

Äthylpalmitat 48 h vor der Bestrahlung gegeben wurde; wenn es 96 h vor der Bestrahlung injiziert wurde, war es wirkungslos.

Die bisherigen Versuchsergebnisse können noch nicht als ein Beweis dafür angesehen werden, daß eine „chemische Splenektomie“ an der Strahlenschutzwirkung des Äthylpalmitats ursächlich beteiligt ist.

### Erhöhung der Kapillardurchlässigkeit für Makromoleküle durch einige Polypeptide

M. Frimmer, Gießen

Nach schonender Säurehydrolyse von Kalbsthymushomogenat konnte durch Chromatographie an CM-Sephadex ein Polypeptid gewonnen werden, das die Kapillardurchlässigkeit der Kaninchenhaut schon in kleinen Dosen erheblich steigert (Messungen mit Evans-Blau und Radiogold-Methode). Die wirksamsten Präparate ergaben bei der Hochspannungselektrophorese noch 2 fast gleich schnell wandernde Fraktionen. Die Präparate waren Ninhydrin-, Biuret-, Sakaguchi- und Bromphenolblau-positiv.

Im Gegensatz zu den Plasmakinen steigert das isolierte Thymuspeptid zwar die Kapillardurchlässigkeit, führt aber am isolierten Darm und Uterus nicht zur Kontraktion. Es senkt den Blutdruck nicht (Kaninchen).

Mit der Radiogold-Methode wurden neben dem Thymuspeptid Nukleinsäurepräparate, Protamine und Histone sowie mehrere gefäßaktive Polypeptide quantitativ auf ihre die Kapillardurchlässigkeit steigernde Wirkung untersucht. Am stärksten wirksam waren Bradykinin und Kallidin. Weit weniger wirksam war Eledoisin. Bradykinin-analoge Oktapeptide steigerten z.T. die Kapillardurchlässigkeit oder waren unwirksam. Die Kapillarwirksamkeit geht nicht mit der Wirkung am isolierten Darm parallel. Substanz-P-Präparate von mittlerer Reinheit steigerten die Kapillardurchlässigkeit für kolloidales Gold mäßig stark.

Es wird postuliert, daß bei entzündlichen Prozessen neben den enzymatisch präformierten Polypeptiden der Plasmakinin-Reihe auch unspezifische Abbauprodukte der Zellkerne (Histonbruchstücke) eine wesentliche Rolle spielen.

### Synthese organischer Stoffe aus Kohlensäure in wässriger Lösung unter Einwirkung von UV-Licht (ohne Anwesenheit von Chlorophyll)

N. Getoff, Wien

Es wurde gezeigt, daß  $\text{CO}_2$  in wässriger Lösung auch ohne Chlorophyll durch Bestrahlung mit UV-Licht reduziert und in organische Substanzen umgewandelt werden kann. Als Primärprodukte wurden bisher Formaldehyd und Ameisensäure neben Kohlenmonoxyd und Wasserstoffperoxyd nachgewiesen. Die Ausbeute ist vom pH-Wert der Lösung stark abhängig. So fällt die Geschwindigkeitskonstante der Aldehydbildung von  $1,05 \cdot 10^{-3} \text{ sek}^{-1}$  bei pH = 4 auf  $0,68 \cdot 10^{-3} \text{ sek}^{-1}$  bei pH = 8,7 ab. Es sind Lichtquanten verschiedener Wellenlängen am Reaktionsprozeß beteiligt. Fe(II)-Ionen in saurem Medium (pH = 3,5) geben eine Ausbeuteerhöhung.

Außerdem wurde festgestellt, daß Kohlensäure durch UV-Licht als Carboxyl-Gruppe in organische Substanzen eingeführt werden kann. Beispielsweise wurde bei UV-Bestrahlung einer 0,1 m wäßrigen Lösung von n-Butanol in Gegenwart von Kohlensäure  $\alpha$ -Oxyvaleriansäure erhalten, während bei Bestrahlung einer 0,1 m Acetaldehyd-Lösung neben Milchsäure auch ein noch nicht identifiziertes Estergemisch nachgewiesen werden konnte. Essigsäure läßt sich unter den gleichen Bedingungen zu Malonsäure carboxylieren. Diese Ergebnisse beweisen die Möglichkeit der Bildung höherer organischer Substanzen aus  $\text{CO}_2$  durch Bestrahlung mit UV-Licht in wässriger Lösung ohne die Anwesenheit von Chlorophyll.

