

„alkalischer“ Phosphatase arbeitete, lassen denn auch eine Gleichgewichtskonstante errechnen, die im Gegensatz zu der unsrigen kleiner als 1 ist. Da nun die Reaktionsgeschwindigkeiten mit der „sauren“ Phosphatase der Prostata im alkalischen Gebiet sehr klein sind, ist für die exakte Prüfung unserer Hypothese und die Berech-

nung des Gleichgewichts mit HPO_4 -Ionen eine besondere Untersuchung erforderlich.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sage ich für die Förderung meiner Arbeiten ehrerbietigen Dank. Bei dieser Untersuchung haben mir Frl. G. Schütz und Hr. H. Brilmayer wertvolle Hilfe geleistet.

Wärmemessung bei Fermentreaktionen¹

Von PAUL OHLMEYER

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen

(Z. Naturforschg. 1, 30–35 [1946]; eingegangen am 18. Oktober 1945)

Es wird ein Calorimeter beschrieben, das 50 bis 250 Milligrammcalorien pro Stunde zu messen erlaubt. Die Wärmetönung der phosphatatischen Reaktion Adenosinmonophosphorsäure \rightarrow Adenosin + Phosphorsäure wurde zu -1600 cal/mol bestimmt. Für die Wärmetönung der Reaktion Adenosintriphosphorsäure \rightarrow Adenosinmonophosphorsäure + 2 Phosphorsäure wurden in Übereinstimmung mit andersartigen Messungen von O. Meyerhof -24000 cal/mol gefunden. Die Messung der Reaktion Fumarat + Wasser \rightarrow l(–)-Malat ergab -3800 cal/mol, die Messung der Rückreaktion + 3900 cal/mol. Aus diesen Werten in Zusammenhang mit dem Temperaturkoeffizienten der Gleichgewichtskonstante folgt für das System der Fumarase die Einstellung eines thermodynamischen Gleichgewichts, für das Ferment also die Natur eines echten Katalysators.

Das volle Verständnis des chemischen Geschehens im Organismus setzt die thermodynamische Betrachtung voraus, und insbesondere die enzymatische Katalyse von Gleichgewichtsreaktionen verlangt die Erforschung der Energieverhältnisse. Dabei ist die Kenntnis ihres Wärmebedarfs sehr oft eine unerläßliche Bedingung. In Bestätigung und Erweiterung der bisher vorliegenden Ergebnisse, die vor allem O. Meyerhof zu verdanken sind, haben wir calorimetrische Messungen bei Fermentreaktionen unternommen, deren erste Resultate wir im folgenden mitteilen.

I. Die calorimetrische Methode

Die Apparatur

Da es leichter ist, eine Temperatur konstant zu halten, als sie mit derselben Genauigkeit zu messen, haben wir ein Verfahren der „isother-

men“ Wärmemessung entwickelt: Wir lassen die Reaktion in einem kleinen Thermostaten mit intermittierender elektrischer Heizung ablaufen, dessen bekannter Wärmebedarf dann durch die Summe von Stromarbeit und Reaktionswärme gedeckt wird. Die Differenz der Stromarbeiten vor und bei Reaktion ist also gleich der gesuchten chemisch erzeugten Wärme.

Konstante Temperatur in der Umgebung des Reaktionsgefäßes wird durch einen elektrisch geheizten Wasserthermostaten von 30 l Inhalt erreicht. Zu den Bedingungen für die Konstanz gehört ein Heizelement mit großer Oberfläche und kleiner Wärmekapazität und in seiner Nähe ein empfindliches Kontaktthermometer. Der Strom wird so gewählt, daß Heizzeit und Heizpause etwa gleich lange dauern; dadurch wird erreicht, daß die minimale Schwankung der Temperatur, die mit der unvermeidlichen Trägheit der Regulation gegeben ist, nicht wesentlich überschritten wird.

Die Schwankung um die Mitteltemperatur bestimmen wir wie folgt: Der Abkühlungskoeffizient, d. h. die stündliche Änderung der Temperatur des ungeheizten Thermostaten, ausgedrückt in Prozent der anfänglichen Temperaturdifferenz gegen die Umgebung, betrug 6,2%. Der Thermostat stand 4,3°

¹ Abdruck einer am 11. Sept. 1944 bei der Redaktion der Zeitschrift für physiolog. Chemie eingegangenen, aber nicht mehr erschienenen Arbeit mit Genehmigung der Herausgeber.



höher als der Raum; die Heizpause dauerte 15 sec. Betrachtet man die logarithmische Kurve der Abkühlung näherungsweise als linear, so folgt für die Schwankung:

$$S = \pm \frac{1}{2} \cdot 4,3 \cdot \frac{6,2}{100} \cdot \frac{15}{3600} = \pm 0,00056\%.$$

Die Mitteltemperatur, gemessen mit dem Beckmann-Thermometer, blieb tagelang fest.

