Für das Redoxgleichgewicht

wurde ein Normalpotential von $E_0 = -0,35 \text{ V}$ (20°) gefunden.

Auf Grund des stark negativen Redoxpotentials der Carbonylanionen sind die Carbonylwasserstoffe des Kobalts und Eisens eindeutig *metastabile Verbindungen*, die sich in ihrer Beständigkeit z. B. mit *Tellurwasserstoff*⁵ vergleichen lassen. Dieses Ergebnis läßt die leichte Zersetzung der Carbonylwasserstoffe in mehrkernige Carbonyle und molekularen Wasserstoff verstehen. Eine ausführliche Veröffentlichung der Untersuchungen erfolgt nach Abschluß einiger kinetischer Messungen an anderer Stelle.

Bei der Auswertung der Normalpotentiale für Eisen-carbonylwasserstoff hat Herr Dipl.-Chem. J. Sedlmeier wertvolle Beiträge geleistet.

⁵ Für das System $\text{TeH}_2 \cdot \text{aq} / \text{Te} + \text{H}_2 + 2 e^-$ beträgt E_0 etwa $-0,7 \text{ V}$.

Autoradiographisches Verfahren zur qualitativen papierelektrophoretischen Auftrennung kleiner und kleinster Eiweißmengen

Von Hermann Bennhold, Ekkehard Kallee und Eva Roth

Medizin. Univ.-Klinik Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. H. Bennhold)

(Z. Naturforschg. **7b**, 324 [1952]; eingeg. am 22. April 1952)

¹³¹J-signiertes Serum^{1,2} normaler Eiweiß (= E.W.)-Konzentration läßt bei der Papierelektrophorese und nachfolgenden Autoradiographie der Elektrophoresestreifen im Falle des fest eingebauten Jods eine Aufgliederung in die typischen Fraktionen erkennen (Abb. 1*). Etwa überschüssiges anorganisches ¹³¹J wandert hierbei in den Anodenpuffer. Es kann also mit dieser Methode entschieden werden, ob ein Jodeinbau bei der Jodierung eines Serums tatsächlich erfolgt ist oder nicht. Ebenso lassen sich Gewebshomogenisate untersuchen (Abb. 2).

Dagegen läßt sich stark verdünntes Serum papierelektrophoretisch nicht auftrennen, weil die E.W.-Lösung vom Papier zu stark absorbiert wird (Abb. 3). Um auch noch sehr stark verdünnte E.W.-Lösungen bzw. E.W.-Spuren sichtbar zu machen, kann man diese mit entsprechend geringen Träger-J-Mengen unter Beibehaltung relativ hoher ¹³¹J-Konzentrationen ($> 0,3 \text{ mC pro ccm des Gesamtansatzes}$) markieren, z. B. nach¹. Zur Inaktivierung des Papierstreifens gibt man bei Verwendung der Graßmann-Apparatur³ auf die Auftragstelle zunächst $0,01 \text{ ccm}$ eines nichtradioaktiven, etwa $2-6\%$ E.W.

* Abb. 1—5, s. Tafel, S. 288 b.

¹ Francis, Mulligan u. Wormall, Nature [London] **167**, 748 [1951].

² H. H. Banks, A. M. Seligman u. J. Fine, J. clin. Invest. **28**, 548 [1949].

³ W. Graßmann u. K. Hannig, Naturwiss. **37**, 496 [1950].

enthaltenden Serums; danach werden auf dieselbe Stelle $0,01 \text{ ccm}$ der radioaktiven E.W.-Lösung aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wird der getrocknete Streifen in einer gewöhnlichen Röntgenkassette autoradiographiert.

