berichten ARNAUDI und ERCOLI (265) über eine neue Differenzierung dieser dehydrierenden Bakterien der Hefe. Sie unterscheiden ein *Bact. steroidiclasium* und an Stelle des fälschlicherweise als *Corynebacterium* bezeichneten, zu den Mikrokokken zu zählenden Keimes, den *Micrococcus dehydrogenans*. Mit diesem *Micrococcus dehydrogenans* oder *Flavobacterium dehydrogenans* läßt sich *Pregnenolon* zu *Progesteron*, *Norcholestenol-(3)-on-(25)* zu *Norcholesten-dion-(3, 25)*, *17-Äthinyl-androstendiol-(3, 17)* zu *Pregnen-in-ol-(17)-on-(3)* und auch *Androstendiol* zu *Testosteron* dehydrieren (266). *Oestradiol* wird sowohl von *Microc. dehydrogenans* als von *Bact. steroidiclasium* zu *Oestron* oxydiert. Beide Keime können die 3-ständigen sekundären alkoholischen Gruppen zu Carbonylgruppen dehydrieren. Diese Umwandlungen sollen mit guter Ausbeute erfolgen und industriell verwertbar sein.

Für den *Cyclopentan-* und *Cyclopentenring* und deren Derivate, z. B. die *Chaulmoogra-*, *Dihydro-chaulmoograsäure*, *Cyclopentyl-* und *Cyclopentenyl-essigsäure* ließen sich keine Dehydrierungen nachweisen, letztere beiden Verbindungen erwiesen sich als starke Gifte. Es ist anzunehmen, daß sowohl der Cyclopentan- als der Cyclopentenring vollständig verbrennen, von der Chaulmoogra- und Dihydrochaulmoograsäure konnten keine Abbauprodukte gefaßt werden (267).

Von den *heterocyclische Ringe* enthaltenden Verbindungen ist bekanntlich das Pyridinderivat Nicotinsäureamid Wirkungsgruppe Wasserstoff übertragender Enzyme. Zahlreiche Mikroorganismen benötigen Nicotinsäureamid bzw. Nicotinsäure als Wachstumsstoff. Untersuchungen von v. EULER und KARRER und Mitarbeitern (483) zeigten, daß bei *Staphylococcus aureus* und *Bacillus Proteus vulgaris* sowohl *Guvacin* oder 1,2,5,6-Tetrahydro-nicotinsäure-(3) als *Hexahydro-nicotinsäure* analog wirken. Diese Mikroorganismen sind daher offenbar zur Dehydrierung der Tetrahydro- und Hexahydro-nicotinsäure befähigt, besonders leicht scheint ihnen das im Falle der Tetrahydro-säure zu gelingen. In frischem Leber- und Nierenbrei ließen sich keine die Tetrahydro-nicotinsäure dehydrierenden Fermente nachweisen.

Nach subcutaner Injektion von insgesamt 10 g *1,2,3,4-Tetrahydrochinolin* (I) in Mengen von 41 mg pro Kilogramm und Tag enthielt der stark gefärbte Hundeharn 2,856 g bzw. 2,70 g (rein) *2-Oxychinolin* (II), was einer Ausbeute von 24,8% d. Th. entspricht. Der Hund kann daher im Pyridinring hydriertes Chinolin dehydrieren.

Von weiteren hydrierten Chinolinen verbrennen *cis-trans-Dekahydrochinolin* und *cis-trans-Dekahydro-isochinolin*, die in Dosen von 51 und



44 mg/die/kg Körpergewicht während 16—25 Tagen gegeben ohne Störungen von Hunden ertragen werden, völlig. Das *1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin* verschwand bis auf eine geringe, aus dem Harn als Pikrat isolierte Menge unveränderten Ausgangsmaterials. *Dekahydro-chinaldin* (*cis-trans*) in Mengen von 44,5 mg/kg/die während 27 Tagen injiziert, konnte nicht mehr aufgefunden werden. Die nachweisbare Dehydrierung bleibt also bei diesen hydrierten Chinolinen und Chinolin-derivaten auf das Tetrahydrochinolin beschränkt (57).

III. Die Oxydation längerer C-Ketten bei bestehender COOH-Gruppe.

Der Schilderung der einzelnen oxydativen Prozesse, welche ausgehend von der Einführung einer Oxygruppe in das Molekül bis zur Entstehung einer Carboxylgruppe führen können, hat die Darstellung des oxydativen Abbaus längerer Kohlenstoffketten zu folgen. Das Vorhandensein von mindestens einer COOH-Gruppe ist dabei Voraussetzung, die Bildung einer zweiten möglich. Die zu betrachtenden Vorgänge betreffen daher die Oxydation aliphatischer Mono- und Dicarbonsäuren mit gerader oder verzweigter C-Kette, von biologischen Substraten in erster Linie die Verbrennung der Fettsäuren. Da viele Aminosäuren durch oxydative Desaminierung oder Umaminierung in Ketosäuren übergehen, kann auch der Abbau der Eiweißstoffe in die Verbrennung der C-Kette auslaufen. Für die Glykogenolyse und Glykolyse ergeben sich durch die unmittelbare Bildung der C_3 -Bruchstücke insofern andere Verhältnisse, als die Spaltung der C—C-Bindung hier schon zu kleinen Einheiten führt, deren Verbrennung im vierten Abschnitt dieser Ausführungen behandelt wird.

I. Abbau normaler und substituierter Fettsäuren (Monocarbonsäuren).

Die zahlreichen experimentellen Arbeiten über Fettsäurestoffwechsel dokumentieren eindeutig das Interesse, das nach wie vor für diese Probleme sowohl von theoretischer als von klinischer Seite besteht. Allein schon über die Entstehung der Ketonkörper aus verschiedensten Fettsäuren

unter normalen und pathologischen Konditionen liegen sehr viele Untersuchungen vor, so daß eine ins Einzelne gehende Besprechung recht umfangreich ausfallen würde und daher nicht angezeigt erscheint.

Neben der weiteren Verfolgung des β -oxydativen Abbaus, dessen Primat unseres Erachtens unerschüttert blieb, wurden die Möglichkeiten eines gleichzeitigen oxydativen Zerfalls der C-Kette in mehrere Bruchstücke diskutiert. Diese Theorie der „alternativen multiplen“ Oxydation ist indessen experimentell nur schwach gestützt.

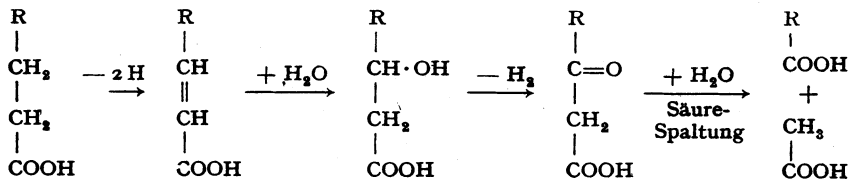
Der ω -Oxydation nach VERKADE dürfte eine wesentliche Bedeutung, namentlich in quantitativer Hinsicht, nicht zukommen.

Eine Reihe von Versuchen zur Oxydation der Fettsäurekette *in vitro* mit Wasserstoffsuperoxyd nach DAKIN veröffentlichten SMEDLEY-MACLEAN und Mitarbeiter (268), ferner WITZEMANN (269).

Die hormonale Beeinflussung des Fettabbaus (*Fettstoffwechsellhormon, Lipotrin*) soll hier nicht behandelt werden, desgleichen haben wir das Problem der *lipotropen Faktoren* nicht berücksichtigt.

a) Die β -Oxydation.

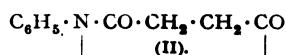
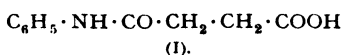
Durch Verfütterung *phenylsubstituierter Fettsäuren* hat im Jahre 1905 bekanntlich KNOOP das Gesetz der β -Oxydation aufgefunden. Dieser Reaktionsvorgang, dessen Aufklärung namentlich Untersuchungen von DAKIN (270) förderten, kann im Sinne H. WIELANDS folgendermaßen formuliert werden:



und darf für bestimmte Teilreaktionen auf Grund experimenteller Befunde als gesichert gelten. Auf die diesbezüglichen Arbeiten wurde bereits eingegangen. Noch nicht bewiesen ist, ob es sich bei dem abgespaltenen Zweierbruchstück tatsächlich um *Essigsäure* handelt. Ihre Entstehung bei der Einwirkung von Caprylsäure auf Leberschnitte glauben LELOIR und MUÑOZ (271) auf Grund einer positiven Lanthan-Reaktion nach KRÜGER und TSCHIRCH (272) gezeigt zu haben. Neuerdings besteht die Auffassung, es handle sich um eine besonders aktive Form der Essigsäure, worauf wir noch zurückkommen.

Die Befunde KNOOPS wurden von verschiedenen Seiten bestätigt und der β -oxydative Abbau auch neuerdings an weiteren Beispielen nachgewiesen. *Cyclohexylsubstituierte Fettsäuren* (vgl. S. 234) mit ungeradzahligter Seitenkette, wie *Cyclohexyl-propion-* und *Cyclohexyl-valerian-*

säure (114 und 83 mg/kg/die), gehen im Tierkörper (Hund) in Hexahydrobenzoe- bzw. *Benzoessäure* über (Ausbeuten 45 und 62%), solche mit geradzahligem C-Kette, wie *Cyclohexyl-butter-* (193 mg/kg/die) oder *Cyclohexyl-decansäure* (100 mg/kg/die), verbrennen über die intermediär entstehende Cyclohexylelessigsäure vollständig (165). Menschliche Niere oxydiert *Phenylpropionsäure* zu *Benzoessäure*, in der isolierten Hundeniere entstand ferner *Zimtsäure* (273). Die *Halbanilide* der *Sebacin-* und *Adipinsäure* werden, als Na-Salze an Hunde verfüttert (153 und 179 mg/kg/die) β -oxydativ zu kleinen Mengen *Anilidobernsteinsäure* (I) und *Succinanil* (II) abgebaut (274).

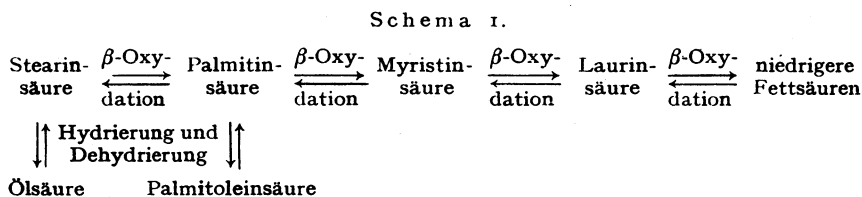


Cyclohexyl- α -aminobuttersäure (165) verhält sich wie die von KNOOP untersuchte α -Phenylaminobuttersäure, sie gab beim Hund nach Dosen von 91 mg/kg/die, *Benzoessäure* (35,5%), verbrennt also nach oxydativer Desaminierung und Decarboxylierung wie die Phenylpropionsäure β -oxydativ. β -Oxy- α -aminosäuren werden nach KNOOP und Mitarbeitern (275) nicht über die α -Ketosäuren, sondern direkt β -oxydativ abgebaut. So gab γ -Phenyl- β -oxy- α -aminobuttersäure *Phenylelessigsäure* (11,4 und 10,9%), δ -Phenyl- β -oxy- α -aminovaleriansäure *Benzo-* bzw. *Hippursäure* (16,1 und 14,4% d. Th.). Gewisse β -Aminosäuren werden nach peroraler Gabe oder nach Injektion von Kaninchen nicht angegriffen. LANG und ADICKES (276) verabreichten je 1 g β -Amino-*n-valerian-*, β -Amino-*n-capron-*, β -Amino-*n-octan-* und β -Amino-*n-decansäure* und stellten auf Grund von Aminostickstoffbestimmungen nach VAN SLYKE fest, daß diese Säuren im Harn erscheinen. Sie wurden auch als 4-Dihydro-uracile, die β -Aminodecansäure zufolge ihrer Schwerlöslichkeit direkt, aus dem Harn erhalten.

Neben diesen an körperfremden Substanzen erhobenen Befunden war es zweifellos wichtig, daß der β -oxydative Abbau auch für die natürlichen Fettsäuren bewiesen wurde. SCHOENHEIMER und RITTENBERG (277) fütterten Mäusen mit einem normalen Futter den Äthylester der *Deuterio-stearinsäure*. Nach 5 Tagen wurden die Tiere getötet. Die bei der Aufarbeitung der Fettsäuren aus den Fettdepots erhaltene *Palmitinsäure* erwies sich als D-haltig, sie muß also durch Abbau aus der gefütterten Stearinsäure entstanden sein. Nach Gaben von *Deuterio-palmitinsäure* an Ratten (278) enthielten *Myristin-* und *Laurinsäure* schweren Wasserstoff. Damit ist die β -Oxydation der am weitesten verbreiteten Fettsäuren in vivo bewiesen. Der Tierkörper ist aber auch zur Verlängerung der C-Kette befähigt, indem bei diesen Versuchen Deuterio-Stearinsäure auftrat. Ganz kürzlich berichtete KLEM (484) über die Umwandlung von Laurin- und Myristinsäure in Fettsäuren höheren Molekularge-

wichtiges im Organismus wachsender und ausgewachsener Ratten. Er verfütterte *Deuterio-laurinsäure* und fand in den Gesamt-Fettsäuren der Tiere *schwere Myristinsäure*. Nach *Deuterio-myristinsäure*-Gaben trat *schwere Palmitinsäure* auf. Wurde ein gemischtes Triglycerid aus *Deuterio-laurinsäure* und Caprylsäure verabreicht, so enthielten sowohl *Myristin-*, *Palmitin-* als *Stearinsäure* schweren Wasserstoff.

Unter Einbeziehung der bereits erwähnten Dehydrierungen (vgl. S. 231) wird das Verhalten der Fettsäuren mit 18 und weniger C-Atomen im Stoffwechsel durch das folgende Schema veranschaulicht:



Unter Benutzung des respiratorischen Quotienten (R. Q.) als Indicator stattfindender Fettsäureverbrennung in überlebendem Lebergewebe untersuchten ANNAU und Mitarbeiter (279) das Verhalten der *Palmitin-*, *Stearin-*, *Öl-*, *Linol-* und *Linolensäure*. Die Methodik der ausschließlichen Messung des Sauerstoffverbrauches als Maß stattfindender Fettsäureverbrennung nach CALIFANO (280) wird mit Recht als unbrauchbar vermieden. *Palmitinsäure*, *Stearinsäure* und *Ölsäure*, denen die Fähigkeit zukommt, den R. Q. in ähnlichem Ausmaß zu senken, werden als gemeinsame Gruppe bezeichnet. Gestützt auf die Untersuchungen von LANG und Mitarbeitern (vgl. S. 232) und von ANNAU und Mitarbeitern (249) über Enzyme der Fettsäuredehydrierung nehmen die Verfasser an, die Stearinsäure werde zu Ölsäure dehydriert und diese β -oxydativ abgebaut. Zu einer zweiten Gruppe gehören die Fettsäuren mit zwei bis vier Doppelbindungen, also *Linol-*, *Linolen-* und *Arachidonsäure*, welche hinsichtlich ihres Verhaltens beim oxydativen Abbau von den übrigen Säuren verschieden sind. Linolsäure allein als Na-Salz zu atmendem Lebergewebe gegeben, verhält sich wie die Säuren der „Ölsäuregruppe“, sie senkt den R. Q. auf z. B. 0,54, gemeinsam mit Ölsäure, findet Anstieg auf 0,95 statt. Linolensäure allein erhöht den R. Q. über die Einheit hinaus, ist indessen auch Ölsäure vorhanden, so sinkt er. Bereits SKRAUP und Mitarbeiter (281) hatten in ausgedehnten Versuchen an Ratten und Hunden diese Eigenschaft der Linolsäure gezeigt und auf die biochemische Bedeutung der ungesättigten Fettsäuren hingewiesen. Eigenartigerweise konnten APPEL und Mitarbeiter (282, 297) diese Befunde nicht bestätigen.

Auch Ammonchlorid vermag den R. Q. zu erniedrigen, welcher indessen wieder ansteigt, sobald Linolsäure, nicht aber Linolensäure zu-

gefügt wird. Die Wirkung des Ammoniaks ist noch nicht klar, es wird angenommen, es übe einen mobilisierenden Einfluß aus, indem in vermehrtem Maße Fette zum Abbau gelangen (vgl. S. 244).

Gestützt auf ausgedehnte Untersuchungen pflanzlicher Wachse und von Insektenwachsen, die z. B. zur Isolierung des Paraffin-Kohlenwasserstoffs n-Nonocosan, $C_{29}H_{60}$ und des zugehörigen Ketons, n-Nonacosan-15-on oder Di-n-tetradecylketons aus den Lipoiden von Kohlblättern führten, veröffentlichten CHIBNALL und PIPER (283) ihre Vorstellungen über die Entstehung dieser Verbindungen. Danach wird eine höhere Fettsäure entweder zum primären Alkohol reduziert oder zur β -Ketosäure oxydiert. Letztere kann unter Verkürzung der Kette um ein C-Atom in ein Methylketon und schließlich in das entsprechende Paraffin übergehen oder aber β -oxydativ eine um 2 C-Atome niedrigere Fettsäure liefern. Diese Auffassung stimmt mit den Beobachtungen über die „Ketonranzigkeit“ der Fette überein.

Bei der Methangärung des *Butanols* entstehende *Buttersäure* wird unter erneuter Methanbildung in *Essigsäure* umgewandelt. Es ist anzunehmen, daß es sich auch hier um einen β -oxydativen Abbau handelt, der über Acetessigsäure verläuft (284). Nach MAZZA und ZANFAGNA (285) wird aus höheren Fettsäuren mit gerader C-Atomzahl, nicht aber aus solchen mit ungerader C-Kette, mit *Bact. coli* Acetessigsäure gebildet und diese nicht decarboxyliert, sondern zu Essigsäure hydrolysiert, welche aerob zu mindestens 85% in Kohlensäure und Wasser übergeht.

Auch für die Verbrennung aliphatischer Dicarbonsäuren gilt, wie VERKADE erstmalig zeigte, das Gesetz der β -Oxydation (vgl. S. 260).

Hinsichtlich der *Fermente* des β -oxydativen Abbaus ist vorläufig wenig bekannt. Über die *Fettsäuredehydrogenasen* ist das Wesentliche bereits erwähnt worden (vgl. S. 201 und 232).

Auf Grund des β -oxydativen Abbaus der Fette läßt sich bekanntlich auch das Auftreten der *Ketonkörper* bei Diabetes mellitus, im Hunger oder bei Überangebot von Fett durch die Annahme erklären, daß der Abbau auf der Stufe der β -Oxybuttersäure bzw. Acetessigsäure stehen bleibt und die Verbrennung dieser Bruchstücke nur noch ungenügend vor sich geht.

Wenn auch in den meisten Fällen keine Zweifel über die Herkunft der Acetonkörper aus den Fetten bestehen dürften, ist indessen gleichwohl zu erinnern, daß endgültige Beweise nicht vorliegen, wohl aber z. B. mit Hilfe des isotopen Kohlenstoffs ebracht werden könnten. Aus der umfangreichen Literatur über die Ketokörperbildung sollen vor allem diejenigen Arbeiten, welche neue Gesichtspunkte zum Problem der Fettsäureverbrennung bringen, Berücksichtigung finden. ANNAU (286) beobachtete in Gegenwart von *Brenztraubensäure* und *Ammonsalzen* durch Leberschnitte stark vermehrte Bildung von Acetessigsäure. In der Leber

gut ernährter Ratten tritt dieser Effekt nicht nur in Gegenwart von Brenztraubensäure, sondern überhaupt ketogener Fettsäuren ein (287). *Ammonchlorid* soll die Ketonkörperbildung aus den meisten Fettsäuren beschleunigen.

Während früher die Anwesenheit von Ketonkörpern stets als Zeichen gestörten Stoffwechsels bewertet wurde, sind heute verschiedene Forscher (288) geneigt, die Ketonkörper als normale, in der Leber entstehende Intermediärprodukte der Fettverbrennung zu betrachten, die, an das Blut und die Gewebe abgegeben, völlig verbrennen. Eine Zunahme der Ketonkörper im Blut beobachteten MACKAY, WICK und BARNUM (289) nach Fütterung von *Butter-*, *Capron-*, *Capryl-* und *Caprinsäuremethylester* an Ratten, obgleich deren Lebern nach beendetem Versuch Glykogengehalte von mehr als 4% aufwiesen. Nicht ketogen wirkten indessen die geradzahligen Fettsäuren mit 12—18 C-Atomen. Es wird daher angenommen, die niederen Säuren verhielten sich trotz großer Glykogenvorräte deshalb ketogen, weil sie im Gegensatz zu den langkettigen *nicht gespeichert* werden, sondern rasch verbrennen (290).

WICK und DRURY (291) untersuchten den Ausnutzungsgrad der β -Oxybuttersäure durch normale Tiere, indem sie Kaninchen Na-butyrat in die Ohrvene injizierten. Bei sehr hohen Gehalten von 200 mg% und mehr β -Oxybuttersäure im Blut wird fast der ganze Umsatz des Tieres durch die Ketonverbrennung gedeckt. Die oberste Grenze dürfte dann erreicht sein, wenn etwa 90% des Sauerstoffverbrauches zur Oxydation der β -Oxybuttersäure verwendet werden. Es ist daher kaum anzunehmen, normale und diabetische Gewebe würden Ketonkörper gleich gut verwerten können, vgl. (305).

Versuche von WINKLHOFER (292) scheinen zu zeigen, daß überlebende Organschnitte von Leber, Milz, Lunge und Muskel von Kaninchen, *Aceton*, *Methyl-n-propylketon*, *Methyl-iso-propylketon*, *Methyläthylketon* und *Diäthylketon* abzubauen vermögen.

Die Beobachtung EMBDENS, daß *ungeradzahlige* Fettsäuren bei der Leberdurchblutung den Gehalt des Perfusats an Acetessigsäure nicht erhöhen, führte zur allgemeinen Ansicht, Fettsäuren mit ungerader C-Zahl wären *nicht* ketogen. Man hat bekanntlich für Diabetiker derartig zusammengesetzte Fette, z. B. Intarvin, synthetisiert. Auch DEUEL und Mitarbeiter (293) vertreten die Ansicht, *Propion-*, *Heptyl-* und *Nonylsäure* wären nicht ketogen und *Valeriansäure* höchstens in sehr geringem Umfang. JOWETT und QUASTEL (294) fanden indessen, daß Leberschnitte aus *Valerian-*, *Heptyl-* und *Nonylsäure*, aber nicht aus *Propionsäure*, *Acetessigsäure* zu bilden vermögen. In Versuchen an Kaninchen bewirkten nach MACKAY und Mitarbeitern (295) *Valerian-*, *Heptyl-*, *Pelargon-* und *Undecylsäure* als Methylester verfüttert, Anstieg, im Falle der C₅- und C₇-Säure sogar ausgesprochene Erhöhung des Blutacetons. Die

Leberglykogengehalte betragen bei diesen Versuchen 3,2—8,9%. Das biologische Verhalten ungeradzahligter Fettsäuren erlangte neuerdings praktisches Interesse im Hinblick auf die Verwendung *synthetischer Fette* für die menschliche Ernährung (296). KEIL, APPEL und BERGER (297) gewannen ein Fett mit ungeradzahligen Fettsäuren. Die Darstellung erfolgte durch Umwandlung von Kokosfettsäuren über Alkohole, Bromide, Nitrile in um ein C-Atom verlängerte Fettsäuren, die mit Glycerin verestert wurden. In Versuchen an Ratten soll sich ein solches Fett von natürlichem Kokosfett nicht unterscheiden (282). Mit einem Fett, das zur Hälfte aus Fettsäuren mit ungerader, zur Hälfte aus solchen mit gerader C-Zahl zusammengesetzt war (C₁₀—C₁₉), ernährte Ziegenlämmer zeigten normale Entwicklung. Von den Kettenlängen von C₁₃—C₁₉ aufweisenden Depotfettsäuren dieser Tiere bestanden 33% aus ungeradzahligen Fettsäuren (298). Hinsichtlich der möglichen Entstehung von *Dicarbonsäuren* wurde festgestellt, daß das ungeradzahlige Kokosfett nur nach sehr reichlichen Fettmahlzeiten geringe Diacidurie, und zwar etwa in gleichem Maße wie analog genossenes natürliches Kokosfett bewirkt (299).

Die ketogene Wirkung verschiedener *Aminosäuren* hat EDSON (300) durch Zugabe von Aminosäuren zu Leberschnitten von Ratten weiter untersucht, wobei sich als stark ketogen *Leucin*, *Tyrosin* und *Phenylalanin*, etwas schwächer das *Oxyprolin* erwies. Keine Vermehrung der Ketonkörper bewirkten Zusätze von *Tryptophan*, *Prolin*, *Cystin*, *Ornithin*, *Lysin* und *Asparaginsäure*.

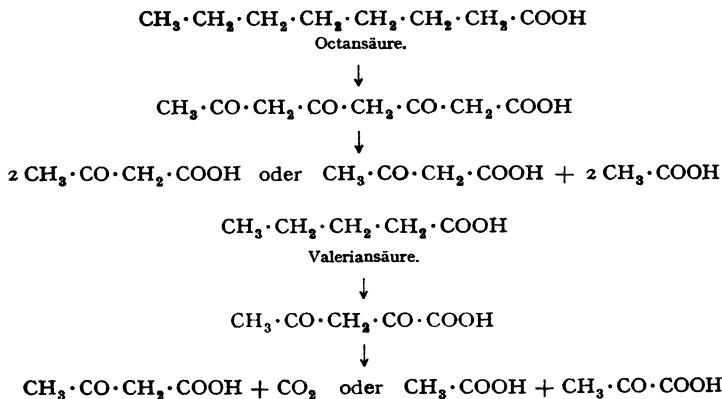
Es wurde verschiedentlich versucht, für die bestimmt sehr engen Beziehungen zwischen Kohlenhydrat- und Fettverbrennung eine plausible Deutung zu finden. Man dachte z. B. an die Möglichkeit der Entstehung eines Kondensationsprodukts der aus dem Kohlenhydratstoffwechsel stammenden Brenztraubensäure mit Acetessigsäure, von dem anzunehmen ist, es weise eine größere Chance zur völligen Verbrennung auf. Eine ungenügende Bereitstellung von Brenztraubensäure infolge gestörten Kohlenhydratabbaus müßte sich zwangsläufig im Sinne einer „Ketose“ auswirken.

Zu interessanten Resultaten gelangte neuerdings BREUSCH, indem er zeigte, daß sich β -Ketosäuren mit *Oxalessigsäure* unter Bildung von *Citronensäure* und der um 2 C-Atome kürzeren Fettsäure umsetzen. Sie werden im Zusammenhang mit dem Abbau der niederen C-Ketten später näher zu erörtern sein (siehe S. 290, 299ff.). Durch Verbrennung des C₂-Bruchstückes über den Citronensäurecyclus erscheinen die Beziehungen zwischen Fett- und KH-Abbau in einem neuen Licht. Das Eingreifen der Oxalessigsäure, die ihrerseits weitgehend aus den Kohlenhydraten stammen kann, würde die alte, unklare Annahme über „die Verbrennung der Fette im Feuer der Kohlenhydrate“ vorteilhaft er-

setzen. Es wird sich zeigen, in welcher Richtung sich diese Versuche weiter entwickeln und inwiefern sie sich *in vivo* endgültig beweisen lassen.

b) *Multiple alternative Oxydation.*

Der β -oxydative Abbau einer Fettsäurekette in seiner ursprünglichen Auffassung der sukzessiven Abspaltung von C_2 -Bruchstücken kann pro *Mol Fettsäure* als Endergebnis lediglich *1 Mol β -Oxybuttersäure* bzw. Acetessigsäure liefern. Eingehende Untersuchungen über die Oxydation normaler gesättigter Fettsäuren durch Leberschnitte, unter quantitativer Bestimmung entstehender β -Oxybuttersäure und Acetessigsäure ergaben indessen weit höhere Mengen an diesen Spaltstücken. JOWETT und QUASTEL (294) nehmen daher an, der β -oxydative Abbauweg entspreche nicht den Tatsachen und versuchen diese Ketonkörperbildung und damit die Fettoxydation durch die Theorie der *multiplen alternativen Oxydation* zu erklären. Danach zerfällt die C-Kette nicht in C-Zweier-Bruchstücke, sondern spaltet, nachdem bei paarigen Fettsäuren Oxydation in β -, δ - und ζ -Stellung, bei unpaarigen in α - und γ -Stellung stattgefunden hat, direkt C_4 -Körper ab:



Diese Deutungen sind nicht neu, indem bereits 1916 durch HURTLEY ähnliche Vorschläge erfolgten und CLUTTERBUCK und RAPER 1925 bei der Einwirkung von Wasserstoffperoxyd auf längere Fettsäuren β -, γ - und δ -Oxydation beobachteten.

Gleichzeitig wie JOWETT und QUASTEL untersuchten DEUEL und Mitarbeiter (301) die Ketonkörperausscheidung hungernder Ratten nach Gaben von *Butter-* oder *Capronsäure* und stellten fest, daß dieselbe quantitativ gleich war wie nach Fütterung einer entsprechenden Menge *Acetessigsäure*. Wurde indessen *Caprylsäure* gegeben, so machten die Ketonkörper im Harn den doppelten Betrag aus. Darin sehen die Autoren

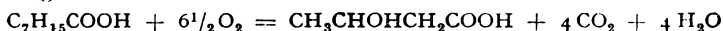
den Beweis eines Zerfalls in 2 C₄-Körper und gelangen zur Schlußfolgerung, sowohl β - als δ -Oxydation würden eine wichtige Rolle im intermediären Fettstoffwechsel spielen. Verfütterte *Valeriansäure* verursachte nur geringe Ketonurie, so daß α -Oxydation höchstens in untergeordnetem Maß möglich war. Wir möchten in diesem Zusammenhang erinnern, daß eine α -Oxydation, wie besonders KNOOP (302) schon hervorhob, nie beobachtet wurde.

Weitere Versuche (303) mit den Äthylestern der *Capryl-, Caprin-, Laurin- und Myristinsäure* ließen wieder mehr als das Doppelte an Ketonkörpern im Harn auffinden als bei analogen Fütterungen von Acetessigsäure-äthylester. Noch ausgeprägter war die ketogene Wirkung von *Palmitinsäure- und Stearinsäure-äthylester*. Es wird daher angenommen, Butter- und Capronsäure würden β -oxydativ, die höheren Säuren durch δ - und ζ -Oxydation oder nach JOWETT und QUASTEL durch *multiple alternative* Oxydation abgebaut.

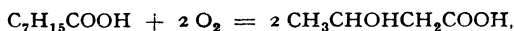
Von der Voraussetzung ausgehend, der nicht in Ketonkörper übergehende Anteil des Fettsäuremoleküls verbrenne zu CO₂ und H₂O, versuchte BLIXENKRONE-MØLLER (304) durch Messung des *Sauerstoffverbrauches* der Leber und der gebildeten *Ketonkörper* zu Einblicken in die quantitativen Verhältnisse der Fettverbrennung zu gelangen. Bei durchströmten Katzenlebern betrug bei 10 Tieren, die zuvor 2 Tage gehungert hatten, der respiratorische Quotient im Mittel 0,57; bei 4 Tieren, die 2 Tage vor dem Versuch pankreasectomiert wurden, nur noch 0,37. Als wichtigste Ursache für den niedrigen R. Q. betrachtet BLIXENKRONE-MØLLER die unvollständige Verbrennung der Fette, experimentell nachweisbar durch vermehrte Ketonkörperbildung. Für die Entstehung von 100 mg β -Oxybuttersäure aus Palmitinsäure sind fast 400 ccm Sauerstoff zur Verbrennung des Restes der C-Kette nötig. Bei einem Versuch, der 527 mg Ketonkörper lieferte, betrug die berechnete Sauerstoffmenge etwa 2100 ccm, die tatsächlich benötigte aber nur $\frac{1}{6}$, in anderen Versuchen nur $\frac{1}{2}$ oder $\frac{1}{4}$ dieses Wertes. Daraus wird geschlossen, aus 1 Mol einer höheren Fettsäure bilde sich nicht nur im Sinne der β -Oxydation 1 Mol β -Oxybuttersäure, es würden vielmehr die Fettsäuren zunächst in Ketten mit 4 C-Atomen zerfallen und aus *jedem Fettsäuremolekül 4 Mol β -Oxybuttersäure* entstehen. Ketonkörper und Glucose werden als regelmäßige Bestandteile bezeichnet, die die Leber als Energiequellen an die Muskulatur und das übrige Gewebe abgibt. In der glykogenarmen Leber ist erhöhter Fettabbau zu verzeichnen, während das glykogenreiche Organ hauptsächlich Glucose produziert.

In weiteren Versuchen setzte BLIXENKRONE-MØLLER (304) dem Perfusionsblut 220—750 mg *Buttersäure* als Natriumsalz zu und beobachtete sowohl einen Anstieg des Blutzuckers als eine Zunahme der Ketonkörper in Blut und Leber. Auch nahm der Glykogengehalt der

Leber zu. Die Menge der ätherlöslichen Säuren ging im Verlaufe des Versuches zurück, die Alkalireserve stieg an, woraus auf das Verschwinden der Buttersäure aus dem Blut geschlossen wurde. Sauerstoffverbrauch und R. Q. zeigten namentlich nach der ersten Versuchshälfte steigende Tendenz. Zusätze von 500 mg *Caprylsäure* (3 Versuche) bewirkten bereits Leberschädigungen, erhebliche Steigerung des Sauerstoffverbrauches, Abfall des R. Q. und Ketonkörperbildung (70—90 mg). Auf Grund der Gleichung:

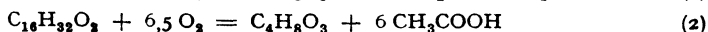
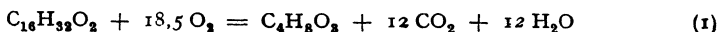


berechnet sich ein R. Q. von 0,61, da indessen nur 0,38 und 0,43 gefunden wurde, wird angenommen, aus einem Molekül Caprylsäure seien 2 Mol Oxybuttersäure entstanden:

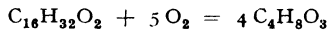


da bei diesem Prozeß der R. Q. Null ist. Eine Zunahme des Blutzuckers wurde durch Caprylsäure nicht erhalten, hingegen durch Bernsteinsäure, wobei der R. Q. anstieg. BLIXENKRONE schließt auch aus diesen Versuchsergebnissen, daß Fettsäuren mit paariger C-Zahl zu C_4 -Bruchstücken, „Butyratketten“, abgebaut werden, welche ihrerseits teilweise in β -Stellung unter Entstehung von β -Oxybuttersäure, teilweise in γ -Stellung unter Bildung von Bernsteinsäure oxydiert werden. Damit wäre über das Fumarsäure-Äpfelsäure-Oxalessigsäure-System der Anschluß an die Kohlenhydrate gefunden und der Übergang der Fette in Zucker gegeben.

Gleichfalls unter dem Gesichtspunkt der multiplen alternativen Oxydation untersuchten STADIE, ZAPP und LUKENS (305) *Ketonkörperbildung* und *Sauerstoffverbrauch* von Leberschnitten normaler und diabetischer Katzen, wobei auch der Einfluß von Kohlenhydraten und Insulin geprüft und die *Ketonkörperverwertung* durch *Muskelbrei* gesunder und diabetischer Katzen kontrolliert wurde. Es zeigt sich, daß die Muskulatur pro Stunde und Kilogramm Körpergewicht 1300 Millimol Ketonkörper umzusetzen vermag, ein Wert, der bei diabetischen Tieren annähernd gleich gefunden wurde. Die Autoren schließen daraus, die Verbrennung der Ketonkörper in der Muskulatur sei vom Insulin unabhängig. Die Versuche über Ketonkörperbildung in Schnitten von Lebern diabetischer Katzen ergaben für den Quotienten aus Sauerstoffverbrauch und entstandenen Ketonkörpern (O_2 /Ketonkörper) im Mittel den Wert $1,68 \pm 0,12$, oder nach Anbringung einer Korrektur, die den in der Leber gleichzeitig vor sich gehenden Desaminierungsprozessen gerecht werden soll, einen solchen von 1,54. Von den theoretisch möglichen Fällen des oxydativen Abbaus nach den Gleichungen



mit den berechneten O_2 /Ketonkörperquotienten von 18,5:1, 6,5:1, 1,25:1 und R. Q. von 0,65, 0 und 0 entspricht die multiple alternative Oxydation am besten den experimentell gefundenen Werten. Auch diese Forscher nehmen daher an, in der Leber der diabetischen Katze zerfalle jedes Fettsäuremolekül in 4 Moleküle Ketonkörper. Der gefundene niedrige R. Q. von $0,32 \pm 0,04$ stützt die Vermutung, die hauptsächlichsten oxydativen Prozesse in der diabetischen Leber würden keine Kohlensäure produzieren. Unter der Voraussetzung, die Fettsäuren seien einzige Quelle der Ketonkörper, läßt sich der totale Sauerstoffverbrauch in einen zur Ketonkörperbildung notwendigen Anteil und in einen restlichen, für weitere Oxydationsvorgänge benötigten aufteilen. Durch Division der Gesamtkohlensäure durch diesen restlichen Sauerstoff berechnet sich der R. Q. für die von der Ketonkörperbildung unabhängigen Oxydationsprozesse der Leber. Nach der Gleichung:



wird als mittlere, für die Bildung von 1 Mol Ketonkörper benötigte Sauerstoffmenge 1,25 Mol angenommen. Auf Grund dieser Überlegungen berechnen die Autoren mit ihren experimentell ermittelten Daten folgende Werte (Tabelle 2):

Tabelle 2.

Lebern von	Millimol Gesamt- O_2 pro 2 Stunden und Gramm	R. Q.	Millimol Rest- O_2 pro 2 Stunden und Gramm	Rest-R. Q.	Millimol Gesamt- CO_2 pro 2 Stunden und Gramm
normalen hungernden Katzen	142 ± 3	$0,64 \pm 0,03$	122 ± 9	$0,81 \pm 0,05$	89 ± 9
diabetischen Katzen	173 ± 8	$0,32 \pm 0,04$	42 ± 9	$1,36 \pm 0,34$	57 ± 8
mit Insulin behandelten diabetischen Katzen	156 ± 3	$0,44 \pm 0,06$	120 ± 4	$0,75 \pm 0,07$	68 ± 7

Diese Berechnungen sind indessen immer unter der Annahme durchgeführt, daß *Palmitinsäure* verbrennt. Unseres Erachtens müssen aber auch weitere Säuren, wie Stearinsäure, ferner die Tatsache, daß neben β -Oxybuttersäure auch *Acetessigsäure* entsteht (nach Angaben der Autoren wurde ungefähr ebensoviel Acetessigsäure gefunden wie β -Oxybuttersäure), berücksichtigt werden. Es ist nun leicht zu zeigen, daß unter solch veränderten Bedingungen die berechneten Quotienten O_2 /Ketonkörper anders ausfallen und z. B. 1,25—1,75 betragen. Damit ändern sich aber auch die Werte für Restsauerstoff und zugehörige R. Q., und es folgt, daß die hohen gemessenen CO_2 -Werte nicht durch den ange-

nommenen Weg der multiplen alternativen Oxydation erklärt werden können.

Daß Leberschnitte pankreasektomierter Katzen wohl große Mengen an Acetonkörpern liefern, aber keine *Essigsäure*, ist keineswegs ein Befund, der gegen die sukzessive β -Oxydation und für die multiple alternative Oxydation spricht, wie STADIE, ZAPP und LUKENS (306) behaupten.

Eine kritische Sichtung der mitgeteilten Arbeiten ergibt demnach, daß Beweise für das Bestehen einer multiplen alternativen Oxydation der Fettsäuren nicht erbracht sind. Die Theorie basiert lediglich auf der Feststellung erhöhter Acetonkörperbildung durch überlebende Leberschnitte von Ratten und Katzen und erhöhte Acetonkörperausscheidung im Harn von Tieren, die zusätzlich zumeist niedere Fettsäuren erhielten. Dafür sind auch andere Erklärungen ebenso wahrscheinlich.

Es ist bereits seit langem bekannt (LOEB, FRIEDMANN), daß bei der Leberdurchströmung dem Perfusat zugesetzte *Essigsäure* den Gehalt an *Acetessigsäure* erhöht. MACKAY, BARNES, CARNE und WICK (307) fütterten hungernden Ratten Essigsäure und fanden im Harn deutlich erhöhte Acetonwerte. Dasselbe konnte in Versuchen an phlorrhizindiabetischen Hunden beobachtet werden. Gleichzeitige Acetonbestimmungen im Blut zeigen, daß es sich um eine *vermehrte Acetonbildung* handeln muß und die Essigsäure demnach *ketogen* wirkt. Es darf nach von SWENDSEID und Mitarbeitern (308) unter Benutzung von isotopem Kohlenstoff durchgeführten Versuchen (vgl. S. 271) als gesichert gelten, daß Essigsäure im Tierkörper zu *Acetessigsäure* kondensiert werden kann. Das β -oxydativ von den Fettsäuren abgespaltene C_2 -Bruchstück dürfte sich daher als aktivierte Form eines Essigsäuremoleküls auch in diesem Sinne verhalten. Eine vermehrte Acetonkörperbildung kann daher nicht ohne weiteres als Ausdruck eines neuen Abbauweges der Fettsäuren gelten.

Neuerdings versuchten MOREHOUSE und DEUEL (309) die Frage einer möglichen δ -Oxydation durch Verfütterung von *Deuteriocabronsäure* zu klären. Sie stellten durch Hydrierung der entsprechenden ungesättigten Säuren eine α - β - und β - γ -*Diduteriocabronsäure* her und verabreichten sie

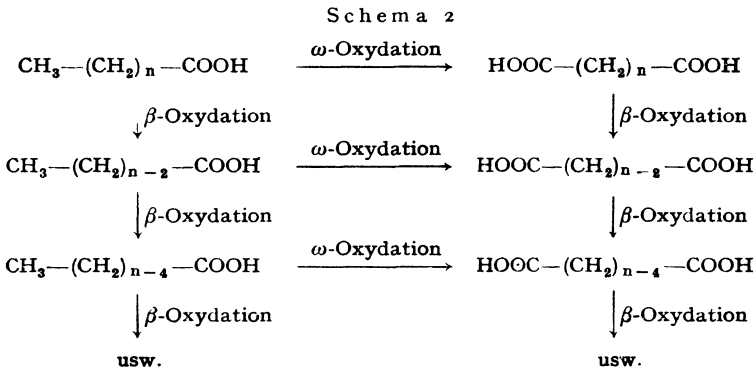


als Na-Salze an Ratten nach vorangehendem 72stündigem Hunger. Aus den Harnen wurde als Silbersalz die β -*Oxybuttersäure* isoliert. Sie sollte nach β -oxydativer Bildung aus der α - β -Säure keinen schweren Wasserstoff mehr enthalten, wies aber in Wirklichkeit 6,43% des in der verabreichten Säure vorhandenen Deuteriums auf. Die nach Gaben der β - γ -Säure ausgeschiedene β -*Oxybuttersäure* enthielt 10,89% des D-Gehaltes derselben. MOREHOUSE und DEUEL betrachten diese Befunde als neue Beweise stattfindender δ -Oxydation. Sie sind aber gleichfalls nicht überzeugend. Beide

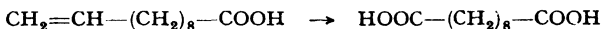
der deuterierten Säuren können wohl β -oxydativ D-haltige C_2 -Bruchstücke und durch Kondensation schweren Wasserstoff aufweisende Acetessigsäure bzw. β -Oxybuttersäure ergeben.

c) ω -Oxydation.

VERKADE hat in zahlreichen Veröffentlichungen (310) seine Befunde über die Methyloxydation gewisser Fettsäuren (vgl. S. 215) für die Verbrennung *aller normalen Fettsäuren* gültig erklärt und die ω -Oxydation gefolgt von bilateraler β -Oxydation nach dem Schema



als *vorherrschenden Abbauweg* der Fettsäuren im Tierkörper bezeichnet. Von den auftretenden Dicarbonsäuren wird angenommen, sie könnten eine gewisse Zeit abgelagert werden, was indessen nach Versuchen von EMMRICH und EMMRICH-GLASER (23) an Ratten nicht der Fall ist. Mit der zwangsläufigen Entstehung von Dicarbonsäuren aus den geradzahligen Fettsäuren der Körper- und Nahrungsfette betrachtet VERKADE die Bildung von C_4 -Dicarbonsäuren und damit den Anschluß an das Bernsteinsäure-Fumarsäure-System von SZENT-GYÖRGY als gegeben. Es würden auf diese Weise aus 100 g Stearinsäure 41,5, aus 100 g Laurinsäure 59 g Bernsteinsäure entstehen. Auch die Kohlenhydratbildung aus Fetten über Bernsteinsäure wird bejaht und ihr quantitativ große Bedeutung zugeschrieben, obgleich für die Glykogenbildung aus Fetten keine Beweise vorliegen und auch von VERKADE nicht erbracht werden. Ein experimenteller Befund über das Verhalten des *Triundecylenins* führte zur Annahme, Dicarbonsäurebildung und anschließende bilaterale β -Oxydation spielten auch beim Abbau *ungesättigter* Fettsäuren eine wichtige, wahrscheinlich dominierende Rolle. Nach Genuß von 15 bzw. 25 g Triundecylenin isolierten VERKADE und VAN DER LEE (311) aus dem Harn der Versuchspersonen 20 bzw. 10 mg rohe Sebacinsäure und halten für bewiesen, der Abbau der Undecylensäure setze an der Doppelbindung ein:



Für die *Ölsäure* konnte ein solcher Abbau nicht gezeigt werden. 150 g Olivenöl, zusammen mit einer kohlenhydratreichen Nahrung innerhalb 10 Stunden aufgenommen, führten bei zwei Versuchspersonen nicht zu Diacidurie. Auch das an *Erucasäure* $\text{CH}_3 \cdot (\text{CH}_2)_7 \cdot \text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{11} \cdot \text{COOH}$ reiche Rüböl, in Mengen von 110 g gegessen, ergab im Harn keine Dicarbonsäuren.

Es muß hervorgehoben werden, daß der ω -oxydative Abbau nur für die *Capryl-*, *Nonyl*, *Caprin-* und *Undecylsäure* bewiesen ist. Bei diesen Säuren handelt es sich um Verbindungen, die in den üblichen Nahrungsmitteln und Depotfetten von Mensch und Tier nicht oder quantitativ nur in untergeordnetem Maß vorkommen. Lediglich Kokosnußfett und -öl enthalten etwa 8—9% Capryl- und 5—7% Caprinsäure. Zudem werden Dicarbonsäuren im Harn erst dann angetroffen, wenn ein Überangebot an diacidogenen Fettsäuren vorliegt, der Organismus gewissermaßen damit überschwemmt wird. Fette, welche die genannten Komponenten nicht enthalten, führen auch bei eigentlichen Belastungen nicht zu Diacidurie. Kokosnußfett wirkt nicht oder nur bei Überangebot diacidogen. Die Theorie VERKADES der Fettverbrennung durch ω - und anschließende bilaterale β -Oxydation als wichtigsten Weg des Fettabbaus im Tierkörper ist daher *erst zu beweisen*. Seine Behauptung „It is at present *practically generally accepted* that the degradation of normal saturated fatty acids in vivo can take place by ω -oxidation and subsequent bilateral β -oxidation of the dicarboxylic acid produced“ (312) können wir nicht zustimmen. Die interessanten Befunde über das Verhalten einzelner, bestimmter Fettsäuren berechtigen nicht zu einer Verallgemeinerung.

Höhere Dicarbonsäuren, z. B. *Tetradecan-*(C_{14})- und *Hexadecan-*(C_{16})-*dicarbonsäure* erscheinen nach Verfütterung nicht mehr im Harn, welcher bei Versuchen an Hunden geringe Mengen *Sebacin-*, *Kork-* und *Adipin-säure* enthält (23). Da die Resorption gesichert scheint und eine Speicherung entgegen den Ansichten VERKADES nicht eintritt, ist die Annahme der völligen Verbrennung dieser Säuren gerechtfertigt. VERKADE will in einem Teil der *endogenen Oxalsäure* das Endprodukt ω -oxydativ gebildeter und bilateral β -oxydierter Dicarbonsäuren erblicken, obwohl FLASCHENTRÄGER und MÜLLER (313) zeigten, daß Fettgenuß den Oxalsäuregehalt von Blut und Harn nicht zu beeinflussen vermag. Die Tatsache, daß *Adipin-*, *Kork-* und *Sebacinsäure* nach Verabreichung an Menschen und Hunde auch bei sehr geringer Dosierung zu einem großen Teil im Harn wieder ausgeschieden werden, ist nach VERKADE kein Argument gegen seine Theorie. Er setzt voraus, gefütterte und intermediär entstehende Dicarbonsäuren würden sich völlig verschieden verhalten. Letztere könnte der Tierkörper als sich bildende Komponenten einer Reaktionskette ohne weiteres verbrennen.

Eine kritische Betrachtung des ganzen Problems ergibt also, 1. daß die Methyloxydation der wichtigsten Nahrungsfettsäuren mit 16 und 18 C-Atomen nicht bewiesen ist und von VERKADE lediglich auf Grund von Analogieschlüssen, basierend auf dem Verhalten einiger weniger Fettsäuren bestimmter C-Zahl, behauptet wird, 2. selbst für diese letzteren Verbindungen in ihrer quantitativen Bedeutung völlig ungeklärt ist und 3. auch der Abbau der entstehenden Dicarbonsäuren noch nicht geklärt ist.

BERNHARD (314) verabreichte an Hunde in getrennten Versuchen *Deuterio-dicarbonensäuren* mit 6, 8 und 10 C-Atomen bei gleichzeitigem Fettangebot. Die in den üblichen Mengen im Harn ausgeschiedene *Adipin*-, *Kork*- bzw. *Sebacinsäure* zeigte denselben Deuteriumgehalt wie vor der Fütterung. Ein Zusammentreffen der signierten Moleküle mit intermediär durch gleichzeitige Fettverbrennung gebildeter *Adipin*-, *Kork*- oder *Sebacinsäure* hätte zu einer Verdünnung des Isotopengehalts geführt und damit die ω -Oxydation natürlicher Fettsäuren bewiesen. Die Befunde wurden daher so interpretiert, daß mit Hilfe des schweren Wasserstoffs der Nachweis gelang, die normale Fettsäureverbrennung verlaufe praktisch nicht über Dicarbonsäuren, d. h. die wichtigsten Komponenten der Nahrungsfette, die Säuren mit 16 und 18 C-Atomen, würden nicht ω -oxydiert. Nach gemeinsamen Gaben von *Tetradecan*- oder *Decan-dicarbonensäure* und *Deuterio-Korksäure* erfährt letztere eine gewisse Verdünnung ihres D-Gehalts. Hier hat eine Vereinigung im Tierkörper entstandener und verfütterter Dicarbonsäuren stattgefunden.

Da Dicarbonsäuren *mittlerer* Kettenlänge schwer angreifbar sind, muß bei den *höheren* und leicht verbrennbaren Homologen mit der Möglichkeit eines die mittleren Glieder größtenteils umgehenden Abbauweges gerechnet werden. Seit sich jedoch die Permeabilität der *Hefezellen* für ionisierte Verbindungen als abhängig von ihrer elektrostatischen Ladung ergeben hat (315), liegt es näher, das verschiedene Verhalten höherer und niedrigerer Dicarbonsäuren solchen Effekten zuzuschreiben (Zunahme der Acidität von den höheren zu den niederen Säuren). Es wäre daher denkbar, daß *Sebacin*-, *Kork*- und *Adipinsäure* nicht mehr oder nur noch teilweise an den Ort der Verbrennung gelangen und daher unverändert zur Ausscheidung kommen. Schließlich muß auch das in einigen Fällen festgestellte unterschiedliche Verhalten intermediär gebildeter und dem Organismus direkt verabreichter Verbindungen bei der Beurteilung dieser Fragen berücksichtigt werden. Intermediär entstehende Dicarbonsäuren treten vielleicht nicht frei, sondern an einen Molekülrest R gebunden, also „aktiviert“, auf.

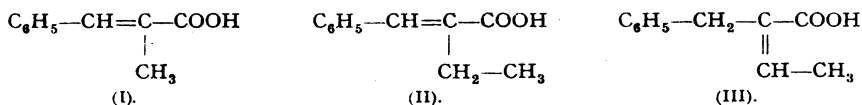
Solange über diese Verhältnisse nicht mehr Klarheit herrscht, kann man endgültige Schlußfolgerungen aus den erwähnten Versuchen BERNHARDS vielleicht als verfrüht bezeichnen. Falls sich jedoch zeigt, daß

Dicarbonsäuren ausschließlich stufenweise β -oxydativ über die niedrigeren „freien“ Homologen verbrennen und die Permeabilität auch für die intermediär entstehenden Abbauprodukte hinreicht, um eine genügende Vermischung mit entsprechenden verfütterten Molekülen zu gewährleisten, ist das Ergebnis der D-Versuche eine eindeutige Widerlegung der Theorie VERKADES.

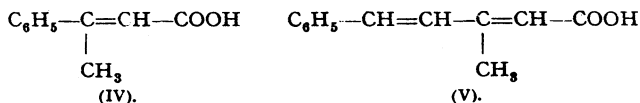
2. Abbau verzweigter Fettsäureketten (Monocarbonsäuren).

Zahlreiche experimentelle Befunde, zumeist Ergebnisse systematischer Untersuchungen, vermitteln ein Bild über die möglichen *Hemmungen* des oxydativen Abbaus durch Seitenketten (BAER und BLUM, EMBDEN, FLASCHENTRÄGER). Sperrungen des von der COOH-Gruppe aus einsetzenden Abbaus können, wie Beobachtungen der letzten Jahre ergaben, zur Bildung einer zweiten Carboxylgruppe führen, Vorgänge, die wir als Methyloxydationen eingehend erörtert haben (vgl. S. 217). Auch wurde auf verschiedene Beispiele β -oxydativen Abbaus nach vorangegangener Methyloxydation bereits hingewiesen.

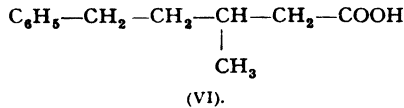
Ausgehend von der Frage, ob die auffallend schwere Verbrennlichkeit der Farbstoffe der *Carotinreihe* durch die chemisch-konstitutive Eigenart dieser Verbindungen bedingt sei, unternahmen R. KUHN und LIVADA (196) eine Reihe von Modellversuchen in der Absicht, die Beeinflussung der Oxydation durch Seitenketten kennenzulernen. Es zeigt sich, daß bereits *Methyl-* oder *Äthyl-*Substituenten in vielen Fällen den β -oxydativen Abbau im Tierkörper hemmen. Während α -*Methylzimtsäure* (I), wie schon KAY und RAPER zeigten, von Hunden noch zu Benzoesäure abgebaut wird, erscheinen α -*Äthylzimtsäure* (II) und α -*Benzylcrotonsäure* (III) nach



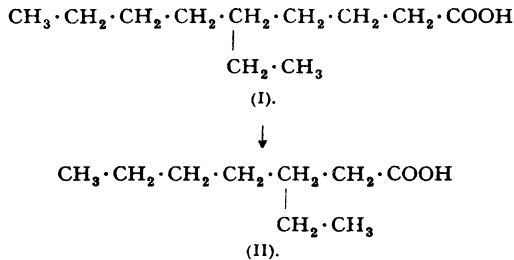
Injektion an Kaninchen oder Hunde zu 30 bzw. 50% unverändert im Harn. Hippursäure bildete sich nicht. Der Lage der Doppelbindung kommt offenbar nur geringe Bedeutung zu, ausschlaggebend ist die Struktur des Kohlenstoffgerüsts selbst. β -*Methylzimtsäure* (IV) vermögen Hunde und Kaninchen nur schwer anzugreifen, erstere scheiden sie in der Hauptsache mit Glykokoll gepaart, Kaninchen zu 30% in freiem Zustande wieder aus. Sehr ähnlich verhält sich β -*Methyldihydrozimtsäure* (β -Methyl- β -phenyl-propionsäure) im Stoffwechsel des Hundes.



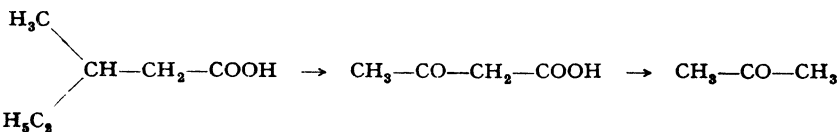
Auch bei der β -*Styrylcrotonsäure* (V) verhindert die β -ständige Methylgruppe den Abbau zu Benzoe- bzw. Hippursäure. Das gleiche gilt für die β -*Methyl- δ -phenylvaleriansäure* (VI). Bei den höheren Homologen



vermögen Methylgruppen den Abbau nicht mehr wesentlich zu beeinflussen. α -, β - und δ -*Methyldodecansäure* an Hunde (als Triglyceride) verfüttert führen nicht oder jedenfalls nur noch in einem geringen Maß zur Ausscheidung saurer Produkte in den Harn (193). β -*Methylstearinsäure* gab gleichfalls keine faßbaren Abbauprodukte, sondern verbrannte weitgehend (179). Das Triglycerid der δ -*Äthyl-nonansäure* (I) wurde an Hunde verfüttert β -oxydativ in β -*Äthyl-heptansäure* (II) umgewandelt (12):

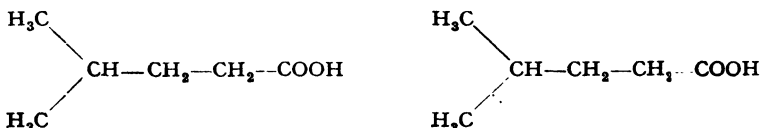


Über den Abbau aliphatischer Fettsäuren mit verzweigter C-Kette durch überlebende *Gewebschnitte* liegen Untersuchungen von LANG und ADICKES vor (316). *Isobuttersäure* lieferte kein Aceton, auch α -*Methylbuttersäure* und α -*Methylhexansäure* kaum. Die α -ständige Methylgruppe scheint den Abbau der beiden letzteren Säuren wesentlich zu hemmen, im Gegensatz zu Befunden anderer Autoren (BAER und BLUM, KAY und RAPER, KUHN und LIVADA). Hingegen lieferte β -*Methylbuttersäure* (Isovaleriansäure) in Übereinstimmung mit BAER und BLUM sowie EMBDEN reichliche Acetonmengen. β -*Äthylbuttersäure* führte im Gegensatz zu früheren Angaben LANGS (317) zu Aceton, dessen Entstehung nach BAER und BLUM durch Entalkylierung über β -Oxybutter- und Acetessigsäure erklärt wird:

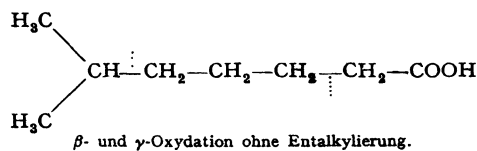
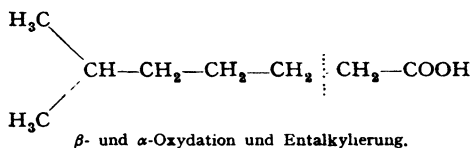
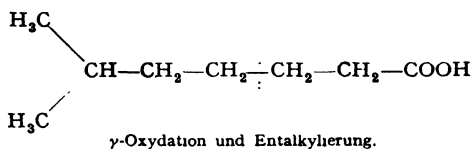


Die Beobachtung, daß γ -*Methylvaleriansäure* (Isocaprinsäure) Aceton

bildet, wird durch γ -Oxydation oder α -Oxydation und Entalkylierung gedeutet:



Bei der δ -Methylcapronsäure läßt sich die Acetonbildung durch β -Oxydation und Entalkylierung erklären. Das Auftreten von Aceton aus ε -Methylheptansäure wird in Analogie zum Verhalten der γ -Methylvaleriansäure erklärt, andererseits auch aufeinanderfolgende β - und γ -Oxydation ohne Entalkylierung für möglich gehalten:



Der Befund, daß auch ζ -Methylcaprylsäure Aceton liefert, scheint den Autoren durch aufeinanderfolgende β -Oxydation und Entalkylierung ohne weiteres verständlich.

Die Acetonbildungen aus den untersuchten Säuren wurden nur durch Schnitte von *Rattenleber*, nicht aber durch solche von Niere, Milz und Lunge erhalten. Dem α - und γ -oxydativen Abbau messen die Verfasser keine allgemeine Bedeutung zu und vermuten ihn nur bei unphysiologischen Substraten in Erscheinung tretend. Indessen wird die Annahme einer Entalkylierung als befriedigende Deutung des Abbaus in β -Stellung methylierter und äthylierter und γ -, δ -, ε - und ζ -methylierter Säuren betrachtet.

Neuerdings untersuchte nun auch WICK (318) die ketogene Wirkung verzweigter Fettsäureketten. Danach bilden α -substituierte Methyl- oder Äthylbuttersäuren oder α -Methyl- oder α -Äthylvaleriansäuren an Kanin-

chen injiziert keine Ketonkörper. Damit werden die Beobachtungen LANGS hinsichtlich der Auswirkung α -ständiger Gruppen bestätigt. Unter analogen Versuchsbedingungen führen β -Methylbutter- und β -Methylvaleriansäure, ferner γ -Methylvaleriansäure zu Acetonkörpern. Nach WICK kommt indessen Entalkylierung und anschließende β -Oxydation für den Abbau dieser Verbindungen nicht in Frage. Vielmehr wird angenommen, die Acetonkörper entstünden aus den β -substituierten Säuren durch paarweise Kondensation des β -oxydativ abgesprengten C_2 -Bruchstückes.

3. Abbau von Dicarbonsäuren.

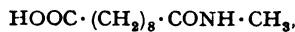
a) Allgemeines.

Während der Tierkörper die aliphatischen Monocarbonsäuren unabhängig von der C-Zahl verbrennt, wird das Stoffwechselverhalten aliphatischer Dicarbonsäuren in weitgehendem Maß durch die Länge der C-Kette bestimmt.

Die besondere biologische Bedeutung gewisser niedrigerer Dicarbonsäuren wird im vierten Abschnitt dieses Berichtes eingehend geschildert. Der Abbau solcher Verbindungen durch spezifische Enzyme, z. B. der Bernsteinsäure durch die Succinodehydrogenase, ist offenbar für die meisten Gewebe eine vertraute Angelegenheit.

Bei einer Kettenlänge von 6—10 C-Atomen werden aliphatische Dicarbonsäuren nur schwer verbrannt, dann aber mit zunehmender C-Zahl leichter abgebaut. Die Ursache dieses Verhaltens ist nicht einwandfrei ersichtlich, obgleich plausible Erklärungen nicht fehlen. Vielleicht könnten *Permeabilitätsverhältnisse* verantwortlich gemacht werden, wobei erwähnt sei, daß für die Hefezelle solche Hinweise durch LYNEN (315) erbracht sind (vgl. auch S. 285). Untersuchungen über die Permeabilität der intakten Hefemembran für Bernsteinsäure und Malonsäure ergaben, daß die elektrische Ladung für die Diffusionsgeschwindigkeit eines Ions durch die Hefemembran von entscheidender Bedeutung ist.

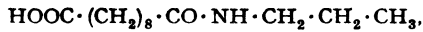
Durch Sperrung einer COOH-Gruppe der Dicarbonsäuren etwa durch Veresterung oder Amidbildung resultieren für den Tierkörper leichter verbrennliche Verbindungen. Schon nach Fütterung der *Monoester* der *Sebacin-*, *Kork-*, *Azelain-*, *Adipin-* und *Bernsteinsäure* an Hunde (319) konnte beobachtet werden, daß die freien Säuren zum Unterschied der veresterten zu 20—30% weniger abgebaut werden. Nur noch geringe Mengen Sebacin- und Korksäure treten auf, wenn die *Halbamide* gegeben werden (320). *Sebacinsäure-mono-N-methylamid*,



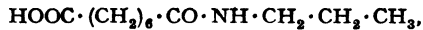
erschien nach subcutaner Injektion nicht im Harn und auch keine Sebacinsäure. Verfüttertes *Sebacinsäure-bis-N-methylamid*,



ließ sich im Harn gleichfalls nicht nachweisen, der nur sehr wenig Sebacin-
säure enthielt. *Sebacinsäure-mono-N-propylamid*,



verbrannte völlig, es wurde nur 1,0% Sebacinsäure aufgefunden. Das
Mono-N-propyl-amid der *Korksäure*,



wurde bis auf einige Milligramme verbrannt, an Korksäure konnten 0,7%
isoliert werden. Der Abbau von der freien Carboxylgruppe aus erfolgt
offenbar viel rascher als die Amidspaltung, die zu den Dicarbonsäuren
führt.

b) *Abbau unverzweigter Dicarbonsäuren.*

Beim Abbau von *Fumar-*, *Bernstein-* und *Oxalessigsäure* durch auf
Agar-Agar gezüchtete Kulturen von *Bact. Coli* entsprach der Sauerstoff-
verbrauch der zur völligen Oxydation notwendigen Menge (321).

Bei der Oxydation aliphatischer Dicarbonsäuren durch *Leberschnitte*
von normalen und hungernden Ratten beobachtete EDSON (234) im all-
gemeinen eine gegenüber der Norm erhöhte Sauerstoffaufnahme, ein
Effekt, der bei den Hungertieren stärker auftrat. Größte Steigerungen
verursachten *Kork-* und *Bernsteinsäure*, nur geringe *Adipin-*, *Pimelin-*,
Azelain- und *Sebacinsäure*. *Malon-*, *Oxy-malon-*, *Oxal-* und *Weinsäure*
reduzierten in Konzentrationen von 0,01 Mol die Atmung und wirkten
ketogen. *Thapsiasäure*-Zugaben beeinflussten die Atmung der Normal-
leber, nicht aber die Ketonkörperbildung. Gleichfalls durch überlebende
Leber- und Nierenschnitte nach dem manometrischen Verfahren von
BARCROFT-WARBURG prüfte MAZZA (322) die Oxydation der *Bernstein-*,
Glutar-, *Adipin-*, *Kork-*, *Azelain-*, *Sebacin-* und *Hexadecan-dicarbonsäure*.
Mit Ausnahme der Glutarsäure, welche nur durch Nierengewebe einen
Abbau erfuhr, wurden alle übrigen Verbindungen sowohl von Leber- als
von Nierenschnitten oxydiert. Der Sauerstoffverbrauch war bei der
Bernsteinsäure infolge ihrer leichten Verbrennlichkeit in fast allen Ge-
weben am größten. Für alle anderen Säuren betrug die Erhöhung der
Sauerstoffaufnahme gegenüber den Kontrollen bei den Leberschnitten
30—100%, bei den Nierenschnitten 15—50%.

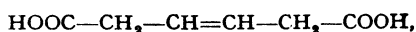
Das Schicksal aliphatischer Dicarbonsäuren im Tierkörper erlangte
erneute biologische Bedeutung im Hinblick auf die von VERKADE beob-
achtete ω -Oxydation der Fette. *Bernsteinsäure* verbrennt weitgehend
oder völlig. BALASSA (323) fand sie in Selbstversuchen nach Aufnahme
von 10 g im Harn nicht auf, ein alter Hund, der pro Tag 10 g erhielt,
schied nur 0,22% unverändert aus (324). Größere Dosen von 1,2 und 3 g
pro kg Körpergewicht und Tag an ein anderes Tier als Ammonsalz ge-
geben (314) verschwanden. Auch im Harn von Ratten, welche im Ver-
laufe von 2—4 Tagen 1 g aufnahmen, war die Verbindung nicht nach-

weisbar. Auf völlige Verbrennung deutete ferner der Befund hin, daß nach Gaben von *Deuterio-Bernsteinsäure* eine gewisse Anreicherung des Körperwassers an D auftrat. *Adipinsäure* wird vom Mensch bei 33 mg/kg/die zu 6,8%, von Hunden bei 150 mg/kg/die zu 18,0 und bei 750 mg/kg/die zu 63,6% ausgeschieden. *Korksäure* ist schwer verbrennlich; im Harn von Menschen fanden sich nach Aufnahmen von 33 bzw. 35 mg/kg/die, 87,8 und 68,8% (rein 60,1 und 44,9%) vor, bei einem Hund nach Gaben von 866 mg/kg/die 87,5% (rein 78,4%). *Sebacinsäure* ging beim Menschen (35 mg/kg/die) zu 34,6% (rein 24,8%) in den Harn über, bei Hunden (100 bzw. 1000 mg/kg/die) zu 30,4 bzw. 55% [rein 17,0 und 37,0% (324)]. Nach VERKADE (325) scheiden Hunde von der *Adipinsäure* (pro kg/die 320 mg) etwa 58%, von der *Korksäure* (333 mg/kg/die) etwa 45%, von der *Sebacinsäure* (340 und 315 mg/kg/die) 33 bzw. 28% unverändert aus.

Mit zunehmender Kettenlänge werden die Dicarbonsäuren, wie bereits erwähnt, besser verbrennlich. Die *Undecandisäure* (C₁₁) erscheint bei Gaben von 346 mg/kg/die bzw. 326 mg zu 17 und 7% im Harn; die *Hexadecandisäure* (C₁₆) (360 bzw. 334 mg/kg/die) wird nicht mehr ausgeschieden. EMMRICH und EMMRICH-GLASER (23) fanden in Versuchen an Hunden von der *Sebacinsäure* (460 mg/kg/die) 44,54% und von der *Decan-dicarbonsäure* (C₁₂) (480 mg/kg/die) 6,51% unverändert im Harn. *Tetradecan-* (C₁₄) und *Hexadecan-dicarbonsäure* (C₁₈) (550 mg pro Tag und kg) waren nicht mehr nachweisbar. Auch in Selbstversuchen war dies bei Gaben von 125—146 mg pro kg und Tag der Fall, während die *Decan-dicarbonsäure* (74 mg/kg/die) noch zu 7,13% aufgefunden wurde.

Die ungeradzahlige *Azelainsäure* (C₉) wird auf Grund zahlreicher Versuche (326) von Hunden im Mittel zu 60% unverändert, die *Brassylsäure* (C₁₃) (352 und 326 mg/kg/die) nur noch in einem sehr geringfügigen Betrag ausgeschieden (325).

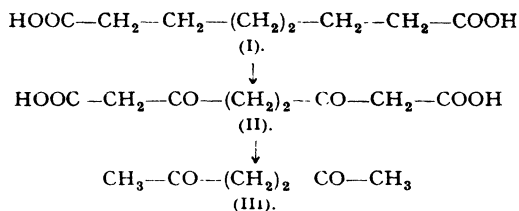
Von den ungesättigten aliphatischen Dicarbonsäuren wurde die *Muconsäure* auf ihr Verhalten im Tierkörper mehrfach geprüft. Die trans-trans-Form konnte nach Injektion von 890 mg pro Tier an Kaninchen im Mittel (6 Versuche) zu 56% im Harn wieder aufgefunden werden, die cis-cis-Säure erschien nach Gaben von 800 mg zu 47,5 und 45,3% unverändert (160). Andererseits wurden intraperitoneale Gaben von 37, 83 und 124 mg trans-trans-Säure pro Kilogramm Körpergewicht und Tag (total 90, 200 und 300 mg) nicht mehr aufgefunden (161). Die in vitro leicht in die α , β -ungesättigte Säure übergehende β , γ -*Dihydro-muconsäure*,



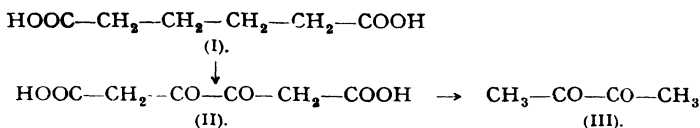
verläßt den Körper des Kaninchens völlig unangegriffen (257). In diesem Zusammenhang sei auch auf das von KUHN und Mitarbeitern erforschte Verhalten der Polycarbonsäuren hingewiesen (vgl. S. 220).

Für zahlreiche Dicarbonsäuren ist ein β -oxydativer Abbau bewiesen. Nach Fütterung von total 100 g *Sebacinsäure* an einen Hund wurden aus dem Harn analysenrein erhalten: 37% Ausgareismaterial, 7% *Korksäure* und 2,42% *Adipinsäure*; das gleiche Tier schied nach insgesamt 25 g *Sebacinsäure* 17% wieder aus, neben 5,5% *Kork-* und 4,0% *Adipinsäure* (327). Nach *Korksäuregaben* (30 g) an einen Hund wurden neben 78,4% unveränderter Säure 1,6% *Adipinsäure* angetroffen, bei Menschen nach 10 g *Sebacinsäure* (24,8% unverändert) 0,44% *Adipinsäure* (324). EMMRICH und EMMRICH-GLASER (23) fanden bei Hunden nach Füttern von *Sebacinsäure* 1,16% *Kork-* und 1,66% *Adipinsäure*, nach Gaben von *Decan-dicarbonsäure* 3,24% *Sebacin-*, 2,15% *Kork-* und 5,33% *Adipinsäure*, aus *Tetradecan-dicarbonsäure* 0,65% *Sebacin-*, 0,98% *Kork-* und 1,27% *Adipinsäure*, während *Hexadecan-dicarbonsäure* in zwei Versuchen 0,03 und 0,01% *Sebacin-*, 0,09 und 0,13% *Kork-* und 0,05 und 0,08% *Adipinsäure* lieferte. Bei ihren Selbstversuchen erhielten diese Autoren nur nach *Decandicarbonsäuregaben* 0,4% *Adipinsäure*, im übrigen aber keine Abbauprodukte. Die pro Kilogramm und Tag aufgenommenen Mengen betragen allerdings nur etwa ein Viertel derjenigen, welche den Hunden zugeführt wurden.

Die *bilaterale* β -Oxydation der Dicarbonsäuren hält ARTOM (328) für *gleichzeitig* verlaufend möglich, womit eine spontane Verkürzung der Kette um 4 C-Atome einträte. Zur Stützung dieser Hypothese wird die Bildung von *Acetylaceton* (III) bei der Oxydation der *Korksäure* (I) mit Wasserstoffsperoxyd in Gegenwart von Kupfersulfat (329) angeführt. Acetylaceton könnte durch Decarboxylierung von β,β' -*Diketokorksäure* (II) entstehen:



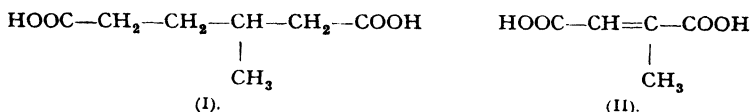
Ferner ist nach MAZZA (322) auf Grund positiver Pyrrolreaktion die Gegenwart von γ -Diketonen unter den Oxydationsprodukten der *Korksäure* durch überlebende Leber- und Nierenschnitte sehr wahrscheinlich. Bei der Einwirkung von Nierenschnitten auf *Adipinsäure* (I) gelang einwandfrei der Nachweis kleiner Mengen *Diacetyl* (III), das sehr wohl aus der β,β' -*Diketo adipinsäure* (II) stammen könnte:



Leberschnitte waren in Gegenwart von Adipinsäure zur Diacetylbildung nicht fähig. MAZZA hält letztere in der Niere durch gleichzeitige beidseitige β -Oxydation von Dicarbonsäuren für eine Sekundärreaktion, welche immerhin die Herkunft des Diacetyls aus den Fettsäuren in Aussicht stellt.

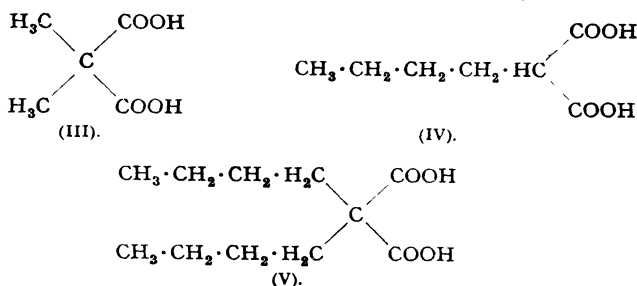
c) Abbau verzweigter Dicarbonsäuren.

Methylierte niedere Dicarbonsäuren kann der Organismus nicht oder nur schwer abbauen. Die Methylgruppe wirkt sich deutlich hemmend aus. EMMRICH (238) fütterte einem Hund pro Tag und Kilogramm Körpergewicht 490 mg *dl*- β -Methyladipinsäure (I) und fand 61,6% davon im Harn auf.



Methylmaleinsäure oder Citraconsäure (II), welche im Gegensatz zur Maleinsäure nicht toxisch wirkt, wurde nach Gaben von 620 mg/kg/die zu 28,4 und 44,3% unverändert im Harn nachgewiesen.

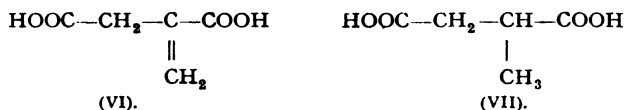
Alkylierte Malonsäuren mit kurzer C-Kette sind ebenfalls schwer verbrennlich. Di-methyl- (III), *n*-Butyl- (IV) und Di-*n*-butylmalonsäure (V)



(230, 570 und 230 mg/kg/die) wurden von Hunden zu 45,6, 55,2 und 55,5% (330), *n*-Amyl-, *iso*-Amyl-, *n*-Hexyl- und *n*-Heptyl-malonsäure (100, 64, 100, 100 mg) zu 52, 60, 45 und 45% (analysenrein, roh zu 79, 72, 57 und 52%) unverändert ausgeschieden (188). Bei den höheren Gliedern ändert sich das Verhalten, hier konnte für die *n*-Octyl-, *n*-Nonyl- und *n*-Decylmalonsäure ein methyloxydativer Abbau gezeigt werden (vgl. S. 217), während *n*-Undecyl-, *n*-Dodecyl-, *n*-Pentadecyl- und *n*-Cetylmalonsäure (98, 91, 104, 85 mg/kg/die) verschwanden, d. h. sehr wahrscheinlich völlig verbrennen.

Von den alkylsubstituierten Bernsteinsäuren wird die Methylbernsteinsäure oder Itaconsäure (VI) nach 630 mg/kg/die zu 38,95% (rein 24,35%) unverändert erhalten. Die *dl*- α -Methylbernsteinsäure oder *dl*-Brenzweinsäure (VII) (620 mg/kg/die) erscheint zu 43,8% unverändert neben einer

kleinen Menge Mesacon- oder Methylfumarsäure (vgl. S. 231). Letztere konnte dem Hunde verfüttert zu 64% unverändert zurückerhalten



werden (238). Aber auch die *Äthyl-, dl-n-Propyl-, dl-n-Butyl- und dl-n-Hexylbernsteinsäure* (600, 380, 395, 110 mg/kg/die) werden größtenteils nicht abgebaut. Sie wurden aus dem Harn durch EMMRICH und Mitarbeiter (330) zu 62,4, 76,1, 52,1, bzw. 75,4 und 14,8% erhalten. Wir fanden die β -Carboxy-pelargonsäure nach Gaben von 117 mg/kg/die zu 72,8% (roh 93%) im Harn des Hundes vor, die β -Carboxy-laurin- und die β -Carboxy-tridecylsäure erscheinen nicht mehr, von denselben konnten Abbauprodukte gefaßt werden (vgl. S. 219), während die β -Carboxy-pentadecylsäure (129 mg/kg/die) wahrscheinlich besser verbrennt (192).

Die *d,l- α -Methylglutarsäure* wurde nach Fütterung von 570 mg/kg/die zu 52,5% unverändert aufgefunden (330).

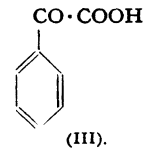
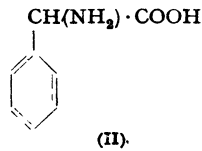
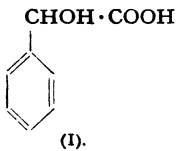
d) Abbau cyclischer Dicarbonsäuren.

Von cyclischen Dicarbonsäuren wurde festgestellt, daß die *ortho-, meta- und para-Cyclohexan-dicarbonsäure* größtenteils nicht verbrennen (167). Sie verhalten sich demnach analog gewissen aliphatischen Dicarbonsäuren. Aus den Harnen von Hunden, welche 93, 75 und 100 mg pro Kilogramm Körpergewicht und Tag per os erhielten, konnten die Säuren zu 69, 34 und 76% analysenrein isoliert werden.

4. Abbau der Seitenkette alicyclischer Verbindungen.

Von verschiedener Seite wurde erneut das Verhalten der *Mandelsäure* (I) im Tierkörper studiert. Die Tatsache, daß diese Verbindung nach Verabreichung größtenteils unverändert ausgeschieden wird, versucht QUICK (331) durch die Annahme zu erklären, es handle sich hier bereits um eine stärkere Säure, so daß eine Paarung, die nach seiner Ansicht auf der Überführung einer schwächeren in eine stärkere Säure beruht, unterbleibt. GARRY und SMITH (332) injizierten decerebrierten Katzen das Racemat der Mandelsäure als Na-Salz und fanden im Harn in geringem Maß *linksdrehende* Säure. Wenn Mandelsäure zu Benzoylameisensäure (III) abgebaut und im Sinne NEUBAUERS erneut in Mandelsäure zurückverwandelt würde, wäre anzunehmen, daß dabei die l-Form bevorzugt gebildet würde. Bei länger dauernden Versuchen wurden 80—90% der verabreichten Verbindung im Harn angetroffen. Nach Gaben der reinen d- oder l-Form waren die Drehungen der aus dem Harn erhaltenen Säuren etwas schwächer als die der injizierten.

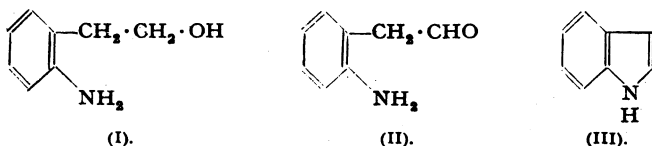
MONTENBRUCK (333) beobachtete in Versuchen an Menschen, daß von 7,5 g. aufgenommenener *d*-Mandelsäure (I) 65% unverändert, 7% als *l*-Phenyl-aminoessigsäure (II) und 14,2% als Benzoylameisensäure (III), der Rest wahrscheinlich als Phenol ausgeschieden wurde. Die *l*-Form in gleichen Mengen aufgenommen erschien zu 73% als *l*-Mandelsäure, zu 7,3% als Benzoylameisensäure und zum restlichen Anteil wahrscheinlich wieder als Phenol.



Das Racemat bildet 13% Benzoylameisensäure. Die Untersuchungen erfolgten im Hinblick auf den Abbau der α -Aminosäuren, deren Desaminierung statt oxydativ auf hydrolytischem Weg erfolgen soll.

Die Seitenkette des *Tryptophans* wird durch *Bact. coli* abgebaut. WOODS (334) beobachtete bei konstanter Belüftung von Suspensionen gewaschener *Coli*-Kulturen eine quantitative Umwandlung von *l*-*Tryptophan* zu *Indol* (III). *d*-*Tryptophan* wurde unter gleichen Bedingungen nur langsam abgebaut. Unter anaeroben Bedingungen entsteht β -*Indolpropionsäure*. Zu keiner *Indol*-bildung führen β -*Indolaldehyd*, β -*Indolcarbonsäure*, β -*Indolessig-*, *-propion-* und β -*Indolvaleriansäure* (335). Nach HAPOLD und HOYLE (336) gelingt die *Indol*-bildung auch in Gegenwart abgetöteter *Coli*-kulturen. Das bei pH 5,0—10 (optimal bei pH 8,5) wirksame Ferment wird als *Tryptophanase* bezeichnet. Aus *Indolpropion-*, *Indolessig-*, *Indolacryl-*, *Indolbrenztraubensäure*, *Indolcarbonsäure* und *Indol-3-aldehyd* entsteht mit *Tryptophanase* kein *Indol*. Auch in völliger Abwesenheit von *Tryptophan* gewachsene Kulturen von *Bact. coli* sind in der Lage, *Tryptophan* zu *Indol* zu oxydieren. Zugaben der Aminosäure zur Nährlösung vermögen indessen das *Indol*-bildungsvermögen der Bakterien und Bakterienpräparate stark zu steigern. Wachsende Kulturen, nicht aber Zellsuspensionen bilden *Indol* auch aus *Indolacrylsäure* (337). Auf Grund des Verhaltens einer Reihe von *Indol*-derivaten mit systematisch veränderter Seitenkette gelangten BAKER und HAPOLD (338) zur Ansicht, der Abbau zu *Indol* gelinge nur bei Anwesenheit einer freien COOH-Gruppe, einer unsubstituierten α -Aminogruppe und eines für den oxydativen Angriff zugänglichen β -C-Atoms. KREBS und Mitarbeiter (339) bewiesen *Indol*-bildung aus *o*-Amino- β -phenyläthanol (I) in Gegenwart von Sauerstoff mit *Bact. coli* und erhielten die besten Ausbeuten bei einer Konzentration von 6 mg pro Kubikzentimeter. Unter optimalen Bedingungen entstand aus dem Aminoalkohol 3mal mehr *Indol* als aus *Tryptophan*. Es wird angenommen, die

Reaktion verlaufe über den *o*-Amino-phenylacetaldehyd (II) als Intermediärprodukt, von dem bekannt ist, daß er in vitro in Indol (III) über-



geht. Der Abbau des Tryptophans zu Indol durch *Bact. coli* beginnt nach Ansicht dieser Autoren mit der Oxydation des Indolringes in Stellung 2 unter Bildung eines *Oxy-indol-Derivats*. Anschließend entstünde durch Ringöffnung ein *o*-Anilinderivat, das zu *o*-Amino-phenylacetaldehyd abgebaut würde, und durch Ringschluß spontan das Indol.

Beim Abbau des Tryptophans durch *Bact. subtilis* (vgl. auch S. 208) erhielten KOTAKE und OTANI (340) aus 2 g Tryptophan 0,036 g Anthranilsäure und 0,016 g Kynurensäure. Aber auch das Kynurenin gibt unter solchen Bedingungen Anthranilsäure und Kynurensäure. KOTAKE und NAKAYAMA (341) fanden ferner, daß Katzenleber und Katzenniere in der Lage sind, zugesetztes Kynurenin unter Bildung von Anthranilsäure zu spalten. Es wird dafür ein spezifisches Ferment, die Kynureninase mit einem p_H -Optimum von 7,3, angenommen. Katzen sollen nach Tryptophangaben einen Harn ausscheiden, der einen intensiv blauviolett fluoreszierenden Ätherextrakt liefert, woraus geschlossen wird, im Organismus der Katze finde der Tryptophanabbau zu Anthranilsäure statt.

IV. Oxydation der Intermediärprodukte der Hauptnährstoffe: Biologischer Abbau der Brenztraubensäure, Essigsäure und der β -Ketocarbonsäuren.

Der biologische Abbau der Fette, Kohlenhydrate und Eiweißkörper verläuft in drei ihrem Wesen nach prinzipiell verschiedenen Etappen. Anschließend an die die Dissimilationsprozesse einleitenden hydrolytischen Vorgänge — Verseifung der Fette, Spaltung der Polysaccharide und Eiweißkörper — findet der erste Angriff auf die C—C-Bindung statt. Er führt wahrscheinlich zunächst zu kurzgliedrigen C-Ketten. In den letzten Jahren haben die die Verbrennung abschließenden, von den C_2 -, C_3 - und C_4 -Körpern zu den Endprodukten der Dissimilation — dem Wasser und dem Kohlendioxyd — führenden Prozesse eine wesentliche Klärung erfahren. Neuere Untersuchungen legen die Möglichkeit nahe, daß der gesamte Endabbau über C_2 -Bruchstücke verläuft. Die Abbauwege der drei großen Körperklassen scheinen hier in einen gemeinsamen Strom zu münden. Der Brenztraubensäure (= BTS) kommt dadurch, daß sie zu-

gleich Ausgangsprodukt der für den Zellstoffwechsel unentbehrlichen C_4 -Dicarbonsäuren ist, eine besondere Bedeutung zu.

Der direkte, die Sprengung der C—C-Bindung bewirkende oxydative Angriff auf die C_2 -Körper scheint der Zelle schwerzufallen oder sogar unmöglich zu sein. Sie bedient sich zu deren Abbau — wie sich seit den ersten Untersuchungen von MARTIUS und KREBS immer deutlicher zeigt — eines Umweges, der über verschiedene α -Ketosäuren und C_4 -Dicarbonsäuren führt und seinen Anfang in der Kondensation des C_2 -Bruchstückes mit *Oxalessigsäure* (= OES) nimmt. Der resultierende C_6 -Körper durchläuft eine Reihe von Dehydrierungsreaktionen und geht unter zweifacher Decarboxylierung wieder in OES über. Resultat dieses „Kreisprozesses“ ist die vollständige Verbrennung des C_2 -Körpers. Das im Verlaufe der Oxydation der C_2 - und C_3 -Bruchstücke zu Kohlendioxyd und Wasser freiwerdende Kohlendioxyd stammt danach ausschließlich aus den Carboxylgruppen der α -Ketosäuren (Brenztraubensäure, Oxalessigsäure, Oxalbernsteinsäure, α -Ketoglutarsäure). Ob darüber hinaus im normalen biologischen Geschehen bei höheren Tieren noch eine andere Möglichkeit der C_1 -Körperbildung aus größeren Einheiten besteht, ist fraglich. Es scheint jedoch, daß auch für den Abbau einiger *l*-Aminosäuren die Decarboxylierung unter Bildung primärer Amine — wie sie für Bakterien als gesichert gilt — eine gewisse Rolle spielt. Jedenfalls kommt dem *Citronensäurecyclus* eine zentrale Stellung im Stoffwechsel zu.

Es schien angebracht, die Bedeutung der KREBSSchen Theorie an Hand der zahlreichen Versuche am *Tierorganismus*, an *Pilzen* und *Bakterien* über den Abbau der *BTS*, *Essigsäure* und *Acetessigsäure* zu prüfen und ihren Gültigkeitsbereich — soweit dies auf Grund des heutigen Wissens möglich ist — abzugrenzen. Von Interesse ist auch die Frage, ob den verschiedenen von *BTS*, *Essigsäure* und *Acetessigsäure* (β -Ketosäuren) zur *Citronensäure* führenden Reaktionswegen drei unterscheidbare Kondensationsmechanismen zugrunde liegen oder ob die *Citronensäuresynthese* erst an einem den drei Verbindungen gemeinsam zugänglichen C_2 -Körper ansetzt und somit in allen Fällen denselben Verlauf nimmt.

Im folgenden wurde nun versucht, die wichtigsten neueren Ergebnisse auf dem Gebiet des biologischen *BTS*-, *Essigsäure*- und *Acetessigsäure*-abbaus im Hinblick auf diese Zusammenhänge darzustellen.

In der Erwägung, analoge Vorgänge der Übersichtlichkeit halber gemeinsam zu behandeln, wurden die Versuche über den Abbau der *Essigsäure* durch Hefe und Schimmelpilze dem Abschnitt über die Oxydation der *Essigsäure* im *Tierorganismus* angegliedert und nicht im Zusammenhang mit dem *Bakterienstoffwechsel* besprochen.

Auf experimentelle Einzelheiten (Präparation der Gewebe, angewandte Substrat- und Gewebemengen, Zusammensetzung der Pufferlösung, Ver-

suchsdauer, Temperatur, Nachweis und Bestimmung der Umsetzungsprodukte usw.) konnte nicht eingegangen werden. Ohne die Beschreibung genauer Versuchsbedingungen verlieren auch Angaben über die Ausbeuten ihren Sinn. Angeführt wurden diese daher nur in einigen vergleichenden Untersuchungen oder wo es für die Beweisführung unumgänglich war. Hingegen fanden die Versuchsergebnisse weitgehend bestimmende Faktoren, wie An- oder Abwesenheit von Sauerstoff, Zusatz von Malonsäure usw. selbstverständlich Erwähnung.

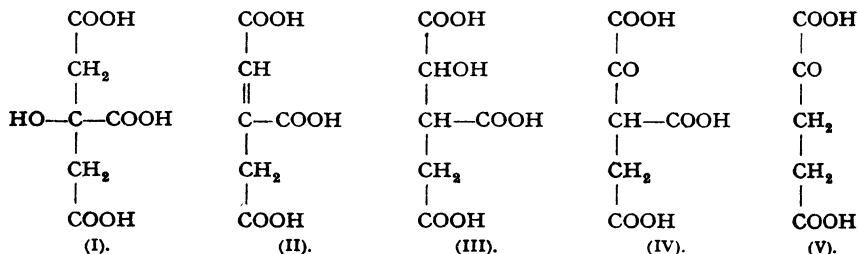
Auch auf spezielle Angaben über die Herkunft des Gewebematerials wurde im allgemeinen verzichtet. Soweit nichts anderes bemerkt, handelt es sich um Gewebe von Hunden, Meerschweinchen, Ratten oder Tauben. Prinzipielle Unterschiede in den besprochenen Stoffwechselfvorgängen bei diesen Organismen dürften, abgesehen von quantitativen Schwankungen, wohl nicht bestehen.

1. Der Abbau der Brenztraubensäure über den Citronensäurecyclus.

a) Bildung und Abbau der Citronensäure nach KNOOP und MARTIUS.

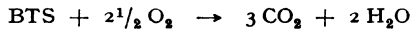
1936 gelang KNOOP und MARTIUS (342) die *in vitro*-Synthese der Citronensäure (I) aus BTS und OES. Der glatte Verlauf dieser Reaktion ließ vermuten, die Bildung der Citronensäure *in vivo* nehme den gleichen oder einen ähnlichen Verlauf. Diese Vorstellung wurde inzwischen durch zahlreiche Untersuchungen gestützt. Nach HALLMAN (343) liefert unter einer großen Zahl daraufhin untersuchter Substanzen die Kombination OES-BTS bei Bebrütung mit den verschiedensten Geweben weitaus die höchsten Ausbeuten an Citronensäure.

WAGNER-JAUREGG und RAUEN (344) fanden für die *Isocitronensäure* (III) im Vergleich zur Citronensäure einen viel rascheren Abbau durch Gurkensamenextrakte, eine Beobachtung, die sofort verständlich wird, wenn man bedenkt, daß die Oxydation eines tertiären Alkohols — wie er in der Citronensäure vorliegt — zum entsprechenden Keton nicht ohne Sprengung der C-Kette möglich ist (MARTIUS, KNOOP). Da sich Isocitronensäure über *cis-Aconitsäure* (II) mit Citronensäure in einem durch das Enzym *Aconitase* gesteuerten Gleichgewicht befindet, lag die Annahme nahe, Citronensäure werde über Isocitronensäure abgebaut. Iso-



citronensäure — ein sekundärer Alkohol — kann nun vom Organismus zur *Oxalbernsteinsäure* (IV) dehydriert werden, ein Vorgang, der völlig analog der Oxydation der Äpfelsäure zu OES oder der Milchsäure zu BTS ist. Oxalbernsteinsäure — zugleich eine α - und β -Ketosäure — geht leicht unter Abspaltung der in β -Stellung zum Carbonyl befindlichen Carboxylgruppe in α -Ketoglutar säure (V) über, die als α -Ketosäure durch Dehydrierung dem Abbau zur nächst niedrigeren Carbonsäure (Bernsteinsäure) unterliegt. Fumarsäure, Äpfelsäure, OES und BTS bilden sich aus der Bernsteinsäure auf bekannte Weise.

Dieser von KNOOP und MARTIUS (345) vorgeschlagene Reaktionsweg konnte weitgehend gesichert werden, indem außer Bernsteinsäure und BTS auch α -Ketoglutar säure unter den Abbauprodukten der Citronensäure nachweisbar war. Wie die Autoren schon damals betonten, führt dieser Abbau somit wieder zu den Ausgangsprodukten der Citronensäurebildung (OES und BTS). Das Endresultat des Kreisprozesses ist die Oxydation eines Moleküls BTS zu Wasser und Kohlendioxyd:



Bemerkenswert ist, daß dieser Reaktionsverlauf die drei wichtigen und für den Aufbau verschiedener Aminosäuren notwendigen α -Ketosäuren: α -Ketoglutar säure, Oxalbernsteinsäure, OES und BTS liefert.

b) Der Citronensäurecyclus.

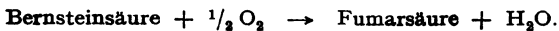
Dieser Kreisprozeß (*Citronensäurecyclus*) konnte von KREBS und Mitarbeitern (346) in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Für die Beweisführung war vor allem die *Malonathemmung* der BTS-Oxydation auf der Stufe der Bernsteinsäure von Bedeutung (vgl. Schema 3).

Die Giftwirkung der Malonsäure auf die Zellatmung klärten erstmals QUASTEL und WOOLDRIDGE (347) an *B. coli*, später QUASTEL und WHEATLEY (348) auch in Untersuchungen anderer Bakterien und tierischer Gewebe auf. Sie beruht auf der Verdrängung der Bernsteinsäure von der wirksamen Oberfläche der Bernsteinsäuredehydrase durch Malonsäure (konkurrierende Hemmung). Die Sperrung des Überganges Bernsteinsäure \rightleftharpoons Fumarsäure durch Malonsäure wurde dann in Versuchen mit schwerem Kohlenstoff eindeutig bewiesen (vgl. S. 274).

KREBS und Mitarbeiter zeigten nun, daß *Fumarsäure* den Abbau der BTS auch im malonatvergifteten Muskel katalysiert. In Anwesenheit von Malonsäure (0,025 Mol) findet folgende Reaktion statt:



In Abwesenheit von Malonsäure wird die Bernsteinsäure weiter oxydiert:



Da die Reduktion von Fumarsäure zu Bernsteinsäure infolge des Malonat-zusatzes nicht stattfinden konnte, muß gefolgert werden, die in Gleichung (I) beschriebene Bernsteinsäurebildung aus Fumarsäure und BTS

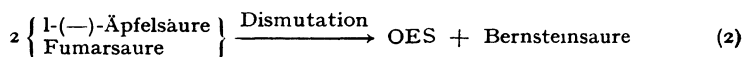
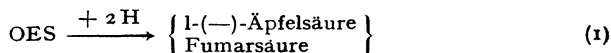
verlaufe über eine Reihe oxydativer Prozesse, wie sie durch die Theorie des Citronensäurecyclus gefordert werden. Eine weitere Stütze findet diese Annahme in der Tatsache, daß bei Anwendung eines Überschusses von BTS Reaktion (I) außer zu Bernsteinsäure auch zu Citronensäure (15%) und zu α -Ketoglutarensäure (50%) führt.

Des weiteren gab OES-Zusatz zu Taubenbrustmuskel, Schafherz und Meerschweinchenniere unter anaeroben Bedingungen Anlaß zur Bildung von Kohlendioxyd, Fumarsäure, Äpfelsäure, α -Ketoglutarensäure, Citronensäure, Bernsteinsäure und BTS. Die Quantitäten dieser Reaktionsprodukte entsprachen der verschwundenen Menge OES und standen in Übereinstimmung mit der Theorie des Citronensäurecyclus (349). Auf die speziellen Verhältnisse in den verschiedenen Organen wird weiter unten eingegangen.

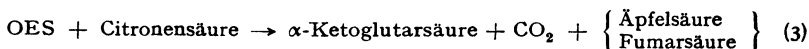
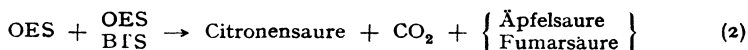
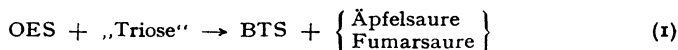
Bestätigt und ergänzt werden diese an einzelnen Geweben ermittelten Befunde durch Versuche an Tieren und Menschen. Nach Injektion von Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure oder OES erscheinen im Harn von Hunden, Kaninchen und Ratten Citronensäure und α -Ketoglutarensäure. Injektion von Malonsäure führt zur Ausscheidung von Bernsteinsäure neben kleinen Mengen Citronensäure und α -Ketoglutarensäure (350). SIMOLA und KRUSIUS (351) berichteten über stark erhöhte Ausscheidung von α -Ketoglutarensäure bei gleichzeitiger leichter Vermehrung der Milchsäure, Citronensäure und BTS im Menschenharn nach Einnahme von 50 g BTS als Na-Salz.

c) *Bedeutung des SZENT-GYÖRGYI-Systems für den Citronensäurecyclus.*

Nach KREBS nimmt das Teilsystem (1) des SZENT-GYÖRGYI-Cyclus

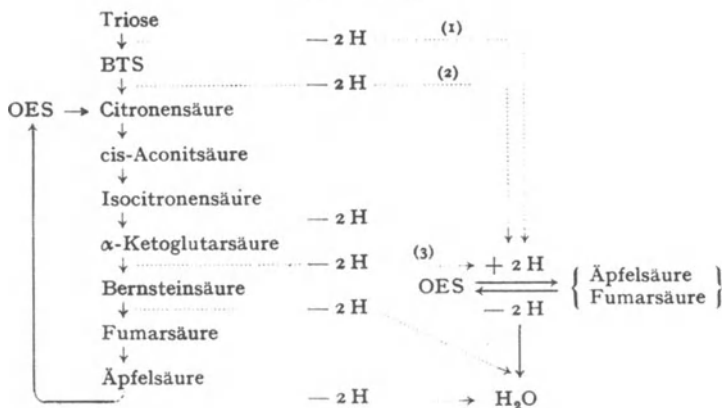


am Wasserstofftransport von mindestens drei der am Citronensäurecyclus mitwirkenden Reaktionen teil (vgl. indessen S. 286):



Der Übersichtlichkeit halber sei das von KREBS entworfene Schema 3 angeführt:

Schema 3.



Danach ist das SZENT-GYÖRGYI-System für den Transport von (mindestens) 6 der 12 im Verlaufe der vollständigen Oxydation der „Triose“ freiwerdenden Wasserstoffatome verantwortlich. Das Endresultat kann in die Gleichung:



gefaßt werden. Dabei steht Äpfelsäure für das System Fumarsäure \rightleftharpoons *l*-(—)-Äpfelsäure und CO_2 für das System $\text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$. Gleichung (4) konnte durch Versuche an Taubenbrustmuskel, Taubenleber und Meerschweinchenniere bestätigt werden.

Die vier Hauptreaktionen, auf denen die Theorie des Citronensäurecyclus basiert, sind somit:

1. Hemmung des Sauerstoff- und BTS-Verbrauches durch Malonsäure.
2. Die spezifische Wirkung der Fumarsäure, in Gegenwart von BTS und Malonsäure die ihr äquivalente Menge Bernsteinsäure zu bilden. Jedes Molekül Fumarsäure bringt ein Molekül BTS zum Verschwinden und bewirkt einen zusätzlichen Sauerstoffverbrauch von 2 O_2 [entsprechend Gleichung (1) S. 267].
3. Bildung von Citronensäure und α -Ketoglutarensäure.
4. Die atmungsunterhaltende Wirkung der in den Citronensäurecyclus eingeschalteten Verbindungen.

d) Abbau der Brenztraubensäure im Herzmuskel.

1939 zeigten HALLMAN und SIMOLA (352), daß Herzmuskel in Gegenwart von OES oder Fumarsäure aus BTS Citronensäure bildet, die über α -Ketoglutarensäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure und OES abgebaut wird. Versuche am Herzmuskel gestatten nun, weit besser als dies mit anderen Organen möglich ist, den Ablauf oxydativer Prozesse im

Gewebebrei mit denjenigen des intakten und physiologisch aktiven Gewebes zu vergleichen. SMYTH (353) kommt zum Ergebnis, daß der BTS-Verbrauch im Herzmuskelbrei von derselben Größenordnung ist, wie er von BRAUN-MENENDEZ und Mitarbeitern (354) am intakten Herzen gefunden wurde, und daß der in seinen Versuchen gemessene Sauerstoffkonsum annähernd dem Bedarf des mit maximaler Belastung arbeitenden Herzens entspricht (355).

BTS in Konzentrationen bis zu 0,02 Mol unterhält die Atmung; höhere Konzentrationen wirken hemmend auf den Sauerstoffverbrauch, resultieren in einer unvollständigen Verbrennung der zugesetzten BTS und bewirken die Anhäufung von Citronensäure und α -Ketoglutar säure, deren Menge durch Fumarsäurezusatz noch gesteigert werden kann. Dieselben BTS-Konzentrationen führen bemerkenswerterweise nach BRAUN-MENENDEZ und Mitarbeitern (354) beim arbeitenden Herzen zu Extrasystolen und anderen Unregelmäßigkeiten der Herz tätigkeit, eine Wirkung, die vielleicht mit der Säurenatur der BTS zusammenhängt.¹

Auch die übrigen am Citronensäurecyclus beteiligten Verbindungen — ausgenommen Citronensäure — bewirken nach Zusatz zum Gewebe eine Steigerung der Atmung. Citronensäure zeigt eine wechselnde und unbestimmte Wirkung (vgl. S. 304 u. 327). Ihr Abbau erfolgt anaerob nur in Gegenwart von OES (Wasserstoffacceptor).

Schließlich zeigen auch Fumarsäure und Malonsäure in Übereinstimmung mit der KREBSSchen Theorie den im vorangehenden beschriebenen Effekt.

e) Abbau der Brenztraubensäure in der Leber.

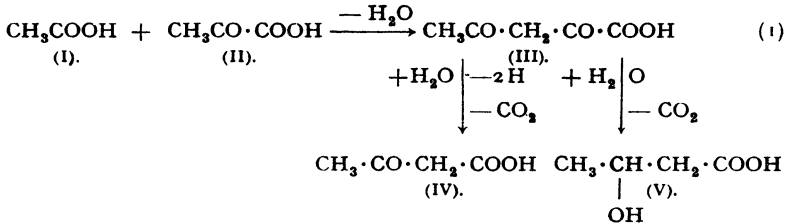
1. *Bildung von Acetessigsäure aus Brenztraubensäure.* Die Fähigkeit der Leber BTS in Acetessigsäure überzuführen ist schon längere Zeit bekannt und neuerdings bestätigt worden (357). Diskutiert wurden vor allem folgende Bildungsmöglichkeiten: 1. Kondensation zweier Moleküle Essigsäure (358); 2. Kondensation von Essigsäure mit Acetaldehyd (359), 3. Intermediäre Bildung von Para-BTS, $\text{CH}_3\text{C}(\text{OH})(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CO}\cdot\text{COOH}$ (360); 4. Kondensation von Essigsäure und BTS (361).

Der erste Reaktionsmechanismus ist nach KREBS (361) unwahrscheinlich, da Bebrütung von BTS oder eines Gemisches derselben mit Essigsäure durch Lebergewebe mehr Acetessigsäure liefert, als aus Essigsäure allein. Reiner Acetaldehyd soll überhaupt nicht ketogen wirken, womit auch die Hypothese FRIEDMANNs ausscheidet. Para-BTS wird vom Gewebe nicht in Acetessigsäure übergeführt und dürfte daher intermediär nicht entstehen.

Nach KREBS und JOHNSON (361) verläuft sowohl die Bildung der

¹ BTS besitzt die für eine Fettsäure hohe Dissoziationskonstante $k = 5,6 \cdot 10^{-8}$ (356).

Acetessigsäure (IV) als auch die der β -Oxybuttersäure (V) aus BTS (II) in der Leber höchstwahrscheinlich über *Acet-BTS* (III):



Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, daß *Acet-BTS* in Leber, Niere, Muskel und Testes (durch α -Oxydation) zu Acetessigsäure abgebaut wird. Die Ausbeute ist dabei größer als bei ihrer Bildung aus Essigsäure und etwa gleich groß wie bei der Entstehung aus *BTS*.

Neuere Untersuchungen von SWENDSEID und Mitarbeitern (308) mit Essigsäure, deren Carboxylgruppe schweren Kohlenstoff enthielt, stellen allerdings den von KREBS und JOHNSON vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus in Frage. SWENDSEID und Mitarbeiter verfütterten die signierte Essigsäure an Ratten und bestimmten den ¹³C-Gehalt der durch den Harn ausgeschiedenen Ketonkörper, die einerseits nach der Methode von VAN SLYKE durch Überführung in Aceton, andererseits als Butylalkoholextrakte isoliert wurden. Bilden sich die Acetonkörper über *Acet-BTS* (III) [Gleichung (1), oben], so kann nur das aus der Essigsäure stammende Carbonyl-Kohlenstoffatom schwer sein; der ¹³C-Gehalt des Acetons müßte somit mit dem der Acetessigsäure und β -Oxybuttersäure übereinstimmen. Tatsächlich war aber derjenige des Acetons bedeutend niedriger. Die Autoren stellen sich daher die Entstehung der Acetonkörper durch Kondensation zweier Moleküle Essigsäure vor.

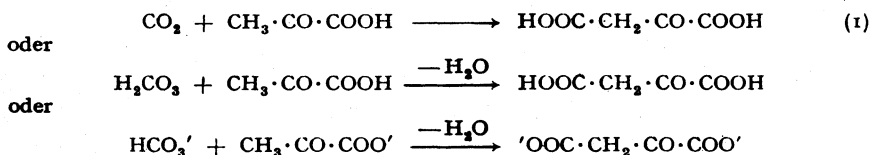
Auch die Bildung schwerer *BTS* aus der verfütterten Essigsäure — die an sich denkbar wäre¹ — könnte nicht das Auftreten doppelt schwerer Acetessigsäure erklären, da diese den zur Markierung dienenden Kohlenstoff nicht in der Carbonyl-, sondern in der Carboxylgruppe tragen würde, welche bei der Oxydation der *Acet-BTS* abgespalten wird.

Während es also kaum möglich ist, die Befunde SWENDSEIDS und Mitarbeiter auf Grund der Hypothese von KREBS und JOHNSON zu verstehen, lassen sich umgekehrt die Versuchsergebnisse dieser letzteren Autoren mit der Vorstellung der Acetessigsäurebildung durch Kondensation zweier Moleküle Essigsäure in Einklang bringen, wenn man annimmt, die aus *BTS* oxydativ gebildete Essigsäure befinde sich in einem reaktionsfähigeren Zustand als die zugesetzte Essigsäure.

