wie des menschlichen oder tierischen Körpers^{52, 53}. Erstere bedienen sich eines an den Photoelektronen-Vervielfacher angebauten Glasgefäßes, das außen versilbert und innen mit Zinksulfid belegt ist und mit der zu messenden Luft gefüllt wird.

Die Geräte zur Bestimmung des Gehalts von Menschen oder Tieren an radioaktiven Stoffen bestehen aus einem doppelwandigen Kessel. In den inneren wird das Versuchsobjekt gebracht, zwischen den Wänden befindet sich ein großes Volumen szintillierender Lösung, deren Lumineszenz durch 50 oder mehr an der Außenwand angebrachte Photoelektronen-Vervielfacher gemessen wird. Ein solches Gerät bedeutet naturgemäß einen riesigen Aufwand und bringt kaum mehr als die für den gleichen Zweck ausgearbeiteten Ionisationskammer-Geräte.

Einer weiteren eingehenden Bearbeitung bedarf noch das Problem des Lichtleiters, der in seiner jetzt meist verwandten Form (Stab oder Konus aus Plexiglas) häufig eine ernste Fehlerquelle darstellt, da er

durch ionisierende Strahlung zwar schwach, aber doch merklich zur Lumineszenz angeregt wird und meist ein viel größeres Volumen hat als der Szintillator. Ein möglicher Weg zur Ausschließung der durch den Lichtleiter verursachten Fehler besteht in der Anbringung von Polaroid-Folien vor und hinter demselben und Durchführung von Differenzmessungen⁵⁴. Doch geht dadurch viel Licht verloren, und die Empfindlichkeit des Gerätes sinkt.

Bemerkenswert und vorteilhaft ist die schon oben erwähnte hohe Widerstandsfähigkeit mancher organischer Szintillatoren gegen Strahlen¹⁰, die bis zu Dosen von 1 Megaröntgen kein Absinken der Lichtausbeute zeigen, sowie die Tatsache, daß bei diesen Szintillatoren die Lumineszenz proportional mit der Dosisleistung ansteigt, also auch bei sehr hohen Werten (40 Kiloröntgen/sec) keine Sättigung eintritt⁹, was bei Ionisationskammern nur sehr schwer erreichbar ist. Über unsere Untersuchungen zu diesen Fragen hoffen wir demnächst ausführlicher zu berichten*.

⁵² C. L. Cowan, F. Reines, F. B. Harrison, E. C. Anderson u. F. N. Hayes, *Physic. Rev.* **90**, 493 [1953].

⁵³ F. Reines, R. L. Schuch, C. L. Cowan, F. B. Harrison, E. C. Anderson u. F. N. Hayes, *Nature* [London] **172**, 521 [1953].

⁵⁴ J. F. B. Dealler, *Brit. J. Radiol.* **27**, 646 [1954].

⁵⁵ G. Breitling u. R. Glocker, *Naturwissenschaften* **42**, 11 [1955].

⁵⁶ G. Breitling u. R. Glocker, *Naturwissenschaften* **42**, 483 [1955].

⁵⁷ G. Breitling u. R. Glocker, *Strahlentherapie* **90**, 390 [1953].

⁵⁸ K. Sommermeyer, *Strahlentherapie* **95**, 424 [1954].

⁵⁹ K. Sommermeyer, *Naturwissenschaften* **42**, 508 [1955].

* Anm. b. d. Korr.: Während der Drucklegung des Berichtes wurden uns noch folgende Arbeiten zugänglich, die sich mit der Dosismessung am Betatron^{55, 56}, mit der Dosismessung in nächster Umgebung radioaktiver Präparate^{57, 58} und mit Strahlenschutzmessungen⁵⁹, sämtliche unter Anwendung von Szintillatoren, beschäftigen.

NOTIZEN

Über die CO₂-Kapazität der Chlorella und den chemischen Mechanismus der CO₂-Assimilation

Von Otto Warburg und Günter Krippahl
Max-Planck-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem
(Z. Naturforschg. **11 b**, 52—54 [1956]; eingeg. am 21. Dez. 1955)

Belichtet man vorher verdunkelte Chlorella, so wird pro Molekül Chlorophyll 1 Mol. O₂ ausgetrieben

wo *hr* die Lichtquanten bedeuten, die von dem mit O₂ verbundenen Chlorophyll absorbiert werden, wie bei der Spaltung des Kohlenoxyd-Häms

Ist der photodissoziierbare O₂ ausgetrieben, so kann er im Dunkeln durch die Energie der induzierten Atmung wieder ersetzt werden. Verhindert man jedoch durch Entziehung des O₂ die induzierte Atmung, so bleibt die Erholung aus, und man erhält bei einer folgenden Belichtung keinen Sauerstoff¹.