Wie Abb. 4 zeigt, ist die Beweglichkeit der Banden des markierten Serums unabhängig von der Art des „Ballast“-E.W. (Abb. 5); die Banden spurenjodierter Seren unterscheiden sich auch nicht von denen nativer Proteine. Eine quantitative Auswertung ist vorläufig noch nicht möglich, da die Gradation dem Bunsenschen und dem Schwarzschildschen, nicht dem Lambert-Beer'schen Gesetz (wie die gefärbten Streifen) gehorcht; ferner dürfte die Jodierbarkeit der Fraktionen wegen der verschiedenartigen Aminosäurezusammensetzungen variieren. Trotzdem eröffnen sich mit diesem Verfahren neue Möglichkeiten zur Auftrennung von Proteohormon-, Ferment-, Toxin- und anderen E.W.-Gemischen, die nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung stehen.

Die Änderung der serologischen Organspezifität beim Buttergelb-Tumor der Ratte im Vergleich zu normaler Leber

Von Eberhardt Weiler

Max-Planck-Institut für Biochemie, Abt. Virusforschung

Herrn Professor Hörlein zum 70. Geburtstag gewidmet

(Z. Naturforschg. **7b**, 324—326 [1952]; eingeg. am 8. April 1952)

Seit den Arbeiten von Landsteiner¹ u. a. ist bekannt, daß es organspezifische Antigene gibt. Diese Antigene sind in Partikelfractionen enthalten, die bei hoher Tourenzahl sedimentieren². Durch Immunisierung von Kaninchen mit solchen aus Rattenleber gewonnenen Partikeln läßt sich ein Antiserum gewinnen, das nach Erschöpfung mit den entsprechenden Partikeln aus Niere, zur Entfernung unspezifischer Antikörper, spezifisch nur noch mit Leber-Antigen reagiert. Es wurde untersucht, ob die organspezifischen Antigene noch in den Carcinomen enthalten sind, die durch Verfütterung von Buttergelb bei der Ratte entstehen, und ob in den Lebertumoren eine von den ursprünglichen Leberzellen abweichende Spezifität aufgetreten ist.

Material und Methode

Zur Untersuchung gelangten 6 mit Buttergelb erzeugte Tumoren (4 Hepatome und 2 Cholangiome) von Ratten des BD-III- oder BD-I-Stammes von Druckrey*. Zur Kontrolle dienten unbehandelte Tiere des gleichen Stammes. Alle Gewebe wurden histologisch untersucht

¹ K. Landsteiner, The specificity of serological reactions, Rev. Edit., Harvard University Press [1945].

² J. Furth u. E. A. Kabat, J. exp. Med. **74**, 257 [1941]; W. Henle, L. A. Chambers u. V. Groupé, ibid. **74**, 495 [1941].

* Herr Prof. Druckrey in Freiburg hat die Freundlichkeit, mir Ratten mit Buttergelb-Hepatomen zu überlassen, wofür ich ihm herzlich danke.

und nur möglichst nekrosefreies Tumormaterial aufgearbeitet.

Die frischen Gewebe wurden bei -79° eingefroren und meist einige Tage bei -15° aufbewahrt. Aus der Leber und den Lebertumoren wurden die Mitochondrien- und Mikrosomen-Fraktion gewonnen durch Zerreiben des Gewebes im Glasgewebemörser nach Ten Broeck und fraktionierte Zentrifugierung in 0,25-m. Saccharose-Lösung mit $m/100$ -Phosphatpuffer (8 sek. zu 2 prim.). Dabei trat keine Agglutination der Teilchen ein im Gegensatz zu Aufarbeitungen in Salzlösung oder elektrolytfreier Saccharose nach Hogeboom und Schneider³. Der Gewebebrei wurde zur Abtrennung der Zellkerne und größeren Zelltrümmer bei 1750 g 8 Min. zentrifugiert. Aus dem Überstand erhält man die Mitochondrienfraktion durch 10 Min. Zentrifugieren bei 9000 g. Die Mikrosomen lassen sich durch weitere $1/2$ -stdg. Zentrifugierung bei 55 000 g darstellen. Mikrosomen und Mitochondrien wurden 2-mal durch Resuspendieren des Sediments und abermaliges Zentrifugieren gewaschen.