In den Thermostaten taucht ein Glaszylinder ein, der das Calorimeter, ein Dewar-Gefäß von 50 cm Fassungsvermögen aufnimmt. Dieses steht also in einem Luftmantel, 35 cm unter dem Wasserspiegel. Wir füllen es mit 20 cm der Reaktionslösung A, in welche die Küvette eines Kontaktthermometers und eine isolierte Heizspirale aus Konstantandraht mit etwa 60 Windungen eintauchen. Die Reaktionslösung B, meistens das Ferment, befindet sich vor der Reaktion in einem Gefäß von 0,15 cm Inhalt, das an einem Haken unter dem Stopfen aufgehängt ist. Ein Hebel streift dieses Gefäß bei Reaktionsbeginn ab, es kippt und bleibt so hängen, daß seine Öffnung eben eintaucht. Die Fortsetzung des Hebels nach oben ist ein dünnes Glasrohr, das zum Anschluß an ein Manometer dient. Durch eine verschließbare Öffnung im Stopfen wird bei Beendigung der Reaktion das Eiweißfällungsmittel eingebracht. Das Kontaktthermometer trägt dicht unter dem Kopf einen Wattekragen, der am Rande des Glaszylinders anliegt und in der Mitte den Manometerrohr-Hebel durchläßt. Ein elektromagnetischer Klöppel versetzt dem Kopf des Thermometers alle 7 sec leichte Stöße, die die Lage des Kontaktfadens nicht verändern; dadurch wird das Kleben des Quecksilberfadens eingeschränkt.

Die Temperaturdifferenz $\Delta \vartheta$ zwischen der Reaktionslösung und dem Thermostaten beträgt einige Hundertstel Grad. Aus $\Delta \vartheta = 0,1^\circ$, dem Abkühlungskoeffizienten des Calorimetergefäßes von 46% und der Dauer der Heizpause von 18 sec ergibt sich für die Schwankung der Temperatur in der Reaktionslösung $S = \pm 0,00012\%$.

Wir bestimmen die Dauer der Heizzeit mittels einer elektrischen Zähluhr, die im Nebenschluß des Batterieheizkreises liegt und wie die Heizspirale Strom über ein Relais bekommt, sobald das Kontaktthermometer ausschaltet. Die Schalthäufigkeit kann an einem Zählwerk abgelesen werden. Zwei Schaltuhren bewirken zur gewählten Stunde Schließung des Heizkreises und (nach Eintritt der Temperaturkonstanz) Einschaltung der Zähluhr.

Das Meßverfahren

Haben Heizzeit und Heizpause gleiche Dauer, so kommt die Konstanz der mittleren Temperatur offenbar dadurch zustande, daß während der Heizzeit zweimal so viel Wärme zugeführt als fortlaufend abgeführt wird. Die Strom-

stärke unter diesen Bedingungen sei i' . Dann entspricht die Wärmezufuhr der Stromleistung $N_1 = i'^2 \cdot W$ und der fortlaufende Wärmeabfluß der Stromleistung $N_2 = \frac{i'^2}{2} \cdot W$, worin W den elektrischen Widerstand der Heizspirale bedeutet. Mit der Stromleistung $N_2 = \frac{i'^2}{2} \cdot W$ würde also bei ununterbrochener Heizung Konstanz erreicht.

Ist unter anderen Bedingungen die Dauer der Heizzeit t , die Dauer der Heizpause t' und die Stromstärke i , so entspricht der Wärmegewinn über t , d. h. die Differenz zwischen Wärmezufuhr und Wärmeabfluß, der Stromarbeit $A_1 = i^2 \cdot W \cdot t - \frac{i^2}{2} \cdot W \cdot t$ und der Wärmeabfluß über t' der Stromarbeit $A_2 = \frac{i^2}{2} \cdot W \cdot t'$. Aus der Konstanz der mittleren Temperatur folgt, daß Wärmegewinn über t und Wärmeabfluß über t' entgegengesetzt gleich sind, und so ergibt sich

$$i' = \pm i \sqrt{2 \cdot \frac{t}{t+t'}}, \quad (1)$$

worin nur das positive Vorzeichen einen physikalischen Sinn hat. Unter allgemeinen Bedingungen wird also mit der Stromleistung $N_2 = \frac{i'^2}{2} \cdot W = i^2 \cdot W \cdot \frac{t}{t+t'}$ bei ununterbrochener Heizung Konstanz erreicht.

Den Ausdruck $\frac{t}{t+t'}$ nennen wir Q_H , den Heizquotienten. Wir finden ihn als Mittelwert, wenn wir am Ende einer bestimmten Meßperiode, zu Beginn einer Heizpause Σt , die Summe aller Heizzeiten an der Zähluhr ablesen und durch die Dauer der Meßperiode dividieren.

Ist Q_H nach Eintritt des Temperaturengleichs vor Beginn der Reaktion bestimmt, so findet man während einer Reaktion mit Wärmetönung einen anderen Wert Q'_H . Q'_H ist kleiner als Q_H bei exothermer, größer bei endothermer Reaktion; Zwischenwerte im Verlauf der Reaktion zeigen einen Gang mit deren Geschwindigkeit und führen am Schluß wieder auf Q_H .

Bei der Wärmemessung benutzen wir den Mittelwert Q'_H für die Zeit τ zwischen dem Beginn der Reaktion und dem Ende des Versuchs. Dann folgt aus der Stromleistung

$$N = i^2 \cdot W \cdot Q_H - i^2 \cdot W \cdot Q'_H \quad (2)$$

die Reaktionswärme als $A = i^2 \cdot W \cdot \tau (Q_H - Q'_H)$ oder weil $Q'_H \cdot \tau = \Sigma t$ abgelesen wird:

$$A = i^2 \cdot W \cdot (Q_H \cdot \tau - \Sigma t). \quad (3)$$

Hierin werden i in Ampère, W in Ohm und τ und Σt in Sekunden ausgedrückt; man findet die Reaktionswärme in Wattsekunden und nach Multiplikation mit dem Faktor 0,239 in Grammcalorien.