Beim experimentellen Ausbau dieser Ergebnisse haben wir folgendes gefunden:

1. Zum Wiederaufbau der O₂-Kapazität im Dunkeln ist nicht nur O₂, sondern auch CO₂ notwendig. Entzieht man nach Austreibung der O₂-Kapazität im Licht der Chlorella die Kohlensäure, so wird trotz Anwesenheit von Sauerstoff im Dunkeln keine O₂-Kapazität nachgebildet. Zum Beispiel wurde nach einer Dunkelzeit von 20 Min. bei Belichtung von 100 cmm Chlorella eine Entwicklung von 20 cmm oder von 0 cmm O₂ gefunden, je nachdem in der Dunkelzeit der CO₂-Druck ¹/₁₀ Atmosphäre oder 0 betrug.

2. Gibt man Chinon im Dunkeln zu einer Suspension von Chlorella (in Kulturlösung), so wird Kohlensäure ausgetrieben, und zwar 1 Mol. pro Mol. Chlorophyll. Enthielten zum Beispiel 200 cmm Chlorella, suspendiert in 3 ccm Lösung *p*_H 3,9, 3,37 μ Mole Chlorophyll und wurden 2 mg Chinon zugegeben (Gasraum Argon), so

¹ O. Warburg, G. Krippahl, W. Schröder u. W. Buchholz, *Z. Naturforschg.* **9 b**, 769 [1954]; O. Warburg u. W. Schröder, **10 b**, 639 [1955].

wurden in 60 Min. 69 cmm CO_2 ($= 3,1 \mu\text{Mole}$) ausgetrieben. Diese Austreibung wird durch 10^{-5} -n. HCN wesentlich und durch 10^{-4} -n. HCN vollständig gehemmt. Wir nennen die durch Chinon austreibbare CO_2 die CO_2 -Kapazität der Chlorella.

3. Nach der Austreibung der CO_2 -Kapazität aus Chlorella durch Chinon im Dunkeln ist die Wirkung des Lichts auf die CO_2 vollständig verschwunden, aber die Wirkung des Lichts auf das Chinon erhalten. Die ihrer CO_2 beraubte Chlorella verhält sich also im Licht wie die isolierten grünen Grana, oder, anders ausgedrückt: die chemisch gebundene CO_2 ist nicht an der Chinon-Reduktion beteiligt.

4. Aus isolierten Grana kann durch Chinon keine CO_2 ausgetrieben werden.

5. Noch schneller als durch Chinon wird die CO_2 -Kapazität der Chlorella im Dunkeln durch Milchsäure ausgetrieben, wobei man am besten beim CO_2 -Druck 0 arbeitet, um keine Bicarbonat- CO_2 in den Zellen zu haben. Auch diese Austreibung der CO_2 wird durch 10^{-5} -n. HCN wesentlich und durch 10^{-4} -n. HCN vollständig gehemmt. Zum Beispiel gaben wir 0,2 ccm 2-n. Milchsäure zu 200 ccm Chlorella, suspendiert in 3 ccm Kulturlösung (Gasraum Argon), und erhielten dann (bei p_{H} 2,7) in 20 Min., nachdem der Endwert erreicht war, 3,16 Mole CO_2 , während die 200 cmm Zellen 3,37 μMole Chlorophyll enthielten. 1-n. H_2SO_4 jedoch, die das Magnesium abspaltet, treibt keine CO_2 aus, da sie die Fermente zerstört.

6. Erhitzt man eine Chlorella-Suspension 7 Min. auf 63° , wobei die Suspension ihr Aussehen nicht ändert, und gibt dann zu dieser erhitzten Suspension Chinon oder Milchsäure, so wird keine CO_2 ausgetrieben. Es folgt daraus, ebenso wie aus der Antikatalyse der Blausäure, daß an der Austreibung der CO_2 -Kapazität Fermentreaktionen beteiligt sind.

7. Chlorophyll, in Alkohol gelöst, absorbiert in alkalischer Lösung, wie Conant 1931 fand², 1 Mol. Sauerstoff. Wir fanden, daß das in Chlorella gebundene Chlorophyll, in wäßriger Suspension, sich entsprechend verhält. Suspendiert man 200 cmm Chlorella in 3 ccm Wasser, erhitzt die Suspension 7 Min. auf 63° und gibt (Gasraum Luft) bei 20° 50 mg LiOH hinzu, so wird im Verlauf von 40 Min. 1 Mol. O_2 pro Mol. Chlorophyll absorbiert. Man kann also die „Conantzahl“ des Chlorophylls der Chlorella bestimmen, ohne das Chlorophyll zu isolieren.