Zur Darstellung der Antisera wurden Kaninchen mit insgesamt 6–9 mg N-Antigen-Material immunisiert. Als serologische Methode diente der Komplementbindungs-Test mit 2 lytischen Einheiten Komplement. Zur elektiven Absorption der Sera wurde Antigenmaterial verwendet, das durch $1/2$ -stdg. Zentrifugierung bei 18 000 g gewonnen worden war. Es absorbierte die entsprechenden Antikörper gegen Mitochondrien und Mikrosomen. Die Serum-Antigen-Gemische wurden 1 Stde. bei 37°C bebrütet, kamen dann 5 bis 20 Stdn. in den Kühlschrank und wurden schließlich scharf abzentrifugiert. Diese Absorption wurde so oft wiederholt, bis keine Reaktion mehr mit dem zur Absorption verwendeten Antigen-Material nachweisbar war. Das ist der wesentliche Punkt, in dem sich die angewandte Methodik von der von Malmgren und Bennison⁴ unterscheidet, die die gleiche Fragestellung an Mitochondrien und Mikrosomen von Mäuselebern bearbeiteten. Sie verwendeten offenbar nur unvollständig absorbierte Sera und kamen dadurch zu weniger klaren Ergebnissen.

Die Antisera gegen Leber- und Tumortypen geben sowohl mit Leber- als auch Tumor-Antigen Kreuzreaktionen. Die Bestimmung der minimalen Antigen-Dosis für die +++-Reaktion (MAD) wurde mit Antigen-Verdünnungen nach Potenzen von 2 im Antikörperüberschuß durchgeführt. Die Serumkonzentration betrug in jedem Ansatz das 5- bis 8-fache des Serumtiters, der vorher bestimmt worden war. Die MAD schwankte zwischen $1/2$ und 2 γN für Mikrosomen- und 2–8 γN für Mitochondrien-Antigen. Tumor-Antigen mit Anti-Leberserum gab höhere und uneinheitliche Werte für die MAD. Die Antisera, die durch Injektion von Mikrosomen gewonnen worden waren, hatten alle einen höheren Titer als die Anti-Mitochondrien-Sera. Qualitative Unterschiede zwischen Mikrosomen und Mitochondrien gleicher Herkunft waren jedoch nie festzustellen.

³ G. H. Hogeboom, W. C. Schneider u. G. Pallade, J. biol. Chemistry 172, 619 [1948].

⁴ R. A. Malmgren u. B. E. Bennison, J. nat. Cancer Inst. 11, 301 [1950]; R. A. Malmgren, B. F. Anderson u. C. C. Risley, ibid. 11, 1277 [1951].

Ergebnisse

1. In den Mikrosomen und Mitochondrien von 6 Lebertumoren ist fast in allen Verdünnungen kein spezifisches Leber-Antigen mehr nachweisbar (Tab. 1). Nur eines der Hepatome zeigte mit normalem Leberserum in der höchsten Dosierung von 16 γN eine Spuren-Reaktion, die wahrscheinlich auf nicht ganz vollständige Absorption des Serums zurückzuführen ist. Wenn noch spezifisches Antigen in den Tumortypen vorhanden wäre, so müßte seine Konzentration, bezogen auf Antigen-N, mindestens 32-mal geringer sein als in den Lebermikrosomen.

Antigen	Antigenmenge (γN)						
	32	16	8	4	2	1	$1/2$
Leber-Mikrosomen	—	—	++++	++++	++++	++++	±
Leber-Mitochondrien	—	—	++++	++++	+++	±	0
Tumor-Mikrosomen	0*	0	0	0	0	0	0
Tumor-Mitochondrien	—	0	0	0	0	0	0

* 32 γN -Dosis nur bei einem Hepatom geprüft

Tab. 1. Antigen-Verdünnungsreihen mit Antiserum gegen Leber-Mikrosomen, das mit Nieren-Antigen erschöpfend absorbiert worden war.

Antigen	Antigenmenge (γN)				
	8	4	2	1	$1/2$
Tumor-Mikrosomen	++++	++++	++++	+	0
Tumor-Mitochondrien	++++	++	0	0	0

Tab. 2. Antigen-Verdünnungsreihen mit Antiserum gegen Tumor-Mikrosomen, das mit Leberantigen erschöpfend absorbiert worden war.

