

ist aber die auf der Umwandlung von Atomkernen beruhende Bombe und die aus den Kernen stammende Energie gemeint. Im Abschnitt: „Neue Wege zur Gewinnung radioaktiver und stabiler Atome“ ist bereits gesagt, wie im Uran-Brenner Wärme entsteht. Es ist jetzt nur noch zu besprechen, wie diese Wärmeenergie nutzbar gemacht werden kann und worin die vorher zu überwindenden Hauptschwierigkeiten bestehen. Die in Aussicht genommenen Anlagen sehen folgendes Verfahren vor⁵²⁾. Ein Uran-Brenner gibt seine Wärme an eine Kühlflüssigkeit (Kühlgas) ab. Die Kühlflüssigkeit führt sie weiter zu einem Austauscher, in dem ein Betriebsgas (Wasserdampf oder Quecksilberdampf) für eine Gasturbine oder eine andere Wärmekraftmaschine erhitzt wird. Das Kühlgas, das den Brenner durchläuft, wird radioaktiv, das Betriebsgas der Wärmekraftmaschine nicht.

⁵²⁾ J. D. Cockroft, Nature [London] v. 4. 10. 1947; J. D. Wheeler, Power (März 1946).

Damit die Maschine einen hohen Nutzeffekt hat, muß der Uran-Brenner, die Kühlflüssigkeit und das Betriebsgas der Wärmekraftmaschine bei möglichst hoher Temperatur betrieben werden. Bisher gelingt es noch nicht, den Uran-Brenner bei höheren Temperaturen sicher zu steuern und es macht Schwierigkeiten als Baumaterial Stoffe zu finden, die einerseits langsame Neutronen nicht absorbieren und andererseits zugleich genügend temperaturbeständig sind. Aluminium, das bei niedrigen Temperaturen verwendbar ist, muß bei höheren ersetzt werden. „Wenn die Natur freundlich ist“ (wie Cockroft sagt), könnte ein Uran-Brenner, der 100 t normales Uran enthält, 100000 kW auf die Dauer von 20 Jahren liefern ohne die Zufuhr von neuem Brennstoffmaterial. Wahrscheinlich wird aber vorher wegen der Neutronenabsorption in den Spaltprodukten deren chemische Abtrennung erforderlich sein.

Eingeg. am 8. November 1948.

[A 163]

Anwendungen der stabilen und radioaktiven Isotope in der Biochemie

Von Prof. Dr. FRIEDRICH WEYGAND, Chemisches Institut der Universität Heidelberg

Stabile und radioaktive Isotope haben sich als äußerst wertvolle Hilfsmittel der biochemischen Forschung erwiesen. Die Anwendungsmöglichkeiten werden besprochen und über zahlreiche, bisher erzielte Ergebnisse wird berichtet.

Allgemeiner Teil

- A) Verdünnungsanalyse
- B) Verfolgung des Weges und des Aufenthaltsortes einer Verbindung
- C) Verfolgung von chemischen Umwandlungsreaktionen, insbes. Stoffwechseluntersuchungen und Biosynthesen
- D) Wahl des geeigneten Isotops

Spezieller Teil

- Na, K, Zn, Co, Mn, Ca, Sr, Fe, Cu, P, As, F, Cl, Br, J, S, N, H², C
- Herstellung indizierter organischer Verbindungen
- Auswahl indizierter organischer Verbindungen
- Literatur

Zum ersten Male wurde ein radioaktives Isotop zur Lösung einer biochemischen Frage 1923 von G. Hevesy¹⁾ herangezogen, als er mit Th B, einem Blei-Isotop (Pb²¹²), den Blei-Stoffwechsel bei Pflanzen untersuchte. Da der Nachweis des radioaktiven Bleis etwa 10⁶ mal empfindlicher ist als der beste chemische Nachweis, konnten die Untersuchungen mit nichttoxischen Dosen durchgeführt werden. Arbeiten über den Blei- und Wismut-Stoffwechsel im tierischen Organismus folgten. Nach der Entdeckung des schweren Wasserstoffs (1932) zog ihn als einer der ersten K. F. Bornhoffer außer zu physikalisch-chemischen auch zu biochemischen Untersuchungen heran. In Amerika begannen dann Schoenheimer und Rittenberg ihre umfangreichen Untersuchungen mit schwerem Wasserstoff und auch mit schwerem Stickstoff, als dieser durch Ureys Arbeiten verfügbar geworden war.

Inzwischen waren die künstlich radioaktiven Elemente bekannt und durch die Erfindung des Cyclotrons in Amerika leicht zugänglich geworden. Als bald setzte dort eine wahre Flut biochemischer Arbeiten mit diesen neuen Hilfsmitteln ein, nachdem Hevesy in Dänemark 1935 mit dem radioaktiven Phosphor den Anfang gemacht hatte. Einen besonderen Aufschwung hat die Verwendung der radioaktiven Isotope zur Lösung chemischer und biochemischer Fragen neuerdings genommen, da durch die Uran-Piles die Radio-Isotope zu ziemlich niedrigen Preisen in beträchtlichem Umfange zugänglich geworden sind²⁾.

Allgemeiner Teil

Bei dem folgenden Überblick über die Anwendungsmöglichkeiten der Isotope können die Strahlenwirkungen beiseite gelassen werden, da diese verabredungsgemäß von R. Fleischmann³⁾ behandelt worden sind.

Für die chemische und biochemische Anwendung der Isotope ist die Allgemeingültigkeit zweier Voraussetzungen wichtig.

1. Die Isotope eines Elementes zeigen gleiches chemisches Verhalten, können aber mit physikalischen Methoden nebeneinander bestimmt werden. Die einzige Ausnahme machen Wasserstoff (H¹), Deuterium (H²) und Tritium (H³). Z. B. ist die C-H¹-Bindung schwächer als die C-H² oder die C-H³-Bindung wegen der höheren Nullpunktsenergie des leichteren Isotops.

2. Die Häufigkeitsverteilung der Isotope eines Elements in der Natur ist konstant, jedenfalls liegt die Schwankungsbreite

bei der üblicherweise angewandten Methodik unterhalb der Meßgenauigkeit. Genauere Messungen zeigten eine gewisse, allerdings sehr kleine Anreicherung von C¹² gegenüber C¹³ durch Pflanzen und Tiere⁴⁾. Es erscheint daher nicht sinnvoll für die Anwendung die Empfindlichkeit der physikalischen Nachweismethoden zu steigern.

Diese Voraussetzungen erlauben die sehr wichtigen Anwendungen, die man unter dem Begriff der „Indicatormethoden“ zusammenfassen kann.

A) Verdünnungsanalyse

Einem Gemisch verschiedener Verbindungen wird die zu analysierende, charakterisiert durch eine anomale Isotopenzusammensetzung, zugesetzt. Die vorher vorhandene und die zugesetzte Verbindung sind durch die üblichen chemischen Verfahren dann nicht mehr zu trennen. Nunmehr wird ein für die Isotopenanalyse ausreichender Teil der Verbindung in reiner Form isoliert und auf seine isotopische Zusammensetzung hin analysiert. Aus der beobachteten Veränderung wird die ursprünglich in dem Gemisch vorhandene Gesamtmenge der Verbindung errechnet. Da man von einer gegenüber der normalen erhöhten Konzentration eines Isotops ausgeht, die dann durch Verdünnung mit der normal vorliegenden Isotopenmischung erniedrigt wird, bezeichnet man diese Analysenmethode am besten als Verdünnungsanalyse. Man kann mit stabilen oder radioaktiven Isotopen arbeiten; die Wahl richtet sich nach der Verfügbarkeit, nach den Konstanten des Isotops, wie Halbwertszeit und Härte der ausgesandten Strahlung, und schließlich nach dem zu erwartenden Verdünnungsgrad. Damit richtige Analysenwerte erhalten werden, darf die indizierte Verbindung natürlich mit keinem anderen Bestandteil der Mischung eine Isotopenaustauschreaktion eingehen.

Angewandt wurde die Verdünnungsanalyse mit großem Erfolg von Rittenberg⁵⁾ bei der Analyse von Aminosäuren in Eiweißhydrolysaten und von Fettsäuren in tierischen Fetten.

Bei der Aminosäure-Analyse arbeitet man bisher mit schwerem Stickstoff, 5–20 mg Substanz reichen aus. Bei den Fettsäuren wurde Deuterium zur Indizierung benutzt. In beiden Fällen kann man genau so gut den schweren Kohlenstoff (C¹³) oder den langlebigen radioaktiven Kohlenstoff (C¹⁴) heranziehen.

¹⁾ G. Hevesy, Biochemic. J. 17, 439 [1923].

²⁾ Availability of Radioactive Isotopes. Science [New York] 103, 697–706 [1946].

³⁾ R. Fleischmann, diese Ztschr. 61, 277 [1949] vgl. auch G. Schubert, Kernphysik und Medizin, Göttingen 1947.

⁴⁾ A. O. Nier u. F. A. Gulbransen, J. Amer. chem. Soc. 61, 697 [1939]; vgl. auch J. biol. Chemistry 142, 47 [1942]; L. O. Krampitz, A. G. Wood u. C. H. Werkman, ebenda 147, 243 [1943].

⁵⁾ D. Rittenberg u. G. L. Foster, J. biol. Chemistry 133, 737 [1940].

Die Berechnung der zu bestimmenden Substanzmenge ist sehr einfach. Es sei C_0 die Konzentration an verwendetem stabilem Isotop in der zugesetzten und C die der isolierten Verbindung, ausgedrückt als prozentiger Überschuß über die normalerweise vorliegende Isotopenmischung. Die zugesetzte Menge der Verbindung sei x und die gesuchte y . Dann ist

$$y = \left(\frac{C_0}{C} - 1\right) x$$

Wenn sich die Molekulargewichte von x und y unterscheiden, wie das bei Verwendung von Deuterium in größeren Prozentgehalten der Fall ist, dann müssen bei der Berechnung die Molekulargewichte berücksichtigt werden⁶⁾. M_1 = Molekulargewicht von x und M_2 = Molekulargewicht von y .

$$y = \left(\frac{C_0}{C} - 1\right) \cdot \frac{M_2}{M_1} \cdot x$$

Wird der Faktor M_2/M_1 vernachlässigt, so können bei der Verwendung von Verbindungen mit hohen Deuterium-Gehalten Fehler von einigen Prozenten entstehen. Wird mit N^{15} oder C^{13} gearbeitet, so kann der Faktor M_2/M_1 , außer bei sehr kleinen Molekeln, vernachlässigt werden. Beim Arbeiten mit radioaktiven Isotopen ist der Prozentgehalt an zugesetztem Isotop so klein, daß Korrekturen für verändertes Molekulargewicht fortfallen.

Bei der Indizierung mit radioaktiven Isotopen ist vor dem Zusatz der radioaktiven Substanz keine Aktivität vorhanden, so daß eine einfache Verdünnungsrechnung das Resultat liefert.

Als Vorteile der Methode werden von Rittenberg angegeben: Der Fehler einer Bestimmung (bei Aminosäuren und Fettsäuren beträgt er etwa 1%) ist unabhängig von der Konzentration im Ausgangsmaterial. Es tritt kein größerer prozentischer Fehler auf, ob nun die absolute Konzentration der zu bestimmenden Substanz im Gemisch 1% oder 50% ist. Besondere Verhältnisse liegen vor, wenn optisch aktive Verbindungen bestimmt werden sollen, wie das bei den Aminosäuren (mit Ausnahme des Glykols) der Fall ist.

Da die zuzusetzenden Aminosäuren meist durch *in vitro* Synthesen gewonnen werden, fallen sie als Racemate an. Werden sie vor dem Zusatz in die optischen Antipoden gespalten und setzt man dann die natürliche Form der Verbindung zu, so treten keine Komplikationen auf. Verwendet man aber das Racemat, so wird die Aminosäure bei der Isolierung in verschiedener stereochemischer Reinheit anfallen. Aus der optischen Drehung und dem Isotopengehalt kann jedoch auch dann die Verdünnung berechnet werden. Günstig liegen die Verhältnisse, wenn man das Racemat und den reinen Antipoden isolieren kann. Alle diese Umstände sind von Rittenberg^{5, 7)} genau diskutiert worden, so daß auf seine Arbeiten verwiesen sei. Zur Illustrierung der Genauigkeit sei nur angegeben, daß sich im Rinderfibrin ein Gehalt an Glutaminsäure von $13 \pm 0,1\%$ ergab. Ferner konnte entgegen den Angaben von Kögl im Tumorprotein keine *d*-Glutaminsäure gefunden werden⁸⁾.

Auch zur Beurteilung der Frage, ob bei bestimmten Reinigungsoperationen noch Begleitstoffe abgetrennt werden, kann die isotopische Verdünnungsanalyse herangezogen werden. Im erwähnten Falle der Glutaminsäure-Bestimmung im Fibrin hätte sich z. B. ein Gehalt von 5% einer anderen Aminosäure im Stickstoff-Gehalt kaum mehr geäußert. Der Isotopengehalt wäre dagegen um 5% geändert gewesen.

Eine andere Art der Verdünnungsanalyse ist die folgende: Wenn es gilt, ein bestimmtes Flüssigkeitsvolumen zu ermitteln und direkte Volumbestimmung ausgeschlossen ist, so kann durch Zusatz einer bekannten Menge eines Stoffes und dessen quantitativer Bestimmung in einem Bruchteil des Gesamtvolumens nach der Durchmischung das Gesamtvolumen ermittelt werden. Zur Bestimmung des Blutvolumens z. B. hat man früher derartige Versuche mit organischen Farbstoffen angestellt.

Injiziert man einem Kaninchen intravenös mit Radionatrium indiziertes Kochsalz und entnimmt danach zu bestimmten Zeiten Blutproben, deren Aktivität bestimmt wird, so findet man, daß bereits nach $\frac{1}{2}$ h eine gleichmäßige Verteilung eingetreten ist, die über längere Zeit erhalten bleibt. Ein genaues Studium dieses Vorganges hat ergeben, daß das Natrium-Ion sich über die gesamte extracelluläre Flüssigkeit verteilt hat, die so zu 29% des Körpergewichtes bestimmt wurde⁹⁾.

Da das Natrium-Ion zu schnell aus der Blutbahn verschwindet, kann man mit seiner Hilfe keine Blutvolumbestimmung ausführen. Das gleiche Verhalten wird auch bei anderen Ionen angetroffen. Man hat sich aber so geholfen, daß die roten Blutkörperchen selbst indiziert wurden. Hevesy¹⁰⁾ verwendete dazu Radio-Phosphor, amerikanische Autoren¹¹⁾ Radio-Eisen. Einem Kaninchen wurde z. B. radioaktives Phosphat gegeben. Nach einer Woche enthielten die Erythrocyten in ihrer Lipoidfraktion ebenso wie in der Fraktion des säurelöslichen Phosphors Radio-phosphor. Eine gewisse Menge Blut wurde abgenommen und einem zweiten Kaninchen intravenös injiziert. Bereits wenige Minuten nach der Injektion solcher gekennzeichneten Erythrocyten waren sie gleichmäßig im Blut verteilt. Aus dem Vergleich der Radioaktivitäten der injizierten und der entnommenen Erythrocyten konnte das Blutvolumen sicher ermittelt werden. Er ergab sich zu 42 cm³/kg Kaninchen. Die bei diesem Versuch verwendete Aktivität war sehr gering. Nur jedes hundertste der injizierten roten Blutkörperchen enthielt je eine aktive Phosphatid-Molekel. Im zweiten Kaninchen war nur noch jedes dreitausendste radioaktiv.

B) Verfolgung des Weges und des Aufenthaltsortes einer Verbindung

Verabfolgt man einem Tier oder einer Pflanze eine radioaktiv indizierte Verbindung, so kann man an der von den einzelnen Gewebeteilen oder von den Körperflüssigkeiten ausgesandten Strahlung in einfacher Weise den Weg der Verbindung verfolgen. Derartige Untersuchungen können natürlich nur dann am lebenden Organismus gemacht werden, wenn das betreffende Radioelement eine nicht zu weiche Strahlung aussendet. Besonders beim Jod¹²⁾ hat man sehr schön zeigen können, wie schnell es von der Schilddrüse bei verschiedenen Krankheitszuständen aufgenommen und abgegeben wird. Die Aktivität wird durch ein Zählrohr vor der Stelle des Halses, an der sich die Schilddrüse befindet, gemessen.