### Die Reduktion von Perchlorat durch Bakterien

E. Huckenthal und W. Mannheim, Heidelberg

Mit Hilfe von  $^{36}\text{Cl}$ -markiertem Perchlorat ließ sich (entgegen früheren Befunden) nachweisen, daß eine Reihe von Bakterienstämmen aus den verschiedensten Gattungen Perchlorat zu reduzieren vermag. Die Stämme besitzen alle eine Nitratreduktase. Chlorat als mögliches Reaktionsprodukt war nicht nachweisbar. Durch Subkultivierung einiger dieser Stämme (bis zu 40 Passagen) auf Nährböden steigender Perchlorat-Konzentration wurden Varianten mit erhöhter Perchlorat-Toleranz erhalten. Sie unterscheiden sich von den Wildstämmen durch den Verlust des Nitrat- und Perchlorat-Reduktionsvermögens, während sich in den sonst untersuchten biochemischen Eigenschaften (Katalaseaktivität und  $\text{O}_2$ -Werte verschiedener Substrate) kein charakteristischer Unterschied zwischen Variante und Wildstamm fand. Der Versuch, die Identität der Nitrat- und Perchlorat-reduktase an ruhenden Zellen von *Bac. cereus* durch den Nachweis einer gegenseitigen kompetitiven Hemmung der Reduktionen zu beweisen, mißlang. Dagegen konnte gezeigt werden, daß die gegenseitige Beeinflussbarkeit des Umsatzes beider Anionen bei der intakten Zelle als Veränderungen der Permeabilitäten zu deuten sind. An zellfreien Extrakten dieses Keimes dagegen, ließ sich eindeutig eine gegenseitige kompetitive Hemmung nachweisen. Die Michaelis-Konstanten betragen  $0,17 \cdot 10^{-3}$  molar (Nitrat) und  $3,8 \cdot 10^{-3}$  molar (Perchlorat); die Umsatzgeschwindigkeiten verhalten sich wie 1:1,2 (Nitrat: Perchlorat). Die Untersuchung des Coferment-Bedürfnisses für die Reduktion von Nitrat und Perchlorat bei zellfreien Extrakten ergab dementsprechend keinen prinzipiellen Unterschied; es besteht ein absolutes Bedürfnis für DPNH bzw. TPNH und FAD. Die Perchlorat- und Nitratreduktion werden also bei Bakterien von dem gleichen Enzym, der Nitratreduktase, katalysiert. Es sei auf eine selten zu findende Parallelität zwischen anorganischer und enzymatischer Katalyse hingewiesen: Als bestes Reduktionsmittel für Perchlorat gilt z. Zt. Zn- oder Cd-Amalgam mit Molybdän als Katalysator, wobei ein Valenzwechsel zwischen  $\text{Mo}^{\text{V}}$  und  $\text{Mo}^{\text{VI}}$  angenommen wird. In allen bisher näher untersuchten Nitrat-reduktasen ließ sich Molybdän als katalytisch wirksames Element nachweisen, wobei ebenfalls ein Valenzwechsel  $\text{Mo}^{\text{V}}$  bis  $\text{Mo}^{\text{VI}}$  wahrscheinlich gemacht werden konnte.

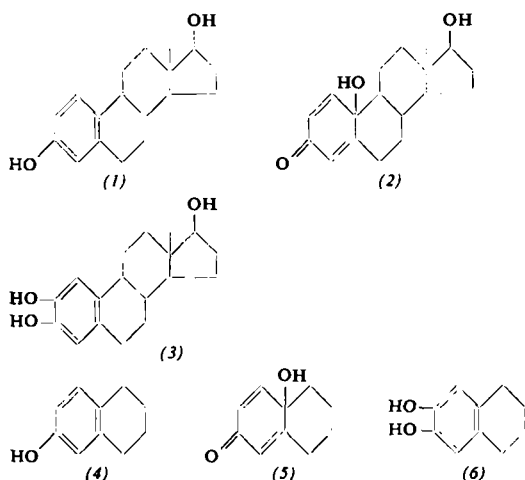
### o-Dihydroxy-Verbindungen als Metaboliten von Oestradiol-(17 $\beta$ ) und Tetralol-(6) in Rattenleber-Mikrosomen in vitro

E. Hecker (mit G. Nowoczek), München

Östradiol-(17 $\beta$ ) (1) sowie Östron werden fast ausschließlich von der Mikrosomenfraktion der Rattenleber metabolisiert. Die Reaktion benötigt TPNH als Cofaktor und ist an die Anwesenheit von Sauerstoff gebunden. So verschwindet Östradiol-(17 $\beta$ )-[16- $^{14}\text{C}$ ] aus dem Inkubationsansatz in 15 min fast vollständig. Die Radioaktivität erscheint zu 75 % in den ätherlöslichen und zu 8 % in den wasserlöslichen Anteilen. 16 % sind homöopolar an das mit Trichloressigsäure fällbare Protein gebunden.

