

einstimmt. Die dabei gewonnenen hämagglutinierenden Einheiten unterscheiden sich aber schon elektronenoptisch eindeutig vom Hämagglutinin der K.P. Während das letztere nur 30 m μ groß ist, haben sie einen Durchmesser bis zu 50 m μ . Teilchen ähnlicher Größe fanden wir beim K.P.-Virus immer dann, wenn wir den Äther zu kurz (2—4 Stdn.) einwirken ließen und die Virusteilchen dadurch nur unvollständig abbauten. Da nun die Elementarteilchen der Influenza in den betreffenden Versuchen nie länger als 2 Stdn. mit Äther behandelt wurden, ist es möglich, daß auch hier derartige Produkte eines unvollständigen Abbaues auftraten. Die weitere, von unseren Befunden abweichende Feststellung, daß das Influenza-Agglutinin kein Kohlenhydrat enthält, ist u. E. durch die bisher vorliegenden Versuche noch nicht hinreichend gesichert.

Das von Tyrrell und Horsfall⁴ beschriebene Degradationsprodukt des Influenza-Virus, das durch häufig wiederholtes (50-mal) Tieffrieren und Auftauen des Erregers gewonnen wurde, zeigt zumindest im elektronenoptischen Bild eine auffallende Ähnlichkeit mit dem gebundenen Antigen der K.P. und seinen kettenförmigen Aggregaten. Da es aber sero-immunologisch nur noch Haptencharakter besitzt, liegt der Verdacht nahe, daß seine Feinstruktur beim Aufschließen der Elementarpartikel zerstört wurde.

Wie die beschriebenen Untersuchungen zeigen, lassen sich durch schonenden Abbau der Elementarteilchen und genauere Analyse der dabei erhaltenen Spaltprodukte unsere Kenntnisse vom Aufbau der tier-pathogenen Viren und den physikalisch-chemischen Grundlagen ihrer biologischen Aktivitäten wesentlich erweitern. Darüber hinaus besteht die Aussicht, auf diesem Wege Ansatzpunkte für ein chemotherapeutisches Vorgehen bei Viruskrankheiten zu finden. Für die Krankheitsbekämpfung könnte auch die Feststellung von Bedeutung sein, daß sich aus den Spaltprodukten der Virus-Elementarteilchen hochwirksame Impfstoffe herstellen lassen, deren Vorteil gegenüber den bisher verwandten Vakzinen darin liegt, daß sie keinerlei Ballaststoffe mehr enthalten. Auswerten läßt sich diese Erkenntnis aber erst, wenn neue Züchtungs- und Anreicherungsverfahren zur Verfügung stehen, die uns in die Lage setzen, große Mengen von gereinigtem Virus mit möglichst geringem Aufwand zu erzeugen.

G. Berger, P. Giebler, U. John und L. Kloetzel danken wir für ihre unermüdliche Mitarbeit.

Die Untersuchungen wurden durch Mittel gefördert, die die Deutsche Forschungsgemeinschaft und das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten zur Verfügung stellten.

Über das Vorkommen und Schicksal des Kynurenins bei verschiedenen Drosophilarassen

VON ROLF DANNEEL UND BERTHILDE ZIMMERMANN

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Bonn

(Z. Naturforschg. 9 b, 788—792 [1954]; eingegangen am 4. August 1954)

Wie die papierchromatographische Analyse von Puppen und Imagines zeigt, verläuft der Tryptophan-Stoffwechsel bei den Augenfarbmutanten von *Drosophila* den Erbformeln entsprechend verschieden. Bei den vermilion-Tieren (v und vbw) bleibt das Tryptophan unverändert liegen, bei der Wildrasse (+) wird es teilweise, bei der Mutante brown (bw) ganz zur Bildung des braunen Augenpigments verbraucht, während die cinnabar-Tiere (cn) das für sie unverwendbare Kynurenin in Kynurensäure umwandeln.