Auch die Verteilung der radioaktiv indizierten Substanzen in den feinsten Strukturelementen kann untersucht werden. Da das Zählrohr nur ein grobes Bild geben würde, hilft man sich dann so, daß dünne Schnitte auf eine photographische Platte aufgebracht werden, wodurch eine Autoradiographie¹³⁾ entsteht. Danach färbt man die Schnitte wie üblich an und untersucht sie histologisch. Diese Technik ist auf Pflanze und Tier anwendbar und vor allem bei der Untersuchung der Insekten¹⁴⁾ angezeigt, da bei diesen kleinen Objekten die üblichen analytischen Untersuchungsmethoden versagen. Besonders bei den in großen Verdünnungen wirksamen Arznei- und Giftstoffen, bei den Wirkstoffen und Spurenelementen ist es nur so möglich, Näheres über ihre Verteilung in den Organismen zu erfahren. Ob allerdings das so ermittelte Verteilungsmuster mit dem Wirkungsmuster der betreffenden Verbindung übereinstimmt, muß durch spezielle Untersuchungen mit anderen Methoden ermittelt werden.

Auch bei der Papierchromatographie von Aminosäuren kann mit sehr gutem Erfolg Weg und Aufenthaltsort mit Hilfe von Isotopen verfolgt werden. Das Aminosäuregemisch wird mit p-J-Phenylsulfosäurechlorid quantitativ zu den p-J-Phenylsulfonfyl-Verbindungen umgesetzt und dann der Verteilungschromatographie auf Papier unterworfen. Erfolgt die Trennung in einzelne Zonen, so können die Aminosäuren quantitativ mit dem Zählrohr bestimmt werden. Das Papier wird in 5 mm breite Streifen zerschnitten und ihre Radioaktivität gemessen¹⁵⁾. Auch bei unvollständiger Trennung der Zonen kann eine einzelne Aminosäure noch quantitativ bestimmt werden, wenn diese noch mit einem anderen Isotop indiziert zugesetzt wird, z. B. als J-Phenylsulfonfyl-Derivat, das mit S³⁵ indiziert ist.

¹⁰⁾ L. Hahn u. G. Hevesy, Acta Physiol. Scand. 1, Heft 1 [1940]; G. Nylin, Brit. Heart J., 7, 81 [1945]; Arch. Kemi. Mineral. Geol. A 20, 1 [1945].

¹¹⁾ P. F. Hahn, W. F. Balfour, J. F. Ross, W. F. Bale u. C. H. Whipple, Science [New York] 93, 87 [1941].

¹²⁾ J. G. Hamilton, J. appl. Physics 12, 440 [1941]; J. G. Hamilton u. M. H. Soley, ebenda 12, 314 [1941]; S. Hertz, ebenda 12, 313 [1941].

¹³⁾ Zusammenfassung bei A. Gorbman, Nucleonics 2, 30-43 [1948]; T. C. Evans, ebenda 2, 52 [1948]; A. M. MacDonald, J. Cobb u. A. K. Solomon, Science [New York], 107, 550 [1948].

¹⁴⁾ R.-Craig, J. appl. Physics 12, 440 [1941].

¹⁵⁾ A. S. Keston, S. Udenfriend u. R. K. Cameron, J. Amer. chem. Soc. 68, 1390 [1946]; A. S. Keston, S. Udenfriend u. M. Levy, ebenda 69, 3151 [1947]; A. S. Keston, S. Udenfriend u. R. K. Cannan, ebenda, 51, 249 [1949].

⁶⁾ H. Gest, M. D. Kamen u. J. R. Reiner, Arch. Biochem. 12, 273 [1947].

⁷⁾ J. Graff, D. Rittenberg u. G. L. Foster, J. biol. Chemistry 133, 745 [1940].

⁸⁾ Vgl. auch Th. Wieland u. W. Paul, Ber. dtsh. chem. Ges. 77, 37 [1944].

⁹⁾ J. F. Manery u. W. F. Bale, Amer. J. Physiol. 132, 215 [1941]; W. O. Fenn, J. appl. Physics 12, 316 [1941].

C) Verfolgung von chemischen Umwandlungsreaktionen, insbes. Stoffwechseluntersuchungen und Biosynthesen

Die Verfolgung des Weges einer Verbindung und die Ermittlung der sich aus ihr neu bildenden Substanzen gehen natürlich oftmals Hand in Hand. Ganz besondere Bedeutung haben dabei die Isotope zum Studium des intermediären Stoffwechsels erlangt. Gerade derartige Untersuchungen waren bisher immer nur schwer durchführbar, so daß viele der früheren Ergebnisse durchaus vorläufigen Charakter hatten. Mit Hilfe der Isotope konnten sowohl alte Anschauungen sichergestellt als auch unerwartete neue Ergebnisse gewonnen werden. Gegenüber der früher in der Biochemie bereits üblichen Kennzeichnung bestimmter Verbindungen durch normalerweise darin nicht vorkommende Atome oder Atomgruppierungen bietet die Indizierung mit Isotopen den großen Vorteil, daß das chemische Verhalten nicht verändert wird und daß außerdem die physiologischen Konzentrationen nicht überschritten zu werden brauchen. (Beispiele im speziellen Teil, insbes. unter Stickstoff und Kohlenstoff).

Bei Stoffwechseluntersuchungen ist es durch die Indizierung mit stabilen oder radioaktiven Isotopen vielfach auch dann noch möglich Zwischenprodukte sicherzustellen, wenn diese normalerweise nur in kleinen Konzentrationen vorkommen oder sehr labil sind. Man verwendet z. B. indiziertes Substrat, setzt das vermutete Zwischenprodukt in nicht indizierter Form zu und isoliert nach einiger Zeit wieder einen Teil desselben. Durch Isotopenanalyse kann dann die gestellte Frage entschieden werden.

So konnte gezeigt werden¹⁶⁾, daß in Nierenschnitten der Umsatz von Acetat über Acetoacetat verläuft, obwohl dieses niemals isoliert werden konnte. Mit C^{13} in der Carboxyl-Gruppe indiziertes Acetat wurde Nierenschnitten zusammen mit Acetoacetat angeboten. In dem am Ende des Versuches isolierten Acetoacetat war C^{13} aus dem Acetat zu finden und zwar in äquimolaren Mengen in der Carboxyl-Gruppe und der β -Keto-Gruppe: $CH_3C^*OOH + CH_3C^*OOH \rightarrow CH_3C^*O \cdot CH_2C^*OOH$. (* bedeutet stabil oder radioaktiv indiziertes Atom).

In vielen Fällen genügt es bei der Untersuchung des Stoffwechsels einer Verbindung nicht, nur mit einem Isotop zu indizieren, da dadurch nur das Schicksal der indizierten Atomgruppierung verfolgt werden kann. Man kann sich aber so helfen, daß man Doppel- und Mehrfachindizierungen anwendet, z. B. in der Essigsäure $C^{13}H_3 \cdot C^{14}OOH$.

Auch zur Untersuchung des Weges und des Stoffwechsels von ganz unphysiologischen Produkten, wie sie die Schädlingsbekämpfungsmittel und chemischen Kampfstoffe darstellen, ist die Indizierung mit Isotopen, insbesondere radioaktiven, hervorragend geeignet, weil diese vielfach die leicht in radioaktiver Form zugänglichen Elemente Chlor, Brom, Phosphor, Schwefel oder Arsen enthalten.

D) Wahl des geeigneten Isotops

Bei der Auswahl eines geeigneten Isotops ist außer der Zugänglichkeit, der Halbwertszeit und des möglichen Verdünnungsgrades auch zu bedenken, ob das gestellte Problem mit einem bestimmten Isotop überhaupt zu lösen ist.

So wurde die Bildungsweise von Bernsteinsäure aus CD_3COOH durch Hefe untersucht. Wenn eine direkte Kondensation stattfindet, sollte eine Bernsteinsäure der Zusammensetzung $HOOC \cdot CD_2 \cdot CD_2 \cdot COOH$ entstehen. Es wurde aber gefunden, daß die im Experiment gebildete Bernsteinsäure nur 2-D-Atome enthält¹⁷⁾. Da sich Bernsteinsäure auch über den Triarbonsäure-Cyclus bilden kann¹⁸⁾, würde, wenn eine symmetrische Zwischenstufe wie Citrat ausgeschlossen ist, die so entstandene Bernsteinsäure nur 2 D-Atome enthalten. Das Resultat des Versuches kann nun so gedeutet werden, daß der Triarbonsäure-Cyclus wirksam ist oder daß durch ein reversibles Gleichgewicht $Bernsteinsäure \rightleftharpoons Fumarsäure$ aus der ursprünglich gebildeten Bernsteinsäure $HOOC \cdot CD_2 \cdot CD_2 \cdot COOH$ zwei D-Atome verschwinden. Mit D als Indicator läßt sich daher das gestellte Problem ohne nähere Kenntnis der endogen gebildeten Bernsteinsäure und der durch den Triarbonsäure-Cyclus gegebenen Verdünnungsmöglichkeiten der in Frage kommenden deuterierten Verbindungen nicht lösen.

Auch die Beeinflussung des biologischen Materials durch die von radioaktiven Indikatoren ausgesandte Strahlung verdient eine gewisse Beachtung. So wurde gefunden¹⁹⁾, daß durch Verabfolgung von subtherapeutischen Dosen von radio-

aktivem Phosphat an Patienten mit Leukämie ein Ansteigen der säurelöslichen P-Fraktion der roten Blutzellen erfolgte, während durch gewöhnliches Phosphat keine solche Veränderung eintrat. Diese Einzelbeobachtung darf nicht verallgemeinert werden, da biologische Systeme in einem erstaunlich verschiedenen Maße strahlungsempfindlich sind. Durch Variation der Menge an radioaktivem Isotop läßt sich jedoch leicht prüfen, ob eine Strahlungswirkung beim untersuchten Prozeß vorliegt. Bei Verwendung von Tritium (H^3) und C^{11} bzw. C^{14} können außerdem Kontrollen mit D und C^{13} durchgeführt werden. Atmung, Glykolyse, N-Stoffwechsel und Enzymaktivität sind offenbar auch durch hohe Strahlungsintensitäten nicht zu beeinflussen²⁰⁾.

Spezieller Teil²¹⁾

Bei den anorganischen Verbindungen interessiert in erster Linie ihre Resorption und Verteilung auf die verschiedenen Gewebe, Organe und feste Strukturen, sowie ihre Ausscheidung. Man hat derartige Untersuchungen mit den Radio-Elementen und Verbindungen von Na, K, Ca, Sr, Zn, Co, Mn, Fe, Cu, P, As, Cl, Br und J angestellt. Mit der Nennung der Elementnamen sind im folgenden immer die Ionen gemeint.

Natrium²²⁾ und Kalium²³⁾

Bei den Alkalien hat sich ergeben, daß Natrium aus dem Magen-Darm-Traktus viel schneller resorbiert wird als Kalium. Natrium wird nach 3 h, Kalium aber erst nach 6 h beim gesunden Menschen vollständig resorbiert. Nach dem Trinken der Salzlösungen tauchte Natrium bereits nach 3–6 min in der Hand auf, Kalium jedoch erst nach 6–15 min. Es ist naheliegend, derartige Untersuchungen mit einer Reihe von Elementen bei den verschiedensten Krankheitszuständen zu machen, um neue diagnostische Hilfsmittel in die Hand zu bekommen. So ist bekannt, daß bei Störungen in der Funktion der Nebennierenrinde oder bei der beim Tier versuchsweise durchgeführten Nebennierenexstirpation starke Veränderungen im Natrium-Kalium-Haushalt beobachtet werden. In derartigen Fällen hat man mit Hilfe der Isotope über das bisherige Wissen hinausgehende Einblicke gewonnen.

Auch zur Untersuchung der Blut-Liquor-Schranke sind radioaktiv indizierte Ionen herangezogen worden. Es ergab sich, daß der Ionenaustausch zwischen Blut und Liquor, verglichen mit dem zwischen Blut und Interstitialflüssigkeit, äußerst langsam vor sich geht, Kalium diffundiert am schnellsten, dann folgen Na, Rb, Sr, Br, die alle ungefähr gleich schnell austauschen. Phosphat-Ionen und Jod-Ionen diffundieren äußerst langsam. Beim Studium des Ionenaustausches zwischen der Hefezelle und dem umgebenden Medium²⁴⁾ hat sich ergeben, daß Kalium bei stark gärender Hefe schnell, bei schwach gärender nur langsam ausgetauscht wird.

²⁰⁾ C. M. Scott, Brit. Med. Res. Council Special Report Nr. 223 [1937].

²¹⁾ In den letzten 15 Jahren sind etwa 1000 Arbeiten über chemische und biochemische Anwendungen der Isotope erschienen. Es kann daher im Rahmen dieses Aufsatzes nur ein Teil der Literatur berücksichtigt werden. Eine Liste bisher erschienener zusammenfassender Darstellungen findet sich am Ende des speziellen Teils.

²²⁾ J. Hamilton u. R. S. Stone, *Radiology* 28, 178 [1937]; J. G. Hamilton, *Proc. nat. Acad. Sci. U. S. A.* 23, 521 [1937]; *Amer. J. Physiol.* 124, 667 [1938]; W. E. Cohn u. D. M. Greenberg, *J. biol. Chemistry* 130, 625 [1939]; L. B. Flexner u. R. B. Roberts, *Amer. J. Physiol.* 128, 154 [1939]; E. Anderson, M. Joseph u. V. Herring, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 42, 782 [1939]; W. E. Cohn u. E. T. Cohn, *ebenda* 41, 445 [1939]; J. H. E. Griffiths u. B. G. Maegrath, *Nature [London]* 143, 159 [1939]; D. M. Greenberg, W. W. Campbell u. M. Murayama, *J. biol. Chemistry* 130, 35 [1940]; L. B. Flexner u. H. A. Pohl, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 44, 345 [1940]; W. E. Cohn, *J. appl. Physics* 12, 316 [1941]; K. Lark-Horowitz, *ebenda* 12, 317 [1941]; H. A. Pohl u. L. B. Flexner, *J. biol. Chemistry* 139, 163 [1941]; A. W. Winkler, A. J. Eismann u. P. Smith, *J. appl. Physics* 12, 349 [1941]; J. F. Manery u. W. F. Bark, *Amer. J. Physiol.* 132, 215 [1941]; L. B. Flexner u. H. A. Pohl, *J. cellular comparat. Physiol.* 18, 49 [1941]; *Amer. J. Physiol.* 132, 594 [1941]; 134, 344 [1941]; D. M. Greenberg, R. B. Aird, M. D. D. Boelter, W. Campbell, W. E. Cohn u. M. Murayama, *J. biol. Chemistry* 140, Proc. 48 [1941]; R. G. Fowler, I. Thomas, J. F. Bonner u. G. Dessauer, *J. biol. Chemistry* 148, 321 [1943]; W. T. Pommerancke u. P. F. Hahn, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 52, 223 [1943]; C. W. E. Cohn u. A. G. Brenizer, *J. clin. Invest.* 22, 103 [1943]; M. B. Visscher u. Ch. W. Carr, *Amer. J. Physiol.* 142, 27 [1944]; Ch. L. Fox u. A. S. Kester, *Surgery, Gynecol. Obstet.* 80, 561 [1945]; P. B. Reaser u. G. E. Burd, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 63, 543 [1946]; H. v. Euler, U. S. v. Euler u. G. Hevesy, *Acta Physiol. Scand.* 12, 261 [1946]; B. C. Smith u. E. H. Quimby, *Radiology* 45, 335 [1945]; *Ann. Surgery* 125, 360 [1947]; H. H. Ussing, *Nature [London]* 160, 262 [1947]; G. Burch, P. Reaser u. J. Cronvich, *J. lab. clin. Med.* 32, 1169 [1947].

