

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg.

Hämoglobine und andere Hämoproteine*.

Von

MANFRED KIESE.

Mit 6 Textabbildungen.

Hämoproteine sind zusammengesetzte Proteine. An ihrer Proteinmolekel befindet sich ein Hämin als charakteristische Wirkungsgruppe. Eine besondere Gruppe der Hämoproteine sind die *Hämoglobine*. Sie sind rote Farbstoffe, welche Sauerstoff reversibel binden können. Alle bisher bekannten natürlichen Hämoglobine enthalten das gleiche *Häm*, Protohäm. Dies ist der Ferrokomplex der 1,3,5,8-Tetramethyl-2,4-divinylporphin-6,7-dipropionsäure, in dem 4 der Koordinationsbindungen des Eisens mit den Stickstoffatomen der Pyrrole besetzt sind. Die Protohäm-Molekel ist eine flache Scheibe, welche im Hämoglobin dem Protein flach aufliegt.

Durch zahlreiche physikalische Untersuchungen sind Größe und Gestalt des Hämoglobins der Säugetiere recht genau erkannt worden. Die Röntgenanalysen von PERUTZ¹² erlauben auch Schlüsse auf die Struktur. Das *Globin* ist aus 4 Scheiben zusammengesetzt; jede Scheibe besteht aus 4 gewundenen Polypeptidketten. Die Hämoglobinmolekel des Blutes der Säuger enthält 4 Häme, welche alle parallel an das Globin angelagert sind. Die Bindung der Häme erfolgt durch Komplexbildung des Eisens mit basischen Gruppen des Globins, wahrscheinlich mit Imidazolgruppen. Die 6. Koordinationsvalenz des Eisens ist nach außen gerichtet und vermag Sauerstoff, Kohlenoxyd, Stickoxyd oder Wasser in den Komplex zu koordinieren.

Die Gruppen des Globins, welche vom Eisen des Häms komplex gebunden werden, sind insofern spezifisch, als sie dem Hämeisen die Fähigkeit vermitteln, Sauerstoff reversibel zu binden. Ihre Spezifität ist an die Intaktheit der Globinmolekel gebunden. Wird die 6. Koordinationsbindung des Eisens durch Sauerstoff, Kohlenoxyd oder Stickoxyd besetzt, so entstehen Verbindungen mit dem bekannten Spektrum, das durch 2 etwa gleich starke Banden im grünen Spektralgebiet ausgezeichnet ist.

Außer dem nativen Globin kann das Eisen des Häms auch andere Verbindungen mit basischen Gruppen koordinieren: Denaturierte Proteine, Pyridin, Nicotin, Hydrazin, Ammoniak u. a. Die so gebildeten

* Vortrag gelegentlich der Tagung der Deutschen Gesellschaft für gerichtliche und soziale Medizin in München 1952.

Verbindungen werden als *Hämochrome* bezeichnet. Abgesehen von der Art der Partner unterscheiden sie sich vom Hämoglobin dadurch, daß das Eisen des Häms jeweils 2 Partner bindet³, und keinen Sauerstoff mehr zu binden vermag. Die Spektren der Hämochrome sind dem des Oxyhämoglobins ähnlich, sie haben ebenfalls auch 2 Banden im grünen Gebiet. Jedoch liegen die Banden bei kürzeren Wellenlängen, und die α -Bande ist wesentlich stärker als die β -Bande.

Man weiß schon lange, daß die Hämoglobine der verschiedenen Säugetiere zwar sehr ähnlich sind aber chemisch nicht identisch. Unterschiede in der Kristallbildung machten schon vor vielen Jahren auf Verschiedenheiten im Bau der Globine aufmerksam. Mit neuen zuverlässigen Analysemethoden konnten die Unterschiede im Aminosäuregehalt einwandfrei erfaßt werden.

Die verschiedene chemische Zusammensetzung des Globins wirkt sich auf das chemische Verhalten der einzelnen Hämoglobine aus. Die Affinität der Hämoglobine verschiedener Tierarten zu Sauerstoff und Kohlenoxyd ist verschieden⁴. Während die Spektren der Oxyhämoglobine nicht wesentlich voneinander abweichen, liegen die Absorptionsmaxima der Kohlenoxydverbindungen, besonders die α -Banden bei verschiedenen Wellenlängen. BARCROFT und Mitarbeiter⁵ haben schon 1925 entdeckt, daß zwischen dem Verhältnis der Kohlenoxyd- und Sauerstoffaffinität der verschiedenen Hämoglobine und dem Abstand der α -Bande der Kohlenoxyd- von der Sauerstoffverbindung, dem *CO-span*, eine einfache Beziehung besteht: Der Logarithmus des Verhältnisses von Kohlenoxydaffinität zu Sauerstoffaffinität ist dem *CO-span* proportional.

Als THEORELL⁶ das Muskelhämoglobin isolierte und dessen optische Eigenschaften sowie Sauerstoff- und Kohlenoxydbindung untersuchte, fügten sich auch dessen vom Hämoglobin stark abweichende Werte in diese Beziehung ein. Hier schien der Einfluß der besonderen Struktur des Proteins auf die Reaktionsfähigkeit des Eisens im Spektrum quantitativ Ausdruck zu finden. Die entsprechenden Daten des von KUBO⁷ sowie KEELIN und WANG aus den Wurzelknollen von Leguminosen isolierten Leghämoglobins und des von KEELIN und WANG^{8, 9} untersuchten Hämoglobins der *Gastrophilus*larven fügen sich jedoch nicht in dies Schema ein. Es gestattet also nicht so weitgehende Schlüsse.

HAUROWITZ¹⁰ sowie BARCROFT und Mitarbeiter¹¹ entdeckten 1935, daß die Sauerstoffaffinität von fetalem Blut stärker ist als die des mütterlichen Blutes und kamen zu dem Schluß, daß das *fetale Hämoglobin* von dem des Erwachsenen verschieden sein müsse.

Inzwischen ist der Unterschied auch in anderen Eigenschaften genauer charakterisiert worden: in der Kristallstruktur¹⁷, der Löslichkeit, der elektrophoretischen Beweglichkeit, der Geschwindigkeit der Denaturierung durch Alkali, dem Gehalt an einzelnen Aminosäuren und dem serologischen Verhalten (JOPE und O'BRIEN¹²). Die Molekulargewichte der beiden Hämoglobinarten sind nicht verschieden. Fetales und erwachsenes Hämoglobin sind jedes für sich nicht einheitlich: im erwachsenen Hämoglobin konnten durch Oberflächendenaturierung¹³ und verschiedene Alkaliempfindlichkeit¹⁴ mindestens 2 Kom-

ponenten unterschieden werden und im fetalen Hämoglobin sind bisher 3 verschieden lösliche Komponenten nachgewiesen worden¹⁵.

Die größere Denaturierungsgeschwindigkeit des Hämoglobins von erwachsenen Menschen wird in einer einfachen optischen *Bestimmung von fetalem und erwachsenem Hämoglobin* ausgenutzt. Bei der Denaturierung entsteht aus Oxyhämoglobin Proteinhämichrom. Dessen Bildung wird an der Zunahme der Extinktion der alkalischen Lösung (p_H 12,7) im roten Spektralbereich (650 $m\mu$) gemessen¹⁶.

Ein von den physiologischen Arten abweichendes Globin wird bei der *Sichelzellenanämie* gebildet. Es unterscheidet sich im isoelektrischen Punkt¹⁸ (6,9 gegenüber 6,68), in der Löslichkeit und Kristallstruktur¹⁹ sowie im Gehalt an SH-Gruppen²⁰ (3 je Mol gegenüber 2 je Mol in normalem Hämoglobin).

Das *Sichelphänomen* tritt bei den roten Zellen der betreffenden Patienten auf, wenn der Sauerstoff aus den Zellen entfernt wird. Dann scheint sich das Hämoglobin an einer oder mehreren Stellen zu sammeln; die Zellmembran kollabiert. Die Zellen werden doppelbrechend²¹; die Hämoglobinmolekeln sind orientiert. Durch Zutritt von Sauerstoff wird die Sichelbildung wieder rückgängig gemacht. PAULING¹⁹ nimmt an, daß die Molekeln des Sichelzellenhämoglobins an Bezirken nahe den an der Molekeloberfläche gelegenen Hämen miteinander reagieren. Durch die Sauerstoffbindung an die Häme wird die Struktur dieser Bezirke verändert und ihre Reaktionsfähigkeit beseitigt.

Die Bildung des Sichelzellenhämoglobins ist für die allgemeine Pathologie von besonderem Interesse, weil das Sichelphänomen auf eine abweichend gebildete Proteinmolekel, also auf eine molekulare Erkrankung, zurückgeführt werden konnte. Auch für die biochemische Genetik ist die Bildung dieses Hämoglobins von großem Interesse, da sie wahrscheinlich unmittelbar genbedingt ist. Bei der Sichelzellenanämie ist das Gen in homozygotem Zustand, bei der Sichelämie in heterozygotem²².

KAPLAN und Mitarbeiter²³ haben ein weiteres abnormes Hämoglobin entdeckt und als *Hämoglobin III* bezeichnet. Diese Abnormität ist ebenfalls erblich. Das Hämoglobin III kommt sowohl allein als auch zusammen mit normalem oder Sichelzellenhämoglobin in den Erythrocyten vor und kann durch seine besondere elektrophoretische Beweglichkeit erkannt werden²⁴.

Eine bisher einzigartige pathologische Globinbildung haben HÖRLEIN und WEBER²⁵ beschrieben. Im Blute von Patienten mit familiärer Hämiglobinämie fanden sie ein Hämoglobin, dessen Spektrum von dem des Hämoglobins aus normalem Hämoglobin abweicht (langwellige Bande bei 600 $m\mu$ gegenüber 630 $m\mu$ bei normalem Hämoglobin).

