Die Gegenüberstellung der nicht zu den Sulfonamiden gehörenden Verbindungen VII und IL zeigt nochmals den auffallenden Wechsel des Wirkungscharakters beim Austausch von *p*-Cl- gegen *p*-NH₂-Substituenten. Sie bestätigt ebenso wie der Vergleich der Verbindungen XL bis IL das eingangs über den Wirkungsmechanismus Gesagte: Erste Voraussetzung zum Zustandekommen der biologischen Wirksamkeit ist das Vorhandensein des bio-

logisch aktiven Zentrums mit stark verringerter Elektronendichte. Der Wirkungscharakter der Substanz wird dagegen von den übrigen Molekülteilen bestimmt, deren Anordnung und Substitutionsform die Verteilung und den Transport der Verbindungen im tierischen oder pflanzlichen Organismus zu den sterisch und energetisch „passenden“ Reaktionspartnern lenken.

Die Einwirkung von Giften auf die Atmung von Backhefe, ihr Nachweis durch die elektrochemische O₂-Messung

Von K. DAMASCHKE und H. P. MUNDT

Aus der Bundesanstalt für Materialprüfung, Berlin-Dahlem
(Z. Naturforschg. **12 b**, 237—240 [1957]; eingegangen am 27. November 1956)

Es wurden einer atmenden Backhefe nachfolgende Verbindungen zugesetzt: Kaliumcyanid, Natriumazid, Natriumsulfid, Hydroxylamin-hydrochlorid, Nicotinsäureamid, Ascorbinsäure, barbitursaures Na, Malonsäure, Natriumfluorid, Bromessigsäure, Trichloressigsäure, Kaliumrhodanid und Penicillin-G-Na-Salz.

Die Konzentration der Gifte in der Meßlösung betrug 10⁻² Mol/l und weniger bis zum Aufhören der Giftwirkung. Es zeigte sich, daß keines der angeführten Reagenzien eine Stimulierung der Atmung, ähnlich wie sie bei *Chlorella* gefunden worden war, hervorrief. Außerdem zeigte sich, daß eine starke Hemmung nur bei schwachen Elektrolyten auftrat. Die allgemein als sehr giftig angesehene Blausäure wurde durch H₂S um das 10-fache und durch HN₃ um das 5-fache an Giftwirkung übertroffen.

Außerdem zeigte sich, daß Hydroxylamin bis zur Entfaltung der vollen Giftwirkung eine längere Zeitspanne als HCN, H₂S und HN₃ benötigte.

Durch die elektrochemische O₂-Meßmethode nach TÖDT^{1,2,3} ist es möglich, schnell verlaufende O₂-Konzentrations-Änderungen, die sich in wenigen Sek. abspielen, gut zu verfolgen. Deshalb wurde diese Methode zur Verfolgung schnell wirkender Gifte auf die Atmung der Backhefe angewendet. Es sollte gleichzeitig festgestellt werden, ob ähnlich wie bei *Chlorella* eine Stimulierung der Atmung möglich ist⁴. Die angewendeten Substanzen waren gut oder mäßig wasserlöslich.

Die Versuche wurden mit einer 0,5-proz. Suspension frischer Hefe mit 0,5% Glucosezusatz durchgeführt. Als Elementkombination zur elektrochemischen O₂-Messung wurden Gold-Amalgam als Kathode und Zink in KCl-Lsg. hinter einem Diaphragma als Anode verwendet. Die Versuchstemperatur betrug 25° C. Die Hefe wurde in einem Phosphatpuffer p_H 5,6 suspendiert. Da die Atmungskurven der Hefe von Luftsättigung bis zu ganz geringen

O₂-Gehalten geradlinig verlaufen, wurde für die Versuche eine O₂-Konzentration von einem Viertel der Luftsättigung gewählt, da die elektrochemische O₂-Meßmethode mit abnehmender O₂-Konzentration immer empfindlicher wird. Es sah dies dann praktisch so aus, daß wir die Hefe ³/₄ des zu Anfang vorhandenen O₂ veratmen ließen und nun die Gifte in gelöster Form zusetzten. Hierbei muß darauf geachtet werden, daß durch den Zusatz der Gifflösungen kein O₂ hineingebracht wird. Dies kann erreicht werden, indem man die Zugabelösung durch Einleiten von N₂ fast sauerstoff-frei macht, oder die Zugabemenge gegenüber der Meßlösung gering hält. Bei der Auswertung der Kurven wurde die unbeeinflusste Atmungsgeschwindigkeit der Hefe = 100% gesetzt. Nach der Giftzugabe stellt sich eine neue Atmungsgeschwindigkeit meist nach wenigen Sek. ein (das Verhältnis der beiden Quotienten *dI*/*dt* zueinander gibt die restliche Atmung). Die Atmungshem-

¹ K. DAMASCHKE, L. ROTHBÜHR u. F. TÖDT, Biochem. Z. **326**, 424 [1955].

