

**Über die Reaktion  
von  $\Delta^9, 12$ -Linolsäureester in Wasser, 5. Mitt.:**\*

Mechanismus der Glykolysehemmung bei Tumorzellen durch  
wasserlösliche Fettsäureester-Hydroperoxyde

Von

**E. Schauenstein, M. Taufer und G. Schatz**

Aus dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Graz

Mit 1 Abbildung

*(Eingegangen am 12. Februar 1962)*

In vorangegangenen Arbeiten dieser Mitteilungsreihe konnte die Hemmwirkung der wasserlöslichen Lipid-hydroperoxyde auf Atmung und Glykolyse von *Ehrlich*-Ascites-Tumorzellen festgestellt werden.

Ferner wurde gefunden, daß die Lipid-hydroperoxyde (LHPO) nicht über eine Schädigung des intrazellulären DPN-Systems wirksam sind und ihrer Hemmwirkung wahrscheinlich eine oxydative Inaktivierung der SH-Enzyme der Glykolysekette zugrunde liegt. Zur experimentellen Prüfung dieser Annahme werden daher zunächst die isolierten Glykolyseenzyme Hexokinase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Aldolase, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Lactat-Dehydrogenase (LDH) nach Einwirkung von Präparat LHPO getestet. Die Messungen ergeben, daß nur die GAPDH und die LDH durch Präparat LHPO inaktiviert werden. Bestimmt man nun die Aktivität dieser beiden Enzyme in einem Extrakt, der aus den intakten und mit LHPO inkubierten Tumorzellen gewonnen wurde, so findet man hier eine vollständige Inaktivierung (halbmaximale Dosis  $7,1 \cdot 10^{-5}$  m Lipid-hydroperoxyd/l). Damit scheint der Wirkungsmechanismus von Präparat LHPO hinsichtlich der Glykolysehemmung klargestellt.

---

\* Herrn Prof. Dr. A. Zinke anlässlich seines 70. Geburtstages mit den besten Wünschen überreicht.

## Einleitung

In früheren Arbeiten<sup>1</sup> dieser Mitteilungsreihe wurde über die Entstehungs- und Darstellungsmöglichkeiten von neuartigen wasserlöslichen C<sub>18</sub>-Fettsäureester-hydroperoxyden berichtet. Wenn auch ihre Reindarstellung noch nicht möglich war, so gelang es doch, sie anzureichern und zu einem Präparat zu kommen, das immerhin bereits aus 50% dieser Lipid-hydroperoxyde (LHPO) besteht.

Die Wasserlöslichkeit des Präparates ermöglichte Versuche über seine biologischen Wirkungen und Eigenschaften. Als wesentliches Ergebnis konnte gefunden werden, daß Präparat LHPO die Atmung und Gärung von Tumorzellen wirksam und in charakteristischer Weise hemmt (halbmaximale Dosis in Molen Lipidhydroperoxyd/l =  $3,15 \cdot 10^{-4}$  [Atmung] und  $1,26 \cdot 10^{-4}$  [Gärung]). In vivo ergab sich nach Inkubation des Präparates mit den Tumorzellen eine 100proz. Hemmung des Tumorwachstums, wie in Versuchen mit *M. Ratzenhofer* und *J. Zangger* festgestellt werden konnte<sup>2, 3</sup>.

Während über den Mechanismus der Atmungshemmung derzeit noch Untersuchungen im Gange sind, ergab sich hinsichtlich der Gärungshemmung die bemerkenswerte Erkenntnis, daß der Wirkungsmechanismus des Präparates LHPO von dem der bisher bekannten alkylierenden Tumorchemostoffe grundsätzlich abweicht. Während diese die Glykolyse durch eine Senkung des DPN-Spiegels der Zelle hemmen, konnte festgestellt werden, daß Präparat LHPO das intrazelluläre DPN-Niveau nur unwesentlich erniedrigt<sup>1</sup>.

Auf der Suche nach einer Erklärungsmöglichkeit für den Mechanismus der Gärungshemmung durch Präparat LHPO kamen wir zu der Vorstellung, daß dieses Präparat mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Grund des darin enthaltenen Hydroperoxydsauerstoffes über eine oxydative Inaktivierung der SH-Enzyme der Glykolysekette wirken könnte.

