

# Über den Weg der nicht-mitochondrialen, Jodacetat-aktivierten Oxydation des Glucose-C-6 in Ascites-Tumor-Zellen

Von

**G. Sauermann**

Aus dem Institut für Krebsforschung der Universität Wien

(Eingegangen am 6. Mai 1967)

Der zytoplasmatische, Mitochondrien-freie Überstand eines Homogenates von Ehrlich-Lettré-Ascites-Carcinom-Zellen vermag Glucose-C-6 in  $\text{CO}_2$  überzuführen. Die Reaktion wird durch Jodacetat stark aktiviert. Die Jodacetat-aktivierte Oxydation von Glucose-C-6 zu  $\text{CO}_2$  zeigt eine ähnliche Abhängigkeit von den Coenzymen  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  wie die Oxydation von Glucose-C-1 zu  $\text{CO}_2$ . Die Jodacetat-aktivierte Oxydation von Glucose-C-6 wird durch einige unmarkierte Metabolite des Glucuronsäure-Cyclus geringfügig, durch 6-Phosphogluconat, einen Metaboliten des Pentosephosphat-Cyclus, jedoch stark herabgesetzt.

Die Resultate sprechen dafür, daß (in Anwesenheit von Jodacetat) C-6 der zugesetzten Glucose in die Position 1 des Glucose-6-P übergeführt, und dann weiter über den Pentosephosphat-Cyclus zu  $\text{CO}_2$  oxydiert wird.

The cytoplasmatic mitochondria-free supernatant of a homogenate of Ehrlich-Lettré-ascites-carcinoma cells is capable of converting glucose-C-6 to  $\text{CO}_2$ . The reaction is strongly activated by iodoacetate. The iodoacetate-activated oxidation of glucose-C-6 to  $\text{CO}_2$  depends in a similar way on the coenzymes  $\text{NAD}^+$  and  $\text{NADP}^+$  as does the oxidation of glucose-C-1 to  $\text{CO}_2$ . The iodoacetate-activated oxidation of glucose-C-6 is negligibly decreased by the addition of some inactive metabolites of the glucuronic acid cycle, but strongly decreased by 6-phosphogluconate, a metabolite of the pentose phosphate cycle.

The results suggest that, in the presence of iodoacetate, C-6 of the added glucose is transferred to position 1 of the glucose-6-P

---

Abkürzungen:  $\text{ATP}$  = Adenosin-5'-triphosphat,  $\text{EDTA}$  = Äthylen-diamintetraacetat,  $\text{NAD}$  = Nicotinamidadenindinukleotid,  $\text{NADP}$  = Nicotinamidadenindinukleotidphosphat,  $\text{UDP}$  = Uridin 5'-diphosphat.

and then further oxidized to  $\text{CO}_2$  via the pentose phosphate cycle.

### Einleitung

Versuche mit Ascites-Carcinom-Zellen der Maus hatten ergeben, daß in Anwesenheit von Cyanid durch Jodacetat die Oxydation von Glucose-C-6 zu  $\text{CO}_2$  aktiviert wird<sup>1</sup>. Unter diesen Bedingungen ist der Substratabbau über den Zitronensäure-Cyclus fast vollständig gehemmt. Durch direkten Abbau über den Pentosephosphat-Cyclus ist eine Oxydation von Glucose-C-6 zu  $\text{CO}_2$  nicht möglich<sup>2</sup>. Die folgenden Versuche wurden mit der Absicht durchgeführt zu klären, über welchen Weg Glucose-C-6 in Anwesenheit der Inhibitoren zu  $\text{CO}_2$  oxydiert wird.

### Ergebnisse

Die bisherigen Versuche waren mit intakten Zellen durchgeführt worden<sup>1</sup>. Die Aktivität des Zitronensäure-Cyclus, dessen Enzyme in den Mitochondrien lokalisiert sind, war dabei durch respiratorische Inhibitoren gehemmt worden. Es wurde nun untersucht, ob auch durch ein subzelluläres, Mitochondrien-freies System in Anwesenheit von Jodacetat Glucose-C-6 zu  $\text{CO}_2$  oxydiert wird. Es sollte auch ermöglicht werden, den Einfluß von Stoffen zu studieren, die die Wand der intakten Zelle nicht zu passieren vermögen.