2. In den Tumor-Mikrosomen und Mitochondrien ist ein Antigen nachweisbar, das in den Mikrosomen und Mitochondrien von normaler Leber nicht enthalten ist, denn Antiserum gegen Tumor-Antigen reagiert nach erschöpfender Absorption mit Leber-Antigen noch mit Tumor-Mikrosomen und Tumor-Mitochondrien (Tab. 2). Diese Reaktion ist aber nicht spezifisch für den Tumor, denn das Antiserum verliert durch Erschöpfung mit Nieren- oder Milz-Antigen seine Reaktionsfähigkeit völlig.

Im Anti-Tumor-Serum sind keine leberspezifischen Antikörper enthalten. Man kann nämlich mit Milz- oder Nierenpartikeln alle Antikörper auch aus einem Serum entfernen, das nicht vorher mit Leber-Antigen erschöpfend worden war. Dadurch wird das Fehlen des leberspezifischen Antigens (vgl. Abs. 1) unabhängig bestätigt.

3. In den Mikrosomen aus nicht-neoplastischem Lebergewebe von Ratten, die mit Buttergelb verschieden lange Zeit behandelt worden waren und z. Tl. einen Tumor gebildet hatten, ist das organspezifische Antigen der Leber verringert, aber nie verschwunden. Die Werte schwankten bei den einzelnen Tieren sehr stark. In einigen Fällen

war auch das neue Antigen nachweisbar, das die Tumorzellen von Leberzellen unterscheidet.

Die Ergebnisse mit den Anti-Lebersera konnten mit der quantitativen Präzipitationsmethode nach Heidelberg bestätigt werden.

Die Arbeit wurde ausgelöst durch eine Überlegung, die Herr G. Melchers Herrn H. Friedrich-Freksa mitteilte, unter dessen Leitung die Arbeit durchgeführt wurde.

Beobachtungen über die Verbreitung azulenhaltiger Schafgarbenpflanzen

Von Annelise Grahle

Botanisches Institut der Universität Tübingen

(Z. Naturforsch. 7b, 326—327 [1952]; eingeg. am 30. April 1952)

In dem durch Wasserdampfdestillation gewonnenen ätherischen Öl der Schafgarbe (*Achillea millefolium* L.) kommt nicht selten Azulen vor, das nach Ruzicka und Rudolph¹ mit dem Kamillenazulen (Chamazulen) identisch ist. Peyer² fand Pflanzen mit hohem Azulengehalt; Koch³ und Rosenthal⁴ konnten Azulen nur in Handelsdrogen, nicht aber in selbst gesammelten Einzelpflanzen feststellen. Es war daher zunächst die topographische Verbreitung azulenhaltiger Schafgarbenpflanzen zu untersuchen und dann festzustellen, ob die Voraussetzungen dieser Verbreitung genetisch oder umweltbedingt sind.

Man nimmt an, daß Azulen aus einer in der Pflanze vorhandenen Vorstufe (oder deren Komponenten⁵) während der Wasserdampfdestillation gebildet wird. Neben dem wie üblich gemessenen Gesamtgehalt an ätherischem Öl⁶ wurde der Azulengehalt der Schafgarbenblüten (das „Blauöl“) nach der kolorimetrischen Methode von Kaiser und Frey⁷ bestimmt. Zur Destillation des ätherischen Öls diente der Apparat von Moritz⁸. Blüten mit azulenfreiem Öl wurden 45 Min. destilliert, azulenhaltige Blüten 9 Stdn.; in dieser Zeit werden etwa 88% des Gesamtazulens gebildet (die Destillation des gesamten Azulens dauert 30 Stdn.). Die Azulenwerte — Gewichtsprozent, bezogen auf luftgetrocknete Blüten — liegen also in Wirklichkeit etwa 12% höher als angegeben. — Der mittlere Fehler der Azulenbestimmungen beträgt ungefähr 1,5% des Mittelwerts.