²³⁾ Einige der unter ²²⁾ zitierten Arbeiten befassen sich auch mit Kalium. Ferner: M. Joseph, W. E. Cohn u. D. M. Greenberg, *J. biol. Chemistry* 128, 673 [1939]; G. Hevesy u. L. Hahn, *Kgl. danske Vidensk. Selsk. biol. Medd.* 16, 3 [1941]; R. B. Dean, T. R. Noonan, L. Haeghe, *Amer. J. Physiol.* 132, 474, 612 [1941]; G. Hevesy, *Acta physiol. scand.* 3, 123 [1942].

²⁴⁾ G. Hevesy u. N. Nielsen, *Acta physiol. scand.* 2, 347 [1941].

¹⁶⁾ G. Medes, S. Weinhouse u. N. F. Floyd, *J. biol. Chemistry*, 157, 751 [1945].

¹⁷⁾ R. Sonderhoff u. H. Thomas, *Naturwiss.* 24, 570 [1936]; Liebigs Ann. Chem. 530, 195 [1937].

¹⁸⁾ F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 541, 217 [1939]; 554, 40 [1943]; 558, 47 [1947].

¹⁹⁾ J. C. Abels, J. M. Kenney, L. F. Graver, L. P. Marinelli u. C. P. Rhoads, *Cancer Res.* 1, 771 [1941].

Calcium und Strontium²⁵⁾

Nicht nur die Permeabilität durch Zellwände und Häute kann untersucht werden, auch ein eventueller Austausch der in den festen Strukturen, wie Knochen und Zähnen, vorhandenen Elemente kann leicht festgestellt werden. So hat sich ergeben, daß sowohl das im Knochen enthaltene Calcium als auch das Phosphat fortgesetzt durch mit der Nahrung aufgenommenes ersetzt werden. Bei tragenden Ratten wandert vorher im Knochen fixiertes Radiocalcium in den letzten Tagen der Tragzeit in die Föten und in den ersten Tagen der Lactation in die Milch.

Da Strontium ebenso wie Calcium vorzugsweise im Knochen abgelagert wird und eine passende harte β -Strahlung von 1,5 MeV sowie eine günstige Halbwertszeit von 55 Tagen besitzt, ist es zur Skelettbestrahlung bei Knochentumoren und bei anderen Erkrankungen des Knochensystems, bei denen man sich von den Strahlenwirkungen günstige Ergebnisse verspricht, vorgeschlagen worden.

Leider können Untersuchungen mit Mg, das in der Natur eine bedeutende Rolle als Bestandteil von Pflanzenfarbstoffen und als Aktivator von Fermenten spielt, nicht leicht durchgeführt werden, da das bis jetzt bekannte Radioisotop Mg^{27} eine Halbwertszeit von nur 10,2 min. hat.

Zink, Cobalt und Mangan^{25a)}

Mit radioaktivem Zink wurden bisher nur wenige Studien unternommen, obwohl es ein wichtiges Bioelement ist. Es wurde der Zink-Gehalt von Insulin bestimmt²⁶⁾, das auf verschiedene Weise umkristallisiert worden war, und zu 0,3 bis 0,6% gefunden. Ferner wurde die Ausscheidung von intravenös injizierten Mikromengen bei Mäusen und Ratten verfolgt²⁷⁾. Das Zink sammelte sich in ziemlich großer Menge in den intestinalen Schleimhäuten an und wurde zum größten Teil in den Faeces, zum geringeren Teil im Urin ausgeschieden. In der Leber wurde das Zink vorübergehend in hohen Konzentrationen angesammelt, aber wieder sehr schnell abgegeben. Die beobachtete Verteilung des Zinks stimmt nicht mit derjenigen der bekannten zinkhaltigen Proteine Insulin und Kohlensäure-Anhydratase überein. Mit $Co^{28)}$ und $Mn^{29)}$ wurde ebenfalls die Lokalisierung und Ausscheidung und zwar bei Ratten untersucht. Co wurde hauptsächlich im Urin, Mn jedoch in den Faeces wieder ausgeschieden. Mn wurde hauptsächlich in der Leber gespeichert. Von 10 γ injiziertem Co wurden nach 4 Tagen nur noch 5% in den Geweben gefunden, was zeigt, wie klein der Co-Bedarf der Ratte ist. Co, das bekanntlich die Bildung des roten Blutfarbstoffes stimuliert, ist neuerdings als Bestandteil des Antiperniciosa-Stoffes aus Leber aufgefunden worden³⁰⁾ (Co-haltiges Polypeptid) und dürfte beim Studium dieses Wirkstoffes noch sehr nützlich werden.

Eisen

Dem Eisen kommt unter den Schwermetallen im tierischen Organismus eine ganz besondere Stellung zu, da es einen wesentlichen Bestandteil des roten Blutfarbstoffes und der eisenhaltigen Atmungsfermente (Wurbsches Atmungsferment, Cytochrome), ferner von Katalase und Peroxydase darstellt. Es ist daher nicht verwunderlich, daß man seinen Stoffwechsel schon früher eingehend untersucht hat. Trotzdem gelingt es gerade hier, mit Hilfe des Radioeisens neue Einblicke zu gewinnen. Man kann studieren, welche Faktoren die Resorption von Eisen aus dem Darm regulieren und welche eisenhaltigen Präparate besonders leicht resorbiert werden. (Hunde resorbieren Fe^{2+} und Fe^{3+} gleich gut, bei Menschen wird Fe^{2+} besser resorbiert³¹⁾).

²⁵⁾ W. W. Campbell u. D. M. Greenberg, Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 26, 176 [1940]; Ch. Pecher, J. appl. Physics 12, 318 [1941]; Proc. Soc. exp. Biol. Med. 46, 86 [1941]; Ch. Pecher u. J. Pecher, ebenda 46, 91 [1941]; D. M. Greenberg, J. appl. Physics 12, 318 [1941]; A. Treadwell, B. V. A. Low-Beer, H. L. Friedell u. J. H. Lawrence, J. med. Sci. 204, 521 [1942].

^{25a)} C. L. Comar, Nucleonics 3, 30 [1948].

²⁶⁾ E. J. Cohn, J. D. Ferry, J. J. Livingood u. M. H. Blanchard, J. Amer. chem. Soc. 63, 17 [1941]; Science [New York] 90, 183 [1939].

²⁷⁾ G. E. Shelin, I. L. Chaikoff, H. B. Jones u. M. L. Montgomery, J. biol. Chemistry 147, 409 [1943]; 149, 139 [1943]; J. exp. Medicine 78, 151 [1943].

²⁸⁾ D. H. Copp u. D. M. Greenberg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 27, 153 [1941]; C. L. Comar u. G. K. Davis, J. biol. Chemistry 170, 379 [1947].

²⁹⁾ H. J. Born, H. A. Timofeeff-Ressovsky u. P. M. Wolf, Naturwiss. 31, 246 [1943]; D. M. Greenberg u. W. W. Campbell, Proc. nat. Acad. Sci. USA 26, 448 [1940]; D. M. Greenberg, J. appl. Physics 12, 318 [1941].

³⁰⁾ E. L. Smith, Nature [London] 162, 144 [1948]; E. L. Rickers et al., Science 108, 398, 634 [1948].

³¹⁾ C. V. Moore, R. Dubach, V. Minnich u. H. K. Roberts, J. Clin. Invest. 23, 755 [1944].

Von den bisher erzielten Ergebnissen³²⁾ sei nur folgendes berichtet. Bei einem durch teilweise Entblutung anämisch gemachten Tier ging die Eisenresorption aus dem Darm von der normalen Höhe von 2% nicht ab. Erst als der normale Hämoglobinspiegel des Blutes auf Kosten der anderen Eisen-Vorräte des Körpers wiederhergestellt war, ergab sich bei einem erneuten Resorptionsversuch, daß nunmehr 10% der Eisenmenge resorbiert wurden. Offenbar ist der Eisenspiegel in den Geweben maßgeblich für die Höhe der Eisenresorption³³⁾.

Diese Beobachtungen bei der Eisenresorption stehen im Gegensatz zu den Befunden bei anderen anorganischen Ionen, bei denen der normale physiologische Spiegel zwar gehalten wird, es findet aber eine fortgesetzte Resorption und Ausscheidung statt, wobei Austausch mit den bereits im Organismus vorhandenen Molekeln der gleichen Art stattfindet.

Es hat sich ferner ergeben, daß Eisen, das aus roten Blutkörperchen durch normalen Zerfall oder durch Einwirkung von Acetyl-phenylhydrazin in Freiheit gesetzt wird, beim Neuaufbau von Erythrocyten vor dem übrigen, im Körper vorhandenen Eisen bevorzugt wird.

Bei einer Gruppe von 176 Schulkindern im Alter von 7–10 Jahren wurde zum ersten Male ein Großversuch mit radioaktiven Indikatoren gemacht und zwar wurde die Eisenresorption bestimmt. Von 2–3 mg Fe wurden 7,7 bis 17,5% resorbiert. Die benötigte mittlere tägliche Eisenmenge bei Kindern dieser Altersgruppe wurde zu 2,3–3,8 mg berechnet³⁴⁾.

Auch über die Rolle des Ferritins haben Untersuchungen mit radioaktivem Eisen Klarheit gebracht³⁵⁾. Das von Laufberger 1937 aufgefundene Ferritin kann bis zu 23% Eisen binden und stellt somit das Eisenreservoir des Körpers dar. Es wurde aus Milz, Leber, Knochenmark und Darmschleimhaut isoliert. Das Ferritin kann reversibel in Apoferritin und Eisen(II)-hydroxyd gespalten werden. Zunächst wurde festgestellt, daß das Eisen aus zerfallenen Erythrocyten auch im Ferritin zu finden ist. Ferner konnte folgender Mechanismus für die Eisenresorption und Lagerung wahrscheinlich gemacht werden: Im Darm wird das Eisen(III)-Ion zunächst zu Eisen(II)-Ion reduziert, dann wird es von den Schleimhautzellen des Duodenums und Jejunums resorbiert. Durch das resorbierte Eisen wird eine vermehrte Bildung von Apoferritin stimuliert, worauf es als Ferritin gelagert wird. Die Resorption des Eisens wird durch ein Gleichgewicht zwischen Ferritin, Plasmaeisen und Eisen(II)-Ionen in der Mucosa (Schleimhaut) reguliert, wobei die Konzentration des letzteren von Redoxgleichgewichten abhängig ist.

Beim Eisen hat man zwei Isotope, nämlich Fe^{55} ($t/2 = 4$ Jahre) und Fe^{59} ($t/2 = 47$ Tage) zur Verfügung, die sich durch die Härte ihrer ausgesandten Strahlung wesentlich unterscheiden. Man kann sie daher leicht nebeneinander bestimmen und so mit verschiedenartig indiziertem Eisen arbeiten.

Kupfer³⁶⁾

Beim Kupfer ist schon lange seine Mitwirkung bei der Bildung des roten Blutfarbstoffes bekannt, ferner ist es in zahlreichen Fermenten zu finden, auch bei der Bildung der eisenhaltigen Fermente scheint es eine Rolle zu spielen. Da das Kupfer zu den schon in Spuren wirksamen Elementen gehört, kann sein normaler

³²⁾ P. F. Hahn, W. F. Bale, E. O. Lawrence u. G. H. Whipple, J. exp. Medicine 69, 739 [1939]; P. F. Hahn, W. F. Bale, R. A. Hettig, M. D. Kamen u. G. H. Whipple, ebenda 70, 443 [1939]; P. F. Hahn, J. F. Ross, W. F. Bale u. G. H. Whipple, ebenda 71, 731 [1940]; M. E. Austoni u. D. M. Greenberg, J. biol. Chemistry 134, 27 [1940]; L. A. Erf, L. W. Tuttle u. K. G. Scott, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 45, 652 [1940]; P. F. Hahn, W. M. Balfour, J. F. Ross, W. F. Bale u. G. H. Whipple, Science [New York] 93, 87 [1941]; W. O. Cruz, P. F. Hahn u. W. F. Bale, Amer. J. Physiol. 135, 585 [1942]; P. F. Hahn, W. F. Bale u. W. M. Balfour, ebenda 135, 600 [1942]; P. F. Hahn u. W. F. Bale, ebenda 136, 314 [1942]; P. F. Hahn, J. F. Ross, W. F. Bale, W. M. Balfour u. G. H. Whipple, J. exp. Med. 75, 221 [1942]; W. M. Balfour, P. F. Hahn, W. F. Bale, W. T. Pommeranke u. G. H. Whipple, ebenda 76, 15 [1942]; P. F. Hahn, J. F. Ross, W. F. Bale, W. M. Balfour u. G. H. Whipple, ebenda 78, 169 [1943]; D. H. Copp u. D. M. Greenberg, J. biol. Chemistry 164, 377, 389 [1946].

³³⁾ P. F. Hahn u. G. H. Whipple, J. appl. Physics 12, 314 [1941].

³⁴⁾ W. J. Darby, P. F. Hahn, M. M. Maser, R. C. Steinkamp, P. M. Daisen u. M. B. Cook, J. Nutrition 33, 107 [1947].

³⁵⁾ Zusammenfassung bei S. Granick, Chem. Rev. 38, 379 [1946]; V. Laufberger, Bull. Soc. Chim. biol. 19, 1575 [1937]; R. Kuhn u. L. Birkofer, Ber. dtsh. chem. Ges. 73, 823 [1940]; P. Hahn, S. Granick, W. Bale u. L. Michaelis, J. biol. Chemistry 150, 407 [1943].

³⁶⁾ M. O. Schultze u. S. J. Simmons, J. appl. Physics 12, 315 [1941]; D. Mazia u. L. J. Mullins, Nature [London], 147, 642 [1941]; H. Yoshikawa, P. F. Hahn u. W. F. Bale, J. exp. Medicine 75, 489 [1942]; M. O. Schultze u. S. J. Simmons, J. biol. Chemistry 142, 97 [1942]; G. Schubert u. W. Riezler, Klin. Wschr. 24/25, 304 [1947] (vgl. diese Ztschr. 59, 252 [1947]).

Stoffwechsel nur mit Hilfe des Radio-Kupfers untersucht werden. Es ist festgestellt worden, daß es vorzugsweise in Leber, Niere und Knochenmark geht, ferner wandert es auch schnell in die Erythrocyten des Blutes ein.

Phosphor

Wegen seiner großen biologischen Bedeutung, seiner angenehmen Halbwertszeit von 14,30 Tagen und seiner leichten Zugänglichkeit stellt P^{32} ein viel verwendetes Radioelement dar. Über seine Anwendungen liegt ein besonders umfangreiches Schrifttum vor³⁷⁾. Es seien folgende Anwendungsmöglichkeiten und Ergebnisse herausgegriffen.

a) Resorptions- und Verteilungsstudien von Phosphat bei Pflanze und Tier³⁸⁾.

Es wurde gefunden, daß Phosphat, ebenso wie andere anorganische Salze, bei Weiden im Xylem aufwärts wandern³⁹⁾. Bei Sonnenblumen war nach dem Einbringen der Pflanzen in die indizierte Phosphatlösung das Phosphat sowohl in den neu gebildeten Blättern wie auch in den alten zu finden⁴⁰⁾. Bei Ratten, ebenso beim Menschen wurden Absorptions- und Retentionsstudien gemacht, wobei sich ergab, daß der Grad der Resorption von der Diät abhängig war. Am meisten Radio-P wurde zurückbehalten, wenn das Phosphat injiziert wurde. Phosphat-Ionen-Austausch zwischen der umgebenden Lösung und dem Phosphat der Hefezelle, das meist organisch gebunden ist, findet nicht statt. Offenbar nimmt nur die wachsende Hefezelle Phosphat auf⁴¹⁾.

b) Austauschreaktionen zwischen anorganischen Phosphat und organischen Phosphorsäureestern.

Wie zu erwarten war, tauscht Phosphat mit Phosphorsäureestern, wie Glycerinphosphorsäure, Nucleinsäuren, Adenylsäure u. dgl. beim Stehen in wäßriger Lösung nicht aus.