Wahrscheinlich müssen wir auch unter normalen Bedingungen noch mit einer gewissen Variabilität des Hämoglobins rechnen. MORSE und Mitarbeiter²⁶ fanden für das Hämoglobin von Kindern eine geringere Sauerstoffaffinität als für das Erwachsener. Bei angeborener Herzerkrankung mit Cyanose war die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins noch geringer als bei gesunden Kindern.

Die *Bindungsreaktion des Sauerstoffs an das Eisen des Hämoglobins* ist bisher immer so formuliert worden, daß das komplexgebundene

Eisen im Hämoglobin unbesetzt ist und der Sauerstoff in Oxyhämoglobin durch kovalente Bindung gehalten wird. HAUROWITZ²⁷ hat nachgewiesen, daß diese Formulierung nicht richtig ist. Im Hämoglobin ist die Bindung, die im Oxyhämoglobin den Sauerstoff bindet, von einer Wassermolekel besetzt. Trockenes Oxyhämoglobin hält den Sauerstoff außerordentlich fest. Bei Erniedrigung des Sauerstoffdruckes auf 0,1 Torr bleibt Oxyhämoglobin noch vollständig gesättigt. Wenn man sauerstofffreies Hämoglobin trocknet, tritt eine Veränderung des Spektrums ein: Die breite Bande des Hämoglobins im grünen Spektralbereich wird durch 2 Banden ersetzt. Diese entsprechen nicht den Oxyhämoglobinbanden, sondern sind identisch mit Hämochrombanden. Wird das getrocknete Hämoglobin wieder aufgelöst und die Lösung mit Sauerstoff gesättigt, so bildet sich wieder normales Oxyhämoglobin. HAUROWITZs Beobachtungen bedeuten also, daß nach Wasserentzug die freie Valenz des Eisens von einer basischen Gruppe der eigenen oder einer anderen Globinmolekel besetzt wird. In trockenem Oxyhämoglobin wird der Sauerstoff so sehr festgehalten, weil er nicht gegen Wasser ausgetauscht werden kann. HAUROWITZs Deutung seiner Beobachtungen ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen von CLARK und Mitarbeitern³. Diese haben gezeigt, daß das Häm 2 Wassermolekeln ans Eisen bindet und daß Hämochrome 2 Basen ans Eisen binden.

Die Untersuchungen über die Kinetik der Sauerstoffbindung und die *S-förmige Sauerstoffbindungskurve* können in Kürze nicht verständlich gemacht werden. Ihre Erörterung muß hier unterbleiben, obgleich sie wegen ihrer Bedeutung für die Kohlenoxydwirkung von großem Interesse ist. Es sei lediglich daran erinnert, daß die *S-förmige Sauerstoff- und Kohlenoxydbindungskurve* durch den HALDANE-Effekt^{28, 29} die besonders hochgradige Anoxie der Gewebe unter Kohlenoxydwirkung verständlich macht.

Die Ähnlichkeit des *Spektrums von Kohlenoxydhämoglobin und Oxyhämoglobin* ließ schon vermuten, daß die Kohlenoxydbindung an das Hämoglobin gleicher Art ist wie die Sauerstoffbindung. Magnetische Messungen haben diese Annahme bestätigt. Hämoglobin ist paramagnetisch: Oxyhämoglobin und Kohlenoxydhämoglobin sind diamagnetisch. Das Eisen im Hämoglobin ist in polarer (Ionen-)Bindung und im Oxyhämoglobin sowie Kohlenoxydhämoglobin in unpolarer (kovalenter) Bindung¹⁴⁵. Es ist jedoch erwähnenswert, daß die Ähnlichkeit der Spektren von Kohlenoxyd- und Oxyhämoglobin nicht durchgängig so groß ist wie im sichtbaren Bereich des Spektrums. Im nahen Ultrarot (zwischen 700 und 1000 $m\mu$) weichen die Absorptionen stark voneinander ab: Oxyhämoglobin hat ein Absorptionsmaximum bei etwa 920 $m\mu$, die Absorption von Kohlenoxydhämoglobin aber nimmt mit steigender Wellenlänge zwischen 700 und 1000 $m\mu$ immer mehr ab.

Kohlenoxydhämoglobin wurde bis vor wenigen Jahren als ein unphysiologisches Hämoglobinderivat betrachtet. SJÖSTRAND³⁰ hat die

Methode der Kohlenoxydbestimmung in der Luft durch Messung der Verbrennungswärme verfeinert und hat 1948 nachgewiesen, daß kleine Mengen Kohlenoxyd, 0,5—1 ml je Stunde, im menschlichen Organismus gebildet werden. Auch wenn Kohlenoxyd in der Einatemluft sicher nicht vorhanden war, fand er in der Alveolarluft Konzentrationen von etwa 0,002%. Dieser Konzentration in der Alveolarluft entspricht ein Kohlenoxydhämoglobingehalt von etwa 0,5% des Hämoglobins. Mit optischen Verfahren ist der Nachweis dieser geringen Kohlenoxydhämoglobinkonzentration im Blute bisher nicht erbracht.

Hämiglobin.

Zu den physiologischen Derivaten des Hämoglobins gehört auch das braune Hämiglobin (Methämoglobin). Es entsteht aus dem Hämoglobin durch Oxydation, und es kann heute als erwiesen gelten, daß das Eisen im Hämoglobin zweiwertig und im Hämiglobin dreiwertig ist. Die Ergebnisse der Oxydationsreduktionsmessungen¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ und der magnetischen Untersuchungen¹⁴⁵ sind durch einen chemischen Beweis von TREIBS³¹ ergänzt worden. Ob die Oxydation des Eisens bei der Hämiglobinbildung die einzige Veränderung des Hämoglobins ist, bedarf noch der Untersuchung. GEORGE und STRATMANN³² fanden bei der Oxydation von Muskelhämoglobin zu Muskelhämiglobin durch Sauerstoff nicht den erwarteten Verbrauch von nur $\frac{1}{4}$ Mol Sauerstoff je Mol Muskelhämoglobin sondern von 2,5 Mol Sauerstoff. Es müssen also — wenigstens beim Muskelhämoglobin — noch andere Oxydationen an der Molekel stattfinden.

Das Hämiglobin besitzt andere *optische Eigenschaften* als das Hämoglobin, und sein Spektrum ist von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Das dreiwertige Eisen des Hämiglobins ist in saurer Lösung positiv geladen und wird in alkalischer Lösung unter Bindung eines Hydroxylions entladen. Die Ionisierungskonstante beträgt $pK = 8,12$ ³³. In saurer Lösung hat das Hämiglobin eine starke Bande bei 630 $m\mu$. In alkalischer Lösung fehlt diese, das Spektrum ist durch 2 Banden im grünen Gebiet charakterisiert.

Das Hämiglobin bindet Sauerstoff nicht, bildet aber mit mehreren anderen Stoffen Verbindungen, welche unter anderem für die Bestimmung von Hämiglobin neben Hämoglobin von praktischem Interesse sind. Solche Stoffe sind Cyanid, Sulfid, Azid, Rhodanid, Cyanat, Nitrit und Fluorid. Ihre Verbindungen mit Hämiglobin sind durch besondere Spektren charakterisiert. Erwähnt sei hier das *Hämiglobinsulfid*³⁴. Während Hämiglobin braun ist, ist Hämiglobinsulfid rot. Sein Spektrum ist mehr dem des Oxyhämoglobins ähnlich als dem des Hämoglobins, ein Absorptionsmaximum im roten Gebiet ist nur angedeutet. Die Bildung von Hämiglobinsulfid kann für den Nachweis von

Hämoglobin in der Leiche von Bedeutung sein. Durch Schwefelwasserstoffentwicklung kann Hämoglobin dem Nachweis entgehen, wenn man die Bande des Hämoglobins im roten Gebiet zum Nachweis benutzt.

Zur *quantitativen Bestimmung von Hämoglobin* im Blute neben Hämoglobin diente früher das HÜFNERsche Verfahren der Extinktionsmessung bei verschiedenen Wellenlängen. Dies Verfahren wird kompliziert und ungenau, wenn außer Hämoglobin und Oxyhämoglobin noch grüne Farbstoffderivate im Blute vorhanden sind. Einfacher und sicherer sind optische Methoden, welche die Extinktionsänderung der Lösung messen, die bei Überführung des Hämoglobins in eine seiner Verbindungen eintritt. EVELYN und MALLOY³⁵ sowie HAVEMANN, JUNG und ISSEKUTZ³⁶ benützten die Extinktionsabnahme im roten Gebiet bei Umwandlung von Hämoglobin in Hämoglobincyamid. HORECKER und BRACKETT³⁷ haben die Empfindlichkeit der Methode dadurch vergrößert, daß sie die Extinktionsunterschiede im nahen Ultrarot bei 800 $m\mu$ maßen. Wesentlich empfindlicher ist auch die Messung der Extinktionszunahme im grünen Gebiet bei Überführung von Hämoglobin in Kohlenoxydhämoglobin³⁸.

Mit diesen empfindlichen Methoden gelang die Bestimmung der geringen Hämoglobinkonzentration im normalen Blut. Sie beträgt 0,5—1% des Gesamtblutfarbstoffes^{39, 40}.

Das physiologische Hämoglobin im Blute entsteht dadurch, daß Hämoglobin mit Sauerstoff nicht nur unter Bildung von Oxyhämoglobin reagiert, sondern auch unter Bildung von Hämoglobin⁴¹. Diese Reaktion verläuft allerdings viel langsamer als die Bildung von Oxyhämoglobin^{42, 43}.

Trotz der fortlaufenden Hämoglobinbildung ist die Hämoglobinkonzentration im normalen Blut sehr niedrig, weil in den roten Zellen Fermentsysteme vorhanden sind, welche Hämoglobin zu Hämoglobin reduzieren. Diese Vorgänge sind weitgehend aufgeklärt⁴⁴. Im wesentlichen sind 3 Fermentsysteme bei der Hämoglobinreduktion wirksam. Diese sind in Tabelle 1 mit ihren Substraten und Reaktionsprodukten angeführt.

