

20stündiges Anquellen in 0,001%iger 2,4-D setzte z.B. die Zahl der Pusteln je Blatt von 30,5 bei den Kontrollen auf 2,2 bei den Versuchspflanzen herab. Im einzelnen schwankten die Ergebnisse je nach der Jahreszeit, in der die Versuche durchgeführt wurden, entsprechend den für Parasit oder Wirtspflanze günstigeren oder ungünstigeren Entwicklungsbedingungen. Im Durchschnitt zeigten Pflanzen, die aus in 0,01%iger 2,4-D-Lösung vorgequollenen Körnern stammten, bei Schwarzrost 5 bis 10%, bei Zwergrost 10 bis 15% der Befallsstärke der Kontrollen. Für eine 0,001%ige Lösung waren die entsprechenden Zahlen 10 bis 20% und 25 bis 35%. Auch durch das Vorquellen in Wirkstofflösung wurde eine gewisse Entwicklungshemmung ausgelöst. Sie war bei Quellung in 0,001%iger Lösung etwa gleich groß wie oben beschrieben.

2,4-D wird durch die Wurzel aufgenommen und mit dem Transpirationsstrom in der ganzen Pflanze verbreitet. Die festgestellte infektionshemmende Wirkung der aufgenommenen 2,4-D kann entweder auf einer spezifischen Schädigung des Parasiten beruhen oder auf einer Beeinflussung der Wirtszellen, durch die diese widerstandsfähiger werden. Kurz vor Abschluß unserer Versuche erhielten wir Kenntnis von einer Mitteilung von IBRAHIM¹⁾, welcher an Hafer durch Besprühen der Pflanzen mit 0,1%iger 2,4-D-Lösung kurz vor oder nach der Infektion mit Haferkronenrost eine starke Verminderung der Befallsstärke erzielte. Die relative Unempfindlichkeit von Gramineen gegen Besprühen mit 2,4-D beruht zum Teil darauf, daß bei ihnen die Spritzlösung durch die Blätter kaum eindringt. Dies legt den Gedanken nahe, daß die Befallsminde rung in erster Linie auf einer spezifischen Schädigung des Parasiten beruhe. IBRAHIM konnte auch zeigen, daß gekeimte Uredosporen in 0,05%iger 2,4-D nicht mehr weiter wuchsen. Andererseits waren aber Sporen von 24 Std in Wuchsstofflösung gebadeten Blättern fast voll keimfähig. Eigene Versuche, bei welchen die Versuchspflanzen mit einer 0,1%igen Lösung von 2,4-D (Ammoniumsalz) übersprüht wurden, ergaben einen wesentlich schwächeren Effekt als jene, bei denen der Wirkstoff durch die Wurzel in die Pflanze aufgenommen worden war. Außerdem wissen wir, daß die Aufnahme von 2,4-D den Zellstoffwechsel der Pflanze in vielfacher Hinsicht beeinflußt. Die Atmungsintensität wird gesteigert, das Verhältnis der löslichen zu den hochmolekularen Kohlenhydraten verändert²⁾. Auch das Enzymsystem der Zelle wird beeinflußt, wie HOFMANN und v. SCHMELING^{3), 4)} kürzlich zeigen konnten. Alle diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die infektionshemmende Wirkung der 2,4-D mindestens zum Teil auch in deren Einfluß auf die Wirtszelle begründet ist. Es ist leicht verständlich, daß die normale Reaktion zwischen Wirtszelle und Parasit⁵⁾ gestört wird, wenn das stoffliche Gefüge der Zelle in der erwähnten Weise verändert ist. Im selben Sinne sprechen auch eigene, noch nicht abgeschlossene Versuche, über die zur gegebenen Zeit an anderer Stelle ausführlicher berichtet werden soll.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Förderung dieser Untersuchungen durch eine Sachbeihilfe.

Botanisches Institut der Technischen Hochschule München in Weihenstephan.

H. v. WITSCH und H. KASPERLIK.

Eingegangen am 18. April 1953.

*) Für die freundliche Überlassung der Weizenstämme aus dem Material der Bayerischen Landessaatzuchtanstalt Weihenstephan möchten wir Herrn Direktor Dr. K. WELLMER auch an dieser Stelle herzlich danken.

