

Chemische und biochemische Untersuchungen über Tumorproteine¹

Von F. KÖGL², Utrecht

Der Beginn der Arbeiten, über die hier zu berichten ist, liegt etwas mehr als zehn Jahre zurück. Der Ausgangspunkt war der Gedanke, in den Tumorproteinen nach D-Aminosäuren zu suchen, ein Gedanke, der alsbald über den Charakter einer gewöhnlichen Arbeitshypothese hinausging und den Kern einer Krebstheorie bildete.

Seit EMIL FISCHERS Zeiten schien es evident, daß die Natur für den Aufbau der Proteine anscheinend ausschließlich nur *eine* der beiden Spiegelbildformen der Aminosäuren verwendet. Die Sachlage vereinfachte sich weiterhin durch die Erkenntnis, daß diese Eiweißbausteine am α -C-Atom alle die gleiche räumliche Anordnung der Substituenten aufweisen. Die einschlägigen Untersuchungen, welche von E. FISCHER³, H. FREUDENBERG⁴ sowie vor allem von P. KARRER⁵ und Mitarbeitern ausgeführt worden sind, gestatten es, die Eiweißbausteine unabhängig vom jeweiligen Drehungssinn als L-Aminosäuren zu bezeichnen. Das Spiegelbild, die D-Form, wurde auch sonst in der Zelle nicht angetroffen, so daß man sie allgemein die «unnatürliche» Konfiguration nannte. Die erste Ausnahme ist im Jahre 1935 bekanntgeworden, als JACOBS⁶ und CRAIG unter den Spaltstücken von Ergotinin D-Prolin nachwiesen. Zwei Jahre später beschrieben IVÁNOVICS⁷ und BRUCKNER das aus D-Glutaminsäure aufgebaute Polypeptid der Milzbrandbazillen. Seit man sich im Zuge der Untersuchungen über Antibiotika intensiv für die Stoffwechselprodukte niedriger pflanzlicher Organismen interessiert, hat man wiederholt D-Aminosäurebausteine angetroffen. Besonders bekannt ist das Beispiel des D-Dimethylcystein- bzw. D-Valinbausteins der Penicilline. Obwohl auch die niedrigen pflanzlichen Organismen auf die L-Aminosäuren eingestellt sind oder diese als Substrat zum mindesten bevorzugen, mehren sich in der

letzten Zeit die Anzeichen, daß in ihrem Eiweiß mit dem Auftreten von D-Bausteinen zu rechnen ist¹. Die Proteine der *höheren* Pflanzen sind vielfach untersucht, und hier steht nur die Frage zur Diskussion, ob neben den L-Bausteinen in manchen Fällen nicht auch ein geringfügiger Prozentsatz an D-Formen auftritt. Während die Proteine niedriger Tierarten in diesem Zusammenhang kaum geprüft sind, kann man jene der höheren Tierarten als die am besten untersuchten Eiweißkörper bezeichnen. Hier läßt sich feststellen, daß in den normalen Gewebeproteinen der *höheren* Tiere bisher kein D-Baustein nachgewiesen werden konnte. Vielleicht darf man die Annahme aussprechen, daß die strenge L-Spezifität der höchstdifferenzierten Organismen entwicklungsgeschichtlich bedingt sein könnte.

Es ist einleuchtend, daß die asymmetrische Synthese der Eiweißbausteine und die Aufrechterhaltung ihrer optischen Reinheit nur durch das Zusammenwirken komplizierter biochemischer Mechanismen ermöglicht wird. W. KUHN² hat 1936 auf Grund einer thermodynamischen und kinetischen Analyse der asymmetrischen Biosynthese das Postulat aufgestellt, daß der Reinheitsgrad optisch aktiver Stoffe im alternden Organismus zwangsläufig sinken müsse.

Als wir 1939 die Stereochemie der Eiweißbausteine in Beziehung zur Krebskrankheit brachten, ließen sich zahlreiche Argumente anführen, die nach unserem Ermessens für einen ursächlichen Zusammenhang sprachen⁸. Am wichtigsten sind nach wie vor die Konsequenzen für die Regulationsmechanismen des Wachstums. Unabhängig davon, ob wir hierbei an hormonale oder enzymatische Wirkungen denken, wird das Auftreten von D-Bausteinen in der Peptidkette der Tumorproteine nicht gleichgültig sein. Die Seitenketten stehen an diesen Stellen entgegengesetzt zur normalen Lage. Dies kann zur Folge haben, daß für ein sich näherndes Wirkstoffmolekül einer der Ankerplätze – z. B. eine Carboxylgruppe – fehlt, oder daß umgekehrt die inverse Seitenkette als Hindernis im Wege steht.

Zur Prüfung der Theorie mußten wir in erster Linie die Tumorproteine durch Erhitzen mit Säuren spalten

¹ Vortrag in der Zürcher und der Basler Chemischen Gesellschaft, gehalten am 19. bzw. 20. Januar 1949. Zugleich 12. Mitteilung über die Chemie der Tumoren.

² Organisch-chemisches Laboratorium der Universität Utrecht.

³ E. FISCHER und K. RASKE, Ber. Dtsch. chem. Ges. 40, 3717 (1907).

⁴ H. FREUDENBERG und Mitarbeiter, Ber. Dtsch. chem. Ges. 57, 1547 (1924).

⁵ P. KARRER und Mitarbeiter, Helv. chim. acta 6, 957 (1925); 18, 782 (1935).

⁶ W. A. JACOBS und L. C. CRAIG, J. Biol. Chem. 110, 522 (1935).

⁷ C. IVÁNOVICS und V. BRUCKNER, Z. physiol. Chem. 247, 281 (1937).

⁸ A. S. KONIKOVA und N. N. DOBBERT, Chem. Abstr. 42, 7832 (1948).

⁹ W. KUHN, Z. angew. Chem. 49, 215 (1936).

