Sitzungsberichte

der

mathematisch-naturwissenschaftlichen Abteilung

der

Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München

1936. Heft II

Mai-Juli-Sitzung

München 1936

Verlag der Bayerischen Akademie der Wissenschaften

in Kommission bei der C. H. Beck'schen Verlagsbuchhandlung

Bayerische Staatsbibliothek München

Einige Beobachtungen am Gift der Brillenschlange (Naja tripudians).

Von Heinrich Wieland und Wilhelm Konz

Vorgelegt in der Sitzung vom 13. Juni 1936

Es finden sich in der Literatur Angaben, nach denen die aktiven Bestandteile der stärksten Schlangengifte, der von Cobra und von Crotalus, stickstofffrei sein sollen.[1] Dadurch schien sich ein Zusammenhang zu den ebenfalls stickstofffreien Giftstoffen der Kröten aufzutun, über deren chemische Natur man ziemlich weitgehend unterrichtet ist.

Das Material, das zur Untersuchung diente, war von dem Haffkine-Institut in Bombay bezogen. Die Wirksamkeit der Präparate von verschiedenen Lieferungen war innerhalb der Fehlergrenzen die gleiche. Sie wurde an ausgewachsenen weißen Mäusen von 18 bis 20 g Gewicht bestimmt, denen die zu prüfenden Lösungen in die Schwanzvene eingespritzt wurden. Als „Mäuseeinheit" wurde die Giftmenge festgesetzt, die innerhalb von 12 Stunden für ein Tier eben noch tödlich war. Dieser Test erwies sich als ziemlich genau; die Werte schwankten höchstens in der Breite von $\pm 10\%$. Das native Kobragift enthielt eine ME in 9–10 γ. 1 mg reicht also aus, um 100 Mäuse zu töten.

Bei der Nacharbeitung der Angabe von E. St. Faust ließ sich das von ihm beschriebene stickstofffreie „Ophiotoxin" nicht gewinnen. Das Produkt, das entsprechend der Vorschrift isoliert wurde, besaß zwar gegenüber dem Ausgangsmaterial einen verminderten Stickstoffgehalt, aber keine erhöhte Giftigkeit.

Zu der gleichen Erkenntnis von der Irrtümlichkeit der Angaben Fausts ist inzwischen F. Micheel[2] im Göttinger Laboratorium auch für das Gift der Klapperschlange gekommen, so daß über die eiweißartige Natur der Schlangengifte kaum mehr ein Zweifel bestehen kann.

---

[1] E. St. Faust, Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 56, 236 (1907); 64, 244 (1911).

[2] F. Micheel und F. Jung, Hoppe-Seylers Ztschr. f. Physiol. Chemie *239*, 217 (1936).

Mit den Ergebnissen Micheels, die in der unlängst erschienenen Abhandlung veröffentlicht sind, gehen die Beobachtungen, die wir beim näheren Studium des Kobragiftes gemacht haben, zu einem guten Teil parallel. Dabei hat man in Göttingen das Gift der Kap-Kobra (Naja flava) bearbeitet. In den beiden Laboratorien ist man auf etwas verschiedenen Wegen zu einer weitgehenden Befreiung des Giftes von unwirksamen Begleitstoffen und damit zu einer Steigerung der toxischen Wirksamkeit auf das Fünffache von der ursprünglichen gekommen. Eine ME ist in 2 γ dieser Präparate enthalten.

Eine weitere Anreicherung der Wirksamkeit ist nicht geglückt. Man kann daraus schließen, daß die toxische Komponente des Kobragiftes nunmehr in einigermaßen einheitlicher Form vorliegt. Dafür spricht der Umstand, daß bei fortgesetzter fraktionierter Fällung solcher Präparate alle Anteile von gleicher Wirksamkeit sind. Ferner zeigt die Messung der Dialysiergeschwindigkeit nach Brintzinger an, daß das angereicherte Kobragift aus Molekeln von im wesentlichen gleicher Größe besteht. Auf Grund der so gemessenen Dialysenkonstanten kommen wir zu einem Molekulargewicht von 1500 bis 2000, während Micheel und Jung diese Größe zwischen 2500 und 4000 eingrenzen. Das ist kein grundsätzlicher Unterschied. Es besteht vielmehr Übereinstimmung darüber, daß die wirksame Komponente des Kobragiftes kein höherer Eiweißkörper ist, wie man bisher allgemein angenommen hatte. In der Zusammensetzung dem Eiweiß verwandt erscheint es als Polypeptid von nicht gesicherter chemischer Einheitlichkeit, nicht gesichert deshalb, weil bis jetzt alle Kristallisationsversuche fehlgeschlagen sind.