¹ Die Kondensation schwerer Essigsäure mit OES muß nach dem von WOOD und Mitarbeitern (367) wahrscheinlich gemachten Reaktionsmechanismus quantitativ zu schwerer Bernsteinsäure und damit auch zu schwerer *BTS* führen (vgl. S. 297).

2. *Bildung von α -Ketoglutar säure und der C_4 -Dicarbonsäuren aus BTS in der Leber.* 1939 beobachteten KREBS und Mitarbeiter (362) die Fähigkeit der Leber, *BTS-Ammonium* in *Glutaminsäure* überzuführen. EVANS (363) erbrachte den Nachweis, daß Bebrütung von BTS durch Taubenleberbrei zu einer raschen Bildung von α -Ketoglutar säure und C_4 -Dicarbonsäuren führt.

Über den Reaktionsverlauf orientieren Arbeiten von KREBS und Mitarbeitern (364), RUBEN und KAMEN (365), EVANS und SLOTIN (366) und WOOD und Mitarbeitern (367). Nach KREBS und EGGLESTON (364) ist der erste Schritt der α -Ketoglutar säurebildung wahrscheinlich die Synthese von OES durch „Carboxylierung“ der BTS,



eine Reaktion, die schon von WOOD und Mitarbeitern (368) für den Stoffwechsel der *Propionsäurebakterien* wahrscheinlich gemacht werden konnte (vgl. S. 309). Damit wäre der Anschluß an den Citronensäurecyclus gegeben, über den die weiteren zur α -Ketoglutar säure und den C_4 -Dicarbonsäuren führenden Reaktionen verlaufen.

Gestützt wird dieser Reaktionsverlauf durch die Tatsache, daß in Anwesenheit von *Natriumhydrogencarbonat* und *Kohlendioxyd* der BTS-Verbrauch um 37—94% über demjenigen des Kontrollversuches (ohne diese Zusätze) liegt. Entsprechend hat die Bildung von α -Ketoglutar säure um 115—170%, von Citronensäure um 160—560% und die der Fumarsäure + Äpfelsäure um 125—400% zugenommen (KREBS und EGGLESTON).¹ SIMOLA und KRUSIUS (351) beobachteten eine geringe Zunahme der α -Ketoglutar säure- und Citronensäureausscheidung im Menschenharn nach Einnahme von 48 g Natriumhydrogencarbonat.

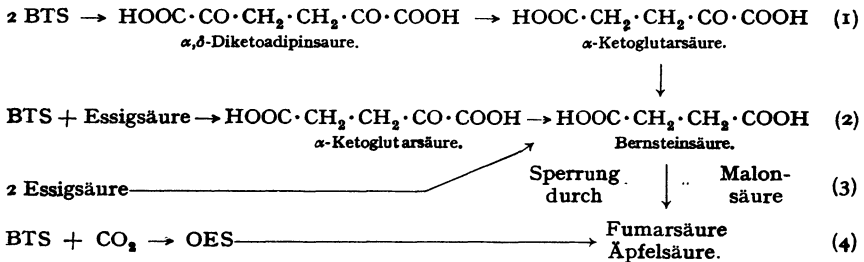
Unter anaeroben Bedingungen findet sowohl die Bildung von α -Ketoglutar säure aus Citronensäure, als auch der Abbau der α -Ketoglutar säure zu Fumar- und Äpfelsäure nur unter Mitwirkung der OES statt (vgl. Schema 3, S. 269). Da andererseits OES zu denselben Verbindungen führt, wie sie etwas langsamer auch aus BTS in Gegenwart von Kohlendioxyd und Hydrogencarbonat (auch anaerob) gebildet werden, folgt, daß die ganze Reaktionskette mit der Synthese der OES ihren Anfang nehmen muß. Eine zweite Erklärung ist nur unter der unwahrscheinlichen Annahme dreier verschiedener und voneinander unabhängiger von der BTS

¹ Diese und die folgenden Untersuchungen wurden meistens an Gewebsschnitten und Gewebeprei durchgeführt.

1. zu Citronensäure, 2. zu α -Ketoglutarsäure und 3. zu Fumar- und Äpfelsäure führender Reaktionen möglich.

Die Bildung der C_4 -Dicarbonsäuren durch Kondensation zweier Moleküle BTS (Schema 4) (1) (369) oder je eines Moleküls BTS und Essigsäure (2) (370) oder zweier Moleküle Essigsäure (3) (371) führt notwendig zuerst über Bernsteinsäure. Die Tatsache, daß Äpfelsäure und Fumarsäure in der Leber auch in Anwesenheit von Malonsäure aus BTS gebildet werden können, ist folglich mit diesen Theorien nicht erklärbar (367). Hingegen steht dieser Befund mit dem von KREBS angenommenen Reaktionsverlauf in Einklang: Fumar- und Äpfelsäure stellen die Reduktionsprodukte der aus BTS gebildeten OES dar (4).

Schema 4.



Berechnet man den Sauerstoffverbrauch unter der Voraussetzung, α -Ketoglutarsäure und die aus ihr entstehenden Verbindungen seien auf dem von TOENNIESSEN und BRINKMANN diskutierten Wege entstanden (1), so findet man bedeutend höhere Werte als die Versuche ergeben (364). Nach der KREBSSchen Hypothese ist jedoch kein Sauerstoff zur Bildung der Citronensäure, α -Ketoglutarsäure, Fumar- und Äpfelsäure nötig. Wenn trotzdem Sauerstoff — was tatsächlich der Fall ist — den BTS-Umsatz erhöht, so ist die Ursache in einer sekundären Wirkung zu suchen, und zwar dürfte in erster Linie die endotherm verlaufende Synthese der OES mit einem aerob verlaufenden Prozeß gekoppelt sein, der von der Sauerstoffkonzentration abhängig ist.

Der unmittelbare Nachweis der „Carboxylierung“ der BTS — die Kohlendioxydabnahme in Gegenwart der BTS — könnte allerdings nicht erbracht werden. Andere gleichzeitig in der Leber stattfindende Umsetzungen (Acetessigsäurebildung, Dismutation von BTS) gleichen diese Kohlendioxydverluste wieder aus. Derartige Decarboxylierungen sind schon anzunehmen, um die von EVANS (363) beobachtete Bildung von α -Ketoglutarsäure aus BTS in einem phosphatgepufferten Medium (in Abwesenheit von Kohlendioxyd und Hydrogencarbonat) zu erklären.

Andererseits stellt die Carboxylierung der BTS nicht den einzigen in der Leber stattfindenden Prozeß dar, in welchem aus Hydrogencarbonat stammendes Kohlendioxyd verbraucht wird. Schon 1932 fanden KREBS und HENSELEIT (372), daß die Bildungsgeschwindigkeit des Harnstoffs in der Leber mit zunehmender Konzentration des Hydrogencarbonat-CO₂-Puffers anwuchs. Die von den Autoren vorgeschlagene Erklärung, daß d-Carbamino-ornithin (Citrullin) die erste Stufe der Synthese des Harnstoffs darstellt, dessen Kohlenstoff ausschließlich aus dem Hydrogencarbonat stammt, konnte durch RITTENBERG und WAELSCH (373) und EVANS und SLOTIN (374) bestätigt werden.

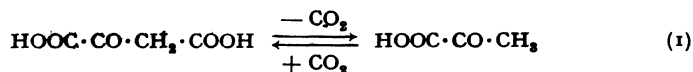
Hingegen konnte Reaktion 1, S. 272, durch Anwendung der *Kohlenstoffisotopen* weitgehend gesichert werden. RUBEN und KAMEN (365) gelang mit Hilfe radioaktiven Kohlenstoffs der Nachweis, daß der Rattenleber die Fähigkeit zukommt, Kohlendioxyd zu assimilieren, ein Vorgang, der durch Cyanwasserstoffsäure gehemmt wird. (Dieser Befund beleuchtet von neuem die zwischen Atmung und „Carboxylierung“ bestehende Kopplung.) EVANS und SLOTIN (366) zeigten in analogen Versuchen die Bildung stark radioaktiver α -Ketoglutarsäure (als 2,4-Dinitrophenylhydrazon isoliert) aus BTS im Leberbrei. Dadurch wurde auch die verschiedentlich in Betracht gezogene Möglichkeit der α -Ketoglutarsäurebildung durch Umaminierung zwischen der im Gewebe vorhandenen Glutaminsäure und BTS für diese Versuche ausgeschaltet. WOOD und Mitarbeiter (375) ergänzten diese Versuche, indem sie in der Leber gebildete schwere α -Ketoglutarsäure durch Permanganat zu Bernsteinsäure und Kohlendioxyd oxydierten und den Beweis erbrachten, daß der schwere Kohlenstoff nur in der der Carbonylgruppe benachbarten Carboxylgruppe fixiert ist (vgl. S. 297). Die Autoren zeigten ferner die Anwesenheit von schwerem Kohlenstoff in den Carboxylgruppen der Citronensäure und der C₄-Dicarbonsäuren (Äpfelsäure und Fumarsäure). Aerob in Gegenwart von Malonsäure gebildete Bernsteinsäure enthielt keinen oder nur wenig schweren Kohlenstoff und wurde somit über α -Ketoglutarsäure gebildet (vgl. S. 297). Unter anaeroben Bedingungen und ohne Zusatz von Malonsäure resultierte hingegen eine ¹³C-haltige Bernsteinsäure, die sich demnach über OES, Äpfelsäure und Fumarsäure gebildet hat (Schema 4, S. 273). Dies beweist nun eindeutig die Sperrung des Überganges Bernsteinsäure \rightleftharpoons Fumarsäure durch Malonsäure.

Gleichzeitig und unabhängig von diesen Forschern gelangten EVANS und SLOTIN (376) in an Taubenleberbrei durchgeführten Versuchen mit radioaktivem Kohlenstoff zu entsprechenden Resultaten. Diese Autoren untersuchten ferner unter gleichen experimentellen Bedingungen *Muskelgewebe* und zeigten, daß im Gegensatz zur Leber in diesem Gewebe gebildete α -Ketoglutarsäure nicht radioaktiv ist, eine Assimilierung von Kohlendioxyd im Muskel somit nicht stattfindet. Zugleich entkräften diese Versuche den Einwand, es handle sich bei der Entstehung radioaktiver OES in der Leber lediglich um eine Austauschreaktion der einen Carboxylgruppe.

Später gelang EVANS und Mitarbeitern (377) die Darstellung zellfreier

Taubenleberextrakte, die in Anwesenheit von BTS und Bernsteinsäure 10—50% des zugesetzten radioaktiven Kohlendioxyds assimilierten. ^{14}C wird als organisch gebundener Kohlenstoff fixiert. In Abwesenheit von BTS und Bernsteinsäure findet nur eine geringe Kohlendioxydaufnahme statt. Ein Unterschied im zeitlichen Verlauf des Kohlendioxydverbrauches soll zwischen den aus Leberbrei gewonnenen Extrakten und den durch Extraktion von acetontrockneter Leber dargestellten Präparaten bestehen, der wahrscheinlich auf einem verschiedenen Verhältnis zwischen kohlendioxydbindenden und freimachenden Reaktionen in den beiden Lösungen beruht. In den Acetonleberextrakten scheinen die Decarboxylierungsvorgänge gehemmt oder vollkommen unterbunden zu sein.

Den unmittelbarsten Beweis der OES-Bildung durch „Carboxylierung“ der BTS erbrachten KRAMPITZ und Mitarbeiter (378), denen mit Hilfe eines aus *Mikrococcus lysodeikticus* gewonnenen Enzyms, das OES zu BTS und CO_2 decarboxyliert, der Austausch von $^{13}\text{CO}_2$ mit der Carboxylgruppe, die der Methylengruppe der OES benachbart ist, gelang:



Fixierung von CO_2 findet außer in der Citronensäure, α -Ketoglutar-säure und den C_4 -Dicarbonsäuren auch in der Carboxylgruppe in der Leber gebildeter *Milchsäure* statt (379). Da dieser Vorgang hauptsächlich an Bakterien erforscht wurde, wird im Abschnitt 7 näher darauf eingegangen.

Im *Muskelgewebe*, das zur Synthese der C_4 -Dicarbonsäuren unfähig ist (vgl. S. 274), erfahren die den Abbau der BTS bewirkenden Reaktionen durch die Sperrung des Übergangs Bernsteinsäure \rightleftharpoons Fumarsäure eine Hemmung, da dadurch die zur Oxydation der BTS notwendige OES nicht mehr regeneriert werden kann. Fumarsäure hebt dementsprechend diese Hemmung auf. Die Fähigkeit der Leber, aus BTS OES zu bilden, erklärt nunmehr auch, weshalb in diesem Gewebe zwei für den Citronensäurecyclus in Herz- und Skelettmuskel typische Reaktionen nicht beobachtet werden konnten: 1. Die Hemmung des BTS- und Sauerstoffverbrauches durch Malonsäure und deren Aufhebung durch Fumarsäure. 2. Die Atmungsunterhaltende Wirkung der C_4 -Dicarbonsäuren.

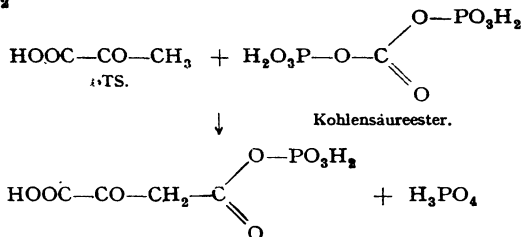
Zusammenfassend kann somit in bezug auf den BTS-Stoffwechsel der Leber festgestellt werden, daß der Citronensäurecyclus auch in diesem Organ stattfindet, es sich aber von quergestreiftem Muskel- und Herzgewebe durch seine Fähigkeit, aus BTS C_4 -Dicarbonsäuren zu bilden, unterscheidet. Es stellt möglicherweise die Quelle jener Dicarbonsäuren dar, die für den gesamten Stoffwechsel von Bedeutung sind.

3. *Allgemeine Bedeutung und Verlauf der Oxalessigsäurebildung.* Die biologische Synthese der OES aus BTS und Kohlendioxyd ist für

Leber und Niere¹ gesichert, für das Gehirn wahrscheinlich und für weitere noch nicht näher untersuchte Gewebe (Testes) nicht ausgeschlossen. In der Herz- und Skelettmuskulatur scheint sie sich nach den bisher vorliegenden Befunden nicht zu vollziehen. Hingegen wurde diese Reaktion auch in der Hefe, gewissen Bakterien und in Pflanzenwurzeln nachgewiesen (365).

Die OES-Bildung dürfte daher ein Glied einer Reaktionskette darstellen, der eine fundamentale Rolle im Stoffwechsel zukommt und vielleicht ein biologisches Prinzip oder Grundgesetz darstellt. Die Bedeutung des Citronensäurecyclus und damit auch der OES für den Endabbau der Nährstoffe im Säugetierorganismus, in der Hefe und in Schimmelpilzen wird noch zu besprechen sein. Die Frage, ob nun die OES-Synthese notwendig mit dem Citronensäurecyclus verknüpft ist oder ob OES auch noch auf anderem Wege in den Stoffwechsel eingreifen kann, ist vorläufig noch nicht entschieden. Doch dürfte ersteres wahrscheinlich sein.

Über den Reaktionsverlauf ist nichts sicheres bekannt. WOOD und WERKMAN (381) nehmen an, daß Phosphorylierungen dabei eine wichtige Rolle spielen. LYNEN (382) zieht auf Grund dieser Arbeiten die Bildung phosphorylierter Kohlensäure in Erwägung, welche in der Art eines Kohlensäureesters mit BTS eine Kondensation etwa folgender Art eingehen soll:²



Die wahrscheinlich endotherm verlaufende Synthese des Kohlensäureesters dürfte mit der Dehydrierung einer Carbonylverbindung energetisch gekoppelt sein (vgl. dazu S. 287 ff.).

RUBEN und KAMEN (365) stellten die Hemmung der CO₂-Assimilierung durch Cyanwasserstoff fest. Da Blausäure die schwermetallhaltigen Atmungsfermente vergiftet, ist anzunehmen, daß eine Störung der oxydativen mit der Carboxylierung der BTS energetisch gekoppelten Prozesse Ursache der Blausäurewirkung auf die Kohlendioxydassimilierung ist. Nach WOOD und WERKMAN (384) unterbindet auch Natriumfluorid die OES-Synthese aus BTS und Kohlendioxyd.

¹ Nach LYNEN wird Milchsäure in der Niere in l(-)-Äpfelsäure übergeführt (380).

² In vitro-Synthesen von β-Ketosäuren unter Anwendung der Kohlensäureester wurden von WALLINGFORD und Mitarbeitern (383) an einem umfangreichen Material ausgeführt.

KREBS und EGGLESTON (364) sprachen die Vermutung aus, die *Carboxylase* greife in den Carboxylierungsvorgang der BTS ein. Danach wäre das Enzym nicht direkt mit der Oxydation der BTS gekoppelt, sondern würde diese nur vorbereiten. Die schwer verständliche Tatsache, daß dasselbe Co-Enzym in der Pflanze und gewissen Mikroorganismen rein decarboxylierende, im tierischen Organismus aber oxydierende Wirkung entfaltet, würde durch die Annahme einer einerseits decarboxylierenden, andererseits carboxylierenden Wirkung plausibler. Zu dieser Anschauung wird KREBS durch die Befunde geführt, daß *Vitamin B₁* den BTS-Umsatz in Suspensionen von Leber *B₁*-avitaminotischer Tauben um das Mehrfache steigert, während in entsprechenden Versuchen mit Muskelgewebe *Vitamin B₁* keinen bedeutenden Effekt bewirkt. Danach soll dieses *Vitamin* an einer in der Leber, nicht aber im Muskel stattfindenden Reaktion, also entweder an der OES- oder der Acetessigsäurebildung, oder auch an beiden Reaktionen beteiligt sein. Da, wie sich zeigte, die Acetessigsäurebildung durch *Vitamin B₁* ebenfalls (wenn auch nicht sehr ausgeprägt) katalysiert wird, scheint den Autoren letzteres der Fall zu sein.

Diese Deutung der Wirkungsweise des *Vitamins B₁* kann, indessen nicht aufrechterhalten werden. Die einzige Tatsache, mit der KREBS seine Ansicht stützt, ist der schon länger bekannte Befund, daß *Vitamin B₁* (*Aneurin*) den BTS-Umsatz avitaminotischer Gewebe steigert. Der aus vergleichenden Untersuchungen an Muskel- und Lebergewebe gezogene Schluß, *Vitamin B₁* nehme an einer Reaktion mit BTS teil, die in der Leber stattfindet, aber von keiner wesentlichen Bedeutung im Muskel ist, ist — wie schon BARRON (385) bemerkte — falsch. KREBS verwendete in seinen Versuchen zerhackten Muskel. Unter diesen Bedingungen findet aber praktisch keine Phosphorylierung des *Aneurins* statt. [Für die biologische Oxydation der BTS in Bakterien konnte der sichere Nachweis erbracht werden, daß Co-Carboxylase und nicht *Vitamin B₁* dabei die wesentliche Rolle spielt, und auch Co-Carboxylase eher als *Vitamin B₁* für die Oxydation der Essigsäure von Bedeutung ist (386).]

Auch der von QUASTEL und WEBLEY (386) hervorgehobene Befund, daß Zusatz von OES zu *Vitamin B₁*-armen *Propionsäurebakterien* keinen mit der Wirkung des *Vitamins* vergleichbaren Effekt ergibt, widerspricht der Annahme von KREBS. Schließlich sei noch auf die Versuche von KRAMPITZ und Mitarbeitern (378) hingewiesen, welche fanden, daß für die von ihnen beobachtete Austauschreaktion [vgl. S. 275, Gleichung (1)] Mg^{++} , aber nicht Co-Carboxylase notwendig ist.

f) Abbau der Brenztraubensäure im Gehirn.

Unsere Kenntnisse über den BTS-Stoffwechsel im Gehirn sind noch ziemlich mangelhaft. Zwar erinnern verschiedene an diesem Organ be-

obachtete Umsetzungen an diesbezügliche Verhältnisse in der Leber, doch lassen die bisherigen Versuchsergebnisse noch keine gesicherten Schlüsse auf einen analogen Abbau der BTS in beiden Organen zu.¹ Wünschenswert wären vor allem Versuche mit Kohlenstoffisotopen, wie sie an der Leber durchgeführt wurden.

Das unter anaeroben Bedingungen quantitativ an erster Stelle stehende Reaktionsprodukt des BTS-Umsatzes im Gehirn ist die *Milchsäure*. Die von verschiedenen Autoren gefundenen Werte variieren zwischen 40 und 50% der verschwundenen BTS. WEIL-MALHERBE (371), ferner LIPMANN (387) fanden der Dismutationstheorie genau entsprechende Mengen. In Aerobiose entsprach die Milchsäure im Mittel 23% des BTS-Umsatzes.

Demgegenüber sind die ermittelten *Essigsäurewerte* starken Schwankungen unterworfen. LONG (388) fand in einem aeroben Ansatz mit Gehirnbrei 25% der abgebauten BTS als Essigsäure wieder; SIMOLA und ALAPEUSO (389) in einem anaeroben Versuch etwas weniger (17%). In Gegenwart von Sauerstoff war die Essigsäurebildung noch geringer (6%).² Bedeutend höhere Quantitäten ergaben anaerobe Versuche mit Gehirnschnitten, in denen 75—80% der nach der Dismutationstheorie (d. h. 37—40% der umgesetzten BTS) zu erwartenden Menge Essigsäure nachgewiesen werden konnten (371). Mit Gehirnbrei fand WEIL-MALHERBE jedoch nur 10% der berechneten Menge. Dieser auffällige Unterschied im Verhalten zwischen Gehirnschnitten und Gehirnbrei wird noch näher zu besprechen sein (vgl. S. 281).

Bemerkenswert ist, daß im Gehirn nach Zusatz von BTS — ähnlich wie in der Leber — eine deutliche Bildung von α -Ketoglutar säure nachweisbar ist, die im Mittel 17% der umgesetzten BTS beträgt (389). Anwesenheit von Sauerstoff bewirkt sowohl eine Steigerung des BTS-Abbaus, als auch eine Vermehrung der α -Ketoglutar säurebildung um zirka 100%. Das Verhältnis der gebildeten α -Ketoglutar säure zur verschwundenen BTS (17%) liegt zwischen dem von EVANS (363) für Leber gefundenen Wert (11%) und demjenigen, den KREBS und EGGLESTON (364) an der Leber in Anwesenheit von Kohlendioxyd und Hydrogencarbonat ermittelten (20%). (SIMOLA und ALAPEUSO verwendeten für ihre Versuche ausnahmslos ein hydrogencarbonatgepuffertes Medium.) Ein Teil der α -Ketoglutar säure wurde wahrscheinlich durch Umaminierung aus Glutaminsäure gebildet, da etwa 16% (anaerob 18%) der verschwundenen BTS als *Alanin* gefunden wurde.

¹ Diese Versuche wurden hauptsächlich an Gehirnen von Rindern, Schafen, Meerschweinchen und Ratten durchgeführt.

² Bestimmt wurden in diesen Versuchen die wasserdampf flüchtigen Säuren. Die angeführten Werte sind auf Essigsäure umgerechnet.

Auch bezüglich der aus BTS gebildeten *Bernsteinsäuremengen* liegen in der Literatur stark divergierende Werte vor. Nach WEIL-MALHERBE (438) gelingt eine aerobe Anhäufung von Bernsteinsäure nur unter Zusatz von Malonsäure. SIMOLA und ALAPEUSO (389) fanden jedoch auch unter aeroben Bedingungen (ohne Malonsäure) kleine Mengen Bernsteinsäure, anaerob etwas höhere, aber ebenfalls verhältnismäßig geringe Werte. Interessant ist, daß WEIL-MALHERBE in den anaeroben Versuchen mit Gehirnschnitten, in denen die Menge der gebildeten Essigsäure 75 bis 80% des nach der Dismutationstheorie geforderten Wertes betrug, 20% Bernsteinsäure fand (berechnet unter der Annahme, daß zur Bildung eines Moleküls Bernsteinsäure zwei Moleküle BTS umgesetzt werden müssen), während bei Verwendung von Gehirnbrei der niedrige Essigsäurewert (10%) von bedeutend höheren Ausbeuten an Bernsteinsäure begleitet wurde (60%).

Hierzu muß allerdings bemerkt werden, daß die übliche Bestimmung der Bernsteinsäure durch Ätherextraktion und Silberfällung in Anwesenheit von α -Ketoglutarsäure zu hohe Werte liefert, in dem die verhältnismäßig schwer löslichen Silbersalze der α -Ketoglutarsäure mitbestimmt werden. SIMOLA und ALAPEUSO fallen daher nach KRUSIUS (390) und KREBS (391) die α -Ketoglutarsäure durch 2,4-Dinitrophenylhydrazin vorher aus.

Citronensäure konnte unter aeroben Bedingungen regelmäßig in kleinen Mengen nachgewiesen werden (2—4% der umgesetzten BTS), die durch Zusatz von *Äpfelsäure* deutlich erhöht wurden (389). Äpfelsäure, allein zum Gewebe gegeben, bewirkte nur eine geringe Citronensäurebildung. Vergleicht man diese Werte mit den an der Leber ermittelten (ohne Hydrogencarbonat- und Kohlendioxidzusatz knapp 2%, mit diesen Zusätzen zirka 9%), so erweisen sie sich wieder von derselben Größenordnung.

Von den zwei von SIMOLA und ALAPEUSO (389) durchgeführten Versuchen zur Bestimmung der *Fumarsäure* fiel nur der eine deutlich positiv aus. *Äpfelsäure*- oder *OES*-Bildung nachzuweisen gelang nicht. Auch die Bestimmung der *Ameisensäure* fiel negativ aus.

Die in Versuchen mit *Gehirnschnitten* und *Gehirnbrei* gefundenen Umsetzungsprodukte — Milchsäure, Essigsäure, Citronensäure, α -Ketoglutarsäure, Acetessigsäure und β -Oxybuttersäure — sind dieselben, wie sie auch beim Abbau der BTS durch die *Leber* beobachtet werden konnten. Die verschiedentlich zur Erklärung der Bernsteinsäure- und α -Ketoglutarsäurebildung in Betracht gezogenen Reaktionsmechanismen (Kondensation zweier Moleküle BTS oder je eines Moleküls BTS und Essigsäure oder zweier Moleküle Essigsäure) mußten für den Leberstoffwechsel ausgeschlossen werden (vgl. S. 273). Der Nachweis dieser Umsetzungen in irgendwelchen anderen Geweben gelang bisher auch nicht. Es fragt sich daher, ob der Bildung der genannten Verbindungen im Gehirn nicht

analoge Vorgänge zugrunde liegen, wie sie für die Leber gelten. KREBS und Mitarbeiter (349) zeigten, daß auch Schafhirn OES in Citronensäure und α -Ketoglutar Säure überführt. Falls daher dem Gehirn ebenfalls die Fähigkeit zukäme, OES aus BTS zu bilden, wäre damit die Hypothese der Entstehung der Citronensäure, α -Ketoglutar Säure und Bernsteinsäure aus BTS über den Citronensäurecyclus wesentlich gestützt. Die atmungssteigernde Wirkung von Fumarsäure in Gegenwart von BTS auf Gehirnbrei und Gehirnsuspension stände mit dieser Annahme in Einklang. Für die Bedeutung der Citronensäure im Stoffwechsel des Gehirns spricht auch das Vorkommen von *Aconitase* und *Isocitronensäure-Dehydrase* in diesem Organ.

Obwohl SIMOLA und ALAPEUSO (389) der Ansicht sind, Versuche am Gehirn hätten vorläufig noch keinen Anhalt für eine Kohlensäureassimilation geliefert, erscheint es nach dem vorliegenden Tatsachenmaterial sehr wahrscheinlich, daß α -Ketoglutar Säure in Gehirn und Leber in analoger Weise entsteht. Die von diesen Autoren ermittelten Citronensäure- und α -Ketoglutar Säuremengen entsprechen weitgehend den von KREBS und EVANS an der Leber gefundenen Werten. In der Arbeit von SIMOLA und Mitarbeitern liegen keine Versuche über die Bildung der BTS in einem hydrogencarbonatfreien Medium vor, so daß nicht entschieden werden kann, ob die gewählte Puffersubstanz einen Einfluß auf die Resultate ausübte.

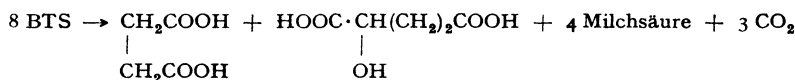
Hingegen deuten die Untersuchungen WEIL-MALHERBES eine derartige Abhängigkeit an. Die Versuche mit Gehirnschnitten wurden zum Teil in einem phosphatgepufferten Medium, zum Teil in einem solchen, das Hydrogencarbonat und Kohlendioxyd enthält, durchgeführt. Während im ersten Fall annähernd der Gesamtbetrag der zu erwartenden Essigsäuremenge auftrat (im Mittel 94 %), lagen die im hydrogencarbonatgepufferten Medium ermittelten Essigsäurewerte deutlich niedriger (70%). Das verschiedene Verhalten in An- und Abwesenheit von Hydrogencarbonat wurde jedoch damals (1937) noch nicht beachtet und daher auch nicht weiter untersucht. Die wenigen Daten, die somit zu einem Vergleich des Hydrogencarbonateinflusses zugänglich sind, ermöglichen uns noch keine sicheren Schlüsse, um so weniger, als nach ELLIOTT und LIBET (392) der Stoffwechsel des Gehirns weitgehend durch pH -Änderungen des Mediums beeinflusbar sein soll.

ASHFORD und HOLMES (393) stellten fest, daß mit Gehirnbrei in Ringerlösung, die 0,025 M Hydrogencarbonat und in der Gasphase eine Mischung von O_2 und CO_2 enthielt, die Atmung um 45% gegenüber einer Probe in Ringerphosphatlösung gesteigert ist. Dieser Befund konnte jedoch von ELLIOTT und Mitarbeitern (392), die den Einfluß von Hydrogencarbonat in isotonischen Lösungen untersuchten, nicht bestätigt werden. Doch braucht die Bildung der C_4 -Dicarbonsäuren nicht notwendig mit einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch verknüpft zu sein, da sie sich

— wie die Versuche an der Leber zeigten — auch unter anaeroben Bedingungen vollziehen kann.

Unter der Annahme der OES-Bildung aus BTS und Kohlendioxyd wäre zu erwarten, der Hydrogencarbonateffekt wirke sich in Versuchen mit Gehirnbrei deutlicher als in Versuchen mit Gehirnschnitten aus. Das von WEIL-MALHERBE beobachtete verschiedene Verhalten von Gehirnschnitten und Gehirnbrei (vermehrte Bernsteinsäurebildung in Gehirnbrei) fände dadurch eine mögliche Erklärung. Die Deutung WEIL-MALHERBES, daß in Gehirnbrei durch die Zerstörung der Zellstruktur ein Wasserstoffüberträger für die zur Bernsteinsäurebildung notwendigen Dehydrierungen verfügbar werde, dürfte kaum zu stützen sein. Nach ASHFORD und HOLMES (393) soll kein Unterschied im Sauerstoffverbrauch zwischen intaktem und zerriebenem Gewebe in einem phosphatgepufferten Medium bestehen.

WEIL-MALHERBE (371) fand in allen Versuchen — sowohl mit Gehirnschnitten wie mit Gehirnbrei — für das Verhältnis: umgesetzte BTS zu gebildetem Kohlendioxyd zu gebildeter Milchsäure annähernd die Proportion 2:1:1. Bildet sich nun Bernsteinsäure über eine Dismutation der α -Ketoglutarensäure (394) nach der Gleichung:



so würde für das Verhältnis BTS:CO₂:Milchsäure der Wert 2:0,75:1 resultieren. WEIL-MALHERBE lehnte aus diesem Grunde die Annahme der Bernsteinsäurebildung über α -Ketoglutarensäure ab. Auch diese Befunde sind jedoch mit der Theorie des Citronensäurecyclus vereinbar und widersprechen unter diesem Gesichtspunkt der Bildung der Bernsteinsäure über α -Ketoglutarensäure nicht. Die hohen im Gehirn nachgewiesenen Milchsäurewerte machen es wahrscheinlich, daß BTS unter anaeroben Bedingungen die Rolle eines Wasserstoffacceptors beim Citronensäurecyclus spielt, d. h. in diesem Organ unter anaeroben Bedingungen die Aufgabe übernimmt, welche nach KREBS sonst der OES zukommt. Welche Dehydrierungen durch das System BTS \rightleftharpoons Milchsäure erfolgen, kann vorläufig noch nicht entschieden werden. Unter aeroben Bedingungen wird der Wasserstoff wahrscheinlich unter Umgehung dieser Acceptoren direkt dem Sauerstoff übergeben. Zu erwähnen ist noch die Tatsache, daß Dismutation der BTS mit zellfreien oder genügend gereinigten Enzympräparaten nicht nachweisbar ist, eine Beobachtung, die auf einen komplexen an die Zellstruktur gebundenen Reaktionsmechanismus hinweist.

2. Abbau der C₃-Körper: Essigsäure, Acetaldehyd und Alkohol (Bildung der Citronensäure aus Essigsäure und Oxalessigsäure).

a) Im Warmblütlerorganismus.

Abbau der Essigsäure. Die Theorie von THUNBERG und WIELAND, nach der sich Bernsteinsäure durch Dehydrierung und Kondensation zweier Moleküle Essigsäure bildet, ermöglichte erstmals die Vorstellung eines restlosen Überganges der Abbaustoffe in Kohlendioxyd und Wasser. Da Bernsteinsäure über OES zu BTS oxydiert werden kann, welche ihrerseits den Ausgangspunkt zur Glykogenbildung darstellt, ließ sich nun auch die Umwandlung von Fetten in Kohlenhydrate — jedenfalls theoretisch — erklären.

Bildung von Bernsteinsäure aus Essigsäure konnte jedoch nur in der *Hefe* beobachtet werden. In *Propions. B.* und *Citrobacter* soll Essigsäure in Gegenwart von OES vermehrte Bernsteinsäurebildung bewirken (vgl. S. 319). Keine Zunahme an Bernsteinsäure wurde hingegen in Nierengewebe — das Essigsäure kräftig abzubauen vermag — festgestellt (395). Ähnlich aber, wie bei *Hefe*, hemmt Malonat (M/100) auch in diesem Organ den Abbau der Essigsäure. Neuere Untersuchungen zeigten, daß die Bernsteinsäurebildung aus Essigsäure in der *Hefe* (siehe S. 283 ff.) nicht den von THUNBERG und WIELAND angenommenen Weg einschlägt, sondern über den *Citronensäurecyclus* verläuft. Ein Übergang von Fetten in Kohlenhydrate ist auf Grund dieses Reaktionsmechanismus aber nicht mehr erklärbar (vgl. S. 292).

Mit tierischem Gewebe gelang der Nachweis der *Citronensäure-* und *α-Ketoglutar Säurebildung* aus Essigsäure und OES nicht. Möglicherweise verschwinden diese Verbindungen rascher als sie unter den gewählten Bedingungen nachgebildet werden und entziehen sich so der Beobachtbarkeit.

WIELAND und Mitarbeiter (395) zeigten, daß gestreifter Muskel (Taubenbrustmuskel und Schenkelmuskel des Rindes) nicht die Fähigkeit besitzt, dem Organbrei zugesetztes Acetat abzubauen. Hingegen hatten aerobe Versuche mit Lunge, Leber und Niere ein positives Ergebnis. Unter anaeroben Bedingungen findet keine Abnahme der Essigsäure statt.

Wie aus vergleichenden Untersuchungen dieser Autoren mit *Acetat* und *Acetat* + *Acetaldehyd* hervorgeht, hemmt Acetaldehyd den Abbau der Essigsäure. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß MARTIUS später einen entsprechenden Einfluß von Acetaldehyd auf den Abbau der BTS in der Leber feststellte. Falls die Hypothese von MARTIUS (418) (vgl. S. 294) zutrifft, wonach BTS über einen „C₂-Körper auf der Oxydationsstufe der Essigsäure“ oxydiert wird, stände der Annahme eines analogen Abbaus von Essigsäure und BTS im tierischen Gewebe kein ernstliches Hindernis mehr im Wege.

Acetaldehyd wird von gestreifter Muskulatur (Brustmuskel der Taube und Schenkelmuskel des Rindes) ebenfalls nicht angegriffen, durch Nierengewebe hingegen unter anaeroben Bedingungen dismutativ zu Essigsäure und Äthylalkohol umgesetzt. Aerob bildet sich hauptsächlich Essigsäure. Da zugesetzter Alkohol von diesem Gewebe nicht dehydriert werden kann und liegen bleibt, muß die Niere über eine *Aldehydmutase* und eine *Aldehydhydrase* verfügen (395). Die Fähigkeit des Säugetierorganismus *Äthylalkohol* zu Essigsäure zu oxydieren, wurde durch die Versuche BERNHARDS eindeutig bewiesen (vgl. S. 227).

b) *Durch Hefe.*

SONDERHOFF und THOMAS (396) gelang der Nachweis der *Citronensäurebildung* aus *Essigsäure* in der *Hefe*, indem sie zeigten, daß die eingesetzte *trideuterierte* Essigsäure zur Bildung einer *zweifach deuterierten* Citronensäure führt (vgl. S. 297). Nach SONDERHOFF und DEFFNER (397) kann die Ausbeute an gebildeter Citronensäure bedeutend erhöht werden, wenn man der Hefe außer Essigsäure noch Oxalessigsäure zusetzt.

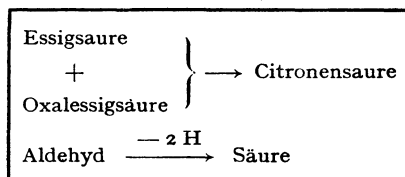
Unter der Einwirkung von Kohlendioxyd nimmt die Atmung gewisser Hefearten, wie HAMON (398) beobachtete, zu. KLEINZELLER (399), der die *Bernsteinsäurebildung* in der *Hefe* näher untersuchte, fand, daß diese ebenfalls von der Anwesenheit von *Kohlendioxyd* und *Hydrogencarbonat* abhängig ist, und nimmt daher an, ihre Synthese verlaufe über OES. In Übereinstimmung damit stehen die Befunde, daß OES und Äpfelsäure die Bernsteinsäurebildung aus Glucose erhöhen und Hefe Kohlendioxyd zu binden vermag (365).

Über den genaueren Verlauf des *Citronensäurecyclus* in der *Hefe* sind wir vor allem durch Arbeiten von LYNEN unterrichtet (400). Er geht von der Beobachtung aus, daß verarmte Oberhefe (15—20 Stunden unter Sauerstoff geschüttelt) Essigsäure erst nach einer mehr oder weniger langen *Induktionszeit* mit normaler Geschwindigkeit abzubauen vermag (401), diese Induktionszeit aber durch Spuren von Alkohol stark verkürzt werden kann. Dieselbe Wirkung zeigt Glucose noch in bedeutend stärkerem Ausmaß. Ebenso wirksam (wie Glucose) erwiesen sich schließlich äquimolare Mischungen aus Alkohol und BTS oder Alkohol und Milchsäure, während BTS und Milchsäure allein einen weit schwächeren Einfluß entfalteten. Danach dürfte die Überlegenheit der Glucose auf ihrer Fähigkeit, neben Alkohol BTS zu bilden, beruhen. LYNEN nimmt an, aus BTS und Kohlendioxyd werde die zum Abbau der Essigsäure notwendige OES gebildet (*Primäreffekt*), wobei die Oxydation des Alkohols die zur Carboxylierung notwendige Energie liefern soll (*Sekundäreffekt*). Gestützt wird diese Annahme dadurch, daß auch Bernsteinsäure, welche durch auch in der Hefe sich abspielende enzymatische Reaktionen mit Oxalessigsäure verknüpft ist, die Induktionsperiode verkürzt. Alkohol

und Glucose verstärken diesen Effekt auch hier wieder, wobei aber in diesem Fall die Glucose dem Alkohol in ihrer Wirksamkeit nicht mehr überlegen ist. Die zusätzliche Bildung von Oxalessigsäure aus BTS fällt in Anwesenheit von Bernsteinsäure nicht mehr ins Gewicht. Diese Versuche zeigen die Notwendigkeit der OES für den Abbau der Essigsäure durch Hefe. Weil andererseits OES, der Hefe neben Essigsäure verabreicht, die Citronensäure- und Bernsteinsäurebildung steigert, darf angenommen werden, die den Abbau der Essigsäure einleitende Reaktion bestehe in der Kondensation mit Oxalessigsäure.

Da nun die aktivierende Wirkung des Alkohols und der Glucose auch der BTS und — was besonders aufschlußreich ist — Propyl- und Butylalkohol zukommt, also Verbindungen, deren Abbauwege die Reaktion *Aldehyd* → *Säure* gemeinsam haben, schließt LYNEN, daß diese Dehydrierung mit der Kondensation der Essigsäure mit Oxalessigsäure in irgendeiner Weise *energetisch gekoppelt* ist:

Schema 5.



(Die Einrahmung soll auf die Koppelung beider Reaktionen hinweisen.)

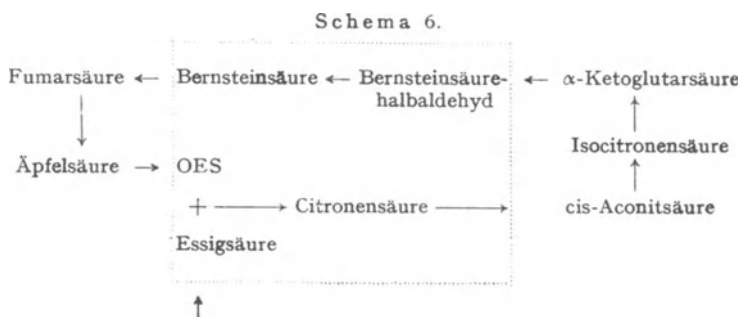
Kontrollversuche, in denen der Einfluß von Acet- und Propionaldehyd auf die Initialphase verarmter Hefe untersucht wurde, wiesen die nach dieser Theorie zu erwartende Wirkung auf. Das Wesen der Kopplung ist noch unklar. Die Dehydrierung des Aldehyds scheint eine (stoffliche) Veränderung des einen oder beider Kondensationspartner zu bewirken, welche möglicherweise Voraussetzung für deren Zusammentreten ist. Nicht ausgeschlossen ist das Mitwirken phosphorylierter Verbindungen.

Über den *Abbau der Citronensäure* in der Hefe orientieren Arbeiten von SONDERHOFF und THOMAS (396) und von LYNEN (382, 402). SONDERHOFF und THOMAS isolierten bei Anwendung trideuterierter Essigsäure zweifach deuterierte Bernsteinsäure, die also nicht durch Dehydrierung zweier Moleküle Essigsäure, wohl aber über die zweifach deuterierte Citronensäure entstanden sein kann, wie weiter unten gezeigt werden soll (vgl. S. 297). LYNEN (382, 400) fand Bernsteinsäure und — nach Zusatz von arseniger Säure als Hemmstoff zur Versuchslösung — α -Ketoglutarsäure unter den Abbauprodukten der Citronensäure. Nach NEUBERG und RINGER (403) wird Bernsteinsäurehalbaldehyd von Hefesaft sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen zu Bernsteinsäure de

hydriert. Der Abbau der Citronensäure nimmt somit auch in der Hefe den von MARTIUS gefundenen, von KREBS und anderen in verschiedenen tierischen Geweben nachgewiesenen Verlauf.

Der über den Citronensäurecyclus fortwährend neu sich bildende *Bernsteinsäurehalbaldehyd* (vgl. Schema 6) müßte — wenn die Theorie stimmt — durch seine Dehydrierung die zur Citronensäurebildung nötige Energie liefern und somit die Rolle der anderen „Aktivatoren“ (Alkohole, Aldehyde) übernehmen können. Versuche bestätigten diese Überlegung: Nach Zusatz von Bernsteinsäurehalbaldehyd zu „verarmter“ Hefe setzt die Oxydation der Essigsäure sofort mit maximaler Geschwindigkeit ein.

Der Verlauf dieses Kreisprozesses ist in Schema 6 dargestellt. Für jedes Molekül Essigsäure, das verbrennt, tritt ein neues Molekül in den Kreisprozeß ein.



Schon diese Befunde lassen annehmen, dem KREBSschen Cyclus der BTS-Verbrennung im Gewebe und dem Abbau der Essigsäure durch Hefe liege eine analoge Reaktionskette zugrunde. Versuche über den *Malonsäureeinfluß* auf die Hefeatmung tragen nun wesentlich zur Stützung dieser Ansicht bei (315). In Übereinstimmung mit Beobachtungen am tierischen Ferment handelt es sich auch bei der Wirkung der Malonsäure auf die Hefedehydrase um eine konkurrierende Hemmung. Bei genügend hoher Bernsteinsäurekonzentration tritt die hemmende Wirkung der Malonsäure zurück.

Wichtig ist ferner, daß freie Dicarbonsäuren weit besser in die Zelle hineindiffundieren als deren Salze. Als Ursache der mangelnden Permeabilität der Salze gilt deren elektrische Ladung im ionisierten Zustand. Während Malonat auf die Zellatmung der Hefe und den Abbau der Essigsäure keinen Einfluß ausübt, bewirkt Malonsäure eine starke Hemmung des Acetatabbaus.

Fumarsäure hebt die Malonathemmung weitgehend auf. Sie wird in Gegenwart von Essigsäure (und Malonsäure) über Äpfelsäure zu Oxal-essigsäure oxydiert und gibt im weiteren Verlauf dieses Prozesses zur

Bildung der äquivalenten Menge Bernsteinsäure Anlaß, die infolge der Ausschaltung des Bernsteinsäuredehydrasesystems sich in der Zelle anreichert.

Auf die *Dehydrierung von Alkohol* zu Essigsäure hat hingegen Malonat keinen Einfluß. Diese Tatsache und der Befund, daß auch in einer an C_4 -Dicarbonsäuren weitgehend verarmten Hefe (die in folgedessen Essigsäure nur sehr langsam abzubauen vermag) Alkohol genau so rasch dehydriert wird wie in einer an C_4 -Dicarbonsäuren gesättigten Probe, beweist die Nichtbeteiligung des SZENT-GYÖRGYI-Systems an der Dehydrierung des Alkohols. Da ferner weder die Dehydrierung der „Triose“ noch der Abbau der Fumarsäure durch Malonat gehemmt werden, muß der SZENT-GYÖRGYI-Cyclus auch von der Beteiligung an diesen Reaktionen ausgeschlossen werden. Nach LYNEN sind die C_4 -Dicarbonsäuren in diesen Versuchen nicht als Wasserstoffüberträger im Atmungssystem der Hefe eingeschaltet, sondern nur als Katalysatoren des Essigsäureabbaus tätig.

c) *Durch Schimmelpilze.*

JOHNSON, KNIGHT und WALKER (404) zeigten, daß *Natriumfluorid* die Citronensäurebildung durch *Aspergillus niger* und *Penicillium* hemmt, *Jodessigsäure* (M/1000 und M/500) hingegen einen starken Anstieg bewirkt. Nach WOOD und WERKMAN (384) unterbindet Natriumfluorid die OES-Synthese aus BTS und Kohlendioxyd. Andererseits zeigten SIMOLA und ALAPEUSO (405), daß die Citronensäureentstehung durch *Aspergillus niger*-Stämme in Natriumhydrogencarbonat-haltigem Medium etwas rascher verläuft als in gewöhnlicher Nährlösung. Es ist daher wahrscheinlich, daß zur Citronensäuresynthese auch in diesem Organismus OES notwendig ist. Die Autoren untersuchten ferner den Einfluß verschiedener Substrate bei Inkubationszeiten von 1—24 Stunden auf die Citronensäurebildung. *BTS* und *Äpfelsäure* steigern die Ausbeute an Citronensäure, und zwar besonders bei gleichzeitiger Darbietung. *Glucose* rief erst nach 20—24 Stunden eine Wirkung hervor. Da es sich in diesen Versuchen um gewaschene Pilzpräparate handelte, dürfte diese Erscheinung in Analogie zur „Inkubationszeit“ verarmter Hefe stehen. Auch die Tatsache, daß *Essigsäure* nicht in allen Versuchen fördernd auf die Citronensäuresynthese wirkte, mag durch den Auswaschungsgrad und die dadurch hervorgerufene wechselnde Verarmung der Zellen an C_4 -Dicarbonsäure bedingt sein. Jedenfalls zeigen diese Versuche, daß Citronensäure in *Aspergillus niger* auf dem für tierische Gewebe und Hefe nachgewiesenen Weg gebildet wird. Da man annehmen darf, Citronensäure habe auch für diesen Organismus die Bedeutung, die ihr im KREBSschen Cyclus zukommt, verläuft ihr Abbau wahrscheinlich ebenfalls analog demjenigen in der Hefe. Gestützt wird diese Ansicht durch die Versuche von CHRZASZCZ und TIUKOW (406), CHRZASZCZ, TIUKOW und

ZAKOMORNY (407) und BERNHAUER und SIEBENÄUGER (408), welche die Bildung von Bernsteinsäure, Fumarsäure, Äpfelsäure und Citronensäure in Anwesenheit von Acetat oder verdünntem Alkohol durch verschiedene Arten von *Schimmelpilzen* nachweisen konnten. Fast alle *Aspergillus*-, *Citromyces*- und *Penicilliumarten* sind zur Citronensäurebildung befähigt. Bemerkt sei ferner, daß die von verschiedenen Autoren beobachteten Citronensäureausbeuten aus Hexosen von 85—100% ebenfalls mit dem hier angenommenen Citronensäurebildungsmechanismus vereinbar sind:



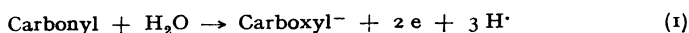
d) Hemmende Wirkung zweiwertiger Kationen auf den Abbau der Citronensäure.

Durch die Aufklärung des Abbauweges der Essigsäure durch Hefe wird auch die von SONDERHOFF und DEFFNER (397) gemachte Beobachtung der Hemmung des Essigsäureabbaus in diesem Organismus durch *Ba^{..}-Ionen* verständlicher. Nach EULER und FRANKE (409) erschwert *Ba^{..}* die Dehydrierung der Citronensäure. WIELAND und Mitarbeiter (410) fanden, daß (in der Niere) außer *Ba^{..}* auch *Mg^{..}* Citronensäure vor dem weiteren Abbau schützt. Der Citronensäurecyclus wird somit durch diese Ionen gehemmt und daher die Oxydation der Essigsäure zurückgedrängt (LYNEN). Nach JACOBSON (411) verschieben *Mg^{..}*-, *Ca^{..}*- und *Mn^{..}*-Ionen das *enzymatische Gleichgewicht* zwischen cis-Aconitsäure und Isocitronensäure zugunsten der cis-Aconitsäure. Wahrscheinlich beruht auch die *Ba^{..}-Wirkung* auf der Beeinflussung des enzymatischen Gleichgewichtes zwischen den beiden *C₆-Tricarbonsäuren*. Diese zweiwertigen Ionen — vor allem *Ca^{..}* — sind daher möglicherweise auch in dieser Hinsicht für das Stoffwechselfgeschehen wichtig. Wie im Abschnitt 9 (S. 326) gezeigt wird, dürfte die Bildung der *C₆-Tricarbonsäure* aus Essigsäure und OES reversibel verlaufen und wäre daher von der Dehydrierung der Isocitronensäure abhängig. Andererseits wieder ist die Synthese der Tricarbonsäuren mit verschiedenen Dissimilierungsvorgängen energetisch gekoppelt. Diese Überlegungen vermitteln eine Vorstellung von der möglichen Bedeutung einer am Citronensäurecyclus angreifenden Stoffwechselsteuerung.

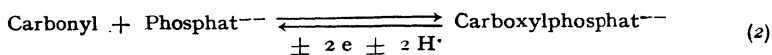
e) Bemerkungen zur energetischen Koppelung.

Da im vorigen das Problem der energetischen Koppelung berührt wurde, welches für das Verständnis biologischer Vorgänge von fundamentaler Bedeutung ist, soll hier noch kurz das Prinzipielle darüber bemerkt werden. Eine Reihe biologischer Reaktionen, wie z. B. die Bildung von Alkohol aus Zuckern oder der OES aus BTS und *CO₂*, verlaufen unter

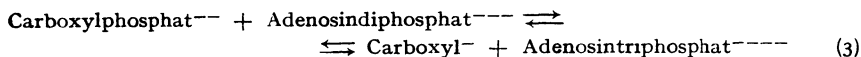
Zunahme an freier Energie ($+ \Delta F_1$). Da ein Energiezuwachs als Endresultat (thermodynamisch) unmöglich ist, müssen derartige Prozesse notwendig mit solchen, die unter Abnahme an freier Energie vonstatten gehen ($-\Delta F_2$) energetisch gekoppelt sein ($\Delta F_2 \geq \Delta F_1$). Neuere enzymatische Untersuchungen haben nun gezeigt, daß bei der biologischen *Oxydation der Carbonyl- zur Carboxylgruppe* nicht Wasser, sondern *Phosphation* angelagert wird (vgl. auch S. 227). Während die Dehydrierung



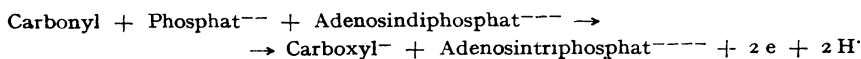
unter beträchtlicher Abnahme an freier Energie verläuft (Bildung resonanzfähiger Elektronensysteme), handelt es sich bei der Dehydrierung von Carbonylphosphat um einen beinahe thermoneutralen Vorgang:



Reaktion (2) ist im Gegensatz zu Reaktion (1) leicht reversibel. Der Phosphatrest des Carboxylphosphats wird nun auf das Adenylsäuresystem übertragen:



Auch dieser Prozeß ist leicht reversibel, weist mit anderen Worten ein kleines ΔF auf. Das Endresultat der Reaktionen (2) und (3)



ist somit die gleichzeitig mit der Dehydrierung des Carbonyls erfolgende Bindung anorganischen Phosphats an das Adenylsäuresystem in einem beinahe thermoneutral verlaufenden Vorgang, bzw. die Übertragung bei der Dehydrierung der Carboxylgruppe freiwerdender Energie an eine Verbindung, welche nun geeignet ist, diese wirksam in den Dienst energieverbrauchender (endothemer) Vorgänge (z. B. Entspannung des kontrahierten Myosins, d. h. Aufladung des kontraktiven Systems des Muskels) zu stellen. Die Spaltung der Pyrophosphatbindung ist als eine der am stärksten exotherm verlaufenden biologischen Reaktionen bekannt.¹

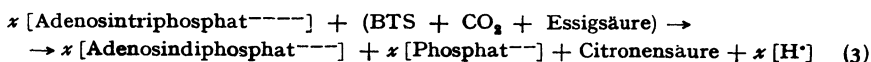
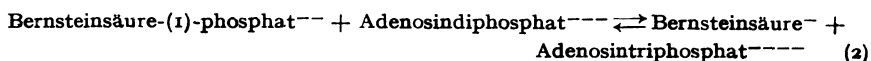
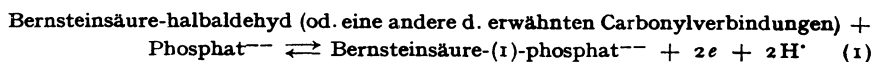
Die Feststellung LYNENS (400) der energetischen Koppelung der OES- bzw. Citronensäurebildung mit der Dehydrierung eines Aldehyds (Acetaldehyd, Propionaldehyd, Bernsteinsäurehalb-aldehyd) läßt nun als höchst wahrscheinlich erscheinen, auch in diesem Fall verlaufe die Energieübertragung nach dem eben dargestellten Prinzip. In Anwesenheit von

¹ Beim Zerfall der Adenosintriphosphorsäure werden pro Mol etwa 12,5 kcal. frei.

Glucose dürfte zudem der Übergang der „Triose“ (Glycerinaldehyd) in die entsprechende Zuckersäure — für den ja die simultane Bindung von Phosphorsäure an das Adenylsystem schon längere Zeit bekannt ist — eine wesentliche Rolle bei der Energiebelieferung der Citronensäuresynthese spielen. Die Beteiligung der Phosphorsäure an der Dehydrierung der α -Ketosäuren wurde für einen ihrer wichtigsten Vertreter, die BTS, von LIPMANN (412) und OCHOA (413) exakt bewiesen. Abgesehen von OES und Oxalbernsteinsäure, die — zugleich α - und β -Ketosäuren — nicht der Dehydrierung, sondern der Decarboxylierung unterliegen, ist auch für die Dehydrierung der übrigen α -Ketosäuren (hauptsächlich die der α -Ketoglutarinsäure) die Mitwirkung von Phosphaten anzunehmen. Jedenfalls gelang es KALCKAR (414) beim Abbau der Glutaminsäure und Citronensäure eine Phosphorylierung nachzuweisen. Da beide Säuren bei der Dehydrierung in α -Ketoglutarinsäure übergehen, scheint es berechtigt, die Bindung anorganischer Phosphorsäuren erst für deren weiteren Abbau anzunehmen. Tatsächlich zeigte in den Versuchen LYNENS (400) auch Bernsteinsäurehalbaldehyd die mit Glucose, BTS, Milchsäure, Aldehyden und Alkoholen beobachtete Wirkung auf den Essigsäureabbau.

Ferner ergaben Untersuchungen an *Propionsäurebakterien*, daß auch die Oxydation von *Fumarsäure* mit einer Phosphorylierung gekoppelt ist, die zur Anreicherung von Adenosintriphosphorsäure in der Zelle führt (386). Die katalytische Wirkung der Fumarsäure auf die Oxydation der Essigsäure dürfte daher ebenfalls zum Teil auf der erhöhten Bildung von Adenosintriphosphat beruhen.

Die energetische Koppelung wäre für den Fall der *Citronensäuresynthese* demnach folgendermaßen zu formulieren:



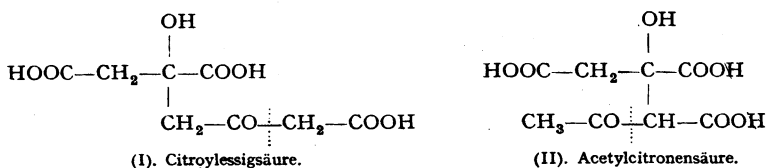
Da die reversiblen Reaktionen (1) und (2) nur dann verlaufen können, wenn Reaktion (3) stattfindet, wäre in diesem System der Abbau der Carbonylverbindungen von der Citronensäurebildung abhängig.

Da es sich bei der Erforschung dieser Vorgänge im wesentlichen um enzymatische Untersuchungen handelt, kann in dieser Arbeit nicht näher auf dieses äußerst interessante Gebiet eingegangen werden. Verwiesen sei auf die Darstellung LYNENS: „Die Rolle der Phosphorsäure bei Dehydrierungsvorgängen und ihre biologische Bedeutung“ (380) und die ausführliche Arbeit KALCKARS: „Energetic coupling in biological syntheses“ (3), denen auch ein Teil dieser Ausführungen entnommen wurde.

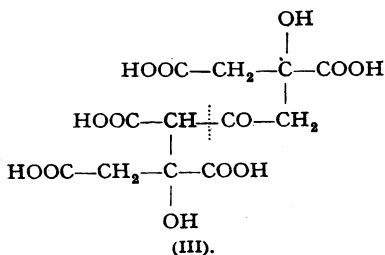
3. Abbau der β -Ketocarbonsäuren über den Citronensäure-Cyclus (Bildung der Citronensäure aus β -Ketocarbonsäuren und Oxalessigsäure).

a) Abbau der Acetessigsäure in Niere und Herzmuskel.

Nach H. WIELAND (410) verläuft in der Niere und im Herzmuskel die Citronensäurebildung nicht über das von KNOOP und MARTIUS (342) angenommene Kondensationsprodukt aus BTS und OES. In diesen Geweben soll vielmehr *Acetessigsäure* die Rolle der BTS übernehmen und mit OES zu einer *Procitronensäure* [Formel (I) oder (II)] kondensieren,



die dann in Citronensäure und Essigsäure zerfällt.¹ Daß sich die Essigsäurebildung dem Nachweis entzieht (die Acetatkonzentration in der Niere ist nach der Citronensäurebildung nicht über die Norm erhöht), kann nach WIELAND folgendermaßen gedeutet werden: 1. Es findet Kondensation zwischen zwei Molekülen Oxalessigsäure und einem Molekül Acetessigsäure unter Bildung von *Citroylcitronensäure* (III) statt, welche dann hydrolytisch in zwei Moleküle Citronensäure gespalten werden könnte (angedeutet durch die punktierte Linie),



2. die von der Procitronensäure abgespaltene Essigsäure befindet sich in einem aktivierten Zustand und setzt sich direkt oder indirekt (über Acetessigsäure) wieder mit Oxalessigsäure um.

b) Abbau der β -Ketocarbonsäuren (β -oxydativer Abbau der Fettsäuren).

Der von WIELAND untersuchte Mechanismus der Citronensäurebildung aus Acetessigsäure und OES ist jedoch — wie BREUSCH 1943 (415) zeigen konnte — nur ein Spezialfall einer allgemeineren Reaktionskette.

¹ Schon HALLMAN (343) fand in Gewebeversuchen Citronensäurebildung mit β -Oxybuttersäure und OES.

BREUSCH prüfte außer Acetessigsäure auch ihre höheren Homologen und einige andere, zum Teil unphysiologische Typen von β -Ketocarbonsäuren (β -Ketocaprinsäure, β -Ketocaprinsäure, β -Keto- δ -methylcaprinsäure, Benzoylessigsäure, β -Ketoglutarsäure) und fand, daß die meisten Gewebe unterschiedslos alle untersuchten β -Ketosäuren umsetzen:¹



BREUSCH schreibt diese Reaktion einem in Muskel, Gehirn und Niere in großer Menge vorhandenen, in der Leber wenig und in Milz und Pankreas überhaupt nicht vorkommenden Enzym *Citrogenase* zu.

Die Bedeutung dieser Feststellung für den *oxydativen Abbau der Fettsäuren* liegt auf der Hand. BREUSCH nimmt an, daß die durch β -Oxydation der Fettsäuren (KNOOP) gebildeten β -Ketosäuren sich mit OES zu Citronensäure und der um zwei C-Atome niedrigeren Fettsäure umsetzen [Gleichung (1)]. Das von den Fettsäuren abgespaltene C_2 -Bruchstück wird über den Citronensäurecyclus verbrannt und die sich regenerierende OES setzt sich von neuem mit der kürzeren Fettsäure (bzw. der aus ihr gebildeten Ketosäure) um, die auf diesem Wege schrittweise dem β -oxydativen Abbau unterliegt.

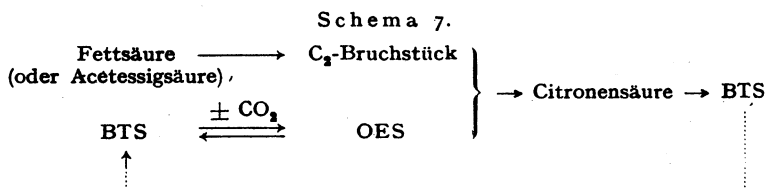
c) *Bemerkungen zur Koppelung des Kohlenhydrat- und Fettsäureabbaus.*

In unmittelbarem Zusammenhang mit dem Abbau der Fettsäuren steht die oft diskutierte Frage, ob Kohlenhydrate aus Fettsäuren gebildet werden können. Für Pflanzen dürfte das zutreffen. Die Möglichkeit eines derartigen Umbaus im Tierorganismus kann nicht von vornherein abgelehnt werden. Von den verschiedenen in Betracht gezogenen möglichen Abbauprodukten der Fettsäuren soll nach den Angaben in der Literatur [vgl. diesbezügliche Zusammenstellung bei STADIE und Mitarbeiter (416)] höchstens Acetessigsäure als Glykogenbildner in Frage kommen. WEIL-MALHERBE (417) gibt an, Nierenschnitte würden aus Acetessigsäure in vitro Glucose bilden. Versuche von STADIE und Mitarbeitern (416) beweisen jedoch, daß auch diese Möglichkeit ausgeschaltet werden muß.

Da von vornherein angenommen werden darf, daß die Bildung von Kohlenhydraten aus Fettsäuren über BTS verlaufen müßte, stellt sich die Frage, ob die derzeitigen Kenntnisse über Fettsäureabbau und BTS-Bildung einen von den Fettsäuren zu BTS führenden Reaktionsmechanismus theoretisch möglich machen. Falls die Fettsäuren auf dem von BREUSCH angegebenen Weg abgebaut werden [vgl. Gleichung (1), oben],

¹ Ausnahme OES, die nicht mit sich selbst reagieren kann.

ist eine Umwandlung von Fettsäuren oder Acetessigsäure in Kohlenhydrate ausgeschlossen, wie aus dem untenstehenden Schema des Reaktionsverlaufs ohne weiteres ersichtlich ist:¹

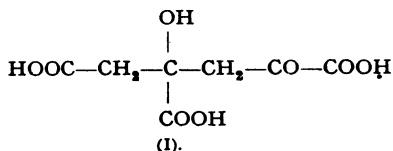


Es ergibt sich damit aber nicht nur die Unmöglichkeit der Bildung von BTS aus Fettsäuren, sondern auch die Notwendigkeit der Gegenwart genügender Mengen BTS als Quelle der für den Abbau der Fettsäuren notwendigen OES. Die *Abhängigkeit des Fettabbaus von der OES* (bzw. BTS) erklärt somit auch die durch *Fettbelastung* oder im *Hungerzustand* auftretende *Ketonurie*. Sie tritt danach dann auf, wenn dem Organismus die zum Abbau der aufgenommenen Fettmenge nötigen Kohlenhydratreserven (oder anderer BTS-bildender Verbindungen) nicht zur Verfügung stehen. Die *antiketogene Wirkung* der Kohlenhydrate und verschiedener anderer Verbindungen beruht danach auf ihrer Fähigkeit, BTS oder OES bilden zu können.

4. Intermediärprodukte der Citronensäuresynthese.

a) Beim Abbau der Brenztraubensäure.

KNOOP und MARTIUS zeigten 1936 (342), daß BTS und OES bei schwach alkalischer Reaktion und Zimmertemperatur zu einem Produkt kondensieren, welches durch Oxydation mit Wasserstoffperoxyd glatt in Citronensäure übergeht. Danach schien es wahrscheinlich, daß BTS und OES unter Aldolkondensation *Oxalcitramalsäure* (I) bilden, deren Oxydation dann zu Citronensäure führt.



Neuerdings gelang jedoch MARTIUS (418) der Nachweis, daß dieser Reaktionsweg — so naheliegend er auch schien — vom Organismus nicht besritten wird. Oxalcitramalsäure wird eigenartigerweise vom Gewebe nicht angegriffen. Da dieses hypothetische Zwischenprodukt bisher

¹ Der Prozeß Fettsäure \rightarrow C₂-Bruchstück verläuft nach den auf S. 241 erwähnten Versuchen wahrscheinlich reversibel.

aber auf keine Weise — selbst nicht bei Anwendung eines großen Überschusses der Komponenten und unter anaeroben Bedingungen — nachgewiesen werden konnte, müßte Oxalcitramalsäure schneller als entstanden weiter zu Citronensäure oxydiert werden.

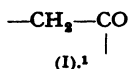
Allerdings sollen sich auch im Gewebe — besonders unter dem Einfluß von Ca^{++} -Ionen — durch Selbstkondensation aus OES Produkte bilden, die wie Citronensäure die Pentabromacetonreaktion geben und möglicherweise Oxalcitramalsäure darstellen (vgl. BREUSCH (419)). Es dürfte sich dabei jedoch um eine unphysiologische Nebenreaktion handeln (418).

MARTIUS beobachtete nun, daß α -Ketobuttersäure, in einer zur BTS und OES äquivalenten Menge dem Gewebe (Herzmuskel) zugefügt, die Citronensäurebildung genau auf die Hälfte reduziert und auch *Acetaldehyd* hemmend auf die Entstehung von Citronensäure aus BTS und OES wirkt. Im letzteren Fall bildet sich als Nebenprodukt *Acetoin* $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}_3$, und zwar in einem der Menge der weniger gebildeten Citronensäure äquivalenten Betrag. MARTIUS deutet das folgendermaßen: Untersuchungen von LONG und PETERS (420) an Gehirnbrei von Tauben ließen erkennen, daß dieses Gewebe BTS und α -Ketobuttersäure unter gleichen Bedingungen gleich rasch angreift. BTS wird dabei größtenteils vollständig, α -Ketobuttersäure bis zur Propionsäure oxydiert. Die hemmende Wirkung des höheren Homologen auf den Abbau der BTS scheint demnach auf derselben Affinität des Enzyms zu beiden α -Ketosäuren zu beruhen (konkurrierende Hemmung), das infolgedessen die zugesetzte BTS nur halb so rasch abzubauen vermag.¹ (Voraussetzung ist allerdings, daß das Enzym schon durch die zugesetzte Menge BTS abgesättigt wird.) Sollte darin die hemmende Wirkung auf die Citronensäurebildung liegen, so folgt, daß nicht BTS, sondern ein Intermediärprodukt ihres Abbaus mit OES reagiert. Dieses Intermediärprodukt ist es nun auch, das vom Acetaldehyd unter Acetoinbildung abgefangen und der Citronensäurebildung dadurch entzogen werden kann.

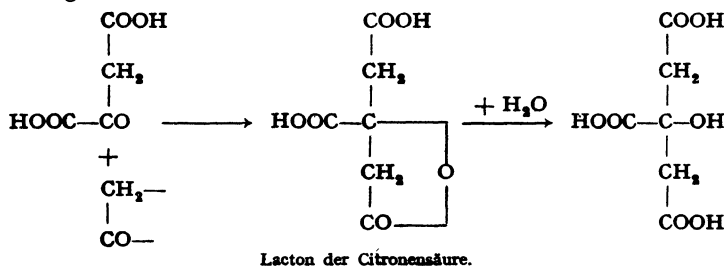
Eine zweite Möglichkeit muß jedoch noch in Betracht gezogen werden. DIRSCHERL (421) zeigte durch in vitro-Versuche, daß auch bei höheren α -Ketosäuren Decarboxylierung zur Bildung von *Acyloinen* führen kann (Butyroin aus α -Ketovaleriansäure). Nach MARTIUS werden BTS und α -Ketobuttersäure nebeneinander abgebaut. Danach könnte ein Teil des aus der BTS entstandenen Intermediärproduktes vor seiner Kondensation mit OES von einem Abbauprodukt der α -Ketobuttersäure unter Acyloinbildung abgefangen werden. Die Wirkung der α -Ketobuttersäure wäre danach völlig analog derjenigen, die MARTIUS zur Erklärung der Hemmung durch Acetaldehyd annahm. Trifft diese Überlegung zu, so müßte unter den Reaktionsprodukten *Äthyl-acetyl-carbinol* oder *Methyl-propionyl-carbinol* gefunden werden.

¹ SMYTH (353) stellte auch eine gegenseitige Hemmung des Abbaus zwischen BTS und α -Ketoglutarinsäure im Herzmuskel fest

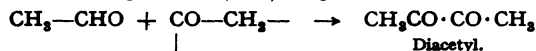
Schon LYNEN (382) sprach auf Grund seiner Versuche mit Hefe die Vermutung aus, daß auch im tierischen Gewebe aus BTS zunächst Essigsäure entsteht, die dann ihrerseits erst die Kondensation mit OES eingeht. Da — wie schon bemerkt wurde — Citronensäurebildung aus *Essigsäure* im Tierkörper nie beobachtet werden konnte, zieht MARTIUS einen auf der *Oxydationsstufe der Essigsäure stehenden Körper* in Betracht (I), entsprechend der allgemeinen Ansicht, nach der die tierische Decarboxylase keine rein decarboxylierende, sondern auch dehydrierende Wirkung entfaltet.



Diese radikal- (keten-)artige Verbindung kann nun mit OES folgendermaßen reagieren:

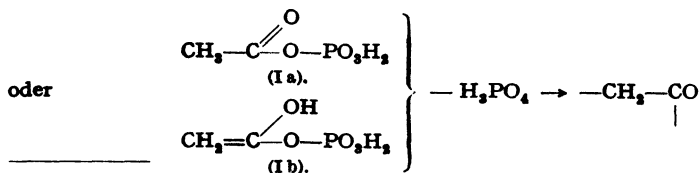


Mit Acetaldehyd findet Kondensation zu *Diacetyl* statt, welches durch Reduktion Acetoin, $\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, liefert.



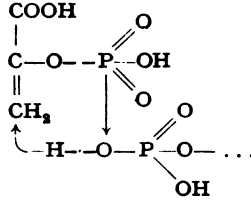
Die Bildung von Acetoin aus Diacetyl würde ihr Analogon in der von NAGEL-SCHMIDT (422) an der Hefe beobachteten, über Acetoin führenden Reduktion von Diacetyl zu β,γ -Butylenglykol haben. Diacetyl wurde von SCHMALFUSS (423) im Blut des Ochsen nachgewiesen. Sein Auftreten im Organismus besagt jedoch noch nichts über seine mögliche Bildung im Stoffwechsel, da es in verschiedenen Nahrungs- und Genußmitteln vorkommt (u. a. auch in Kaffee, Kakao, Milch, Butter, Honig, Bier).

Die formelle Beziehung des von MARTIUS vorgeschlagenen Intermediärprodukts zum *Acetylphosphat* [(Ia) oder (Ib)], welches nach den auf S. 289 gemachten Ausführungen Zwischenprodukt der Dehydrierung der BTS sein soll, ist leicht ersichtlich:

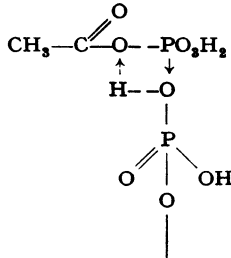


¹ Diese Formulierung soll weniger die Struktur, als die reaktiven Eigenschaften des C_2 -Körpers verdeutlichen.

Ob sich im weiteren Verlauf der Reaktion aus Acetylphosphat ein solcher radikalartiger Körper bildet, hängt vom Mechanismus der Phosphatverschiebung ab. Für die *Phospho-enol-BTS* wird die Umesterung der Phosphorsäure auf das Adenylsäuresystem folgendermaßen angenommen:



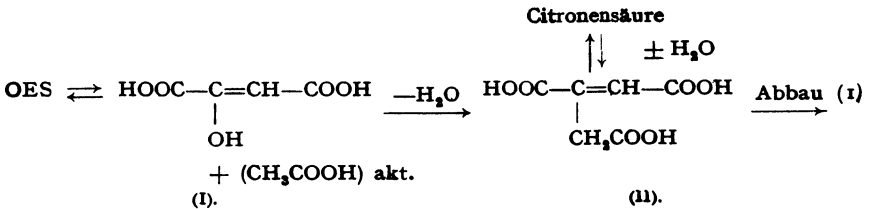
Analog dürfte sich die Übertragung des Phosphats vom Acetylphosphat auf die Adenosindiphosphorsäure gestalten:



Die Bildung radikalartiger Zwischenprodukte träte unter diesen Bedingungen nicht auf.

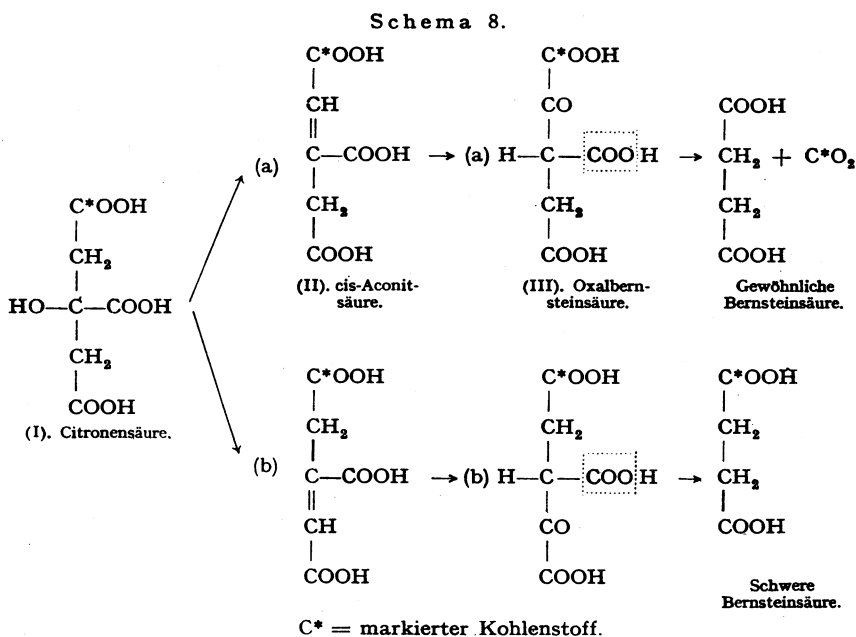
b) *Versuche mit signierter Oxalessigsäure und Trideuterioessigsäure zur Klärung des Kondensationsmechanismus.*

Versuche mit schwerem Kohlenstoff an der Leber. Die Annahme, die Reaktion zwischen OES und der aus BTS gebildeten „aktivierten“ Essigsäure führe direkt zu Citronensäure, ist noch nicht bewiesen. Es wäre nämlich auch eine Umsetzung zwischen *Enol-OES*¹ (I) und „aktivierter Essigsäure“ denkbar, die unter Wasserabspaltung unmittelbar zur *cis-Aconitsäure* (II) führen würde. Citronensäure entstünde somit indirekt über das Gleichgewichtssystem *cis-Aconitsäure* \rightleftharpoons Citronensäure:

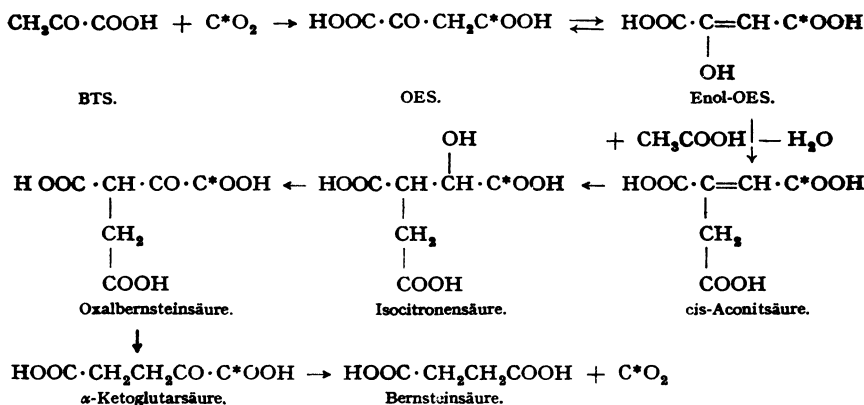


¹ OES liegt nach den Ergebnissen der Bromtitration in wäßriger Lösung zu 30% enolisiert vor (424).

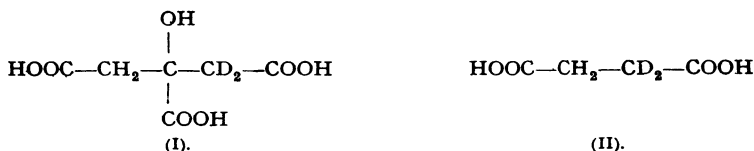
Ein solcher Reaktionsmechanismus ergibt sich nun, mit großer Wahrscheinlichkeit aus den Versuchen von WOOD und Mitarbeitern (367), die den aeroben Abbau von BTS durch Taubenleber in einer Lösung, welche durch ^{13}C -markiertes Natriumhydrogencarbonat enthielt, untersuchten. Merkwürdigerweise enthielt von der durch Malonatzusatz zur Anhäufung gelangten α -Ketoglutar säure und Bernsteinsäure nur die α -Ketoglutar säure schweren Kohlenstoff. Würde nun der Abbau über die symmetrische Citronensäure verlaufen, so hätte man zwei α -Ketoglutar säuren zu erwarten (siehe Schema 8), von denen die eine zu schwerer Bernsteinsäure führen müßte:



Die oxydative Spaltung der isolierten α -Ketoglutar säure in $^{13}\text{CO}_2$ und normale Bernsteinsäure bewies jedoch, daß dieser nur die Struktur (IIIa) zukommt, aus ihr im Organismus gebildete Bernsteinsäure daher keinen schweren Kohlenstoff enthalten kann. Der Abbau der BTS verläuft somit nicht über die symmetrische Citronensäure, sondern höchstwahrscheinlich auf dem von WOOD und Mitarbeitern (367) vorgeschlagenen Weg, welcher hier mit der nach MARTIUS (418) notwendigen Abänderung, wonach nicht BTS, sondern Essigsäure die Kondensation mit OES eingeht, wiedergegeben ist:



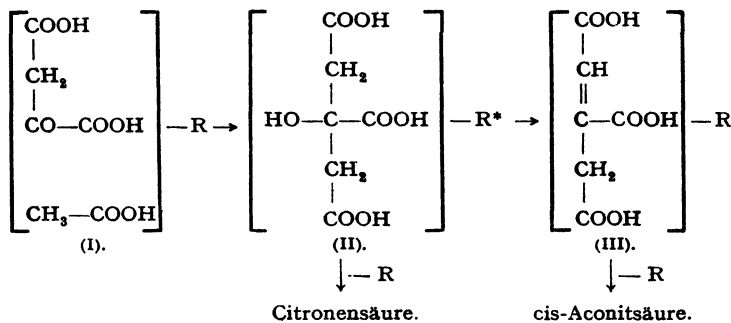
Versuche mit trideuterierter Essigsäure an der Hefe. Den gleichen Schwierigkeiten war man schon vier Jahre vorher begegnet, als in den Versuchen von SONDERHOFF und THOMAS (396) Hefe aus Trideuterioessigsäure, $\text{CD}_3\cdot\text{COOH}$, die zu erwartende zweifach deuterierte Citronensäure (I), aber — was damals nicht erklärt werden konnte — auch di-deuterierte Bernsteinsäure (II) bildete:



Diese Versuche zeigen zugleich, daß an Kohlenstoff (dem keine enolisierbare Ketogruppe benachbart ist) gebundenes Deuterium nicht in nachweisbarem Betrage gegen Wasserstoff ausgetauscht wird, selbst dann nicht, wenn das D-tragende C-Atom an der Reaktion unmittelbar teilnimmt. Im Organismus stattfindende Verdünnungen im D-Gehalt sind daher in solchen Fällen durch Vermischung mit im Körper vorhandenen oder in ihm gebildeten entsprechenden Verbindungen bedingt.

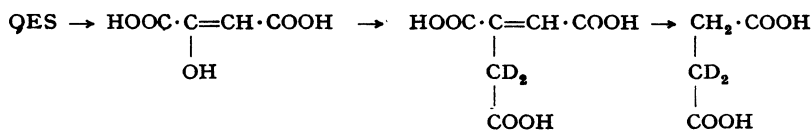
Hätte sich — wie damals angenommen wurde — die Bernsteinsäure aus der Citronensäure (I) gebildet, so wäre (da die Wasserstoff- und die deuteriumtragende Methylengruppe der Citronensäure dem oxydativen Angriff gleichermaßen ausgesetzt sind) im Mittel eine einfach deuterierte Bernsteinsäure zu erwarten gewesen. Andererseits widerlegten diese Befunde endgültig die Annahme, Bernsteinsäure werde in der Hefe durch Dehydrierung zweier Moleküle Essigsäure gebildet, da auf diesem Wege eine vierfach deuterierte Bernsteinsäure resultiert hätte. Es handelt sich somit auch hier darum, eine Formulierung für die zur Bernsteinsäure führende Reaktionskette zu finden, welche die symmetrisch gebaute Citronensäure umgeht. Nach LYNEN (siehe S. 284) ist für die Kondensation der Essigsäure mit OES die „Aktivierung“ des einen oder beider

Kondensationspartner Voraussetzung, ein Vorgang, welcher auf einer stofflichen Veränderung dieser Komponenten beruhen soll, und in einer Verknüpfung mit einem noch unbekanntem Rest gesucht werden muß. Die Kondensation führt somit zu einer Citronensäure, deren Symmetrie durch diesen Rest aufgehoben ist (II). Aus ihr entsteht nun durch einseitigen Wasserentzug eine *pro-Aconitsäure* (III), die unter Abspaltung des Restes R in Aconitsäure übergehen kann:



* Der Rest R ist der einen der beiden $-\text{CH}_2\text{COOH}$ -Gruppen zuzuordnen.

An sich liegt jedoch kein zwingender Grund zur Annahme eines Restes R vor, um den einseitigen Wasserentzug zu verstehen. Auch bei dieser Kondensation besteht ja die Möglichkeit einer direkt unter Wasserabspaltung erfolgenden Synthese [vgl. Reaktion (r), S. 295]. Diese Deutung würde zudem zwanglos die Tatsache erklären, daß die Doppelbindung der *cis-Aconitsäure* immer in den Teil des Moleküls zu liegen kommt, der aus der OES stammt:



Das schließt jedoch keineswegs aus, daß bei der „Aktivierung“ der Kondensationspartner irgendwelche reversiblen Bindungen mit anderen Molekülresten, z. B. Phosphorylierungen, mitspielen. Weniger wahrscheinlich ist hingegen, daß der von LYNEN formulierten „Procitronensäure“ (Formel II, oben) die von WIELAND angenommene Struktur [Formel (I), (II) oder (III), S. 296] zugrunde liegt.

c) Zusammenfassende Betrachtungen über den Reaktionsverlauf bei der Citronensäurebildung.

Für die biologische Synthese von Citronensäure erwies sich OES als unbedingt notwendig und nicht durch andere Verbindungen ersetzbar,

es seien denn solche, die im Organismus in OES übergeführt werden können (BTS, bestimmte Aminosäuren). Hingegen scheinen in bezug auf die zweite Kondensationskomponente Variationsmöglichkeiten zu bestehen. Außer BTS können auch Acetessigsäure (ganz allgemein β -Ketosäuren) und Essigsäure mit OES zur Bildung von Citronensäure führen. Da nun dem Organismus die Fähigkeit zukommt, sowohl BTS als auch Acetessigsäure zu Essigsäure abzubauen, erhebt sich die Frage, ob nicht in jedem Fall Essigsäure die Rolle des zweiten Kondensationspartners übernimmt.

Wie LYNEN bemerkte (315), handelt es sich beim KREBSSchen Cyclus für den Abbau der BTS in tierischen Geweben und den Reaktionen, die in der Hefe für die Oxydation der Essigsäure verantwortlich sind, im Grunde genommen um dieselben Vorgänge. Voneinander abweichendes Verhalten zeigten nur die Reaktionen, die zur Citronensäure führen. Versuche von MARTIUS (418) machen es nun wahrscheinlich, daß auch in dieser Hinsicht keine wesentlichen Unterschiede bestehen: Der „aktivierte“ C_2 -Körper, der in der Hefe mit OES zu Citronensäure zusammentritt, könnte identisch mit dem von MARTIUS angenommenen „ C_2 -Körper auf der Oxydationsstufe der Essigsäure“ sein. Falls nun aber BTS über „aktivierte“ Essigsäure abgebaut wird, gewinnt auch die Annahme, Essigsäure selbst verbrenne in Leber und Niere über den Citronensäurecyclus. Ein Abbau von BTS zu Essigsäure konnte im Gehirn (vgl. S. 277 ff.), in der Leber (425), der Niere (394, 425) und im Hoden (394) nachgewiesen werden.

Es bleibt noch, den Abbau der β -Ketosäuren näher zu betrachten. WIELAND (410) und BREUSCH (415) nehmen an, daß die Bildung der Citronensäure über ein Kondensationsprodukt zwischen OES und der zur Reaktion gelangenden β -Ketosäure führt, welches dann im Fall der Acetessigsäure, Essigsäure, im Fall einer höheren β -Ketosäure die entsprechende höhere Fettsäure abspaltet und in Citronensäure übergeht. Diese Zwischenprodukte sind jedoch rein hypothetischer Natur. Der von WIELAND formulierte Reaktionsmechanismus stützt sich einzig auf den Befund, daß bei Bebrütung eines Gemisches von OES und Acetessigsäure mit Nierengewebe erheblich mehr Sauerstoff verbraucht und Citronensäure gebildet wird, als aus den beiden der Niere getrennt dargebotenen Säuren. (In zahlreichen Versuchen konnte bis zu 80% des eingesetzten Acetacetats an Citronensäure gefunden werden.) Die Theorie BREUSCHS gründet sich auf die von KNOOP bewiesene Tatsache, daß Fettsäuren durch sukzessive paarweise Abspaltung von C_2 -Ketten über die niedrigeren geradzahligen Homologen abgebaut werden und auf die in Gleichung (1), S. 291, formulierte beobachtete Umsetzung der β -Ketosäuren. Auch in diesem Fall ist ein der Kondensation vorangehender Zerfall der Ketosäuren in ein C_2 -Bruchstück („aktivierte“ Essigsäure) und einen rest-

lichen Teil des Moleküls denkbar. Daß Acetat im Tierkörper in allen bisherigen Versuchen zur Citronensäurebildung unwirksam war, widerspricht dieser Überlegung nicht. Der Nachweis eines Intermediärproduktes gelingt nur dann, wenn es rascher gebildet als weiter verändert wird. Die Ansicht BREUSCHS (415), daß intermediär keine Essigsäure entstehe, weil der Warmblütlerorganismus Essigsäure nur in geringem Grade verbrennen kann, ist nicht stichhaltig. Erstens baut gerade die Niere (die ja auch Acetessigsäure besonders leicht angreift) Essigsäure kräftig ab, zweitens beweisen die Versuche von MARTIUS (418) und auch diejenigen von LYNEN (400), daß es sich bei dem C_2 -Körper, der mit OES reagieren soll, um eine „aktivierte“ Essigsäure handeln muß.

Es sei daran erinnert, daß auch die Bildung von Acetessigsäure in der Leber nach KREBS und JOHNSON (vgl. S. 271) rascher in Gegenwart von BTS als mit Essigsäure verläuft, obwohl auch BTS vor der Kondensationsreaktion in Essigsäure übergeht. BERNHARD (426) wies ferner durch Verfütterung von *Hexahydrophenylalanin*, $C_6H_{11}CH_2CH(NH_2)COOH$ zusammen mit *Deuterio-essigsäure* die Bildung von D-haltigem *Acetyl-l-(—)-hexahydrophenylalanin* nach. Diese Versuche zeigen, daß die Acetylierung der Aminosäuren (wie auch die der Essigsäure zu Acetessigsäure) *nicht von der BTS auszugehen braucht*. Auch in diesen Untersuchungen erwies sich jedoch „nascierende“ Essigsäure als reaktionsfähiger. Während die Beteiligung der Deuterio-essigsäure an der Acetylierung 13—25% betrug (berechnet auf Grund des D-Gehaltes der ausgeschiedenen Acetylverbindung), beteiligte sich verfüttertes Deuterio-äthanol zu über 40% an der Acetylierung. Die Verhältnisse sind hier — wenn auch nicht so ausgeprägt — dem zwischen BTS und Essigsäure festgestellten Unterschied in der Reaktionsfähigkeit mit OES durchaus analog. Ein abweichendes Verhalten intermediär gebildeter und dem Gewebe zugesetzter Essigsäure geht übrigens auch deutlich aus den Versuchen WIELANDS (410) hervor, in denen in keinem Fall die geringste Anhäufung von Essigsäure beobachtet werden konnte. Trotzdem muß sie sich, ob nun direkt aus Acetessigsäure oder aus der Citroylessigsäure bzw. Acetylcitronensäure in zur Citronensäure äquivalenten Mengen gebildet haben. Der Reaktionsverlauf über Citroylcitronensäure [(III) S. 290], bei deren Zerfall keine Essigsäure frei würde, setzt für die Acetessigsäure einen besonderen, bei ihren Homologen kaum mehr möglichen Reaktionsmechanismus voraus und ist daher unwahrscheinlich.

Der Nachweis der enzymatischen Bildung von Essigsäure aus Acetessigsäure in Rattenmuskel und Nierenbrei konnte eindeutig durch LEHNINGER (236) geführt werden. Dieser Befund deckt sich ebenfalls mit der Annahme des Acetessigsäureabbaus über Essigsäure, welche anschließend in Anwesenheit von OES über den Citronensäurecyclus weiter oxydiert werden kann.

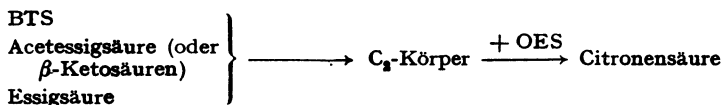
Die nach WIELAND intermediär entstehende „Procitronensäure“ (Citroylessigsäure, Acetylcitronensäure oder Citroylcitronensäure) wurde nicht nachgewiesen. Die Bildung von Citronensäure aus Acetessigsäure und OES ohne organisches Material gelang nicht. Ebensowenig gelang es, die bei der hydrolytischen Spaltung der „Procitronensäure“ freiwerdende Essigsäure nachzuweisen. Man ist somit gezwungen, entweder den

Reaktionsverlauf über Citroylcitronensäure oder die direkte oder indirekte (über Acetessigsäure führende) Kondensation der gebildeten Essigsäure mit OES anzunehmen. Nach den Arbeiten von MARTIUS und von LYNEN dürfte die unmittelbare Reaktion zwischen der nascierenden Essigsäure und OES das wahrscheinlichste sein, was aber zwei verschiedene neben- bzw. miteinander wirkende Citronensäure bildende Enzyme voraussetzt.

Auch BREUSCH hat in seinen Versuchen die hypothetischen Kondensationsprodukte aus OES und β -Ketosäuren nicht nachgewiesen. Wenn nun für die Acetessigsäure ein primärer Zerfall in „aktivierte“ Essigsäure wahrscheinlich ist, so dürfte eine entsprechende Säurespaltung auch bei homologen Verbindungen stattfinden. Auf einen einheitlichen Reaktionsmechanismus weist die Feststellung BREUSCHS hin, daß alle untersuchten β -Ketosäuren unterschiedslos — physiologische und un-physiologische — von den meisten Geweben leicht abgebaut werden.

Die Annahme zweier verschiedener Citronensäure bildender Enzyme (*Citrogenasen*) — die doch sehr zweifelhaft erscheint — erübrigte sich indessen, falls die Citronensäuresynthese allgemein über den von MARTIUS für den Abbau der BTS vorgeschlagenen C_2 -Körper verläuft. Ihre Bildung aus OES und BTS bzw. β -Ketosäuren erforderte dann mindestens drei verschiedene Enzyme: eines für die Ketosäurespaltung, eines, das den Abbau der BTS katalysiert, und ein drittes, die *Citrogenase*, welche die Synthese besorgt. Die Tatsache, daß in der Leber Citronensäurebildung aus Acetessigsäure nur in geringem Maße möglich ist, während die Niere mit diesen Komponenten deutlich höhere Ausbeuten an Citronensäure liefert als mit BTS + OES, fände ihre Erklärung nunmehr darin, daß die Leber hauptsächlich BTS, die Niere besser Acetessigsäure zu dem betreffenden C_2 -Körper abzubauen vermag. Jedenfalls wäre die wechselnde Fähigkeit der Gewebe, zum Teil aus BTS, zum Teil besser aus Acetessigsäure oder anderen β -Ketosäuren Citronensäure aufzubauen, auf dieser Grundlage leicht verständlich.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, daß BTS und Essigsäure auch im tierischen Organismus über denselben C_2 -Körper abgebaut werden dürften, und wahrscheinlich der Acetessigsäureumsatz ebenfalls über dieses Intermediärprodukt verläuft. Der Bildung von cis-Aconit-säure aus OES scheint demnach ein *einheitlicher Kondensationsmechanismus* zugrunde zu liegen, dessen sich die verschiedensten Organismen für den Endabbau der Nahrungsstoffe bedienen:



Möglicherweise ist derselbe C_2 -Körper auch an dem der β -Oxydation entgegengesetzten Prozeß beteiligt, nämlich an der auf S. 241 be-

sprochenen schrittweisen Verlängerung der Fettsäurekette um je 2 C-Atome.

Im Abschnitt über „energetische Kopplung“ (vgl. S. 287) wurde auf die gegenseitige Abhängigkeit exergoner und endergoner¹ Reaktionen aufmerksam gemacht. Dieses Ineinandergreifen simultan verlaufender Prozesse muß nun unbedingt bei der Beurteilung des Abbaus von Intermediärprodukten berücksichtigt werden. Nehmen wir an, die Verbindung A werde im Organismus über das Zwischenprodukt B in den Körper C übergeführt, wobei die beiden Reaktionen $A \rightarrow B$ (exergon) und $B \rightarrow C$ (endergon) energetisch gekoppelt seien. Führt man nun dem Organismus direkt das Zwischenprodukt B zu, so kann er dieses — wenn nicht eine andere Reaktion die energetische Rolle des Vorgangs $A \rightarrow B$ übernimmt — nicht in die Verbindung C überführen. Daher braucht eine im normalen Stoffwechsel entstehende Verbindung, auch wenn die übrigen Bedingungen für den Abbau erfüllt sind (Resorption, Permeabilität, Konzentration usw.) bei direkter Zufuhr nicht angegriffen zu werden. Im Allgemeinen wird es so sein, daß sie — direkt verabreicht — langsamer verschwindet, als nach der Abbaugeschwindigkeit der Vorstufe A zu erwarten wäre. Derartigen Verhältnissen ist man bekanntlich verschiedentlich begegnet und schrieb sie einem „aktivierten“, d. h. besonders reaktionsfähigen Zustand des sich bildenden Moleküls zu. Obwohl man annehmen muß, weitaus die Mehrzahl der in der organischen Chemie bekannten Umsetzungen spiele sich an „aktivierten“ Molekülen ab (aus theoretischen Erwägungen über die Reaktionsgeschwindigkeit), dürfte im biologischen Geschehen die Hauptursache dieses Verhaltens in vielen Fällen — besonders aber wenn es sich um endergone Reaktionen handelt — in der *energetischen Kopplung* und nicht im „aktivierten“ Zustand zu suchen sein. Das Wort „aktiviert“ steht ohnehin nur für einen noch nicht näher bekannten Mechanismus. Ist dieser erforscht, so kann an Stelle dieses Begriffs die für den Mechanismus geltende Vorstellung treten. In Arbeiten über Atmungsfermente bezog sich das Wort „aktivieren“ auf die Aktivierung von Sauerstoff (WARBURG) oder Wasserstoff (WIELAND) durch ein Enzym. In den in dieser Arbeit betrachteten Fällen brachte der Begriff „aktiviert“ die Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit intermediär entstehender, andererseits dem Organismus direkt verabreichter Verbindungen zum Ausdruck und schien mithin eine völlig andere Bedeutung zu haben. Die Aufklärung der Oxydationsprozesse ließ erkennen, daß weder Sauerstoff noch Wasserstoff durch die Atmungskatalysatoren „aktiviert“ wird. Seitdem man nun die Bedeutung der energetischen Kopplung für den Stoffwechsel erkannt hat, erscheint es berechtigt, auch in diesen Fällen das Wesen der „Aktivierung“ im *Zusammenspiel* verketteter Vorgänge zu sehen.

Wie S. 289 gezeigt wurde, dürfte die Citronensäuresynthese mit der Dehydrierung einer Carbonylverbindung energetisch gekoppelt sein. Da nach LYNEN die Bildung der Citronensäure aus BTS über Essigsäure führt, liegt die Annahme nahe, diese Reaktion liefere die für die anschließenden synthetischen Prozesse notwendige Energie. Setzt man nun an Stelle der BTS dem Organbrei Essigsäure zu, so fällt diese Energiequelle weg; die Synthese kann somit — falls nicht von anderer Seite die

¹ CORYELL (427) schlug vor, die Begriffe „exotherm“ und „endotherm“ nur zur Charakterisierung negativer und positiver Wärmetönung ($\pm \Delta H$) zu verwenden und für Änderungen in freier Energie die Begriffe „exergon“ ($-\Delta F$) und „endergon“ ($+\Delta F$) einzuführen.

nötige Energie freigesetzt und zur Verfügung gestellt wird — nicht stattfinden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß ein anaerober Abbau von Essigsäure oder Acetessigsäure nie beobachtet werden konnte, während BTS auch unter diesen Bedingungen verschwindet. Scheinbar sind die zusätzlichen, für den Angriff der Essigsäure und Acetessigsäure notwendigen Umsetzungen an die Gegenwart von Sauerstoff gebunden. Die Bedeutung der Dehydrierung von Carbonylverbindungen für den Abbau von Essigsäure in der Hefe wurde von LYNEN (382) klar hervorgehoben. Daß aber solche Dehydrierungen auch den Acetylierungsvorgang beeinflussen, machen die erwähnten Versuche BERNHARDS und ferner diejenigen von KREBS und JOHNSON (361) über Acetessigsäurebildung aus BTS wahrscheinlich.

5. Bemerkungen zu den Einwänden gegen die Theorie des Citronensäurecyclus.

Die von verschiedener Seite gegen die Theorie des Citronensäurecyclus erhobenen Einwände gründen sich auf folgende Beobachtungen und Überlegungen:

1. Deutliche Anhäufung von Citronensäure konnte nur in Untersuchungen, bei denen die OES-Konzentration unphysiologisch hoch war, nachgewiesen werden. BREUSCH (428) [vgl. auch THOMAS (429)] beobachtete eine *Citronensäurebildung*, die höchstens 2% der umgesetzten OES betrug. 2. Die durch Malonsäure gehemmte Atmung des querstreiften Muskels kann durch Fumarsäure, Äpfelsäure, OES und α -Ketoglutarsäure, nicht aber durch Citronensäure wieder in Gang gebracht werden (430). Ähnliche Befunde wurden mit Herzmuskel (353) und Gehirn erhoben (431). EVANS und SLOTIN (376) stellten in Versuchen, in denen die Bildung radioaktiver α -Ketoglutarsäure in der Leber untersucht wurde, fest, daß zugesetzte Citronensäure keine Verdünnung der gefundenen α -Ketoglutarsäure bewirkte und somit nicht abgebaut wurde. 3. Ein wesentliches Argument der KREBSschen Theorie — die oxydative Bildung von Bernsteinsäure aus OES (bzw. Fumarsäure) über den Citronensäurecyclus — basiert auf der Sperrung der reduktiven Bernsteinsäurebildung aus OES (bzw. Fumarsäure) durch Malonsäure. Nach BARRON (432) ist diese Annahme jedoch nicht genügend gesichert. 4. BREUSCH (419) zeigte, daß Ca^{++} -Ionen in verdünnter wäßriger Lösung die Bildung citronensäureähnlicher die Pentabromacetonreaktion gebender Produkte aus OES bewirken. Solche Kondensationsprodukte sollen sich in Anwesenheit von Ca^{++} auch in tierischen Geweben bilden und Citronensäure daher ein *Kunstprodukt* sein, das durch Ca^{++} -Katalyse bei Bebrütung von Lösungen unphysiologisch hoher OES-Konzentration mit Gewebe entsteht. 5. BREUSCH (433) berechnete ferner den Sauerstoffverbrauch unter der Annahme, daß OES nach der KREBSschen Formu-

lierung in l-(—)-Äpfelsäure übergehe und fand bedeutend höhere O_2 -Mengen, als in seinen im Vakuum ausgeführten Versuchen zur Verfügung standen. Trotzdem erfolgte die Umwandlung von OES in Äpfelsäure praktisch mit derselben Geschwindigkeit, wie unter aeroben Bedingungen. 6. Zudem soll die entgegen dem natürlichen Verlauf des Citronensäurecyclus gerichtete reduktive Umwandlung der OES in l-(—)-Äpfelsäure bis 30mal rascher erfolgen als die Reaktion Citronensäure \rightarrow Äpfelsäure. Auch die Bildung der Äpfelsäure aus α -Ketoglutarinsäure oder Bernsteinsäure verläuft bedeutend langsamer als die Umsetzung zwischen den Endgliedern des Cyclus, OES und Äpfelsäure. Es wäre jedoch zu erwarten, die Umwandlungsgeschwindigkeit zwischen den einzelnen Kettengliedern sei gleich oder größer als die Geschwindigkeit des Umsatzes der ganzen Reaktionskette.

Die Entstehung der Citronensäure aus Fumarsäure über OES widerlegt den Einwand, zur Bildung der Citronensäure wären unphysiologisch hohe Konzentrationen an OES notwendig (434). Seitdem nun neuere Untersuchungen zeigten, daß freie Citronensäure gar nicht in den direkten Verlauf des Cyclus eingeschaltet ist, vielmehr angenommen werden muß, sie bilde sich erst aus der größtenteils dem Abbau unterliegenden cis-Aconitsäure oder über eine an einen Molekülrest R gebundene reaktionsfähige Vorstufe, ist ihre geringe Anhäufung im Gewebe und auch ihre gegenüber den anderen C_4 -Dicarbonsäuren geringe Wirksamkeit auf die Atmung malonsäurevergifteter Gewebe begreiflich. Es sei ferner an das auf S. 287 (vgl. auch S. 302) besprochene Prinzip der energetischen Koppelung erinnert, das möglicherweise auch in diesem Fall an der Ursache der Reaktionsträgheit zugesetzter Citronensäure mitbeteiligt ist. Zudem fand JACOBSON (411), daß Aconitase durch hohe Substratkonzentrationen gehemmt wird (vgl. auch S. 327).

Andererseits kann die anaerobe Bildung von Bernsteinsäure aus OES — auch wenn der Übergang Fumarsäure \rightarrow Bernsteinsäure blockiert ist — nicht durch die Theorie SZENT-GYÖRGYIS, sondern nur durch den *Citronensäurecyclus* erklärt werden. Daß aber in den Experimenten mit Malonsäure dieser Übergang gesperrt war, geht eindeutig aus den Leberversuchen von WOOD und Mitarbeitern (379) mit schwerem Kohlenstoff hervor. Oxydativ über Citronensäure gebildete Bernsteinsäure enthält kein fixiertes CO_2 (367). Hingegen führt die Reduktion schwerer OES zu schwerer Bernsteinsäure. Die Autoren zeigten nun, daß die in Anwesenheit von Malonsäure entstandene Bernsteinsäure keinen oder nur wenig schweren Kohlenstoff enthielt, während in Abwesenheit von Malonat schwere Bernsteinsäure resultierte. Diese Versuche beweisen somit endgültig die Existenz zweier Wege der Bernsteinsäurebildung aus OES (vgl. auch S. 274).

Wie LYNEN (315) an der Hefe zeigte, hemmt Malonat nur den Abbau .

der Essigsäure, nicht aber die Dehydrierung von Alkohol. Auch diese Befunde sind zwanglos auf Grund des Citronensäurecyclus, nicht aber durch die Theorie SZENT-GYÖRGYIS zu erklären.

Schließlich konnte MARTIUS (418) auch die Ansicht BREUSCHS widerlegen, wonach Citronensäure ein Kunstprodukt infolge Selbstkondensation der OES sein soll. Diese Möglichkeit wird durch den Befund ausgeschaltet, daß die Citronensäuresynthese im Organismus einen vollkommen anderen Verlauf nimmt als in den in vitro-Versuchen. Auf die Bedeutung der Citronensäure für den Stoffwechsel weisen ferner Untersuchungen ALWALLS (435) hin. Nach diesem Autor soll beim Kaninchen in den verschiedenen Geweben zwischen der Höhe ihres Citronensäuregehaltes und ihrem Sauerstoffverbrauch ein deutlicher Parallelismus bestehen, da die relativen Werte des Citronensäuregehaltes und des Sauerstoffverbrauches (bezogen auf die Skelettmuskulatur) eine auffallende Übereinstimmung zeigen.

Die Tatsache der anaeroben Umwandlung der OES in l-(—)-Äpfelsäure erlaubt schwerlich einen Entscheid zu fällen, auf welchem Wege letztere gebildet wurde. BREUSCH verwendete in seinen Versuchen 10 g Gewebe und 1 mM OES, aus der 0,8 mM Äpfelsäure resultierten. Falls nicht schon die nötigen Mengen an Wasserstoffacceptoren im Gewebe vorhanden waren, um die 3,2 mM Wasserstoff aufzunehmen, welche im Verlauf der Oxydation der OES über den Citronensäurecyclus zu Äpfelsäure verschoben werden, kann ein Ausgleich der oxydoreduktiven Prozesse wahrscheinlich auch durch teilweise Reduktion der OES stattfinden.

Auch die Versuche BREUSCHS über die Umwandlungsgeschwindigkeit der am Citronensäurecyclus beteiligten Verbindungen in l-(—)-Äpfelsäure können aus verschiedenen Gründen nicht als Beweis gegen die Theorie des Citronensäurecyclus gewertet werden. Erstens hat sich gezeigt, daß tatsächlich zwei Wege der Äpfelsäurebildung aus OES bestehen. Zweitens aber weisen vor allem Citronensäure und α -Ketoglutar säure — deren Abbau wahrscheinlich energetisch mit anderen Reaktionen gekoppelt ist — eine langsame Umwandlung in Äpfelsäure auf.¹ Die Verhältnisse liegen hier vielleicht analog wie bei der Essigsäure, welche dem Gewebe zugesetzt ebenfalls nur schwer abgebaut zu werden vermag. BREUSCH (415) glaubt ferner auf Grund seiner Versuche mit β -Ketosäuren erneut gezeigt zu haben, daß das C₂-Bruchstück, welches zum Aufbau der Citronensäure aus C₄-Dicarbonsäuren nötig ist, nicht aus der BTS stammt. Da die Beobachtungen, die die Bildung der Citronensäure aus BTS und

¹ Oxallessigsäure ist im Gewebe nur in kleinen Konzentrationen existenzfähig, da das Gleichgewicht der Reaktion Oxallessigsäure + Dihydrococymase \rightleftharpoons l-(—)-Äpfelsäure + Cocymase stark nach rechts verschoben ist. Die Dehydrierung der Äpfelsäure wird daher schon durch Zusatz kleinster Mengen Oxallessigsäure vollständig aufgehoben.

OES in Frage stellen, bereits besprochen wurden, braucht hier nicht nochmals darauf eingegangen zu werden.