Der Wärmebedarf des Calorimetergefäßes vor der Reaktion und damit der Meßbereich wird durch $\Delta \vartheta$, die variable Temperaturdifferenz zwischen Gefäßfüllung und Thermostat, festgelegt. $\Delta \vartheta$ braucht nicht genau bekannt zu sein. Wir messen meistens über zwei Stunden und richten den chemischen Vorgang so ein, daß zwischen 50 und 250 Milligrammcalorien in der Stunde entwickelt werden.

Prüfung der Apparatur

1. Versuch. Konstanz von Q_H . Das Calorimeter wurde mit Wasserfüllung 7 h geheizt; Q_H wurde zehnmal über etwa 40 min bestimmt.

Q_H (0 ... 7 h)	f_m (%)	F_W (%)	Q_H (5,5 ... 7 h)
0,411	$\pm 4,6$	$\pm 0,9$	0,416

2. Versuch. Anwendung von Gleichung (1). Nach dieser Gleichung kann man i' , die Stromstärke für die Bedingung $Q_H = 0,5$ berechnen, wenn i , die effek-

i (mA)	2,07	2,43	2,58	2,79	3,94
Q_H	0,671	0,487	0,440	0,370	0,191
i' (mA)	2,40	2,40	2,42	2,40	2,43

tive Stromstärke, und Q_H , der zugehörige Heizquotient, bekannt sind. Für die Prüfung der Apparatur

mit Hilfe dieser Beziehung wurde i so variiert, daß Q_H (über 60 min) innerhalb des praktisch wichtigen Bereichs 0,15—0,75 gefunden wurde: für i' ergab sich mit geringer Streuung ein konstanter Wert. Gleichung (1) war also erfüllt.

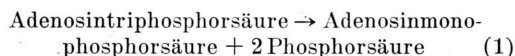
3. Versuch. Anwendung von Gleichung (2). Nach dieser Gleichung kann man eine zusätzliche thermische Leistung N errechnen, wenn der zugehörige Heizquotient Q'_H und die Größen $i^2 \cdot W$ und Q_H bekannt sind. Für die Prüfung der Apparatur mit Hilfe dieser Beziehung wurde neben die Heizspirale mit dem Widerstand $W = 225,4 \Omega$ eine zusätzliche Spule mit $W_1 = 59,2 \Omega$ gelegt. Durch die Stromstärke i_1 im zweiten Heizkreis war dann eine (konstante) thermische Leistung $N = i_1^2 \cdot W_1$ gegeben, die calorimetrisch mit einem mittleren Fehler von $\pm 5\%$ gefunden wurde. Gleichung (2) war also erfüllt (Tab. 1).

II. Wärmemessungen bei Fermentreaktionen

Spaltung von Adeninnucleotid

Die Energieumwandlung bei der Abspaltung von Phosphorsäure aus Adeninnucleotid interessiert wegen ihres Beitrags zur Wärmebildung im tätigen Muskel und neuerdings besonders nach der Entdeckung des Zusammenhangs zwischen Dephosphorylierung von Adenosintriphosphorsäure und Verkürzung der Myosinfaser².

Die Wärme der Reaktion



haben schon O. Meyerhof und K. Lohmann³ errechnet, indem sie die drei Reaktionen:

² W. A. Engelhardt, M. N. Ljubimova u. R. A. Meitina, C. R. Acad. Sci. URSS. **30**, 644 [1941], zitiert nach C. 1942, II, 66; Szent-Györgyi, Studies from the Inst. of Med. Chem. Univ. Szeged **1** [1941].

³ Biochem. Z. **191**, 125, 19; **253**, 431 [1932].

$\Delta \vartheta$ (°)	0,025		0,037		0,144	
i (mA)	1,99	1,99	2,18	2,18	3,59	3,59
Q_H	0,550	0,550	0,564	0,564	0,680	0,680
i_1 (mA)	1,17	1,56	1,91	2,54	3,44	5,35
Q'_H	0,448	0,376	0,362	0,202	0,456	0,078
N { ber.	0,81	1,44	2,16	3,82	7,00	17,00
Watt · 10 ⁴) { gef.	0,91	1,37	2,16	3,87	6,50	17,45
f (%)	+ 12,4	− 4,9	± 0	+ 1,3	− 7,1	+ 2,6

Tabelle 1.

Adenosintriphosphorsäure \rightarrow Inosinmonophosphorsäure + 2 Phosphorsäure + Ammoniak,

Adenosinmonophosphorsäure \rightarrow Inosinmonophosphorsäure + Ammoniak
und

Inosintriphosphorsäure \rightarrow Inosinmonophosphorsäure + 2 Phosphorsäure

im thermometrischen Calorimeter von Meyerhof mit Muskelferment verwirklichten. Nachdem wir gefunden hatten, daß die Phosphatase der Prostata die Phosphorsäure aus Adenin-nucleotid quantitativ abspaltet⁴, haben wir die beiden Reaktionen:

Adenosintriphosphorsäure \rightarrow Adenosin + 3 Phosphorsäure

und

Adenosinmonophosphorsäure \rightarrow Adenosin + Phosphorsäure

calorimetrisch gemessen und so die Wärme-

tönung der Reaktion (1) errechnet. Meyerhofs und unsere Ergebnisse stimmen sehr gut überein.