Die Zellen wurden durch Schütteln mit Glaskugeln im Rohrzucker-*EDTA*-Medium homogenisiert. Zu den Versuchen wurde der Überstand eingesetzt, der durch Zentrifugieren des Homogenates bei  $1,8 \cdot 10^6$  gmin gewonnen wird, und von dem bekannt ist, daß er die Enzyme des Pentosephosphat-Cyclus und der Glykolyse enthält. Den Inkubationsansätzen wurde *ATP* und Hexokinase zugesetzt, um die markierte Glucose in das 6-Phosphat überzuführen. Die Zahlen der Tab. 1 zeigen, daß durch den Homogenat-Überstand Glucose-C-6 in  $\text{CO}_2$  übergeführt wird, und daß diese Reaktion durch Jodacetat stark stimuliert wird.

Glucose-6-P wird im Pentosephosphat-Cyclus durch die Glucose-6-phosphatdehydrogenase und weiter durch die 6-Phosphogluconatdehydrogenase in das Ribulose-5-P übergeführt, wobei der C-1 des Glucose-6-P zu  $\text{CO}_2$  oxydiert wird<sup>2</sup>.

Es wurde geprüft, ob die Oxydation des C-6 der zugesetzten Glucose eine ähnliche Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen aufweist wie die Oxydation des Glucose-C-1.

<sup>1</sup> G. Sauermann, *Biochim. Biophys. Acta* **118**, 268 (1966).

<sup>2</sup> S. Hollmann, Nicht-glykolytische Stoffwechselwege der Glucose, Georg Thieme, Stuttgart, 1961.

Tabelle 1. Der Einfluß von Jodacetat auf die Oxydation von Glucose-C-1 und -C-6 durch den Überstand eines Zellhomogenates

Zusätze	µAtome Glucose zu C-1	zu CO <sub>2</sub> * C-6
Keine	172	1,1
Jodacetat	47	10,4

\* pro mg Protein.

Alle Ansätze enthielten je 1 ml des Überstandes des Homogenates, 10 mM D-Glucose, 1 mM *ATP*, 0,5 mM *NADP*<sup>+</sup>, je 1,4 Einheiten Hexokinase. Endkonzentration des Jodacetats: 0,3 mM. Volumen 2 ml, Temp. 30° C. Inkubationszeit 60 Min. Gasphase: Luft. Die Reaktionen wurden durch Zugabe einer Lösung, die die markierte Glucose und das Jodacetat enthielt, gestartet.

Tabelle 2. Der Einfluß von Coenzymen auf die Glucoseoxydation in Anwesenheit von Jodacetat

Zusätze	µAtome Glucose zu C-1	zu CO <sub>2</sub> * C-6
Keine	1,1	0,5
0,1 µMol <i>NAD</i> <sup>+</sup>	1,9	0,9
1,0 µMol <i>NAD</i> <sup>+</sup>	3,8	2,2
3,0 µMol <i>NAD</i> <sup>+</sup>	5,2	3,2
0,1 µMol <i>NADP</i> <sup>+</sup>	21	10,3
1,0 µMol <i>NADP</i> <sup>+</sup>	66	33

\* Pro mg Protein.

Bedingungen wie in Tab. 1. Alle Ansätze enthielten je 1 ml des Homogenat-Überstandes 10 mM D-Glucose, 0,3 mM Jodacetat, 1 mM *ATP*, je 1,4 Einheiten Hexokinase. Die Reaktionen wurden durch Zugabe einer Lösung, die die markierte Glucose und das Jodacetat enthielt, gestartet.