Auch zum Studium von Umesterungen von Phosphorsäureestern innerhalb der gleichen Molekel, wie bei der enzymatischen Umlagerung von Glucose-1-phosphat in Glucose-6-phosphat wurde Radio-P herangezogen. In diesem Falle findet kein Austausch mit zugesetztem anorganischem Phosphat statt, d. h. die Umesterung ist eine intramolekulare Umlagerung. Die gleiche Beobachtung wurde bei der Umlagerung von β -Glycerophosphat, sei es durch Säure oder Schweinenierenphosphatase gemacht⁴²⁾.

c) Phosphatstoffwechsel³⁸⁾.

Während, wie unter b) angegeben, zwischen Phosphat und Phosphorsäureestern kein Austausch stattfindet, wird *in vivo* ein Einbau von Phosphat in organische Bindung festgestellt, was auf direkte Synthese zurückzuführen ist. Bei Versuchen mit Katzen hat sich gezeigt, daß nach Verabfolgung einer sehr kleinen Menge Radio-Phosphat der Eintritt in Phosphorsäureester-Bindung am schnellsten in der Leber, im Darm und im Muskel erfolgt, während der Einbau in die Gehirnzellen und in die festen Strukturen langsamer vor sich geht. Die Aufnahme von Radio-Phosphat durch die verschiedenen Abschnitte des zentralen und

peripheren Nervensystems wurde neuerdings eingehend von F. Roeder untersucht⁴³⁾.

Da die Knochen mengenmäßig einen großen Teil des Tieres ausmachen und der Austausch nur langsam erfolgt, findet man nach langen Versuchszeiten hier die meiste Aktivität. Auch in den Zähnen reichert sich Radio-P an und zwar schneller in den inneren Teilen als im Schmelz⁴⁴⁾. Der Austausch von säurelöslichem Phosphat im Serum des Frosches mit solchem in der Muskelzelle ist sehr langsam, der Austausch in der Muskelzelle selbst ist jedoch ein schnell verlaufender Vorgang.

Läßt man eine an Tabakmosaikvirus erkrankte Tabakpflanze Radio-Phosphat aufnehmen⁴⁵⁾, so wird es in die Nucleoprotein-Molekel des Virus eingebaut. Da die normalen Proteine der Tabakpflanze niemals einen höheren Radio-P-Gehalt aufwiesen als die Virus-Molekel, kann geschlossen werden, daß dieses nicht aus den Nucleoproteinen der Pflanze, sondern direkt aufgebaut wird.

d) Phospho-Proteine; Antigen-Antikörper Reaktion.

Im Casein der Ziegenmilch konnte Radio-P bereits wenige Stunden nach der Verabfolgung von Radio-Phosphat nachgewiesen werden. Injizierte man Hühnern Radio-Phosphat, so fand man insbesondere in den nach einigen Tagen gelegten Eiern reichlich Radio-P im Vitellin und Lipo-vitellin. Diese beiden Radio-P-haltigen Proteine wurden zum Studium der Antigen-Antikörper-Reaktion herangezogen⁴⁶⁾.

e) Phospholipide⁴⁷⁾.

Nach der Verabfolgung von indiziertem Phosphat an verschiedene Tierarten findet auch ein Einbau in die Phospholipide statt. Da kein direkter Austausch zwischen den isolierten Verbindungen vor sich geht, wird hierdurch gezeigt, daß auch die Phospholipide im Organismus in einem dynamischen Gleichgewicht stehen. Überall dort, wo das anorganische Phosphat schnell hingelangt, findet auch ein schneller Einbau in die Phosphatide statt, insbesondere im Dünndarm, in der Leber, Niere und im Blut, langsamer Einbau wird im Gehirn beobachtet. In den Lecithin- und Kephalin-Fractionen wird die Hauptaktivität gefunden. Die im Plasma vorhandenen Phospholipide stammen hauptsächlich aus der Leber, jedoch können Niere und Darm sie auch aufbauen, wie sich aus Versuchen mit hepatektomierten Hunden ergab⁴⁸⁾.

Obwohl in Leber- und Nierenschnitten eine fortgesetzte Abnahme der Phospholipide stattfindet, kann trotzdem mit indiziertem Phosphat gezeigt werden, daß auch unter diesen Bedingungen eine Synthese stattfindet, aber nur dann, wenn gleichzeitig zur Deckung des Energiebedarfes der Phospholipid-Synthese Sauerstoff-Aufnahme stattfindet⁴⁹⁾.

Der Phospholipid-Stoffwechsel von Tumoren⁵⁰⁾ ist nach

³⁷⁾ Zusammenfassungen bei: J. K. Parnas, *Bull. Soc. Chim. biol.* 21, 1059 [1939]; O. Meyerhof, ebenda 21, 1094 [1939]; G. Hevesy, *Ann. Rev. Biochemistry* 9, 641 [1940] u. *Enzymologia* 5, 138 [1938].

³⁸⁾ Vgl. 37); ferner: A. Artom, G. Sarzana, C. Perrier, M. Santangelo u. E. Segre, *Chem. Zbl.* 1937, 11, 1036 (*Ric. sci. Progr. tecn. Econ. naz.* (2) 8, 1, 216 [1937]); *Arch. int. Physiol.* 47, 245 [1938]; E. Chargaff, *J. biol. Chemistry* 123, 587 [1939]; W. E. Cohn u. D. M. Greenberg, ebenda 128, 116 [1939]; G. Hahn, L. Hahn u. O. Rebbe, *Kgl. danske Vidensk. Selsk. biol. Medd.* 14, 3 [1939]; W. E. Cohn u. D. M. Greenberg, *J. biol. Chemistry* 130, 625 [1939]; B. V. A. Low-Beer, J. H. Lawrence u. R. S. Stone, *Radiology* 39, 573 [1942]; N. Shimotori u. A. F. Morgan, *J. biol. Chemistry* 147, 201 [1943]; J. Roche, *Presse méd.* 52, 50 [1944]; J. L. Bollmann u. E. V. Flood, *Amer. J. Physiol.* 144, 437 [1945]; E. G. Johannsson, M. Falkenheim u. H. C. Hodge, *J. biol. Chemistry* 159, 129 [1945]; K. G. Scott, *Cancer Res.* 5, 365 [1945]; D. C. Posin, *Proc. Montana Acad. Sci.* 3, 4, 10 [1942/43]; H. Allen, L. H. Hempelmann, N. C. Womack, *Cancer Res.* 5, 239 [1945]; A. Marshak u. A. C. Walker, *Amer. J. Physiol.* 143, 226 [1945]; P. F. Hahn, W. D. Donald, R. C. Grier, ebenda 143, 105 [1945]; N. O. Kaplan u. D. M. Greenberg, *J. biol. Chemistry* 156, 511 [1944]; O. Lindberg, *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* 21 B, Nr. 3, 1 [1945]; K. Schmidt-Nielsen, *Acta Physiol. Scand.* 12, Suppl. 37, 83 [1946]; W. S. Wilde, D. B. Corbie u. L. B. Flexner, *Amer. J. Physiol.* 147, 360 [1946]; M. Falkenheim, W. F. Neuman u. H. C. Hodge, *J. biol. Chemistry* 169, 713 [1947].

³⁹⁾ P. R. Stout, D. R. Hoagland, *Amer. J. Botany* 26, 320 [1939]; F. G. Gustavson u. M. Darken, ebenda 24, 615 [1937].

⁴⁰⁾ G. Hevesy, K. Linderstroem-Lang u. C. Olsen, *Nature* [London] 139, 149 [1937].

⁴¹⁾ G. Hevesy, K. Linderstroem-Lang u. N. Nielsen, *Nature* [London] 140, 725 [1937]; S. Spiegelman u. M. D. Kamen, *Science* [New York] 104, 585 [1946].

⁴²⁾ E. Chargaff, *J. biol. Chemistry* 144, 455 [1942].

⁴³⁾ F. Roeder: P^{32} im Nervensystem. Der Phosphataustausch des Nervensystems untersucht mit Hilfe der Isotopenmethoden. Muster-Schmidt Göttingen 1948, vgl. *Naturwiss.* 33, 111 [1947]; H. Schachner, B. A. Fries u. I. L. Chaikoff, *J. biol. Chemistry* 146, 95 [1942].

⁴⁴⁾ W. E. Cohn u. D. M. Greenberg, *J. biol. Chemistry* 130, 625 [1939]; H. J. Born, *Naturwiss.* 28, 476 [1940].

⁴⁵⁾ H. J. Born, A. Lang, G. Schramm u. K. G. Zimmer, *Naturwiss.* 29, 222 [1941]; G. Schramm, H. L. Born u. A. Lang, ebenda 30, 170 [1942]; H. J. Born, A. Lang u. G. Schramm, *Arch. ges. Virusforsch.* 2, 461 [1943].

⁴⁶⁾ G. E. Francis u. A. Wormall, *Bioch. J.* 42, 649 [1948]; J. C. Boursnell, H. M. Davy, G. E. Francis u. A. Wormall, *Nature* [London] 160, 339 [1947]; *Biochem. J.* 42, XLII [1948].

⁴⁷⁾ Zusammenfassung bei I. L. Chaikoff, *Physiol. Rev.* 22, 291 [1942]; ferner: D. B. Zilversmit, C. Enteman u. C. M. Fishler, *J. gen. Physiol.* 26, 325 [1943]; J. M. Patterson, N. B. Keevil u. E. L. MacHenry, *J. biol. Chemistry* 153, 489 [1944]; L. Hahn u. H. Tyren, *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* 21, Nr. 11, 1 [1945]; C. Enteman, I. L. Chaikoff u. H. D. Friedlander, *J. biol. Chemistry* 162, 111 [1946]; C. Artom u. W. E. Carnaker, ebenda 165, 393 [1946]; C. Enteman, I. L. Chaikoff u. D. B. Zilversmit, ebenda 166, 15 [1946].

⁴⁸⁾ M. C. Fishler, C. Enteman, M. L. Montgomery u. I. L. Chaikoff, *J. biol. Chemistry* 150, 47 [1943].

⁴⁹⁾ M. C. Fishler, A. Taurog, I. Perlman u. I. L. Chaikoff, ebenda 141, 809 [1941].

⁵⁰⁾ W. E. Cohn u. D. M. Greenberg, *J. biol. Chemistry* 123, 185 [1938]; H. B. Jones, I. L. Chaikoff u. J. H. Lawrence, ebenda 128, 631 [1939]; J. H. Lawrence u. K. G. Scott, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 40, 694 [1939]; E. Adler u. H. v. Euler, *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* 13, A Nr. 26 [1940]; J. M. Kenney, L. D. Marinelli u. H. O. Woodward, *Radiology* 37, 683 [1941]; T. B. Kohman u. H. P. Rusch, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 46, 403 [1941]; L. A. Erf u. J. H. Lawrence, *J. Clin. Invest.* 20, 567 [1942]; *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 46, 694 [1941]; L. A. Erf, L. W. Tuttle u. J. H. Lawrence, *Ann. intern. Med.* 15, 487 [1941]; L. A. Erf, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 47, 287 [1941]; J. M. Kenney, *Cancer Res.* 2, 130 [1942]; G. Hevesy, H. v. Euler, *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* 15 A, Nr. 15 [1942]; J. G. Hamilton, *Radiology* 39, 541 [1942]; A. Treadwell, B. V. A. Low-Beer, H. L. Friedell u. J. H. Lawrence, *Amer. J. Med. Sci.* 204, 521 [1943]; S. Warren, *Cancer Res.* 3, 334 [1943]; A. Fassberg u. F. Jacobsson, *Acta Radiol.* 20, 523 [1945]; J. Grundland u. H. Bulliard, *C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées* 140, 976 [1946]; A. Fassberg, *Acta Radiol.* 27, 88 [1946].

zahlreichen Untersuchungen dadurch gekennzeichnet, daß ein schnellerer Einbau von Phosphat stattfindet und daß auch mehr Phosphat zurückgehalten wird als in anderen Geweben. In die Nucleoproteine der Tumoren geht P^{32} etwas schneller als in die Phospholipide.

f) Intermediärer Kohlehydratstoffwechsel⁵¹⁾.

Beim Zuckerabbau durch Gärung oder Glykolyse spielen Phosphorsäureester eine entscheidende Rolle. Fortgesetzt finden dabei Phosphorylierungen, Umphosphorylierungen und Entphosphorylierungen statt, die z. T. energetisch mit Dehydrierungsreaktionen gekoppelt sind. Schon 1938 wurden die ersten Untersuchungen mit radioaktivem Phosphat durchgeführt. Man stellte zunächst durch enzymatische Synthese die folgenden radioaktiven Phosphorsäureester dar: Hexosemonophosphat, Hexosediphosphat, Glycerinphosphorsäure, Adenosintriphosphat, um mit ihnen Teilreaktionen der Gärung und Glykolyse in zellfreien Medien zu studieren. Es konnte so sichergestellt werden, daß von der Adenosintriphosphorsäure eine Phosphorsäure-Molekel auf das Fructose-6-phosphat übertragen wird unter Bildung von Fructose-1,6-diphosphat.

Bei der in Muskelpreßsäften studierten Reaktion: 2 Triosephosphat + 2 Brenztraubensäure + 1 Adenylsäure \rightleftharpoons 2 Phosphoglycerinsäure + 2 Milchsäure + Adenosintriphosphat wurde entsprechend der Formulierung als Gleichgewichtsreaktion schließlich Radioaktivität in allen Phosphorsäureestern gefunden, nachdem von Radio-Phosphat ausgegangen worden war⁵²⁾.

Die Glykolyse selbst wurde ebenfalls mit radioaktivem Phosphat studiert. Doch zeigen die ersten Arbeiten dieser Art, daß man auch leicht zu falschen Ergebnissen gelangen kann, wenn nicht alle Umstände sorgfältig beachtet werden⁵³⁾. Es wurde radioaktives Phosphat in den Muskel injiziert. Aus der beobachteten Phosphor-Verteilung wurde der Schluß gezogen, daß die Milchsäure-Bildung im Muskel nicht über phosphorylierte Zwischenstufen verlaufe. Das war jedoch nicht richtig. Wie spätere Untersuchungen zeigten⁵⁴⁾, wandert das Phosphat nur langsam in die Muskelzellen ein. Die Aktivität in den Muskelzellen ist also sehr klein, verglichen mit der des umgebenden Mediums. Durch sorgfältiges Auswaschen des nicht in die Zellen gelangten Phosphats konnte dieses restlos entfernt werden und dann erst wurde die Radio-P-Verteilung in den Muskelzellen selbst bestimmt. Anorganisches Phosphat, Phosphokreatin und Pyrophosphat hatten alle sehr ähnliche Aktivitäten, wodurch die Gültigkeit der Formulierung des Glykolyse-Verlaufs über phosphorylierte Zwischenstufen im Sinne von *Embden-Meyerhof* bestätigt wurde.

Von großer Wichtigkeit ist die mit Hilfe von Radio-P gemachte Beobachtung der Reversibilität der Reaktion: Brenztraubensäure + Adenosintriphosphat \rightleftharpoons Phosphoenolbrenztraubensäure + Adenosindiphosphat.

Bis zum Erscheinen dieser Arbeit⁵⁵⁾ wurde der Zerfall der Phosphoenolbrenztraubensäure für irreversibel gehalten.

Arsen⁵⁶⁾

Beim Arsen interessiert in erster Linie der Transport und die Verteilung, weil es als Bestandteil bedeutender Heilmittel wichtig ist. Bisher sind nur wenige Untersuchungen durchgeführt worden. Beim Kaninchen werden kleine Mengen Arseniat vorzugsweise in Leber und Niere festgehalten, im Gehirn war die erreichte Konzentration sehr klein. Es wurde schnell im Urin ausgeschieden. Bei Ratten wurde die höchste As-Konzentration im Blut beobachtet. Beim Menschen wurden von einer 1,5 mg Dosis in den ersten 24 h bereits wieder 50% ausgeschieden.

⁵¹⁾ J. K. Parnas, *Enzymologia* 5, 166 [1938]; G. Hevesy, T. Baranowski, A. J. Guthke, P. Ostin u. J. K. Parnas, *Acta Biol. exp. [Varsovie]* 12, 34 [1938]; J. K. Parnas, *Bull. Soc. Chim. biol.* 21, 1059 [1939].