² F. TÖDT, Angew. Chem. **9/10**, 266 [1955].

³ W. SCHWARZ, Werkstoffe und Korrosion **11**, 527 [1955].

⁴ K. DAMASCHKE, L. ROTHBÜHR u. F. TÖDT, Z. Naturforschg. **10 b**, 4, 215 [1955].

mung wird in den Diagrammen in Prozenten angegeben.

Die Abb. 1 zeigt als Beispiel ein Original-Schreiberblatt. Der Kurvenast a gibt die ungestörte Atmung der Hefe wieder. Bei Punkt A erfolgt die Giftzugabe ($6,6 \cdot 10^{-6}$ Mol/l Na_2S). Die Giftwirkung setzt sofort ein, und schon nach 6 Sek. hat sich die neue, geringere Atmungsgeschwindigkeit eingestellt

Abb. 1. Hemmung der Atmung durch Zugabe von Na_2S bei Punkt A, entsprechend $6,6 \cdot 10^{-6}$ Mol/l. Hemmung 86% (Original-Schreiberkurve).

(Kurvenast b). Die Hemmung beträgt in diesem Falle 86,5 Prozent. Die angewendeten Konzentrationen betrugen nie mehr als $m/100$, da man bei höheren Konzentrationen nicht mehr von einer Giftwirkung sprechen kann und sich außerdem ein gegenüber der Pufferlösung nicht zu vernachlässigender osmotischer Druck bemerkbar machen würde. Die Konzentration der Elektrolytlösung war $m/15$, überwiegend an KH_2PO_4 . Die bei *Chlorella* eingetretene stimulierende Wirkung von Penicillin und Hydroxylamin⁴ trat bei Hefe nicht auf. In einer 0,3-proz. Penicillin-G-Na-Salzlösung, das ist das Doppelte der bei *Chlorella* verwendeten Konzentration, zeigte sowohl frische als auch 4 Wochen im Eisschrank gelagerte Hefe keinerlei Änderung der Atmung. Die bei *Chlorella* fördernd wirkende Hydroxylamin-Konzentration von $4,8 \cdot 10^{-3}$ Mol/l bewirkte bei Hefe eine etwa 75-proz. Hemmung (vgl. auch die späteren Versuche mit Hydroxylamin).

Auch alle anderen der vorn angeführten Verbindungen zeigten keine stimulierende Wirkung.

Kaliumrhodanid bewirkt erst in einer Konzentration von $3,3 \cdot 10^{-2}$ Mol/l eine Hemmung von 33,3%, die Giftwirkung ist also sehr schwach.

Dagegen zeigen Natriumsulfid, Kaliumcyanid, Natriumazid und Hydroxylamin-hydrochlorid eine sehr starke Wirkung.

Die Atmungshemmung durch Natriumsulfid ist aus Abb. 2 ersichtlich.

Abb. 2. Abhängigkeit der Atmungshemmung von der angewendeten Na_2S -Konzentration.

Da sich oft gezeigt hatte, daß meist nur undissoziierte Verbindungen eine Giftwirkung ausüben, z. B. bei Untersuchungen von *Chlorella*⁴, ist das Ausmaß der Vergiftung nicht von der zugegebenen Salzkonzentration, sondern von der Konzentration an freier undissoziierter Säure oder Gase abhängig. Deshalb ist es angebracht, die Konzentration bei Zugabe von Salzen auf die der freien Säure bzw. Base nach dem MWG umzurechnen.

Die Dissoziations-Konstanten wurden dem Werk von LANDOLT-BÖRNSTEIN, „Physikal. chem. Tabellen“ entnommen.

Für Schwefelwasserstoff ergibt sich mit $K = 9,1 \cdot 10^{-8}$, daß seine Konzentration bei pH 5,6 gleich der des zugegebenen Salzes ist. Die Halbwertskonzentration, die eine 50-proz. Atmungshemmung hervorruft, beträgt $c_{1/2} = 1,4 \cdot 10^{-6}$ Mol/l H_2S . Das Konzentrations-Intervall zwischen beginnender und vollkommener Hemmung erstreckt sich etwa von $2 \cdot 10^{-8}$ bis $2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, umfaßt also 3 Zehnerpotenzen (die Hemmung durch H_2S von 56% wurde wegen mangelhafter Linearität dieser Atmungskurve aus dem Quotienten dI/dt nach einer Min. ermittelt).