Wir haben das Kobratoxin mit dem kristallisierten Eiweiß aus Antiaris-Milchsaft, das wir Herrn H. Kiliani in Freiburg verdanken, verglichen. Die beiden Peptide scheinen sich wegen ihres ausgesprochen hohen Schwefelgehaltes nahe zu stehen. (Kobratoxin enthält gegen 5%, Antiaris-Eiweiß 7% Schwefel.) Das pflanzliche Eiweiß läßt sich – ganz anders als etwa die kristallisierten Globuline – aus heißem Lösungsmittel umkristallisieren. Die neurotoxische Wirkung fehlt ihm vollkommen. Eine vergleichende Hydrolyse der beiden polypeptidartigen Verbindungen ist noch im Gange.

Wir kommen fernerhin, ebenso wie Micheel, zu der Auffassung, daß im Kobratoxin kein Symplex im Sinne Willstätters vorliegt. Dagegen spricht schon die niedrige Molekulargröße des Toxins. Man wird seiner weiteren Untersuchung die Arbeitshypothese zugrunde legen können, daß einer definierten polypeptidartigen Verbindung vermöge einer noch nicht erkannten spezifischen Gruppe die neurotoxische Wirkung zukommt. Mit dieser Auffassung steht es auch gut im Einklang, daß wir aus dem Kobratoxin Salze darstellen konnten, ein Pikrat und ein Chlorhydrat. Die aus dem Pikrat regenerierte Base besitzt nahezu unverminderte Aktivität; auch das Chlorhydrat ist in seiner Wirksamkeit kaum geschwächt. Es ist weiter wahrscheinlich, daß die „prosthetische" Gruppe des Toxins leicht hydrolytisch abgespalten wird und daß darauf seine (nicht allzu große) Empfindlichkeit gegen Säuren und Alkalien zurückzuführen ist. Durch Hydrolyse scheint auch die Thermolabilität der wäßrigen Giftlösungen bedingt zu sein. Denn bei gleicher Temperatur, bei der die wäßrige Lösung an Wirksamkeit einbüßt, wird in Alkohol keine Inaktivierung wahrgenommen.

Es ist nun höchst merkwürdig, daß das Kobratoxin, auch nachdem es durch Zellophan dialysiert ist, aus der wäßrigen Lösung durch kurzes Erhitzen auf 100° ausgeflockt wird, in ganz derselben Weise, wie dies bei einer Lösung von Eieralbumin der Fall ist. Das Antiaris-Eiweiß, das auf Grund der Dialysiergeschwindigkeit höher molekular ist als unser Präparat, zeigt diese Erscheinung nicht.

Einige Eigenschaften und Reaktionen des Rohgiftes

Das Rohgift besteht aus hellgelben Körnern vom Aussehen des Eieralbumins oder von zerkleinertem Gummiarabikum. Es enthält 10–12% Wasser, die aus der gepulverten Substanz beim Trocknen im Vakuum über Phosphorpentoxyd weggehen. In Wasser ist es langsam, aber vollständig löslich, rasch in verdünnten Säuren, auch Essigsäure und Alkalien. Die wäßrigen Lösungen sind schwach opaleszierend und geben unter verschiedenem pH kaum nennenswerte Fällungen. Die Angaben von Cal-

mette,[1] daß beim kurzen Erhitzen der wäßrigen Lösung des Giftes auf 75° ein großer Teil der Substanz zur Koagulation komme, können wir an unserem Material nicht bestätigen. Dagegen beginnt die wäßrige Lösung beim Erhitzen im siedenden Wasserbad nach ½ Stunde sich zu trüben. Nach 2–3 Stunden hat sich ein dicker flockiger Niederschlag ausgeschieden, der auch in viel Wasser nicht mehr in Lösung zu bringen ist. In verdünnter Lauge ist diese Fällung leicht löslich und wird aus dieser Lösung durch Säure wieder ausgeschieden.