¹⁰ F. KÖGL und H. ERXLEBEN, Z. physiol. Chem. 258, 57 (1939) (1. Mitt.).

und dann bei jeder Aminosäure kontrollieren, ob die spezifische Drehung mit jener der reinen L-Form übereinstimmt. Wenn die Aminosäure frei von Begleitstoffen war, konnte aus einer Depression der spezifischen Drehung auf die Anwesenheit der entgegengesetzten d-Form geschlossen werden. Aber hier kamen wir unter das Schwert des Damokles. Von einer Reihe von Aminosäuren war nämlich bekannt, daß sie während der Hydrolyse durch das Kochen mit Säure zum Teil razemisieren, wobei also aus der ursprünglich vorhandenen L-Form ein gewisser Prozentsatz an d-Form entsteht. Natürlich ließen wir alle in dieser Hinsicht suspekten Aminosäuren außer Diskussion und beschränkten uns auf jene Eiweißbausteine, welche die Säurehydrolyse ohne nennenswerte Razemisation durchstehen. Letzterer wurde dadurch Rechnung getragen, daß wir bei den isolierten Aminosäuren einen Gehalt von 2% d-Form als Fehlergrenze der Methode betrachteten.

Im allgemeinen zeigte es sich, daß die meisten säurestabilen Aminosäuren auch in den Tumorproteinen nur als L-Form vorhanden waren. Bei einigen Aminosäuren fanden wir einen die genannte Fehlergrenze überschreitenden Gehalt an d-Form; eine wesentliche Abweichung ergab sich jedoch beim Glutaminsäurebaustein der Tumorproteine. Während normale Gewebe praktisch optisch reine L-Glutaminsäure ($[\alpha]_D = +31,7^\circ$) lieferten, isolierten wir aus Tumorproteinen Glutaminsäure, deren Drehung eine beträchtliche Depression aufwies. Diese war am größten bei dem besonders malignen Brown-Pearce-Tumor des Kaninchens (20 bis 25% d-Form); bei den mit karzinogenen Kohlenwasserstoffen (z. B. mit Benzpyren) hervorgerufenen Tumoren von Ratten entsprach die Drehung 10–13% d-Form, während das relativ gutartige, nicht metastasierende Jensen-Sarkom der Ratte nur eine Glutaminsäure mit 6–8% d-Form lieferte. Menschliche Krebsgeschwülste, wie Ovarialkarzinom, Magensarkom, Lebermetastasen, ergaben Glutaminsäure mit 10–25% d-Form, dagegen zeigte sich bei gutartigen menschlichen Myomen keine deutliche Abweichung.

Sobald unsere theoretischen Betrachtungen und die experimentellen Befunde Anfang 1939 bekannt wurden¹, wandte man sich in zahlreichen Laboratorien dem neuen Gebiet zu, um die Befunde nachzuprüfen. Während gegen unsere Theorie der malignen Entartung keine ernsten Einwände gemacht werden konnten, wurde unseren experimentellen Ergebnissen alsbald widersprochen. Verschiedene Autoren teilten mit, daß sie auch aus Tumoren nur die gewöhnliche L-Glutaminsäure isolieren konnten. Sehr vereinzelt kamen Bestätigungen unserer Befunde; aber als von anderer Seite immer wieder negative Resultate mitgeteilt wurden, standen wir bald allein. Vergeblich wiesen wir darauf hin, daß viele Opponenten offensicht-

lich eine andere Versuchsmethodik angewandt haben und daß es ein leichtes sei, bei den Reinigungsoperationen DL-Glutaminsäure in den Mutterlaugen zu verlieren.

In diesem Stadium wäre ein persönlicher Kontakt, ein Austausch von Mitarbeitern, überaus nützlich gewesen, um die Ursachen der gegensätzlichen Befunde aufzuklären. Leider wurde dies durch den Ausbruch des Krieges verhindert. Immerhin erhielten wir in der ersten Zeit noch ausländische Fachliteratur, und so kam 1940 eine amerikanische Untersuchung zu unserer Kenntnis, die in der Tat einen sehr schweren Angriff gegen unsere Versuchsergebnisse enthielt. GRAFF¹, RITTENBERG und FOSTER synthetisierten DL-Glutaminsäure, die mit dem Stickstoffisotop N¹⁵ markiert war, und setzten diese den Proteinhydrolysaten zu. Isoliert man dann L- und DL-Glutaminsäure aus dem Gemisch, so wird der N¹⁵-Gehalt der betreffenden Präparate durch die ursprünglich im Hydrolysat anwesenden Antipoden der Glutaminsäure erniedrigt sein. Auf diese Weise wurde bei 6 Tumoren etwa 10% des Proteingewichts an L-Form nachgewiesen; der Gehalt an d-Form war minimal und unterschied sich praktisch nicht von jenem eines Hydrolysats von normalem Gewebe.

Es zeigte sich bald, daß man in der genannten Arbeit fast allgemein einen überzeugenden Gegenbeweis erblickte. Die Methode der Isotopenverdünnung schien zwangsläufig zu den absoluten Werten zu führen, während wir bisher von der Ausbeute an isolierter Glutaminsäure abhängig waren. Diese betrug anfänglich nur etwa 4% des Proteingewichts, ließ sich aber durch zunehmende Übung auf etwa 9% und bei einem Brown-Pearce-Tumor sogar auf 12,9% an partiell razemischer Glutaminsäure steigern², was den Grenzwert der amerikanischen Autoren beträchtlich übertraf. Jedenfalls gaben wir uns nicht geschlagen, und da 1940 das Stickstoffisotop in Europa nicht zugänglich war, arbeiteten wir in der Folgezeit mit schwerem Wasserstoff als Indikator. Im Prinzip mußte die Methode der Isotopenverdünnung natürlich auch mit Deuterioglutaminsäure ausführbar sein. Wir haben auf diese Weise in Dutzenden von Hydrolysaten den Gehalt an L- und D-Glutaminsäure bestimmt. Das Ergebnis³ war praktisch eine völlige Bestätigung unserer früheren, auf präparativem Wege erhaltenen Befunde über den Razematgrad der verschiedenen Tumortypen. Andererseits ergaben die untersuchten normalen Gewebe – ebenso wie auch der Gesamtorganismus der normalen Ratte – Werte, die innerhalb der früher erwähnten Fehlergrenze lagen. Auffälligerweise betrug jedoch der von uns gefundene Totalgehalt an Glutamin-

¹ F. KÖGL und H. ERXLEBEN, Z. physiol. Chem. 258, 57 (1939) (1. Mitt.).

