

## Wirkungen von Hydroxypentalen auf den Stoffwechsel von Krebs- und Normalzellen

Von

I. J. Bickis, E. Schauenstein und M. Tauffer

Aus der McGill University Surgical Clinic, Montreal General Hospital,  
Montreal, Canada\*,

und dem Institut für Biochemie der Karl-Franzens-Universität,  
Graz, Österreich

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 23. Dezember 1968)

4-Hydroxy-2,3-*trans*-pentalen (*HPE*) hemmt stark den oxydativen Tricarbonsäurecyclus, die Glykolyse und den Einbau radioaktiver Precursor in *DNS*, *RNS*, Proteine und Lipide von Ascites-Tumorzellen, aber nicht die Decarboxylierung von Glucose über den Pentosephosphatcyclus. Die genannten Hemmungen unterbleiben bei Gegenwart von *GSH* im Inkubationsmedium, auch kann die Hemmung von Glykolyse und Sauerstoffaufnahme in aldehydbehandelten Zellen durch Zugabe von *CySH* aufgehoben werden. Ähnlich wird der Stoffwechsel in Zellen aus normalem Gewebe (Milz, Thymus, Dünndarm) gehemmt, es ist aber hier die erforderliche Dosis an *HPE* 4mal so hoch. Noch höhere Konzentrationen an *HPE* (1 mMol/l) führen zur Zellzerstörung (Stalagmose).

Die Doppelbindung des *HPE* reagiert lebhaft mit den SH-Gruppen von *GSH* und *CySH* unter Ausbildung einer kovalenten Bindung. In ähnlicher Weise hemmt *HPE* auch die Aktivität kristallisierter Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase; diese Hemmung kann durch hohe Konzentrationen von *CySH* aufgehoben werden. Fünf andere kristallisierte SH-Enzyme werden dagegen nicht nennenswert beeinflusst. Es hat aber den Anschein, daß *HPE* den Zellstoffwechsel hauptsächlich durch seine Einwirkung auf die entsprechenden SH-Enzyme und/oder SH-Cofaktoren (*CoA*, Liponsäure, *GSH*) hemmt. Die

---

\* Gegenwärtige Adresse: Dalhousie Clinical Research Centre, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada.

verhältnismäßige Widerstandsfähigkeit des Stoffwechsels normaler Zellen mag auf einen höheren Gehalt an niedermolekularen SH-Verbindungen zurückzuführen sein, die einen besseren Schutz der funktionellen SH-Gruppen der Enzyme gewährleisten.

*Effect of Hydroxypentalen on the Metabolism of Normal and Malignant Cells*

Hydroxypentalen (4-hydroxy-2,3-*trans*-pentalen) strongly inhibits tricarboxylic acid cycle oxidations, glycolysis and the incorporation of radioactive precursors into *DNA*, *RNA*, protein and lipids of ascites tumor cells. It does not inhibit, however, the decarboxylation of glucose by the pentose phosphate cycle. All the observed inhibitions can be prevented by addition of *GSH* to the incubation medium. The inhibition of glycolysis and oxygen uptake can also be reversed by addition of *CySH* to aldehyde treated cells. The metabolism of cells in normal tissues (spleen, thymus, jejunum) is inhibited in similar manner, but about four times higher concentration of hydroxypentalen is necessary to obtain the same degree of inhibition as in tumor cells. High concentrations of hydroxypentalen (1 mM and more) cause cell disintegration (stalagmosis).

The double bond of hydroxypentalen reacts avidly with SH groups of *GSH* and *CySH*, forming a covalent bond. By a similar reaction hydroxypentalen inhibits also the activity of crystalline glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The latter inhibition can be reversed by high concentrations of *CySH*. Five other crystalline SH-enzymes, however, were not significantly affected. Nevertheless, the indications are that hydroxypentalen inhibits cell metabolism mainly by its reactions with respective SH enzymes and/or SH cofactors (CoA, lipoic acid, *GSH*). The relative resistance of normal cell metabolism probably may be the result of higher contents of low molecular SH-compounds, providing a better protection of functional SH-groups of enzymes.

## Einleitung

4-Hydroxy-2,3-*trans*-enale stellen eine bisher nicht beschriebene Gruppe von Aldehyden dar, die verschiedene Stoffwechselprozesse in Tumorzellen wirksam hemmen. Der erste Vertreter dieser Gruppe, das Hydroxyoctenal (*HOE*) mit einer C<sub>8</sub>-Kette, wurde aus den wasserlöslichen Autoxydationsprodukten von 9,12-Methylinoleat isoliert<sup>1, 2</sup>. Nach Inkubation mit Ascites-Tumorzellen tritt eine starke Hemmung von Atmung und Glykolyse und bei höheren Konzentrationen Desintegration der Zellen auf (Stalagmose). Jedoch konnten, auch bei viel höheren Konzentrationen, solche Effekte bei normalen Nieren- und Leberzellen nicht beobachtet

<sup>1</sup> E. Schauenstein und H. Esterbauer, Mh. Chem. **94**, 164 (1963).

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

werden<sup>3, 4, 5</sup>. In der Folge wurden neue Homologe mit 4 bis 13 C-Atomen synthetisiert<sup>6</sup>, die alle, mit gewissen quantitativen Unterschieden, die gleichen *in-vitro*-Effekte auf den Stoffwechsel der Tumorzellen zeigten. Den stärksten cancerociden Effekt zeigt das C<sub>5</sub>-Homologe, Hydroxypentalal (*HPE*)<sup>7, 8</sup>, über dessen Wirkungen auf den Stoffwechsel von Tumor- und Normalzellen hier berichtet werden soll.

## Methoden

### *Stoffwechselfmessungen*

Der Einfluß von *HPE* auf den Zell-Stoffwechsel wurde durch kombinierte Messung der Atmung und Glykolyse sowie Bestimmung des Einbaues von <sup>14</sup>C in verschiedene Zellbestandteile untersucht<sup>9-12</sup>. Verwendet wurden Warburggefäße mit Einsatz; Hauptraum: Gewebsschnitte oder Zellsuspensionen in Krebs-Ringer-Phosphat- bzw. -Bicarbonat-Puffer. Birne: Markierte Substrate und *HPE*, nach Angleichen und Gasen zugekippt (Meßbeginn). Gesamtvolumen 3 ml, *T* = 37° C. Homogenisieren des Kolbeninhalts mit Glas-Teflon-Homogenisator, Fällung mit Trichloressigsäure (Endkonzentration = 10%), zweimaliges Waschen des Niederschlages mit 5proz. Trichloressigsäure; Lipidextraktion durch 2mal. Waschen (Raumtemp. und 60° C) mit 95proz. Äthanol. *RNS*-Extraktion mit 0,2*M*-KOH (Raumtemp., über Nacht), *DNS*-Extraktion mit 5proz. Trichloressigsäure (90° C, 15 Min.). Zurückbleibender Niederschlag (Protein) wird 1mal mit 5proz. Trichloressigsäure, 1mal mit Aceton gewaschen und in 2*M*-NH<sub>4</sub>OH gelöst. Bei Versuchen mit <sup>14</sup>C-Glucose 0,5 ml 20proz. Trichloressigsäure in das Inkubationsgefäß zugeben, 15 Min. schütteln. KOH-Filterpapier samt 3 bis 4 Spülungen aus dem Einsatz in Zentrifugenröhrchen übertragen, auf 5 ml mit Aqua destill. auffüllen und verschlossen über Nacht stehenlassen. Nach Entfernung des Papiers K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mit gesätt. BaCl<sub>2</sub>-Lösung fällen, Niederschlag 2mal mit Aqua destill. und 1mal mit Aceton waschen und in

<sup>3</sup> E. Schauenstein, H. Esterbauer, G. Jaag und M. Taufer, Mh. Chem. **95**, 180 (1964).

<sup>4</sup> E. Schauenstein, J. Zangger und M. Ratzenhofer, Z. Naturforsch. **19 B**, 923 (1964).

<sup>5</sup> E. Schauenstein, J. Lipid Res. **8**, 417 (1967).

<sup>6</sup> H. Esterbauer und W. Weger, Mh. Chem. **98**, 1884, 1994 (1967).

<sup>7</sup> E. Schauenstein und B. Wünschmann, Abstracta, 5. Internat. Kongr. f. Chemotherapie, Wien 1967, Part 1, Verlag Wien. Med. Akademie, 1967, S. 527.

<sup>8</sup> E. Schauenstein, B. Wünschmann und H. Esterbauer, Z. Krebsforsch. **71**, 21 (1968).

<sup>9</sup> I. J. Bickis und E. Schauenstein, Abstracta, 5. Internat. Kongr. f. Chemotherapie, Wien 1967, Part 2, Verlag Wien. Med. Akademie, 1967, S. 965.

<sup>10</sup> I. J. Bickis und J. H. Quastel, Nature [London] **205**, 44 (1965).