114 mg Rohgift in 6 ccm Wasser gelöst, wurden 6 Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt. Der nach dem Erkalten abfiltrierte und mit Azeton gewaschene Niederschlag wog 65 mg. Die Lösung gab schwache Ninhydrinreaktion, ein Zeichen, daß teilweise Hydrolyse unter Bildung von Aminosäuren eingetreten war.

Von *Eiweißreaktionen* des Rohgiftes ist die Biuretprobe positiv, aber viel schwächer als z. B. bei Hühnereiweiß. Die Xanthoproteinreaktion ist von etwa gleicher Stärke. Ninhydrinprobe negativ, ebenso Reaktion nach Adamkiewicz-Hopkins. Bleiprobe auf Schwefel stark positiv. Da eine, wenn auch schwache Farbreaktion mit α-Naphthol-Schwefelsäure festgestellt wurde, hat man mit einem sehr geringen Kohlehydratgehalt des Rohgiftes zu rechnen.

Daß *höheres Eiweiß* im nativen Kobragift nicht in beachtlicher Menge enthalten ist, zeigt außer den Erscheinungen bei der Dialyse das Fehlen der Koagulierbarkeit der wäßrigen Lösungen bei mäßiger Temperatur. Auch nach der Methode von Sevag[2] durch Einfrieren einer konzentrierten wäßrigen Lösung des Giftes mit flüssiger Luft und Ausschütteln der aufgetauten Lösung mit Chloroform-Amylalkohol ließ sich kein Eiweiß abscheiden.

Adsorptionsversuche

Die untersuchten Mittel, Tierkohle, Kaolin, Tonerde, Silikagel, Seidenfibroin, adsorbieren ohne Auswahl und praktisch vollständig. Die Elution gelingt nur ganz unzulänglich und liefert unwirksame Präparate. Nur an basischem Aluminiumsulfat nach Karrer[3] hat sich eine Verstärkung der Wirksamkeit erreichen

[1] Ann. Inst. Pasteur *11*, 214 (1897).
[2] Biochem. Ztschr. *273*, 419 (1934).
[3] Zschr. f. Physiol. Chem. *135*, 134 (1924).

lassen, indem 50 mg Rohgift, in 80% igem Alkohol gelöst (vom Unlöslichen war abzentrifugiert worden), an 1,5 g des basischen Salzes adsorbiert und mit wäßrigem Alkohol von abnehmender Konzentration in Fraktionen wieder eluiert wurden. Mit 20% igem Alkohol wurden 10 mg von der Wirksamkeit 5 γ je ME herausgelöst.

Um die Schwierigkeiten der Elution zu vermeiden, adsorbierte man an ein Adsorbens, das, unter milden und harmlosen Bedingungen gelöst, den aufgenommenen Giftstoff wieder freigab. Frisch gefälltes Zinkhydroxyd scheint dieser Forderung zu genügen. Man adsorbierte die Lösung von 32 mg Kobragift in 10 ccm 60% igen Alkohol an einer 6 cm hohen Säule von $Zn(OH)_2$ vom Durchmesser 6 mm. Alle wirksame Substanz wurde festgehalten. Durch 15stündiges Schütteln des Zinkhydroxyds mit Wasser wurden 21 mg eluiert von einer stark verminderten Wirksamkeit (30–40 γ je ME). Der wirksame Anteil, der festgehalten wurde, ließ sich zusammen mit dem Zinkhydroxyd leicht in verdünnter Essigsäure auflösen. Seine Abtrennung durch Dialyse war unmöglich. Man würde aber wohl zum Ziel kommen, nachdem jetzt die Fällbarkeit des Toxins mit Pikrinsäure und die Zerlegbarkeit des Pikrats fast ohne Einbuße an Wirksamkeit gefunden worden sind.

Auch die *Filtration* der wäßrigen Giftlösung *durch eine Kollodiummembran* steigert die Aktivität des hindurchgegangenen Anteils auf etwa den doppelten Wert, da die höher molekularen Beimengungen zurückgehalten werden. Präparative Bedeutung kommt dieser Methode jedoch nicht zu. Bei der *Elektrodialyse* durch Kollodiummembran findet ebenfalls eine Scheidung statt; die in den Kathodenraum übergegangene Substanz hat aber, wahrscheinlich unter der Wirkung des Stroms, sehr erheblich an Wirksamkeit verloren. Wir haben auch, jedoch ohne Erfolg, die Druckfiltration durch sehr feinporige Membranfilter bei 100 Atmosphären untersucht.