Aus unseren Experimenten schließen wir, daß die CO_2 -Assimilation auf chemischen Zwischenreaktionen des Chlorophylls beruht. Von der Chlorophyllformel interessiert dabei nur der halbfett gedruckte Teil, das ist ein Teil des geöffneten isocyclischen Rings Fischers, den Conant² bereits 1931 in der hier benutzten Form geschrieben hat.

An diesem Teil des Chlorophylls sollen sich die folgenden Reaktionen abspielen:

1. Reduktion der CO_2 :

2. Reduktion des Chinons:

oder dasselbe nach Abspaltung der CO_2 .

Auch die induzierte Atmung bei der CO_2 -Assimilation wird durch unsere Formeln chemisch erklärt. Wenn der O_2 im Licht abgespalten worden ist, so muß, damit der Anfangszustand wiederhergestellt wird, der reduzierte Kohlenstoff in Stellung (11) sich ablösen und durch neue Kohlensäure ersetzt werden, was chemische Arbeit erfordert. Diese Arbeit wird dadurch gewonnen, daß in anderen belichteten Chlorophyllmolekülen der O_2 seinen ganzen Weg zurückreagiert und dabei $-\text{CHO}$ zu $-\text{COOH}$ zurückoxydiert. Die bei dieser Oxydation freierwerdende Energie wird dann als ATP oder in anderer Form für die Fixierung der CO_2 zur Verfügung gestellt.

Von allen Assimilationstheorien der Vergangenheit kommt hiernach dem tatsächlichen Sachverhalt am nächsten die Peroxyd-Theorie von Willstaetter und Stoll³, die zu einer Zeit aufgestellt wurde, als die chemische Konstitution des Chlorophylls noch unbekannt war und als die Photodissoziation des O_2 und die induzierte Atmung noch nicht entdeckt worden waren. So fehlte in der Theorie von Willstaetter und Stoll das Zusammenwirken von Atmungs- und Lichtenergie, und es fehlte näheres über den Ort der Peroxydbildung im Chlorophyllmolekül. Erst durch Fischer⁴, vor allem aber durch Conant² und seine Arbeiten über die Allomerisation des Chlorophylls, ist es möglich gewor-

³ R. Willstaetter u. A. Stoll, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin 1918.

⁴ H. Fischer u. A. Stern, Chemie des Pyrrols, Band II, 2., Leipzig 1940.

² J. B. Conant, J. Amer. chem. Soc. 53, 359, 1615, 2382, 3171 [1931]; Science [New York] 73, 268 [1931].

den, den Ort der Peroxydbildung im Chlorophyllmolekül anzugeben.

Aus unseren Gleichungen folgt, daß es in assimilierenden grünen Zellen 3 Arten von Chlorophyll gibt: solche, die an Stelle (11) ein Carboxyl tragen; solche, deren (11)-Carboxyl reduziert ist; und solche, deren (11)-Stelle frei ist. Es ist in diesem Zusammenhang interessant, daß die Chlorophyll-Präparate von Fischer⁵, auch wenn sie kristallisiert waren, zu seinem Leidwesen oft erhebliche Mengen von „Pyro-Chlorophyll“ enthielten, das ist Chlorophyll, das an Stelle (11) das Carboxyl abgespalten hat; und daß seine Chlorophyll-Derivate oft erhebliche Mengen Purpurin enthielten, das ist ein Chlorophyll-Derivat, das in (10)-Stellung oxydiert ist. Es ist hier ferner interessant, daß Clendenning⁶ 30 Sek. nach Belichtung von Chlorella in ¹⁴CO₂ in der Lipoidfraktion (die das Chlorophyll enthält), Radioaktivität fand. Es sei ferner hervorgehoben, daß nach unseren Gleichungen der gesamte im Licht dissoziierende O₂ aus dem Wasser stammt; daß man aber die Gleichungen leicht so ändern kann, daß die Hälfte des abgespaltenen O₂ aus dem Wasser und die Hälfte aus der CO₂ stammt.