<sup>11</sup> I. J. Bickis und I. W. D. Henderson, Cancer **19**, 89 (1966).

<sup>12</sup> I. J. Bickis, I. W. D. Henderson und J. H. Quastel, Cancer **19**, 103 (1966).

1 ml Aceton suspendieren. Abtrennung von Lipiden, *RNS*, *DNS* und Proteinen, wie beschrieben.

Alle radioaktiven Gewebsfraktionen wurden auf Aluminiumplättchen gegeben: Eiweiß und  $\text{BaCO}_3$  quantitativ, jedoch Lipide, *RNS* und *DNS* in Aliquots von 0,5 ml und nach vollkommener Trocknung unter Berücksichtigung des Untergrundes mit einem Geiger-Müller-Zählrohr automatisch gezählt. In Anbetracht der geringfügigen Materialmengen auf jedem Plättchen erwiesen sich Korrekturen für die Eigenabsorption als nicht notwendig.

#### *Aktivitätsmessungen an isolierten Enzymen*

Die Messungen erfolgten nach den Angaben der Literatur<sup>13</sup> bzw. Informationen der Fa. Boehringer & Söhne. In einigen Versuchen wurden die inaktivierten Enzympräparationen bei 4° C 8 Stdn. gegen destill. Wasser dialysiert. Der ausdialysierte freie Aldehyd wurde spektrometrisch<sup>1, 2</sup>, der an das Enzymprotein gebundene Aldehyd mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin (2,4-DNPH) bestimmt<sup>14</sup>.

#### *Cytologische Beobachtungen*

Die verwendeten Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (*EATZ*) stammten grundsätzlich vom 6. bis 8. Tag post transplant. und wurden unter den bei Tab. 8 beschriebenen Bedingungen auf das Erscheinen der Stalagmose<sup>4</sup> bzw. nach Zusatz von 3 Tropfen 0,5proz. Trypanblau auf Anfärbbarkeit untersucht<sup>15</sup>. In gleicher Weise wurden Zellen gesunder Leber und Niere sowie menschliche Leukozyten untersucht.

## Biologisches Material

#### *Normalzellen und -gewebe*

Schnitte von Rattenthymus und -milz, Stücke von Rattenjejunum, Affennieren und -leberzellen, menschliche Leukozyten.

#### *Tumorzellen und -gewebe*

Ehrlich-Ascites-Carcinom- und Sarkom-37-Zellen der Maus, Schnitte von menschlichen Tumoren. Beide Ascitestumoren wurden in Swiss-Albinomäusen durch intraperitoneale Inokulationen gezüchtet. Mäuse wurden am 6. bis 8. Tag post transplant. getötet, die Ascitesflüssigkeit entnommen und in graduierten Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Zellen wurden durch wiederholte Suspension in isotoner NaCl-Lösung und Zentrifugieren gereinigt. Die Zelldichte wurde auf 100 mg Naßgewicht pro ml der endgültigen Suspension eingestellt<sup>10</sup>. Menschliche Tumoren wurden unmittelbar nach der Operation<sup>11, 12</sup> verwendet. Normale Milz, Thymus und Jejunum wurden von Sprague-Dawley-Ratten (150 bis 200 g) erhalten. Von Solidtumoren, Milz und Thymus wurden dünne Schnitte mit einem Stadie-Riggs-Handmikrotom hergestellt. Stücke von Jejunum wurden aufgeschnitten und

<sup>13</sup> H. U. Bergmeyer, Meth. der enzymat. Analyse, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1963.

<sup>14</sup> F. Dorner, Dissertation, Universität Graz, 1967.

<sup>15</sup> P. G. Seeger und W. Schacht, Protoplasma [Wien] **51**, 1 (1959).

nach Waschen in NaCl-Lösung mit einem feinen Skalpell zu quadratischen Stückchen entsprechender Größe zugeschnitten. Nach Abtupfen auf Filterpapier wurden die Gewichte der frischen Gewebspräparate mit einer Torsionswaage bestimmt. Während dieser Prozeduren wurden die Schnitte und Gewebe in Petrischalen auf Eis gehalten. Eingesetzt wurden in den Inkubationsgefäßen 50 mg Ascitestumorzellen und 70 bis 80 mg Schnitte (Naßgewichte).

Leukocyten wurden aus der menschlichen Vene nach der Vorschrift von *Löhr* und *Waller*<sup>16</sup> erhalten, indem das venöse Blut unmittelbar aus der Kanüle in eine *EDTA*-Lösung fließen gelassen wurde. Nach Abtrennung der Erythrocyten wurde der Überstand, der die Leukocyten enthält, mit Pufferlösung gewaschen und die Zellsuspension für cytologische Versuche eingesetzt. Affenleber- und -nierenzellen wurden von der Firma Immuno (Wien) erhalten. Sie wurden folgendermaßen präpariert: die Leber oder die Nieren wurden unmittelbar nach Tötung des Tieres entfernt, mit NaCl-Lösung perfundiert, in kleine Stückchen zerschnitten und bei 37° C mit gepufferter Trypsin-Lösung inkubiert. Nach Verdauung der Bindegewebsanteile wurde eine reine Zellsuspension durch wiederholtes Waschen und Zentrifugieren erhalten.

### Reagentien

4-Hydroxy-2-*trans*-pental, synthetisiert nach der Methode von *Esterbauer* und *Weger*<sup>6</sup>. Reinheitskontrolle: Dünnschichtchromatographie und UV-Spektrometrie<sup>3-6</sup>. *HPE* ist eine farblose Flüssigkeit mit  $n_D^{20} = 1,47257$ ,  $Sdp_{0,4} = 50-52^\circ C$ . In wäßr. Lösung zeigt sich ein intensives Absorptionsmaximum bei 44 800  $\gamma'$  ( $\epsilon_{max} = 13\ 800$ ) und ein charakteristisches Halbwellenpotential von  $-1,54 V^6$ .

Die radioaktiven Substanzen stammten von New England Nuclear Corp., Boston. Entsprechende nichtradioaktive Verbindungen wurden als Träger zugesetzt, um die für jede radioaktiv markierte Verbindung geforderte Konzentration zu erhalten. Kristallisierte Enzyme, Coenzym und Substrate stammten von der Fa. Boehringer & Söhne (Mannheim).

### Ergebnisse

Die ersten orientierenden Versuche bestätigten, daß *HPE*, wie die ursprünglich aus autoxydierten Fetten erhaltene Stammverbindung *HOE*, starke Hemmeffekte auf die Atmung und Glykolyse von Tumorzellen besitzt. Das Hauptinteresse der vorliegenden Untersuchung galt nun der Frage, ob *HPE* einen Effekt auf andere lebenswichtige Funktionen der Tumorzellen äußert, insbesondere die Biosynthese von Proteinen, *RNS* und *DNS*. Dies geschah durch Untersuchung der Effekte von *HPE* auf den Einbau radioaktiv markierter Substanzen, wie L-(1-<sup>14</sup>C)-Leucin, (8-<sup>14</sup>C)-Adenin, (1-<sup>14</sup>C)-Glucose und (6-<sup>14</sup>C)-Glucose in die entsprechenden Zellbestandteile. Gleichwohl wurde in den meisten Experimenten die Wirkung von *HPE* auf die Atmung und/oder die Glykolyse während der Inkubationsperiode gemessen.

<sup>16</sup> G. W. Löhr und H. D. Waller, Dtsch. Med. Wschr. 89, 171 (1964).

*Wirkungen von HPE auf 1-<sup>14</sup>C-Leucin- und 8-<sup>14</sup>C-Adenin-Einbau in Ascites-Tumorzellen*

Da die Radioaktivität von L-1-<sup>14</sup>C-Leucin spezifisch in Proteine und die von 8-<sup>14</sup>C-Adenin in Nucleinsäuren (*RNS* und *DNS*) eingebaut wird (unter Verwendung der unter „Methoden“ beschriebenen Techniken), ist es möglich, diese Prozesse gleichzeitig zu messen, indem man beide markierten Substanzen im selben Inkubationsgefäß zusetzt. Tatsächlich wird ein gewisser Proteinanteil während der Isolierung von *RNS* und, wenn auch zu einem kleinen Teil, von *DNS* hydrolysiert. Diese Verunreinigung kann aber vernachlässigt werden, wenn man die Zufuhr der Radioaktivität für Adenin von Anfang an 3- bis 4mal höher einstellt als für Leucin. In Hinblick auf beträchtliche Variationen in der Stoffwechselaktivität von Tumorzellen aus verschiedenen Tieren, geben gleichzeitige Messungen mehrerer Stoffwechselprozesse in derselben Zellpräparation bessere Information über die relative Empfindlichkeit gegenüber einem vorgegebenen Hemmstoff.