¹⁾ IBRAHIM, J. A.: *Phytopathology* 41, 951 (1951). — Nach Referat in *Ber. wiss. Biol.* 77, 159 (1952).

²⁾ FROBERGER, E.: *Höfchen-Briefe* 4, 236 (1951).

³⁾ HOFMANN, E., u. B. v. SCHMELING: *Naturwiss.* 40, 23 (1953).

⁴⁾ HOFMANN, E., u. B. v. SCHMELING: *Z. Pflanzenbau u. Pflanzenschutz* 3, 264 (1952).

⁵⁾ GÄUMANN, E.: *Pflanzliche Infektionslehre*, 2. Aufl. 1951.

Zum Glukagon-Problem.

Anknüpfend an unsere früheren Versuche mit glukagon-reicheren Insulinfractionen, haben wir zu Darstellungsversuchen die BLUMSCHE Methode (Pankreasextraktion mit Wasser bei 70°, Eindampfen im Vakuum und fraktionierte Fällung), modifiziert durch Zugabe von 2 g Cystein/1 kg Drüsen (Rind und Kalb), angewandt. Hierbei ließ sich durch isoelektrische Fällung aus acetonhaltiger Lösung bei p_H 5,1 in recht ergiebiger Ausbeute folgendes Produkt gewinnen:

Es handelt sich nach in vivo- (intravenöse Gabe beim Kaninchen) wie in vitro-Versuchen (Leberschnittmethode) um

einen glykogenolytischen, blutzuckersteigernden Stoff, der etwa in der gleichen Größenordnung wirkt, wie von anderen Arbeitskreisen für deren entsprechende Produkte beschrieben (Ausnahme: der von BÜRGER dargestellte Faktor); z.B. erhielten wir eine 100%ige Blutzuckersteigerung beim Kaninchen nach 0,7 mg/kg i.v. und eine maximale Glykogenolyse im Leberschnitt bei 0,4 mg/150 mg Leber in 1,5 cm³ Phosphatpuffer. Unser Präparat zeigte keine Insulinwirkung.

Die hyperglykämisierend-glykogenolytische Potenz verlor sich in der Trockensubstanz innerhalb von 2 bis 3 Tagen. Reaktivierung zu etwa 50% war durch Inkubation mit zehnfacher Menge Cystein über 10 Std bei 37° und p_H 7,4 möglich. Versuche mit dem Ziel eines Oxydationsschutzes durch Trocknung über Pyrogallol-Natronlauge brachten keinen Vorteil. Die anzunehmende Stabilisierung des Faktors in seiner Wirksamkeit durch Gegenwart von Insulin konnten wir bisher nicht beweisen.

Der Faktor ist amorph. Gibt man 500 mg in 50fache Menge mol/50 Phosphatpuffer zur Lösung, fügt gleiche Menge Aceton hinzu, bringt auf p_H 7,5, filtriert und säuert das Filtrat auf 5,1 an, entstehen gleich große, sechseckige Kristalle oder Kristalloide, welche die Ebene des polarisierten Lichtes drehen. Amorphes, vorher biologisch wirksames Produkt unterscheidet sich elektrophoretisch nicht von dem kristallisierten. Die glykogenolytische Aktivität in vitro beider Produkte ist nach Inkubation mit Cystein praktisch gleich. In der Bausteinanalyse ergeben sich ebenfalls keine sicheren Differenzen.

Der isoelektrische Punkt unseres Faktors liegt bei 4,6. Bei Elektrophorese (p_H 8,6) verhält er sich in seiner Wanderungsgeschwindigkeit etwa wie α_2 - bis γ -Globuline. Er zeigt drei sehr nahe zusammenliegende Banden. Er ist ein Glukoprotein mit 9,5% Hexose vom Mannose-Galaktose-Hexosaminotypus. Die sonstige Bausteinanalyse ergibt rund in g/100 g Glukoprotein: Asparaginsäure 7,5; Glutaminsäure 7; Lysin 6; Arginin 5; Histidin 2; Serin 5,5; Glycin 2; Alanin 9; Valin etwa 10; Phenylalanin etwa 10; Leucin etwa 7; Prolin etwa 8; Tryptophan 2,4; sehr wenig Cystin; wenig Tyrosin; sicher sind nicht vorhanden: Threonin, Oxyprolin und Methionin. Der Körper entspricht in seinen Eigenschaften und seiner Zusammensetzung am ehesten dem von H. E. WEIMER c. s. beschriebenen und von K. SCHMID kristallisiert erhaltenen Glukoprotein (MP 1) aus Menschen Serum. Er unterscheidet sich scharf davon durch Lage des isoelektrischen Punktes, Fehlen von Threonin und den geringeren KH-Gehalt.