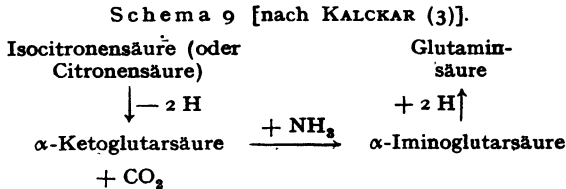
6. Allgemeine Bemerkungen zur bakteriellen Gärung.

Gärung ist, als Ganzes betrachtet, ein exergoner Vorgang. Das schließt jedoch nicht aus, daß einzelne Endprodukte ein höheres Niveau an freier Energie besitzen, als den Ausgangsstoffen zukommt; mit anderen Worten, die Gärung braucht (ebensowenig wie die Atmung) keine ausschließliche Dissimilation zu sein. Beispiele für gleichzeitig Dissimilations- und Assimilationsprozesse einschließende Gärungen sind die alkoholische Gärung und die Fettsäuregärung, während die Glykolyse eine reine Dissimilierung darstellt. Die Begriffe „Dissimilation“ und „Assimilation“ als Ausdruck biologischer Umsetzungen, die unter Ab- bzw. Zunahme an freier Energie verlaufen, sind daher streng von den Begriffen Ab- und Aufbau zu unterscheiden und dürfen auch nicht mit „Oxydation“ und „Reduktion“ gleichgesetzt werden. Ob eine Reaktion exergon (vgl. Fußnote S. 302) oder endergon verläuft, hängt einzig von der Änderung der Stabilität der molekularen Gruppen ab, die sich an der Reaktion beteiligen (3).

Im anaeroben Stoffwechsel (Glykolyse, Gärung), wie er in Bakterien (und tierischen Geweben) entweder aus Mangel an Sauerstoff oder infolge Fehlens sauerstoffaktivierender Enzyme vorkommt, muß jeder Oxydationsstufe¹ eines Nahrungsstoffs A eine Reduktionsstufe einer Verbindung B entsprechen, wobei B aus A gebildet wird. Die Oxydation der Verbindung A liefert den für diesen Prozeß notwendigen Wasserstoffacceptor B, der in weitaus den meisten Fällen eine *Carbonylverbindung* ist (Beispiele: *BTS* → Milchsäure, *Acetaldehyd* → Alkohol, *Acetoin* → β , γ -Butylenglykol, *Acetessigsäure* → β -Oxybuttersäure, *OES* → Äpfelsäure). Jedoch können auch α - oder β -Oxyverbindungen, wie *Milchsäure*, β -*Oxybuttersäure*, *Glycerin*, *Äpfelsäure* und *Acetaldol* reduziert werden, wobei wahrscheinlich deren α , β -ungesättigte Anhydroverbindungen als Wasserstoffacceptoren wirken (*Acrylsäure* $\text{CH}_2=\text{CH}\cdot\text{COOH}$, *Crotonsäure* $\text{CH}_3\cdot\text{CH}=\text{CH}\cdot\text{COOH}$, *Acrolein* $\text{CH}_2=\text{CH}\cdot\text{CHO}$, *Fumarsäure* $\text{HOOC}\cdot\text{CH}=\text{CH}\cdot\text{COOH}$, *Crotonaldehyd* $\text{CH}_3\cdot\text{CH}=\text{CH}\cdot\text{CHO}$). Selbst einige *Fettsäuren* scheinen durch bakterielle Fermente der Reduktion zum entsprechenden Alkohol zugänglich zu sein (*Propionsäure* → Propylalkohol, *Buttersäure* → Butylalkohol). Während somit eine *Dismutation* die Oxydation einer Verbindung durch ihr Anhydrid (oder Ketoform) darstellt, kann die *Gärung* als Oxydation einer Substanz durch das Anhydrid (oder Ketoform) ihres eigenen Oxydationsprodukts (um eine oder zwei Stufen höher oxydiert) charakterisiert werden (3).

¹ Der Ausdruck „Oxydationsstufe“ bedeutet hier Entzug von zwei Elektronen. Entsprechendes gilt für „Reduktionsstufe“.

In diesem Sinne ist die Bildung von *Trimethylenglykol* aus Glycerin, wie sie bei einigen *Aerogenes-Stämmen* beobachtet wurde, als Dismutation, hingegen der Übergang der Isocitronensäure (oder Citronensäure) in *Glutaminsäure* (Schema 9) (436) als Gärung zu bezeichnen:



Man kann prinzipiell zwei Gärungstypen unterscheiden: 1. Das Substrat wird um eine Stufe oxydiert: *Milchsäuregärung*, *alkoholische Gärung* (Nahrungsstoff auf der Oxydationsstufe der „Triose“). 2. Der Nahrungsstoff wird um zwei Stufen oxydiert: *Propionsäuregärung*, *Bernsteinsäuregärung*, *Buttersäure* und *Butanolgärung* (Nahrungsstoff auf der Oxydationsstufe der „Triose“). Auch die *Coligärung*, bei welcher die durch Hydrolyse aus BTS gebildete Ameisensäure zum Teil weiter zu Kohlendioxyd und Wasserstoff (Gas) oxydiert wird, muß zur zweistufigen Gärung gezählt werden (obwohl der letztgenannten Reaktion keine Hydrierungsstufe zu entsprechen braucht).

Nach KALCKAR (3) nimmt nun die *Milchsäuregärung* insofern eine Sonderstellung ein, als bei ihr der Zucker vollständig in eine einzige Verbindung niedrigeren Energieinhalts übergeführt wird (keine Kohlendioxydbildung).¹ In allen anderen Fällen dienen Abbau- oder Kondensationsprodukte der BTS als Wasserstoffacceptoren, wobei BTS folgende weitere Veränderungen erfahren kann:

- a) Decarboxylierung zu Acetaldehyd und CO₂ (alkoholische Gärung);
- b) Hydrolyse zu Ameisensäure und CO₂ (Coligärung);
- c) Oxydation zu Essigsäure und CO₂ (Fettsäuregärung);
- d) Kondensation mit CO₂ zu OES (Bernsteinsäuregärung).

Acetaldehyd braucht ebenfalls nicht direkt als Wasserstoffacceptor zu wirken (*Carbinolbildung* bei der *Aerogenesgärung*). Essigsäure kann weiter oxydativ abgebaut werden oder auch zu sekundären Kondensationsreaktionen wie Acetessigsäurebildung (*Clostridium Butyricum*) oder schließlich zu Acetylierungen Anlaß geben.

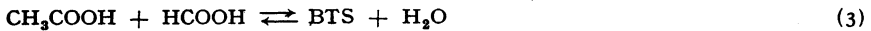
Die Hydrolyse der BTS zu *Ameisensäure* und *Kohlendioxyd* ist hinsichtlich der *Totalsynthese der Zucker* interessant. BARRON und LYMAN (437) wiesen die Bildung von Ameisensäure aus BTS durch *Streptococcus haemolyticus* nach und beobachteten die Abhängigkeit dieser Reaktion vom Vitamin-B₁-Gehalt der Zellen. WOOD und

¹ Ein ähnlicher Fall liegt bei der Vergärung von Glycerin in Propionsäure vor (vgl. S. 308).

Mitarbeiter (439) fanden unter den Abbauprodukten von Galaktose, BTS oder Citronensäure durch *B. coli* in Anwesenheit von schwerem Kohlendioxyd schwere Ameisensäure:



Falls diese Reaktion reversibel verlaufen würde, wäre eine Erklärung der Zuckersynthese aus Kohlendioxyd und Wasser möglich:

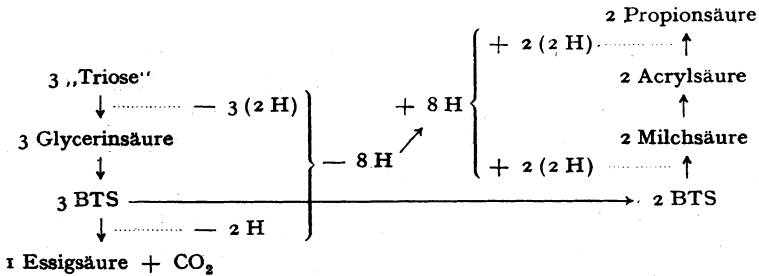


Die Reversibilität der Reaktion (1) wurde 1936 durch Wood (440) an *B. coli* nachgewiesen.

7. Die Propionsäuregärung.

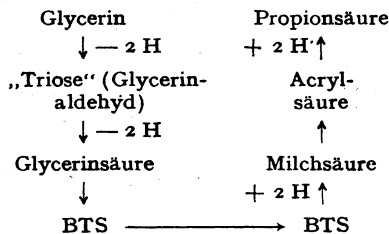
Auf Grund der schon 1890 von FITZ für die anaerobe Umwandlung von Kohlenhydraten in Propionsäure durch *Propionsäurebakterien* gefundenen Beziehung: 3 „Triose“ \rightarrow 2 Propionsäure + 1 Essigsäure + 1 CO_2 und späteren Arbeiten von VIRTANEN (1923) und VAN NIELS (1928) formulierte KALCKAR (3) die Propionsäuregärung folgendermaßen:

Schema 10.



Abweichend von der Milchsäuregärung findet hier eine zweistufige Oxydation der „Triose“ statt und entsprechend unterliegt auch der Wasserstoffacceptor (BTS) einer Reduktion um zwei Stufen (Propionsäure). In Einklang damit steht die Beobachtung von VAN NIELS, wonach Glycerin durch *Propionsäurebakterien* quantitativ in Propionsäure übergeführt wird:

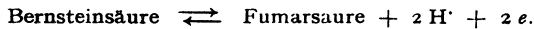
Schema 11.



Ob die Reduktion der Milchsäure zu Propionsäure über *Acrylsäure* verläuft, steht noch nicht fest. Eine direkte Reduktion der Milchsäure erscheint ebenfalls möglich. Das Potential (berechnet aus thermischen Daten) des Systems (3)



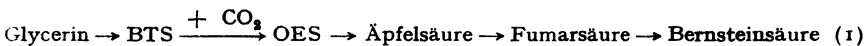
ist annähernd gleich demjenigen des Systems:



MICKELSON und WERKMAN (441) beobachteten die Reduktion von Propionsäure zu *Propylalkohol* durch *Aerobacter*. WOOD und Mitarbeiter (439) fanden bei der Vergärung von Glycerin oder Glucose durch *Propionsäurebakterien* in Anwesenheit von schwerem Hydrogencarbonat unter den gebildeten Produkten neben schwerer Propionsäure schweren Propylalkohol.

a) Bildung der C_4 -Dicarbonsäuren.

WOOD und WERKMAN (442) zeigten, daß *Propionsäurebakterien* in Anwesenheit von Carbonat aus Glycerin dem CO_2 -Verbrauch äquivalente Mengen Bernsteinsäure bilden, wobei die Ausbeuten an Propionsäure entsprechend abnehmen, und schlugen folgenden Reaktionsmechanismus vor:

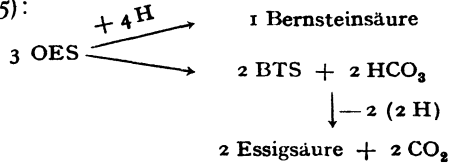


der durch verschiedene Untersuchungen bestätigt werden konnte. WOOD und Mitarbeiter (443) bewiesen die Überführung von Glycerin in BTS und später mit Hilfe von schwerem Kohlenstoff (444) die Fixierung des assimilierten Kohlendioxyds in der Carboxylgruppe der Bernsteinsäure. KREBS und EGGLESTON (445) gelang der Nachweis, daß aus OES oder Glycerin gleichzeitig neben Bernsteinsäure, Äpfelsäure und Fumarsäure gebildet werden, die nach einiger Zeit dann wieder verschwinden, während die Bernsteinsäurebildung weiter zunimmt. Ferner zeigten diese Autoren, daß die Abbaugeschwindigkeit der Zwischenprodukte mit der des Glycerins in Einklang steht. Entsprechende Resultate wurden mit *E. coli* erhalten (364).

Schon 1935 stellten GLADSTONE und Mitarbeiter (446) fest, daß *E. coli* in kohlendioxydfreiem Medium nicht zu wachsen vermag. ELSDEN (447) beobachtete die Abhängigkeit der Bernsteinsäurebildung aus Glucose oder BTS vom CO_2 -Druck. RUBEN und KAMEN (365) gelang dann mit radioaktivem Kohlenstoff der Nachweis der CO_2 -Assimilierung durch *E. coli*.

Die für den Abbau der OES durch *Propionsäurebakterien* gefundenen Werte an Bernsteinsäure, freiem Kohlendioxyd und Hydrogencarbonat machen es wahrscheinlich, daß als reduktives Äquivalent der Oxydation

zweier Moleküle OES (bzw. BTS) ein Molekül Bernsteinsäure aus OES gebildet wird (445):



(Dieser Vorgang kann als *Dismutation* aufgefaßt werden.)

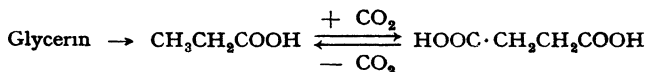
Vermutlich kann jedoch OES auch durch Dehydrierung anderer intracellulärer Verbindungen oder durch weitere oxydative Veränderungen der Essigsäure zu Bernsteinsäure reduziert werden. Dieser Umstand könnte die etwas höheren als theoretisch zu erwartenden Werte an gefundener Bernsteinsäure und Kohlendioxyd erklären.

Die der OES nahestehenden Verbindungen *Mesoxalsäure* $\text{HOOC} \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH}$ und α -*Ketoglutar säure* werden nach KREBS und EGGLESTON (445) durch *Propionsäurebakterien* nicht angegriffen.

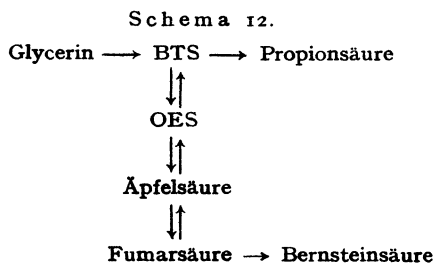
Versuche von SLADE und Mitarbeitern (448) mit *Aerobacter Indologenes*, *Staphylococcus candidus*, *Streptococcus paracitrovorus*, *Proteus vulgaris* und *Clostridium welchii* führten in Anwesenheit von $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ ebenfalls zu schwerer Bernsteinsäure. Ausnahmen sind nicht bekannt, was auf die allgemeine Bedeutung der Bernsteinsäurebildung durch Assimilierung von Kohlendioxyd hinweist.

b) *Zur Bildung der C₃-Körper (Propionsäure, BTS und Milchsäure).*

CARSON und RUBEN (449) wiesen in ihren Untersuchungen mit signiertem Kohlendioxyd den Kohlenstoff ^{14}C nicht nur in der aus Glycerin gebildeten Bernsteinsäure, sondern auch in der *Propionsäure* nach. Dieser Befund beweist das Stattfinden reversibler Carboxylierungen und Decarboxylierungen zwischen C_3 - und C_4 -Körpern. Da für die von den Autoren zunächst in Betracht gezogene Austauschreaktion zwischen Bernsteinsäure und Propionsäure



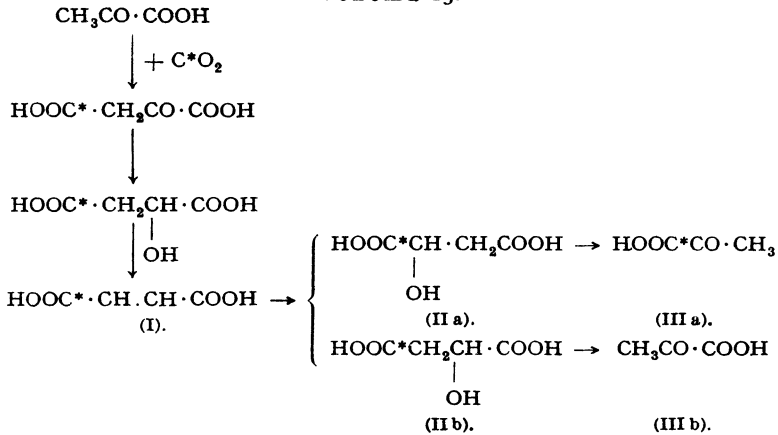
kein Beweis erbracht werden konnte, wurde von ihnen folgender Reaktionsverlauf angenommen:



Bei der Überprüfung der Umsetzungen, die zu einer in der Carboxylgruppe schweren BTS führen könnten, schied auch die Möglichkeit eines Austauschs der Carboxylgruppe der BTS aus, da in Versuchen mit Hefecarboxylase und $^{14}\text{C}^*\text{O}_2$ (450) oder $^{13}\text{C}^*\text{O}_2$ (451) ein solcher Austausch nicht beobachtet werden konnte.

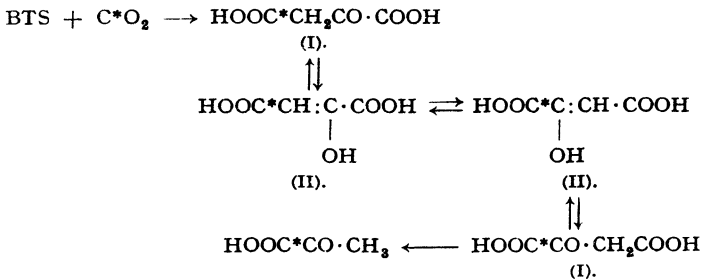
Die zur „radioaktiven“ oder „schweren“ Propionsäure führenden Umsetzungen müssen danach über die symmetrisch gebaute Fumarsäure (I) verlaufen, da nur aus Äpfelsäure der Struktur (IIa) markierte BTS (IIIa) hervorgehen kann:

Schema 13.



C* bedeutet markierter Kohlenstoff.

Die Reversibilität der OES-Synthese wurde endgültig durch Versuche von KRAMPITZ und WERKMAN (452) sichergestellt. Diese Autoren bewiesen mit Hilfe eines aus *Mikrococcus lysodeikticus* isolierten Enzyms, das OES zu decarboxylieren vermag, den Austausch der der Methylengruppe benachbarten Carboxylgruppe der OES mit markiertem Kohlendioxyd des Mediums. Hingegen bestehen noch Zweifel, ob der weitere Verlauf der Reaktion nach Schema 12 (S. 310) verläuft. SLADE und Mitarbeiter (448) ziehen die Möglichkeit eines symmetrischen Platzwechsels der schon von MEYERHOF beweglich gedachten Hydroxylgruppe der Enol-OES (II) in Betracht:



1941 zeigten SLADE und Mitarbeiter (453), daß eine Fixierung von Kohlendioxyd auch in der durch verschiedene Bakterien gebildeten *Milchsäure* stattfindet. Später gelang mit schwerem Kohlenstoff die Lokalisierung des assimilierten Kohlendioxyds in der Carboxylgruppe der Milchsäure nachzuweisen (Oxydation der Milchsäure durch Permanganat zu Acetaldehyd und Kohlendioxyd) (448). In Anwesenheit von $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ gebildete Milchsäure enthält fast immer schweren Kohlenstoff in der Carboxylgruppe. Nur wenige Mikroorganismen sind bisher bekannt (*Streptococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*), welche zu dieser CO_2 -Assimilierung nicht befähigt sind. Wie bereits erwähnt wurde (S. 275), konnte das Auftreten schwerer Milchsäure auch in der Leber nachgewiesen werden. Ebenso enthielt unter diesen Bedingungen gebildete *Propionsäure* ^{13}C in ihrer Carboxylgruppe.¹ Die beiden bisher zur Erklärung dieser Erscheinung in Betracht gezogenen Umsetzungen (vgl. S. 310 und 311), welche über schwere BTS führen, sind zwar vom chemischen Standpunkt aus gesehen plausibel, können jedoch die quantitativen Beziehungen zwischen den ^{13}C -Werten in den C_3 - und C_4 -Körpern kaum verständlich machen. Verschiedentlich wurde schon darauf hingewiesen, daß aus schwerer BTS gebildete C_4 -Dicarbonsäuren in beiden Carboxylgruppen schweren Kohlenstoff enthalten müßten und somit höhere ^{13}C -Werte in diesen Verbindungen zu erwarten wären, als experimentell gefunden wurden. Jedenfalls sollte, falls sowohl die C_3 -Körper als auch die C_4 -Dicarbonsäuren aus BTS gebildet werden, eine Beziehung zwischen ihren ^{13}C -Werten bestehen. Auch diese Forderung ist nicht erfüllt. SLADE und Mitarbeiter (448) beobachteten ferner, daß *Streptococcus paracitrovorus* aus Glucose und Citronensäure schwere Bernsteinsäure bildet; andererseits war aber nur die durch Vergärung der Glucose entstandene Milchsäure markiert, nicht hingegen die aus Citronensäure gebildete. Die Reaktion $\text{BTS} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{OES}$ muß somit in beiden Fällen (in beiden Richtungen) stattgefunden haben (ein anderer Mechanismus zur Bildung schwerer C_4 -Dicarbonsäuren ist nicht bekannt). Warum diese aber das eine Mal zu schwerer, das andere Mal zu gewöhnlicher BTS führte, ist nicht verständlich. Obwohl diese Befunde die von CARSON und RUBEN (vgl. S. 310) und SLADE und Mitarbeitern (vgl. S. 311) vorgeschlagenen Reaktionsmechanismen nicht ausschalten, machen sie es doch wahrscheinlich, daß noch ein zweiter, nicht direkt über BTS führender Weg zur Bildung schwerer C_3 -Körper besteht.

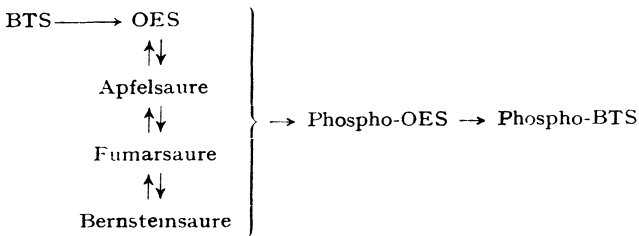
Ein Austausch des Carboxylkohlenstoffs in der Milchsäure findet auch im Verlauf ihrer Reduktion zu Glykogen statt. CONANT und Mitarbeiter (454) wiesen nach Verfütterung in der Carboxylgruppe radioaktiver Milch-

¹ Hingegen waren, wie zu erwarten, gebildete *Buttersäure* und auch *Butylalkohol* frei von schwerem Kohlenstoff, da deren Synthese über einen C_2 -Körper verläuft.

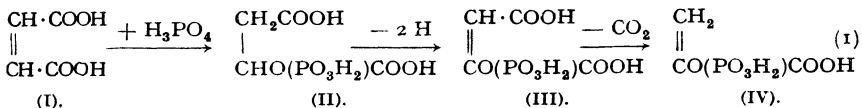
säure (Milchsäure I) an Ratten im gebildeten Leberglykogen nur 1,6% der Aktivität der verabreichten Verbindung nach, obwohl 32% der zugeführten Milchsäure an der Glykogenbildung teilnahmen. Aus weiteren Versuchen (455), in denen gewöhnliche Milchsäure (oder Glucose) zusammen mit $\text{NaH}^{11}\text{CO}_3$ verabreicht wurde, geht hervor, daß es sich in den vorhergehenden Versuchen nicht um einen bloßen „Verdünnungseffekt“ handeln konnte, da auch in diesen beiden Fällen radioaktives Glykogen gebildet wurde. Im Mittel stammten 11,4% (Milchsäure) bzw. 13,1% (Glucose) des gebildeten Glykogenkohlenstoffs aus Kohlendioxyd. Die höchsten gefundenen Werte überschritten die Grenze 16,7% entsprechend einem aus Kohlendioxyd stammenden C-Atom pro Glucosemolekül nicht. Daß die Hälfte des Carboxylkohlenstoffs der Milchsäure im Verlauf der Glykogensynthese ausgetauscht wird, bestätigen Versuche (456) mit Milchsäure, in welcher der radioaktive Kohlenstoff auf die α - und β -C-Atome verteilt war (Milchsäure II). Unter diesen Bedingungen wird prozentual doppelt soviel ^{11}C im Glykogen fixiert.

Die einzelnen Stufen des Übergangs des HARDEN-YOUNG-Esters in Milchsäure sind mit der einzigen Ausnahme der Überführung der Phospho-BTS + Adenosindiphosphat in BTS und Adenosintriphosphat reversibel. (Es ist nicht möglich, aus Adenosintriphosphat und BTS rückgängig zu Phospho-BTS zu gelangen) Jedoch kann, wie FERDMANN und EPSTEIN (457) am Muskel, KALCKAR (458) an Leber und Niere gefunden haben, unter aeroben Bedingungen aus Milchsäure oder Äpfelsäure [in Leber und Niere kann Milchsäure in Äpfelsäure übergehen (380)] durch eine noch unbekannte Reaktion Phospho-BTS entstehen, so daß mit Sauerstoff die irreversible Stufe der Glykolyse umgangen werden kann.

VENNESLAND und Mitarbeiter nehmen folgende mit ihren Versuchen in Einklang stehende Reaktionskette an:

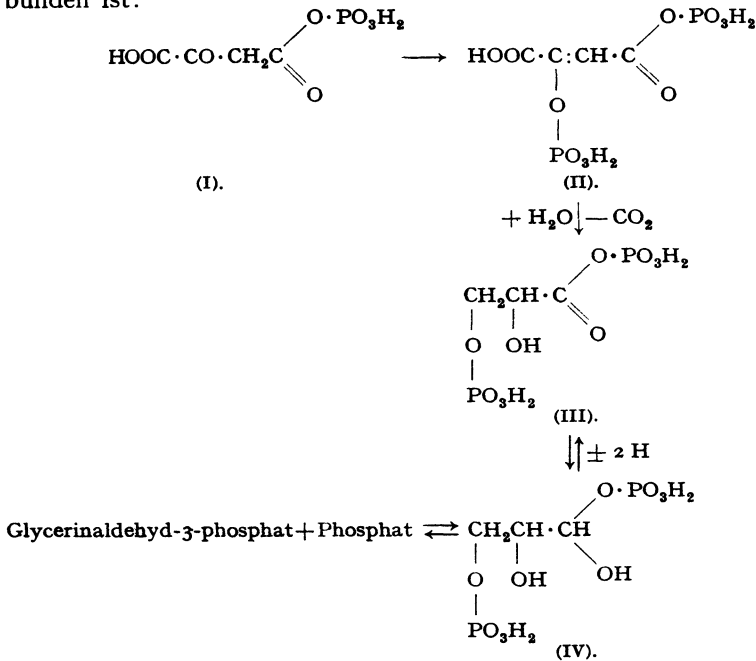


LIPMANN (459) und KALCKAR (3) formulierten den zur Phospho-BTS führenden Reaktionsmechanismus wie folgt:



Das von VENNESLAND und Mitarbeitern vorgeschlagene Schema ist ähnlich demjenigen, das von CARSON und RUBEN (vgl. Schema 12, S. 310)

zur Bildung schwerer Propionsäure angenommen wurde. Es läßt jedoch die Frage offen ob BTS über OES zurückgebildet wird oder unter Abkürzung des Reaktionsweges aus einer der drei anderen C_4 -Dicarbonsäuren hervorgehen kann, wie es z. B. bei dem von LIPMANN und von KALCKAR vorgeschlagenen Prozeß der Fall ist. Erinnert sei ferner an die von LYNEN in Erwägung gezogene Bildung der OES aus BTS und Kohlensäurephosphatester (S. 276), die direkt zu OES-I-phosphat (I) führen würde. Von dieser Verbindung wäre ein Weg zu der wichtigen, von NEGELEIN und BRÖMEL (460) isolierten *1,3-Diphosphoglycerinsäure* (III) denkbar, welcher durch reversible — wahrscheinlich über 1,3-Diphosphotriose (IV) führende — Reaktionen mit *Glycerinaldehyd-3-phosphat* verbunden ist:



1,3-Diphosphotriose stellt wahrscheinlich den „aktiven“ Zucker dar (3).

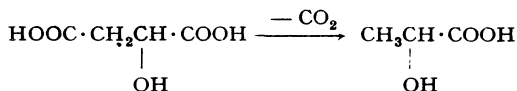
Die Annahme der Bildung der C_3 -Körper aus Äpfelsäure, Fumarsäure oder Bernsteinsäure hat daher viel für sich, weil sie notwendig einen 50%igen Austausch der Carboxylgruppe der C_3 -Körper zur Folge hätte. WOOD und Mitarbeiter (439) zogen aus diesem Grunde die Bildung von Propionsäure durch Decarboxylierung der Bernsteinsäure in Betracht (eine Annahme, die sich jedoch als unrichtig erwies). Es zeigte sich nämlich auch bei den Versuchen dieser Autoren, daß der ^{13}C -Gehalt der Carboxylgruppe der gebildeten Propionsäure demjenigen der Carboxyl-

gruppen der Bernsteinsäure genau entsprach (Tabelle 3). Auch die in den Versuchen von SLADE und Mitarbeitern (448) ermittelten ¹³C-Werte der Bernsteinsäure und Milchsäure lassen einen solchen Zusammenhang erkennen (Tabelle 3). Ferner stimmen die in einem anaeroben Versuch mit Lebergewebe von WOOD und Mitarbeitern (439) direkt bestimmten ¹³C-Werte der Carboxylgruppen der Äpfelsäure und Milchsäure ebenfalls befriedigend überein (Äpfelsäure 1,74% ¹³C, Milchsäure 1,78% ¹³C).

Diese Zusammenstellung zeigt, daß die C₃-Körper im allgemeinen nahezu 50% ihres Carboxyl-C austauschen. Da Milchsäure jedoch auf anderem Wege gebildet werden kann (Glykolyse, Reduktion von BTS), sind die teilweise tieferen Werte verständlich. Es besteht somit die Möglichkeit der Milchsäurebildung durch direkte Decarboxylierung von Äpfelsäure [oder ihres phosphorylierten Produkts (II) Gleichung (1), S. 313]:

Tabelle 3

	Berechnet	Gefunden
Milchsäure % ¹³ C	1,48	1,36
	1,21	1,17
	1,19	1,19
	1,36	1,18
Propionsäure % ¹³ C	1,46	1,48
	1,22	1,23

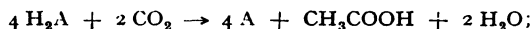


Auf dieser Grundlage wäre nun auch die Beobachtung von SLADE und Mitarbeitern (448) verständlicher, daß *Streptococcus paracitrovorus* aus Glucose, nicht aber aus Citronensäure, schwere Milchsäure bildet, obwohl in beiden Fällen schwere Bernsteinsäure resultierte. Die Decarboxylierung von Äpfelsäure oder Fumarsäure scheint nicht immer stattzufinden. Daher braucht auch die Tatsache, daß einzelne Mikroorganismen kein Kohlendioxyd in der gebildeten Milchsäure fixieren, nicht auf einem völligen Unvermögen zur Kohlensäureassimilation zu beruhen.

c) Bildung der Essigsäure.

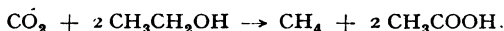
Daß der Bildung von Essigsäure in den verschiedenen Mikroorganismen kein einheitlicher Mechanismus zugrunde liegt, wurde schon durch frühere Versuche nahegelegt und in den letzten Jahren mit der *Isotopentechnik* eindeutig bewiesen. Kürzlich zeigten SLADE und Mitarbeiter (448, 453) die Fixierung von schwerem Kohlendioxyd in der Carboxylgruppe der durch *Aerobacter* und *Clostridium welchii* gebildeten Essigsäure. Anders liegen die Verhältnisse bei der durch BARKER und Mitarbeiter (461) an *Clostridium acidi-urici* mittels radioaktivem Kohlenstoff erforschten Essigsäurebildung, welche zu einer in der Methyl- und der Carboxylgruppe ¹⁴C-haltigen Essigsäure führt und eine Reduktion von Kohlendioxyd zu Essigsäure unter gleichzeitiger Oxydation von Harnsäure darstellt. WIERINGA (462) wies die Reduktion von Kohlendioxyd zu Essigsäure mit

gasförmigem Wasserstoff durch *Clostridium aceticum* nach. Die allgemeine Reaktionsgleichung für diesen Prozeß kann folgendermaßen formuliert werden. (463)



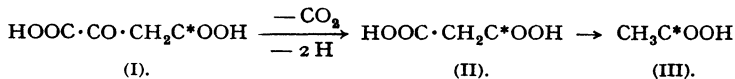
wobei AH_2 irgendein Wasserstoffdonator, A dessen Oxydationsprodukt darstellt.

Essigsäure bildet sich ferner als oxydatives Äquivalent bei der an *methanbildenden Bakterien* beobachteten Reduktion von Kohlendioxyd zu Methan (284):

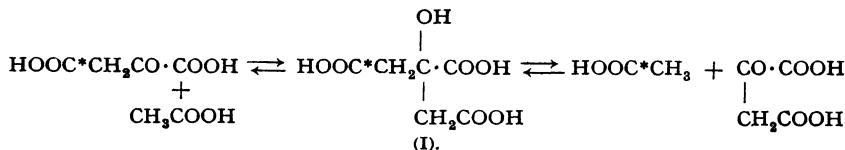


Eine Reduktion von Essigsäure zu Äthanol konnte bisher nicht beobachtet werden. In den Versuchen von SLADE und Mitarbeitern (448) enthielt gebildeter Äthylalkohol in keinem Fall (auch nicht, wenn schwere Essigsäure entstand) schweren Kohlenstoff.

Die von SLADE und Mitarbeitern in schwerer Essigsäure nachgewiesenen Werte an ^{13}C waren, verglichen mit denjenigen, die sich in markierter Bernsteinsäure und Milchsäure vorfanden, verhältnismäßig tief. Da ein Teil der gebildeten Essigsäure wahrscheinlich durch Oxydation von BTS entstanden war, dieser Vorgang aber selbst dann, wenn schwerer Kohlenstoff in der Carboxylgruppe der BTS vorhanden ist, nicht zu schwerer Essigsäure führt, ist der geringe ^{13}C -Gehalt der Essigsäure verständlich. Über den zur schweren Essigsäure führenden Reaktionsmechanismus sind noch keine gesicherten Aussagen möglich. SLADE und Mitarbeiter zogen folgende Möglichkeiten in Betracht: 1. Bildung einer schweren C_4 -Dicarbonsäure nach WOOD und WERKMAN, die dann in zwei C_2 -Bruchstücke zerfällt. 2. Oxydativer Abbau der OES (I) durch α -Decarboxylierung und Dehydrierung zu Malonsäure (II), welche weiter zu Essigsäure (III) decarboxyliert wird:



3. Abspaltung eines C_2 -Bruchstückes aus einem Intermediärprodukt des Stoffwechsels, das mehr als 4 C-Atome enthält, z. B. Citronensäure (I):



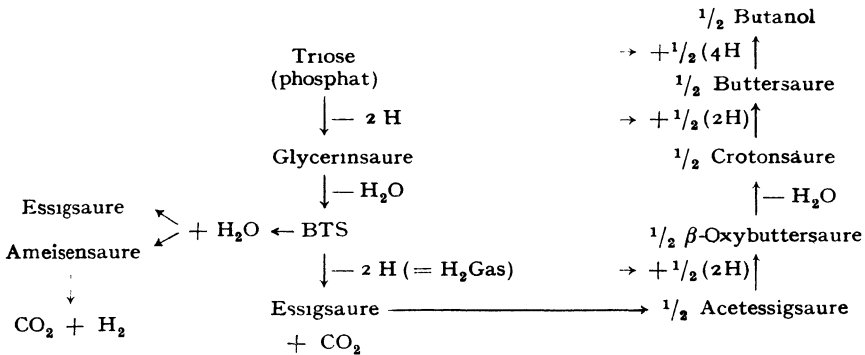
Die ersten zwei in Erwägung gezogenen Umsetzungen setzen bisher noch nicht beobachtete Vorgänge voraus. Hingegen konnte der Zerfall von Citronensäure in OES und Essigsäure bei verschiedenen Citronensäure

vergärenden Mikroorganismen festgestellt werden (vgl. S. 324 ff.). Dieser Befund und die im Abschnitt 9 angeführten Ergebnisse stützen die Annahme der Bildung markierter Essigsäure aus schwerer Citronensäure.

8. Die Buttersäure- und Butanolgärung.

Über die Bildung von Fettsäuren aus Kohlenhydraten im tierischen Organismus ist wenig bekannt. Untersuchungen bakterieller Gärungen, in denen Fettsäuren entstehen, können indessen einige Hinweise auf die dabei beteiligten Reaktionsmechanismen geben und sind aus diesem Grunde von hohem Interesse. Bakterielle Umwandlungen von Zucker in Fettsäuren, selbst die Bildung von Capronsäure aus Alkohol, sind *Energiequellen* für das Bakterienwachstum (3).

Clostridium butyricum vergärt Zucker unter Bildung von 1 Äquivalent Buttersäure, 2 Äquivalenten Kohlendioxyd und 2 Äquivalenten Wasserstoff. Daneben entstehen wechselnde Mengen Essigsäure. Falls Butanol gebildet wird, tritt kein Wasserstoff auf (Buttersäure + 2 H₂ = Butanol). Auf Grund der Untersuchungen von FERNBACH an *Clostridium acetobutyricum* dürfte die Buttersäuregärung folgendermaßen verlaufen (3):



Die Triose unterliegt (abweichend von der Propionsäuregärung) vollständiger Oxydation zu Essigsäure und Kohlendioxyd (zweistufige Gärung). Erst an letzterer, bzw. ihrem Kondensationsprodukt, *Acetessigsäure*, setzen daher die reduktiven Vorgänge an. Acetessigsäure übernimmt die Rolle der BTS in der Propionsäuregärung, *Crotonsäure* CH₃CH:CH·COOH, die der Acrylsäure CH₂:CH·COOH. Entsprechend der Reduktion von Propionsäure zu Propylalkohol kann auch bei der Buttersäuregärung *Butylalkohol* gebildet werden. Die Reduktion von Crotonsäure zu Buttersäure wurde von BERNHAUER (464) gezeigt. Infolge der Koppelung dieser Vorgänge kann zugesetzte Acetessigsäure nicht mehr in Buttersäure übergeführt werden (vgl. hierzu S. 302).

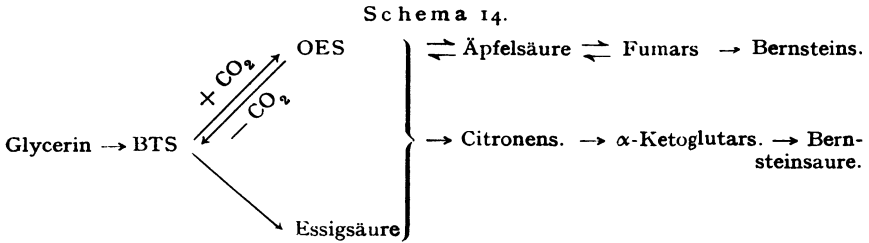
Essigsäure geschüttelt werden (37°), eine 300%ige Steigerung des Sauerstoffverbrauchs gegenüber einer Probe ohne Substratzusatz auf. Damit dürfte die Fähigkeit dieser Organismen, Essigsäure anaerob und aerob abzubauen, weitgehend gesichert sein. Hingegen ist der Mechanismus dieser Oxydation noch unklar.

Nach KREBS (445) bewirkt Essigsäurezusatz bei *Propionsäurebakterien* unter anaeroben Bedingungen vermehrte Bernsteinsäurebildung aus OES. Entsprechende Verhältnisse fanden SLADE und Mitarbeiter (448) bei *Citrobacter*. WOOD und Mitarbeiter (439) beobachteten in zahlreichen Versuchen, daß bei der Vergärung von BTS durch *E. coli* äquivalente Mengen C₁- und C₂-Körper resultieren, obwohl ein Teil des gebildeten Kohlendioxyds zur Synthese von C₄-Dicarbonsäuren verbraucht wird.

Es ist klar, daß unter anaeroben Bedingungen ein der Oxydation der Essigsäure entsprechendes reduktives Äquivalent gebildet werden muß. Auf Grund dieser Forderung erklärt KREBS die vermehrte Bernsteinsäurebildung aus OES nach Zusatz von Essigsäure. Neben dieser Koppelung zwischen reduktiven und oxydativen Prozessen besteht nach den Versuchen von WOOD und Mitarbeitern (439) offenbar auch eine Beziehung zwischen der Oxydation der Essigsäure und der Assimilierung von Kohlendioxyd, die auf Grund der bisherigen Kenntnisse vom Bakterienstoffwechsel nicht verständlich ist.

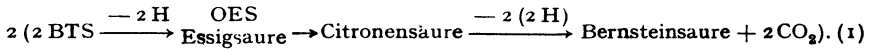
Propionsäurebakterien führen die aus Glycerin gebildete BTS zum Teil in Propionsäure, zum Teil in Bernsteinsäure über, reduktive Prozesse, die gleichfalls mit oxydativen Vorgängen gekoppelt sind. KREBS und EGGLESTON (445) nehmen an, dem zur Bernsteinsäure führenden Reaktionswege komme die Bedeutung zu, der Zelle die als Atmungskatalysatoren notwendigen C₄-Dicarbonsäuren zur Verfügung zu stellen. Für die Hefe konnte indessen LYNEN (400) zeigen, daß die C₄-Dicarbonsäuren nicht als Wasserstoffüberträger in das Atmungssystem der Zelle eingeschaltet sind, sondern als „Katalysatoren“ des Essigsäureabbaus im Sinne des KREBSschen Cyclus wirken (vgl. S. 286). Auch bei *Propionsäurebakterien* und *B. coli* muß mit der Möglichkeit eines solchen Wirkungsmechanismus gerechnet werden. (Auf analoge Erscheinungen im Stoffwechsel der Hefe und *B. coli* wird weiter unten noch eingegangen [S. 329]). Ob die Übertragung des Citronensäurecyclus auf den Stoffwechsel der Bakterien gerechtfertigt ist, müssen erst weitere Versuche beweisen. Hier soll lediglich gezeigt werden, inwiefern bisherige Erfahrungen dafür sprechen.

Vorausgesetzt, Essigsäure werde auch durch Bakterien über den *Citronensäurecyclus* abgebaut, wäre das von WOOD und Mitarbeitern entworfene Schema [S. 309, Gleichung (1)] folgendermaßen zu ergänzen:

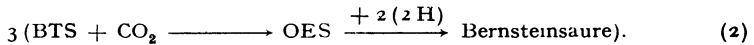


Ein Teil der gebildeten OES könnte bei der anaeroben Oxydation der Essigsäure als *Wasserstoffacceptor* wirken und dabei in Bernsteinsäure übergehen.

Die *oxydativen Prozesse* beim Abbau der BTS wären dann folgende:



Als *reduktives Äquivalent* müssen drei Moleküle OES in Bernsteinsäure überführt werden:

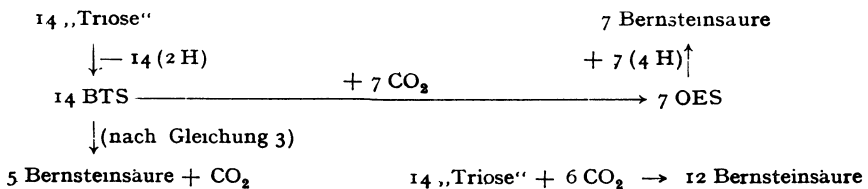


Unter der Voraussetzung, daß OES und Äpfelsäure (bzw. Fumarsäure) die einzigen Wasserstoffacceptoren bei dieser Gärung sind, kann somit folgende Bilanzgleichung aufgestellt werden:

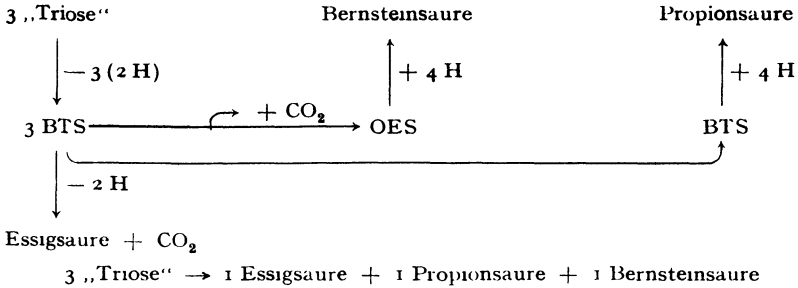


Von den fünf Molekülen Bernsteinsäure sind drei auf reduktivem, zwei auf oxydativem Wege entstanden. Dadurch, daß die gebildete Essigsäure zu Kohlendioxyd abgebaut wurde, tritt trotz der OES-Bildung (Assimilierung von Kohlendioxyd) eine Zunahme von Kohlendioxyd auf, wie sie in zahlreichen Versuchen beobachtet werden konnte.

Während für den Abbau der BTS der Grenzfall der totalen Überführung des Substrats in Bernsteinsäure (und Kohlendioxyd) theoretisch (in bezug auf die oxydoreduktiven Vorgänge) möglich ist [Gleichung (3)], kann ein solcher Prozeß bei Verwendung von Zucker als Gärsubstrat nur in Anwesenheit von *Hydrogencarbonat* stattfinden:



In Abwesenheit von *Hydrogencarbonat* ist die maximal resultierende Menge Bernsteinsäure äquivalent der gebildeten Menge an Propionsäure:



Damit unter diesen Bedingungen Essigsäure abgebaut werden kann, muß die relative Propionsäuremenge weiter zunehmen (gebildete Propionsäure zu gebildeter Bernsteinsäure > 1).

In Anwesenheit von Hydrogencarbonat spielt es, vom Standpunkt eines oxydoreduktiven Ausgleichs der Prozesse aus gesehen (nicht aber unter Berücksichtigung der thermodynamischen Verhältnisse), keine Rolle, ob OES oder BTS als Wasserstoffacceptor dient.

Diese Überlegungen sollen weniger die in Wirklichkeit viel komplexeren Verhältnisse bei der Propionsäuregärung wiedergeben, als den Einfluß verschiedener Faktoren (Oxydationsstufe des Substrats, Stattfinden eines Abbaus der gebildeten Essigsäure, Kohlendioxydkonzentration des Mediums) auf die Bildung von Propionsäure und das Verhältnis zwischen oxydativ und reduktiv entstandener Bernsteinsäure verdeutlichen. Da nach der hier gemachten Annahme OES für den Abbau der Essigsäure unbedingt notwendig ist, erstere aber aus BTS und Kohlendioxyd synthetisiert werden muß, erscheint auf dieser Grundlage eine Beziehung zwischen Essigsäureabbau und CO₂-Assimilierung, wie sie von WOOD und Mitarbeitern (439) beobachtet wurde, verständlich.

KREBS (445) zeigte, daß Zusatz kleiner Mengen *Fumarsäure* zu einer gewaschenen Zellsuspension von *Propionsäurebakterium Shermanii* die Bildung von Kohlendioxyd und Bernsteinsäure aus Glycerin um ein Mehrfaches der angewandten Fumarsäuremenge steigert. Noch ausgeprägter ist die katalytische Wirkung der OES. Bernsteinsäure verhält sich hingegen, wie zu erwarten war, inaktiv, indem sie nach KREBS anaerob nicht dehydriert werden kann. Da die C₄-Dicarbonsäuren im Tierorganismus, in der Hefe und in Schimmelpilzen am Citronensäurecyclus teilnehmen und diesen katalysieren, die Bedeutung der C₄-Dicarbonsäuren als Wasserstoffüberträger im Sinne des SZENT-GYÖRGYI-Cyclus aber zweifelhaft geworden ist (vgl. S. 286), wird auch in dieser Beziehung Schema 14 (S. 320) den experimentellen Befunden besser gerecht.

Neuerdings untersuchte KREBS (480) die Oxydation von Essigsäure durch *Acetobacter*, die ein mit den von LYNEN (400) an Hefe durchgeführten Versuchen auffallend übereinstimmendes Resultat ergab. Auch hier konnte eine „Induktionsperiode“ festgestellt werden. Suspensionen von *Acetobacter* verbrauchen nicht unmittelbar nach Essigsäurezusatz Sauerstoff, sondern erwerben sich erst nach einer gewissen Zeit die Fähigkeit, Essigsäure zu oxydieren. Die Inkubationszeit kann nun, ähnlich wie bei Hefe, durch Zufügen von BTS, Milchsäure, Glucose, Äpfelsäure und α -Ketoglutar säure verkürzt werden. Etwas schwächere Wirkung als die genannten Verbindungen zeigte Adenosinpyrophosphat. Äthanol und Propanol waren hingegen unwirksam. Diese Ergebnisse deuten somit ebenfalls auf einen weitgehend analogen Abbaumechanismus der Essigsäure in Hefe und *Acetobacter* hin.

Eine der wesentlichsten Stützen für den von WOOD und WERKMAN (442) vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus [S. 309, Gleichung (1)] liefern die Versuche mit schwerem Kohlenstoff. In Anwesenheit mit ^{13}C signierten Natriumhydrogencarbonats gebildete Bernsteinsäure enthält regelmäßig schweren Kohlenstoff in den Carboxylgruppen. Die bisher immer unter der Annahme, daß die gesamte Bernsteinsäure *reduktiv* aus der durch „Carboxylierung“ der BTS gebildeten OES entstanden ist, berechneten ^{13}C -Werte fielen ausnahmslos zu hoch aus, d. h. lagen über den experimentell ermittelten Daten. Allerdings ist die Berechnung mit gewissen Unsicherheiten verknüpft. Erstens kann man sich fragen, ob das in Lösung befindliche Kohlendioxyd vollständig mit dem in der Zelle produzierten Kohlendioxyd ins Gleichgewicht kommt. Zweitens nimmt die Konzentration des Mediums an schwerem Kohlenstoff im Verlaufe des Versuchs ab, da eine Verdünnung mit dem aus den Substraten stammenden Kohlendioxyd stattfindet. Infolgedessen wurde der Rechnung gewöhnlich die *Endkonzentration* des der Zelle verfügbaren $^{13}\text{CO}_2$ zugrunde gelegt. Trotzdem lagen die experimentell gefundenen Werte meistens tiefer. Daher vermuten SLADE und Mitarbeiter (448) noch einen anderen Weg der Bernsteinsäurebildung, der unabhängig von der Kohlendioxyd-assimilierung verläuft. Diese Annahme erübrigt sich indessen, falls ein Teil der Bernsteinsäure *oxydativ* über den Citronensäurecyclus gebildet wird und daher keinen schweren Kohlenstoff enthalten kann (vgl. S. 297).

Nach Gleichung (3) (S. 320) werden drei Fünftel der Bernsteinsäure reduktiv und zwei Fünftel oxydativ aus OES gebildet. Es ist nun interessant, daß die auf Grund einer *mittleren* $^{13}\text{CO}_2$ -Konzentration im Medium (arithmetisches Mittel aus den $^{13}\text{CO}_2$ -Konzentrationen zu Beginn und am Ende des Versuchs) und unter Berücksichtigung des „*Verdünnungsfaktors*“ drei Fünftel berechneten ^{13}C -Werte in den meisten Fällen vollkommen befriedigend mit den experimentell gefundenen übereinstimmen. Zum Vergleich seien die nach den Versuchsdaten von Wood und Mitarbeitern (439) unter verschiedenen Annahmen berechneten Werte angeführt (Tabelle 4, Kolonne 1—4). Eine Ausnahme machen die Versuche 2 und 5, in welchen

der Faktor $\frac{1}{2}$ das richtige Resultat vermittelt. Kolonne 5 wurde auf Grund eines Versuchs von SLADE und Mitarbeitern (448) berechnet.

Tabelle 4. Berechnung der ^{13}C -Konzentration der Bernsteinsäure. (Die Zahlen bedeuten % ^{13}C in der Bernsteinsäure.¹)

Versuch		1	2	3	4	5	6	
Organismus		E. coli		Propionsäure B.			Leber	
Substrat		Galaktose	BTS	Glycerin	Glycerin	Glucose	BTS	
1	NaHCO ₃ zu Beginn des Versuchs.	4,17	2,58	4,64	2,56	9,00	9,61	
2	NaHCO ₃ am Schluß des Versuchs.	2,72	2,30	3,62	2,10	3,13	6,02	
3	Arithmetisches Mittel aus 1 und 2.	3,44	2,44	4,13	2,33	6,06	7,82	
4	Bernsteinsäure berechnet	aus 3	1,68	1,43	1,85	1,40	2,33	2,77
5		aus 2	1,50	1,39	1,72	1,34	1,60	2,32
6		aus 3 unter Berücksichtigung des Faktors $\frac{3}{5}$	1,44	1,26 ²	1,53	1,28	1,71 ²	1,93 ²
7	Bernsteinsäure, gefunden	1,46	1,24	1,65	1,28	1,68	1,61	

Kolonne 6 der Tabelle 4 bezieht sich auf einen Versuch von WOOD und Mitarbeitern (379), in welchem der ^{13}C -Gehalt der anaerob in der Taubenleber in Anwesenheit von schwerem Natriumhydrogencarbonat aus BTS gebildeten Abbauprodukte bestimmt wurde. In diesem Fall ergab die unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors $\frac{1}{2}$ durchgeführte Berechnung noch einen etwas zu hohen Wert. (Nur der dritte Teil der gebildeten Bernsteinsäure scheint hier reduktiv aus OES gebildet worden zu sein.) Leider ist dieser Versuch der einzige dieser Art, in welchem die Anfangs- und Endkonzentration des $^{13}\text{CO}_2$ im Medium bestimmt und angegeben wurde, so daß keine weiteren Schlüsse daraus gezogen werden können. Sollte sich aber ein solcher Zusammenhang zwischen dem BTS-Stoffwechsel der Leber und dem der Mikroorganismen bestätigen, so dürften damit die hier gemachten Überlegungen weitgehend bewiesen sein. Gleichzeitig stützen diese Tatsachen die Annahme, daß Kohlendioxyd nur in der einen Carboxylgruppe der Bernsteinsäure fixiert wird (wie nach der Theorie von WOOD und WERKMAN zu erwarten ist), und daß das in der Lösung befindliche Kohlendioxyd mit dem in der Zelle vorhandenen rasch ins Gleichgewicht kommt. Da die Zellen Kohlendioxyd lebhaft auszuschleiden vermögen, ist für diese Verbindung von vornherein eine hohe Diffusionsfähigkeit zu erwarten.

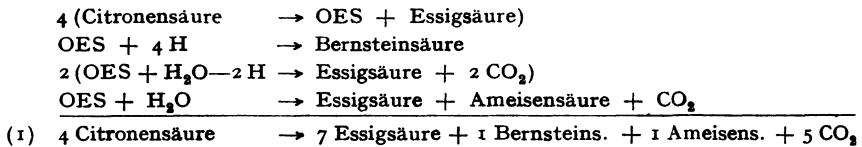
Die Übertragung des Citronensäurecyclus auf den Stoffwechsel der Mikroorganismen wird weiter durch Untersuchungen über den

¹ Die Werte wurden auf Grund der Gleichung: $\frac{3 \cdot 1,09 + X}{4} = \% \text{ } ^{13}\text{C}$ Bernsteinsäure berechnet. 1,09 ist der normale ^{13}C -Gehalt des Kohlenstoffs. X gibt die ^{13}C -Konzentration im Medium an.

² Faktor $\frac{1}{2}$.

b) Abbau der Citronensäure

in Bakterien gerechtfertigt. Verschiedene Bakterienarten (*B. coli*, *B. lactis aerogenes*, *B. suis pertifer*, *B. aertryche*, *B. pyocyaneum*, *B. acidilactici*, *Aerobacter indologenes*) vermögen Citronensäure anzugreifen, wobei sich anaerob Essigsäure, Ameisensäure, Bernsteinsäure und Kohlendioxyd bilden. Nach BREWER und WERKMAN (471) wird der Abbau der Citronensäure durch ihre Spaltung in Essigsäure und OES eingeleitet. OES unterliegt weiteren oxydativen und reduktiven Umwandlungen (472):



Gleichung (1) konnte durch DEFFNER und FRANKE (473) in Untersuchungen an „Hefebakterien“ (*Bact. lactis aerogenes*) bestätigt werden.

Schon BREWER und WERKMAN (474) machten jedoch auf die in qualitativer und quantitativer Hinsicht voneinander abweichenden Befunde bei der Vergärung der Citronensäure durch verschiedene Bakterien aufmerksam. In ihren Untersuchungen erreichte die Ausbeute an Essigsäure mit *Citrobacter Freudii* kaum die Hälfte derjenigen mit *Aerobacter indologenes*. Umgekehrt bildete *Citrobacter* dreimal mehr Bernsteinsäure als *Aerobacter*. Ameisensäure konnte nur unter den Abbauprodukten von *Aerobacter* nachgewiesen werden. Auch die Bildung kleiner Mengen Äthylalkohol, Acetoin, β , γ -Butylenglykol und Milchsäure wurden nur bei *Aerobacter* beobachtet.

BREWER und WERKMAN erkannten auch, daß der erstmals von ihnen formulierte Reaktionsmechanismus für den Abbau der Citronensäure durch *Aerobacter indologenes* (471) in verschiedener Hinsicht den Befunden mit *Citrobacter* nicht gerecht wird. Nach dieser Formulierung [vgl. Gleichung (1), S. 326] müßte das gesamte im Verlauf des Versuchs gebildete Kohlendioxyd aus den beiden Carboxylgruppen der OES stammen. Falls nun auch Bernsteinsäure aus OES entsteht, kann die totale Ausbeute an Kohlendioxyd den zweifachen Betrag der Differenz zwischen der abgebauten Citronensäuremenge und der Ausbeute an Bernsteinsäure nicht überschreiten. Der so ermittelte CO_2 -Wert beträgt jedoch nur die Hälfte des experimentell bestimmten Betrages.

Auch diese Autoren vermuteten daher noch einen anderen Mechanismus der Bernsteinsäurebildung (neben der Reduktion der OES) und zogen die Kondensation zweier Moleküle Essigsäure zu Bernsteinsäure in Betracht. An diese Umsetzung wurde für den Stoffwechsel der Bakterien schon verschiedentlich gedacht, in keinem Fall aber gelang es, diese Annahme zu beweisen.

Der von BREWER und WERKMAN (471) formulierte Abbauweg ist ferner in bezug auf die oxydoreduktiven Prozesse bei der Vergärung der Citronensäure durch *Citrobacter* nicht ausgeglichen. Setzt man nämlich als einzigen Weg der Bernsteinsäurebildung die Reduktion von OES voraus, so folgt aus den Versuchen eine zirka 70%ige Reduktion der aus Citronensäure entstandenen OES zu Bernsteinsäure. Der Oxydation zu Essigsäure standen demnach nur noch 30% zur Verfügung. Danach hätten die reduktiven Vorgänge die oxydativen beinahe um das Fünffache überwogen.

WOOD und Mitarbeiter (439) fanden beim anaeroben Abbau der Citronensäure durch *Citrobacter* zur verschwundenen Citronensäure äquivalente Mengen gebildeter Bernsteinsäure. Damit aber die vollständige Reduktion der entstandenen OES zu Bernsteinsäure unter anaeroben Bedingungen möglich ist, muß entweder ein Teil der Citronensäure direkt über α -Ketoglutarensäure oder die Hälfte der entstandenen Essigsäure zu Kohlendioxyd und Wasser oxydiert worden sein. Denkbar wäre allerdings auch eine teilweise Oxydation der Essigsäure durch Dehydrierung zu Bernsteinsäure, wie dies schon BREWER und WERKMAN annahmen. Berechnet man nach dieser zweiten Möglichkeit auf Grund der gefundenen Kohlendioxyd- und Essigsäurewerte die Mengen der Bernsteinsäure, die einerseits reduktiv aus OES, andererseits oxydativ aus Essigsäure entstanden sein müßten, so ergibt sich zwar eine gute Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Ausbeuten an Bernsteinsäure, hingegen ein bedeutendes Überwiegen der oxydativen über die reduktiven Prozesse.¹

Es wäre nun aber möglich, den experimentellen Tatsachen durch die Annahme eines teilweisen Abbaus der Essigsäure über den *Citronensäurecyclus* oder — was im Prinzip auf dasselbe hinausläuft — durch die Oxydation eines Teiles der Citronensäure über α -Ketoglutarensäure zu

¹ Die Rechnung grundet sich auf folgende Überlegung:

Abgebaute Citronensäuremenge	100 mM
Gebildetes Kohlendioxyd	126,7 mM
Gebildete Essigsäure	92,4 mM

Bernsteinsäure aus OES:

$$100 - \frac{126,7}{2} = 36,5$$

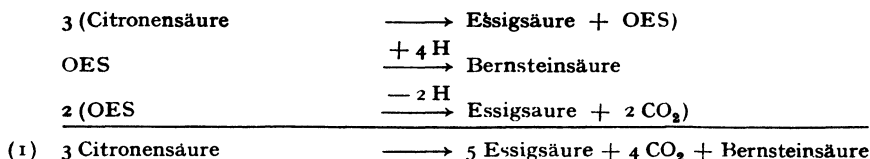
Aus Citronensäure gebildete OES. Zu Essigsäure abgebaute OES.

Bernsteinsäure aus Essigsäure:

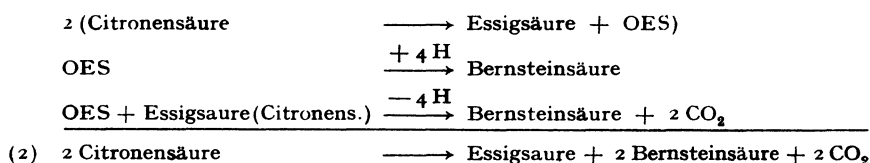
$$\frac{1}{3} \left(100 + \frac{126,7}{2} - 92,4 \right) = 35,5$$

Aus Citronensäure gebildete Essigsäure. Aus OES gebildete Essigsäure. Gefundene Essigsäure. 72,0

Bernsteinsäure weitgehend gerecht zu werden. Die ursprünglich von BREWER und WERKMAN (471) formulierten Prozesse:

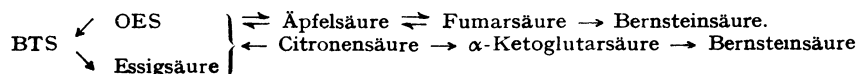


wären danach durch folgende Reaktionen zu ergänzen:



Gleichung (2) (oben) entspricht dem Befund von WOOD und Mitarbeitern, wonach zur verschwundenen Citronensäure äquivalente Mengen Bernsteinsäure gebildet wurden. Multipliziert man Gleichung (2) mit dem Faktor 2,5 und addiert Gleichung (1), so findet man eine mit den Versuchsergebnissen von BREWER und WERKMAN befriedigende Übereinstimmung der Essigsäure-, Bernsteinsäure- und CO₂-Werte (Bernsteinsäure gefunden 65—82%, berechnet 75%; Essigsäure gefunden 73—96%, berechnet 89%; CO₂ gefunden 111—120%, berechnet 111%). Bemerkenswert sei noch, daß auf dieser Grundlage auch die von SLADE und Mitarbeitern (448) bei *Citrobacter* beobachtete vermehrte Bernsteinsäurebildung aus OES durch Zusatz von Essigsäure verständlich würde. Schließlich fände dadurch die von BREWER und WERKMAN (474) gefundene Beziehung zwischen den Mengen gebildeter Bernsteinsäure und Essigsäure (vermehrte Essigsäurebildung geht mit verminderter Bernsteinsäurebildung parallel) eine plausible Erklärung.

Um diesen Befunden gerecht zu werden, wäre somit in Schema 14, S. 320, die zur Citronensäure führende Reaktion reversibel zu formulieren. Für den besonderen Fall des anaeroben Abbaus der Citronensäure nähme es folgende Gestalt an:



Danach bestehen nach dem primären teilweisen Zerfall der Citronensäure in OES + Essigsäure prinzipiell zwei Möglichkeiten für den weiteren Reaktionsverlauf: a) Die OES kann zum Teil oxydativ zu Essigsäure abgebaut werden, welche liegen bleibt. Der oxydative Abbau der Citronensäure über α -Ketoglutar säure wird entsprechend zurückgedrängt, und es resultieren hohe Essigsäure- und niedrige Bernsteinsäurewerte [entsprechend den Befunden von DEFFNER und FRANKE (473)]. b) Die OES wird vollständig zu Bernsteinsäure reduziert. Das entsprechende oxy-

dativ Äquivalent liefert der Abbau der Citronensäure über α -Ketoglutar-säure. Unter den Endprodukten überwiegt Bernsteinsäure [beobachtet von WOOD und Mitarbeitern (439)]. Dieser Prozeß ist vollkommen analog der vermehrten Bernsteinsäurebildung aus OES nach Zusatz von Essig-säure bei *Propionsäurebakterien* und *Citrobacter*.

Die Anhäufung der gebildeten Essigsäure in den Versuchen von DEFFNER und FRANKE ist wohl in erster Linie auf individuelle Unter-schiede im Angriffsvermögen der Bakterien auf Essigsäure, in zweiter Linie auf die Versuchsbedingungen zurückzuführen. JACOBSON (411) fand, daß die Aktivität der *Aconitase* außerordentlich von der *Substrat-konzentration* abhängig ist und mit ihrer Zunahme stark zurückgedrängt wird.¹ Hohe Konzentrationen an Citronensäure hemmen folglich ihren Abbau über α -Ketoglutar-säure. (SMYTH beobachtete eine atmungs-hemmende Wirkung der Citronensäure auf den Herzmuskel [vgl. S. 270].) DEFFNER und FRANKE arbeiteten mit Citronensäuremengen vom 4- bis 14fachen Gewicht der Trockensubstanz der Bakterien, Bedingungen, unter denen durchaus mit einer Blockierung des Citronensäurecyclus zu rechnen ist.

Nach BREWER und WERKMAN (476) wird sowohl der aerobe als auch der anaerobe Abbau der Citronensäure durch *A. indologenes* mit 0,003 M *arseniger Säure* vollständig blockiert. Natriumarsenit unterbindet in spezifischer Weise die Dehydrierung der α -Ketosauren.² Diese Befunde stützen ebenfalls die Annahme, der Citronensäurecyclus sei für den aeroben und anaeroben Abbau der Citronensäure notwendig. Die Autoren zeigten ferner, daß auch beim aeroben Abbau der Citronensäure durch *B. coli aerogenes* anfänglich (analog dem anaeroben Abbau) Essigsäure, Bernsteinsäure und Ameisensäure gebildet werden, nach einiger Zeit dann aber verschwinden und nur in der ersten Phase des Citronensäureabbaus auftreten. Dieses Verhalten läßt sich durch die Annahme eines anfänglich teilweisen Zerfalls der Citronensäure in OES und Essigsäure erklären. Sobald jedoch die für den Citronensäurecyclus notwendigen Mengen C₄-Dicarbonsäuren gebildet sind, wird die Citronensäure über den Cyclus abgebaut.

Bemerkenswert ist ferner, daß ein äquimolekulares Gemisch aus OES und Essigsäure in Versuchen mit *B. pyocyaneum* und *B. lactis aerogenes* (473) einen geringeren Sauerstoffverbrauch bewirkt als nach der Oxy-dationsgeschwindigkeit der einzelnen Verbindungen zu erwarten wäre

¹ Aconitase wurde von MARTIUS (475) in *B. coli*, *B. prodigiosum* und *B. pyocyaneum* nachgewiesen

² KREBS (98) zeigte die Anhaufung von α -Ketosauren in Nierengewebe ver-schiedener Säugetiere nach Zusatz von Aminosäure und M/1000 arseniger Säure; LYNEN wies mit dieser Methode die α -Ketoglutar-säurebildung in der Hefe nach (vgl. S. 284).

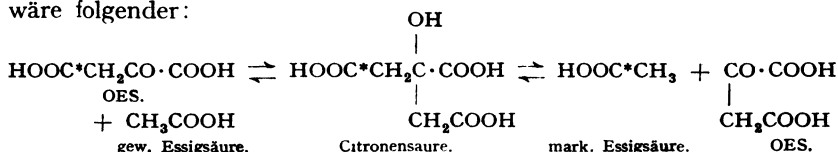
(die relativen Werte für den Sauerstoffverbrauch waren: Essigsäure 8, OES 5, Essigsäure + OES 10) und sich das Gemisch hinsichtlich seiner atmungssteigernden Wirkung völlig gleich wie Citronensäure verhält. Falls die Abbauvorgänge der Essigsäure und der OES unabhängig voneinander verlaufen würden, wäre eine solche Beziehung kaum verständlich. Führt der Abbau dieser Verbindungen über Citronensäure, so muß zur Oxydation der OES erst Essigsäure, für die der Essigsäure OES gebildet werden. Diese zusätzlichen Prozesse bedingen vermutlich den vermehrten Sauerstoffverbrauch.

Da einerseits in Bakterien der Zerfall der Citronensäure in OES und Essigsäure nachgewiesen werden konnte, andererseits die umgekehrte Reaktion in Tieren, zahlreichen Pilzen und wahrscheinlich auch in höheren Pflanzen eine bedeutende Rolle spielt, liegt die Annahme nahe, es handle sich um einen *reversiblen Vorgang*, vergleichbar mit der Spaltung des HARDEN-YOUNG-Esters in Dioxyacetonphosphorsäure und Glycerinaldehydphosphorsäure (ebenfalls eine rückläufige Aldolkondensation). Bildung und Spaltung der Citronensäure würden dann durch ein einziges Ferment (eine Aldolase) katalysiert und die Reaktionsrichtung hänge nur von den Konzentrationsverhältnissen der Reaktionsteilnehmer ab. Wird die Citronensäure durch einen anschließenden Prozeß aus dem Gleichgewichtssystem entfernt, so ist damit die Möglichkeit für ihre Bildung aus OES und Essigsäure gegeben.

Schon MARTIUS (475) vermutete, der Abbau der Citronensäure nehme auch in Mikroorganismen den Weg über α -Ketoglutarinsäure. Auf Grund von Bilanzversuchen, des träge verlaufenden Abbaues zugesetzter α -Ketoglutarinsäure, und aus der Überlegung heraus, der über α -Ketoglutarinsäure verlaufende Reaktionsweg enthalte eine überzählige Dehydrierungsstufe, glaubten DEFFNER und FRANKE (473) diese Möglichkeit ausschalten zu können. Die vorliegenden Betrachtungen zeigen jedoch, daß der Abbau der Citronensäure über α -Ketoglutarinsäure mit den Bilanzversuchen in Übereinstimmung steht und auch hinsichtlich der oxydoreduktiven Vorgänge ausgeglichen ist. Der dritte Einwand, der sich auf die schlechte Abbaufähigkeit der α -Ketoglutarinsäure bezieht, darf nicht überschätzt werden. Wird eine Verbindung leicht abgebaut, so kann ihre Körperverträglichkeit angenommen werden; hingegen ist im umgekehrten Fall ein solcher Schluß nicht erlaubt. So wird z. B. die zellvertraute BTS von der Hefe nur langsam abgebaut und Hexosediphosphorsäure überhaupt nicht vergoren, weil die intakte Zellwand sie vollständig zurückhält (477). Somit ständen auch in dieser Beziehung dem Verständnis des Abbaus der Citronensäure in Mikroorganismen keine Schwierigkeiten im Wege.

Zugunsten der Hypothese, daß Citronensäure in verschiedenen Bakterien sowohl gebildet als auch wieder in OES und Essigsäure gespalten werden kann, spricht die Gegenwart aus der Lösung stammenden Kohlendioxyds in der Carboxylgruppe der durch *Clostridium* und *Aerobacter* gebildeten Essigsäure (SLADE und Mitarbeiter vgl. S. 316). Da die Bildung von OES zur Zeit die einzige hier in Frage kommende Reaktion ist, bei der Kohlendioxyd fixiert wird, ein Zerfall von C_4 -Dicarbonsäuren

in zwei C₂-Stücke aber nicht beobachtet werden konnte, wird die Annahme, fixiertes Kohlendioxyd enthaltende Essigsäure stamme aus Citronensäure, diesem Befund am besten gerecht. Der Reaktionsverlauf wäre folgender:



So entstandene Essigsäure kann somit maximal die Hälfte des in der einen Carboxylgruppe der C₄-Dicarbonsäuren fixierten *CO₂ enthalten.

S. 319 wurde bemerkt, daß die besondere Bedeutung, die den C₄-Dicarbonsäuren in der Hefe und im Tierkörper zukommt, möglicherweise auch für den Bakterienstoffwechsel Geltung besitze. Abgesehen von den inzwischen besprochenen Tatsachen, die mit dieser Annahme gut vereinbar sind, wird ein solcher Analogieschluß auch durch schon früher bekannte nahe Beziehungen zwischen Hefe- und *B. coli*-Stoffwechsel einigermaßen gerechtfertigt. ENDO (478) zeigte mit einem aus *B. coli* dargestellten Acetontrockenpulver, daß bei der Vergärung von Kohlenhydraten durch diesen Organismus ähnliche Reaktionskoppelungen vorliegen wie bei der alkoholischen Gärung und auch dieselben phosphorylierten Zwischenstufen auftreten. Während die Spaltung von Glucose in Abwesenheit von Fluorid mit dem Trockenpulver meist auf der Stufe der BTS zum Stehen kommt, tritt in Gegenwart von Fluorid hauptsächlich Phosphoglycerinsäure auf. Acetaldehyd beschleunigt die Angärung und wird dabei zu Alkohol reduziert. WOOD und WERKMAN (444) fanden, daß — ähnlich wie bei *Aspergillus niger* und *Penicillium* — *Natriumfluorid* eine Erhöhung der Kohlendioxyd- und eine Hemmung der Bernsteinsäurebildung bei *B. coli* und *Propionsäurebakterien* bewirkt (Hemmung der OES-Synthese aus BTS und Kohlendioxyd).

c) Abbau der Acetessigsäure durch *B. coli*.

Intermediärprodukte des aeroben Acetessigsäureabbaus durch *B. coli* nachzuweisen, gelang nicht. Nach DEOTTO (479) bewirkt *Malonat* eine Senkung des Sauerstoffverbrauchs. Eine ausgeprägte Hemmung der Atmung resultiert unmittelbar nach Zusatz von *Na-Bisulfit*.

Der einzige bisher bekannte Abbauweg der Acetessigsäure ist der von WIELAND (410) und auch von BREUSCH (415) im Tierkörper beobachtete (vgl. S. 290 ff.), welcher über den Citronensäurecyclus verläuft. Falls die Annahme, der Citronensäurecyclus finde in *B. coli* ebenfalls statt, zutrifft, dürfte in diesem Organismus ein prinzipiell analoger Reaktionsmechanismus zu erwarten sein.

Wie für die Niere wahrscheinlich gemacht werden konnte, scheint auch bei *B. coli* der erste Angriff auf Acetessigsäure auf ihrer Spaltung

in 2 C₂-Körper (Essigsäure) zu beruhen. In den aeroben Versuchen DEOTTO (479) fiel zwar der Nachweis intermediär entstehender Essigsäure negativ aus. Wahrscheinlich unterliegt diese rasch weiteren Umwandlungen. Jedenfalls gelang es LEHNINGER (236) in anaeroben Versuchen den Abbau der Acetessigsäure zu Essigsäure nachzuweisen. Auf Nierenextrakten gezüchtete Kulturen bilden unter diesen Bedingungen pro Mol abgebauter Acetessigsäure annähernd 2 Mol Essigsäure. Ferner ist sowohl in der Niere (410), wie auch in *B. coli* (479) der Abbau der Acetessigsäure an die Gegenwart von Sauerstoff gebunden. Anwesenheit von *Phosphat* steigert nach CALIFANO (470) den Acetessigsäureabbau erheblich. (Eine entsprechende beschleunigende Wirkung von Phosphaten wurde auch von WIELAND und JENNEN (395) beim Abbau der Essigsäure durch Nierengewebe beobachtet.) Auf synthetischen Nährböden (nach MASSOL und BRETON) gezüchtete Stämme vermögen Acetessigsäure erst nach einer „Induktionszeit“ anzugreifen. Diese Tatsache und der in allen Fällen von DEOTTO beobachtete (und von CALIFANO bestätigte) *autokatalytische Verlauf* der Abbaugeschwindigkeit der Acetessigsäure würden durch einen den Citronensäurecyclus voraussetzenden Oxydationsmechanismus verständlich, indem die Intensität der Reaktion dann in dem Maße zunähme, als OES (welche erst angereichert werden muß) der Zelle verfügbar wird. Diese Verhältnisse erinnern an die von LYNEN (400) (vgl. S. 283 ff.) beim Abbau der Essigsäure durch Hefe beobachteten Erscheinungen. Auch die Tatsache, daß die Verbrennung der Acetessigsäure mehr Sauerstoff verbraucht und Kohlendioxyd produziert, als für die totale Oxydation der Verbindung zu Kohlendioxyd und Wasser notwendig ist, weist auf eine Koppelung der Abbauprozesse mit anderen (energieliefernden) Vorgängen hin, wie sie für die Hefe wahrscheinlich gemacht werden konnte. Erinnert sei noch an die bereits erwähnte Beobachtung CALIFANOS (470), daß Aufschwemmungen von *B. coli*, die in Gegenwart von Essigsäure geschüttelt werden (37°), eine 300%ige Steigerung des Sauerstoffverbrauchs gegenüber einer Probe ohne Substratzusatz aufweisen.

Diese Befunde fügen sich somit ebenfalls zwanglos unseren Vorstellungen vom Acetessigsäureabbau über den Citronensäurecyclus ein, doch dürfte ein endgültiger Entscheid in dieser Frage auf Grund der wenigen und keineswegs beweiskräftigen Tatsachen noch verfrüht sein.

Es hat sich gezeigt, daß die Befunde, die gegen den Citronensäurecyclus in Bakterien zu sprechen scheinen, nicht stichhaltig sind. Wenn umgekehrt auch keines der verschiedenen, zugunsten des Citronensäurecyclus angeführten Argumente als Beweis für einen solchen Reaktionsmechanismus betrachtet werden kann, so dürften diese in ihrer Gesamtheit Schema 14 (S. 320) doch weitgehend sichern. Vor allem wird der

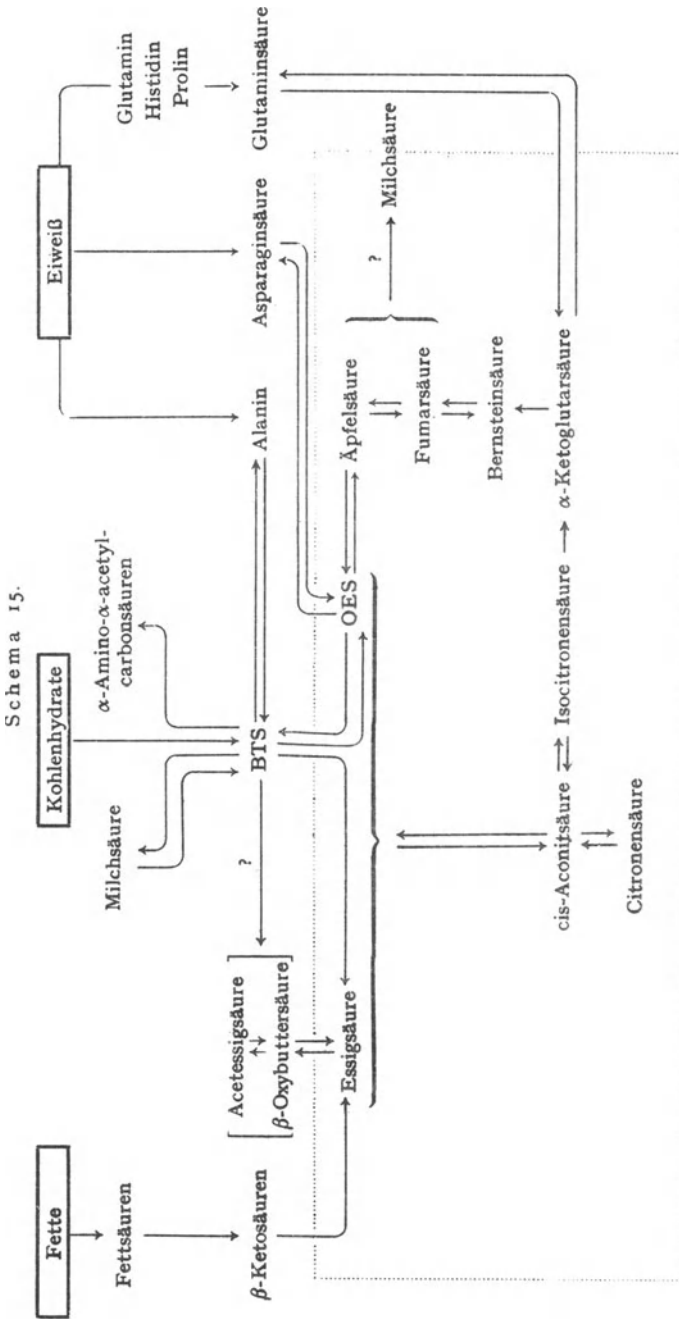
angenommene Abbauweg durch die Tatsache des Bestehens zweier verschiedener Möglichkeiten der Bernsteinsäurebildung nahegelegt. Ein Entscheid könnte möglicherweise durch Bestimmung des Gehaltes an fixiertem Kohlendioxyd in Gegenwart von Malonsäure aerob gebildeter Bernsteinsäure gefällt werden [analog den Versuchen von WOOD und Mitarbeitern (375) an der Leber (vgl. S. 274)].

10. Schlußbemerkung.

Bis vor kurzem glaubte man, in der Oxydation der Essigsäure zu *Bernsteinsäure*, wie sie von THUNBERG und WIELAND formuliert wurde, einen Weg gefunden zu haben, dessen sich die Organismen zum Endabbau der Nahrungsstoffe bedienen. Diese Hypothese stützte sich auf die hauptsächlich an der Hefe festgestellte Tatsache, daß Essigsäure in Bernsteinsäure übergeführt werden kann. Durch die Aufklärung der am Citronensäurecyclus beteiligten Vorgänge und auf Grund der mit Tri-deuterioessigsäure gewonnenen Resultate mußte jener Bernsteinsäurebildungsmechanismus aufgegeben werden. An seine Stelle traten zwei von der OES ausgehende Reaktionswege: 1. Reduktion der OES zu Bernsteinsäure (bewiesen für den Warmblütlerorganismus und für Mikroorganismen); 2. Kondensation von Essigsäure mit OES und anschließende Oxydation der gebildeten C_6 -Tricarbonsäure zu Bernsteinsäure (bewiesen für den Warmblütlerorganismus, für Hefe und Schimmelpilze). Weitere Versuche, die den Abbau des β -oxydativ von den Fettsäuren abgespaltenen C_2 -Bruchstückes, ferner die Verbrennung der durch Dehydrierung der BTS entstandenen Essigsäure über den Citronensäurecyclus bewiesen, ließen die fundamentale biologische Bedeutung dieses Kreisprozesses erkennen, in welchen zudem auch die Abbauwege verschiedener Aminosäuren münden (vgl. Schema 15, S. 332).

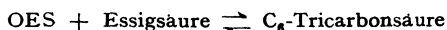
Ein zweiter grundlegender Befund der letzten Jahre ist folgender: Die Vorstellung, die dem Wirkungsmechanismus der C_4 -Dicarbonsäuren seit den Arbeiten SZENT-GYÖRGYIS zugrunde lag, wurde ebenfalls fragwürdig. Erstens kann durch die Beteiligung der C_4 -Dicarbonsäuren am Citronensäurecyclus ihr katalytischer Charakter ohne weiteres erklärt werden (die Annahme, sie würden als Wasserstoffüberträger in das Zellgeschehen eingreifen, ist nicht mehr zwingend), zweitens zeigten Untersuchungen über den Malonateinfluß auf Dehydrierungen die Nichtbeteiligung des SZENT-GYÖRGYI-Systems an der Dehydrierung der „Triose“, der Alkohole und der Fumarsäureoxydation über den Citronensäurecyclus (Dehydrierung der Äpfelsäure, Isocitronensäure und der α -Ketoglutarinsäure). Den C_4 -Dicarbonsäuren kommt daher wahrscheinlich nur innerhalb des Citronensäurecyclus Bedeutung zu.

Die Frage nach dem Wirkungsmechanismus der C_4 -Dicarbonsäuren ist von großer Wichtigkeit. Bildung von C_4 -Dicarbonsäuren wurde außer



im Tierorganismus auch bei zahlreichen Mikroorganismen und bei Pflanzen beobachtet. Falls diese Verbindungen nicht als Atmungskatalysatoren im Sinne SZENT-GYÖRGYIS am Stoffwechsel beteiligt sind, dürfte mit ziemlicher Sicherheit der Citronensäurecyclus auch für diese Organismen Geltung besitzen. Daß auch noch andere Gründe für diese Ansicht sprechen, wurde im Abschnitt 9 zu zeigen versucht. Sie seien kurz zusammengefaßt:

Essigsäure, Citronensäure und Acetessigsäure werden von verschiedenen Mikroorganismen abgebaut (S. 318, 324, 329). In Anwesenheit von OES konnte mit Essigsäure in einigen Fällen vermehrte Bernsteinsäurebildung nachgewiesen werden (S. 319). BREWER und Mitarbeiter (474) (S. 326) fanden eine Abhängigkeit zwischen den Mengen gebildeter Essigsäure und Bernsteinsäure beim Abbau der Citronensäure. Auf die Notwendigkeit der OES für den Abbau der Essigsäure weist die von WOOD und Mitarbeitern (439) beobachtete Beziehung zwischen dem Abbau der Essigsäure und der Kohlendioxydassimilation hin (S. 319). Zudem machen Untersuchungen von KREBS (480) (S. 322) einen weitgehend analogen Abbaumechanismus von Essigsäure in Hefe und *Acetobacter* wahrscheinlich. Nun kann aber oxydativ über den Citronensäurecyclus entstandene Bernsteinsäure kein fixiertes Kohlendioxyd enthalten (S. 295). Der Gehalt an schwerem Kohlenstoff in der gebildeten Bernsteinsäure hinge demnach vom Verhältnis zwischen dem auf oxydativem und dem auf reduktivem Weg hervorgegangenen Anteil ab und würde in allen Fällen unter der ^{13}C -Konzentration der OES liegen. Versuche haben dies bestätigt (S. 323). Daß neben der Reduktion der OES noch ein anderer Mechanismus der Bernsteinsäurebildung bestehen muß, bewiesen zudem Untersuchungen über den Abbau der Citronensäure durch BREWER und WERKMAN (471) (S. 324) und WOOD und Mitarbeiter (439) (S. 325). Arsenige Säure, die den Citronensäurecyclus auf der Stufe der α -Ketoglutarsäure blockiert, hemmt auch den Abbau von Citronensäure durch Bakterien (S. 327). Interessant ist ferner der Befund von SLADE und Mitarbeitern (448, 453) (S. 316), daß durch einige Mikroorganismen gebildete Essigsäure in der Carboxylgruppe fixiertes Kohlendioxyd enthält, eine Beobachtung, die vorläufig nur unter der Annahme einer reversiblen zur C_6 -Tricarbonsäure führenden Reaktion



zwanglos erklärt werden kann.

Gestützt auf diese Beobachtungen und Folgerungen dürfte der Schluß erlaubt sein, dem Endabbau der Nahrungsstoffe — wie er durch den Citronensäurecyclus beschrieben wird — liege ein *allgemeiner* und *im wesentlichen einheitlicher biologischer Vorgang* zugrunde, von derselben prinzipiellen Bedeutung, wie sie etwa den Wasserstoff- und Phosphat-

verschiebungsmechanismen zukommt. Die Beziehung zu den einzelnen biologisch wichtigen Verbindungsklassen ist aus dem Schema 15 (S. 332) ersichtlich.

Literaturverzeichnis.

1. WURMSER, R.: *Annu. Rev. Biochem.* **1**, 55 (1932); **2**, 15 (1933). — A. BERTHO: *Annu. Rev. Biochem.* **3**, 23 (1934). — R. SONDERHOFF: *Annu. Rev. Biochem.* **4**, 17 (1935). — D. E. GREEN and D. KEILIN: *Annu. Rev. Biochem.* **5**, 1 (1936). — F. LIPMANN: *Annu. Rev. Biochem.* **6**, 19 (1937). — L. MICHAELIS and C. V. SMYTHE: *Annu. Rev. Biochem.* **7**, 1 (1938). — M. DIXON: *Annu. Rev. Biochem.* **8**, 1 (1939). — K. G. STERN: *Annu. Rev. Biochem.* **9**, 1 (1940). — E. S. G. BARRON: *Annu. Rev. Biochem.* **10**, 1 (1941). — E. G. BALL: *Annu. Rev. Biochem.* **11**, 1 (1942).
2. GREEN, D. E.: *Mechanismus of Biological Oxidation*. New York: Macmillan Co., 1941.
3. KALCKAR, H. M.: *Chemic. Rev.* **28**, 71 (1941).
4. HEVESY, G.: *Application of Radioactive Indicators in Biology*. *Annu. Rev. Biochem.* **9**, 641 (1940).
5. SCHOENHEIMER, R. and D. RITTENBERG: *The study of intermediary Metabolism of Animals with the Aid of Isotopes*. *Physiol. Rev. (Am.)* **20**, 218 (1940). — K. BERNHARD: *Stoffwechselforschung mit Hilfe der Isotopen*. *Schweiz. med. Wschr.* **71**, 317 (1941).
6. LINTZEL, W.: *Biochem. Z.* **273**, 243 (1934).
7. HOPPE-SEYLER, F. A.: *Ber. Physiol.* **81**, 392 (1934).
8. MÜLLER, H. u. I. IMMENDÖRFER: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **275**, 267 (1942).
9. MOREHOUSE, M. G.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **41**, 595 (1939); *J. biol. Chemistry* **129**, 769 (1939).
10. MEYER C. E. and W. C. ROSE: *J. biol. Chemistry* **115**, 721 (1936). — M. WOMACK and W. C. ROSE: *J. biol. Chemistry* **116**, 381 (1936).
11. FISCHER, F. G. u. H. J.-BIELIG: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **266**, 73 (1940).
12. KEIL, W.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **276**, 26 (1942).
13. MATSUOKA, Y.: *J. Biochemistry* **17**, 267 (1933).
14. IKEBE, K.: *J. Biochemistry* **17**, 275 (1933).
15. FOSTER, G. L. and A. B. GUTMAN: *J. biol. Chemistry* **87**, 289 (1930).
16. MEDES, G.: *Biochemic. J.* **26**, 917 (1932).
17. BLATHERWICK, N. R.: *J. Amer. med. Assoc.* **103**, 1933 (1934).
18. MATSUDA, F.: *Nagasaki Igakkwai Zasshi (Jap.)* **11**, 821 (1933).
19. FÖLLING, A.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **227**, 169 (1934).
20. ZELLER, E. A.: *Helv. chim. Acta* **26**, 1614 (1943).
21. MOSS, A. R. and R. SCHOENHEIMER: *J. biol. Chemistry* **135**, 415 (1940).
22. — *J. biol. Chemistry* **137**, 739 (1941).
23. EMMRICH, R. u. I. EMMRICH-GLASER: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **266**, 183 (1940).
24. PAPAGEORGE, E. and H. B. LEWIS: *J. biol. Chemistry* **123**, 211 (1938).
25. BUTTS, J. S., M. S. DUNN and L. F. HALLMAN: *J. biol. Chemistry* **123**, 711 (1938).
26. SEALOCK, R. R. and H. E. SILBERSTEIN: *J. biol. Chemistry* **135**, 251 (1940).
27. — — *Science (New York)* **90**, 517 (1939).
28. CLOSS, K. u. K. BRAATEN: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **271**, 221 (1941).
29. LANYAR, F.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **275**, 225 (1942).

30. BALLOWITZ, K.: Jb. Kinderhk. **134**, 182 (1932).
31. LANYAR, F.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **275**, 217 (1942).
32. EVANS, W. C. and H. S. RAPER: Biochemic. J. **31**, 2155, 2162 (1937).
33. DAMODARAN, M. and R. RAMASWAMY: Biochemic. J. **31**, 2149 (1937).
34. SCHULER, W., H. BERNHARDT u. W. REINDEL: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **243**, 90 (1936).
35. RAPER, H. S.: J. chem. Soc. (London) 125 (1938).
36. GREEN, D. E. and D. RICHTER: Biochemic. J. **31**, 596 (1937).
37. LUTWAK-MANN, C.: Biochemic. J. **37**, 246 (1943).
38. HORN, F.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **238**, 84 (1936).
39. — Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **242**, 23 (1936).
40. KUHN, R., F. KÖHLER u. L. KÖHLER: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **247**, 197 (1937).
41. SCUDI, J. V.: Science (New York) **91**, 486 (1940).
42. JAMES, G. V.: Biochemic. J. **34**, 640 (1940).
43. WILLIAMS, R. T.: Biochemic. J. **35**, 1169 (1941).
44. STROUD, S. W.: Nature (London) **146**, 166 (1940).
45. WILEY, F. H.: J. biol. Chemistry **124**, 627 (1938).
46. BOYLAND, E. and A. A. LEVI: Biochemic. J. **29**, 2679 (1935).
47. — — Biochemic. J. **30**, 728 (1936).
48. DOBRINER, K., C. P. RHOADS and G. I. LAVIN: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **41**, 67 (1939).
49. CHALMERS, J. G. and D. CROWFOOT: Biochemic. J. **35**, 1270 (1941).
50. KUHN, R.: Die Chemie **56**, 236 (1943).
51. BERNHARD, K.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **257**, 54 (1939).
52. MORI, T.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **258**, 143 (1939).
53. FISCHER, F. G.: Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **3**, 30 (1939).
54. ASAHINA, Y u. M. ISHIDATE: Ber. dtsh. chem. Ges. **61**, 533 (1928).
55. REINARTZ, F. u. K. MEESEN: Ber. dtsh. chem. Ges. **72**, 1 (1939).
56. KUHN, R. u. I. LÖW: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **254**, 139 (1938).
57. BERNHARD, K.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **258**, 96 (1939).
58. KOTAKE, Y: Ergebn. Physiol. biol. Chem. exp. Pharmakol. **37**, 245 (1935).
59. WIELAND, H. u. B. WITKOP: Liebigs Ann. Chem. **543**, 171 (1940).
60. DUPILLE, J. et M. LACHAUX: Bull. Soc. Chim. biol. **16**, 194 (1934).
61. BLASCHKO, H., D. RICHTER and H. SCHLOSSMANN: J. Physiologie **89**, 39 P; **90**, 1 (1937).
62. RICHTER, D.: Biochemic. J. **31**, 2022 (1937).
63. BLASCHKO, H., D. RICHTER and H. SCHLOSSMANN: Biochemic. J. **31**, 2187 (1937).
64. PUGH, C. E. M. and J. H. QUASTEL: Biochemic. J. **31**, 286, 2306 (1937).
65. GOEFFERT, G. J.: J. biol. Chemistry **140**, 525 (1941).
66. WOOD, H. G. and C. H. WERKMAN: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **31**, 938 (1933 bis 1934).
67. MÜLLER, D.: Biochem. Z. **254**, 97 (1932).
68. REICHEL, L. u. H. KÖHLE: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **236**, 158 (1935).
69. FEULGEN, R. u. M. BEHRENS: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **256**, 15 (1938).
— R. FEULGEN u. TH. BERSIN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **260**, 217 (1939).
70. — u. H. GRÜNBERG: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **257**, 161 (1939).
71. MÜLLER, D.: Biochem. Z. **254**, 102 (1932).
72. HERMANN, S. u. P. NEUSCHUL: Biochem. Z. **233**, 129 (1931).
73. VIRTANEN, A. I. and M. NÖRDLUND: Biochemic. J. **27**, 442 (1933).

74. NEUBERG, C. u. E. HOFMANN: *Biochem. Z.* **279**, 318 (1935).
75. UNDERKOFER, L. A. and E. I. FULMER: *J. Amer. chem. Soc.* **59**, 301 (1937).
76. FULMER, E. I., J. W. DUNNING and L. A. UNDERKOFER: *J. Sci.* **13**, 279 (1939).
77. SCHLUBACH, H. H. u. J. VORWERK: *Ber. dtsh. chem. Ges.* **66**, 1251 (1933).
78. MAURER, K. u. B. SCHIEDT: *Biochem. Z.* **271**, 61 (1934).
79. BÖESEKEN, J. et J. L. LEEFERS: *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **54**, 861 (1935).
80. BERNHAUER, K. u. B. GÖRLICH: *Biochem. Z.* **280**, 375 (1935).
81. FULMER, E. I., J. W. DUNNING, J. F. GUYMON and L. A. UNDERKOFER: *J. Amer. chem. Soc.* **58**, 1012 (1936).
82. WELLS, P. A., J. J. STRUBBS, L. B. LOCKWOOD and E. T. ROE: *Ind. Engng. Chem., Analyt. Edit.* **29**, 1385 (1937).
83. ENKLEWITZ, M. and M. LASKER: *J. biol. Chemistry* **110**, 443 (1935).
84. KLUYVER, A. J. et A. J. BOEZAARDT: *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **58**, 956 (1939).
85. THALER, H. u. G. GEIST: *Biochem. Z.* **302**, 121 (1939).
86. — — *Biochem. Z.* **302**, 369 (1939).
87. — u. W. EISENLOHR: *Fette u. Seifen* **48**, 316 (1941).
88. COZIC, M.: *C. R. Soc. Biol.* **117**, 371 (1934).
89. GREEN, D. E. and J. BROSTEAU'X: *Biochemic. J.* **30**, 1489 (1936)
90. —, J. G. DEWAN and L. F. LELAIR: *Biochemic. J.* **31**, 934 (1937)
91. HOFF-JØRGENSEN, E.: *Skand. Arch. Physiol.* **80**, 176 (1938).
92. LANG, K.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **277**, 114 (1943).
93. HOFF-JØRGENSEN, E.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **266**, 56 (1940).
94. BERNHAUER, K. u. B. GÖRLICH: *Biochem. Z.* **280**, 367 (1935)
95. — u. H. KNOBLOCH: *Biochem. Z.* **303**, 308 (1939/40).
96. PENNEY, J. R. and S. S. ZILVA: *Biochemic. J.* **37**, 403 (1943).
97. KREBS, H. A.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **217**, 191 (1933).
98. — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **218**, 157 (1933).
99. BERNHEIM, F., M. L. C. BERNHEIM and A. G. GILLASPIE: *J. biol. Chemistry* **114**, 657 (1936).
100. WAELSCH, H. and E. BOREK: *J. Amer. chem. Soc.* **61**, 2252 (1939). — E. BOREK and H. WAELSCH: *J. biol. Chemistry* **140**, XVII (1941); **141**, 99 (1941).
101. KREBS, H. A.: *Biochemic. J.* **29**, 1620 (1935).
102. WARBURG, O. u. W. CHRISTIAN: *Biochem. Z.* **295**, 261 (1937).
103. — *Biochem. Z.* **298**, 150 (1938); vgl. auch KARRER, P., P. FREI, B. H. RINGIER u. H. BENDAS: *Helv. chim. Acta* **21**, 826 (1938).
104. KREBS, H. A.: *Enzymologia (Den Haag)* **7**, 53 (1939).
105. NEBER, M.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **240**, 70 (1936).
106. FELIX, K. u. K. ZORN: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **258**, 16 (1939).
107. KARRER, P. u. H. FRANK: *Helv. chim. Acta* **23**, 948 (1940).
108. KÖGL, F. u. H. ERXLBEN: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **258**, 57 (1939) usw.
109. WESTPHAL, U.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **276**, 191 (1942)
110. — u. K. LANG: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **276**, 205 (1942).
111. — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **278**, 222 (1943).
112. EDLBACHER, S. u. H. GRAUER: *Helv. chim. Acta* **27**, 151 (1944).
113. WEIL-MALHERBE, H.: *Biochemic. J.* **30**, 665 (1936).
114. EULER, H. v., E. ADLER, G. GÜNTHER u. N. B. DAS: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **254**, 61 (1938).
115. BRAUNSTEIN, A. E. u. M. G. KRITZMANN: *Enzymologia (Den Haag)* **2**, 129, 138 (1937/38); *Nature (London)* **140**, 503 (1937).
116. KRITZMANN, M. G.: *Enzymologia (Den Haag)* **5**, 44 (1938/39).

117. BRAUNSTEIN, A. E.: *Enzymologia* (Den Haag) **7**, 25 (1939).
118. COHEN, P. P.: *Biochemic. J.* **33**, 1478 (1939).
119. — *J. biol. Chemistry* **136**, 545, 585 (1940).
120. BRAUNSTEIN, A. E.: *Nature* (London) **143**, 609 (1939).
121. COHEN, P. P. and G. L. HEKHUIS: *J. biol. Chemistry* **140**, 711 (1941)
122. SCHOENHEIMER, R., S. RATNER and D. RITTENBERG: *Science* (New York) **89**, 272 (1939). — R. SCHOENHEIMER and D. RITTENBERG: *Physiologic Rev.* **20**, 218 (1940). — R. SCHOENHEIMER and S. RATNER: *Annu. Rev. Biochem.* **10**, 197 (1941).
123. FOSTER, G. L., R. SCHOENHEIMER and D. RITTENBERG: *J. biol. Chemistry* **127**, 319 (1939). — D. RITTENBERG, R. SCHOENHEIMER and A. S. KESTON: *J. biol. Chemistry* **128**, 603 (1939). — R. SCHOENHEIMER, S. RATNER and D. RITTENBERG: *J. biol. Chemistry* **130**, 703 (1939). — R. SCHOENHEIMER, S. RATNER and D. RITTENBERG: *J. biol. Chemistry* **127**, 333 (1939). — S. RATNER, D. RITTENBERG, A. S. KESTON and R. SCHOENHEIMER: *J. biol. Chemistry* **134**, 665 (1940). — S. RATNER, R. SCHOENHEIMER and D. RITTENBERG: *J. biol. Chemistry* **134**, 653 (1940).
124. WEISSMAN, N. and R. SCHOENHEIMER: *J. biol. Chemistry* **140**, 779 (1941)
125. HERBST, R. M. and L. L. ENGEL: *J. biol. Chemistry* **107**, 505 (1934); R. M. HERBST: *J. Amer. Chem. Soc.* **58**, 2239 (1936).
126. KNOOP, F. u. C. MARTIUS: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **258**, 238 (1939)
127. KARRER, P., H. KOENIG u. R. LEGLER: *Helv. chim. Acta* **24**, 127 (1941)
128. ROSE, W. C.: *Physiol. Rev.* **18**, 109 (1938). — R. W. JACKSON and J. P. CHANDLER: *Annu. Rev. Biochem.* **8**, 249 (1939). — H. H. MITCHELL: *Annu. Rev. Biochem.* **11**, 257 (1942).
129. VIGNEAUD, V. DU, M. COHN, G. B. BROWN, O. J. IRISH, R. SCHOENHEIMER and D. RITTENBERG: *J. biol. Chemistry* **131**, 273 (1939).
130. RATNER, S., R. SCHOENHEIMER and D. RITTENBERG: *J. biol. Chemistry* **134**, 653 (1940).
131. BUTENANDT, A., W. WEIDEL u. W. VON DERJUGIN: *Naturw.* **30**, 51 (1942). — A. BUTENANDT, W. WEIDEL, R. WEICHERT u. W. VON DERJUGIN: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **279**, 27 (1943)
132. JACKSON, R. W.: *J. biol. Chemistry* **131**, 469 (1939).
133. KOTAKE, Y. u. K. ICHIHARA: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **195**, 171 (1931).
134. BERG, C. P., W. C. ROSE and C. S. MARVEL: *J. biol. Chemistry* **85**, 207 (1930). — C. P. BERG: *J. biol. Chemistry* **91**, 513 (1931); **104**, 373 (1934). — L. C. BAUGUENESS and C. P. BERG: *J. biol. Chemistry* **104**, 675, 691 (1934).
135. BAUGUENESS, L. C. and C. P. BERG: *J. biol. Chemistry* **106**, 615 (1934).
136. KYU-SUI, C.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **257**, 12 (1939)
137. KOTAKE, Y. u. S. OTANI: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **214**, 1 (1933).
138. HENRIKSEN, S. D. and K. CLOSS: *Acta pathol. microbiol. scand.* **15**, 101 (1938).
139. SHAMBAUGH, N. F., H. B. LEWIS and D. TOURTELLOTTE: *J. biol. Chemistry* **92**, 499 (1931).
140. CHANDLER, J. P. and H. B. LEWIS: *J. biol. Chemistry* **96**, 619 (1932).
141. FÖLLING, A. u. K. CLOSS: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **254**, 256 (1938).
142. CLOSS, K. u. K. FÖLLING: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **254**, 258 (1938).
143. SEALOCK, R. R., J. D. PERKINSON jr. and D. H. BASINSKI: *J. biol. Chemistry* **140**, 153 (1941).
144. PENROSE, L.: *Lancet* **228**, 1, 23 (1935). — L. PENROSE and J. H. QUASTEL: *Biochemic. J.* **31**, 266 (1937).
145. JERVIS, G. A.: *Arch. Neurol. Psychiatry* **38**, 944 (1937).

146. PENROSE, L. and J. H. QUASTEL: *Biochemic. J.* **31**, 266 (1937)
147. JERVIS, G. A.: *J. biol. Chemistry* **126**, 305 (1938).
148. —, R. J. BLOCK, D. BOLLING and E. KANZE: *J. biol. Chemistry* **134**, 105 (1940).
149. FELIX, K., K. ZORN u. H. DIRR-KALTENBACH: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **247**, 141 (1937).
150. LANG, K. u. U. WESTPHAL: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **276**, 179 (1942).
151. FELIX, K. u. K. ZORN: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **268**, 257 (1941).
152. TÖ, T.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **260**, 175 (1939).
153. BERGMANN, M. u. H. SCHLEICH: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **205**, 65 (1932); **207**, 235 (1932).
154. BERNHEIM, M. L. C.: *J. biol. Chemistry* **93**, 299 (1931).
155. SLOTTA, K. H. u. J. MÜLLER: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **238**, 14 (1936).
156. BERNHEIM, F. and M. L. C. BERNHEIM: *J. biol. Chemistry* **123**, 317 (1938).
157. ROLOFF, M., S. RATNER and R. SCHOENHEIMER: *J. biol. Chemistry* **136**, 561 (1940).
158. GRESSLY, E.: *Die Oxydation des Benzolkerns im Tierkörper*. Diss. med. Zürich, 1941.
159. BOESECKEN, J. and G. SLOOF: *Proc. Acad. Sci. Amsterdam* **32**, 1043 (1929).
160. DRUMMOND, J. C. and I. L. FINAR: *Biochemic. J.* **32**, 79 (1938).
161. BERNHARD, K. u. E. GRESSLY: *Helv. chim. Acta* **24**, 83 (1941).
162. BERNHAUER, K. u. B. GÖRLICH: *Biochem. Z.* **280**, 394 (1935)
163. AEPPLI, H.: *Über das Verhalten hydrocyclischer Verbindungen im tierischen Organismus*. Diss. med. Zürich, 1941.
164. TORBOLI, A.: *Boll. soc. ital. biol. sper.* **12**, 368 (1937).
165. BERNHARD, K.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **256**, 49 (1938).
166. — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **248**, 256 (1937).
167. — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **256**, 59 (1938).
168. WEIL-MALHERBE, H. and H. A. KREBS: *Biochemic. J.* **29**, 2077 (1935).
169. EDLBACHER, S. u. J. KRAUS: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **191**, 225 (1930); **195**, 267 (1931).
170. — u. M. NEBER: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **224**, 261 (1934).
171. ABDERHALDEN, E. u. H. HANSON: *Fermentforsch.* **15**, 274 (1937).
172. KOTAKE, Y.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **270**, 38 (1941).
173. EDLBACHER, S. u. G. VIOLLIER: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **276**, 108 (1942).
174. — u. F. HEITZ: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **276**, 117 (1942).
175. TSCHOPP, W. u. H. TSCHOPP: *Biochem. Z.* **298**, 206 (1938). — F. NIENDORF: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **259**, 194 (1939).
176. KAPELLER-ADLER, R.: *Biochem. Z.* **264**, 131 (1933). — R. KAPELLER-ADLER u. F. HAAS: *Biochem. Z.* **280**, 232 (1935). — F. FÖLDES: *Biochem. Z.* **283**, 199 (1936). — W. D. LANGLEY: *J. biol. Chemistry* **137**, 255 (1941).
177. STEUDEL, H.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **213**, 11 (1932).
178. BÖHM, F.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **267**, 163 (1941).
179. KUHN, R., F. KÖHLER u. L. KÖHLER: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **242**, 171 (1936).
180. FROMHERZ, K.: *Handb. der normalen und pathologischen Physiologie* **5**, 996. Berlin, 1928.
181. FLASCHENTRÄGER, B. u. K. BERNHARD: *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **55**, 278 (1936).
182. KUHN, R. u. I. Löw: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **259**, 182 (1939).
183. VERKADE, P. E., M. ELZAS, J. VAN DER LEE, H. H. DE WOLFF, A. VERKADE-SANDBERGEN u. D. VAN DER SANDE: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **215**, 225 (1933).

