

wird in wenig Alkohol gelöst und mit der erforderlichen Menge einer konzentrierten salzsauren 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung vereinigt. Die voluminös ausfallenden Hydrazone werden nach 10 Minuten abgesaugt und aus Alkohol umkristallisiert. Wegen der verhältnismäßig leichten Löslichkeit des Acetolhydrazons in Wasser, erwies es sich der besseren Abscheidung halber als zweckmäßig in überschüssiger Lösung am Wasserbad das Osazon des Acetols zu fällen.

Dem Vorstand des Institutes, Herrn Prof. Dr. F. Wessely, bin ich für sein stets förderndes Interesse an dieser Arbeit zu größtem Dank verpflichtet.

## Die Wirkung von Toxinen auf Fermente.

### II. Über den Einfluß von Diphtherietoxin auf den Lactat- und Pyruvatstoffwechsel in Meerschweinchengeweben.

(Kurze Mitteilung.)

Von

**O. F. Schwarz, H. Eibl, W. Zischka und O. Hoffmann-Ostenhof.**

Aus dem I. Chemischen Laboratorium und dem Pathologisch-anatomischen Institut der Universität Wien und dem Bundesstaatlichen serotherapeutischen Institut in Wien.

(Eingelangt am 20. März 1951. Vorgelegt in der Sitzung am 12. April 1951.)

In der I. Mitteilung dieser Reihe<sup>1</sup> berichteten wir, daß gewaschene Gewebshomogenate von Meerschweinchen, welche mit Diphtherie intoxicifiziert waren, eine geringere Atmung aufwiesen als Gewebshomogenate unbehandelter Tiere. Versuche, einen dieser Erscheinung parallelen Effekt *in vitro* feststellen zu können, fielen auch in der Folgezeit negativ aus. Es konnte bei genauem Studium des Einflusses des Diphtherietoxins auf die Fermentsysteme des Zitronensäurezyklus keinerlei Anhaltspunkt für einen direkten Angriff auf eines der bekannten Systeme des aeroben Abbaus der Brenztraubensäure gefunden werden.

Verschiedene Angaben in der Literatur<sup>2</sup> gaben uns Anlaß zur Annahme, daß es vielmehr der Bereich der Glykolyse (also der Vorstufe des aeroben Abbaus der Brenztraubensäure) ist, in welchem wir einen primären Angriffspunkt des Diphtherietoxins zu suchen haben. So konnten Cross und Holmes<sup>2</sup> zeigen, daß Leberschnitte aus diphtherieintoxicifizierten Tieren schlechter Glykogen aus Lactat, Pyruvat und Alanin synthetisieren als solche, welche normalen Tieren entstammten.

Wir haben nun versucht, analoge Effekte durch Zusatz von Toxin

<sup>1</sup> Mh. Chem. 81, 616 (1950).

<sup>2</sup> Vgl. das Übersichtsreferat von E. Holmes, Physiologic. Rev. 19, 439 (1939). — M. Taubenhaus und S. Soskin, J. clin. Endocrinology 2, 171 (1942).

zu Gewebshomogenaten aus gesunden Tieren zu erreichen, indem wir den Verbrauch zugesetzten Lactats bzw. Pyruvats bestimmten.

### Methodik.

*Gewinnung der Gewebshomogenate.* Die Meerschweinchen wurden durch intraperitoneale Injektion einer 5%igen Pentothallösung narkotisiert und darauf durch Genickschlag getötet. Dann wurde sofort seziiert und die zur Verwendung kommenden Gewebe in Eiswasser aus *Aqua destillata* eingebracht.

Die gekühlten Gewebe wurden nach Wägung in der Apparatur von *Potter und Elvehjem*<sup>3</sup> mit einem Medium homogenisiert, welches folgende Zusammensetzung hatte: 6 Teile Phosphatpuffer nach *Krebs*<sup>4</sup>, 6 Teile 0,1-molare  $\text{KHCO}_3$ , 3 Teile 9%ige NaCl-Lösung, 3 Teile 9%ige KCl-Lösung und 16 Teile Wasser. Pro Gramm des Gewebes wurden 7,6 ml des Mediums verwendet und 50 mg Nicotinsäureamid zugesetzt.