² F. KÖGL und H. ERXLEBEN, Z. physiol. Chem. 264, 198 (1940) (6. Mitt.).

³ F. KÖGL, H. ERXLEBEN und G. J. v. VEERSEN, Z. physiol. Chem. 277, 251 (1943) (9. Mitt.).

säure nicht 10%, sondern 12–16% des Proteingewichts. Dies bedeutet, daß sich bei der Arbeitsweise der amerikanischen Autoren außer der D-Form auch ein Teil der L-Form dem Nachweis entzogen hatte.

Die im Jahre 1943 veröffentlichte Deuteriumarbeit hat leider nicht die erwartete Auswirkung gehabt. Von anderer Seite wurden weiterhin negative Ergebnisse mitgeteilt. So erschien Anfang 1944 eine Arbeit von THEODOR WIELAND¹ und PAUL, die in den Besitz von N¹⁵ gekommen waren und hiermit die Versuche der amerikanischen Autoren wiederholten. Sie fanden bei drei Analysen von Brown-Pearce-Tumoren wiederum nur gegen 10% L-Glutaminsäure neben 0,5% D-Form. Letztere wurde als Artefakt betrachtet, eine Meinung die auch alle anderen Opponenten vertreten hatten. Im besonderen wurde noch auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die von uns angewandte Deuteriummethode durch die größere Labilität der C-D-Bindungen weniger zuverlässig sein könnte.

Natürlich hätten auch wir für unsere Bestimmungen die Verwendung von N¹⁵ bevorzugt; hierzu ist es jedoch durch die Kriegsergebnisse nicht mehr gekommen. So blieb in dieser sehr bedrängten Zeit nur noch die Möglichkeit übrig, die Utrechter Arbeitsweise zur Kontrolle auch in einem anderen Laboratorium zu demonstrieren. Zu Beginn des Jahres 1944 hat meine Mitarbeiterin, Frl. H. ERXLEBEN, im Institut von HANS FISCHER einige Tumoren mit dem von uns erwarteten Ergebnis analysiert. Wie mir H. FISCHER in einem seiner letzten Briefe noch schrieb, konnte K. BÜRGER nach den in Gemeinschaft mit H. ERXLEBEN ausgeführten Versuchen hernach auch in zwei unabhängigen Tumoranalysen unsere Ergebnisse bestätigen. H. ERXLEBEN hat durch ihre besondere experimentelle Geschicklichkeit und Energie an der Entwicklung der Arbeiten großen Anteil gehabt. Als die Untersuchungen nach dem Kriege mit weniger erfahrenen Mitarbeitern fortgesetzt werden mußten, traten manche Schwierigkeiten auf. Es ist vor allem das Verdienst von T. J. BARENDEGT, daß diese überwunden wurden und die früheren Ergebnisse weiterausgebaut werden konnten.

Wir hatten bereits während der Kriegsjahre wichtige Ergebnisse über die Biosynthese des D-Glutaminsäurebausteins der Tumorproteine erhalten. Es schien jedoch zwecklos, diese Befunde zu veröffentlichen, solange immer wieder die analytischen Grundlagen unserer Arbeiten bestritten oder zum mindesten in Zweifel gezogen wurden. Die Gegenseite war von unserem «experimentellen Irrtum» überzeugt, und da wir gegenüber einer großen Mehrheit allein standen, ist es nicht verwunderlich, wenn im allgemeinen auch der neutrale Beobachter die Angelegenheit für erledigt hielt. Unter den gegebenen Umständen mußten wir uns daher auch nach dem Kriege zunächst wieder mit

den analytischen Problemen beschäftigen. Es war uns seit langem klar geworden, daß unsere Versuchstechnik in irgendeiner Hinsicht eine Besonderheit aufweisen mußte, die für den Erfolg entscheidend war. Wir suchten früher die Erklärung hauptsächlich bei der Isolierungstechnik. In der Tat ist viel Übung und Erfahrung erforderlich, um das Hydrochlorid der partiell razemischen Glutaminsäure in guter Ausbeute (d. h. mindestens 8% des Proteingewichts an freier Glutaminsäure!) aus den Hydrolysatirupen zu isolieren. Theoretisch muß nun zwar die Isotopenmethode unabhängig von den Ausbeuten den absoluten Gehalt an beiden Antipoden ergeben. Voraussetzung ist hierfür jedoch eine ideale Mischung, die in dem Gemenge von Aminosäuren nicht unter allen Umständen gewährleistet schien. Die einschlägigen Versuche führten jedoch nicht zu einer befriedigenden Erklärung der Widersprüche.