Schüttelt man die wäßrige Lösung des Kobragiftes längere Zeit mit *Anilin*, so werden etwa 30% des Einsatzes an unwirksamer Substanz ausgeflockt. Aus der Lösung läßt sich dann, allerdings in unzureichender Menge, ein Präparat von der Wirksamkeit 6–7 γ je ME isolieren.

Reinigung des Rohgiftes durch fraktionierte Fällung

Vorversuche. Je 10 mg Rohgift wurden fein gepulvert, mit je 2 ccm absol. Alkohol, 80-, 60-, 40- und 20%igem Alkohol übergossen und unter häufigem Umschütteln 4 Wochen lang aufbewahrt. Dann wurde zentrifugiert, die Lösung in einer Glasschale im Vakuumexsikkator über Ätzkali und konz. Schwefelsäure eingedunstet und die Wirksamkeiten des Inhaltes der Lösungen wie vom Ungelösten bestimmt. Vom 40%igen Alkohol wurden 9 mg, vom 20%igen die ganze Substanz gelöst. Die Wirksamkeit war voll erhalten. Im absol. Alkohol blieben 9,6 mg ungelöst, im 80%igen waren es 4,6 mg. Am günstigsten war die Aufteilung mit 60%igem Alkohol. Es blieben ungelöst 2 mg von der Wirksamkeit 50 γ je ME, der in Lösung gegangene Anteil zeigte eine Wirksamkeit von 6 bis 7 γ. Während absol. Äthylalkohol nichts von dem Toxin aufnimmt, wurden von absol. Methylalkohol bei einem analogen Ansatz 3,6 mg von der Wirksamkeit 18 γ gelöst.

Das präparative Verfahren. 10 g Rohgift werden in 1560 ccm Wasser gelöst; zu dieser Lösung läßt man unter Umrühren langsam 2400 ccm absol. Alkohol zufließen. Die abgeschiedenen Flocken haben sich nach einstündigem Stehen des Kolbens im Eisschrank abgesetzt, vollständige Klärung erreicht man durch sich anschließendes Zentrifugieren. Der abzentrifugierte Niederschlag wiegt nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator 2,7 g und hatte eine Wirksamkeit von rund 100 γ. Das entspricht 2% der im Ausgangsmaterial enthaltenen Aktivität.

Die wäßrig-alkoholische Lösung wird im Vakuum bei einer Badtemperatur von höchstens 40° auf etwa $^1/_4$ Liter eingedampft; der Alkohol muß vollkommen entfernt sein. Die eingeengte, schwach gelb gefärbte Lösung wird mit Wasser auf 360 ccm verdünnt. Man läßt in sie 360 ccm Azeton unter Umschwenken des Kolbens einlaufen. Die auftretende Trübung verdichtet sich nach fünfstündigem Stehen im Eisschrank zu einem feinen Niederschlag, von dem abzentrifugiert wird. Im Vakuumexsikkator getrocknet sind es 340 mg von der Wirksamkeit 14 γ. Die abgetrennte Lösung wird alsbald mit weiteren 360 ccm Azeton vermischt, die einen farblosen flockigen Niederschlag hervorrufen,

der abzentrifugiert und in der Zentrifuge mit Wasser-Azeton 1:2 gewaschen wird. Man trocknet diesen Niederschlag, der das hochwirksame Toxin darstellt, im Vakuum, zuerst über Schwefelsäure, dann über Phosphorpentoxyd. Die Ausbeute beträgt 2,21 g von der Wirksamkeit 2,5 γ.

In der Endlösung ist noch rund die Hälfte des eingesetzten Rohgiftes enthalten. Man dampft wieder im Vakuum ein und trocknet den Rückstand. Es sind 4,85 g einer hellgelben harzartigen Substanz, deren Wirksamkeit immer noch 25 γ beträgt.

