

## Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents

### Zur Indikation biochemischer Vorgänge durch kristallisierendes Kupferchlorid

Langsames Verdunstenlassen wässriger Kupfer(II)-chloridlösungen auf einer umgrenzten Glasfläche führt je nach zugesetztem Lösungsgenossen zu charakteristischen Kristallgefügen<sup>1,2</sup>. Geringste Mengen Blut ergeben so durch Einbau oder Anlagerung von Cu-Eiweisskomplexen je nach Art und Herkunft des Blutes verschiedene Aggregate<sup>3</sup>, von denen die immer wieder betonte Häufigkeit von «Hohlformen» und «Querlagerungen» bei malignen Erkrankungen<sup>4</sup> hier von besonderem Interesse ist. Man war bisher nicht in der Lage, hierfür eine definierte Substanz verantwortlich zu machen. An Hand von Modellversuchen wurde daher in den letzten Jahren untersucht<sup>5</sup>, ob Störungen durch spiegelbildlich asymmetrische Substanzen<sup>6</sup>, also durch Verunreinigungen des Lösungsgenossen mit optischen Antipoden, in der Lage sind, sichtbare Habitusänderungen des im Van't Hoff'schen Sinne symmetrischen  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  zu induzieren.

Der Methodik wurde die grösste Aufmerksamkeit geschenkt, um reproduzierbare Resultate zu garantieren. Die Kristallisation erfolgte auf speziell gereinigten, horizontal gelagerten ( $\pm 0,02 \text{ mm/m}$ ) und mit einem parafinierten Glasring ( $\varnothing 72 \text{ mm}$ ) umgrenzten Diaplaten in einem Raum ( $0,45 \text{ m}^3$ ) konstanter Temperatur und Feuchtigkeit. Unter den Faktoren, die in mehreren hundert Kristallisationen auf ihren Einfluss untersucht und unter Kontrolle gebracht wurden, sollen folgende als Beispiel erwähnt werden: a) Die Reinigung der Platten, wobei zum Beispiel Netzmittel vermieden werden müssen. b) Spurenverunreinigungen im Lösungsmittel; entionisiertes Wasser von  $3 \cdot 10^6 \Omega$  war zum Beispiel noch unbrauchbar. c) Staubpartikel, diese sind in gewissen Grenzen ohne Einfluss. d) Vibrationen; ihr Effekt wird allgemein von Lösungsgenossen dominiert, sie müssen jedoch ausgeschaltet werden, da sie nicht nur die Ausbildung des Idealgefüges beim zusatzfreien Kupferchlorid, sondern auch den Einfluss enantiomorpher Lösungsgenossen unterdrücken. e) die Verdunstungszeit, die bei der Untersuchung asymmetrischer Zusätze ein «prearrangement» ( $> 15 \text{ h}$ ) vor Einsetzen der eigentlichen Kristallisation erlauben muss. Allgemein ergab sich, dass Faktoren, die zwar die Kristallisation des zusatzfreien Kupferchlorids dominieren, bei Kristallisationen mit den meisten Zusätzen vernachlässigt werden können, jedoch nicht bei asymmetrischen Zusätzen (Molekülen mit asymmetrischen C-Atomen), deren spezifische Wachstumsbeeinflussung sie empfindlich stören. Einige Testplatten mit reinem Kupferchlorid (Abb. 1) wurden daher pro Ansatz als Kontrolle mitkristallisiert.

Als Modellsubstanzen dienten optisch aktive Antipoden (und deren Mischungen) von Aminosäuren, die, wenn nötig, über ihre Chlorazetyl-derivate mit Taubenleberhomogenisat enzymatisch gereinigt waren, ferner Antipoden von Oxysäuren und von Aminopurinen, die aus optisch reinen Aminosäuren synthetisiert wurden, sowie einige elektrophoretisch einheitliche Proteine. Diese Zusätze wurden in