Unser Faktor enthält Zn in Spuren (unter 1 μ /5 mg); er kann durch Zn nicht reaktiviert oder in seiner Aktivität gesteigert werden. Kristallisationsversuche aus Zn-haltiger Lösung verliefen stets negativ.

Es muß offen bleiben, inwieweit unser Faktor mit den bisher als Glukagon beschriebenen identisch ist oder dieses als Komponente enthält. Gegenüber den bisher in der Literatur festgelegten wenigen chemischen bzw. physikalischen Daten ergibt sich — abgesehen von der Rolle des Zn — kein Widerspruch.

Diabetikerheim und Forschungsinstitut für Diabetes Garz und Karlsburg, Kreis Greifswald (Direktor: Prof. Dr. G. KATSCH).

G. MOHNIKE und H. BOSER.

Eingegangen am 20. April 1953.

Über einen nervösen Hemmungsfaktor in Gehirn und Rückenmark.

Wie an anderer Stelle ausführlich berichtet werden wird, findet sich in Gehirn und Rückenmark (Pferd, Rind, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte, Maus) ein Stoff, der noch in hoher Verdünnung (10^{-7}) bei Krebsen (untersucht: *Cambarus clarkii*, *Palinurus argus*) die Wirkung der peripheren Hemmungsnerven ersetzen kann. Untersuchungen am Krebsherzen zeigten, daß dieser Stoff die nervösen Automatiezentren untätig macht oder die Frequenz der von ihnen ausgehenden Impulse verringert, während der Herzmuskel selbst unbeeinflusst und zu normalen Kontraktionen befähigt bleibt. Untersuchungen am Öffner- und Schließermuskel der Krebschere ergaben, daß durch den Hemmungsfaktor die Impulsübertragung vom motorischen Axon auf den Muskel verhindert oder stark gehemmt wird, während die Erregungsleitung im Axon selbst nicht beeinträchtigt erscheint. Am Krebsdarm bewirkt der Stoff eine Aufhebung der Spontanaktivität und blockiert die Wirkung von Acetylcholin.

Der Hemmungsfaktor konnte chemisch gereinigt werden und zeigt folgende Eigenschaften: Kochbeständig, dialysierbar, löslich in Wasser und HCl-Äthanol, unlöslich in Äthanol,

Propanol, Butanol, Aceton, Äther, Chloroform und Benzol. Der Faktor ist nur dann wirksam, wenn das p_H der Lösung den Wert 7 nicht überschreitet.