Der Augenfarbstoff der Wildrasse von *Drosophila* setzt sich, wie schon lange bekannt ist, aus zwei Komponenten zusammen, einer braunen und einer roten.

Der rote Farbstoff wird unter dem Einfluß des Erbfaktors bw⁺ gebildet; ist statt seiner das Allel

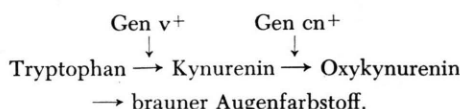
bw (brown) vorhanden, so bleiben die Augen rein braun, enthalten also keine Rotkomponente. Über die Vorstufen und die chemische Konstitution des roten Augenfarbstoffs wissen wir noch so gut wie nichts.

Der braune Augenfarbstoff der Taufiege entsteht unter der Einwirkung der Gene v⁺ und cn⁺ aus

Genkombination	Kynurenin	Oxykynurenin	Braunes Pigment	Rotes Pigment
$v^+cn^+bw^+ (= +)$	+	+	+	+
$v^+cn^+bw^- (= v)$	—	—	—	+
$v^+cn^-bw^+ (= cn)$	+	—	—	+
$v^+cn^+bw^- (= bw)$	+	+	+	—
$v^-cn^+bw^- (= vbw)$	—	—	—	—
$v^+cn^-bw^- (= cnbw)$	+	—	—	—
$v^-cn^-bw^- (= vcnbw)$	—	—	—	—

Tab. 1. Vorkommen der Augenpigmente und der bisher bekannten Vorstufen bei verschiedenen *Drosophilarassen*.

Tryptophan über Kynurenin und Oxykynurenin (Butenandt)¹ nach dem folgenden Schema:



Wird diese Reaktionskette an irgendeiner Stelle unterbrochen, so entfällt der braune Augenfarbstoff und es entstehen rein rotäugige Tiere. Dies ist z. B. der Fall bei der Mutante vermilion ($v^-cn^+bw^+$), die nicht imstande ist, Tryptophan in Kynurenin umzuwandeln, während die ebenfalls rotäugige Mutante $v^+cn^-bw^+$ zwar Kynurenin zu bilden vermag, dieses aber nicht in Oxykynurenin überführen kann. Die Genkombinationen $v^-cn^+bw^-$ und $v^+cn^-bw^-$ lassen weder die Bildung der roten noch die der braunen Komponente zu; v^-bw^- und cn^-bw^- -Fliegen haben daher farblose Augen, unterscheiden sich aber physiologisch-chemisch natürlich dadurch voneinander, daß die cn^-bw^- -Tiere Kynurenin bilden können, die v^-bw^- -Tiere aber nicht (Tab. 1).

Die beiden Augenfarbstoffe treten, wie das folgende Diagramm zeigt (Abb. 1), nicht gleichzeitig auf; der braune Farbstoff erscheint vielmehr im Laufe der Entwicklung zuerst, nämlich $2\frac{1}{2}$ Tage nach der Verpuppung, der rote dagegen erst 24 Stdn. später (bei 25°C). In dem Bild geben die Ziffern neben den einzelnen Kurvenpunkten das Alter der Puppen in Tagen an. Aus den beiden Koordinaten kann man außerdem die jeweilige Farbe des Pigments (Farbmeßtafel nach Ostwald) ablesen, die uns hier aber nicht beschäftigen soll (Danneel²).

Die folgenden Untersuchungen gingen vielmehr von der Frage nach dem Schicksal des Kynurens

bei den cn^- -Tieren aus, die ja das Kynurenin nicht, wie die cn^+ -Tiere, in Oxykynurenin und weiterhin in braunes Pigment umzuwandeln vermögen.

Material und Methoden

Unsere Beobachtungen beruhen auf papier-chromatographischen Untersuchungen. Als Solvens verwendeten wir *n*-Propanol-Ammoniak (1%) im Verhältnis 2:1, bei der 2-dimensionalen Chromatographie außerdem das Partridge-Gemisch (Butanol-Eisessig-Wasser) als zweiten Entwickler. Nach einigen Vorversuchen entschieden wir uns für das Papier SS 2040^b, das bei den uns interessierenden Stoffen die besten Trennungen ergab.