Da die oben erwähnten Enzymreaktionen des Pentosephosphat-Cyclus an das *NADP*, nicht jedoch an das *NAD* gekoppelt sind, wurde zunächst der Einfluß dieser Nukleotide auf die Reaktion untersucht. Alle Ansätze des in Tab. 2 angeführten Versuches enthielten Jodacetat. Die Ergebnisse zeigen, daß die Oxydation des C-6 der zugesetzten Glucose durch Zugabe von *NAD*<sup>+</sup> nur wenig, durch Zugabe von *NADP*<sup>+</sup> jedoch stark gesteigert wird. Die Oxydation des C-6 zeigt eine ähnliche Abhängigkeit von der Nukleotidkonzentration wie die Oxydation des Glucose-C-1.

Es ist bekannt, daß der Elektronenakzeptor Methylenblau die über den Pentosephosphat-Cyclus erfolgende Oxydation von Glucose-C-1 zu CO<sub>2</sub> stimuliert. Um die intrazelluläre *NADP*-Konzentration möglichst beizubehalten, wurde der in Tab. 3 gezeigte Versuch mit intakten Zellen

durchgeführt. Der Substratabbau über den Zitronensäure-Cyclus wurde durch Cyanid gehemmt, wie an dem geringen Umsatz von Glucose-C-6 zu  $\text{CO}_2$  zu ersehen ist. Die Resultate zeigen, daß Methylenblau die Oxydation von Glucose-C-6 nur geringfügig erhöht, daß es jedoch die durch Jodacetat induzierte Oxydation von Glucose-C-6 stark steigert.

Tabelle 3. Der Einfluß von Methylenblau und Jodacetat auf die Glucoseoxydation durch intakte Zellen in Anwesenheit von Cyanid

Zusätze	$\mu\text{M}$ Atome C-1	Glucose zu $\text{CO}_2$ * C-6
Cyanid	250	2
Cyanid + Jodacetat	206	45
Cyanid + Methylenblau	1170	7
Cyanid + Jodacetat + Methylenblau	800	330

Pro Ansatz wurden  $10^8$  Ascites-Tumor-Zellen eingesetzt. Alle Ansätze enthielten 10 mM D-Glucose und 5 mM Cyanid. Endkonzentration der übrigen Zusätze: 0,3 mM Jodacetat, 33  $\mu\text{M}$  Methylenblau. Volumen: 3 ml, Temp. 37°C, Inkubationszeit 60 Min. Gasphase: Luft. Die Reaktionen wurden durch Zugabe einer Lösung, die die markierte Glucose und die in der Tab. angegebenen Zusätze enthielt, gestartet.

Die Resultate der Versuche mit den Coenzymen und mit Methylenblau weisen darauf hin, daß die nicht-mitochondriale, durch Jodacetat aktivierte Oxydation des Glucose-C-6 über den gleichen Weg verläuft wie die Oxydation des Glucose-C-1.

Ein anderer Weg, über den eine Oxydation von Glucose-C-6 zu  $\text{CO}_2$  erfolgen kann, ist der Glucuronsäure-Cyclus<sup>2</sup>. Falls der durch Jodacetat aktivierte Abbau des Glucose-C-6 über diesen Weg verlaufen würde, wäre zu erwarten, daß bei Zugabe eines Überschusses eines unmarkierten Metaboliten, der vor der Decarboxylierungsstufe liegt, die Menge an Glucose-C-6 im  $\text{CO}_2$  stark abnehmen würde. Alle Ansätze der in Tab. 4 angeführten Versuche enthielten Jodacetat. Die Ergebnisse zeigen, daß keines der zugeetzten Substrate des Glucuronsäure-Cyclus, nämlich *UDP*-Glucose, *UDP*-Glucuronsäure, Glucuronsäure, Glucuronsäurelacton und Gulonsäurelacton, die Oxydation des Glucose-C-6 wesentlich herabsetzt. Aus den Werten des Versuches 4 der Tab. 4 ist jedoch zu ersehen, daß 6-Phosphogluconat, ein Metabolit des Pentosephosphat-Cyclus, die Menge an Glucose-C-6 im  $\text{CO}_2$  stark senkt.