Die Effekte verschiedener *HPE*-Konzentrationen auf Atmung, Glykolyse, Protein-, *RNS*- und *DNS*-Synthese von *EATZ* sind in Tab. 1 dargestellt. In einer Konzentration von 0,1 mMol/l ist *HPE* ohne signifikante Wirkung auf Atmung und Glykolyse. Bei höheren Konzentrationen werden sowohl Atmung wie Glykolyse gehemmt, wobei das Ausmaß der Hemmung von der *HPE*-Konzentration einerseits und von der Inkubationsdauer andererseits abhängt (vgl. die Werte für die letzten 20 Inkubationsminuten). Bei 0,5 mM *HPE*\* und 1stdg. Inkubation ist die Atmung praktisch zum Stillstand gekommen und das Ausmaß der anaeroben Glykolyse hat um ungefähr 50% abgenommen. Die aerobe Glykolyse, die hier nicht dargestellt ist, aber in ähnlichen Experimenten gemessen wurde, ist im allgemeinen weniger empfindlich gegenüber *HPE* als die anaerobe Glykolyse. Der Einbau von radioaktiven Vorstufen in Proteine, *DNS* und *RNS* erwies sich als viel empfindlicher gegenüber *HPE*: bereits bei einer Konzentration von 0,1 mM *HPE*, wenn Atmung und Glykolyse noch nicht meßbar betroffen sind, ist der Einbau von Adenin in die Proteine um etwa 60% gehemmt und der Einbau von Leucin in die Proteine um ungefähr 30%. Beide Hemmungen steigen weiter an auf 90% bzw. 70% mit 0,2 mM *HPE*. Die Synthese der *RNS* erscheint am wenigsten sensibel gegenüber der Wirkung von *HPE*, obwohl mit 0,5 mM *HPE* 70—75% Hemmung erreicht werden. Wie ferner zu ersehen ist, ist die Hemmung aller drei Biosynthesewege nur wenig stärker bei anaerober Einwirkung der Substanz als bei aerober. Im wesentlichen die gleichen Ergebnisse werden auch bei Sarkom-37-Asciteszellen erhalten.

\* Alle Konzentrationsangaben in mM bedeuten mMol/l (Gesamtvolum).

Tabelle 1. Wirkungen verschiedener *HPE*-Konzentrationen auf den Stoffwechsel von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

Einstündige Inkubation aerob in Krebs-Ringer-Phosphat bzw. Bicarbonat (anaerob), Glucosezusatz 10 mM. Markierte Substrate: 2 mM L-(1-<sup>14</sup>C)-Leucin und 0,1 mM (8-<sup>14</sup>C)-Adenin. Nach dem Gasen und thermischen Angleichen werden Tracer und *HPE* aus dem Seitenarm in den Hauptraum gekippt: Meßbeginn. Hauptraum enthält 50 mg Zellen (Naßgewicht). Stoffwechselaktivität angegeben pro 50 mg Zellen und Stunde

| Konz. an <i>HPE</i> | Aerobe Inkubation (Luft)    |                                |                                       |  | Anaerobe Inkubation (95% N <sub>2</sub> + 5% CO <sub>2</sub> ) |                                |                                       |                                   |
|---------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|--|--|--------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
|                     | Atmung<br>μl O <sub>2</sub> | Leucin<br>im Protein<br>mμMole | Adenin<br>in der <i>RNS</i><br>mμMole | Adenin<br>in der <i>DNS</i><br>mμ Mole | Glykolyse<br>μl CO <sub>2</sub>                                | Leucin<br>im Protein<br>mμMole | Adenin<br>in der <i>RNS</i><br>mμMole | Adenin<br>in <i>DNS</i><br>mμMole |
| Blindwert           | 36 (12)*                    | 33,3                           | 9,4                                   | 1,73                                   | 278 (79)*  | 40,1                           | 13,2                                  | 2,15                              |
| 0,1 mM              | 35 (12)                     | 23,4                           | 8,6                                   | 0,69                                   | 291 (86)   | 22,5                           | 10,3                                  | 0,57                              |
| 0,2 mM              | 28 (9)                      | 11,1                           | 5,6                                   | 0,14                                   | 231 (62)   | 12,7                           | 7,0                                   | 0,15                              |
| 0,3 mM              | 24 (8)                      | 9,4                            | 4,7                                   | 0,08                                   | 208 (52)   | 9,6                            | 5,0                                   | 0,07                              |
| 0,4 mM              | 20 (5)                      | 7,1                            | 3,7                                   | 0,06                                   | 191 (47)   | 8,1                            | 4,1                                   | 0,05                              |
| 0,5 mM              | 17 (3)                      | 6,7                            | 2,8                                   | 0,05                                   | 180 (41)   | 6,4                            | 3,3                                   | 0,04                              |

\* Die Zahlen in Klammern entsprechen den Atmungs- und Glykolysewerten innerhalb der letzten 20 Minuten.

Die Zeitabhängigkeit der durch *HPE* bewirkten Hemmeffekte zeigt Tab. 2. In diesem Experiment wurden die Wirkungen von 0,2 mM *HPE* auf die anaerobe Glykolyse und die 3 Biosynthesen in 30-Min.-Intervallen über insgesamt 2 Stdn. gemessen. Die progressive Hemmung der anaeroben Glykolyse kann am besten aus den Werten für die letzten 15 Min. jeder Inkubationsperiode ermittelt werden (Klammer-Werte). Sie belief sich auf etwa 25% nach einer Stunde und etwa 50% nach 2 Stdn. Inkubation. Die *DNS*-Synthese ist wahrscheinlich innerhalb der ersten 10 Min. zum Stillstand gekommen, wenn die Glykolyse noch praktisch unbeeinflusst ist. Die Hemmung der Synthese von *RNS* und Proteinen jedoch war selbst nach 2stdg. Inkubation noch nicht vollständig. Praktisch identische Ergebnisse wurden erhalten, wenn das Experiment aerob in einem Glucose-enthaltenden Phosphatmedium wiederholt wurde. In einem Experiment, in dem  $8\text{-}^{14}\text{C}$ -Adenin allein als Tracer zugesetzt worden war, bewirkte 0,2 mM *HPE* nach 1stdg. Inkubation eine den vorhergehenden Befunden entsprechende Hemmung des Einbaus in die *RNS* und *DNS*, war jedoch ohne Effekt auf die Radioaktivität der Nukleotide in der säurelöslichen Fraktion. Diese Resultate scheinen zu bestätigen, daß die beobachteten Hemmeffekte von *HPE* auf die Synthesen von *DNS*, *RNS* und Proteinen primär durch eine spezifische Wechselwirkung mit den betreffenden polymerisierenden Enzymen vermittelt werden. Die Wirkung von *HPE* auf die energieliefernden Prozesse (Atmung und Gärung) wird wahrscheinlich nur sekundär für die Synthesen bedeutungsvoll, und zwar bei hohen *HPE*-Konzentrationen und verlängerter Inkubationsdauer.

Bekanntlich wird die durch Alkylantien, wie Triäthylenimine, Trenimon, Carcinophilin, hervorgerufene Glykolysehemmung von einer Abnahme des intrazellulären *NAD*-Niveaus begleitet und beide Effekte können durch Zugabe von Nikotinamid<sup>17-20</sup> aufgehoben werden. Gleichwohl konnten 10 mM Nicotinamid die Hemmungen, die durch 0,2 mM *HPE* auf anaerobe Glykolyse und Einbau von radioaktiven Substanzen bewirkt werden, nicht verhindern, auch wenn das Nicotinamid den Zellen vor dem *HPE* zugesetzt worden war. Dies bestätigt ähnliche Beobachtungen, die in früheren Untersuchungen<sup>3</sup> mit *HOE* erhalten worden waren. Offensichtlich wird die Hemmung der Glykolyse durch Hydroxyenale durch einen anderen Mechanismus bewirkt als dies bei den Alkylantien der Fall ist. Auch die Zugabe von 10 mM Pyruvat, Glutamat, Succinat oder Fumarat, einzeln oder in Kombination aller 4 Metaboliten

<sup>17</sup> J. M. Roitt, Biochem. J. **63**, 300 (1965).

<sup>18</sup> F. Hölzel und H. Maas, German Med. Monthly **8**, 51 (1963).

<sup>19</sup> C. G. Schmidt, Acta Unio Intern. Contra Cancerum [Löwen] **20**, 968 (1964).

<sup>20</sup> I. J. Bickis, bisher unveröffentlichte Versuche.