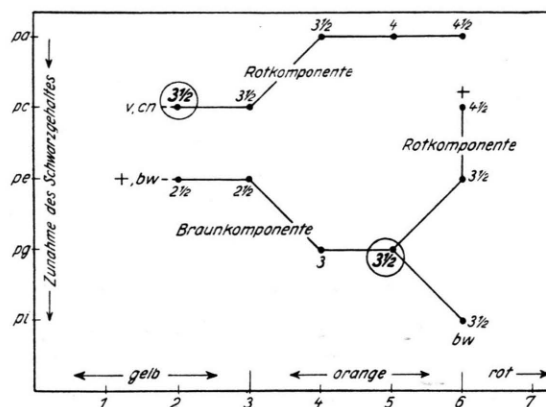


Abb. 1. Der Verlauf der Augen-Ausfärbung bei $+$, bw^- , cn^- und v^- -*Drosophila*-Puppen. Die Ziffern neben den einzelnen Kurvenpunkten geben das Alter der Puppen in Tagen an (25° -Zuchten). Abszisse: Vollfarben und ihre Farbwerte. Ordinate: Grad der Schwarztrübung.

Untersucht wurden $+$, bw^- , cn^- , v^- , cn^-bw^- , v^-bw^- und w^- -Tiere, und zwar Puppen aller Altersstadien sowie frisch geschlüpfte Imagines, wobei wir jeweils die Köpfe und Körper getrennt prüften. Zur Gewinnung des Ausgangsextraktes wurden die Köpfe bzw. Körper ohne Vorbehandlung auf die Startlinie aufgequetscht, die entstandenen Flecke getrocknet und bei 15° aufsteigend chromatographiert.

Da die in Betracht kommenden Stoffe fluoreszieren, konnten wir sie unter der UV-Lampe lokalisieren. Zur Identifizierung dienten außer den R_f -Werten die aus der Literatur bekannten Nachweisreaktionen (Hellmann³) und die UV-Absorptionen der Eluate, die mit dem Beckman-Spektrophotometer ermittelt wurden*.

Für die einfachen Chromatogramme verwendeten wir jeweils 20, für die zweidimensionalen 100 und für die spektrophotometrischen Untersuchungen mindestens 300 Köpfe bzw. Körper.

³ H. Hellmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 287, 205 [1951].

* Die Vergleichssubstanzen verdanken wir Herrn Prof. Dr. A. Butenandt, Tübingen.

¹ A. Butenandt, W. Weidel u. H. Schloßberger, Z. Naturforschg. 4b, 242 [1949].

² R. Danneel, Biol. Zbl. 61, 388 [1941].

