

Experimenteller Teil

Acridin-aldehyd-(9)-phenylhydrazon⁴

Orangerote Kristalle (aus Alkohol) vom Schmp. 229 bis 230° (Zers.).

N-Phenyl-N'-[2-carboxy-phenyl]-C-[acridyl-(9)]-formazan (I)

210 mg Anthranilsäure werden in 1 ccm konz. Salzsäure gelöst und mit einer konz. Lösung von 150 mg Natriumnitrit bei — 5° diazotiert. Der Diazoniumlösung wird eine Lösung von 300 mg Acridin-aldehyd-(9)-phenylhydrazon und 500 mg Natriumhydroxyd in 150 ccm Methanol bei 0° zugegeben. Das Gemisch wird sofort rot. Nach 2 Stdn. wird filtriert und mit Eisessig angesäuert. Auf Zusatz von Wasser fällt die *Formazylverbindung I* aus. Aus Alkohol umkristallisiert, rote Kristalle vom Schmp. 263 bis 264° (Zers.); Ausbeute 290 mg.

$C_{27}H_{19}O_2N_5$ (445,4). Ber. N 15,73. Gef. N 15,30.

Nickelkomplex (II)

Eine alkohol. Lösung von 80 mg der Verbindung I wird mit einer konz. wäbr. Lösung von je 80 mg Nickelsulfat und Natriumacetat versetzt und einige Minuten auf dem Wasserbad gekocht. Das vom Ungelösten abfiltrierte dunkelgrüne Filtrat wird eingengt; beim Abkühlen scheidet sich der *Nickelkomplex II* ab. Schwarzgrüne Kristalle, die bei 320° noch nicht schmelzen.

$C_{27}H_{17}O_2N_5Ni$ (504,1). Ber. N 13,89. Gef. N 14,09, 13,83.

Anwesenheit bestimmter Enzymsysteme in Gewebekulturen

(Kurze Mitteilung.)

Von

H. Perschke, E. Broda und O. Hoffmann-Ostenhof

I. Chemisches Laboratorium der Universität Wien

und

L. Stockinger, H. Enzl und G. Kellner

Histologisch-Embryologisches Institut der Universität Wien.

(Eingelangt am 22. November 1955.)

Kulturen von embryonalen Hühnchenfibroblasten (Extremitätenmesenchym) in einem aus Embryonalextrakt und Aszitesflüssigkeit bestehenden Nährmedium wurden mit radioaktiven Substraten versetzt, und es wurde geprüft, ob radioaktives Kohlendioxyd erzeugt wird. Dies war bei Verwendung von

⁴ A. Bernthsen und F. Muhlert, Ber. dtsh. chem. Ges. **20**, 1548 (1887). — M. Seyhan, Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, Ser. A **17**, 309 (1952).

Glukose, Fruktose, Mannose und Glycerin als Substrat der Fall, nicht dagegen bei Verwendung von Saccharose. Es wird geschlossen, daß das Gewebe zwar über Enzymsysteme zur „Verwertung“ der erstgenannten Stoffe, aber über kein System zur Verwertung von Rohrzucker verfügt.

In früheren Veröffentlichungen wurde ein Verfahren zur Untersuchung des Stoffwechsels von Gewebekulturen beschrieben^{1, 2, 3}. Der Kultur wird am Kohlenstoff markierter Nährstoff (Glukose) zugesetzt, und es wird nach Ende einer Periode der Bebrütung festgestellt, welche markierten Verbindungen gebildet wurden. Besonders eingehend wurde bisher die Erzeugung radioaktiven Kohlendioxyds in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen verfolgt⁴.

Es wurde bereits kurz darauf hingewiesen, daß dieses experimentelle Verfahren nicht nur dazu dienen kann, den Stoffwechsel von Kulturen einer Art unter verschiedenen Bedingungen oder den Stoffwechsel von Kulturen verschiedener Art zu vergleichen, wobei ein und dasselbe Substrat (Glukose) verwendet wird, sondern daß mit seiner Hilfe auch geprüft werden kann, inwiefern ein Gewebe verschiedene Substrate verwerten kann⁴. Aus dem Auftreten von radioaktiven Stoffwechselprodukten muß geschlossen werden, daß das betrachtete Gewebe über ein Enzymsystem verfügt, durch das das Substrat angegriffen wird.

Wir haben nun eine erste Versuchsserie ausgeführt, durch die festgestellt wurde, ob eine Gewebeart, nämlich embryonale Hühnerfibroblasten, Hexosen und Glycerin angreifen und daraus CO₂ erzeugen kann. Das Gewebe stammte von Extremitäten von 8 bis 10 Tage bebrüteten Hühnerembryonen und wurde als Rollerröhrchenkultur angesetzt. In jedes Röhrchen wurden 2 bis 3 Explantate eingebracht. Vor Versuchsbeginn wurde die Kultur einige Tage mit Nährmedium (Gey-Lösung + Embryonalextrakt + menschliche Aszitesflüssigkeit 5 : 1 : 4) im Brutschrank bei 37° gehalten, um eine gleichmäßige Reihe von Gewebestücken auswählen zu können. (Lediglich die Versuche Nr. 5, 6 und 7 der Tabelle 1 wurden nach einer abgeänderten Gewebekulturtechnik^{4a} ausgeführt.)