Tabelle 2. Zeitabhängigkeit der Hemmwirkungen von *HPE* in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen  
 Anaerobe Inkubation in Krebs-Ringer-Bicarbonat. Konzentration der Glucose 10 mM, der markierten Substrate: 2 mM, L-(1-<sup>14</sup>C)-Leucin und 0,1 mM (8-<sup>14</sup>C)-Adenin. Tracer und 0,2 mM *HPE* werden vom Seitenarm in den Hauptraum gekippt: Meßbeginn. Stoffwechsellaktivität angegeben pro 50 mg Zellen.

| Inkubationsdauer | Anaerobe Glykolyse<br>µl CO <sub>2</sub> |                  | Leucin im Protein,<br>mµMole |                  | Adenin in der <i>RNS</i><br>mµMole |                  | Adenin in der <i>DNS</i><br>mµMole |                   |
|------------------|--|------------------|------------------------------|------------------|------------------------------------|------------------|------------------------------------|-------------------|
|                  | Blindwert                                | 0,2mM <i>HPE</i> | Blindwert                    | 0,2mM <i>HPE</i> | Blindwert                          | 0,2mM <i>HPE</i> | Blindwert                          | 0,2 mM <i>HPE</i> |
| 30 min           | 200 (97)*                                | 193 (87)*        | 19,1                         | 7,1              | 5,9                                | 3,4              | 0,79                               | 0,16              |
| 60 min           | 381 (87)                                 | 331 (65)         | 33,8                         | 10,0             | 9,1                                | 4,8              | 1,54                               | 0,17              |
| 90 min           | 541 (76)                                 | 408 (47)         | 48,6                         | 11,6             | 11,9                               | 5,4              | 2,33                               | 0,18              |
| 120 min          | 672 (73)                                 | 500 (38)         | 60,0                         | 13,5             | 14,3                               | 6,4              | 3,11                               | 0,18              |

\* Eingeklammerte Werte: Glykolyseraten für die letzten 15 Minuten jeder Inkubationsperiode.

Tabelle 3. Aufhebung der durch *HPE* in Sarkom-37-Asciteszellen gesetzten Hemmungen durch *GSH*  
 Experimentelle Bedingungen wie Tab. 1. *GSH* zu den Zellen im Haupttraume zugesetzt, Stoffwechsellaktivitäten der Kontrollzellen ohne Zusätze = 100; Zahlen in Klammern geben die tatsächlichen Werte wieder: Atmung und Glykolyse in µl, Einbau von (8-<sup>14</sup>C)-Adenin in *DNS* und *RNS* sowie von (1-<sup>14</sup>C)-Leucin in die Proteine in mµMolen pro 50 mg Zellen pro Stunde. Die Wirkungen von *HPE* und *GSH* dargestellt als % der Aktivität der Kontrollzellen.

| Konzentration der Zusatzstoffe | Anaerobe Inkubation (Luft) |            |         | Anaerobe Inkubation (95% N <sub>2</sub> + 5% CO <sub>2</sub> ) |            |         |
|--------------------------------|----------------------------|------------|---------|--|------------|---------|
|                                | Atmung                     | <i>DNS</i> | Protein | Glykolyse  | <i>DNS</i> | Protein |
| Blindwert                      | 100                        | 100        | 100     | 100  | 100        | 100     |
| 0,2 mM <i>HPE</i>              | (34)                       | (1,2)      | (30,7)  | (278)  | (2,1)      | (34,3)  |
| 0,4 mM <i>HPE</i>              | 85                         | 15         | 35      | 92   | 11         | 29      |
| 1 mM <i>GSH</i>                | 53                         | 4          | 20      | 70   | 3          | 14      |
| 0,2 mM <i>HPE</i> }            | 85                         | 87         | 106     | 106  | 79         | 87      |
| 0,4 mM <i>HPE</i> }            | 82                         | 87         | 96      | 98   | 70         | 81      |
|                                | 94                         | 74         | 96      | 103  | 66         | 81      |

\* In Anwesenheit von *GSH* 1 mM

bei einer Konzentration von 3 mM konnte die Hemmwirkungen von 0,4 mM *HPE* auf die Atmung und die *DNS*-, *RNS*- und Proteinsynthese der Tumorzellen nicht verhindern. Offenbar ist die Hemmung der Tumorzellatmung durch *HPE* nicht bewirkt durch eine beschränkte Verfügbarkeit von Substraten des Tricarbonsäurecyclus. Wie in Tab. 3 gezeigt wird, kann die Zugabe von 1 mM Glutathion (*GSH*) zu Sarkom-37-Zellsuspensionen die durch 0,2 und 0,4 mM bewirkten Hemmungen nahezu vollständig verhindern. Am wenigsten geschützt erscheint zunächst die Synthese der *DNS*, doch wird der Unterschied wesentlich geringer, wenn man die Wirkung von *GSH* allein in Betracht zieht. Ein besserer Schutz wird beobachtet, wenn *GSH* gemeinsam mit *HPE* im Seitenarm vorinkubiert wird. Im Hinblick auf die hier eingehaltenen experimentellen Bedingungen beweist dies allerdings noch nicht streng, daß die durch *HPE* bewirkte Stoffwechselblockade durch Zugabe von SH-Verbindungen tatsächlich rückgängig gemacht werden kann. Wie später dargestellt werden wird, reagiert nämlich *HPE* schnell mit *GSH* oder *CySH*. Wenn diese Verbindungen dem Inkubationsmedium, das gleichzeitig *HPE* enthält, zugesetzt werden, läßt die prompte Reaktion zwischen *CySH* und *GSH* mit *HPE* eine rasche Inaktivierung des *HPE* direkt erwarten. Daher ist es auch verständlich, daß nach Vorinkubation von *HPE* mit *GSH* im Seitenarm des Warburggefäßes ein besserer Schutz beobachtet wird. Ob Stoffwechselhemmungen, die durch *HPE* bewirkt werden, gegenüber *GSH*- oder *CySH*-Zugabe reversibel sind, kann mit Sicherheit nur überprüft werden, wenn die Zellen nach der Wechselwirkung mit dem Aldehyd vom überschüssigen Aldehyd durch mehrfaches Waschen befreit werden und wenn dann Stoffwechselblockaden nach Zugabe einer SH-Verbindung abnehmen oder ganz verschwinden. Dies konnte bei *EATZ* sowohl für die anaerobe Glykolyse wie auch für den Sauerstoffverbrauch in eindeutiger Weise nachgewiesen werden. Wie an anderer Stelle berichtet<sup>21</sup>, kann durch 70 mM *CySH* die 100proz. Hemmung der anaeroben Glykolyse, die durch 2 mM *HPE* hervorgerufen wird, auf 15% gesenkt werden, wenn der überschüssige Aldehyd durch dreimaliges Waschen der Zellen mit isotoner NaCl-Lösung entfernt wurde. Unter den gleichen experimentellen Bedingungen verschwindet die 93proz. Hemmung des Sauerstoffverbrauches vollständig<sup>22</sup>. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluß, daß die Stoffwechselhemmungen, die der Atmungshemmung bzw. Gärungshemmung zugrunde liegen, durch eine direkte Wechselwirkung zwischen *HPE* und funktionellen SH-Gruppen der Zelle hervorgerufen werden und daß diese Reaktion gegenüber der Zugabe von SH-Verbindungen reversibel ist.

<sup>21</sup> H. Verdino, Dissertation, Universität Graz, 1968.

<sup>22</sup> M. Taufer und E. Schauenstein, Mh. Chem. (in Vorbereitung).

*Effekte von HPE auf den 1-<sup>14</sup>C-Glucose- und 6-<sup>14</sup>C-Glucose-Stoffwechsel in Ascites-Tumorzellen*

Das Hauptziel dieser Experimente war die Untersuchung der jeweiligen Wirkungen von *HPE* auf die Oxydation der Glucose, einerseits über den Pentosephosphat-, andererseits über den Tricarbonsäurecyclus, durch Messung der Radioaktivität des Atmungs-CO<sub>2</sub> aus 1-<sup>14</sup>C-Glucose und 6-<sup>14</sup>C-Glucose. Die Fragmente beider Glucosen werden auch in Fette, Proteine und Nucleinsäuren eingebaut. Da sich die Zwischenreaktionen, die zu diesen Synthesen führen, von denen des Einbaus von Leucin und Adenin unterscheiden, war es von Interesse, die *HPE*-Wirkungen auch auf den Einbau von Glucose-1-<sup>14</sup>C und Glucose-6-<sup>14</sup>C in Proteine, *RNS* und *DNS* zu bestimmen. Es muß erwähnt werden, daß mit <sup>14</sup>C-Glucose als Tracer die Radioaktivität in der Proteinfraction beträchtlich höher ist als in den *RNS* und *DNS* und daß deshalb eine stärkere Verunreinigung der Nucleinsäuren durch Spuren von hydrolysierten Proteinen zu erwarten ist im Vergleich zu Experimenten, in denen eine Mischung von 1-<sup>14</sup>C-Leucin und 8-<sup>14</sup>C-Adenin verwendet wurde. Wie die Ergebnisse zeigen, konnten die spezifischen Unterschiede in der Verteilung von eingebautem C-1 und eingebautem C-6 der Glucose trotz dieser Verunreinigung beobachtet werden. Typische Resultate eines solchen Experimentes sind in Tab. 4 dargestellt. Wie daraus ersehen werden kann, stimuliert 0,2 und 0,4 mM *HPE* geringfügig, wenn überhaupt, den Einbau von C-1 in das respiratorische CO<sub>2</sub>, obwohl die Gesamtatmung um 22% und 35% gehemmt worden war. Andererseits wurde der Einbau von C-6 um 45% und 60% gehemmt. Dementsprechend hat sich der Quotient C-1/C-6 des CO<sub>2</sub>, der für die Kontrollen 3,1 betrug, auf 6,4 mit 0,2 mM *HPE* erhöht und auf 8,1 mit 0,4 mM *HPE*. In einem anderen Experiment, in dem die Asciteszellen mit 0,2 und 0,4 mM *HPE* 20 Min. vorinkubiert worden waren, bevor die <sup>14</sup>C-Glucosen zugekippt wurden, war die Gesamtatmung nach einer Stunde um 34% und 48% gehemmt, doch war das C-1/C-6-Verhältnis des CO<sub>2</sub> von 2,7 der Kontrollen auf 10,8 (mit 0,2 mM *HPE*) und 12,2 (mit 0,4 mM *HPE*) angestiegen. Solche Ergebnisse zeigen an, daß *HPE* die Dehydrogenasen des Pentosephosphatcyclus nicht beeinflußt und daß die Hemmung der Atmung nur auf Wirkungen von *HPE* auf die Oxydationen des Tricarbonsäurecyclus oder des wasserstoffübertragenden Systems zurückzuführen ist.