⁵²⁾ O. Meyerhof, P. Ohlmeyer, W. Gentner u. H. Maier-Leibnitz, *Biochem. Z.* 298, 396 [1938].

⁵³⁾ J. Sachs, *Amer. J. Physiol.* 129, 227 [1940]; J. L. Bollman u. E. V. Flock, *J. biol. Chemistry* 147, 155 [1943].

⁵⁴⁾ G. Hevesy, *J. Chem. Soc. [London]* 1939, 1213; H. M. Kalckar, J. Dehlinger u. A. Mehler, *J. biol. Chemistry* 154, 275 [1941]; R. F. Furchgott u. E. Shorr, *ebenda* 151, 65 [1943].

⁵⁵⁾ H. A. Lardy u. J. A. Ziegler, *J. biol. Chemistry* 159, 343 [1945].

⁵⁶⁾ T. F. Hunter u. A. F. Kipp, *J. appl. Physics* 12, 324 [1941]; L. B. Norton u. R. Hansberry, *J. econ. Entomol.* 34, 431 [1941]; H. J. Born u. H. Timofeff-Ressovsky, *Naturwiss.* 29, 182 [1941]; O. DuPont, I. Ariel u. S. Warren, *J. appl. Physics*, 12, 324 [1941]; P. Sée, *J. chim. physique Physico-Chim. biol.* 40, 17 [1943].

Fluor, Chlor, Brom und Jod

Mit den Halogen-Ionen von $F^{57)}$, $Cl^{58)}$ und $Br^{59)}$ wurden ähnliche Verteilungsstudien unternommen wie mit den Alkalien. Für die direkte Gewebestrahlung wurden einige Farbstoffe synthetisiert, die radioaktive Halogene enthalten, z. B. das Dibromtrypanblau, ein Dis-azofarbstoff⁶⁰⁾. Das Schicksal von Radio- Cl_2 nach der Einatmung durch Mäuse wurde untersucht⁶¹⁾.

Es ist im allgemeinen Teil schon erwähnt worden, daß mit Radio-Jod sehr schön die Anreicherung von Jod in der Schilddrüse gezeigt werden kann. Eine große Zahl von Arbeiten⁶²⁾ sind der genauen Untersuchung dieses Vorgangs gewidmet worden. Als bald nach der Verabfolgung erscheint das Jod in der Schilddrüse in organischer Bindung und zwar hat das Dijodtyrosin eine höhere spezifische Aktivität als das Thyroxin. Durch thyreotropes Hormon hyperaktiv gemachte Schilddrüsen sind aktiver in der Aufnahme von Jod als normale, während Thiouracil die Bildungsgeschwindigkeit von Dijodtyrosin und Thyroxin herabsetzte. Auch in Schilddrüsenkarzinom-Metastasen tritt das Radio-Jod vorzugsweise ein⁶³⁾.

Die Bildung von Dijodtyrosin durch Schnitte von Schafschilddrüse wird verhindert, wenn gleichzeitig die Cytochromoxydase durch Azid, H_2S , Cyanid oder CO gehemmt wird, ein Zeichen, daß die Überführung von Jod in organische Bindung an das gleichzeitige Abfließen von Oxydationsvorgängen gebunden ist⁶⁴⁾. Außer der Konzentrierung von Jod in der Schilddrüse durch Übergang in organische Bindung gibt es offenbar auch noch andere Mechanismen (Konzentrierung in anorganischer Form⁶⁵⁾), wie sich insbesondere an propylthiouracil-behandelten Ratten zeigt.

Bei Ratten, denen die Schilddrüse entfernt worden ist, findet trotzdem eine (allerdings geringe) Synthese von Dijodtyrosin und Thyroxin statt⁶⁶⁾. Es wurden trägerfreie Mengen an radioaktivem Jodid gegeben. Die Abwesenheit von thyreoidem Gewebe im Hals und in den mediastinalen Bezirken wurde durch Radioautographien sichergestellt. Die Entfernung der Hypophyse bei schon thyreoektomierten Ratten hatte keinen Einfluß auf die Bildung von Dijodtyrosin und Thyroxin an den neuen, noch nicht näher bekannten Bildungsstätten. Schon 24–96 h nach der Radio-J-Gabe waren 30% als organisch gebundenes Jod im Dünndarm und in der Leber zu finden.

Schwefel

Aus der Gruppe der Untersuchungen mit Radio-Schwefel (S^{35}) seien einige besonders schöne Beispiele herausgegriffen.

Am Aneurin (Vitamin B_1) wurde untersucht, ob es im menschlichen Organismus oxydiert wird. Bei den kleinen in Frage kommenden Mengen würde der übrige Schwefel-Stoffwechsel den des Aneurins bei gewöhnlichen Analysemethoden vollkommen überdecken. Es wurde daher mit S^{35} indiziertes Aneurin verwandt⁶⁷⁾. Von 8 injizierten mg wurden von einem gesunden Menschen etwa 15% des Schwefels als anorganisch gebundener Schwefel im Urin wieder ausgeschieden. Es ergab sich ferner, daß das injizierte Vitamin schon im Körper vorhandenes verdrängt, denn das im Urin ausgeschiedene hatte eine geringere Aktivität als das injizierte. Selbst nach 36 Tage langer B_1 -freier Kost wurde diese Beobachtung noch gemacht.

Auch das Penicillin wurde mit radioaktivem Schwefel indiziert⁶⁸⁾, indem man den Penicillium-Kulturen radioaktives Sulfat zusetzte. Mit so erhaltenem Penicillin wurde untersucht,

⁵⁷⁾ J. F. Volker, R. F. Sognaes u. B. H. Bibby, *Amer. J. Physiol.* 132, 707 [1941].

⁵⁸⁾ J. F. Manery, *Amer. J. Physiol.* 129, 417 [1940]; P. K. Smith, A. J. Eisman u. A. W. Winkler, *J. biol. Chemistry* 141, 555 [1941]; J. Ch. Wang, *J. gen. Physiol.* 31, 259 [1948].

⁵⁹⁾ I. Perlman, M. E. Morton u. I. L. Chaikoff, *Amer. J. Physiol.* 134, 107 [1941]; J. Hamilton, *ebenda* 124, 667 [1938].

⁶⁰⁾ L. H. Tobin u. F. D. Moore, *J. clin. Invest.* 22, 155 [1943].

⁶¹⁾ H. J. Born u. H. Timofeff-Ressovsky, *Naturwiss.* 28, 253 [1940].

⁶²⁾ Zusammenfassung bei F. R. Keatin, *Amer. J. med. Sci.* 213, 628–31 [1947].

⁶³⁾ A. S. Keston, R. P. Ball, V. Frank u. W. Palmer, *Science [New York]* 95, 362 [1942]; L. D. Marinelli, F. W. Foote, R. F. Hill u. A. F. Hoeker, *Amer. J. Roentgenol. Radiation Therapy* 58, 17 [1947].

⁶⁴⁾ H. Schächner, A. L. Franklin u. I. L. Chaikoff, *J. biol. Chemistry* 151, 191 [1943].

⁶⁵⁾ A. Taurag, I. L. Chaikoff u. D. D. Feller, *ebenda* 171, 189 [1947].

⁶⁶⁾ M. E. Morton, I. L. Chaikoff, O. Reinhardt u. E. Anderson, *J. biol. Chemistry* 147, 757 [1943].

⁶⁷⁾ H. Borsook, J. H. Hatcher u. D. M. Jost, *J. appl. Physics* 12, 325 [1941].

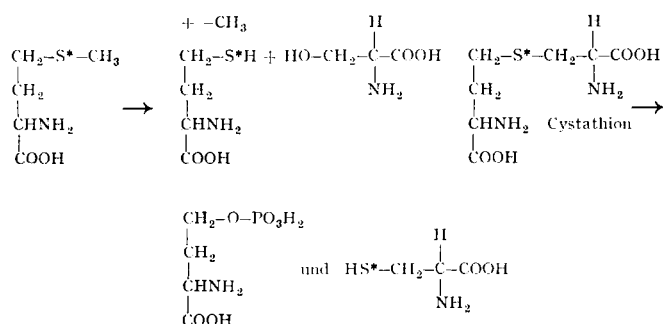
⁶⁸⁾ S. F. Howell, J. D. Tayer u. X. Labow, *Science [New York]*, 107, 299 [1948]; D. Rowley, J. Miller, S. Rowlands u. E. Lester-Smith, *Nature [London]* 161, 1009 [1948].

wieviele Penicillin-Moleküle von einem Bakterium aufgenommen werden müssen, damit es sich nicht mehr vermehrt. Es ergab sich, daß es, falls eine Aufnahme überhaupt stattfindet, weniger als 10 Penicillin-Moleküle pro Bakterienzelle sind. Die Radioaktivität des verwandten Penicillins erlaubte eine Erfassung von 0,004 l. E. mit einer Genauigkeit von $\pm 5\%$.

Um die Reaktion lost-ähnlicher Verbindungen mit Proteinen besser studieren zu können, wurden sie mit S^{35} indiziert⁶⁹).

Von den schwefelhaltigen Aminosäuren sind Methionin und Cystein unentbehrliche Bestandteile der Nahrung, letzteres aber nur, wenn kein Methionin gegeben wird. Nach dieser und anderen Beobachtungen lag es nahe, die Bildung von Cystein aus Methionin anzunehmen, was mit S^{35} bewiesen werden konnte. Nach Gaben von S^{35} -Methionin ließ sich radioaktives Cystin aus den Haaren und der Haut der als Versuchstiere dienenden Ratten isolieren⁷⁰).

Der Übergang des Methionins in Cystein findet nicht etwa so statt, daß das Methionin von der Seite der Carboxyl-Gruppe her verkürzt wird, sondern auf folgende Weise: Methionin wird zu Homocystein entmethyliert, die Methyl-Gruppe wird zu Um-methylierungsreaktionen verbraucht⁷¹). Das Homocystein setzt sich mit Serin zu Cystathion um. Schließlich wird das Cystathion in Cystein und wahrscheinlich Phosphohomoserin gespalten⁷²). Mit einem Ferment aus Leber + Adenosintriphosphat und



Mg- oder Zn-Ionen gelang auch *in vitro* die Spaltung von Cystathion. Daß die C-Kette des Methionins nicht in diejenige des Cysteins eingeht, konnte von du Vigneaud⁷³) mit Hilfe des doppelindizierten Methionins $\text{H}_3\text{C}\cdot\text{S}^{35}\cdot\text{C}^{13}\text{H}_2\cdot\text{C}^{13}\text{H}_2\cdot\text{CHNH}_2\cdot\text{COOH}$ gezeigt werden. In dem aus den Haaren isolierten Cystin waren 80% S^{35} , aber nur Spuren von C^{13} enthalten.

Von Ratten kann auch Sulfid-Schwefel, allerdings nur in kleinem Umfange verwendet werden. Nach Verfütterung von Brombenzol wurde radioaktive Mercaptursäure ausgeschieden und auch aus Haaren, Haut, Leber und Skelettmuskel ließ sich radioaktives Cystin gewinnen⁷⁴). Die Hauptmenge des Sulfids wurde zu Sulfat oxydiert.

Die mit N^{15} gemachte Entdeckung des dynamischen Gleichgewichtszustandes der Proteine im Tierkörper konnte mit S^{35} bestätigt werden. Man ließ die Tiere fasten und gab ihnen dann eine minimale Menge S^{35} -Methionin. Dieses wurde in die Proteine von Darmschleimhaut, Niere, Plasma, Milz und Gehirn eingebaut⁷⁵) und zwar mit abnehmender Geschwindigkeit in der angegebenen Reihenfolge.

Der tierische Organismus kann Schwefel in elementarer Form, als Sulfid oder Sulfat nicht in organische Bindung überführen, dagegen können Pflanzen Sulfid und Sulfat verwerten. Wenn organisch gebundener Schwefel aus den Blättern in die Wurzeln oder Samen transportiert wird, soll er vorübergehend in Sulfat übergehen^{75b}).

⁶⁹) J. L. Wood, J. R. Rachele, C. M. Stevens, F. H. Carpenter u. V. du Vigneaud, J. Amer. Chem. Soc. 70, 2547 [1947].

⁷⁰) H. Tarver u. C. L. A. Schmidt, J. biol. Chemistry 130, 67 [1939].

⁷¹) F. Binkley u. V. du Vigneaud, ebenda 144, 507 [1942].

⁷²) De Witt Stetten, J. biol. Chemistry 144, 501 [1942]; F. Binkley, W. P. Anslow u. V. du Vigneaud, ebenda 143, 559 [1942]; F. Binkley, ebenda 153, 39 [1944].

⁷³) V. du Vigneaud, G. W. Kilman, J. R. Rachele u. M. Cohn, J. biol. Chemistry 155, 645 [1944].

⁷⁴) D. D. Dziewiatkowski, ebenda 161, 723 [1945]; 164, 165 [1946].

⁷⁵) H. Tarver u. L. M. Morse, ebenda 173, 53 [1948]; 167, 395 [1947].

^{75b}) M. V. Thomas, R. H. Hendricks, L. C. Bryner u. G. R. Hill, Plant Physiol. 19, 227 [1944].

Stickstoff

Schwerer Stickstoff (N^{15}) ist ein bequemes Hilfsmittel zur Untersuchung der Bildungs- und Umwandlungsreaktionen von Aminosäuren, Proteinen, Purinen und Pyrimidinen u. dgl. Zu Doppelindizierungen hat man von Anfang dieser Untersuchungen an, die hauptsächlich auf die Initiative von R. Schoenheimer, zurückgehen, Deuterium herangezogen und in den letzten Jahren auch C^{13} und C^{14} verwendet. Der radioaktive N^{13} ist nur wenig angewandt worden.

Schon in den ersten Untersuchungen⁷⁶) mit N^{15} konnte die alte Frage, ob Ammoniak, das z. B. in Form von Ammoniumcitrat verfüttert wird, in die Aminosäuren und damit in das Körpereweiß eingebaut werden kann, endgültig positiv entschieden werden. Man fand ihn in allen Aminosäuren der Proteinhydrolysate mit Ausnahme von Lysin wieder. Auch beim Füttern von einzelnen Aminosäuren wie Glykokoll oder Leucin, die mit N^{15} und z. T. auch mit Deuterium indiziert waren, wurde eine Verteilung des schweren Stickstoffs über alle anderen Aminosäuren, aber wieder mit Ausnahme des Lysins beobachtet. Nächste der gefütterten Aminosäure hatte immer die Glutaminsäure den höchsten N^{15} -Gehalt. Anscheinend kommt ihr bei der Umaminierung nach Braunstein und Kritzman eine besondere Rolle zu. Demnach befinden sich die Proteine des Tierkörpers in einem fortgesetzten Auf- und Abbau⁷⁷).

An diesem dauernden Austausch der Aminosäuren nimmt nicht nur das normale Körpereweiß teil, auch die Aminosäuren in den spezifischen Antikörperproteinen, die nach Injektion eines Antigens im Tierkörper gebildet werden, werden fortgesetzt ausgewechselt, ein Zeichen, daß auch die Antikörperproteine sich in einem dynamischen Gleichgewicht befinden⁷⁸). Dagegen nehmen die durch passive Immunisierung einem Tier einverleibten Antikörper nicht am N-Austausch teil⁷⁹).

Nach Rittenberg und Shemin⁸⁰) kann man annehmen, daß es zu dem Aminosäureaustausch in den Proteinen auf zweierlei Wegen kommen kann: 1. Entweder wird eine Proteinmolekel bis zu den Aminosäuren abgebaut oder 2. eine einzelne Aminosäure wird aus der Polypeptidkette entfernt und durch eine identische ersetzt. Während der Öffnung der Kette werden die freien Enden durch Nebenvalezen in der richtigen Stellung gehalten.