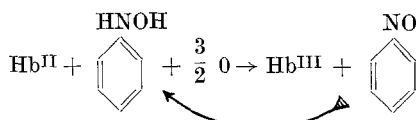
Tabelle 1. *Enzymische Reduktion von Hämoglobin.*

Substrat	Ferment	Reaktionsprodukt
1. Hexosemonophosphat	„Zwischenferment“, TPN Hämoglobinreduktase	+ Hb ^{III} → Hb ^{II} + CO ₂
2. Lactat	Milchsäuredehydrase (DPN, Co-Enzymfaktor I)	+ Hb ^{III} → Hb ^{II} + Pyruvat
3. Triosephosphat	Dehydrase, DPN (Co-Enzymfaktor I)	+ Hb ^{III} → Hb ^{II} + Pyruvat

Hämoglobin, das in vivo oder in vitro aus den roten Zellen ausgetreten ist, kann durch die Fermente der roten Zellen nicht mehr beeinflußt werden und bleibt nach der Oxydation Hämiglobin. Auch intracellulär steigt die Hämiglobinkonzentration an, wenn in roten Zellen — z. B. in der Leiche — die Substrate für die reduzierenden Fermente erschöpft sind und Sauerstoff mit dem Hämoglobin reagieren kann.

Es gibt eine erbliche Erkrankung, die *familiäre Hämiglobinämie*, bei der im Blute ohne Einwirkung hämiglobinbildender Gifte hohe Hämiglobinkonzentrationen (30–40% des Blutfarbstoffs) vorhanden sind. GIBSON⁴⁵ hat die Hämiglobinreduktion in den roten Zellen solcher Patienten untersucht und gefunden, daß ihre hämiglobinreduzierenden Fermente weniger wirksam sind.

Die hämiglobinreduzierenden Fermente bewirken die Reduktion des Hämiglobins ebenfalls nach der Einwirkung hämiglobinbildender Gifte. Sie sind aber auch an der *Hämiglobinbildung durch aromatische Amine und Nitroverbindungen* beteiligt. Diese werden durch Oxydation bzw. enzymische Reduktion zunächst in Phenylhydroxylamin übergeführt. v. ISSEKUTZ⁴⁶ entdeckte durch quantitative Hämiglobinbestimmungen, daß jede Molekel Phenylhydroxylamin im Tier eine Mehrzahl von Äquivalenten Hämoglobin zu Hämiglobin oxydieren kann, während Phenylhydroxylamin in Lösungen von Oxyhämoglobin höchstens ein Äquivalent Hämoglobin bildet^{47, 48}. Wir haben durch eingehende Untersuchung der Reaktionen des Phenylhydroxylamins mit Hämoglobin in Lösungen und in roten Zellen den Mechanismus der Bildung einer Vielzahl von Äquivalenten Hämoglobin durch Phenylhydroxylamin aufklären können^{49–51}. Phenylhydroxylamin reagiert mit Hämoglobin und Sauerstoff unter Bildung von Hämiglobin und Nitrosobenzol. Das Nitrosobenzol wird in den roten Zellen wieder zu Phenylhydroxylamin reduziert. Diese Reduktion wird von dem Fermentsystem, zu dem die Hämiglobinreduktase gehört, durchgeführt, also von Fermenten, welche unter physiologischen Bedingungen die Reduktion des Hämiglobins durchführen.



Hydrierte Hämiglobinreduktase.

Da Hämiglobinreduktase eine größere Affinität zu Nitrosobenzol hat als zu Hämiglobin, reduziert sie jenes statt des Hämiglobins und produziert immer wieder neues Gift.

Das Nitrosobenzol, das bei der Hämiglobinbildung durch aromatische Amino- und Nitroverbindungen in den roten Zellen auftritt, bildet mit Hämoglobin eine Verbindung, Nitrosobenzol-Hämoglobin, die von JUNG⁵² entdeckt wurde. Diese Verbindung ist wahrscheinlich ähnlicher Art wie die Sauerstoff-, Kohlenoxyd- oder Stickoxydverbindung des Hämoglobins. Jedenfalls hat sie ein Spektrum mit einer

Doppelbande im grünen Bereich. Die Bindung des Nitrosobenzols an das Hämoglobin ist fester als die Bindung von Sauerstoff und entspricht etwa der Kohlenoxydbindung.

Von anderen hämoglobinbildenden Reaktionen sei lediglich die *Reaktion des Hämoglobins mit Nitrit* erwähnt, weil sie zu mehreren optisch erkennbaren Hämoglobinderivaten führt. Während der Ablauf der Reaktion noch weiterer Aufklärung bedarf, sind die Reaktionsprodukte, welche bei der Reaktion von Hämoglobin mit Nitrit auftreten, durch neuere Untersuchungen^{54, 55} auch quantitativ bekannt.

Bei Ausschluß von Sauerstoff reagiert Nitrit mit Hämoglobin unter Bildung von 1 Äquivalent Hämoglobin und 1 Äquivalent *Stickoxyd-*

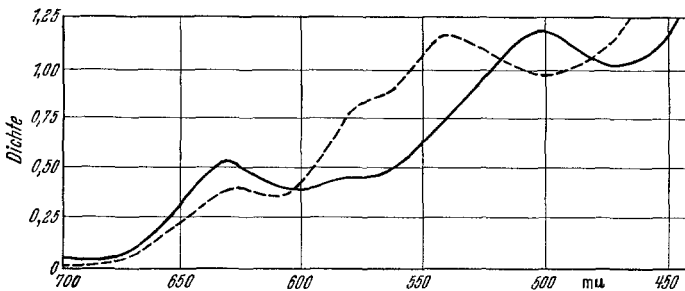
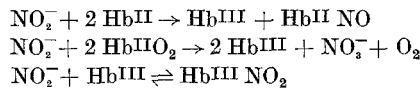


Abb. 1. Hämoglobinnitrit in 0,1 molarer Phosphatlösung, pH 6,8. Abszisse: Wellenlänge in Millimikron. Ordinate: Extinktion. — Hämoglobin, --- Hämoglobinnitrit (JUNG und REMMER).

*hämoglobin*⁵³. In Gegenwart von Sauerstoff wird das Stickoxyd oxydiert. Ein Mol Nitrit kann dann 2 Äquivalente Hämoglobin bilden^{54, 55}. Wirkt Nitrit im Überschuß auf Hämoglobin ein, so reagiert das noch unveränderte Nitrit mit dem gebildeten Hämoglobin unter Bildung einer Verbindung: *Hämoglobinnitrit*^{56, 57}.



Das Hämoglobinnitrit ist an einem besonderen Spektrum erkennbar. Seine Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich des Spektrums liegen bei 625 und 538 $m\mu$. Dieses Spektrum ist bei flüchtiger Betrachtung ähnlich dem eines Gemisches von Hämoglobin und Stickoxydhämoglobin (Abb. 1).

Wenn man Blut mit intakten roten Zellen mit einem Überschuß von Nitrit versetzt, so wird zunächst das gesamte Hämoglobin zu Hämoglobin oxydiert und dieses bildet mit dem überschüssigen Nitrit Hämoglobinnitrit. Läßt man das Blut dann bei 37° C 12—24 Std stehen, so wird durch reduzierende Fermente in den roten Zellen Hämoglobin zu Hämoglobin reduziert. Das Hämoglobin reagiert dann mit dem noch

vorhandenen Nitrit unter Bildung von Hämoglobin und Stickoxydhämoglobin. Durch diese Reaktionen kann je nach den Verhältnissen eine erhebliche Menge Stickoxydhämoglobin gebildet werden⁵⁷. Die Reaktionen können auch im Blut der Leiche ablaufen, zumal aus diesem nach Stillstand des Kreislaufs der Sauerstoff durch die überlebenden Gewebe entfernt wird. LAVES⁵⁸ hat im Leichenblut von Meerschweinchen schon 3—6 Std nach tödlicher Nitritvergiftung Stickoxydhämoglobin nachgewiesen. Im Menschenblut geht die Bildung von Stickoxydhämoglobin langsamer, da rote Zellen vom Menschen Hämoglobin langsamer reduzieren als Meerschweinzellen⁵⁹. Da das Spektrum des Stickoxydhämoglobins dem des Kohlenoxydhämoglobins sehr ähnlich ist, verdienen die beschriebenen Reaktionen auch für die Praxis der Beurteilung von Vergiftungen Beachtung.

Bei der Erwähnung des Nitrits sei bemerkt, daß in den letzten Jahren zahlreiche Fälle von Hämoglobinbildung durch Nitrit bei Kindern, deren Nahrung mit nitrathaltigem Wasser zubereitet war, beschrieben wurden⁶⁰⁻⁷².

Hämoglobin kann Sauerstoff nicht reversibel binden wie Hämoglobin. Über den Ausfall an Sauerstoffkapazität des Blutes hinaus hat das Hämoglobin noch einen weiteren Einfluß auf die Atmungsfunktion des Blutfarbstoffes. Wenn Hämoglobin durch ein Gift teilweise zu Hämoglobin oxydiert wird, verändert sich die Sauerstoffaffinität des noch unveränderten Hämoglobins, die Sauerstoffbindungskurve wird in den Bereich niedriger Sauerstoffdrucke verlagert, der Sauerstoff wird fester gebunden^{73, 74} (Abb. 2). Diese Wirkung bedeutet, daß bei Hämoglobinbildung im Blute die Sauerstoffversorgung der Gewebe ebenso wie bei der Kohlenoxydvergiftung stärker beeinträchtigt ist als dem Ausfall an Sauerstoffkapazität des Blutes entspricht.