Es schien jedoch möglich, die ganzen Schwierigkeiten beheben zu können, wenn der Nachweis gelingen sollte, daß unsere Opponenten das Proteingemisch weniger vollständig hydrolysierten, als das bei unserer Arbeitsweise der Fall war. Es sei daran erinnert, daß die anderen Autoren auf Grund der N¹⁵-Analysen einen Totalgehalt von etwa 10% des Proteingewichts an freier Glutaminsäure errechneten, während wir bei einem besonders eingehend untersuchten Brown-Pearce-Tumor 12,9% an analysenreiner, freier Glutaminsäure isoliert¹ hatten! Zunächst war es nicht zu begreifen, inwiefern unsere Hydrolysemethode eine Besonderheit aufweisen sollte. Als wir vor 10 Jahren eine geeignete Methode zur Hydrolyse der Gewebe-proteine suchten, haben wir uns in einer Übersicht von MAX BERGMANN² Rat geholt, in der u. a. 7stündigtes Erhitzen mit dem 3fachen Volumen konz. Salzsäure genannt war. Da wir die Razemisation *in vitro* soviel als möglich vermeiden wollten, schien diese kurze Hydrolyse für unsere Zwecke besonders geeignet zu sein. Als sich später zeigte, daß das 7stündige Erhitzen – besonders bei normalen Geweben – nicht ausreichend ist, sind wir zur 20stündigen Hydrolyse übergegangen. Wir arbeiteten mit einem Ölbad und erwärmen «zum gelinden Sieden». Hierbei entweicht allmählich der überschüssige Chlorwasserstoff und die Reaktionstemperatur schien durch den Siedepunkt der konstant siedenden 20prozentigen Salzsäure definiert. In der Tat beträgt die Temperatur der Reaktionsflüssigkeit 112°, wenn man mit einem Babo-Trichter arbeitet; die heiße Luft außerhalb des Kolbens hat dann eine Temperatur von ungefähr 200°. ERXLEBEN hat jedoch die Temperatur des Ölbadts erst langsam auf 135° gebracht und dann im Laufe der weiteren Stunden auf maximal 150–160° gesteigert. Die Reak-

¹ F. KÖGL und H. ERXLEBEN, Z. physiol. Chem. 264, 198 (1940) (6. Mitt.).

² M. BERGMANN und L. ZERVAS in: G. KLEIN, Hb. d. Pflanzenanalyse (Verlag J. Springer, Wien 1933) III. Teil, S. 299.

Tabelle I

Einfluß der Reaktionsbedingungen auf den Hydrolysegrad der Proteine von Benzpyrentumoren (Mittelwerte bei 20stündiger Hydrolyse)

Badtemperatur	Bad	Reaktions-temperatur	Gefäß	Zugefügte Säure	$\frac{\text{NH}_2\text{-N}}{\text{Total-N}}$
135–160°	Öl	im Mittel 116°	Rückfluß-kolben	3 vol. konz. HCl	76–79 %
200°	Luft	112°	Rückfluß-kolben	3 vol. konz. HCl	69 %
118°	Ölthermostat	118°	Carius-Röhre	3 vol. 20-proz. HCl	69 %
112°	Ölthermostat	112°	Carius-Röhre	3 vol. konz. HCl	74 %

tionsflüssigkeit zeigt dann nur in Intervallen ein leich-tes Aufsieden, und nachträglich fanden wir nun, daß zwischen dem kurzen Aufwallen ein Siedeverzug auf-tritt; in diesen Perioden steigt die Temperatur einige Grade und sinkt dann während des «gelinden Siedens» wieder auf 112°. Auf diese Weise beträgt die mittlere Reaktionstemperatur 116° und nicht 112° wie beim Kochen auf dem Luftbad.

Es mußte nun natürlich geprüft werden, ob der Hydrolysegrad durch die genannten Versuchsbedin-gungen beeinflußt wird. Zu diesem Zweck wurden die Proteine von Benzpyrentumoren auf verschiedene Weise hydrolysiert und die durch die Spaltung der Peptidbindungen frei werdenden NH₂-Gruppen nach VAN SLYKE bestimmt. Die Ergebnisse sind in der obigen Tabelle I zusammengestellt, welcher die Unter-suchung von etwa 100 Hydrolysaten zugrunde liegt.

Wie man sieht, ist der Hydrolysegrad bei unserer üblichen Arbeitsweise etwa 9% höher als beim ge-wöhnlichen Kochen am Luftbad. Diese Differenz ist ungefähr viermal so groß als zur Erklärung unserer hö-heren Werte an Totalglutaminsäure erforderlich ist. Daß der höhere Hydrolysegrad nicht durch einen hö-heren Ammoniakgehalt – also durch größere Zer-setzung – vorgetäuscht wird, ergab sich aus unab-

hängigen NH₃-Bestimmungen; der Quotient $\frac{\text{NH}_2\text{-N}}{\text{Total-N}}$ zeigte nur eine Zunahme von 0,9%.

Aus der dritten Versuchsserie geht hervor, daß der Hydrolysegrad bei Verwendung von 20prozentiger Salzsäure durch eine Temperaturerhöhung auf 118° praktisch nicht beeinflußt wird. Die vierte Hydrolyse-art zeigt die große Bedeutung der Salzsäurekonzentra-tion; immerhin wird auch hier nicht ganz der Hydrolysegrad erreicht, den wir bei unserer üblichen Arbeits-weise erzielen.

Wir haben somit bei unseren Untersuchungen un-vorhergesehener Weise eine besonders wirksame Hy-drolysemethode angewandt, während unsere Oppo-nenten vermutlich durchwegs nach dem an zweiter

Stelle angeführten Verfahren gearbeitet haben, bei dem der überschüssige Chlorwasserstoff rasch ent-weicht. Auf diese Weise erhielten auch wir nur einen Totalwert von durchschnittlich 10,5% Glutaminsäure mit einem unbeträchtlichen Gehalt an D-Form. Die Frage, warum die D- bzw. die DL-Glutaminsäure bei der mildereren Hydrolyse nicht oder wenigstens nur un-vollständig freigesetzt wird, ist vorläufig noch nicht zu beantworten. Es sei daran erinnert, daß wir beim Übergang von der 7- zur 20stündigen Hydrolyse den gleichen D-Gehalt, aber höhere L-Werte fanden; der D-Gehalt ist also nicht proportional der Hydrolysedauer. Außer rein chemischen Ursachen – schwieriger spaltbare Bindungen, vielleicht in gewissen Ringstruk-turen – könnte auch das Vorhandensein von schwerer angreifbarem Struktureiweiß verantwortlich sein. Man darf nicht außer acht lassen, daß zwar unnennbar viel Hydrolysen von gewöhnlichen Proteinen beschrieben sind, daß aber über die Hydrolyse von Gewebe bzw. von Zellbruchstücken sehr viel weniger Erfahrungen vorliegen. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, daß wir Polypeptide, die durch partielle Verdauung von Tumorproteinen erhalten wurden, trotz hohen Gehalts an D-Form bereits durch gewöhnliches Kochen mit Salzsäure gut spalten konnten.