Diese Daten bilden einen Hinweis dafür, daß der Hauptanteil des Glucose-C-6, der im  $\text{CO}_2$  vorgefunden wird, nicht über den Glucuronsäure-Cyclus, sondern über den Pentosephosphat-Cyclus zu  $\text{CO}_2$  oxydiert wurde.

Tabelle 4. Der Einfluß von Metaboliten des Glucuronsäure-Cyclus und des Pentosephosphat-Cyclus auf die Glucoseoxydation in Anwesenheit von Jodacetat

Versuch	Zusätze	mg. Atome Glucose zu C-1	zu CO <sub>2</sub> * C-6
1	Keine	52	15,2
	Glucuronsäure	75	33
	Glucuronsäurelacton	72	30
2	Keine	59	13,0
	Gulonsäurelacton	60	13,6
	UDP-Glucuronsäure	57	11,2
3	Keine	39	11,2
	UDP-Glucose	38	10,4
4	Keine	61	29
	6-Phosphogluconat	5,2	0,07

\* Pro mg Protein.

Bedingungen wie in Tab. 1. Alle Ansätze enthielten je 1 ml des Homogenat-Überstandes, 10 mM D-Glucose, 0,3 mM Jodacetat, 1 mM ATP, 0,5 mM NADP<sup>+</sup>, je 1,4 Einheiten Hexokinase. Endkonzentration der übrigen Zusätze: 10 mM D-Glucuronsäure, 10 mM D-Glucuronsäure- $\gamma$ -lacton, 10 mM L-Gulonsäure- $\gamma$ -lacton, 1,5 mM UDP-Glucuronsäure, 1 mM UDP-Glucose, 10 mM 6-Phosphogluconat. Die Reaktionen wurden durch Zugabe einer Lösung, die die markierte Glucose, das Jodacetat und die angegebenen Zusätze enthielt, gestartet.

### Diskussion

Die vorliegenden Befunde zeigen, daß die Mitochondrien-freie zyttoplasmatische Fraktion von Ehrlich-Ascites-Carcinom-Zellen Glucose-C-6 in CO<sub>2</sub> überzuführen vermag, und daß diese Reaktion durch Jodacetat stark aktiviert wird. Die Daten lassen es als unwahrscheinlich erscheinen, daß die Oxydation über den Glucuronsäure-Cyclus erfolgt. Die Oxydation des Glucose-C-6 weist hingegen eine ähnliche Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen auf wie die über den Pentosephosphat-Cyclus erfolgende Oxydation des Glucose-C-1.

Durch direkten Abbau über den Pentosephosphat-Cyclus kann jedoch Glucose-C-6 nicht zu CO<sub>2</sub> oxydiert werden<sup>2</sup>. Das bei der Decarboxylierung des Glucose-6-P entstehende Ribulose-5-P wird durch Transaldolase- und Transketolase-katalysierte Reaktionen wieder in ein Hexosephosphat übergeführt. C-6 der ursprünglich zugesetzten Glucose scheint jedoch wieder in Position-6 des neugebildeten Hexosephosphates auf<sup>2</sup>.

In Versuchen mit intakten Zellen, die parallel zu den vorliegenden durchgeführt worden waren, konnte nachgewiesen werden, daß in Anwesenheit von Jodacetat C-6 der zugesetzten Glucose in die Position 1 des Glucose-6-P transferiert wird<sup>3</sup>. Die vorliegenden Resultate sprechen dafür, daß der Kohlenstoff dann weiter über den Pentosephosphat-Cyclus zu CO<sub>2</sub> oxydiert wird. Damit dürfte geklärt sein, auf welchem Wege Glucose-C-6 bei gleichzeitiger Anwesenheit respiratorischer Inhibitoren und des Glykolyse-Inhibitors Jodacetat zu CO<sub>2</sub> oxydiert wird.

