

I. *Versuche in der Apparatur nach Warburg.* Es wurde eine Anzahl von Versuchsreihen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. 7—10 ccm Normalserum⁴ wurden mit 0,6—13 mg mehrfach durch Umkristallisieren gereinigtem Natriumbutyrat mit oder ohne Zusatz von Pufferlösung ($p_H = 7,3$) sowie mit oder ohne vorherige Sättigung mit O_2 , in der Apparatur nach *Warburg* bis zu 48 Stunden lang bebrütet, wobei niemals die geringste Mehraufnahme an O_2 gegenüber den Kontrollen festgestellt werden konnte, was zu erwarten wäre, wenn eine oxytrophe Buttersäuredehydrase das Butyrat dehydrieren würde. Selbst die geringste angewandte Substratmenge müßte unter diesen Bedingungen bei einer fermentativen Wirkung einen merklichen Manometerausschlag verursachen.

II. *Versuche mit der Methylenblaumethodik.* Dehydrasen sind allgemein in stände, eventuell unter Mitwirkung von Überträgersystemen, Akzeptorfarbstoffe, so insbesondere Methylenblau, bei Einhaltung bestimmter Bedingungen zu entfärben, wenn das entsprechende Substrat zugegen ist. Wir führten eine analoge Versuchsreihe zu der oben geschilderten mit der Methylenblaumethodik in der *Thunberg*-Apparatur durch, konnten aber auch hier niemals die Wirkung einer Dehydrase beobachten. --

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es unmöglich ist, mit Hilfe der beiden enzymchemischen Methoden die Existenz einer Buttersäuredehydrase nachzuweisen, wodurch diese wohl weitgehendst in Frage gestellt wird. Weitere Versuche, einen eventuellen durch andere Fermente katalysierten Abbau der Buttersäure im Serum nachzuweisen, sind in Vorbereitung.

Bemerkungen zu der vorstehenden Arbeit von O. Hoffmann-Ostenhof und G. Rada

Von A. Christiani.

Aus dem Laboratorium für Krebsforschung am Krankenhaus der Stadt Wien-Lainz.

(Eingelangt am 17. März 1948. Vorgelegt in der Sitzung am 15. April 1948.)

Zu der vorläufigen Mitteilung von *Hoffmann-Ostenhof* und *Rada* über Versuche zum Nachweis einer Buttersäuredehydrase im Normalserum wäre folgendes zu bemerken:

Bei meinen biochemischen Untersuchungen ergab sich zwischen Carcinomserum und Normalserum ein stets reproduzierbarer Unterschied. Setzt man zu 2,5 ccm eines mit Äther ausgeschüttelten Carcinomserums 1 mg Cholesterin und $\frac{1}{2}$ mg Buttersäure, bebrütet es und schüttelt wieder mit Äther aus, so findet man im Extrakt einen Stoff, der in

⁴ Für die Überlassung von Normalserum (Pferdeserum) sind wir dem Staatlichen Serotherapeutischen Institut (Vorstand Prof. *M. Eisler*) zu Dank verpflichtet.

seinem biologischen Verhalten gegenüber dem krebszelllösenden Stoff des Normalserums (Pferdeserum) dem synthetischen Cholesterinbutyrat gleicht. Der gleiche Versuch ergibt im Normalserum keine Bildung dieses Stoffes.

Dieser kennzeichnende Unterschied kann nun mehrfach theoretisch erklärt werden:

Unter der Annahme, daß es sich bei diesem Stoff um Cholesterinbutyrat handelt, sind zu dessen Bildung aus physiologischen Analogien folgende Vorbedingungen denkbar:

1. Eine aufbauende Esterase, die entweder nur im Carcinomserum wirksam wäre und im Normalserum fehlt bzw. blockiert ist, oder die in beiden Seren wirksam ist, aber im Normalserum durch eine Cholesterinbutyrat spaltende Esterase kompensiert ist. Diese spaltende Esterase wäre nun ihrerseits im Carcinomserum fehlend oder blockiert.

2. Eine der beiden zugesetzten Esterkomponenten oder beide werden im Normalserum entweder abgebaut oder andersartig verwendet, im Carcinomserum aber nicht.