Es ist nicht überflüssig, darauf hinzuweisen, daß wir – unter sinngemäßen Bedingungen – zahlreiche Versuche über die Razemisierbarkeit der L-Glutamin-säure ausgeführt haben. Beim 20stündigen Erhitzen mit konz. Salzsäure in der Carius-Röhre auf 115° und auch unter extremen Bedingungen – Erhitzen mit 20prozentiger Salzsäure auf 130° – ergab sich, daß die Razemisierung weit unterhalb der Fehlergrenze lag, mit der wir stets gerechnet haben. Im letzteren Fall wurde dieses Ergebnis auch mit Hilfe der Isotopen-methode bestätigt.

Die Aufgabe, mittels der Methode der Isotopenver-dünnung verschiedene Tumortypen und verschiedene Normalgewebe sowie ihre löslichen und unlöslichen Fraktionen, nach den unterschiedlichen Hydrolyse-

Tabelle II

 D_2O -Tränkversuche bei Ratten mit Chemotumoren

I: Benzpyrentumoren (5 Ratten). — II: Benzpyrentumoren (11 Ratten). — III: Methylcholanthrentumoren (4 Ratten)

Nr.	Versuchsdauer	Atom-% Deuterium im Blut	Gewebe	Atom-% Denterium im Glutaminsäurebaustein	
				L-Form	D-Form
I	7 Tage	1,42 ± 0,01	Leber	0,45 ± 0,02	
			Tumor	0,44 ± 0,01	0,06 ± 0,03
II	12 Tage	1,63 ± 0,02	Leber	0,51 ± 0,01	
			Tumor	0,51 ± 0,01	0,23 ± 0,03
III	17 Tage	1,37 ± 0,02	Leber	0,45 ± 0,01	
			Tumor	0,48 ± 0,01	0,48 ± 0,03

verfahren systematisch zu analysieren, stellt für ein einzelnes Institut ein Arbeitsprogramm von Jahren dar. Vielleicht werden sich aber in der Zukunft auch für die Bestimmung von D-Glutaminsäure mikrobiologische Verfahren verwenden lassen; ein Anlauf hierzu liegt bereits vor¹. Bezuglich der neueren Arbeitsmethoden sei noch erwähnt, daß die hervorragende Methode der Verteilungschromatographie von CONSDEN², GORDON, MARTIN und SYNGE in unserem Laboratorium z. B. zur Kontrolle der Reinheit der Aminosäurepräparate fortwährend Anwendung findet. Übrigens haben wir die Methode durch Verwendung von Papiersäulen auch in präparativem Maßstab ausgeführt. Unter Verwendung von Butanol-NH₃ als fließender Phase konnten die Dicarbonsäuren von den übrigen Aminosäuren abgetrennt werden, während die Fraktionierung von Glutaminsäure und Asparaginsäure mit Hilfe von Phenol-NH₃ erfolgte. Die Methode lieferte die partiell razemische Glutaminsäure in guter Ausbeute, ist aber in der bisherigen Ausführungsform noch zu umständlich, um mit dem gewöhnlichen Isolierungsverfahren konkurrieren zu können.

Unsere biochemischen Untersuchungen hatten ein doppeltes Ziel. Zunächst galt es, positive Beweise dafür zu erbringen, daß der D-Glutaminsäurebaustein bereits *in vivo* in den Tumoren anwesend ist. Andererseits bestand die Hoffnung, auf diesem Wege einen Einblick in die enzymatischen Vorgänge zu erhalten, die zur Störung der normalen Prozesse führen.

Durch die Markierung mit Isotopen der Bioelemente hat man in den letzten zehn Jahren einen Einblick in die enorme Dynamik bekommen, mit der fast alle Stoffe des Organismus einem fortwährenden Abbau und Wiederaufbau unterliegen. Aus den Untersuchungen amerikanischer Autoren — vor allem von R. SCHOENHEIMER³ und seiner Schule — ist bekannt,

welche Rolle diese Prozesse insbesondere auch bei den Proteinen spielen. Wir waren daher seit langem darauf bedacht, die durch die Isotopentechnik gegebenen Möglichkeiten auf das Problem der Tumorproteine anzuwenden. Wie verhält sich hier der D-Glutaminsäurebaustein im Vergleich zur L-Form? Über diese Frage liegen fünf bisher unveröffentlichte Arbeiten von A. J. KLEIN, H. ERXLEBEN und G. J. VAN VEERSEN vor; die wichtigsten Ergebnisse werden im folgenden kurz angeführt.

Die erste Arbeit bezieht sich auf Versuche, bei denen die Körperflüssigkeit von Tumorratten auf einen Deuteriumgehalt von etwa 1,5 Atom-% gebracht wurde. Dies erfolgte nach dem Vorbild von FOSTER¹, RITTENBERG und SCHOENHEIMER zu Beginn des Versuchs durch Injektion entsprechender Mengen D_2O und hierauf durch Tränken mit Wasser von 2,5 Atom-% Deuterium. Tabelle II zeigt das Ergebnis von drei Versuchsserien.

Wie man sieht, wird Deuterium in den D-Glutaminsäurebaustein langsamer eingebaut als in die L-Form von Tumor und Leber.

In der folgenden Arbeit wurde das Natriumsalz von DL-Deuterioglutaminsäure einer geeigneten Grunddiät zugefügt.