Die zweite Hypothese erscheint zunächst einleuchtender, jedoch sprechen die erwähnten Versuche von Heidelberger⁷⁹) für die erstere. Ein Kaninchen wurde gegen Typ III Pneumokokken aktiv immunisiert. Nachdem ein Maximum an Typ III Antikörper im Serum erreicht war, wurde passiv gegen Typ I Pneumokokken immunisiert. Daraufhin wurde $\text{H}_2\text{N}^{15}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$ gefüttert. Nach 3 Tagen wurden die Typ I und Typ III Antikörper mit Hilfe der spezifischen Polysaccharide getrennt isoliert. Sowohl das Serumprotein wie der Typ III Antikörper enthielten beträchtliche Mengen N^{15} , während der Typ I Antikörper kein N^{15} aufgenommen hatte. Da anzunehmen ist, daß die beiden Antikörper ziemlich ähnlich gebaut sein müssen, kann geschlossen werden, daß einzelne Aminosäuren in einem intakten Protein nicht ausgewechselt werden können. Es kann also offenbar nur ein Einbau von Aminosäuren durch Neuaufbau der Proteinmolekel zustande kommen.

Die oben erwähnte Ausnahmestellung des Lysins wird durch Doppelindizierung mit D und N^{15} noch deutlicher als sie es nach den Arbeiten mit N^{15} allein schon ist. In dem aus dem Körperprotein von Ratten isolierten Lysin war nach Verfütterung von deuteriertem, N^{15} -haltigem Lysin das D/N-Verhältnis daselbe wie im gefütterten. Doch wurde auch D und N^{15} in anderen Aminosäuren gefunden. Daraus ist zu schließen, daß ein Abbau des Lysins zwar stattfinden kann, ist es aber einmal desaminiert, so kann es nicht reaminiert werden, denn sonst hätte das D/ N^{15} -Verhältnis verschoben werden müssen.

⁷⁶) R. Schoenheimer, S. Ratner u. D. Rittenberg, J. biol. Chemistry 127, 33, 211, 282, 301, 315, 319, 329, 333 [1939]; 130, 703 [1939]; 134, 665 [1940]; 153, 401 [1944]; R. Schoenheimer, S. Ratner, D. Rittenberg u. M. Heidelberger, ebenda 144, 541 [1942].

⁷⁷) R. Schoenheimer: Dynamic State of Body Constituents, Harvard Press 1942.

⁷⁸) R. Schoenheimer, S. Ratner, D. Rittenberg u. M. Heidelberger, J. biol. Chemistry 144, 545 [1942].

⁷⁹) M. Heidelberger, H. P. Treffers, R. Schoenheimer, S. Ratner u. Rittenberg, ebenda 144, 555 [1942].

⁸⁰) D. Rittenberg u. D. Shemin, Annu. Rev. Biochem. 15, 247 [1946].

Besonders eingehend ist auch die Frage geprüft worden, in welche stickstoff-haltigen Verbindungen der N aus $\text{H}_2\text{N}^{15}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$ im Organismus der Ratte eingehen kann⁸¹). Um gleichzeitig einen Einblick in die N-Stoffwechselaktivität der verschiedenen Organe und Gewebe zu gewinnen, wurden die Tiere nach 0, 2, 4, und 7 Tagen analysiert. Es ergab sich, daß die einzelnen Proteine des Muskels stark in ihrer N-Austauschgeschwindigkeit variieren. In der Leber wird etwa die Hälfte der Proteine in 7 Tagen umgebaut. Im Ammoniak und in den Amidin-Gruppen der Leberproteine fand man etwa die gleiche N^{15} -Konzentration, was für die Gültigkeit des Harnstoff-Cyclus von *Krebs* spricht. In den Amidin-Gruppen der übrigen Körperproteine war die N^{15} -Konzentration viel niedriger. Dies stützt die Ansicht, daß der Harnstoff in der Leber gebildet wird. Das Glykokoll geht auf einem ziemlich direkten Wege in Äthanolamin über, wie ist allerdings noch nicht klar⁸²). Nach dem Füttern von N^{15} -Glykokoll zeigte das aus den Phosphatiden isolierte Äthanolamin einen sehr hohen N^{15} -Gehalt. Der Glykokoll-Teil des Glutathions (Glutaminyll-cysteinyl-glykokoll) erleidet einen auffallend schnellen Austausch mit N^{15} -Glykokoll im Tierkörper⁸³). Das Glutathion ist demnach besonders labil. Betain geht über Glykokoll und Äthanolamin in Cholin über⁸⁴).

Durch Doppelindizierung von l-Serin mit N^{15} und C^{13} (in der Carboxyl-Gruppe) wurde bei Ratten und Meerschweinchen gezeigt⁸⁵), daß es unter Verlust des β -C-Atoms direkt in Glykokoll übergehen kann. Das $\text{N}^{15}/\text{C}^{13}$ -Verhältnis im verabfolgten Serin und in der ausgeschiedenen Hippursäure war dasselbe.

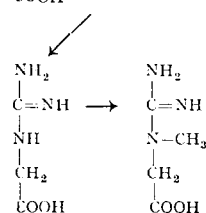
Durch Doppelindizierung von Prolin mit D und N^{15} wurde dessen direkter Übergang in Glutaminsäure im Rattenorganismus bewiesen⁸⁶). Ferner werden innerhalb von 3 Tagen 25% des Prolins in Oxyprolin verwandelt. Auch im Ornithin, das aus Gewebearginin isoliert wurde, war D und N^{15} enthalten, N^{15} sowohl in der α - wie in der δ -Amino-Gruppe.

Auch über den Einbau von N^{15} , das in Form von Ammoniumsalzen oder als Harnstoff an Ratten oder Tauben verfüttert wurde, in Nucleinsäuren, Purine und Pyrimidine liegen Untersuchungen vor⁸⁷). Der Ammoniak-N wird von Tauben ziemlich rasch in Harnsäure eingebaut und als solcher ausgeschieden. In Guanin, Adenin, Cytosin und Thymin aus der Nucleinsäure-Fraktion war der N^{15} -Gehalt geringer als in der Harnsäure. Der N^{15} aus Harnstoff ging bei Tauben jedoch nur in sehr geringem Maße in die Harnsäure und die genannten Basen über. Guanin und Adenin enthielten den schweren Stickstoff sowohl in den Amino-Gruppen wie in den Ring-N-Atomen. Ratten konnten den Ammoniak-N ebenfalls zum Aufbau von Purinen und Pyrimidinen verwerten. Sowohl die Amino-Gruppen wie die Ring-N-Atome zeigten einen N^{15} -Gehalt. Der Abbau der Harnsäure *in vivo* zu Allantoin muß über eine symmetrische Zwischenstufe verlaufen. Wurde Harnsäure, die am N_1 - und N_3 -Atom mit N^{15} indiziert war, an Ratten verfüttert, so war die N^{15} -Verteilung im ausgeschiedenen Allantoin im Harnstoff- und Hydantoin-Teil gleichmäßig. Es liegt somit eine gewisse Parallelität der biologischen Oxydation der Harnsäure mit der durch alkalisches Permanganat vor⁸⁸).

Einen sehr schnellen N-Austausch zeigt die Amino-Gruppe des Adenosintriphosphates im Muskel, während in der gleichen Zeit (8 h) die Ring-N-Atome nicht austauschen⁸⁹).

Über die Bildung von Harnsäure aus verschiedenen möglichen Bausteinen wird im Abschnitt „Kohlenstoff“ berichtet, wo aufgeführt ist, daß das N_7 -Atom der Harnsäure aus Glykokoll hervorgeht. Ähnliches gilt für die Hefe *Torulopsis utilis*⁹⁰). Der Stickstoff aus $\text{H}_2\text{N}^{15}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$ wurde im N_7 -Atom des Purin-Ringes wiedergefunden.

Mehrere Arbeiten liegen über den Mechanismus der Kreatin-Bildung bei Ratten vor⁹¹). Aus Glykokoll und Ar-



ginin kann Glykocyamin (Guanidinoessigsäure) entstehen, das durch Methionin zu Kreatin methyliert wird. Die Versuche mit N^{15} bestätigen diese Auffassung. Ein besonders hoher N^{15} -Gehalt im Kreatin wurde nach Gaben von N^{15} -haltigem Glykocyamin gefunden.

Wasserstoff

Seit 1934 ist Deuterium zum Studium zahlreicher chemischer und biochemischer Probleme benutzt worden. Er stellt neben dem Phosphor das am meisten verwendete Isotop dar, da er immer am leichtesten zugänglich war und auch heute noch ist. Die ältere Literatur, sowie die Besonderheiten, die sich bei der Anwendung von Deuterium ergeben, sind bereits eingehend geschildert worden⁹²).

Lediglich auf einige wichtige Punkte sei erneut hingewiesen. Alle an O und N gebundenen D-Atome unterliegen im Kontakt mit H_2O einem schnellen Isotopenaustausch (auswaschbare D-Atome), ferner werden D-Atome, die sich in Nachbarschaft von enolisierbaren Gruppen befinden in Abhängigkeit von der Enolisierungsgeschwindigkeit gegen H ausgetauscht. Weiter ist mit der Möglichkeit zu rechnen, daß auch stabil gebundene D-Atome bei der Bildung von Enzym-Substrat Verbindungen gelockert werden. Trotzdem hat sich das Deuterium als wertvolles Hilfsmittel bei der Aufklärung des Stoffwechsels einzelner Verbindungen und bei der Entwirrung des intermediären Stoffwechsels erwiesen. Es muß nur jeweils geprüft werden, ob nicht unvermutete Austauschreaktionen im Spiele sind, was am besten durch Doppelindizierung mit einem C-Isotopen geschieht. Ohne Bedenken kann das Deuterium zur Indizierung einer Verbindung verwandt werden, wenn lediglich der Transportweg verfolgt wird, ohne daß Umwandlungen an der Molekel erfolgen. Unter gewissen Umständen kann sogar mit Ketonen gearbeitet werden, die am α -ständigen C-Atom mit Deuterium indiziert sind, nämlich dann, wenn die Hydrierung der Keto-Gruppe zu einer Alkohol-Gruppe vor sich geht und die Reduktionsgeschwindigkeit größer ist als die der Enolisierung (Beispiel: Koprostanon \rightarrow Koprostanol⁹³).

Es kann hier nur ein Ausschnitt aus den vielfältigen Untersuchungen gebracht werden, die mit Deuterium auf biochemischem Gebiete durchgeführt worden sind⁹⁴). Es sei auf die Arbeiten mit deuterierten Fettsäuren, auf die Ummethylierung sowie auf die Acetylierung von Aminen im Tierkörper eingegangen.

a) Fettsäuren. Höhere Fettsäuren (über C_{10}) werden stets zuerst in das Körperfett (Fettdepots und innere Organe) eingelagert, bevor sie abgebaut werden. Mindestens die Hälfte der resorbierten Fettsäureeinheiten wird in den Fettgeweben abgelagert, selbst bei Tieren mit beschränkter Diät, die keine Gewichtszunahme zeigen. Im Gegensatz zu den höheren werden die niederen Fettsäuren direkt umgesetzt. Bei erwachsenen Mäusen wird die Hälfte des Körperfetts innerhalb einer Woche regeneriert, bei den gesättigten Fettsäuren des Leberfetts geht dieser Umbau schon innerhalb eines Tages vor sich. Das Körperfett ist daher keine träge Masse, sondern befindet sich wie die Proteine in einem dynamischen Zustand⁷⁷).

Am intermediären Fettsäurestoffwechsel hat sich ergeben, daß eine dauernde hin- und rückläufige Umwandlung eines Fettsäuretyps in einen anderen stattfindet⁹⁵). Einfach ungesättigte Säuren entstehen und werden auch zu gesättigten hydriert. Die

⁸¹) D. Shemin u. D. Rittenberg, J. biol. Chemistry 153, 401 [1944].

⁸²) De Witt Stetten, ebenda 140, 143 [1941].

⁸³) H. Waelsch u. D. Rittenberg, ebenda 133, CIV [1940]; 139, 761 [1941]; 144, 53 [1942]; E. A. Zeller u. A. Maritz, Experientia 1, 30 [1945].

⁸⁴) De Witt Stetten, J. biol. Chemistry 138, 437 [1941]; 140, 143 [1941]; 142, 629 [1942].

⁸⁵) D. Shemin, ebenda 162, 297 [1946].

⁸⁶) De Witt Stetten u. R. Schoenheimer, J. biol. Chemistry 153, 113 [1944].

⁸⁷) F. W. Barnes u. R. Schoenheimer, ebenda 151, 123 [1943].

⁸⁸) G. B. Brown, P. M. Roll u. L. F. Cavallieri, ebenda 171, 835 [1947].

⁸⁹) H. M. Kalckar, Symposia Soc. Exptl. Biol. I. Nucleic Acid 1947, 38.

⁹⁰) R. Abrams, E. Hammarsten u. D. Shemin, J. biol. Chemistry 173, 429 [1948].

⁹¹) H. Borsock u. J. W. Dubnoff, Science [New York] 91, 551 [1940]; K. Bloch u. R. Schoenheimer, J. biol. Chemistry 133, 633 [1940]; 138, 167 [1941]; K. Bloch, R. Schoenheimer u. D. Rittenberg, ebenda 138, 155 [1941].

⁹²) G. Hevesy, Naturwiss. 23, 775 [1935]; O. Reitz, Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. 44, 72 [1938]; K. F. Bonhoeffer, ebenda 44, 87 [1938]; R. Schoenheimer u. D. Rittenberg, Science [New York], 87, 212 [1938].

⁹³) M. Anchel u. R. Schoenheimer, J. biol. Chemistry 125, 23 [1938].

⁹⁴) R. Schoenheimer u. D. Rittenberg, Physiol. Rev. 20, 218 [1940].

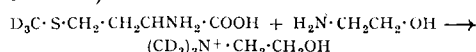
⁹⁵) R. Schoenheimer, J. appl. Physics, 12, 322 [1941].

C-Ketten können um je 2 C-Atome verkürzt (z. B. $C_{22} \rightarrow C_{18} \rightarrow C_{16} \rightarrow C_{14}^{96}$) oder verlängert werden.

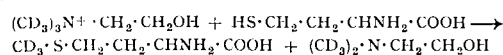
Ausgehend von der Essigsäure über die Acetessigsäure werden offenbar die langkettigen Fettsäuren aufgebaut⁹⁷: Mit D und C^{13} (in der Carboxyl-Gruppe) indizierte Essigsäure wurde an Ratten und Mäuse verfüttert. Der C^{13} -Überschuß in den Carboxyl-Gruppen der gesättigten Fettsäuren, die aus der Leber und dem übrigen Körper isoliert wurden, war doppelt so hoch wie der im Durchschnitt aller C-Atome, woraus geschlossen werden kann, daß die C^{13} -Atome sich in alternierenden Stellungen der C-Kette befinden. In der Leber können Fettsäuren offenbar nach dem Schema der alternierenden β -Oxydation abgebaut werden⁹⁸).

b) Ummethylierung⁹⁹.

Von du Vigneaud et al. ist mit Hilfe deuterierter Verbindungen die Ummethylierung eingehend untersucht worden. Unter Ummethylierung versteht man den Übergang von „labilen“ Methyl-Gruppen eines Methyl-Donators auf einen Methylacceptor. Die Methyl-Gruppe des Methionins ist „labil“ und kann auf Aminoäthanol übertragen werden, das zum Cholin wird. Methionin kann daher bei gewissen Tierarten das Cholin ersetzen (das Aminoäthanol kann aus Glykokoll gebildet werden; siehe unter „Stickstoff“):

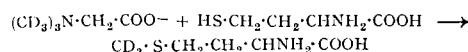


Umgekehrt kann aus Homocystein und Cholin das Methionin hervorgehen:



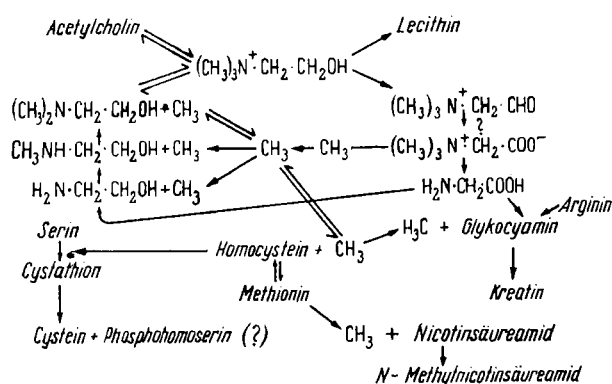
Die Methyl-Gruppen des Dimethyl-aminoäthanol sind nicht labil, jedoch kann es wie das Monomethyl-aminoäthanol im Organismus zu Cholin methyliert werden.