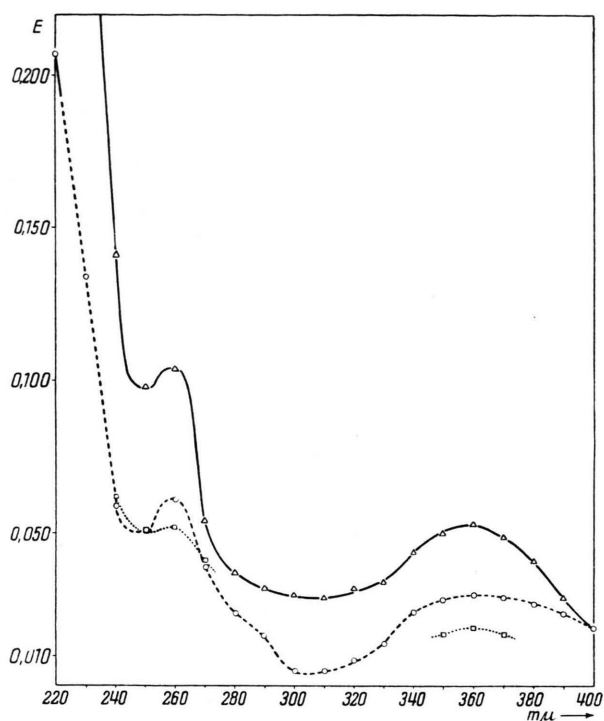


Abb. 2. Absorptions-Spektrum des fluoreszierenden Fleckes 3. Ordinate: Extinktionskoeffizient. Abszisse: Wellenlänge in $m\mu$. —: 0,0001% Kynurenin. ----: Eluat (in 3 ccm dest. Wasser) des Fleckes 3 aus 300 cn-Puppenköpfen.: 0,00005% Kynurenin.

Versuchsergebnisse

I. Bei der papierchromatographischen Analyse von Extrakten aus Puppenköpfen und -körpern auf SS-

Papier 2040^b mit Propanol-NH₃ (2:1) als Solvens fanden wir zunächst das Kynurenin in Form eines blau-fluoreszierenden Fleckes („Fleck 3“) mit dem R_f -Wert 0,51, der u. E. mit dem von Hadorn⁴ beobachteten „Fleck 6“ ($R_f = 0,57$, Whatman I) identisch ist. Daß es sich um Kynurenin handelt, geht aus folgenden Befunden hervor:

1. Der R_f -Wert des Fleckes stimmt mit dem des reinen Kynurenins überein.

2. Die Substanz liefert, wie Kynurenin, eine karminrote Färbung mit Äthyl- α -Naphtylamin (Hellmann).

3. Die nach der Elution mit Wasser aufgenommene Absorptionskurve fällt mit der des Kynurenins (Dannenberg⁵) zusammen. Sie weist oberhalb von 250 $m\mu$ zwei Maxima auf, nämlich bei 260 $m\mu$ und bei 360 $m\mu$ (Abb. 2). Die Menge des aus 300 Puppenköpfen gewonnenen Kynurenins betrug, wie vergleichende Absorptionsmessungen mit reinem Kynurenin ergaben, etwa 1,5–3 γ . Sie liegt aber infolge der Verluste, die bei den verschiedenen Manipulationen auftreten, natürlich unter dem wahren Wert.

Wie zu erwarten war, fanden wir den „Fleck 3“ nur bei den v^+ -Rassen, also bei +, bw-, cn- und cnbw-Fliegen**, nicht aber bei v- und vbw-Tieren (Abb. 3). Dort wo er vorhanden war, trat er nicht immer zu derselben Zeit und mit derselben Intensität auf, wie die folgenden Beobachtungen zeigen:

Nr. der Flecke	Farbe der Fluoresz.	Rf. Werte	cn			cnbw			v			vbw			bw			w			+				
			bis 3 1/2 d	P ab 3 1/2 d	F	bis 3 1/2 d	P ab 3 1/2 d	F	bis 3 1/2 d	P ab 3 1/2 d	F	bis 3 1/2 d	P ab 3 1/2 d	F	bis 2 1/2 d	P ab 2 1/2 d	F	bis 2 1/2 d	P ab 2 1/2 d	F	bis 2 1/2 d	P ab 2 1/2 d	F		
1	blauviolett	0,80	■	■	■		■	■	■		■	■	■		■	■	■		■	■	■		■	■	■
2	blau	0,66			●																				
3	graublau	0,51	■	■	■	■	■	■	■					■	■			■	■	■			■	■	
4	grün	0,45		☐	☐						☐	☐											☐	☐	
5	gelbgrün	0,37		☐	☐						☐	☐	☐										☐	☐	
6	blau	0,31	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
7	gelbbraun	0,21													○	○						○	○		
8	violett/blau	0,15	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		

Zeichenerklärung: P = Puppen; F = Fliegen (frisch geschlüpft); d = Alter in Tagen; ○ = Köpfe, □ = Körper
 ■ = violette Fluoreszenz ■■■ = blaue Fluoreszenz ■■■■ = grüne Fluoreszenz ■■■■■ = gelbgrüne Fluoreszenz
 □ = gelbe Fluoreszenz

Abb. 3. Vorkommen der Fluoreszenzflecke 1–8 bei verschiedenen Drosophila-Rassen im Laufe der Entwicklung und in verschiedenen Körperteilen.