Mengen von 1–3% mit Kupferchlorid kristallisiert. Ein durch die reine L-Form induziertes Kristallgefüge war – wie zu erwarten – in jedem Fall identisch mit dem der D-Form der gleichen Substanz. Während chemisch verschiedene Substanzen gleicher Konfiguration (L-Reihe) bei sehr unterschiedlichen Endaggregaten (zum Beispiel Albumin sternförmige, grob verzweigte nicht verwobene Nadeln; Globulin fein verzweigte Gefüge subparalleler, verwobener Fasern) in Mischungen lediglich die zu erwartenden kontinuierlichen Übergänge von der einen zur anderen Endform induzierten, fand bei allen bisher untersuchten Mischungen optischer Antipoden, trotz deren identischer Endbilder eine «Entflechtung» des Kupferchloridgefüges statt, die oft schon bei einer 1%igen Verunreinigung mit dem Antipoden einsetzte (Abb. 2). Besonders auffällig ist die Wachstumsbeeinflussung durch optisch reine Mandelsäure (Abb. 3a bzw. 3c) verglichen mit der des inaktiven Gemischs (Abb. 3b). Der Typus solcher Aggregate ist von Versuch zu Versuch identisch reproduzierbar. Selbst der Flächeninhalt der planimetrierten «Vakuolen» in Abbildung 2b zum Beispiel variiert bei gleichen Bedingungen in zwanzig Versuchen nur um  $\pm 11\%$ .



Abb. 1: Idealgefüge des reinen Kupferchlorids ohne Zusatz. 100 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  in 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

<sup>1</sup> A. und O. SELAWRY, *Die Kupferchloridkristallisation in Naturwissenschaft und Medizin* (Fischer Verlag, Stuttgart 1957).

<sup>2</sup> W. KLEBER *et al.*, *Z. Kristallogr.* 111, 3 (1959).

<sup>3</sup> E. PFEIFFER, *Münchn. med. Wschr.* 3, 92 (1938). – N. JUNG, *Pharmazie* 10, 628 (1952). – H. RIEBELING, *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 170, 209 (1953).

<sup>4</sup> A. SELAWRY, *Med. Kll.* 47, 107 (1952). – W. KREBS, *Helv. chir. Acta* 14, 232 (1947). – J. TRUMPF und S. RASCHER, *Münchn. med. Wschr.* 86, 544 (1939). – O. SELAWRY, *Arch. Geschwulstf.* 12, 367 (1958).

<sup>5</sup> F. VESTER, XVI. Congr. of pure and appl. Chem., Paris (1957).

<sup>6</sup> Spiegelbildliche Asymmetrie bezieht sich auf eine Spiegelebene zwischen zwei asymmetrischen Objekten; diese sind Spiegelbilder voneinander, besitzen jedoch selber keine Spiegelebene.

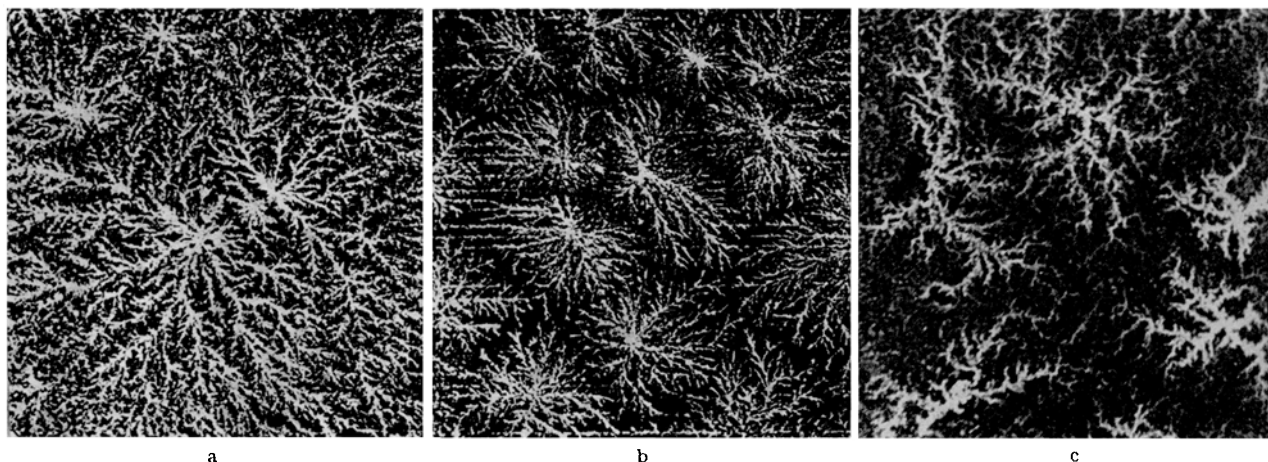


Abb. 2: Spurenverunreinigung mit Antipoden. 100 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  + 2 mg 6-Succinaminopurin (SAP)

a) optisch reiner Zusatz (100 D-SAP + 0 L-SAP); b) 1%ige Verunreinigung (99 D-SAP + 1 L-SAP); c) inaktives Gemisch (50 D-SAP + 50 L-SAP). Ausschnitte je 30 mm der Plattenmitte