184. — u. J. VAN DER LEE: Proc., Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam **36**, 314, 876 (1933); Biochemic. J. **28**, 31 (1934).
185. FLASCHENTRÄGER, B. u. K. BERNHARD: Helv. chim. Acta **18**, 962 (1935); Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **238**, 221 (1936).
186. VERKADE, P. E., J. VAN DER LEE u. A. J. S. VAN ALPHEN: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **247**, 111 (1937).
187. BERNHARD, K.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **251**, 47 (1938).
188. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **269**, 135 (1941).
189. FLASCHENTRÄGER, B., K. BERNHARD, C. LÖWENBERG u. M. SCHLÄPFER: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **225**, 157 (1934).
190. BERNHARD, K., K. SCHLUMPF u. CH. WOLFENSBERGER: Helv. biol. Acta **1**, 6 (1935).
191. FLASCHENTRÄGER, B., K. BERNHARD, P. FABER, H. WALDMANN u. CH. WOLFENSBERGER: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **250**, 189 (1937).
192. BERNHARD, K. u. H. LINCKE: Helv. chim. Acta **28** im Druck (1944).
193. KEIL, W.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **274**, 175 (1942).
194. HAUSSER, K. W., R. KUHN, A. SMAKULA u. A. DEUTSCH: Z. physik. Chem. Abt. B **29**, 378 (1935).
195. FLASCHENTRÄGER, B. u. K. BERNHARD. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **246**, 124 (1937)
196. KUHN, R. u. K. LIVADA: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **220**, 235 (1933).
197. BIELIG H.-J. u. A. HAYASIDA: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **266**, 99 (1940).
198. ASAHINA, Y. u. M. ISHIDATE: Ber. dtsh. chem. Ges. **66**, 1673 (1933); **67**, 71 (1934); **68**, 947 (1935).
199. REINARTZ, F., W. ZÄNKE u. K. FAUST: Ber. dtsh. chem. Ges. **67**, 1536 (1934).
200. WESTPHAL, U.: Naturwiss. **29**, 782 (1941); Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **273**, 1, 13 (1942).
201. KREHAN, M.: Arch. Mikrobiol. **3**, 277 (1932).
202. JANKE, A. u. S. KROPACSY: Biochem. Z. **277**, 268 (1935); **278**, 30, 37 (1935).
203. ROTINI, O. T., E. DAMMANN u. F. F. NORD: Biochem. Z. **288**, 414 (1936).
204. BERNHARD, K.: Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. **267**, 99 (1941).
205. LELOIR, L. F. and J. M. MUÑOZ: Biochemic. J. **32**, 299 (1938).
206. STETTEN, D. and R. SCHOENHEIMER: J. biol. Chemistry **133**, 347 (1940).
207. QUICK, A. J.: J. biol. Chemistry **97**, 403 (1932).
208. — J. biol. Chemistry **98**, 537 (1932).
209. HEMINGWAY, A., J. PRYDE and R. T. WILLIAMS: Biochemic. J. **28**, 136 (1934).
210. LIPSCHITZ, W. L. and E. BUEDING: J. biol. Chemistry **129**, 333 (1939).
211. MILLER, C. O. and J. A. CONNAR: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **30**, 630 (1933).
212. —, G. F. BRAZDA and E. C. ELLIOT: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **30**, 633 (1932 bis 1933).
213. AMBROSE, A. M. and C. P. SHERWIN: J. biol. Chemistry **105**, IV (1934).
214. ICHIHARA, K. u. S. TAMURA: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **214**, 33 (1933).
215. PRYDE, J. and R. T. WILLIAMS: Biochemic. J. **30**, 799 (1936).
216. GOEBEL, W. F.: J. biol. Chemistry **122**, 649 (1937/38).
217. SOMMA, A. A. DI: J. biol. Chemistry **133**, 277 (1940).
218. WILLIAMS, R. T.: Biochemic. J. **32**, 1849 (1938)
219. — Biochemic. J. **34**, 690 (1940).
220. SNAPPER, I., T. F. YU and Y. T. CHIANG. Proc. Soc. exp. Biol. Med. **44**, 30 (1940).
221. UMEZAWA, S. u. H. MASAMUNE: J. Biochemistry **28**, 487 (1938).
222. WILLIAMS, R. T.: Biochemic. J. **37**, 329 (1943).
223. PRYDE, J. and R. T. WILLIAMS: Biochemic. J. **30**, 794 (1936).

224. MAUGHAN, G. B., K. A. EVELYN and J. S. L. BROWNE: *J. biol. Chemistry* **126**, 567 (1938).
225. MOZOLOWSKI, W.: *Biochemic. J.* **34**, 823 (1940).
226. KAPP, E. M.: *J. biol. Chemistry* **134**, 143 (1940).
227. HERMANN, S. u. P. NEUSCHUL: *Biochem. Z.* **233**, 129 (1931); **287**, 400 (1936).
228. — — *Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. II* **93**, 25 (1935).
229. — — *Bull. Soc. chim. biol.* **18**, 390 (1936).
230. TAKAHASHI, T. u. T. ASAI: *Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh., Abt. II* **93**, 248 (1936).
231. ERB, C., H. G. WOOD and C. H. WERKMAN: *J. Bacteriol.* **31**, 595 (1936).
232. REICHEL, L. u. H. BERCZELY: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **203**, 178 (1931).
233. — u. R. WETZEL: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **224**, 176 (1934). — L. REICHEL u. H. KÖHLE: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **236**, 145 (1935).
234. EDSON, N. L.: *Biochemic. J.* **30**, 1855 (1936).
235. SAMMONS, H. G. and R. T. WILLIAMS: *Biochemic. J.* **35**, 1175 (1941).
236. LEHNINGER, A. L.: *J. biol. Chemistry* **143**, 147 (1942).
237. BARRETT, H. M. and J. H. JOHNSTON: *J. biol. Chemistry* **127**, 765 (1939).
238. EMMRICH, R.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **261**, 61 (1939).
239. CARTER, H. E., E. OSMAN, H. LEVINE and S. GAMM: *J. biol. Chemistry* **128**, XIII (1939).
240. SCHOENHEIMER, R. and D. RITTENBERG: *J. biol. Chemistry* **113**, 505 (1936).
241. STETTEN, D. and R. SCHOENHEIMER: *J. biol. Chemistry* **133**, 329 (1940).
242. MAZZA, F. P.: *Ergebn. Enzymforsch.* **9**, 207 (1943).
243. LANG, K.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **261**, 240 (1939). — K. LANG u. H. MAYER: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **261**, 249 (1939). — H. D. CREMER: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **263**, 240 (1940).
244. — u. H. MAYER: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **262**, 120 (1939).
245. — u. F. ADICKES: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **262**, 123 (1939).
246. SHAPIRO, B. u. E. WERTHEIMER: *Biochemic. J.* **37**, 102 (1943).
247. MAZZA, F. P.: *Boll. Soc. ital. Biol. speriment.* **10**, 138 (1935); *Arch. Scienze biol.* **21**, 320 (1935).
248. GLASER, H.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **266**, 123 (1940).
249. ANNAU, E., A. EPERJESSY u. Ö. FELSZEGHY: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **277**, 58 (1943).
250. TANGL, H. u. N. BEREND: *Biochem. Z.* **232**, 181 (1931).
251. BERNHARD, K. and R. SCHOENHEIMER: *J. biol. Chemistry* **133**, 707 (1940). — K. BERNHARD, H. STEINHAUSER u. F. BULLETT: *Helv. chim. Acta* **25**, 1313 (1942).
252. BUTENANDT, A. u. H. KUDSZUS: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **237**, 75 (1935).
253. DIRSCHERL, W. u. F. HANUSCH: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **236**, 131 (1935).
254. BERNHARD, K.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **248**, 256 (1937); **256**, 59 (1938).
255. BERNHAUER, K. u. H. H. WAELSCH: *Biochem. Z.* **249**, 223 (1932).
256. ANSLOW, W. K. and H. RAISTRICK: *Biochemic. J.* **25**, 39 (1931).
257. GRUNDMANN, C. u. I. LÖW: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **256**, 141 (1938).
258. SCHOENHEIMER, R., D. RITTENBERG and M. GRAFF: *J. biol. Chemistry* **111**, 183 (1935).
259. VERCELLONE, A. u. L. MAMOLI: *Ber. dtsch. chem. Ges.* **71**, 152, 154 (1938).
260. MAMOLI, L. u. A. VERCELLONE: *Ber. dtsch. chem. Ges.* **71**, 1686 (1938). — L. MAMOLI: *Ber. dtsch. chem. Ges.* **71**, 2278 (1938). — L. MAMOLI: *Angew. Chem.* **52**, 39 (1939).

261. MAMOLI, L.: Ber. dtsh. chem. Ges. **71**, 2701 (1938).
262. — Gazz. chim. ital. **69**, 237 (1939).
263. — R., KOCH, H. TESCHEN: Naturwiss. **27**, 319 (1939).
264. — Ber. dtsh. chem. Ges. **72**, 1863 (1939).
265. ARNAUDI, C. e A. ERCOLI: Boll. Ist. sieroterap. milanese iment. **20**, 137 (1941).
266. ERCOLI, A.: Boll. Sci. Fac. chim. Ind. **1**, 279 (1940); Biochim. Terap. speriment. **28**, 125 (1941). — C. ARNAUDI: Boll. Ist. sieroterap. milanese **21**, 1 (1942).
267. BERNHARD, K. u. LEO MÜLLER: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **256**, 85 (1938). — LEO MÜLLER: Diss. med. Zürich, 1938.
268. SMEDLEY-MACLEAN, I. and M. S. B. PEARCE: Biochemic. J. **25**, 1252 (1931); **28**, 486 (1934). — R. O. JONES and I. SMEDLEY-MACLEAN: Biochemic. J. **29**, 1690 (1935).
269. WITZEMANN, E. J.: J. biol. Chemistry **107**, 475 (1934).
270. DAKIN, H. D.: Oxidations and Reductions in the Animal Body, 2nd edit. London: Longmans, Green and Co., 1921.
271. LELOIR, L. F. and J. M. MUÑOZ: Biochemic. J. **33**, 734 (1939).
272. KRÜGER, D. u. E. TSCHIRCH: Ber. dtsh. chem. Ges. **63**, 826 (1930).
273. SNAPPER, I. and A. GRÜNBAUM: Chinese J. Physiol. **15**, 301 (1940).
274. FLASCHENTRÄGER, B. u. K. BERNHARD: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **256**, 71 (1938).
275. KNOOP, F., F. DITT, W. HECKSTEDEN, J. MAIER, W. MERZ u. R. HÄRLE; Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **239**, 30 (1936).
276. LANG, K. u. F. ADICKES: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **269**, 236 (1941).
277. SCHOENHEIMER, R. u. D. RITTENBERG: J. biol. Chemistry **120**, 155 (1937).
278. STETTEN, D. and R. SCHOENHEIMER: J. biol. Chemistry **133**, 329 (1940).
279. ANNAU, E., A. EPERJESSY u. Zs. L. ZATHURECZKY: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **279**, 66 (1943).
280. CALIFANO, L.: Biochem. Z. **289**, 354 (1937).
281. SKRAUP, S., F. STRIECK u. J. SCHORN: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **259**, 1 (1939).
282. APPEL, H., G. BERGER, H. BÖHM, W. KEIL u. G. SCHILLER: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **266**, 158 (1940).
283. CHIBNALL, A. C. and S. H. PIPER: Biochemic. J. **28**, 2209 (1934).
284. BARKER, H. A.: Arch. Mikrobiol. **7**, 404, 420 (1936).
285. MAZZA, F. P. e R. ZANFAGNA: Boll. Soc. ital. Biol. speriment. **9**, 1251 (1934).
286. ANNAU, E.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **224**, 141 (1934).
287. EDSON, N. L.: Biochemic. J. **29**, 2082 (1935).
288. BARNES, R. H., D. R. DRURY: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **36**, 350 (1937). — R. H. BARNES, D. R. DRURY, P. O. GREELEY and A. N. WICK: Amer. J. Physiol. **130**, 144 (1940). — R. H. BARNES, E. M. MACKAY, G. K. MOE and M. B. VISSCHER: Amer. J. Physiol. **123**, 272 (1938).
289. MACKAY, E. M., A. N. WICK and C. P. BARNUM: J. biol. Chemistry **135**, 183 (1940).
290. CHANNON, H. J., G. N. JENKINS and J. A. B. SMITH: Biochemic. J. **31**, 41 (1937). — D. RITTENBERG, R. SCHOENHEIMER and E. A. EVANS jr.: J. Biol. Chemistry **120**, 503 (1937).
291. WICK, A. N. and D. R. DRURY: J. biol. Chemistry **138**, 129 (1941).
292. WINKLHOFFER, F.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **263**, 235 (1940).
293. BUTTS, J. S., C. H. CUTLER, L. F. HALLMAN and H. J. DEUEL jr.: J. biol. Chemistry **109**, 597 (1935). — H. J. DEUEL jr., J. S. BUTTS, L. F. HALLMAN and C. H. CUTLER: J. biol. Chemistry **112**, 15 (1935/36).
294. JOWETT, M. and J. H. QUASTEL: Biochemic. J. **29**, 2159 (1935).

295. MACKEY, E. M., A. N. WICK and C. P. BARNUM: *J. biol. Chemistry* **136**, 503 (1940).
296. FLÖSSNER, O.: *Die Ernährung* **8**, 89 (1943).
297. KEIL, W., H. APPEL u. G. BERGER: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **257**, 1 (1939).
298. APPEL, H., H. BÖHM, W. KEIL u. G. SCHILLER: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **274**, 186 (1942).
299. EMMRICH, R. u. E. NEBE: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **266**, 174 (1940).
300. EDSON, N. L.: *Biochemic. J.* **29**, 2498 (1935)
301. BUTTS, J. S., C. H. CUTLER, L. HALLMAN and H. J. DEUEL jr.: *J. biol. Chemistry* **109**, 597 (1935).
302. KNOOP, F.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **209**, 277 (1932)
303. DEUEL, H. J., L. F. HALLMAN, J. S. BUTTS and S. MURRAY: *J. biol. Chemistry* **116**, 621 (1936).
304. BLIXENKRONE-MØLLER, N.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **252**, 117, 137 (1938); **253**, 261 (1938).
305. STADIE, W. C., J. A. ZAPP jr. and F. D. W. LUKENS: *J. biol. Chemistry* **132**, 423 (1940).
306. — — — *J. biol. Chemistry* **137**, 75 (1941)
307. MACKEY, E. M., R. H. BARNES, H. O. CARNE and A. N. WICK: *J. biol. Chemistry* **135**, 157 (1940).
308. SWENDSEID, M. E., R. H. BARNES, A. HEMINGWAY and A. O. NIER: *J. biol. Chemistry* **142**, 47 (1942).
309. MOREHOUSE, M. G. and H. J. DEUEL jr.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **45**, 96 (1940)
310. VERKADE, P. E. u. J. VAN DER LEE: *Congr. int. Quim. pura apl. Madrid*, 1934. S. 199; *Chem. Weekbl.* **33**, 163 (1936). — P. E. VERKADE: *Bull. Soc. Chim. biol.* **18**, 989 (1936); *Fette u. Seifen* **46**, 521 (1939); *J. Soc. Chem. & Ind.* **57**, 704 (1938).
311. — — *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **230**, 207 (1934); *Proc., Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam* **37**, 590 (1934).
312. — *J. Soc. chem. Ind., Chem. & Ind.* **57**, 704 (1938)
313. FLASCHENTRÄGER, B. u. P. B. MÜLLER: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **251**, 52 (1938).
314. BERNHARD, K.: *Helv. chim. Acta* **24**, 1412 (1941).
315. LYNEN, F.: *Liebigs Ann. Chem.* **554**, 40 (1943).
316. LANG, K. u. F. ADICKES: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **263**, 227 (1940)
317. — *Kongreßber. II*, 107, XVI. *int. Physiologenkongreß 1938, Zurich*
318. WICK, A.: *J. biol. Chemistry* **141**, 897 (1941).
319. FLASCHENTRÄGER, B. u. K. BERNHARD: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **240**, 19 (1936). — K. BERNHARD: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **246**, 133 (1937).
320. BERNHARD, K.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **256**, 65 (1938)
321. CALIFANO, L. u. I. BANGA: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **250**, 234 (1937)
322. MAZZA, F. P.: *Arch. Scienze biol.* **22**, 307 (1936).
323. BALASSA, G.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **249**, 217 (1937).
324. BERNHARD, K. u. M. ANDREAE: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **245**, 103 (1937).
325. VERKADE, P. E., J. VAN DER LEE u. A. J. S. VAN ALPHEN: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **250**, 47 (1937).
326. GREGG SMITH, H.: *J. biol. Chemistry* **103**, 531 (1933).
327. FLASCHENTRÄGER, B. u. K. BERNHARD: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **238**, 221 (1936).

328. ARTOM, C.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **245**, 276 (1937).
329. PONSFORD, A. P. and I. SMEDLEY-MACLEAN: Biochemic. J. **28**, 892 (1934).
330. EMMRICH, R., P. NEUMANN u. I. EMMRICH-GLASER: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **267**, 228 (1941).
331. QUICK, A. J.: Annu. Rev. Biochem. **6**, 291 (1937).
332. GARRY, R. C. and I. A. SMITH: Biochemic. J. **34**, 490 (1940).
333. MONTENBRUCK, D.: Diss. Kiel, 1938; Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol. **195**, 164 (1940).
334. WOODS, D. D.: Biochemic. J. **29**, 640 (1935).
335. — Biochemic. J. **29**, 649 (1935).
336. HAPPOLD, F. C. and L. HOYLE: Biochemic. J. **29**, 1918 (1935).
337. FILDES, P.: Biochemic. J. **32**, 1600 (1938).
338. BAKER, J. W. and F. C. HAPPOLD: Biochemic. J. **34**, 657 (1940).
339. KREBS, H. A., M. M. HAFEZ and L. V. EGGLESTON: Biochemic. J. **36**, 306 (1942).
340. KOTAKE, Y. u. S. ÔTANI: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **214**, 1 (1933).
341. — u. Y. NAKAYAMA: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **270**, 76 (1941).
342. KNOOP, F. u. C. MARTIUS: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **242**, 1 (1936).
343. HALLMAN, N.: Acta physiol. Scand. **2**, Suppl. IV (1940).
344. WAGNER-JAUREGG, TH. u. H. RAUEN: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **237**, 227 (1935).
345. MARTIUS, C. u. F. KNOOP: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **246**, 1 (1937).
346. KREBS, H. A. and L. V. EGGLESTON: Biochemic. J. **34**, 442 (1940). — H. A. KREBS: Biochemic. J. **34**, 460, 775 (1940).
347. QUASTEL, J. H. and W. R. WOOLDRIDGE: Biochemic. J. **22**, 694 (1928).
348. — and A. H. M. WHEATLEY: Biochemic. J. **25**, 117 (1931).
349. KREBS, H. A., L. V. EGGLESTON, A. KLEINZELLER and D. H. SMYTH: Biochemic. J. **34**, 1234 (1940).
350. —, E. SALVIN and W. A. JOHNSON: Biochemic. J. **32**, 113 (1938). — A. H. SMYTH and J. M. ORTEN: J. biol. Chemistry **124**, 43 (1938).
351. SIMOLA, P. E. u. F. E. KRUSIUS: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **261**, 209 (1939).
352. HALLMAN, N. and P. E. SIMOLA: Science (New York) **90**, 594 (1939).
353. SMYTH, D. H.: Biochemic. J. **34**, 1046 (1940).
354. BRAUN-MENENDEZ, E., CHUTE and P. W. G. EGORY: Quart. J. exp. Physiol. **29**, 91 (1939).
355. EVANS, C. L., F. GRANDE, F. Y. SHU, D. H. K. and A. G. MULDER: Quart. J. exp. Physiol. **24**, 365 (1935).
356. KARRER, P.: Lehrbuch der organischen Chemie, S. 279, 7. Aufl. Leipzig, 1941.
357. ANNAU, E.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **224**, 141 (1934). — N. L. EDSON: Biochemic. J. **29**, 2082 (1935).
358. LOEB, A.: Biochem. Z. **47**, 118 (1912).
359. FRIEDMANN, E.: Biochem. Z. **55**, 436 (1913).
360. ANNAU, E.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **224**, 141 (1934).
361. KREBS, H. A. and W. A. JOHNSON: Biochemic. J. **31**, 772 (1937).
362. ÖRSTRÖM, Å., M. ÖRSTRÖM, H. A. KREBS and L. V. EGGLESTON: Biochemic. J. **33**, 995 (1939).
363. EVANS jr., E. A.: Biochemic. J. **34**, 829 (1940).
364. KREBS, H. A. and L. V. EGGLESTON: Biochemic. J. **34**, 1383 (1940).
365. RUBEN, S. and H. D. KAMEN: Proc. nat. Acad. Sci. USA **26**, 418 (1940).
366. EVANS, jr. E. A. and L. SLOTIN: J. biol. Chemistry **136**, 301 (1940).

367. WOOD, H. G., C. H. WERKMAN, A. HEMINGWAY and A. O. NIER: *J. biol. Chemistry* **139**, 483 (1941).
368. — — *Biochemic. J.* **32**, 1262 (1938); **34**, 7 (1940). — H. G. WOOD, C. H. WERKMAN, A. HEMINGWAY and A. O. NIER: *J. biol. Chemistry* **139**, 365 (1941).
369. TOENNIESSEN, E. u. E. BRINKMANN: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem* **187**, 137 (1930).
370. KREBS, H. A.: *Nature (London)* **138**, 288 (1936).
371. WEIL-MALHERBE, H.: *Biochemic. J.* **31**, 2202 (1937).
372. KREBS, H. A. u. K. HENSELEIT: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **210**, 33 (1932).
373. RITTENBERG, D. and H. WAELSCH: *J. biol. Chemistry* **136**, 799 (1940).
374. EVANS jr. E. A. and L. SLOTIN: *J. biol. Chemistry* **136**, 805 (1940).
375. WOOD, H. G., C. H. WERKMAN, A. HEMINGWAY and A. O. NIER: *J. biol. Chemistry* **139**, 483 (1941); **142**, 31 (1942).
376. EVANS jr., E. A. and L. SLOTIN: *J. biol. Chemistry* **141**, 439 (1941).
377. — — and B. VENNESLAND: *J. biol. Chemistry* **143**, 565 (1942).
378. KRAMPITZ, L. O., H. G. WOOD and C. H. WERKMAN: Unveröffentlichte Versuche, zit. nach H. G. WOOD, C. H. WERKMAN, A. HEMINGWAY and A. O. NIER: *J. biol. Chemistry* **142**, 31 (1942).
379. WOOD, H. G., C. H. WERKMAN, A. HEMINGWAY and A. O. NIER: *J. biol. Chemistry* **142**, 31 (1942).
380. LYNEN, F.: *Naturwiss.* **30**, 398 (1942).
381. WOOD, H. G. and C. H. WERKMAN: *Biochemic. J.* **34**, 7 (1940); L. O. KRAMPITZ and C. H. WERKMAN: *Biochemic. J.* **35**, 595 (1941).
382. LYNEN, F.: *Liebigs Ann. Chem.* **552**, 270 (1942).
383. WALLINGFORD, V. H., A. H. HOMEYER and D. M. JONES: *J. Amer. chem. Soc.* **63**, 2252 (1941).
384. WOOD, H. G. and C. H. WERKMAN: *Biochemic. J.* **34**, 129 (1940).
385. BARRON, E. S. G.: *Annu. Rev. Biochem.* **10**, Seite 16 (1941).
386. QUASTEL, J. H. and D. M. WEBLEY: *Biochemic. J.* **36**, 8 (1942).
387. LIPMANN, F.: *Scand. Arch. Physiol.* **76**, 186 (1937).
388. LONG, C.: *Biochemic. J.* **32**, 1711 (1938).
389. SIMOLA, P. E. u. H. ALAPEUSO: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **278**, 57 (1943).
390. KRUSIUS, F. E.: *Suomen Kemistil. B* **IX**, 10 (1938); *Acta physiol. Scand.* **2**, Suppl. III (1940).
391. KREBS, H. A.: *Biochemic. J.* **32**, 108 (1938).
392. ELLIOTT, K. A. C. and B. LIBET: *J. biol. Chemistry* **143**, 227 (1942).
393. ASHFORD, CH. A. and E. G. HOLMES: *Biochemic. J.* **25**, 2028 (1931).
394. KREBS, H. A. and W. A. JOHNSON: *Biochemic. J.* **31**, 645 (1937).
395. WIELAND, H. u. R. G. JENNEN: *Liebigs Ann. Chem.* **548**, 255 (1941).
396. SONDERHOFF, R. u. H. THOMAS: *Liebigs Ann. Chem.* **530**, 195 (1937).
397. — u. M. DEFFNER: *Liebigs Ann. Chem.* **536**, 36 (1938).
398. HAMON, FR.: *Ann. Physiol. Physicochim. biol.* **12**, 940 (1936).
399. KLEINZELLER, A.: *Biochemic. J.* **35**, 495 (1941).
400. LYNEN, F. u. N. NECIULLAH: *Liebigs Ann. Chem.* **541**, 203 (1939); F. LYNEN: *Liebigs Ann. Chem.* **552**, 270 (1942); **554**, 40 (1943).
401. WIELAND, H., O. PROBST u. H. CRAWFORD: *Liebigs Ann. Chem.* **536**, 51 (1938).
402. LYNEN, F. u. N. NECIULLAH: *Liebigs Ann. Chem.* **541**, 203 (1939).
403. NEUBERG, C. u. M. RINGER: *Biochem. Z.* **91**, 131 (1918).
404. JOHNSON, E. M., E. C. KNIGHT and TH. K. WALKER: *Biochemic. J.* **33**, 357 (1939).
405. SIMOLA, P. E. and H. ALAPEUSO: *Enzymologia (Den Haag)* **9**, 241 (1940—1941).
406. CHRZASZCZ, T. u. D. TIUKOW: *Biochem. Z.* **229**, 343 (1930).
407. — — u. M. ZAKOMORNY, *Biochem. Z.* **250**, 254 (1932).

408. BERNHAUER, K., N. BÖCKL u. H. SIEBENÄUGER: *Biochem. Z.* **253**, 37 (1932).
409. EULER, H. v. u. W. FRANKE: *Chemie der Enzyme*, II/3 Abschnitt S 572 München, 1934.
410. WIELAND, H. u. CH. ROSENTHAL: *Liebigs Ann. Chem.* **554**, 241 (1943)
411. JACOBSON, K. P.: *Enzymologia* (Den Haag) **8**, 327 (1940).
412. LIPMANN, F.: *Enzymologia* (Den Haag) **4**, 65 (1937); *Nature* (London) **143**, 281 (1939).
413. OCHOA, S.: *Nature* (London) **145**, 747 (1940).
414. KALCKAR, H.: *Enzymologia* (Den Haag) **6**, 209 (1939).
415. BREUSCH, F. L., C. R. annuel et arch de la Soc. Turque des Sciences Phys. et Naturelles 1942/43, S. 55
416. STADIE, W. C., J. A. ZAPP and F. D. W. LUKENS: *J. biol. Chemistry* **137**, 63 (1941).
417. WEIL-MALHERBE, H.: *Biochemic J* **32**, 2276 (1938).
418. MARTIUS, C.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **279**, 96 (1943)
419. BREUSCH, F. L.: *Istanbul Univ. fen Fak. Mecmuasi* (Rev. fac. Sci. Univ. Istanbul) Sér. A, **6**, 144 (1941).
420. LONG, C. and R. A. PETERS: *Biochemic J* **33**, 759 (1939).
421. DIRSCHERL, W. u. H. NAHM: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **264**, 41 (1940).
422. NAGELSMIDT, G.: *Biochem. Z.* **186**, 317 (1927).
423. SCHMALFUSS, H.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **227**, 247 (1934)
424. MEYER, K. H.: *Ber. dtsch. chem. Ges.* **45**, 2843 (1912).
425. WIELAND, H., O. PROBST, H. WALCH, W. SCHWARZE u. K. RAUCH. *Liebigs Ann. Chem.* **542**, 145 (1939)
426. BERNHARD, K. u. H. STEINHAUSER: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **273**, 31 (1942).
427. CORYELL, C. D.: *Science* (New York) **92**, 380 (1940).
428. BREUSCH, F. L.: *Biochem. Z.* **295**, 101 (1937); *Enzymologia* (Den Haag) **10**, 165 (1942).
429. THOMAS, J.: *Enzymologia* (Den Haag) **7**, 231 (1939).
430. BAUMANN, C. A. and F. J. STARE: *J. biol. Chemistry* **133**, 183 (1940).
431. BANGA, J., S. OCHOA and R. A. PETERS: *Biochemic. J.* **33**, 1980 (1939)
432. BARRON, E. S. G.: *Annu. Rev. Biochem.* **10**, Seite 22 (1941).
433. BREUSCH, F. L.: *Enzymologia* (Den Haag) **10**, 165 (1941—1942).
434. KREBS, H. A.: *Biochemic. J.* **34**, 460 (1940).
435. ALWALL, N.: *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **197**, 353 (1941).
436. ADLER, E., H. v. EULER, G. GÜNTHER and M. PLASS: *Biochemic. J.* **33**, 1028 (1939).
437. BARRON, E. S. G. and C. M. LYMAN: *J. biol. Chemistry* **127**, 143 (1939).
438. WEIL-MALHERBE, H.: *Biochemic. J.* **31**, 299 (1937).
439. WOOD, H. G., C. H. WERKMAN, A. HEMINGWAY and A. O. NIER: *J. biol. Chemistry* **139**, 365 (1941).
440. WOODS, D. D.: *Biochemic. J.* **30**, 515 (1936).
441. MICKELSON, M. N. and C. H. WERKMAN: *J. Bacteriol.* **37**, 619 (1939).
442. WOOD, H. G. and C. H. WERKMAN: *Biochemic. J.* **30**, 48 (1936); **32**, 1262 (1938), **34**, 7 (1940).
443. —, R. W. STONE and C. H. WERKMAN: *Biochemic. J.* **31**, 349 (1937).
444. — and C. H. WERKMAN: *Biochemic. J.* **34**, 7 (1940).
445. KREBS, H. A. and L. V. EGGLESTON: *Biochemic. J.* **35**, 676 (1941).
446. GLADSTONE, G. P., P. FILDES and G. M. RICHARDSON. *Brit. J. exp. Path.* **16**, 335 (1935).
447. ELSDEN, S. R.: *Biochemic. J.* **32**, 187 (1938).

448. SLADE, H. D., H. G. WOOD, A. O. NIER, A. HEMINGWAY and C. H. WERKMAN: *J. biol. Chemistry* **143**, 133 (1942).
449. CARSON, S. F. and S. RUBEN: *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **26**, 418 (1940).
450. EVANS, E. A. and L. SLOTIN, siehe P. W.-WILSON: *Symposium on respiratory enzymes*. Madison, 1942.
451. KRAMPITZ, L. O., zit. nach H. D. SLADE, H. G. WOOD, A. O. NIER, A. HEMINGWAY and C. H. WERKMAN: *J. biol. Chemistry* **143**, 133 (1942).
452. — and C. H. WERKMAN: *Biochemic. J.* **35**, 595 (1941).
453. SLADE, H. D., H. G. WOOD, A. O. NIER, A. HEMINGWAY and C. H. WERKMAN: *Iowa State Coll. J. Sci.* **15**, 339 (1941).
454. CONANT, J. B., R. D. CRAMER, A. B. HASTINGS, F. W. KLEMPERER, A. K. SOLOMON and B. VENNESLAND: *J. biol. Chemistry* **137**, 557 (1941).
455. SOLOMON, A. K., B. VENNESLAND, F. W. KLEMPERER, J. M. BUCHANAN and A. B. HASTINGS: *J. biol. Chemistry* **140**, 171 (1941). — B. VENNESLAND, A. K. SOLOMON, J. M. BUCHANAN and A. B. HASTINGS: *J. biol. Chemistry* **142**, 379 (1942).
456. VENNESLAND, B., A. K. SOLOMON, J. M. BUCHANAN, R. D. CRAMER and A. B. HASTINGS: *J. biol. Chemistry* **142**, 371 (1942).
457. FERDMAN, D. L. and S. F. EPSTEIN: *Science (New York)* **91**, 365 (1940).
458. KALCKAR, H.: *Biochemic. J.* **33**, 631 (1939).
459. LIPMANN, F.: *Advances in Enzymology*, New York **1**, 99 (1941).
460. NEGELEIN, E. u. H. BRÖMEL: *Biochem. Z.* **301**, 135 (1939); **303**, 132 (1939).
461. BARKER, H. A., S. RUBEN and M. D. KAMEN: *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **26**, 426 (1940).
462. WIERINGA, K. T.: *ANTONIE VAN LEEUWENHOEK* **6**, 251 (1940).
463. BARRON, E. S. G.: *Annu. Rev. Biochem.* **10**, 18 (1941).
464. BERNHAUER, K. u. K. KÜRSCHNER: *Biochem. Z.* **280**, 379 (1935).
465. HAEHN, H.: *Z. techn. Biol.* **9**, 217 (1921).
466. STONE, R. W., H. G. WOOD and C. H. WERKMAN: *Biochemic. J.* **30**, 624 (1936).
467. WOOD, H. G. and C. H. WERKMAN: *Biochemic. J.* **30**, 618 (1936).
468. — — *Biochemic. J.* **32**, 1262 (1938); **34**, 7 (1940).
469. NIEL, C. B. VAN: *The Propionic Acid Bacteria*. Haarlem, 1928.
470. CALIFANO, L.: *Arch. Mikrobiol.* **13**, 159 (1942—1943).
471. BREWER, C. R. and C. H. WERKMAN: *Enzymologia (Den Haag)* **6**, 273 (1939).
472. DEFFNER, M.: *Liebigs Ann. Chem.* **536**, 44 (1938).
473. — u. W. FRANKE: *Liebigs Ann. Chem.* **541**, 85 (1939).
474. BREWER, C. R. and C. H. WERKMAN: *Enzymologia (Den Haag)* **9**, 236 (1940).
475. MARTIUS, C.: *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* **257**, 29 (1939).
476. BREWER, C. R. and C. H. WERKMAN: *Enzymologia (Den Haag)* **6**, 273 (1939); **8**, 318 (1940).
477. LYNEN, F.: *Liebigs Ann. Chem.* **539**, 1 (1939); F. LYNEN u. N. NECIULLAH **541**, 204 (1939).
478. ENDO, S.: *Biochem. Z.* **296**, 56 (1938).
479. DEOTTO, R.: *Enzymologia (Den Haag)* **8**, 289 (1940).
480. TOŠIĆ, J. and H. A. KREBS: *Biochemic. J.* **37**, XV (1943).
481. BERENBLUM, I., D. CROWFOOT, E. R. HOLIDAY and R. SCHOENTAL: *Cancer Res.* **3**, 151 (1943).
482. WEIGERT, F. and J. C. MOTTRAM: *Biochemic. J.* **37**, 497 (1943).
483. EULER, H. v., B. HÖGGER, P. KARRER, H. SALOMON u. H. RUCKSTUHL: *Helv. Chim. Acta*, **27**, 382 (1944).
484. KLEM, A.: *Fette und Seifen*, **51**, 184 (1944).

Über monomolekulare Filme an Wassergrenzflächen und über Schichtfilme.

Einführung in diesen Teil der Grenzflächenforschung und in seine Bedeutung für chemische und physiologische Fragestellungen.

Von H. J. TRURNIT, Universität Heidelberg.

(Mit 14 Abbildungen.)

Namen und Zeichen.

Die Oberflächenspannung einer Lösung hat die Dimension Dyn/cm . Die mit dem Schubmesser (Langmuirwaage) gemessene Differenz der Oberflächenspannungswerte vor und hinter dem Schwimmer wird im Schrifttum meist „Druck“ genannt. Das ist physikalisch falsch, da ein Druck die Dimension Dyn/qcm hat. Es muß aus Gründen der physikalischen Sauberkeit ein neuer Ausdruck geprägt werden. Daß er in allen Sprachen fehlt, liegt daran, daß die Physik mit der Definition und Benennung elementarer mechanischer Größen fertig war, ehe man anfang, sich mit makroskopisch nur zweidimensionalen Gebilden zu beschäftigen, an denen thermodynamische Vorgänge stattfinden können. Die Größe mit der Dimension Dyn/cm wird im folgenden „Schub“ genannt. Das Zeitwort „schieben“ ist die genaue Bezeichnung für das Vorwärtsschieben des filmbegrenzenden Barrens, der dadurch den „Schub“ am Schwimmer erzeugt. Das Wort ist kurz, sinngemäß und in näher benachbarten Gebieten noch nicht anderweitig mit Beschlag belegt. — Das von WO OSTWALD (319) verwendete Wort „Spreitungsspannung“ erscheint zu lang für den häufigen Gebrauch. Als Bezeichnung elementarer, physikalischer Größen und Dimensionen werden erfahrungsgemäß gern kurze, markante Worte assimiliert, z. B. Erg, Dyn, Volt, Joule, Watt, Phon, Stilb — Kraft, Druck, Schub.

Im übrigen schließen wir uns den von OSTWALD vorgeschlagenen Verbesserungen an und wollen zur Kennzeichnung des thermodynamischen Zustandes

- einen gasartigen Film „expansiv“ oder „e-Film“,
- einen flüssigen Film „beweglich“ oder „m-Film“,
- einen festen Film „starr“ oder „r-Film“

nennen (von *mobilis* und *rigidus*). Die bisher als „liquid expanded“ bezeichneten Filme werden „gedehnte Filme“ oder „d-Filme“ genannt. Wir übernehmen, um Verwirrung zu vermeiden, die im angelsächsischen Schrifttum übliche Bezeichnung des Schubes mit F (force) und der Filmfläche mit A (area). Auch folgen wir der LANGMUIRSCHEN Bezeichnungsart für spezielle Schicht- und Filmsorten mit großen Buchstaben, die die Entstehungsweise kennzeichnen (siehe unten). In konsequenter Fortführung dieser Bezeichnungsart haben wir neu dazu genommen die Bezeichnungen: D-Film, L-Film (bei LANGMUIR AL), K-Film (VON KATHERINE BLODGETT und ihr zu Ehren; B ist schon vergeben, siehe unten) P-Film und R-Film.

Die verwendeten Worte und Zeichen haben also folgende Bedeutung:

Die Art einer Grenzfläche:

fl/g = flüssig/gasförmig,

fl/fl = flüssig/flüssig,

fl/f = flüssig/fest.

Schicht = eine einzelne Moleküllage.

Film = eine einzelne Moleküllage auf Wasser oder ein Aggregat aus mehreren Schichten auf festen Trägern.

H-Film = Spreitungsfilm auf Wasser (oder anderer Flüssigkeit) } beide auch an der
D-Film = Diffusionsfilm, durch Diffusion aus der Lösung heraus } Grenze fl/fl.

L-Film = einschichtiger Film auf festem Träger, der durch waagerechtes Abheben (nicht Tauchen) eines H- oder D-Films von der Wasseroberfläche entstanden ist (lifted).

K-Film = mehrschichtiger Aufbaufilm nach BLODGETT auf Träger. Auch „Schich-film“.

S-Film (oder -Schicht) = Einzelschicht, die unter Wasser aus der Lösung heraus an einen K-Film adsorbiert wurde.

P-Film = poröser K-Film (skeleton film), durch Herauslösen eines löslichen Anteils von Molekülen aus einem K-Film.

R-Film = Restfilm, Einzelschicht, die nach Abreiben eines K-Films auf dem Träger bleibt (rubbed down layer).

Spezielle Bezeichnungen bei K-Filmen:

X-Film = K-Film, bei dessen Bau nur beim jedesmaligen *Eintauchen* eine Schicht aufzieht.

Y-Film = K-Film, bei dessen Bau beim *Ein-* und *Austauschen* jeweils eine Schicht aufzieht (der gewöhnliche Fall).

Z-Film = K-Film, bei dessen Bau nur beim jedesmaligen *Austauschen* eine Schicht aufzieht.

T = Trägerplatte für K-Filme (beliebiges Material).

U = Unterlage, die vor dem Filmbau auf T gebracht wird (Paraffin- oder Stearatschichten).

A-Schicht = jede beim *Eintauchen* des Trägers aufziehende Schicht.

B-Schicht = jede beim *Austauschen* des Trägers aufziehende Schicht.

Die A-Schichten sind *exotrop* (polare Gruppen zeigen nach außen vom Träger weg).

Die B-Schichten sind *endotrop* (polare Gruppen zeigen nach innen zum Träger hin).

Die filmtragende Lösung wird meist als *Substrat* bezeichnet. Der Sinn dieses Wortes umschließt das hier gemeinte so gut, daß es im „Filmjargon“ seinen eigentlichen Platz hat. Die Enzymologie gebraucht es einer längst überholten Vorstellung entsprechend nach heutiger Kenntnis sinnwidrig. Heute könnte man das riesige Fermentmolekül selber eher als „substratum“ bezeichnen. — Für „in bulk“ benutzen wir „*im Vollen*“.

Einleitung.

Die Untersuchung der lebenden Substanz liefert immer häufiger Hinweise darauf, daß das Verhalten der Materie an Phasengrenzen ein wichtiges Element der Analyse ist. Man darf bei dem heutigen Stand der Dinge sogar vermuten, daß die Erforschung der besonderen Bedingungen, unter denen sich hier Stoffe und Reaktionen befinden, gerade bei solchen zellphysiologischen Problemen sich als förderlich erweisen wird, die bisher besonders undurchsichtig waren.

Der vorliegende Beitrag bringt einen Überblick über die experimentellen Erfahrungen, die auf dem Gebiet der Herstellung und Untersuchung unlöslicher monomolekularer Schichten an Grenzflächen und mehrschichtiger Filme auf Trägern gemacht worden sind. Da es in Deutschland bisher keine systematische Behandlung erfahren hat, dagegen im Ausland, besonders in Amerika und England, zu einer beachtlichen Höhe entwickelt wurde, soll dieser Überblick möglichst vollständig sein.

Es werden im wesentlichen *Experimentalarbeiten* besprochen, um Biochemiker und Physiologen auf die experimentellen Möglichkeiten und die interessante Vielfältigkeit dieses Gebietes aufmerksam zu machen. Aus Gründen der Vollständigkeit wird einzelnen Abschnitten eine Zusammenstellung (im wesentlichen ausländischer) zugehöriger *theoretischer Arbeiten* beigelegt.¹ Theoretische und experimentelle Arbeiten, die sich mit der Oberflächenspannung von *Lösungen* grenzflächenaktiver Stoffe befassen, finden sich in deutscher Sprache in größerer Zahl in der Kolloid-Zeitschrift. Dieses Gebiet behandeln wir hier nur am Rande.

Die letzte größere Zusammenfassung ist in dem Buche von N. K. ADAM (1) erschienen. Dieses Werk enthält eine gute Auswahl besonders der englischen Arbeiten. Seitdem sind aber etwa 200 neue Arbeiten auf diesem Gebiete veröffentlicht worden, unter denen vor allem die Arbeiten über Eiweißschichten einen großen Bruchteil der Neuerscheinungen einnehmen. Da das Werk von ADAM, dessen erste Auflage 1930 erschien, bei uns nicht sehr bekannt ist, werde ich auch den darin enthaltenen Stoff, soweit er zum Thema gehört, mit einer gewissen Abgrenzung summarisch referieren, ohne aber alle Einzelheiten anzuführen und verweise für die weniger wichtigen Arbeiten auf die zweite Auflage dieses Buches (1938).²

Kurze Zusammenfassungen über das Gesamtgebiet oder einzelne Abschnitte finden sich bei BRILL (75), DEVAUX (109, 110), FREUNDLICH (132, 133), HAVINGA (209), LANGMUIR (251, 252, 253, 254, 256, 263), MARCELIN (281 a) RIDEAL (333, 334), VOLMER (395), WOLF (406 a), ferner in der Diskussion über Grenzflächenerscheinungen in Proc. Roy. Soc. (London) Ser. A 155, 710 (1936), interessante Ausführungen über die biologische Bedeutung in dem älteren Werk von BAYLISS (48). Eine Reihe von Praktikumsversuchen ist zusammengestellt bei WOLF-TRIESCHMANN (407) und DUNKEN (115 a).

Ein Blick in das Literaturverzeichnis zeigt, daß es mit ganz wenigen Ausnahmen Ausländer waren, die sich um die Entwicklung des Gebietes verdient gemacht haben. Seine Begründung verdanken wir jedoch einer deutschen Forscherin, AGNES POCKELS; sie hatte sich am Ende des vorigen Jahrhunderts ohne eigentliche wissenschaftliche Vorbildung mit dem Zustande von Wasseroberflächen beschäftigt und war in zehnjähriger Arbeit zu systematischen Ergebnissen gelangt, die sie Göttinger Professoren zur Kenntnis gab. Als sie dort kein Verständnis fand und gleichzeitig hörte, daß sich Lord RAYLEIGH inzwischen mit ähnlichen Versuchen beschäftigte, beschrieb sie diesem in einem ausführlichen Brief ihre Experimente. RAYLEIGH er-

¹ Inzwischen ist von EUCKEN eine ausgezeichnete Darstellung der Theorie des Gebietes erschienen (117 a).

² Inzwischen ist (1941) eine 3. Auflage des Werkes erschienen, die dem Verfasser aber noch nicht vorgelegen hat.

kannte die Bedeutung der POCKELSSchen Versuche und Überlegungen, und ließ den Brief im Januar-Heft der „Nature“ von 1891 abdrucken.¹ Wir können heute feststellen, daß ein wesentlicher Teil der heute verwendeten technischen Hilfsmittel zur Untersuchung der monomolekularen Schichten nur Abarten und Verfeinerungen der von AGNES POCKELS begründeten Technik sind. 1899 hat dann Lord RAYLEIGH (331) die grundlegende POCKELSSche Beobachtung, daß die Oberflächenspannung einer Wasseroberfläche, auf der ein Ölfilm zusammengeschoben wird, plötzlich von einem bestimmten Punkt ab sinkt, bestätigt und ihr die entscheidende Deutung gegeben: daß nämlich von dem kritischen Moment an die vorher frei auf dem Wasser schwimmenden einzelnen Moleküle sich berühren und so eine lückenlose, *monomolekulare* Schicht bilden, die eine Dicke von der Größenordnung 10 Å hat.

Es sind dann vor allem I. LANGMUIR und seine Schüler gewesen, die zu diesem Grundstock ganz wesentliche Beiträge geliefert und die theoretische Behandlung des Gebietes ausgebaut haben. Während sich die LANGMUIRSche Schule experimentell als besonders erfinderisch hervorgetan hat, wurden von HARKINS und seinen Schülern in Chicago vor allem Methoden entwickelt, um mit äußerster Präzision das Verhalten monomolekularer Schichten kennenzulernen. MCBAIN hat interessante Methoden entwickelt, um die GIBBSSche Gleichung direkt zu prüfen. In England wird in einer Reihe von Laboratorien ebenfalls experimentell und theoretisch gearbeitet und hier sind besonders die Versuche über Reaktionen an Filmen im Laboratorium von RIDEAL zu nennen. Von ADAM und seinen Schülern wurde eine sehr große Anzahl verschiedener Stoffe auf ihr Verhalten bei der Spreitung untersucht. In Rußland hat sich FRUMKIN besonders um die Messung der Voltapotentialeänderung verdient gemacht, nachdem GUYOT in Frankreich die grundlegenden Arbeiten hierzu geliefert hatte (188, 189). Dort sind weitere Forscher, wie DEVAUX (109, 110), MARCELIN, DERVICHIAN und GUASTALLA als besonders erfolgreich zu nennen. In Holland hat GORTER mit mehreren Schülern umfangreiche Arbeiten über Eiweißfilme durchgeführt und im Laboratorium von KÖGL ist eine Untersuchungsreihe begonnen worden. In Schweden arbeitet TEORELL und das Ehepaar STENHAGEN auf unserem Gebiet. Der Umfang und die Zahl der Arbeiten der letztgenannten Autoren ist aber relativ gering, verglichen mit der amerikanischen und englischen Literatur. In Deutschland ist dann im letzten Jahrzehnt unser Gebiet von BRILL, von THIESSEN und von WOLF mit ihren Mitarbeitern unter neuen Gesichtspunkten bearbeitet worden. Um die Klärung der begrifflichen „Topographie“ des Gebietes hat sich Wo. OSTWALD sehr verdient gemacht (319).

¹ Das Historische reicht in diesem Falle nur 50 Jahre zurück, ist also leicht zugänglich. Jeder Freund des Grenzflächengebietes sollte sich die Freude machen, diesen Brief und die Ausführungen Wo. OSTWALDS (318) über die Arbeiten von AGNES POCKELS zu lesen.

Wenn die Arbeiten von M. VOLMER und seinen Schülern (396) und die von F. SEELICH erst an dieser Stelle erwähnt werden, so geschieht das, um damit gleichzeitig den Umfang dieses Berichtes abzugrenzen. Die Arbeiten dieser und anderer deutscher Grenzflächenforscher gehören nicht mehr in den Rahmen, den wir gewählt haben, obwohl in vielen Einzelheiten Übergänge zu unserem Thema bestehen. Die Arbeiten über Filme auf Quecksilber bleiben ebenfalls außerhalb der Betrachtung.

Alle Versuche, die im folgenden besprochen werden, bestehen in irgendeinem Stadium darin, daß wasserunlösliche (oder wasserlösliche) Substanzen auf die Oberfläche wäßriger Lösungen gebracht werden. Durch die besonderen Energieverhältnisse an dieser Oberfläche erfahren die Moleküle eine mehr oder weniger ausgesprochene Orientierung, die darin besteht, daß die funktionellen Gruppen des Moleküls sich zum Wasser hinwenden, die Kohlenwasserstoffreste dagegen sich zur angrenzenden Phase — Luft oder mit Wasser nicht mischbare Flüssigkeit — hinwenden. Die hierfür verantwortliche Kraft ist die Oberflächenspannung.

Die freie Grenzflächenenergie ist gleich derjenigen Arbeit, die erforderlich ist, um einen Quadratzentimeter neuer, ebener Oberfläche der betreffenden Flüssigkeit gegen Luft zu schaffen. Sie wird in Erg/qcm gemessen. Die Oberflächenspannung einer solchen Flüssigkeit gegen Luft hat numerisch den gleichen Wert und wird in Dyn/cm gemessen. Sie gibt den „Zug“¹ an, mit der sich die rechts und links einer (in der Oberflächenschicht gedachten) Grenzlinie befindlichen Flüssigkeitsmoleküle längs jeden Zentimeters festhalten. Die Differenz der vor und hinter dem Schwimmer einer LANGMUIRSCHEN Waage vorhandenen Oberflächenspannungen ist gleich dem mit dieser Waage gemessenen Schub F (siehe Abschnitt: Namen und Zeichen). Seine Dimension ist ebenfalls Dyn/cm.

Ganz allgemein läßt sich sagen, daß von den sechs möglichen Grenzen beim Aufeinandertreffen zweier Phasen die Grenzflächen f/fl , fl/fl und fl/g für unsere Betrachtung allein von Bedeutung sind. Zwischen den Systemen f/fl und fl/fl besteht vermutlich ein gleitender Übergang, wenn es sich um die Grenzfläche eines Eiweißmoleküls gegen Wasser handelt. Man könnte ein unlösliches Proteinmolekül als feste Phase betrachten, muß aber im Hinblick auf das gebundene Wasser eher ein Bild gelten lassen, das man als eine Grenzfläche zwischen freiem und gebundenem Wasser bezeichnen könnte. Das gebundene Wasser ist dann zusätzlich mit der Eiweißstruktur durchsetzt. Dieser Gesichtspunkt ist wichtig im Hinblick auf die Frage, wo die katalytische Grenzfläche in den Zellen identisch ist mit der Oberfläche der frei in der Lösung schwimmenden Eiweißmoleküle und wo diese an flächenartigen Strukturen adsorbiert sind und selber als Ganzes nur Bestandteil einer Grenzfläche sind (Desmolasen, Hydrolasen). Untersuchungen der Grenzfläche Eiweiß/Wasser unter diesen Gesichtspunkten sind aber noch nicht durchgeführt worden.

¹ „Zug“ als der dem „Schub“ entgegengerichtete Vektor und mit ihm dimensionsgleich.

Die Grenzfläche fl/fl ist wohl in allen Körperzellen verwirklicht, an der Zellgrenze, an der Kerngrenze und an Lipoideinschlüssen im Plasma. Die Mehrzahl der Untersuchungen ist aber an der Grenze fl/g gemacht worden. Die Technik hierbei ist einfacher und die Zahl der unabhängigen Variablen geringer.

Die Arbeit ist so aufgebaut, daß in einem ersten Teil im wesentlichen auf die Technik der Filmuntersuchungen eingegangen wird und die damit gewonnenen Ergebnisse an Nichteiweißstoffen behandelt werden. Dann folgt ein zweiter Teil über K-Filme. In einem dritten Teil über Eiweißfilme wird dann die Technik als bekannt vorausgesetzt und im wesentlichen auf die Ergebnisse eingegangen.

I. H-Filme.

1. Einfache Erfahrungen an Wasseroberflächen.

Wenn man Messungen der Grenzflächenspannung vornimmt, bemerkt man, daß man je nach der Vorgeschichte des verwendeten Wassers ganz verschiedene Werte bekommt. Die höchsten Werte erhält man mit absolut sauberem Wasser, das sich staubgeschützt in völlig sauberen Gefäßen befindet. Mit frischem Leitungswasser bekommt man gewöhnlich ebenfalls Werte, die dem Maximalwert (72,8 Dyn/cm bei 20° C) recht nahe liegen. Gewöhnliches destilliertes Wasser dagegen gibt meist erheblich niedrigere Werte.

Wenn man auf Wasser, das länger gestanden hat, ein feines Papierschnitzelchen wirft, in seine Umgebung Talcum auf die Oberfläche streut und durch eine Pipette schräg gegen das Papierschnitzelchen bläst, sieht man, daß dieses bei der Fortbewegung über die Oberfläche die umgebenden Talcumteilchen mitnimmt. Wenn man dagegen eine völlig reine Wasseroberfläche nimmt, bewegt es sich zwischen den Talcumteilchen hindurch und diese führen Relativbewegungen gegeneinander aus.

Diese einleitenden Experimente zeigen, daß Wasseroberflächen offenbar häufig von einer feinen Haut überzogen sind, die 1. die Oberflächenspannung verringert und 2. Teilchen von sichtbarer Größe bewegen kann. Um über diese Erscheinung sinnvolle Versuche anstellen zu können, ist es zunächst erforderlich, einwandfrei saubere Oberflächen herstellen zu können. Dann wird man durch Zugabe bekannter Mengen von bekannten Stoffen leicht zu konkreten Aussagen über die Art solcher Häute kommen. A. POCKELS verwendete zur Reinigung ein ebenso einfaches wie wirksames Verfahren: das Wasser befand sich in einem Gefäß von rechteckiger Form, das genau bis zum unbenetzbar gemachten Rande gefüllt war. Wenn man am einen Ende dieses Gefäßes auf den Rand irgendeinen Barren, also z. B. einen prismatischen, unbenetzbaren Glasstab, legt und ihn langsam über das ganze Gefäß schiebt, so daß er die Wasser-

oberfläche gewissermaßen abschabt, so zeigen unmittelbar nachher angestellte Experimente von der obengenannten Art, daß keine Haut auf dem Wasser vorhanden ist. Diese Art der Reinigung ist um so wirksamer, je besser der Rand und der Barren unbenetzbar gemacht worden sind.

RÖNTGEN verwandte ein wenn möglich noch einfacheres Verfahren: er stellte einen gewöhnlichen Glastrichter mit geschliffenem Rand vertikal auf, versah ihn unten mit einem Schlauchstutzen und leitete durch diesen Leitungswasser ein bis zur Füllung des Trichters. Sobald die Oberfläche neu verunreinigt ist, genügt ein kurzes Aufdrehen des Wasserhahns, so daß die oberste Schicht über den Rand schwappt. Die Wasseroberfläche ist wieder völlig sauber. Es hat sich aber bei allen späteren Untersuchungen die POCKELSSche Technik durchgesetzt, denn sie ermöglicht eine einfache Bestimmung der Flächengröße und die Reinigung ohne wesentlichen Verlust einer eventuell kostbaren Lösung. Der „Röntgentrichter“ ist dagegen für Vorlesungszwecke und orientierende Versuche sehr praktisch. Auch eine Kombination beider Verfahren hat Vorzüge.

Nachdem so die Reinigung der Wasseroberfläche möglich ist, kann man daran gehen, eine bekannte Schicht aufzubringen. Wenn man also z. B. das Verhalten von Ölsäure prüfen will, könnte man eine winzige Menge Ölsäure aus einer Kapillare auf die Wasseroberfläche bringen. Man würde aber bemerken, daß diese Art der Versuche zur Verwendung außerordentlich großer Wasseroberflächen zwingen würde oder aber zur Verwendung unbequem kleiner Ölmengen.¹ Man verfährt statt dessen besser so, daß man das Öl in einem flüchtigen Lösungsmittel auflöst (POCKELS) und die Konzentration so wählt, daß 1—3 Tropfen der Lösung die für den benutzten Trog geeignete Menge sind. Es zeigt sich, daß sehr viele so untersuchte Stoffe beim Auftreffen auf die Wasseroberfläche sich dort ausbreiten, aber nicht zu einer beliebig großen Schicht. Man kann die Ausdehnung solcher Schichten sehr schön sehen, wenn man vorher Talkpuder auf die Wasseroberfläche gestreut hat.

Die drei möglichen Verhaltensweisen eines wasserunlöslichen Stoffes sind folgende: entweder breitet er sich auf der Wasseroberfläche nicht aus, sondern bleibt als Linse (oder Partikel) dort liegen (z. B. Paraffinöl; *enthält keine polaren Gruppen*), oder er breitet sich zu einer mehr oder weniger großen Schicht aus, deren Vorhandensein man unter Umständen auch an dem Auftreten von Interferenzfarben erkennen kann. In diesem Falle ist also die Schichtdicke vergleichbar mit der Wellenlänge des sichtbaren Lichts (z. B. das später zu besprechende *Indicatoröl*; *ein Teil der Moleküle enthält polare Gruppen*). Oder der Stoff breitet sich zu einer so großen Schicht aus, daß seine Dicke, die leicht aus Volumen der Ausgangssubstanz und Flächen-

¹ 1 mg Ölsäure hat als H-Film auf Wasser einen Mindestflächenbedarf von 4360 qcm!

größe der Schicht zu ermitteln ist, weit unter der für Interferenzen notwendigen Stärke liegt. In diesem Falle findet man regelmäßig, daß die Dicke — aus Volumen und Fläche berechnet — von der Größenordnung des Moleküldurchmessers des verwendeten Stoffs ist. Im besonderen zeigt sich bei aliphatischen Säuren, Alkoholen, Nitrilen u. a. (*alle Moleküle enthalten polare Gruppen*), daß die Schichtdicke maximal gleich der aus Röntgendaten bekannten Kettenlänge dieser Moleküle ist.

Gerade die Zugehörigkeit der meisten der größeren biochemisch wichtigen Moleküle zu dieser letzten Gruppe begründet die Bedeutung der Grenzflächenforschung für die Biologie. (Über anorganische Filmbildner siehe die Anmerkung in Abschnitt 26.)

2. Methoden der Schubmessung.

Wir haben es nun im folgenden ausschließlich mit Substanzen zu tun, die sich nach dieser letztbeschriebenen Art verhalten. Zu ihrer Untersuchung verfuhr A. PÖCKELS so, daß sie auf die gereinigte Wasseroberfläche eines länglichen Troges quer einen paraffinierten Papierstreifen legte, der bis fast zu den beiden Rändern reichte, und vor dem Streifen die zu untersuchende Substanz auf der Oberfläche spreitete. Wenn sie nun an das andere Ende des Troges einen Barren auflegte und ihn langsam in Richtung auf den freischwimmenden Streifen (in Zukunft stets „Schwimmer“ genannt) zubewegte, beobachtete sie, falls die Substanzmenge nicht zu groß war, daß der Schwimmer zunächst regungslos liegen blieb und sich von einem bestimmten Moment ab, wie von unsichtbaren „Kräften“ geschoben, im gleichen Abstand vor dem Barren herbewegte. Die Verwendung dieses PÖCKELSSchen Schwimmers ist die Grundlage aller im folgenden beschriebenen Meßgeräte. Wenn man in den Schwimmer in der Mitte ein feines Loch gebohrt hat und von oben her senkrecht in dieses Loch einen äußerst feinen Glasfaden senkrecht einführt und fixiert, sieht man, daß von dem kritischen Moment an dieser Glasfaden durch den Schwimmer in zunehmendem Maße durchbogen wird. Der Film überträgt somit eine Kraft. Man kann mittels der Auslenkung des Glasfadens, nach Eichung desselben, diese Kraft messen. Wenn man dann diese (auf den Zentimeter der Schwimmerlänge bezogene) Kraft, die wir Schub (F) nennen wollen, in Abhängigkeit von der jeweils erreichten Filmflächen-größe (A) in einem Diagramm aufzeichnet (F/A -Diagramm) und diesen Versuch mit verschiedenen Stoffen macht, findet man, daß bestimmte Stofftypen bestimmte Kurventypen ergeben. Dies ist das Grundexperiment zur Gewinnung der *Schub/Oberflächenkurven*. Die Fläche wird gewöhnlich in Å^2 pro Molekül angegeben.

Nun nimmt man zur Schubmessung aber meist feinere Hilfsmittel und verwendet sie als Nullmethode. Jede Art von Waage ist recht.¹ Im einfachsten Fall kann man

¹ Wegen dieser Verwendung von waageähnlichen Systemen zu Schubmessung

an dem Schwimmer eine kleine Nase anbringen, die auf das untere Ende des Zeigers einer Balkenwaage wirkt. An dem einen waagerechten Balken der Waage kann man dann durch ein Reitergewichtchen den Vorschub des Schwimmers gerade kompensieren. Die Waage wurde in diesem Fall auf einer Schneide spielen [LANGMUIR (250)]. Man kann auch [ADAM und JESSOP (76)] das Balkensystem an einem quer über den Trog gespannten Torsionsdraht befestigen und die am Torsionskopf zur Kompensation notwendige Drehung als Maß für den Schub wählen¹ [siehe auch (1, 195 201, 277)] Schließlich sind Verfahren entwickelt, die mit einer kleinen Stahlachse in guter Steinlagerung arbeiten und die Gegenkraft durch eine oder zwei entgegengesetzt wirkende Schneckenfedern erzeugen [GORTER und SEEDER (178, 179), GORTER (165)] Ein Galvanometerspiegel dient meist bei diesen Schubmessern zur Nullanzeige. Mit solchen Geräten lassen sich große Empfindlichkeiten erreichen. Für e-Filme (siehe unten) muß man bis 0,001 Dyn/cm heruntergehen GUASTALLA (185) hat ein direkt anzeigendes Verfahren entwickelt; er hängt über dem Schwimmer an vier Fäden einen feinen Pendelkörper auf. Die Aufhängung ist so lang, daß man ohne wesentlichen Fehler die durch die Auslenkung aus der Nulllage bewirkte Gegenkraft als proportional der Auslenkung ansehen darf Die Größe dieser Auslenkung wird optisch gemessen [siehe auch (183, 184)] MARCELIN (279, 280) befestigt den Schwimmer an seinem einen Ende an einem vertikalen Torsionsfaden, so daß der Filmschub eine Drehbewegung des Schwimmers um diesen Faden als Achse bewirkt. Auch hier wird die Gegenkraft durch Drehung eines Torsionskopfes ausgeübt. Ein ähnliches, hochempfindliches Gerät stammt von MOSS und RIDEAL (300). MARCELIN (281) hat ein „zweidimensionales Aneroidbarometer“ entwickelt, bei dem der Schichtdruck auf ein Glimmerblatt wirkt, das mit zwei Gummilaschen federnd in einen Rahmen gespannt ist. Die Anzeige erfolgt direkt durch einen Zeiger, der durch das Glimmerblatt betätigt wird. Das Gerät zeigt etwa 2 Dyn/cm an Die Reinigung der Vergleichsoberfläche durfte aber schwierig sein TRURNIT hat 1944 ein Präzisionsgerät entwickelt mit nur einem Torsionsdraht, bei dem der Schwimmer mit den Kulissen ein vom Schubmesser unabhängiges Aggregat bildet. Der Meßbereich ist 0,004—50,0 Dyn/cm.

Über die Technik des Arbeitens mit all diesen Geräten und die erheblichen Vorichtsmaßregeln und mannigfachen Tricks, die zur Gewinnung reproduzierbarer Ergebnisse dabei notwendig sind, findet man einiges in dem Buch von ADAM (1) und vieles in den Arbeiten der Laboratorien von HARKINS, RIDEAL und GORTER. Die Angaben von LANGMUIR und seinen Schülern sind oft nicht exakt oder zu allgemein gehalten, obwohl gerade diese Arbeiten besonders reich an Beobachtungen und Anregungen sind.

Der PÖCKELSSche Schwimmer soll einen völlig sauberen Teil der Trogoberfläche von dem filmbedeckten Teil trennen. Nur dann ist der gemessene Schub gleich der Differenz der Oberflächenspannung der reinen Lösung und der des filmbedeckten Teiles. HARKINS und ANDERSON (191) empfehlen nun besonders für biologische Laboratorien ein anderes, vor 80 Jahren von WILHELMY (402) angegebenes Verfahren: den Vorläufer der Ringmethode zur Messung der Oberflächenspannung. Statt des Ringes wird eine kleine vertikale Glasplatte verwendet. Sie setzen die Vorzüge des Verfahrens auseinander und entwickeln seine Theorie. Wenn die Oberflächen-

hat man die Geräte „LANGMUIR Waage“, „ADAM-JESSOP-Waage“ oder „Filmwaage“ genannt. Wir wollen den Ausdruck „Waage“ aber in Zukunft vermeiden, da eine Waage ein Gerät zum Messen oder Vergleichen von Gewichten (Schwerkraft) ist! Hier werden aber andere Kräfte gemessen. Wir werden diese Geräte daher „Schubmesser“ oder „Schubmeter“ nennen.

¹ Abbildung des ersten Schubmessers von LANGMUIR in (250), von ADAM in (1a) und (132).

spannung der filmtragenden Lösung einmal bekannt ist, kommt man zur Schubbestimmung mit einer Messung aus. Das Verfahren vermeidet die Notwendigkeit, über längere Zeiten sich auf die Sauberkeit der Kontrollfläche hinter dem Schwimmer verlassen zu müssen. Man kann nach Säuberung der Gesamtoberfläche diese gleich mit dem Film bedecken und messen. Eine nachträgliche Verunreinigung des Films ist nicht mehr so störend.

Eine weitere interessante Möglichkeit, den Filmschub zu messen, besteht in der Verwendung von sog. Indikatoröl (siehe unten).

3. Änderung des Voltapentials.¹

Es zeigt sich nun, daß bei Verkleinerung der Filmfläche nicht nur der Schub sich ändert, sondern auch das Voltapential der Grenzfläche Wasser/Luft. Wenn man es zunächst für die filmfreie, völlig saubere Grenze Wasser/Luft mißt, auf Null kompensiert und nun einen Film aufbringt, ergeben sich meist erhebliche Potentialänderungen (ΔV) (von der Größenordnung bis 10^3 mV), deren Größe systematisch von der Art der Filmmoleküle und ihrer Orientierung und Dichte und im Zusammenhang damit von Art und Konzentration der Lösungslösungen abhängt (138, 188). Man benutzt die Messung dieser Potentialänderung, um — unter Voraussetzung gewisser Annahmen (siehe unten) — entweder aus der bekannten Molekülform und der bekannten Verteilung der elektrischen Ladung auf die Orientierung des Moleküls im Film zu schließen, oder umgekehrt, um aus der — aus anderen Filmdata bekannten Lage und Konzentration der Moleküle — auf Größe und Orientierung des Dipolmoments und auf etwa vorhandene Wasserstoffbindungen zu schließen. Ferner kann man durch Abtasten der Oberfläche mit der Potentialsonde feststellen, ob der Film — in Dimensionen, die denen der Sonde vergleichbar sind — homogen ist.

In einer elektrischen Doppelschicht, die aus bürstenartig gelagerten Dipolen besteht, ist nach HELMHOLTZ die Beziehung zwischen dem Potentialsprung (ΔV) in dieser Schicht und der Vertikalkomponenten μ des Dipolmomentes der einzelnen Teilchen gegeben durch

$$\Delta V = 2 \pi \cdot n \cdot \mu \quad (\text{HARKINS}),$$

wobei n die Zahl der Teilchen pro Quadratcentimeter bedeutet und angenommen wird, daß die DK dieses Kondensators gleich 1 ist. Wenn δ der Winkel des Dipols (mit dem Moment $\bar{\mu}$) gegen die Normale ist, und D die DK des Films, ergibt sich²

$$\mu = \frac{\bar{\mu} \cos \delta}{D}$$

¹ Zum näheren Studium sei auf den diesbezüglichen Abschnitt bei ADAM (1) hingewiesen, sowie auf den von LANGE im Handbuch der Experimentalphysik XII/2, ferner auf die vielen Arbeiten von FRUMKIN, insbesondere seine Zusammenfassung in *Ergebn. exakt. Naturwiss.* 7, 257 (1928). Die erste Untersuchung über einen möglichen Zusammenhang zwischen elektrischem Verhalten einer Grenzfläche und der Orientierung ihrer Moleküle stammt von HARDY, *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. A 86, 634 (1911). Besonders sei auf die kurze, klare Besprechung von FRUMKIN und WILLIAMS (138) hingewiesen.

² RIDEAL (334) setzt: $\mu = \bar{\mu} + \frac{\Delta V}{4 \pi n}$, um den Beitrag der Ionenschicht im Substrat abzugrenzen.

Es zeigt sich nun, daß μ bei solchen Messungen an Filmen selten Werte erreicht, die den vierten Teil des sonst für diese Moleküle bekannten μ -Wertes bilden, wenn man den Wert von μ aus der ersten Gleichung nach Einsetzen der gemessenen Werte für ΔV und n gewinnt. Das hängt in schwer zu übersehender Weise mit der Konzentration und Art der Ionen und mit der Orientierung der Wasserdipole in der unterliegenden Lösung zusammen. Man nimmt bei solchen Messungen ein Anwachsen von $\frac{\Delta V}{n}$ beim Zusammenschieben des Films als ein Zeichen für die Aufrichtung der Dipole im Film, ohne aus der Größe von ΔV zu weitgehende quantitative Folgerungen zu ziehen¹. Aber schon ein solcher Hinweis kann bei der Konstitutionsermittlung (siehe unten) eine wichtige Rolle spielen, vor allem, wenn es sich um stereochemische Fragen handelt. Die Werte von μ liegen in der Größenordnung von 10^{-19} bis 10^{-18} e. s. E. \times cm, während die von $\bar{\mu}$ zwischen 10^{-18} und 10^{-17} e. s. E. \times cm liegen. Die μ -Werte von Eiweißfilmen liegen bei 10^{-17} e. s. E. \times cm (siehe Abb. 10 und Anmerkung 1 auf S. 425). Der Wert 10^{-18} e. s. E. \times cm wird oft als Einheit genommen und 1 Debye genannt. Die Angabe der Meßwerte erfolgt dann in m-Debye (Milli-Debye), siehe Abb. 7.

Meist ist die Doppelschicht, die die Filme bilden, oben positiv und unten negativ, vor allem bei aufgerichteten aliphatischen Molekülen, da das positive C-Atom hier oberhalb des negativen Dipolpartners liegt (z. B. =O, —OH). Man bekommt also meist einen positiven Wert von ΔV .² Von den wenigen Ausnahmen sei der von FRUMKIN (136a) gefundene Fall des Br·(CH₂)₁₅·COOH erwähnt, das auf neutraler Lösung ein ΔV von —850 mV gibt! Für diesen hohen negativen Wert ist offenbar das Bromatom am oberen Kettenende verantwortlich.

Wenn sich beim Zusammenschieben des Films auf der Oberfläche der Wert $\frac{\Delta V}{n}$ nicht ändert, darf man annehmen, daß die Moleküle in diesem Flächenintervall keine Orientierungsänderung bezüglich der Vertikalen erfahren oder daß die Wirkung einer solchen gerade aufgehoben wird durch die gleichzeitigen Änderungen im Substrat (Dipole und Ionen).

Zur Messung von ΔV benutzt man eine radioaktive Sonde (37, 108, 190, 194, 195, 354, 361), wie sie auch zur Messung sonstiger elektrischer Felder an Stelle von Tropfen- oder Flammensonden Verwendung findet. Meist wird ein mehrere Quadratmillimeter großes, mit Polonium³ beschicktes Silberplättchen genommen, das höchstisoliert einige Millimeter über der Oberfläche — seitlich allseitig verschieblich — angebracht ist. Als Meßgerät dient dann ein Elektrometer oder Röhrenvoltmeter. Die Messung erfolgt meist als Nullmessung.

¹ Ein Anwachsen von ΔV allein kann sogar noch mit einem Absinken des μ -Wertes verbunden sein.

² Eine reine Wasseroberfläche ist dagegen negativ gegen das Innere, die Wasserdipole stellen sich bevorzugt mit dem O-Atom nach außen. Ebenso verhalten sich andere polare Flüssigkeiten (PH. LENARD, 1914).

³ Als intensiver α -Strahler mit geeigneter Lebensdauer, aus dem keine instabilen, β - oder γ -strahlenden Elemente mehr entstehen.

Wenn aus irgendwelchen Gründen Bedenken gegen diese Art der Messung bestehen (radioaktive Substanz in der Nähe eines hochempfindlichen Elektrometers, schwierige Isolierung der Elektrometerzuleitungen infolge hohen Wasserdampfgehalts der Luft in Trognähe), kann man anders verfahren. Man bewegt eine kleine Metallplatte, die sich wieder in waagerechter Lage befindet, in der Vertikalrichtung (VOLTA). Dabei ändert sich die durch die Doppelschicht induzierte Ladungsgröße (139, 189). Wenn man eine schnelle Auf- und Abbewegung vornimmt, kann man die dabei induzierte Wechselspannung so verstärken, daß sie leicht an einem Zeigerinstrument abgelesen und durch Kompensation wieder auf Null gebracht werden kann. Die vibrierende Bewegung der Platte wird entweder durch einen schwingenden Klaviersaitendraht (410), oder geschickter durch ein Lautsprechersystem bei einigen 100 Hz bewirkt (325, 408). Auch bei diesem Verfahren ist es natürlich möglich, die ganze Oberfläche abzutasten.

Die gewonnenen Meßwerte werden gewöhnlich in Abhängigkeit von der Filmfläche in einem sog. $\Delta V/A$ -Diagramm aufgetragen und gemeinsam mit den F/A -Kurven betrachtet.

RIDEAL (334) schließt aus dem offenbaren Vorhandensein einer durch den Film im Substrat induzierten diffusen Ionenschicht auf die Möglichkeit elektrokinetischer Erscheinungen an Filmen und findet bei entsprechenden Messungen an Filmstückchen auf freien Wasseroberflächen Geschwindigkeiten von $0,9 \mu/\text{Sek.}$ ($p_H 7$), $0,22 \mu/\text{Sek.}$ ($p_H 6$), $0,06 \mu/\text{Sek.}$ ($p_H 4$) bei Feldstärken von 1 Volt/cm.

4. Das thermodynamische und molekulare Bild der Filme.

Im folgenden soll nun gezeigt werden, wie sich das F/A - und das $\Delta V/A$ -Verhalten der verschiedenen Stoffe ordnen läßt durch die Aufstellung einer kleinen Anzahl von Filmtypen. Dabei ergibt sich, daß ein bestimmter Stoff je nach der Temperatur und dem Schub Filme des einen oder anderen Typs bilden kann und je nachdem auf was für einem Substrat er gespreitet ist. Diese Filmtypen unterscheiden sich — mit einigen Abweichungen — etwa so voneinander, wie die Aggregatzustände der Materie in makroskopisch dreidimensionaler Anordnung, also wie fest, flüssig und gasförmig. Eine besondere, sehr häufig vorkommende Form allerdings, die „gedehnten“ oder d-Filme, haben kein dreidimensionales Analogon!

Um dauernde Verwechslungen und die Neigung zu unangebrachten Analogieschlüssen vom makroskopisch dreidimensionalen auf das makroskopisch zweidimensionale Verhalten auszuschalten, wollen wir nicht dem Brauch der meisten Autoren folgen, für die Bezeichnung der Filmzustände die Worte fest, flüssig und gasförmig zu ver-

wenden, sondern in Anlehnung an OSTWALD 319) *starr* (r), *beweglich* (m) und *expansiv* (e) sagen. Dazu kommt die Bezeichnung „*gedehnt*“ (d). Eine besondere Bezeichnung ist nicht nur gerechtfertigt, sondern geboten, da die Begriffe der Thermodynamik für makroskopisch dreidimensionale Materiemengen definiert und nur bei deren Betrachtung sinnvoll sind. Außerdem ist die dreidimensionale Homogenität eine Voraussetzung bei diesen Definitionen. Ein Grenzflächenfilm aber ist makroskopisch nur in zwei Dimensionen homogen. Aus beiden Richtungen der dritten Dimension können auf jedes einzelne Teilchen der Gesamtmenge Einflüsse wirken, die nicht identisch sind mit denen, die im dreidimensionalen Fall allein für den Zustand der betrachteten Menge verantwortlich sind (Bindungskräfte, innere Energie). Die Grenzbedingungen der dreidimensionalen Thermodynamik, die dort nur eine — wenn auch oft sehr unangenehme — theoretische Rolle bei Ansätzen und Berechnungen spielen und quantitativ nur als Korrekturglieder auftauchen, werden hier — vor allem von der Seite des Substrats her — zu oft entscheidenden Faktoren. Ein Analogon zu solcher Einwirkung von der Seite einer weiteren, dem betrachteten System nicht eigenen Dimension existiert im Dreidimensionalen nicht.¹ Wir haben also hier eigenartige, *prinzipiell* andere Verhältnisse als im Dreidimensionalen, die zu einer größeren Mannigfaltigkeit der Zustände führen. Die Bezeichnungen e-Film, m-Film und r-Film sind in einem weiteren Sinne nur Hauptmarken auf einer großen Skala, als es die Bezeichnungen gasförmig, flüssig und fest im Dreidimensionalen sind. Zu den Parametern Druck, Temperatur, Bindungskräfte der Teilchen untereinander, die im Dreidimensionalen allein den Zustand bedingen, kommen neue hinzu. Beim Übergang vom Zwei- zum Eindimensionalen, von der Grenzfläche zur Grenzlinie und weiter zum Grenzpunkt steigt dieser Gewinn an Modulationsfähigkeit von Zustandsformen der Materie weiter an. Hier liegt fruchtbares Neuland für die theoretische Biophysik ebenso wie für die Grenzflächenforschung.

Die Analyse der F/A -Kurven in Verbindung mit den Ergebnissen der Potentialmessung hat zur Aufstellung folgender Hauptfilmtypen geführt:²

1. *Starre* oder r-Filme. Die Moleküle darin sind eng gepackt, wenig beweglich und stehen in vielen Fällen annähernd normal zur Oberfläche.

2. *Bewegliche* oder m-Filme. Die Moleküle sind noch durch ausreichende VAN DER WAALSsche Kräfte aneinandergebunden. Die gegenseitige Beweglichkeit und der Raumbedarf sind aber größer als in den starren Filmen. Diese beiden Filmarten gemeinsam nennt man auch

¹ Dieser Besonderheit verdanken die d-Filme ihre Existenz.

² In Anlehnung an ADAM (1)

kondensierte Filme. Die F/A -Kurve gibt allein keine Auskunft darüber, welche Art vorliegt.

3. *Expansive* oder e-Filme. Die Moleküle bewegen sich in mehr oder weniger großem seitlichem Abstand voneinander frei auf der Wasseroberfläche. Ihre Längsachse oder Hauptebene liegt in der Oberfläche.

4. *Gedehnte* oder d-Filme (liquid expanded). Eigenartige Zwischenform zwischen den m- und e-Filmen, die außerordentlich häufig auftritt (siehe Abschnitt 4c).

Eine besondere Art von Filmen zeigt ein Verhalten, das zwischen dem der e- und der d-Filme liegt. Sie werden in der angelsächsischen Literatur mit „vapour expanded“ bezeichnet, hier als e/d-Filme. OSTWALD verwendet das Zeichen e*. Auf diesen Typ soll nicht näher eingegangen werden. Es wird auf ADAM (r) und auf OSTWALD [(319), S. 41] verwiesen.

Ebenso kennt man Filmzustände, die in ihrem Verhalten zwischen den r- und den m-Filmen stehen. DERVICHIAN nennt diesen Zustand „mesomorph“, wir bezeichnen ihn mit m/r (Beispiel: Eiweißfilme). Diese „zweidimensionalen Gallerten“ sind durch Hysterese beim Zusammenschieben erkennbar. Im ganzen wird das Verhalten eines Films von folgenden Faktoren bestimmt: Temperatur, Schub, Substratbeschaffenheit, Alterungsgrad, ferner Kettenlänge, Art der Ringe, Größe, Art und Gestalt der polaren Gruppen, Zahl und Lage der Mehrfachbindungen, Neigung zu inter- oder intramolekularen Wasserstoffbindungen. Umgekehrt gestattet die Untersuchung des Filmverhaltens unter geeigneten Umständen Aussagen über jeden einzelnen dieser Faktoren.

Unter dem Gesichtspunkt der Stärke der Anziehung zwischen dem Wasser des Substrates und der Endgruppe des Filmbildners faßt ADAM (r) folgende vier Gruppen zusammen:

1. Sehr geringe Anziehung, keine Filmbildung: Kohlenwasserstoffe, CH_2J , CH_2Br , CH_2Cl , NO_3 .

2. Geringe Anziehung, instabile, leicht kollabierende Filme: CH_2OCH_3 , $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$, COOCH_3 .

3. Starke Anziehung, stabile Filme, kaum merkliche Löslichkeit bei einer Kettenlänge von 16 C-Atomen: CH_2OH , COOH , CN , CONH_2 , CH:NOH , $\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$, CH_2COCH_3 , NHCONH_2 , NHCOCH_3 .

4. Sehr starke Anziehung, löslich bei einer Kettenlänge von 16 C-Atomen: $\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3'$, SO_3' , OSO_3' , NR_3 .

Zur Gruppe 3 gehören die meisten der im folgenden besprochenen Substanzen.

a) *Expansive Filme.*

Dieser Typ ist der einfachste. Sein Verhalten entspricht weitgehend dem Verhalten eines dreidimensionalen Gases. e-Filme dehnen sich auf

genügend großen Flächen unbegrenzt aus. Fast alle wasserlöslichen, grenzflächenaktiven Stoffe bilden e-Filme und diejenigen wasserunlöslichen, bei denen das Bestreben, flach auf dem Wasser zu liegen,¹ groß ist im Verhältnis zu der lateralen Anziehungskraft der Teilchen. Bei diesen Filmen findet sich auch eine Analogie zu dem nichtidealen Zustand von Gasen. Nur wenn für die einzelnen Moleküle sehr viel Fläche zur Verfügung steht, gilt eine einfache Zustandsgleichung. Bekanntlich ist die kinetische Energie für jeden Freiheitsgrad eines einzelnen Teilchens gleich $\frac{1}{2} kT$, also für die beiden in der Ebene vorhandenen Freiheitsgrade gleich kT . Entsprechend dem Dreidimensionalen äußert sich diese Energie in dem zweidimensionalen Druck (der den Namen Schub erhalten hat) auf die Begrenzung des Films. Die übliche kinetische Entwicklung dieses Ansatzes führt für einen idealen Film zu der Gleichung

$$F \cdot A = kT.$$

Wenn F in Dyn/cm und A in Å^2 gemessen wird, ist das Produkt kT für Zimmertemperatur gleich 400. Das bedeutet also, daß bei einem Schub von 1 Dyn/cm jedem Molekül eine Fläche von 400 Å^2 zur Verfügung steht. Für einen solchen Film ist aber ein ideales Verhalten noch nicht zu erwarten, da bei einem Flächenbedarf von z. B. 120 Å^2 für ein liegendes Palmitinsäuremolekül die Fläche von 400 Å^2 viel zu klein ist.² Erst bei 10—100mal größeren Flächen/Molekül nähert sich das Filmverhalten dem idealen Zustand. Abb. 1 erläutert die Verhältnisse. Zu solchen Messungen sind Geräte mit einer Empfindlichkeit von 10^{-3} Dyn/cm erforderlich.

Expansive Filme zeigen immer über ihrer ganzen Fläche ein einheitliches Potential.

Beispiele für Stoffe, die unter geeigneten Bedingungen expansive

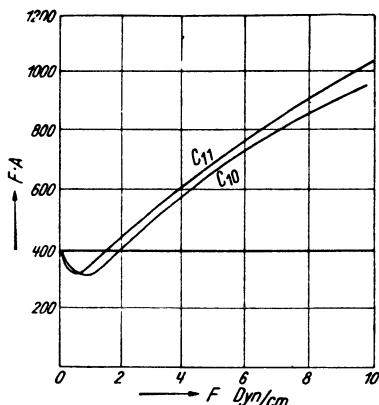


Abb. 1. Die Abweichung vom idealen Verhalten bei expansiven Filmen.

Bei idealem Verhalten müßten die Kurven im Ordinatenabstande 400 parallel zur Abszisse verlaufen. Die Kurven sind an dabischen Estern gewonnen worden [ADAM und JESSOP (12)]. Der Verlauf dieser Kurven entspricht genau dem bei einem dreidimensionalen Gase. Bei sehr kleinen Schubsen wird der theoretische Wert von 400 für das Produkt FA sehr nahe erreicht. Das heißt, die BOLTZMANNsche Konstante k gilt auch für Filme. Die Abweichungen des wahren vom theoretischen Kurvenverlauf sind bei kleinen Schubsen durch die gegenseitige Anziehung der Moleküle, bei größeren Schubsen durch ihren Flächenbedarf bedingt. Es gilt eine der VAN DER WAALSSchen entsprechende Gleichung.

¹ Der Flächenbedarf für jede neue CH_2 -Gruppe steigt dabei immer um den gleichen Betrag [siehe VOLMER (394)].

² In diesem Fall gilt eine der VAN DER WAALSSchen entsprechende Gleichung (395, 398).

Filme geben, sind langkettige Fettsäuren, Ester, Nitrile und Alkohole. Mit diesen erreicht man $F \cdot A$ -Werte bis zu 25% des theoretischen Wertes. Folgende Stoffe ergeben Filme mit nahezu theoretischem $F \cdot A$ -Wert: die Acetate der langkettigen Amine, Nonoyltrimethoxybenzol, das Triacetat von Östriol und die langkettigen Fettsäuren auf $n/10$ alkalischer Lösung kurz nach dem Spreiten.

Wenn man statt des theoretischen Wertes 400 für das Produkt $F \cdot A$ einen Wert in der Nähe von 200 findet, bedeutet das eine Assoziation zu

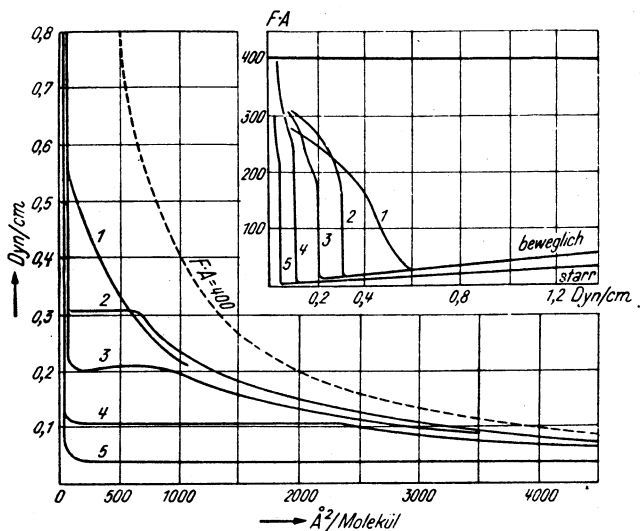


Abb. 2. Kondensation expansiver Filme [aus ADAM (1), S. 44].

1 Laurinsäure ($14-16^\circ$), 2 Tridecylsäure ($14,5^\circ$), 3 Myristinsäure ($14,5^\circ$), 4 Pentadecylsäure ($14,5^\circ$), 5 Palmitinsäure (12°). Der Verlauf der $FA \cdot \gamma$ -Kurve für Laurinsäure im Nebendiagramm deutet auf Bildung von Doppelmolekülen hin.

Doppelmolekülen. Beispiele dafür sind: Myristinsäure bei ganz kleinen Schüben und $\omega\omega'$ -Diresorcinyldodecan.¹ Weitere Untersuchungen in dieser Richtung mit hochempfindlichen Instrumenten werden sicher noch eine Menge Beispiele für derartige Fälle bringen. Übrigens zeigt Ölsäure in hochverdünnten Filmen keine Neigung zur Bildung von Doppelmolekülen.

In Abb. 2 ist an einer Reihe von Beispielen das Verhalten einiger Fettsäuren bei zunehmender Flächenverkleinerung dargestellt. Entsprechend den Kondensationserscheinungen von Gasen tritt in Abhängigkeit von der Temperatur und der Kettenlänge ein Zustand ein, in dem über einen großen Flächenbereich der Schub konstant bleibt. In diesem Zustand existieren gleichzeitig nebeneinander kondensierte (starre) und expansive

¹ Das Tetraacetat dieser Verbindung gibt dagegen den Wert 400!

Filmbereiche. Im Dreidimensionalen bedeutet der zu dem waagerechten Kurventeil gehörige Druck den Dampfdruck der Flüssigkeit bei der betreffenden Temperatur. Man kann hier also von einem zweidimensionalen Dampfdruck sprechen. Mit wachsender Kettenlänge wird derselbe wegen der zunehmenden VAN DER WAALSSchen Kräfte immer geringer. Andererseits zeigt die Kurve der Laurinsäure, daß der Film sich bei der angegebenen Temperatur schon über seinem kritischen Punkt befindet.

Als Überleitung zum folgenden Abschnitt sei erwähnt, daß für viele starre Filme ein zweidimensionaler Dampfdruck bisher nicht hat gemessen werden können. Für eine Reihe von Substanzen ist dies aber gelungen. Die gefundenen Werte sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Sie beziehen sich auf Zimmertemperatur ohne genauere Angaben. Aus technischen Gründen ist die Messung an Filmen bei Temperaturen über oder unter Zimmertemperatur schwierig. Da bezüglich anderer Filmeigenschaften eine Kettenverlängerung um eine CH_2 -Gruppe die gleiche

Tabelle 1. Schubwerte für die Entweichungstendenz kondensierter Filme (zweidimensionaler Dampfdruck) [aus ADAM (1)].

Stoff	Zahl der C-Atome in der Kette	Schub Dyn/cm	Quelle (Nr. d Schr.-Verz.)
Tridecylsäure	13	0,30	10
Myristinsäure	14	0,19	10
Pentadecylsäure	15	0,11	10
Palmitinsäure	16	0,04	10
Myristylnitril	14	0,39	23
Palmitylnitril	16	0,15	10
Margarylnitril	17	0,10	10
Stearylnitril	18	0,04	10
Tetradecylalkohol	14	0,11	10
Hexadecylalkohol	16	0,02	10
α -Monomyristin	14	0,17	13
α -Monopalmitin	16	< 0,04	13
Äthylmargarat	17	0,10	10
Äthylstearat	18	0,03	10
p-Nonylphenol	9	0,03	13
Lauryldimethoxybenzol ..	12	0,07	14
Höhere Glieder dieser Serien, Cholesterin, Tripalmitin	—	< 0,02	—

Die genannten Säuren waren auf n/50 HCl gespreitet, alle anderen Verbindungen auf reinem Wasser.

Wirkung hat wie eine Temperatursenkung von 8—10 Grad, kann aus den Werten der Tabelle geschlossen werden, daß der Temperaturkoeffizient des Dampfdruckes von der Größenordnung 0,01 Dyn pro Zentimeter und Grad ist.

DUNKEN (115b) zeigt, daß der Temperaturpunkt, bei dem ein Fettsäurefilm aus dem starren Zustand in einen Zustand merklicher

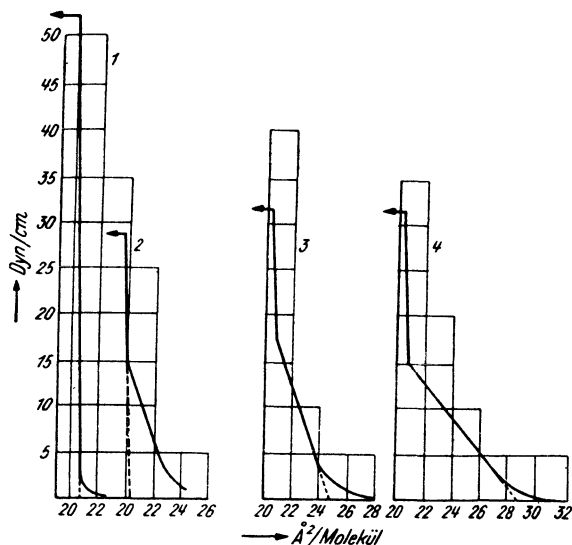


Abb. 3. Verhalten auf verschiedenem Substrat und Gewinnung des Wertes für den minimalen Flächenbedarf [aus ADAM (1), S. 47].

1 gesättigte Fettsäure auf altem destilliertem Wasser, 2 gesättigte Fettsäure auf frischem destilliertem Wasser, 3 gesättigte Fettsäure auf verdünnter Salzsäure, $n/10$ — $n/100$, 4 Iso-Olsäure (α - β) auf verdünnter Säure. Der Unterschied zwischen 1 und 2 ist durch Spuren 2- und 3-wertiger Ionen bedingt. Auf saurer Lösung ist die Dissoziation der Endgruppen praktisch aufgehoben. Siehe auch die Bedeutung der Wasserstoffbindung für das Verhalten kondensierter Filme (Abschn. 43).

Beweglichkeit übergeht, ungefähr übereinstimmt mit dem gewöhnlichen Schmelzpunkt des dem Kohlenwasserstoffrest der betreffenden Fettsäure entsprechenden Kohlenwasserstoffs. Das bedeutet, daß „zum Beweglichwerden eines Moleküls einer als Oberflächenlösung vorliegenden Substanz die gleiche Energie notwendig ist, wie sie ein Molekül des um 1 C-Atom ärmeren Kohlenwasserstoffs bei dessen Schmelzpunkt besitzt“.

Eine andere Möglichkeit, den Molekülen eines starren Films Beweglichkeit zu verleihen, besteht darin, daß man diesen Film in eine Grenzfläche von Wasser nicht gegen Luft, sondern gegen eine Flüssigkeit bringt, in der die Kohlenwasserstoffenden löslich sind, z. B. Paraffinöl.

b) Kondensierte Filme.

Diesen Zustand können die meisten der untersuchten Stoffe unter geeigneten Bedingungen annehmen. Die Moleküle liegen eng gepackt nebeneinander.

der, da die Adhäsion zwischen ihnen groß ist. Wenn mehr Fläche zur Verfügung steht als dieser dichten Packung entspricht, ist die übrige Wasserfläche entsprechend der Größe des eben besprochenen Dampfdrucks von mehr oder weniger Einzelmolekülen bedeckt. Die Potentialmessung ergibt entsprechende Schwankungen. Beim Zusammenschieben des Films dagegen wird, je nach Art der Moleküle, ihre Orientierung zur Normalen unter mehr oder weniger schnellem Schubanstieg geändert, d. h. wenn es sich um Ketten handelt, stellen sie sich senkrecht. Bei einem Versuch, den Film noch weiter zusammenzuschieben, steigt der Schub steil an. In diesem Gebiet scheint (siehe

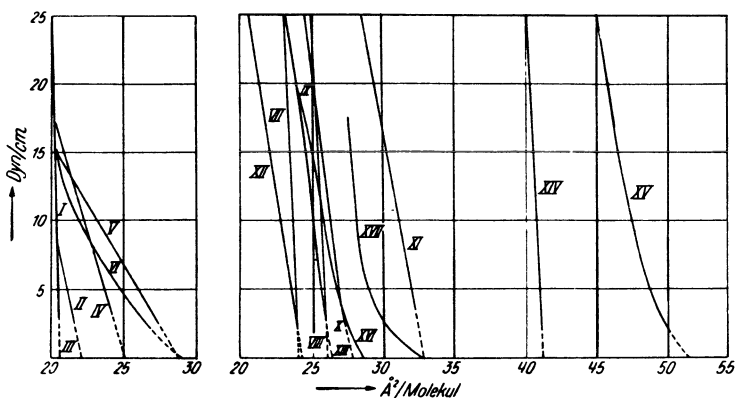





Abb. 4. Einfluß verschiedener Endgruppen (siehe Tab. 2) und Temperaturen auf das F, A -Verhalten [aus ADAM (1), S. 49].


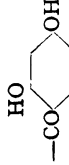
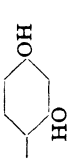
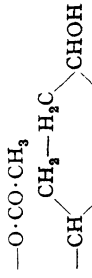
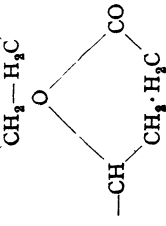
Die römischen Zahlen beziehen sich auf Tabelle 2. Diskussion im Text.

unten) Wasser aus dem Film gepreßt zu werden, das bis dahin noch zwischen den Ketten vorhanden war. Schließlich erfolgt ein Brechen des Films, der sog. Kollaps.¹ Je nach der Art des Films (m oder r) kann sich dies in dem Auftreten von ultramikroskopisch sichtbaren Tröpfchen, Schollen, Konglomeraten oder Falten (Eiweiß) äußern. Typische Kurven zeigen die Abb. 3 und 4. In Tabelle 2 ist der Flächenbedarf für die einzelnen Stofftypen im Falle engster Packung zusammengestellt. Dazu ist zu sagen, daß für eine bestimmte Endgruppe der Flächenbedarf unabhängig von der Kettenlänge ist, falls diese nur ausreicht, um bei der Untersuchungstemperatur einen starren Film zu ergeben. Die angegebenen Zahlen für den Flächenbedarf werden (siehe Abb. 3) so gewonnen, daß derjenige steile Kurventeil, für dessen Zustand man den Flächenbedarf angeben will, bis zur Abszisse verlängert wird. Diese Werte sind also auf den Wert $F = 0$ extrapoliert und zu Vergleichen geeignet, dagegen nicht zur Beurteilung des wirklichen Platzbedarfes bei großem Schub [siehe die Tabelle in der Arbeit von ALEXANDER (31c)], was oft vergessen wird.

¹ Über die Abhängigkeit dieses Kollaspunktes vom p_H siehe z. B. MYERS (304).

Tabelle 2. Filme langkettiger Verbindungen [aus ADAM (1)].

Kurve	Reihe	Endgruppe	Flächen- bedarf A ² /Mol.	X (Anm.)	Quelle	
I	Säuren auf Wasser	—COOH	20,5	13	(4, 5)	
	Dibasische Ester	—COOC ₂ H ₅ (beide Enden)	20,5	17	(12)	
	Amine (auf alk. Lösung)	—CH ₂ NH ₂	20,5	13	(18)	
	Amide	—CONH ₂	20,5	13	(5, 8)	
	Methylketone	—COCH ₃	20,5	14	(11)	
	Triglyceride (pro Kette)	—COOCH ₂	20,5	(10)	(5, 169)	
	Harnstoffe (über kritischer Temperatur)	—NH·CO·NH ₂	20,5	(13)	(5, 8, 9)	
	Acetamide (unter kritischer Temperatur)	—NH·CO·CH ₃	20,5	16	(9)	
	Ester gesättigter Säuren	—COOR	22,0	schwankt	(5, 6, 8, 9)	
	Alkohole	—CH ₂ OH	21,6	11	(5, 6, 9)	
	Säuren auf verdünnter HCl	—COOH	25,1	14	(4, 5, 6, 9, 17)	
	Isoölsäure auf HCl	—CH:CH·COOH	28,7	15	(5, 6)	
	Äthylisooleat	—CH:CH·COOC ₂ H ₅	28,7	16	(8)	
	VII	Phenole u. andere einfache p-Benzolverbindungen		24,0	—	(7, 13)
						
						
	VIII	Harnstoffe (unter kritischer Temperatur)	—NH·CO·NH ₂	26,0	(13)	(5, 8, 9)
—C≡N			27,7	17	(5, 8, 9, 23)	
—CHBr·COOH			27,2	16	(8)	
—CHBr·COOH			32,8	16	(9)	
—NH·CO·CH ₃			24,2	16	(13)	
IX	Nitrile	—C≡N	27,7	17	(5, 8, 9, 23)	
		—CHBr·COOH	27,2	16	(8)	
X	α-Bromsäuren auf HCl (n = 16—19)	—CHBr·COOH	27,2	16	(8)	
		—CHBr·COOH	32,8	16	(9)	
XI	α-Bromsäuren auf HCl (n = 15)	—CHBr·COOH	27,2	16	(8)	
		—CHBr·COOH	32,8	16	(9)	
XII	Acetamide (über kritischer Temperatur)	—NH·CO·CH ₃	24,2	16	(13)	
		—NH·CO·CH ₃	24,2	16	(13)	

XIII	Monoglyceride	$-\text{COOCH}_2\cdot\text{CHOH}\cdot\text{CH}_2\text{OH}$	26,3	16	(13)
XIV	Cholesterin	—	40,8	—	(25, 16)
XV	Hydrolecithin	—	52,0	—	(11)
XVI	Acylresorcinole		(28)	7	(14)
	Acylphloroglucine		(32)	7	(14)
	Acetanilide	$-\text{NH}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_3$	28,2/25,8	—	(7)
	Aldoxime	$-\text{CH}=\text{NOH}$	24—25,4	14	(8, 24)
	Alkylresorcinole		(28)	18	(14)
XVII	Acetate	$-\text{O}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_3$	23	16	(9)
	p-Alkylcyclohexanole		30	11	(25)
	Lactone		29	—	(20)

Der Flächenbedarf ist in Å^2 pro Molekül angegeben, extrapoliert auf den Schubwert $F_x = 0$ (siehe Text). Die Spalte X gibt die Zahl der Ketten-C-Atome an (abzüglich des in der Endgruppe mitgezeichneten), die nötig sind, damit der Film bei 15°C eben noch kondensiert ist. Die Zahlen der letzten Rubrik beziehen sich auf das Schriftenverzeichnis.

Wie Tabelle 2 zeigt, ist der Flächenbedarf für einen Teil der langkettigen aliphatischen Verbindungen $20,5 \text{ \AA}^2$. Der wirkliche Wert bei hohem Schub liegt (siehe Abb. 3) bei $19,5 \text{ \AA}^2$. Aus Röntgenuntersuchungen an Kristallen hat sich für die gleichen Stoffe ein Wert von $18,4 \text{ \AA}^2$ ergeben [MÜLLER (301a)], und für Kristalle dicht unter dem Schmelzpunkt (Rotation, hexagonale Ordnung) ein Wert von $19,5 \text{ \AA}^2$ [MÜLLER (302)]. Diese Differenz liegt weit außerhalb der Fehlermöglichkeit. Sie könnte erklärt werden durch eine Neigung der Ketten im Film von $26,5^\circ$ gegen die Normale,¹ gleiche Packungsdichte im Film und Kristall vorausgesetzt. Wahrscheinlicher ist aber die Annahme, daß die größere Fläche im Film durch Wassermoleküle bedingt wird, die zwischen den Ketten sitzen.² Bezüglich der Diskussion der übrigen in Tabelle 2 aufgeführten Flächenwerte verweisen wir auf ADAM (1). Hier nur einige Hinweise:

Für die Harnstoff- und Acetamidderivate sind je zwei Werte angegeben. Bei diesen Stoffen tritt innerhalb des relativ kleinen Temperaturintervalls, in dem die Filme untersucht werden können, ein Umwandlungspunkt auf. Das Eigenartige ist nun, daß in einem Falle (Acetamide) die größere Fläche oberhalb und im anderen Falle (Harnstoffe) unterhalb der Umwandlungstemperatur eingenommen wird. Für beide Moleküle muß eine Winkelung der Endgruppenachse gegen die Hauptachse angenommen werden. Beim Acetamid ist unterhalb der Umwandlungstemperatur noch keine Energie für die Rotation der Moleküle frei und der Flächenbedarf dem Zeitmittel entsprechend gering. Oberhalb des kritischen Temperaturpunktes beginnt eine Drehung des Moleküls. Anders beim Harnstoff. Hier dreht sich das Molekül auch schon unterhalb des Umwandlungspunktes, aber unter Aufrechterhaltung des Winkels. Im Umwandlungspunkt schmilzt diese Winkelstarrheit und das Molekül dreht sich in gestreckter gerader Form weiter.³

Daß die phenolischen Endgruppen einen relativ so geringen Flächenbedarf haben, läßt sich nur so deuten, daß die Ringe aufrecht stehen und daraus wieder kann man schließen, daß bei dem Schub, für den diese Meßwerte gelten, die Anziehungskraft der Ringe untereinander

¹ Bei diesem Winkel würden die Zickzacklinien der Hauptketten gerade ineinander passen [LYONS und RIDEAL (277)].

² Siehe die unten angeführten Arbeiten über Verdunstung durch Filme hindurch. Außerdem haben Elektronenbeugungsaufnahmen von Filmen, die unter Wahrung des Flächenverhältnisses 1,00 (siehe unten) auf Tragerplatten gebracht wurden, ergeben, daß die Ketten genau senkrecht stehen. Ferner hat DERVICHIAN (100a) für Triglyceride gezeigt, daß der Flächenbedarf beim Kollapspunkt pro Kette bei $18,7 \text{ \AA}^2$ liegt.

³ Die Rotation darf man sich nicht als gleichförmige Drehbewegung vorstellen, sondern eher als ruckartige, also beschleunigte Drehbewegung in unregelmäßiger „tanzender“ Folge von Rechts- und Linksdrehung. Siehe dazu auch RADULESCU (329a) und ALEXANDER (31a und b).

größer ist als die der Ringe an das Wasser. Der große Flächenbedarf für die Nitrilgruppe entspricht dem Parachorwert des Nitrils.

Der Druck, unter dem die Filmsubstanz bei einem Schub von 50 Dyn/cm und einer Kettenlänge von 20 Å steht, beträgt $2,5 \cdot 10^8$ Dyn/qcm oder rund 250 Atmosphären. MONQUIN und RIDEAL (299) berechnen für die Festigkeit von Palmitinsäurefilmen einen Wert von $5 \cdot 10^7$ Dyn/qcm oder 50 Atmosphären.

ADAM unterscheidet zwei Arten kondensierter Filme voneinander: dichtgepackte Endgruppen, durch Kompression zu ordnen, und dichtgepackte Endgruppen, durch Kompression nicht zu ordnen. Zur ersten Art gehören z. B. IX und XII, zur letzteren z. B. VII, VIII und XIII (siehe Tabelle 2). Siehe dagegen die Deutung von ALEXANDER (31b und c) (Wasserstoffbindung).

Die meisten untersuchten Substanzen zeigen bezüglich der F/A -Kurve keine Hysterese. Eine solche wurde aber z. B. gefunden in der Nähe der Umwandlungstemperatur für die Harnstoffderivate (9). Eine elastische Nachwirkung zeigen Filme von Hydrolecithin [(11), S. 368] und Dodecylphenol (m/r-Filme). Wenn man diese Filme zusammenschiebt, steigt in einem bestimmten Moment der Schub plötzlich steil an, um nach etwa 10 Minuten bei gleicher Fläche auf einen kleineren Wert abzusinken. Diese Erscheinung hängt offenbar im Falle des Phenolderivats mit einem Widerstand gegen die Veränderung des normalen Packungswinkels der Phenolringe zusammen.

Über die Orientierung der Moleküle in expansiven und kondensierten Filmen läßt sich zusammenfassend folgendes sagen: Lange Moleküle mit mehreren, über das Molekül verteilten aktiven Gruppen bilden expansive Filme, z. B. auch Sterinderivate mit Hydroxylgruppen im Ring A und D oder im Ring A und der Seitenkette. Lange Moleküle mit einer aktiven Gruppe am Ende bilden bei genügender Kettenlänge kondensierte Filme. Bei kleinerer Kettenlänge, geeignetem Substrat und kleinem Schub können sie expansive Filme bilden (siehe hierzu auch Abschnitt 43).

Je nach der Kettenlänge und der Art der Endgruppen können durch großen Schub auch Kettenmoleküle mit zwei aktiven Endgruppen zum Aufrichten und zur Bildung kondensierter Filme gebracht werden.

Einen gut abgewogenen Versuch, die verschiedenen bekannten Typen des kondensierten Zustandes auf Grund aller bekannten Daten einheitlich zu deuten, stellt die besonders klare Arbeit von ALEXANDER (31c) dar.

c) Gedehte Filme.

Der wesentliche Unterschied in dem Verhalten dieser Filme gegenüber den vorher erwähnten ist aus Abb. 5 ersichtlich. Ihre Kondensation ist kein echter, d. h. sprunghafter Phasenwechsel wie in Abb. 2. Das waagerechte Kurvenstück aus Abb. 2 ist hier (Ordinatenmaßstab) die dicht über

der Abszisse liegende, ihr parallele Gerade. Alle Fettsäuren, und ähnlich auch α -Bromsäuren, Nitrile, Alkohole, Amide, Harnstoffe, Oxime, Amine und Acetamide zeigen unter bestimmten Umständen diesen Kurventyp. Der Flächenbedarf ist bei Zimmertemperatur und kleinen Schüben etwa 48 \AA^2 . Die Filme zeigen einen „zweidimensionalen Dampfdruck“ von ungefähr $0,2 \text{ Dyn/cm}$.

Der Übergang vom expansiven Zustand zum kondensierten Zustand erfolgt bei diesen Filmen nicht direkt über ein Gebiet *konstanten* Schubes,

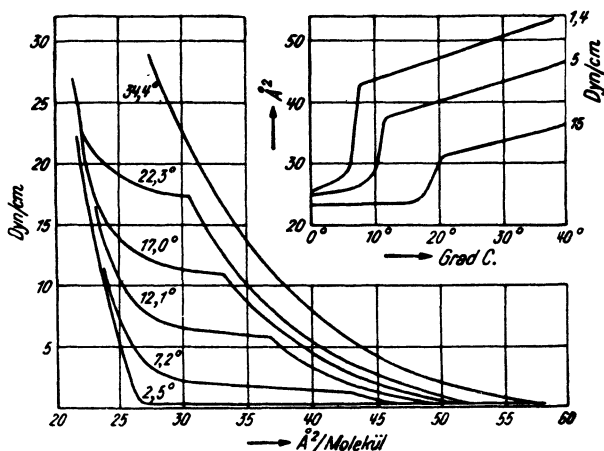


Abb. 5. F/A -Verhalten und seine Temperaturabhängigkeit bei gedehnten Filmen (d-Filmen) [aus ADAM (1), S. 59]. Beispiel Myristinsäure auf saurem Substrat. Rechts vom Knickpunkt der Kurven ist der Film in seinem „gedehnten“ Zustand, nach links hin vom Knickpunkt zunehmende Kondensation. (Erläuterung im Text. Das Nebendiagramm ist wichtig für Abschnitt 18 und 43.)

sondern auf diese konstante Schubstufe setzt sich noch eine 2. hohe Stufe, nach links ansteigend auf.¹ Der steile Endteil der Kurve ist weniger steil als bei den starren Filmen. Bei tieferer Temperatur sind die Filme völlig kondensiert, bei hoher Temperatur bleiben sie auch bei großen Schüben gedehnt.