Zu einer ersten Prüfung dieser damaligen Arbeitshypothese wurde das isolierte Enzym Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH der Fa. Boehringer, aus Muskel isoliert) in Gegenwart von Präparat LHPO auf seine Aktivität getestet, wobei eine vollständige Inaktivierung festgestellt werden konnte<sup>2</sup>. Die halbmaximale Dosis in Molen Lipidhydroperoxyd/l beträgt  $6,9 \cdot 10^{-6}$ .

<sup>1</sup> *E. Schauenstein, G. Schatz und G. Benedikt, Mh. Chem. 92, 442 (1961); dort weitere Literatur.*

<sup>2</sup> *E. Schauenstein, G. Schatz und M. Taufer, Z. Krebsforsch. 64, 465 (1962).*

<sup>3</sup> *J. Zangger, M. Ratzenhofer und E. Schauenstein, Z. Krebsforsch. 64, 473 (1962).*

Messungen an weiteren isolierten SH-Enzymen der Glykolyse

Um die Frage zu studieren, ob Präparat LHPO die GAPDH selektiv oder auch andere Enzyme, für deren Funktion die Anwesenheit von SH-Gruppen erforderlich ist, inaktivieren kann, wurden zunächst folgende Glykolyse-Fermente getestet:

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH der Fa. Boehringer aus Hefe), die nach den Untersuchungen von *Scharfschwerdt* und *Rapoport*<sup>4</sup> SH-Natur besitzt, und Hexokinase<sup>5, 6</sup> (HK der Fa. Boehringer, aus Hefe). Schließlich wurden noch die Aldolase<sup>5</sup> (ALD, Fa. Boehringer, aus Muskel) sowie die Lactatdehydrogenase (LDH, Fa. Boehringer, aus Muskel) in unsere Untersuchungen einbezogen.

Die folgende Tabelle stellt die mit sämtlichen untersuchten Enzymen erhaltenen Ergebnisse übersichtlich zusammen. Man entnimmt daraus, daß nur die beiden Enzyme Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase durch Präparat LHPO inaktiviert werden.

Tabelle 1

Enzym	Enzym-Protein im Ansatz	Mole Lipid-hydroperoxyd/l	% Hemmung
G-6-PDH . . . . .	0,001 mg/3,09 ml	$3,65 \cdot 10^{-4}$	0
HK . . . . .	0,0005 mg/3,04 ml	$3,65 \cdot 10^{-4}$	0
ALD . . . . .	0,025 mg/3,03 ml	$1,5 \cdot 10^{-3}$	0
GAPDH . . . . .	0,01 mg   3,13 ml	$3,4 \cdot 10^{-5}$	100
	0,01 mg   3,13 ml	$6,9 \cdot 10^{-6}$	50
LDH . . . . .	0,0005 mg   3,05 ml	$1,5 \cdot 10^{-3}$	78
	0,0005 mg   3,05 ml	$1,0 \cdot 10^{-3}$	50

Damit ist über die Reaktion des Präparates LHPO in der intakten Zelle allerdings noch nichts Sicheres ausgesagt. Diese Frage ist in einfacher Weise durch Präparation des Acetontrockenpulvers aus den Zellen und Messung der Aktivität der betreffenden Enzyme in dem erhaltenen Enzymextrakt zu erbringen.

#### Aktivitätsmessungen an GAPDH und LDH im Enzymextrakt aus *Ehrlich*-Ascites-Tumorzellen

Wir stellten aus *Ehrlich*-Ascites-Tumorzellen der Maus, die einerseits in physiologischer Kochsalz-Lösung, andererseits in physiologischer Kochsalz-LHPO-Lösung bei 37°C 20 Min. anaerob vorinkubiert wurden, das Acetontrockenpulver nach der Vorschrift von *G. Weitzel*<sup>7</sup> her. Im

<sup>4</sup> *H. Scharfschwerdt* und *S. Rapoport*, Naturwiss. **47**, 204 (1960).

<sup>5</sup> *J. R. Whitaker*, Food Res. **24**, 37 (1959).

<sup>6</sup> *F. Caramia*, Sperimentale **111**, 97 (1961).

<sup>7</sup> *G. Weitzel* und *E. Buddecke*, Z. physiol. Chem. **323**, 14 (1961).

wäßrigen Auszug aus dem Acetonrockenpulver wurde die Aktivität der GAPDH und der LDH gemessen.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Dosis—Effekt-Kurve (Abb. 1) graphisch dargestellt.