⁴ E. Hadorn, Jber. schweiz. Ges. Vererbungsforsch. 26, 470 [1951].

⁵ H. Dannenberg, Z. Naturforsch. 4b, 327 [1949].

** Tiere der weißäugigen Rasse w lieferten bei $R_f = 0,51$

in allen Puppenstadien zwar ebenfalls einen Fleck, der aber nur sehr schwach blau fluoreszierte und sich mit Äthyl- α -Naphtylamin bisher nicht nachweisen ließ. Kynureninsäure (s. u.) konnten wir hier überhaupt nicht finden.

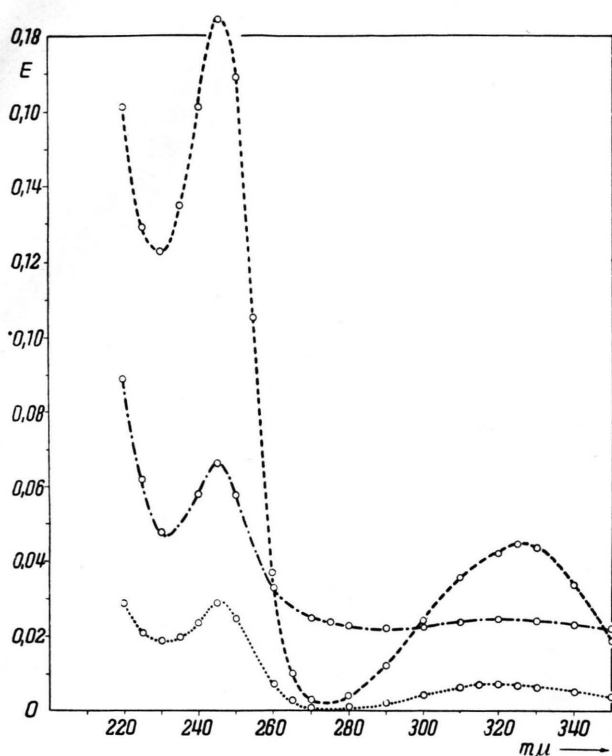


Abb. 4. Absorptions-Spektrum des fluoreszierenden Fleckes 2. Ordinate und Abszisse wie in Abb. 2. ----: 0,005% Kynurensäure in $n/10$ -NaOH; - · - · - ·: Eluat (in $n/10$ -NaOH) des Fleckes 2 aus 400 mg cn-Fliegen; ·····: 0,0005% Kynurensäure in $n/10$ -NaOH.

1. In den Chromatogrammen aus Kopfextrakten von +- und bw-Tieren verschwindet der blaue Kynureninfleck, wenn die Puppen $2\frac{1}{2}$ Tage alt sind, wenn also die Bildung des braunen Pigments beginnt. Doch wird bei den +-Tieren nicht alles verfügbare Kynurenin verbraucht, sondern ist in den Körpern der Imagines auch später noch nachweisbar. Bei den bw-Tieren verschwindet der Fleck dagegen völlig. Wir halten es für möglich, daß im Auge nur eine bestimmte Gesamtfarbstoffmenge Platz hat, daß also das rote Pigment bei den +-Tieren auf Kosten des braunen entsteht, vielleicht durch Inanspruchnahme eines Teiles der Granula, während bei den bw-Tieren alles Kynurenin in braunes Pigment verwandelt werden kann.

2. Bei den cn- und cnbw-Tieren, die ja Kynurenin bilden, es aber nicht weiter umzuwandeln vermögen, bleibt das Kynurenin bis zum Schlüpfen der Tiere in den Köpfen und Körpern unverändert lie-

gen. Nach dem Schlüpfen läßt sich in den Körpern der Imagines auch weiterhin Kynurenin nachweisen, in den Köpfen dagegen nicht mehr. Wir kommen auf diese Frage später noch einmal zurück.