LANGMUIR (256) stellt sich vor, daß diese Filme gleichsam eine Doppelschicht bilden, deren oberer Teil eine flüssige Kohlenwasserstoffphase darstellt und deren unterer Teil somit einen expansiven Film (bestehend aus den aktiven Endgruppen der Moleküle) an der Grenzfläche Wasser/Kohlenwasserstoff bildet. (Dünne Schichten von Paraffinöl, dem etwas Fettsäure beigemischt ist, benehmen sich auf Wasser ähnlich.) Diese Filme werden von ihm Duplexfilme genannt.

Über Einzelheiten der Theorie dieser Filme und ihre Zustandsgleichung muß auf die Originalarbeit oder auf ADAM (1) verwiesen werden. Siehe auch ARIYAMA (39).

¹ Beim Vergleich mit Abb. 2 beachte den Unterschied im Abszissen- und Ordinatenmaßstab!

ADAM (1) bringt einige Tabellen (S. 64 u. 65), in denen die Daten über diese Filme zusammengestellt sind. Eine ausführliche Wiedergabe der LANGMUIRSchen Theorie findet sich bei BRILL (75). Diese stellt im wesentlichen eine physikalische Interpretierung der Größe F_0 in der hier gültigen Zustandsgleichung $(F - F_0)(A - A_0) = C$ dar.

An Filmen von Östronderivaten (siehe Abschnitt 7) erhält man F/A -Kurven, die denen beweglicher Filme vollkommen gleichen. Trotzdem sind die Ursachen für ihr Zustandekommen offenbar ganz andere, denn es besteht zwischen 0° und 45° keine merkliche Temperaturabhängigkeit des zur beginnenden Kondensation nötigen Schubes (oder der Stufenhöhe der F/A -Kurve)! [ADAM, DANIELLI, HASLEWOOD und MARRIAN (19a).]

Ebenso muß bezüglich der in letzter Zeit vorgenommenen feineren Untersuchung des Filmverhaltens,¹ die zur Auffindung von Transformationspunkten höherer Ordnung geführt hat, auf die Originalliteratur verwiesen werden, insbesondere auf die große Arbeit von HARKINS und BOYD (193) und die von ALEXANDER (31a und b). Siehe ferner DERVICHIAN und JOLLY (107) DERVICHIAN (103). Über Transformationen in starren Mischfilmen höherer n-Fettsäuren (C_{22} — C_{23}) berichten STÄLLBERG-STENHAGEN und STENHAGEN (370a).

Arbeiten theoretischen Inhalts über F/A -Kurven und $\Delta V/A$ -Kurven finden sich bei MOSS und RIDEAL (300), HUGHES (221), ADDINK (27), HARKINS, CARMAN und RIES (194), HARKINS und MYERS (201), ALEXANDER und SCHULMAN (34), BIKERMAN und SCHULMAN (56), MARSDEN und SCHULMAN (282), RIES (340), TRAPEZNIKOV (387), NUTTING und HARKINS (315).

Arbeiten thermodynamischen Inhalts über die Zustandsform von Filmen bei HARKINS und NUTTING (204), GUGGENHEIM (187), HARKINS, YOUNG und BOYD (206), DÖRING und NEUMANN (114), INNES und ROWLEY (230).

GREGG (181) untersucht die Verwandtschaft von Oberflächenfilmen auf festen Körpern und auf Wasser.

5. Einfluß des Substrates.²

Die Filme der einfachen, aliphatischen Fettsäuren gehören zum expansiven oder gedehnten Typ, je nachdem welches p_H das Substrat hat. Auf sauren und neutralen Lösungen sind die Moleküle wenig oder gar nicht dissoziiert, haben also noch starke Restvalenzen, die VAN DER WAALSschen Kräfte zwischen den Ketten bestimmen weitgehend das Filmverhalten. Die Filme sind gedehnt. Auf alkalischem Substrat stoßen sich die ionisierten Endgruppen gegenseitig ab, das Filmverhalten hängt von dem Verhältnis dieser abstoßenden Kräfte zu den anziehenden ab, die Filme können expansiv sein. In der gleichen Richtung liegt der Befund, daß die Expansionstemperatur für Fettsäuren auf alkalischen Lösungen niedriger ist als auf neutralen oder sauren. Für p_H 12 liegt sie um 35 — 60° niedriger als bei p_H 4, wobei die genaue Differenz durch die Art und Menge der übrigen Ionen der Lösung gegeben ist [ADAM und MILLER (21)]. Ähnlich verhalten sich die Amine, nur daß hier die Erniedrigung der Expansionstemperatur in der Richtung vom sauren zum alkalischen hin verläuft.

¹ Siehe den Anfang von Abschnitt 4.

² Siehe unter „Namen und Zeichen“

Allgemein läßt sich sagen, daß die seitliche Anziehung der Ketten untereinander durch Ionisation der Endgruppen stark gehindert wird.¹ Bei gleichem p_H aber hängt doch ihre Größe stark von den übrigen Ionen

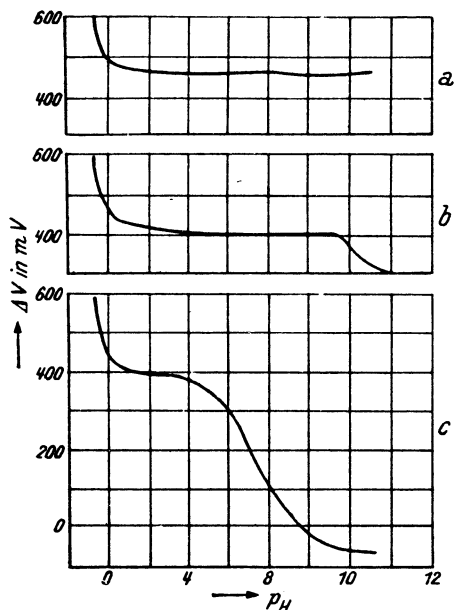


Abb. 6. Wirkung des p_H auf das Voltapotentiale verschiedener Stofftypen [aus ADAM (1), S. 73].

a Octadecyl-Methyläther, b Tetradecylalkohol, c Myristinsäure. Alle drei Kurven sind bei höchstmöglichem Schub, also einer konstanten Fläche von etwa 20 \AA^2 aufgenommen. Der steile Anstieg im stark sauren Gebiet bei allen drei Kurven wird auf die Bildung von Oxoniumsalzen zurückgeführt. Der p_H -Wert für die undissoziierte Myristinsäure liegt bei p_H 1–2. Bei höherem p_H erfolgt zunehmende Dissoziation. Der Alkohol bleibt über einen viel größeren p_H -Bereich undissoziiert.

α - β -Stellung zur Endgruppe erniedrigt die Expansionstemperatur weniger als eine in Mittelstellung befindliche. Stoffe mit zwei und drei Doppelbindungen, entfernt von der Endgruppe, bilden bewegliche Filme mit einem Flächenbedarf, der mit der Zahl der Doppelbindungen wächst. Solche hochungesättigten Filme sind nur auf Substraten haltbar, denen eine reduzierende Substanz (z. B. Hydrochinon) zugesetzt ist. Eine Dreifachbindung, fern von der Endgruppe, bewirkt eine so starke Zunahme der Affinität zum Wasser hin, daß die Filme (z. B. Stearolsäure) expansiv werden. Außerdem wächst der ΔV -Wert stark an (144, 145, 227).

¹ Siehe auch Abschnitt 43, vorletzter Absatz.

ab. Z. B. ist die Expansionstemperatur der Säuren auf Boratpuffern von einem p_H größer als 6 über 30° höher als auf Phosphatpuffern.

Über die Wirkung des p_H und der Substrationen auf die Änderung des Voltapentials (siehe Abb. 6) und das F/A -Verhalten berichten im einzelnen folgende Arbeiten: LANGMUIR (254, 256), LANGMUIR und SCHAEFER (268), HARKINS und MYERS (201, 203), MITCHELL, RIDEAL und SCHULMAN (397), SCHULMAN (349), PANKRATOV (321). Siehe auch besonders LANGMUIR und BLODGETT (264a), HUGHES (352), TRAPEZNIKOV (387). Ferner MYERS u. HARKINS (306a).

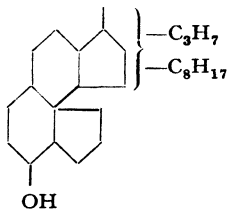
6. Filme von Kettenmolekülen mit Doppelbindung.

Die Einfügung einer Doppelbindung in die Mitte einer Kette läßt die Filme leichter expandieren und führt zu einem etwas größeren Flächenbedarf. Die stereochemische Konfiguration ist dabei von erheblichem Einfluß. Z. B. hat Brassidinsäure eine um mehr als 30° höhere Expansionstemperatur als Eucasäure. Eine Doppelbindung in

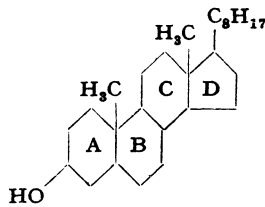
Über ungewöhnlich große Unterschiede im Verhalten der α - und β -Form der Anlagerungsverbindung von Maleinsäureanhydrid an α - und β -Elaeostearinsäure hinsichtlich der F/A -Kurve und der $\Delta V/A$ -Kurve berichten GEE und RIDEAL (147, 148).

7. Filme von Sterinen und ähnlichen Verbindungen.

Die Einzelheiten über den Flächenbedarf und das Filmverhalten dieser Substanzen interessieren im Rahmen dieses Überblicks weniger als der Hinweis auf die Tatsache, daß gerade bei dieser Stoffklasse die Filmuntersuchung wichtige Beiträge zur Konstitutionsermittlung geliefert hat. Als Beispiel sei das *Cholestanol* angeführt. Messungen ergaben einen Flächenbedarf bei dichtester Packung von 39 \AA^2 . Für eine lange diskutierte Formel (I) dieses Moleküls ließ sich ein theoretischer Mindestflächenbedarf von 54 \AA^2 berechnen, während nach der heute gültigen Formel (II) ein solcher von $35\text{--}40 \text{ \AA}^2$ erwartet wird. Nur mit diesem Wert stimmen die Messungen am Film überein. Die Moleküle stehen im kondensierten Film aufrecht, mit den Ringebenen senkrecht. Die Hydroxylgruppe an C_3 ist dabei der tiefste Punkt.



I.



II.

Über die *sterischen Verhältnisse* in dieser Gruppe geben die ΔV -Messungen oft Aufschluß. Bei steil auf dem Wasser stehendem Ringssystem befindet sich im Falle der *cis-trans*-Isomerie die Hydroxylgruppe (und damit das negative Ende des Dipols) einmal etwas oberhalb und einmal senkrecht unterhalb des positiven C-Atoms. Cholestanol zeigt z. B. ein ΔV von $+400 \text{ mV}$, epi-Cholestanol ein solches von -100 mV . Koprostanol und epi-Koprostanol zeigen ein ähnliches Verhalten.

Bei der *Aufklärung der Konstitution in der Oestrongruppe* hat die Filmuntersuchung ebenfalls eine wichtige Rolle gespielt. Nachdem bekannt war, daß das Grundskelett dieser Gruppe drei Ringe in phenantrenartiger Verknüpfung enthielt und daß im Oestriol drei Hydroxylgruppen (zwei benachbarte alkoholische und eine phenolische) vorhanden waren, haben ADAM, DANIELLI, HASLEWOOD und MARRIAN 1932 (19a) eine Entscheidung zwischen den damals für Oestriol diskutierten Möglichkeiten (1, 2 und 3) dadurch herbeigeführt, daß sie das dreifach acetylierte Oestriol (I) und

den Methyläther des zweifach acetylierten Oestriols (II) auf ihre Filmeigenschaften untersuchten.¹

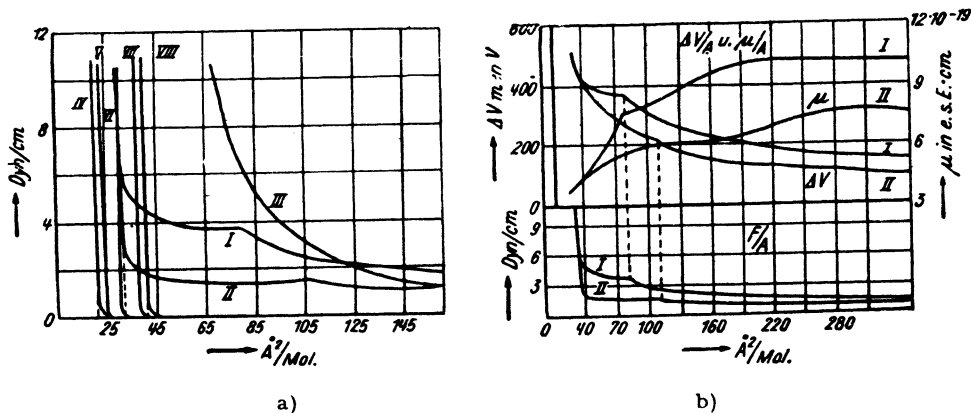
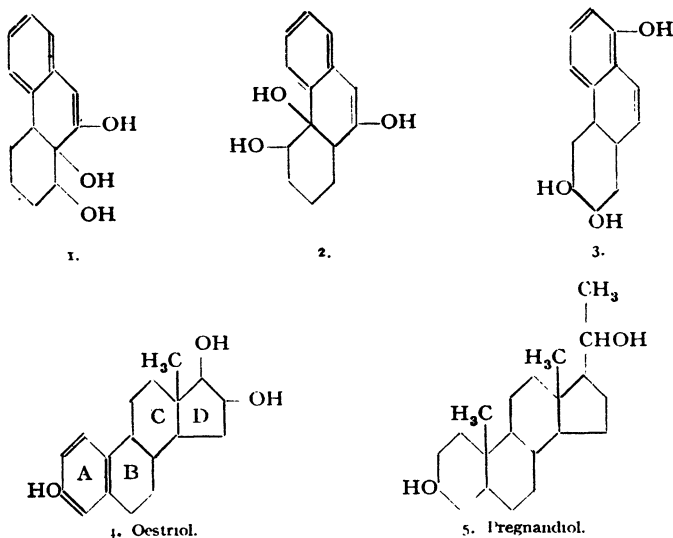


Abb. 7. Das Filmverhalten einiger Sterinderivate und anderer Stoffe [aus ADAM u. a. (19a)].

I 3, 16, 17-Triacetyloestriol, II 3-Methoxy-16, 17-diacetyloestriol, III Pregnandiol, IV Palmtinsäure, V p-Hexadecylphenol, VI p-Hexadecyl-cyclo-hexanol, VII Ergosterin, VIII Cholesterin. Die rechte Ordinatenskala im Diagramm b reicht von 300—1200 milli DEBYE.

Das Filmverhalten ist in Abb. 7a und b dargestellt. I und II geben bei großen Flächen annähernd ideale expansive Filme. Bei einer Kompression auf 3,6 bzw. 1,5 Dyn/cm beginnt eine Kondensation des Films, der

¹ Andere Derivate des Oestriols eigneten sich weniger gut zur Untersuchung, da sie zu leicht löslich waren oder die Filme schon bei zu kleinen Schuben kollabierten.

extrapolierte Endflächenbedarf für beide Substanzen beträgt $32,5 \text{ \AA}^2$. Die Filme wurden auf destilliertem Wasser oder auf $1/100$ KCl gespreitet. Zum Vergleich sind in Abb. 7a die F/A -Kurven von einigen anderen Verbindungen [nach ADAM u. a. (l. c.)] wiedergegeben.

Die Leichtigkeit, mit der die Moleküle im Film durch Schub aufzurichten sind, ließ unter den drei zunächst diskutierten Formelbildern (1—3) nur das dritte als möglich zu, in welchem die phenolische Hydroxylgruppe möglichst weit von den beiden alkoholischen entfernt steht. Da aus anderen Untersuchungen bekannt war, daß eine Methoxygruppe weniger stark an Wasser haftet als Acetylgruppen, muß man annehmen, daß das Molekül mit der phenolischen Hydroxylgruppe nach oben ziemlich aufrecht im komprimierten Film steht. Für die Konfiguration 3 sprach auch der sehr geringe Flächenbedarf. Das Molekül 1 würde sich wohl aufrichten (um die gestrichelte Achse drehen), aber einen wesentlich größeren Flächenbedarf haben (etwa 70 \AA^2), während das Molekül 2 sich auch bei höherem Schub nicht aufrichten würde. Die Schlußfolgerungen haben sich auch bei Aufstellung der endgültigen Oestriolformel (4) als richtig erwiesen.

Der Unterschied im F/A -Verhalten der beiden untersuchten Verbindungen ist ein weiterer Beweis für die Annahme der Aufrichtung der Moleküle unter erhöhtem Schub. Der Kondensationspunkt (beginnende Aufrichtung) für die Verbindung II liegt bei kleinerem Schub als der für die Verbindung I, entsprechend der leichteren Ablösbarkeit der Methoxygruppe von Wasser.

Die Kurven für I und II gleichen in ihrem Aussehen sehr denen beweglicher Filme (siehe Abschnitt 4 c). Sie unterscheiden sich von diesen aber dadurch, daß sich der Kondensationsschub nicht wie bei jenen mit der Temperatur ändert (siehe z. B. Abb. 5), sondern zwischen 0° und 45° nur um weniger als $0,3 \text{ Dyn/cm}$ zunimmt. Die Tatsache der fehlenden Temperaturabhängigkeit des Kondensationsgebietes der F/A -Kurven scheint mit der Starrheit des Moleküls (im Gegensatz zu der inneren Beweglichkeit langer Fettsäureketten) im Zusammenhang zu stehen.

Im oberen Teil der Abb. 7b ist das elektrische Verhalten der Filme dargestellt. Es zeigt sich, daß genau bei dem Flächenwert, bei dem die Kondensation des Films beginnt, auch eine Unstetigkeit in dem Gang der Vertikalkomponente des Dipolmoments auftritt. Dieses Verhalten weicht ebenfalls von dem langkettiger Fettsäuren ab. Man muß es so deuten, daß von diesem Moment ab die flach auf dem Wasser liegenden Moleküle sich aufzurichten beginnen. Da μ von diesem Punkt an sehr stark absinkt, muß man annehmen, daß die Dipolachsen in einem größeren Winkel zur Ringebene stehen und sich beim Aufrichten des ganzen Moleküls mehr der Waagrechten nähern, so daß die Vertikalkomponente ihres Moments abnimmt. Aus dem starken Absinken ist ferner zu folgern, daß die beiden

alkoholischen Hydroxylgruppen nach der gleichen Seite von der Ringebene weg orientiert sind, im anderen Falle würde sich ihre Wirkung zum Teil aufheben.

Während sich Cholesterinmoleküle beim Komprimieren so stellen, daß der Ring A dem Wasser zugekehrt ist, stehen also die Oestriolderivate im komprimierten Film mit dem Ring D zum Wasser hin. Das Pregnandiol (Abb. 7a) hat an den beiden entgegengesetzten Enden seines Moleküls zwei gleichstark hydrophile alkoholische Hydroxylgruppen, die ein Aufrichten unmöglich machen. Es verhält sich daher im ganzen *F/A*-Bereich wie ein zweidimensionales Gas (expansiv).

ADAM (1) bringt die *F/A*- und ΔV -Kurven einer Reihe von Sterinderivaten und diskutiert dieselben näher. Die wesentlichen Arbeiten über Sterinfilme sind folgende: (14), (15), (265); ferner: ROSENHEIM und ADAM, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 105, 422 (1929); FOSBINDER, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A 139, 93 (1933); DANIELLI und ADAM, Biochemic. J. 28 1583 (1934); ADAM, ASKEW und DANIELLI, ebenda 29, 1786 (1935); ADAM u. a. ebenda 26, 1233 (1932); DANIELLI, MARRIAN, und HASLEWOOD, ebenda 27, 311 (1933). HARKINS, RIES und CARMAN (Pimarsäure), J. Amer. chem. Soc. 1935, 2224; ASKEW (Pflanzenfarbstoffe), J. chem. Soc. (London) 1936, 1595.

8. Filme von Kohlenhydraten und synthetischen Polymeren

sind von KATZ und SAMWELL (240), [ferner Liebigs Ann. Chem. 472, 241, 474, 296 (1929)], ADAM (2), HARDING und ADAM (190) untersucht worden. MOSS (J. Amer. chem. Soc. 1934, 41) hat verschiedene Polyäthylsuccinate gespreitet. HARKINS, CARMAN und RIES (194) fanden, daß ω -Oxydecansäure im polymerisierten Zustand so lange spreitet, bis die Ketten flach auf dem Wasser liegen. ADAM fand dagegen, daß polymerisiertes Methyl- und Äthyl- α -methylacrylat nur teilweise spreitet und bei Dunkelfeldbeobachtung viel ungespreitetes Material auf dem Film zu sehen ist.

Die Filme von Cellulosederivaten zeigen alle den gleichen Typ. Bei Flächen über 60 Å² pro Hexosegruppe ist bei den Höherpolymeren der Schub selten größer als 1 oder 2 Dyn cm. Diese Fläche entspricht einem flachliegenden Hexosering. Es ist anzunehmen, daß bei ausreichendem Platz die Celluloseketten flach auf dem Wasser liegen. Sie werden dabei um so weniger miteinander verfilzt sein, je verdünnter die Lösung war, aus der sie gespreitet wurden. Entsprechend wird die Filmdicke willkürlich variierbar sein. Diese Tatsache ist technisch, z. B. bei der Herstellung von Objektträgern für das Elektronenmikroskop, von Bedeutung. Die vollgespreiteten Filme können ohne zu kollabieren bis auf 40 Å² zusammengeschoben werden. Dabei fällt der μ -Wert beträchtlich, offenbar gehen die Ringe dabei aus der waagrechten Lage in eine geneigte über. Die Benzylester brauchen je nach dem Grade der Benzylisierung 65—80 Å² pro Ring. Auffallend ist, daß die Methyl- und Äthylester *F/A*-Kurven geben, die bei kleinen Schüben geradlinig auf die Abszisse zulaufen. Für

Flächen von einigen hundert \AA^2 lassen sich nur noch Schübe von weniger als 0,02 Dyn/cm nachweisen. Weitere interessante Einzelheiten über diese Cellulosefilme müssen in den Originalarbeiten und bei ADAM (S. 85/86) nachgelesen werden.

9. Filme von anderen Stoffen.

Untersuchungen über verschiedene andere Stoffe sind im folgenden zusammengestellt: ADAM (11) und TURNER und WATSON, *Biochemic. J.* **24**, 113 (1930) über Lecithin, Kerasin, Sphingomyelin; HUGHES, *Biochemic. J.* **29**, 430 (1935), über Lysolecithin, BUCHNER, KATZ und SAMWEL (79) über cyclische Ketone, ADAM (14) über aliphatisch substituierte Polyoxyphenole; FOX und DANIELLI (129) über Astacin, Lutein und Vitamin A; STÄLLBERG und STENHAGEN (370) über Phytol, Dihydrophytol und Phytansäure; STENHAGEN (370 b), STENHAGEN und STALLBERG (370 c), STENHAGEN und STÄLLBERG (370 d) und STÄLLBERG-STENHAGEN-STENHAGEN (370 e) über langkettige aliphatische Säuren und Ester mit Methylseitengruppen in verschiedener Stellung, ALEXANDER (30) über Ester und Triazogruppe; KNIGHT (244) über Bathyl, Chimyl- und Sebacylalkohol; RIES (340) über p-Tricresylphosphat und Verwandte, ADDINK (27) und ADDINK und RIDEAL (28) über Myristinsäure, HARKINS und ANDERSON (192) über oxydiertes Cytochrom C; HUGHES (224) über Chlorophyll und Hamine, HUGHES und ALLSOPP (225) über magnesiumhaltige Farbstoffe, LANGMUIR und SCHAEFER (267) über Aufbaufilme aus Chlorophyll; STENHAGEN (372) über Aufbaufilme aus Estern; SOBOTKA und BLOCH (366) über Aufbaufilme aus Sterinen; HARKINS, RIES und CARMAN (205) über Fünferingsysteme, Betulinsäure u. a. elastische Nachwirkungen; MATTEI (283) über Zerotinsäureester, elastische Nachwirkungen; ADAM und JESSOP (14a) über dibasische Säuren

Bevor wir nun auf die weiteren Untersuchungsmethoden an Filmen eingehen, müssen wir ein Kapitel nachholen, das phänomenologisch an den Anfang gehört hätte, aber doch an dieser Stelle aus begrifflichen Gründen leichter verständlich ist: Vorher wurde das Verhalten fertiger Filme geschildert, jetzt soll über ihre Entstehung und Bewegung in Grenzflächen berichtet werden. Einen guten Einblick in diese Vorgänge bekommt man bei der Beschäftigung mit den „flüssigen Schubmessern“, man nennt sie

10. Indicatoröle.

Es handelt sich um Filme von oxydiertem Mineralöl auf Wasser, die den Schub, den sie ausüben, bzw. unter dem sie stehen, durch ihre Interferenzfarbe anzeigen. Reines Mineralöl bleibt auf Wasser als dicke Linse liegen. Je stärker man es röstet, um so mehr aktive Gruppen entstehen, die seine Spreitungstendenz zunehmend vergrößern. Bei einem bestimmten Röstungsgrad spreitet solches Öl auf Wasser spontan zu einem eben noch sichtbaren gelbgrauen Film (Gelb 1. Ordnung). Wenn man diesen Film zusammenschiebt, ändert sich seine Farbe entsprechend seiner zunehmenden Dicke. Wenn man nun den zu jeder Farbe gehörigen Schub mißt und notiert, kann man Filme dieses so geeichten Öls als Schubmesser

für andere Filme benutzen, indem man sie gleichzeitig mit dem zu messenden Film auf die Wasseroberfläche gibt [BLODGETT (57)].¹

Ein Modell solcher Indicatoröle kann man sich nach LANGMUIR und BLODGETT (264a) folgendermaßen herstellen: Man löst in reinem Mineralöl in verschiedenen Proben sehr kleine, steigende Mengen Stearinsäure auf ($1/10^5$ — $1/5 \cdot 10^5$) und spreitet diese Proben auf $n/50$ NaOH. Die Flächengröße der Linsen wächst mit steigendem Stearinsäuregehalt genau linear. Alle Stearinsäure geht in die Grenzfläche. Der Quotient Linsenfläche/Zahl der Säuremoleküle hat dabei den konstanten Wert 88 \AA^2 . Das ist (siehe oben) der vierfache Flächenbedarf des gleichen Moleküls in einem r-Film. Wenn man höhere Konzentrationen von Stearinsäure nimmt (10^{-3} bis $6 \cdot 10^{-3}$), werden die Filme so dünn, daß sie Interferenzfarben zeigen. Der Flächenbedarf bleibt auch hier $88 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$. Diese dünnen Filme sind aber instabil, das Öl zieht sich nach einigen Sekunden zu dickeren Schlieren und Linsen zusammen, die Stearinsäure bleibt als monomolekularer Film auf dem Wasser.

Wenn die Troglösung eine winzige Menge Calcium enthält, ist die Spreitungstendenz viel geringer, die Linsen bleiben jeweils um das Vierfache kleiner, der Flächenbedarf ergibt sich konstant zu $20,0 \text{ \AA}^2$.

II. Spreitungsmechanismus, Bewegung in Grenzflächen.²

WASHBURN und KEIM (400) untersuchten die Spreitung flüchtiger organischer Verbindungen auf Wasser in Gegenwart monomolekularer Filme. Das Prinzip der Messung bestand darin, daß zunächst ein Film von Palmitinsäure oder Stearinsäure oder Tristearin aufgebracht und dann festgestellt wurde, welcher Schub gerade ausreicht, um ein aufgebracht, spreitendes Material am Spreiten unter dem ersten Film zu verhindern. Als spreitendes Material wurde verwendet Nitrobenzol, Toluol, Anisol, Diäthylcarbonat und Isoamylchlorid. Die gefundenen Minimalschübe sagen etwas über die Spreitungstendenz der Substanzen aus. Die Werte liegen in der Reihenfolge der obengenannten Substanzen bei allen drei Primärfilmen in der Gegend von 3, 8, 9, 11, 32 und 15 Dyn/cm. Die Werte für die einzelnen Primärfilme unterscheiden sich jeweils nur um einige Zehntel Dyn/cm. Im weiteren Verfolg untersuchten KEIM und WASHBURN (242) die Spreitung von Gemischen flüchtiger organischer Stoffe auf Wasser. Die Ergebnisse enthalten viele interessante Einzelheiten, z. B. die folgende Beobachtung: Brombenzol und Cyclohexan spreiten in reiner Form nicht auf Wasser. Ihre Mischungen mit Benzol

¹ Über die Verwendung zu einem anderen Zweck (Kennzeichnung von Proteinen) siehe unten [SCHAEFER (343)].

² Theoretisches dazu bei: LANGMUIR (254, 255, 260, 356), HARKINS, YOUNG und BOYD (206), HARKINS und NUTTING (204), BAKKER (42), INNES und ROWLEY (229, 230).

dagegen spreiten. Wenn nun die Konzentration von Brombenzol oder Cyclohexan steigt, sinken die in der vorher besprochenen Arbeit definierten kritischen Spreitungsschübe ab, d. h. ein immer kleinerer Schub des Primärfilms genügt schon zur Verhinderung der Spreitung des Gemisches. Schließlich wird ein Mischungsverhältnis erreicht, das auch bei noch so kleinem Schub des Primärfilms nicht mehr spreitet. Der Schubmesser zeigt keine Änderung, wenn der Mischungstropfen auf die Oberfläche gegeben wird. Die Linse wandert aber auf der Oberfläche umher. Wenn man nun den Primärfilm langsam komprimiert, hört von einem bestimmten Moment ab dieses Wandern der Linse auf. Wenn man diesen „Stopp Schub“ gegen das Mischungsverhältnis aufträgt, ergibt sich eine homogene, leicht gekrümmte Kurve. Da die Wanderung der Linse wahrscheinlich mit lokalen Änderungen der Oberflächenspannung an ihrer Peripherie zusammenhängt, die eine geringe Spreitungstendenz¹ verraten, scheint dieser Stopp Schub das beste Kriterium der Spreitungstendenz zu sein. — Da es sich dabei um Vorgänge an einer *Grenzlinie* handelt, bestehen Beziehungen zu der Arbeit von BRADLEY (siehe unten).

TRANSNE, WASHBURN und KAHLER (386) untersuchen im Anschluß an die vorigen Arbeiten den Spreitungsschub von Benzol, Toluol, Acetophenon und Isoamylchlorid und unterscheiden dabei (im Anschluß an HARKINS) für jeden Stoff drei verschiedene Werte. Durch gleichzeitige Kontrollmessungen mit anderer Technik wird festgestellt, daß die gefundenen Spreitungsschübe mit den Spreitungskoeffizienten der Oberflächenspannung gegen Wasser übereinstimmen und damit die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens belegen.

FORD und WILSON (122) untersuchen ebenfalls die Struktur der Oberfläche von filmbedeckten Lösungen durch Messung des Widerstandes gegen die Spreitung anderer Stoffe. Siehe auch HEYMANN und JOFFE (215). (Diese Fragen hängen eng mit dem Problem der Grenzschmierung zusammen.)

MILLER (292a) findet, daß bei einem bestimmten Schub benzolische Lösungen der betreffenden Filmsubstanz als Linsen auf Wasser gerade im Gleichgewicht mit ihrem Film stehen. Das läßt sich zur Bestimmung des Flächenbedarfes auswerten.

Wenn man einen Film dadurch herstellt, daß man die zu spreitende Substanz in fester oder flüssiger Form auf die Wasseroberfläche bringt, kann man fragen, wie diese Ausbreitung zeitlich verläuft.² Es hat sich gezeigt, daß die Ausbreitungsgeschwindigkeit, gemessen entlang dem Radius des Ausbreitungskreises, mit der Zeit stark abnimmt. Solche

¹ Der die Verdämpfung des gespreiteten Materials gerade das Gleichgewicht hält.

² Wenn die zu spreitende Substanz in einem flüchtigen, mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel, z. B. Benzol, auf die Oberfläche gebracht wird, ist der Spreitungsmechanismus ein sehr komplexer Vorgang

Messungen lassen sich durch Bestäuben des Wassers mit Talcum und Zeitnahme durch Stoppuhr oder „Film“ ausführen. Im Zusammenhang mit biologischen Problemen erscheint es wichtig, Anordnungen zu finden, die eine konstante Spreitungsgeschwindigkeit ergeben. Bisher hat man die Spreitungsgeschwindigkeit auch immer nur an ebenen Grenzflächen untersucht. Da sie von der Größe der Oberflächenspannung und diese vom Krümmungsradius der Oberfläche — vor allem bei sehr kleinen Radien — abhängt, wären Messungen an stark gekrümmten Grenzflächen sehr interessant.

NEUMANN (308) bespricht in einem Vortrag Versuche von JOLY, von VOLMER und von LANGMUIR und eigene Versuche über Bewegungsvorgänge in Grenzflächen.

Auf die Arbeiten von VOLMER und seinen Schülern [z. B. VOLMER und ADHIKARI (397)] sei nur am Rande hingewiesen, da sie sich meistens auf Bewegungen in Grenzflächen f/fl oder f/g beziehen. Prinzipiell wichtig aber ist, daß von VOLMER die *Anisotropie des Bewegungszustandes* adsorbierter Moleküle als charakteristische Eigenschaft der Materie an Grenzflächen erkannt worden ist. Für biologische Anwendungen erscheint dieser Gesichtspunkt sehr fruchtbar, da offenbar im Zellgeschehen bei Transportvorgängen, für deren Ablauf die Diffusion als zu langsam ausscheidet, die sehr viel schnellere Wanderung entlang Grenzflächen als möglicher Mechanismus erwogen werden kann. Dem Verfasser scheint z. B. die Tatsache der schnellen Zerstörung des Acetylcholins, *nachdem* es frei wurde und wirkte, möglicherweise so erklärbar, daß es vom Wirkort aus durch Grenzflächenwanderung in den Bereich der Esterase gerät, wobei Wirkort und Esterase selber Grenzfläche, bzw. grenzflächengebunden sind, also durch ein strukturelles Gefüge in einem Abstand voneinander fixiert sind. Auch das Eindringen von Fremdmolekülen (Heilstoffe, Gifte) ins Gewebe könnte sich so abspielen.

BRINKMANN und Sz. GYÖRGYI (77) machen unter diesem Gesichtspunkt Studien über die physikochemischen Grundlagen der vitalen Permeabilität. Im dritten Teil ihrer Untersuchung verfolgen sie die Ausbreitung kapillaraktiver Substanzen an der Wasseroberfläche. Sie finden Geschwindigkeiten von 20—25 cm/Sek. Diese sind um viele Zehnerpotenzen größer als die entsprechenden Diffusionsgeschwindigkeiten. In dieser Arbeit wird auch die Möglichkeit der Beeinflussung der Wanderungsgeschwindigkeit durch starke Oberflächenkrümmung schon erwähnt. Die Wanderungsgeschwindigkeit an der Grenze fl/fl wird etwas größer gefunden.

LANDT und VOLMER (248) untersuchen, aufbauend auf früheren Arbeiten, die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Öl auf Wasser. Früher hatten sie gefunden, daß z. B. Benzophenon bei der Wanderung auf Glas einen Reibungswiderstand pro Mol von 10^{13} Dyn hat, dagegen gleichgroße Moleküle bei Diffusion in Lösung einen solchen von 10^{15} Dyn/Mol. Sie

finden für unreines Olivenöl auf Wasser bei radialer Ausbreitung Anfangsgeschwindigkeiten von 60 cm/Sek. Eine längere theoretische Betrachtung führt zu dem Ergebnis daß die Wanderungsgeschwindigkeit von Benzophenon auf Wasser bei einem Schub von 1 Dyn/cm etwa 10³mal größer ist als auf Glas bei gleichem Schub. Der Faktor wird beim Vergleich zwischen Oberfläche und Lösungsinnerem noch erheblich größer, entsprechend den beiden obengenannten Zahlen für den Reibungswiderstand.

Modellversuche, die sich auch als Vorlesungsversuche eignen, beschreibt SÖLLNER (367). Er füllt ein H-förmiges Glasrohrsystem mit langem Querschenkel mit Wasser bis über den Querschenkel hinaus. Das Wasser ist mit Lackmus versetzt. Beim Eintropfen von Säure in den einen Steilschenkel kann diese nur durch Diffusion in den anderen Steilschenkel gelangen. Die hierbei sehr geringe Geschwindigkeit ist an der Wanderung der Farbgrenze abzulesen. Um die viel höhere Wanderungsgeschwindigkeit an der Wasseroberfläche (z. B. Buttersäure) zu zeigen, wird der Wasserspiegel soweit gesenkt, daß er den Querschenkel gerade halbiert. Diese Versuchsanordnung kann offenbar zu Modellversuchen in vielseitiger Weise variiert werden.

FORD und WILSON (121) [siehe auch MCBAIN, FORD und WILSON (286)] untersuchten die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Ölsäure auf frischen und gealterten Oberflächen von Lösungen von Hydrozimsäure, zum Teil kinematographisch. Sie fanden Werte von 5—10 mm/sek.¹

RAMDAS und VAIDYANATHAN (330) untersuchten die Auflösung von Campher in Wasser und stellten fest, daß durch die Spreitung des Camphers, der auch an der Grenze Wasser/Gefäßwand in die Tiefe wandert, eine bizirkulare Strömung auftritt, die den Temperaturgradienten senkrecht zur Wasseroberfläche verringert. Die beschriebene Strömung hat auch einen Mischungseffekt zur Folge.

SCHULMAN und TEORELL (360) untersuchten den Einfluß der Bewegung von Filmen auf die Wasserunterlage. Sie fanden, daß die Dicke der vom Film mitgenommenen Wasserschicht etwa 0,02—0,07 mm beträgt. Diese Dicke hängt (zwischen 1,4 und 4,3 cm/Sek.) nicht von der Filmgeschwindigkeit ab.

Diese Ergebnisse erscheinen wichtig im Hinblick auf alle Anordnungen, bei denen eine Diffusion durch Membranen und ein Rührwerk eine Rolle spielen, denn beim Rühren bleibt auch eine ungestörte Schicht von gleicher Dicke an der Membran haften und muß bei der Berechnung der Diffusionsgeschwindigkeit durch die Membran hindurch offenbar in Rechnung gesetzt werden. — In den Blutgefäßen würde die betreffende Schichtdicke infolge der größeren Viskosität entsprechend noch größer sein. Die Blut-

¹ WILSON und FORD (403) prägen für das schon von PÖCKELS beobachtete explosionsartig schnelle Spreiten mancher Substanzen den Ausdruck „pöckeln“

körperchen werden aber wie Mikrorührwerke diese Schicht immer wieder stören.

Wir stellen also fest, daß die Wanderungsgeschwindigkeit grenzflächenaktiver Stoffe entlang Grenzflächen viel größer sein kann als die entsprechende Diffusionsgeschwindigkeit. Die Größe des Stofftransports pro Zeiteinheit kann natürlich bei entsprechend großem Querschnitt im zweiten Fall trotzdem größer sein. In den Fällen, wo es im biologischen Geschehen aber darauf ankommt, überhaupt einen bestimmten, hochaktiven Stoff — wenn auch nur in kleinster Menge — an seinen Wirkort zu bringen, wird man annehmen dürfen, daß sich die Natur nach Möglichkeit des Grenzflächentransports bedient. — Es ist dabei zu bedenken, daß dieser Transport nur an einer noch nicht anderweitig besetzten Grenzfläche mit maximaler Geschwindigkeit statthat.

Die Eigenschaften monomolekularer Filme lassen sich nun auch noch auf verschiedene andere Art und Weise untersuchen.

12. Ultramikroskopische Beobachtung.

ZOCHER und STIEBEL (411) haben einen Dunkelfeldkondensator unter der Wasseroberfläche angebracht und festgestellt, daß sich schon bei ganz geringer Überschreitung des Kollapsschubes auf diese Art Störungen im Film erkennen lassen. Auch läßt sich die Vollständigkeit der Spreitung bei schlecht spreitendem Material so kontrollieren. Siehe dazu auch SPIERER (368) und FOWKES, MYERS und HARKINS (128). Im Laufe der Übersicht wird öfters auf diese Kontrollmöglichkeit hingewiesen. Wenn man den umständlichen Einbau eines Kondensators in den Trog vermeiden will, genügt in vielen Fällen auch eine starke seitliche Beleuchtung unter Wasser.

13. Viskosität.¹

Man kann entsprechend der dreidimensionalen Viskositätsmessung nach POISEUILLE bei Flüssigkeiten Filme durch einen schmalen Schlitz (also eine zweidimensionale Kapillare) aus einem Oberflächenabschnitt in den anderen fließen lassen und die Durchflußgeschwindigkeit in Abhängigkeit von Schub, Schlitzweite und Länge messen. Man findet hierbei Zusammenhänge, die dem POISEUILLESchen Gesetz entsprechen. Als Komplikation erweist sich aber die Tatsache, daß schon bei einiger Schlitzbreite die Durchflußgeschwindigkeit unabhängig von der Art des Filmmaterials ist. Es zeigt sich, daß der Film die unmittelbar unter ihm liegende Wasserschicht sehr festhält und mitreißt (siehe oben) und die Hauptreibung diejenige von Wasser gegen Wasser ist. Nur bei sehr schmalen Schlitzten tritt diese konstante Wasserreibung hinter der Größe der eigentlichen Filmreibung zurück.

¹ Siehe JOLY (239).

Die Arbeiten über dieses Thema finden sich bei MYERS und HARKINS (306), JOLY (239), NUTTING und HARKINS (316) (sehr sorgfältiger Vergleich des Schlitzviskosimeters mit dem Torsionspendel), HARKINS und KIRKWOOD (198) (Mitberücksichtigung der Viskosität des Wassers) Theoretisches bei MOORE und EYRING (298), DERVICHIAN und JOLY (107) [Verbesserung der Rechenweise von HARKINS und Kritik der diesbezüglichen Gleichung von BRESLER und TALMUD (73)]. Siehe auch DERVICHIAN und JOLY (106) und JOLY (237, 238). MCBAIN, FORD und WILSON (286) diskutieren die Vorstellung, die man sich über die Tiefe einer Oberflächenschicht machen kann, die von einem Film von löslichen Substanzen bedeckt ist (siehe auch die dort zitierte Literatur über diesen Punkt).

Im wesentlichen wurde gefunden, daß bei sehr engem Spalt, hoher Viskosität und kleiner Schubdifferenz die Ausflußgröße q der dritten Potenz der Spaltbreite proportional und der Filmviskosität umgekehrt proportional ist. Bei weitem Spalt wird q vom Filmmaterial unabhängig (siehe oben). Die zweidimensionalen Filmviskositäten η_g liegen zwischen 10^{-6} und 10^3 c. g. s.-Einheiten ($\text{Dyn}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{sec}$). Umgerechnet ins Dreidimensionale ergibt das ein η von 10^1 — 10^{10} c. g. s.-Einheiten ($\text{Dyn}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{sec}$), wenn man eine Schichtdicke von 10 \AA einsetzt. — Die Viskosität eines Stoffes ist also im Film um viele Zehnerpotenzen größer als im Vollen. Der Anreiz der Strukturviskosität infolge Orientierung der Moleküle ist sehr groß. Ebenso der „innere Druck“ aus dem gleichen Grunde. Mit zunehmender Orientierung infolge größeren Schubes nimmt bei m-Filmen die Viskosität ab! JOLY bezeichnet das als eine Art innerer Eigenschmierung. Dieser Befund erscheint im Hinblick auf das dreidimensionale Verhalten von konzentrierten Lösungen langkettiger Moleküle und dessen Deutung höchst bemerkenswert (Diskussion der Viskositätsanomalien bei konzentrierten Lösungen von Hochpolymeren).

Andere Verfahren zur Messung siehe bei BOYD und HARKINS (68), FOURT und HARKINS (124, 125) (Torsionspendel), WASHBURN und WAKEHAM (401) (Viskosität von Stearatfilmen in Abhängigkeit von Druck, Temperatur und p_H), TRAPEZNIKOV und REHBINDER (388) (Torsionspendel)

Ein Teil der Arbeiten bezieht sich sowohl auf die Elastizität als auch auf die Viskosität von Filmen. Wir haben nämlich bei dieser zweidimensionalen Erscheinungsform der Materie die Eigenart, daß wegen der Kleinheit der Absolutkräfte, die bei diesen Messungen auftreten, sowohl die r-Filme wie die m-Filme mit der gleichen experimentellen Anordnung (z. B. Torsions-Scheibenpendel) untersucht werden können. Elastizität ist ein Begriff, der ursprünglich zur Beschreibung einer Eigenschaft fester Körper definiert wurde, und Viskosität ein Begriff, der für Flüssigkeiten geprägt wurde. Die Messung der Viskosität eines m-Films geht also kontinuierlich über in die Messung der elastischen Eigenschaften des r-Films.

14. Elektrische Leitfähigkeit,¹

J. W. MCBAIN und PEAKER (289) untersuchen die Größe der durch unlösliche monomolekulare Fettsäurefilme bewirkte Leitfähigkeit von reinem Wasser und leiten aus den gewonnenen Befunden ab, daß bei 25° etwa $\frac{1}{9}$ der Säure dissoziiert ist.

MCBAIN und FOSTER (287) bestimmen mit verbesserter Methode unter Verwendung von Wechselstrom die Oberflächenleitfähigkeit, die durch Filme auf Glas und Wasser bedingt wird. Sie bestätigen ihre früheren Werte und finden jetzt, daß die spezifische Leitfähigkeit von Stearinsäure, Palmitinsäure und Oleinsäure 3,8, 4,0 und $8,4 \times 10^{-8}$ reziproke Ohm pro Kubikzentimeter beträgt. Diese Werte sind größer, als es einer frei beweglichen Ionenschicht am Molekülende entspricht. Man muß eine zusätzliche Beweglichkeit der ganzen Moleküle innerhalb der Schicht annehmen. Heftige Bewegung der Oberfläche vermindert die Zusatzleitfähigkeit.

15. Verdampfung durch Filme hindurch.

Eine Reihe von Untersuchungen hat sich mit dem Grad der Verdampfung des Wassers durch die Filme hindurch befaßt. Die zuerst ausgeführten Untersuchungen wurden ohne Berücksichtigung des Schubes angestellt und man fand mit einer merkwürdigen Ausnahme (Cetylalkohol) erstaunlicherweise keinen Stoff, der der Verdampfung des Wassers einen nennenswerten Widerstand entgegensetzte. Untersuchungen von Filmen im Vakuum [RIDEAL (332), LANGMUIR (254a)] und solche, bei denen der Film unter verschiedene gemessene Schübe gesetzt wurde, zeigten (siehe unten), daß mit steigendem Schub die Verdampfung zunächst ungehindert bleibt, um dann von einem bestimmten Schub ab ganz plötzlich auf ein Minimum von wenigen Prozent des Ausgangswertes herabzusinken. Man muß sich das so vorstellen, daß erst in diesem Moment das sehr festhaftende Wasser durch den mehrere 100 at betragenden Druck² zwischen den langen Filmmolekülen herausgedrückt wird. Bis zu relativ hohen Drucken können Wassermoleküle zwischen den Filmmolekülen hindurch leicht bis an die Filmoberfläche gelangen und bilden in diesem Bereich also wohl einen regelmäßigen Bestandteil der meisten Filme. Für die Wasserdurchlässigkeit biologischer Membranen ist diese Frage von großem Interesse. Es sei auf die Möglichkeit eines Zusammenhanges mit den Befunden von O'CONNOR (Abschnitt 18) hingewiesen.

Eine gute ältere Arbeit stammt von HEDESTRAND (212).

¹ Siehe dazu die große Übersicht: „Oberflächenleitfähigkeit“ von J. J. BIKERMAN, Kolloid-Z. 72, 100 (1935).

² Da hier der dreidimensionale Raum in molekularen Bereichen gemeint ist, ist das Wort Druck am Platz.

LANGMUIR und LANGMUIR (264) haben schon früh die Wirkung von Filmen auf die Verdampfung von Äther aus dem Wasser heraus untersucht. RIDEAL (332) hat mit einer interessanten Technik (Vakuum) den Einfluß von Stearin-, Laurin- und Ölsäurefilmen auf die Verdampfung untersucht und findet, daß mit zunehmendem Schub die Verdampfung verringert wird. SEBBA und BRISCOE (364) untersuchen mit sehr sauberer neuer Technik (HEDESTRAND hatte ein ähnliches Prinzip verwendet) die Wirkung von n-Docosanol auf die Verdampfung. Der jeweilige Schub wird mit der Wilhelmywaage gemessen. Die verdampfte Wassermenge wird gewogen. Wenn beim Schub 0 die Verdampfungsgröße 100 genannt wird, sinkt sie bei den Schüben 3, 9,7, 16,2, 33,0, 48,0 Dyn/cm auf 96, 77, 23, 14 und 1%. Es wurden außerdem untersucht Cholesterin, Ölsäure, Elaidinsäure und Eialbumin (siehe unten), die keine Verdampfungs-minderung bewirken. Ferner Stearinsäure, Brassidinsäure, Arachinsäure, Cetylalkohol, Octadecylalkohol, die ebenso wie n-Docosanol unter Schub die Verdampfung auf einen kleinen Betrag reduzieren können. In der angegebenen Zahlenfolge fällt der Sprung in der Verdampfungs-minderung zwischen 9,7 und 16,2 Dyn/cm auf. Dieser Punkt plötzlicher Verdampfungshemmung liegt für jede Substanz (bei gleicher Temperatur) an einer charakteristischen Stelle. Die Werte liegen über demjenigen Schubwert, bei dem die Filme inkompressibel werden. Hydrophile Gruppen in der Kette scheinen den Verdampfungswiderstand zu verringern. Kettenverlängerung vermehrt den Widerstand und vermindert den oben gekennzeichneten kritischen Schub. Der Verdampfungswiderstand kann nicht mit dem thermodynamischen Zustand des Films in Verbindung gebracht werden, z. B. bietet der feste Albuminfilmen keinen, der flüssige Cetylalkoholfilm jedoch großen Widerstand. Eigenartig ist auch, daß ein Film von Indicatoröl, der etwa 100 Moleküle dick ist, der Wasserverdampfung weniger Widerstand bietet als ein monomolekularer Cetylalkoholfilm. Die Verfasser leiten aus ihren Versuchen die Vorstellung ab, daß die monomolekularen Filme „gelöstes“ Wasser enthalten und im Gleichgewicht mit einer Lösung des Films im Substrat stehen.

Versuche mit Mischfilmen sind offenbar noch nicht gemacht worden, z. B. der Versuch, einen Eiweißfilm zu „imprägnieren“.

DOCKING, HEYMAN, HERLEY und MORTENSEN (113) suchen Filme, die sich dazu eignen, größere Wasserflächen im Freien (Australien) längere Zeit gegen Verdunstung zu schützen. Wellen, Wind und chemischer Angriff machen das aber zunächst unmöglich.

16. Mischfilme und Wechselwirkung.

Weiter oben war gezeigt worden, daß für jede Substanz, die m-Filme bilden kann, eine bestimmte Expansionstemperatur existiert. Es zeigt sich nun, daß diese Expansionstemperatur sich in charakteristischer Weise

ändert, wenn man solchen Filmen Fremdmoleküle zusetzt, die für sich allein ebenfalls filmbildungsfähig sind. Z. B. bekommt man mit Fettsäure, der auf 2—4 Moleküle Fettsäure ein Molekül Cholesterin zugemischt ist, starre Filme, während sie ohne diese Beimengung m-Filme geben würden. Nicht nur Cholesterin, sondern auch andere sperrige Moleküle, z. B. Tripalmitin, wirken so. Man kann drei Ursachen für diese Wirkung erwägen:

1. Es bestehen starke Anziehungskräfte zwischen den beiden Molekülsorten, die die Kondensation bewirken. Dagegen spricht aber die Tatsache, daß in diesen Mischfilmen der zweidimensionale Dampfdruck des Fettsäureanteils nicht dem Mengenverhältnis entsprechend erniedrigt ist.

2. Es ist möglich (ADAM), daß die sperrigen Moleküle, wie Cholesterin oder Tripalmitin, die Schwingungen der Fettsäureketten im Kohlenwasserstoffanteil des Films dämpfen.

3. Es ist möglich (LANGMUIR), daß durch die verschiedene Länge der beiden Molekülsorten die Oberfläche des Films in molekularen Dimensionen uneben ist und daher die freie Grenzflächenenergie gegen Luft erhöht ist, was die Expansionstendenz verringern würde.

Ein interessanter Befund ist beim p-Nonylphenol erhoben worden. Dieses bildet normalerweise m-Filme. Diese lassen sich nun nicht durch Tripalmitin oder ähnliche Moleküle kondensieren, sondern ausschließlich durch Cholesterin. Verantwortlich dafür ist offenbar die Tatsache, daß die untere Hälfte des p-Nonylphenols einen starren Ring bildet und die daran sitzende Kette nicht lang genug ist, um so zu wirken wie bei den längeren Fettsäureketten.

Vor dem Eingehen auf Einzelarbeiten dieses Gebietes wollen wir feststellen, daß der Grad der Wechselwirkung zwischen den Filmmolekülen und irgendwelchen Partnern eine Intensitätsskala durchläuft, die wir folgendermaßen markieren können. Schon die *Wirkung der Ionen und Wasserdipole* (siehe oben) auf das Filmverhalten ist als ein geringer Grad der Wechselwirkung zu bezeichnen. Ihm etwa gleichzustellen ist die *Adsorption* von gelösten Molekülen unter dem Film. Die nächste Stufe stellt die *Penetrierung* des Films dar, für die wir oben ein Beispiel brachten, eine weitere die *Komplexbildung*. Wenn die Penetrierung dazu führt, daß die ursprünglich filmbildenden Moleküle im Falle ihrer Löslichkeit verdrängt werden, spricht man von *Verdrängung*. Als letzter Grad der Wechselwirkung kommt die *chemische Reaktion* in Frage. Für alle Formen sind Beispiele bekannt.

ADAM, ASKEW und PANKHURST (3) bringen Buthylalkohol, Buttersäure und Phenol unter Myristinsäure. Es erfolgt bei kleinem Druck (0,2 Dyn) Eindringen in den Film, keine Komplexbildung. Weiter werden Filme

von Cholesterin, dibasischen langen Estern, Chymylalkohol und anderen Stoffen untersucht.¹

HUGHES (223) untersucht die Wirkung von Schlangengift (Kobra und vier andere Sorten) auf Lecithinfilme. Die Hydrolyse ist abhängig von der Giftkonzentration und vom p_H . Kompression der Filme verlangsamt die Hydrolyse. Konzentrationen von $1/10^8$ sind noch nachweisbar. Hämolyseversuche an roten Blutkörperchen zeigen Parallelen zwischen Lecithinasegehalt und hämolytischer Wirksamkeit. (Die Giftlecithinase macht aus Lecithin Lysolecithin.)

KELLER und KÜNZEL (243) untersuchen die Wirkung von Vitamin B₁, B₂ und C auf die Oberflächenspannung (σ) von Wasser. Die reinen verdünnten Vitaminlösungen machen keine Veränderung von σ . Dagegen wirken die drei Stoffe stark auf die Oberflächenspannung von Lecithin- und Cholesterinlösungen ein. Die Wirkung ist p_H -abhängig.

COCKBAIN und SCHULMAN (93) untersuchen in einer sorgfältigen Arbeit die Assoziation zwischen Aminen und Säuren. Es wird Octadecylamin mit den verschiedensten organischen Säuren kombiniert. Die Ergebnisse sind folgende: 1. Die meisten Säuren geben starke polare, aber schwache VAN DER WAALSSche Wechselwirkung. 2. Man kann zwei Gruppen unterscheiden: a) Säuren mit wenig Carboxylgruppen und wenig unpolaren Gruppen reagieren kaum mit dem Film oder man kann sie durch Kompression des Films unter den Film drücken. b) Säuren mit viel Carboxylgruppen, z. B. Gerbsäure, Purpurogallin, werden stark als zweite Schicht unter dem Film adsorbiert. Der Film wird schon bei relativ kleinen Schüben kondensiert und kollabiert bei etwas höheren Schüben.

MARSDEN und SCHULMAN (291) untersuchen die molekulare Anziehung in Filmen, die aus äquimolekularen Mischungen von je zweien der Stoffe Cethylalkohol, Octadecylmethyläther, Stearinsäure und Octadecylamin hergestellt sind. Es werden F/A - und $\Delta V/A$ -Kurven in Abhängigkeit vom p_H untersucht. Die COULOMBSchen Kräfte, die dabei auftreten, gehören drei Gruppen an: 1. Ion/Ion, 2. Ion/Dipol und 3. Dipol/Dipol. Da die Ionisierung p_H -abhängig ist, ist die gesamte Wechselwirkung p_H -abhängig. ALEXANDER (31b) weist hinsichtlich dieser Arbeit auf die vermutliche Rolle der Wasserstoffbindung hin.

GORTER (165) [siehe auch Proc. Kon. Acad. Wetensch. Amsterdam 34, 471 (1931)] hat gezeigt, daß die zur vollen Hämolyse gerade ausreichende Menge eines Saponins (Parillin), als Film gespreitet, gerade die Oberflächengröße der hämolysierten Zellen hat. — Die Gesamtmenge der

¹ In einer Fortsetzung der Arbeit findet PANKHURST (321a), daß eine Kettenverlängerung der penetrierenden Moleküle um je eine CH₂-Gruppe immer einer Konzentrationsminderung um den Faktor 4,5 entspricht, wenn die Konzentration jeweils auf gleiche Penetrierungsstärke eingestellt wird.

aus einem roten Blutkörperchen extrahierbaren Lipide spreitet auf Wasser zu einem Film von der Größe der doppelten Zelloberfläche!

SCHULMAN und RIDEAL (357) besprechen die Komplexbildung von Digitonin mit Filmen von Cholesterin und Epicholesterin und untersuchen die Wirkung hämolytischer und agglutinierender Stoffe auf Fett-Eiweiß- (Cholesterin, Gliadin) Filme. Lytische Stoffe penetrieren den Cholesterinfilmen oder lösen den Eiweißfilm auf und sind kapillaraktiv. Agglutinine werden vom Film nur adsorbiert, zeigen keine Penetration und sind kaum kapillaraktiv. Aus den Versuchen geht hervor, daß die Form der Moleküle für die Art der Wirkung von großer Bedeutung ist. Als Fortsetzung dieser Arbeit untersuchen SCHULMAN und STENHAGEN (359) auf sehr systematische Art die Komplexbildung in Lipoidfilmen nach dem Schema Ring—Ring, Ring—Kette und Kette—Kette unter Variierung des molaren Verhältnisses. Wenn ringhaltige Systeme, z. B. Digitonin, in das Substrat unter einen Cholesterinfilmen gebracht werden, bilden sich nur 1/1-Komplexe. Natriumcethylsulfat penetriert einen Cholesterinfilmen ebenfalls im Verhältnis 1/1. Wenn es dagegen unter einen Kettenfilmen, z. B. Cethylalkohol, gebracht wird, penetriert es diesen und bildet stabile Komplexe von der Zusammensetzung 1/1 und 1/3. Die Bildung von 1/3- und 1/1-Komplexen bei gesättigten Ketten und von 1/2- und 1/1-Komplexen mit ungesättigten trans-Ketten führt die Verfasser zu der Auffassung, daß es sich bei diesen Filmen um verschiedene Kristallsymmetrien handeln müsse, wobei die PATTERSONSche Klassifikation anwendbar wäre. Die energetischen Beziehungen bei der Komplexbildung können sowohl aus der Druckoberflächenkurve wie auch aus der Konzentration des einen Partners in Lösung berechnet werden. Die GIBBSsche Gleichung wird dabei bestätigt und gezeigt, daß die Komplexe sich wie chemische Verbindungen verhalten. (Der Schub des Komplexes ist abhängig von der Konzentration des Komplexpartners im Substrat und steht mit ihr im Gleichgewicht.)

SCHULMAN, RIDEAL und STENHAGEN (358) publizieren als vorläufige Mitteilung zu den oben genannten Arbeiten weitere Einzelheiten: Cethylsulfat bildet leicht Komplexe mit trans-Eleaidinalkohol, schwer mit der cis-Verbindung. Bilirubin geht bei pH 7,2 leicht an Cholesterin, bei pH 8,2 kaum. Biliverdin geht nicht an Cholesterin. Taurocholsäure geht nicht an Bilirubin.

MYERS und HARKINS (305) und HARKINS und MYERS (202) zeigen, daß die Gegenwart von Paraffinöl, das für sich auf Wasser gebracht nicht spreitet, an einem expandierten Film einer Fettsäure, z. B. Myristinsäure, einen überraschend großen Effekt auf die F/A -Kurve hat. Man müßte also annehmen, daß nicht alles Paraffinöl in Tropfenform auf dem Film liegt, sondern zum Teil Komplexe mit der Myristinsäure bildet. Dafür sprechen auch neue Befunde von TRURNIT (391b) über Misch-

filme zwischen langkettigen Sulfamidderivaten und gleichlangen Paraffinmolekülen. Eine molekulare Beimischung im Verhältnis 1:1 von Paraffinketten wirkt optimal stabilisierend auf den Film.

FOWKES, MYERS und HARKINS (128) untersuchen daher das gleiche System mit der ultramikroskopischen Methode nach ZOCHER und STIEBEL (l. c.). Wenn man Mischungen von einem Gewichtsteil Nujol (Paraffinöl) mit zwei Teilen Stearin-, Myristin-, Pentadecyl- oder Ölsäure spreitet, bekommt man viele Linsen von 1–2 μ Durchmesser bei allen Schüben. Die Dichte der Linsen auf einem expandierten Film ist von der Größenordnung 2000 pro Quadratmillimeter. Die Filme, die ein größeres Verhältnis Paraffinöl zu Fettsäure hatten, gaben Linsen, deren Größe mit der relativen Konzentration des Öls anwächst (siehe Abschnitt 10). Wenn man dagegen Mischungen untersucht, die 0,3 oder weniger Teile Paraffinöl auf einen Teil Fettsäure enthalten, treten (ultramikroskopische) Linsen erst von einem kritischen Schub an auf. Sie treten alle gleichzeitig auf. Ihr Durchmesser scheint kleiner als 1 μ zu sein, und ihre Flächendichte ist von der Größenordnung 2500 Linsen pro 1 qmm. Wenn man den Schub wieder um 1–2 Dyn erniedrigt, verschwinden sie wieder, um bei neuer Kompression wieder aufzutreten. Der kritische Schub ist von dem Gehalt an Öl abhängig.

DAVIES, KRAHL und CLOWES (98) untersuchen Mischfilme von polycyclischen Kohlenwasserstoffen (darunter vielen carcinogenen Kohlenwasserstoffen) und Sterinen. Es werden 35 verschiedene, meist cyclische Kohlenwasserstoffe mit Cholesterin oder Cholestanol gemischt. Die meisten untersuchten Kohlenwasserstoffe haben genügend Affinität zu den Sterinen, um im Film festgehalten zu werden. Das geschieht offenbar auf zwei Arten. Entweder bildet sich eine zweidimensionale Lösung, dann ist der Prozentgehalt an Kohlenwasserstoffen eine Funktion des Schubes und bei konstantem Schub von der Art der beiden Partner abhängig, oder es bilden sich Komplexe; dazu ist ein strukturmäßiges Zueinanderpassen der beiden Partner notwendig. Alle Einflüsse, die zu einem hohen Grad von Ordnung der Sterinmoleküle führen (tiefe Temperatur), erleichtern die Komplexbildung. Die Autoren meinen, daß die erste Art der Filmbildung vielleicht beim Transport von Krebskohlenwasserstoffen im Blut eine Rolle spielen kann und die zweite Art bei der Fixierung dieser Stoffe an entscheidenden Zellstrukturen.

HARKINS und FLORENCE (196) untersuchen Wechselwirkungen bei Mischfilmen aus Alkoholen, Säuren und Aminen durch Aufnahme der F/A -Kurven, ΔV -Kurven und durch Dunkelfeldmikroskopie. Wenn im Film keine Komplexbildung eintritt, sondern nur Mischung, entsprechen Schub und ΔV -Wert den Zwischenwerten, die nach den Mischungsverhältnissen zu erwarten sind. Komplexbildung macht sich durch Abweichung der Werte von diesen Zwischenwerten bemerkbar, besonders

stark dann, wenn der Partner ein Amin ist. Es werden sehr viele Substanzen untersucht, wobei auch immer die Kettenlänge variiert wird.

TRURNIT (391 c) zeigt, daß man langkettige polare Moleküle, die außerdem eine hydrophile Gruppe in der Mitte der Kette haben und sich beim Komprimieren des Films haarnadelförmig mit beiden Kettenhälften aufrecht stellen, durch Beimischung starrer Moleküle, deren hydrophile Gruppen an den Kettenenden sitzen, dazu veranlassen kann, daß sie — offenbar auf Grund VAN DER WAALSScher Aneinanderlagerung im gasförmigen Zustand des Films — beim Komprimieren in gestrecktem Zustand mitaufgerichtet werden, also pro Molekül nur noch den halben Flächenbedarf zeigen. Dabei genügt zur vollständigen Streckung ein um so geringerer Anteil der starren Molekülsorte, je niedriger die Versuchstemperatur ist.

17. Reaktionen der Filme.

Nach der genauen Untersuchung aller irgendwie meßbaren Eigenschaften von Filmen der verschiedensten Substanzen und von Mischfilmen, und nach dem Studium der Wechselwirkungen zwischen Film und Substrat, soweit sie sich auf Ionenwirkung, Adsorption, Penetrierung oder Komplexbildung organischer Moleküle beziehen, ist der nächste und wichtigste Schritt auf dem Wege zum biologischen Modell die Untersuchung von chemischen oder physikochemischen Reaktionen an Filmen. Um das letztere vorwegzunehmen, sei zunächst eine Reihe von Arbeiten über photochemische Reaktionen besprochen.

RIDEAL und MITCHELL (338) untersuchen mit einer kompendiösen Apparatur¹ die photochemischen Eigenschaften der Keto-Imino-Bindung. Als Vorbereitung für die Untersuchung dieser Bindung in Eiweißarten (siehe unten) wurde die Keto-Imino-Bindung von relativ einfachen Stoffen untersucht, und zwar besonders von solchen, die einen aromatischen Chromophor enthalten. Als Beispiel wird zunächst stearinsäures Anilin verwendet.

Einleitend wird ausführlich die Kinetik photochemischer Reaktionen in Monoschichten diskutiert. Dann werden die mechanischen und elektrischen Eigenschaften der Schichten auf stark saurem Substrat untersucht. Die Autoren vergewissern sich, daß auf stark saurem Substrat die Geschwindigkeit der Dunkelreaktion genügend klein ist. Durch Bestrahlung mit Licht von der Wellenlänge 2350—2400 und 2483 Å wird die Filmsubstanz hydrolysiert. Die langwellige Grenze der Wirksamkeit ist wahrscheinlich in der Gegend von 2500 Å. Aus der Abhängigkeit der

¹ Quarzilluminator für monochromatische Bestrahlung des Films mit einem Quarzprisma von 11 cm Basislänge; es wird eine Filmfläche von 5 × 6 cm gleichmäßig bestrahlt. Als Lichtquelle dient ein Wasserstoffrohr, das mit 2 kV betrieben wird.

Reaktionsgeschwindigkeit vom p_H scheint zu folgen, daß das primäre Reaktionsprodukt ein Ionenkomplex ist. Es wird weiter auf die besondere Bedeutung der jeweiligen Molekülorientierung für die Steuerung des photochemischen Umsatzes hingewiesen und eine provisorische Deutung für die beobachtete Änderung der scheinbaren Quantenausbeute in Abhängigkeit von der Filmfläche gegeben. Die absolute Quantenausbeute bei diesen Versuchen auf 5n saurem Substrat ist 0,26 ($\pm 18\%$) für den Wellenlängenbereich 2350—2400 Å.

In einer theoretischen Arbeit untersucht MITCHELL (293) vorbereitend die Rolle der molekularen Orientierung bei photochemischen Reaktionen in Filmen. Im Zusammenhang mit diesbezüglichen quantitativen Überlegungen ergibt sich, daß das Phasengrenzpotential wahrscheinlich von der Größenordnung 10^8 V/cm ist. Er zeigt, daß für adsorbierte Dipole im Film der Extinktionskoeffizient um $\frac{3}{2} \cdot \sin^2 \vartheta$ größer ist als im Vollen, wobei ϑ der Winkel zwischen Lichtstrahl und Dipolachse ist. Der Verfasser zeigt ferner, daß bei der Annahme einer Dicke der optischen Übergangsschicht von 3—4 Å für reines Wasser und dem entsprechenden Grenzflächenpotential von $1,5 \cdot 10^8$ V/cm, der resultierende Starkeffekt bei 2400 Å für Stearinsäureanilid 37 Å betragen müßte [siehe auch MITCHELL (294)].

FOSBINDER hat [nach RIDEAL (334)] die Umwandlung von Ergosterin in Vitamin D während der Bestrahlung mit der ΔV -Sonde verfolgt.

G. GEE und RIDEAL (143) und GEE (141) berichten über katalytische Polymerisation in monomolekularen Schichten trocknender Öle [ebenso BRESSLER, TALMUD und JUDIN (74)]. Die gleichen Autoren untersuchen in einer weiteren Reihe von Arbeiten (144—148) die Autoxydation der Anlagerungsverbindung von Maleinsäureanhydrid an Elaeostearinsäure. Es wird der Einfluß der Temperatur und des Druckes auf die Oxydationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom p_H untersucht und dabei gezeigt, daß die Ergebnisse gut mit der Annahme freier Radikale übereinstimmen.

Ferner wird die Wirkung von metallischen Katalysatoren für diese Reaktion und von organischen Hemmungs- und Förderungsstoffen untersucht. Die Größe und Richtung des katalytischen Effekts hängt vom p_H des Substrats ab. Kobaltionen wirken fördernd mit steigender Konzentration. Mangan wirkt schwach fördernd bei kleiner Konzentration, hemmend in großer Konzentration. Das gleiche gilt für Blei. Die Verhältnisse bei Kobalt werden genau untersucht. Hydrochinon wirkt je nach dem p_H mit steigender Konzentration zunehmend hemmend oder fördernd (p_H 6—7 fördernd, unter 5,5 hemmend). Piperidin wirkt bei einer gewissen mittleren Konzentration optimal fördernd, bei höherer Konzentration hemmend; desgleichen p-Nitroanilin.

KÖGL und HAVINGA (245, 246, 247) haben eine Methode zur kontinuier-

lichen Darstellung von monomolekularen Schichten entwickelt. Sie teilen einen langen Trog durch Querwände, die bis ganz dicht unter die Wasseroberfläche reichen, in drei hintereinanderliegende Abschnitte. Auf dem ersten wird der Film erzeugt, auf dem zweiten reagiert der Film mit einem Stoff im Substrat, vom dritten Abschnitt wird der Film durch eine halb getauchte Walze in einen Endabschnitt gebracht und dort angesammelt. Es können so wägbare, zur Analyse verwendbare Mengen gewonnen werden. In dem ersten Abschnitt ist gleichzeitig eine Vorrichtung zur dauernden, gleichmäßigen Kompression des Films untergebracht. Die Filme werden zur näheren Charakterisierung ultramikroskopisch untersucht und auch die Beugung von Elektronenstrahlen als Hilfsmittel herangezogen [HAVINGA und DE VAEL (210)]. Mit dieser Apparatur wird dann die Laktonisierung von ω -Oxyäthylstearylmalonsäure untersucht und festgestellt, daß sie zwischen p_H 3 und p_H 6 in monomolekularer Schicht mit einer Geschwindigkeit erfolgt, die 10^3 — 10^4 mal größer ist als im Vollen bei gleichem p_H . Außerdem wird gefunden, daß die γ -Oxystearinsäure bei p_H 0 ebenso schnell wie die erstgenannte bei p_H 4 reagiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit beider Stoffe unterscheidet sich im Vollen dagegen kaum voneinander.

GEE, DAVIES und MELVILLE (142) untersuchen die Polymerisation von Butadiengas an der Grenzfläche von wäßriger Peroxydlösung gegen Luft. Beobachtet wird die Verringerung der Oberflächenspannung der Lösung mit Hilfe der Ringwaage. Durch Änderung der Stabilität des Wasserstoffperoxyds kann gezeigt werden, daß die Lebensdauer des aktivierten Zustandes kürzer als die Reaktionszeit ist. Durch kinetische Betrachtungen wird gezeigt, daß der Reaktionsmechanismus derart ist, daß zunächst ein H_2O_2 -Molekül mit einem monomeren Filmmolekül reagiert. Der so gebildete Komplex veranlaßt dann eine polymerisierende Kettenreaktion.

RIDEAL und FOSSBINDER (337) untersuchen die Hydrolyse von γ -Stearolakton in Filmen. Es werden $\Delta V/A$ - und F/A -Kurven aufgenommen. Aus dem Verhalten und der Art des elektrischen Moments (μ) der γ -Oxystearinsäure bei Schub- und Temperaturänderungen folgt, daß die reagierende Gruppe unter Druck aus dem Wasser gehoben wird. Die Kinetik der Hydrolyse wird an Hand der experimentellen Daten näher untersucht und es wird gezeigt, daß die übliche kinetische Theorie, wie sie auf Lösungen anwendbar ist, auch hier zum Ziel führt.

HUGHES und RIDEAL (227) haben als eine der ersten Arbeiten über Reaktionen an Filmen eine Untersuchung über die Geschwindigkeit der Oxydation monomolekularer Schichten von ungesättigten Fettsäuren angestellt. Sie untersuchen Filme von Ölsäure, cis-Petroselinäure, Δ^2 -Isoölsäure und Chaulmoograsäure auf leicht sauren Kaliumpermanganatlösungen. Die Doppelbindungen bei den vier Säuren sind 7, 3, 1 und 13 Kohlenstoffatome von der Carboxylgruppe entfernt. Es werden F/A - und $\Delta V/A$ -Kurven aufgenommen. Außer den sonst üblichen Größen wie

Stoßzahl, Wahrscheinlichkeit und Größe der Energieübertragung spielt bei der kinetischen Betrachtung der beobachteten Reaktion hier noch ein sog. Zugänglichkeitsfaktor eine Rolle, der sich auf die Zugänglichkeit der Doppelbindung für die oxydierende Substratwirkung bezieht. Auch stärkste Kompression kann die Oxydation nicht ganz verhindern, es wird maximal eine Verminderung um etwa das Zehnfache erreicht. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist um so größer, je höher die Vertikalkomponente des elektrischen Moments ist. Diese ältere, ausgezeichnete Arbeit ist für das Verständnis solcher Untersuchungen an Filmen besonders lehrreich.

HUGHES (220) publiziert einen Teil des gleichen Versuchsmaterials und zusätzlich noch Ergebnisse von Versuchen mit anderen Stoffen.

In einer neueren Arbeit untersuchen MITTELMANN und PALMER (297a) die Permanganatoxydation von Triolein-Filmen im Anschluß an die ältere Arbeit von HUGHES und RIDEAL (siehe oben). Es wird der Anfangsteil des offenbar aus drei Teilreaktionen bestehenden Ablaufs untersucht, der mit einer Expansion verbunden ist. Dieser 1. Teil besteht in der Umwandlung der Doppelbindung in eine „polare“ Gruppe. Zur Erklärung des zeitlichen Ablaufs wird ein energetisches Modell eingeführt.

HAUROWITZ und SCHWERIN (207) befassen sich in einer interessanten Arbeit mit der Katalyse der Autoxydation von Linolsäure durch Hämin. Diese erfolgt nur in heterogener Emulsion, also offenbar an der Grenzfläche Öltröpfchen/Wasser. Sie wird aufgehoben, wenn man die Emulsion durch Zusatz geeigneter Stoffe homogenisiert. Bei neuer Entmischung setzt die Reaktion wieder ein. Ein Überschuß von Hämin setzt die Oxydationsgeschwindigkeit herab. Die Verfasser vermuten, daß das durch Verdrängung von Linolsäure aus dem Grenzflächenfilm bewirkt wird. Beweisend für den ausschließlichen Ablauf der Reaktion an der Grenzfläche ist auch der Befund, daß Verdünnung der homogenen Phase ohne Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit ist. Die Größe der wirksamen Grenzfläche wird dadurch nicht geändert. Das Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit wird bei einem Hämin/Substratverhältnis von 1—4 Häminmolekülen auf je 100 Moleküle Linolsäure erzielt.

NASINI und MATTEI haben in einer Reihe von Arbeiten [siehe die Übersicht (307)] Reaktionen von monomolekularen Filmen untersucht und die Ergebnisse zur Deutung der Molekülstruktur ausgewertet.

HUGHES, YUDKIN, KEMP und RIDEAL (288) haben eine Mikromethode zur Messung der Potentialänderung an Grenzflächen entwickelt für Mengen bis herunter zu 0,1 ccm und untersuchen damit die Wirkung von D_2O auf Fermentreaktionen an Filmen. Sie fanden keine Abweichung gegenüber dem Verhalten in normalem Wasser.

18. Beiträge zu Problemen der Physiologie und Pharmakologie.

Die bisherigen Ausführungen haben gezeigt, und im dritten Teil wird das noch deutlicher werden, daß von der Seite der Grenzflächenforschung her mancher wertvolle Beitrag zu biochemischen Problemen geleistet wurde und noch zu erwarten ist. Eine Reihe von Arbeiten aus dem Laboratorium von O'CONNOR zeigt nun, daß offenbar auch rein physiologische Fragen durch Anwendung der Ergebnisse unseres Gebietes gefördert und angeregt werden können.

BAYLISS (48) hat schon 1922 in seinen „amerikanischen Vorträgen“ grundlegende Vermutungen über die Möglichkeiten einer solchen Entwicklung ausgesprochen.

Der Stoffwechsel der Tiere, gemessen an der Größe ihres Sauerstoffverbrauches steht in Beziehung zur Körpertemperatur. Messungen an Kaltblütern hatten gezeigt, daß der Temperaturkoeffizient (Q_{10}) hierbei die gleiche Größe hat wie bei chemischen Reaktionen, nämlich den Wert 2. Feinere Messungen haben aber nun ergeben, daß der Anstieg des Sauerstoffverbrauches keineswegs linear mit der Temperatur geht, wie bei einer chemischen Reaktion *in vitro*. O'CONNOR (317a, c und d) und O'CONNOR und O'DONOVAN (317b) stellen auf Grund von Messungen am Frosch fest, daß zur Erklärung dieser nichtlinearen Abhängigkeit die ARRHENIUSsche Gleichung nicht ausreicht, daß man sie dagegen durch die Aktivitätsänderung eines Atmungsferments erklären kann.

Zwischen 6 und 14° C erfolgt eine geringe Steigerung des Sauerstoffverbrauches, bei 15° eine sprunghafte Steigerung, dann Konstanz und von 21° ab wieder eine weitere Zunahme. Mit diesem Befund werden folgende Tatsachen in Zusammenhang gebracht: Bei einem Schub von etwa 7 Dyn/cm liegt das Expansionsintervall eines Myristinsäurefilms zwischen 5 und 14°. Bei 15—16° geht ein Palmitinsäurefilm aus dem starren in den beweglichen Zustand über und von 21° C ab expandiert er. Es wird nun vermutet, daß die Moleküle eines in den Oxydationsstoffwechsel eingeschalteten Ferments mit einem Mischfilm aus Palmitin- und Myristinsäure bedeckt sind und daß der physikalische Zustand dieses Films in Abhängigkeit von der Temperatur den Umsatz steuert.

Folgende Befunde sprechen für die Berechtigung der Annahme einer solchen Möglichkeit. Die proportionalen Zunahmen des Sauerstoffverbrauches in den beiden Temperaturintervallen stehen in Übereinstimmung mit den relativen Mengen von Palmitinsäure (P) und Myristinsäure (M) im Fettvorrat des Frosches. Fütterung mit reiner P oder reiner M ändert die Größe des Sauerstoffverbrauches bei verschiedenen Temperaturen in der erwarteten Weise!

O'CONNOR stellt sich vor, daß die Aktivität des sauerstoffübertragenden Ferments (gelbes Ferment?) um so größer wird, je geringer in wachsender Temperatur die Besetzung seiner Oberfläche mit Fettsäuremolekülen

ist. Er läßt offen, ob der mit der Temperatur wachsende zweidimensionale Partialdruck der Fettsäuremoleküle die Fermentoberfläche oder die Sauerstoffmoleküle anregt oder ob einfach die wachsende Zugänglichkeit des Ferments für die steigende Aktivität verantwortlich ist. Über einen möglichen Deutungsversuch unter Beibehaltung der Grundvorstellung von O'CONNOR siehe weiter unten. Vielleicht kann man sich aber auch den steuernden Mischfilm in der Zelloberfläche — und nicht an der Fermentoberfläche — lokalisiert denken.

Jede der Fettsäuren eines Mischfilms macht, wie KANE (239a) in einer besonderen Untersuchung gezeigt hat, unabhängig von den Mischpartnern mit steigender Temperatur folgende Wandlungen durch.¹ Zunächst ist der betreffende Filmpartner starr, dann „schmilzt“ er, expandiert, wird „gasförmig“, um schließlich bei einer bestimmten Temperatur aus der Grenzfläche heraus in Lösung zu gehen. Das geschieht für Myristinsäure bei etwa 32° C und für Palmitinsäure bei etwa 36° C. Bei diesen Temperaturen wäre also ein Sprung in der Kurve Temperatur/Sauerstoffverbrauch zu erwarten. Dieser Sprung tritt nun, wie O'CONNOR an der Fingerhaut der menschlichen Hand gezeigt hat, bei 32° C und bei 36° C tatsächlich auf, aber in umgekehrter Richtung als der oben vermutete Wirkungsmechanismus erwarten lassen sollte (317d). Mit steigender Temperatur tritt nämlich bei 32° C und bei 36° C ein Absinken des Sauerstoffverbrauches auf! Der zweite Abfall ist stärker als der erste. O'CONNOR versucht nicht, den Widerspruch seiner Theorie der Bedeutung des zweidimensionalen Partialdrucks zu diesen Befunden aufzuklären. Das Wesentliche ist zunächst die Koinzidenz der Temperaturwerte. Man könnte sich den Wirkungsmechanismus so vorstellen: die lockere Kombination von Fettsäuren mit bestimmten Gruppen des Fermentmoleküls stellt den eigentlich aktiven Zustand des Ferments dar. Im Falle des kondensierten Films ist (abgesehen von dem Sinken jeglicher Reaktionsbereitschaft mit sinkender Temperatur) die Flächenbedeckung so dicht und die Bindung an das Ferment so starr, daß beides der Fermentwirkung ungünstig ist. Mit steigender Temperatur wird — für die verschiedenen Säuren nacheinander — die Bindung lockerer, die Flächenbesetzung geringer. Es wird ein optimaler Zustand erreicht, der jeweils in dem Expansionsgebiet der betreffenden Säure liegt. Schließlich wird bei Erreichen der Lösungstemperatur der Fettsäure-Fermentkomplex gespalten, die Aktivität geht zurück. Danach rückt die nächsthöhere Säure an die Stelle der verschwundenen.

Die Existenz des negativen Temperaturkoeffizienten bei 36° C führt im weiteren Verfolg zu der Auffassung, daß die Höhe der normalen Warmblütertemperaturen, die für die verschiedenen Arten zwischen 37 und

¹ Siehe auch Abschnitt 4.

42° C liegen, mit dem Prozentgehalt des Körpers an Palmitinsäure zusammenhängen. Geringer Palmitinsäureanteil bedingt hohe Körpertemperatur und umgekehrt. O'CONNOR zeigt an Hand der Daten von 11 Tierarten, daß dies tatsächlich zutrifft. Beim Wal und beim Tümmler scheint die Regel nicht zu stimmen. Sie haben bei sehr geringem Palmitinsäuregehalt eine relativ geringe Körpertemperatur. Ihr Fett enthält nun aber große Mengen Cethylalkohol, der in seinem Grenzflächenverhalten der Palmitinsäure sehr ähnelt und diese hier offenbar ersetzt.

In diesem Zusammenhang ist weiter interessant, daß das Fett der Leber, die ja einige Grade wärmer als der übrige Körper ist, weniger Palmitinsäure enthält als das übrige Körperfett.¹

Diese Befunde erlauben nun eine sehr einfache Deutung der Einstellung der normalen Körpertemperatur als einer automatischen Regulation: Wenn bei einem Tier, das normal 37° warm ist, die Temperatur etwas sinkt, steigt der Sauerstoffverbrauch und gleicht den Wärmeverlust durch die gesteigerte Verbrennung aus. Ob diese automatische Regulation ausreicht, hängt von der Größe der Wärmeabgabe ab, die ihrerseits in ihrer Spitze durch das Zentralnervensystem geregelt wird, aber zur Hauptsache durch Fettpolster und Haarkleid oder Bekleidung bestimmt ist. Daß unter diesbezüglich geeigneten Versuchsbedingungen das Zentralnervensystem zur Aufrechterhaltung der normalen Körpertemperatur nicht notwendig ist, hat THAUER (382a) gezeigt.

Bisher hatte man versucht, das Geheimnis der Temperaturkonstanz beim Warmblüter allein durch korrelative Mechanismen zu erklären. Der neue Deutungsversuch liefert einen ansprechenden physikochemischen Grundmechanismus, dem dann die korrelativen Mechanismen als Feinsteuerung überlagert sind. Er verwandelt jetzt das Problem der Konstanz einer Temperatur in ein solches der Konstanz eines Mengenverhältnisses und das erscheint weniger unangreifbar. Man muß jetzt nach Unterschieden in der Fettresorption, der Fettspeicherung und dem Fettabbau zwischen Kalt- und Warmblütern suchen und darf vermuten, daß das Wesentliche beim Warmblüter der Schutz gegen die Wärmeabgabe durch Haarkleid, Fett oder Körpergröße ist.²

Die Versuche O'CONNORS an der Fingerhaut haben weiter gezeigt, daß durch tagelange äußerliche Behandlung der Haut mit Laurin-, Myristin-, Palmitin-, Stearin- oder Ölsäure die Umsatzsenken bei 32 und 36° C der Theorie entsprechend zu beeinflussen sind. Z. B. wird die Senke bei 32° (Inlösungsgehen der Myristinsäure) durch Behandlung mit Palmitinsäure (Verdrängung der Myristinsäure) aufgehoben, es tritt dann nur die Senke bei 36° C auf. Beim Regenwurm tritt eine solche Senke schon bei 17° auf.

¹ Siehe HILDITCH, Chemical Constitution of Natural Fats (1940).

² Fettanalysen bei Winterschläfern zu verschiedenen Jahreszeiten wären zur weiteren Prüfung der Theorie besonders interessant.

Dieses ist die Temperatur, bei der Laurinsäure löslich wird. Das Fett des Regenwurms enthält im Gegensatz zum Froschfett Laurinsäure!

O'CONNOR und O'DONOVAN (l. c.) fanden weiter, daß der Proteinumsatz nicht mit dem Sauerstoffverbrauch schwankt. Bei Temperaturen in der Nähe von 0° C wird fast aller Sauerstoff durch Protein verbraucht, bei 16° (siehe oben) tritt bei gleichzeitiger plötzlicher Zunahme des Sauerstoffverbrauches eine Steigerung der Fettverbrennung auf, von 21° ab wird dann auch Kohlenhydrat mitverbrannt.

Diese letzteren Befunde scheinen darauf hinzudeuten, daß das oben skizzierte Bild eines möglichen Wirkungsmechanismus vielleicht noch weiter ausgebaut werden kann. Es wäre auch denkbar, daß jene Erfassung der Stoffwechselphysiologie, daß die „Fette im Feuer der Kohlenhydrate verbrennen“, im Zusammenhang mit diesen Befunden eines Tages eine *anschauliche* Erklärung finden.

Es scheint so, als ob diese Arbeiten von O'CONNOR nicht nur neue physiologische Gesichtspunkte zugänglich machen, sondern auch für die Klinik große Bedeutung erlangen könnten (Fieberbekämpfung, künstliches Fieber, Theorie der Entzündung u. v. a.).¹

Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung des Grenzflächenverhaltens von Stoffen im biologischen Geschehen bringt TRURNIT (390). Er vergleicht die Größe der gesamten Ganglienzelloberfläche im Rückenmark (Frosch) mit der Fläche, die eine Menge Strychnin in monomolekularer Ausbreitung einnehmen würde, die gerade zur vollen Vergiftung ausreicht. Er findet, daß diese letztere Fläche etwa von der gleichen Größenordnung ist, wie derjenige Teil der Ganglienzelloberfläche, der von den Synapsen bedeckt ist. In diesem Zusammenhang betont er, daß offenbar der wesentliche Unterschied zwischen allen Stoffen, die in kleinsten Mengen wirken (u. a. den sog. Wirkstoffen) und den übrigen Agenzien darin besteht, daß die ersteren an Grenzflächen wirken, die letzteren im Vollen. Gewisse Stoffe gehen nur in bestimmte Organe oder Zellsorten und dort vermutlich an bestimmte Grenzflächen in monomolekularer Ausbreitung. Ihre *Flächenkonzentration* dort kann sehr hoch sein und entsprechend ihre Wirkung auf den ganzen Organismus groß, wenn es sich um korrelative Organe handelt, obwohl die *Volumkonzentration* verschwindend gering ist (vor allem, wenn man auf das ganze Tier bezieht). Wenn man genau so leicht die Größe der für einen bestimmten Stoff zuständigen inneren Grenzfläche bestimmen könnte, wie man das Gewicht eines Tieres bestimmen kann, und dann die Konzentrationen *sinngemäß* jeweils auf Quadratmeter oder Kilogramm bezöge, würden sich diese Zahlen nicht mehr um 6—8 Größenordnungen unterscheiden (Gamma und Gramm), sondern

¹ Die von einigen geäußerte Ansicht, daß nur die Filme von *wasserlöslichen*, *grenzflächenaktiven* Stoffen für biologische Fragen von Bedeutung sein könnten, wird durch die vorstehend besprochenen Arbeiten widerlegt.

in der gleichen Größenordnung liegen. In dieser Richtung scheint eine prinzipielle Bereicherung des pharmakologischen Denkens möglich zu sein.

Auch die Technik physiologischer Untersuchungen hat schon Nutzen aus den Ergebnissen der Filmforschung gezogen. v. MURALT (303) hat von der Tatsache Gebrauch gemacht, daß sich die Randwinkel einer Öllinse auf Wasser in Abhängigkeit von dessen Oberflächenspannung ändern und durch Randwinkelmessungen an solchen Linsen einen — offenbar grenzflächenaktiven — Nervenerregungsstoff nachgewiesen.¹

BALLENTIN (43) weist darauf hin, daß man kleine Mengen wäßriger Lösung quantitativ aus Gefäßen entleeren kann; die vorher durch eine monomolekulare Eisenstearatschicht unbenetzbar gemacht wurden.

19. Ergebnisse anderer Untersuchungen.

Im folgenden werden einige neuere Arbeiten besprochen, die nicht unmittelbar zum Thema gehören, jedoch entweder die Frage der Orientierung der Moleküle in der Grenzfläche berühren oder über neue Methoden berichten.

TEIGE (380) diskutiert die verschiedenen Formeln für die Adsorptionsisotherme und stellt unter der einfachen Annahme, daß die Erniedrigung der Oberflächenspannung proportional dem Quadrat der Konzentration der aktiven Substanz in der Oberfläche ist, eine neue Gleichung auf. Er versucht dann die darin enthaltenen Konstanten physikalisch zu interpretieren. Das führt im besonderen auf die Annahme von Moleküllassoziationen. Ferner wird abgeleitet, daß die Oberflächenspannungserniedrigung, die jedes einzelne Molekül bewirkt, gleich ist $k \cdot T$. Siehe dazu die Ausführungen von LANGMUIR (250), der findet, daß der Beitrag zur Adsorptionswärme, den jede neue CH_2 -Gruppe einer aliphatischen Verbindung liefert, gleich $1,08 k \cdot T$ ist.

HERSHEY (214) untersucht, angeregt durch die Weintränen am Rande von Gläsern, in denen schwerer Wein ist, den Zusammenhang zwischen Oberflächenkrümmung und Temperatur an dünnen Wasserschichten (0,2 mm) auf lokal erhitzten Objektträgern. BRADLEY (70) untersucht den Einfluß der Krümmung der Grenzfläche zwischen Flüssigkeiten auf die Löslichkeit der einen in der anderen. SEBBA und BRISCOE (363) verfolgen die Änderung der Löslichkeit von Filmen in Abhängigkeit vom Schub und den Einfluß dieser Größe auf die wahre Oberflächenspannung.

Ein ganz neues Gebiet schneidet eine Arbeit von BRADLEY (71) an. Er mißt die Grenzlinienspannung an der Grenze fl/fl/g. Schon GIBBS (157) hatte die Grenzlinie am Treffort dreier Phasen gesondert betrachtet und sie als den Sitz einer linearen Energie und Entropie und einer linearen Adsorption bezeichnet [siehe BRADLEY (69)]. Vermutlich ist ein großer Teil der heterogenen Gaskatalyse an die Grenzlinie fl/fl/g gebunden. Daran lassen sich Messungen aber nicht ausführen. BRADLEY betrachtet daher die Grenze fl/fl/g. Er mißt den Durchmesser und die Dicke von großen Öllinsen auf Wasser in Abhängigkeit vom pH. Siehe dazu auch LANGMUIR (258).

CASSEL und FORMSTECHE (86) untersuchen die Adsorption von Paraffindämpfen an Wasser, die Ketten liegen immer flach auf dem Wasser. SEBBA und BRISCOE (363) beschäftigen sich mit einem neuen Alterungsphänomen an Filmen auf Wasser. In Docosanolfilmen bilden sich offenbar Quadrupole, die flach auf dem Wasser liegen. Bei konstantem Schub wächst die Fläche langsam. TAUBMANN berichtet in einer Reihe von Arbeiten (379) über die waagerechte Lage und die Solvatation von Molekülen in Adsorptionsschichten.

¹ Die Methode stammt von LANGMUIR und BLODGETT (264a).

Von Interesse sind ferner die Untersuchungen von McBAIN und Mitarbeitern über die direkte Messung der Konzentrationsdifferenz zwischen Oberflächenschicht und Lösung bei Lösungen grenzflächenaktiver Stoffe (120, 285, 288, 290); Zusammenfassung in (286). Die Oberflächenschicht des Wassers wird mit einem sehr schnell bewegten Mikrotommesser (10—14 m/Sek.) abgeschnitten und sammelt sich dabei in einem Silbergefäß. Die abgeschnittene Schichtdicke beträgt 0,05—0,1 mm. Eine andere Methode besteht darin, zunächst den Brechungsindex der Lösung zu bestimmen, nachdem sie mit ihrer Oberflächenschicht in ein Konzentrationsgleichgewicht gekommen ist und ihn dann nach einer intensiven Durchmischung neu zu bestimmen. Dieses Verfahren ist dann anwendbar, wenn die Diffusionsgeschwindigkeit nicht zu groß ist. Die Autoren arbeiteten mit Hydrozimsäure. Die gefundenen Werte folgten mit großer Genauigkeit der GIBBSschen Gleichung.

Die gleichen Autoren haben, um auch an löslichen Filmen mit der Langmuirwaage arbeiten zu können, unter deren Schwimmer eine feine Gummibarriere zwischen beiden Trogteilen angebracht. ALEXANDER (31) untersucht die Oberflächenalterung von Lösungen von Hydrozimsäure, Dodecylsulfat u. a. und stellt fest, daß die auch schon früher festgestellten Abweichungen von der klassischen Diffusionstheorie durch eine sehr lange Einstellzeit an der Grenze Wasser/Luft erklärt werden müssen. An der Grenze Wasser/Öl dagegen stellt sich das Gleichgewicht sehr schnell ein. Ebenso wirkt die Bedeckung des Wassers mit einem Ölsäurefilm. Theorien, die mit der Annahme abstoßender elektrostatischer Kräfte oder der Bildung mehrmolekularer Schichten operieren, können demnach nicht zutreffen. Statt dessen wird angenommen, daß die Geschwindigkeit der Einstellung des Gleichgewichts bestimmt wird durch die Penetration und Reorientierung der hydrophoben Molekülteile. Beides geschieht bei überlegender Ölphase schnell, bei Fehlen derselben langsam [siehe auch ALEXANDER und TEORELL (34a)].

20. Filme an der Grenze fl/fl.

Die meisten der vorher beschriebenen Meßverfahren, vor allem aber die Schubmessung, bieten an der Grenze fl/fl leider so große Schwierigkeiten, daß bisher nur eine kleine Anzahl von Arbeiten darüber vorliegt.

MATTHEWS (284) hat mit einer modifizierten Tropfenmethode Filme von Kohlenhydraten an der Grenze Wasser/Cyclohexan untersucht. Für Laktose (0), Dextrose (I), Dextrin (II), Äpfelpektin (III), Citruspektin (IV), Gummi arabicum (V) und Glykogen (VI) stellt sich schon nach Minuten eine stabile Grenzflächenspannung ein. Bei Stärke und Insulin dauert es sehr viel länger. Der Verlauf der Kurve Konzentration/Oberflächenpannung hängt davon ab, ob sich ein starrer oder expansiver Film bildet. 0, I und V geben expansive Filme bei allen Konzentrationen. II gibt bei kleinen Konzentrationen e-Filme, bei größeren r-Filme. III, IV und VI geben Zwischentypen.

Es könnte sein, daß derartige Untersuchungen als Hilfsmittel bei der Konstitutionsaufklärung solcher Stoffe einmal aufschlußreicher sind als die Viskositätsmessung. Und zwar aus folgenden Gründen: Die Teilchen ordnen sich im Bereich der Grenzfläche freiwillig bis zu einem gewissen Grad, die Art dieser Ordnung läßt sich weitgehend ermitteln. Außerdem kann man — etwas grob gesagt — an die orientierten Teilchen von zwei

gegenüberliegenden Seiten mit unter sich verschiedenen und in gewissen Grenzen austauschbaren Medien heran. Diese haben wieder einen bestimmbaren Einfluß auf die Orientierung. Über einen Versuch zur Bestimmung des Molekulargewichtes von großen Molekülen an Grenzflächen siehe im zweiten Teil (GUASTALLA).

MERIGOUX und AUBRY (291) untersuchen die Adsorption an der Grenze Wasser/Paraffinöl und Wasser/Tetrachlorkohlenstoff [siehe auch ALEXANDER (314) und HEYMANN und YOFFE (215a)].

Von TEORELL (381) stammt eine technisch reizvolle Arbeit über die Messung der elektrischen Leitfähigkeit dünner Filme an der Grenze f/fl. Er macht — genau wie Seifenblasen in Luft — Nitrobenzolblasen in n/10 KCl-Lösung, mißt die Leitfähigkeit der dünnen Nitrobenzolwand für Gleich- und Wechselstrom und findet, daß sich diese mit Dünnerwerden der Wand („aufblasen“) *sprungweise* vergrößert.¹ Obwohl innen und außen die gleiche Lösung vorhanden ist, besteht eine Potentialdifferenz zwischen innen und außen.

ALEXANDER, TEORELL und ABORG (35) haben die Wirkung von Ionen auf Kephalfilme untersucht. An der Grenze Wasser/Luft bewirkt Ca⁺⁺ eine geringe Kondensation des Films, an der Grenze Wasser/Benzol verhindert es die Auflösung des Kephals in Benzol. Es bildet sich ein in beiden Phasen unlösliches Calciumsalz. Magnesium-, Natrium- und Kaliumionen wirken nicht so. Wir haben hier ein besonders schönes Beispiel dafür, wie die Grenzflächenforschung zur Aufklärung ganz spezieller biologischer Befunde beitragen kann.

ASKEW und DANIELLI (40) berichten über Messungen von Filmen an der Grenze Wasser/Brombenzol. Außer Albumin (siehe unten) wurde Eicosansäure, α -Aminopalmitinsäure und Trimethylcellulose untersucht. Die Stoffe geben sehr kompressible m-Filme oder e-Filme.

SCHULMAN und COCKBAIN (351) untersuchen die Bildung molekularer Komplexe an der Grenze Öl/Wasser im Zusammenhang mit der Frage nach der Stabilität von Emulsionen und der Phasenumkehr. Die Arbeit gehört in das große Gebiet „Emulgatoren“.

21. Filme an der Grenze f/fl.

FOWKES und HARKINS (127) haben den Zustand monomolekularer Schichten an der Grenze f/fl untersucht. Sie bedienen sich dazu der Theorie des Randwinkels und eines eigens entwickelten Randwinkelmeßgerätes. Eine Platte der betreffenden festen Substanz wird teilweise in die Lösung getaucht und um eine Achse, die genau in der Wasseroberfläche liegt, solange gedreht, bis die Wasseroberfläche völlig eben bis zur Platte hin verläuft. Der Drehwinkel ist dann gleich dem Randwinkel. Die Versuche

¹ Siehe dazu die Arbeit von PERRIN [über Seifenblasen (322)].

wurden so sorgfältig durchgeführt, daß der Eintauch- und Austauschwinkel gleich groß waren. Die untersuchten festen Partner waren Paraffin, Antimonit, Graphit und Talk. Die in Wasser gelösten Filmbildner waren immer Substanzen mit vier oder weniger C-Atomen. Sie bildeten an der Grenze f/fl e-Filme. Es ergab sich qualitativ das gleiche F/A -Verhalten wie an der Grenze fl/g. Ebenso wie an dieser Grenze ist auch an der Grenze f/fi die Buttersäure aktiver als ihr Na-Salz. Die Kettenlänge des Filmbildners ist kaum von Einfluß auf die Filmart, wohl aber seine Konzentration in der Lösung. Der kleinste bei diesen Untersuchungen erhaltene Flächenwert (40—50 Å²/Molekül) ist um das doppelte größer als der Wert für Kettenmoleküle in r-Filmen an der Grenze fl/g.

Eine theoretische Betrachtung über die Natur der Adsorptionskräfte organischer Dipolmoleküle an Metallgrenzflächen stammt von DUNKEN (115b). Hierin wird unter dem gleichen Gesichtspunkt die Aneinanderlagerung von Dipolen zu Quadrupolen und die Adsorption von Dipolmolekülen an die Metalloberfläche (an das elektrostatische Spiegelbild im Metall) betrachtet. Der Einfluß des Dipolmomentes auf die Assoziation zu Quadrupolen erweist sich dabei als größer als auf die Adsorption von Molekülen an Metallen.

II. K-Filme.

22. Herstellung und Messung.

Filme nichtlöslicher Substanzen kann man unter geeigneten Bedingungen von der Wasseroberfläche auf feste Träger bringen, und zwar so, daß in diesen abgehobenen Filmen die Ordnung und Orientierung der Moleküle die gleiche ist wie auf der Wasseroberfläche (LANGMUIR 1917). Im Anschluß an diese Beobachtung von LANGMUIR hat KATHERINE BLODGETT (58, 59, 60, 61, 63, 64) ein Verfahren entwickelt, in kontinuierlichem Arbeitsgang eine fast beliebig große Zahl von Filmen auf dem Träger übereinanderzuschichten und die Dicke solcher Aufbaufilme (Schichtfilme) genau zu messen.¹ Die Herstellung geschieht dadurch, daß man die Trägerplatte langsam durch die Wasseroberfläche, die den Film trägt, auf und ab bewegt und währenddessen den Film auf dem Wasser unter einem geeigneten, konstanten Schub hält. Die Tauchbewegung soll lineare, nicht sinusförmige Geschwindigkeit haben. Der konstante Schub wird durch einen automatisch von dem Schubmesser gesteuerten Barrenvorschub ausgeübt oder nach dem Verfahren von BLODGETT, das in Abb. 8 dargestellt ist. Die Wasseroberfläche wird durch einen unbenetzbar ge-

¹ Diese Filme werden im folgenden K-Filme genannt. Diese mehrschichtigen Gebilde auf Trägern werden, ebenso wie die einschichtigen auf Wasser, als „Filme“ bezeichnet, die einzelnen Elemente heißen „Schichten“. Siehe den Abschnitt „Namen und Zeichen“.

machten Seidenfaden in zwei Teile geteilt. Auf die eine Hälfte wird der Baufilm gespreitet, auf die andere Hälfte ein „Schubfilm“ aus einer Substanz wie z. B. Ölsäure, der in Gegenwart einer kleinen Linse über-

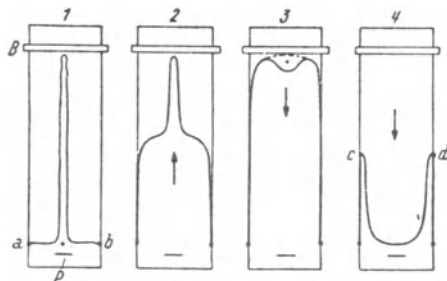


Abb. 8. Verfahren von BLODGETT zur Herstellung von K-Filmen.

Aufsicht auf den Trog in verschiedenen Stadien. *B* ist der Barren, mit dem zuvor die Wasseroberfläche gereinigt wurde. *P* der Querschnitt der zu tauchenden Trägerplatte. Stadium 1: Die Wasseroberfläche ist sauber, bei *a* und *b* wird ein paraffinierter Seidenfaden fixiert und in der dargestellten Art auf das Wasser gelegt. An der markierten Stelle vor dem Träger wird die zu spreitende Lösung aufgebracht. Der Film drängt den Seidenfaden an die Trogwände (Stadium 2). Man gibt soviel Tropfen Lösung, bis die Fläche fast ganz bedeckt ist. Dann setzt man zwischen Barren und Seidenfaden eine winzige Menge Ölsäure oder anderes Schuböl, das nun nach Maßgabe des Filmverbrauches beim Tauchen, (das jetzt beginnen kann) den Baufilm unter konstantem Schub auf den Träger zuschiebt (Stadium 3–4). Es ist zweckmäßig, vor Beginn des Tauchens den Faden bei *c* und *d* zu fixieren.

schüssiger Ölsäure an seiner Grenzlinie — unabhängig von der jeweils eingenommenen Fläche — einen konstanten Schub ausübt (Ölsäure gibt 29,5 Dyn/cm bei 20° C, Ricinusöl etwa 16 Dyn/cm).

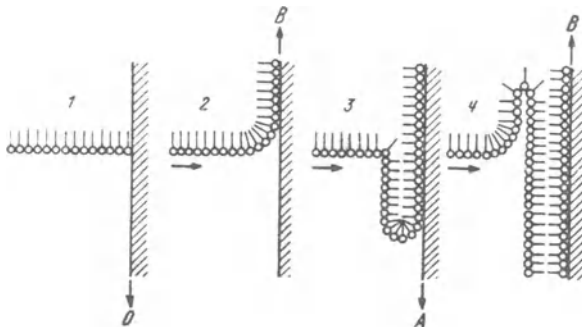


Abb. 9. Schematische Darstellung des Vorganges beim Bau von K-Filmen.

Die Moleküle sind durch geschwänzte Kreischen dargestellt. Das Kreischen bedeutet die aktive Endgruppe. Die schraffierte Wand sei der Querschnitt der Trägeroberfläche. Beim ersten Eintauchen (1) kommt der Träger filmfrei unter Wasser. Beim ersten Auftauchen (2) zieht eine B-Schicht auf, beim zweiten Eintauchen (3) zieht die erste A-Schicht auf, beim zweiten Auftauchen (4) die zweite B-Schicht usw. Näheres im Text.

Die Art des Aufbauvorganges wird durch Abb. 9 erläutert. Wenn der Träger aus sauberem Glas oder Metall besteht, kommt er beim ersten Eintauchen blank unter Wasser, es zieht keine Schicht auf. Beim ersten Auftauchen dagegen haften die unmittelbar benachbarten Filmmoleküle (Beispiel: Stearinsäure) mit ihrem hydrophilen Ende am Träger und

werden unter Kippung um 90° auf dem Träger nach oben fortbewegt. Durch den Schub rücken andere nach, und so gleitet eine Filmfläche von der Größe der ausgetauchten Trägerfläche auf den Träger zu und heftet sich auf ihm fest. Beim Eintauchen legt sich nun unter geeigneten Bedingungen eine zweite Schicht auf die erste, aber jetzt so, daß die hydrophoben Moleküle zum Träger hinzeigen, also den hydrophoben Enden der ersten Schicht gegenüberstehen. Beim Wiederaustauchen legt sich eine dritte Schicht — orientiert wie die erste — darüber usw. Außerhalb des Wassers sind also bei dieser Bauart nur Filme mit ungerader Schichtenzahl möglich, unter Wasser nur solche mit gerader Schichtenzahl. Die aufgebrauchte Substanz liegt also als Kristall vor, der aus Doppelschichten besteht, deren Orientierung alternierend um 180° wechselt. Die beim Eintauchen aufziehenden Schichten werden A-Schichten genannt, die beim Austauchen aufziehenden B-Schichten. Die Orientierung der A-Schichten wird mit „exotrop“ bezeichnet, die der B-Schichten mit „endotrop“. Man hat auf diese Art bis 3000 Schichten übereinandergebracht.

Die auf die eben geschilderte Art aufgebauten Filme werden *Y-Filme* genannt. Unter anderen Baubedingungen ziehen nur beim Eintauchen Schichten auf, solche K-Filme werden *X-Filme* genannt. Wenn nur jeweils beim Austauchen eine Schicht aufgezo-gen ist, nennt man den Film *Z-Film*. Wenn man den Träger vorher mit einer Kohlenwasserstoffgrundlage überzogen hat (Paraffin), zieht schon beim ersten Eintauchen eine A-Schicht auf.