Die Hemmung durch Kaliumcyanid wird durch Abb. 3 wiedergegeben. Mit einer Dissoziations-Konstanten von $K = 7,2 \cdot 10^{-1}$ ist auch in diesem Fall die Salzkonzentration gleich der der Säure (bei pH 5,6). Die Halbwertskonzentration beträgt $c_{1/2} =$

$1,2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l HCN. Das Konzentrations-Intervall, in dem die Wirkung von der Konzentration abhängig ist, beträgt hier 2 Zehnerpotenzen, allerdings ist auch bei hohen Konzentrationen keine völlige Hemmung zu erreichen. 2 bis 3% der ursprünglichen Atmung bleiben bestehen. Für diese dürfte ein Mechanismus anzunehmen sein, der keine eisen- bzw. schwermetallhaltigen Fermente benötigt. Zum Vergleich sei bemerkt, daß WARBURG⁵ die Halbwerts-konzentration für KCN zu $0,45 \cdot 10^{-5}$ Mol/l angibt.

Abb. 3. Abhängigkeit der Atmungshemmung von der angewendeten KCN-Konzentration.

Abb. 4 zeigt die Vergiftung durch Natriumazid. Bei einer Dissoziations-Konstanten von $1,9 \cdot 10^{-5}$ für die Säure ergibt sich: $1,16 \cdot 10^{-1} c_{\text{NaN}_3} = c_{\text{HN}_3}$ zur Umrechnung der Salzkonzentration auf die freie Säure bei p_H 5,6. Die Halbwerts-konzentration beträgt $2,7 \cdot 10^{-6}$ Mol/l HN_3 , das Konzentrations-Intervall von beginnender bis zur vollständigen Hemmung umfaßt etwa $2^{1/2}$ Zehnerpotenzen.

Abb. 4. Abhängigkeit der Atmungshemmung von der angewendeten NaN_3 -Konzentration.

Abb. 5 gibt die Hemmung durch Hydroxylaminhydrochlorid wieder, mit einer Dissoziations-Konstanten von $1,1 \cdot 10^{-8}$ für die Base errechnet sich für p_H 5,6 $c_{\text{NH}_2\text{OH}} = 2,7 \cdot 10^{-1} c_{\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}}$. Bei der Zugabe zeigte sich, daß die volle Giftwirkung erst

Abb. 5. Abhängigkeit der Atmungshemmung von der angewendeten $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ -Konzentration.

nach 1–2 Min. auftrat, also nach einer Zeitspanne, in der die Hefe den noch vorhandenen Sauerstoff schon veratmet hat. Zur Feststellung der konstanten Atmungsschäden wurde daher die Atmungsgeschwindigkeit durch geringere Hefeeinwaage herabgesetzt, 0,2% Hefesuspension statt 0,5%, gleichzeitig wurde die Umlaufgeschwindigkeit der Schreiberwalze verringert. Die auf diese Art aufgenommenen Kurven, die der Abb. 5 zugrunde liegen, zeigen dann die der vollen Giftwirkung entsprechende Hemmung, repräsentiert durch einen wieder linearen Kurvenast mit praktisch konstantem Quotienten dI/dt . Die Halbwerts-konzentration beträgt $1,1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l Base, ist also wesentlich höher als die der anderen Gifte, eine völlige Hemmung war nicht zu erreichen.

Alle anderen hier nicht noch einmal erwähnten Verbindungen bewirkten keine Hemmung der Atmung.

Abb. 6. Völlige Hemmung der Atmung nach Zugabe von Natriumazid bei Punkt A ($3,3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) und Aufhebung der Hemmung durch Auswaschen.

⁵ O. WARBURG, Biochem. Z. 165, 196 [1925]; E. NEGELEIN, Biochem. Z. 165, 203 [1925].