In letzter Zeit habe ich in Versuchen am Meerschweinchen-Ileum und am Kaninchen-Ileum folgendes gefunden: Wenn man normale Tyrodelösung als Badeflüssigkeit und Lösungsmittel verwendet, haben wäßrige Kochextrakte aus Gehirn, Rückenmark und Rückenmarkswurzeln eine kontrahierende Wirkung. Die nach Atropin und Neo-Atergan verbleibende Wirkung ist nach den Angaben von LEMBECK¹⁾ auf EULERS Substanz P zurückzuführen. Wie UMRATH²⁾ zeigt, läßt sich die aus dorsalen Wurzeln, Rückenmark und Gehirn gewinnbare Substanz P äußerst rasch fermentativ abbauen. — Testet man nun mit ungepufferter Tyrodelösung (p_H 6,5) oder solcher, die auf p_H 6,8 gepuffert ist (Verschiebung des Verhältnisses $NaH_2PO_4:NaHCO_3$), dann bekommt man völlig andere Wirkungen. Die Kontraktionswirkung der Substanz P (auch des gereinigten Wirkstoffs P, der von Prof. Dr. U. S. von EULER freundlichst zur Verfügung gestellt wurde) bleibt völlig aus. Die Wirkung von Acetylcholin ist dagegen eher verstärkt. Nur Extrakte aus ventralen Rückenmarkswurzeln zeigen die zu erwartende Acetylcholinwirkung, während Gehirn- und Rückenmarksextrakte scheinbar keinerlei Wirkung zeigen (Meerschweinchen-Ileum) bzw. die Spontanaktivität stark vermindern (Kaninchen-Ileum). Sie verursachen allerdings in manchen Fällen eine leichte Erschlaffung des betreffenden Darmstückes. Fügt man zu der mit Gehirn- oder Rückenmarksextrakt (1:200) beschickten Badeflüssigkeit Acetylcholin zu (in einer Konzentration, die normalerweise eine starke Kontraktion auslösen würde), dann bleibt dieses Acetylcholin völlig wirkungslos. Extrakte aus dorsalen und ventralen Rückenmarkswurzeln enthalten keinen Hemmfaktor; auch in Darmextrakten konnte dieser nicht nachgewiesen werden. — Wichtig ist, daß die zu testenden Extrakte ein p_H unter 7,0 aufweisen, da sonst der Hemmfaktor in einem unwirksamen Zustande an das Testobjekt gelangt. Ein p_H von 6,95 genügt aber, um ihn voll zur Wirkung kommen zu lassen. — Die Hemmungswirkung von Nervextrakten bleibt erhalten, wenn die mitenthaltene Substanz P durch raschen fermentativen Abbau verschwindet. Die Hemmungssubstanz wird durch ein anderes Ferment aus Gehirn, Rückenmark und Rückenmarkswurzeln zerstört. Das Optimum der Fermentaktivität liegt zwischen p_H 7 und p_H 8.

Der hier nachgewiesene Hemmfaktor konnte chemisch gereinigt werden (darüber wird noch ausführlich berichtet). Der gereinigte Faktor zeigt dieselben Wirkungen wie der noch in ungereinigten Extrakten enthaltene Hemmfaktor. Da sich die Eigenschaften des am Krebs nachgewiesenen Hemmfaktors mit denen decken, die der am Meerschweinchen- und Kaninchen-Ileum nachgewiesene Faktor aufweist, ist anzunehmen, daß es sich um ein und dieselbe wirksame Substanz handelt.

Kerckhoff Laboratories of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, USA.

Zoologisches Institut der Universität Graz, Österreich.

ERNST FLOREY.

Eingegangen am 15. April 1953.

¹⁾ LEMBECK, F.: Arch. exp. Path. u. Pharmakol. (im Druck).

²⁾ UMRATH, K.: Manuskript (1953).

Zur Unterscheidung synthetischer Muskelrelaxantien.

Der Einführung von d-Tubocurarinchlorid als Muskelrelaxans folgte unmittelbar die Suche nach synthetisch zugänglichen Substanzen mit gleicher oder ähnlicher Wirkung.

Therapeutisch verwendet werden in Deutschland im wesentlichen derzeit folgende Verbindungstypen:

- Succinyl-bis-cholinchlorid (Präparat (P) 1),
- Succinyl-bis-cholinjodid (P 2, 3),
- 1.2.3-Tri (β -Triäthylammoniumäthoxy) benzoltrijodid (P 4, 5),
- und Guajacol-Glycerinäther (P 6),
- neben d-Tubocurarinchlorid (P 7).

Für die qualitative Erkennung und papierchromatographische Analyse läßt sich das Verhalten gegenüber DRAGENDORFFS Reagenz heranziehen. Mit demselben reagieren d-Tubocurarinchlorid und Guajacol-Glycerinäther im Gegensatz zu P 1—5 nicht. Im Papierchromatogramm geben Succinyl-bis-cholin-Präparate einen hellrosa Fleck mit schmalen weißem Rand, 1.2.3-Tri (β -Triäthylammoniumäthoxy)-benzoltrijodid dunkelrosa Flecke mit hellrotem Rand. Da-

gegen läßt sich P 6 papierchromatographisch durch Besprühen mit alkoholischer Kalilauge (n/2) als hellgelber Fleck identifizieren. d-Tubocurarinchlorid kann bei Abwesenheit von Phenol und dergleichen mit FOLINS Reagenz und anschließendem Besprühen mit einer 5% Ammoniaklösung als hellblaugrauer Fleck erkannt werden.