Die Oberfläche eines normalen Y-Films ist unbenetzbar sowohl für Öl als auch für Wasser (257, 261). Ersteres liegt offenbar daran, daß die aus lauter CH_3 -Gruppen bestehende Oberfläche geringere VAN DER WAALSsche Kräfte ausübt als eine solche aus CH_2 -Ketten.

Da die Dicke jeder einzelnen Stearatschicht etwa 25 Å beträgt, bekommt man bei einigen hundert Schichten schon Interferenzfarben, wenn der Brechungsindex des Trägers genügend verschieden von dem des Films ist. Bei sehr großen Einfallswinkeln genügt eine entsprechend geringere Schichtenzahl. Wenn als Träger Metall genommen wird, sind die Interferenzfarben (des reflektierten Lichts) besonders brillant, vor allem bei Chrom. Wenn der Brechungsindex des Filmmaterials bekannt ist, kann man aus Einfallswinkel, Wellenlänge des Lichts (bei Beleuchtung mit monochromatischem Licht) und reflektierter Intensität die Film-dicke berechnen. Die Meßtechnik, eine reizvolle Verknüpfung interferometrischer und polarisationsoptischer Methoden, und die Art der Berechnung wird von BLODGETT (l. c.) genau angegeben, ein verbessertes Meßverfahren von TRURNIT und BERGOLD (392).¹

Weitere Arbeiten zur Herstellung und Messung der Schichten: BLODGETT (62), BLODGETT und LANGMUIR (64), FRAZER (130, 131), SCHAEFER und SOBOTKA (346),

¹ Siehe auch (45).

JENKINS und NORRIS (231), eine sehr interessante Arbeit mit mikroskopischer Technik bei J. PERRIN (322). BOUHET (65), BRAIN, BACON und BRUCE (72) über optische Oberflächendicke von reinem Wasser, TRONSTADT (389) über Depolarisation an filmbedeckten Metallen.

BRUCE (78) diskutiert die aus der FRESNELSchen Theorie abgeleiteten Formeln von MACLAURIN (278) und von DRUDE (115) und die neuere von STRACHAN (375) und zeigt, daß die beiden ersten identisch sind, und daß es entgegen der bisherigen Auffassung nicht möglich ist, aus zwei unabhängigen Messungen der Interferenzintensitäten bei verschiedenen Wellenlängen den Brechungsindex *und* die Schichtdicke zu berechnen. Es ist nur möglich, eine theoretische kleinste Schichtdicke zu berechnen, wenn man den Brechungsexponenten des Schichtmaterials gleich $\sqrt{n_1 \cdot n_2}$ setzt, wobei n_1 und n_2 die Brechungsindices der angrenzenden Medien sind. Diese Arbeit engt den theoretischen Wert der Berechnungen von BLODGETT und LANGMUIR offenbar ein, dagegen wohl kaum den praktischen, denn die Schichtdicke der nach BLODGETT gemessenen Stearinsäure-K-Filme stimmt genau mit dem aus andersartigen Messungen bekannten Wert für die Kettenlänge des Stearinsäuremoleküls überein. VASIČEK umgeht durch eine besondere Meßtechnik die von BRUCE betonte Schwierigkeit (393). Eine interessante Methode zur Untersuchung der Oberflächeneigenschaften von K-Filmen hat SCHAEFER (345) entwickelt. Er mißt die Intensität des Streulichtes, das unter kleinem Winkel zum Primärstrahl gestreut wird. Dessen Richtung ist normal zur filmtragenden Glasplatte. Der Film wird vorher angehaucht oder mit einem Ölfilm versehen. Es treten mit zunehmender Schichtenzahl periodische Schwankungen in den Eigenschaften der obersten Schicht auf, die noch nicht geklärt sind.¹

23. Mechanische Eigenschaften.

LANGMUIR (261) hat über die Art der Haftung der untersten Schicht am Träger Versuche angestellt. Oberflächen von Platin, Glimmer, Glas, Calcit, Sphalerit und Galena, die einen *monomolekularen* Ölsäurefilm tragen, sind durch Wasser und Öl benetzbar. Wasser verdrängt dabei reinstes Petroleum, dagegen nicht Petroleum, das eine Spur von Fettsäure enthält. Von Glimmer rutscht der Ölsäurefilm leicht wieder auf reines Wasser, auf den anderen Stoffen bleibt er fest haften. Es kann allgemein gefolgert werden, daß sich das Verhalten von Filmen auf festen Unterlagen von dem auf Wasser dadurch unterscheidet, daß im ersten Fall die Orientierung und Haftfestigkeit durch die Unterlagenstruktur bedingt und fest gegeben ist. Man muß damit rechnen, daß bei Monofilmen oder K-Filmen der Kontaktwinkel gegen Wasser von der Art der Unterlage abhängig ist.

Eine Reihe von Arbeiten befaßt sich mit der Frage, inwieweit sich beim Filmbau die Flächengröße und Teilchenorientierung des Films auf dem Wasser beim Aufziehen auf den Träger ändert. Insbesondere das sog. Flächenverhältnis A_w/A_p (A_w = Filmfläche auf Wasser, A_p = Filmfläche auf der Platte) wird unter verschiedenen Bedingungen gemessen

¹ Siehe dazu TAMMANN und BOEHME, Ann. Physik [5] 22, 77 (1935) und FUCHS, Kolloid-Z. 71, 145. MOSER hat 1847 schon sog. Hauchbilder beschrieben. SCHAEFER erwähnt diese Arbeiten nicht.

[siehe z. B. BIKERMAN (54)]. Sein Wert wurde für Aufbau auf Glas [LANGMUIR (257)], auf Metallplatten [STENHAGEN (372)] und auf Metallzylinder [LANGMUIR, SCHAEFER und SOBOTKA (272)] zu 1,0 ermittelt, und zwar für Stearat-, Ester- und Stearinsäurefilme. Dieser Befund ist nicht selbstverständlich, da auch die bestpolierte Metallplatte in molekularen Dimensionen nicht eben ist. BIKERMAN (l. c.) versah eine Metallplatte mit Rillen nach Art der ROWLANDSchen Gitter (160 Rillen pro Zentimeter, 0,019 mm tief). Die wahre Fläche der Platte war dadurch um das 1,12fache größer geworden als die geometrische Fläche (Flächenverhältnis also 0,894). Beim Aufbau eines Stearatfilms auf diese Platte ergab sich ein mittleres Flächenverhältnis von 0,98 (Extremwerte bei 10 Versuchen: 1,04 und 0,93). Das ermutigte ihn, Filme auf Drahtgaze zu bauen. Das Flächenverhältnis lag hier zwischen 0,8 und 0,9. Selbst wenn die Gaze schwarz platinert wurde, lag es bei Y-Filmen aus Octadecylacetat bei 0,86 [ALEXANDER und SCHULMAN (34)]. Man muß nach diesen Untersuchungen annehmen, daß die Filme sich selbst über makroskopische Unebenheiten wie Seifenlamellen hinspannen. Über die diesbezüglichen Einzelheiten bei X-, Y- und Z-Filmen muß im Original nachgelesen werden. Siehe auch BIKERMAN (55). Eine sehr ausführliche Arbeit über die Abhängigkeit des Flächenverhältnisses vom Bauschub stammt von DENARD (100).

STENHAGEN (373) diskutiert ausführlich die Beziehungen zwischen dem röntgenologisch gefundenen Schichtebenenabstand im Kristall und dem optischen Abstand im Film. Der letztere hängt vom Flächenverhältnis und dieses vom Schub beim Filmbau ab. DENARD hatte gefunden, daß bei Schüben unter 2 Dyn/cm das Flächenverhältnis etwa 1,4 ist und daraus geschlossen, daß die Moleküle auf Metall dichter gepackt sind als auf Wasser. Auch glückt es nicht, die erste beim Eintauchen entstehende Schicht eines X-Films beim Austauchen auf der Platte zu behalten, sie gleitet wieder auf das Wasser zurück. STENHAGEN deutet das so: Bei großem Schub sind die Kohäsionskräfte und die Ordnung der Moleküle auf der Wasseroberfläche so groß, daß der Film wie eine starre Platte die Unebenheiten der Trägerplatte überbrückt. In diesem Fall ist das Aufbringen mehrerer Schichten möglich. Bei zu kleinem Schub folgen die Moleküle in ungeordneter Weise den Unebenheiten des Trägers und schwimmen wegen der mangelnden seitlichen Kohäsion beim Austauchen wieder ab.

TURNIT (391a) findet durch genaue Messung des Flächenverhältnisses bei steigendem Schub an Stearinsäurefilmen auf $\frac{n}{1000}$ HCl mit Chromträgern, daß auch schon bei sehr kleinem Schub (unter 1 Dyn/cm) ein Teil der Chromoberfläche irreversibel mit Filmmolekülen besetzt wird. Dieser Besetzungsgrad vergrößert sich bei wieder-

holtem Austauschen des Trägers (bei konstantem geringem Schub), bis eine Menge Filmmaterial auf der Platte deponiert ist, die dem mehrfachen geometrischen Flächenwert des Trägers entspricht. Offenbar werden zuerst aktive Stellen der Metalloberfläche bedeckt, während die weitere Anlagerung dann unter Mitwirkung VAN DER WAALSScher Kräfte zwischen den Ketten erfolgt. Erst nachdem die ganze „wirkliche“ Metalloberfläche besetzt ist, zieht *ohne* Schubsteigerung die erste A-Schicht auf. Auch glückte auf diesem Wege die weitere Aufklärung der Umstände, von denen die X-, Y- oder Z-Filmbildung abhängt.

LANGMUIR (261, 262) berichtet über die Fähigkeit der Moleküle der obersten Schicht eines im Bau befindlichen K-Films, sich umzudrehen, und die Möglichkeiten, das zu verhindern. Diese Erscheinung wird regelmäßig bei X- und Z-Filmen beobachtet, die ja ihrer Aufbauart nach nur aus exotropen, bzw. nur aus endotropen Schichten bestehen dürften. Man findet aber, daß die fertigen Filme genau so aus alternierenden Schichten bestehen, wie die Y-Filme. Also müssen sich die Moleküle jeder zweiten Schicht beim Bau umgekehrt haben. Siehe dazu Abschnitt 26, Absatz 6.

Man kann nun durch geeignete Behandlung erreichen, daß sich die oberste Schicht eines normalen Y-Films umkehrt, also exotrop und damit hydrophil wird. Und zwar durch kurzes Eintauchen der Platte in Th- oder Al-Ionen enthaltende Lösung (265, 266). Es ist zunächst nicht verständlich, wie die einzelnen dichtgepackten, stäbchenförmigen Moleküle einzeln umklappen sollen. Ein möglicher Mechanismus wäre folgender: Während ein K-Film in reinem Wasser völlig hydrophob ist, dringt bei Anwesenheit großer mehrwertiger Ionen das Wasser, geführt von den Ionen, zwischen die CH_2 -Ketten der obersten Schicht ein und gelangt so bis zur ersten hydrophilen Schichtgrenze, in der sich ja die aktiven Gruppen einander gegenüberstehen. Damit gehört aber die oberste Schicht gewissermaßen nicht mehr zum Film, sondern zum Wasser, die neue Phasengrenze ist die bisherige erste Schichtgrenze und die oberste Schicht steht verkehrt herum zur Grenzfläche. Das so bedingte Bestreben der Moleküle, sich zu wenden, wird durch die Anwesenheit des Wassers offenbar erleichtert und führt zum Umklappen.¹

Über Kristallisationsvorgänge in K-Filmen und die Möglichkeit des Einfrierens noch nicht kristallisierter Filme siehe STENHAGEN (373) und KNOTT und SCHULMANN (244 a).

¹ Erfahrungen bei der Behandlung von bestimmten Fasern könnten aber dafür sprechen, daß dieses von LANGMUIR vermutete Umklappen gar nicht stattfindet, sondern daß die Metallionen auch so auf der CH_2 -Fläche haften und als Bindeglied für die eventuell aufgebrachte S-Schicht dienen (siehe Abschnitt 31).

24. Elektrische Eigenschaften.

So wie bei H-Schichten auf Wasser außer der mechanischen Untersuchung auch die elektrische Untersuchung zur Kennzeichnung der Eigenschaften herangezogen wird, kann man bei K-Filmen neben der optischen Untersuchung auch die Messung einer meist vorhandenen Potentialdifferenz zwischen Träger und Filmoberfläche zur Kennzeichnung verwenden. Ein K-Film kann prinzipiell zwei Arten von Potentialdifferenzen zeigen: Einmal bedeutet ja das Aufbringen einer Schicht von orientierten Dipolen die Herstellung einer elektrischen Doppelschicht. Bei alternierendem Orientierungswechsel hebt sich dieser Effekt bei großen Schichtzahlen für alle Schichten außer einer auf. Zum anderen ist es möglich, daß beim Aufziehen der B-Schichten Ionen zwischen der letzten A-Schicht und der neuen B-Schicht hängen bleiben und in den Film eingebaut werden.

PORTER und WYMAN (307) haben als erste solche Messungen angestellt. Sie fanden für X-Filme aus Stearinsäure auf Metallplatten für 170 Schichten ein Voltapotalential von 8,6 Volt, bei Y-Filmen für 10 Schichten ein solches von 0,12 Volt und bei weiterer Schichtzahlvergrößerung keine Steigerung mehr. Bei den X-Filmen bedeutet das pro Schicht ein Potential von 50 mV und eine Feldstärke von etwa $2 \cdot 10^5$ V/cm. In einer großen Arbeit untersuchen die Autoren dann diese Verhältnisse in Abhängigkeit von den Substrationen (328). Weitere Arbeiten dazu von BIKERMAN (53), BIKERMAN und SCHULMAN (56) und FANKUCHEN (118). Dieser Untersucher „wickelte“ X-Filme von Wasser auf einen rotierenden Zylinder, dessen Achse in der Wasseroberfläche lag. Er bekam dabei nur geringe ΔV -Werte.

Einen hübschen Demonstrationsversuch beschreiben GORANSON und ZISMAN (158). Sie beschicken eine Längshälfte eines Zylinders aus Isoliermaterial mit einem K-Film, hängen diesen Zylinder mit vertikaler Achse an einen feinen Faden, an dem ein Spiegelchen angebracht ist, und erhalten so ein Gerät zum Ausmessen elektrischer Felder, das genau einem Spiegelgalvanometer entspricht. Denn der K-Film zeigt eine permanente Volumpolarisation! In einem Felde von 100 V/cm gab dieses Gerät bei 1 m Skalenabstand einen Ausschlag von 160 mm! Auf dem Halbzylinder waren 340 X-Schichten von Ca-Stearat aufgebracht. Die filmbedeckte Fläche betrug etwa 2,3 qcm. Die Angaben über die Größe der molekularen elektrischen Momente müssen im Original nachgelesen werden.

Die gleichen Autoren (159) berichten in einer größeren Arbeit über Messungen an X- und Y-Filmen, die mit verschiedenen Substraten und verschiedener Tauchgeschwindigkeit hergestellt wurden. Die filmbedeckten, aus Isoliermaterial gefertigten Träger werden zur Messung in einen isoliert aufgestellten Faradaykäfig gehängt, der mit zwei Platten eines Quadrantenelektrometers verbunden ist. Weitere Messungen und Ausführliches über die Technik bei den gleichen Autoren (160).

HARKINS und MATTOON (199) finden, daß das Kontaktpotential zwischen zwei Goldplatten, auf deren eine ein X-Film aufgebracht ist, pro Schicht 100 mV beträgt. Solche Potentiale sinken bei 22° in 14 Tagen auf die Hälfte, bei 50° 50mal schneller, bei 85° 2500mal schneller, bei Bestrahlung mit Polonium in 15 Minuten auf $\frac{1}{10}$ des Ausgangswertes. Ein dünner Paraffinfilm auf Chrom gibt kein Potential. Darauf aufgebrachte X-Schichten können mehr als 1 Volt pro Schicht geben! Eintauchen in Quecksilber kann das Kontaktpotential von X- und Y-Filmen um 10—11 Volt erhöhen! Das Ablösen einer X-Schicht durch Zurückspreiten auf Wasser kann das Potential des Films um mehrere 100 V erniedrigen.

Es ist zu beachten, daß das Potential der äußersten Schicht gegen das Trägermetall mit der Filmdicke wachsen muß, auch wenn die gesamte Ladung nur in der äußersten Schicht lokalisiert ist. In einer späteren Arbeit diskutieren die gleichen Autoren (200) an Hand weiterer Versuche den Entstehungsmechanismus dieser Potentiale. Es handelt sich wahrscheinlich um eine Aufladung nur der obersten Schicht. Diese tritt nur bei X-Filmen auf.¹ Bei Y-Filmen werden keine oder nur sehr geringe Potentiale gefunden. Gold hat sich bei diesen Versuchen als Trägermaterial besonders bewährt, da sein Kontaktpotential ziemlich unempfindlich gegen Verunreinigung ist.

HARKINS und GROETZINGER (197) untersuchen diese Verhältnisse von einer anderen Seite her, indem sie den beim Bau auftretenden Ein- und Austauschstrom messen. Sie finden, daß die gesamte, während des Ein- und Austauschens bewegte Ladung von derselben Größenordnung ist, wie zu erwarten, wenn das beobachtete Potential auf der Aufladung nur einer Schicht beruhen würde. Die früher entwickelte Vorstellung über die Ursache der Potentiale wird also bestätigt. STENHAGEN (372) macht Messungen an K-Filmen aus Estern.

Auch LANGMUIR (259) beschäftigt sich mit diesen Erscheinungen. Er glaubt ebenfalls, daß es sich eher um eine Aufladung der obersten Schicht als um die Wirkung der Orientierung von Dipolmolekülen handelt.

RACE und REYNOLDS (329) untersuchen in einer außerordentlich sauberen Arbeit mit Hilfe einer Hg-Tropfenelektrode die Dielektrizitätskonstante von Stearin- und Arachin-K-Filmen auf Substraten mit Ba-, Ca-, Cd-, Cu- und Pb-Ionen. Die DK beträgt 2,55 und ist unabhängig von Filmdicke und Meßfrequenz (bis 10^6 Hz). Sie ist stärker vom p_H des Substrats und damit vom Verhältnis Säure/Seife abhängig, als von der Art der Substrationen. Der dielektrische Verlust $\text{tg } \delta$ ist gleich 0,0009, unabhängig von Frequenz und Filmart. P-Filme (siehe unten) benehmen

¹ Die hier besprochenen Potentiale fallen nicht unter den Begriff des Volta-potentials!

sich so, wie es nach den LANGMUIRSchen Vorstellungen über ihren Aufbau zu erwarten ist. Es lassen sich mit Wechselstrom bei diesem Verfahren maximale Feldstärken von $2 \cdot 10^6$ Volt/cm aufrechterhalten! Ihre große Schwankungsbreite rührt von Störstellen im Film her. Auf Substrat mit relativ hohem p_H werden die in dieser Hinsicht stabilsten Filme gewonnen.

In diesem Zusammenhang interessiert auch eine kurze Mitteilung von THIESSEN, BEISCHER und GILLHAUSEN (384), die mit Gleichstrom die Durchschlagsfestigkeit von Ba- und Cd-Stearatfilmen untersuchten. Die Schichtdicken betragen 100—1000 Å. Ein Durchschlag erfolgte bei Feldstärken von $4-5 \cdot 10^6$ Volt/cm. Im Zusammenhang damit hat TRURNIT (391) darauf hingewiesen, daß diese Befunde vermutlich von Bedeutung für die Theorie der Biopotentiale sind.¹ Aus diesem Grunde wurde auch hier so ausführlich auf dieses interessante Kapitel eingegangen, obwohl es den mehr chemisch orientierten Lesern ferner liegen wird.

Ein Versuch von NORTON (313), durch Anlegen einer hohen Spannung an die Trägerplatte in ionisierter Luft eine Daueraufladung von K-Filmen zu erreichen, mißlang. Beim Abschalten der Spannung verliert der Film exponentiell wieder die aufgefangenen Ladungsträger. ZAHL, HASKINS, GALLAGHER und BUCHWALD (409) haben Messungen des elektrischen Widerstandes und der Kapazität der K-Filme in Abhängigkeit von der Art und Konzentration der Substrationen gemacht. Ihre Werte stimmen nicht mit denen von RACE und REYNOLDS (l. c.) überein.

Alle Untersucher sind sich darüber einig, daß die Größe der beim Filmbau auftretenden Potentiale eine komplizierte Abhängigkeit vom Filmmaterial, Substrat und der Art des Tauchens zeigt.

25. P-Filme (skeleton films).

BLODGETT und LANGMUIR (60) haben gefunden, daß man durch Eintauchen eines Stearat-K-Films in Benzol, dem eine Spur Alkohol zugesetzt ist, die Stearinsäuremoleküle zwischen den Stearatmolekülen herauslösen kann. Die Stearatmoleküle bleiben dabei an ihren alten Plätzen, falls ihr Anteil am Gesamtfilm, der vom p_H der Troglösung abhängt, nicht zu gering war (mindestens 50—60% des Films müssen aus Stearat bestehen). Während man einen K-Stearatfilm auf gewöhnlichen mikroskopischen Objektträgern wegen der zu geringen Differenz der Brechungsindices auch bei günstiger Stufenzahl kaum sieht, zeigt er als poröser Film sofort deutliche Interferenzfarbe. Das beweist, daß sich nicht seine Dicke geändert hat, sondern sein Brechungsindex, also in diesem Fall seine Dichte. Man kann nun mit solchen porösen Filmen viele

¹ Nach den Untersuchungen von J. W. SCHMIDT (347) ist die Lipoidhülle des Nerven ein zylindrischer K-Film, und zwar ein Mischfilm aus Lipoid- und Eiweißlagen.

interessante Versuche durchführen, z. B. kann man die Poren mit aliphatischen Molekülen füllen, wenn deren Kettenlänge nicht zu groß ist. Diese können wieder herausgelöst und durch andere ersetzt werden. Man kann also selektive Absorption von Kettenmolekülen bewirken und könnte z. B. so aus einer Lösung eine genau bestimmbar kleine Menge von Molekülen entfernen! Oder man kann über einen porösen Film eine monomolekulare Eiweißschicht ziehen und nun deren Durchlässigkeit für Moleküle prüfen, die ohne Zwischenschicht in die Poren gehen würden. Wenn man einen solchen porösen Film auf Drahtgaze (siehe oben) als Trennwand zwischen zwei Raumteile bringen würde, könnte er als „semipermeable“ oder besser „kettenpermeable“ Membran fungieren. Ringmoleküle würden zurückgehalten.¹ Weiter könnte ein solcher P-Film zum Nachweis allergeringster Spuren von Kettenmolekülen in Lösungsmitteln oder von geeigneten gasförmigen Substanzen dienen.

Es ist anzunehmen, daß auch diese porösen Filme ein wichtiges experimentelles Hilfsmittel bei biologischen Modellversuchen sein werden.

26. Untersuchungen mit Röntgen- und Elektronenstrahlen.

a) Röntgenstrahlen.

Es lag nahe, sich über den Feinbau von L- und von K-Filmen auch mit diesen Hilfsmitteln ein genaueres Bild zu verschaffen. Es sollen hier aber nur einige wesentliche Arbeiten erwähnt werden.

Dabei liegen die Verhältnisse so, daß zur Gewinnung guter Röntgenogramme vielschichtige K-Filme nötig sind, während man für die feinere Strukturanalyse mit Elektronenstrahlen abgehobene Einzelschichten verwenden kann.

Nachdem durch die Untersuchungen von BRILL und MEYER (76) bekannt geworden war, daß in den Fettsäurekristallen die Moleküle in Schichten liegen, die alternierend die polaren und die apolaren Seiten einander zuehren, konnte man annehmen, daß die K-Filme genau so aufgebaut sind. Das hat sich bestätigt. SCHULMAN und RIDEAL (355) fanden z. B. bei Stearatfilmen einen Identitätsabstand von 51 Å. Das entspricht der doppelten Moleküllänge. Die Schichtgrenzen, in denen sich die CH₃-Gruppen einander gegenüberstehen, geben keine merklichen Interferenzen. HOLLEY und BERNSTEIN (219) fanden für Bariumstearat-Y-Filme einen Schichtebenenabstand von 48,8 Å.²

Siehe auch die Arbeiten von CLARK und Mitarbeitern (89, 90).³ Es

¹ Über Ionendurchlässigkeit poröser Filme siehe weiter unten [BEISCHER und ÖCHSEL (49)], dort auch eine Bemerkung über ihre Struktur.

² Siehe hierzu auch: BIJVOET, KOLKMEIJER und MAC GILLAVRY, Röntgenanalyse von Kristallen (Berlin 1940), insbesondere Kapitel 8 B.

³ In (89) wird folgender hübsche Versuch mitgeteilt: Man kann Eisenchlorid in Petroläther gelöst auf Wasser spreiten, das NH₄OH enthält. Es bildet sich ein

wurden, ausgehend von der Tatsache, daß sich chlorierte aliphatische Zusätze als Schmiermittelverbesserer eignen, solche chlorierten Derivate (chlorierte Ester von Säuren und Alkoholen) als dünne Filme auf Träger gebracht und bezüglich ihrer Orientierung mit den nichtchlorierten Verbindungen verglichen. Die chlorierten Moleküle stehen dichter im Film (doppelt) und bilden daher festere Filme. Der Grad der Orientierung hängt von der Metallunterlage ab. Das wird durch Vergleiche von Kupfer, Eisen, Zink, Cadmium und Messing gezeigt.

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse. Durch weitere Untersuchungen wird es wahrscheinlich gemacht, daß langkettige chlorierte Derivate, schon in kleiner Konzentration — Kohlenwasserstoffölen beigemischt —, orientierend auf die Paraffinmoleküle einwirken.

Tabelle 3 Molekulare Orientierung auf verschiedenen Metalloberflächen [aus CLARK, STERRETT und LINCOLN (90)].

Substanz	Cu	Fe	Zn	Cd
a) Stearinsäure	4	0	3	2
b) Methylstearat	0	3	4	4
c) Dichloroctadecylstearat	2	4	3	3
d) Methylpalmitat	—	4	—	—
e) Dichloräthylstearat	0	4	3	3
f) Monochloridiphenylenoxyd	3	4	4	2
g) Trichlorphenol	1	4	4	2
h) Trichlornaphthahn	4	4	4	4
i) Dichlorstearinsäure	4	—	—	—
j) Dichlormyrcylpalmitat	0	—	4	0

Orientierungsgrad von Substanzen in aufgeschmolzenen dickeren Schichten auf verschiedenen Metallen (gegenüber dem Original geändertes Zahlenschema).

Die Zahlen bedeuten von 1—4 zunehmende Güte der Orientierung. 0 bedeutet: kein Anhalt für Orientierung. Die Zahlenskala gilt nur als relatives Maß für jede einzelne Substanz. Der Wert 4 kann also für zwei verschiedene Substanzen verschieden gute Orientierung bedeuten. Ein Vergleich der Substanzen untereinander auf Eisen ergibt folgende Skala von gut nach schlecht: g, e, d, b, c, f, a, h. Dabei sind die beiden zuerst angeführten allen anderen weit überlegen (g und e).

BERNSTEIN (52) findet, daß bezüglich der Orientierung der Schichten zwischen X- und Y-Filmen kein Unterschied ist. Das wird von FANKUCHEN (118) bestätigt. Er findet an einem X-Film aus 100 Schichten Bariumstearat einen Schichtebenenabstand von 51,5 Å. Die X-Filme

Fe(OH)₃-Film, den man auf einen Träger bringen kann. Dieser abgehobene Film hat andere Oberflächeneigenschaften als der, welcher umgekehrt durch Spreitung von NH₃-haltigem Benzol auf Fe⁺⁺⁺-Ionen-haltigem Wasser entsteht. Das beweist, daß auch anorganische Filme auf Wasser Orientierung zeigen. Nach Stock (374a) bilden sich an der Grenze Lösung/Luft, Lösung/Platin und Lösung/lebendes Gewebe monomolekulare Filme von HgCl₂.

waren nach BIKERMAN (siehe oben) durch Aufwickeln auf einen chromierten Ring hergestellt [siehe auch HOLLEY (216, 217, 218)] und zur Technik der Aufnahmen (66, 67)] (siehe dazu Abschnitt 23, Absatz 4).

b) *Elektronenstrahlen.*

HAVINGA und DE WAEL (210) untersuchten mittels Durchstrahlung verschieden langkettige Säuren, die in Einzelschichten auf dünne Träger gebracht waren. Die Ketten stehen senkrecht auf der Unterlage und bilden einen flachen hexagonalen Kristall. Die Aufnahmen lassen darauf schließen, daß die „zweidimensionalen“ Einkristalle, d. h. die störstellenfreien Bereiche im Film mindestens einige Quadratmillimeter groß sind. Die Arbeit ist technisch mit aller Sorgfalt ausgeführt und gibt ein gutes Beispiel für das Arbeiten mit Filmen [siehe auch FINCH und WILMAN (119)]. GERMER und STORKS (153) untersuchten Stearatfilme mit Durchstrahlung und Reflexion. Die Moleküle stehen senkrecht, die Ordnung ist eine hexagonale. Die Achsen haben einen Abstand von 4,8 Å voneinander [siehe auch GERMER (150)]. GERMER und STORKS (152, 154) stellen ferner folgendes fest: In Einzelschichten von Bariumstearat auf Metall stehen die Moleküle senkrecht, in Stearinsäure-K-Filmen stehen die Ketten dagegen im Winkel von 57° gegen die Unterlage (der normale Winkel in Stearinsäurekristallen). Aber in einer Einzelschicht von Stearinsäure auf Metall stehen die Moleküle senkrecht, bilden also wohl mit dem Metall der Unterlage ein Stearat. — Methodisches zu solchen Untersuchungen bei GERMER (151), SCHOON (348) mit Zahlen- und Bildmaterial, THIESSEN und SCHOON (385) Apparatur.

DE WAEL und HAVINGA (399) stellen Reflexionsdiagramme von Stearatfilmen auf Gold, Platin und Nitrocellulose her. Stearylalkoholfilme gleichen völlig den Bariumstearatfilmen. Aus dem Fehlen einer bestimmten Interferenz muß auf lebhaftere Wärmebewegung der Ketten, und zwar Rotation um ihre Längsachse, geschlossen werden. Kristalle von Stearylalkohol gehen 6° unter dem Schmelzpunkt in eine hexagonale Modifikation über. Hier beginnt offenbar die Rotation¹ der Moleküle [MÜLLER (302), (302a), BERNAL (51)]. Im Film rotieren die Ketten schon bei erheblich geringerer Temperatur. Wir haben hier einen interessanten energetischen Unterschied zwischen dem Verhalten eines Stoffes im Film gegenüber seinem Verhalten im Kristallverband vor uns.

STENHAGEN (373) hat interessante kristallographische Untersuchungen an K-Filmen ausgeführt. Es wurden abwechselnd Schichten von Substanzen verschiedener Kettenlänge übereinandergelagert und der Grad der Diffusion der einzelnen Partner ineinander untersucht.

¹ Siehe die Anmerkung 3 auf S. 368.

27. Restfilme.

LANGMUIR hatte gezeigt, daß man gute Einzelschichten z. B. von Eisenstearat auf Glas bekommt, wenn man einen K-Film aus diesem Material von Glas mit einem feinen Lappen abreibt. Es bleibt dann — auch nach intensivem, aber vorsichtigem Abreiben — eine Einzelschicht auf dem Träger (rubbed down layer).¹ Diese Technik ist recht zweckmäßig, wenn man benutzte Platten mit K-Filmen von neuem verwenden will zum Filmbau. Man umgeht so das äußerst schwierige Reinigen der Platten vor dem Aufbringen der ersten Schicht und schont die Politur der Trägerplatte. Allerdings gehört zum richtigen Abreiben viel Übung. GERMER und STORKS (155, 156) fanden nun, daß in solchen Restfilmen die Ordnung etwas geringer ist als in normal aufgebrachtene einschichtigen Filmen. Die Bilder gleichen im übrigen den normalen Bildern. Bei andersartigen Versuchen stellten BEISCHER und ÖCHSEL (49) fest, daß ihre Restfilme recht fehlerhaft waren. Das Abreiben ist eben noch kein normierter Vorgang, sondern ein handwerklicher.

28. K-Filme als Schutzschichten.

BEISCHER und ÖCHSEL (49) haben untersucht, inwieweit Aufbaufilme aus Stearin- und Arachinsäure fähig sind, als Schutzschichten auf Metalloberflächen zu wirken. Wenn man eine Kupferplatte mit einem sog. Stufenfilm [siehe (392)] bedeckt und dann Schwefelwasserstoff auf die Platte einwirken läßt, kann man an den Anlauffarben die Stärke der Schutzwirkung der verschiedenen Schichtdicken der einzelnen Stufen erkennen. Ebenso wird die Wirkung von Joddampf auf filmbedeckte Silberplatten untersucht. Während die K-Filme dem Schwefelwasserstoff einen gewissen Diffusionswiderstand bieten, wirken sie für Jod als gutes Lösungsmittel, sie saugen es schwammartig auf und verstärken so seine Wirkung auf das Silber. Versuche an porösen Filmen zeigen, daß diese für Moleküle und Ionen durchlässiger sind als normale K-Filme.

Interessant im Hinblick auf die Frage der Struktur der porösen Filme und damit der K-Filme, erscheint dem Verfasser folgender Befund der Autoren: Wenn man ein Cadmiumblech mit einer Stufenfolge von 1, 3 und 5 Schichten Cadmiumarachinat nebeneinander bedeckt, dann die Filmschichten porös macht und dann Kupfersulfatlösung einwirken läßt, zeigt sich, daß der Unterschied in der Schutzwirkung zwischen der 1-Stufe und der 3-Stufe sehr viel größer ist als zwischen der 3-Stufe und der 5-Stufe. Die Schutzwirkung der 1-Stufe ist sehr gering. Dieses Verhalten ist zu erwarten, wenn man annimmt 1. daß etwa 50% Material

¹ Die falsche und sinnentstellende Übersetzung „abgeriebener Film“ sollte vermieden werden. Das, was abgerieben ist, sitzt am Lappen, nicht mehr auf der Platte! Der Ausdruck „Restfilm“ sagt das Richtige.

aus dem Film herausgelöst wurde, 2. daß die Moleküle in jeder Schicht regelmäßige Abstände haben, und 3. daß sie — und darauf kommt es an — jeweils über den Lücken der unteren Schicht stehen. Im idealen Fall würden dann schon zwei Schichten einen großen Schutz geben und noch besseren Schutz drei Schichten, weil dann eine Schichtgrenze mit polaren Enden vorhanden wäre. Der Befund deutet also auf ein sehr regelmäßiges Kristallgitter hin. Es fragt sich, ob sich dieses erst beim Herauslösen der Säuremoleküle ordnet, oder ob die drei- und zweidimensionale Regelmäßigkeit in der Verteilung der Säure- und Seifenmoleküle schon im K-Film oder gar auf dem Wasser vorhanden ist. Röntgenaufnahmen an tiefgekühlten P-Filmen könnten vielleicht Aufschluß geben.

29. Wirkung von UV-Licht auf K-Filme.

SCHAEFER (344) hat die Wirkung von UV-Licht auf K-Filme untersucht. Die Interferenzfarben eines Stearatfilms, der 50% Säure enthielt, änderten sich unter der Bestrahlung. Bestrahlung bewirkt — so wie Eintauchen in Benzol — eine Erniedrigung des Brechungsindex. Die Schichtdicke sinkt etwas. Im Hochvakuum verläuft der ganze Vorgang viel schneller. Die Bestrahlung wirkt offenbar decarboxylierend. Wirksam ist das Gebiet zwischen 2300 und 2700 Å. Filme aus reinem Ba-Stearat zeigen unter gleichen Bedingungen nur $\frac{1}{30}$ des Dickenverlustes. Die Zeretzungsprodukte gehen im Hochvakuum in 10 Minuten vollständig aus dem Film. In Luft, Argon oder Stickstoff dagegen dauert die Schichtdickenänderung noch mehrere Stunden nach der Bestrahlung an. Wenn man bei 0° C bestrahlt, kann der photochemische Primärakt von dem Verdampfungsvorgang zeitlich getrennt werden. Selbst nach 20 Minuten ist noch kein Dickenschwund zu bemerken. Sofort nach Temperatursteigerung beginnt die Verdampfung. Die Lage der wirksamen Spektralbereiche wurde so ermittelt, daß auf den Film als lichtempfindliche Platte ein UV-Gitterspektrum entworfen wurde. Es wurden nach 6stündiger Bestrahlung 23 Linien auf dem Film festgestellt (zwischen 1949 und 3983). Diese hübsche Methode läßt sich noch für manchen anderen Zweck ausbauen. Es werden weiter UV-Absorptionsmessungen an Filmen beschrieben. Als Gegenstand der Messung fungiert eine Quarzplatte mit 700 Filmschichten, als Meßgerät ein gleicher Film, dessen Farbänderung verfolgt wird. Als Kontrolle dient die Quarzplatte ohne Film. Es wurde ein Absorptionskoeffizient von $2 \cdot 10^{-4}$ pro Schicht gefunden. Bestrahlung eines Films unter Wasser wirkt so, daß nach dem Auftauchen der gleiche Schichtdickenverlust eintritt wie nach Bestrahlung in Luft. Filme mit kürzeren Ketten (C₁₄—C₁₇) geben ihre Zerfallsprodukte schon unter Wasser in kurzer Zeit ab.

30. Verdampfung von K-Filmen.

Zur Bestimmung des Kondensationskoeffizienten und des Gehalts an freier Säure in Stearat- und Arachinatfilmen haben GREGG und WIDDOWSON (182) die Größe der Verdampfung von K-Filmen dieser Substanzen bei Erhitzung im Hochvakuum gemessen. Siehe auch ALTY und MACKAY (36).

31. S-Schichten.

LANGMUIR und SCHAEFER (265, 266) zeigten, daß man einen K-Film, dessen Interferenzfarben ja gegen sehr kleine Dickenänderungen empfindlich sind, durch Eintauchen in Aluminium- oder Thoriumsalslösungen so präparieren kann, daß seine Oberfläche hydrophil wird und nun in der Lage ist, aus einer Lösung Eiweißmoleküle (oder andere Stoffe) in monomolekularer Schicht zu adsorbieren. So adsorbierte Schichten werden S-Schichten genannt. Die Dicke der S-Schichten läßt sich mit großer Genauigkeit messen [TURNIT und BERGOLD (392)]. Die beschriebene Präparation der K-Filme bewirkt offenbar ein Umklappen der Moleküle in der obersten Schicht (siehe Abschnitt 23).

Leider haben wir bisher keine Beweise dafür, daß die an so präparierte Platten adsorbierten Moleküle die Unterlage vollständig bedecken, so daß die interferometrisch gewonnenen Schichtdickenwerte keinen sicheren Schluß auf den Teilchendurchmesser senkrecht zur Unterlage gestatten. Alle Zahlenangaben darüber gelten deshalb nur mit Vorbehalt. Da die S-Schichten für biochemische Untersuchungen aber eine große Bedeutung haben und also eine Klärung dieser Frage dringend notwendig ist, hat der Verfasser eine diesbezügliche Untersuchung begonnen.

Arbeiten über Schichtdickenmessungen an S-Schichten von Nichteiweißstoffen finden sich weiter bei LANGMUIR, SCHAEFER und SOBOTKA (272) (S-Schichten von Digitonin auf Sterinunterlagen) und bei THIESSEN und BEGER (383) (Bestimmung der Polarität der Oberflächen durch polymere Adsorption von Farbstoffen).

III. Eiweißfilme.¹

Es liegt nahe, einschichtige Filme von Eiweiß und ihre Eigenschaften als besonders wichtig für biologische Funktionen zu halten, und gerade in den letzten 10 Jahren ist zahlenmäßig der größere Teil aller Filmarbeiten über Eiweißfilme gemacht worden. Ehe wir aber im einzelnen auf diese Arbeiten eingehen, wollen wir folgendes feststellen: Die meisten der Arbeiten befassen sich mit Eiweißfilmen, die entweder durch Spreitung (H) oder durch Diffusion (D) aus der Lösung heraus an Wasseroberflächen entstanden sind. Alle diese Filme bestehen, soweit es die Ergebnisse

¹ Zusammenfassende Übersichten bei NEURATH und BULL (312), LANGMUIR (262), LANGMUIR und SCHAEFER (271).

der Untersuchungen erkennen lassen, aus irreversibel verändertem Eiweiß. Das beste Bild für die Art dieser Veränderung ist das des Aufrollens oder Entfaltens des sphärischen, nativen Moleküls. Die Filme haben in nicht-komprimiertem Zustand eine Dicke um 4–5 Å, während der Durchmesser eines kugeligen Eiweißmoleküls vom Molekulargewicht 40000 etwa 46 Å ist. Wir müssen uns diese Filme als zweidimensionales Flechtwerk aus mehr oder weniger gedehnten Polypeptidketten oder als Ringketten im Sinne des TALMUDSchen (376) Modells vorstellen.

Es ist nun möglich, daß in den Zellen an den Grenzflächen fl/fl die Spreitungskräfte nicht überall so stark sind, daß eine irreversible Deformierung des Eiweißmoleküls stattfindet. Es wird sich vielmehr oft um eine Adsorption handeln. Mit solchen an der Grenze fl/fl oder fest/fl aus Lösung adsorbierten Eiweißschichten (S) befaßt sich eine weitere Reihe von Arbeiten.

Trotzdem scheint die Untersuchung der Eiweißfilme an Wasseroberflächen — vor allem auch solcher, bei denen die Wirkung von Zusätzen, z. B. Lipoiden, studiert wird — wertvolle Aufschlüsse über das Eiweißmolekül als solches zu liefern,¹ und wir müssen für jede neue Angriffsmöglichkeit auf dem Eiweißgebiet dankbar sein.

Wir besprechen zunächst die auch zeitlich zuerst untersuchten Filme an Wasseroberflächen. Einige Hinweise auf besondere Untersuchungsmethoden seien vorausgeschickt.

32. Untersuchungstechnik.

Außer den schon beschriebenen Hilfsmitteln zur Messung der Schubflächenbeziehung und des ΔV sind für Eiweißfilme noch einige besondere Methoden entwickelt worden.

GORTER und SEEDER (179) haben eine Abwandlung des Langmuir-Adam-Schubmessers angegeben, bei der die Gegenkraft statt mit einem Torsionsdraht mit einer Schneckenfeder oder zwei solchen in Gegenschaltung erzeugt wird. Die gleichen Autoren haben wegen der angeblich abweichenden Ergebnisse [HERČIK (213)] von Messungen mit dem DU NOUVSchen Tensiometer und der Langmuirwaage mit beiden Methoden gleichzeitig am gleichen Film (Zein, Insulin, Myristinsäure, Ovalbumin) Vergleichsmessungen angestellt und genau übereinstimmende Ergebnisse erhalten (178). Die Unterschiede liegen in der Deutung der Tensiometerdaten durch die verschiedenen Untersucher.

HARKINS und ANDERSON (191) zeigen, daß es — wenn man nicht einen sehr guten Schubmesser besitzt und mit diesem äußerst sorgsam umgeht — zweckmäßig ist, das alte Prinzip der Wilhelmywaage zu benutzen. Vor allem scheint gerade bei Eiweißfilmen die Reinigung einfacher zu sein, also die Gefahr der Oberflächenverschmutzung durch alte Reste geringer.

GORTER und SEEDER (177) haben eine Methode entwickelt, die Dampfung zu messen, die ein Film an Wasserwellen erzeugt. Daraus kann auf die Änderung der Oberflächenspannung durch den Film geschlossen werden. Die hierzu entwickelte Theorie ist nach NEURATH und BULL (312) nicht ganz klar.

¹ Siehe z. B. in Abschnitt 41 die Arbeit von ROTHEN und LANDSTEINER (341 a).

Auf die von SCHAEFER (343) entwickelte Methode der Spreitungsfiguren in Indikatorölfilmen wird unten kurz eingegangen.

Gegen die Verwendung von Indikatoröl als Schuböl beim Spreiten von Eiweiß machen NEURATH und BULL (312) mit Recht geltend, daß sich bei diesen hohen Schüben sicher keine volle Spreitung ergibt.

33. Allgemeine Eigenschaften.

Man kann durch geeignete Maßnahmen (siehe unten) alle nativen Eiweißstoffe auf einer Wasseroberfläche spreiten (Ausnahmen siehe unten). Sie dehnen sich dabei mehr oder weniger schnell zu Schichten von etwa 5 Å Dicke aus. Diese Schichten haben eine hohe Kompressibilität. Man kann sie reversibel auf etwa den fünften Teil zusammendrücken, und sie werden nach vollendeter Spreitung vollkommen unlöslich.

Die beiden Bildungsmöglichkeiten für solche Filme sind folgende: An der Oberfläche einer frisch hergestellten Eiweißlösung bildet sich in kürzester Zeit spontan ein Eiweißfilm der oben beschriebenen Art, z. B. auf Insulinlösung von 0,1% in weniger als einer Sekunde [BULL (82)]. Es ist für die Art des Films zunächst gleichgültig, von welcher Seite der Phasengrenze her das Eiweißmolekül in den Bereich der Grenzflächenkräfte gebracht wird. Diese aus der Lösung gebildeten D-Filme unterscheiden sich aber einige Zeit nach ihrer Herstellung wesentlich von den „Spreitungsfilmen“ (H-Filmen) (siehe unten). Sie adsorbieren nämlich aus der Lösung eine Schicht von nativen Molekülen, die sich dabei wahrscheinlich wenig ändern, aber beim Abheben des Films auf eine Trägerplatte mitgehen und dann bei Dickenmessungen für die bei solchen Filmen gefundenen großen Dicken verantwortlich sind. Da das Maß der Adsorption nicht gut vorauszusehen ist, eignen sich solche Diffusionsfilme nicht zu allen Untersuchungen (BULL, l. c.). Da ihre Eigenschaften häufig im Zusammenhang mit der Frage nach der Art der Denaturierung an Oberflächen untersucht worden sind, werden sie in dem Abschnitt über Denaturierung besprochen (Abschnitt 36 e).

Von diesen Diffusionsfilmen unterscheiden sich die H-Filme, die durch Aufbringen eines Tropfens Eiweißlösung auf die Wasseroberfläche entstehen. H-Filme aller untersuchten Eiweißarten gleichen sich weitgehend bezüglich ihrer Dicke, Unlöslichkeit und bezüglich des Vorhandenseins einer hohen Kompressibilität. Sie spreiten alle am besten auf Wasser vom I. E. P. des betreffenden nativen Eiweißes. Dagegen zeigen sich charakteristische Unterschiede hinsichtlich Viskosität, Reaktivität, Expansionsmuster, Kontaktwinkel und p_H -Empfindlichkeit.

Ehe wir auf die Spreitung als solche eingehen, bringen wir einen Überblick über die verschiedenen Methoden der Spreitung. Sie haben sich aus der Notwendigkeit heraus gebildet, schwer spreitbares Eiweiß spreitbar zu machen, und aus dem Bestreben, bei zu leicht löslichen Proteinen einen Substanzverlust in die Lösung hinein zu vermeiden.

34. Spreitungsmethoden.

Die Spreitung von wasserlöslichem Eiweiß wird von vielen Untersuchern so vorgenommen, daß analog den Versuchen mit Fettsäure ein Tropfen einer verdünnten wäßrigen Eiweißlösung vorsichtig auf die Wasseroberfläche gebracht wird. Während nun im Fall der Fettsäure das Lösungsmittel (Benzol) nicht mischbar mit Wasser ist und schnell verdunstet, sollte man in diesem Falle befürchten, daß ein wesentlicher Teil des Tropfens in die Tiefe gerät, ohne daß die darin befindlichen Eiweißmoleküle in den Bereich der Grenzflächenkräfte kommen und so das Eiweiß in Lösung bleibt. Man bekommt auch tatsächlich mit diesem Verfahren ohne besondere Vorsicht keine reproduzierbaren Werte. Andererseits ist zu sagen, daß alle löslichen Eiweißmoleküle, die durch Diffusion an die freie Wasseroberfläche gelangen, dort denaturiert werden und Film bilden, so daß nach sehr langer Zeit auch in die Tiefe geratenes Eiweiß in den Film gehen würde.¹

Die im folgenden aufgezählten Verfahren bemühen sich alle, auf irgendeine Art diesen Fehler zu umgehen.

GORTER und GREDEL (168) injizieren mit einer Mikropipette die Lösung horizontal unter die Wasseroberfläche, die am Trogrand wegen dessen Unbenutzbarkeit ein überstehendes Polster bildet. Dadurch soll erreicht werden, daß altes Eiweiß in Oberflächennähe kommt.

Zweckmäßiger erscheint das Verfahren von BULL (81) nach einem Vorschlag von BRIGGS. Die Pipette mit der Eiweißlösung wird in senkrechter Stellung mit der Wasseroberfläche eben in Berührung gebracht und dann wieder etwas hochgezogen. Dann läßt man sehr langsam auslaufen. Die Strömungsverhältnisse in dem Wasserkonus unter der Pipettenspitze sind so, daß alles Eiweiß an die Oberfläche kommt.

Bei etwas schwerer spreitenden Proteinen, die gelartige Filme geben, wie z. B. Ovalbumin, benetzen LANGMUIR und SCHAEFER (271) die untere Kante eines Nickelbandes mit einer gemessenen Menge der Eiweißlösung. Das Band, das die Länge der Trogbreite hat, wird dann in waagrechter Lage gleichmäßig getaucht. Während das vorige Verfahren zu einer radialen Ausbreitung des Films führt und dessen Elastizität schon während des Entstehens beansprucht, wird das durch die frontale Spreitung vom Nickelband aus vermieden.

In Fällen, in denen nur sehr wenig Eiweiß zur Verfügung steht oder sein Reinheitsgrad nicht hoch ist, spreiten LANGMUIR und SCHAEFER (270)

¹ ADAM (1) schreibt hierzu, daß, obwohl sehr löslich, die Eiweißmoleküle doch offenbar stark von der Oberfläche adsorbiert würden. Das ist inkorrekt. Erst das durch die Oberflächenkräfte veränderte Molekül — das aber dadurch schon etwas Neues, Unlösliches geworden ist — wird adsorbiert. Die nativen Moleküle geraten nur durch Diffusion an die Oberfläche, ja, erfahren sogar nach LANGMUIR infolge ihrer Ladung durch die elektrostatische Bildkraft eine Abstoßung dort.

eine sehr konzentrierte Lösung auf gesättigte Salzlösung zu einem dicken Film, der Interferenzfarben zeigt. Dieser wird als B-Film (siehe unten) auf einen Träger gebracht und von diesem Träger in gewünschten Mengen als vollspreitender Film auf Wasser vom I. E. P. Diese „ausgesalzenen“ Filme sind einfach reversible Oberflächenfällungen durch Wassorentzug.

MITCHELL (295) stellt fest, daß man von dem schlecht spreitenden Gliadin nur dann gute Filme bekommt, wenn man die (alkoholische) Lösung höchstens 0,01%ig an Protein macht, andernfalls geht etwas in Lösung.

Sonst wird bei schlecht spreitenden Proteinen, wie Gliadin und Zein, das Verfahren von HUGHES und RIDEAL (226) [siehe auch HUGHES (202) und FOSSBINDER und LESSIG (123)] angewendet, die kleinste feste Partikelchen der Stoffe an der Quarzfadenspitze einer Nernstwaage auf Wasser bringen.¹ Die Gefahr, in Lösung zu gehen, ist hier wegen der Schwerlöslichkeit der in Frage kommenden Stoffe gering, aber man kann nicht beurteilen, ob nicht Mikroteilchen ungespreitet auf dem Film wie auf einem Floß vom Hauptteilchen abschwimmen und so gar nicht zur Spreitung kommen.

PHILIPPI (324) vergleicht die beiden Methoden von BULL und von HUGHES und RIDEAL kritisch.

Ein weiterer Kunstgriff beim Spreiten widerspenstiger Proteine ist gelinder Fermentabbau. Wenn man z. B. dem schlecht spreitenden Fibrinogen $\frac{1}{50}$ — $\frac{1}{5000}$ seines Gewichtes an Trypsin zusetzt [GORTER, MAASKANT und VAN LOOKEREN CAMPAGNE (170)], spreitet es leicht.

Um schwerlösliche Proteine zu spreiten oder um zu verhindern, daß Eiweiß beim Spreiten in Lösung gerät, setzt DERVICHIAN (101) der Lösung 1—2% oberflächenaktive Substanz (z. B. Amylalkohol oder Butylalkohol) zu. Das Spreiten geht dann sehr schnell. Es besteht aber die Gefahr der Bildung von Mischfilmen (Verf.).

STÄLLBERG und TEORELL (371) verwenden zur Erleichterung der Spreitung bei widerspenstigen Proteinen, vor allem aber zur Herstellung von Mischfilmen mit Lipoiden, folgenden Ansatz: 3 ccm Natriumacetat (1,7 m) plus 6 ccm Propylalkohol (normal oder iso-), dazu unter heftigem Rühren 1 ccm wäßrige Proteinlösung (0,1—1%ig). Diese Mischung nimmt auch Lipoid auf.

RIDEAL, MOSS und BATE SMITHS (339) finden, daß Laktat die Spreitung von Myosin befördert, und GORTER, v. ORMONDT und MEIJER (175) finden, daß Tartrazin und Glutathion dasselbe bei der Spreitung von Ovalbumin leisten. ADAM (1) bemerkt dazu, daß diese Substanzen vermutlich entweder eine Lockerung der Proteinbindungen oder eine Verstärkung der

¹ 1 Okularskalenteil = $3,4 \cdot 10^{-6}$ g. Ablesbar 0,2 Skalenteile. Eichung mit Myristinsäure.

Adhäsion des nativen Moleküls an der Grenzfläche bewirken. Auf diese Arbeiten kommen wir weiter unten in anderem Zusammenhang zurück.

Man kann also fast jedes Eiweiß irgendwie dazu bringen, einen unlöslichen Film auf Wasser zu bilden. Über Ausnahmen, z. B. Tabakmosaikvirus, siehe weiter unten.

35. Das Spreiten.

Es besteht das eigentümliche Mißverhältnis, daß dem Mechanismus des Spreitens bei den Nichteiweißen eine hinreichende Aufmerksamkeit geschenkt worden ist, obwohl die Dinge da vermutlich noch relativ einfach liegen und neue Aussagen über die Moleküle im Film nach der Spreitung aus solchen Überlegungen nicht zu erwarten sind. Ein Fettsäuremolekül z. B. ist zunächst in Benzol gelöst, kommt beim Spreiten an die Grenzfläche Wasser/Benzol. Das Benzol verdunstet. Das Molekül als solches ist dann in der Grenzfläche Wasser/Luft. Es wird während dieses Umgebungswechsels neuen Kräften unterworfen, die seine Form ändern und seine Lage fixieren können, aber es bleibt doch im chemischen Sinne das gleiche Molekül.

Ganz anders beim Eiweiß, wo nun aber der Spreitungsvorgang als solcher bisher kaum Gegenstand der Untersuchung gewesen ist. Und dabei darf man erwarten, gerade aus derartigen Versuchen einen wertvollen Aufschluß über die Bindungen im Molekül zu erhalten. Man darf bei der prinzipiellen Betrachtung nicht von der Spreitung eines kristallisierten festen Eiweißstoffs ausgehen, sondern muß das native solvatisierte Molekül betrachten. Wenn ein solches Molekül an eine Oberfläche Wasser/Luft gerät, so bedeutet das immer das Ende seines nativen Daseins. Bei den „ausgesalzenen“ Filmen (siehe unten) ist bisher nicht bekannt, ob die Bildung „flüssiger Kristalle“ bis zur oberflächlichsten Schicht reicht oder ob diese auch denaturiert ist. Es erfolgt ein Vorgang, den wir eine „Aufrollung“ nennen wollen, wenn wir uns das Molekül als einen mit inneren Bindungen versehenen eingefalteten Polypeptidfaden vorstellen, oder ein „Aufklappen“, wenn wir es uns z. B. als aus Ringketten bestehenden Ebenen aufgebaut vorstellen. Dieser Aufbau wird durch die Grenzflächenbedingungen, vielleicht durch die Dipolorientierung der obersten Wassermolekülschicht angegriffen und weitgehend zerstört. Es scheint, daß gerade die inneren Bindungen (Salzbindungen, Wasserstoffbindungen) gelöst werden, die aus der Polypeptidkette den räumlichen Bau des Moleküls fügen, daß dagegen nicht die Ketten gesprengt werden. Und gerade die Beschaffenheit dieser Bindungen ist es, die uns beim gegenwärtigen Stand der Eiweißchemie interessiert. Die verschiedenen anderen Arten der „Denaturierung“ sind oft untersucht worden. Aber es ist wahrscheinlich, daß gerade diese Art ein so übersichtliches

und abgestuftes Abbauen ermöglicht, daß wir einen besonderen Einblick in die Eiweißstruktur erwarten dürfen.

Zu den relativ leicht spreitenden Proteinen gehören Eialbumin, Serumalbumin, Insulin, Pepsin, Zein. Kaum oder gar nicht spreitbar sind Fibrinogen (170), Myosin (173) und Tabakmosaikvirus (362), wenn man auf Wasser vom betreffenden I. E. P. spreitet. Links und rechts vom Stabilitätsbereich spreitet jedes Eiweiß. Ebenso macht, wie schon erwähnt, ein Zusatz von Trypsin fast jedes Eiweiß spreitbar. Wenn die Fermentwirkung aber zu lange anhält, geht ein Teil der Proteins in Lösung.

Hitzenaturiertes, im nativen Zustand leicht spreitendes Protein ist schwer spreitbar (309), was darauf hindeutet, daß die Hitzenaturierung offenbar nicht wie die Grenzflächendenaturierung in einer Lösung, sondern in einer irreversiblen Festigung der „Proteinbindungen“ (inneren Bindungen) besteht.

Gelatine und Protamine spreiten wegen zu großer Löslichkeit unvollständig (163).

Die Spreitungszeit ist von den Salzen der Troglösung und vom pH abhängig und kann von einigen Minuten bis zu mehreren Stunden betragen. HUGHES und RIDEAL (226) und GORTER und PHILIPPI (176).

NEURATH (309) hat die Wirkung von UV-Strahlen und Erhitzung auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit der zu spreitenden wäßrigen Proteinlösungen auf Acetatpuffer untersucht. Beide Arten der Vorbehandlung bewirken eine Verminderung der Spreitungsgeschwindigkeit. Verschiedene Wellenlängen wirken verschieden stark.

LANGMUIR und SCHAEFER (270) berichten in einer interessanten Arbeit über Versuche mit sog. „ausgesalzene“ Filmen [siehe auch HUGHES (221)]. Sie gehen von folgender Beobachtung aus:

1. Wenn man eine präparierte Blodgettplatte (K-Film) in eine 1%ige Insulinlösung taucht, herauszieht und mit destilliertem Wasser spült und trocknet, ist eine Schichtverdickung von 45 Å auf der Platte festzustellen.

2. Wenn man mit 0,8%igem NaCl spült, danach mit destilliertem Wasser und trocknet, ist die Schichtdickenvergrößerung 70—200 Å.

3. Wenn man das Insulin vor der Adsorption nicht in destilliertem Wasser, sondern in 0,8%igem NaCl gelöst hat und dann den Versuch mit der Platte wiederholt und mit 0,8%igem NaCl und mit destilliertem Wasser spült, ist die Schichtdickenvergrößerung wieder nur 48 Å.

Als Ursache der größeren Schichtdicke beim zweiten Versuch wird die Wirkung des Konzentrationsgradienten Wasser \rightarrow Salzlösung angenommen. Die Salzlösung entreibt der Eiweißlösung das Wasser. Das Eiweiß geliert. An theoretische Erörterungen über das hiermit zusammen-

hängende LUDWIG-SORET-Phänomen¹ und eine Auseinandersetzung mit der HARTLEYSchen Theorie hierzu werden anschließend an den Befund von SEASTONE (362), daß Tabakmosaikvirus (TMV) sich auf Wasser von seinem I. E. P. nicht spreiten läßt, eine große Anzahl mannigfach variiertes Versuche mit ausgesalzene Filmen von TMV und anderen Proteinen wiedergegeben. Die von BAWDEN, PIRIE, BERNAL und FANKUCHEN (66, 67) gefundene kristalline Flüssigkeitsphase (es handelt sich um ein Koazervat) in konzentrierten TMV-Lösungen gibt das Vorbild für die Vermutung, daß sich in den auf Salzlösungen gespreiteten TMV-Filmen die Moleküle in ähnlichen Micellen mit hexagonaler Struktur anordnen. LANGMUIR und SCHAEFER (l. c.) berichten, wie man die Dicke solcher ausgesalzene Filme auf Wasser durch Farbvergleich mit von Platten abgeschwemmten Bariumstearataufbaufilmen messen kann, und meinen, daß es sich um poröse Strukturen handeln muß nach Art der P-Filme (siehe oben), da sich beim Darüberhalten eines mit Octan getränkten Papierstreifens die Interferenzfarben ändern. TALMUD (377) hat aber gezeigt, daß auch Proteinlösungen in hohem Maße Kohlenwasserstoffe aufnehmen, z. B. nimmt Edestin pro Molekül 2000 Moleküle Pentan *ins Innere* seines Moleküls auf!

Die Aussalzfirme scheinen aus zwei Schichten zu bestehen, einer diffusen unteren und einer kompakten oberen.

Die Dickenbestimmung erfolgt so, daß die ausgesalzene Filme auf eine Platte bekannter Fläche gebracht werden, von dieser spreiten sie dann zu einer echten Monoschicht auf Wasser. Diese Monoschicht wird wieder auf eine Blodgettplatte gebracht und die Dicke gemessen. (Das ist erforderlich, weil die dicken Originalfilme zu viel diffuses Streulicht geben. Mit Tabakmosaikvirus geht das aber nicht.) Man kann nun auf diese Art die ursprüngliche, auf die Salzlösung gebrachte Proteinmenge mit der im ausgesalzene Film gefundenen vergleichen und so den Verlust in die Lösung hinein berechnen. Wenn man solche quantitativen Versuche mit Fermenteiweiß anstellt und vorher und nachher den Aktivitätsgrad der Fermente bestimmt, ergibt sich, wie LANGMUIR und SCHAEFER überzeugend dartun, daß die Methode des Aussalzens von Eiweiß in Filmen zu einer vorzüglichen Mikromethode zur Reinigung von Enzymen oder anderen Eiweißstoffen ausgebaut werden könnte. Z. B. zeigten Versuche, daß Northrop-Pepsin (50000 E/g) Aussalzfirme von mindestens 90% der ursprünglichen Aktivität gab. Ein käufliches Pepsin (8000 E/g) dagegen gab einen Aussalzfilm, der (pro Gramm) 400% der Aktivität des Originalpräparats hatte! Also ist inaktives Ballastmaterial aus dem Film in Lösung gegangen.

Ehe wir auf die speziellen Eigenschaften eines voll gespreiteten Films

¹ Wandern der gelösten Partikel in einer homogenen Lösung zu kälteren Teilen derselben hin.

näher eingehen, insbesondere auf Viskosität, Homogenität und Kompressibilität, und uns ein Bild von seiner Struktur zu machen versuchen, wollen wir das F/A - und $\Delta V/A$ -Verhalten von Proteinfilmen betrachten.

36. Spezielle Eigenschaften.

a) F/A und $\Delta V/A$ -Verhalten.

Alle Untersucher sind sich einig, daß man mit jedem Eiweiß, wenn man es auf Wasser von seinem I. E. P. spreitet, spezifische Filmflächen von der Größenordnung 1 qm/mg bekommt und, bei der Annahme einer Dichte von 1,3, eine Filmdicke von 7,7 Å. Diese Flächenwerte beziehen sich aber auf ziemlich stark komprimierte Filme und sind zu Vergleichen nicht sehr geeignet. Während bei den Filmen aller anderen Substanzen der Flächenbedarf in Å²/Molekül angegeben wird, hat GORTER für Eiweiß

Tabelle 4 Spreitungszahlen von isoelektrischen Proteinfilmen, die durch Extrapolation des linearen Teiles der F/A -Kurve auf den Schub Null gewonnen wurden [aus NEURATH und BULL (312)].

Protein	Zusammensetzung des Mediums	pH	Fläche pro mg in qm
Eialbumin.....	n/300 Acetatpuffer	4,8	0,88
„	n/20 „	4,8	0,88
„	n/300 „	4,8	0,93
„	n/300 „	4,5	1,06
„	n/150 „	4,9	1,04
„ , hitzedenaturiert .	n/150 „	4,9	0,99
„ , harnstoffdenatur.	n/150 „	4,9	0,98
„ , harnstoffdenatur.	Citrat-Phosphat-Puffer	7,0	1,84
„	n/300 Acetatpuffer	4,6	1,10
Serumalbumin.....	n/20 „	4,8	1,04
„	n/10 KCl + HCl	4,36	1,08
Pepsin	n/100 KCl + HCl	2,80	0,92
„	HCl	2,90	1,00
„	HCl	2,70	1,10
Trypsin		7,0	1,00
Laktoglobulin	n/200 Acetatpuffer	5,3	0,98
Insulin.....	n/300 „	5,4	1,07
„	n/300 „	5,0	0,88
Oxyhamoglobin	Phosphatpuffer	6,8	0,60
Gliadin	„	5,9	1,1
Zein		5,3	1,1
Cytochrom C	K ₂ CO ₃	10,0	1,2
Insulin ¹	n/100 H ₂ SO ₄		1,75
„ ¹	n/100 H ₂ SO ₄		1,23
Gliadin ¹	n/100 H ₂ SO ₄		1,18
Zein ¹	n/100 H ₂ SO ₄		1,50

¹ Auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes gespreitet.

Tabelle 5. Spreitungszahlen von Proteinfilmern Durch Sauren oder Enzyme geförderte Spreitung [aus NEURATH und BULL (312)].

Protein	Spreitung gefördert durch	pH	Fläche pro mg in qm
Myosin	Trypsin	7,3	1,0
Fibrinogen	"	4,7	0,7
Casain	Salzsäure n 10		1,0
Bence-Jones	Salzsaure	1,0	0,8
Urease	"	1,0	1,0
Hamocyanin Limulus.	"	1,0	1,4
Vaccine	"	1,0	0,7
Hitzedenaturiertes Eialbumin	Pepsin		ungefähr 1,0
Nervenprotein	Alkohol	1,0	0,80

die Angabe von qm/mg als zweckmäßig eingeführt. Diese Bezeichnung hat sich eingebürgert. Ungeschickt ist allerdings, daß man auch die Art der Gewinnung dieser spezifischen Spreitungszahl durch Extrapolation

Tabelle 6 Kompressibilitäten von Proteinfilmern, die auf isoelektrischen Pufferlösungen gespreitet sind [aus NEURATH und BULL (312)].

Protein	Kompressibilitätskoeffizient in cm pro Dyn
Eialbumin	0,0160
"	0,0145
Serumalbumin	0,0242
"	0,0230
Laktoglobulin	0,0187
Gliadin	ungefähr 0,028
Cytochrom C	0,029
Palmitinsäure	0,0021

des geraden steilen Kurven- teiles auf den Schub Null von den Fettsäurefilmen übernommen hat. Der starke Knick in deren Kurven berechtigt dazu. Dieser Knick ist aber bei den Eiweißfilmen nicht vorhanden. Ihre Elastizität ist zu groß. Neuere Arbeiten (NEURATH und BULL, l. c.) schlagen vor, statt dessen den Punkt minimaler Kompressibilität als Vergleichspunkt zu wählen, der für die einzelnen Eiweißarten eine recht spezifische

Größe hat. Er liegt z. B. für Eialbumin auf Acetatpuffer (pH = 4,9) bei 14 Dyn/cm. Die Kompressibilität ist (üblicherweise) definiert als $-\frac{1}{A_0} \left(\frac{dA}{dF} \right)$, worin A_0 die spezifische Filmfläche von GORTER ist (siehe oben).

Die Kompressibilitäten variieren zwischen $16 \cdot 10^{-3}$ cm/Dyn für Ovalbumin und dem doppelten dieses Wertes für Gliadin, während die spezifischen Filmflächen viel einheitlicher sind. Die Kompressibilität sagt vermutlich etwas aus über das Verhalten der Seitenketten im Molekül. Beim Minimum geht irgendeine entscheidende Umwandlung vor sich.

Dieser Punkt liegt aber noch auf dem geraden Teil der F/A -Kurve, wird also durch die GORTERSche Spreitungszahl nicht erfaßt.

Typische F/A -Kurven von vielen Proteinen findet man in den GORTERSchen Arbeiten. Als Beispiel diene die Abb. 10 aus ADAM, die das Verhalten von Gliadin nach Versuchen von HUGHES und RIDEAL (226) zeigt. Es sind darin gleichzeitig die Änderung von ΔV und μ bei Flächenände-

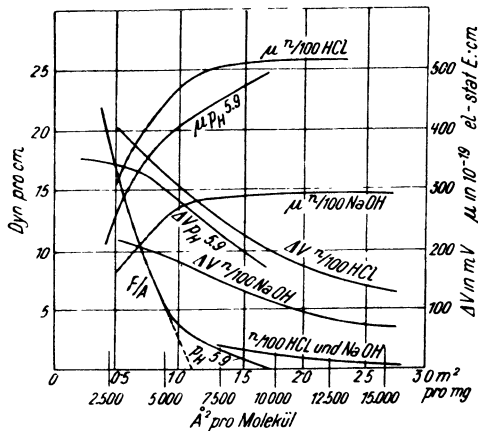


Abb. 10 Das Grenzflächenverhalten von Gliadin [aus ADAM (1) nach HUGHES und RIDEAL].

Für die F/A -Kurve gilt der linke Ordinatenmaßstab, für die übrigen Kurven der rechte, in den angegebenen Einheiten. Die gestrichelte Tangente an die F/A -Kurve stellt die Extrapolation auf den Druck Null dar. Der dadurch gefundene Abszissenwert 1,1 ist die GORTERSche Spreitungszahl. Die so gewonnenen Werte von Filmen auf verschiedenem pH, kurz nach der Spreitung gemessen, ergeben die GORTERSche Kurve (siehe Abb. 11). Beachte dagegen: In dem Teil der F/A -Kurve, der bei Flächen über 1,2 qm/mg liegt, ist die Fläche für stark saures und stark basisches Substrat größer als für isoelektrisches. Das ist kein Widerspruch gegen den Befund der GORTERSchen Kurve. n/100 HCl hat ein pH von 2. Für Gliadin hat man sich die in Abb. 11 gezeichnete, für Ovalbumin geltende GORTERSche Kurve um eine pH-Einheit nach rechts verschoben zu denken. pH 2 liegt dann schon im ansteigenden Teil des Kurvenastes. Über die ΔV - und μ -Kurven siehe den Text. Der rechte Ordinatenmaßstab umfaßt die μ -Werte von 0—60 Debye.

rungen eingetragen. Auf sauren und alkalischen Lösungen ist die Endfläche etwa 2,8 qm/mg = 15 800 Å² pro Molekül, während sie nahe beim I. E. P. 1,65 qm/mg ist.

Der Verlauf der ΔV -Kurve zeigt, daß das Oberflächenpotential auf sauren Lösungen am höchsten und auf alkalischen am kleinsten ist. Die μ -Werte sinken für Schübe höher als 2 Dyn/cm steil ab, sind aber im Gebiet größerer Flächen nahezu konstant.¹ Das bedeutet, daß Zahl und Orientierung der Dipole im Film bei Schüben unter 2 Dyn/cm bei einer Kompression des Films wenig geändert werden. Weitere Kompression des Films scheint aber eine schnell einsetzende Änderung der Dipolorientierung zu bewirken. Die Seitenketten, die bisher flach auf dem Wasser gelegen haben, orientieren sich jetzt vermutlich so, daß die polaren

¹ Die großen Absolutwerte von μ (vergleiche dagegen z. B. Abb. 7) sind durch die große Anzahl polarer Seitenketten an einer solchen „Molekülscholle“ bedingt.

Seitenketten ins Wasser tauchen und die apolaren nach oben stehen. Daß auf alkalischen Lösungen ΔV klein ist, erscheint verständlich, da die COOH-Gruppe im Gegensatz zur NH₂-Gruppe, wie aus anderen Untersuchungen bekannt ist, durch die Salzbildung ihren Beitrag am Oberflächenpotential stark vermindert.

LANGMUIR und SCHAEFER (271) veröffentlichen F/A -Kurven, aus denen hervorgeht, daß Pepsin und Ovalbumin sich sehr ähnlich verhalten, dagegen Insulin bei gleichen Drucken höhere Flächenwerte hat.

Außer vielen anderen haben auch COCKBAIN und SCHULMAN (93, 94) Messungen dieser Art angestellt und folgendes gefunden: Filme von Gliadin erreichen bei Schüben über 0,1—0,2 Dyn/cm erst einen Zustand, in dem der Schub meßbar wird. Von 1—2 Dyn/cm aufwärts befinden sich die Filme in einem flüssigen Zustand, in dem bei Kompression die flach an der Oberfläche liegenden Eiweißketten einander genähert werden. Zusatz von Gerbsäure zum Substrat ergibt Veränderungen im Verhalten die zeigen, daß man sich den Film als ein Gerüstwerk aus zweidimensionalen Micellen vorzustellen hat.

Bei weiterer Kompression der Gliadinfilme bleibt das elektrische Moment zunächst noch konstant. Es wird nur Wasser aus den Micellarräumen und den Micellen herausgepreßt. Von Drucken über 2 Dyn bis aufwärts zum Kollapspunkt werden die Seitenketten langsam in der oben beschriebenen Weise aufgerichtet. In diesem Gebiet bleibt die Kompressibilität des Films nahezu konstant. Bei weiterer Schubsteigerung, d. h. in der zweiten Hälfte dieses Bereiches, geliert der Film, vermutlich durch eine zunehmende „Adlineation“ der Polypeptidketten in den Micellen. Die Verfasser machen Dipolkräfte, VAN DER WAALSSche Kräfte und Salzbindung dafür verantwortlich. Sie kommen auf Grund stereochemischer Überlegungen dazu, für den Verlauf der Polypeptidketten im Film einen verschlungenen Verlauf anzunehmen, da nur so eine sterische Hinderung bei der Einstellung der polaren und apolaren Seitenketten bei höherem Druck vermieden wird.

MITCHELL (295) findet an Gliadin-, Zein- und Insulinfilmen, daß man F/A -Kurven mit einem deutlichen Knick im Gebiet von etwa 3 qm/mg bekommt, also bei hoch expandierten Filmen. Solche Filme bilden sich aber nur, wenn man Lösungen von 0,001—0,1% spreitet und vor der Messung bis 15 Stunden wartet. MITCHELL versucht seine Ergebnisse stereochemisch zu deuten, indem er auf die Bausteinanalyse und bekannte Röntgendaten Bezug nimmt. Er betrachtet die Filme bei höheren Drucken als zweidimensionale Gele, in denen außer den VAN DER WAALSSchen Kräften noch Wasserstoffbrücken zwischen den Polypeptidketten wirken. Die Ketten sollen bei höheren Drucken eine Faltung erfahren. Die von MITCHELL gefundene untypische F/A -Kurve wird von JENKINS und TAYLOR (232) für ein Produkt der Oberflächenverunreinigung ge-

halten. Diese sei bei einem Spreit-Meßintervall von vielen Stunden kaum zu vermeiden. Sie wiederholen die Versuche von MITCHELL unter möglichst den gleichen Bedingungen und können keine Unstetigkeit in der F/A -Kurve finden. Ihre Filme sind nach 5 Minuten im Gleichgewicht. Ihre Flächenwerte betragen bei Wartezeiten bis 70 Minuten im Mittel 0,82 qm/mg. Die Flächenzahl bei einem Versuch mit über 1000 Minuten Wartezeit betrug 0,8 qm/mg, wenn der parallel bestimmte Blindwert abgezogen wurde. Beide Arbeiten machen einen sorgfältigen Eindruck. Die Ursache der Abweichungen kann in der Ungleichheit der Ausgangsmaterialien begründet sein, was bei Proteinen naheliegt. Die weiter unten zitierten Arbeiten von DERVICHIAN und JOLY (Abschnitt Viskosität) sprechen für die Realität des Befundes von MITCHELL.

FOURT und SCHMITT (126) untersuchen bestimmte Eiweißextrakte von Hummernerven und als Vergleich Ovalbumin und gehen bei der Gewinnung der F/A -Kurven so vor, daß sie nach jeder Flächenverkleinerung den jeweils momentan ablesbaren Druck notieren und bei konstanter Fläche solange den Schub verfolgen, bis er erst schnell, dann langsam absinkend — konstant geworden ist. Aus den so gewonnenen F/A -Kurven von Ovalbumin ziehen sie interessante Folgerungen bezüglich des physikalischen Zustandes des Films bei den jeweiligen Drucken. Auch zeigen sie, daß bis zu Schüben von 25 Dyn/cm herauf die Kompression reversibel ist. Das sog. Plateau — der Kurvenverlauf bis etwa 0,3 qm/mg — ist bei dem Nervenprotein nicht vorhanden. Es besteht aber eine noch nicht ganz klare Abhängigkeit vom Substratpuffer.

Der Verlauf der F/A -Kurve ähnelt dem von HUGHES und RIDGAL (226) und von TER HORST (382) gefundenen.

In Richtung zunehmender Kompression ist in der Gegend des Plateaus das zunächst ansteigende η schon konstant geworden und wird durch die jeweilige Einstellung des Schubgleichgewichtes im oberen Kurventeil nicht beeinflußt. Es kann sich bei dieser Einstellung also nicht um Neigen der Seitenketten handeln, sondern um ein „Sicharrangieren“, ein „Zurechtrücken“ der Eiweißketten in den Zustand kleinster freier Energie, wobei sich die einzelnen dabei sicher auftretenden Kippungen der Seitenketten aufheben.

b) Abhängigkeit der Spreitungsfläche vom p_H .

METCALF (292)¹ berechnete 1905 für „Peptonhäutchen an Wasseroberflächen“ 30 Å Dicke und maß auch die Viskosität des Films. DEVAUX hat 1903/1904 als erster Eiweiß auf Wasser gespreitet und Film-dicken von 30—80 Å berechnet. GORTER und seine Mitarbeiter haben von 1925 ab [die erste größere Arbeit: GORTER und GREDEL (169)] systematische Untersuchungen an Eiweißfilmen vorgenommen. Diese

¹ Promotionsarbeit bei WI OSTWALD

ungefähr 20 Arbeiten werden in der zweiten Auflage von ADAMS Buch (S. 91) zitiert und besprochen.

Da der Gegenstand der Untersuchungen Eiweiß war, achtete man von vornherein auf die Abhängigkeit der Spreitung von der Wasserstoffionenkonzentration und dem Salzgehalt der Trogfüllung. Es zeigte sich dabei 1. eine p_H -Abhängigkeit der Spreitungsgeschwindigkeit, 2. daß die verschiedenen Kat- und Anionen in einer der HOFFMEISTERSchen Reihe entsprechenden Folge die Spreitungsgeschwindigkeit und die Flächenausdehnung beeinflussen, und 3. daß die Spreitung auf Substrat vom I. E. P. des betreffenden Eiweißes am schnellsten vor sich geht und daß in diesem Punkt ein Flächenmaximum erreicht wird.

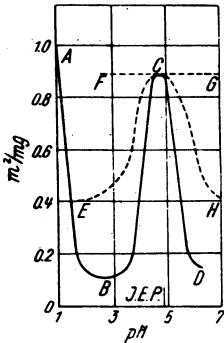


Abb. 11. Die sog. GORTER-Kurve für Ovalbumin [aus LANGMUIR (261a)].

Der Verlauf ABCD ergibt sich auf Substrat mit minimalem Ionengehalt. Der Verlauf ECH und FCG ergibt sich bei steigendem Ionengehalt oder mit steigender Wertigkeit. Diese Aussagen gelten für Messungen bald nach der Spreitung. Wenn man rechts und links vom I. E. P. zunehmend wartet, bekommt man auch auf ionenarmer Lösung schließlich den Verlauf FCG (siehe Text).

Es entstand eine lebhafte Auseinandersetzung über die Ursache dieses Kurvenverlaufes. Entweder bedeuten die Minima rechts und links vom I. E. P., daß der Film bei diesem p_H entsprechend dicker ist oder daß beim Spreiten etwas in Lösung gegangen ist. LANGMUIR und SCHAEFER (271) haben Pepsinfilme auf Wasser von verschiedenem p_H gespreitet, wobei es die typische p_H -Flächenkurve gibt. Die Filme werden dann auf Trägerplatten übertragen und ihre Dicke interferometrisch gemessen. Für alle Filme ergab sich eine Dicke von 15—16 Å (siehe Tabelle 7). Der Versuch zeigt, daß bei p_H 2,6 (I. E. P.) 94% des aufgetragenen Eiweißes im Film gefunden werden, für diesen Fall also tatsächlich eine Schicht-

dicke von etwa 15 Å zu erwarten ist. Da die Fläche bei p_H 7 etwa 640mal kleiner als bei p_H 2,6 ist, müßte die Dicke entsprechend 640mal größer sein. Sie ist aber genau so groß wie bei p_H 2,6. Diesen Unterschied (auch für p_H 5,8, wo der Faktor 6,4 beträgt) durch eine Dehnung beim Aufbringen auf die Platte zu erklären, erscheint völlig unzulässig. Die Größe des Wertes 16 Å für die Dicke zeigt, daß es sich entsprechend den gewählten Spreitungsbedingungen nicht um einen vollexpandierten Film gehandelt hat. Die Spreitungsverluste könnten entweder in einem Verlust in die Lösung hinein bestehen oder man kann annehmen, daß ein Teil der Moleküle in nichtentfaltetem Zustand auf dem Film schwimmt oder in ihn eingebunden ist. Gegen die erste Deutung sprechen Versuche von

BERGOLD und BRILL (50), die bei der Spreitung von Insektenviren eine der GORTERSCHEN Kurve ähnliche Kurve fanden, bei der übrigens die maximale Spreitungsfläche nicht genau beim I. E. P. lag. Um die Deutung dieser Kurve zu fördern, haben sie durch die Glaswand des

Tabelle 7 [aus LANGMUIR und SCHAEFER (271)].

p_H	Dicke des Films bei 16.5 Dyn/cm interferometrisch gemessen Angstrom	GORTERSCHE Spreitungszahl $\mu\text{m}/\text{mg}$	Gespreitete Menge μg	Aus Fläche und Dicke berechnete Menge μg	Verhältnis von berechneter Menge zu gespreiteter Menge = wirklich gespreiteter Anteil in %
2,0	16	0,620	0,0416	0,0382	92
2,6	15	0,640	0,040	0,0376	94
3,0	16	0,630	0,0118	0,0110	93
4,2	15	0,570	0,040	0,033	82
5,8	16	0,095	0,034	0,007	20
7,0	15	0,001	0,200	0,003	1

Troges ein Lichtbündel unmittelbar unter der Oberfläche entlanggestrahlt und das Tyndall-Licht beobachtet. Dabei zeigte sich bei der üblichen Spreitung in einem p_H -Bereich von p_H 1—13 keine Spur von Tyndall-Licht in einem Bereich von p_H 1—7. Kontrollen ergaben, daß man schon mit sehr geringen Eiweißkonzentrationen in der Lösung unter diesen Bedingungen ein Aufleuchten bekommt. Sie schließen aus diesen Versuchen auf eine tatsächliche p_H -Abhängigkeit der Schichtdicken. Es fragt sich alsdann, wie diese Ergebnisse mit der optischen Schichtdickenmessung von LANGMUIR und SCHAEFER in Einklang zu bringen ist.

DERVICHIAN (101) hat folgenden Versuch gemacht: Eine Eialbuminlösung wurde mit der Technik von GORTER und GREDEL (168) auf m/1000 Acetatpuffer (I. E. P. = p_H 4,9) gespreitet. Dann wurde nach Einstellung des Gleichgewichtes unter konstantem Druck von 1,5 Dyn/cm das p_H des Substrats nacheinander auf die Werte 3,2, 5,1, 2,6, 4,9 und 11 gebracht. Die dazugehörigen Flächen ergaben sich, wenn die Anfangsfläche mit 100 bezeichnet wird, zu 106, 100, 108, 100, 109.

In einem anderen Versuch wurde Eialbumin auf p_H 7,8 gespreitet und das p_H nachträglich auf 4,9 gebracht. Die entsprechenden Flächen waren 97 und 100. Wir sehen also, daß der p_H -Einfluß auf die Flächengröße in Wirklichkeit nur etwa 10% beträgt, statt mehrere 100% wie bei der GORTERSCHEN Kurve, daß die Fläche nämlich rechts und links vom I. E. P. etwas ansteigt, was aus der abstoßenden Wirkung der rechts und links vom I. E. P. vermehrten ionisierten Seitenketten verständlich ist.

BERGOLD und BRILL (50) haben mit Insektenvirus einen ähnlichen

Versuch gemacht mit gleichem Ergebnis. Ebenso 1939 BATEMAN und CHAMBERS (46).¹

BATEMAN und CHAMBERS (47) haben nun außerdem Elastizitätskurven aufgenommen, aus denen hervorgeht, daß die Filmelastizität in dem Gebiet des I. E. P. ein langsames kontinuierliches Steigen zeigt, in dem die p_H -Flächenkurve durch ein ausgesprochenes Maximum geht. Sie betonen, daß man sich nicht vorstellen kann, daß ein Film von 10fach größerer Dicke nur eine um einige Prozent größere Elastizität haben soll.

Die Deutung, die den Ergebnissen von allen mitgeteilten Untersuchungen gerecht wird, wäre dann offenbar die auch von BATEMAN und CHAMBERS gegebene, daß beim Spreiten größere Partikelchen des nativen Eiweißes irgendwie im Film hängen bleiben (siehe oben). Diese würden weder bei der optischen Dickenmessung noch bei der Elastizitätsmessung sich bemerkbar machen. Eine ultramikroskopische Untersuchung dieser Filme würde vielleicht Inhomogenitäten zeigen, wie sie HUGHES und RIDEAL (226) für Eialbuminfilme unter hohem Druck gezeigt haben. Ebenso könnte man versuchen, einen solchen Film auf eine Glasplatte zu bringen und hier unter experimentell einfacheren Bedingungen das Streulicht zu untersuchen. Offenbar kommt nun also die GORTERSche Kurve so zustande, daß die Filmflächen immer zu früh gemessen werden, denn wie in dem Abschnitt über Spreitungsgeschwindigkeit gezeigt wird, hat diese die gleiche Abhängigkeit vom p_H wie die Filmfläche (beim I. E. P. am größten, links und rechts davon kleiner, im stark Sauren wieder groß). Die Deutung wäre die, daß die ungespreiteten Partikelchen im Laufe der Zeit je nach dem p_H langsamer oder schneller auch noch spreiten.

Obwohl so alle diesbezüglichen Versuche in einen plausiblen Zusammenhang gebracht sind, so sträubt sich doch das Gefühl dagegen, daß in Abhängigkeit vom p_H eine mehr oder weniger große Zahl von größeren ungespreiteten Partikelchen im Film verbleiben soll. Wodurch unterscheiden sich diese Molekülgruppen von den anderen, die sofort spreiten? Die Anwendung einer statistischen Betrachtung hat keinen rechten Ansatzpunkt. Es bleibt dabei offenbar noch etwas Prinzipielles zu klären. Notwendig wäre, daß mit zwei oder drei typenverschiedenen, reinen Proteinen im gleichen Laboratorium alle diese Messungen unter besten Bedingungen wiederholt würden.

Die Wirkung der Ionen im Substrat ist so geartet [GORTER (164)], daß beim Spreiten auf verschiedenem p_H die tiefen Minima rechts und links des I. E. P. in der GORTERSchen Kurve durch geeigneten Elektrolytzusatz vermindert oder ganz aufgehoben werden können (siehe Abb. 11). Auf der sauren Seite des I. E. P. ist der Effekt von der Konzentration und der Wertigkeit des Anions abhängig, auf der alkalischen Seite von

¹ BERGOLD und BRILL (l. c.) geben irrtümlicherweise als Zitat: (47) an.

der des Kations. Die für einen bestimmten Effekt erforderlichen molaren Konzentrationen für ein-, zwei- und dreiwertige Anionen wurden z. B. gefunden zu 0,04, 0,002 und 0,00003. Man muß sich also vorstellen, daß die Möglichkeit der sofortigen Salzbildung beim Auftreffen des Tropfens zu spreitender Lösung auf der Substratfläche das Verbleiben des Moleküls an der Oberfläche erleichtert und so den Verlust durch Inlösunggehen vermindert (siehe auch NEURATH (309)) oder im Sinne der anderen Deutung der GORTER-Kurve ein vollständiges Spreiten befördert.

In einer neueren Arbeit befaßten sich GORTER, v. ORMOND und MEIJER (175) mit dem Ioneneinfluß auf Eiweißfilme, und sagen, daß alle Mittel, die eine Dissoziation der COOH- und NH₃-Gruppen verhindern, die Spreitung erleichtern. Zusatz von Tartrazin zum Ovalbumin läßt das Flächenminimum auf der sauren Seite des I. E. P. verschwinden, desgleichen Spreitung von Ovalbumin auf Glutathionlösungen. Zusatz von Spermidin zu Pepsin oder von Clupein zu Insulin läßt das Flächenminimum auf der alkalischen Seite des I. E. P. verschwinden. GORTER (167) weist in diesem Zusammenhang auch auf die Bedeutung des verschiedenen K⁺- und Na⁺-Ionengehaltes in den Zellen und den Körperflüssigkeiten hin. Seine Zusammenstellung geben wir in Tabelle 8 wieder.

Tabelle 8 [aus GORTER (167)]

	Ionen im Gewebe in mill.-Äqu. pro Liter Muskelwasser	Ionen in mill.- Äqu. pro Liter Serumwasser	Beim Spreiten von Eiweiß gleich stark fördernde Ionenkonzentra- tion in mill.-Äqu. pro Liter
Na	48,0	154,0	160,0
K	112,5	5,3	80,0
Ca	5,2	5,1	4,0
Mg	23,9	2,8	4,0
Glutathion	1	0	1

Die Tabelle zeigt, daß die Ionen, die eine besonders stark fördernde Wirkung beim Spreiten (Denaturieren) haben, im Blut in kleinerer Konzentration enthalten sind, als in den Zellen (vor allem K, Mg und Glutathion). Das entspricht der Trennung von löslichem Funktionseiweiß und fixiertem Struktureiweiß.

Übrigens hat BULL (81) die Druckoberflächenversuche bis zu Drucken von 40 Dyn/cm ausgedehnt und findet, daß die Kurven von 25 Dyn/cm ab einen neuen Anstieg zeigen. Bis etwa 31 Dyn/cm ändern sich dabei die hydrophilen Eigenschaften der Filmoberfläche nach Ausweis von Randwinkelemessungen an auf Platten übertragenen Filmen kaum. Über 31 Dyn/cm werden die Filme plötzlich hydrophob.

HARKINS und ANDERSON (192) zeigen, daß durch 10^{-5} mol Aluminiumchlorid im Substrat — wodurch die F/A -Kurven von Stearatfilmen völlig verändert werden (die COO-Enden werden zusammengenietet) — die Filme von Cytochrom in ihrem F/A -Verhalten nicht merkbar verändert werden. Die Karboxylgruppen werden durch die Verankerung der Seitenketten an der Polypeptidkette stabil voneinander entfernt gehalten.

c) Spreitungsdauer.

Versuche von GORTER und PHILIPPI (176) und von PHILIPPI (323) zeigen, daß die Spreitungsgeschwindigkeit genau so vom p_H abhängt wie die Filmoberfläche. Rechts und links vom I. E. P. dauert die Spreitung viel länger. Z. B. spreitet Ovalbumin am I. E. P. (p_H 4,9) komplett in etwa 2 Minuten, bei p_H 3,8 in 2 Stunden, bei p_H 1,07 in 10 Minuten. Bei p_H 5,72 dauert es 9 Stunden. NEURATH und BULL (312) führen auf diese großen Differenzen wohl mit Recht den Verlauf der GORTERSchen Kurve zurück (siehe oben). Die Flächenmessung ist meist zu früh vorgenommen worden. Die Spreitungsgeschwindigkeit wird nach PHILIPPI (324) vom p_H in der Weise beeinflusst, daß damit auch die Wirkung der Ionen auf den Verlauf der GORTERSchen Kurve erklärt wird. Z. B. verkürzt bei p_H 3,9 Zugabe von $n/80$ Kaliumchlorid zur Trogfällung die Spreitungszeit von 2 Stunden auf 5 Minuten, bei p_H 5,7 von 9 auf 2 Stunden. Also: Die Entladung der ionisierten Seitenketten beschleunigt die Spreitung! PHILIPPI meint (das bezieht sich auf die GORTERsche Spreitungstechnik), daß die jeweilige Überschußladung das Hingelangen der Moleküle an die Oberfläche durch Abstoßung verhindert.

d) Dicke der Filme. — Molekulargewichtsbestimmungen.

Einer Filmfläche von 1 qm pro Milligramm Eiweiß entspricht bei der angenommenen Dichte von 1,33, wie eine einfache Rechnung zeigt, eine Filmdicke von 7,5 Å. KEENAN (241) hat für Gelatinefilme auf Hg den Wert 7,5 Å bekommen.

HUGHES und RIDEAL (226) haben an Gliadinfilmen, die nach Ausweis von ΔV -Messungen und ultramikroskopischen Beobachtungen homogen waren, Dicken bis zu 3 Å herunter, berechnet aus dem Flächenwert, erhalten. HARKINS und ANDERSON (192) fanden für Cytochrom C bei 0,5 Dyn/cm und p_H 10 (I. E. P.) eine Dicke von 3,5 Å, aus der Fläche berechnet. Der höhere Wert von 50 Å bei 10 Dyn/cm und p_H 5 ist aus den oben angeführten Gründen sicher nicht real.

Da das Gewinnen eines homogenen, vollexpandierten Films, der nur unter kleinem Druck stehen darf, sehr schwierig ist, haben die früheren Untersucher immer die sonst übliche Extrapolation des steilen geraden Teiles der F/A -Kurve auf $F = 0$ gewählt und sind so zu den größeren Filmdicken gekommen. Auch die optische Dickenmessung der Filme

nach Übertragung auf Platten führt zu höheren Dickenwerten, als einem vollexpandierten Film entspräche, weil bei dem üblichen Tauchverfahren nach BLODGETT die Filme unter einem gewissen Druck stehen müssen, um gut aufzuziehen. Aufbringen eines vollexpandierten Films durch langsames Auftauchen einer waagrecht liegenden Trägerplatte müßte auch bei der optischen Messung zu einem Schichtdickenwert von 3–4 Å führen.

Zur Dickenmessung siehe auch den schönen Fadenversuch von DEVAUX, der im Abschnitt Denaturierung beschrieben wird. Derselbe Autor hat ferner (112) durch einen hübschen, ebenfalls mehr qualitativen Versuch an der Grenze fl/fl die Dicke eines Ovalbuminfilms bestimmt: Wenn man ein Reagensglas zu einem Drittel mit hochverdünnter Proteinlösung füllt und darüber Benzol schichtet ($\frac{1}{4}$ der Glashöhe) und den Inhalt dann schüttelt, wird das Eiweiß an der großen entstehenden Grenzfläche denaturiert und bildet einen Film. Oberhalb einer gewissen Grenzkonzentration vereinigen sich die Benzoltropfen nicht wieder zu einer einheitlichen Phase.¹ Unterhalb dieser Konzentration, die dadurch gegeben ist, daß gerade nur soviel Eiweiß vorhanden ist, wie an der Grenzfläche Glas/Wasser und der normalen Grenze Wasser/Benzol adsorbiert werden kann, bildet sich wieder eine einheitliche Benzolphase nach dem Schütteln. Die Grenzfläche ist vollkommen klar durchsichtig. Wenn man das Reagensglas unmittelbar nach dem Schütteln waagrecht hält, so ist die Grenzfläche Wasser/Benzol maximal groß. Bei richtiger Wahl der Ausgangskonzentration ist die Grenzfläche in dieser Lage gerade mit einem expandierten Film bedeckt. Dieser wird nun beim langsamen Aufrichten des Rohres mit zunehmender Grenzflächenverkleinerung komprimiert. Die Grenzflächenspannung zwischen Wasser und Benzol nimmt dabei immer mehr ab und es kommt ein scharf beobachtbarer Kippwinkel, bei dem die vorher klar durchsichtige Grenzfläche plötzlich kahmig, d. h. trüb und undurchsichtig, wird. Das wird durch zahllose Mikrofältchen in dem überkomprimierten Film bedingt. LANGMUIR nimmt an, daß das in dem Moment geschieht, in dem die Grenzflächenspannung den Wert Null erreicht hat. In seiner Arbeit gemeinsam mit WAUGH über Eiweiß-Lipoidmembranen (274) bespricht er die theoretische Begründung für diese Ansicht.

DEVAUX kommt durch die Bestimmung der kritischen Konzentration und Ausmessen der Oberfläche bei diesem Versuch auf eine Filmdicke von 9 Å an der Grenze Wasser/Benzol (für p_H 5) und von 22 Å an der Grenze destilliertes Wasser/Luft. Die Elastizität an der ersten Grenze

¹ Weil genügend Eiweiß da ist, um die gesamte Grenzfläche zu beschicken und die Grenzflächenspannung zwischen Tropfen und Lösung dem Wert Null zu nähern. Nur im Fall $\sigma = 0$ ist die Emulsion stabil

bestimmt er zu 5—6%, an der letzteren zu 500—600%. Für die Bildungszeit des Films gegen Luft gibt er mehrere Stunden an, für die an der Grenze Wasser/Benzol mehrere Minuten.

In einem früheren Abschnitt wurde gezeigt, daß die gasförmigen Filme von aliphatischen langkettigen Verbindungen, wenn sie ideales Verhalten zeigen würden, bei einem Druck von 1 Dyn/cm eine Fläche von 400 Å²/Molekül gebrauchen würden. (Aus den Abweichungen der gefundenen Kurve von diesem theoretischen Verhalten kann auf die im Film wirkenden Kräfte geschlossen werden.) In Anlehnung an diese Überlegungen hat GUASTALLA (186) versucht, aus Flächenmessungen an Eiweißfilmen bei kleinsten Schüben das *Molekulargewicht* zu bestimmen. In der allgemeinen Gasgleichung für Filme

$$F \cdot A = k \cdot T$$

wird $k = 1,372$, wenn F in Dyn/cm und A in Å² angegeben ist. Für 19° C ist kT dann 400. A bezieht sich auf die molare Fläche. In diesem Falle der Proteinfilme ist aber der annähernd gasförmige Zustand erst bei sehr kleinen Schüben (Millidyn/cm) erreicht, und die Filmkonzentrationen liegen in der Größenordnung von 0,1 mg/qm, die Filmflächen in der Größenordnung 10 qm/mg. Bei einem Schub von 0,001 Dyn/cm ist dann der mittlere Spielraum, der einem Molekül zugeordnet ist, $\lambda = \frac{400}{0,001} = 4 \cdot 10^5$ Å². Ein Mol nimmt dann eine Fläche von $6 \cdot 10^{23} \cdot 4 \cdot 10^5 = 24 \cdot 10^{28}$ Å² ein (2400 Quadratkilometer). Aus den GUASTALLA'schen Meßwerten entnimmt man für Ovalbumin für einen Schub von 0,001 Dyn/cm einen Flächenbedarf von etwa 60 qm/mg (reziprokes Abszissenmaß von GUASTALLA). Das sind $6 \cdot 10^{21}$ Å²/mg. Ein Molekül wiegt dann $\frac{24 \cdot 10^{28}}{6 \cdot 10^{21}}$ mg = $4 \cdot 10^4$ g. GUASTALLA findet so durch Extrapolation auf den Druck Null für Ovalbumin ein Molekulargewicht von 40000, für Gliadin ein solches von 27000 in guter Übereinstimmung mit den SVEDBERG'schen Werten. Der viel zu kleine Wert 12000 für Hämoglobin scheint durch Zerfall des Moleküls zustande zu kommen. Der bekannte Zerfall in Viertel zu je 16700 scheint also auch beim Spreiten (abgesehen von der Entfaltung des Moleküls) stattzufinden. GUASTALLA schließt seine Arbeit nach Mitteilung der Molekulargewichte ab.

Wenn die Messungen zeigen, daß die Gasgleichung an solchen höchstexpandierten Eiweißfilmen mit Erfolg zu Molekulargewichtsbestimmungen angewendet werden kann, dann muß auch eine wichtige Voraussetzung der Gasgleichung in erster Näherung für die schollenförmigen, denaturierten Eiweißteilchen zutreffen, nämlich die der idealen Elastizität. Der Gesamtimpuls bleibt beim Stoß erhalten, es geht keine kinetische Energie z. B. durch bleibende Verformung verloren. Die Schollen, die bei Ovalbumin

und 4 Å Dicke eine Flächenausdehnung von etwa $13\,000\text{Å}^2$ haben,¹ verhalten sich also annähernd starr elastisch. Und das wahrscheinlich in höherem Maße als die Teilchen in nativem Zustand. Denn im dreidimensionalen Fall (Bestimmung des Molekulargewichtes aus dem osmotischen Druck) sind größere Korrekturglieder erforderlich als im Falle des Films, wie aus einer Abschätzung der GUASTALLASchen Kurve hervorgeht.²

e) Denaturierung.

Die Bildung der sog. Diffusionsfilme erfolgt so, daß die Moleküle in eine neu auf Eiweißlösung entstehende Oberfläche hinein diffundieren und sich dort entfalten und unlöslich werden. Man muß also damit rechnen, daß Eiweißlösungen nach jedem Umgießen oder Vermischen einen neuen zusätzlichen Anteil oberflächendenaturiertes und damit unlösliches Eiweiß enthalten. Außerdem wird sich an der Grenze Lösung/Gefäßwand immer ein Film bilden, dessen Moleküle je nach den dort herrschenden Bedingungen mehr oder weniger denaturiert sind. Diese Überlegung müßte — was zur Zeit noch nicht der Fall ist — eine Rolle bei allen quantitativen Untersuchungen mit hochverdünnten Eiweißlösungen spielen. Auch hat man bei kataphoretischen Untersuchungen offenbar lange nicht beachtet, daß an der Oberfläche der Eiweißlösung vor dem Übersichten mit Puffer ein Diffusionsfilm existiert.

Eine Reihe von Forschern hat untersucht, welcher Unterschied zwischen hitzedenaturiertem und oberflächendenaturiertem Eiweiß besteht. LEE und WU (276) spreiten harnstoffdenaturiertes Eialbumin auf p_H 7 glatt. BULL (87) bekommt bei hitze- und harnstoffdenaturiertem Eiweiß auf p_H 4,9 gleiche F/A -Kurve wie von nativen Eiweißen. STÄLLBERG (369) kommt zu etwas abweichenden Ergebnissen. RIDEAL (335) und GORTER (165) denaturieren durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, ebenso NEURATH (309). Er zeigt, daß Bestrahlung von Serumalbumin und Eialbumin mit einer Hg-Lampe eine Flächenverkleinerung des Films macht. Die Kurven gehen im F/A -Diagramm nach links. Die Wirkung der Bestrahlung ist nach der Spreitung viel stärker als vor der Spreitung. Der Effekt ist bei Serumalbumin größer als bei Eialbumin. Das steht im Einklang mit kolloidchemischen Untersuchungen von PAULI und FENT (320). Sie zeigen, daß das Serumalbuminmolekül eine relativ geringere innere Festigkeit hat als das Ovalbuminmolekül. Die Bestrahlung scheint Hauptvalenzen zu sprengen und den Film in lösliche Bruchstücke zu spalten. Weiteres Arbeiten in dieser Richtung erscheint sehr erfolgversprechend.

¹ Der molekulare Flächenbedarf ist für alle voll gespreiteten Proteine bei 4 Å Filmdicke etwa gleich $\frac{1}{3}$ des Molekulargewichtswertes in Å².

² Die Wahl eines linearen Maßstabes zur Darstellung der Abszissenwerte ist bei seiner Originalkurve übrigens nicht sehr zweckmäßig!

BULL (83) bestimmt die Dichte von hitzedenaturiertem, nativem und oberflächendenaturiertem Ovalbumin zu $1,345 \pm 0,005$. Diese Übereinstimmung sagt aber nichts über eine etwa gleiche Art des Entstehens der Denaturierung aus.

DEVAUX (111) komprimiert einen Ovalbuminfilmm stark über den Kollapspunkt hinaus, bis er auf Wasser sichtbar wird, und zieht ihn dann mit einem Platindraht in Form eines feinen Fadens von der Wasseroberfläche. Die Dicke dieses Fadens mißt er zu 26μ und berechnet daraus die ursprüngliche Dicke des expandierten Films zu 10 \AA . Dieser hübsche Versuch zeigt, wie man mit relativ groben Mitteln (die Gleichmäßigkeit der Fadendicke erscheint nicht gewährleistet) doch zu einer guten Abschätzung der Filmdicke kommen kann.

BULL (83) bestimmt den Temperaturkoeffizienten der Oberflächendenaturierung zu $Q_{10} = 0,95$. WU und LING (404) finden für Ovalbumin $Q_{10} = 1,09$.

Eine Auseinandersetzung auf experimenteller Basis über die Art der Oberflächendenaturierung von Protein beim Schütteln fand zwischen BULL und NEURATH (84), WU und LING (405) und WU und WANG (406) statt. Schütteln der Proteinlösung in Flaschen (Eialbumin, Oxyhämoglobin und Methämoglobin) zeigt, daß der Betrag der Denaturierung nicht von der Zeit und Konzentration abhängig ist, dagegen von der Art des Schüttelns und der Flaschenform. Die Reaktion ist also nullter Ordnung und muß an gesättigter Oberfläche stattfinden. Die Autoren stimmen darin überein, daß die Geschwindigkeit der Oberflächendenaturierung beim I. E. P. am größten ist und daß ein Einfluß der Salzkonzentration nicht nachzuweisen ist. Oberflächenaktive Stoffe, wie Alkohol und Saponin, verringern die Denaturierungsgeschwindigkeit. Unterschiede in der Auffassung bestehen hinsichtlich des Ablaufes der Denaturierung. BULL und NEURATH (l. c.) zeigen, daß das Protein erst an der Oberfläche denaturiert und dann in der Lösung koaguliert, denn rechts und links vom I. E. P. geht denaturiertes Filmeiweiß in Lösung und präzipitiert, wenn man diese Lösung auf den I. E. P. bringt. Die chinesischen Autoren konnten dies nicht bestätigen und weisen darauf hin, daß BULL und NEURATH offenbar kein reines Eiweiß verwendet hätten. Diese wiederholten unter sorgfältigen Bedingungen ihren Versuch und kamen zu den gleichen Ergebnissen wie vorher (85).

JOHLIN (234, 235) fand, daß Lösungen von Insulin, die mit Chloroform geschüttelt werden, ihre Wirksamkeit verlieren. Eine bestimmte Fraktion dieser Lösungen zeigte eine geschwächte, aber stark verlängerte Wirkung. Er zeigte ferner, daß Lösungen von Ricin, Tetanustoxin und Staphylokokkentoxin ihre Giftigkeit durch Emulgieren mit Chloroform verlieren, dagegen nicht ihre Fähigkeit zu immunisieren. Es handelt sich bei diesen Arbeiten um eine Denaturierung an der Grenze fl/fl. Die Grenzflächen-

spannung zwischen Wasser und Benzol beträgt 27.7 Dyn/cm. Wir sehen, daß es zum Denaturieren gar nicht der hohen Grenzflächenkräfte an der Grenze Wasser/Luft bedarf.

Bei Versuchen, die Dicke der Diffusionsfilme zu bestimmen, bekam DU NOUY aus den Minima der Kurve: Konzentration gegen Oberflächenspannung an Albuminlösungen mit seiner Ringmethode Werte von 30 bis 40 Å und HERČEK (213) in seinem Institut mit der gleichen Methode dieselben Werte. Sie führten die Dicke auf eine molekulare Schicht nativer Moleküle zurück und glaubten irrtümlicherweise, daß sich bei der Diffusion aus der Lösung heraus kein denaturierter Film bildet und daß *aus diesem Grunde* die Untersuchung solcher Filme für biologische Untersuchungen besonders geeignet sei.

BULL (82) hat solche Diffusionsfilme mit einer neuen originellen Methode ausführlich untersucht. Er verwendet eine gewöhnliche Porzellanwalze, die sich in einer Wasserschale dreht, wie sie in Büros zum Anfeuchten von Leimpapier benutzt wird. In die Schale wird eine abgemessene Menge Albuminlösung gegeben und etwas Baumwolle zum Abwischen des denaturierten Eiweißes von der Walze. Dann wird die Walze, deren ausgetauchte Oberfläche genau bekannt ist (171 qcm), mit gemessener Geschwindigkeit gedreht. Damit ist die Größe der Oberflächenbildungsgeschwindigkeit bekannt. Es wird dann nach einer bestimmten Zeit die Konzentrationsabnahme der Lösung mit einem Zeißschen Tauchrefraktometer gemessen und in Beziehung gebracht einerseits zu der Rotationsgeschwindigkeit, anderseits zur Ausgangskonzentration der Lösung. Aus diesen Daten läßt sich die Filmbildungsgeschwindigkeit berechnen und durch eine Extrapolierung auf die Geschwindigkeit Null auch die Menge des in der Oberfläche adsorbierten Proteins für den Fall einer stehenden Eiweißlösung. Auf Grund der Meßergebnisse stellt BULL fest, daß die pro Oberflächeneinheit denaturierte Menge abhängt erstens von der Konzentration der Lösung und zweitens von der Geschwindigkeit der Neubildung der Oberflächen. Bei Konzentrationen von 0,1% und weniger besteht der Film aus einer monomolekularen Schicht in einer Dicke von etwa 10 Å.¹ Wenn die Konzentration größer ist, setzt sich eine Schicht von vermutlich nicht denaturierten Molekülen unter diesen Film. Die in dieser Schicht vorhandene Eiweißmenge steigt maximal auf das 3,5fache der eigentlichen Filmschicht, also auf 35 Å. Soweit BULL.