Der Mechanismus der Hämoglobinwirkung auf die Sauerstoffbindung des Hämoglobins ist aus der Sauerstoffbindungskurve verständlich. Bei partieller Hämoglobinbildung werden die einzelnen Hämoglobinmolekeln teilweise oxydiert, je nach dem Ausmaß der Hämoglobinbildung 1, 2 oder 3 der 4 Häme einer Hämoglobinmolekel. Oxydation eines Häms an der Hämoglobinmolekel hat einen ähnlichen Einfluß auf die Sauerstoffaffinität der anderen wie die Bindung von Sauerstoff. Die gleiche Art der Wirkung von Oxydation und Sauerstoffbindung am Häm auf das Globin ist an dem Einfluß auf jene ionisierten Gruppen des Globins

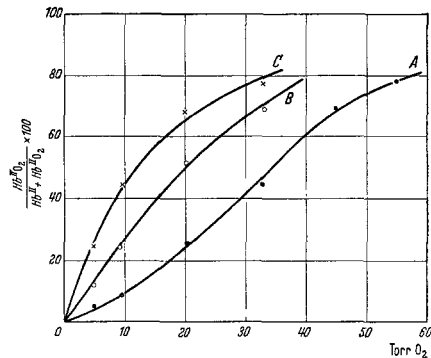


Abb. 2. Einfluß partieller Hämoglobinbildung auf die Sauerstoffbindung von Hämoglobin. Kurve A: Hämoglobin 2 % des Gesamtblutfarbstoffes; Kurve B: Hämoglobin 54 % des Gesamtblutfarbstoffes; Kurve C: Hämoglobin 79 % des Gesamtblutfarbstoffes. Gesamtblutfarbstoffkonzentration 25 g/100 ml, pH 7,4, Temperatur 37° C (KIESE und KLINGMÜLLER).

erkennbar, welche vom Häm gebunden (heme-linked) sind. Ihre Dissoziationskonstanten werden durch Oxydation und Sauerstoffbindung in gleicher Weise verändert^{75, 76} (Tabelle 2).

Methämalbumin.

Bei verschiedenen Erkrankungen (hämolytischen Anämien, Schwarzwasserfieber) ist Hämatin im Plasma vorhanden. Es ist dann nicht frei in Lösung, sondern bildet mit Plasmaalbumin eine Verbindung, welche sich durch ihr Spektrum sowohl vom Hämoglobin als auch von freiem Hämatin unterscheidet. Die Verbindung wurde von HEILMEYER^{77, 78} entdeckt, von FAIRLEY⁷⁹ als Methämalbumin und von J. KEILIN⁸⁰ als Hämatinalbumin bezeichnet. Die Ferrerverbindung hat

Tabelle 2. Dissoziationskonstanten (pK) der hämgebundenen (heme-linked) ionisierenden Gruppen des Globins. Pferdehäemoglobin, 30° C. $\mu = 0,16$.

Hb ^{II}	Hb ^{II} O ₂	Hb ^{III}
5,17	5,67	5,67
7,85	6,60	6,60
—	—	7,85

eine Bande bei 623 $m\mu$ (Hämoglobin 630 $m\mu$). Sie bildet im Gegensatz zum Hämoglobin keine Verbindungen mit Sulfid, Azid und Fluorid^{79, 80}. Wahrscheinlich ist die Bindung des Hämatins an das Albumin anderer Art als die

Bindung an das Globin im Hämoglobin⁸⁰. Ein Mol Plasmaalbumin kann 1 oder 2 Mole Hämatin binden⁸¹.

Methämalbumin bildet sich auch, wenn Hämoglobin in Plasma gelöst wird. Das Häm des Oxyhämoglobins dissoziiert vom Globin ab und wird an Albumin gebunden. Ebenso kann Gelatine das Häm vom Hämoglobin übernehmen^{82, 83}.

Grüne Blutfarbstoffderivate.

Durch verschiedene Einwirkungen in vitro und in vivo kann das Hämoglobin in grüne Derivate umgewandelt werden. Es gibt mehrere grüne Blutfarbstoffe. Wir haben für diese den Namen *Verdoglobine* vorgeschlagen⁸⁶ weil sie grün sind und wasserlösliches Globin enthalten.

Eins der Verdoglobine entdeckte HOPPE-SEYLER⁸¹ 1863 bei der Einleitung von Schwefelwasserstoff in eine Lösung von Oxyhämoglobin und bezeichnete dieses Derivat als *Sulphämoglobin*. Es wurde auch nach Schwefelwasserstoffeinatmung im Blute in vivo gefunden⁸⁹. HIJMANS VAN DEN BERGH⁸⁸ fand diesen grünen Farbstoff später auch im Blut von Menschen, welche nicht toxischen Schwefelwasserstoffkonzentrationen ausgesetzt waren.

Die Bildung von Sulphämoglobin im Blute ist seither als eine ziemlich unregelmäßige Wirkung verschiedener Gifte, vor allem aromatischer Amine und Nitroverbindungen, bekannt. Die Bedingungen seiner Bil-

dung in vivo durch die genannten Gifte sind noch nicht aufgeklärt. Sulfhämoglobin wurde besonders dann beobachtet, wenn ein aromatisches Amin, etwa Acetanilid, Phenacetin oder ein Sulfanilamidderivat gleichzeitig mit Schwefel oder Sulfaten längere Zeit eingenommen wurden⁹⁰. Im Tierexperiment kann durch die gleichen Mittel eine Sulfhämoglobinbildung bewirkt werden^{91, 92}. Ob Sulfhämoglobin physiologisch in kleinen Mengen im Blut vorhanden ist, kann nach den bisherigen Untersuchungen noch nicht entschieden werden. Sulfhämoglobin konnte aber beim Abbau des Hämoglobins in der Leber und in

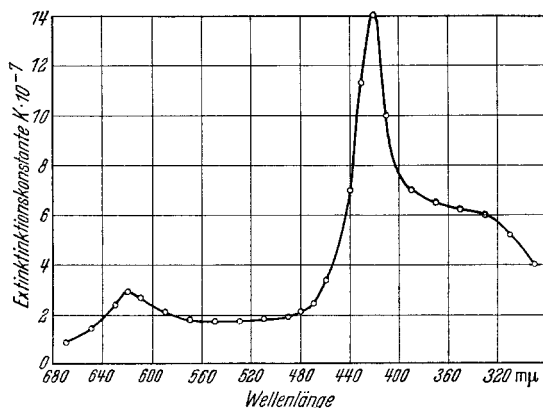


Abb. 3. Extinktion des Verdoglobins (Sulfhämoglobin). Abszisse: Wellenlänge in Mikromikron. Ordinate: Extinktionskonstante $K = \ln I_0/I \cdot c^{-1} \cdot d^{-1}$; c Konzentration in Grammatom Fe/ml; d Schicht in Zentimeter (KIESE).

der Milz in vivo⁹³ und beim enzymischen Abbau durch Leberextrakte in vitro⁹⁴ nachgewiesen werden.

Im Leichenblut kann schon 2—3 Tage nach dem Tode Verdoglobin gefunden werden⁵⁸.

Das Sulfhämoglobin ist wahrscheinlich keine einheitliche Verbindung^{95, 96}. Seine Hauptkomponente ist charakterisiert durch ein Absorptionsmaximum im roten Spektralbereich bei 620 mμ, das nach Reduktion mit Dithionit auch in Gegenwart von Hämoglobin leicht zu erkennen ist (Abb. 3). Es bildet eine Kohlenoxydverbindung, deren Absorptionsmaximum bei 616 mμ liegt und eine stärkere Lichtabsorption besitzt als das Absorptionsmaximum des Verdoglobins bei 620 mμ.

Ebenso wie Hämoglobin und andere Hämoproteine haben Sulfhämoglobin und andere Verdoglobine eine starke γ -Bande (Soret-Bande) im violetten Gebiet.

Die durch andere Reaktionen des Hämoglobins gebildeten Verdoglobine sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Die einzelnen Verdoglobine lassen sich durch ihre eigenen Spektren bzw. die ihrer Kohlenoxydverbindungen oder die Spektren der aus ihnen gebildeten Verdochrome

Tabelle 3. Grüne Blutfarbstoffderivate.

Name	Bildungsreaktion in vitro	Absorptionsmaxima zwischen 600 und 700 m μ			In vivo gebildet durch
		Ferro- form	CO- Verbindung	Hämochrom* CO- Hämochrom	
Sulfhämoglobin ¹ , Verdoglobins ²	HbII + H ₂ S + O ₂	620 ²	616 ²	Py 600 ³	Phenacetin + Schwefel- Phenyl- hydrazin ^{4,5} 2,4-Diamino- toluol ⁵
— ⁴ , VerdoglobinpH ⁵	HbII + Phenylhydrazin + O ₂	639 ⁵	634 ⁵	Py 660, 625 ⁵	
Pseudohämoglobin ⁶ , VerdoglobinCN ²	HbII + HCN + H ₂ O ₂	630 ²	630 ²	Py 616 ⁵ Hy 611 ⁵	
Choleglobin ⁷ , Verdoglobina ²	HbII + Ascorbinsäure + O ₂	629 ⁷ 630 ²	628 ⁷ 630 ²	Py 619 ¹ Py 620 ³ Hy 617 ²	
— ⁸ , VerdoglobinNO ⁹	HbIII + NaNO ₂ + H ₂ O ₂	620 ⁹		Py 610 ⁹ Hy 615 ⁹	
Cruoralbin ¹⁰	HbIII + HCN + Na ₂ S ₂ O ₄ + O ₂	624 ¹⁰	620—625 ¹⁰	Pr 628 ¹⁰ Pr 618 ¹¹	
Grünes Hämin ¹² , Verdohämochrom ¹³	Häm + Pyridin + Hydrazin- hydrat + O ₂			Py 662 ¹³	
	Hämin + Pyridin + Bäcker- hefe ^{5, 14}			Py [*] 655 ⁵ Hy 645 ⁵	

* Py = Pyridin, Hy = Hydrazinhydrat, Pr = Protein.