Hierbei ist Chlorophyll die prosthetische Gruppe eines Ferments, das durch chemische Zwischenreaktionen katalytisch wirkt. Aber die chemischen Reaktionen in diesem Ferment sind ihrerseits wiederum Fermentreaktionen, und so ist Raum für die Wirkung des Carotinoido-Ferments (das durch sein Wirkungsspektrum entdeckt worden ist) und für die Schwermetallfermente (die durch das Phenanthrolin und die Blausäure entdeckt worden sind). Auch ist Raum für eine mögliche Beteiligung der Phosphorsäure, wenn man in (11) die Bildung von Acylphosphat annimmt und erst dann die Reduktion vor sich gehen läßt nach Analogie der Oxydationsreaktion der Gärung^{6a}. — Was das Endprodukt anbetrifft, so wird heute, nachdem Horecker die universelle kondensierende Wirkung der Zymohexasen nachgewiesen hat, niemand mehr nach Formaldehyd suchen. Im übrigen könnte in (11) nicht nur Kohlensäure, sondern auch Oxalsäure angelagert werden, bei deren Reduktion dann die von Tolbert⁷ gefundene Glykolsäure entstehen würde. Doch sind dies, wie auch die Frage der Beteiligung der Phosphorsäure, zunächst unwichtige Einzelheiten gegenüber dem Hauptergebnis: daß die CO₂-Assimilation auf einer Wechselwirkung zwischen den C-Atomen (10) und (11) des Chlorophylls beruht, bei der (10) oxydiert und (11) reduziert wird.

Unsere Gleichungen erfüllen ferner eine Forderung, die wir seit 1944, seit der Entdeckung der Chinonreaktion⁸ in den isolierten grünen Grana, immer gestellt haben: daß die photochemische O₂-Entwicklung bei der Reduktion der Kohlensäure und des Chinons aus der gleichen Substanz, durch den gleichen Mechanismus erfolgen muß.

⁵ H. Fischer u. I. Riedmair, Liebigs Ann. Chem. **506**, 107 [1933].

⁶ K. A. Clendenning, Arch. Biochemistry **27**, 75 [1950].

^{6a} O. Warburg, Biochem. Z. **303**, 40 [1939].

⁷ N. E. Tolbert, Fed. Proc. **14**, 292 [1955].

⁸ O. Warburg u. W. Lüttgens, Naturwissenschaften **32**, 161, 301 [1944]; O. Warburg, Heavy Metals, Clarendon Press, Oxford 1949.

Tatsächlich unterscheiden sich Grana und intakte Zellen nur dadurch, daß in den Grana die Fermente fehlen, die für die Wechselwirkung zwischen den C-Atomen (10) und (11) verantwortlich sind.

Schließlich ist durch unsere Gleichungen die Photosensibilisierung aus der CO₂-Assimilation eliminiert worden und damit alles, was mit Radikalen, aktiven Zuständen und Lebensdauern zusammenhängt. Denn nunmehr wirkt die Lichtenergie in demselben Molekül, in dem sie absorbiert wird.

Über die Wirkungsweise der Hydroxyanthranilsäure-Oxydase

Von O. Wiss

Max-Planck-Institut für Biochemie und Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen

(Z. Naturforschg. **11 b**, 54–55 [1956]; eingeg. am 19. Nov. 1955)

In einer früheren Mitteilung¹ haben wir ausgeführt, daß die enzymatische Spaltung der 3-Hydroxyanthranilsäure zum aliphatischen Spaltprodukt, der sog. Acroleinfumarsäure, Sauerstoff benötigt und daß Eisen(II)-Ionen und Cystein als Aktivatoren wirken.

Henderson und Mitarbb.² und Schweigert und Mitarbb.³ haben durch Eisen(II)-Ionen auch eine geringe Steigerung der 3-Hydroxyanthranilsäure-Oxydation beobachtet. Durch Zusatz von Komplexbildnern, wie α, α' -Dipyridyl und *o*-Phenanthrolin konnten sie die Reaktion hemmen.

Die Fortsetzung unserer Untersuchungen hat zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. Zur quantitativen Umwandlung von einem Mol. 3-Hydroxyanthranilsäure in die Acroleinfumarsäure wird ein Mol. Sauerstoff benötigt (Tab. 1).

		200 γ 3-Hydro- xanth.	500 γ 3-Hydro- xanth.	1000 γ 3-Hydro- xanth.
O ₂ -Verbrauch	gef.	28,5 mm ³	77 mm ³	140 mm ³
	ber.	29,2 mm ³	73 mm ³	146 mm ³

Tab. 1. O₂-Verbrauch der 3-Hydroxyanthranilsäure.

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der geforderten Struktur des primären Spaltproduktes.

2. Enzympräparate, die durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung aus Schweineleber-Aceton-Trockenpulver gewonnen wurden, lassen sich in der Kälte gegen Tris-puffer (Tri-hydroxy-methyl-amino-methan) dialysieren, ohne daß die Enzymaktivität wesentlich abnimmt. Wird

¹ O. Wiss, Z. Naturforschg. **9 b**, 740 [1954].

² C. L. Long, H. N. Hill, I. M. Weinstock u. L. M. Henderson, J. biol. Chemistry **211**, 405 [1954].

³ Aiko Miyake, A. H. Bokman u. B. S. Schweigert, J. biol. Chemistry **211**, 391 [1954].