Von 26 in der Umgebung von Tübingen gesammelten Mischproben von Schafgarbenblüten (Ernte 1948) waren 4 azulenfrei, 22 enthielten Azulen. Der mittlere Azulengehalt dieser Proben betrug 31 mg%, die azulenreichste Probe hatte 64 mg% Azulen.

In dem gleichen Gebiet, in welchem die Mischproben gesammelt worden waren (4-km-Umkreis um Tübingen), wurden die Blüten von 241 Einzelpflanzen untersucht

(Ernte 1948/49). Von diesen Einzelpflanzen hatten 52 (= 21,6%) Azulen, 189 hatten kein Azulen.

Alle azulenhaltigen Pflanzen entstammten dem Neckartal, wo sie unmittelbar neben azulenfreien wuchsen. Von 117 Pflanzen des Neckartals waren 65 azulenfrei, 52 (= 44,5%) enthielten Azulen. Außerhalb des Neckartals wurden nur azulenfreie Pflanzen (124) gefunden.

Der mittlere Azulengehalt der untersuchten Pflanzen betrug 131 mg%, der Höchstwert 377 mg%. Eine irgendwie regelmäßige Beziehung zwischen Gesamtölmenge und Azulenmenge, zwischen dem Gehalt an farblosen Ölen und dem Gehalt an Azulen scheint nicht zu bestehen; die Verteilung der Ölgehalte auf die untersuchten Individuen ist in Abb. 1 wiedergegeben.

Abb. 1. Variation des Ölgehalts. I: Pflanzen mit azulenfreiem Öl (M = 350 mg%, n = 168); II: Pflanzen mit azulenhaltigem Öl; azulenfreier Anteil (M = 340 mg%, n = 34); III: Pflanzen mit azulenhaltigem Öl; Azulen (M = 131 mg%, n = 53). Ordinate: Zahl der Individuen, Abszisse: Gehalt an äther. Öl.

Ein Einzelstandort sei wie folgt beschrieben: In etwa 50 m Abstand vom Neckar fanden sich auf einer Fläche von 3-mal 5 m 11 Schafgarbenpflanzen. Es ist anzunehmen, daß auf diesem kleinen Ausschnitt die Umweltfaktoren annähernd gleichartig sind. Trotzdem war der Azulengehalt der Pflanzen sehr verschieden hoch: neben einer azulenfreien gab es azulenarme (20, 21, 60 mg%) und höchst azulenreiche (171, 185, 202, 280, 285, 305, 377 mg%) Formen. Dieser Umstand spricht gegen eine überwiegende Beeinflussung des Azulengehalts durch äußere Faktoren und für ein Zustandekommen durch Mutation. Die Entscheidung hierüber konnte nur durch Anbauversuche erbracht werden.

Im Herbst 1949 wurden mehrere bezeichnete Pflanzen mit bekanntem hohem Azulengehalt aus dem Neckartal in den Botanischen Garten Tübingen verpflanzt. Sie wurden im Frühjahr 1950 nochmals umgepflanzt. Trotzdem änderten sich die Azulengehalte der Pflanzen nicht wesentlich; z. B.:

¹ L. Ruzicka u. E. A. Rudolph, Helv. chim. Acta 9, 118 [1926].

² W. Peyer, Dtsch. Apotheker-Ztg. 55, 1, 631 [1940].

³ K. Koch, Dtsch. Apotheker-Ztg. 55, 758 [1940].

⁴ C. Rosenthal, Arch. Pharmaz. 18, 344 [1941].

⁵ G. Kunert, Pharmazie 6, 549 [1951].

⁶ H. Kaiser u. W. Lang, Dtsch. Apotheker-Ztg. 91, 163 [1951].

⁷ H. Kaiser u. H. Frey, Dtsch. Apotheker-Ztg. 53, 1385, 1402 [1938]; 54, 882 [1939].

⁸ O. Moritz, Arch. Pharmaz. 15, 368 [1938]; Dtsch. Apotheker-Ztg. 55, 517 [1940].