*Versuchsordnung.* Für einen Ansatz verwendeten wir 2,7 ml der beschriebenen Gewebssuspension, welche in ein *Warburg*-Gefäß gebracht, mit 0,1 ml Diphtherietoxin Nr. 28 versetzt und darauf 30 Min. eisgekühlt stehen gelassen wurde. In den Seitenarm des *Warburg*-Gefäßes kamen die Substrate, welche vor Einstellen des Gefäßes in den Schüttelthermostaten (37°) eingekippt wurden. Nach Erreichung der Temperaturkonstanz im Thermostaten wurde 20 Min. lang geschüttelt, der Sauerstoffverbrauch in dieser Zeit manometrisch gemessen und die Reaktion dann durch Zusatz von 2 ml 50%iger Trichloressigsäure unterbrochen, worauf man auf 10 ml auffüllte und neuerlich im Homogenisator behandelte. Als Substrate kamen zur Verwendung: 1 mg Lithiumlactat, 5 mg Hexosediphosphat, 5 mg Glykogen, 1 mg Natriumpyruvat.

*Bestimmung des Lactat- bzw. Pyruvatgehaltes.* Die Bestimmung des Lactats erfolgte kolorimetrisch nach der Methode von *Barker und Summerson*<sup>5</sup> in der Modifikation von *LePage*<sup>6</sup>. Pyruvat wurde als Gesamtketosäure nach *Quastel und Penrose*<sup>7</sup> bestimmt, wobei der durch die etwaige Anwesenheit anderer Ketosäuren bedingte Fehler vernachlässigt wurde.

### Ergebnisse und Diskussion.

Bei allen durchgeführten Versuchen, und zwar sowohl in den Kontrollversuchen als auch in den mit Diphtherietoxin beschickten Ansätzen, gleichgültig ob Substrat zugesetzt wurde oder nicht, war der Sauerstoffverbrauch in der Versuchszeit praktisch gleich hoch.

Die Versuche mit Lactat als Substrat wurden derartig durchgeführt, daß nur die Veränderung des Lactatgehaltes bestimmt wurde; eine Ab-

<sup>3</sup> J. biol. Chem. **114**, 495 (1936).

<sup>4</sup> Adv. Enzymology **3**, 191 (1943).

<sup>5</sup> J. biol. Chem. **138**, 535 (1941).

<sup>6</sup> G. A. *LePage* in: *W. W. Umbreit, R. H. Burris und J. F. Stauffer*, Manometric Techniques and Tissue Metabolism, S. 192. Minneapolis 1949.

<sup>7</sup> Biochemic. J. **31**, 266 (1937).

nahme des Lactatgehaltes bezeichnen wir als „Verwertung“, ohne damit über das Schicksal der Substanz etwas Bestimmtes aussagen zu wollen. 15 Versuche mit Leberhomogenaten und Lactat als Substrat ergaben, daß die mit Toxin versetzten Ansätze einen Mehrgehalt an Lactat gegenüber den mit gekochtem Toxin versetzten Kontrollen aufwiesen, das heißt, daß die „Verwertung“ des Lactats gestört war. Bei den Kontrollen wurde ein Verschwinden von durchschnittlich 32% des zugesetzten Lactats beobachtet, während bei den mit Toxin beschickten Ansätzen insoweit wohl sehr divergente Ergebnisse erhalten wurden, als in manchen Fällen eine sehr geringe „Verwertung“ (10%), in den meisten Fällen gar keine „Verwertung“ und schließlich sogar vereinzelt eine Mehrbildung an Lactat (bis zu 50%) festgestellt werden konnte. Die *Gemeinsamkeit dieser Resultate* liegt aber darin, daß alle Toxinansätze sich von den Kontrollen im gleichen Sinne, *nämlich durch den Mehrgehalt an Lactat*, unterscheiden.

An dieser Stelle muß erwähnt werden, daß bei der geschilderten Versuchsanordnung manchmal weder in den Kontrollen noch in den mit Toxin versetzten Proben eine Veränderung des Lactatgehaltes beobachtet werden konnte; die Ursache für diese Erscheinung dürfte in einem technischen Fehler bei der Bereitung der Homogenate liegen, den wir bisher noch nicht ausschalten konnten. Derartige negative Versuche wurden in dem oben berichteten Ergebnis nicht berücksichtigt.