Spaltungswärme der Adenosinmonophosphorsäure

Ansatz: 40 mg Substrat; 0,15 ccm dial. Prostataferment; 0,015-m. Citrat-Salzsäure; V_F 20,15 ccm; p_H 3,7; θ 24,3°. Zur Abtötung des Ferments 3 ccm 20-proz. Trichloressigsäure. Bestimmung von abgespaltenem P. Rechnung nach Gl. (3); $W = 428,1 \Omega$; U = Wärmetönung, bei exothermer Reaktion trägt sie nach der neueren Zeichengebung das negative Vorzeichen (Tab. 2).

Spaltungswärme der Adenosintriphosphorsäure

Die Substanz enthielt 0,14 P-Äquivalente Adenosinmonophosphorsäure als Begleitstoff. Ansatz: 9 mg Substrat; 0,15 ccm dial. Ferment; 0,015-m. Citrat-Salzsäure; V_F 20,15 ccm; p_H 3,7; θ 24,3°. Bestimmt wurde die Bildung von anorg. P (a) und die Abnahme des leicht hydrolysierbaren P (b). ($a - \frac{3}{2}b$) entspricht der Adenosinmonophosphorsäure, deren Spaltungswärme $A' = 1550 \cdot 0,239 - 1$ Ws/mol in die Berechnung einging. $\mu\text{mol} = 10^{-6}$ Mol (Tab. 3).

Ver-such	i (mA)	Q_H	τ (s)	Σt (s)	A (Ws)	Chem. Umsatz (mmol)	U (cal/mol)	f (%)
A	1,12	0,608	6860	2965	0,65	0,115	— 1350	— 12,9
B	1,12	0,666	6930	3200	0,76	0,110	— 1650	+ 6,5
C	1,12	0,725	6425	3670	0,52	0,082	— 1520	+ 1,3
D	1,24	0,381	6670	1455	0,72	0,101	— 1700	+ 10,0
E	1,24	0,597	7060	3375	0,55	0,099	— 1330	— 14,2
F	1,24	0,420	8210	2320	0,75	0,105	— 1700	+ 10,0
G	1,24	0,557	9720	4380	0,68	0,101	— 1600	+ 3,2

Tabelle 2.

Mittel: — 1550

Versuch	i (mA)	Q_H	τ (s)	Σt (s)	P (mg)	
					anorg.	l. hydr.
A	1,20	0,496	9550	4000	+ 0,509	— 0,251
B	0,904	0,628	9550	4080	+ 0,675	— 0,365

Berechnung:

Versuch	A (Ws)	Adenosin-monophosphorsäure		Adenosintriphosphorsäure		
		Umsatz (μmol)	A' (Ws)	Umsatz (μmol)	$A - A'$ (Ws)	U (cal/mol)
A	4,59	4,26	0,275	4,05	4,315	— 25 500
B	6,70	4,13	0,268	5,90	6,052	— 26 100

Tabelle 3.

⁴ P. Ohlmeyer, Diese Z. **1**, 18 bes. 25 [1946].

Versuch	i (mA)	W (Ω)	Q_H	τ (s)	Σt (s)	A (Ws)	Umsatz (mmol)	U (cal/mol)
A	2,93	225,4	0,640	5580	3100	0,90	0,19	— 1170
B	2,72	428,1	0,472	4365	1840	0,69	0,116	— 1380
C	1,20	423,1	0,582	7310	2040	1,36	0,246	— 1300
D	1,60	428,1	0,550	6640	2560	1,19	0,246	— 1160

Tabelle 4.

Für die Wärmetönung bei der Abspaltung von 3 P aus Adenosintriphosphorsäure wurden also im Mittel -25800 cal/mol gefunden. Durch Subtraktion des Wertes für die Spaltung von Adosinmonophosphorsäure folgt für Reaktion (1) $-25800 + 1550 = -24250$ cal/mol. Meyerhof und Lohmann haben 24000 cal/mol errechnet.

Hydrolyse von Glycerinphosphorsäure

Vor kurzem haben wir die phosphatatisch katalysierte Reaktion Glycerin + Phosphorsäure \rightleftharpoons Glycerinphosphorsäure thermodynamisch berechnet und calorimetrisch gemessen³. Aus dem Temperaturkoeffizienten der Gleichgewichtskonstante folgte nach der Reaktions-Isochore $\frac{d \ln K}{dT} = \frac{U}{RT^2}$ die Wärmetönung -1300 cal/mol für die Esterspaltung. Da die Wärmemessung denselben Wert ergab, so war damit zum erstenmal gezeigt, daß eine Hydro-