3. Diese Fermente sind physiologischerweise nur in beschränkter Stärke wirksam, die weder durch Anbot überphysiologischer Substratmengen noch durch beliebige Verlängerung der Einwirkungsdauer über ein bestimmtes charakteristisches Maß erhöhbar ist. Bei Vorlage physiologische Grenzen weit überschreitender Testsubstrate muß daher vorausbedacht werden, in welcher Größenordnung ungefähr Maßdifferenzen zu erwarten sind.

Was nun eine aufbauende Esterase im Carcinomserum anlangt, so war sie von vornherein anzunehmen, da der Ester sich darin obligat bildet. Im Normalserum dagegen konnte erst durch Änderung des p_H oder auch durch Versuchsanordnung im anaeroben Milieu (Stickstoff- oder Kohlensäureatmosphäre) ihr Vorhandensein erschlossen werden. Wodurch aber wird sie im Normalserum unwirksam? Die p_H -Verhältnisse sind in beiden Serumarten gleich, daher irrelevant. Es ist jedoch denkbar, daß das aerobe Milieu des Normalserums die aufbauende Esterase nicht aktiv werden läßt.

Mischt man Normal- und Carcinomserum zu gleichen Teilen, so zeigt sich, daß der Cholesterinbutyrataufbau trotzdem vor sich geht, also jene Hemmung der aufbauenden Esterase aus dem Normalserum nicht auf die wirksame aufbauende Esterase übertragen wird.

Das legt die Schlußfolgerung nahe, daß es sich im Normalserum nicht um eine blockierende Eigenschaft des Milieus gegenüber Aufbauesterase allein handeln muß, sondern daß Cholesterinbutyrat in dem gleichen Maße, in dem es gebildet wird, auch schon durch eine spaltende Esterase abgebaut wird, die nach physiologisch bekannten Analogien ein und dasselbe Ferment sein kann, das je nach den Milieuverhältnissen (aerob, nicht aereob) einmal spaltet und einmal aufbaut.

Nachdem im Carcinomserum anaerobe Verhältnisse vorliegen, käme der spaltende Effekt nicht zur Auswirkung. Für das Vorhandensein einer spaltenden Eigenschaft der Normalserum-Esterase spricht das Ergebnis

folgenden Versuches: Kleine Mengen zugesetzten Cholesterinbutyrats ($0,2\gamma/\text{ccm}$) werden, im Normalserum am biologischen Test gemessen, zum Verschwinden gebracht, während ätherausgeschütteltes Carcinomserum die gleiche Cholesterinbutyratmenge unverändert nachweisen läßt. (Die Ätherausschüttelung ist zwecks Entfernung des nativ vorhandenen Cholesterinbutyrats notwendig.)

Noch wäre zu überlegen, ob der Unterschied in der Cholesterinbutyratsynthesefähigkeit zwischen Normal- und Carcinomserum nicht auf Abbau einer seiner Komponenten beruht. Cholesterin als eines der stabilsten Stoffwechselprodukte wird nicht verändert. Über den Buttersäurestoffwechsel wissen wir wohl wenig Sicheres: Es ist durchaus denkbar, daß die Kohlehydratabbaustufe Buttersäure im normalen oxydativen Verlauf überhaupt nicht oder nur instabil durchschritten wird. Im letzten Falle würde man ein buttersäureabbauendes Ferment (wahrscheinlich im Hinblick auf *Wielands* Theorie eine Dehydrase) annehmen. Im Carcinomstoffwechsel würde das Vorhandensein des Cholesterinbutyrats die Bildung von Buttersäure voraussetzen, diese also an das anoxybiotische Milieu gebunden sein.

Die physiologisch auftretende Dehydrase würde vermutlich nur geringfügige Buttersäuremengen im Normalen zu fermentieren haben, da über einen chemisch faßbaren höheren Buttersäurespiegel im Blut nichts bekannt ist. Demnach ist auch die spezifische Dehydrase auf eine physiologisch beschränkte Wirkungsbreite eingestellt.