Es wurde ferner eine Anzahl von Versuchen durchgeführt, um eine etwaige bestehende wechselseitige Abhängigkeit zwischen Pyruvatgehalt und Lactatgehalt nachzuweisen. Bei Versuchen mit Pyruvat als Substrat und Leberhomogenaten konnte in den Kontrollen durchschnittlich eine 50%ige *Abnahme*, in den mit Toxin beschickten Ansätzen eine 70%ige *Abnahme des Pyruvatgehaltes* beobachtet werden. Einige Versuche mit Hirnhomogenaten ergaben gleiche Ergebnisse. Dagegen konnte bisher bei entsprechend durchgeführten Parallelversuchen mit gleichzeitiger Bestimmung von Pyruvat- und Lactatgehalt keinerlei Resultat erhalten werden, welches auf eine wechselseitige Abhängigkeit zwischen den Veränderungen des Gehaltes dieser beiden Bestandteile schließen läßt. Ein Präparat der sogenannten Milchsäuredehydrogenase der tierischen Gewebe (DPN · H<sub>2</sub>-Brenztraubensäure-transhydrogenase) scheint sich durch Toxinzusatz in seiner Aktivität nicht beeinflussen zu lassen.

Versuche mit Hirnhomogenaten, wobei Glykogen bzw. Hexosediphosphat als Substrate zugesetzt wurden, ergaben im ersteren Falle einen Mehrgehalt von 38% Lactat gegenüber den Kontrollen, im zweiten Falle einen solchen von 32%.

Wir berichten diese vorläufigen Versuchsergebnisse, welche noch in verschiedener Hinsicht der Komplettierung bedürfen, schon jetzt, weil

die beschriebenen Effekte unseres Wissens den ersten Fall der Beobachtung einer direkten Wirkung des Diphtherietoxins auf ein Stoffwechselsystem außerhalb des Organismus darstellen (vgl. *Peters*<sup>8</sup>, *Schlechter*<sup>9</sup>). Eine weitergehende Deutung der Resultate soll an dieser Stelle nicht versucht werden; sie berechtigen unserer Meinung zur Zeit nur zu der einzigen Schlußfolgerung, daß *ein Angriffspunkt des Diphtherietoxins im Glykolyseteil des Kohlehydratstoffwechsels liegt.*

## Beeinflussung der Ultraviolettabsorption von menschlichem Sehnenkollagen durch Hydrolyse.

(Kurze Mitteilung.)

Von

**E. Schauenstein.**

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

(Eingelangt am 19. März 1951. Vorgelegt in der Sitzung am 12. April 1951.)

Für die Kenntnis der Eigenschaften und Struktur des in späteren Arbeiten eingehend zu untersuchenden Hyalin erwies es sich als unerlässlich, die hydrolytische Spaltung von normalem Sehnenkollagen zu untersuchen. Die hydrolytische Spaltung zeigt sich nämlich als eine der wichtigsten Methoden zur Untersuchung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung von Faserproteinen. Diese weisen eine mehr oder minder intensive Absorption ihres Peptidgerüsts, genauer gesagt, der enolisierten Peptidgruppen auf<sup>1</sup>, die so stark sein kann, daß die typische Eigenabsorption der chromophoren Aminosäuren mehr oder minder verdeckt wird<sup>2</sup>.

Dies ist bei Kollagen tatsächlich der Fall und man muß daher, um Aufschluß über die Aminosäurezusammensetzung zu erhalten, die Gerüstabsorption zum Verschwinden bringen, das heißt, das Peptidgerüst möglichst weitgehend zerstören. Dies wurde mit folgenden Mitteln erreicht:

### 1. Pepsin—Salzsäure.

Kollagen löst sich darin erwartungsgemäß praktisch restlos auf und die Absorption bleibt im kurzwelligen Gebiet praktisch unverändert, sinkt aber im längerwelligen UV. beträchtlich ab.

<sup>8</sup> *Biochemic. J.* **35**, 219 (1941).

<sup>9</sup> *Riv. ist. sieroterap. ital.* **24**, 10 (1949); *Chem. Abstr.* **43**, 9152 (1949).

<sup>1</sup> *E. Schauenstein* und *D. Stanke*, *Makromolek. Chem.* **5**, 262 (1951). — *O. Kraiky* und *E. Schauenstein*, *Z. Naturforsch.* **5 b**, 281 (1950).

<sup>2</sup> *E. Schauenstein*, *M. Hoehenegger* und *M. Walzel*, *Z. Biol.* (1951), im Druck.