3. Extrakte aus v- und vbw-Puppen und -Fliegen enthalten erwartungsgemäß kein Kynurenin, wohl aber freies *Tryptophan*, kenntlich an dem R_f -Wert (0,6) und der positiven Reaktion mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd.

II. Bei der chromatographischen Aufarbeitung von Extrakten aus Tieren der *Drosophila*-Rasse cn läßt sich in allen Teilen der Puppen und in den Körpern der Imagines deutlich Kynurenin nachweisen, in den Köpfen der Imagines dagegen nicht mehr. Dort tritt statt des blau fluoreszierenden Kynureninfleckes ($R_f = 0,51$) eine neue, sonst bei keiner der untersuchten Rassen vorhandene fluoreszierende Substanz auf („Fleck 2“), die mit der als Umwandlungsprodukt des Tryptophans schon lange bekannten *Kynurensäure* identisch ist:

1. Der Stoff fluoresziert grau-blau bei $R_f = 0,66$. Das gleiche Verhalten bei gleichem R_f -Wert zeigt reine Kynurensäure.

2. Die Fluoreszenz wird erst dann deutlich, wenn man das getrocknete Chromatogramm einige Min. lang mit UV-Licht bestrahlt (Wiss und Hellmann⁶). Die Intensität der Fluoreszenz verstärkt sich im Laufe von einigen Tagen noch weiter.

3. Die photometrische Messung der mit $\frac{1}{10}$ -n. NaOH eluierten fluoreszierenden Streifen ergab das Absorptionsbild der reinen Kynurensäure (Abb. 4). In beiden Fällen zeigt sich ein Maximum bei 245 $m\mu$ und ein zweites Maximum bei 310–330 $m\mu$. Der etwas geringere Anstieg der Kurve des eluierten Stoffes bei 320 $m\mu$ dürfte teils auf seiner geringen Konzentration, teils auf der Überlagerung durch andere Stoffe beruhen.

Während die *Drosophila*-Rassen bw und + das Kynurenin über Oxykynurenin in braunes Augenpigment umwandeln, wird also bei cn-Tieren das Kynurenin nach dem Schlüpfen zu Kynurensäure abgebaut. Die sehr labile Zwischenstufe dieses Abbaues, die *o*-Aminobenzoyl-Brenztraubensäure (Wiss⁷), konnten wir nicht nachweisen.

Wir hatten weiterhin erwartet, daß sich die weißäugige Mutante cnbw hinsichtlich des Kynureninabbaues genau wie die cn-Rasse verhielte. Der bei den cn-Tieren so deutliche Nachweis der Kynurensäure gelingt aber bei der Mutante cnbw nicht.

⁶ O. Wiss u. H. Hellmann, Z. Naturforschg. 8b, 70 [1953].

⁷ O. Wiss, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 293, 106 [1953].

Auch nach der Aufarbeitung eines großen Puppen- und Fliegenmaterials trat niemals eine Substanz auf, welche die für die Kynurensäure typischen Eigenschaften besaß. Der Abbau des Kynurenins muß hier also in anderer Richtung verlaufen, was angesichts der Erbformel sehr auffällig ist.

III. Oberhalb des Fleckes 2 (Kynurensäure) liegt bei $R_f = 0,8$ noch ein weiterer *Fleck 1*, den wir aber vorläufig weder identifizieren noch seinem Vorkommen nach in die Ommochrombildung einordnen konnten und der deshalb hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden soll. Er ist bei allen untersuchten Rassen vorhanden, und zwar in den Puppen und in den Fliegen. Der Stoff fluoresziert blau-violett, ist ninhydrin-negativ, färbt sich mit Methylrot rosa-rot, mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd braun an und reagiert nicht mit Äthyl- α -Naphthylamin, ist also nicht mit Anthranilsäure identisch, die den R_f -Wert 0,7 besitzt.