Ein weiterer Methyl-Donator ist das Betain, wie sich 1. aus Versuchen an Hühnchen ergab, die auf einer an „labilen“ Methyl-Donatoren-armen Diät mit Betain + Homocystein gutes Wachstum zeigten und 2. aus Versuchen mit Deutero-betain an Ratten:



Die „labile“ Methyl-Gruppe des Methionins kann ferner auf die Guanidinoessigsäure (Glykocyamin) übertragen werden, die dadurch zu Kreatin methyliert wird. Rattenleberschnitte können mit Methionin als Methyl-Donator Nicotinsäureamid zu N-Methyl-nicotinsäureamid methylieren¹⁰⁰.

Das nachfolgende Diagramm zeigt die zur Zeit bekannten Zusammenhänge zwischen Methyl Donatoren und Acceptoren, wie sie sich durch Arbeiten mit D und N^{15} ergeben haben¹⁰¹.]



c) Acetylierung.

Durch gleichzeitiges Verfüttern von Sulfanilamid, p-Aminobenzoessäure oder Cyclohexylalanin mit deuterierter Essigsäure wurde insbesondere durch Bernhard gezeigt, daß die verabfolgte

Essigsäure zu etwa 10% zu direkten Acetylierungen verwandt werden kann. Auch bei Gaben von Deutero-äthylalkohol an Stelle von Essigsäure werden die deuterierten Acetyl-Verbindungen im Urin ausgeschieden¹⁰².

Vergleichende Untersuchungen über die Acetylierbarkeit von Sulfanilamid und γ -Phenyl- α -aminobuttersäure im tierischen Organismus haben ergeben, daß beide durch Essigsäure acetyliert werden können, aber nur die α -Aminosäure kann durch Alanin acetyliert werden. Wahrscheinlich wird das Alanin oxydativ in die Brenztraubensäure verwandelt, die das eigentliche Acetylierungsmittel ist¹⁰³. Bloch und Rittenberg¹⁰³ verwandten Essigsäure, die in der Methyl-Gruppe deuteriert und in der Carboxyl-Gruppe mit C^{13} indiziert war. Auf Grund der Isotopenverteilung in den ausgeschiedenen acetylierten Aminen konnten sie die tägliche endogene Essigsäure-Bildung berechnen. Die Autoren studierten auch die Acetylierung von körperfremden Aminen, wenn acetylierte Aminosäuren gegeben wurden¹⁰⁴. Im allgemeinen scheint zunächst eine Hydrolyse der acetylierten Aminosäuren stattzufinden, die frei werdende Essigsäure vermischt sich mit der körpereigenen und dementsprechend wird in der ausgeschiedenen Acetyl-Verbindung nur wenig Deuterium gefunden. Vom Acetyl-glykokoll scheint jedoch eine direkte Übertragung auf α -Amino- γ -phenylbuttersäure zu erfolgen, da der D-Gehalt der ausgeschiedenen Acetyl-amino-phenylbuttersäure 5–20 mal höher war nach der Fütterung von Deutero-acetyl-glykokoll als nach der Fütterung von Deuteroacetat.

Tritium

Das radioaktive Isotop des Wasserstoffs ist das Tritium (H^3 , auch als T bezeichnet), mit der Halbwertszeit von $11 \pm 1,5$ Jahren. Die ausgesandten β -Strahlen haben eine besonders niedrige Energie, weshalb es nicht leicht zu bestimmen ist. Wegen der höheren Masse ist die Bindungsfestigkeit von C-T-Bindungen größer als die von C-D- und C-H-Bindungen. Da wasserstoffübertragende Fermente sehr empfindlich sind gegen kleine Änderungen der Aktivierungsenergie (z. B. Verlangsamung der Oxydation von Glucose bei hohen D-Gehalten), besteht die Möglichkeit einer Isotopentrennung durch Fermente bei tritiierten Verbindungen. Von großer Bedeutung ist, daß beim Arbeiten mit Tritium der mögliche Verdünnungsgrad viel größer ist als bei der Verwendung von Deuterium. Wegen der schweren Zugänglichkeit wurden bisher kaum biochemische Untersuchungen durchgeführt. Untersucht wurde z. B., ob das Chlorophyll bei der Assimilation von CO_2 an einer Oxydoreduktion teilnimmt. Mit Sicherheit ließ sich diese Frage auch nicht mit Tritium entscheiden, doch sprechen die bisherigen Befunde dagegen¹⁰⁵.

Kohlenstoff

Beim Kohlenstoff liegt der glückliche Umstand vor, daß drei Isotope zur Verfügung stehen: Der stabile C^{13} , der kurzlebige C^{11} ($t/2 = 20,35 \pm 0,08$ min.) und der langlebige C^{14} ($t/2 = 5100 \pm 200$ Jahre). Für jedes Problem kann daher ein geeignetes Isotop ausgewählt werden. C^{14} ist erst durch die Uran-Piles in größeren Aktivitäten verfügbar geworden, weshalb er bisher nur in den USA umfangreiche Anwendung gefunden hat. Während Untersuchungen mit C^{13} durch keinen Zeitfaktor beeinträchtigt werden, müssen solche mit C^{11} in 10 bis 12 Halbwertszeiten = 3 bis 4 h beendet sein und mit C^{14} indizierte Stoffe zeigen in Jahrzehnten praktisch keine Verminderung der Aktivität.

Für Transportstudien, Umlagerungsreaktionen, Biosynthesen und Stoffwechseluntersuchungen von organischen Verbindungen stellen die C-Isotope ideale Hilfsmittel dar, zumal durch die drei verfügbaren Isotope leicht die Möglichkeit zu Doppelindizierungen gegeben ist. Darüber hinaus können einzelne Atomgruppenierungen, wie die CH_3 -Gruppe, durch Deuterium weiter indiziert werden und bei Verbindungen mit Heteroatomen (N, S, O) lassen sich auch diese noch indizieren, so daß alle interessierenden Molekelbezirke durch stabile oder radioaktive Isotope gekennzeichnet werden können.

¹⁰² K. Bernhard, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 267, 91 [1940], 267, 99 [1940], 271, 208 [1941]; K. Bernhard u. H. Steinhäuser, ebenda 273, 31 [1942].

¹⁰³ V. du Vigneaud, M. Cohn, G. B. Brown u. O. J. Irish, J. biol. Chemistry 131, 273 [1939]; K. Bloch u. D. Rittenberg, ebenda 159, 45 [1945].

¹⁰⁴ K. Bloch u. D. Rittenberg, ebenda 169, 467 [1947].

¹⁰⁵ T. H. Norris, S. Ruben, M. B. Allen, J. Amer. Chem. Soc. 64, 3037 [1942]; M. B. Allen u. S. Ruben, ebenda 64, 948 [1942].

⁹⁶ K. Bernhard u. E. Fischer, Helv. chim. Acta 29, 929 [1946].

⁹⁷ D. Rittenberg u. K. Bloch, J. biol. Chemistry 160, 417 [1945].

⁹⁸ Zusammenfassung über den Fettsäureabbau: F. L. Breusch, Advances in Enzymology 8, 343 [1948].

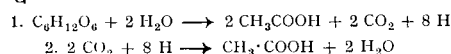
⁹⁹ V. du Vigneaud, J. P. Chandler, A. W. Moyer u. D. M. Keppel, J. biol. Chemistry 131, 57 [1939]; V. du Vigneaud, J. P. Chandler, M. Cohn u. G. B. Brown, ebenda 134, 787 [1940]; S. Simmonds u. V. du Vigneaud, ebenda 146, 685 [1942]; V. du Vigneaud, J. P. Chandler, S. Simmonds, A. W. Moyer u. M. Cohn, ebenda 164, 603 [1946]; S. Simmonds, M. Cohn u. V. du Vigneaud, ebenda 170, 631 [1947].

¹⁰⁰ W. A. Perlzweig, M. L. Bernheim u. F. Bernheim, ebenda 150, 401 [1943].

¹⁰¹ Th. H. Junkes, Annu. Rev. Biochem. 16, 195 [1947].

Das Protozoon *Tetrahymena gelii* vergärt Glucose zu Milchsäure, Essigsäure und Bernsteinsäure. C^*O_2 wird fixiert und nur in den Carboxyl-Gruppen der Bernsteinsäure gefunden¹¹⁹). Die Pilze *Rhizopus nigricans* und *Aspergillus niger* nehmen bei der Vergärung von Glucose ebenfalls C^*O_2 auf, das in den Carboxyl-Gruppen von Fumar- und Citronensäure nachgewiesen werden kann.

Clostridium thermoaceticum vergärt Glucose zu Essigsäure¹²⁰). Da kein C_1 -Bruchstück beobachtet werden konnte, wurde CO_2 -Fixierung vermutet. $C^{14}O_2$ wurde tatsächlich aufgenommen und konnte nach 3–6 Tagen in der Essigsäure und zwar gleichmäßig auf Methyl- und Carboxyl-Gruppe verteilt wiedergefunden werden. Auch im Zellmaterial war C^{14} enthalten. Essigsäure wird nicht zu CO_2 oxydiert, denn wurde in einem zweiten Versuch Essigsäure, die in der Methyl- und der Carboxyl-Gruppe mit C^{14} indiziert war, zugesetzt, so ging keine Aktivität in das CO_2 . Auf Grund der Tatsache, daß die Glucose nur in Essigsäure übergeführt und kein CO_2 abgegeben wird, daß ferner zugesetztes C^*O_2 in $C^*H_3 \cdot C^*OOH$ verwandelt wird, kam man zu folgender Gärgleichung:

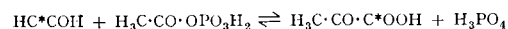


Butyribacterium rettgeri kann C^*O_2 in an allen C-Atomen indizierte Essigsäure und Buttersäure verwandeln¹²¹). *Clostridium cylindrosporus* führt anaerob Harnsäure in CO_2 , NH_3 , Essigsäure und Glykokoll über. Durch Zugabe von $C^{14}O_2$ wurde dessen Einbau in die gebildete Essigsäure und das Glykokoll bewiesen¹²²).

Außer der Wood-Werkman-Reaktion gibt es eine weitere Art der CO_2 -Fixierung, die in Extrakten von *Clostridium butylicum* beobachtet wurde (Koepsell¹²³). Brenztraubensäure wird in Acetat, CO_2 und H_2 verwandelt. Mit $C^{13}O_2$ konnte das Vorliegen einer Gleichgewichtsreaktion festgestellt werden. Das aus der Brenztraubensäure hervorgehende C_2 -Bruchstück ist wahrscheinlich Acetylphosphat.



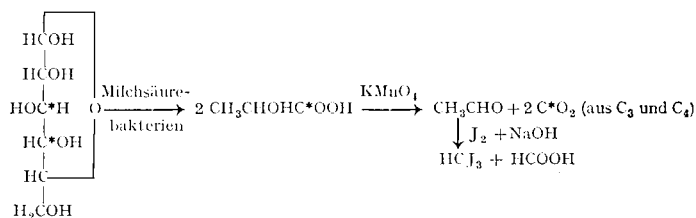
Ferner existiert eine dritte Art der CO_2 -Fixierung¹²⁴). *Escherichia coli* kann CO_2 mit Wasserstoff zu Ameisensäure reduzieren, die mit einem C_2 -Körper zu Brenztraubensäure kondensiert wird. Bietet man Extrakten aus *E. coli* HC^*OOH und Brenztraubensäure an, so findet man nach einiger Zeit eine Gleichverteilung der Aktivität in der Carboxyl-Gruppe der Brenztraubensäure und der Ameisensäure (CO_2 konnte als Zwischenprodukt ausgeschlossen werden). Auch bei *Lactobacillus delbrückii* konnte ein Gleichgewicht zwischen Ameisensäure und Brenztraubensäure nachgewiesen werden, das C_2 -Bruchstück ist wahrscheinlich auch hier Acetylphosphat:



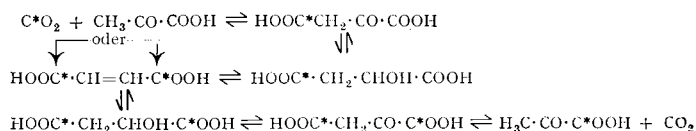
Die Fixierung von CO_2 durch Rattenleber¹²⁵) und Taubenleber¹²⁶) konnte mit C^*O_2 nachgewiesen werden. Aus Taubenleberbrei konnte nach Inkubation mit Brenztraubensäure und $NaHC^{11}O_3$ α -Ketoglutarinsäure isoliert werden, die das C^{11} -Atom in der α -Ketogruppe trug.

An fastenden Ratten konnte die CO_2 -Fixierung sehr schön verfolgt werden¹²⁷). Gewöhnliche Milchsäure wurde verfüttert und $NaHC^{11}O_3$ injiziert. Das gebildete Glykogen enthielt 0,3 bis 1,5% C^{11} . Es wurde berechnet, daß ungefähr 11% des Leberglykogens durch Aufbau unter Mitwirkung von CO_2 gebildet worden waren. Die indizierten C-Atome befanden sich in der

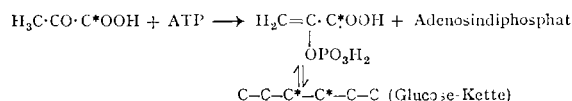
aus dem Glykogen durch Hydrolyse erhaltenen Glucose in 3- und 4-Stellung (Versuche mit $C^{13}O_2$ wiederholt¹²⁸)), was durch folgenden Abbau bewiesen wurde:



Da bei der C^*O_2 -Fixierung durch die Ratte die Aktivität nur in den C-Atomen 3 und 4 zu finden ist, muß zunächst irgendwie $H_3C \cdot CO \cdot C^*OOH$ gebildet werden. Man nimmt Fixierung über die Wood-Werkman-Reaktion an (die Koepsel-Reaktion konnte im Tierkörper noch nicht demonstriert werden):



Wenn das Schema des Glucose-Abbaus auch bei der Resynthese Gültigkeit hat, so muß der nächste Schritt die Bildung der Phosphoenol-brenztraubensäure sein. Dies erscheint in der Tat nach Lardy und Ziegler¹²⁹) möglich (mit Extrakten von Rattenmuskel + Adenosintriphosphat und K-Ionen):



Auf die Beziehungen zwischen Kohlehydrat- und Fettstoffwechsel, wie sie sich nach den neueren Arbeiten mit C-Isotopen darbieten, kann hier wegen der erforderlichen umfangreichen Darlegungen nicht eingegangen werden, ebenso wie auf die neueren Arbeiten über den Tricarbonsäure-Cyclus. Es sei auf die zusammenfassenden Darstellungen von Buchanan und Hastings, Gurin, Wood und von Breusch verwiesen¹³⁰).

Herstellung indizierter organischer Verbindungen

Bei der Herstellung indizierter organischer Verbindungen ergeben sich reizvolle und z. T. recht schwierige Aufgaben. Die stabilen oder radioaktiven Isotopen stehen in Form einfacher Verbindungen wie CO_2 , HCN , H_2O , NH_3 , H_2S , H_2SO_4 u. dgl. zur Verfügung und müssen von diesen ausgehend in die organischen Molekeln eingebaut werden. Im Laboratorium ist man daher gezwungen, Totalsynthesen auszuarbeiten, wenn es sich um die Indizierung aller Atome einer Art in einer Molekel handelt, oder Partialsynthesen, wenn nur charakteristische Gruppen indiziert werden sollen. Um komplizierte Molekeln in allen Atomen einer Art zu indizieren, bedient man sich am besten der Biosynthese durch Pflanze oder Tier.

Deuterium. Zur Deuterierung stehen mehrere Methoden zur Verfügung, von denen der Austausch zwischen D_2O und einer Verbindung mit Hilfe eines Edelmetallkatalysators die gebräuchlichste ist. Sehr wertvoll ist auch die Deuterierung mit D_2SO_4 . An Doppel- und Dreifachbindungen kann D leicht durch Hydrieren mit D_2 herangebracht werden. Ausgehend von Calciumcarbid lassen sich sehr viele Verbindungen in total deuterierter Form gewinnen.