Es verbleibt das Problem, auf welchem Wege Glucose-C-6 in Position 1 des Glucose-6-P übergeführt wird, da dies, wie oben erwähnt, über den Pentosephosphat-Cyclus nicht möglich ist. Jodacetat hemmt die Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase. Es erscheint daher am wahrscheinlichsten, daß die Glucose zu den Triosephosphaten abgebaut wird, und aus den Triosephosphaten, die über die Isomerase im Gleichgewicht stehen, durch Umkehr der Glykolyse wieder resynthetisiert wird. Auf diesem Wege könnte eine Umlagerung des Kohlenstoffes von Position 6 in Position 1 erfolgen. Dies würde allerdings voraussetzen, daß der erste Abschnitt der Glykolyse in Ascites-Tumor-Zellen reversibel ist.

#### Methodik

Ehrlich-Lettré-Ascites-Carcinom-Zellen der Maus wurden 8—11 Tage nach der Überimpfung gewonnen und 2mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die Inkubationen erfolgten im Warburg-Apparat. Das Medium für die Versuche mit intakten Zellen enthielt: 103 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 30 mM Phosphat (pH 7,4).

Homogenisationsbedingungen: Die mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Zellen wurden 1mal mit einer Lösung von 0,25 M-Saccharose—2 mM-EDTA gewaschen und im gleichen Medium im Zellhomogenisator von Merckenschlager (Fa. Braun, Melsungen) durch Schütteln mit Glasperlen homogenisiert<sup>4</sup> (Glasperlen, 50 g, Durchmesser 0,45 bis 0,50 mm; Zellen, 5—10 g Naßgewicht; wäßrige Phase, 35 ml; Homogenisationszeit, 20 Sekunden; Schüttelfrequenz, 4000/Min.). Die der Homogenisation folgenden Prozeduren wurden bei 0°—4° C durchgeführt. Das pH des Homogenates wurde mit KOH auf 7,4 eingestellt. Die Suspension wurde in der Ultrazentrifuge 15 Min. bei 120000 g zentrifugiert. Pro Ansatz wurde 1 ml des klaren, im mittleren Teil des Zentrifugenbeckers befindlichen Überstandes eingesetzt (8—20 mg Protein/ml). Das Inkubationsmedium für die Homogenat-Versuche enthielt: 125 mM Rohrzucker, 2 mM EDTA, 15 mM KCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan · HCl, 20 mM Phosphat (pH 7,4).

<sup>3</sup> G. Sauermann, Biochim. Biophys. Acta **136**, 577 (1967).

<sup>4</sup> M. M. Merckenschlager, K. Schlossmann und W. Kurz, Biochem. Z. **329**, 332 (1957).

Nach dem Temperaturangleich im Warburg-Apparat wurden die Reaktionen durch Zukippen einer Lösung, die die (1-<sup>14</sup>C)- oder (6-<sup>14</sup>C)-markierte Glucose und andere Zusätze enthielt, gestartet. Die Zusätze, die zugleich mit der Glucose zugekippt wurden, sind im Text der Tabellen angegeben. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Säure beendet, worauf noch eine Stunde weiter geschüttelt wurde. Das CO<sub>2</sub> wurde in 20proz. KOH absorbiert.

Die Radioaktivität wurde im Packard Tri Carb Liquid Scintillation Spektrometer ausgemessen. Der Protein-Gehalt wurde nach einer modifizierten Biuret-Methode<sup>5</sup> bestimmt.

Die Enzyme, Coenzyme und das 6-Phosphogluconat wurden von Boehringer, Mannheim DBR; D-Glucuronsäure, D-Glucuronsäure- $\gamma$ -lacton, L-Gulonsäure- $\gamma$ -lacton und Jodacetat von Fluka AG, Buchs, Schweiz; die radioaktiv markierten Verbindungen vom Radiochemical Center, Amersham, England; UDP-glucose und UDP-glucuronsäure von Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA, bezogen.

Herrn N. Haselberger danke ich für seine Mitarbeit.

---

<sup>5</sup> G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfeleiderer, Z. Naturf. **8 b**, 555 (1953).