Hydratation der Fumarsäure

K. P. Jacobsohn⁵ berechnete die Reaktion Fumarat + Wasser \rightleftharpoons l(—)-Malat auf Grund des Temperaturkoeffizienten der Gleichgewichtskonstante und fand für die Hydratationswärme -4100 cal. Auch H. A. Krebs, D. H. Smyth und E. A. Evans⁶ bestimmten die Gleichgewichtskonstante bei verschiedenen Temperaturen; aus ihren Werten folgt nach der Gleichung der Reaktions-Isochore -3420 cal. Jacobsohn fand den Betrag von 4100 cal jedoch nicht in Einklang mit dem Temperaturkoeffizienten der Geschwindigkeitskonstanten für Hin- und Rückreaktion, verwarf daher die Berechnung mit Hilfe der Reaktions-Isochore und bildete eine Hypothese, die in Anlehnung an Vorstellungen H. v. Eulers die Temperaturabhängigkeit auf die Beteiligung des Ferments zurückführt. Eine wesentlich niedrigere Hydratationswärme, nämlich -670 cal, errechnet sich

Versuch	Substrat (mmol)		i (mA)	W (Ω)	Q_H	τ (s)	Σt (s)	A (Ws)	Chem. Umsatz	U (cal/mol)
	Fumar- säure	Apfel- säure							(μ mol)	
A	—	—	0,70	428,1	0,448	2510	1250	$-0,025$	—	—
B	0,075	0,39	0,48	428,1	0,478	4125	1855	$+0,015$	—	—
C	3,45	—	2,69	428,1	0,495	6880	3180	$+0,62$	37,8	-3930
D	3,45	—	1,79	215,0	0,664	4995	1315	$+1,38$	92,5	-3570
E	3,45	—	1,99	215,0	0,630	6615	1160	$+2,56$	159,0	-3850
F	—	3,0	1,44	215,0	0,404	4915	3360	$-0,61$	39,2	$+3740$
G	—	3,0	1,44	215,0	0,117	5425	1855	$-0,54$	32,2	$+4020$

Tabelle 5.

lase als echter Katalysator ein echtes Gleichgewicht einstellen kann. Hier bringen wir die genauen Belege für die Wärmemessung.

Ansatz: 125 mg Substrat als Kaliumsalz; 0,15 ccm dial. Prostataferment; 0,015-m. Citrat-Salzsäure; V_F 20,15 ccm; p_H 4,5; θ 24,3°. — Bestimmung von P (Tab. 4).

noch aus potentiometrischen Messungen im kombinierten System der Succinodehydrase und Fumarase, die H. Borsook und H. F. Schott⁷

⁵ Biochem. Z. **274**, 167 [1934].

⁶ Biochem. J. **34**, 1041 [1940].

⁷ J. biol. Chemistry **92**, 559 [1931].

ausführten. Die Möglichkeit, zwischen diesen sich widersprechenden Rechnungen durch direkte Wärmemessung zu entscheiden, sah Jacobssohn „wegen des zu langsamen Ablaufs der Reaktion“ nicht gegeben.

Um einen weiteren Beitrag zur Theorie der fermentativen Katalyse zu gewinnen, haben wir nun sowohl die Wärmebildung in der Reaktion Fumarsäure \rightarrow Apfelsäure als auch den Wärmeverbrauch in der Reaktion Apfelsäure \rightarrow Fumarsäure calorimetrisch gemessen und -3800 cal bzw. $+3900$ cal erhalten.

Gewinnung des Ferments. Kalbsleber wurde durch die Latapiemühle getrieben, der Brei mit einem halben Volumen Wasser angerührt, 24 h bei 0° aufbewahrt und zentrifugiert. Die überstehende Lösung stand vor Beginn der Versuche 10 Tage unter Toluol im Kühlschrank.

Ansatz: 16 ccm Substratlösung; 4 ccm Veronalpuffer; 0,15 ccm Ferment; im Gasraum Stickstoff; p_H 6,8; θ 24,3°. In dem Versuch A ist das Substrat, in den Versuchen F und G der Puffer fortgelassen.

Analyse. Bestimmung der Apfelsäure polari-

metrisch nach Jacobssohn³, der Fumarsäure gravimetrisch nach A. Hahn u. W. Haarman⁴.

Ergebnisse. Versuch A: Das Einkippen des Ferments in Pufferlösung verläuft praktisch thermoneutral. Versuch B: Mischt man Malat und Fumarat nach Maßgabe der Gleichgewichtskonstante und setzt Ferment zu, so tritt kein Vorgang ein, dessen Wärmetönung die Fehlergrenze der Messung überschreite. Unter dieser Voraussetzung konnten wir für Hin- und Rückreaktion entgegengesetzt gleiche Wärmemengen finden (Versuche C...G) (Tab. 5).

Für die Theorie folgt, daß die Gleichung der Reaktions-Isochore durch die Werte für Gleichgewichtskonstante und Wärmetönung in den Grenzen der Methoden befriedigt wird. Das Ferment ist also ohne Einfluß auf die thermodynamisch geforderte Gleichgewichtslage.

Ich danke Frl. G. Schütz für ihre Hilfe bei der Ausführung der Messungen.

⁴ Z. Biol. 87, 107 [1928].

Auslösung von Polyploidie durch Kälte bei *Drosophila melanogaster*

Von HANS BAUER

Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie, Hechingen

(Z. Naturforschg. 1, 35—38 [1946]; eingegangen am 1. September 1945)

Durch Kältebehandlung von 2 Stdn. alten Embryonen wird eine Polyploiditierung von Urkeimzellen erzielt, die am Auftreten triploider Nachkommen festgestellt wird.