¹ HOPPE-SEYLER, F.: *Zbl. med. Wiss.* **1**, 433 (1863). — ² KIESE, M., u. H. KAESKE: *Biochem. Z.* **312**, 121 (1942). — ³ KIESE, M.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **205**, 747 (1948). — ⁴ LEWIN, L.: *Z. Biol.* **42**, 107 (1901). — ⁵ KIESE, M., u. L. SEIFELT: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **200**, 648 (1943). — ⁶ BARKAN, G., u. O. SCHALE: *Z. physiol. Chem.* **248**, 96 (1937); **253**, 83 (1938). — ⁷ LEMBERG, R., J. W. LÖEGGE, W. H. LOCKWOOD: *Nature (Lond.)* **142**, 148 (1938); *Biochem. J.* **35**, 328 (1941). — ⁸ HAVEMANN, R.: *Biochem. Z.* **308**, 1 (1941); *Klin. Wschr.* **1944**, 179. — ⁹ KIESE, M.: *Arch. exper. Path. u. Pharmacol.* **204**, 385 (1947). — ¹⁰ HOLDEN, H. F.: *Austral. J. Exper. Biol. Med. Sci.* **21**, 159 (1943); **23**, 255 (1945). — ¹¹ LEMBERG, R., and J. P. CALLAGHAN: *LEMBERG-LÖEGGE Hematin compounds*, S. 488. — ¹² WARBURG, O., u. E. NEUGELEIN: *Ber. dtsh. chem. Ges.* **63**, 1816 (1930). — ¹³ LEMBERG, R.: *Biochemic. J.* **29**, 1322 (1935). — ¹⁴ FISCHER, H., u. F. LINDNER: *Z. physiol. Chem.* **153**, 54 (1926).

charakterisieren und unterscheiden. Nur 3 der bisher bekannten Verdoglobine sind *in vivo* gefunden worden.

Die *Konstitution der Verdoglobine* ist erst wenig aufgeklärt. *In vitro* können Verdoglobine nur durch Oxydationsreaktionen gebildet werden, welche zu Veränderungen des Porphyrins führen. Die Art dieser Veränderungen ist nur zum Teil bekannt. Unter den grünen Blutfarbstoffderivaten nimmt WARBURGS⁹⁷ „*grünes Hämin*“ eine besondere Stellung ein. Es wird durch Einwirkung von Hydrazinhydrat und Sauerstoff auf Pyridinhämochrom gewonnen, wird also nicht als grünes Protein erhalten. Aus WARBURGS⁹⁷ grünem Hämin hat LEMBERG⁹⁸ ohne weitere Oxydation lediglich durch Einwirkung von Essig Biliverdin erhalten. Im grünen Hämin muß also die α -Methinbrücke des Porphinrings herausgespalten und durch eine labile Gruppe ersetzt sein, welche durch einfache Hydrolyse unter Entfernung des Eisens die Aufspaltung in Biliverdin erlaubt. LEMBERG hat dementsprechend das grüne Hämin als ein cyclisches Biliverdinanhydrid formuliert.

Neben dem Zerfall des grünen Hämins in Biliverdin können folgende Eigenschaften des grünen Hämins die LEMBERGSche Strukturformel stützen: Durch Einwirkung von Ammoniak wird aus dem grünen Hämin ein Monoazahämin gebildet⁹⁹; grünes Häm kann durch Reduktion nicht in ein rotes Häm (Protohäm oder ein nahe verwandtes) verwandelt werden¹⁰⁰.

WARBURGS grünes Hämin wird nicht aus einem Verdoglobin gewonnen, also einem Protein, sondern durch Oxydation von Pyridinhämochrom. Es entsteht in kleiner Menge wahrscheinlich bei der Choleglobinbildung, denn aus Choleglobin können durch Essigsäure etwa 10% des ursprünglichen Hämins als Gallenfarbstoff abgespalten werden¹⁰¹.

Das grüne Hämin ist von großem Interesse als ein Zwischenprodukt der Gallenfarbstoffbildung. Man darf vermuten, daß es auch *in vivo* beim Blutfarbstoffabbau auftritt. Doch konnte es bisher im tierischen Organismus noch nicht nachgewiesen werden.

Die *prothetischen Gruppen der Verdoglobine*, also der aus Hämoglobin gebildeten grünen Proteine, sind von WARBURGS grünem Hämin verschieden, wie schon ihre optischen Eigenschaften zeigen. Sie zerfallen in Essigsäure nicht in Gallenfarbstoff. Mit starken Reduktionsmitteln können sie in alkalischer Lösung in rote Hämochrome zurückverwandelt werden¹⁰⁰⁻¹⁰³; der Porphinring muß bei ihnen also intakt sein. Welche Veränderungen am Porphyrin bei den einzelnen Verdoglobinen vorliegen, ist noch unklar. Ebenso ist noch nicht bekannt, ob die Mannigfaltigkeit der optisch unterscheidbaren Verdoglobine ausschließlich durch jedesmal andere Veränderungen des Porphyrins oder auch zum Teil durch verschiedenartige Bindung der prothetischen

Gruppen an das Globin bedingt wird. Lediglich bei einem Verdoglobin konnte bisher eine chemische Veränderung des Porphyrins aufgeklärt werden, welche die Vergrünung des Blutfarbstoffs verständlich macht: Im Porphyrin des *Verdoglobins* NO_2 ist eine der Gruppen am Porphin zu einer Formylgruppe oxydiert¹⁰⁴. Dieses Porphyrin ist also dem Spirographisporphyrin^{105, 106} ähnlich, mit ihm aber nicht identisch.

Vom Sulfhämoglobin konnte ein von Protoporphyrin verschiedenes Porphyrin abgetrennt werden^{107, 108}; die Art der Veränderung ist aber noch nicht sicher bestimmt worden.

Verdoglobine können innerhalb der roten Zellen nicht wieder in Hämoglobin zurückgeführt werden. Ihre Elimination erfolgt durch Abbau der roten Zellen⁹⁶.

Der *Nachweis von Verdoglobinen* im Blute kann qualitativ durch den spektroskopischen Nachweis einer Bande im roten Spektralbereich, welche durch Reduktion nicht beseitigt wird, geführt werden. Als Reduktionsmittel werden im allgemeinen Dithionit oder Ammoniumsulfid verwandt. Es ist zu beachten, daß beide Reduktionsmittel mit Oxyhämoglobin Verdoglobin bilden können. Zur quantitativen photometrischen *Bestimmung von Verdoglobinen im Blut* werden am besten Verdoglobin und Hämoglobin in die Kohlenoxydverbindungen übergeführt und die Absorption des Kohlenoxydverdoglobins im Rot gemessen¹⁰⁹.

Im Zusammenhang mit den grünen Blutfarbstoffderivaten fand das *leicht abspaltbare Bluteisen* von BARKAN¹¹⁰ viel Beachtung. Das leicht abspaltbare Bluteisen gehört jedoch keiner besonderen Verbindung an, sondern stammt im wesentlichen aus dem Hämoglobin¹¹¹⁻¹¹⁴. Auch für die Erkennung einer überstandenen Kohlenoxydvergiftung hat es keine Bedeutung¹¹⁵.

Ein grünes Hämoprotein, das im tierischen Organismus in größerer Menge angetroffen werden kann, ist die *Verdoperoxydase*¹¹⁶⁻¹¹⁸ oder Myeloperoxydase, nach ihrer Herkunft aus den Myelocyten. Sie ist im wesentlichen der grüne Farbstoff des Eiters und der chloroleukämischen Infiltrate. In Leukoeyten kommt das Ferment zu 1—2% vor; es bewirkt hier unter anderem die Nadi-Reaktion.

Im reduzierten Zustand hat das Ferment eine starke Absorptionsbande im roten Gebiet bei 637 $m\mu$. Die Struktur seines Hämins ist noch nicht aufgeklärt. Durch Erhitzen in alkalischer Lösung mit Dithionit kann es in Protohämochrom verwandelt werden.

Muskelhämoglobin (Myohämoglobin).

Der rote Muskelfarbstoff ist ein Hämoglobin, ein sauerstoffbindendes Hämoprotein. Sein Hämin ist identisch mit dem des Blutfarbstoffes, das Protein ist verschieden¹¹⁹. Das Molekulargewicht beträgt nur $\frac{1}{4}$ des Hämoglobingewichtes: 17 000. Jede Molekel enthält nur ein Häm.

Die optischen Eigenschaften des Muskelhämoglobins sind denen des Hämoglobins ähnlich, doch weicht die Lage der Banden der Sauerstoff- und Kohlenoxydverbindung ein wenig von der der Hämoglobinverbindungen ab.

DE DUVE¹²⁰ hat die Abweichung des Spektrums der Kohlenoxydverbindung des Hämoglobins und Muskelhämoglobins zur *Bestimmung von Muskelhämoglobin neben Hämoglobin* benutzt. Durch Messung der Extinktion bei 576 $m\mu$ (isobestischer Punkt) wird die Gesamtkonzentration bestimmt und aus der Differenz der Extinktionen bei 568 und 584 $m\mu$ die Konzentration an Hämoglobin (Abb. 4).

Das Muskelhämoglobin hat eine größere Sauerstoffaffinität und eine geringere Kohlenoxydaffinität als das Hämoglobin. Seine Sauerstoffbindungskurve ist nicht S-förmig sondern hyperbolisch¹²¹. Die Unterschiede der Affinitäten werden aus MILLIKANS¹²² kinetischen Messungen verständlich. Muskelhämoglobin reagiert viel schneller mit Sauerstoff als Hämoglobin. Der Zerfall der beiden Sauerstoffverbindungen erfolgt etwa gleich schnell. Mit Kohlenoxyd reagiert Muskelhämoglobin etwa 3mal so schnell wie Hämoglobin, aber Kohlenoxyd-Muskelhämoglobin zerfällt 10mal so schnell wie Kohlenoxydhämoglobin.

Die Oxydation des Muskelhämoglobins zu Hämoglobin durch Sauerstoff verläuft viel schneller als die des Hämoglobins. Daher liegt der Muskelfarbstoff in Muskelextrakten, wenn sie kurze Zeit aufbewahrt sind, im Plasma und im Harn bei Erkrankungen mit Übergang des Muskelfarbstoffes ins Blut immer als Muskelhämoglobin vor.