Tabelle III

Verfütterung von Mononatriumsalz der DL-Deuterioglutaminsäure (7,5 Atom-%) an Ratten mit Benzpyrentumoren (Fehlergrenze bei D-Formen ± 0,03 Atom-%)

Versuchsdauer	Atom-% Deuterium der isolierten Aminosäuren				
	aus den Lebern		aus den Tumoren		
	L-GS	L-AS	L-GS	D-GS	L-AS
5 Tage	0,02	0,12	0,03	0,15	0,09
15 Tage	0,01	0,04	0	0,32	0,17

¹ G. L. FOSTER, D. RITTENBERG und R. SCHOENHEIMER, J. Biol. Chem. 125, 13 (1938).

In der dritten Arbeit wurde in fünf Versuchsserien Natrium-deuterio-glutamat subkutan injiziert. Die Ergebnisse sind in Tab. IV zusammengestellt.

Tabelle IV

Injection von Natrium-deuterio-glutamat in Ratten mit Benzypyren-tumoren

Versuchsdauer 4 Tage. Zweimal pro Tag je 200 mg DL-GS (bzw. 100 mg bei den Antipoden) pro Ratte. I und III je 6 Ratten, II, IV und V je 5 Ratten. Fehlertoleranz bei D-Formen $\pm 0,03$ Atom-%.

Nr.	Injektion Na-Salz von GS		Hydrolyse-dauer	Atom-% der isolierten Aminosäuren					
				aus den Lebern		aus den Tumoren			
	Form	Atom-%		L-GS	L-AS	L-GS	D-GS	L-AS	
I	DL-	4,6	7	0,03	—	0,03	0,27	—	
II	DL-	5,8	7	0,14	0,19	0,11	0,36	—	
III	DL-	5,0	20	0,11	0,29	0,14	0,40	0,13	
IV	L-	4,6	20	0,06	0,22	0,06	0	0,19	
V	D-	4,4	20	0,01	0,10	0,04	0,50	0,05	

Wie bei den Fütterungsversuchen zeigt sich auch nach der Injektion ein erhöhter Deuteriumgehalt der D-Form; dieser Effekt ist hier bereits nach vier Tagen sehr ausgeprägt. Besonders eindrucksvoll ist das unterschiedliche Ergebnis bei der Injektion der Antipoden in der vierten und fünften Versuchsserie.

Bei der folgenden Untersuchung haben wir in analoger Weise das Natriumsalz von DL-Deuterioasparaginsäure injiziert:

Tabelle V

Injection von Natrium-DL-deuterio-aspartat in Ratten mit Benzypyrentumoren

Zweimal pro Tag je 200 mg DL-AS pro Ratte.
I: 6 Ratten. II: 4 Ratten. Fehlertoleranz bei D-Formen:
 $\pm 0,03$ Atom-%

Nr.	Injektion Na-Salz von DL-AS Atom-%	Ver- suchs- dauer in Ta- gen	Atom-% in den isolierten Amino- säuren				
			aus den Lebern		aus den Tumoren		
			L-GS	L-AS	L-GS	D-GS	L-AS
I	3,5	4½	0	0,05	0,01	0,12	0,09
II	3,75	8	0,05	0,22	0,02	0,34	0,06

In der letzten Arbeit dieser Reihe wurde DL-Deuterio-alanin injiziert. Zur Darstellung der deuterierten Aminosäuren haben wir durchwegs die entsprechenden Ketoverbindungen nach der Knoopschen Reaktion in ammoniakalischer Lösung mit D_2 und Pd hydriert.

Der erstgenannte Injektionsversuch ist 1944 von ERXLEBEN, der zweite vier Jahre später von BARENDEGRT ausgeführt worden.

Tabelle VI

Injection von DL-Deuterio-alanin in Ratten mit Benzypyrentumoren. Zweimal pro Tag je 200 mg DL-Alanin pro Ratte. Versuchsdauer 8 Tage. I: 5 Ratten; II: 4 Ratten. Fehlertoleranz bei D-Formen: $\pm 0,03$ Atom-%

Nr.	Injektion DL-Alanin Atom-%	Atom-% in den isolierten Amino- säuren				
		aus den Lebern		aus den Tumoren		
		L-GS	L-AS	L-GS	D-GS	L-AS
I	4,5	0,01	0,02	0,02	0,48	0
II	5,2	0,05	0,03	0,08	0,66	0,01

Als Gesamtergebnis der biochemischen Deuterium-versuche läßt sich feststellen, daß sich der D-Glutaminsäurebaustein hinsichtlich des Einbaus von Deuterium durchwegs anders verhält als die L-Form. Wäre die D-Glutaminsäure wirklich erst *in vitro* durch Razemisierung entstanden, so müßte sie natürlich im Isotopengehalt der L-Form entsprechen, eine L-Glutaminsäure mit 0,08 Atom-% kann bei der Razemisierung niemals eine D-Form mit 0,66 Atom-% liefern! Noch wichtiger als diese analytische Konsequenz sind für die Zukunft die Schlußfolgerungen, welche aus den Ergebnissen über die Biosynthese der D-Glutaminsäure zu ziehen sind. Es kann kein Zweifel darüber bestehen, daß diese unabhängig von jener des L-Antipoden erfolgt, doch dürfte es verfrüht sein, heute bereits weitere Konsequenzen zu diskutieren.

Auch eine zweite biochemische Arbeitsrichtung hat einen strikten Beweis dafür erbracht, daß die aus den Tumorproteinen isolierte D-Glutaminsäure kein Artefakt ist. Nach unseren Auffassungen war zu erwarten, daß die Tumorproteine durch die normalen Enzyme nicht völlig verdaut werden. Es schien uns wichtiger, dies zunächst durch Verdauungsversuche *in vivo* zu prüfen, da man dann die Sicherheit hatte, daß alle Enzyme *in optima forma* zur Einwirkung kamen. In der Tat konnten nach Verfütterung von gekochten Tumoren aus Harn und Faeces von Hunden Polypeptide mit hohem Gehalt an D-Glutaminsäurebaustein isoliert werden¹:

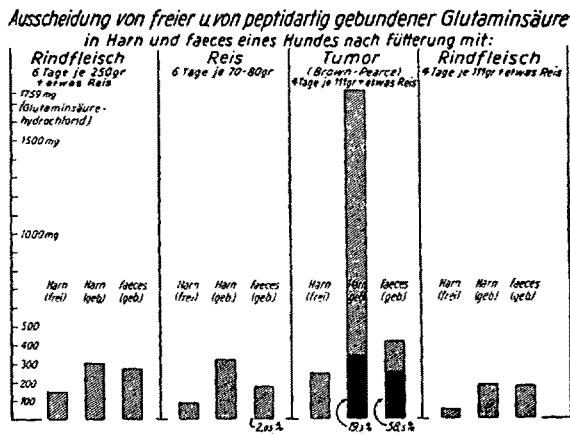
Tabelle VII

Verfütterung von gekochten Tumoren an normale Hunde
I und II: H. ERXLEBEN (1940); III: T. J. BARENDEGRT (1948).

