

Über die Wirkungen von Aldehyden auf gesunde und maligne Zellen, 1. Mitt.:

Hydroxy-octenal, ein neuer Fettaldehyd

Von

E. Schauenstein, H. Esterbauer, G. Jaag und M. Taufer

Aus der Lehrkanzel für Biochemie am Institut für Physikalische Chemie der Universität Graz, Österreich

(Eingegangen am 19. November 1963)

Aus dem komplex zusammengesetzten Mischpräparat „LHPO“ wird eine Substanz isoliert, die kein Lipidhydroperoxyd ist und trotzdem eine starke selektive Hemmung auf *Ehrlich-Ascites-Tumorzellen* besitzt. Die Substanz konnte als 4-Hydroxy-2-*trans*-octenal identifiziert werden.

In mehreren vorangegangenen Mitteilungen¹ wurde über die biologische Wirkung wasserlöslicher, neutraler, peroxydaktiver Autoxydationsprodukte von Linolsäureester (Präparat „LHPO“) berichtet. Auf der Suche nach den für diese Wirkung verantwortlichen Komponenten des Präparates trennten wir dieses auf säulenchromatographischem Weg in vier Hauptfraktionen, A, B, C, D, und prüften ihre Wirkung auf den Stoffwechsel von EAT[†]-Zellen². Dabei ergab sich einerseits eine Bestätigung unserer früheren Annahme, daß die Wirkung auf den Stoffwechsel der Tumorzellen den Hydroperoxyden zuzuordnen ist, daß andererseits aber auch noch eine andere wirksame Gruppierung vorhanden ist.

Die Fraktion C zeigte nämlich bei einem Peroxydgehalt von nur 2 γ aktiven Sauerstoffs pro Milligramm eine 100proz. Hemmung der Glykolyse, wenn 15 Mio Zellen 30 Min. mit 0,4 mg inkubiert wurden. Würde man die Hemmung der OOH-Gruppe zuschreiben, so müßte das in Frak-

[†] *Ehrlich-Ascites-Tumor* der Maus.

¹ a) *E. Schauenstein* und *G. Schatz*, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **61**, 1068 (1959). b) *E. Schauenstein*, *G. Schatz* und *G. Benedikt*, *Mh. Chem.* **92**, 442 (1961). c) *E. Schauenstein*, *G. Schatz* und *M. Taufer*, *Z. Krebsforsch.* **64**, 465 (1962).

² *H. Esterbauer* und *E. Schauenstein*, *Mh. Chem.* **94**, 998 (1963).

tion C enthaltene Peroxyd außerordentlich aktiv sein. Wir trennten Fraktion C säulenchromatographisch in drei Komponenten auf², die wir mit den Ziffern 7, 8* und 9 bezeichneten*. Komponente 8* erwies sich im Stoffwechselltest als die wirksamste. Sie konnte schließlich in drei Substanzen aufgetrennt werden, die wir mit den Ziffern 81, 82, 83* bezeichneten. Von diesen drei Substanzen war Substanz 81 am wirksamsten und wurde näher untersucht.

Die Substanz 81 zeigt im UV ein charakteristisches, ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 45000 ν' (Lösungsmittel: Methanol); der spez. dekadische Extinktionskoeffizient ϵ' beträgt 81. Die Lage der Absorptionsbande ist für α, β -ungesättigte Aldehyde, Ester und Säuren typisch.

Im Polarogramm zeigt sich die für α, β -ungesättigte Aldehyde³ ebenfalls typische Reduktionsstufe bei $E_{1/2} = -1,6$ V (0,15 m LiCl, Benzol—Methanol 1:1). Die im IR-Spektrum auftretenden Absorptionsbanden sind in Tab. 1 zusammengefaßt (Substanz als kapillarer Film zwischen NaCl-Fenstern).

Tabelle 1

Bande μ	Zuordnung
3,41	CH ₂ (Valenz)
3,50	
7,26	CH ₃ (Deformation)
13,8	(CH ₂) _n , n \geq 4
14,35	
2,93	C—OH, assoz. (Valenz)
3,67	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}—\text{H} \end{array}$ (CH-Valenz)
10,27	CH=CH- <i>trans</i> (CH-Deformation)-
6,12	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{CH}=\text{CH}-\text{C}=\text{O} \end{array}$ (C=C-Valenz)
5,93	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{CH}=\text{CH}-\text{C}=\text{O} \end{array}$ (Aldehyd-C=O-Valenz)

Auf Grund der polarographischen, UV- und IR-spektrometrischen Befunde schließen wir, daß Substanz 81 ein α, β -ungesättigter Hydroxyaldehyd ist.

Die Substanz erwies sich als besonders instabil gegen erhöhte Temperatur und Alkalien. Auch bei längerem Einwirken von Säuren kommt es zu Zersetzungsreaktionen.

* Das Zeichen * bedeutet peroxyd-aktive Substanz.

³ C. O. Willits und C. Ricciutti, *Analyt. Chem.* **24**, 785 (1952).

Durch Umsetzen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin kann mit einer Ausbeute von ca. 70% das Dinitrophenylhydrazon der Substanz 81 erhalten werden. Die Reaktion läuft zwar in saurem Medium ab, nach 10 Min. ist jedoch der Großteil des Aldehyds zum Hydrazon umgesetzt und damit dem Angriff der Säure entzogen. Das gebildete Hydrazon reinigen wir zuerst säulenchromatographisch. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Chloroform—Hexan (1:4) kommt man schließlich zu einem Produkt mit konstantem spez. Extinktionskoeffizienten von $\epsilon' = 78$ bei 26800 ν' . Die Lage des Maximums ist wiederum charakteristisch für Dinitrophenylhydrazone α, β -ungesättigter Aldehyde⁴. Der Schmelzpunkt der Substanz liegt bei 123° C. Die Elementaranalyse, durchgeführt am Dinitrophenylhydrazon der Substanz 81, ergab folgende Werte: C = 52,6%, H = 5,9%, N = 17,6%, O = 23,9%. Daraus errechnet sich die Summenformel $C_{14}H_{18}O_5N_4$ (ber. C 52,17, H 5,63, N 17,38, O 24,82); der Substanz 81 ist demnach die Summenformel $C_8H_{14}O_2$ zuzuordnen.