Durch die Wirkung hämoglobinbildender Gifte wird vom Muskelhämoglobin in vivo nur ein viel kleinerer Teil zu Muskelhämoglobin oxydiert als vom Hämoglobin des Blutes zu Hämoglobin⁸⁶. Auch von

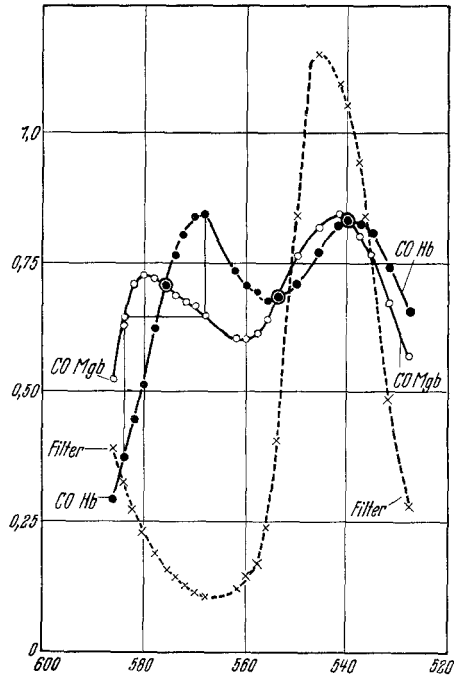


Abb. 4. Extinktionskoeffizienten der Kohlenoxydverbindungen des Hämoglobins und Muskelhämoglobins. Abszisse: Wellenlänge in Millimikron. Ordinate: $E = \log I_0/I \cdot c^{-1} \cdot d^{-1}$; c Konzentration in Gramm Hämoglobin je Liter; d Schicht in Zentimeter (DE DUVE).

der Verdoglobulinbildung in vivo wird das Muskelhämoglobin viel weniger betroffen als das Hämoglobin⁹⁶; in vitro kann es ebenso wie Hämoglobin in Verdoglobine übergeführt werden. In der Leiche geht das Muskelhämoglobin in Muskelhämiglobin über, wenn nach Erschöpfung der Gärungsvorgänge Sauerstoff an den Muskel gelangen kann¹²³.

Wenn die großen Muskeln stark gequetscht werden, tritt Muskelhämoglobin aus dem Muskel ins Blut über und wird durch die Niere ausgeschieden¹²⁴. Die Ausscheidung erfolgt schneller als die des Hämoglobins. In der Niere werden jedoch durch Muskelhämoglobin die gleichen Veränderungen bewirkt wie bei plötzlicher Hämolyse (crush syndrome¹²⁵). Bei der Haff-Krankheit und der Kreuzlähme der Pferde wird ebenfalls Muskelhämoglobin im Harn ausgeschieden¹²⁶.

Katalasen und Peroxydasen.

Von den Hämoproteinen sind die Katalasen und Peroxydasen, welche Protohäm in als prosthetische Gruppen enthalten, durch spektroskopische Untersuchungen der Gewebe oder einfacher Gewebsextrakte bei Zimmertemperatur nicht erkennbar, da sie keine scharfen Banden besitzen und in den Geweben nur in sehr geringer Konzentration vorhanden sind. Durch Abkühlung auf die Temperatur der flüssigen Luft werden die Banden verschärft und verstärkt (s. unten), so daß in Leberschnitten die Banden der Katalase und Peroxydase sichtbar werden¹²⁷.

Cytochrome.

Spektroskopisch nachweisbar in den Zellen ist eine Gruppe von Hämoproteinen, welche MACMUNN¹²⁸ entdeckt und als *Histohämatine* bezeichnet hat. KEELIN¹²⁹ hat diese eingehend untersucht und als *Cytochrome* bezeichnet. Sichtbar sind im Gewebe nur die Ferroformen der Cytochrome. Am leichtesten erkennbar sind ihre α -Banden bei 605, 564 und 550 $m\mu$, welche dem Cytochrom a, b und c angehören.

In den meisten Zellen ist *Cytochrom c* reichlicher enthalten als die anderen Cytochrome. Im Brustmuskel der Taube sind 50—70 mg-%, im Herzmuskel 20—30 mg-%, in anderen Organen weniger Cytochrom c vorhanden^{131, 132}. Ein Teil des Cytochrom c ist löslich und geht bei wäßriger Extraktion zerriebener Gewebe in Lösung. Es ist ein gegen Säure, Alkali und Wärme sehr wenig empfindliches Protein vom Molekulargewicht 13000 mit einem Eisengehalt von 0,43%; es enthält ein Häm in jeder Molekel¹³⁰. Cytochrom c bildet in der Ferroform mit Kohlenoxyd keine Verbindung; die Ferriform reagiert mit Cyanid¹³³.

Die Lichtabsorption des reduzierten Cytochrom c ist ähnlich der der Hämochrome, die α -Bande bei 550 $m\mu$ ist wesentlich stärker als die β -Bande bei 522 $m\mu$.

Das Hämin des Cytochrom c ist insofern vom Protohämin verschieden als dessen Vinylgruppen 2 Cysteinreste angelagert sind¹³⁴⁻¹³⁶, über die es mit dem Protein fest verbunden ist.

Die Cytochrome b und a, ein Teil des Cytochrom c, sowie das sauerstoffübertragende Ferment^{137, 138} (Cytochromoxydase¹³⁹, Cytochrom a₃¹⁴⁰) sind in den Strukturen der Mitochondrien verankert und können nur durch Autolyse und Einwirkung von Gallensäuren¹⁴¹ aus diesen Bindungen herausgelöst werden.

Cytochrom b konnte kürzlich von den anderen Cytochromen abgetrennt werden in einer Form, die noch die gleichen Absorptionsbanden bei 432, 530 und 564 m μ aufweist wie das

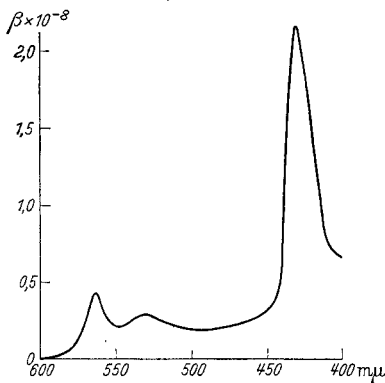


Abb. 5.

Abb. 5. Extinktionskonstanten des Cytochrom b aus Herzmuskulatur. $\beta = \ln I_0/I \cdot c^{-1} \cdot d^{-1}$; c Konzentration in Grammatom Fe/ml, d Schichte in Zentimeter. Abszisse: Wellenlänge in Millimikron (HÜBSCHER und KIESE).

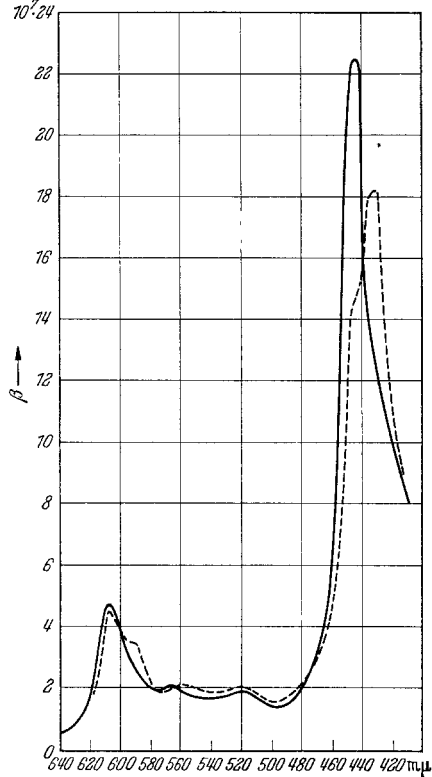


Abb. 6.

Abb. 6. Extinktionskonstanten eines Präparates von sauerstoffübertragendem Ferment und Cytochrom a, gelöst in 2 %igem Cholat und 0,1 mol Phosphat, pH 7,4. $\beta = \ln I_0/I \times c^{-1} \cdot d^{-1}$. (c = Grammatom Eisen \times ml⁻¹, d = Schichte in Zentimeter.) — Unter Stickstoff mit Dithionit reduziert; — — — unter Kohlenoxyd mit Dithionit reduziert.

Cytochrom b in der Zelle¹⁴² (Abb. 5). Cytochrom b bildet weder mit Kohlenoxyd noch mit Cyanid Verbindungen. Sein Hämin ist identisch mit Protohämin und läßt sich vom Protein leicht abtrennen.

Cytochrom a und sauerstoffübertragendes Ferment konnten zusammen aus der Bindung in der Zelle herausgelöst und von den anderen Cytochromen abgetrennt werden¹⁴³. Das sauerstoffübertragende Ferment ist in der reduzierten Form neben dem Cytochrom a mit seinen Banden

bei 605 und 443 $m\mu$ nicht erkennbar. Es läßt sich aber durch seine Kohlenoxydverbindung mit Banden bei 590 und 432 $m\mu$ nachweisen, da Cytochrom *a* mit Kohlenoxyd nicht reagiert (Abb. 6).

Sauerstoffübertragendes Ferment und Cytochrom *a* enthalten ein Hämin, dessen Struktur von der des Protohämins abweicht. Das Hämin bildet ein Pyridinhämochrom mit einer Bande bei 587 $m\mu$. Sein Porphyrin ist durch ein Spektrum vom Rhodotyp mit stark nach Rot verlagerten Banden charakterisiert (bei 648, 586, 560 und 518 $m\mu$ in Äther). Es ist mit keinem bisher bekannten Porphyrin identisch. Über seine Struktur ist bisher bekannt, daß es bis auf zwei der am Porphin substituierten Gruppen mit dem Protoporphyrin identisch oder diesem isomer ist. Eine dieser beiden Gruppen ist eine Formylgruppe^{143, 144}.