Nr.	Tumor D-GS Total-GS	Gehalt der isol. GS an D-Form nach Hydrolyse der Polypeptide	
		aus Harn	aus Faeces
I	Brown-Pearce (25%)	16,9%	53,1%
II	Brown-Pearce (25%)	19,3%	56,8%
III	Benzypyren (13%)	8,8%	33,5%

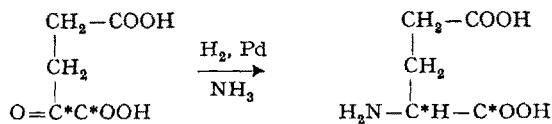
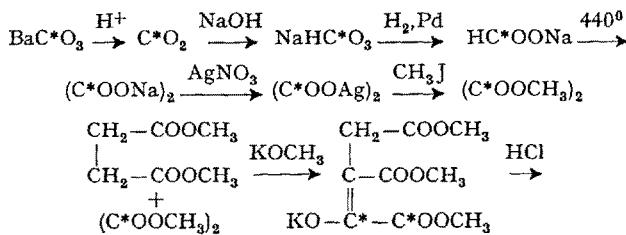
¹ F. KÖGL und H. ERXLEBEN, Z. physiol. Chem. 264, 108 (1940) (5. Mitt.).

Der Vergleich mit anderen Diäten ergibt sich aus folgender Abbildung.



Durch eine Arbeit von S. RATNER¹ ist 1944 bekanntgeworden, daß die Ratte nach Fütterung von D-Glutaminsäure im Harn deren Lactam, die D-Pyrrolidon-carbonsäure ausscheidet. Dieser unvorhergesehene Befund veranlaßte uns, auch in dem nach Fütterung von Benzpyrentumoren ausgeschiedenen Harn des Hundes nach dieser Verbindung zu suchen. In der Tat gelang es, aus dem Äthylacetatextrakt optisch reine D-Pyrrolidoncarbonsäure ($[\alpha]_D = +11,2^\circ$) zu isolieren². In einem folgenden Versuch fütterten wir normale Ratten mit den Proteinen von Rattentumoren, die durch Benzpyren hervorgerufen waren. Auch hier trat im Harn D-Pyrrolidoncarbonsäure auf, die wir in diesem Falle unmittelbar in Glutaminsäure umsetzten. Nach der spez. Drehung ($[\alpha]_D = -31,5^\circ$) lag auch hier die optisch reine D-Form vor. Schätzungsweise werden etwa 10% des im Tumoreiweiß vorhandenen D-Glutaminsäurebausteins in der Form des Lactams ausgeschieden. Da im Magendarmkanal nicht mit Salzsäure gekocht wird, wird der Behauptung, daß die D-Form künstlich entstehe, allein bereits durch die zuletzt genannten Befunde der Boden entzogen.

Zum Schluß ist noch über Versuche mit radioaktiver Glutaminsäure zu berichten. J. HALBERSTADT hat zunächst radioaktives Bariumcarbonat (Oak Ridge) nach den Angaben von MELVILLE³ und Mitarbeitern in Natriumformiat* umgesetzt und hieraus auf folgendem Wege Glutaminsäure* synthetisiert:



Die im α -Carboxyl und in der α -Stelle mit C¹⁴ markierte Glutaminsäure wurde in der üblichen Weise in die Antipoden gespalten.

Nun hatten SHEMIN¹ und RITTENBERG B₂-avitaminotische Ratten mit DL-Glutaminsäure gefüttert, die durch N¹⁵ markiert war. Es wurde bereits erwähnt, daß hierbei im Harn D-Pyrrolidoncarbonsäure auftritt; die hieraus gewonnene D-Glutaminsäure zeigte den gleichen N¹⁵-Gehalt wie die verfütterte Verbindung. Die amerikanischen Autoren folgerten hieraus, daß im Organismus der B₂-avitaminotischen Ratte und demnach wahrscheinlich auch im normalen Tier keine D-Glutaminsäure synthetisiert wird, da diese durch Mischung den Isotopengehalt herabgesetzt hätte.

Man erkennt, daß hierdurch für unser Problem ein experimentum crucis auszuführen war. Wenn verfütterte oder injizierte radioaktive D-Glutaminsäure im Tumornicht rein additiv eingebaut wurde, sondern die genuine D-Form teilweise verdrängte, dann mußte sich dies bei der im Harn ausgeschiedenen D-Pyrrolidoncarbonsäure bzw. der daraus zu gewinnenden D-Glutaminsäure durch eine Herabsetzung der Radioaktivität manifestieren. Ob der Effekt meßbar sein würde, hing natürlich nicht zuletzt von einem günstigen Verhältnis zwischen zugeführter und zelleigener D-Glutaminsäure ab.

Tabelle VIII

Injektion von radioaktivem Natrium-D-glutamat bei normalen Ratten und Ratten mit Benzpyrentumoren².