In der gegenwärtigen Versuchsreihe sollte nicht die kennzeichnende Geschwindigkeit der Verwertung der Substrate bestimmt werden. Dies wäre auch gar nicht möglich gewesen, da die Gewebe verschiedene Größe

¹ O. Suschny, E. Broda, L. Sverak, O. Feldstein, H. Bilek, L. Stockinger und H. Madl, Mh. Chem. **83**, 1091 (1952).

² L. Stockinger, H. Enzl, E. Broda, O. Suschny und L. Sverak, Mh. Chem. **85**, 327 (1954).

³ H. Schönfellinger, E. Broda und L. Stockinger, Mh. Chem. **86**, 318 (1955).

⁴ L. Sverak, O. Suschny, G. Manner, E. Broda, R. Stark, L. Stockinger und H. Enzl, Mh. Chem. **86**, 124 (1955).

^{4a} G. Kellner, unveröffentlicht.

und zweifellos auch verschiedene „Vitalität“ aufwiesen. Vielmehr sollte qualitativ festgestellt werden, ob ein geeignetes Enzymsystem für die Verarbeitung eines jeden Substrats überhaupt vorhanden ist.

Natürlich mußte größter Wert auf Reinheit des Substrate gelegt werden. Die Mannose, Saccharose und das Glycerin wurden aus Harwell bezogen, während Glukose und Fruktose von uns selbst durch Radiophotosynthese erzeugt worden waren⁵. (Alle Substrate waren an sämtlichen Kohlenstoffatomen markiert.) Prüfung durch Papierchromatographie zeigte, daß die anderen Zucker durch Glukose verunreinigt waren. Daher wurde in jedem Falle (auch der Glycerins) eine Reinigung durch eindimensionale Papierchromatographie (Butanol-Eisessig-Wasser 4 : 1 : 5) ausgeführt, der der gewünschten Substanz entsprechende Fleck wurde mit 70% Alkohol eluiert und das Eluat bei niedriger Temperatur (30 bis 35°) im Vakuum unter Durchleiten von Stickstoff eingedampft. Die niedrige Temperatur erwies sich als notwendig, um Hydrolyse bzw. Umwandlung der Zucker zu vermeiden. Schließlich wurde das Substrat in isotonischer Salzlösung aufgenommen. Diese Lösung mußte, um Zersetzung zu verhindern, kalt (durch Filtration) sterilisiert werden.

Kontrollchromatographie an einem Teil der fertigen Lösung ergab dann völlige Reinheit, insbesondere im Falle der anderen Zucker Abwesenheit von Glukose. 1% Glukose in den anderen Substraten wäre noch nachweisbar gewesen.

Das experimentelle Verfahren war das gleiche wie bei der Untersuchung der Atmung von Rollerkulturen bei Zufuhr von Radioglukose⁴. Die Nährlösung (zirka 1 cm³) war ebenso zusammengesetzt, wie oben beschrieben, nur wurde natürlich zuckerfreie Gey-Lösung verwendet, andererseits aber radioaktives Substrat zugefügt. Um uns von der Lebensfähigkeit der Kulturen zu überzeugen, wurde innerhalb jeder Serie ein Kontrollversuch angestellt, bei dem als Substrat entweder reine radioaktive Glukose oder eine Mischung dieser Glukose mit der zu untersuchenden Verbindung verwendet wurde. In jedem Kontrollversuch wurde starke Aktivität des CO₂ nachgewiesen, doch sind diese Werte nicht in die Tabelle I aufgenommen.

Die Aktivität des CO₂ wurde wieder mit Hilfe des Gas-Geiger-Zählrohres gemessen⁶. In Tabelle I sind die durch eine gleiche Ziffer, aber verschiedene Buchstaben bezeichneten Einzelversuche gleichzeitig, also als Serie angestellte Parallelversuche. Die „Blindwerte“ (Spalte 5) wurden beim Bebrüten des Nährmediums mit Substrat, aber in Abwesenheit von Gewebe erhalten; sie fallen niemals ins Gewicht.

⁵ L. Sverak, O. Suschny und E. Broda, Mh. Chem. 84, 931 (1953).

⁶ E. Broda und G. Rohringer, Z. Elektrochem. 54, 634 (1954).

Tabelle I. Aktivität des Kohlendioxyds.