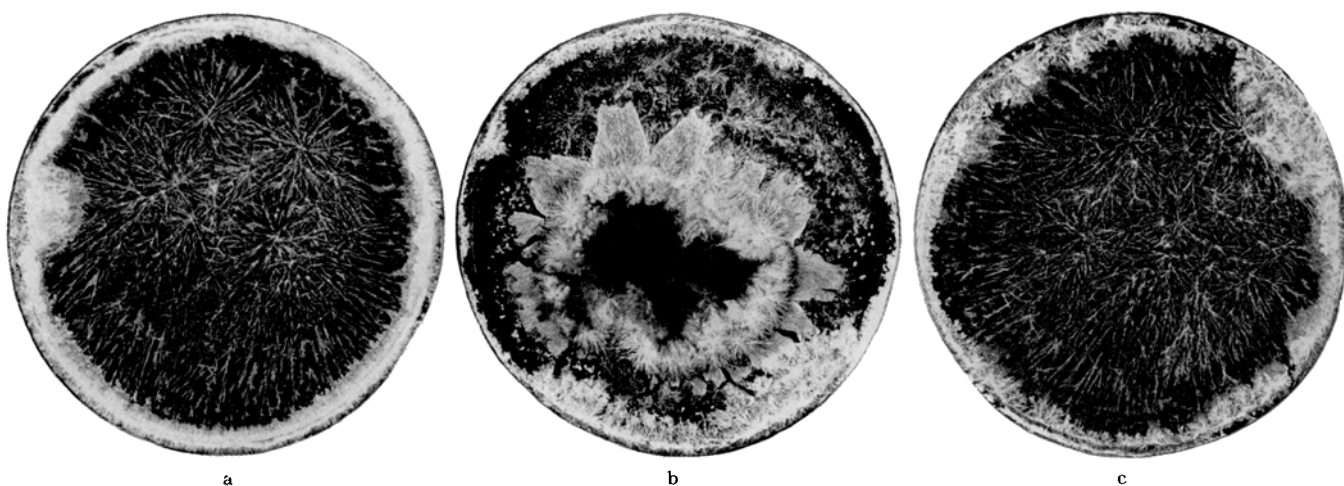


Abb. 3: «Entflechtung» identischer End-Aggregate bei Mischungen der Antipoden. 100 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  + 3 mg Mandelsäure

a) optisch reiner Zusatz (3% L-Mandelsäure); b) inaktives Gemisch (1,5% D- + 1,5% L-Mandelsäure); c) optisch reiner Zusatz (3% D-Mandelsäure)

Mehrere der hier angeführten experimentellen Befunde sowie auch theoretische Überlegungen<sup>7</sup> deuten auf die Möglichkeit eines besonderen Mechanismus der Wachstumsbeeinflussung hin, der spezifisch auf Zusätze der enantiomorphen Formen anspricht. Die Übertragung einer spezifischen Information spiegelsymmetrischer Asymmetrie wäre z.B. wie folgt denkbar: Ein auf der Glasoberfläche durch Van der Waals'sche Kräfte in vier verschiedene Richtungen (*Oben-Luft*, *Unten-Glas*, *Plattenzentrum*-beginnende Kristallisation, *Plattenrand*-Wachstumsrichtung bzw. Lösung) als Van't Hoff'sches Tetraeder orientiertes asymmetrisches Molekül (oder dessen Komplexverbindung mit Kupferchlorid) vermag zwei energetisch gleiche Positionen (Auflagerungen) des Kupferchlorids, bei denen lediglich rechts und links vertauscht sind, zu unterscheiden und könnte mit diesen ähnlich wie bei der Bildung von Diastereomeren zwei in ihrem Energieinhalt unterschiedliche «Addukte» bilden. In der Tat sind zwei solche spiegelsymmetrische Auflagerungen des Kupferchlorids kristallographisch möglich und werden durch die quasi-zweidimensionale Kristallisationsanordnung manifest, da sie erst unter Zuhilfenahme der dritten Dimension, zum Beispiel erst durch eine  $\sim 90^\circ$ -Drehung um die c-Achse, ineinander übergehen können. Es sind