Die Empfindlichkeit des spektroskopischen Nachweises von Cytochromen wird erhöht durch starke Abkühlung des zu untersuchenden Materials. KEILIN und HARTREE¹²⁷ haben gefunden, daß bei der Temperatur der flüssigen Luft die Absorptionsbanden der Hämoproteine verschmälert und um das 5—10fache verstärkt sind. Durch die starke Abkühlung werden sie gleichzeitig um 5—10 $m\mu$ ins kurzwellige Gebiet verlagert. Es ist schon erwähnt, daß durch Abkühlung auf die Temperatur der flüssigen Luft die Banden der Katalase und Peroxydase in der Leber sichtbar gemacht werden können. KEILIN und HARTREE haben bei ihren spektroskopischen Untersuchungen tiefgekühlter Zellen eine neue Bande entdeckt, die sie als e-Bande bezeichnen. Sie ist bei 552 $m\mu$ gelegen und bei Zimmertemperatur nicht nachweisbar. Vermutlich gehört sie einem neu entdeckten *Cytochrom e* an.

Literatur.

- ¹ BOYES-WATSON, J., E. DAVIDSON and M. F. PERUTZ: Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. A **191**, 83 (1947); **195**, 474 (1949). — ² BOYES-WATSON, J., and M. F. PERUTZ: Nature (Lond.) **151**, 714 (1943). — ³ CLARK, W. M., J. F. TAYLOR, T. H. DAVIES and C. S. VESTLING: J. of Biol. Chem. **135**, 543 (1940). — ⁴ BARCROFT, J.: The respiratory function of the blood. Cambridge 1928. — ⁵ ANSON, M. L., J. BARCROFT, A. E. MIRSY and S. OINUMA: Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B **97**, 61 (1925). — ⁶ THEORELL, H.: Biochem. Z. **268**, 46, 64 (1934). — ⁷ KUBO, H.: Acta phytochim. (Tokyo) **11**, 195 (1939). — ⁸ KEILIN, D., and Y. L. WANG: Nature (Lond.) **155**, 227 (1945). — ⁹ KEILIN, D., and Y. L. WANG: Biochemic. J. **40**, 855 (1946). — ¹⁰ HAUBOWITZ, F.: Z. physiol. Chem. **232**, 125 (1935). — ¹¹ BARCROFT, J., R. H. E. ELLIOT, L. B. FLEXNER, F. G. HALL, W. HERKEL, E. F. MCKARTHY, T. McCLURKIN and M. TALAAT: J. of Physiol. **83**, 192 (1935). — ¹² JOPE, H. M., and J. R. P. O'BRIEN: In ROUGHTON and KENDREW, Hemoglobin, S. 269. — ¹³ DOGNON, A., et L. GOUGEROT: C. r. Soc. Biol. Paris **142**, 1490 (1948). — ¹⁴ BRINGMAN, R.: J. of Physiol. **80**, 337 (1934). — ¹⁵ DERRIEN, Y., et J. ROCHE: C. r. Soc. Biol. Paris **142**, 1001 (1948). — ¹⁶ BRINKMAN, R., and J. H. P. JONXIS: J. of Physiol. **88**, 117, 162 (1936). — ¹⁷ KENDREW, J. C., and M. F. PERUTZ: Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. A **194**, 375 (1948). — ¹⁸ PAULING, L., H. A. ITANO, J. S. SINGER and J. C. WELLS: Science (Lancaster, Pa.) **110**, 543 (1949). — ¹⁹ PERUTZ, M. P., A. M. LI-

- QUORI and F. EIRICH: *Nature (Lond.)* **167**, 929 (1951). — ²⁰ INGBAR, S. H., and E. H. KASS: *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **97**, 74 (1951). — ²¹ SHERMAN, I. J.: *Bull. Hopkins Hosp.* **67**, 309 (1940). — ²² NEEL, J. V.: *Science (Lancaster, Pa.)* **110**, 64 (1949). — ²³ KAPLAN, E., W. W. ZUELZER and J. V. NEEL: *Blood* **6**, 1240 (1951). — ²⁴ ITANO, H. A., and J. V. NEEL: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **36**, 613 (1950). — ²⁵ HÖRLEIN, H., u. G. WEBER: *Dtsch. med. Wschr.* **1948**, 476. — ²⁶ MORSE, M., D. E. CASSELS and M. HOLDER: *J. Clin. Invest.* **29**, 1091, 1098 (1950). — ²⁷ HAUROWITZ, F.: In ROUGHTON and KENDREW, *Hemoglobin*, S. 53. — *J. of Biol. Chem.* **193**, 443 (1951). — ²⁸ HALDANE, J. S., and J. LORRAINE-SMITH: *J. of Physiol.* **22**, 231 (1897). — ²⁹ HALDANE, J. S., C. G. DOUGLAS and J. B. S. HALDANE: *J. of Physiol.* **44**, 275 (1913). — ³⁰ SJÖSTRAND, T.: *Acta physiol. scand. (Stockh.)* **16**, 201 (1948). — *Scand. J. Clin. a. Lab. Invest.* **1**, 201 (1949). — *Nature (Lond.)* **164**, 580 (1949). — ³¹ TREIBS, A.: *Z. physiol. Chem.* **286**, 8 (1950). — ³² GEORGE, P., and C. J. STRATMANN: *Biochemic. J.* **51**, 103 (1952). — ³³ AUSTIN, J. H., and D. L. DRABKIN: *J. of Biol. Chem.* **112**, 67 (1935). — ³⁴ KEILIN, D., and E. F. HARTREE: *Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B* **113**, 393 (1933). — ³⁵ EVELYN, K. E., and H. T. MALLOY: *J. of Biol. Chem.* **126**, 655 (1938). — ³⁶ HAVEMANN, R., F. JUNG u. B. V. ISSEKUTZ jr.: *Biochem. Z.* **301**, 116 (1939). — ³⁷ HORECKER, B. L., and F. S. BRACKETT: *J. of Biol. Chem.* **152**, 669 (1944). — ³⁸ KIESE, M.: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **204**, 190 (1947). — ³⁹ HEUBNER, W., M. KIESE, M. STUHLMANN u. W. SCHWARZKOPFF: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **204**, 313 (1947). — ⁴⁰ SLYKE, D. D. VAN, A. HILLER, J. R. WEISINGER and W. O. CRUZ: *J. of Biol. Chem.* **152**, 669 (1944). — ⁴¹ NEILL, J. M.: *J. of Exper. Med.* **41**, 561 (1925). — ⁴² NEILL, J. M., and A. B. HASTINGS: *J. of Biol. Chem.* **63**, 479 (1925). — ⁴³ BROOKS, J.: *Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B* **109**, 35 (1932); **118**, 560 (1935). — ⁴⁴ KIESE, M.: *Klin. Wschr.* **1946**, 81. — ⁴⁵ GIBSON, Q. H.: *Biochemic. J.* **42**, 13 (1948). — ⁴⁶ ISSEKUTZ jr., B. V.: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **193**, 551, 567, 569 (1939). — ⁴⁷ HEUBNER, W., R. MEIER u. H. RHODE: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **100**, 149 (1923). — ⁴⁸ KIESE, M., u. D. REINWEIN: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **211**, 392 (1950). — ⁴⁹ KIESE, M., u. M. SOETBEER: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **207**, 426 (1949); **210**, 305 (1950). — ⁵⁰ KIESE, M., D. REINWEIN u. H. D. WALLER: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **210**, 393 (1950); **211**, 345 (1950). — ⁵¹ DANNENBERG, H., u. M. KIESE: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **211**, 102, 410 (1950). — ⁵² JUNG, F.: *Biochem. Z.* **305**, 248 (1940). — ⁵³ MEIER, R.: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **110**, 241 (1925). — ⁵⁴ GREENBERG, L. A., D. LESTER and H. W. HAGGARD: *J. of Biol. Chem.* **151**, 665 (1943). — ⁵⁵ REMMER, H.: *Diss. Berlin* 1945. — JUNG, F., u. H. REMMER: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **206**, 459 (1949). — ⁵⁶ HARRIDGE, H.: *J. of Physiol.* **54**, 253 (1920). — ⁵⁷ JUNG, F., u. H. REMMER: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **206**, 459 (1949). — ⁵⁸ LAVES, W.: *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* **12**, 549 (1928). — ⁵⁹ KIESE, M., u. B. WEIS: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **202**, 493 (1943). — ⁶⁰ SCHWARTZ, A. S., and E. J. RECTOR: *Amer. J. Dis. Childr.* **60**, 652 (1940). — ⁶¹ COMLY, H. H.: *J. Amer. Med. Assoc.* **129**, 112 (1945). — ⁶² FERRANT, M.: *J. of Pediatr.* **29**, 585 (1946). — ⁶³ FAUCETT, R. L., and H. C. MILLER: *J. of Pediatr.* **29**, 593 (1946). — ⁶⁴ JOHNSON, G., A. KURZ, J. CERNY, A. ANDERSON and G. MATLACK: *J. Iowa Med. Soc.* **36**, 4 (1946). — ⁶⁵ BRODY, N.: *J. Amer. Med. Assoc.* **141**, 1319 (1949). — ⁶⁶ MARCUS, H., and J. R. JOFFE: *New England J. Med.* **240**, 599 (1949). — ⁶⁷ CARLISLE, M. C.: *Texas J. Med.* **46**, 703 (1950). — ⁶⁸ EVELOFF, A. R.: *Illinois Med. J.* **98**, 294 (1950). — ⁶⁹ EVING, M. C.: *Lancet* **1951 I**, 931. — ⁷⁰ NELSON, H. G., and H. R. SANDERS: *Oklahoma Med. Assoc. J.* **44**, 232 (1951). — ⁷¹ CAMPBELL, W. A. B.: *Brit. Med. J.* **1952 II**, 371. — ⁷² Editorials: *J. Amer. Med. Assoc.* **137**, 823 (1948); **141**, 534 (1949). — *Lancet* **1948 I**, 956. — *Brit. Med. J.* **1952 II**, 381. — ⁷³ DARLING, C. R., and F. J. W. ROUGHTON: *Amer. J. Physiol.* **137**, 56 (1942). — ⁷⁴ KIESE, M., u. G. KLINGMÜLLER: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **207**, 655