In den ätherlöslichen Anteilen solcher Ansätze ist als p-Hydroxylierungsprodukt das 17 $\beta$ -Hydroxy-östra-p-chinol-(10 $\beta$ ) (2) nachgewiesen worden. Als weiterer Metabolit wird nach papierchromatographischer Abtrennung aus der ätherlöslichen Fraktion, Acetylierung und Umkristallisation bis zur konstanten spezifischen Aktivität 2-Hydroxy-östradiol-(17 $\beta$ ) (3) gefunden. Die Bildung von (3) erfordert TPNH als Cofaktor. Die gleichzeitig ablaufende Bindung von Radioaktivität an das säurefällbare Protein wird unter reinem Sauerstoff wenig stimuliert, unter Kohlenoxyd wenig, unter Stickstoff und mit p-Chloromercuri-benzoat vollständig gehemmt. Es stellt sich die Frage nach der Spezifität der TPNH-abhängigen Östrogenhydroxylase. Daher wurde auch die Hydroxylierung von Tetralol-(6) (4) in ähnlichen Ansätzen untersucht.

Aus Tetralol-(6)-[4-<sup>14</sup>C] entsteht bei 10 °C in 15 min Tetralin-p-chinol (5), das sich als 2,4-Dinitrobenzol-<1-azo-6>-tetralin isolieren läßt. Die Ausbeute durchläuft in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ein Maximum und erreicht nach 15 min ein Plateau. Die gleichzeitige Proteinbindungsreaktion ist linear. In demselben Zeitraum wird eine geringe aber signifikante Menge 6,7-Dihydroxy-tetralin (6) gebildet (als Di-benzoat gereinigt).



Der Nachweis von p- und o-Hydroxylierungsprodukten stützt den früher formulierten Mechanismus dieser enzymatischen Hydroxylierung als eine primäre Dehydrierung des Phenols zum Phenoxyradikal. Um zu prüfen, ob das chemisch möglich ist, wurde die Dehydrierung von Tetralol-(6) durch Hydroxyl-Radikale untersucht, die bei der Fe<sup>2+</sup>-katalysierten Zersetzung von Wasserstoffperoxyd (Fentons-Reagenz) generiert werden. Es gelingt nach entspr. Trennungen Tetralin-p-chinol als 2,4-Dinitrobenzol-<1-azo-6>-tetralin nachzuweisen und säulenchromatographisch zu isolieren. Aus analogen Ansätzen kann 6,7-Dihydroxy-tetralin durch Bleisalz-fällung isoliert, papierchromatographisch gereinigt und spektrophotometrisch bestimmt werden.

#### Aktiver Glykolaldehyd als Zwischenprodukt der Transketolase-Reaktion

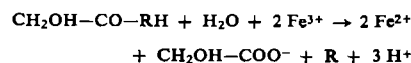
R. Kattermann und H. Holzer, Freiburg/Breisgau

Das am Pentosephosphat-Cyclus beteiligte Enzym Transketolase benötigt Thiaminpyrophosphat (TPP) als Coenzym. Seit langem vermutet man, daß bei der Einwirkung des Enzyms auf das Ketolsubstrat ein „aktiver Glycolaldehyd“ gebildet wird, der dann auf den Acceptor-aldehyd übertragen wird. In Inkubationsversuchen mit gereinigter Transketolase und uniform <sup>14</sup>C-markiertem D-Fructose-6-phosphat finden Votr., daß nach Abstoppen des Reaktionsansatzes mit heißem Methanol ca. 1 % der Radioaktivität bei der Chromatographie auf Dowex-2-Säulen zusammen mit dem TPP eluiert wird. Nach Abspaltung des Pyrophosphats mit saurer Phosphatase verhält sich der „aktive Glycolaldehyd“ bei Papierchromatographie und Elektrophorese wie Thiamin. Bei anschließender Behandlung mit Bisulfit findet Spaltung in Pyrimidin- und Thiazol-Teil statt, wobei letzterer die Radioaktivität trägt. Bei Inkubation des <sup>14</sup>C-markierten „aktiven Glycolaldehyds“ mit D-Ribose-5-phosphat bzw. Glycolaldehyd als Acceptor-aldehyde in Gegenwart von Apotransketolase werden radioaktives Seduheptulose-7-phosphat bzw. L-Erythrulose gebildet. L-Erythrulose kann mit DPNH und Polyol-dehydrogenase spektrophotometrisch erfaßt werden. Durch Einwirkung von Perjodsäure auf „aktiven Glycolaldehyd“ entsteht Formaldehyd, der entweder als Dimedon-Derivat oder colorimetrisch mit Acetylaceton und Ammoniumacetat nachgewiesen werden kann. Analog zu dem bei der Decarboxylierung bzw. Oxydation der Brenztraubensäure beschriebenen „aktiven Acetaldehyd“ (2-Hydroxyäthyl-TPP) dürfte im „aktiven Glycolaldehyd“ 2-(α,β-Dihydroxyäthyl)-TPP vorliegen.