Die Bilanz des Verfahrens gestaltet sich wie folgt:

Eingesetzt 10 g getrocknetes Rohgift entsprechend			1 100 000 ME
Gewonnen:	I. Vorfällung,	2,7 g entsprechend	27 000 ME
	II. Vorfällung,	0,34 g entsprechend	24 000 ME
	Hauptfällung	2,21 g entsprechend	886 000 ME
	Aus der Endlösung	4,85 g entsprechend	194 000 ME
	insgesamt		1 131 000 ME.

Es ist demnach bei der Verarbeitung kein nachweisbarer Verlust an toxischer Wirksamkeit entstanden. In den 22 Gew.% der Hauptfällung sind über 80% der Gesamtwirksamkeit enthalten.

Zu bemerken ist schließlich noch, daß bei dem von uns angewandten Anreicherungsverfahren die hämolytische Komponente des Kobragiftes so gut wie vollständig entfernt und in einer der neurotoxisch unwirksamen Fraktionen angereichert wird.

Von verschiedenen Versuchen, die Anreicherung des Toxins weiter zu treiben, war eine Fällung mit Alkohol erfolgreich. 50 mg des Toxins wurden in 6 ccm Wasser gelöst, zur Lösung wurden 9 ccm absol. Alkohol gefügt. Die Alkoholkonzentration ist die gleiche wie bei der Vorfällung, die Substanzkonzentration aber um ¼ größer.

Nach einstündigem Stehen trennt man wieder durch Zentrifugieren und verfährt in der gleichen Weise wie bisher. Niederschlag 11 mg von der Wirksamkeit 12 γ, aus der Lösung 39 mg von der Wirksamkeit 2 γ je ME.

Man sieht, daß aus dem durch Alkohol-Azeton angereicherten Toxin noch 20% weniger wirksamer Begleitstoffe entfernt worden sind.

Dialysenversuche

Die quantitative Auswertung der Dialyse nach Brintzinger, in der von F. Klages[1] angegebenen, vereinfachten Apparatur ergab, daß in dem hochwirksamen Toxin Molekeln von annähernd gleicher Größe vorliegen. Als Membran diente Zellophan 300 von der Firma Kalle & Co. Als Mittelwert aus den einzelnen Messungen errechnet sich ein Dialysen-Koeffizient von 0,0740 und 0,0589 (2 Meßreihen). Nach derselben Methode und mit derselben Membran wurde der Dialysen-Koeffizient des Klupeins, für dessen Überlassung wir Herrn E. Waldschmidt-Leitz danken, bestimmt; als Mittelwert ergab sich 0,0496. Nach der Formel $\frac{\lambda_1}{\lambda_2} = \frac{m_2}{m_1}$ (λ = Dialysen-Koeffizient, m = Molekulargewicht) ergibt sich unter Zugrundelegen des Molekulargewichtes 2000 für Klupein ein mittleres Molekulargewicht von 1555 für das Kobratoxin.

Die *Koagulation* des *Kobratoxins* beim Erhitzen seiner wäßrigen Lösung auf 100° geht in derselben Weise wie beim Rohgift vor sich.

113 mg in 6 ccm Wasser gelöst, wurden 6 Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt. Es waren 80,6 mg ausgeflockt.

Auch die frisch dialysierte Substanz wird unter diesen Bedingungen etwa in gleichem Maße ausgeflockt.

49,3 mg in 3 ccm Wasser gelöst. Nach 6 Stunden bei 100° war ein Niederschlag von 30 mg entstanden.

Azidimetrische Titrationen. Die vergleichende Titration mit alkoholischer Lauge (N = 0,010) und Phenolphthalein als Indikator in Wasser, 40-, 70- und 90%igem Alkohol ergab folgende Äquivalente:

Lösungsmittel	Kobratoxin	Antiaris-Eiweiß	Substanz aus Endlösung
H_2O	1960	1670	2630
40%iger Alkohol . . .	1625	1140	826
70%iger Alkohol . . .	1100	710	580
90%iger Alkohol . . .	620	565	425

[1] Liebigs Annalen 520, 87 (1935).

Zum Vergleich wurde auch die aus der Endlösung von der Anreicherung des Giftes erhaltene Substanz titriert (letzte Kolonne). Man sieht, daß Kobratoxin weniger saure Gruppen enthält, als Antiaris-Eiweiß, daß dagegen die Begleitsubstanzen, die sich in der Endlösung befinden, stärker sauer sind als das eigentliche Gift.