dies die Auflagerungen auf (110) und ( $1\bar{1}0$ ) (Abb. 3), die zwar polarisationsoptisch zum Beispiel nicht unterscheidbar sind, jedoch durch die Anwesenheit asymmetrischer Lösungsgenossen voreinander Bevorzugung erfahren, was zu den beobachteten Störungen im Gefügebild Anlass geben könnte; ein Mechanismus, der auf Zusätze gleicher Konfiguration bzw. auf solche mit «normalen», symmetrischen C-Atomen gar nicht ansprechen würde. Auf andere Möglichkeiten einer allerdings unspezifischen Beeinflussung wie über die adsorptionsfreudigen Endflächen (001) oder durch Auto-Diastereomerisierung der Mandelsäure über das zweiwertige Kupfersalz kann hier nicht näher eingegangen werden.

Die Ergebnisse sind neben ihrer womöglichen Bedeutung für das noch ungelöste Problem, optische Verunreinigungen in Gemischen nachzuweisen, vor allem von Interesse im Zusammenhang mit der Frage, ob die Interpretation gewisser Kristallstrukturen als Hinweis auf krebsartige Erkrankungen<sup>1,4</sup>, wie sie erstmalig von R. STEINER<sup>1</sup> angeregt wurde, biochemisch fundiert werden

<sup>7</sup> F. VESTER, XVII. Congr. of pure and appl. Chem., München, Ref. B 206 (1959).

kann. Kinetische Untersuchungen von KUHN<sup>8</sup> lassen die enzymatische Entstehung hoher optischer Reinheitsgrade im Innern biochemischer Systeme nur als temporären Effekt erscheinen. Obwohl die im Laufe der Zeit so entstehenden endogenen Antipoden genaue Spiegelbilder der natürlichen Substanzen sind, das heisst bei gleichen physikalischen Eigenschaften auch chemisch gleichartig reagieren, könnten sie sich durch Bildung von Diastereomeren wie Antimetaboliten verhalten und im Gegensatz zu exogenen Antipoden, gegen die sich der Organismus im allgemeinen zu schützen weiss<sup>9</sup>, zu empfindlichen Störungen im Zellstoffwechsel führen. Angesichts der gezeigten Beeinflussung des Kristallwachstums durch optische Verunreinigungen liegt es nahe, auch bei der Ausbildung der als für kanzeröse Fälle häufig angegebenen Kristallaggregate bei der erwähnten «diagnostischen Biokristallisation» nicht die eine oder andere Einzelsubstanz, sondern ein gemeinsames Prinzip, wie etwa eine beginnende Razemisierung, verantwortlich zu machen. Bestärkt wird diese Ansicht durch Untersuchungen von SELAWRY, welche zeigen, dass eine offensichtlich starke Beziehung der Häufigkeit solcher Texturen nicht nur mit malignem Wachstum<sup>4</sup>, sondern auch mit dem Alter der Versuchsperson<sup>1,10</sup> (allmähliche Razemisierung?) besteht.

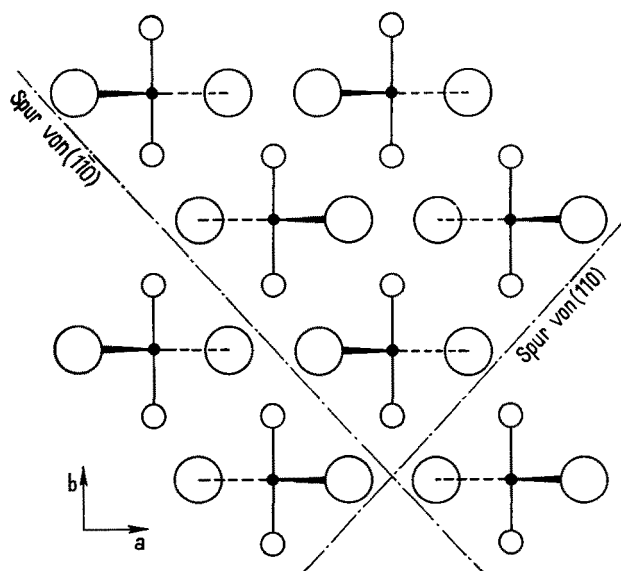
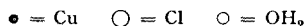


Abb. 4: Modell eines Kupfer(II)chloridkristalls mit 2 spiegelbildlichen Auflagerungsmöglichkeiten. Auf (110) aufliegende Chloratome zeigen durchgehend nach rechts, auf (1 $\bar{1}$ 0) aufliegende durchgehend nach links vom Cu-Zentralatom aus gesehen. (Wachstumsrichtung = c-Achse, senkrecht zur Papierebene)