Es ergibt sich somit, daß die Erklärung für die bei der Einwirkung von Präparat LHPO festgestellte Glykolysehemmung in der vollständigen Inaktivierung der Enzyme Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase zu suchen ist. Nachdem in vorangegangenen

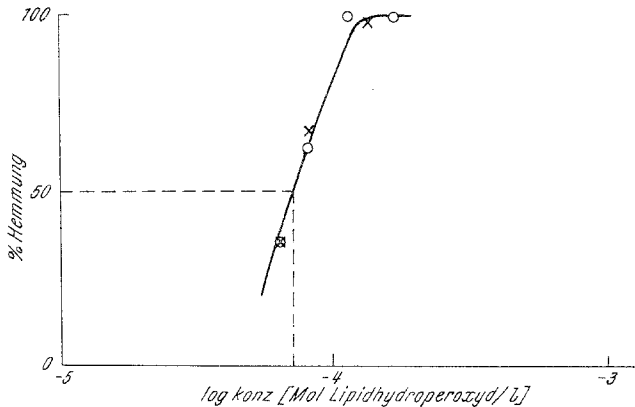


Abb. 1. Hemmung der GAPDH (O O O) und der LDH (X X X) nach Inkubation der intakten Zellen mit Präparat LHPO. Messung im Acetonrockenpulverextrakt

Untersuchungen bewiesen werden konnte, daß bei der Einwirkung von Präparat LPHO auf die Tumorzellen eine nennenswerte Schädigung des intrazellularen DPN-Systems mit Sicherheit auszuschließen ist, scheint der Wirkungsmechanismus der wasserlöslichen Lipid-hydroperoxyde in bezug auf die Glykolysehemmung klargestellt.

### Diskussion

Über die Hemmung von Atmung und Glykolyse bei *Ehrlich*-Ascites-Tumorzellen durch verschiedene organische Peroxyde und Hydroperoxyde liegen umfangreiche Untersuchungen von *Weitzel* und Mitarbeitern<sup>8</sup> vor; danach scheint für alle glykolysehemmenden Peroxyde und Hydroperoxyde — und auch für die wasserlöslichen Lipid-hydroperoxyde — die Inaktivierung von Glykolyse-Fermenten charakteristisch zu sein.

Wie sich jedoch die Hemmwirkung auf die einzelnen Enzyme verteilt und ob die betreffende Peroxyverbindung außerdem den DPN-Spiegel senkt, hängt von deren chemischer Konstitution ab. Die wasserlöslichen Lipid-hydroperoxyde in Präparat LHPO verhalten sich ähnlich wie das

von Weitzel und Mitarbeitern<sup>7, 8</sup> untersuchte saure tert.-Butylmaleinperoxyd, das mit hoher Spezifität Glykolyse-Fermente hemmt, ohne das DPN-System anzugreifen. Dagegen unterscheiden sich die wasserlöslichen Lipid-hydroperoxyde von dem genannten Peroxyd im Ferment-Wirkungsspektrum, vor allem in bezug auf Aldolase (keine Wirkung der wasserlöslichen Hydroperoxyde) und Lactat-Dehydrogenase (100proz. Inaktivierung). Auch liegen bei Präparat LHPO die wirksamen Konzentrationen um eine Größenordnung tiefer als bei dem genannten Peroxyd.

### Experimenteller Teil

#### a) Messungen mit isolierten Enzymen

Sämtliche getesteten isolierten Enzyme wurden einerseits mit eiskaltem bidest. Wasser (Leermessung), andererseits mit der Hemmstofflösung im Verhältnis 1:1 gemischt, wobei für die Untersuchungen der G-6-PDH 0,025 ml, der HK 0,02 ml, der ALD 0,05 ml, der GAPDH 0,1 ml und der LDH 0,05 ml Enzymlösung genommen wurden. Die Mischungen wurden dann 15 Min. bei 0°C vorinkubiert. Es ergab sich auch bei längeren Inkubationszeiten keine Änderung der Hemmwirkung, so daß die Zeit von 15 Min. vollkommen ausreichend war. Unmittelbar vor der Messung wurden dann die vorinkubierten Mischungen mit den in den Boehringer-Informationen vorgeschriebenen Zusätzen auf ein Gesamtvolumen von rund 3 ml aufgefüllt. Die Enzym-Protein-Konzentrationen der einzelnen Fermente waren entsprechend gewählt, um einen linearen Ablauf des Testes zu erreichen und sind aus Spalte 2 der Tab. 1 zu ersehen. Nach den Standardvorschriften für den zusammengesetzten optischen Test (Boehringer-Informationen) wurden mit diesen Konzentrationen folgende Durchschnittszeiten erhalten (Tab. 2).