Die Werte für die Kontrollzellen zeigen an, daß hier C-1 in Nucleinsäuren, C-6 in Proteine und Lipide geringfügig bevorzugt eingebaut werden. Aus insgesamt 5 Experimenten ergab sich ein C-1/C-6-Quotient von rund 0,9 (0,82 bis 0,93) für Proteine und Lipide, aber durchwegs von 1,0 oder mehr für *DNS* (1,0 bis 1,33) und *RNS* (1,02 bis 1,26). In allen Fällen blieb der Effekt von *HPE* derselbe, nämlich: keine signifikanten

Tabelle 4. Wirkungen von *HPE* auf den Glucose-Stoffwechsel in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen  
 1 Stde. Inkubation in Krebs-Ringer-Phosphat. Konzentrationen der markierten Substrate: 5 mM (1-<sup>14</sup>C)-Glucose und 5 mM  
 (6-<sup>14</sup>C)-Glucose. Stoffwechsellaktivitäten pro 50 mg Zellen Naßgewicht pro Stunde. *GSH* im Seitenarm und mit *HPE* und  
 Tracer in den Hauptraum zugekippt: Meßbeginn.

| Zugaben                      | Atmung<br>μl O <sub>2</sub> | Einbau von <sup>14</sup> C     |                    |                                |                        |                       |         |
|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|------------------------|-----------------------|---------|
|                              |                             | CO <sub>2</sub><br>μμ<br>Atome | DNS<br>μμ<br>Atome | E <sub>NS</sub><br>μμ<br>Atome | Protein<br>μμ<br>Atome | Lipide<br>μμ<br>Atome |         |
|                              |                             | C-1/C-6                        | C-1/C-6            | C-1/C-6                        | C-1/C-6                | C-1/C-6               | C-1/C-6 |
| Blindwert                    |                             |                                |                    |                                |                        |                       |         |
| (1- <sup>14</sup> C)-Glucose | 33                          | 97,1                           | 3,2                | 11,3                           | 1,06                   | 27,8                  | 17,2    |
| (6- <sup>14</sup> C)-Glucose | 32                          | 31,6                           | 3,0                | 10,7                           |                        | 31,8                  | 18,6    |
| 0,2 mM <i>HPE</i>            |                             |                                |                    |                                |                        |                       |         |
| (1- <sup>14</sup> C)-Glucose | 26                          | 111,7                          | 2,2                | 7,5                            | 1,21                   | 15,7                  | 12,3    |
| (6- <sup>14</sup> C)-Glucose | 25                          | 17,4                           | 1,9                | 6,2                            |                        | 17,0                  | 13,6    |
| 0,4 mM <i>HPE</i>            |                             |                                |                    |                                |                        |                       |         |
| (1- <sup>14</sup> C)-Glucose | 20                          | 101,5                          | 1,5                | 5,1                            | 1,34                   | 6,1                   | 7,5     |
| (6- <sup>14</sup> C)-Glucose | 21                          | 12,8                           | 1,1                | 3,8                            |                        | 6,9                   | 8,4     |
| 0,4 mM <i>HPE</i>            |                             |                                |                    |                                |                        |                       |         |
| 1,0 mM <i>GSH</i>            | 34                          | 111,7                          | 3,4                | 10,8                           | 1,32                   | 27,0                  | 17,0    |
| (1- <sup>14</sup> C)-Glucose | 35                          | 26,7                           | 2,6                | 8,2                            |                        | 29,3                  | 19,2    |
| (6- <sup>14</sup> C)-Glucose |                             |                                |                    |                                |                        |                       |         |
| 1,0 mM <i>GSH</i>            | 32                          | 97,1                           | 3,5                | 12,3                           | 1,17                   | 28,6                  | 18,4    |
| (1- <sup>14</sup> C)-Glucose | 34                          | 28,5                           | 2,8                | 10,5                           |                        | 30,6                  | 19,0    |
| (6- <sup>14</sup> C)-Glucose |                             |                                |                    |                                |                        |                       |         |

Veränderungen im C-1/C-6-Quotienten für den Einbau in Proteine und Lipide, aber ein beständiger Anstieg von C-1 über C-6 für den Einbau in *DNS* und *RNS*. Jedwede Verunreinigung aus der Proteinfraction könnte dieses Verhältnis für die Nucleinsäuren zugunsten von C-6 verschoben haben. Eine solche Verunreinigung würde in den Kontrollzellen stärker sein, in denen die Menge des radioaktiven Proteins beträchtlich höher ist als in den Zellen, die durch *HPE*-Einfluß gehemmt worden sind (Tab. 4). Der tatsächliche C-1/C-6-Quotient für die Kontrollen könnte aus diesem Grund höher sein, als mit unserer Versuchsmethodik gefunden wurde (vgl. z. B. Zit.<sup>23</sup>). Die Hemmung des Einbaus von C-6 und C-1 in die Proteine (50% mit 0,2 mM und 78% mit 0,4 mM *HPE*) entspricht praktisch der, die für den Einbau von 1-<sup>14</sup>C-Leucin beobachtet wird (Tab. 1). Der Einbau beider Glucosekohlenstoffatome in die Lipide scheint weniger empfindlich zu sein, obwohl immerhin 50% bis 60% Hemmung mit 0,4 mM *HPE* beobachtet wird. Die Hemmung des Einbaus von C-1 und C-6 in die Nucleinsäuren ist für Vergleichszwecke weniger geeignet, da *HPE* den Einbau der beiden C-Atome unterschiedlich beeinflusst. Die 65proz. Hemmung des C-6-Einbaus in die *RNS*, bewirkt durch 0,4 mM, entspricht etwa der, die mit 8-<sup>14</sup>C-Adenin beobachtet wird (Tab. 1). Der Einbau der Glucosekohlenstoffatome in die *DNS* ist jedoch viel weniger empfindlich als der Einbau von 8-<sup>14</sup>C-Adenin. Der letztgenannte wurde durch 0,2 mM *HPE* zu 90% gehemmt (Tab. 1), während 0,4 mM *HPE* den Einbau von Glucose-C-1 nur um 53% und von Glucose-C-6 nur um 64% (vgl. Tab. 4) gehemmt hat. Die Ursachen für solche Differenzen erscheinen derzeit noch nicht klar. Jedenfalls können sie nicht durch Verunreinigungen von den Proteinen her hervorgerufen sein, die eine relativ höhere Einbauhemmung ergeben. Wie im vorangegangenen Kapitel mit Adenin gezeigt werden konnte, scheint *HPE* auf die Synthese der Nucleotide ohne Effekt zu sein. Die Möglichkeit einer erhöhten Aktivität im Desoxyribonucleotid-Pool wird später diskutiert werden.

Wie Tab. 4 veranschaulicht, verhindert wiederum 1 mM *GSH* alle durch 0,4 mM *HPE* bewirkten Hemmeffekte auf den C-1- und C-6-Stoffwechsel. Ein offensichtlich verbleibender Rest von Empfindlichkeit des C-1-Stoffwechsels gegenüber *HPE* ist wahrscheinlich auf die Wirkungen des *GSH* selbst zurückzuführen, das anscheinend den C-1-Stoffwechsel der Glucose leicht stimuliert und den C-6-Stoffwechsel proportional gehemmt hat.