Eine ausführliche Beschreibung sämtlicher Ergebnisse erfolgt an anderer Stelle. Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Der Autor möchte Herrn Prof. Dr. H. SEIFERT, Münster, für seine Anregungen und sein ermutigendes Interesse sowie Herrn Dr. D. JUNG, Saarbrücken, für zahlreiche Diskussionen seinen aufrichtigen Dank aussprechen. Für manch wertvolle Hilfe bei der Ausführung von Vorversuchen fühlt sich der Autor den Herren Dr. O. SELAWRY, Buffalo, N. Y., und Prof. Dr. K. E. SCHAEFER, New London, Mass., verbunden.

F. VESTER

Biochemische Abteilung des Instituts für organische Chemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 12. Januar 1960.

### Summary

It is shown that differences in the asymmetry (optical impurities) of an added compound may influence considerably the crystallisation pattern of cupric chloride when crystallised under constant conditions on a glass plate. The high amplification of a purely formal difference in asymmetry calls for a specific information mechanism, one crystallographic possibility of which is discussed. This shows an approach to the problem of recognizing optical impurities in mixtures. The results are discussed in connection with the spontaneous racemisation in biochemical systems and may contribute to the understanding of the 'diagnostic biocrystallisation' of copper chloride in cases of cancer

<sup>8</sup> W. KUHN, Exper. 11, 429 (1955).

<sup>9</sup> Z. B. A. MEISTER, *Biochemistry of the Aminoacids* (Academic Press Inc., New York 1957), p. 110.

<sup>10</sup> O. SELAWRY, private Mitteilung.

### Über die Entstehung von Mehrfachbildungen der Flügelimaginalscheibe bei Großschmetterlingen

Auffallende Aberrationen einer grössenmässig fluktuierenden, normalerweise funktionslosen Gewebestülpung am oberen Imaginalscheibenrand der Flügelimaginalscheibe wurden seit längerer Zeit von dem Verfasser an den Raupen verschiedener Großschmetterlingsarten beobachtet (Abb. 1 und 2b, dU). Im Inneren dieser hohlen Gewebetaschen begann nämlich dann, wenn 1–2 Tracheen in sie eingewachsen waren, eine ähnliche Strukturbildung wie im präsumptiven Flügelblatt (vgl. hierzu Abb. 2a, dU<sub>2</sub>); dabei verklebten die einander zugewandten Hypodermisunterseiten der dU mit ihren Basalmembranen zu einer Mittelmembran (Mim) und differenzierten ein Stelzellenepithel aus. Durch eine aufgewölbte Hypodermispartie (vgl. hierzu Abb. 3, Zw) konnte überdies der nach dorsal auswachsende Gewebestummel der dU von dem ventral gelegenen präsumptiven Flügelblatt abgetrennt werden und einen eigenen Zugang aus der Leibeshöhle erhalten (vgl. hierzu Abb. 3, Zu<sub>1</sub> und Zu<sub>2</sub>). An unoperierten Flügelimaginalscheiben entwickelten sich solche Bildungen jedoch nicht weiter. Erst in postoperativer Folge bestimmter Imaginalscheibendefekte (zum Beispiel auto- und heteroplastische Implantationen bzw. Teil-exstirpationen des präsumptiven Flügelblattes) traten überzählige dorsale Flügelblattbildungen mit eigenem Tracheen- und Lakunensystem auf (Abb. 3, Fltr und Lak), welche jedoch offensichtlich nicht aus der Wundstelle<sup>1</sup>, sondern aus der dU entstehen. Letztere offenbart demnach im 4. und 5. Raupenstadium eine latente Organbildungspotenz, welche durch einen anderwärts gesetzten Wundreiz an der Flügelimaginalscheibe aktiviert werden kann. Regeneriert nun noch zusätzlich über einer solchen Doppelbildung (Abb. 3, dFlb und vFlb) eine Einfachbildung (R) aus der Hypodermis, so entsteht eine aus zwei Komponenten zusammengesetzte Dreifachbildung des präsumptiven Flügelblattes, welche in 2 verschiedenen Peripodialsäcken in der Leibeshöhle liegt (Abb. 3, 1. Kom-

<sup>1</sup> H. KROEGER, Roux' Arch. Entw.-Mech. Organ. 150, 401 (1958).