Um festzustellen, ob die Vergiftung mit Natriumazid reversibel ist, wurde die Hefe, nachdem völlige Atmungshemmung eingetreten war, auf einer Zentrifuge abgeschleudert und ausgewaschen. Sie zeigte anschließend wieder die normale Atmung. Diesen Vorgang gibt Abb. 6 wieder: Kurventeil a_1 zeigt die normale Atmung, bei Punkt A erfolgte die Giftzugabe, nach etwa 4 Sek. ist die Atmung völlig gehemmt. Kurve b gibt die Atmungsgeschwindigkeit nach dem Abschleudern und Auswaschen wieder. Wie man sieht, ist die Atmungsgeschwindigkeit der Kurve a_1 und b gleich.

Zur Versuchsdurchführung sei noch bemerkt, daß KCN, NaN_3 , Na_2S , $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ und Penicillin keinen Einfluß auf die elektrochemische O_2 -Messung haben.

Zusammenfassend sei noch einmal betont, daß es nicht gelang, stimulierende Verbindungen zu finden, wie bei der Atmung der Chlorella. Das mag darauf

zurückzuführen sein, daß bei letzterer die autotrophe Atmung untersucht wurde, bei Hefe jedoch, da wir immer Glucose zugaben, die heterotrophe Atmung. Eine Anregung der Atmung über diese hinaus ist offenbar nicht möglich bzw. es wurde noch keine derartige Verbindung gefunden.

Es zeigte sich weiterhin, daß eine starke Hemmung nur bei schwachen Elektrolyten auftritt, dieser Umstand stützt die Annahme, daß die Konzentration an undissoziierter Säure oder Base maßgebend ist. Sonst wäre z. B. von Natriumfluorid ebenfalls eine Wirkung zu erwarten, welches auch ein guter Komplexbildner für Eisen ist, und das etwa durch die Blockierung des Eisens der Atmungsfermente wirken könnte, das aber im Gegensatz zu den anderen Verbindungen ein starker Elektrolyt ist. Für die gesamte Erscheinung dürfte in starkem Maße der Transport der Gifte durch die Zellwand bestimmend sein.

Zum Wirkungsmechanismus organischer Sulfhydryl-Verbindungen als Strahlenschutzstoffe

Von U. HAGEN und R. KOCH

Aus dem Radiologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
und der Biophysikalischen Abteilung des Heiligenberg-Institutes, Heiligenberg (Baden)
(Z. Naturforschg. 12 b, 240—249 [1957]; eingegangen am 4. Januar 1957)

Es wurde die chemische Reaktionsfähigkeit der SH-Gruppe einer Reihe von organischen SH-Verbindungen geprüft und mit ihrer Strahlen-Schutzwirkung im Tierversuch verglichen.

Einen Strahlenschutz geben nur SH-Verbindungen der Konstitution

Geringe Änderungen können zur Strahlen-Sensibilisierung führen, wie an β -Homocystein, Isocystein, Penicillamin und Thioglykol in Tierversuchen gezeigt werden konnte.

Die Reaktionsfähigkeit der SH-Gruppe betrachteten wir an folgenden Reaktionen: Redoxpotential, Autoxydation unter Schwermetall-Katalyse, Additionsreaktion an Monojodessigsäure und Aktivierungsfähigkeit eines inaktiven Kathepsinpräparates.

Eine eindeutige Parallele zwischen Reaktionsfähigkeit der SH-Gruppe und Strahlen-Schutzwirkung ergab sich nur bei der Aktivierung des verwendeten Fermentpräparates, d. h. alle Schutzkörper aktivieren das Kathepsin ebensogut wie Cystein, während die unwirksamen die Fermentaktivität kaum beeinflussen.

Es ist wahrscheinlich, daß der zum Strahlenschutz führende Vorgang der Kathepsin-Aktivierung sehr ähnlich ist. Hierfür kommt neben einer Reduktionswirkung des SH-Körpers vor allem seine Fähigkeit, gemischte Disulfide zu bilden, in Betracht.

Die Ergebnisse werden zusammen mit bereits bestehenden Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus der SH-haltigen Strahlenschutz-Verbindungen diskutiert. Dabei muß an eine Affinität der Schutzkörper zu bestimmten körpereigenen SH-Gruppen gedacht werden.

Wie neuere Untersuchungen gezeigt haben, wirken einige organische Sulfhydryl-Verbindungen (SH-Verbindungen) im Tierexperiment als Strahlen-Schutzstoffe, d. h. ihre prophylaktische Verabrei-

chung vermag die Überlebenszahl der Tiere nach Einwirkung von ionisierenden Strahlen beträchtlich zu erhöhen. Im Dosisbereich der LD_{100} verlängern sie die Überlebenszeit der Tiere (CATSCH und Mit-