Bei *Drosophila melanogaster* sind triploide ♀♀ und tetraploide Fliegen beider Geschlechter bekannt. Erstere werden seit langem regelmäßig gezüchtet; 4n-Tiere aber sind nur vereinzelt beobachtet worden¹. Für die Klärung mancher genetischer Fragen besonders auch der Mutationsforschung wären konstante tetraploide Stämme nützlich. Sie müßten sich erhalten lassen, wenn bei ihrem Aufbau attached-X-Chromosomen verwandt würden². Voraussetzung für die willkürliche Herstellung solcher 4n-Stämme ist es, sich von dem Aufsuchen spontan auf-

tretender Polyploider unabhängig zu machen, also ihre experimentelle Auslösung zu erreichen. Diesem Ziel dienten die im folgenden beschriebenen Versuche.

In der botanischen Genetik herrscht heute zur experimentellen Polyploidisierung das Colchicin-Verfahren vor. Seine Anwendung auf Tiere ist durch die Schwierigkeit, das Colchicin in einer für den Organismus unschädlichen Weise wirksam an die Keimzellen heranzubringen, noch stark eingeschränkt. Es liegen nur ganz vereinzelte positive Versuchsberichte vor. Um nicht erst mühsam einen geeigneten Weg zur Überwindung der Schwierigkeiten suchen zu müssen, wurde auf das älteste Verfahren zurückgegriffen, die von J. J. Gerassi-

¹ C. B. Bridges, Cytological and genetic basis of sex. Sex a. intern. secretions. 2nd ed. 15—63 [1939].

² H. Bauer, Fortschr. d. Zool. N.F. 7, 256 [1943].

now³ eingeführte Kältebehandlung. Es wurden sich entwickelnde Eier der Kälte ausgesetzt; sie reagieren bei ihrer geringen Dicke gleichmäßiger, als von den Larven angenommen werden kann, und enthalten Urkeimzellen, die noch eine längere Mitosenfolge zu durchlaufen haben. Aus einer polyploid gewordenen Urkeimzelle muß, wenn sie nicht entwicklungsbenachteiligt ist, eine größere Menge polyploider Keimzellen entstehen, daher ist eine gruppenweise Häufung von polyploiden Nachkommen zu erwarten, die zugleich ein wichtiger Anhaltspunkt für den Erfolg des Versuches ist. Es wurden daher frühe Embryonalstadien, bei denen die Urkeimzellen als Polzellen ausgetreten sind, behandelt. Das ist bei 2 Stdn. alten Eiern der Fall⁴.

Als Kriterium für die gelungene Polyploidisierung der Urkeimzellen wurde das Auftreten triploider Töchter bei der Kreuzung von (im Embryonalstadium) kältebehandelten ♀♀ mit unbehandelten ♂♂ benutzt. Die ♀♀ hatten die Konstitution *Notch^s/yellow white* (*N^s/yw*), die ♂♂ *facet-notchoid* (*fa^{no}*). Der Faktor *fa^{no}* wurde deshalb gewählt, weil er in Kombination mit *Notch* larvenletal ist⁵. Dadurch wird die Anzahl der auszuzählenden ♀♀ auf die Hälfte reduziert und es tritt normalerweise bei ihnen ebenso wie bei den ♂♂ (infolge Absterbens der *N^s/Y*-Zygoten) nur eine Klasse auf. Außerdem sollte durch *fa^{no}* in Anwesenheit von *N^s* eine Klasse der möglichen triploiden F₁-♀♀ gekennzeichnet werden. Die durch die Kältebehandlung erzielten tetraploiden Oogonien haben die Konstitution *N^s/N^s/yw/yw*. Bei Zufallsverteilung der X-Chromosomen in den Reifeteilungen entstehen also 3 Sorten von diploiden Eizellen: *N^s/N^s*, *N^s/yw* und *yw/yw* im Verhältnis 1 : 4 : 1, demnach 3 Sorten von triploiden Zygoten: *N^s/N^s/fa^{no}*, *N^s/yw/fa^{no}* und *yw/yw/fa^{no}*. Die ersteren sind wie die diploiden *N^s/fa^{no}*-Zygoten letal, die aus den letzteren hervorgehenden ♀♀ unterscheiden sich nicht von *yw/fa^{no}*-♀♀. Die *N^s/yw/fa^{no}*-♀♀ dagegen sollten nach der von Bauer⁵ gegebenen Deutung den *Notch*-Phänotypus aufweisen. Nach dieser Deutung

stellt *facet-notchoid* ein Deficiency eines der Elemente einer im normalen Genotypus der Art vorhandenen Genduplikation dar; bei *Notch*-Faktoren ist dagegen das ganze Gendublett entfernt. Für die normale Flügelausbildung sind je X-Chromosom durchschnittlich mindestens 1,5 dieser Gene notwendig. Der *Notch*-Phänotypus kommt bei einem Gen-X-Verhältnis von 1,0 zustande (*N^s/+*; *fa^{no}/fa^{no}*; *fa^{no}-♂*). Ein Verhältnis <1 ist letal. Bei den zu erwartenden 3n-♀♀ der Konstitution *N^s/yw/fa^{no}* liegt ein Verhältnis 1,0 vor (0+2+1:3); sie sollten also *Notch*-Flügel besitzen. Das hat sich in den Versuchen durch Weiterzucht der Triploiden bestätigt, womit die vorgeschlagene Deutung der Natur des *fa^{no}*-Faktors eine weitere Stütze erhält.