Ein kugelförmiges Teilchen vom Molekulargewicht 40000 und der Dichte 1,34 hat einen Durchmesser von ungefähr 45 Å. Die Schichtdicke für homogene Raumerfüllung [siehe TRURNIT und BERGOLD (392)] würde für den Fall dichtester Kugelpackung auf der Fläche ungefähr 28 Å betragen

¹ Das gilt für die Genauigkeit, mit der man extrapolieren kann. Nach langer Zeit setzt sich vermutlich auch bei geringeren Konzentrationen als 0,1% eine zweite Schicht unter den Film. Über die nötigen Zeiten siehe unten.

Wenn man nun nur einen Teil des für Eialbumin bei Sedimentations- und Diffusionsversuchen gefundenen Reibungsverhältnisses (f/f_0) einem realen Formfaktor zuschreibt, erscheint die Annahme, daß sich eine *ein* Molekül dicke Schicht unter den denaturierten Film legt, dann möglich, wenn die Teilchen mit ihrer langen Achse normal zur Oberfläche stehen.

BULL stellt eine ähnliche Überlegung an, glaubt aber, da er die notwendige Reduktion des Moleküldurchmessers außer acht läßt, daß es sich um eine unvollständige Besetzung unter dem Film handelt. Daß die Teilchen in dieser zweiten Schicht nicht denaturiert sind, zeigt er durch eine quantitative Überlegung und ein Kontrollexperiment, in dem das „unlösliche“ Protein in einem Behälter gesammelt, vorsichtig einige Male mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet und gewogen wird. Dieser Versuch wird mit zwei Konzentrationen der Ausgangslösung hergestellt (0,1 und 1,5%). Bei dem Versuch mit 0,1%iger Ausgangslösung waren von dem in der Baumwolle aufgefangenem Protein 93,5% unlöslich und bei dem Versuch mit 1,5%iger Ausgangslösung nur 31,9%, also sind 68% des aus der 1,5%igen Lösung in die Oberfläche gegangenen Proteins löslich und undenaturiert oder 88,3% des Materials der zweiten, unterliegenden Schicht.

HAUSER und SWEARINGEN (208) haben mit der vorher von ANDREAS, HAUSER und TUCKER (38) entwickelten photographischen Methode Oberflächenspannungsmessungen an hängenden Tropfen von Eialbuminlösungen gemacht, wobei die Abhängigkeit vom Alter der Oberflächen, Konzentration, p_H und von gewissen mechanischen und thermischen Vorbehandlungen untersucht wurde. Sie fanden, daß Lösungen von etwa 0,05—2% nach genügend langem Altern demselben Oberflächenspannungswert zustreben. Lösungen mit kleinerer oder größerer Konzentration zeigen andere Werte. Für das lange Altern machen sie die Bildung von Adsorptionsfilmen unter den Primärfilmen verantwortlich. Die Lösungen zeigen im I. E. P. ein Minimum der Oberflächenspannung, was mit den Ergebnissen anderer Autoren übereinstimmt. Ebenso das Verhalten in dem übrigen p_H -Bereich. Verdünnte Lösungen, die für 3 Stunden auf 60° erhitzt wurden, zeigen eine schwache Koagulation.

Die Verfasser zeigen außerdem eine Kurve, aus der hervorgeht, daß bei 0,001%igen Lösungen eine Alterung der Oberfläche, d. h. ein Absinken der Oberflächenspannung mit der Zeit, sehr im Gegensatz zu den höher konzentrierten Lösungen praktisch nicht mehr stattfindet. Während bei einer 0,005%igen Lösung die Oberflächenspannung nach 100 Minuten schon unter 50 Dyn/cm gesunken ist und bei einer 4%igen Lösung nach der gleichen Zeit auf 42 Dyn/cm, bleibt sie bei der 0,001%igen Lösung nach etwa 10 Minuten konstant in der Gegend von etwa 71 Dyn/cm stehen. Denselben Wert hat JOHLIN (233) mit einer anderen Methode

nach 90 Minuten Alterung gefunden. Die Verfasser gehen auf diese Kurve nicht weiter ein.

Es liegt nun nahe, anzunehmen, daß in der Gegend dieser geringen Konzentration nicht mehr genug Eiweiß in der Lösung vorhanden ist, um die gelartigen, dichten Diffusionsfilme zu bilden. Es handelt sich ja um die Untersuchung eines Tropfens, der an einer Kapillare hängt; eine Nachlieferung durch Diffusion aus der Kapillare heraus würde erstens sehr langsam erfolgen, und zweitens darf man nicht vergessen, daß die Glaswand der Kapillare auch einen Film festhält. Eine einfache Rechnung zeigt, daß in einer Kapillare von annähernd 0,2 mm Durchmesser (der exakte Wert liegt ein klein wenig tiefer) die Glasoberfläche gerade Raum bietet, um aus einer 0,001%igen Ovalbuminlösung sämtliche Teilchen in dichter Kugelpackung zu adsorbieren, wenn man für den Durchmesser der Kugeln 46 Å ansetzt. Ebenso ergibt sich, daß in einem Tropfen einer 0,001%igen Ovalbuminlösung, der einen Durchmesser von 0,6 mm hat, alles Eiweiß in einem 10 Å dicken Film an der Oberfläche untergebracht werden kann. In einem Tropfen von 2 mm Durchmesser ist dreimal soviel Eiweiß vorhanden, wie nötig ist, um einen solchen Film an seiner Oberfläche zu bilden. Wenn die außerordentlich geringe Diffusionsgeschwindigkeit berücksichtigt wird, erscheint trotzdem diese Deutung der Kurve von HAUSER und SWEARINGEN möglich.¹

f) Homogenität der Filme.

Entsprechend den allgemeinen Schwierigkeiten bei Eiweißfilmen sind auch die Angaben über die Homogenität sehr widersprechend.² HUGHES und RIDEAL (226), PHILIPPI (323) und andere haben sich der Abtastung der Oberfläche mit der ΔV -Elektrode bedient. Bei homogenen Filmen dürfen die Schwankungen nicht größer als 2—3 mV sein. Ungeeignetes Substrat oder Kompression des Films vor völliger Spreitung macht stärkere Schwankungen. ZOCHER und STIEBEL (411) haben Filme ultramikroskopisch untersucht. ADAM (2) hat die Methode dadurch vereinfacht, daß er nicht mit Unterwasserkondensator arbeitet, sondern mit starkem seitlichem Licht, das unter der Oberfläche entlang strahlt. HUGHES und RIDEAL fanden mit dieser Methode an Eialbuminfilmen, daß gerade lange Falten senkrecht zur Druckrichtung auftreten, wenn der Film komprimiert wird. ZOCHER und STIEBEL fanden,

¹ Nach der EINSTEIN-SMOLUCHOWSKYSchen Formel ergibt sich, wenn man für die innere Reibung der Lösung den Wert von Wasser bei 20° einsetzt, daß in einer Kugel von 1 mm Radius ein im Zentrum befindliches Teilchen vom Radius 22 Å 115 Minuten braucht, um an die Oberfläche der Kugel zu gelangen. Dabei ist die Anisodiametrie und die Hydratation nicht berücksichtigt. Die wirkliche Wanderdauer dürfte erheblich länger sein.

² Da seit 1938 nichts Neues hierzu beigetragen wurde, halten wir uns an den entsprechenden Abschnitt in dem Referat von NEURATH und BULL (312).

daß Kaseinfilm, die auf $n/10$ HCl gespreitet wurden, ganz homogen sind, solche auf destilliertem Wasser dagegen viele kolloide Partikelchen im Film eingebettet enthalten. Im übrigen dürfte sich zur Beurteilung der makroskopischen Homogenität von abgehobenen Eiweißfilmen auf Platten ein ähnliches Verfahren entwickeln lassen, wie es BEISCHER und ÖCHSEL (49) (siehe oben) für Stearatschichten anwenden. Dieses sehr hübsche Verfahren hat den Vorzug, daß gleichzeitig chemische Daten dabei gewonnen werden können. (Angriff einer Metallplatte z. B. durch H_2S durch den Film hindurch, wenn dieser als Schutzschicht wirkt.)

g) *Elastizität.*

BATEMAN und CHAMBERS (46, 47) definieren in Anlehnung an QUINKE und SCHÜTT als die Elastizität eines Films die Größe $M_s = -A \left(\frac{dF}{dA} \right)^1$. Diese Größe wird in ihrer Abhängigkeit vom p_H untersucht. M_s geht bei jeder Filmkompression durch ein Maximum, und die Lage dieses Maxi-

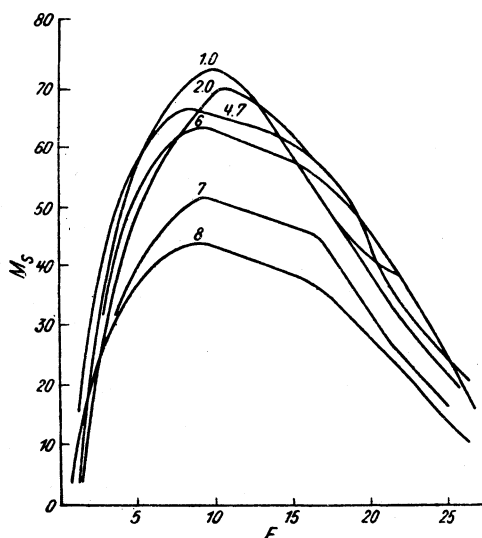


Abb. 12. F/M_s -Kurven für Ovalbumin und, verschiedenes p_H [aus BATEMAN und CHAMBERS: J. chem. Physics 7, 244 (1939)].

Zahlen an der Kurve bedeuten p_H . Molare Substratkonzentration 0,01. F und M_s in Dyn/cm. A_0 in qm/mg , aus der aufgetragenen Menge Eiweiß berechnet.

mums ändert sich nicht mit dem p_H . Diese Maxima liegen bei Drucken, die Punkten im geraden Teil der üblichen F/A -Kurve entsprechen, und

¹ A ist hier keine Konstante wie in dem Ausdruck für die Kompressibilität [siehe oben NEURATH und BULL (312)].

diese M_s -Werte sind für die einzelnen Proteine recht verschieden, d. h. kennzeichnend. Dagegen liegen die A_{max} -Werte (beim I. E. P.) für alle Proteine nahe beieinander. Die Verfasser schlagen vor, als kennzeichnende Größe für einen Proteinfilm nicht die GORTERSche Spreitungszahl, sondern M_s zu wählen, da es bezeichnender sei. Im Zusammenhang mit den Ansichten von MITCHELL (295) und den Ergebnissen einer Röntgenunter-

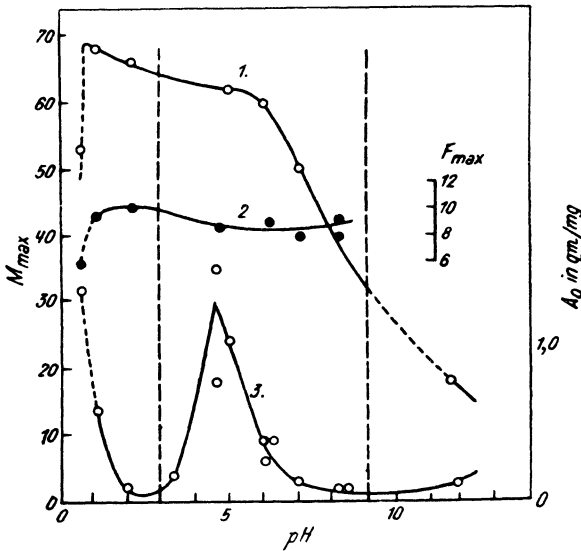


Abb 13. Maximal-Elastizität, Schube bei maximaler Elastizität und GORTERSche Kurve gegen pH aufgetragen [aus BATEMAN und CHAMBERS: J. chem. Physics 7, 244 (1939)]. Die gestrichelten Vertikalen begrenzen den pH-Stabilitätsbereich nach SVEDBERG [J. Amer. chem. Soc. 52, 2855 (1930)].

suchung von ASTBURY und Mitarbeitern (41) vermuten sie, daß das Aufrichten der Seitenketten im Laufe der Kompression dem ansteigenden Ast der M_s/F -Kurve entspricht. Im Maximum ist der Widerstand gegen die Aufrichtung ins Gleichgewicht gekommen mit zwischenmolekularen Kräften, die mit zunehmender Annäherung und Parallelisierung stärker werden und ein Absinken der Elastizität zur Folge haben. Die Verfasser bemerken zum Schluß, daß die M_s/pH -Kurve die Stabilität biologischer Membranen als präformierte Gebilde leichter verständlich macht als die GORTERSche Kurve. Umgekehrt dürfte man diese vielleicht als Ausdruck der Spreitungstendenz dem notwendigen lebhaften Austausch zwischen Struktur und Lösung in der Zelle zuordnen.

h) Kompressibilität.¹

Die reversible Kompressibilität ist bei allen Proteinfilmen groß. Insulinfilme kann man — wenn es nicht zu langsam geschieht — durch einen Druck von 35 Dyn/cm auf 20% ihrer Ausgangsfläche vollkommen reversibel komprimieren [LANGMUIR und SCHAEFER (271)]. In dem Gebiet dieser hohen Kompression werden offenbar keine neuen Bindungen gebildet, sondern es handelt sich um ein Zusammenrücken der Ketten. Hierzu liefern ebenfalls einen Beitrag die zitierten Arbeiten von FOURTH und SCHMITT (126) und BULL (81).

i) Viskosität.

METCALF (292) hat die Viskosität von Peptonhäutchen auf Wasser durch Dämpfung der Rotation eines schwimmenden Korkens gemessen. LANGMUIR und SCHAEFER (268) und SCHAEFER (343) bestimmen die Dämpfung von Rotationsschwingungen einer Scheibe in der Oberfläche von einer großen Anzahl verschiedener Eiweißlösungen bei verschiedenen Filmdrucken (Tabelle 9). In ihrem Übersichtsreferat (271) besprechen sie

Tab. 9. Absolute Viskositäten von Protein-Monoschichten.

$M = 131,8$, $D = 4,5$, $p_H = 5,8$, $T = 25^\circ \text{C}$, $t =$ ungefähr 34 Sek.

Protein	Absolute Viskosität η_g in g/sec Schub in Dyn/cm					
	2	6	10	16,5	19	29,5
Casein	0,0036	0,010	0,015	0,4	12,0	
Edestin	5,0	26,0	52,0			
Eialbumin	0,15	0,28				
Gliadin (bei $p_H = 7,2$)	0,001	0,003	0,01	0,8		54,0 ^e
Gliadinacetat	0,001	0,007	0,016			
Hämoglobin	0,024	0,12	0,37			
Pferdeglobulin	120,0	210,0	340,0			
Insulin	0,004	0,028	0,10			
Papain	0,08	0,18	0,38			
Pepsin	0,68	0,75	1,5	150,0		
Pepsinogen	0,110	0,17	0,46			
Tabakglobulin	0,048	0,20	0,36	140,0		340,0
Trypsin	0,009	0,23	0,57			
Trypsinogen	0,40	1,0	5,5			
Zein	0,003	0,003	0,003			

$t =$ Schwingungsdauer der rotierenden Viskosimeterscheibe, $M =$ Trägheitsmoment des schwingenden Systems, $D =$ Maß für die Richtkraft des Torsionsdrahtes.

Die absolute zweidimensionale Viskosität η_g hat die Dimension g/sec oder $\text{Dyn} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{sec}$. Näheres siehe bei LANGMUIR und SCHAEFER (268).

¹ Die Maßzahlen der Kompressibilität und der Elastizität sind in der Dimension reziprok zueinander: cm/Dyn und Dyn/cm .

diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den Eiweiß-Spreitungsfiguren in Ölfilmen, die SCHAEFER (235) zuerst beschrieben hat. Diese Figuren erlauben drei verschiedene Gruppen von Proteinen zu unterscheiden und den Verlauf der Denaturierung bei einem Protein zu verfolgen.

SCHULMAN und RIDEAL (357) messen die Viskosität an Filmen aus Lipoid und Eiweiß. Es handelt sich um Mischungen von Gliadin und Cholesterin. LANGMUIR und SCHAEFER haben die Versuche wiederholt, wir geben sie in Tabelle 10 wieder. Interessant ist an den Ergebnissen unter anderem, daß die Beimischung von nur $\frac{1}{16}$ Gewichtsteil Cholesterin zum Gliadin bewirkt, daß die Viskosität dieses Mischfilms bei etwa 30 Dyn/cm 50mal geringer ist als die eines reinen Gliadinfilms! Cholesterin wirkt hier als zweidimensionaler Weichmacher. Auch das Maximum bei der Mischung 1/4 ist interessant.

Tabelle 10. Absolute Viskositäten von Protein-, Lipo-Protein- und Lipoidfilmen [aus LANGMUIR und SCHAEFER, Chem Rev 24, 181 (1939)].

$M = 131,8$, $D = 4,5$, $p_H = 7,2$, $T = 25^\circ C$, $t =$ ungefähr 34 Sek.

Cholesterin Gewichtsteile	Gliadin Gewichtsteile	Absolute Viskosität in g/sec Schub in Dyn/cm							
		2	10	16,5	19	29,5	16,5	17,5	29,5
I	0	0,002 ¹	0,002	0,019	0,002	0,002			
I	2	0,002	0,02	0,04	0,04	0,002			
I	4	0,001	0,001	0,76	0,16	0,05		0,49	0,04
I	8	0,002	0,002	0,36	0,06	0,02	0,36		
I	16	0,006	0,006	0,18	0,85	1,25			
0	1	0,001	0,01	0,83		54,0			

Erläuterungen siehe im Text.

JOLY (236) und DERVICHIAN (102) machen darauf aufmerksam, daß man je nach der Spreitungsart offenbar zwei Arten von Filmen bekommt. Die Sorte α , die entsteht, wenn man dem Film zum Spreiten beliebig viel Fläche gibt, ist sehr stabil und wenig viskös. Der Schub beim Spreiten darf einige Zehntel Dyn/cm nicht überschreiten. Diese α -Filme dehnen sich spontan zu echten e-Filmen aus. Vollgespreitete α -Filme zeigen eine hohe reversible Kompressibilität. Die β -Filme, die entstehen, wenn man den Schub beim Spreiten nicht unter 1,5 Dyn/cm fallen läßt, sind dicker, inhomogen, ziemlich viskös, zeigen irreversible Kompressibilität, d. h. starke Hysterese. Werden β -Filme oberhalb eines gewissen Ausgangsdruckes komprimiert, so werden sie starr und zeigen eine hohe reversible Elastizität. β -Filme zeigen das sog. „Altern“, d. h. ihre Viskosität steigt bei konstantem Druck langsam stark an bis zu einem Grenz-

¹ Die niedrigen Werte von η_p sind ungenau um ungefähr $\pm 0,005$.

wert, der oft erst nach Stunden erreicht wird. Die Bedingungen bei der Herstellung der β -Filme sind so, daß die Moleküle offenbar gar nicht zur vollständigen Entfaltung kommen, sondern sich vorher schon wieder zu einem neuen Raumgefüge „vernetzen“ das stabiler ist als das ursprüngliche.

Alle Arbeiten mit Spreitungsfilmen von Proteinen, die ohne Berücksichtigung dieser Tatsachen gemacht werden, müssen daraufhin entsprechend vorsichtig bewertet werden. JOLY (239) geht in diesem Zusammenhang auf die Theorie und Technik der Viskositätsmessungen ein und gibt eine gute Literaturzusammenstellung der einschlägigen Arbeiten.

37. Spezielle Untersuchungen.

Die Zahl der Arbeiten, in denen spezielle Stoffe gespreitet werden, die den Biologen interessieren, ist noch gering. BERGOLD und BRILL (50) haben Spreitungsversuche mit dem Polyederveiweiß von Insektenviren angestellt (Seidenraupe, Schwammspinner und Nonne). Sie fanden die typische GORTERSche Kurve. Allerdings lag das Flächenmaximum nicht mit Sicherheit beim I. E. P. der einzelnen Proteine. Man kann dazu sagen, daß im Hinblick auf die Entfaltung des Moleküls beim Spreiten der I. E. P. der Moleküle in Lösung und in Filmen nicht notwendig identisch sein muß. Die gegenwärtige Ansicht vom Bau des löslichen Eiweißmoleküls besagt ja, daß die apolaren Seitenketten im wesentlichen nach innen, die polaren nach außen gewendet sind. Wenn nun aber auch innen polare Seitenketten vorhanden sind und nach dem Entfalten die Gesamtladung ändern, bedeutet das eine Verschiebung des I. E. P. Eine experimentelle Untersuchung dieser Frage scheint erforderlich und möglich zu sein.

HARKINS und ANDERSON (192) haben Filme von oxydiertem Cytochrom C (I. E. P. 9,9—10,0) hergestellt. Diese sind sehr stabil. (Nähere Angaben siehe oben im Abschnitt Filmdicke.)

SEASTONE (362) hat Filme von Hämocyanin, Tabakmosaikvirus (TMV), Vaccine und Bakterieneiweiß untersucht. Allgemein fand er, daß mit diesen Stoffen eine so vollständige Spreitung wie bei den Proteinen mit dem üblichen Molekulargewicht nicht erreicht werden kann. TMV gibt auf halbgesättigter Ammonsulfatlösung Filme von etwa 1000 Å Dicke. SEASTONE meint, daß die Moleküle aufrecht stünden.¹ Die zu spreitende Lösung wird bei dieser Arbeit mit einer Platinschlinge von 0,006 ccm Fassungsvermögen aufgebracht. SEASTONE bezeichnet die Art der Spreitung von Bakterien und Tabakmosaikviren auf den Salzlösungen als

¹ Diese Ansicht ist nach den neueren Befunden über die Form und Größe des TMV nicht aufrechtzuerhalten. Siehe dagegen die Ansicht in der LANGMUIRSchen Arbeit über ausgesalzene Filme (l. c.).

explosionsartig. Es handelt sich um ausgesalzene Filme im Sinne LANGMUIRS.

GORTER und MAASKANT (171) untersuchten die Spreitung von Urease und Bence Jones-Protein. Dabei bestimmen sie den I. E. P. des Bence Jones-Proteins durch Aufnahme der GORTERSchen Kurve, was zweifellos nach dem oben Gesagten unzulässig erscheint.

MOSS, RIDEAL und SMITH (301) stellen fest, daß Laktat-Ionen im Substrat einen Myosinfilmen veranlassen, sich zu dehnen, einen Albuminfilmen dagegen nicht. Die Wirkung ist bei pH 10,0 am größten. Anorganische Ionen können das nicht, ebenso Acetat- und Propionationen nicht. Dagegen macht Tartrat es im geringeren Maße. Diese Befunde dürften nur der Anfang einer Reihe von weiteren Untersuchungen sein. Sie sind interessant im Zusammenhang mit den neueren Befunden von SZENT-GYÖRGYI über das Verhalten von Myosin [z. B. GERENDAS und SZENT-GYÖRGYI (149) und ENGELHARD und LJUBIMOWA (117)].

38. Mischfilme.

Die eben beschriebenen Versuche leiten über zu einer Gruppe von Untersuchungen, in denen das Filmverhalten von Mischungen untersucht wird oder der Eiweißfilm auf ein Substrat mit gelösten, differenten, organischen Molekülen gebracht wird. Ihr Verhalten wird durch ihre Affinität zur Grenzfläche als solche und durch ihre Affinität zum Filmmaterial bestimmt. Es wird durch die Begriffe Adsorption, Penetration, Komplexbildung, Verdrängung und schließlich Reaktion gekennzeichnet. Ein Beispiel für die Adsorption unter dem Film bilden die Diffusionsfilme auf Eiweißlösungen, wo sich ja unter die eigentliche Filmschicht aus denaturierten Molekülen eine Schicht nativer Moleküle legt (BULL, l. c.). Dieser Fall scheint biologisch sehr wichtig zu sein. Die Arbeit von LANGMUIR und WAUGH (275) über drucklösliche und druckverdrängbare Komponenten in Eiweißfilmen gehört zum Teil auch hierher (siehe unten).

NEURATH (310) untersuchte Mischungen von Eialbumin mit Myristinsäure. Unter der Annahme, daß der Flächenbedarf des Proteins in Gegenwart der Kettenmoleküle kein anderer ist als ohne diese, folgt aus den Messungen, daß bei Mischungsverhältnissen von 100—400 Molekülen Säure auf 1 Molekül Protein keine Wechselwirkung vorhanden ist. Bei einem geringeren Säuregehalt jedoch wird der Flächenbedarf der Säuremoleküle größer und erreicht bei einem Molenbruch von 9 den Wert 180 Å. Die Filme sind dann gasförmig oder gasförmig expandiert.

STENHAGEN und RIDEAL (374) untersuchen die Wechselwirkung zwischen Bilirubin oder Porphyrin und monomolekularen Schichten von Lipoiden und Proteinen.

SCHULMAN (350) untersucht Systeme von Lipoid- oder Eiweiß- oder Lipoid-Eiweiß-Mischfilmen mit differenten Stoffen wie Fettsäuren,

Taurocholsäure, Saponin, Digitonin im Substrat. Solche Systeme erscheinen geeignet zur Aufklärung der Agglutination und Hämolyse. In den Film penetrierende Stoffe hämolysieren. Alle Substanzen, die wegen zu geringer Affinität der apolaren Teile nur unter den Film adsorbiert werden, z. B. Tannin, agglutinieren im biologischen Experiment auch nur. Die Ähnlichkeit der Modellsysteme geht noch weiter, z. B. penetriert Pelargonsäure, da sie nur eine kurze Kette hat, den Film nur langsam, ihre hämolytische Wirkung ist dementsprechend gering. Farbstoffe, z. B. Janusgrün, die sonst als Sensibilisatoren bekannt sind, penetrieren erst bei hoher Konzentration. Solches Penetrieren macht sich durch steigenden Schub bemerkbar. Es können so hohe Schübe erreicht werden (z. B. 60 Dyn/cm), wie sie bei einheitlichen Filmen nie möglich sind. Der physikalische Zustand des Eiweißfilms bei einem bestimmten Schub kann durch Penetrieren je nach dem Partner entweder in Richtung einer Verflüssigung oder einer Erstarrung verschoben werden. SCHULMAN und RIDEAL (357) besprechen die biologische Bedeutung dieser Befunde ausführlich.

39. K-Filme.¹

Ehe wir auf die letzte Stufe der Wechselwirkung, auf die Reaktionen im Film, eingehen, müssen wir die im wesentlichen von LANGMUIR und Mitarbeitern entwickelte Technik der Herstellung von Eiweißaufbaufilmen erwähnen, da sich ein großer Teil der Untersuchungen von Reaktionen an Filmen auf sog. S-Schichten bezieht.

LANGMUIR, SCHAEFER und WRINCH (273) zeigen, daß man auf einer Bariumstearatunterlage Aufbaufilme von gespreiteten Eiweißmonoschichten aufziehen kann. Wenn der Eiweißfilm dabei unter einem Schub von 30 Dyn/cm steht, ist die Schichtdicke auf der Platte 20 Å, bei 15 Dyn/cm um das 0,8fache dünner. Die LANGMUIRSche Nomenklatur bezeichnet einen Film, der beim Eintauchen der Platte entsteht, als A-Film, und einen solchen, der beim Auftauchen entsteht, als B-Film. Die Platte selbst wird mit T bezeichnet und die Stearatunterlage mit U. Mit reinem Wasser als Substrat kann man wohl TUAB-, aber nicht TUABAB-Filme aufbauen. Ein Zusatz von 10 mg $ZnCl_2$ pro l macht das aber möglich bis zu 30 Schichten. TUBBB geht ohne Zn, wenn nach Aufbringen jeder einzelnen Schicht getrocknet wird. TUBAB geht auch ohne Zn, weiter aber nur mit Zn. TUAAA geht nicht. Alle diese Versuche gelingen bei 30 Dyn/cm besser als bei 15 Dyn/cm. Die Benetzungseigenschaft dieser Aufbaufilme wird im einzelnen untersucht, und es werden daraus Schlüsse gezogen. Die Oberfläche eines A-Films scheint etwas hydrophiler zu sein als die eines B-Films. Die Moleküle scheinen sich nicht leicht auf dem Träger umdrehen zu können. Auf einen TUA-

¹ Siehe auch ASTBURY (41b).

oder TUB-Film kann man weitere Stearatfilme bringen. Auf diese Art lassen sich beliebige Schichtfolgen aus Eiweiß- und Fettsäure übereinanderschichten.

Auf die früher beschriebenen P-Filme kann man Eiweißfilme bringen und nun deren Durchlässigkeit für solche Stoffe untersuchen, die die Fähigkeit haben, die Poren im P-Film auszufüllen.

BULL (80) hat 1937 vergeblich versucht, Aufbaufilme von Ovalbumin auf einer Chromplatte zu machen. Dagegen gelang es mit hochgereinigtem Zein, das aus 85%igem Alkohol auf reinem Wasser gespreitet wurde. Auch hier ist Trocknen jeder neuen Schicht erforderlich. Es wurden 100 Schichten übereinandergelagert, die brillante Farben zeigten und eine mittlere Schichtdicke von 10 Å hatten. Während sonst Zein sehr hydrophob ist, sind diese Aufbaufilme daraus hydrophil.

40. Filme an der Grenze fest/flüssig. (S-Schichten).

Solche Filme waren schon früh Gegenstand der Untersuchung [siehe das Referat von NEURATH und BULL (l. c.)!]. Es wurden zur Adsorption aber immer organische oder anorganische Pulver verwendet. LANGMUIR und SCHAEFER (265) haben nun ein Verfahren entwickelt, das es erlaubt, diese monomolekularen Filme unter verschiedenen Bedingungen an einer ebenen Grenze fest/flüssig zu bilden und direkt zu sehen. Zur Erzeugung dieser sog. S-Schichten taucht man eine Blodgettplatte zunächst einige Minuten in eine Lösung von Aluminium- oder Thoriumsalz. Wir wollen das „Präparieren“ nennen [LANGMUIR und SCHAEFER (265)]. Dadurch drehen sich die obersten Stearatmoleküle um¹ und bilden eine hydrophile Oberfläche, die in der Lage ist, aus Lösungen native Eiweißmoleküle zu adsorbieren [LANGMUIR und SCHAEFER (266)]. Wie aus später angeführten Untersuchungen hervorgeht, setzt sich nun eine Einzelschicht von Molekülen an die präparierte Platte und ist durch vorsichtiges Abspülen der Platte nach dem Herausziehen aus der Lösung nicht zu entfernen. Auch nach dem Abspülen und Trocknen scheinen die Eiweißmoleküle nicht wesentlich denaturiert zu sein, wie durch eine Reihe von Untersuchungenargetan wird, die im folgenden Abschnitt besprochen werden.

CLOWES, KRAHL und DAVIS (91) haben die Wirkung des p_H auf die Schichtdicke von S-Schichten verschiedener Proteine untersucht (Salmin, Insulin, Histon, Thymonucleinsäure, Casein, Trypsin).² Die Lösungen waren 0,1%ig. Die Versuche ergaben, daß die größere Dicke meist in der Nähe des I. E. P. gefunden wurde. Die Schichtdicken sind zum Teil viel größer (bis 500 Å), als es einer monomolekularen Schicht von sphärischen

¹ Siehe Abschnitt 23

² Siehe auch SOBOTKA und BLOCH (366a) über Saccharase, ferner CAMPBELL und FOUNT (85a) und HARKINS, FOUNT und FOUNT (196a) über Katalase.

Tabelle 11. Auf Blodgettplatten gemessene Schichtdicken von gelbem Ferment [aus TRURNIT und BERGOLD, Kolloid-Z. 100, 177 (1942)].

Konzentration %	Dauer der Adsorption Minuten	Dicke der Schicht Å	
0,72	10	18	18
0,72	30	21	22
		Mittel 19,7	
0,072	15	23	22
0,072	30	25	28
0,072	60	24	24
0,072	60	26	27
0,072	70	19	18
0,072	70	25	24
		Mittel 23,7	
0,0072	70	22	23
0,0072	70	19	19
		Mittel 20,7	
Gesamtmittel 21,4			

Die Meßwerte sind einzeln wiedergegeben, um den Grad der Streuung zu zeigen Daten für das Molekül: $V_{20} = 0,731$, $M_s = 82000$ (KECKWICK und PEDERSEN), $b/a = 3,84$ (POLSON). Ungepufferte Originallösung und Verdünnungen.

Konzentration %	PH	Dicke der Schicht Å	
0,072	6,15	22	
0,072	7,0	19	
0,072	8,1	21	
		Mittel 20,7	
0,72	6,15	26	
0,072	6,15	22	
0,0072	6,15	22	
		Mittel 23,3	

Losung von gelbem Ferment in $n/150$ Puffer. 1,5 ccm Fermentlösung + 0,5 ccm Pufferlösung. Adsorptionsdauer 30 Minuten.

Durchmesser von 58 Å: Bei dichtester Packung solcher Kugeln in einer Ebene würde das für homogene Schichtdicke einen Schichtdicken-

Molekülen des betreffenden Molekulargewichtes entsprechen würde. Die Verfasser bezeichnen diese Mitteilung als eine vorläufige. Auch die Dickenangaben in der eben zitierten Arbeit von LANGMUIR und SCHAEFER, die recht summarisch ist, erscheinen nicht ganz zuverlässig und schwanken stark. Zur Präparierung der Blodgettplatten verwenden die Verfasser nicht nur die Behandlung mit Thorium- oder Aluminiumsalz, sondern auch z. B. das Aufbringen eines Ovalbuminfilms. Wenn man eine spezielle Affinität der Platten zu hydrophoben Molekülen verlangt, kann man sie auch durch einen Überzug von gespreiteter Desoxycholsäure präparieren.

Neuere Ergebnisse von TRURNIT und BERGOLD (392) zeigen entgegen diesen amerikanischen Arbeiten, daß man bei Verwendung äußerst reinen Eiweißes und Einhaltung sehr konstanter Bedingungen sehr wohl reproduzierbare Werte bekommen kann (siehe Tabelle 11), die im übrigen auch übereinstimmen mit den Vorstellungen, die man sich bei Annahme nichtkugelförmiger Gestalt von den Proteinmolekülen machen kann. Z. B. haben *Kugeln* von der Dichte 1,34 und dem Molekulargewicht 82000 einen

zuwachs von 35 \AA ergeben. Wenn man dagegen bei Annahme von Rotationsellipsoiden das nach POLSON für gelbes Ferment berechnete Achsenverhältnis $b/a = 3,84$ und liegende Teilchen mit langer Rotationsachse der Rechnung zugrunde legt, bekommt man einen theoretischen Schichtdickenzuwachs von $29,5 \text{ \AA}$. Die Tabelle 11 enthält Werte bis 28 \AA . Die Autoren glauben, daß diese direkten Schichtdickenmessungen für die Berechtigung der Deutung des Reibungsverhältnisses als Formfaktor sprechen. Gleichzeitig zeigten sie, daß mit Handelspräparaten und ge-

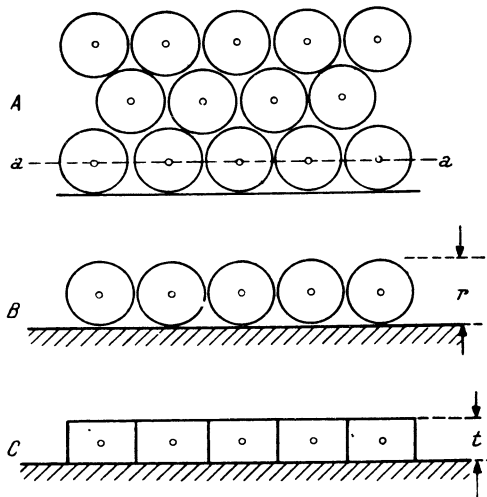


Abb 14. Definition der homogenen Schichtdicke für interferometrische Schichtdickenmessung (TURNIT).
 A Aufsicht auf eine monomolekulare Schicht von Kugeln in dichtester Packung. B Schnitt in der Höhe a . Die Interferenz der an der Ober- und Unterseite dieser Schicht reflektierten Strahlen erfolgt so, als ob eine Schicht homogener Dichte C vorhanden wäre. r dividiert durch t ist gleich $1,64$. Dieser Faktor gilt auch für beliebige Rotationsellipsoide (mit langer Rotationsachse) in dichtester Packung. Aus einer interferometrisch gefundenen Schichtdicke t muß man auf den vertikalen Molekuldurchmesser r zurückrechnen durch Multiplikation mit $1,64$. Für andere Arten der Packung gelten andere Faktoren.

wöhnlichen im Labor hergestellten Präparaten erheblich größere Dickenwerte gefunden wurden, die dazu noch sehr inkonstant waren. Sie haben die interferometrische Meßtechnik derart modifiziert, daß man mit recht einfachen Mitteln schon eine große Meßgenauigkeit bekommt (siehe oben).

TURNIT und BERGOLD untersuchten weiter mit dieser Methode Hämocyanin und Insektenvirus. Ihre Befunde am Hämocyanin deuten auf eine stark anisodiametrische Gestalt vor allem der Bruchstücke und stehen in gutem Einklang mit den Vorstellungen, die man sich über die Teilchenform aus den Untersuchungen schwedischer Forscher machen kann. Sie weisen im übrigen darauf hin, daß bei der Berechnung der Teilchendurchmesser aus den interferometrischen Dickenmessungen mit einer bisher nicht berücksichtigten homogenen

Schichtdicke gerechnet werden muß (siehe Abb. 14 und Tabelle 12). Wenn es gelingt, durch zusätzliche Messung der aus der Lösung an die Platte hin diffundierten Absolutmenge die Größe der Flächenbedeckung der Platte zu bestimmen, dann ist durch solche kombinierten Untersuchungen ein sehr direktes Mittel geschaffen, zu entscheiden, ob es sich um kugelige Teilchen handelt oder nicht, und wie groß die Abweichung von der Kugelgestalt ist, wenn man weiterhin im Sinne des bisherigen Achsenverhältnisses die Gleichheit zweier Raumachsen zuläßt, also rotationssymmetrische Ellipsoide annimmt. Wenn man außerdem noch aus chemischen und physikalischen Untersuchungen ein weiteres Bestimmungsstück besitzt, so kann man, wie TRURNIT und BERGOLD zeigen, unter Umständen auch die beiden kleineren Raumachsen noch differenzieren. Es handelt sich beim Hämocyanin um die zusätzliche Erfahrung, daß beim Verschieben des p_H vom I. E. P. ins Alkalische hinein die Moleküle zu Hälften und weiter zu Achteln zerfallen, aber nie zu Vierteln. Über die mögliche Deutung siehe die Originalarbeit. Die bisherigen Bestimmungen der Anisodimetrie basierten auf indirekten Schußfolgerungen.

DEAN, GATTY und STENHAGEN (99) untersuchen Aufbaufilme auf Platten und auf Gaze (Seide und Metall) und machen ΔV -Messungen an

Tabelle 12. Berechnete mittlere Schichtdicken von monomolekularen Hämocyaninschichten unter der Annahme dichtester Packung bei verschiedenen Raumformen der Teilchen [aus TRURNIT und BERGOLD, Kolloid-Z. 100, 177 (1942)].
Werte in Å.

	Große Achse	Kleine Achse	Schichtdicke
Kugel	275	275	168
Würfel	222	222	222
Rotationsellipsoid	890	153	94
Prisma mit quadratischem Querschnitt	890	108	108
Prisma mit rechteckigem Querschnitt 1:2	890	150/75	75

Grundlage der Berechnung sind: Molekulargewicht des Teilchens, das spezifische Volumen und die Größe der langen Achse (890 Å) nach Messungen der Strömungsdoppelbrechung durch BJÖRNSTAHL und SNELLMAN [nach BROHULT, siehe (392)].

Die von TRURNIT und BERGOLD experimentell gefundene Schichtdickenzunahme bei Adsorption einer S-Schicht von Hämocyaninmolekülen an einer Blodgettplatte liegt, wenn das p_H der Lösung die Existenz ungespaltener Hämocyaninmoleküle erwarten läßt, zwischen 60 und 70 Å. Der Vergleich mit den theoretischen Werten der Tabelle zeigt, daß, wenn man mit einigermaßen vollständiger Flächenbedeckung rechnen darf, die längliche Teilchengestalt real ist. Ebenso stimmt der experimentell gefundene Wert (38—40 Å) für Achtelbruchstücke, die bei einem bestimmten höheren p_H vorliegen, gut mit dem Wert von 37,5 Å überein, der sich aus dem von den Verfassern vorgeschlagenen Modell ergibt.

diesen Schichten. Sie bestimmen auch das Flächenverhältnis, d. h. den Flächenverlust auf der Wasseroberfläche, verglichen mit der nachher vom Film bedeckten Plattenfläche, und finden es bei vorsichtigem Arbeiten gleich 1,0. Bei zu schnellem Arbeiten ist es kleiner, d. h. der Film dehnt sich beim Aufziehen. Die Filme überbrücken immer die feinen Maschen der Gaze auf beiden Seiten.

GATTY und SCHULMAN (140) machen ähnliche Versuche und bringen auch einen Doppelaufbaufilm in Luft auf eine feine Glasschlinge von 0,2 mm Durchmesser. Ferner machen sie zunächst sehr eigenartig anmutende Versuche, die darin bestehen, daß sie Molch- und Froscheier nach Abpräparieren der Gallerthülle auf destilliertem Wasser spreiten und von diesen (Misch-!) Filmen Aufbaufilme auf Chromplatten herstellen! Molcheier cytolisieren auf destilliertem Wasser besser als Froscheier. Röntgen-diagramme von diesen Filmen deuten auf Schichtebenenabstände von 9,6 und 50 Å hin. Ersterer wird dem Eiweiß, letzterer dem Lipoid zugeschrieben. Auch ganze „Molchbabies“ (baby newt) werden gespreitet!¹ Die Aufbaufilme auf Gaze werden bezüglich ihrer Durchlässigkeit für Farbstoffe und Ionen untersucht.

41. Reaktionen an Filmen.

Untersuchungen über eigentliche chemische Reaktionen zwischen Film und Substrat, wie weiter oben beschrieben, liegen für Eiweißfilme noch nicht vor. Dagegen haben MITCHELL und RIDEAL (296) die Wirkung von Ultraviolettlicht auf Filme von Gliadin, Zein, Insulin und Ovalbumin mit erheblichem experimentellem und theoretischem Aufwand untersucht. Die benutzten Wellenlängen lagen in drei Gruppen zwischen 2350 und 3175 Å. Gemessen wurde die Änderung des Grenzflächenpotentials bei konstanter Fläche. Die Berechnung der Quantenausbeute ergibt, daß diese bei Gliadin (auf völlige Abspaltung der aromatischen Aminosäuren bezogen) 1/2 beträgt für $\lambda = 2350$ und 3030 Å. Der Erfolg der Bestrahlung ist eine Verfestigung des Films und dementsprechend ein Anstieg von ΔV . Ferner eine oxydative Spaltung. Die aromatischen Aminosäuren werden an ihren Peptidbindungen aus der Kette gelöst. Spuren von Metall im Substrat bewirken offenbar eine Sensibilisierung des Prozesses. — Eine Weiterführung derartiger Versuche erscheint vielversprechend.

Eine Reihe von Untersuchungen befaßt sich mit der enzymatischen Wirkung von Filmen aus Fermenteiweiß auf Eiweiß im Substrat und umgekehrt. 1933 machten SCHULMAN und RIDEAL (356) die bemerkenswerte Beobachtung, daß im „Vollen“ durch Pepsin verdautes Pankreatin bei Einstellung auf sein p_H -Optimum im Vollen kein Eiweiß mehr angreifen

¹ Dem Verfasser ist nicht bekannt, um welches Stadium der ontogenetischen Entwicklung es sich dabei handelt, vermutlich um ein Morula- oder Blastulastadium.

kann, wohl aber Eiweißfilme! 1935 stellten dann SCHULMAN und HUGHES (353) fest, daß in dem Pankreatin ein Eiweißfettsäurekomplex vorhanden war, den man mit heißem Alkohol auswaschen kann. Dieser Komplex hatte den Eiweißfilm verdrängt und so eine Fermentwirkung vorgetäuscht. Sie zeigen dann, daß reine Fermentlösungen im Vollen und im Film gleich wirken.

LANGMUIR und SCHAEFER (269) haben Urease und Pepsin als I. Schichten auf Blodgettplatten gebracht und die fermentative Wirksamkeit untersucht. Die Ureaseplatte wirkt bei p_H 7 spaltend auf Harnstoff, ohne ihre Schichtdicke/zu ändern (20 Å). Ebenso wirkt Pepsin noch nach der Spreitung. In einer späteren Arbeit machen die gleichen Autoren (271) aber auf Fehlermöglichkeiten aufmerksam, insbesondere auf die unvollkommene Spreitung, die es ermöglicht, daß undenaturierte Teilchen des Proteins im Film sitzen und mit auf die Platte kommen.

Eine interessante Arbeit, die auch in diesen Zusammenhang gehört, ist die von TALMUD und TALMUD (378) über die katalytische Aktivität von Fermenten auf organischen Adsorbentien. Urease und Pepsin werden auf Palmitinsäure- oder Cetylamin aufbau filme gebracht und die Wirksamkeit verglichen.

Eine weitere Gruppe von Untersuchungen benutzt diese Technik, um damit den Mechanismus immunologischer Reaktionen aufzuklären. Diese Arbeitsrichtung erscheint sehr vielversprechend, da die Empfindlichkeit außerordentlich groß ist und die Meßmöglichkeiten mannigfacher sind als bei der üblichen Technik.

Es bestehen folgende prinzipielle Möglichkeiten: Entweder spreitet man das Antigen, bringt den Film (als L-Schicht) auf Blodgettplatten und taucht diese in homologes Antiserum oder zur Kontrolle in Normalserum und mißt die Dicke der daran adsorbierten S-Schicht [siehe ROTHEN und LANDSTEINER (341) und die unten besprochene Arbeit von LANGMUIR und SCHAEFER (266)].

Umgekehrt kann man das Antiserum oder den reinen Antikörper als Film spreiten, auf Platten bringen und in Antigenlösung tauchen (siehe unten die Arbeit von DANIELLI, DANIELLI und MARRACK). Eine dritte Möglichkeit besteht darin, die eine der beiden Komponenten zunächst aus der Lösung heraus an die Platte zu adsorbieren (S-Schicht) und die so präparierte Platte dann in die Lösung der anderen Komponente zu tauchen. Man vermeidet so für die beiden Komponenten die starke Oberflächen denaturierung [LANGMUIR und SCHAEFER (l. c.), PORTER und PAPPENHEIMER (326) und SHAFFER und DINGLE (365)].

BATEMAN, CALKINS und CHAMBERS (siehe unten) bemerken hierzu, daß sie glauben, daß die beiden ersten Fälle aus stereochemischen Gründen nicht ohne Bedeutung für immunbiologische Fragen sind, daß aber der dritte Fall besonders wichtig ist, weil er eine Möglichkeit verspricht, sehr

saubere und quantitative Untersuchungen anzustellen. Sie machen darauf aufmerksam, daß die derzeitigen Schranken nicht in einer mangelnden Eignung des biologischen Systems liegen, sondern in einer mangelnden Eindeutigkeit der optischen Daten bei der interferometrischen Dickenmessung. Einen großen Teil ihrer Arbeit widmen sie daher auch der Verbesserung der optisch-theoretischen Grundlage.

SHAFFER und DINGLE (365) untersuchen so Albumin als Antigen. Die mit einem Albuminfilmm (S-Schicht) versehenen Platten nehmen aus homologem Kaninchenantiserum eine Schicht von 100 Å Dicke auf, aus normalem Kaninchen- oder Pferdeserum oder aus solchen heterologen Seren dagegen nichts. Wenn die Antigen-S-Schicht aus Pneumokokkenkohlenhydrat (Typ III) besteht, nimmt die Platte aus Antiserum vom Kaninchen eine Schicht von 100 Å Dicke auf, aus Antiserum vom Pferd 240 Å, aus Normalserum und heterologem Antiserum nichts. Vier verschiedene Pferdeantisera mit verschiedenem Antikörpergehalt ergaben den gleichen Wert. Die gleichen Versuche mit Typ V und Typ VIII ergaben dagegen, aus Kaninchen- und Pferdeantiserum eine Adsorptionsschicht von jeweils 100 Å. Die Dickenmessungen dürften nur größenordnungsmäßig stimmen, da die verwendete Methode nicht sehr genau ist. Interessant ist, daß die mit einer Schicht Antigenalbumin plus einer Schicht Antikörper beschickte Platte, von neuem in eine Albuminlösung getaucht, die Antikörperschicht darin wieder verliert. Die Antikörpermoleküle können sich offenbar drehen und der neue Symplex kann nicht mehr festgehalten werden.

ROTHEN und LANDSTEINER (341) stellen bei gleichartigen Versuchen fest, daß Ovalbuminfilme auf Blutgettplatten aus homologem Immuns serum Schichten von 40—60 Å, aus heterologem Immuns serum Schichten von 5—14 Å und aus Normalserum Schichten von 2—7 Å adsorbieren (also spezifische Adsorption). Wenn man umgekehrt Immuns serum und normales Serum auf Platten bringt, adsorbieren beide aus Ovalbuminlösungen eine Schicht von 20—30 Å (unspezifische Adsorption). In einer neueren wichtigen Arbeit (341a) finden sie u. a. folgendes: Filme von nativem Globulin auf Wasser reagieren auf Platten gebracht, spezifisch mit Antikörpern gegen natives Globulin, wenn diese Platten in antikörperhaltiges Serum getaucht werden. Wenn man die Globulinfilme auf Wasser stehen läßt, verschwindet diese Reaktionsfähigkeit nach drei Stunden vollkommen: Verunreinigung kam nicht in Frage, da Ovalbuminfilme diesen Alterungseffekt nicht zeigen. Filme von nativem oder denaturiertem Globulin dagegen zeigen sich nach Alterung von 48 Stunden noch aktiv, wenn man Immuns serum gegen denaturiertes Globulin verwendet. Diese Befunde gelten für Filme, die während der Alterungszeit sich beim Schub 0 auf der Wasseroberfläche befanden. Wenn man dagegen zwei Minuten nach

dem Spreiten (während dieser Zeit volle Ausdehnung des Films auf 8—12 Å Dicke wie vorher) den Globulinfilm auf 20 Dyn/cm komprimiert, ist er noch nach 16 Stunden aktiv gegen homologe Antikörper (vor dem Aufziehen auf Träger wieder entspannt). Ein während 16 Stunden komprimierter Film verliert einige Stunden nach der Entspannung seine Aktivität. Durch Alterung inaktivierter Film kann durch Kompression nicht wieder aktiviert werden. — Diese Befunde zeigen auf das Eindringlichste die Möglichkeit, durch Versuche mit Filmen einer Aufklärung der innermolekularen, labilen Bindungen im Proteinmolekül näher zu kommen. Es scheint ein gestuftes und teilweise reversibles Entfalten des Moleküls möglich.¹

Es bleibt zu fragen, warum an eine L-Schicht aus Serum oder Immuns serum relativ soviel Ovalbumin (unspezifisch) adsorbiert wird und an eine L-Schicht von Ovalbumin im Falle des Normalserums oder heterologen Serums so wenig. Beide Male handelt es sich um eine unspezifische Adsorption an gespreitetes, auf Platten fixiertes Protein. Die Autoren gehen auf diese Frage nicht ein. Aus einem Vergleich mit den Ergebnissen von DANIELLI, DANIELLI und MARRACK (96) (auf deren Arbeit sie sich auch, aber in einem anderen Zusammenhang, beziehen) scheint aber hervorzugehen, daß nicht etwa das gespreitete Serumglobulin auf der Platte eine höhere Affinität zum Ovalbumin in der Lösung hat als in dem Fall, wo die Plätze vertauscht sind (man könnte dann vermuten, daß das Spreiten dem Globulin antikörperartige Eigenschaften verleiht), sondern daß irgendein anderer Bestandteil des gespreiteten Serums (Mischfilm Lipoid-Eiweiß?) für die hohe unspezifische Adsorption verantwortlich ist.

Man kann nun an die Frage, ob adsorbiert wird oder nicht, die Überlegung anschließen, welche räumliche Orientierung die Partner haben. Sie ist noch etwas unsicher, weil wir die „funktionelle Gestalt“ der Proteinmoleküle (ebenso wie die geometrische) noch nicht kennen. Man darf aber hoffen, gerade aus solchen Versuchen etwas darüber zu lernen. So untersucht CHAMBERS (87) die Orientierung der Antigen-Antikörperspezifität von Filmen. Filme aus gespreitetem Antigen (hämolytisches Agglutinogen von Streptokokken) werden als A- oder AB-Filme auf Platten gebracht und in Gefäße mit Antiserum plus lebenden Streptokokken getaucht. Nach einer Wirkzeit von 2 Stunden bei 37° wird die Platte gefärbt und die anhaftenden Zellen gezählt. Die mit Antigen bedeckte Plattenoberfläche soll als Modell der Bakterienoberfläche wirken, die Agglutination der Bakterien aneinander konkurriert mit der Agglutination der Bakterien an die Platte hin.

Die hydrophoben AB-Filme reagieren besser mit Antiscrum gegen Nucleoprotein (also spezifisch), die hydrophilen A-Filme besser mit Antiserum gegen ganze Bakterien (also unspezifisch). Die Kontrollversuche

¹ S. Abschnitt 36 h.

sind sehr sorgfältig. CHAMBERS bespricht am Schluß die Gründe, die eine Deutung der Befunde noch als verfrüht erscheinen lassen.

CHAMBERS, BATEMAN und CALKINS (88) untersuchten im Anschluß an diese Arbeit, inwieweit die Vollständigkeit der Spreitung des Antigens von Einfluß auf den Orientierungseffekt ist und welche Wirkung eine Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration hat. Als Antigene werden ein Nucleoproteinagglutinogen (NPA) von hämolytischen Streptokokken und eine phosphorfreie Fraktion daraus (P_6) verwendet. Die Untersuchungstechnik ist die gleiche wie bei CHAMBERS. Es zeigte sich, daß „vollkommen gespreitete“ Filme von NPA und von P_6 in einem weiten pH -Bereich als AB-Filme erheblich mehr Bakterien binden als in Form von B-Filmen. Bei den unvollständig gespreiteten Filmen waren diese Unterschiede viel geringer. Zwischen NPA- und P_6 -Filmen bestanden in beiden Fällen keine Unterschiede. Es scheint so, als ob die Nucleinsäure bei der in diesen Versuchen sich äußernden serologischen Spezifität keine Rolle spielt. Aus dem Vergleich der in Kontrollversuchen optisch gemessenen Schichtdicke der Antigenfilme mit der aus Filmfläche und aufgebraachter Menge berechneten Dicke folgt, daß aus den NPA-Filmen offenbar etwas in Lösung gegangen ist (oder ungespreitet geblieben). Die Verfasser vermuten, daß es sich um freie Nucleinsäure handelt. Bei den P_6 -Filmen stimmen die Dickenwerte überein. Diese Aussagen gelten für vollständig gespreitete Filme. Bei den unvollständig gespreiteten zeigt der Vergleich der Dickenwerte, daß sowohl für NPA- wie für P_6 -Filme die gemessenen Dicken kleiner sind als die berechneten. Es geht aus der Arbeit aber nicht hervor, wie hierbei die der Berechnung zugrunde gelegte, auf $F = 0$ extrapolierte Filmfläche gemessen wurde! Da außerdem das Flächenverhältnis nicht bestimmt wurde (siehe oben) und Kontrollträger und Meßträger aus verschiedenem Material waren, erscheint eine Diskussion unangebracht.

BATEMAN, CALKINS und CHAMBERS (45) untersuchen in einer sehr sorgfältigen Arbeit [siehe auch dieselben (44) und (88)] die Reaktion an Platten, auf denen LANCEFIELDsche M-Substanz (das typenspezifische Protein von *Streptococcus pyogenes*) als A-, B- oder AB-Schicht aufgebracht ist. Es wird Antiserum vom Kaninchen gegen Streptokokken des betreffenden Typs, gegen das eines anderen Typs und gegen Nucleoproteinagglutinogen verwendet, zur Kontrolle dann noch Ovalbumin als Antigen und das homologe Kaninchenantiserum.

Die Verfasser finden, daß die aus Antiserumlösung adsorbierten Schichten mit steigender Serumverdünnung dünner werden. Platten, die aus verdünntem Serum eine Schicht aufgenommen haben, nehmen in konzentriertem Serum nichts mehr zusätzlich auf. Mit zunehmender Verdünnung (bis 1:300) gehen die Schichtdicken von 250 Å (normaler Wert bei unverdünntem Serum) herunter auf einen Grenzwert von etwa 55 Å

und die Adsorptionsdauer für halbe Bedeckung von 5 Minuten auf 30 Minuten herauf. Es könnte sich um eine durch Verdünnung verursachte Desaggregation großer Antikörperteilchen handeln. Die Autoren nehmen das aber trotz der Befunde von GOODNER, HORSFALL und BAUER (161, 162) nicht an. Diese zeigen, daß der Antikörper in verdünntem Serum durch viel feinere Poren läuft als im konzentrierten und daß die relative Wirksamkeit der Antiseren mit zunehmender Verdünnung steigt. Die Autoren machen vielmehr die Asymmetrie der Globulinteilchen verantwortlich [NEURATH (311) gibt für trockenes Kaninchenserumglobulin 274 und 37 Å für lange und kurze Achse an]. Die gefundenen Grenzdicken von 250 und 55 Å passen nicht schlecht zu diesen Werten. Bei Adsorption aus konzentriertem Serum würden sich also die Antikörperteilchen mit der langen Seite normal zur Trägerplatte stellen, in verdünntem Serum dagegen legen. Die Diskussion vieler Fragen, z. B. der bezüglich spezifischer oder unspezifischer Adsorption, verschieben die Autoren auf einen späteren Zeitpunkt. Das Verfahren gestattet, Antikörperkonzentrationen von $4 \cdot 10^{-7}$ g/ccm noch nachzuweisen!

Während in diesen Versuchen das Antigen vor der Reaktion gespreitet, also denaturiert war, und diese Behandlung seine Fähigkeit, mit Antikörper zu reagieren, nicht beeinträchtigte, haben DANIELLI, DANIELLI und MARRACK (96) reinen Pneumokokkenantikörper auf Wasser und an der Grenze fl/fl gespreitet. Er reagierte dann nicht mehr mit dem Antigen (Polysaccharid). Andererseits reagieren Filme von Pferdeserumglobulin nicht mehr mit hochaktivem Kaninchenantiserum.

Das könnte so gedeutet werden: Der erste Befund besagt, daß der Antikörper das Spreiten offenbar nicht verträgt. Der zweite Befund besagt, daß Antigen, wenn es sich dabei um ein *Globulin* handelt, das Spreiten auch nicht verträgt. Und da Antikörper ja aus Globulin besteht, würden alle Befunde zusammen bedeuten, daß Globulin — sowohl als Antikörper wie auch als Antigen — strukturempfindlicher ist als z. B. Ovalbumin. In diesem Zusammenhang sei auf die hochinteressante Arbeit von PAULING und CAMPBELL (320 b) hingewiesen, da offenbar die Möglichkeit besteht, den dort mitgeteilten Befund einer Antikörperbildung in vitro an S-Filmen näher zu analysieren.

Über die Beziehungen zwischen dem Konzentrationsverhältnis von Antikörper (A) und Antigen (G) und der quantitativen Zusammensetzung des Komplexes nach der Reaktion, die in diesem Zusammenhang interessieren, berichten GRABAR und DERVICHIAN (180). Sie finden, daß sich bei Überschuß von A ein Komplex A_6G bildet, in der Äquivalenzzone A_3G , in der Hemmungszone A_3G_2 und bei großem Überschuß von G ein Komplex AG_6 .

Im Zusammenhang mit diesen Versuchen und unter Verwendung des von DERVICHIAN (104a, 105, 105a) vorgeschlagenen Modells für Protein-

moleküle entwickeln DERVICHIAN und GRABAR (105b) eine interessante Theorie der Antigen-Antikörperreaktion, die eine geometrisch-kristallographische Deutung der Spezifität gibt. Entgegen der Vorstellung von PAULING (1940), der mit länglichen Molekülen operiert und sich die Spezifität an deren Enden lokalisiert vorstellt, werden hier scheibenartige Zylinder angenommen, deren Endflächen der Sitz der Spezifität sind. Die freien polaren Gruppen der Aminosäurereste treten zu „Mustern“ zusammen. Von diesen Mustern sind auf jeder der beiden Endflächen drei oder ein Vielfaches davon vorhanden, und zwar in dreizähliger Symmetrie (hexagonale Anordnung). Jedes solche Antigenmolekül kann sich also mit sechs Antikörpermolekülen, die entsprechend vorzustellen sind, verbinden. Die Begriffe chemische Bindung und Adsorption passen beide nicht für die Art dieser Verbindung. Jedes Muster wirkt gewissermaßen als eine Valenz. Wenn in dem Protein viele verschiedene Aminosäuren mit freien polaren Gruppen enthalten sind, ist das Muster groß und die Spezifität hoch, wenn weniger darin sind, ist das Muster kleiner und die Spezifität entsprechend geringer. Schließlich können auf jeder Endfläche auch mehrere verschiedene Muster vorhanden sein, jedes davon aber in Dreizahl.

42. Filme an der Grenze fl/fl.

Angeregt durch die Untersuchungen von HARVEY und SHAPIRO (211) und DANIELLI und HARVEY (97) über die Öltropfen in marinen Eiern hat DANIELLI (95) eine Reihe von Proteinen (Ovalbumin, Pepsin, Trypsin, Hämoglobin, Serumglobulin und Sturin) an der Grenze Brombenzol/Wasser untersucht.

Aus den oben genannten Untersuchungen hatte sich ergeben, daß an der Grenze Öl/Wasser in den Zellen und an den Zellmembranen lebender Zellen äußerst geringe Oberflächenspannungen herrschen (Größenordnung 1 Dyn/cm). Das deutet auf eine Eiweißmembran hin. (Siehe den oben angeführten Kippversuch von DEVAUX, Abschn. 36 d.)

DANIELLI bespricht nur die Ergebnisse mit Ovalbumin näher, da es ein auch für andere Proteine typisches Verhalten zeigt. Die F/A -Kurve ist im Prinzip die gleiche wie an der Grenze Wasser/Luft, sie ist aber in Richtung größerer spezifischer Flächen verschoben. Die Spreitung an der Grenze Wasser/Öl geht schnell vor sich und der Schub stellt sich bald auf einen konstanten Wert ein.

Die p_H -Abhängigkeit der Fläche zeigt ein den GORTERSchen Kurven komplementäres Verhalten. Die Flächen sind bei jedem p_H größer als an der Grenze Wasser/Luft, aber beim I. E. P. liegt nicht ein Maximum, sondern ein Minimum. Dieser Verlauf ist, wie wir oben auseinandergesetzt haben, zu erwarten. Rechts und links vom I. E. P. ist die Zahl der ionisierten Gruppen gleicher Ladung größer als beim I. E. P. und damit auch die abstoßenden Kräfte im Film.

LANGMUIR und WAUGH (274) haben, angeregt durch den DEVAUXschen Kippversuch, eine Ovalbuminlösung mit Benzol überschichtet und durch die Grenzfläche eine Platindrahtschlinge getaucht. Über diese zog sich dabei ein Eiweißdoppelfilm, der aber sehr kurzlebig war. Zugabe von etwas Lecithin zum Benzol machte solche Filme viel haltbarer. Sie enthalten dann zwischen den beiden Eiweißschichten offenbar noch zwei Lipoidschichten. Weitere Anwendungsmöglichkeiten wurden nicht untersucht.

ALEXANDER und RIDEAL (32) messen F/A -Kurven an der Grenzfläche von Serumalbumin- oder Gliadinlösungen gegen Benzol. Bei geringem Schub sind die Flächen viel stärker expandiert als an der Grenze Wasser/Luft. Die gefundenen Kurven lassen sich durch eine Gleichung $(F - F_0)(A - A_0) = C$ darstellen. Übergang von der Grenze Wasser/Luft zur Grenze Wasser/Benzol beseitigt die Schubkorrektur F_0 , läßt aber die Flächenkorrektur A_0 bestehen. Das erscheint verständlich, da sich im zweiten Fall die VAN DER WAALSschen Kräfte, die für F_0 verantwortlich sind, im Benzol betätigen können.

43. Struktur der Filme.

Das, was wir mit Sicherheit aus den geschilderten Untersuchungen an Eiweißfilmen entnehmen können, ist folgendes: Eine Anzahl von Proteinen verändert sich beim Berühren der Moleküle mit einer Grenzfläche Wasser/Luft so, daß aus den rundlichen Teilchen flache, im extremen Falle so flache Gebilde werden, wie sie der Dicke von Polypeptidketten entsprechen. Eine ähnliche Deformierung geschieht an der Grenzfläche Wasser/Öl. Der Grad der Deformierung ist davon abhängig, wieviel Fläche zur Ausdehnung dem Protein zur Verfügung gestellt wird. Die Veränderung der Moleküle an der Grenzfläche Wasser/Luft ist für völlig gespreitete Filme irreversibel: Vollgespreitete Filme gehen nicht wieder in Lösung. Die Hilfsmittel, die man anwenden muß, um schlecht spreitende Filme zum Spreiten zu veranlassen, deuten darauf hin, daß die Deformierung durch eine Lösung innerer Bindungen bewirkt wird, die nicht identisch sind mit den Bindungen in der Polypeptidkette.

Einen mehr hypothetischen Charakter haben die Vorstellungen, die sich die Autoren über das intimere Verhalten der entfalteten Moleküle unter den verschiedenen Schuboberflächenbedingungen machen. LANGMUIR und SCHAEFER (271) schreiben: „Proteinfilme bestehen im wesentlichen aus Polypeptidketten, die an der Grenze Luft/Wasser durch ihre hydrophoben Seitenketten verankert sind. Die Struktur ist gleich der eines Netzes, das man durch Korken, die entlang der Oberfläche verteilt sind, an der Wasseroberfläche angeheftet hat. Die hydrophoben Teile der Polypeptidketten tauchen ins Wasser, aber sind nicht frei, um sich ganz von der Oberfläche zu entfernen, da sie an der Hauptkette angeheftet

sind. Die hydrophoben Gruppen suchen sich auf Grund ihrer BROWNSchen Bewegung wie die Moleküle eines zweidimensionalen Gases an der Oberfläche auszubreiten, jedoch ist diese Expansion gehemmt durch die elastischen Eigenschaften der Hauptketten, die durch die Flexibilität bedingt werden. Quantitative Untersuchungen der Viskosität, Kompressibilität, Elastizität usw. von Proteinfilmern werden sehr dazu helfen, nicht nur die Struktur der Filme, sondern auch die der nativen Moleküle aufzuklären.“

NEURATH und BULL erörtern in ihrer Zusammenfassung (l. c.) eine Reihe von Arbeiten, aus denen hervorzugehen scheint, daß die Filme in ihrer vollexpandierten Form aus Polypeptidketten nach Art des β -Keratin-typs bestehen, d. h. die Aminosäuren flach ausgestreckt an der Oberfläche liegen. Wenn die Länge der Peptidbausteine in Kettenrichtung mit 3,5 Å angenommen wird und die mittlere Länge der Seitenketten mit 4,5 Å, und man eine alternierende Anordnung der Seitenketten zuläßt, berechnet sich pro Aminosäure ein Mindestflächenbedarf von 31,5 Å². Die gefundenen Werte für diesen Flächenbedarf liegen für Eialbumin bei 27,5 Å², Insulin 33,0 Å², Serumalbumin 32,0 Å², Gliadin 32,8 Å², Cytochrom C 30,6 Å². Sie stimmen alle mit dem zu erwartenden Wert gut überein. Für gewisse Eiweißstoffe ist gefunden worden, daß sie schon bei kleinen Drucken stark zusammenhängende Filme bilden. Das wird auf die anziehende Wirkung benachbarter polarer Seitenketten in der Polypeptidkette zurückgeführt. Die Dicke eines vollexpandierten Films berechnet sich aus den Flächenmessungen zu etwa 5 Å, wenn man die Dichte = 1,3 setzt. Das stimmt gut überein mit den interferometrisch gemessenen dünnsten Schichtdicken. Die Veränderungen im Film bei Kompression eines vollexpandierten Films hat man sich so vorzustellen, daß die flachliegenden Moleküle zunächst einander genähert werden, daß sich dann die polaren und apolaren Seitenketten nach unten und oben richten und daß sie schließlich bei höheren Drucken ganz gestreckt nebeneinanderliegen. In diesem Zustand machen sich die VAN DER WAALSSchen Kräfte schon stark bemerkbar. Der Punkt der maximalen Elastizität ist überschritten, die Viskosität stark angestiegen. In diesem Gebiet scheint auch eine Dehydratation des Filmmaterials stattzufinden. Stereochemische Überlegungen unter Beachtung des Valenzwinkels scheinen eine Faltung der Polypeptidkette bei Kompression auszuschließen. Weder das β -Keratin noch das superkontrahierte Keratin (ASTBURY), noch irgendeine andere Ringstruktur lassen genügend Raum für die vertikal orientierten Seitenketten und würden zu kleineren Flächen führen, als sie in Wirklichkeit beobachtet worden sind. RIDEAL (336), PHILIPPI (324) und MITCHELL (295) haben eine sich an die LANGMUIRSche Theorie der expandierten Filme anschließende Vorstellung entwickelt, nach der man einen Proteinfilm als einen Triplexfilm betrachten kann, dessen obere Schicht aus den

apolaren Seitenketten sich wie eine Art Kohlenwasserstoffschicht mit niedrigen Dielektrizitätskonstanten und einer Dicke von etwa 3,5—4 Å verhält. Die mittlere Schicht wird durch die stark hydratisierten Hauptketten gebildet und die untere Schicht durch die polaren Seitenketten, die schon der wäßrigen Phase zuzurechnen sind. Stereochemische Betrachtungen dieser Art finden sich in den Arbeiten von COCKBAIN und SCHULMAN (94), HUGHES und RIDEAL (226).

In einer neueren experimentell und theoretisch interessanten Arbeit beschäftigen sich LANGMUIR und WAUGH (275) mit dem Phänomen der Filmalterung und der Stabilisierung durch Herauspressen von löslichen Komponenten aus dem Film in die Lösung hinein. Die Molekulargewichte dieser löslichen Bruchstücke werden zu 1000—2000 berechnet. Ferner umreißen sie eine Theorie der *F/A*-Kurven auf Grund des Verhaltens der sog. *verdrängbaren Komponenten*, d. h. der schwach hydrophoben Seitenketten aus dem Film in die oberste Wasserschicht hinein. Sie finden, daß man am gleichen Film gut reproduzierbare *F/A*-Kurven bekommt, wenn man durch längere Kompression alle löslichen Anteile aus dem Film preßt.

Filme von vorher denaturiertem oder unverdaulichem Protein haben einen großen drucklöslichen Anteil. Die Mengen können gemessen und so eine Denaturierung verfolgt werden.

Die Theorie der verdrängbaren Komponenten führt zu einer Beziehung zwischen dem Verhalten bei Kompression und dem Prozentgehalt an den einzelnen Aminosäuren. Die Seitenketten mit einer Löslichkeit, die derjenigen von $-C_2H_5$ entspricht (und größer), bestimmen das *F/A*-Verhältnis in dem Schubintervall von 1—3 Dyn/cm. Die Seitenketten mit kleinerer Löslichkeit (die auch bei hohem Schub in der obersten Filmschicht bleiben) bestimmen die Flächengröße in der Gegend von 25 Dyn/cm. Zwischen ihnen werden dann die VAN DER WAALSSchen Kräfte wirksam, die das gelartige Verhalten der komprimierten Filme bedingen. Die Unterschiede in dem Gehalt an einzelnen Aminosäuren bestimmen die Unterschiede in dem *F/A*-Verhalten der verschiedenen Proteine.

Diese Arbeit erscheint deswegen so wichtig, weil sie einen Zusammenhang herstellt zwischen dem chemischen Bruttoaufbau der Proteine und einer leicht meßbaren Kurve *an Filmen* aus diesen Proteinen, d. h. an den völlig auseinandergefalteten Makromolekülen, wobei *jeder Einzelbaustein* (Aminosäure) seinen Beitrag liefert. Das ist bei Messungen solcher Zusammenhänge am nativen Molekül — z. B. der Kataphorese — wohl nicht immer der Fall.

DERVICHIAN (104) entwickelt auf Grund seiner Untersuchungen eine Theorie der Filmstruktur, die besagt, daß das Spreiten eine Keratinisierung des Proteinmoleküls veranlasse. Als Stütze führt er das Anwachsen der Viskosität beim Spreiten an.

Weiteren Aufschluß über die Struktur der Filme hat man zu erlangen versucht durch Spreitung eines Tripeptids aus α -Amino-Caprylsäure (172). Die eingenommene Fläche ist p_H -abhängig. Beim I. E. P. gespreitet ist der Flächenbedarf pro Molekül 93 \AA^2 . Mit senkrechtstehenden Seitenketten würde man einen theoretischen Flächenbedarf von 50 \AA^2 , mit flachliegenden einen solchen von 116 \AA^2 haben. Die Moleküle liegen also annähernd flach.

DERVICHIAN (104) findet in einer interessanten Arbeit, daß, wenn bei α - und β -Filmen (Abschn. 36 i) das Flächenverhältnis A_W, A_P (A_W = Fläche auf Wasser; A_P = Fläche auf Platte) bestimmt wird, so ergibt sich für β -Filme ein Wert von 1 und bei Serumalbumin für α -Filme bei $0,1 \text{ Dyn/cm}$ ein maximaler Wert von 2, der bei noch kleineren Drucken wieder sinkt. Das heißt offenbar, daß die α -Filme beim Aufbringen auf eine Platte sich nicht, wie man erwarten sollte, dehnen, sondern daß die Moleküle während des Aufbringens auf die Platte aneinanderrücken. Dieser Befund erscheint höchst eigenartig und sagt offenbar etwas aus über die Wirkung der anziehenden Kräfte der Stearatunterlage oder der Filmbestandteile untereinander in dem Moment, wo beim Austauschen zwischen Film und Unterlage das Wasser verschwindet.

ALEXANDER und RIDEAL (33) machen darauf aufmerksam, daß man durch Untersuchung von Filmen aus Amid- und Ureiden darauf schließen kann, daß die Wasserstoffbindung, wie sie von ASTBURY¹ für die Proteinstruktur gefordert wird, bei Filmen von Stoffen mit $-\text{CO}\cdot\text{NH}$ -Gruppen und auch bei einfachen Säuren eine entscheidende Rolle spielt und daß man ihre Art und Größe gerade in Filmuntersuchungen sehr gut bestimmen kann.

In einer neueren diesbezüglichen Arbeit (31a und b) untersucht ALEXANDER die Wasserstoffbindung in Filmen von Harnstoffderivaten, Amid- und Acetaniliden, einfachen Säuren und α -Aminosäuren genauer. Als Beispiel diene folgendes Schema² (S. 462) aus dieser Arbeit.

Ebenso deuten bei m-Filmen gleicher Kettenlänge aber verschiedener Endgruppe die Dehnungstemperaturen (t') (die die Temperatur der halb-vollendeten Dehnung für einen Standardschub von $1,4 \text{ Dyn/cm}$ angeben) auf die Bedeutung der Wasserstoffbindung für die Art des kondensierten Zustandes hin, denn sie zeigen (Tabelle 13), daß bei solchen Endgruppen, zwischen denen eine intermolekulare Wasserstoffbindung möglich ist, t' höher liegt als bei denen, wo eine solche Bindung nicht möglich ist.

¹ Siehe dessen neuere Übersicht hierüber (41a).

² Das Anwachsen von μ vom Wert 302 auf 390 m-Debye ist durch die immer stärkere Ausbildung der Wasserstoffbindung verursacht [„ionenähnliche“ Bindung nach PAULING (320a)] Wenn man beachtet, daß von $1 \rightarrow 2$ der $:\text{C}=\text{O}$ Dipol seine Lage nicht ändert, sein Beitrag zu μ aber von $2 \rightarrow 3$ ganz entfällt, d. h. negativ wird, erkennt man, wie stark der Beitrag der H-Bindung an μ auf dem Wege von $2 \rightarrow 3$ zunimmt!

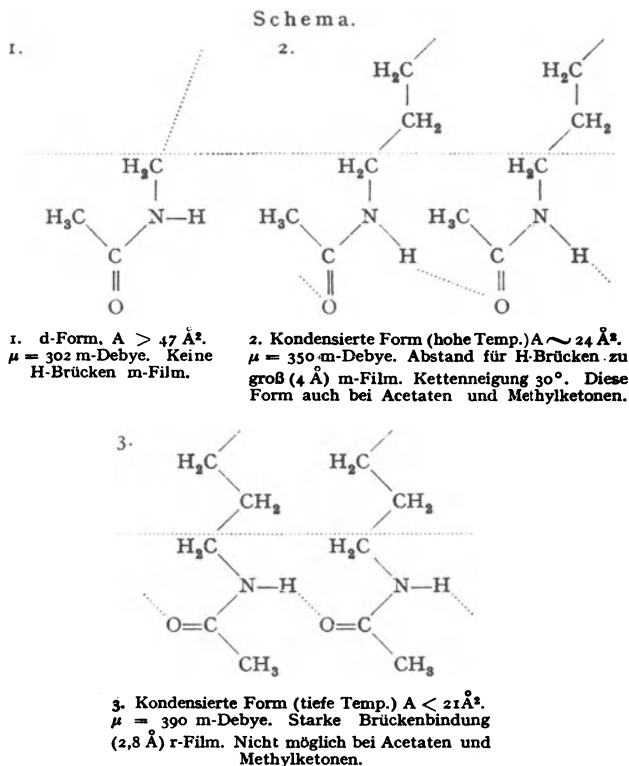


Tabelle 13 [aus ADAM (1) S. 64 und ALEXANDER (31b)].
(Die Kettenlänge ist in allen Fällen $C_{16}H_{33}$, der Schub $1,4 \text{ Dyn/cm.}$)

Endgruppe	t' in $^\circ\text{C}$	Art des Films im kondensierten Zustand
—OCOCH ₃	20	m
—COCH ₃	33	m
—COOCH ₃	34	m
—COOH	37,5	m/r
—CHNOH	42	r
—CONH ₂	44	r
—NHCONH ₂	48	r

Der Flächenbedarf der Substanzen auf Substrat von verschiedenem p_H (Abschnitt 4) und ihr ΔV -Verhalten lassen sich durch die Art der Wasserstoffbindung deuten.

Die Wasserstoffbindung wirkt stabilisierend im Film, denn es läßt sich zeigen, daß bei den Acetamiden der Unterschied der freien Energien einer —CONH-Gruppe, die (in m-Filmen) H-Brücken zum

Wasser hin hat, zu einer solchen, die (in r-Filmen) mit ihresgleichen H-Brücken bildet, etwa 800 cal Mol beträgt.

Auf solche Untersuchungen aufbauend, läßt sich die Art der Wirkung von Harnstoff auf die Keto-Imino-H-Brücken im Eiweißmolekül untersuchen. Je nach der Art der zum Filmbau verwendeten Modells substanz kann man so vielleicht auch die anderen, im Proteinmolekül vorhandenen Bindungstypen einzeln genauer untersuchen.

Eine weitere Methode, die offenbar geeignet ist, Aufschluß über die Filmstruktur zu geben, ist die Untersuchung der Verdampfungsgröße des Wassers durch einen Film hindurch. Weiter oben wurde auf diese Methode schon eingegangen und die Technik beschrieben. SEBBA und BRISCOE (364) stellen fest, daß der Widerstand, den ein gespreiteter Film der Wasserverdampfung entgegensetzt, eine sehr spezifische Eigenschaft des Filmbildners ist. Sie finden, daß Eialbumin zu den Stoffen gehört, die auch unter hohem Schub keine praktisch merkbare Verdampfungsminderung bewirken. Ein Eialbumin film gab bei 21 Dyn/cm noch keinen merkbaren Effekt, während Cetylalkohol bei 22 Dyn/cm eine merkliche Verringerung bewirkt und n-Docosanol bei 23 Dyn/cm die Verdampfung auf 17% herabsetzt! Mit höheren Drucken konnte bei Eiweiß aus technischen Gründen nicht gearbeitet werden. Es wäre interessant, bei verschiedenen Eiweiß- und Lipoproteinfilmen unter höherem Schub auf verschiedenen Substraten die Verdampfungswerte zu messen. Sie besagen ja etwas über die Durchgängigkeit solcher Filme für Wassermoleküle und fordern zu Vergleichen mit der Zellmembran heraus.

IV. Ausblick.

Daß in dieser Übersicht so heterogene Dinge wie Thermodynamik zweidimensionaler Systeme, Volumpolarisation von Schichtkristallen, Konstitutionsermittlung bei Sterinen, Temperaturregulation bei Warmblütern, Antikörper-Antigenreaktion und Wasserstoffbindung gleichberechtigt nebeneinander auftauchen, zeigt zunächst, daß es sich offenbar um ein Gebiet handelt, in dem Physik, Chemie und Biologie sich mit ihren Interessen überschneiden, also um ein wirkliches Grenzgebiet. Und doch wird in dem unbefangenen Beschauer der Gedanke sehr lebendig geworden sein, daß die Beziehungsarmut der Fragestellungen untereinander nur in der Ebene der Zweckdienlichkeit existiert, daß aber in der eigentlich wissenschaftlichen Ebene gedanklich und methodisch das ganze Gebiet sich um den Begriff der Grenzfläche als um ein natürliches Zentrum ordnet. Und diese Ordnung wird um so beziehungsreicher und lebendiger werden, je mehr es uns gelingt, den Begriff der Grenzfläche durch wachsende Experimentierkunst und theoretische Beherrschung zu vertiefen. Daß er als Strukturelement im Aufbau der unbelebten und vor allem der belebten Materie

eine entscheidende Rolle spielt, ist seit langem klar geworden. Wir durchleben zur Zeit einen Abschnitt der wissenschaftlichen Entwicklung, in dem die Grenzflächenforschung sich theoretisch und methodisch zu einem selbständigen Forschungsgebiet auswächst. Die Berechtigung dieser Selbständigkeit gründet sich auf die Tatsache, daß man mit wenigen und allgemeinverständlichen Worten den wesentlichen Inhalt des zentralen Prinzips angeben kann. So wie sich die Physik mit der Verwandlung der Energieformen und die Chemie mit der Verwandlung der Stoffe beschäftigt, so die Grenzflächenforschung mit der Bedeutung der Grenzflächen für die Umwandlung von Energien und Stoffen. Grenzfläche bedeutet eine ganz bestimmte Art von Strukturierung der Materie, die dadurch ausgezeichnet ist, daß in der Grenzfläche in der Erstreckung zweier räumlicher Dimensionen makrophysikalische Betrachtung, also im wesentlichen klassische Physik, in der dritten Dimension dagegen mikrophysikalische Betrachtung, also im wesentlichen statistische und Quantenphysik erforderlich sind. In diesem Sinne darf man in Abwandlung von OSTWALDS bekannter Formulierung geradezu von einer „Welt der inkommensurablen Dimensionen“ sprechen.

Eine Grenzfläche ist der Ort besonderer Kräfte, unter deren Einfluß in zweidimensionaler Erstreckung eine Ordnung oder Umordnung der Elementarbausteine zustandekommt. Diese weniger abstrakte Formulierung des zentralen Prinzips läßt auch erkennen, warum gerade von Seiten der Biologie der Grenzflächenforschung so hohe Bedeutung beigemessen werden muß. Die lebende Substanz zeigt — in mehreren lebendig verwobenen Stufen — höhere Formen der Ordnung als die unbelebte Materie in ihrer gewöhnlichen dreidimensionalen Erscheinungsform. Die unterste dieser Stufen — im Anorganischen schon vorhanden, im Organischen unentbehrlich — ist nun offenbar die Strukturierung durch Grenzflächenbildung und als unmittelbare Folge davon die Orientierung von Molekülen und Steuerung von Reaktionen. Auf dem Wege von der unbelebten *Reaktion* zur lebendigen *Funktion* ist das Grenzflächenprinzip vielleicht die entscheidende Stufe.

Wenn wir nun noch einmal abschließend überblicken, was die bisherige Arbeit ergeben hat, und abzuschätzen versuchen, in welcher Richtung die weitere Entwicklung gehen wird, ergibt sich etwa folgendes Bild: In keiner der vielen Einzelrichtungen ist auch nur annähernd ein Abschluß erreicht, alles ist noch im Fluß. Am weitesten scheint die systematische Durchprüfung des thermodynamischen Verhaltens von Filmen organischer Substanzen an Wasseroberflächen fortgeschritten zu sein. Wir finden ein dem Dreidimensionalen ähnliches Verhalten und bemerken, daß man Stoffe in Form von Filmen mit besonders einfachen Mitteln unter extreme oder neuartige Bedingungen bringen und auf besonders durchsichtige Art Feinheiten in der Änderung des molekularen Ord-

nungsgefüges in sterischer wie energetischer Hinsicht untersuchen kann.

Die ursprünglichen vereinfachenden Vorstellungen über die ideale Unordnung der unmittelbar der Grenzschicht anliegenden Flüssigkeit werden mit wachsender Kenntnis von der Struktur der Flüssigkeiten sich verwandeln zu einem Bild von der Wechselwirkung zwischen Grenzfläche und Phaseninnerem.

Die Untersuchung von Bewegungs- und Diffusionsvorgängen innerhalb der Grenzschichtebene ebenso wie das Verhalten von Filmen zwischen zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten befindet sich erst in den Anfängen und ist — vor allem für biologische Probleme — von großer Bedeutung.

Im Zusammenhang mit modernen quantentheoretischen Betrachtungen (JORDAN)¹ über die Verstärkerfunktion des Organismus (d. h. die Aussage, daß vom akasalen mikrophysikalischen eschehen aus makrophysikalische, kausale Vorgänge im Organismus gesteuert werden können) erscheint die weitere Verfolgung der Grenzflächenforschung in Richtung Grenzlinie und Grenzpunkt wichtig und interessant.²

Die hier behandelten elektrischen Erscheinungen an Phasengrenzen gehören, von der Seite der Physik her gesehen, zusammen in ein großes Gebiet mit den Erscheinungen der Elektrostatik, der Elektrokinese, der lichtelektrischen und thermoelektrischen Erscheinungen. Es ist anzunehmen, daß auf den Physiker in diesem speziellen Untergebiet noch manches Neue und Wertvolle wartet. Andererseits ist es nicht zweifelhaft, daß von hier aus mit mehr Erfolg als von anderen Seiten her die bioelektrischen Erscheinungen einer Aufklärung näher gebracht werden können.

Das besondere Verhalten der Eiweißkörper an Grenzflächen, das sich u. a. in einer Entfaltung des Moleküls beim Spreiten äußert, machte ein eigenes Kapitel der Darstellung notwendig. Die Gesetzmäßigkeiten dabei sind aber prinzipiell keine anderen als bei den übrigen spreitenden Substanzen. In einer späteren Übersicht dürfte dieses Kapitel im Rahmen einer Darstellung über die Spreitungseigenschaften makromolekularer Stoffe eingegliedert sein. Die experimentellen Beiträge dazu sind aber noch so gering an Zahl, daß es zunächst gerechtfertigt schien, die große Zahl der Arbeiten über Eiweißfilme für sich zusammenzufassen. Es sei hier nochmals auf die interessante Tatsache hingewiesen, daß Virus-eiweiß sich beim Spreiten anders verhält als die übrigen Proteine. An

¹ Siehe z. B. „Die Physik und das Geheimnis des organischen Lebens“, Vieweg 1943.

² Im Zusammenhang damit sei auf eine soeben erschienene Arbeit von HEYMANN und YOFFE (215a) hingewiesen, in der die Grenzlinie Öllinse/filmbedeckte Wasseroberfläche/Luft als Potentialwall aufgefaßt und einer statistischen Betrachtung unterworfen wird

vielen Stellen zeichnen sich Möglichkeiten ab, die gewonnenen Erkenntnisse technisch nutzbar zu machen, z. B. Wirkstoffe zu reinigen, auf ihren Reinheitsgrad zu prüfen oder Heilstoffe oder Gifte in abgestufter, meßbarer Weise zu modifizieren bzw. zu schwächen. Großen Erfolg darf man sich auch von der weiteren Bearbeitung serologischer Fragen mit der Grenzflächentechnik versprechen.

Bezüglich der Methodik steht der erfinderischen Phantasie auf dem Grenzflächengebiet noch ein besonders schönes Betätigungsfeld offen. Das lehren die vielen Arbeiten aus dem LANGMUIRSchen Laboratorium. Die Verwendung der K-Filme als Untersuchungsgegenstand und Hilfsmittel der Untersuchung scheint in dieser Hinsicht sehr ergiebig zu sein. Von rein chemischem Gesichtspunkt aus ist auffallenderweise bisher kaum davon Gebrauch gemacht worden [siehe dagegen BEISCHER und ÖCHSEL (49)]. Vielleicht liegt das daran, daß die Theorie und Methodik des Grenzflächengebietes dem physikalischen Denken und Arbeiten näher liegen als dem chemischen, und doch wird gerade der Chemiker oder Physikochemiker durch die Möglichkeit der Orientierung einzelner Moleküle und wegen ihrer übersichtlichen Zugänglichkeit bei vielen Fragen mit Erfolg Gebrauch von dieser Methodik machen können. Probleme der Strukturchemie, der Affinitätslehre und Reaktionskinetik lassen sich vermutlich besonders klar auf diese Art angehen. Es sei erinnert an die Untersuchungsmöglichkeit der einzelnen Bindungstypen des Eiweißmoleküls.

Für den Biochemiker scheint in der Verwendung der Grenzflächentechnik ein besonderer Vorteil darin zu liegen, daß er nur außerordentlich geringe Substanzmengen zur Untersuchung braucht. Es dürfte möglich sein, in einzelnen Fällen die Nachweisbarkeitsgrenze in Konzentrationsgebiete zu verschieben, die sonst nur mit biologischen Testen erreicht werden.

In ihrer Anwendung auf biologische Probleme wird die Grenzflächenforschung zu einer Art „submikroskopischer Physiologie“ (oder „Strukturphysiologie“) führen, die zu der „submikroskopischen Morphologie“¹ in der gleichen Beziehung steht wie die Physiologie zur Anatomie. Die Zusammenarbeit beider Richtungen wird viel zu dem Bemühen beitragen, elementare Lebensprozesse aufzuklären. Je näher wir der Lösung dieser analytischen Aufgabe kommen, um so besser wird dadurch unser chemisches Rüstzeug für die Nachahmung und Abwandlung natürlicher Synthesen.

¹ Deren Methoden im wesentlichen die polarisationsoptische, die röntgenoptische und elektronenmikroskopische Analyse sind. Siehe dazu das Buch von FREY-WYSSLING (134), das im übrigen eine Fundgrube von Anwendungsmöglichkeiten der Grenzflächenforschung auf biologischem Gebiet ist. R. NILSSON betitelt eine Übersicht über seine neueren Arbeiten (312a): „Über die Bedeutung der Struktur für den harmonischen Verlauf des Stoffwechsels in der Zelle.“

Diese Arbeit wurde wesentlich dadurch gefördert, daß mir Herr Professor BUTENANDT in verständnisvoller und großzügiger Weise Gelegenheit gegeben hat, während meiner Zugehörigkeit zum Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem (1940) einen Teil der Literatur durchzuarbeiten. Seiner Anregung verdankt die Arbeit auch ihre Entstehung.

Literaturverzeichnis.¹

1. ADAM: The Physics and Chemistry of Surfaces, 2. Aufl. Oxford, 1938.
- 1a.— Kolloid-Z. **61**, 168 (1932).
2. — Trans. Faraday Soc. **29**, 90 (1933).
3. —, ASKEW u. PANKHURST: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **170**, 485 (1939).
4. — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **99**, 336 (1921).
5. — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **101**, 452 (1922).
6. — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **101**, 516 (1922).
7. — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **103**, 676 (1923).
8. — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **103**, 687 (1923).
9. — and DYER: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **106**, 694 (1924).
10. — u. JESSOP: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **110**, 423 (1926).
11. — — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **112**, 362 (1926).
12. — — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **112**, 376 (1926).
13. —, BERRY u. TURNER: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **117**, 532 (1928).
14. — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **119**, 628 (1928).
- 14a.— u. JESSOP: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **112**, 363 (1926).
15. — — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **120**, 473 (1928).
16. — u. ROSENHEIM: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **126**, 25 (1929).
17. — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **126**, 366 (1930).
18. — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **126**, 526 (1930).
19. — u. HARDING: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **138**, 411 (1932).
- 19a.—, DANNIELLI, HASLEWOOD u. MARRIAN: Biochemic. J. **26**, 1233 (1932).
20. — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **140**, 223 (1933).
21. — u. MILLER: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **142**, 401 (1933).
22. — — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **142**, 416 (1933).
23. — u. HARDING: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **143**, 104 (1933).
24. —, DANNIELLI u. HARDING: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **147**, 491 (1934).
25. —, — u. a.: Biochemic. J. **26**, 1233 (1932).
27. ADDINK: J. chem. Physics **2**, 574 (1934).
28. — u. RIDEAL: J. chem. Physics **2**, 144 (1934).
29. ALEXANDER: J. chem. Soc. (London) **1937**, 1813.
30. — J. chem. Soc. (London) **1939**, 177.
31. — Trans. Faraday Soc. **37**, 15, 192 (1941).
- 31a.— Trans. Faraday Soc. **37**, 426 (1941).
- 31b.— Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **179**, 470 (1942).
- 31c.— Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **179**, 486 (1942).
- 31d.— Trans. Faraday Soc. **37**, 117 (1941).

¹ Anmerkung beim Umbruch (5. November 1944): Da seit der Abgabe des Manuskriptes über ein Jahr verstrichen ist, war es nicht möglich, alle in diesem Jahre dem Verfasser zur Kenntnis gekommenen Veröffentlichungen ausführlicher im Text zu verarbeiten. Dies ist nur bei den wichtigsten geschehen, auf die anderen wird nur hingewiesen.

33. ALEXANDER u. RIDEAL: *Nature (London)* **147**, 541 (1941).
34. — u. SCHULMANN: *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A* **161**, 115 (1937)
- 34a. — u. TEORELL: *Trans. Faraday Soc.* **35**, 727 (1939).
35. —, TEORELL u. ABORG: *Trans. Faraday Soc.* **35**, 1200 (1939).
36. ALTY u. MACKAY: *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A* **149**, 104 (1935)
37. ANDAUER u. LANGE: *Handbuch der Experimentalphysik* **12/2**, S. 310.
38. ANDREAS, HAUSER u. TUCKER: *J. physic. Chem.* **42**, 1001 (1938).
39. ARIYAMA: *Bull. chem. Soc. Japan* **12**, 335 (1937).
40. ASKEW u. DANIELLI: *Trans. Faraday Soc.* **36**, 785 (1940).
41. ASTBURY, BELL, GORTER u. v. ORMONDT: *Nature (London)* **142**, 33 (1938).
- 41a. — *Trans. Faraday Soc.* **36**, 871 (1940).
- 41b. — *Ann. Reports on the Progress of Chemistry* **35**, 198 (1938)
42. BAKKER: *Z. physik. Chem., Abt. A* **171**, 49 (1934).
43. BALLENTIN: *Science* **89**, 301 (1939).
44. BATEMAN, CHAMBERS u. CALKINS: *J. Immunology* **39**, 511 (1940)
45. —, CALKINS u. CHAMBERS: *J. Immunology* **41**, 321 (1941).
46. — u. CHAMBERS: *J. chem. Physics* **7**, 244 (1939).
47. — — *J. physic. Chem.* **45**, 209 (1941).
48. BAYLISS: *Interfacial Forces and Phenomena in Physiology*. London, 1923
49. BEISCHER u. OECHSEL: *Z. Elektrochem. angew. physik. Chem.* **49**, 310 (1943)
50. BERGOLD u. BRILL: *Kolloid-Z.* **99**, 1 (1942).
51. BERNAL: *Nature (London)* **129**, 870 (1932).
52. BERNSTEIN: *Nature. J. Amer. chem. Soc.* **60**, 1511 (1938).
- 52a. BIKERMAN: *Kolloid-Z.* **72**, 100 (1935).
53. — *Trans. Faraday Soc.* **34**, 800 (1938).
54. — *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A* **170**, 130 (1939)
55. — *Trans. Faraday Soc.* **36**, 412 (1940).
56. — u. SCHULMAN: *Physic. Rev.* **53**, 909 (1938).
57. BLODGETT: *J. opt. Soc. America* **24**, 313 (1934).
58. — *J. Amer. chem. Soc.* **56**, 495 (1934).
59. — *J. Amer. chem. Soc.* **57**, 1007 (1935)
60. — *Physic. Rev.* **51**, 964 (1937).
61. — *J. physic. Chem.* **41**, 975 (1937).
62. — *Science* **1939**, 60.
63. — *Physic. Rev.* **57**, 921 (1940).
64. — u. LANGMUIR: *Physic. Rev.* **51**, 964 (1937).
65. BOUHET: *Ann. Physique* **15**, 5 (1931).
66. BOWDEN, PIRIE, BERNAL u. FANKUCHEN: *Nature (London)* **138**, 1051 (1936).
67. —, —, —, — *Nature (London)* **139**, 923 (1937).
68. BOYD u. HARKINS: *J. Amer. chem. Soc.* **61**, 1188 (1939).
69. BRADLEY: *Philos. Mag. J. Sci.* **8**, 202 (1929).
70. — *Trans. Faraday Soc.* **36**, 392 (1940).
71. — *Trans. Faraday Soc.* **36**, 999 (1940).
72. BRAIN, BACON u. BRUCE: *J. chem. Physics* **7**, 818 (1939).
73. BRESSLER u. TALMUD: *Physik. Z. Sowjetunion* **4**, 864 (1933).
74. —, — u. JUDIN: *J. physic. Chem.* **14**, 801 (1940).
75. BRILL: *Z. Elektrochem. angew. physik. Chem.* **44**, 459 (1938).
76. — u. MEYER: *Z. Kristallogr., Mineral., Petrogr. Abt. A* **67**, 570 (1928)
77. BRINKMANN u. SZENT GYÖRGYI: *Biochem. Z.* **139**, 261 (1923).
78. BRUCE: *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A* **171**, 411 (1939).
79. BÜCHNER, KATZ u. SAMWELL: *Z. physik. Chem., Abt. B* **5**, 327 (1929).
80. BULL: *J. physic. Chem.* **41**, 985 (1937).

- 81 BULL: J. biol. Chemistry **125**, 585 (1938).
 82. — J. biol. Chemistry **123**, 17 (1937).
 83 — Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. **6** (1938).
 84. — u. NEURATH: J. biol. Chemistry **118**, 163 (1937).
 85. — — J. biol. Chemistry **125**, 113 (1938).
 85a. CAMPBELL u. FOUNT: J. biol. Chem. **129**, 385 (1939).
 86. CASSEL u. FORMSTECHE: Kolloid-Z. **61**, 18 (1932).
 87. CHAMBERS: J. Immunology **36**, 543 (1939).
 88. —, BATEMAN u. CALKINS: J. Immunology **40**, 483 (1941).
 89 CLARK, STERRET u. LEPPLA: J. Amer. chem. Soc. **57**, 330 (1935).
 90 —, — u. LINCOLN: Ind. Engng. Chem., Analyt. Edit. **28**, 1318 (1936).
 91 CLOWES, KRAHL u. DAVIES: Proc. Soc. exp. Biol. Med. **38**, 526 (1938).
 91a. — The Amer. Assoc. for the Advancement of Science (1939), Nr. 7, S. 61.
 92. COEHN: Ergebn. exakt Naturwiss. **1**, 145 (1922).
 93 COCKBAIN u. SCHULMAN: Trans. Faraday Soc. **35**, 716 (1939)
 94. — — Trans. Faraday Soc. **35**, 1266 (1939).
 95 DANIELLI: Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol. **6**, 190 (1938)
 96 — DANIELLI u. MARRACK: Brit. J. exp. Pathol. **19**, 393 (1938)
 97 — u. HARVEY: J. cellular comparat. Physiol. **5**, 483 (1935).
 98. DAVIS, KRAHL u. CLOWES: J. Amer. chem. Soc. **62**, 3080 (1940)
 99. DEAN, GATTY u. STENHAGEN: Nature (London) **1939**, 721.
 100 DENARD: J. Chim. physique **36**, 210 (1939).
 101. DERVICHIAN: Nature (London) **144**, 629 (1939).
 102. — C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **209**, 156 (1939)
 103 — J. Chim. physique **7**, 931 (1939).
 104. — J. Chim. physique **37**, 110 (1940).
 104a — C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **211**, 792 (1940).
 105 — C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **212**, 86 (1941).
 105a — J. chem. Physics **38**, 59 (1941).
 105b — u. GRABAR: J. Chim. physique, Physico-Chim. biol. **39**, 159 (1942).
 106. — u. JOLY: C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **204**, 1318 (1937).
 107. — — Nature (London) **141**, 975 (1938)
 108. — — J. Physique Radium **6**, 427 (1935)
 109 DEVAUX: Kolloid-Z. **58**, 129 (1932).
 110. — Kolloid-Z. **58**, 260 (1932).
 111 — C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **201**, 109 (1935)
 112 — C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **202**, 1957 (1936).
 113. DOCKING, HEYMAN, HERLEY u. MORTENSEN: Nature (London) **146**, 265 (1940).
 114 DORING u. NEUMANN: Z. physik. Chem., Abt. A **186**, 193 (1940)
 115 DRUDE: Wied. Ann. **39**, 481 (1890)
 115a DUNKEN: Z. physik. Chem., Abt. B **43**, 240 (1939), Abt. B **46**, 38 (1940)
 115b — Z. physik. Chem., Abt. A **193**, 40 (1943).
 116 EHRENFEST: Rec. trav. Chem. **42**, 784 (1923)
 111 ENGELHARD u. LJUBIMOWA: Nature (London) **144**, 668 (1939).
 117a EUCKEM: Lehrbuch der chemischen Physik Bd II, Kap. 7. Leipzig 1944.
 118 FANKUC EN: Physic. Rev. **53**, 909 (1938).
 119 FINCH u. WILMAN: Trans. Faraday Soc. **33**, 337 (1937)
 120 FORD u. MCBAIN: J. Amer. chem. Soc. **58**, 378 (1936).
 122. — u. WILSON: J. phys. Chem. **42**, 1051 (1938)
 123 FOSBINDER u. LESSING: J. Franklin Inst. **215**, 579 (1933).
 124 FOUNT u. HARKINS: J. phys. Chem. **42**, 897 (1938)
 125 — — Kolloid-Z. **84**, 362 (1938)

126. FOURT u. SCHMITT: *J. physic. Chem.* **40**, 989 (1936).
127. FOWKES u. HARKINS: *J. Amer. chem. Soc.* **62**, 3377 (1940)
128. —, MYERS u. HARKINS: *J. Amer. chem. Soc.* **59**, 593 (1937).
129. FOX u. DANIELLI: *Chem. and Ind.*, **59**, 346 (1940).
130. FRAZER: *Physic. Rev.* **33**, 97 (1929).
131. — *Physic. Rev.* **34**, 644 (1929).
132. FREUNDLICH: *Kapillarchemie I*, 4. Aufl., S. 432ff. Leipzig, 1930.
133. — *Ergebn. exakt. Naturwiss.* **12**, 82 (1933).
134. FREY-WYSSLING: *Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate*. Berlin, 1938.
134a. — *Techn.-Ind. schweiz. Chemiker-Ztg.* **26**, 73 (1943).
135. FRUMKIN: *Z. physik. Chem., Abt. A* **116**, 485 (1925).
136. — *Z. physik. Chem., Abt. A* **116**, 478 (1925).
136a. — *J. chem. Physics* **4**, 624 (1936).
137. —, GORODETZKAJA u. TSCHUGUNOW: *Acta physicochim. URSS* **1**, 12 (1934)
138. — u. WILLIAMS: *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **15**, 400 (1929).
139. GARRISON: *J. physic. Chem.* **29**, 1517 (1925).
140. GATTY u. SCHULMAN: *Trans. Faraday Soc.* **35**, 1510 (1939).
141. GEE: *Trans. Faraday Soc.* **32**, 187, 656, 666 (1936).
142. —, DAVIES u. MELVILLE: *Trans. Faraday Soc.* **35**, 1298 (1939).
143. — u. RIDEAL: *J. chem. Soc. (London)* **1937**, 772.
144. — — *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A* **153**, 116 (1935).
145. — — *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A* **153**, 129 (1935).
146. — — *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A* **155**, 692 (1936).
147. — — *J. chem. Physics* **5**, 794 (1937)
148. — — *J. chem. Physics* **5**, 801 (1937)
149. GERENDAS u. SZENT GYÖRGYI: *Enzymologia (Den Haag)* **9**, 117 (1940).
150. GERMER: *Z. Physik* **54**, 408 (1938).
151. — *J. appl. Physik* **9**, 143 (1938).
152. — *J. chem. Physics* **6**, 171 (1938).
153. — u. STORKS: *J. chem. Physics* **6**, 280 (1938).
154. — — *Physic. Rev.* **53**, 322 (1938).
155. — — *Physic. Rev.* **55**, 648 (1939).
156. — — *Kolloid-Z.* **88**, 242 (1939).
157. GIBBS: *Gesammelte Werke I*, S. 287.
158. GORANSON u. ZISMAN: *Physic. Rev.* **53**, 668 (1938).
159. — — *Physic. Rev.* **54**, 544 (1938).
160. — — *J. chem. Physics* **7**, 492 (1939).
161. GOODNER, HORSFALL u. BAUER: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **34**, 617 (1937)
162. — — — *J. Immunology* **35**, 439 (1938).
163. GORTER: *The Chemistry of the Amino Acids and Proteins*. [Herausg.: C. L. SCHMIDT. Springfield (Ill.) 1938.]
164. — *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam.* **35**, 838 (1932).
165. — *Amer. J. Diseases Children* **47**, 945 (1934).
166. — *J. gen. Physiol.* **18**, 421 (1935).
167. — *Trans. Faraday Soc.* **33**, 1125 (1937).
168. — u. GRENDL: *Trans. Faraday Soc.* **22**, 477 (1926).
169. — — *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam.* **29**, 371, 1262 (1926).
170. —, MAASKANT u. VAN LOOKEREN CAMPAGNE: *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam* **39**, 1187 (1936).
171. — — *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam* **40**, 71, 74 (1937).
172. —, MEIJER u. PHILIPPI: *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam* **37**, 355 (1937)

173. GORTER u. v. ORMONDT: *Biochemic. J.* **29**, 48 (1935).
174. —, — u. DOM: *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam* **35**, 838 (1932).
175. —, — u. MEIJER: *Biochemic. J.* **29**, 381 (1935).
176. — — — *Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam* **37**, 788 (1934).
177. — u. SEEDER: *Kolloid-Z.* **58**, 257 (1932).
178. — — *Kolloid-Z.* **61**, 246 (1932).
179. — — *J. gen. Physiol.* **18**, 427 (1934).
180. GRABAR u. DERVICHIAN: *J. Chim. physique-chim. biol.* **39**, 160 (1942).
181. GREGG: *J. chem. Soc. (London)* **1942**, 696.
182. — u. WIDDOWSON: *Nature (London)* **144**, 666 (1939).
183. GUASTALLA: *C. R. hebd. Séances Acad. Sci.* **189**, 241 (1929).
184. — C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **206**, 993 (1938).
185. — C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **208**, 973 (1939).
186. — C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **208**, 1078 (1939).
187. GUGGENHEIM: *Trans. Faraday Soc.* **36**, 397 (1940).
188. GUYOT: *C. R. hebd. Séances Acad. Sci.* **159**, 307 (1914).
189. — *Ann. Physique* **2**, 506 (1924).
190. HARDING u. ADAM: *Trans. Faraday Soc.* **29**, 837 (1933).
191. HARKINS u. ANDERSON: *J. Amer. chem. Soc.* **59**, 2189 (1937).
192. — — *J. biol. Chemistry* **125**, 369 (1938).
193. — u. BOYD: *J. Physic. Chem.* **45**, 20 (1941).
194. —, CARMAN u. RIES: *J. chem. Physics* **3**, 692 (1935).
195. — u. FISCHER: *J. chem. Physics* **1**, 852 (1933).
196. — u. FLORENCE: *J. chem. Physics* **6**, 847 (1938).
196a. —, FOURT u. FOURT: *J. biol. Chem.* **132**, 111 (1940).
197. — u. GROETZINGER: *J. chem. Physics* **7**, 204 (1939).
198. — u. KIRKWOOD: *Nature (London)* **141**, 38 (1938).
199. — u. MATTOON: *Physic. Rev.* **53**, 911 (1938).
200. — — *J. chem. Physics* **7**, 186 (1939).
201. — u. MYERS: *J. chem. Physics* **4**, 716 (1936).
202. — — *J. Amer. chem. Soc.* **58**, 1817 (1936).
203. — — *Nature (London)* **139**, 626 (1937).
204. — u. NUTTING: *J. Amer. chem. Soc.* **61**, 1702 (1939).
205. —, RIES u. CARMAN: *J. chem. Physics* **4**, 228 (1936).
206. —, YOUUG u. BOYD: *J. chem. Physics* **8**, 954 (1940).
207. HAUROWITZ u. SCHWERIN: *Enzymologia (Den Haag)* **9**, 193 (1940).
208. HAUSER u. SWEARINGEN: *J. physic. Chemistry* **45**, 644 (1941).
209. HAVINGA: *Diss. Utrecht* 1939.
210. — u. DE WAEL: *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **56**, 375 (1937).
211. HARVEY u. SHAPIRO: *J. cellular comparat. Physiol.* **5**, 255 (1934).
212. HEDSTRAND: *J. physic. Chemistry* **28**, 1244 (1924).
213. HERČYK: *Kolloid-Z.* **56**, 1 (1931).
214. HERSHEY: *Physic. Rev.* **56**, 204 (1939).
215. HEYMANN u. JOFFE: *Trans. Faraday Soc.* **38**, 408 (1942).
215a. — u. YOFFE: *Trans. Faraday Soc.* **39**, 217 (1943).
216. HOLLEY: *Physic. Rev.* **51**, 1000 (1937).
217. — *Physic. Rev.* **53**, 525 (1938).
218. — *Physic. Rev.* **53**, 534 (1938).
219. — u. BERNSTEIN: *Physic. Rev.* **52**, 525 (1937).
220. HUGHES: *J. chem. Soc. (London)* **1933**, 338.
221. — *Trans. Faraday Soc.* **29**, 211 (1933).
222. — *Trans. Faraday Soc.* **29**, 214 (1933).