Bei einer Identifizierung mit Hilfe von DRAGENDORFFS Reagenz lassen sich somit die Muskelrelaxantien in zwei Gruppen aufteilen: I. DRAGENDORFF-negative (P 6 und 7); II. DRAGENDORFF-positive (P 1—5).

Mit dem Lösungsmittel n-Butylalkohol, Eisessig und Wasser (60:15:30) (= Lö 9) ergibt P 6 einen R_F -Wert von 0,23, P 7 von 0,54.

Von der Gruppe II ergeben mit Lö 9 die Präparate 1—5 folgende Werte:

P	R_F	R_F	Temperatur
1	0,13	0,32	18—19° C
2	0,13	—	18—19° C
3	0,13	—	18—19° C
4	0,33	—	18—19° C
5	0,33	—	18—19° C

Der R_F -Wert von 0,32 ist identisch mit dem Wert von Cholinchlorid, das gleichfalls mit DRAGENDORFFS Reagenz eine zuerst violette, dann beim Trocknen stark verblassende Rosafärbung gibt.

Eine Variation der Lösungsmittel führt auch zu höheren R_F -Werten, wie nachstehende Tabelle zeigt. Doch fällt bei dem Lösungsmittel 4 (Chloroform, Methylalkohol und Wasser 25:16:5) der R_F -Wert von P 1—3 mit dem Wert von Cholinchlorid zusammen, was auf Grund des Befundes bei P 1 nicht wünschenswert ist. Günstige Resultate lieferte Lö 10a mit der Zusammensetzung Benzol, Methylalkohol und Wasser (10:85:5). Lö 9 ohne Essigsäure (= Lö 9a) führte bei P 1—3 zu keiner Wanderung, bei P 4 und 5 zu länglichovalen Flecken.

P	Lö 4 — R_F	Lö 9a — R_F	Lö 10a — R_F
1	0,65/0,67	0,00/0,09	0,53/0,60
2	0,65	0,00	0,53
3	0,65	0,00	0,53
4	0,74	0,00—0,16	0,69
5	0,74	0,00—0,16	0,69
Cholinchlorid	0,67	0,09	0,60

Eine weitere Trennung der Präparate der Gruppe II führt durch Besprühen mit 10% Kupfersulfatlösung zum Ziele: P 4 und 5 geben einen auch beim Trocknen beständigen braunen Fleck, P 1 und 2 keine Reaktion, P 3 feuchtet einen hellbraunen Fleck, der beim Trocknen (bei 100°) innerhalb weniger Minuten verschwindet.

Gearbeitet wurde mit der aufsteigenden Methode unter Verwendung von Papier Schleicher & Schüll Nr. 2043b.

Universitätsapotheke Tübingen.

ARMIN WANKMÜLLER.

Eingegangen am 2. Mai 1953.

Die spontane und künstliche Verwandlung von Sproßpilzen (Hefen) in Spaltpilze (Bakterien).

Die Biologie der Hefen lernt man bei den üblichen Kulturmethoden nicht vollständig kennen, vor allem nicht bei alleiniger Kultur in Traubenmost von p_H 2,8 bis 3,6. Man muß die in den Hefelaboratorien bisher üblichen Routinemethoden abändern, weniger saure Kulturmedien verwenden, die Kulturen bedeutend längere Zeit, als bisher üblich war, beobachten und vor allem bei Agarkulturen Sorge tragen, daß im Laufe von 12 bis 15 Monaten die Kulturen nicht eintrocknen können.

Läßt man erneut aus einer einzigen Zelle gezogene Hefestämme, also absolute Reinkulturen, in sorgfältigst sterilisierten, 2 bis 3 Wochen auf Sterilität geprüften, über EK-Schichten filtrierten Möhren- oder Bohnensamendekokten mit einem p_H 4,8 bis 6,2 wachsen und 12 bis 16 Monate lang ungeöffnet stehen, so kann man feststellen, daß nach dieser Zeit keineswegs mehr in allen Kulturen Hefen zu finden sind, sondern daß in 30 bis 45% der Reinkulturen die Hefezellen fast total verschwunden und an ihre Stelle sporulierende Bakterien getreten sind.

Diesen schon vor Jahren gemachten Beobachtungen bin ich mit einer Reihe äußerst sorgfältig angelegter, spezieller Versuche näher nachgegangen. So wurden am 5. 3. 51