Daß auch die diploiden *yw/fa^{no}*-♀♀ in einem geringen Prozentsatz kleine Flügelausschnitte aufweisen⁵, stört nicht, da sie an der fehlenden Aderverdickung stets von den 3n-♀♀ unterschieden werden können.

Durch die Auszählung der *Notch*-Fliegen werden also zwei Drittel der triploiden ♀-Zygoten erfaßt. Von den diploiden ♀-Zygoten ist dagegen nur die Hälfte lebensfähig. Das Verhältnis von 3n : 2n-Zygoten ist also etwas kleiner als das der 3n : 2n-♀♀.

Der Versuchsgang war der folgende: Unbefruchtete *N^s/+*-♀♀ wurden bei 25° mit *yw-♂♂* in Röhrchen gebracht, die in üblicher Weise mit agarbedeckten Objektträgern besetzt waren. Auf der Höhe der Legeperiode wurden die Objektträger in einstündigen Intervallen gewechselt. Die abgelegten Eier wurden dann nach Erreichen eines Durchschnittsalters von 2 Stdn. mit den Agarplättchen unmittelbar auf Eis oder auf eine Eiskochsalzmischung gebracht, so daß sie Temperaturen von 0° bzw. -4° ausgesetzt waren. Nach 1/2—4 Stdn. wurden die Eier in Kulturfラスen gebracht, wo sie bei 25° die weitere Entwicklung durchmachten. Die schlüpfenden *N^s/yw*-♀♀ wurden unbefruchtet abgesammelt und zu 2 bis 4 zusammen mit *fa^{no}-♂♂* in Flaschen angesetzt.

Über die Behandlungsdauer in den Einzelversuchen gibt Tab. 1 Auskunft, in der zugleich die Daten über die durch die Behandlung bedingte Sterblichkeit zusammengefaßt sind. Von jeder Temperatur und Behandlungsdauer wurden 3—4 Einzelversuche gemacht, die in der Tabelle nur gesammelt angeführt sind. Die Sterblichkeitswerte in diesen Teilversuchen streuen stark. Im ganzen tritt mit zunehmender

³ Bull. Soc. Imp. Natur. Moscou No. 1 u. 2. 185 [1901].

⁴ D. F. Poulson, Act. scient. et ind. (Paris) 498, 1 [1937].

⁵ H. Bauer, Z. Vererbgs. 81, 374 [1943].

Temperatur	Behandlungsdauer in Stunden	Anzahl der behandelten Eier	Anzahl der erwarteten Fliegen	Anzahl der geschlüpften Fliegen	kältebewirkte Mortalität in %
0°	1	603	301	144	52,2
	2	825	412	244	40,8
	3	1290	645	165	74,4
	4	757	378	119	68,5
-4°	1/2	1226	613	315	48,6
	1	779	389	224	42,4
	1 1/2	966	483	108	77,6
	2	921	460	158	65,7

Tab. 1. Sterblichkeit der Fliegen auf frühen Entwicklungsstadien nach Kältebehandlung.

Behandlungsdauer und abnehmender Temperatur aber eine Zunahme der Sterblichkeit auf. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Sterblichkeit nicht ausschlaggebend auf einer Partialpolyploidisierung des Embryos beruht; denn diese dürfte in erster Linie durch den Abkühlungsschock bedingt und unabhängig sein von der weiteren Dauer der Kälteeinwirkung über eine wohl nur kurze Minimalzeit hinaus.

Die Ergebnisse der Nachkommenzuchten der kältebehandelten ♀♀ faßt Tab. 2 zusammen. Aus ihr geht hervor, daß der Prozentsatz triploider ♀♀ in den Kontrollzuchten außerordentlich gering ist; er beträgt nur 0,015%. Die 3 Triploiden traten einzeln in verschiedenen Kulturen auf. Anders ist das Bild in den Versuchs-

Versuchsart		geschlüpfte F ₁ -Fliegen			3n-♀♀ in % aller ♀♀
		♂♂	2n-♀♀	3n-♀♀	
Kontrolle		19 226	20 513	3	0,015
Temp.	Stunden				
	1	397	516	2	
	2	3 706	4 197	21	
	3	1 572	1 683	—	
	4	269	459	3	
Gesamt . . .		5 944	6 855	26	0,38
-4°	1/2	702	673	4	
	1	619	644	13	
	1 1/2	342	366	1	
	2	669	817	1	
Gesamt . . .		2 332	2 500	19	0,75

Tab. 2. Auftreten triploider ♀♀ nach Kältebehandlung der Mütter im Embryonalzustand.

zuchten: Bei 0°-Behandlung wurden 0,38%, bei -4°-Behandlung 0,75% triploide ♀♀ erhalten. Die Steigerung gegenüber den Kontrollen beläuft sich, wenn auch eine genaue statistische Bewertung nicht möglich ist, auf das 25- bis 50-fache. Das ist zwar immer noch wenig, reicht aber für den Zweck der willkürlichen Herstellung polyploider Stämme voll aus. Wieweit reale Unterschiede zwischen den Versuchen mit verschiedener Temperatur und Behandlungsdauer vorliegen, läßt sich im einzelnen nicht sagen.