- 223 HUGHES: *Biochem. J.* **29**, 437 (1935).
224. — *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A* **155**, 710 (1936).
225. — u. ALLSOPP: *Nature (London)* **137**, 502 (1938).
226. — u. RIDEAL: *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A* **137**, 62 (1932).
227. — — *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A* **140**, 253 (1933).
228. —, YUDKIN, KEMP u. RIDEAL: *J. chem. Soc. (London)* **1934**, 1105.
229. INNES u. ROWLEY: *J. physic. Chem.* **45**, 158 (1941).
230. — — *J. physic. Chem.* **46**, 548 (1942).
231. JENKINS u. NORRIS: *Nature (London)* **144**, 441 (1939).
232. — u. TAYLOR: *Nature (London)* **1938**, 291.
233. JOHLIN: *J. physic. Chem.* **29**, 897 (1925).
234. — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **36**, 523 (1937).
235. — *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **38**, 568 (1938).
236. JOLY: *C. R. hebd. Séances Acad. Sci* **208**, 975 (1939).
237. — *J. Physique Radium [7]* **8**, 471 (1937).
238. — *J. Physique Radium* **9**, 345 (1938).
239. — *Kolloid-Z.* **89**, 26 (1939).
239a KANE: *Proc. Roy. Irish Acad., Sect. B* **47**, 265 (1942).
240 KATZ u. SAMWELL: *Nature (London)* **16**, 592 (1928).
241. KEENAN: *J. physic. Chem.* **33**, 379 (1929).
242. KEIM u. WASHBURN: *J. Amer. chem. Soc.* **62**, 2318 (1940).
243. KELLER u. KUNZEL: *J. exp. Med.* **103**, 704 (1938).
244 KNIGHT: *Biochem. J.* **24**, 257 (1930).
244a. KNOTT u. SCHULMAN: *Ann. Reports of the Progress of Chemistry* **36**, 100 (1939).
245. KÖGL u. HAVINGA: *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **59**, 249 (1940).
246. — — *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **59**, 323 (1940).
247. — — *Recueil Trav. chim. Pays-Bas* **59**, 601 (1940).
248. LANDT u. VOLMER: *Z. physik. Chem., Abt. A* **122**, 398 (1926).
249. LANGE: *S.-B. physik-med. Soz. Erlangen* **71**, 257 (1940).
250. LANGMUIR: *J. Amer. chem. Soc.* **39**, 1848 (1917).
251. — *J. chem. Educat.* **8**, 850 (1931).
252. — *Chem. Reviews* **13**, 147 (1933), Nobelvortrag 1932, Stockholm.
253. — *Gen. electr. Rev.* **38**, 402 (1935).
254. — *Colloid Sympos. Monogr.* **3**, 48 (1925).
254a. — *J. physic. Chem.* **31**, 1719 (1927).
256. — *J. chem. Physics* **1**, 756 (1933).
257. — *J. Franklin Inst.* **218**, 143 (1934).
258. — *J. Amer. chem. Soc.* **59**, 2189 (1937).
259. — *J. Amer. chem. Soc.* **60**, 1190 (1938).
260. — *J. chem. Physics* **6**, 873 (1938).
261. — *Science* **87**, 493 (1938).
261a. — *Cold Spring Harbor Sympos. quantit. Biol.* **6**.
262. — *J. chem. Physics* **6**, 171 (1938).
263. — *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A* **170**, 1 (1939).
264. — u. LANGMUIR: *J. physic. Chem.* **31**, 1719 (1927).
264a. — u. BLODGETT: *Kolloid-Z.* **73**, 257 (1935).
265. — u. SCHAEFER: *J. Amer. chem. Soc.* **59**, 1406 (1937).
266. — — *J. Amer. chem. Soc.* **59**, 1762 (1937).
267. — — *J. Amer. chem. Soc.* **59**, 2075 (1937).
268. — — *J. Amer. chem. Soc.* **59**, 2400 (1937).
269. — — *J. Amer. chem. Soc.* **60**, 1351 (1938).

270. LANGMUIR u. SCHAEFER: J. Amer. chem. Soc. **60**, 2803 (1938).
 271 — — Chem. Reviews **24**, 181 (1939).
 272. — — u. SOBOTKA: J. Amer. chem. Soc. **59**, 1751 (1937)
 273. — — u. WRINCH: Science **85**, 76 (1937).
 274. — u WAUGH: J. gen. Physiol. **21**, 745 (1938)
 275. — — J. Amer. chem. Soc. **62**, 2771 (1940).
 276. LEE u. WU: Chin. J. Physiol. **6**, 307 (1932).
 277 LYONS u. RIDEAL: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **124**, 322, 333, 344 (1929)
 278. MACLAURIN: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **76**, 49 (1905)
 279. MARCELIN: Ann. Physique **4**, 481 (1925)
 280. — Ann. Physique **4**, 503 (1925).
 281 — Ann. Physique **4**, 505 (1925)
 281a — Kolloid-Beih. **38**, 177 (1933)
 282 MARSDEN u. SCHULMAN: Trans. Faraday Soc. **34**, 748 (1938)
 283. MATTEI: Kolloid-Z. **101**, 117 (1942).
 284 MATTEWS: Trans. Faraday Soc. **35**, 1113 (1939)
 285 MCBAIN, FORD u. MILLS: Rev. sci. Instruments **7**, 341 (1936).
 286. — — u WILSON: Kolloid-Z. **78**, 1 (1937).
 287. — u FOSTER: J. physic. Chem. **39**, 331 (1935).
 288 — u HUMPHREYS: J. physic. Chem. **36**, 300 (1932)
 289 — u PEAKER: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **125**, 394 (1929)
 290 — u SWAIN: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **154**, 608 (1936)
 291 MÉRIGOUX u. AUBRY: J. chim., physique, Phys.-chim. et biol., Sect. B **36**,
 221 (1939).
 292 METCALF: Z. physik. Chem. **52**, 1 (1905).
 292a MILLER: J. physic. Chem. **45**, 289 (1941).
 293 MITCHELL: J. chem. Physics **4**, 725 (1936).
 294 — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **155**, 696 (1936).
 295 — Trans. Faraday Soc. **33**, 1129 (1937).
 296 — u RIDEAL: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **167**, 342 (1938).
 297 — — u. SCHULMAN: Nature (London) **139**, 625 (1937).
 297a MITTELMANN u. PALMER: Trans. Faraday Soc. **38**, 506 (1942)
 298 MOORE u. EYRING: J. chem. Physics **6**, 391 (1938).
 299 MONQUIN u. RIDEAL: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **114**, 690 (1927).
 300 MOSS u. RIDEAL: J. chem. Soc. (London) **1933**, 1525.
 301. — — u. BATE SMITH: Nature (London) **136**, 260 (1935).
 301a. MÜLLER: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **114**, 542 (27), **120**, 437 (1928).
 302 — Nature (London) **129**, 436 (1932).
 302a. — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **174**, 137 (1940)
 303. v MURALT: Naturwiss. **27**, 265 (1939).
 304. MYERS: J. Amer. chem. Soc. **57**, 2734 (1935).
 305 — u. HARKINS: J. physic. Chem. **40**, 959 (1936).
 306. — — J. chem. Physics **5**, 601 (1937).
 306a — — Nature (London) **139**, 368 (1937).
 307 NASINI u. MATTEI: Kolloid-Z. **101**, 113 (1942).
 308 NEUMANN: Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. **44**, 474 (1938)
 309 NEURATH: J. physic. Chem. **40**, 361 (1936).
 310 — J. physic. Chem. **42**, 39 (1937).
 311. — J. Amer. chem. Soc. **61**, 1841 (1939).
 312. — u. BULL: Chem. Reviews **23**, 391 (1938)
 312a NILSSON: Arch. Mikrobiol. **12**, 63 (1941)
 313. NORTON: J. Amer. chem. Soc. **61**, 3162 (1939).

314. DU NOUY: Kolloid-Z. **56**, 1 (1931).
315. NUTTING u. HARKINS: J. Amer. chem. Soc. **61**, 1180 (1939); **61**, 2040 (1939).
316. — — J. Amer. chem. Soc. **62**, 3155 (1940).
317. —, LANG u. HARKINS: J. Amer. chem. Soc. **62**, 1496 (1940).
317a. O'CONNOR: Proc. Roy. Irish Acad., Sect. B **45**, 355 (1939); **47**, 251 (1942),
48, 85, 93 (1942).
318. OSTWALD: Kolloid-Z. **58**, 1 (1932).
319. — Kolloid-Z. **100**, 2 (1942).
320. PAULI u. FENT: Kolloid-Z. **67**, 228 (1934).
320a. PAULING: The nature of the chemical bond. (1939) Cornell
320b. — u. CAMPBELL: Science **94**, 440 (1942).
321. PANKRATOV: Acta Physicochim. URSS **10**, 45 (1939).
321a. PANKHURST: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **179**, 393 (1942).
322. PERRIN: Kolloid-Z. **51**, 2 (1930).
323. PHILIPPI: Recueil Trav. chim. Pays-Bas **53**, 81 (1934).
324. — Über die Natur der Eiweißstoffe. Diss. Univ. Leyden, 1936
325. PORTER: J. Amer. chem. Soc. **1937**, 1884.
326. — u. PAPPENHEIMER: J. exp. Medicine **69**, 755 (1939).
327. — u. WYMAN: J. Amer. chem. Soc. **59**, 2746 (1937).
328. — — J. Amer. chem. Soc. **60**, 1083 (1938).
329. RACE u. REYNOLDS: J. Amer. chem. Soc. **61**, 1425 (1939).
329a. RADULESCU: Kolloid-Z. **98**, 34 (1942).
330. RAMDAS u. VAIDYANATHAN: Proc. Indian Acad. Sci., Sect. A [7] **186**, 96 (1938).
331. RAYLEIGH: Philos. Mag. **48**, 321 (1899).
332. RIDEAL: J. phys. Chem. **29**, 1585 (1925).
333. — Surface Chemistry, 2. Aufl. 1930.
334. — Kolloid-Z. **61**, 177 (1932).
335. — Kolloid-Z. **61**, 218 (1932).
336. — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **155**, 684 (1936)
337. — u. FOSSBINDER: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **143**, 61 (1933)
338. — u. MITCHELL: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **159**, 206 (1937).
339. —, MOSS u. BATE SMITH: Nature (London) **136**, 260 (1935)
340. RIES: J. Amer. chem. Soc. **60**, 3087 (1938).
341. ROTHEN u. LANDSTEINER: Science **90**, 65 (1939).
341a. — — J. exp. Med. **76**, 437 (1942).
342. ROWLEY u. INNES: J. phys. Chem. **46**, 694 (1942).
343. SCHAEFER: J. phys. Chem. **42**, 1089 (1938).
344. — Science **89**, 465 (1939).
345. — J. phys. Chem. **45**, 681 (1941).
346. — u. SOBOTKA: J. Amer. chem. Soc. **59**, 1751 (1937).
347. SCHMIDT: Z. Mikrosk. **54**, 159 (1937).
348. SCHOON: Z. Elektrochem angew. physik. Chem. **44**, 498 (1938).
349. SCHULMAN: Kolloid-Z. **61**, 218 (1932).
350. — Trans. Faraday Soc. **33**, 1116 (1937).
351. — u. COCKBAIN: Trans. Faraday Soc. **36**, 651, 661 (1940).
352. — u. HUGHES: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **138**, 430 (1932)
353. — — Biochem. J. **29**, 1236, 1243 (1935).
354. — u. RIDEAL: Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **130**, 259 (1931).
355. — — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. A **130**, 284 (1931).
356. — — Biochem. J. **27**, 1581 (1933).
357. — — Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B **122**, 29, 46 (1937)
358. — — u. STENHAGEN: Nature (London) 785 (1938).

- 359 SCHULMAN, RIDEAL u STENHAGEN: Proc Roy. Soc. (London). Ser. B **126**, 356 (1938).
360. -- u. TEORELL: Trans Faraday Soc. **34**, 1337 (1938).
361. SAWAI: Trans. Faraday Soc **31**, 705 (1935)
- 362 SEASTONE: J. gen. Physiol **21**, 621 (1938).
363. SEBBA u. BRISCOE: J. chem Soc (London) **1940**, 114.
- 364 -- -- J. chem Soc. (London) **1940**, 106
365. SHAFFER u. DINGLE: Proc Soc. exp. Biol. Med **38**, 528 (1938)
- 366 SOBOTKA u BLOCH: J. biol. Chemistry **124**, 559 (1938)
- 366a. -- -- J. physic Chem **45**, 9 (1941)
- 367 SÖLLNER: Kolloid-Z **62**, 31 (1932)
- 368 SPIERER: Kolloid-Z **55**, 36(1931)
369. STÄLLBERG: Traus. Faradery Soc. **35**, 1410 (1939).
- 370 STÄLLBERG u STENHAGEN Svensk kem Tidskr. **53**, 44 (1941)
- 370a. STÄLLBERG-STENHAGEN u STENHAGEN: Svensk kem Tidskr. **55**, 63 (1943)
- 370b STENHAGEN: Trans Faraday Soc **36**, 597 (1940)
- 370c - u STÄLLBERG: Svensk kem Tidskr. **53**, 44 (1941)
- 370d. - -- J biol. Chemistry **139**, 345 (1941)
- 370e. STÄLLBERG-STENHAGEN u STENHAGEN: J biol. Chemistry **148**, 685 (1943)
- 371 STÄLLBERG u TEORELL Trans Faraday Soc **35**, 1413 (1939)
- 372 STENHAGEN Trans. Faraday Soc. **34**, 1328 (1938)
- 373 - Ark kem., Mineral Geol., Ser A **14**, 1 (1941)
- 374 - u. RIDEAL. Biochem J **33**, 1591 (1939)
- 374a STOCK Ber. dtsch chem. Ges. **72**, 1844 (1939)
- 375 STRACHAN Proc. Cambridge philos Soc **29**, 116 (1933)
376. TALMUD: Acta Physicochim. USSR **10**, 753 (1939)
377. -- Acta Physicochim USSR **14**, 562 (1941)
- 378 -- u TALMUD: Acta Physicochim USSR **10**, 481 (1939)
- 379 TAUBMANN: C R (Doklady) Acad Sci USSR **29**, 22, 103, 210, 213 (1940).
380. TEIGE. Kolloid-Z. **102**, 132 (1943)
- 381 TEORELL. Nature (London) **137**, 994 (1939)
382. TER HORST. Recueil Trav chim Pays-Bas **55**, 33 (1936)
- 382a. THAUER Ergebn Physiol **41**, 607 (1939)
383. THIESSEN u BEGER: Kolloid-Z **89**, 175 (1939)
384. -- BEISCHER u GILLHAUSEN. Naturwiss **28**, 205 (1940)
- 385 -- u. SCHOON. Z physik Chem., Abt B **36**, 195 (1937)
- 386 TRANSNE, WASHBURN u KAHLER J Amer chem Soc. **64**, 274 (1942)
- 387 TRAPEZNIKOV: Acta Physicochim USSR **10**, 65 (1939)
- 388 -- u REHBINDER C R (Doklady) Acad Sci URSS **18**, 185 (1938)
- 389 TRONSFADT. Trans Faraday Soc **29**, 502 (1933)
- 390 TRURNIT. Pflügers Arch ges Physiol Menschen Tiere **243**, 562 (1940)
391. - Naturwiss **28**, 476 (1940)
- 391a -- Demnächst in der Kolloid-Z
- 391b. -- Demnächst an anderen Ort
- 391c. -- Demnächst in der Kolloid-Z
- 392 -- u. BERGOLD: Kolloid-Z. **100**, 177 (1942)
- 393 VASIČEK. Physic Rev. **57**, 925 (1940)
- 394 VOLMER. Z. physic. Chem. **115**, 239 (1925)
- 395 -- Die Physik I, H. 3 1933
396. -- Kinetik der Phasenbildung 1939
- 397 -- u. ADHIKARI: Z physik Chem., Abt A **119**, 46 (1926)
- 398 - u NEUMANN: Die Physik V, H 4 1937

399. DE WAEL u. HAVINGA: Recueil Trav. chim. Pays-Bas **59**, 770 (1940).
400. WASHBURN u. KEIM: J. Amer. chem. Soc. **62**, 1747 (1940).
401 — u. WAKEHAM: J. Amer. chem. Soc. **60**, 1294 (1938).
402. WILHELMY: Pogg. Ann. **119**, 186 (1863).
403. WILSON u. FORD: Nature (London) **137**, 235 (1936).
404. WU u. LING: Chin. J. Physiol. **1**, 407 (1927).
405. — u. LEE: Chin. J. Physiol. **6**, 307 (1932).
406. — u. WANG: J. biol. Chemistry **123**, 439 (1938).
406 a. WOLF: Theoretische Chemie, 3. Teil, S. 633ff. Leipzig, 1943.
407. WOLF-TRIESCHMANN: Praktische Einführung in die physikalische Chemie. Braunschweig, 1938.
408. YAMINS u. ZISMAN: J. chem. Physics **1**, 656 (1933).
409. ZAHL, HASKINS, GALLAGHER u. BUCHWALD: Trans. Faraday Soc. **35**, 308 (1939).
410. ZISMAN: Rev. sci. Instruments **3**, 367 (1932).
411. ZOCHER u. STIEBEL: Z. physik. Chem. **147**, 401 (1930).

(Etwa 20 weitere Arbeiten sind zusätzlich im Text zitiert. Es handelt sich meist um ältere Arbeiten von ADAM und Mitarbeitern. Im ganzen wurden etwa 500 Arbeiten zitiert. Die Literaturangaben bringen bis Ende 1944 das Wesentliche.)

Namenverzeichnis.

Die *kursiv gedruckten* Ziffern beziehen sich auf die Literaturverzeichnisse

- ABDERHALDEN**, E. 213, 338.
ABORG 400, 468
ACKERMANN 190
ADAIR 132, 183
ADAM 350, 355, 356, 358, 360, 361, 369, 370, 371, 373, 374, 376, 377, 386, 418, 419, 425, 439, 462, 467, 471.
ADDINK 371, 377, 467
ADHIKARI 380, 475
ADLER, E 307, 336, 345
ADICKES, F 241, 255, 340, 341 342
AEPPLI, H. 338
Alapeuso, H 278, 280, 286, 344
ALEXANDER 365, 368, 369, 371, 377, 387, 399, 400, 405, 458, 461, 462, 467, 468
ALLARD, H A 183.
ALLSOPP 377, 472
ALPHEN, A J S VAN 339
ALTY 415, 468
ALWALL, N 305, 345
AMBROSE, A M. 339
AMIES, R. C 185
ANDAUER 468
ANDERSAG, H. 62.
ANDERSON, J F. 187
ANDERSON, T. F. 184
ANDERSON 355, 377 416, 432, 444, 471.
ANDREAE, M. 342.
ANDREAS 438, 468
ANDREWES, C N 100, 183
ANNAU, E 232, 233, 242, 243, 340, 341, 343
ANSCHUTZ 221.
ANSLOW, W K. 235 340
ANSON, M. L 147, 183
ANTOPOL, W. 46, 48 59, 60, 61
APPEL, H. 242, 245, 341, 342
ARDENNE, M. v. 118, 120, 175, 183
ARIYAMA 370, 468
ARNAUDI, C 238, 341
ARNOLD, A 45
ARRHENIUS, S 183
ARTOM, C. 260, 343.
ASAHINA, Y. 196, 225, 335, 339.
ASAI, T 230, 340.
ASCHAM, J. K. 50, 62.
ASHE, W. F 47, 61
ASHFORD, CH A. 280, 344
ASKEW 27, 376, 386, 400, 467, 468
ASTBURY 441, 446, 461, 468
ATKIN, L. 48, 61
AUBRY 400, 473
AUHAGEN, E. 43, 58, 63
AXTMANN, G 44.
BAARS, J K 86
BABCOCK, S H 35, 43, 45
BACON 404, 468
BAER 254, 255
BAKER, A B 48, 61.
BAKER, J. W 263, 343
BAKKER 378, 468.
BALASSA, G 258, 342
BALD, J G 183
BALL, E. G. 188, 334
BALLA, G 26
BALLENTIN 398, 468
BALLOWITZ, K. 335.
BANGA, J. 342, 345
BARETT 231.
BARGER, G 22, 24, 27
BARKER, H A. 315, 341, 346
BARNES, R H 47, 60, 250, 341, 342
BARNETT, J W 40, 45
BARNUM, C P 244, 341, 342
BARRETT, H M 340
BARRON, E S G 277, 303, 307, 334, 344, 345, 346
BASINSKI, D. H 337.
BASTEDO, W A. 57, 59, 63
BATEMAN 430, 440, 441, 452, 455, 468, 469
BATE SMITHS 419, 473

- BATELLI 230.
 BAUER 450, 470.
 BAUERNFEIND 43.
 BAUGUESS, L. C. 337.
 BAUMANN, C. A. 345.
 BAUSDEN, F. C. 88, 102, 110, 140, 151,
 105, 169, 170, 171, 172, 183.
 BAYLISS 349, 394, 468.
 BEAMES 111.
 BEAN, W. B. 47, 48, 61.
 BEARD, D. 183, 185.
 BEARD, J. W. 88, 114, 179, 183, 185, 187.
 BECHOLD 121, 123, 183.
 BECKER, E. 64, 76, 78, 79, 80, 82, 83, 85,
 86, 207.
 BECKER, E. R. 47, 60.
 BEGER 415, 475.
 BEHRENS, M. 335.
 BEHRINGER, H. 15, 10, 26.
 BEISCHER 409, 410, 413, 440, 468, 475.
 BELL 27, 468.
 BENDAS, H. 336.
 BENDER, R. C. 40, 60.
 BENHAM, R. W. 49, 61.
 BERCZELY 230, 340.
 BERENBLUM, J. 195, 346.
 BEREND, N. 233, 340.
 BERG, C. P. 207, 337.
 BERGER, E. 137, 184.
 BERGER, G. 245, 341, 342.
 BERGMANN, M. 209, 338.
 BERGOLD, G. 88, 96, 131, 173, 174, 175,
 183, 184, 187, 403, 415, 429, 437, 444,
 448, 449, 468, 475.
 BERKMANN, S. 30, 44.
 BERNAL, J. D. 152, 156, 157, 160, 172,
 183, 412, 422, 468.
 BERNHARD, K. 211, 214, 210, 217, 219,
 227, 234, 236, 253, 283, 300, 303, 334,
 335, 338, 339, 340, 341, 342, 345.
 BERNHARDT, H. 335.
 BERNHAUER, K. 200, 201, 235, 287, 317,
 336, 338, 340, 345, 346.
 BERNHEIM, F. 183, 210, 336, 338.
 BERNHEIM, M. I. C. 183, 209, 336, 338.
 BERNSTEIN 410, 411, 468, 471.
 BERRY 467.
 BERSIN, TH. 199, 335.
 BERTHO, A. 188, 334.
 BERTRAND 199.
 BIELIG, H. J. 191, 223, 224, 228, 232,
 334, 339.
 BIJVOET 410.
 BIKERMAN, J. J. 384, 405, 407, 412, 468.
 BILTZ, H. 71, 75, 85, 86.
 BIRCH, T. W. 46, 47, 50, 60, 62.
 BITTNER, J. J. 183.
 BJÖRNSTAHL, Y. 130, 187, 450.
 BLACK, S. 43.
 BLASCHKO, H. 198, 335.
 BLATHERWICK, N. R. 191, 334.
 BLIXENKRONE-MØELLER, N. 247, 342.
 BLOCH 377, 447, 475.
 BLOCK, E. 6, 26.
 BLOCK, R. J. 338.
 BLODGETT 372, 378, 398, 401, 403, 409,
 468, 472.
 BLUM 254, 255.
 BÖCKL, N. 345.
 BÖHM, F. 338.
 BÖHM, H. 341, 342.
 BOEHME 404.
 BÖESEKEN, J. 200, 210, 336, 338.
 BOEZAARDT, A. J. 200, 336.
 BOHLE, K. 5, 26.
 BOLLEN, W. B. 43.
 BOLLING, D. 338.
 BONNER, J. 44, 49, 50, 61, 62.
 BONNER, M. 49, 61.
 BOREK, E. 202, 336.
 BORG, A. J. 134.
 BORN, H. 97, 183.
 BORRIES, B. V. 118, 183.
 BORSON, H. J. 47, 61.
 BOUHET 404, 468.
 BOWDEN 422, 468.
 BOYACK, G. A. 45.
 BOYD 371, 378, 383, 468, 471.
 BOYD, M. J. 44.
 BOYLAND, E. 195, 335.
 BRAATEN, K. 192, 208, 334.
 BRADLAY 379, 398, 468.
 BRADWAY, E. 43.
 BRAIN 404, 468.
 BRAUN-MENENDEZ, E. 270, 343.
 BRAUNSTEIN, A. E. 203, 336, 337.
 BRAZDA, G. F. 339.
 BRESLOVE, B. B. 44.
 BRESSLER 383, 468.
 BREUSCH, F. L. 245, 290, 293, 299, 301,
 303, 305, 329, 345.
 BREWER, C. R. 324, 333, 346.
 BRIGGS, L. H. 25, 27.
 BRIGGS 418.
 BRILL, R. 131, 183, 349, 371, 410, 429,
 444, 468.

- BRINKMANN, E. 273, 343, 380, 468.
 BRISCOE 385, 463, 475.
 BRÖMEL, H. 314, 346.
 BROHULT 450.
 BROSTEAUX, J. 130, 186, 200, 336.
 BROWN, G. B. 337.
 BROWN, H. 178, 183.
 BROWNE, J. S. L. 340.
 BRUCE 404, 468.
 BUCHANAN, J. M. 346.
 BUCHNER 377.
 BUCHWALD 409, 476
 BÜCHNER 468.
 BUFDING, E. 229, 339
 BULOW, M. 85.
 BULL 415, 416, 418, 423, 431, 432, 435,
 436, 437, 439, 442, 459, 468, 469, 473.
 BULLET, F. 340.
 BURGERS, J. M. 183.
 MCBURNEY, C. H. 43.
 BURR 233.
 BUSH, R. P. 48, 61.
 BUSINGER, A. 33, 44.
 BUTENANDT, A. 99, 104, 157, 183, 207,
 234, 337, 390.
 BUTTS, J. S. 192, 334, 341, 342.
 CALDWELL, J. 93, 183.
 CALIFANO, L. 242, 318, 330, 341, 342, 346.
 CALKINS 452, 455, 468, 469.
 CAMPBELL 447, 456, 469, 474.
 CAMPBELL, D. H. 138, 186.
 CARMAN 371, 376, 377, 471.
 CARNE, H. O. 250, 342
 CARROLL, J. J. 27
 CARSNER, E. 102, 183.
 CARSON, S. F. 313, 346.
 CARTER, H. E. 33, 44, 340.
 CASPERSSON, T. 97, 183
 CASSEL 398, 469.
 CAYONNA, G. 27.
 CHALMERS, J. G. 335
 CHAMBRÈS 430, 440, 441, 452, 454, 455,
 468, 469,
 CHANDLER, J. P. 208, 211, 337.
 CHANNON, H. J. 341.
 CH'AN SU 13.
 CHASSIN, M. R. 48, 61.
 CHEN, K. K. 58, 63.
 CHESTER, K. S. 141, 142, 183.
 CHIBNALL, A. C. 243, 339, 341.
 CHICK, H. 46, 47, 60.
 CHRISTIAN, W. 202, 336
 CHRZASZCZ, T. 286, 344.
 CHUTE 343.
 CLARK 410, 411, 469.
 CLARK, P. F. 178, 184.
 CLAUDE, A. 106, 184.
 CLEMO, G. T. 23, 27.
 CLEWER 27.
 CLOSS, K. 192, 208, 334, 337.
 CLOWES 389, 447, 469.
 CLUTTERBUCK 246.
 COCKBAIN 387, 400, 426, 460, 469, 474.
 COEHN 469.
 COHEN, P. P. 204, 337.
 COHEN, S. S. 184.
 COHN, M. 337.
 CONANT, J. B. 312, 346.
 CONGER, TH. V. 58, 63.
 CONNAR, J. A. 229, 339.
 O'CONNOR 384, 394, 397, 474.
 COOK, A. H. 67, 85.
 COOPER, G. R. 185.
 COOPING, A. M. 46, 60.
 CORYELL, C. D. 302, 345.
 COWGILL, G. R. 47, 61.
 COZIC, M. 336.
 CRAIG, L. C. 25.
 CRAIGIE, J. 143, 184.
 CRAMER, R. D. 346.
 CRAWFORD, H. 344
 CREMER, H. D. 340.
 CROOKS, H. M. 27.
 CROWFOOT, D. 195, 335, 346.
 CUTLER, C. H. 341, 342.
 DAFT, F. S. 43.
 DAKIN, H. D. 231, 240, 341.
 DALMA, G. 26.
 DAMMANN, E. 339.
 DAMODARAN, M. 193, 335.
 DANIELLI 373, 376, 377, 400, 454, 456,
 457, 467, 468, 469, 470.
 DANNEEL, R. 184, 207
 DAS, N. B. 336.
 DAVIES 389, 392, 469, 470.
 DAVIS 447, 469.
 DAY, D. 49, 62.
 DEAN 450, 469.
 DECKER, P. 76, 79, 85, 86.
 DEFFNER, M. 283, 287, 324, 326, 344, 346.
 DEHLINGER, K. 98, 184.
 DENARD 405, 469
 DEOTTO, R. 329, 346.
 DERJUGIN, W. VON 337.

- DERVICHIAN 350, 360, 368, 371, 383, 419, 427, 429, 443, 456, 460, 469, 471.
 DEŶEL jun., H. J. 244, 246, 250, 341, 342
 DEUTSCH, A 339.
 DEVAUX 349, 350, 433, 436, 469
 DEVIRIAN 50
 DEWAN, J. G 336.
 DINGLE 452, 453, 475.
 DIRR-KALTENBACH, H. 338.
 DIRSCHERL, W. 234, 293, 340, 345
 DITT, F 341.
 DIXON, M. 188, 334
 DOBRINER, K. 335.
 DOCKING 385, 469.
 DÖLLKEN, H. 47, 61.
 DÖRING 371, 469.
 DOERR, R. 89, 107, 184.
 DOM 428, 471
 O'DONOVAN 394, 397.
 DORFMAN, A. 30, 44.
 DORP, W. A. VAN 44.
 DOW, R. B. 185
 DRAGSTEDT, C. A. 139, 184
 DRUDE 469.
 DRUMMOND 210, 338.
 DRURY, D. R 244, 341.
 DUBOS, R. J. 187.
 DUNKEN 349, 364, 401, 469.
 DUNN, M. S. 334.
 DUNNING, J. W. 336.
 DUPILLE, J. 197, 335.
 DUSPIVA, F. 175, 184.

 EAGLES, G. H 185.
 EAKIN, R. E. 49, 58, 61, 63
 EARLE, A. 45
 ECKARDT, R. E. 46, 60
 ECKLER, CH. R. 58, 63
 EDLBACHER, S. 203, 213, 336, 338
 EDSON, N. L. 245, 258, 340, 341, 342, 343.
 EGGLESTON, L. V. 272, 277, 278, 309, 319. 343
 EHRENFEST 469
 EISENLOHR, W 336
 ELDERFIELD, R. C. 2, 6, 26
 ELFORD, W. J. 92, 121, 123, 184, 155
 ELLIOT, A. M. 43
 ELLIOT, E. C. 339
 ELLIOT, K. A. C 280, 344
 EL-SADR, M 46, 60.
 ELSDON, S. R. 309, 345
 ELVEHJEM, C. A 43, 44, 47, 58, 61, 63.
- ELZAS, M 338.
 EMBDEN 244, 254, 255
 EMERSON, GL. A. 46, 60.
 EMMRICH-GLASER, I. 251, 259, 334, 343.
 EMMRICH, R. 192, 231, 251, 259, 261, 334, 340, 342, 343
 ENDO, S. 346
 ENGEL, L. L. 206, 337
 ENGEL, R. W. 43.
 ENGELHARD 445, 469.
 ENKLEWITZ, M. 200, 336.
 EPERJESSY, A. 340, 341
 EPSTEIN, S. F. 313, 346
 ERB, C. 340
 ERCOLI, A. 238, 341
 ERIKSON-QUENSEL, I. B 184
 ERLÉNMEYER, H 137, 184
 ERXLÉBEN, H. 203, 336
 EUCKEN, A. 469
 EULER, H. v. 58, 63, 203, 214, 235, 287, 307, 336, 345, 346
 EVANS, C. L. 343
 EVANS jun., E. A 193, 272, 273, 274, 278, 280, 303, 341, 343, 344, 346
 EVANS, W. C 44, 46, 60, 335
 EVELYN, K. A 229, 340
 EWINS 209
 EYRING 383, 473
 EYSENACH, H. 26

 FABER, P. 339.
 FANKUCHEN, J. 152, 156, 157, 160, 172, 183, 407, 411, 422, 468, 469
 FARMER, ST. N. 20, 27
 FAUST, K 226, 339.
 FEENEY, R. F 45
 FELIX, K 203, 209, 211, 336, 338
 FELSZEGRY, Ö. 340
 FENT 435, 474
 FERDMAN, D. L 213, 346
 FERNBACH 317.
 FEULGEN, R 199, 335
 FIESER 4, 26
 FILDES, P. 343, 345
 FINAR, J. I. 210, 338
 FINCH 412, 469
 FINKELSTEIN, J. 32, 34, 44, 45.
 FISCHER 471.
 FISCHER, E. 70
 FISCHER, F. G 191, 223, 224, 228, 232, 334, 335
 FISCHER, H 85.
 FITZ 308

- FLASCHENTRÄGER, B. 214, 216, 218, 252, 254, 338, 339, 341, 342.
 FLEXNER, J. 48, 61.
 FÖLDES, F. 338.
 FÖLLING, A. 191, 208, 334, 337.
 FLÖSSNER, O. 342.
 FLORENCE 389, 471.
 FOLKERS, K. 45, 51, 52, 53, 54, 56, 62, 63.
 FOED 379, 381, 383, 469, 473, 476.
 FORD jr., Z. 48, 61.
 FORMSTECHE 398, 469.
 FOSSBINDER 376, 391, 392, 419, 469, 474.
 FOSTER 384, 473.
 FOSTER, G. L. 191, 334, 337.
 FOULDS, L. 100, 184.
 FOURT 383, 427, 442, 447, 469, 470, 471.
 FOUTS, P. J. 47, 60.
 FOWKES 382, 389, 400, 470.
 FOX 377, 470.
 FRÄNKEL-CONRAT, H. L. 22, 24, 27.
 FRAMPTON 184.
 FRANK, H. 203, 336.
 FRANKE, W. 287, 324, 326, 345, 346.
 FRAZER 403, 470.
 FREI, P. 336.
 FREUNDLICH 349, 470.
 FREY, CH N. 48, 61.
 FREY-WYSSLING 466, 470.
 FRIED, J. 26.
 FRIEDMANN, E. 250, 270, 343.
 FRIEDRICH-FREKSA, H. 95, 98, 99, 104, 119, 120, 140, 157, 160, 165, 183, 184, 185, 186.
 FRIES, N. 49, 61.
 FROMHERZ, K. 214, 338.
 FROSC 87, 185.
 FROST, D. V. 47, 61.
 FRUMKIN 350, 356, 357, 470.
 FUCHS 404.
 FULMER, E. I. 199, 336.
 GABRIEL, S. 65, 85.
 GATZI-FICHTER, M. 35, 44, 45.
 GALLAGHER 409, 476.
 GALLOWAY, J. A. 184.
 GAMM, S. 340.
 GANS, R. 184.
 GARD, S. 88, 176, 177, 178, 184, 187.
 GARRISON 470.
 GARRY, R. C. 262, 343.
 GATTY 450, 451, 469, 470.
 GAVIN, G. 47, 60.
 GEBHARDT, I. P. 147, 186.
 GEE 373, 391, 392, 470.
 GEIST, G. 200, 336.
 GERENDAS 445, 470.
 GERMER 412, 413, 470.
 GIBBS 398, 470.
 GILLASPIE, A. G. 336.
 GILLHAUSEN 409, 475.
 GLADSTONE, G. P. 309, 345.
 GLASER, E. 32, 33, 44.
 GLASER, H. 233, 340.
 GOEBEL, W. F. 339.
 GÖNNERT, R. 184.
 GOEPFERT, G. J. 198, 335.
 GÖRLICH, B. 200, 201, 235, 336, 338.
 GOLDBERGER, J. 46, 60.
 GOLDBLATT, H. 47, 60.
 GOODNER 456, 470.
 GOODPASTURE, E. W. 93, 187.
 GOODYEAR, G. H. 43.
 GORANSON 407, 470.
 GORODETZKAJA 470.
 GORTER 350, 355, 387, 418, 419, 421, 423, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 435, 445, 468, 470, 471.
 GOSS, H. 49, 61.
 GOWEN, J. W. 184.
 GRABAR 456, 469, 471.
 GRAFF, M. 340.
 GRANDE, F. 343.
 GRAUER, H. 203, 336.
 GREELEY, P. O. 341.
 GREEN, D. E. 188, 193, 200, 334, 335, 336.
 GREEN, R. H. 184.
 GREENE, R. D. 51, 62.
 GREGG 371, 415, 471.
 GREGG SMITH, H. 342.
 GREGORY, P. W. 343.
 GREDEL 418, 427, 429, 470.
 GRESSLY, E. 211, 338.
 GROETZINGER 408, 471.
 GRÜNBERG, H. 199, 335, 341.
 GRUSSNER, A. 35, 44.
 GRÜNDMANN, C. 236, 340.
 GUASTALLA 350, 355, 434, 471.
 GÜNTHER, G. 336, 345.
 GUGGENHEIM 471.
 GUIRARD, B. M. 49, 61.
 GUTMAN, A. B. 191, 334.
 GUYMON, J. F. 336.
 GUYOT 350, 471.
 GYE, W. E. 184.
 GYORGY, P. 43, 46, 47, 50, 57, 58, 60, 62, 86.

- HAAS, F. 338.
 HAEHN, H. 346.
 HARLE, R. 341.
 HAFEZ, M. M. 343.
 HAGEDORN, A. 16, 20, 27.
 HALLIDAY, N. 46, 47, 60.
 HALLMAN, L. F. 260, 269, 290, 334, 341, 342, 343.
 HALLMAN, N. 343.
 HAMON, FR. 344.
 HANDLEY, W. R. C. 44.
 HANSON, H. 338.
 HANUSCH, F. 234, 340.
 HAPFOLD, F. C. 44, 263, 343.
 HARDING 376, 467, 471.
 HARDY 356.
 HARKINS 350, 355, 371, 372, 370, 377, 378, 379, 382, 383, 388, 389, 400, 408, 410, 432, 444, 447, 468, 469, 470, 471, 473, 474.
 HARRIES jr., TH. H. 85.
 HARRIS, L. J. 46, 50, 60.
 HARRIS, ST. A. 35, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 59, 62, 63.
 HARTELIUS, V. 30, 37, 44, 45.
 HARTMANN, M. 26.
 HARTWIG, ST. 157, 183.
 HARVEY 457, 469, 471.
 HASKINS 409, 476.
 HASLEWOOD 371, 373, 467.
 HASTINGS, A. B. 346.
 HAUROWITZ 393, 471.
 HAUSER 438, 468, 471.
 HAUSSER, I. 55, 63.
 HAUSSER, K. W. 339.
 HAVINGA 349, 391, 412, 471, 472, 476.
 HAYASIDA, A. 339.
 HECKSTEDEN, W. 341.
 HEDESTRAND 384, 385, 471.
 HEIDELBERGER, M. 139, 140, 184.
 HEITZ, F. 338.
 HEKHUIS, G. L. 337.
 HELFENSTEIN 8, 26.
 HELMER, O. M. 47, 60.
 HELMHOLTZ 356.
 HEMINGWAY, A. 339, 342, 343, 345, 346.
 HENDERSON, L. M. 45.
 HENGSTENBERG, J. 183.
 HENLE J. 105.
 HENRIKSEN, S. D. 337.
 HENRIOT 111.
 HENSELEIT, K. 274, 344.
 HEPDING, I. 48, 61.
 HERBST, R. M. 206, 337.
 HERČIK 416, 437, 471.
 D'HERELLES, F. 91.
 HERLEY 385, 469.
 HERMANN, S. 199, 227, 229, 335, 340.
 HERSHEY 398, 471.
 HERZBERG 94.
 HERZOG, R. O. 128, 184.
 HESSE, G. 6, 26.
 HEVESY, G. 189, 334.
 HEYMANN 379, 385, 400, 405, 469, 471.
 HILDEBRANDT 222.
 HILLS, G. M. 30, 44.
 HITCHINGS, G. H. 43.
 HOAGLAND, C. L. 184.
 HÖBOHM, K. O. 184.
 HOCHBERG, M. 60.
 HÖGBERG, B. 346.
 HOEHN, W. M. 3, 26.
 HÖRLEIN, H. 86.
 HÖYRUP, M. 187.
 HOFF-JÖRGENSEN, E. 201, 336.
 HOFMANN, A. 26.
 HOFMANN, E. 199, 336.
 HOFMANN-LA ROCHE & Co. 40, 44, 45, 63.
 HOGAN, A. G. 46, 60.
 HOLADAY, D. 43.
 HOLIDAY, E. R. 195, 346.
 HOLLEY 410, 411, 471.
 HOLMES, E. G. 280, 344.
 HOLMES, F. O. 91, 107, 184.
 HOMEYER, A. H. 344.
 HOOD, D. B. 48, 61.
 HOOGWERFF, M. M. S. 44.
 HOPKINS, F. G. 64, 65, 70, 76, 85.
 HOPPE-SEYLER, F. A. 334.
 HORN, F. 335.
 HORSFALL 456, 470.
 HOYLE, L. 263, 343.
 HRUBESCH, A. 84, 86.
 HÜTTEL, R. 80, 85.
 HUGENARD 111.
 HUGHES 371, 372, 377, 387, 392, 393, 419, 421, 425, 427, 432, 452, 460, 471, 472, 474.
 HUMPHREYS 473.
 HURTLEY 246.
 HÜTCHINGS, B. L. 401 441 451 481 61.
 ICHIBA, A. 50, 51, 54, 58, 62, 63.
 ICHIHARA, K. 229, 337, 339.
 I. G. Farbenindustrie Akt. Ges. 62, 63

- IKAWA, S. 13, 26.
 IKEBE, K. 334.
 ILLIG, R. 128, 184.
 IMMENDÖRFER, I. 190, 334.
 INNES 371, 378, 472, 474.
 IRISH, O. J. 337.
 ISHIDATE, M. 196, 225, 335, 339.
 IVANOVICS, G. 41, 45.
 IWANOWSKI 87.
- JACKSON, R. W. 207, 337.
 JACOBS, W. A. 2, 25.
 JACOBSEN, R. P. 26.
 JACOBSON, K. P. 287, 304, 327, 345.
 JAFFÉE 210, 214.
 JAMES, G. V. 194, 335.
 JANKE, A. 227, 339.
 JANSEN, E. 43.
 JANSSEN, L. W. 88, 115, 175, 176, 184.
 JARETZKY, R. 8, 26.
 JENKINS 404, 426, 472.
 JENKINS, G. N. 341.
 JENNEN, R. G. 344.
 JENNER 180.
 JENSEN, H. 26.
 JENSEN, J. H. 161, 184.
 JERVIN 25.
 JERVIS, G. A. 208, 209, 337, 338.
 JESSOP 377, 467.
 JOFFE 379, 471.
 JOHANSEN, G. 45.
 JOHLIN 436, 438, 472.
 JOHNSON, E. M. 344.
 JOHNSON, W. A. 270, 286, 300, 303, 343, 344.
 JOHNSTON, J. H. 231, 340.
 JULY 371, 380, 382, 383, 427, 443, 469, 472.
 JONES, D. M. 344.
 JONES E. M. 27.
 JONES, R. O. 341.
 JORDAN 465.
 JORDAN, P. 98, 184.
 JOWETT, M. 244, 246, 341.
 JUDIN 391, 468.
 JUKES, T. H. 28, 35, 43, 45, 46, 47, 60, 61.
 JUNG, F. 48, 49, 59, 61.
- KABAT, E. A. 184.
 KAHLENBERG, O. J. 46, 60.
 KAHLER 379, 475.
 KALCKAR, H. M. 188, 289, 307, 308, 313, 334, 345, 346.
- KAMEN, H. D. 272, 274, 276, 309, 343, 346.
 KANE 395, 472.
 KANGA, D. D. 27.
 KANZE, E. 338.
 KAPELLER-ADLER, R. 338.
 KAPP, E. M. 229, 340.
 KARRER, P. 58, 63, 203, 206, 238, 336, 337, 343, 346.
 KATZ 376, 377, 468, 472.
 KAUSCHE, G. A. 95, 104, 118, 119, 120, 135, 142, 146, 148, 151, 161, 167, 169, 184, 186.
 KECKWICK 448.
 KECKWICK, R. A. 185.
 KEENAN 432, 472.
 KEIL, W. 219, 245, 334, 339, 341, 342.
 KEILIN, D. 188, 334.
 KEIM 378, 472, 476.
 KELLER 387, 472.
 KEMP 393, 472.
 KENDALL, F. E. 139, 140, 184.
 KERESZTESY, J. C. 32, 44, 45, 48, 50, 51, 54, 57, 59, 61, 62.
 KESTON, A. S. 337.
 KIDD, J. G. 184, 186.
 KIKUTH, W. 92, 184.
 KIRKWOOD 383, 471.
 KLEINZELLER, A. 283, 343, 344.
 KLEM, A. 241, 346.
 KLEMPERER, F. W. 346.
 KLENK, L. 175, 186, 214.
 KLOTZ, A. W. 44.
 KLUYVER, A. J. 200, 336.
 KNIGHT 377, 472.
 KNIGHT, C. A. 155, 166, 185.
 KNIGHT, E. C. 286, 344.
 KNOBLOCH, H. 336.
 KNOOP, F. 202, 206, 214, 266, 290, 292, 299, 337, 341, 342, 343.
 KNOTT 406, 472.
 KOBAYASHI, Y. 13, 26.
 KOCH, R. 105, 341.
 KÖGL, F. 30, 38, 44, 203, 336, 350, 391, 472.
 KÖHLE, H. 198, 335, 340.
 KÖHLER, E. 91, 103, 185.
 KÖHLER, F. 214, 218, 220, 335, 338.
 KÖHLER, L. 214, 218, 220, 335, 338.
 KOENIG, H. 206, 337.
 KOHN, M. 33, 44.
 KOLB, L. C. 47, 60.
 KOLKMEIJER 410.
 KOLMER, J. A. 178, 183.

- KON, G. S. R. 29, 27.
 KONDO, H. 14, 26.
 KOONES, H. F. 48, 57, 59, 61.
 KOPCOWSKA, L. 185.
 KOSCHARA, W. 68, 80, 81, 82, 84, 85, 86.
 KOSER, ST. A. 30, 44.
 KOTAKE, M. 13, 14, 26.
 KOTAKE, Y. 197, 207, 208, 213, 264, 335,
 337, 338, 343.
 KOTTLER, A. 85.
 KOTZSCHMAR, A. 85.
 KRAHL 389, 447, 469.
 KRAMPITZ, L. O. 275, 277, 311, 344, 346.
 KRATKY, O. 129, 185.
 KRAUS, J. 338.
 KRAUSE, M. E. 46, 60.
 KRAUSKOPF, E. J. 43.
 KREBS, H. A. 202, 212, 263, 265, 267, 268,
 270, 272, 273, 274, 277, 278, 280, 285,
 299, 300, 303, 309, 310, 318, 321, 322,
 327, 333, 336, 338, 343, 344, 345, 346.
 KREHAN, M. 227, 339.
 KREIS, W. 26.
 KRINGSTAD, H. 43, 50, 62.
 KRITZMANN, M. G. 203, 336.
 KROPACSY, S. 227, 339.
 KRÜGER, D. 240, 341.
 KRUEGER, J. 27.
 KRUSIUS, F. E. 268, 272, 279, 343, 344.
 KUDAR, H. 128, 184.
 KUDSZUS, H. 234, 340.
 KÜHLING, O. 65, 85
 KÜHN 207.
 KÜHNAU, J. 47, 61.
 KÜNZEL 387, 472.
 KÜRSCHNER, K. 346.
 KUHN, R. 32, 34, 35, 37, 38, 40, 44, 45,
 46, 50, 51, 54, 55, 58, 59, 60, 62, 63,
 67, 85, 86, 195, 196, 214, 217, 218,
 220, 222, 223, 254, 255, 259, 335, 338,
 339.
 KUHN, W. 128, 185.
 KUNITZ, M. 185.
 KUNKEL, L. O. 103, 185
 KUWADA, K. 13, 14, 26
 KYU-YUI, C. 208, 337.

 LACHAUX, M. 199, 335.
 LADISCH, R. K. 48, 61
 LAIDLAW, P. 92, 185, 209
 LAINE, T. 45.
 LAKEY, C. F. 102, 185
 LAMB, J. D. 6, 26.

 LAMM, O. 124, 185.
 LANDSTEINER, K. 185, 452, 453, 474
 LANDT 380, 472.
 LANG 474.
 LANG, A. 97, 183.
 LANG, K. 201, 203, 209, 232, 241, 242,
 255, 336, 338, 340, 341, 342.
 LANGE 356, 468, 472.
 LANGLEY, W. D. 338.
 LANGMUIR, I. 124, 131, 152, 185, 349,
 350, 355, 370, 372, 377, 378, 380, 384,
 385, 386, 398, 401, 403, 404, 405, 406,
 408, 409, 413, 415, 418, 421, 422, 426,
 428, 429, 442, 443, 445, 446, 447, 452,
 458, 460, 468, 472, 473.
 LANTZ, E. M. 50, 62.
 LANYAR, F. I. 193, 334, 335.
 LASKER, M. 200, 336.
 LASZT, L. 58, 63.
 LAUFFER, M. A. 129, 148, 158, 185, 187.
 LAVIN, G. I. 25, 184, 185, 187, 335.
 LAWSON, E. J. 35, 44.
 LEDINGHAM, J. C. 94, 185.
 LEE 435, 473, 476.
 LEE, J. VAN DER 251, 338, 339, 342.
 LEEFERS, J. L. 200, 336.
 LEEUWENHOEK, ANTONIE VON 346
 LEGLER, R. 206, 337.
 LEHNINGER, A. L. 231, 300, 330, 340.
 LELOIR, L. F. 228, 240, 336, 339, 341.
 LENARD, PH. 357.
 LEPKOVSKY, S. 43, 46, 47, 50, 58, 60, 62.
 LEPPLA 469.
 LESSING 419, 469.
 LEVADITI, C. 102, 185.
 LEVI, A. A. 195, 335.
 LEVINE, H. 340.
 LEVINE, S. 124, 152, 185
 LEVY, H. 36, 45.
 LEWIS, H. B. 192, 208, 211, 334, 337.
 LIBET, B. 280, 344.
 LICHTENSTEIN, J. 132, 185
 LIEBIG, R. 73, 86.
 LIER, W. 8, 26
 LILLIE 60
 LINCOLN 411, 469.
 LINCKE, H. 219, 339.
 LING 436, 476.
 LINTZEL, W. 190, 334.
 LINVILLE, R. G. 26.
 LIPMANN, F. 188, 278, 289, 313, 334, 344,
 345, 346
 LIPSCHITZ, W. I. 229, 339

- LIPSCHÜTZ, B. 89, 185.
 LIVADA, K. 223, 254, 255, 339.
 LJUBIMOWA 445, 469.
 LOCKWOOD, L. B. 336.
 LOEB, A. 343.
 LÖFFLER, F. 87, 185.
 LÖW, I. 55, 56, 63, 196, 217, 236, 335,
 338, 340.
 LOEW 250.
 LÖWENBERG, C. 339.
 LOGAN, M. A. 44.
 LONG, C. 278, 293, 344, 345.
 LOOKEREN CAMPAGNE, VAN 419, 470
 LORING, H. S. 155, 185
 LUKENS, F. D. W. 248, 342, 345.
 LUNDE, G. 43, 50, 62.
 LUTWAK-MANN, C. 194, 335
 LYMAN, C. M. 43, 307, 345.
 LYNEN, F. 257, 283, 284, 286, 287, 288,
 289, 294, 297, 299, 301, 302, 304, 319,
 322, 327, 330, 342, 344, 346
 LYONS 368, 473

MAASKANT 419, 445, 470
 MCBAIN 350, 381, 383, 384, 399, 469, 473.
 MACCLEMENT, W. D. 186, 187.
 MCCOY 43.
 MCELROY, L. W. 49, 61.
 MCFARLANE, A. S. 185
 MCFARLANE, M. C. 144, 182, 185.
 MACGILLVARY 410.
 MCHENRY, E. W. 47, 60.
 MCILWAIN, H. 41, 44, 45, 48, 61.
 MCINTOSH, J. 100, 185.
 MACKAY 415, 468.
 MACKAY, E. M. 47, 60, 244, 254, 255,
 341, 342
 MCKIBBIN, J. M. 43, 47, 61.
 MCKINNEY, H. H. 103, 185.
 MACLAURIN 473.
 MCMAHAN, I. R. 58, 63.
 McMORGAN, W. G. 23, 27.
 MACRAE, T. F. 47, 60.
 MADDEN, R. J. 43.
 MAIER, J. 341.
 MAITLAND 93, 185.
 MAJOR, R. T. 34, 44, 45.
 MAKINO, K. 53, 62.
 MALMBERG, M. 58, 63.
 MAMOLI, L. 237, 340, 341
 MANNICH 4, 26
 MARCELIN 349, 350, 355, 473.
 MARKER, R. E. 16, 17, 19, 20, 21, 27

 MARRACK, J. R. 185, 454, 456, 469.
 MARRIAN 371, 373, 467.
 MARSDEN 371, 387, 473.
 MARTIN, A. J. P. 47.
 MARTIN, C. J. 47, 60.
 MARTIN, D. W. 47, 60, 61.
 MARTIUS, C. 206, 265, 266, 282, 290, 292,
 294, 296, 299, 301, 305, 327, 337, 343,
 345, 346.
 MARVEL, C. S. 337.
 MASAMUNE, H. 339.
 MASON 3, 26.
 MATSUBARA, T. 5, 26.
 MATSUDA, F. 334.
 MATSUOKA, Y. 191, 334.
 MATTEI 377, 393, 473.
 MATTEWS 399, 473.
 MATTOON 408, 471.
 MATUKAWA, T. 51, 62.
 MAUGHAN, G. B. 340.
 MAURER, K. 200, 336.
 MAX, F. 85
 MAY, E. L. 33, 44, 45
 MAYER, H. 340.
 MAZZA, F. P. 232, 243, 258, 260, 340, 341,
 342
 MEDES, G. 191, 334.
 MEESSEN, K. 196, 226, 335.
 MEHL, J. W. 130, 185.
 MEIJER 419, 431, 470, 471.
 MELCHERS, G. 103, 104, 106, 150, 158,
 161, 162, 163, 170, 185.
 MELNICK, D. 60.
 MELVILLE 392, 470.
 Merck & Co. 45, 62.
 MERIGOUX 400, 473.
 MERZ, W. 341
 METCALF 427, 442, 473.
 METTIER, St. R. 47, 61.
 METZGER, H. 85.
 MEYER 410, 468.
 MEYER, C. E. 334.
 MEYER, K. H. 345.
 MEYERHEIM, G. 66, 67, 68, 85.
 MEYERHOF 311.
 MICHAELIS, L. 188, 334.
 MICH, K. 50, 51, 54, 58, 62, 63.
 MICKELSEN, O. 43.
 MICKELSON, M. N. 309, 345.
 MILLER 371, 379, 467, 473.
 MILLER, C. O. 29, 339.
 MILLER, G. L. 185.
 MILLER, P. H. 44

- MILLS 473.
 MITCHELL 372, 390, 391, 419, 426, 441,
 451, 459, 473, 474.
 MITCHELL, H. H. 337.
 MITCHELL, H. K. 40, 44, 45, 47, 60.
 MITTELMANN 393, 473.
 MITTERMAIR, J. 32, 44.
 MOE, G. K. 341.
 MÖLLER, E. F. 28, 38, 40, 43, 45, 48, 49,
 59, 60, 61.
 MOLL, TH. 48, 58, 59, 61, 63.
 MONQUIN 369, 473.
 MONTENBRUCK, D. 263, 343.
 MOORE 383, 473.
 MOORE, F. J. 85.
 MOREHOUSE, M. G. 190, 250, 334, 342.
 MORGAN, A. F. 43.
 MORI, T. 196, 335.
 MORII 53.
 MORRIS, SH. 62.
 MORTENSEN 385, 469.
 MOSER 404.
 MOSHER, W. A. 44.
 MOSS 355, 371, 419, 445, 473, 474.
 MOSS, A. R. 192, 334.
 MOTTSAM, J. C. 195, 346.
 MOZOLOWSKI, W. 229, 340.
 MÜLLER 368, 412, 473.
 MÜLLER, D. 335.
 MÜLLER, H. 147, 151, 154, 186, 190, 334.
 MÜLLER, J. 199, 210, 252, 338.
 MÜLLER, J. H. 44.
 MÜLLER, L. 341.
 MÜLLER, P. B. 342.
 MULDER, A. G. 343.
 MULDER, D. H. K. 343.
 V. MURALT 398, 473.
 MURRAY, S. 342¹
 MUÑOZ, J. M. 228, 240, 339, 341.
 MYERS 365, 371, 372, 382, 388, 389, 470,
 471, 473.
 NAGELSCHMIDT, G. 294, 345.
 NAHM, H. 345.
 NAKAYAMA, Y. 264, 343.
 NASINI 393, 473.
 NEBE, E. 342.
 NEBER, M. 203, 212, 336, 338.
 NECIULLAH, N. 344.
 NEGELEIN, E. 314, 346.
 NEUBAUER 202, 262.
 NEUBERG, C. 199, 284, 336.
 NEUMANN 371, 380, 469, 473, 475.
 NEUMANN, P. 343.
 NEUMANN, W. 26.
 NEURATH 415, 416, 421, 423, 431, 432,
 435, 436, 439, 445, 456, 459, 469, 473.
 NEURATH 179, 184, 185.
 NEUSCHUL, P. 199, 227, 230, 335, 340.
 NEUSTÄDTER, V. 33, 44.
 NEWBOLD, R. C. 25, 27.
 NEY, L. F. 33, 44.
 NICOLAU, S. 102, 185.
 NIEL, C. B. VAN 346.
 NIELS, VAN 308, 318.
 NIELSEN, N. 37, 45.
 NIENDORF, F. 338.
 NIER, A. O. 342, 344, 346.
 NILSSON, R. 466, 473.
 NORD, F. F. 227, 339.
 NORDLUND, M. 199, 335.
 NORRIS 404, 472.
 NORRIS, E. R. 86.
 NORRIS, L. C. 43.
 NORTHROP, J. H. 91, 97, 110, 117, 138,
 144, 182, 185, 186.
 NORTON 409, 473.
 NOUY, DU 437, 474.
 NUTRIT, J. 43.
 NUTTING 371, 378, 383, 471, 474.
 OCHOA, S. 289, 345.
 ODDO, G. 22, 27.
 ÖCHSEL 410, 413, 440.
 ÖSTROM, Å. 343.
 ÖSTROM, M. 343.
 OHDAKE, S. 51, 62.
 OHNO, S. 13, 14, 26.
 OHTA, Z. 27.
 ORMONDT, V. 419, 428, 431, 468, 471.
 ORTEN, J. M. 343.
 OSHIMA, M. 47, 61.
 OSMAN, E. 47.
 OSTWALD 347, 350, 359, 360, 427, 474.
 OTANI, S. 264, 337, 343.
 PALMER 393, 473.
 PANKHURST 386, 387, 467, 474.
 PANKRATOV 372, 474.
 PAPAGEORGE, E. 192, 334.
 PAPPENHEIMER 452, 474.
 PARKE, H. C. 32, 35, 37, 44.
 PARKER, R. F. 143, 144, 180, 186.
 PASCHEN 180.
 PASTEUR 102.
 PAULI 474

- PAULING, L. 138, 186, 456, 457, 461, 474.
 PEAKER 384, 473.
 PEARCE, M. S. B. 341.
 PEDERSEN 448.
 PEDERSEN, K. O. 88, 111, 176, 184, 187.
 PELCZAR jr., M. J. 44.
 PENNEY, J. R. 201, 336.
 PENNINGTON, D. 45.
 PENROSE, L. 208, 211, 337, 338.
 PERDAU, J. R. 186.
 PERKINSON jr., J. D. 337.
 PERRIN 400, 404, 474.
 PERRIN, F. 128, 186.
 PERUTZ, M. F. 126, 186.
 PETERLIN, A. 130, 186.
 PETERS, R. A. 293, 345.
 PETERSON, W. H. 28, 43, 48, 61
 PFALTZ, H. 43.
 PFANKUCH, E. 104, 118, 135, 136, 148,
 151, 155, 158, 161, 167, 184, 186.
 PHILIPPI 419, 421, 432, 439, 459, 470, 474.
 PHILLIPS, P. H. 43.
 PICKELS, E. G. 111, 186, 187.
 PIPER, S. H. 243, 341.
 PIRIE, N. W. 88, 110, 149, 151, 165, 171,
 172, 173, 183, 186, 187, 422, 468.
 PLASS, M. 307, 345.
 PLATTNER, PL. H. 26.
 PLATZ, B. R. 47, 50, 60, 62.
 POCKELS 349, 352, 354.
 POLING, C. E. 43.
 POLSON, A. G. 127, 128, 129, 185, 186.
 PONSFORD, A. P. 343
 PORTER 407, 452, 474.
 PORTER, J. R. 44.
 POTAKI, J. 26.
 PRATT, E. F. 44.
 PRELOG, V. 24, 25.
 PRICE, D. 45.
 PRICE, W. C. 148, 184, 185.
 PROBST, O. 344, 345
 PRYDE, J. 339
 PUGH, C. E. M. 198, 335.
 PURRMANN, R. 85.
 PUTZEYS, P. 130, 186.
 PYL, G. 120, 146, 175, 176, 183, 186
 QUACKENBUSH, F. W. 47, 60
 QUAGLIARELLO 232.
 QUASTEL, J. H. 198, 208, 211, 244, 246,
 267, 277, 335, 337, 338, 341, 343, 344
 QUICK, A. J. 229, 262, 339, 343.
 QUINKE 440.
 RACE 408, 474.
 RADULESCU 368, 474.
 RAISTRICK, H. 235, 340.
 RAMASWANY, R. 193, 335.
 RAMDAS 381, 474.
 RANE, L. 40, 44.
 RAPER, H. S. 193, 246, 255, 335
 RAPER, R. 23, 27, 254.
 RATNER, S. 337, 338.
 RAUCH, K. 345.
 RAUEN, H. 266, 343
 RAYLEIGH, Lord 349, 474.
 REBENSBURG, L. 134, 167, 186
 REEDMAN, E. J. 58, 63.
 REHBINDER 383, 475
 REICH, H. 35, 45.
 REICHEL, L. 198, 230, 335, 340
 REICHENEDER, T. 26
 REICHERT, R. 70, 85
 REICHSTEIN, T. 8, 13, 26, 32, 33, 34, 35.
 37, 40, 43, 44, 45.
 REINARTZ, F. 196, 226, 335, 339
 REINDEL, W. 335.
 RENZ, J. 7, 8, 10, 26.
 REYNOLDS 408, 474
 RHODAS, D. P. 335
 RICHARDSON, G. M. 345
 RICHARDSON, L. R. 46, 60.
 RICHTER, D. 193, 198, 335
 RIDEAL 349, 350, 355, 356, 358, 368, 369,
 371, 372, 373, 384, 385, 388, 390, 391,
 392, 393, 410, 419, 421, 425, 427, 432,
 435, 439, 443, 445, 451, 458, 459, 460,
 461, 467, 468, 470, 472, 473, 474, 475
 RIES 371, 376, 377, 471, 474
 RINGER, M. 284, 344.
 RINGIER, B. H. 336
 RITTENBERG, D. 189, 241, 274, 334, 337,
 340, 341, 344.
 RIVERS, T. M. 89, 143, 180, 184, 186, 187
 ROBBINS, W. J. 49, 61.
 ROBERTS, D. J. 178, 184
 ROBEZNIKES, I. 58, 63.
 ROBINSON, F. A. 40, 45, 130
 ROBINSON, J. R. 186.
 ROBL, R. 85
 ROCHELMEYER, H. 22, 23, 27
 ROE, E. T. 336.
 RÖTTGER 232.
 ROHRMANN, E. 27, 43, 44
 ROLOFF, R. 338.
 ROSCOE, M. H. 60.
 ROSE, W. C. 334, 337.

- ROSENHEIM 370, 467.
 ROSENMUND, H 8, 26
 ROSENTHAL, CH. 44
 ROSS, A F 146, 154, 186.
 ROTHEN 452, 453, 474.
 ROTINI, O T. 339
 ROUS, P. 99, 184, 186.
 ROWLEY 371, 378, 472, 474
 RUBEN, S. 272, 274, 276, 309, 310, 312,
 313, 343, 346.
 RUCKSTUHL, H. 346.
 RUGGLI, P 33, 44.
 RUSKA, E 183.
 RUSKA, H. 89, 94, 118, 180, 182, 184, 186.
 RUZICKA, L. 2, 26

 SABIN, A. B. 178, 186.
 SACHS, F. 66, 67, 68, 85
 SALAMAN, M. H. 104, 144, 170, 185, 186
 SALMON, W. D. 43, 46, 47, 60.
 SALOMON, H. 346
 SALVIN, E. 343.
 SAMMONS, H G. 230, 340
 SAMPSON, W. L. 43, 58, 63.
 SAMUEL, G. 183
 SAMWELL 376, 468, 472
 SANDE, D. VAN DER 338
 SAUM, A. M. 185.
 SAUNDERS, F 44.
 SAWAI 475
 SAYED, I. Z. 27.
 SCHAEFER 372, 377, 378, 403, 404, 405,
 414, 415, 417, 418, 421, 422, 426, 428,
 429, 442, 443, 446, 447, 452, 458, 472,
 473, 474.
 SCHAEFER, A. E. 47, 61
 SCHÄFER 131, 185.
 SCHAUDER, H. 86.
 SCHEER, J. VAN DER 185
 SCHEIBE, G. 157, 183
 SCHEIDER, W. 26
 SCHIEDT, B. 200, 336.
 SCHILLER, G. 341, 342.
 SCHINDLER, J. 178, 184.
 SCHIRO, H. S. 47, 61.
 SCHLÄPFER, M. 339.
 SCHLEICH, H. 209, 338
 SCHLENK, F. 58, 63.
 SCHLESINGER, M. 123, 183, 186.
 SCHLITTLER, E. 26.
 SCHLOSSMANN, H. 198, 335
 SCHLUBACH, H H 336.
 SCHMALFUSS, H 294, 345

 SCHMIDT, J. W. 409, 470, 474.
 SCHMIDT, M. B. 49, 61.
 SCHMITT 427, 442, 470
 SCHNEIDER, H. A. 47, 50, 60, 62.
 SCHNITTSPAHN, M. 58, 63.
 SCHOEN, R. 102, 185
 SCHOENHEIMER, R. 189, 192, 206, 210,
 228, 231, 241, 334, 337, 338, 339, 340,
 341
 SCHOENTAL, R. 195, 346.
 SCHÖPF, C. 64, 70, 76, 78, 79, 83, 85, 86
 SCHOON 412, 474, 475.
 SCHOOR, A. VAN 51, 62
 SCHOPFER, W. H. 49, 61.
 SCHORN, J. 341.
 SCHRAMM, G. 88, 96, 97, 104, 111, 134,
 136, 140, 147, 149, 151, 154, 158, 160,
 161, 164, 167, 174, 183, 185, 186.
 SCHRÖDER, H. 47, 61.
 SCHÜTT 440.
 SCHULER, W. 335.
 SCHULMAN 372, 381, 387, 388, 400, 405,
 406, 407, 410, 426, 443, 445, 451, 452,
 460, 468, 469, 470, 472, 473, 474, 475.
 SCHULTZ, A. S. 48, 61.
 SCHULTZ, E. W. 186.
 SCHWARZ, K. 29, 42, 43, 43.
 SCHWARZ, KL. 48, 61
 SCHWARZE, W. 345.
 SCHWERIN 393, 471.
 SCUDI, J. V. 48, 57, 59, 61, 63, 335.
 SEALOCK, R. R. 334, 337.
 SEASTONE, C. V. 187, 422, 444, 475.
 SEBBA 385, 398, 403, 475
 SEBRELL, W. H. 43.
 SEEDER 355, 471.
 SEELICH, F. 351.
 SEIDEL, E. 47, 61
 SEIFFERT, G. 92, 187.
 SEKORA, A. 129, 185
 SELBIE, F. R. 185.
 SHABICA, A. C. 27.
 SHAFFER 452, 453, 475
 SHAMBAUGH, N. F. 208, 337.
 SHAPIRO 457, 471.
 SHAPIRO, B. 232, 340
 SHARP, D. G. 179, 183, 185, 187.
 SHEDLOWSKY, TH. 187
 SHERWIN, C. P. 339.
 SHOPE, R E 178, 187.
 SHU, F. Y. 343.
 SIEBENÄUGER, H 345.
 SIEGEL, L. 60.

- SIEWERT, G. 4, 26.
 SILBERSTEIN, H. E. 334.
 SIMMONS, R. W. 86.
 SIMMS, H. D. 43.
 SIMOLA, P. E. 268, 269, 272, 278, 280,
 286, 343, 344.
 SKRAUP, S. 242, 341.
 SLADE, H. D. 310, 315, 316, 319, 322,
 328, 333, 346.
 SLOOF 210.
 SLOTIN, L. 272, 274, 303, 343, 344, 346.
 SLOTTA, K. H. 209, 338.
 SMADEL, J. E. 184, 186, 187.
 SMAKULA, A. 339.
 SMEDLEY-MACLEAN, I. 240, 341, 343.
 SMITH 445.
 SMITH, A. H. 343.
 SMITH, D. H. 262, 270, 293, 327, 343.
 SMITH, I. A. 343.
 SMITH, J. A. B. 341.
 SMITH, K. M. 186, 187.
 SMITH, S. 6, 26
 SMITH, S. G. 47, 61
 SMYTHE, C. V. 144, 186, 188, 334.
 SNAPPER, I. 339, 341.
 SNELL, E. E. 28, 40, 43, 45, 48, 49, 61.
 SNELLMAN 450.
 SNELLMANN, O. 130, 187.
 SOBOTKA 377, 403, 405, 415, 447, 473,
 474, 475.
 SOLLNER 381, 475
 SØRENSEN, S. P. L. 117, 187
 SOLTYS, A. 22, 23, 27.
 SOLOMON, A. K. 346.
 SOMMA, A. A. DI 339
 SONDERHOFF, R. 188, 283, 284, 287, 297,
 334, 344.
 SONN, A. 65, 85
 SPIERER 475.
 SPIES, J. R. 85.
 SPIES, T. D. 43, 45, 47, 48, 61
 SPOONER, E. T. C. 186
 SPRENGLING, G. 80, 85.
 SREENIVASAYA, M. 187
 STADIE, W. C. 248, 291, 342, 345
 STALLBERG 377, 419, 435, 475
 STALLBERG-STENHAGEN 371, 377, 475
 STAGE, N. E. 25, 27.
 STANBERY, S. 43, 45.
 STANLEY, W. M. 88, 110, 120, 147, 151,
 155, 164, 166, 170, 171, 183, 184, 185,
 186, 187.
 STAPP, C. 142, 187.
 STARE, F. J. 345.
 STAUDINGER, H. 155, 187
 STEENBOCK, H. 47, 50, 60, 62.
 STEIGER 3, 13, 26.
 STEINHAUSER, H. 340, 345.
 STENHAGEN 350, 371, 377, 388, 405, 406,
 408, 412, 445, 450, 469, 474, 475.
 STEPP, W. 47, 61.
 STERN, K. G. 188, 230, 334.
 STERRETT 411, 469.
 STETTEN, D. 228, 231, 339, 340, 341
 STEUDEL, H. 213, 338.
 STEVENS, J. R. 50, 51, 54, 62
 STIEBEL 382, 389, 439, 476.
 STILLER, E. T. 32, 34, 35, 36, 44, 45, 51,
 54, 62
 STOCK 411, 475.
 STOLL, A. 6, 8, 10, 26, 197
 STONE, R. W. 345, 346
 STORKS 412, 413, 470
 STRACHAN 475
 STREET, H. R. 47, 61
 STRIECK, F. 341.
 STRONG, F. M. 28, 43, 45
 STROUD, S. W. 195, 335
 STRUBBS, J. J. 336
 STUART, H. A. 130, 186
 STUBBE, H. 104, 135, 167, 184, 186
 SUBBAROW, Y. 40, 43, 44
 SÜFFERT, F. 86
 SUPPLEE, G. C. 46, 60
 SURE, B. 48, 61.
 SURMATIC, J. D. 27
 SVEDBERG, TH. 111, 112, 124, 184, 187,
 441
 SVENSON, H. 187
 SWAIN 473.
 SWAMINATHAN, M. 58, 63
 SWEARINGEN 438, 471
 SWENSEID, M. E. 250, 271, 342
 SZENT-GYORGY 251, 268, 286, 304, 331,
 380, 445, 468, 470.
 SZPILFOGEL, S. 24, 25
 TAKAHASHI, T. 230, 340.
 TALMUD 383, 391, 416, 422, 452, 468, 475.
 TAMMAN 398
 TAMURA, J. T. 44.
 TAMURA, S. 229, 339
 TANGL, H. 233, 340
 TARTTER, A. 77, 85, 86
 TATUM, E. L. 43
 TAUBMANN 398, 475.

- TAYLOR 426, 472.
 TAYLOR, A. R. 183, 185, 187.
 TEIGE 398, 475.
 TEORELL 350, 381, 399, 400, 419, 468, 475.
 TER HORST 427, 428, 475.
 TESCHEN, H. 341.
 THALER, H. 200, 336.
 THAUER 396; 475.
 THIERFELDER 214.
 THIESSEN 350, 409, 412, 415, 475.
 THOMAS, H. 283, 284, 297, 344.
 THOMAS, I. 345.
 THOMAS, R. M. 85, 214.
 THUNBERG 282, 331.
 TISELIUS, A. 115, 116, 132, 177, 178, 187.
 TIUKOW, D. 286, 344.
 To, T. 338.
 TOENIENEN, E. 273, 344.
 TÖPPLER 113, 116.
 TORBOLI, A. 211, 338.
 TOŠIĆ, I. 346.
 TOURTELOTTE, D. 337.
 TRAUSSNE 379, 475.
 TRAPEZNIKOV 371, 372, 475.
 TRAUBE, W. 66, 67, 68, 70, 85
 TRONSTADT 404, 475.
 TRUESDAIL, J. H. 43.
 TRURNIT, H. J. 131, 185, 187, 388, 390,
 397, 403, 405, 415, 437, 448, 449,
 475.
 TSCHESCHE, R. 5, 16, 20, 26, 27, 84, 86.
 TSCHIRCH, E. 240, 341.
 TSCHOPP, H. 338.
 TSCHOPP, W. 338.
 TSCHUGUNOW 470.
 TSUKAMOTO, T. 27.
 TUCKER 438, 468
 TURNER 467.
 TURNER, D. I. 27.
 TUTIN 27.
 TYTELL, A. A. 44.

 UENO, Y. 27.
 ULSHAFEN, P. R. 27.
 UNDERKOFER, I. A. 199, 336.
 UNNA, KL. 43, 46, 48, 58, 59, 60, 60, 61, 63
 URNEZAWA, S. 339:

 VAIDYANATHAN 381.
 VASIČEK 404, 475.
 VEAL, DE 392.
 VEEN, A. G. v. 86.
 VENNESLAND, B. 313, 374, 346

 VERCELLONE, A. 237, 340.
 VERKADE, P. E. 215, 216, 240, 243, 251,
 258, 338, 339, 342.
 VERKADE-SANDBERGEN, A. 338
 VERZAR, F. 58, 63.
 VIER, B. S. 60.
 VIGNEAUD, V. DU 206, 337.
 VILTER, R. W. 48, 61.
 VIOLLIER, G. 213, 338.
 VIRTANEN, A. L. 45, 199, 308, 335
 VISSCHER, M. B. 341.
 VOGT, G. 8, 26.
 VOLMER 349, 351, 380, 475.
 VOLTA 358.
 VORWERK, J. 336.
 VOSS, W. 8, 26.

 WAEL, DE 412, 471, 476.
 WAELSCH, H. 202, 235, 274, 336, 349, 344
 WAGNER, R. B. 27.
 WAGNER-JAUREGG, TH. 46, 60, 86, 269,
 343.
 WAISMAN, H. A. 43, 44, 63.
 WAKEHAM 383, 476.
 WALCH, H. 345.
 WALDMANN, H. 339.
 WALKER, K. 286, 344.
 WALLENFELS, K. 22, 23, 27.
 WALLINGFORD, V. H. 344.
 WANG 436, 476.
 WARBURG, O. 202, 214, 302, 336
 WARD, S. M. 184.
 WASHBURN 378, 379, 383, 472, 475, 476
 WATSON 377.
 WAUGH 433, 445, 458, 460, 473
 WEBB, T. J. 54, 56, 57, 59, 63.
 WEBLEY, D. M. 277, 344.
 WEICHERT, R. 337.
 WEIDEL, W. 337.
 WEIGAND, C. G. 58, 63.
 WEIGERT, F. 195, 346.
 WEIJLARD, J. 36, 45.
 WEIL-MALHERBE, H. 203, 212, 278, 280,
 291, 336, 338, 344, 345.
 WEINSTOCK jr., H. H. 33, 40, 43, 44, 45.
 WEISSMAN, N. 337.
 WELLS, P. A. 336.
 WENDT, G. 46, 50, 51, 54, 56, 58, 59, 60,
 62, 63.
 WERKMAN, C. H. 276, 286, 309, 311, 316,
 318, 322, 324, 329, 333, 335, 340, 343,
 344, 345, 346.
 WERTHEIMER, E. 232, 340.

- WESTPHAL, K. 51, 62.
 WESTPHAL, O. 51, 62.
 WESTPHAL, U. 203, 209, 226, 336, 338, 339.
 WETZEL, R. 340.
 WEYGAND, F. 33, 44.
 WHEATLEY, A. H. M. 267, 343.
 WHITE, PH. R. 50, 62.
 WICK, A. N. 244, 250, 256, 341, 342.
 WIDDOWSON 415, 471.
 WIELAND, H. 15, 16, 26, 32, 34, 35, 37, 38, 40, 44, 45, 73, 76, 77, 85, 86, 197, 214, 227, 240, 282, 287, 290, 299, 300, 302, 329, 331, 335, 344, 345.
 WIERINGA, K. T. 315, 346.
 WILEY, F. H. 335.
 WILEY, P. F. 37, 45.
 WILHELMY 355, 476
 WILLERDING 19, 27.
 WILLIAMS 356, 470.
 WILLIAMS, R. J. 28, 29, 30, 31, 32, 35, 40, 43, 44, 45, 49, 58, 61, 63.
 WILLIAMS, R. T. 194, 229, 230, 335, 339, 340.
 WILMAN 412, 469.
 WILSON 379, 381, 383, 469, 473, 476.
 WILSON, A. N. 56, 59, 63.
 WINDAUS, A. 19, 27.
 WINKLHOFER, F. 244, 341
 WINTROBE, M. M. 47, 60.
 WISHART, F. O. 143, 184.
 WITHMAN, L. 93, 187.
 WITKOP, B. 197, 335.
 WITTFOGEL, H. 105, 187.
 WITTLE, E. L. 27.
 WITZEMANN, E. I. 240, 341.
 WOLF 350, 476.
 WOLF, H. J. 47, 61, 84, 86.
 WOLFENBERGER, CH. 339
 WOLFF, H. H. DE 338.
 WOLF-TRIESCHMANN 349, 476.
 WOMACK, M. 334.
 WOOD, H. G. 198, 272, 274, 276, 286, 296, 304, 307, 309, 312, 314, 316, 318, 322, 325, 329, 333, 335, 340, 343, 344, 345, 346.
 WOODS, D. D. 263, 343, 345.
 WOODRUFF, A. M. 93, 187.
 WOOLDRIDGE, W. R. 267, 343.
 WOOLLEY, D. W. 31, 32, 34, 39, 40, 43, 44, 45, 48, 61.
 WOORDEN, A. N. 60.
 WRINCH 446, 473.
 WU 435, 436, 473, 476.
 WURMSER, R. 188, 334.
 WYCKOFF, R. W. G. 88, 111, 114, 170, 171, 179, 182, 183, 185, 187
 WYMAN 407, 474.
 YAMINS 476.
 YOFFE 400, 465, 471.
 YOSIL 232.
 YOUNG 371, 378, 471
 YUDKIN 393, 472.
 YU, T. F. 339.
 ZAHL 409, 476.
 ZAKOMORNY, M. 287, 344.
 ZANFAGNA, R. 243, 341.
 ZANKE, W. 226, 339.
 ZAPP, jr., J. A. 248, 342, 345.
 ZATHURECKY, Zs. L. 341.
 ZELLER, E. A. 191, 334.
 ZEMPLÉN, G. 27.
 ZETZSCHE 232.
 ZIHA, S. S. 201, 336.
 ZIMA, O. 48, 59, 61.
 ZIMMER, K. G. 108, 187.
 ZIMMERMANN, H. M. 47, 61.
 ZINSSER, H. 187.
 ZISMAN 407, 476.
 ZOCHER 382, 389, 439, 476.
 ZORN, K. 203, 211, 336, 338.
 ZSCHIESCHE, E. 45.

Sachverzeichnis.

- Abrin** 208.
Acetaldehyd 197.
Acetalphosphatide 199.
Acetessigsäure 191, 231, 243, 246, 250, 270.
Aceton 199, 250.
Acetonylacetone 260.
Acetoxy-21-oxynorcholadiensäure 2.
21-Acetoxy- Δ^3 -pregnenol-(3)-on(20) 238.
Acetylcitronensäure 290.
Acetyl-Pantothensäure 35, 39.
Achromotrichie 29.
Aconitase 266, 280.
cis-Aconitsäure 266, 295.
ADAM-JESSOP-Waage 355.
Adermin = Vitamin B₆ 46.
Adermin-Protein 50.
Adermin-violett 56.
Adipinsäure 211, 212, 216, 241, 258.
Adrenalin 193, 198.
Adrenochrom 193.
Adynerigenin 5, 9.
Adynerin 5, 9.
17-Äthynyl-androstendiol-(3, 17) 238.
Äthylalkohol 227.
Äthylbernsteinsäure 262.
Äthylbuttersäure 255.
 ϵ -Äthyl-decansäure 219.
Äthylheptansäure 255.
 γ -Äthyl-korksäure 220.
Äthylnonansäure 255.
 γ -Äthyl-octansäure 191, 219.
 α -Äthyl- β -oxy-hexansäure 191
 α -Äthyl-zimtalkohol 228.
 ν -Äthyl-zimtsäure 228, 254.
12-epi-Ätiocholansäure 3.
Alanin 181, 202, 203.
 β -Alanin 30, 33, 40.
Aldehydrase 230.
Alkaptonurie 192, 208.
Alkohol-Dehydrogenasen 198.
Alloaglykone 6.
Alloemicymarin 6.
Allostrophantidin 6.
Alloxazin-adenin-dinucleotid 202.
Alloxazine 67.
Amine 197.
 β -Aminobuttersäure 38.
dl- α -Aminobuttersäure 202, 204.
 β -Amino-n-capronsäure 241.
 β -Amino-n-decansäure 241.
2-Amino-1-naphthol 195.
 β -Amino-n-octansäure 241.
o-Aminophenol 194.
o-Amino- β -phenyl-äthanol 263.
Aminopherasen 204.
l-Aminosäure-desaminase 202.
d-Aminosäureoxydase 202.
 β -Amino-n-valeriansäure 241.
Aminooxydasen 198.
n-Amyl-malonsäure 261.
iso-Amyl-malonsäure 261.
Androstendiol 237.
Androstendion 237.
Androsteron 19.
Aneurin 277.
Anhydro-calotropagenin 9.
Anhydro-convallotoxinogenin 4.
Anhydro-strophanthidin 4, 9.
Anilidobernsteinsäure 241.
Anthracen 195.
Anthranilsäure 214, 264.
Anti-acro-dynie-Faktor = Vitamin B₆ 46.
Antidermatitis-Faktor = Vitamin B₆ 46.
Antigen L 181.
LS-Antigen 143.
Antigen S 181.
Antipellagra-Faktoren 46.
Arachidonsäure 242.
Arenobufagin 12
Arenobufogenin 12, 13.
Arginin 206.
l-Ascorbinsäure 201.
Asparaginsäure 202, 204, 206.

- Aspartico-aminopherase 204.
 Astern-yellow-Virus 103.
 Aucubamosaikvirus 161, 164, 165.
 Azelainsäure 216, 258.
 Azin-Purine 66.

Bakteriophagen 91, 109, 144, 182.
 Benzalacetone 191.
 Benzal-methyl-äthyl-keton 194.
 Benzol 210.
 N-Benzolsulfonyl-N-methyl- α -amino-
 adipinsäure 218.
 N-Benzolsulfonyl-N-methyl- α -amino-
 laurinsäure 218.
 Benzoylameisensäure 262
 Benzpteridine 65, 67
 3,4-Benzpyren 195.
 3,4-Benzpyren-5,8-chinon 195
 Benzylcrotonsäure 254
 Bernsteinsäure 212, 258, 279, 322
 Bernsteinsäurehalbaldehyd 285.
 Biliverdin 77.
 BOLLINGER-Körper 96
 Brenztraubensäure 202, 203
 Brenzweinsäure 261
 Bufagin 12, 13.
 Bufalin 12.
 Bufogenin 13
 Bufotalidin 12
 Bufotalin 12, 13, 15.
 F₃-Bufotalin 12
 Bufotalinin 12
 Bufotoxine 16.
 Bushy-stunt-Virus 109, 117, 123, 125,
 144, 153, 154.
 Butanol 243.
 Buttersäure 243, 247
 Butylbernsteinsäure 262
 n-Butylmalonsäure 261

Calotoxin 9, 11
 Calotropagenin 6, 9, 11
 Calotropin 11.
 Campher 196, 225.
 trans- π -Campher-carbonsäure 225
 Camphersäure 226
 Caprinsäure 215, 252
 Capronsäure 216
 Caprylsäure 215, 242, 248, 252
 α -Carboxy-decandicarbonsäure-1,9 218
 Carboxylase 277
 β -Carboxy-laurinsäure 219, 262
 α -Carboxy-nonandicarbonsäure-1,9 217
 β -Carboxy- γ -oxy-adipinsäure 219.
 β -Carboxy-pelargonsäure 262.
 β -Carboxy-pentadecylsäure 262
 α -Carboxy-sebacinsäure 218
 β -Carboxy-tridecylsäure 262
 Cassain 10.
 Cerberigenin 5, 9.
 Cerberin 5, 9
 Cerberose 9.
 n-Cetyl-malonsäure 261.
 Cevin 25
 Chinasäure 235.
 Chlorogenin 16, 21
 Cholestanol 373
 Cholestenon 236.
 Cholesterin 21, 234, 236, 374
 Chrysopterin 64, 77
 Chymotrypsin 129
 Cinnamal-aceton 194.
 Cinobufagin 12, 13, 14
 Cinobufotalidin 12
 Cinobufotalin 12, 14.
 Citraconsäure 261
 Citral 222
 Citrogenase 291, 301.
 Citronellal 196.
 Citronellol 224.
 Citronensäure 245.
 Citroylcitronensäure 290
 Citroylessigsäure 290
 Convallamarin 8.
 Convallatoxigenin 4.
 Convallatoxin 4, 9
 Corpusluteum-Hormon 19
 Coumingidin 10.
 Crotonsäure-anilid 194
 N-Crotonyl-q-amino-phenol 194
 Curlytop-Virus 102
 Cyclocamphanon 226
 Cyclohexan 211
 Cyclohexandicarbonsäure 262
 Cyclohexanol 211
 Cyclohexen 211
 Cyclohexyl- α -amino-buttersäure 235
 Cyclohexylbuttersäure 212, 241
 Cyclohexyldecansäure 212, 241
 Cyclohexyllessigsäure 211
 Cyclohexylpropionsäure 235, 240
 Cyclohexylvaleriansäure 235, 240
 Cyclopentan 238.
 Cymarin 8, 11
 Cymarose 9, 11
 Cysteinsäure 204

- Dahlemense-Virus 167.
 Decandicarbonsäure 259.
 Decatetraensäure 221.
 n-Decyl-malonsäure 217, 261.
 Dehydroandrosteron 234, 237.
 Dehydro-l-ascorbinsäure 201.
 Dekahydrochinaldin 239.
 Dekahydrochinolin 239.
 Dekahydroisochinolin 239.
 Dekahydronaphthalin 195.
 Dekahydro- α -naphthoesäure 236.
 Dekahydronaphthol 195.
 Desacetyloleandrin 9.
 Desiminoleukopterin 70, 71, 76.
 Desoxycholsäure 196.
 Desoxycorticosteron 226, 238.
 6-Desoxyleukopterin 70.
 Deuteriobuttersäure 190.
 Deuterio-capronsäure 250.
 Deuteriocetylalkohol 228.
 Deuteriolarinsäure 242.
 Deuteriomyristinsäure 242.
 Deuteriooctylalkohol 228.
 Deuterio- β -Oxybuttersäure 190.
 Deuteriopalmitsäure 228, 241.
 Deuteriostearinsäure 228, 241.
 1⁶⁻⁵-3,21-Diacetoxy-pregnenon-20 2.
 Diacetyl 260.
 Diacidurie 245.
 Dianhydrogitoxigenin 9.
 1,2,5,6-Dibenzanthracen 195.
 Di-n-butylmalonsäure 261.
 Dicarbonsäuren 252.
 Digilanidase 10.
 Digilanidobiose 10, 11.
 Digipurpidase 10.
 Digitogenin 16, 21.
 Digitoxigenin 5, 9.
 Digitoxin 11.
 Digitoxose 11.
 Digoxygenin 3.
 Dihydroisoxanthopterin 78.
 Dihydromyrcen 224.
 Dihydro-o-toluylsäure 236.
 Dihydroxanthopterin 68:
 3,5-Dijodo-4-oxyphenylmilchsäure 191.
 Dijodotyrosin 191.
 Diketo adipinsäure 260.
 3,12-Diketo- α -tiocholansäure 3.
 2,3-Diketo-l-gulonsäure 201.
 Diketokorksäure 260.
 4,5-Dimethyl-2-acetyl-salicylsäure 215.
 β,β -Dimethylacrylsäure 221.
 Dimethylanilin 194.
 Dimethylanilinoxid 194.
 Dimethylbrenztraubensäure 202.
 Dimethylcampher 196, 226.
 o-Dimethyl-cyclohexan 211, 214.
 p-Dimethyl-cyclohexan 211, 214.
 2,5-Dimethyl-furan 222.
 (2,6)-Dimethyl-hepten-(2)1-oxy-7-mono-carbonsäure 224.
 1,5-Dimethyl-hexadien-(1,5)-1,6-di-carbonsäure 223.
 N,N-Dimethyl-hexahydrobenzamid 234.
 Dimethylmalonsäure 261.
 Dimethylterephthalsäure 215.
 O,N-Dimethyltyrosin 209.
 Dioscin 22.
 Diosgenin 16, 21, 22.
 Dioxyaceton 199.
 α,ϵ -Dioxy-capronsäure 40.
 α,γ -Dioxy- β,β -dimethyl-buttersäure 32, 40.
 α,γ -Dioxy- β,β -dimethyl-butylrolakton 38,
 1,2-Dioxy-1,2-dihydro-anthracen 195.
 4,4'-Dioxy-diphenyl 195.
 α,γ -Dioxy- β -methyl- β -äthyl-buttersäure 40.
 α,γ -Dioxy- α -methyl-buttersäure 40.
 α,γ -Dioxy- β -methyl-buttersäure 40.
 β,γ -Dioxy- β -methyl-buttersäure 40.
 α,γ -Dioxy- β -methyl- β -oxymethyl-buttersäure 40.
 1-3,4-Dioxyphenyl-alanin 191, 193.
 2,4-Dioxy-4-phenyl-butan 191.
 2,6-Dioxy-pteridin 65.
 8,9-Dioxy-pteridine 72, 73, 75.
 α,γ -Dioxy-valeriansäure 40.
 Diphosphoglycerinsäure 314.
 n-Dodecyl-malonsäure 261.
 Dopa 193.
 Durol 215.
 Durylsäure 215.
 Eialbumin 132.
 Einschlusskörper 94, 96.
 Ektromelie 92, 94.
 Elementarkörper 94, 180
 Emicymarin 6.
 Emulsin 10.
 Enationvirus 164, 165.
 Epiallolithocholsäure 7.
 Equilenin 234.
 Equilin 234.
 Ergosterin 374.

- Erucasäure 252.
 Erythrit 199.
 Erythropterin 64, 77, 78, 79.
 Erythrose 199.
 Essigsäure 227, 240, 250.

 Farnesensäure 228.
 Farnesol 228.
 Fettsäuredehydrogenase 232.
 Filmwaage 355.
 Flavine 67.
 Formylglutamin 213.
 Fumarsäure 258, 267.
 Furanacrylamid-(2)-carbonsäure-(5)
 222.
 Furan-2,5-dicarbonensäure 222.

 Galactonsäure 230.
 Galaktose 230.
 Gamabufogenin 12, 14.
 Gamabufotalin 12.
 Geflügelpocken 96.
 Gelbfieber 93.
 Gentsinsäure 194.
 Geraniumsäure 222.
 Gitogenin 16, 21.
 Gitoxigenin 9.
 d-Gluconsäure 229.
 d-Glucose 229.
 α -Glucosidase 10.
 β -Glucosidase 10.
 Glucuronsäure 229.
 Glutamico-aminopherase 204.
 Glutaminsäure 202, 203, 206, 210, 212,
 213.
 Glutaminsäuredehydrase 203.
 Glutarsäure 258.
 Glycerin 199.
 Glycerinaldehyd-phosphorsäure 197.
 Glycyldehydrophenylalanin 209.
 Glykokoll 206.
 Green aucuba 166.
 Guanin 74.
 GUARNERI-Körper 96.
 Gurkenmosaikvirus 141, 151, 164, 166,
 167.
 Guvacin 238.

 Harnsäure 75, 77.
 Hefenucleinsäure 144, 155.
 n-Heptyl-malonsäure 261.
 „Herellen“ 183.
 Herpesvirus 92, 147.

 Hexadecandicarbonensäure 258.
 p-Hexadecyl-cyclohexanol 374.
 p-Hexadecyl-phenol 374.
 Hexahydroaminobenzoensäure 212.
 Hexahydrobenzoensäure 234.
 Hexahydrobenzoylalanin 234.
 Hexahydrobenzoylsarkosin 234.
 Hexahydro-hippursäure 234.
 Hexahydro-nicotinsäure 238.
 Hexahydro-m-toluylsäure 235.
 Hexatrien-1,6-dicarbonensäure 221.
 Hexensäureamid 217.
 Hexylbernsteinsäure 262.
 n-Hexyl-malonsäure 261.
 HILDEBRANDT-Säure 223.
 Histidase 213.
 Histidin 206, 213.
 HOLMES' masked Virus 166.
 HOLMES Ribgrass-Virus 166.
 Homogentisinsäure 192, 208.
 Hühnersarkom 99.
 Hypoxanthin 77.

 Ichthyopterin 64, 80.
 Imbecillitas phenylpyruvica 208.
 Imino-lumazin 74.
 Indolbrenztraubensäure 206.
 β -3-Indolbrenztraubensäure 208.
 β -3-Indolmilchsäure 208.
 Inosit 211.
 Inosose 200.
 Insektenviren 109, 117, 144.
 Insulin 129.
 Intarvin 244.
 β -Ionon 224.
 Isatosäureanhydrid 214.
 Isoalloxazine 67.
 Isobuttersäure 255.
 Isocitronensäure 266, 280.
 Isoguanin-Guanopterin 77.
 Isopropylalkohol 199.
 Isoxanthopterin 64, 67, 68, 73, 74, 75,
 76, 77, 78.
 Itaconsäure 261.

 Kaninchenmyxom 94, 96, 115.
 Kaninchenpapillomvirus 114, 117, 125,
 144, 146, 178.
 Kartoffel-Blattrollvirus 169.
 Kartoffelviren 142.
 Kartoffel-A-Virus 168.
 Kartoffel-X-Virus 103, 104, 109, 119, 151,
 153, 154, 168, 169.

- Kartoffel-Y-Virus 109, 119, 151, 168, 170.
 Kartoffel-Z-Virus 168.
 α -Keto- δ -amino-valeriansäure 202.
 α -Ketobuttersäure 202.
 12-Keto-3-cholensäure 196.
 Ketogluconsäure 201.
 α -Ketoglutarsäure 202, 203, 212, 267, 271.
 α -Keto-isocaprinsäure 202, 209
 β -Keto-korksäure 212.
 α -Keto- γ -methiobuttersäure 202
 Ketonkörper 243
 Koprosterin 236.
 Korksäure 216, 258.
 Kuhpockenvirus 94, 102, 180
 Kynurenin 207, 264.
 Kynurensäure 197, 207

Lactoflavin 74.
Lävulose 199.
Lanataglykoside 10.
LANGMUIR-Waage. 355.
Laurinsäure 216, 241
Lecithin 233.
Leucin 191, 202, 206.
Leukopterin 64, 67, 70, 71, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79.
Leukopterin-glykol 76.
Liligenin 16, 21.
Linolensäure 233, 242.
Linolsäure 47, 233, 242.
Lumazin 65, 67.

Malonathemmung 267, 285
Malonsäure 258.
Mandelsäure 262.
Mannit 199.
Mannonsäure 230.
Mannose 230.
Marinobufagin 12, 13
Menschenpocken 102, 180
p-Menthan-3,8-diol 197.
Mesacon- α -amidsäure 221
Mesaconsäure 231.
Mescaline 210.
Meso-Inosit 200.
Mesopterin 64, 77
dl-Methionin 202.
4-Methoxy-diphenyl 195
p-Methoxyphenyl-brenztraubensäure 209.
Methyladipinsäure 261
 δ -Methylaminovaleriansäure 213
Methylandrosterdiol 237
Methylbenzol 215.
d-Methylbernsteinsäure 231.
5-Methyl-brenzschleimsäure 222, 230
2-Methyl-buten-(1,2)-1,4-dicarbonensäure 219.
3-Methyl-campher-mono-carbonsäure 226.
Methylcapronsäure 256
Methylcaprylsäure 256.
Methylcyclohexan 211, 215.
Methylcyclopentenphenanthren 22, 23
Methyldodecansäure 255.
5-Methyl-furfurol 230
 β -[5-Methyl-furyl-(2)]-acrylsäureamid 222.
 α -Methylglutarsäure 262
Methylheptansäure 256
2-Methyl-hepten-(1,2)-1,7-dicarbonensäure 218.
N-Methyl-hexahydrobenzamid 234
Methylhexansäure 255
 β -Methyl- β -n-hexyl-acrylsäure 218.
Methylketone 200.
 β -Methyl- β -n-nonyl-acrylsäure 219
 β -Methyl- δ -phenyl-valeriansäure 255
Methylpiperidin 213.
 β -Methyl- β -propylacrylsäureamid 219
Methylreduktinsäure 9, 11
Methylstearinsäure 255
Methyltestosteron 237
Methylvaleriansäure 255
Methylzimtsäure 254.
d-Milchsäure 191
Milchsäuredehydrogenase 200
p-Monomethylamino-phenol 194
Muconsäure 210, 220
Myristinsäure 216, 241
Myxomvirus 109

 β -Naphthylamin 195
NEGRI-Körper 96
Neotigogenin 21.
Neriantin 5, 9.
Neriantogenin 5, 9.
Nicotinsäure 238.
Nonandicarbonensäure 215
n-Nonocosan 243
n-Nonocosan-15-on 243
Nonylsäure 252
n-Nonyl-malonsäure 217, 261
Noreholestendion(3,25) 238
Norcholestenol-(3)-on-(25) 238
Nucleinsäure 97, 144, 150

- Octadien-3,5-säureamid 217.
 Octatetraen-2,4,6,8-dicarbon-1,8-amid-
 säure-I 221.
 Octatriensäure 221.
 Octopin 206.
 n-Octylmalonsäure 217, 261.
 Ölsäure 232, 242, 252.
 Oenanthsäure 216.
 Oestradiol 238.
 Oestriol 373.
 Östron 234, 238, 373.
 Oleandrin 5, 9.
 Oleandrigenin 5, 9.
 Oleandrose 9.
 Origidin 9.
 Ornithin 202, 210.
 Ouabagenin 4, 9.
 Ouabain 4, 9.
 Oxalbernsteinsäure 267.
 Oxalcitramalsäure 292.
 Oxallessigsäure 202, 204, 245, 258.
 Oxalsäure 258.
 trans- π -oxo-campher 225.
 8-oxy-3,4-benzpyren 195.
 α -Oxybuttersäure 271.
 β -Oxybuttersäure 190, 201, 244, 246, 271.
 β -Oxybuttersäure-dehydrogenase 201.
 Oxy-campher 196.
 π -Oxy-campher 225.
 Oxychinolin 238.
 2-Oxy-chinolin 197.
 π -Oxy-cyclo-camphanon 226.
 α -oxy- β , β -dimethyl-butyrolakton 33.
 4-Oxy-dimethyl-campher 196.
 Oxy-malonsäure 258.
 6-Oxy-2-methyl-benzoessäure 235.
 Oxymethylreduktinsäure 9, 11.
 Δ^{20-22} -3-Oxynorcholensäure 2.
 p-Oxy- β -phenäthyl-äthylketon 194.
 p-Oxy-phenylbrenztraubensäure 191, 192.
 p-Oxyphenylessigsäure 192, 209.
 6-(p-Oxyphenyl)-hexen-(5)-ol-(2) 194.
 6-(p-Oxyphenyl)-hexen(5)-on-(2) 194.
 l-p-Oxyphenylmilchsäure 191, 192.
 8-Oxypteridine 68.
 9-oxypteridine 72, 75.
 d-Oxytryptophan 197, 207.

 Palmital 199.
 Palmitinsäure 216, 231, 241, 374.
 Palmitoleinsäure 232.
 Pelargonsäure 215.
 Pellagra 46.

 n-Pentadecyl-malonsäure 261.
 Periplocin 9, 10.
 Periplogenin 9.
 Pferdecephalitis 93, 144.
 Phagenprotein 144.
 Phenylalanin 192, 202, 206, 208, 209.
 l(-)-Phenylalaninoxidase 203.
 Phenylaminoessigsäure 263.
 Phenylaminobuttersäure 206.
 Phenylbrenztraubensäure 191, 202, 206,
 208.
 γ -Phenylbuttersäure 233.
 γ -Phenyl-crotonsäure 233.
 Phenylketonurie 208, 211.
 Phenylmilchsäure 191.
 γ -Phenyl- β -oxy- α -aminobuttersäure 241.
 δ -Phenyl- β -oxy- α -aminovaleriansäure
 241.
 γ -Phenyl- β -oxybuttersäure 233.
 Phenylpropionsäure 241.
 Phosphoserin 204.
 Phytensäure 228.
 Phytol 228.
 Pimelinsäure 216.
 Piperidin 213.
 Plasmal 199.
 Pockenvirus 143, 146.
 Polyederkrankheit 136, 173.
 Polyencarbonsäuren 220.
 Polyomyelitis 93, 119, 177.
 Pregnan diol 226, 374.
 Pregnenolon 237.
 Progesteron 226, 237.
 Prolin 202, 206, 212.
 Propyl-bernsteinsäure 262.
 Protocatechusäure 235.
 Protoveratrin 25.
 Pseudoätiocolansäure 13.
 Pseudobufotalin 13.
 Pseudodesacetylbufotalin 12, 13.
 Pseudopyridoxin 49.
 Pseudosapogenin 19.
 Pseudosarsasapogenin 19, 21.
 Pseudotigogenin 21.
 Pteridin 64.
 Pterobilin-proteid 76.
 Purine 70.
 Purpureaglykoside 10, 11.
 Pyridoxin-Vitamin-B₆ 46.
 Pyrrolidon-carbonsäure 212.

 Rhamnose 9.
 Rhodopterin 64.

- Ribgrass-Virus 167.
 Ringfleckenvirus 145.
 Rous-Sarkom 144, 146.

 Säugetierpocken 96.
 Salicylsäure 41, 194.
 Sarmentogenin 3.
 Sarsasapogenin 16, 17, 21.
 Scillabiose 10.
 Scillaren-A 6, 10.
 Scillarenase 10.
 Scillirosid 7, 9.
 Sebacinsäure 216, 241, 257, 258.
 Senso 13.
 Severe-Etch-Virus 151, 171.
 Smilagenin 16, 21.
 Solangustidin 22, 23.
 Solangustin 22, 23.
 Solanidin-s 22, 23, 25.
 Solanidin-t 22, 23, 24.
 Solanin-s 22, 23.
 Solanin-t 22, 23.
 Solanocapsidin 23.
 Solanocapsin 22, 23, 24.
 Solasodin 22, 25.
 Solasonin 22.
 Solatubin 22.
 Solatunin 22.
 Solauricidin 22, 23.
 Solauricin 22, 23.
 Somalin 9.
 Sorbinsäure 220.
 Sorbit 199.
 Sorbose 199.
 Staphylococcusbakteriophagen 147, 182.
 Stearal 199.
 Stearinsäure 216, 241.
 g-Strophanthidin 4.
 Strophantobiase 10, 11.
 Strophantöbiose 10.
 Strophanthotriose 10, 11.
 Strophanthidin 6, 9.
 k-Strophanthin- β 10, 11.
 k-Strophanthosid 9, 10, 11.
 Styrylcrotonsäure 255.
 Succinanyl 241.
 Sulfanilamide 194.
 Synthetische Fette 245.

 Tabakmosaikvirus siehe TM-Virus.
 Tabaknekrosevirus 109, 110, 141, 151,
 153, 154, 173.

 Tabakringfleckenvirus 141, 144, 151, 153,
 170.
 Teresantol 226.
 Testosteron 19.
 Tetradecan-dicarbonsäure 259.
 Tetrahydro-chinolin 197, 238.
 Tetrahydro-isochinolin 239.
 Tetrahydro-(1,2,3,4)-naphthalin-carbon-
 säure-(1) 236.
 Tetrahydro-o-toluyil-säure 236.
 Tetralin 195.
 Thapsiasäure 258.
 Thevetogenin 5.
 d(-)Threonin 190.
 Thymonucleinsäure 144.
 Tigogenin 16, 20, 21.
 TM-Virus = Tabakmosaikvirus 103, 104,
 106, 109, 110, 117, 118, 119, 120, 122,
 123, 124, 128, 129, 130, 134, 135, 136,
 140, 141, 144, 145, 146, 147, 148, 149,
 149.
 Tollwut 93, 96, 102.
 p-Toluylsäure 215.
 Tomaten-Bushy-stunt-Virus 151, 171.
 Tomatenvirus Dahlem (Dahlemense) 164.
 Toxoflavin 74.
 Transaminase 205.
 Trichloräthylen 231.
 Trichloressigsäure 231.
 Trillarin 22.
 Trillin 22.
 Trimethylamin 190.
 Trimethylaminoxyd 190.
 Trimethyl-leukosterin 70, 76.
 Trimethoxy-phenyl-essigsäure 210.
 Tryptophan 197, 206, 207, 263.
 Tryptophanase 263.
 Triundecylin 215.
 Tyramin 209.
 Tyrosin 192, 206, 209.
 Tyrosinase 193.
 Tyrosinosis 191.

 Umaminierung 204.
 Undecandisäure 259.
 Undecylensäure 251.
 n-Undecyl-malonsäure 261.
 Undecylsäure 215, 252.
 Urocaninase 213.
 Urocaninsäure 213.
 Uropterin-Xanthopterin 81.
 Urothion 64, 74, 81, 82, 84.

- Uscharin 9, 11.
Uzarigenin 2, 5.
- Vaccine** 102, 115, 134, 144, 149, 150.
Valin 202, 205.
Vanillin 230.
Vanillinsäure 230.
Variola 102, 180.
Virus III 92.
Virus der Encephalomyelitis 115.
Virus der Kinderlähmung 93, 146.
Virus der Maul- und Klauenseuche 109,
110, 115, 117, 119, 120, 122, 146, 175,
177.
Virus der Schweinelähme 146.
- Weinsäure** 258.
- Xanthin** 77.
Xanthindehydrase 73.
Xanthopterin 64, 67, 68, 72, 73, 74, 75,
76, 77, 78, 79, 80, 84.
Xanthopterin-carbonsäure 68.
l-Xyloketose 200.
p-Xylol 215.
- Yellow aucuba-Virus** 166.
- Zimtalkohol** 228.
Zimtsäure 228, 241.