Behandelt man das Hydrazon mit Salzsäure bei erhöhter Temperatur, so erhält man ein Hydrazon mit einem Absorptionsmaximum bei 25600 ν' (Lösungsmittel: Chloroform). Diese Absorptionslage ist kennzeichnend für Dinitrophenylhydrazone von 2,4-Dienalen⁵. Offenbar ist also durch die Salzsäurebehandlung unter Wasserabspaltung eine zweite CH=CH-Bindung, konjugiert zur ursprünglich vorhandenen, entstanden. Damit scheint uns die Stellung der Hydroxygruppe am C₄-Atom gesichert. Alle vorliegenden Befunde sprechen somit eindeutig dafür, daß Substanz 81 4-Hydroxy-2-*trans*-octenal ist.

Substanz 81 zeigt folgende Hemmwirkungen auf den Stoffwechsel von EAT-Zellen der Maus (vgl. Tab. 2):

Tabelle 2

Konzentration	
anaerobe Gärung, 100% Hemmung	$c \cong 2,8 \cdot 10^{-4}$ Mol/l
aerobe Gärung, 90% Hemmung	$c \cong 4,2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l
Atmung, 90% Hemmung	$c \cong 3,9 \cdot 10^{-4}$ Mol/l

15 Mio. Zellen 30 Min. aerob vorinkubiert in Bicarbonat- bzw. Phosphatpuffer, Gesamtvolumen: 2,5 ml

Die Gärungshemmung wird dadurch bewirkt, daß Substanz 81 mit hoher Spezifität die Enzyme GAPDH und MDH der Tumorzelle inaktiviert. Durch Zusatz eines 100fachen molaren Überschusses an Cystein ist die

⁴ P. Haverkamp und K. de Jong, Rec. Trav. Chim. Pays-bas **78**, 275 (1959).

⁵ G. Hoffmann, J. Amer. Oil Chemist's Soc. **38**, 31 (1961).

Hemmung vollkommen aufhebbar. Daraus ist zu schließen, daß es sich um eine spezifische Reaktion mit den funktionellen SH-Gruppen der genannten Enzyme handelt. Hiefür spricht auch der Befund, daß bei Zusammenbringen von Substanz 81 mit Cystein in 1,5fachem molarem Überschuß bereits nach wenigen Sekunden die äquimolare Menge an freien SH-Gruppen sowie andererseits die Aldehydgruppe spektrometrisch nicht mehr nachweisbar ist⁶. Für die hohe Affinität zu den Ferment-SH-Gruppen bzw. für die starke Gärungshemmung der Substanz 81 ist offenbar die Hydroxyenalgruppe verantwortlich, denn Heptenal besitzt eine etwa 10mal schwächere, Heptanal, auch bei 20facher Konzentration, überhaupt keine Hemmaktivität. Auch bei der Atmungshemmung zeigt sich ein analoges Verhalten.

Aldehyd 81 senkt ferner mit zunehmender Gärungshemmung den intrazellulären DPN-Spiegel, maximal um 87%. Nikotinsäureamidzusatz bewirkt eine nur 60proz. Senkung, doch bleibt die Gärungshemmung vollkommen bestehen. Daraus ergibt sich, daß für die Gärungshemmung durch Substanz 81 in erster Linie die vorhin erwähnte Enzymblockade verantwortlich ist. Besonders interessant erscheint schließlich, daß Substanz 81 die Atmung gesunder Zellen, auch unter extrem veränderten experimentellen Bedingungen, nicht meßbar beeinflusst (vgl. Tab. 3).

Tabelle 3

Konz. in Mol/l	$\geq 3,9 \cdot 10^{-4}$	$\geq 4,8 \cdot 10^{-4}$	$\geq 1 \cdot 10^{-2}$
Atmungshemmung	90—95%	0%	0%
30 Min. aerob vorinkubiert in Phosphatpuffer, Gesamtvolum.: 2,5 ml	15 Mio. EAT-Zellen	0,25 Mio. Affenleberzellen	0,3 Mio. Affennierenzellen

Diese Zahlen zeigen, daß das Hydroxyoctenal — auch in 12- bis 25facher Konzentration und bei Verringerung der Zelldichte um das 50- bis 60fache — die Atmung der gesunden Zellen nicht meßbar beeinflusst. Die selektive Wirkung der Substanz auf die Tumorzellen zeigt sich auch in einem von *Ratzenhofer* und *Zannger* beobachteten und eingehend untersuchten cytotoxischen Effekt, mit dem auch die carcinolytische Aktivität der Substanz in Zusammenhang zu stehen scheint. Darüber wird in Kürze gemeinsam a. a. O. berichtet werden.

Wir sind der Rockefeller Foundation, New York, sowie dem Österreichischen Krebsforschungsinstitut, Wien, für die Bereitstellung von Apparaturen, der Nitritfabrik GmbH. & Co., Feldkirchen bei München, für die Subventionierung der Arbeit zu Dank verpflichtet.

⁶ A. Hubmann, Dissert. Univ. Graz, 1964.