Die eingebauten Mengen und die Verteilung von Glucose-1-<sup>14</sup>C und -6-<sup>14</sup>C in CO<sub>2</sub>, Nucleinsäuren, Proteinen und Lipidfraktionen der *EATZ* stimmen mit den Resultaten von *Uppin* und *Scholefield*<sup>23</sup> überein. Doch

<sup>23</sup> B. I. Uppin und P. G. Scholefield, *Canad. J. Biochem.* **43**, 209 (1964).

hemmt nach diesen Autoren 0,1 mM Jodacetat den C-1-Einbau in das CO<sub>2</sub> um 22%, während der C-6-Einbau um 20% stimuliert wird. Jodacetat hemmt auch den Glucoseeinbau in Proteine (50%) und Nucleotide (30%), war jedoch ohne signifikanten Effekt auf den Einbau in Nucleinsäuren und Lipide.

#### *Wirkungen von HPE auf den Stoffwechsel von normalen Geweben*

In früheren Untersuchungen war bereits darüber berichtet worden, daß die Atmung von normalen Säugetierzellen gegenüber HOE viel resistenter ist als die von Tumorzellen<sup>3</sup>. Diese Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit auch für HPE bestätigt. EATZ, menschliche Leukocyten, Schnitte von Mäuseleber und -nieren wurden 30 Min. aerob bei 37° C in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer mit HPE-Lösungen verschiedener Konzentrationen vorinkubiert und nach Glucosezusatz die Atmungsgrößen gemessen. 0,45 mM HPE bewirkte eine 50proz. Hemmung der Atmungsgröße bei den EATZ, während bei Leukocyten für die gleiche Atmungshemmung 4,5, Leber- und Nierenschnitten 8,5 mM HPE benötigt wurden<sup>22</sup>.

Tab. 5 zeigt, daß auch hinsichtlich der Biosynthesen von Proteinen und Nucleinsäuren ganz ähnliche Differenzen zwischen Ascites-Tumorzellen und Schnitten von Rattenjejunum, -milz und -thymus gefunden wurden. Die relativen Empfindlichkeiten der genannten Synthesen gegenüber HPE waren im Normalgewebe und in den Tumorzellen die gleichen. Um dasselbe Ausmaß der Hemmung zu erzielen, wurden jedoch in den Normalgeweben 0,4 mM HPE benötigt, in den Ascites-Tumorzellen jedoch nur 0,1 mM. Dieser Unterschied könnte vielleicht teilweise mit einer langsameren Permeation von HPE in die Schnitte, verglichen mit freien Zellen, erklärt werden. Dies wäre wenigstens eine der Erklärungsmöglichkeiten, warum die Schnitte von Jejunum gegenüber HPE weniger empfindlich waren, als die um einiges dünneren Schnitte von Milz und Thymus. Die letztgenannten geben jedoch einen großen Teil ihrer Lymphocyten und Thymocyten in das Inkubationsmedium während der Inkubation ab und nähern sich so den Bedingungen einer Suspension freier Zellen. Auch die Resistenz der Atmung der Leukocyten<sup>9, 22</sup> zeigt an, daß die Dicke der Schnitte wahrscheinlich nur ein untergeordneter Faktor für die relative Resistenz der Normalgewebe gegenüber HPE sein dürfte.

#### *Effekte von HPE auf den Stoffwechsel menschlicher Tumoren in vitro*

Im folgenden wurden die Wirkungen von HPE auf menschliche Primärtumoren im Vergleichstest mit anderen bekannten und bereits in klinischer Verwendung stehenden Carcinostatica geprüft. Die Empfindlichkeit individueller Tumoren kann bekanntlich beträchtlich variieren,

Tabelle 5. Vergleich der Wirkungen von *HPE* auf den Stoffwechsel von Ascitestumorzellen und einigen gesunden Geweben der Ratte

1 Stde. Inkubation in Krebs-Ringer-Phosphat-Glucose. Markierte Substrate: 2 mM L-(1-<sup>14</sup>C)-Leucin und 0,1 mM (8-<sup>14</sup>C)-Adenin. Ascitestumorzellen unter Luft, Schnitte gesunder Gewebe unter O<sub>2</sub> inkubiert. Die Wirkungen von *HPE* auf die gemessenen Stoffwechselgrößen in Prozenten der entsprechenden Kontrollen.

|  | Atmung in %<br>der Blindwerte | Einbau in % der Blindwerte |                             |                             |
|--|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|  |                               | Leucin<br>in Protein       | Adenin<br>in der <i>RNS</i> | Adenin<br>in der <i>DNS</i> |
| Ehrlich-Asciteszellen<br>+ 0,1 mM <i>HPE</i>   | 97                            | 70                         | 90                          | 40                          |
| Sarkom-37-Asciteszellen<br>+ 0,1 mM <i>HPE</i> | 95                            | 72                         | 90                          | 48                          |
| Ratten-Dünndarmschnitte<br>+ 0,4 mM <i>HPE</i> | 93                            | 96                         | 110                         | 81                          |
| Ratten-Milzschnitte<br>+ 0,4 mM <i>HPE</i>     | 83                            | 77                         | 78                          | 58                          |
| Ratten-Thymusschnitte<br>+ 0,4 mM <i>HPE</i>   | 94                            | 71                         | 83                          | 50                          |

auch wenn die Tumoren gleich lokalisiert sind und demselben histologischen Typ angehören. Ein solcher Vergleichstest kann somit für die Auswahl einer Substanz für die klinische Chemotherapie von Wert sein<sup>12</sup>. Wie die Werte der Tab. 6 zeigen, sind die Wirkungen von *HPE* auf den Stoffwechsel dreier menschlicher Tumoren *in vitro* durchaus vergleichbar mit den Effekten von 5 bekannten Cytostatica. Die Wirkungen von *HPE* auf jeden einzelnen Tumor variieren beträchtlich, wie man das auch von anderen Cytostatica bereits kennt. Besonders überraschend ist die vergleichsweise hohe Empfindlichkeit der *DNS*-Synthese des Colonicarcinoms gegenüber *HPE*, die gegenüber Metothrexit und 5-Fluoruracil offensichtlich resistent ist. Beide genannten Cytostatica sind spezifische Inhibitoren der *DNS*-Synthese und normalerweise die besten Agentien bei gastrointestinalen Tumoren<sup>12</sup>.

#### *Reaktionen zwischen HPE- und SH-Verbindungen*

Die durch *HPE* gesetzten Stoffwechselblockaden in Tumorzellen, insbesondere die Reversibilität dieser Effekte gegenüber Zusatz von SH-Verbindungen, legten die Annahme einer essentiellen Beteiligung zellulärer SH-Gruppen nahe. Dies wurde weiterhin in Modellexperimenten mit verschiedenen SH-Verbindungen geprüft.

Tabelle 6. Vergleich der *in vitro*-Wirkungen von *HPE* und einigen anderen Tumorchemikalien auf 3 menschliche Tumoren  
 2 Stdn. aerobe Inkubation in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Glucose. Gasphase 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>. Markierte Substrate: 2 mM L-(1-<sup>14</sup>C)-Leucin und 0,1 mM (8-<sup>14</sup>C)-Adenin zugekippt in den Hauptraum: Meßbeginn. *HPE* sowie die übrigen Substanzen wurden den Gewebsschnitten im Hauptraum etwa 20 Min. vor dem Gasen und dem thermischen Angleichen zugesetzt.

| Tumor   | Biosynthese,<br>gemessen | Aktivität in Anwesenheit der Hemmstoffe, in % der Kontrollen |                       |                          |                        |                         |                         |
|---|--------------------------|--|-----------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|   |                          | <i>HPE</i> ,<br>0,3 mM                                       | Trenimon,<br>0,004 mM | 5- <i>FU</i> ,<br>3,5 mM | Methotrexat,<br>0,1 mM | <i>VLB</i> ,<br>0,06 mM | Mitomycin C,<br>0,15 mM |
| Lymphknoten-Metastase<br>eines Eileiter-carcinoms | Protein                  | 73   | 100                   | 92                       | 100                    | 84                      | 88                      |
|   | <i>RNS</i>               | 77   | 98                    | 71                       | 116                    | 98                      | 67                      |
|   | <i>DNS</i>               | 45   | 43                    | 42                       | 27                     | 72                      | 79                      |
| Hirnd-Adenocarcinom                               | Protein                  | 43   | 66                    | 92                       | 94                     | 58                      | 58                      |
|   | <i>RNS</i>               | 54   | 64                    | 73                       | 105                    | 67                      | 56                      |
|   | <i>DNS</i>               | 46   | 55                    | 54                       | 45                     | 37                      | 40                      |
| Metastase im Omentum<br>eines Colon-carcinoms     | Protein                  | 29   | —                     | 63                       | 70                     | —                       | —                       |
|   | <i>RNS</i>               | 35   | —                     | 61                       | 77                     | —                       | —                       |
|   | <i>DNS</i>               | 42   | —                     | 77                       | 73                     | —                       | —                       |

Abkürzungen: *HPE*: Hydroxypentenal; 5-*FU*: 5-Fluorouracil; *VLB*: Vincalencoblastin.



a) *Reaktion zwischen HPE und Glutathion oder Cystein*

*HPE* zeigt wie auch die anderen homologen Hydroxyenale eine außerordentliche Affinität zu SH-Verbindungen, wie etwa *GSH* oder *CySH*. Bei Zusatz von *GSH* zu einer wäßr. Lösung von Hydroxyenalen tritt eine prompte chemische Reaktion ein, die durch das Verschwinden der freien SH-Gruppe von *GSH* und der chromophoren Gruppe des Aldehyds charakterisiert ist und an Hand beider Reaktionen quantitativ verfolgt werden kann. Die Reaktion verläuft so rasch, daß kinetische Messungen nur in einem Konzentrationsbereich von 0,1 mMol/l überhaupt möglich sind. Im genannten Konzentrationsbereich und bei Zimmertemp. und einem pH von 7,3 beträgt die Halbwertszeit der Reaktion zwischen *HPE* und *GSH* 32 Min. Für eine *HPE*-Konzentration von 0,5 mM und für *CySH* 1 mM betrug die Halbwertszeit 2,65 Min.<sup>14</sup> Solche Reaktionsgeschwindigkeiten machen die Ergebnisse der Experimente an Ascites-Tumorzellen verständlich, in denen das molare Verhältnis zwischen *HPE* und *GSH* 1,5 bzw. 1:2,5 und die Temperatur 37° C betrug (Tab. 3 und 4).