1	2	3	4	5	6	7
Versuch Nr.	Substrat	Ein-gesetzte Menge (γ)	Ein-gesetzte Aktivität (Stöße/Min)	Blindwert (Stöße/Min im CO ₂)	Gewebeleistung (Stöße/Min im CO ₂)	Mittlerer Umsatz (% der eingesetzten Aktivität im CO ₂)
1 A, B, C	Mannose	22	$3,3 \cdot 10^5$	33; 22; 32	1780; 1130; 2540	0,55
2 A, B, C	Mannose	17,6	$2,7 \cdot 10^5$	21; 9	1030; 2010; 2920	0,73
3 A, B, C	Saccharose	0,5	$8,3 \cdot 10^4$	0; 33	13; 20; 3	< 0,01
4 A, B, C	Saccharose	0,3	$5,0 \cdot 10^4$	13; 13	14; 14; 9	< 0,02
5 A, B, C	Saccharose	1,0	$1,7 \cdot 10^5$	15	46; 39; 59	0,02
6 A, B, C	Fruktose	1,2	$3,6 \cdot 10^5$	59	640; 1340	0,28
7 A, B, C	Fruktose	0,6	$1,8 \cdot 10^5$	17	1030; 880; 1030; 720	0,50
8 A, B	Glyzerin	24	$5,9 \cdot 10^5$	50	18700; 13660	2,74

Unsere Ergebnisse stehen mit denjenigen von *Harris* und *Kutsky*⁷ im Einklang. Die genannten Autoren, die keine markierten Substrate verwendet haben, berichten, daß ihre Hühnerherzfibroblasten in dialysierten Medien imstande sind, sowohl auf Glukose und Mannose als auch — wenngleich wesentlich langsamer — auf Fruktose zu wachsen und Milchsäure zu bilden.

Es wird heute allgemein angenommen, daß für die Teilnahme von Zuckern am tierischen Stoffwechsel die erste Bedingung die Bildung phosphorylierter Monosaccharide ist. Diese werden dann auf verschiedenen Wegen — *Embden-Meyerhof*-Abbau mit folgender Oxydation über den Citronensäurezyklus oder oxydativer Hexosenmonophosphatabbau — weiter bis zum Kohlendioxyd abgebaut.

Unsere Versuche zeigen nun, daß die Fibroblasten wohl imstande sind, aus Glukose, Mannose, Fruktose und Glyzerin stoffwechselfähige Zwischenprodukte zu bilden, die der Weiteroxydation anheimfallen, während dies bei Saccharose nicht der Fall ist. Sie enthalten also Phosphorylierungsmechanismen für Glukose, Mannose, Fruktose und Glyzerin, wobei als Zwischenprodukte Glukose-6-phosphat, Fruktose-6-phosphat, Mannose-6-phosphat und α -Glyzerinphosphat zu postulieren wären.

Bei der Beurteilung der Zahlenwerte der Spalten 3 und 7 der Tabelle I ist zu bedenken, daß die Nährlösung neben den zugesetzten radioaktiven Substraten stets vom Embryonalextrakt und der Aszites-

⁷ *M. Harris* und *P. Kutsky*, *J. Cell. Comp. Physiol.* **42**, 449 (1953).

flüssigkeit her eine viel größere Menge nicht radioaktiver Glukose enthielt, die mit den radioaktiven Substraten in Konkurrenz treten konnte.

Die Unfähigkeit der Fibroblastenkultur zur Veratmung von Saccharose läßt sich wohl damit erklären, daß saccharosespaltende Fermente — beim Tier wohl ausschließlich α -Glucosidasen — in höheren Tieren weitgehend in spezialisierten Organen, vor allem im Verdauungstrakt, lokalisiert sind⁸.

Diese Untersuchung wurde durch eine Subvention des Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research, dem wir unseren Dank aussprechen, großzügig gefördert.

Über eine einfache Herstellung von P^{32} -markiertem Adenosintriphosphat

(Kurze Mitteilung)

Von

O. Gabriel, A. Klima † und O. Hoffmann-Ostenhof

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien

(Eingelangt am 28. Dezember 1955)

Im Verlauf unserer Arbeiten ergab sich die Notwendigkeit, in Fermentversuchen ein am Phosphat markiertes Adenosintriphosphat (ATP) einzusetzen. Zur Herstellung solcher Präparationen sind bisher drei Methoden beschrieben worden. Nach *Dounce* und Mitarbeitern¹ wird einem Kaninchen intravenös eine Dosis radioaktiv markiertes Orthophosphat injiziert; darauf wird das Tier 30 Min. lang in der Weise einer größeren Anstrengung ausgesetzt, daß man es in einer mit Wasser gefüllten Wanne schwimmen läßt; schließlich wird das Kaninchen nach $2\frac{1}{2}$ Stdn. Ruhepause getötet und nach der von den Autoren ausgearbeiteten Methode auf ATP aufgearbeitet. *Hems* und *Bartley*² benützen eine atmende Suspension aus Hammelherzmuskel, der sie nicht markiertes ATP und radioaktives Orthophosphat zusetzen. Dabei findet ein sehr rascher Austausch zwischen den beiden terminalen Phosphatresten des ATP und dem Orthophosphat statt. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich kleine Mengen einer sehr aktiven ATP-Präparation erzeugen; aller-

⁸ Vgl. *C. Neuberg* und *I. Mandl*, in „The Enzymes“, herausgegeben von *J. B. Sumner* und *K. Myrbäck*, Bd. I/1, S. 551. New York. 1950.

¹ *A. L. Dounce*, *A. Rothstein*, *G. T. Beyer*, *R. Meier* und *R. M. Freer*, *J. Biol. Chem.* **174**, 361 (1948).

² *R. Hems* und *W. Bartley*, *Biochemic. J.* **55**, 434 (1953).