Will man durch Biosynthesen deuterierte Verbindungen herstellen, so ist zu beachten, daß reines D_2O nicht verwendet werden darf, da es giftig wirkt. Daher haben die so gewonnenen deuterierten Verbindungen meist nur geringen D-Gehalt.

Stickstoff. Alle Amino-Gruppen enthaltenden sowie die heterocyclischen Verbindungen lassen sich, soweit sie synthetisch zugänglich sind, ausgehend von $N^{15}H_3$ bzw. HCN^{15} und $HN^{15}O_3$ herstellen.

¹²⁸) H. G. Wood, N. Lifson u. V. Lorber, ebenda 159, 475 [1945].

¹²⁹) H. A. Lardy u. A. Ziegler, J. biol. Chemistry 159, 343 [1945].

¹³⁰) J. M. Buchanan u. A. B. Hastings, Physiol. Rev. 26, 120 [1946]; S. Gurin, Advances Carbohydrate Chem. 3, 247 [1948]; H. G. Wood, Physiol. Rev. 26, 198 [1946]; F. L. Breusch, Advances Encymology 8, 343 [1948].

¹¹⁹) C. B. van Niel, J. S. Thomas, S. Ruben u. M. D. Kamen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 28, 157 [1942].

¹²⁰) F. E. Fontaine, W. H. Petersen, E. McCoy, M. J. Johnson u. G. L. Ritter, J. Bacteriol. 43, 701 [1942]; H. A. Barker u. M. D. Kamen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 31, 219 [1945].

¹²¹) H. A. Barker, M. D. Kamen u. V. Haas, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 31, 355 [1945].

¹²²) H. A. Barker u. S. R. Elsdon, J. biol. Chemistry 167, 619 [1947].

¹²³) H. J. Koepsell, M. J. Johnson u. J. S. Meck, J. biol. Chemistry 154, 535 [1944], 145, 379 [1942]; H. G. Wood, Physiol. Rev. 26, 198 [1946].

¹²⁴) F. Lipman, Cold Springs Harbor Symposia Quant. Biol. 7, 248 [1939]; M. F. Utter, F. Lipman u. C. H. Werkman, J. biol. Chemistry 158, 521 [1945].

¹²⁵) S. Ruben u. M. D. Kamen, Proc. nat. Acad. Sci. USA 26, 418 [1940].

¹²⁶) E. A. Evans u. L. Slotin, J. biol. Chemistry 136, 301 [1940], 141, 439 [1941]; H. G. Wood, C. H. Werkman, A. Hemingway u. A. O. Nier, ebenda 139, 483 [1941], 142, 31 [1942].

¹²⁷) A. K. Solomon, B. Vennesland, F. W. Klemperer, J. M. Buchanan u. A. B. Hastings, J. biol. Chemistry 140, 171 [1941].

Schwefel. Alle interessierenden Verbindungen, wie S-haltige Aminosäuren, Aneurin, Penicillin usw. können leicht chemisch bzw. biochemisch dargestellt werden. Besonders die Synthese von S³⁵-haltigem Methionin ist eingehend durchgearbeitet worden.

Kohlenstoff. Die präparative organische Chemie hat eine große Zahl von synthetischen Methoden entwickelt, mit deren Hilfe auch die indizierten Verbindungen aufgebaut werden können. Es ist jedoch in den meisten Fällen notwendig die Methoden so abzuwandeln, daß die Ausbeuten bei der Einführung der Isotopen möglichst hoch werden. Im allgemeinen empfiehlt es sich, das Isotop bei mehrstufigen Reaktionen möglichst spät einzuführen. Die Reaktion zwischen Grignard-Reagens und C*O₂ hat zu zahlreichen Säuren mit aktiver Carboxyl-Gruppe geführt. Auch die Umsetzung von KC*N mit Aldehyden und Halogenalkylen hat vielfach Anwendung gefunden. Der biochemische Weg ist, insbesondere mit C¹⁴ dann beschritten worden, wenn es sich darum handelte, in kurzer Zeit aus C¹⁴O₂ für weitere Untersuchungen geeignete Substrate zu erhalten: Ein Propionsäurebakterium wandelte in 30 min mit Glycerin als Substrat 80% des angebotenen radioaktiven Kohlendioxids in radioaktive Propionsäure und Bernsteinsäure um. Das *Bacterium aceturici* — führte mit Hypoxanthin als Substrat in 80 min das gesamte C*O₂ in aktive Essigsäure über¹³¹).

Eine Auswahl indizierter organischer Verbindungen

a) S³⁵-haltige Verbindungen

Methionin ¹³²)	BAL (British Antilewisite) = 2,3-Dimercapto-1-propanol ¹³⁵)
Cystein ¹³³)	Dichloräthylsulfid ¹³⁶)
Aneurin ¹³⁴)	Butylmercaptan ¹³⁷)
Penicillin ⁶⁸)	Benzylmercaptan ¹³²)
	p-Amino-, phenylthiazol ^{137a}).

b) N¹⁵-haltige Verbindungen

Alanin ¹³⁸)	Kreatin ^{140,144})
Äthanolamin ¹³⁹)	Methylhydantoinsäure ¹³⁹)
Arginin ^{139,140})	Ornithin ¹⁴⁰)
Cholin ¹³⁹)	Phenylalanin ¹³⁸)
Glykokoll ^{138,141})	Prolin ¹⁴⁰)
Glutaminsäure ^{138,8})	Sarkosin ¹³⁹)
Glutathion ¹⁴²)	Tyrosin ^{138,145})
Guanidinoessigsäure ¹³⁹)	γ-Phenyl-α-aminobuttersäure ¹⁴⁶)
Harnstoff ^{140,143})	Isoguanin-1,3-N ¹⁵ 146a)
Hydantoinsäure ¹³⁹)	

c) C¹¹, C¹³ und C¹⁴-haltige Verbindungen

NaC ¹⁴ N ¹⁴⁷)	n-Dodecylamin-1-C ¹⁴ 158)
C ¹⁴ O ¹⁴⁸)	Fumarsäure ¹⁵⁹)
C ¹⁴ H ₃ ¹⁴⁹)	Benzoessäure ¹⁶⁰)
C ¹¹ H ₃ ¹⁵⁰)	CH ₃ C ¹⁴ O·COOH ¹⁶¹)
C ¹¹ H ₄ ¹⁵¹)	CH ₃ C ¹¹ HOH·COOH ¹⁶²)

- ¹³¹) H. A. Barker, S. Ruben u. J. V. Beck, Proc. nat. Acad. Sci. USA 26, 477 [1940].
¹³²) H. Tarver u. C. L. A. Schmidt, J. biol. Chemistry 130, 67 [1939], 146, 69 [1942].
¹³³) J. B. Melchior u. H. Tarver, Arch. Biochem. 12, 301 [1947].
¹³⁴) H. Borsook, E. R. Buchmann, J. B. Hatcher, D. M. Yost u. E. McMillan, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 26, 412 [1940].
¹³⁵) L. Young, Science [New York] 103, 439 [1946].
¹³⁶) T. E. Banks, J. C. Boursnell, G. E. Francis, F. L. Hopwood u. A. Wormald, Biochem. J. 40, 743, 756 [1946].
¹³⁷) Ch. Walling, J. Amer. Chem. Soc. 70, 2561 [1948].
^{137a}) H. Noll, E. Sörkin u. H. Erlenmeyer, Helv. chim. Acta 32, 609 [1949].
¹³⁸) R. Schoenheimer u. S. Ratner, J. biol. Chemistry 127, 301 [1939].
¹³⁹) K. Bloch u. R. Schoenheimer, ebenda 138, 167 [1941].
¹⁴⁰) R. Schoenheimer, J. appl. Physics, 12, 311 [1941].
¹⁴¹) R. Schoenheimer, D. Rittenberg, M. Fox, A. S. Keston u. S. Ratner, J. Amer. Chem. Soc. 59, 1768 [1937].
¹⁴²) H. Waelsch u. D. Rittenberg, J. biol. Chemistry 139, 761 [1941].
¹⁴³) K. Bloch u. R. Schoenheimer, ebenda 133, 633 [1941].
¹⁴⁴) K. Bloch, R. Schoenheimer u. D. Rittenberg, ebenda 138, 155 [1941].
¹⁴⁵) R. Schoenheimer, S. Ratner u. D. Rittenberg, ebenda 127, 333 [1939].
¹⁴⁶) V. du Vigneaud, M. Cohn u. G. B. Brown, ebenda 131, 273 [1939].
^{146a}) A. Bendich, J. F. Tinker u. G. B. Brown, J. Amer. Chem. Soc. 70, 3109 [1948].
¹⁴⁷) A. W. Adamson, J. Amer. Chem. Soc. 69, 2564 [1947].
¹⁴⁸) J. T. Kummer, ebenda 69, 2239 [1947]; J. L. Huston u. T. H. Norris ebenda 70, 1968 [1948].
¹⁴⁹) B. M. Tolbert, ebenda 69, 1529 [1947].
¹⁵⁰) D. Harman, T. D. Stewart u. S. Ruben, ebenda 64, 2293 [1942].
¹⁵¹) H. A. Barker, S. Ruben, u. M. D. Kamen, Proc. nat. Acad. Sci. USA 26, 426, [1940].

C¹⁴H₃OH¹⁵²)

HC¹¹OOH¹⁵⁰)

C¹¹OOH¹⁵³)

↓

C¹¹OOH

C¹¹H₃C¹¹OOH¹⁵¹)

C¹³H₃COOH¹⁵⁴)

C¹⁴H₃COOH¹⁵⁵)

CH₃CH₂C¹¹OOH¹⁵⁶)

CH₂C¹¹OOH^{118,159})

↓

CH₂C¹¹OOH

Palmitinsäure (C¹⁴OOH)¹⁵⁷)

Palmitinsäure-6-C¹⁴ 157)

Laurinsäure (C¹⁴OOH)¹⁵⁸)

CH₃C¹³O·CH₂·C¹³OOC₂H₅¹⁶³)

CH₃CO·CH₂·C¹³OOC₂H₅¹⁶³)

CH₃C¹³O·CH₂COOC₂H₅¹⁶³)

H₂NCH₂·C¹³OOH¹⁶³)

H₂NC¹³H₂(CH₂)₃CHNH₂

COOH(Lysin)¹⁶⁴)

Tyrosin (C¹⁴OOH)¹⁶⁵)

Phenylalanin¹⁶⁶)

p-Aminobenzoessäure

(C¹⁴OOH)¹⁶⁶)

Nicotinsäure (C¹³COOH)¹⁶⁷)

H₃C¹⁴·S·CH₂CH₂CHNH₂

COOH¹⁶⁸) (Methionin)

Phenanthren-9-C¹⁴ 169)

1,2,5,6-Dibenzanthracen-

9,10-C¹⁴ 170)

Testosteron-3-C¹⁴ 171)

Stärke-C¹³ 172)

Stärke-C¹⁴ 173)

Glucose-C¹⁴ 173)

Fructose-C¹⁴ 173)

Progesteron-21-C¹⁴ 173a)

d) Doppelindizierte Verbindungen

D ₃ C·S·C ¹³ H ₂ ·C ¹³ H ₂ ·CHNH ₂ ·	Prolin mit N ¹⁵ und D ¹⁷⁵)
COOH (Methionin) ¹⁷⁴)	Serin mit N ¹⁵ und C ¹³ OOH ⁸⁵)
Leucin mit N ¹⁵ und D ^{138, 175})	Essigsäure mit C ¹³ und D ⁹⁷)
Lysin mit N ¹⁵ und D ¹⁷⁵)	Adenin mit N ¹⁵ und C ¹⁴ 175a)

e) Deuterierte Verbindungen

Eine ziemlich vollständige Aufstellung aller bisher deuterierter Verbindungen findet sich bei Kamen¹⁷⁶).

Schlußbemerkung

Die Zeit des Abtastens der Anwendungsmöglichkeiten der stabilen und radioaktiven Isotope kann als abgeschlossen gelten. Weitere Fortschritte werden in Zukunft im wesentlichen durch Spezialisten auf den jeweiligen Arbeitsgebieten erzielt werden, wobei eine intensive Zusammenarbeit zwischen Physikern, Chemikern, Biologen und Medizinern am fruchtbringendsten sein wird. Es ist begrüßenswert, daß nun auch in Deutschland einige radioaktive Isotope (P³², S³⁵, J¹³¹, K⁴², Cu⁶⁴ und Na²³) in größerem Umfang durch die Vermittlung der British Research Branch verfügbar geworden sind¹⁷⁷). Ohne N¹⁵, C¹³ und C¹⁴ wird sich jedoch nicht allzuviel ausrichten lassen.

- ¹⁵²) B. M. Tolbert, J. Amer. Chem. Soc. 69, 1529 [1947].
¹⁵³) F. A. Long, ebenda 61, 570 [1939].
¹⁵⁴) S. H. Anker, J. biol. Chemistry 166, 219 [1946].
¹⁵⁵) B. M. Tolbert, ebenda 173, 205 [1948].
¹⁵⁶) P. Nahinsky, C. N. Rice, S. Ruben u. D. M. Kamen, J. Amer. Chem. Soc. 64, 2299 [1942].
¹⁵⁷) W. G. Dauben ebenda 70, 1376 [1948].
¹⁵⁸) H. J. Harwood u. A. W. Ralston, J. org. Chemistry 12, 740 [1947].
¹⁵⁹) M. B. Allen u. S. Ruben, J. Amer. Chem. Soc. 64, 948 [1942].
¹⁶⁰) W. G. Dauben, J. C. Reid, P. E. Yankwich u. M. Calvin, ebenda 68, 2117 [1946].
¹⁶¹) M. Calvin, u. R. M. Lemmon, ebenda 69, 1232 [1942].
¹⁶²) B. Vennesland, A. K. Solomon, J. M. Buchanan, R. D. Cramer u. A. B. Hastings, J. biol. Chemistry 142, 371, [1942].
¹⁶³) W. Sakami, W. E. Evans u. S. Gurin, J. Amer. Chem. Soc. 69, 1110 [1947].
¹⁶⁴) P. Olynec, D. B. Camp, A. M. Griffith, S. Woilowski, u. R. W. Helm-kamp, J. org. Chemistry 12, 465 [1948].
¹⁶⁵) J. C. Reid, Science [New York], 105, 208 [1947].
¹⁶⁶) A. Murray, W. W. Foremann u. W. Laugham, J. Amer. Chem. Soc. 70, 1037 [1948].
¹⁶⁷) Dieselben, Science [New York] 106, 277 [1947].
¹⁶⁸) D. B. Melville, J. R. Rachele u. E. B. Keller, J. biol. Chemistry 169, 419 [1947].
¹⁶⁹) C. J. Collins, J. Amer. Chem. Soc. 70, 2418 [1948].
¹⁷⁰) Ch. Heidelberg, Ph. Brewer u. W. G. Dauben, ebenda 69, 1389 [1947].
¹⁷¹) R. B. Turner, Science [New York] 106, 248 [1947].
¹⁷²) L. C. Livingston u. G. Medes, J. gen. Physiol. 31, 75 [1947].
¹⁷³) E. W. Putnam, W. Z. Hassid, G. Krotkov u. H. A. Barker, J. biol. Chemistry 173, 785 [1948].
^{173a}) B. Riegel u. F. S. Prout, J. org. Chemistry 13, 933 [1948].
¹⁷⁴) G. W. Kilmer u. V. du Vigneaud, J. biol. Chemistry 154, 247 [1944].
¹⁷⁵) R. Schoenheimer, S. Ratner u. D. Rittenberg, ebenda 130, 703 [1939]; N. Weissman u. R. Schoenheimer, ebenda 140, 779 [1941].
^{175a}) L. F. Cavalieri, J. F. Tinker u. A. Bendich, J. Amer. Chem. Soc. 71, 533 [1949].
¹⁷⁶) M. D. Kamen: Radioactive Tracers in Biology, Academic Press, New York 1947.
¹⁷⁷) Vgl. diese Ztschr. 60, 220 [1948].