		Anzahl der Kulturen	Kulturen mit n Triploiden, n =													
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Kontrolle		62	59	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Temperatur	Stunden															
0°	{	1	3	2	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		2	9	5	—	—	1	2	—	—	—	—	1	—	—	—
		3	5	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		4	4	2	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
— 4°	{	1/2	5	4	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		1	4	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
		1 1/2	2	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		2	7	6	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Kälteversuche gesamt .		39	28	4	2	1	2	—	—	—	—	—	1	—	—	1

Tab. 3 Verteilung der Triploiden auf die Einzelzuchten.

Besonders auffällig ist die Verteilung der Triploiden auf die einzelnen Kulturen (Tab. 3). Ohne weiteren statistischen Vergleich ist es klar, daß solche Verteilungen, wie sie besonders bei 0° 2 Std. und bei -4° 1 Std., aber auch bei den anderen Versuchsgruppen mit mehr als einem 3n-♀ beobachtet wurden, nicht eine Zufallsverteilung wiedergeben⁶. Sie zeigen vielmehr eine Häufung der Triploiden in den Einzelkulturen an. Die Erklärung dafür ist nach dem oben Gesagten offensichtlich; während das Auftreten der Triploiden in den Kontrollversuchen wohl allein auf meiotische Störungen zurückgeht, müssen einzelne der behandelten ♀♀ als Folge der Polyploidisierung der Urkeimzellen tetraploide Ovarteile, einzelne

oder Gruppen von Eiröhren, besitzen, aus denen mehrere diploide Eizellen entstehen.

Daß nur so wenige größere Gruppen von Triploiden beobachtet wurden, liegt zum Teil daran, daß nur $\frac{1}{3}$ der diploiden Eizellen erfaßt werden; denn nicht nur $\frac{1}{3}$ der 3n-♀ entzieht sich der Beobachtung oder stirbt ab, sondern auch eine den 3n-Zygoten gleiche Zahl von XXY-Zygoten bleibt unberücksichtigt. Außerdem werden auch wohl nicht wenige hypo- oder hyperdiploide Eizellen entstehen. Die Beschränkung der Triploidenzugung auf nur vereinzelt ♀♀ schließlich liegt zweifellos daran, daß nur in einem geringen Teil der behandelten Eier einzelne Urkeimzellen gerade in dem für die Restitutionskernbildung geeigneten Mitosestadium sind. Es ist wahrscheinlich, daß eine mehrfache Kältebehandlung mit kurzen Erwärmungspausen einen noch erheblich günstigeren Versuchsausfall gibt.

Hrn. G. W i e r t z, der die Versuche ausgeführt hat, bin ich für seine Hilfe dankbar.

⁶ Unter der vereinfachenden Annahme, daß die Einzelkulturen gleiche Individuenanzahlen aufwiesen, berechnet sich die Wahrscheinlichkeit dafür, daß die Gesamtverteilung der Triploiden in den Kälteversuchskulturen (Tab. 3, unterste Zeile) einer Poisson-Verteilung entspricht, auf $P < 10^{-6}$.

Unregelmäßige Chromosomenverteilung durch eine Mutation bei *Ephestia kühniella* Z.

Von ALFRED KÜHN und DORE-LI WOYWOD

Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie, Hechingen

(Z. Naturforschg. 1, 38—44 [1946]; eingegangen am 1. September 1945)

Die unvollständig dominante Mutation *Mo* bewirkt unregelmäßige Chromosomenverteilung, meist in einer der ersten embryonalen Teilungen. In dem reinen Stamm entstehen etwa 20% Mosaiktiere, meist Halbseitenmosaiks, die verschiedenen helle Flügel-schuppen haben. Im Mittel ist die eine Seite gegenüber der Flügelhelligkeit der gleichseitigen Tiere des Stammes aufgehellt, die andere verdunkelt. Nach Einkreuzung spalten verschiedene rezessive mutierte Allele nicht gekoppelter Gene mosaikhaft heraus. *Mo* bewirkt also die unregelmäßige Verteilung verschiedener Chromosomen. Das auf der einen Seite ausfallende Chromosom kann ganz verloren gehen oder der anderen Seite zugeteilt werden. Auch zweifach monosome Flügel können entstehen.

In unseren Zuchten von *Ephestia kühniella* und von *Ptychopoda seriata* kommen ab und zu Mosaiktiere vor. Drei Fälle wurden früher schon beschrieben: von *Ephestia* ein Sektorialmosaik¹ und ein Halbseitenmosaik², in

denen bei einem +/b-Heterozygoten eine Seite *b* zeigte, und von *Ptychopoda* ein Halbseitenmosaik³, bei dem in einer wildfarbigen Zucht auf einer Seite die der Mutation *At* entsprechende Flügelbeschuppung erschien.

¹ A. Kühn, Versuche über die Wirkungsweise der Erbanlagen. Naturwiss. 24, 6 [1936].

² A. Kühn, Zur Entwicklungsphysiologie der Schmetterlingsschuppen. Biol. Zbl. 61, 136 ff. [1941].

³ A. Kühn u. M. v. Engelhardt, Über zwei melanistische Mutationen (*At* und *ni*) von *Ptychopoda seriata* Schrk. Biol. Zbl. 63, 264 ff. [1943].