Pikrat des Toxins. 50 mg Kobratoxin werden in 5 ccm H_2O gelöst und mit 2 ccm kalt gesättigter Pikrinsäurelösung gefällt; der gelbe, flockige Niederschlag wird abgetrennt, mit Wasser und Äther ausgewaschen und getrocknet; man erhält 59,0 mg Pikrat. Zur Zerlegung wird in möglichst wenig Wasser aufgeschlämmt und mit verdünnter Salzsäure gerade sauer gegen Kongo gemacht; dann mit einem großen Überschuß von Azeton versetzt und solange durchgerieben, bis der Bodenkörper rein weiß erscheint.

Jetzt wird abfiltriert und mit Azeton ausgewaschen. Man erhält 37,2 mg eines rein weißen Pulvers, des Chlorhydrats, das in absol. Alkohol völlig löslich ist. Die Wirksamkeit liegt bei 3–4 γ.

Chlorbestimmung: 7,954 mg Substanz ergaben 2,51 mg AgCl; gef.: 7,81% Cl.

Chlorhydrat. 30–40 mg Kobratoxin werden in 5 ccm einer methylalkoholischen Salzsäure (N = 0,090) gelöst und die Lösung mit 15 ccm Essigester gefällt. Der feine, flockige Niederschlag wog nach dem Trocknen 36 mg. Die Substanz ist in Wasser, Methanol, Äthanol leicht löslich. Der ganze Versuch wird so rasch als möglich ausgeführt, um die schädigende Wirkung der Salzsäure auf die Wirksamkeit der Substanz auszuschalten. Die Wirksamkeit des so gewonnenen Chlorhydrats beträgt gegen 3 γ.

Chlorbestimmung: 4,167 mg Substanz gaben 1,24 mg Ag Cl; gef. 7,36% Cl.

Auf analoge Weise läßt sich aus dem Antiaris-Eiweiß ebenfalls ein Chlorhydrat gewinnen; aus 40 mg reinem Protein wurden 39 mg des Salzes erhalten; dieses ist ebenfalls spielend löslich in Wasser, Methanol und Äthanol.

Chlorbestimmung: 4,266 mg Substanz gaben 0,68 mg Ag Cl; gef. 3,94% Cl.

Zum Schwefelgehalt des Kobragiftes.

Schwefelbestimmungen.

Rohgift: 9,440 mg gaben 2,18 mg Ba SO_4; gef. 3,17% S.
10,211 mg gaben 2,35 mg Ba SO_4; gef. 3,10% S.
12,101 mg gaben 2,84 mg Ba SO_4; gef. 3,22% S.

Substanzen aus der Zerlegungsoperation.

Niederschlag mit 60%igem Alkohol:
12,030 mg: 2,00 mg Ba SO_4; gef. 2,38% S.
17,420 mg: 2,72 mg Ba SO_4; gef. 2,14% S.

Substanz aus der Endlösung:
15,871 mg: 4,28 mg Ba SO_4; gef. 3,70% S.
16,103 mg: 4,25 mg Ba SO_4; gef. 3,62% S.

Kobratoxin: 9,836 mg: 3,66 mg Ba SO_4; gef. 5,11% S.
20,441 mg: 7,66 mg Ba SO_4; gef. 5,14% S.

Über die Haftung des Schwefels im Kobragift wurden folgende Beobachtungen gemacht. Das Rohgift und auch die stark wirksamen Präparate geben mit alkalischer Bleilösung beim Kochen eine sehr starke Schwefelreaktion, die diejenige von Eieralbumin um ein Vielfaches übertrifft. Das gleiche gilt für das Antiaris-Eiweiß. Nachdem man das Kobragift – das rohe wie das wirksamere Material – in wäßriger Lösung einige Stunden erhitzt hat, fällt beim Koagulat wie beim Inhalt der Lösung die Schwefelprobe negativ aus. Dabei ist kein Schwefelwasserstoff abgespalten worden. Die gleiche Veränderung tritt auch beim Albumin aus Hühnerei auf.

Die Mittel zur Beschaffung des Ausgangsmaterials für diese Untersuchung sind durch den Roche-Fonds der Deutschen Forschungsgemeinschaft in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt worden.