IV. Unterhalb des Fleckes 3 (Kynurenin) folgen zwei weitere fluoreszierende *Flecken 4 und 5* mit den R_f -Werten 0,45 und 0,37 (Abb. 3), die offenbar

mit der Bildung des *roten Augenfarbstoffes* zusammenhängen, weil sie bei bw-, cnbw- und vbw-Tieren fehlen. Diese beiden Substanzen interessieren uns natürlich besonders und sind Gegenstand weiterer Untersuchungen. Ein noch weiter unten liegender gelb fluoreszierender *Fleck 7*** mit dem R_f -Wert 0,21 kommt nur bei Fliegen vor, die braunes Augenpigment zu bilden vermögen (+ und bw). Dann folgt ein violett fluoreszierender *Fleck 8* ($R_f = 0,15$), dessen Farbe bei den Puppen, die rotes Augenpigment bilden (+, cn, v) gegen Ende der Verpuppungszeit in Blau umschlägt, bei den braun- und weißäugigen Puppen (bw, cnbw, vbw, w) dagegen nicht. Und schließlich finden sich bei der von uns verwendeten Technik in der Nähe des Startpunktes bei $R_f = 0,09$ und 0,03 zwei weitere Stoffe, die bereits bei Tageslicht orange gefärbt sind und offensichtlich Komponenten des roten Augenfarbstoffes selbst darstellen (*Fleck 9 und 10*).

** Der bei $R_f = 0,31$ liegende *Fleck 6* tritt bei allen untersuchten Drosophilarassen auf, hat mit der Augenfarbe also offenbar nichts zu tun.

Mitosegifte und Funktions-Formwechsel bei Zellen des Mäuse-Ascitescarcinoms

VON WILHELM HOMANN

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Erlangen (Direktor: Prof. Dr. Erich Müller)

(Z. Naturforschg. 9 b, 792—796 [1954]; eingegangen am 29. September 1954)

1. Es wird gezeigt, daß es möglich ist, mit den bekannten cytostatischen Substanzen Trypaflavin und Colchicin den Funktions-Formwechsel von Zellen des MAC zu beeinflussen.

2. Einwirkung von Trypaflavin führt zu schweren Veränderungen im Bereich des chromatischen Apparates des Kernes und damit zum Ausfall aller Zeichen einer funktionellen Zellphase. Die Folge dieser Erscheinungen ist die Verhinderung des Eintritts der Zellen in die Phase der Teilung.

3. Nach Colchicin-Einwirkung hingegen tritt die funktionelle Phase der MAC-Zellen verstärkt in Erscheinung. Der Nucleolus wird häufig sehr groß, oft finden sich zwei oder mehr Nucleoli in einem Kern. Es wird angenommen, daß durch die Aktivierung der funktionellen Zellphase die Teilungstendenz der Zellen in gewissem Umfang zunächst gesteigert wird. Die eigentliche spindel-arretierende Wirkung des Colchicins setzt erst später ein.

Nach Altmann^{1,2}, Grundmann und Marquardt³, Marquardt⁴ und Grundmann⁵ lassen sich im Leben einer Zelle zwei grundsätzlich verschiedene Phasen unterscheiden, von denen eine

jede durch festumrissene morphologische Merkmale charakterisiert ist. Die eine Phase ist der Vermehrung der Zellen gewidmet und läuft unter den bekannten Zeichen des Teilungs-Formwechsels ab, während die andere der Funktion der Zelle dient und durch den

¹ H. W. Altmann, Z. Krebsforsch. 58, 632 [1952].

² H. W. Altmann, Grundle. u. Praxis chem. Tumorbehandlung, 190 S., Springer 1954.

³ E. Grundmann u. H. Marquardt, Naturwissenschaften 40, 557 [1953].

⁴ E. Grundmann u. H. Marquardt, Chromosoma 6, 115 [1953].

⁵ E. Grundmann, Grundlagen u. Praxis chem. Tumorbehandlung, 187 S., Springer 1954.