I. Periode: An 4 Tagen pro Ratte und Tag je 25 mg D-GS* (als Natriumsalz injiziert)

Messungstage	Vergleich der Radioaktivität von BaC*O ₃ (durch Umsetzung von D-GS*HCl erhalten)		
	Na-Salz der Ausgangs D-GS	aus Harn von normalen Ratten	aus Harn von Tumorratten
6. 12. 48	100 %	97,8 %	87,4 %
7. 12. 48	100 %	97,8 %	88,0 %

II. Periode: Während 2 Tagen keine Injektion.

III. Periode: An 4 Tagen pro Ratte und Tag je 100 mg D-GS* (als Natriumsalz injiziert).

Mittelwert von 4 Messungstagen:	100 %	100,7 %	94,8 %
---------------------------------	-------	---------	--------

¹ S. RATNER, J. Biol. Chem. 152, 559 (1944).

² F. KÖGL, T. J. BARENDECT und A. J. KLEIN, Nature 162, 732 (1948).

³ D. B. MELVILLE, J. R. RACHELE und E. B. KELLER, J. Biol. Chem. 169, 419 (1947).

¹ D. SHEMIN und D. RITTENBERG, J. Biol. Chem. 151, 507 (1943).

² Diät: Amylum oryzae, gekochtes Rindfleisch, Lebertran, wasserlösliche Vitamine, Salzmisch.

BARENDEGRT und HALBERSTADT haben zwei normalen Ratten und zwei Ratten mit Benzpyren-tumoren unter genau den gleichen Versuchsbedingungen radioaktives Natrium-D-glutamat injiziert. Aus dem Harn wurde in der schon beschriebenen Weise D-Glutaminsäure isoliert. Die Bestimmung der Radioaktivität der einzelnen Präparate erfolgte im Kernphysikalischen Institut Amsterdam, wobei uns A. H. W. ATEN jr. mit Rat und Hilfe zur Seite stand. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. VIII zusammengestellt.

Nach der dritten Periode wurde die Glutaminsäure aus den Tumorproteinen isoliert und die Radioaktivität der Antipoden verglichen. Während jene der L-Form kaum höher als die spontanen Ausschläge lag, zeigte die D-Form 8,9% der Radioaktivität des injizierten Präparats. Die L-Glutaminsäure aus den Leberproteinen war nicht radioaktiv. Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit jenen des entsprechenden Deuterium-versuchs (vgl. Tab. IV, Nr. V).

Natürlich ist dies erst ein Beginn, aber im Rahmen der übrigen Beweisführung läßt sich heute schon sagen, daß die Erniedrigung des Isotopengehalts in der D-Glutaminsäure des Tumorharns ein für die künftige Forschung wichtiges Ergebnis ist, das zu zahlreichen neuen Versuchen anregt. Abgesehen von der Ausdehnung auf andere Tumorarten und andere Organismen wird man sich bemühen, die Versuchstechnik zu vervollkommen. Hierzu liegen verschiedene Möglichkeiten vor der Hand, wie z. B. durch Variation von Versuchsdauer und Dosierung bei Injektion und Fütterung. Weitaus am wichtigsten ist jedoch sicherlich die Verwendung der genauesten Methoden zur Isotopenbestimmung, wobei wohl von der Entwicklung der massenspektrometrischen Versuchstechnik am meisten zu erwarten ist. Es wäre natürlich außerordentlich wichtig, wenn sich das neue Prinzip später für diagnostische Zwecke verwenden ließe. Die Zukunft muß entscheiden, ob dies realisierbar ist oder ob diese Hoffnung eine Utopie bleibt.

Als ich vor zehn Jahren über unsere ersten Ergebnisse sprach, habe ich die Äußerung eines englischen Arztes zitiert. Nach dieser sind bei einer medizinischen Entdeckung drei Perioden zu unterscheiden: in der ersten wird die Richtigkeit, in der zweiten die Wichtigkeit bestritten. Läßt sich schließlich beides nicht mehr in Abrede stellen, dann heißt es, daß die Entdeckung altbekannt sei.

Es war sehr schwer, zehn Jahre gegen den Strom anzukämpfen. Wenn nun in der Tat die «zweite Periode» beginnt, so hoffe ich, daß wir in dieser nicht wiederum allein stehen werden.

Summary

In 1939 a theory on malignancy has been published which was based on the experimental evidence that D-glutamic acid is a characteristic constituent of tumour proteins. However, other authors were unable to confirm the experimental results; they found only L-glutamic acid and considered the D-form as an artefact. Both views have been checked by the isotope dilution method, using N^{15} and deuterium respectively. The results were again contradictory.

(1) It is now pointed out that many negative results may have been caused by a less complete hydrolysis, the concentration of the hydrochloric acid being an important factor.

(2) Meanwhile numerous biochemical experiments have been carried out which give unequivocal evidence that D-glutamic acid is a constituent of tumour proteins. In the first investigation the deuterium content of the body fluids of tumour bearing rats was raised to 1.5 atom p. c. Furthermore feeding experiments with DL-deutero-glutamic acid have been carried out and in a following group of investigations deuterium labeled monosodium glutamate and aspartate as well as deutero-alanine have been injected. The results of all these experiments demonstrated that the biosynthesis of L- and D-glutamic acid is accomplished by different pathways.

(3) The normal dog is unable to digest tumour proteins in the same way as common meat. In the former case urine and faeces contain polypeptide fractions which on hydrolysis yield glutamic acid with a high content of D-form. Moreover, the urine contains optically pure D-pyrrolidone carboxylic acid. This compound was also isolated from the urine of normal rats after feeding with tumour proteins of rats.

(4) Radioactive (C^{14} labeled) DL-glutamic acid has been synthesized and resolved.

(5) After injection of C^{14} -labeled sodium D-glutamate normal rats excrete D-pyrrolidone carboxylic acid which delivers D-glutamic acid with practically the same radioactivity as the injected material. The same experiment was carried out with tumour-(benzpyrene)-bearing rats. In this case the isolated D-glutamic acid showed a definite diminution of the radioactivity. This is a new decisive proof for the production of D-glutamic acid in the living tumour cells.

Grateful acknowledgment is made to the Rockefeller Foundation for the support of our work.