So bildet sich Cholesterinbutyrat im Carcinomserum aus im Überschuß vorgelegter Buttersäure (500γ in $2\frac{1}{2}\text{ccm}$) dennoch bloß in durchschnittlich 65γ pro ccm Serum, d. h. nur ungefähr 12γ Buttersäure werden zur Estersynthese herangezogen. In ungefähr angenäherten Größenordnungen dürften sich also korrelative Fermentwirkungen bewegen. Keinesfalls aber kann der Buttersäurespiegel die vorgelegten Buttersäuremengen (mindestens $5\text{mg}\cdot\%$) jemals physiologischerweise erreichen; demnach ist die zum Abbau solcher Mengen benötigte Dehydrase auf keinen Fall zu erwarten; vielmehr dürfte sich der Abbau in solchen Dimensionen bewegen, die *chemisch durch keine der bekannten Methoden erfaßt werden können, weil diese in Betracht kommenden Mengen noch innerhalb der Fehlerbreite, ja unter der Ablesbarkeitsschwelle liegen.*

Nach den bisherigen Arbeiten sowohl *Hinsbergs* als auch *Hoffmann-Ostenhofs* glaube ich heute annehmen zu dürfen, daß nicht die ganze, auch von mir im in vitro-Versuch vorgelegte Buttersäuremenge mit Hilfe der Dehydrase abgebaut wird, sondern größtenteils nach der Bebrütung wiedergefunden werden kann. Warum trotz des Buttersäureüberschusses im Normalserum kein Ester gebildet wird, wurde im vorstehenden bereits beleuchtet: Die esteraufbauende Esterase arbeitet im aeroben Milieu nicht, bzw. wird ein fakultativer Aufbau durch die spaltende Tätigkeit der Esterase kompensiert. Die bei Anwesenheit von Hemmstoffen physiologischerweise stattfindende Cholesterinbutyratsynthese kann nach diesen erweiterten Ausführungen sowohl auf Grund einer Blockierung der Buttersäuredehydrase als auch der spaltenden Esterase beruhen.

Keinesfalls jedoch ändert sich an den diesbezüglichen Tatsachen, die zur Aufstellung meiner Krebstheorie den Grund gelegt haben, das geringste, selbst wenn der Begriff „Buttersäuredehydrase“ durch Hinzunahme weiterer erklärender Faktoren eine Erweiterung erfährt.

Diese Tatsachen bleiben unberührt:

1. Bildungsfähigkeit des Cholesterinbutyrats im anaeroben Milieu, deren Fehlen im aeroben normalen Milieu.
2. Abbau von zugesetztem Cholesterinbutyrat im Normal-, Unverändertbleiben dessen im Carcinomserum.
3. Bildung und Nachweis des Cholesterinbutyrats bei Anwesenheit von Hemmstoffen.
4. Rückführung aller besprochenen Vorgänge auf fermentative Prozesse.

Absorptionsspektrographische Studien an l-Ascorbinsäure I.

(Vorläufige Mitteilung.)

Von E. Schauenstein

(unter experimenteller Mitarbeit von Inge Ochsenfeld-Lohr,
Helga Puxkandl und Margret Stampier).

Aus dem Institut für theoretische und physikalische Chemie der Universität Graz.

(Eingelangt am 6. März 1948. Vorgelegt in der Sitzung am 11. März 1948.)

Oxydiert man l-Ascorbinsäure 1. mit p-Benzochinon¹, 2. mit Wasserstoffsperoxyd in Gegenwart von Platinschwarz² und 3. elektrochemisch in salzsaurer Lösung, so entsteht bei allen Reaktionen im Endstadium ein Stoff, dessen ultraviolettes Absorptionsspektrum folgende übereinstimmende Daten aufweist:

	ν'_{\max} mm ⁻¹	log ϵ_{\max}	ϵ_{\max}
l-Ascorbinsäure, oxydiert mit p-Benzochinon .	3300	—	—
" " " H ₂ O ₂	3370	2,58	380
" elektrochemisch oxydiert . .	3150	2,56	361
l-Ascorbinsäure in H ₂ O ³ (zum Vergleich) . .	4100	3,98	9550

¹ Merck's Jahresber. 50, 70 (1931).

² I. C. Ghosh und P. C. Rhakshit, Biochem. Z. 299, 401 (1938).

³ Vgl. z. B.: H. Mohler, Absorptionsspektr. d. chem. Bindung, Verl. Fischer, Jena 1943; H. Rudy, Naturwiss. 24, 497 (1936); G. Scheibe, Ber. dtsch. chem. Ges. 58, 594 (1925).