- (1949). — ⁷⁵ WYMAN jr., J., and E. N. INGALLS: *J. of Biol. Chem.* **139**, 877 (1941). — ⁷⁶ THEORELL, H.: *Ark. Kem., Mineral. Geol., Ser. A* **16**, Nr 14 (1943). — ⁷⁷ HEILMEYER, L.: *Dtsch. Arch. klin. Med.* **173**, 128 (1932). — ⁷⁸ HEILMEYER, L.: *Medizinische Spektrophotometrie*, S. 121. Jena 1933. — ⁷⁹ FAIRLEY, N. H., and R. J. BROMFIELD: *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. a. Hyg.* **28**, 307 (1934); **31**, 139, 372 (1938). — ⁸⁰ KEILIN, J.: *Nature (Lond.)* **154**, 120 (1944). — ⁸¹ ROSENFELD, M., and D. M. SURGENOR: *J. of Biol. Chem.* **183**, 663 (1950). — ⁸² BLYUMENFELD, L. A., i A. M. CHARUYI: *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* **75**, 873 (1950). — *Chem. Abstr.* **45**, 4278 (1951). — ⁸³ BLYUMENFELD, L. A.: *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* **78**, 539 (1951). — *Chem. Abstr.* **45**, 10272 (1951). — ⁸⁴ STIER, E.: *Z. inn. Med.* **2**, 257 (1947). — ⁸⁵ LIÉBECQ, CL.: *Actualités biochimiques* **7** (1947). — *Experientia (Basel)* **4**, 56 (1948). — ⁸⁶ KIESE, M., u. H. KAESKE: *Biochem. Z.* **312**, 121 (1942). — ⁸⁷ HOPPE-SEYLER, F.: *Zbl. med. Wiss.* **1**, 433 (1863). — ⁸⁸ HIJMAN VAN DEN BERGH, A. A.: *Dtsch. Arch. klin. Med.* **83**, 86 (1905). — ⁸⁹ MEYER, E.: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **41**, 325 (1898). — ⁹⁰ GIORDANO, C., e E. C. VIGLIANI: *Arch. Sci. med.* **64**, 137 (1937). — ⁹¹ HARROP, G. A., and R. L. WATERFIELD: *J. Amer. Med. Assoc.* **95**, 647 (1930). — ⁹² MICHEL, H. O.: *J. of Biol. Chem.* **126**, 323 (1938). — ⁹³ KIESE, M.: *Naturwiss.* **30**, 587 (1942). — ⁹⁴ KESZTYÜS, L. v., u. M. KIESE: *Klin. Wschr.* **1943**, 746. — ⁹⁵ LEMBERG, R., H. F. HOLDEN, J. W. LEGGE and W. H. LOCKWOOD: *Austral. J. Exper. Biol. Med. a. Sci.* **20**, 161 (1942). — ⁹⁶ KIESE, M., u. L. SEIFELT: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **200**, 648 (1943). — ⁹⁷ WARBURG, O., u. E. NEGELEIN: *Ber. dtsch. chem. Ges.* **63**, 1816 (1930). — ⁹⁸ LEMBERG, R.: *Biochem. J.* **29**, 1322 (1935). — ⁹⁹ LEMBERG, R.: *Austral. J. Exper. Biol. a. Med. Sci.* **21**, 239 (1943). — ¹⁰⁰ FOULKES, E. C., R. LEMBERG and P. PURDOM: *Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B* **138**, 386 (1951). — ¹⁰¹ LEMBERG, R., W. H. LOCKWOOD and J. W. LEGGE: *Biochem. J.* **35**, 363 (1941). — ¹⁰² DRABKIN, D. L., and J. H. AUSTIN: *J. of Biol. Chem.* **112**, 89 (1936). — ¹⁰³ KIESE, M.: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **204**, 385 (1947). — ¹⁰⁴ ALSLEV, J., u. M. KIESE: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **207**, 525 (1949). — ¹⁰⁵ WARBURG, O., u. E. NEGELEIN: *Biochem. Z.* **244**, 239 (1932). — ¹⁰⁶ FISCHER, H., u. C. v. SEEMANN: *Z. physiol. Chem.* **242**, 133 (1936). — ¹⁰⁷ HAUBOWITZ, F.: *J. of Biol. Chem.* **137**, 771 (1941). — ¹⁰⁸ KIESE, M.: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **205**, 747 (1948). — ¹⁰⁹ KIESE, M.: *Klin. Wschr.* **1942**, 565. — ¹¹⁰ BARKAN, G.: *Z. physiol. Chem.* **148**, 124 (1925). — BARKAN, G., u. E. BERGER: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **136**, 278 (1928). — BARKAN, G., u. O. SCHALES: *Z. physiol. Chem.* **248**, 96 (1937). — ¹¹¹ VENNDT, H.: *Z. physiol. Chem.* **263**, 162 (1940). — ¹¹² MILLER, L. L., and P. P. HAHN: *J. of Biol. Chem.* **134**, 585 (1940). — ¹¹³ LEGGE, J. W., and R. LEMBERG: *Biochem. J.* **35**, 353 (1941). — ¹¹⁴ KIESE, M.: *Klin. Wschr.* **1942**, 565. — *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **200**, 648 (1943). — ¹¹⁵ BLÖMER, K., u. M. KIESE: *Arch. exper. Path. u. Pharmakol.* **204**, 377 (1947). — ¹¹⁶ AGNER, K.: *Acta physiol. scand. (Stockh.)* **2**, Suppl. VIII (1941). — ¹¹⁷ AGNER, K.: *Adv. Enzymol.* **3**, 137 (1943). — ¹¹⁸ AGNER, K.: *Nature (Lond.)* **159**, 271 (1947). — ¹¹⁹ ROSSI-FANELLI, A.: In ROUGHTON and KENDREW, *Hemoglobin*, S. 115. — ¹²⁰ DUVE, CHR. DE: *Acta chem. scand. (Københ.)* **2**, 264 (1948). — ¹²¹ THEORELL, H.: *Biochem. Z.* **268**, 73 (1934). — ¹²² MILLIKAN, G. A.: *Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. A* **155**, 277 (1936). — ¹²³ BROOKS, D.: *Biochem. J.* **23**, 1391 (1929). — ¹²⁴ BYWATERS, E. G. L., G. E. DELORY, C. RIMINGTON and J. SMILES: *Biochem. J.* **35**, 1164 (1941). — ¹²⁵ BYWATERS, E. G. L., and J. K. STEAD: *Quart. J. Exper. Physiol.* **33**, 53 (1944). — ¹²⁶ VOGT, H., u. G. GEISELER: *Dtsch. Arch. klin. Med.* **189**, 44 (1942). — ¹²⁷ KEILIN, D., and E. F. HARTREE: *Nature (Lond.)* **164**, 254 (1949). — ¹²⁸ MACMUNN, C. A.: *Philosophic. Trans. Roy. Soc. Lond.* **176**, 661 (1885); **177**, 267 (1886). — *J. of Physiol.* **8**, 57 (1887). — *Z. physiol. Chem.* **13**, 497 (1899). — ¹²⁹ KEILIN, D.: *Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B* **98**, 312 (1925); **100**, 129 (1926). — ¹³⁰ THEORELL, H.: *Erg. Enzym-*

forsch. **9**, 239 (1943). — ¹³¹ FUJITA, A., T. HATA, J. NAMUTA u. M. AJISAKA: Biochem. Z. **301**, 376 (1939). — ¹³² PRADER, A., u. A. GONELLA: Experientia (Basel) **3**, 462 (1947). — ¹³³ HORECKER, B. L., and A. KORNBERG: J. of Biol. Chem. **165**, 11 (1946). — ¹³⁴ THEORELL, H.: Enzymologia (Den Haag) **4**, 192 (1937). — ¹³⁵ ZELLE, K., u. H. MEYER: Naturwiss. **27**, 596 (1939). — Z. physiol. Chem. **262**, 178 (1939). — ¹³⁶ ZELLE, K., u. G. GNANT: Z. physiol. Chem. **263**, 147 (1940). — ¹³⁷ WARBURG, O., u. E. NEGELEIN: Biochem. Z. **193**, 339 (1928); **202**, 202 (1928); **214**, 64 (1929). — ¹³⁸ WARBURG, O.: Naturwiss. **16**, 345 (1928). — ¹³⁹ KEILIN, D., and E. F. HARTREE: Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B **125**, 171 (1938). — ¹⁴⁰ KEILIN, D., and E. F. HARTREE: Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B **127**, 167 (1939). — ¹⁴¹ STRAUB, F. B.: Z. physiol. Chem. **268**, 227 (1941). — ¹⁴² HÜBSCHER, G., u. M. KIESE: Naturwiss. **39**, 524 (1952). — HÜBSCHER, G., M. KIESE u. R. NICOLAS: Biochem. Z. (im Druck). — ¹⁴³ DANNENBERG, H., u. M. KIESE: Biochem. Z. **322**, 395 (1952). — ¹⁴⁴ KIESE, M.: Naturwiss. **39**, 403 (1952). — ¹⁴⁵ PAULING, L., and C. D. CORYELL: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **22**, 210 (1936). — ¹⁴⁶ CONANT, J. B.: J. of Biol. Chem. **57**, 401 (1923). — CONANT, J. B., and N. D. SCOTT: J. of Biol. Chem. **69**, 575 (1926); **76**, 207 (1928). — ¹⁴⁷ HAVEMANN, R.: Biochem. Z. **293**, 399 (1937); **314**, 118 (1943). — ¹⁴⁸ TAYLOR, J. F., and A. B. HASTINGS: J. of Biol. Chem. **131**, 649 (1939).

Prof. Dr. MANFRED KIESE, Marburg a. d. Lahn,
Pharmakologisches Institut der Universität.