Wie an anderer Stelle ausführlich berichtet<sup>24</sup>, beruht die Reaktion zwischen den Hydroxyenalen und *GSH* bzw. auch anderen SH-Verbindungen im wesentlichen auf Bildung eines Thioäthers, wobei die SH-Gruppe an die Doppelbindung des Aldehyds addiert wird, während das freie Hydroxyl von C-4 einen intramolekularen furanoiden Ring mit der Aldehydgruppe (C-1) schließt.

b) *Wirkungen von HPE auf kristallisierte Enzyme*

Die Wirkungen von *HPE* auf 6 kristallisierte SH-Enzyme sind in Tab. 7 dargestellt. Man ersieht daraus eine starke und auffallend selektive Hemmung der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (*GAPDH*). Ähnliche Hemmungen wurden beobachtet, wenn die Aktivitäten der betreffenden Enzyme in Extrakten aus *HPE*-behandelten *EATZ* gemessen wurden<sup>22</sup>. Bekanntlich spielt die *GAPDH* eine führende Rolle im *Embden-Meyerhof*-Weg und eine Blockade dieses Schrittes dürfte schließlich auch viele andere Reaktionen, die diesem Schritt zeitlich vor- bzw. nachgelagert sind, hemmen. Die Tatsache, daß die Glykolyse in Tumorzellen eine viel wichtigere Rolle spielt als in Normalzellen, könnte auch ein Faktor sein, der für die geringere Empfindlichkeit der Normalzellen gegenüber *HPE* verantwortlich sein könnte. Die relative Unempfindlichkeit der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase stimmt mit der in Tab. 4 gezeigten Resistenz der Pentosephosphat-Oxydationen gut überein. Die progressive Hemmung der kristallisierten *GAPDH* bei

<sup>24</sup> E. Schauenstein, F. Dorner und J. Sonnenbichler, Z. Naturforsch. 23 B, 316 (1968).

Tabelle 7. Hemmwirkung von *HPE* auf die Aktivität einiger SH-Enzyme  
 Alle Enzyme in den angegebenen Konzentrationen von *HPE* oder (Kontrollen) in destill. Wasser 30 Min. bei 4° C vorinkubiert.  
 Testansätze nach C. F. Boehringer-Vorschriften bzw. *Bergmeyer*<sup>13</sup>.

| Enzym   | <i>HPE</i><br>mM | % Hemmung |
|---|------------------|-----------|
| Hexokinase<br>( <i>ATP</i> : D-Hexose-6-phosphotransferase; EC 2.7.1.1.)  | 40,0             | 31        |
| Glucose-6-phosphat-dehydrogenase<br>(D-Glucose-6-phosphat: <i>NADP</i> -Oxidoreduktase; EC 1.1.1.49)            | 40,0             | 6         |
| Aldolase<br>(Ketose-1-phosphat: Aldehydligase; EC 4.1.2.b)  | 40,0             | 0         |
| Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase<br>(D-Glyceraldehyd-3-phosphat: <i>NAD</i> -Oxidoreduktase; EC 1.2.1.12) | 0,40             | 100       |
| Milchsäure-dehydrogenase<br>(L-Lactat: <i>NAD</i> -Oxidoreduktase; EC 1.1.1.27)                                 | 40,0             | 18        |
| Alkohol-dehydrogenase (Hefe)<br>(Aldehydreduktase; Alkohol: <i>NAD</i> -Oxidoreduktase; EC 1.1.1.1.)            | 40,0             | 20        |

Einwirkung verschiedener Konzentrationen von *HPE* ist in Abb. 1 graphisch wiedergegeben.

c) *Quantitative Untersuchung der Reaktion zwischen HPE und GAPDH*

Um eine 100proz. Hemmung des genannten Enzyms zu erhalten, muß das Verhältnis Enzym zu Aldehyd im ursprünglichen Inkubationsansatz 1 : 1000 betragen. Das durch die halbstündige Inkubation voll-

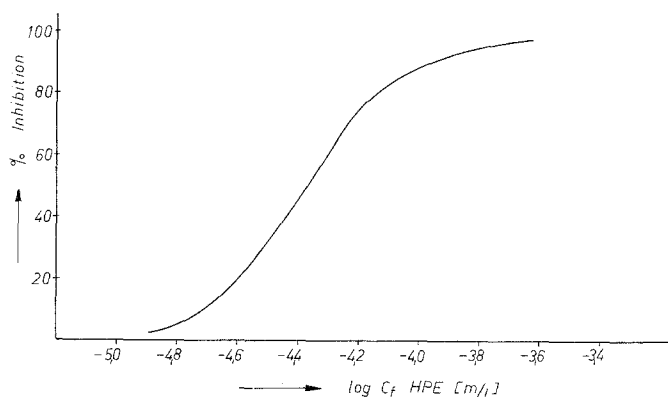


Abb. 1. Hemmung von kristallisierter Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (*GAPDH*) durch Zusatz verschiedener *HPE*-Konzentrationen. Die Enzymaktivität wurde nach 30 Min. Vorinkubation bei 4° C mit den entsprechenden *HPE*-Konzentrationen bzw. bidestill. Wasser (Kontrolle) bestimmt. Reaktionsgemisch: nach Boehringer Biochemica Informationen. Reaktionsmessung nach optischem Test nach Warburg.  $c_E$  = Endkonzentration

ständig gehemmte Enzym wird 8 Stdn. bei 4° C gegen destilliertes Wasser dialysiert. In bestimmten Zeitintervallen werden Proben des Dialysats entnommen und die Menge des in den Dialysmantel übergetretenen freien Aldehyds spektrometrisch bestimmt. Die erhaltenen Mengen werden in Prozenten des Aldehyds, der im ursprünglichen Inkubationsansatz vorhanden war, ausgedrückt. Die Ergebnisse zeigen an, daß nach 5 Stdn. der größte Teil des Aldehyds in den Dialysmantel übergetreten ist. Wenn das Enzym nun auf seine Aktivität geprüft wird, wird gleichwohl vollständige Inaktivität festgestellt. Als Vergleich diente eine Enzymlösung, die der völlig analogen Behandlung mit Ausnahme des Aldehydzusatzes unterworfen worden war (Abb. 2, Kurven 3 und 4).

Die Menge des an das Enzymprotein gebundenen Aldehyds kann auf Grund der Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin quantitativ bestimmt werden<sup>14</sup>. Solche Messungen ergaben, daß nach erschöpfender

Dialyse pro Mol Enzymprotein angenähert 4 Mole *HPE* gebunden bleiben. Die quantitative chemische Bestimmung von SH-Gruppen am Enzym vor und nach Behandlung mit Aldehyd ergab einen Verlust von ebenfalls angenähert 4 SH-Gruppen pro Molekül<sup>25</sup>. Diese Zahl entspricht praktisch der Zahl der funktionellen SH-Gruppen der *GAPDH*<sup>26</sup>.