Tabelle 2

Enzym	$t_0$ in sec
G-6-PDH . . . . .	52 ± 1
HK . . . . .	52 ± 1
ALD . . . . .	600 ± 80
GAPDH . . . . .	17 ± 2
LDH . . . . .	128 ± 8

Bezeichnet man die mit den verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen gemessene Zeit, in der sich die Extinktion des Testansatzes bei 366 m $\mu$  um 0,100 ändert, mit  $t_x$ , so ergibt sich die prozentuale Hemmung nach:

$$\left(1 - \frac{t_0}{t_x}\right) \cdot 100$$

$t_0$  bezeichnet das entsprechende Zeitintervall ohne Hemmstoffzusatz.

<sup>8</sup> G. Weitzel, E. Buddecke und F. Schneider, Z. physiol. Chem. **323**, 211 (1961).

Die so ermittelten Hemmprozente haben eine Fehlerbreite von durchschnittlich  $\pm 8\%$  und sind in Spalte 4 der Tab. 1 angeführt.

b) *Hemmstoffkonzentrationen*

Mit Hemmstoff wird in den geschilderten Versuchen stets der Lipidhydroperoxyd-Anteil im Gesamtpräparat LHPO bezeichnet, wobei als Wirkungs-träger der in den Hydroperoxyden anwesende aktive Sauerstoff angesehen wird. Der Hydroperoxydanteil beträgt zwischen 40 und 50 Gewichtsprozent des Gesamtpräparates LHPO. Zur Angabe der Hemmstoffkonzentration in Molen/l wurde an der wäßrigen Lösung des Gesamtpräparates LHPO zunächst der aktive Sauerstoff nach der Methode von *Hartman*<sup>9</sup> ermittelt. Aus dem Durchschnittsmolekulargewicht der Lipid-hydroperoxyde von 350 folgt, daß durch Multiplikation der erhaltenen Gramme aktiven Sauerstoffes mit 22 die Gramme Lipid-hydroperoxyd, bzw. durch anschließende Division des Produktes durch 350 die Mole Lipid-hydroperoxyde erhalten werden.

c) *Messungen an den Enzym-Extrakten aus Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen (Herstellung des Acetontrockenpulverextraktes)*<sup>7</sup>

18 ml Zellsuspension (Konz. 45  $\mu$ l Zellen/ml glucosefreier *Krebs-Ringer*-Bicarbonat-Puffer,  $p_H$  7,4) mit 18 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) bzw. Hemmstofflösung 20 Min. bei 37°C unter  $N_2/CO_2$  inkubieren. Eingießen in eiskalte Ringerlösung (ohne Bicarbonat), waschen, aufschwemmen in wenig Ringerlösung, mit kaltem Aceton übergießen, 2  $\times$  mit Aceton waschen. Den abzentrifugierten Rückstand im Exsikkator trocknen, bei 0°C 24 Stdn. aufbewahren, mit bidest. Wasser aufnehmen (50 mg Trockenpulver/ml  $H_2O$ ), scharf abzentrifugieren, Überstand (Enzymextrakt) bei 0°C aufbewahren. Die Reaktionszeiten  $t_0$  für GAPDH und LDH in den Enzymextrakten aus Tumorzellen, die, wie früher beschrieben, inkubiert worden waren, wurden wiederum nach den oben genannten Standardvorschriften ermittelt. Sie schwankten beträchtlich von Versuch zu Versuch und betragen im Mittel  $143 \pm 100$  (für GAPDH) und  $78 \pm 40$  (für LDH). Trotz dieser erheblichen Streuungen der enzymatischen Aktivität sind die mit LHPO gefundenen prozentualen Hemmungen bei beiden Enzymen auf  $\pm 8\%$  genau.

<sup>9</sup> *L. Hartman, J. Sci. Food Agric.* 5, 476 (1954).