#### Zum Wirkungsmechanismus der Phosphoketolase

W. Schröter und H. Holzer, Freiburg/Breisgau

Gereinigte Phosphoketolase aus *Lactobacillus plantarum* reduziert Eisen(III)-cyanid mit den Substraten Xylulose-5-phosphat, Hydroxypyruvat und Fructose-6-phosphat. Das Geschwindigkeitsverhältnis ist in der Reihenfolge der Substrate 100:56:14. Als Oxydationsprodukt entsteht pro Mol Fe(III)-cyanid 0,5 Mol Glycolsäure.



In Gegenwart von Orthophosphat und bei Abwesenheit von Fe(III)-cyanid wird mit den genannten Substraten im gleichen Geschwindigkeitsverhältnis Acetylphosphat gebildet, wenn man 1 Mol Acetylphosphat äquivalent zwei Molen Fe(II)-cyanid setzt. Beide Reaktionen sind von Thiaminpyrophosphat abhängig. Durch Zusatz von Orthophosphat wird die Geschwindigkeit der Reduktion von Fe(III)-cyanid um 1/3 vermindert.

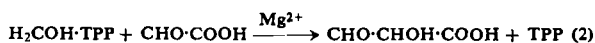
Aus Analogiegründen zur Transketolase-Reaktion sowie zur oxydativen Decarboxylierung von Pyruvat und Hydroxypyruvat wird als erstes, beiden durch Phosphoketolase katalysierten Reaktionen gemeinsames Zwischenprodukt „aktiver Glycolaldehyd“ (2-[α,β-Dihydroxyäthyl]-thiaminpyrophosphat) angenommen. Die Kinetik der Reaktionen und weitere Zwischenstufen, insbesondere die Dehydratisierung von „aktivem Glycolaldehyd“ zu 2-[α-Hydroxyvinyl]-thiaminpyrophosphat und dessen Tautomerisierung zu Acetylthiaminpyrophosphat als Zwischenstufen der Acetylphosphatbildung, wurden besprochen.

#### Zum Mechanismus der Carboligase-Reaktion. Ein neuer „aktiver“ Formaldehyd

J. Koch und L. Jaenicke, Köln

Ein auf Oxalsäure wachsendes Bakterium der Gattung *Pseudomonas* braucht für den Abbau des Oxalats neben Coenzym A als weiteren Cofaktor Thiaminpyrophosphat (TPP). Die zunächst über Oxalyl-CoA entstehende Glyoxylsäure wird in der TPP-abhängigen Glyoxylat-Carboligase-Reaktion zu Tartronaldehydsäure (CHO·CHOH·COOH) umgewandelt und nach Reduktion zu Glycerinsäure in den Stoffwechsel eingeführt. Bei anderen analogen „Carboligasen“ treten wie bekannt TPP-gebundene Aldehyde als Zwischenstufen auf.

Das daher in der Glyoxylat-Carboligase-Reaktion zu erwartende Intermediärprodukt 2-Hydroxymethyl-TPP wurde von den Votr. durch Kondensation von TPP mit Formaldehyd bei pH = 5 bis 6 synthetisiert und seine Struktur durch Abbau bewiesen. Hierzu wurden folgende neue Verfahren entwickelt: 1. Durch Spaltung des 2-Hydroxymethyl-thiazol-Ringes mit Hydroxylamin wurde Glykolyldihydroxamsäure erhalten. 2. Nach Öffnen des Thiazol-Ringes mit Alkali, Methylierung und saurer Spaltung wurde Methoxyessigsäure als Abbauprodukt isoliert. Extrakte aus *Pseudomonas* sp. bilden aus <sup>14</sup>C-Hydroxymethyl-TPP und Glyoxylsäure markierte Tartronaldehydsäure. Ihre spezifische Aktivität entspricht etwa derjenigen des eingesetzten Hydroxymethyl-TPP. Der Mechanismus der Carboligase-Reaktion ist daher als Acetoin-Kondensation anzusehen: Nach TPP-katalysierter Decarboxylierung eines Moleküls Glyoxylsäure (I), wird das entstandene TPP-gebundene Formaldehyd-Bruchstück mit einem zweiten Molekül Glyoxylsäure kondensiert (2).



Bei der Carboligase-Reaktion tritt also der Formaldehyd als nucleophiler Partner auf, während bei den bisher bekannten Formaldehyd-Übertragungen mittels Tetrahydrofolsäure nucleophile Reaktionspartner erforderlich sind.