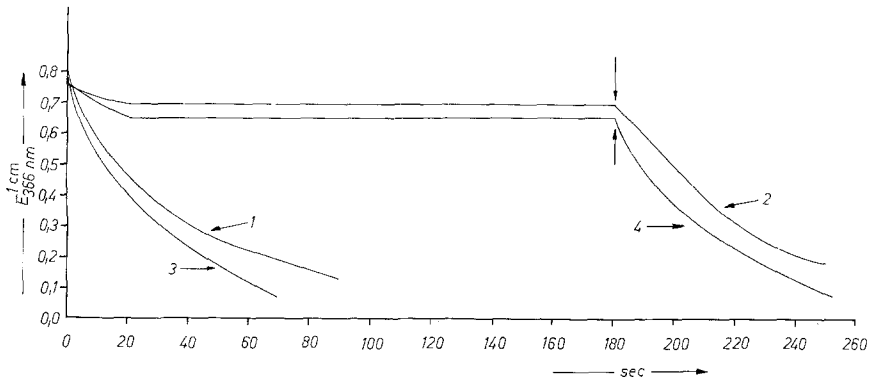


Abb. 2. Reversibilität der Hemmung von *GAPDH* mit Cystein. Kurve 1: Enzymaktivität nach 30 Min. Vorinkubation mit destill. Wasser (Kontrolle). Kurve 2: Aktivität des gehemmten Enzyms (30 Min. Vorinkubation mit 0,4 mM *HPE*) nach Addition von 40 mM *CySH* (Pfeil). Kurve 3: Enzymaktivität nach 8 Stdn. Dialyse (ohne *HPE*). Kurve 4: Aktivität des gehemmten und dialysierten Enzyms nach Addition von 40 mM *CySH* (Pfeil)

#### d) Reversibilität der *HPE*-Wirkung

Die Aktivität von *GAPDH*, die durch 0,4 mM *HPE* zu 100% inaktiviert worden war, kann durch Zugabe von Cystein in vollem Ausmaß wieder hergestellt werden (vgl. auch S. 1086). Die Menge des zu der Reaktionsmischung zugesetzten Cysteins hat etwa 100mal höher zu sein als die Menge des anwesenden *HPE* (Abb. 2, Kurve 2). In analoger Weise stellt Cystein auch die Aktivität des nach *HPE*-Inkubation erschöpfend adialysierten Enzyms wiederum her (Abb. 2, Kurve 4).

Die genannten mit *GSH* und *CySH* erhaltenen Resultate ergeben somit eindeutig, daß *HPE* mit freien SH-Gruppen unter Thioätherbildung reagiert, wobei die Aldehydgruppe reagibel bleibt. Die prinzipiell gleiche Reaktion tritt auch sehr selektiv mit Enzym-SH-Gruppen ein, was zum Aktivitätsverlust beim betreffenden Enzym führt. Die Reaktion mit Enzym-SH-Gruppen ist gegenüber *GSH* und *CySH* voll reversibel<sup>25</sup>.

<sup>25</sup> A. Kylianek, Dissertation, Universität Graz, 1968.

<sup>26</sup> R. E. Amelunxen, Biochim. Biophys. Acta **139**, 24 (1967).

## Zytologische Beobachtungen

Tumorzellen, die *HPE*-Konzentrationen von  $\geq 1 \text{ mM}$  ausgesetzt werden, zeigen charakteristische morphologische Änderungen. Dieses Phäno-

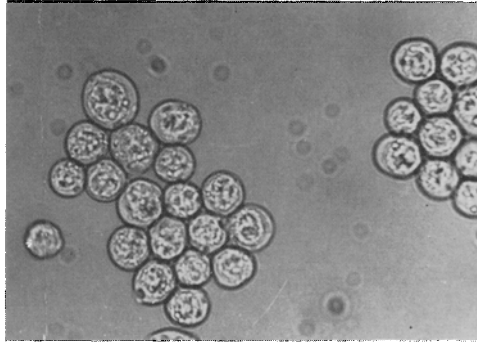


Abb. 3a.

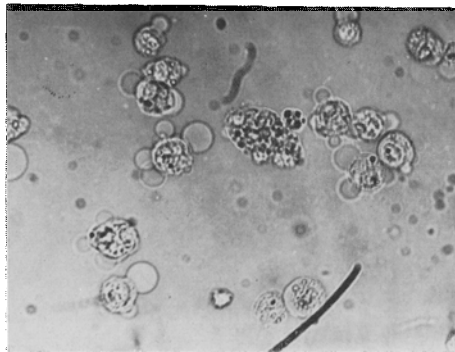


Abb. 3b.

Abb. 3. a) Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (*EATZ*) nach 30 Min. Inkubation in isotoner Kochsalzlösung. b) Verschiedene Formen der Stalagmose bei *EATZ* nach 30 Min. Inkubation mit  $5 \text{ mM HPE}$

men, das nach *Ratzenhofer* und *Zangger*<sup>4, 27</sup> Stalagmose und Stalagmoptyse benannt worden war, ist in Abb. 3 dargestellt. Bild A zeigt die Kontrollzellen nach 30 Min. aerober Inkubation in isotoner Salzlösung

<sup>27</sup> *M. Ratzenhofer* und *J. Zangger*, Beitr. Path. Anatomie u. Allgem. Path. **130**, 243 (1964).

mit normaler Morphologie, Bild B die verschiedenen Stadien der morphologischen Änderungen der Tumorzellen nach Inkubation mit 5 mM *HPE*. In den frühen Stadien des Effektes treten kleine Protrusionen auf der Zelloberfläche auf, die schließlich die Form kleiner Tröpfchen annehmen. Diese Tröpfchen bleiben noch mit der Zelle durch feine Stiele verbunden, werden allmählich größer (Mikrostalagmose) und vergrößern sich schließlich so stark, daß ihr Durchmesser den der Zelle erreicht oder sogar übertrifft (Stalagmose), worauf es schließlich zu einer Abtrennung der Extrusionen kommt (Stalagmoptyse). Zytospektrophotometrische und zytochemische Untersuchungen haben ergeben, daß diese Plasmaextrusionen Proteine und *RNS*, aber keine *DNS* enthalten<sup>28</sup>. Die Stalagmose kann daher als eine Desintegration des Zytoplasmas angesehen werden, die höchstwahrscheinlich durch einen Schaden an der Zellmembran hervorgerufen wird. Es ist bekannt, daß z. B. die Wirkung organischer Quecksilberverbindungen auf Erythrozyten zu einem Verlust an SH-Gruppen der Proteine der Zellmembran führt. Die Folge sind Änderungen in der Membranpermeabilität gegenüber Kalium, Natrium und Glucose<sup>29</sup>. Daß *HPE* die Zellmembran tatsächlich beeinflußt, kommt auch in der Änderung der Permeabilität von Ascitestumorzellen gegenüber Trypanblau zum Ausdruck (vgl. Tab. 8). Es erscheint bemerkenswert, daß bei einer

Tabelle 8. Cytologische Wirkungen von *HPE* auf Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

0,2 ml nativer Ehrlich-Ascitestumor, gemischt mit 0,5 ml *HPE*-Lösungen, 30 Min. bei 37° C inkubiert. Nach Verdünnung 1 : 10 mit isotoner Kochsalzlösung Untersuchung der Zellen hinsichtlich Trypanfärbung und morphologischer Veränderungen.

| <i>HPE</i> ,<br>mM | Zellen, die mit<br>Trypanblau<br>anfärbbar sind | Zellen, die Stalagmose<br>und Stalagmoptyse<br>zeigen |
|--------------------|---|---|
| 0,5                | 6—8%  | vereinzelt  |
| 2,0                | 90%   | 80—85%  |
| 5,0                | 96%   | 96%   |

Konzentration von 0,5 mM *HPE*, bei der die fünf in dieser Arbeit gemessenen biochemischen Parameter zu 50% und mehr gehemmt wurden (Tab. 1), weder ein positiver Trypantest, noch Stalagmose auftritt, das heißt also, daß diese zytologischen Kriterien noch keine signifikante Änderung der Zellvitalität anzeigen. Ob hier eine tatsächliche oder nur

<sup>28</sup> E. Schauenstein, W. Wöhl und I. Kramer, Z. Naturforsch. **23 B**, 530 (1968).

<sup>29</sup> R. M. Sutherland, J. N. Stannard und R. I. Weed, Internat. J. Radiat. Biol. **12**, 551 (1967).

eine scheinbare Diskrepanz besteht, kann nicht sicher beurteilt werden, da die biochemischen Parameter und die cytologischen Kriterien unter nicht streng vergleichbaren Bedingungen untersucht wurden: Die erstgenannten bei 1stdg. Einwirkungsdauer von *HPE* und Glucosezusatz, die letztgenannten bei halbstündiger Einwirkungszeit ohne Glucosezusatz und bei viel höherer Zelldichte.

Zellen, isoliert aus normaler Leber und Niere von Ratten, oder auch menschliche Leukocyten zeigen nicht das Phänomen der Stalagmose, auch nicht nach Inkubation mit Konzentrationen von 10 mM. Diese auf Grund der cytologischen Kriterien festgestellte wesentlich höhere Resistenz von Normalzellen entspricht durchaus den Ergebnissen der biochemischen Messungen (Tab. 5).

### Zusammenfassende Besprechung der Ergebnisse

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, daß *HPE* verschiedene Wege des Zell-Stoffwechsels wirksam blockiert: Glykolyse, Atmung, Biosynthese von *DNS*, *RNS* und Proteinen.

Über den Mechanismus der einzelnen Hemmeffekte sind derzeit folgende Aussagen möglich:

Die prinzipielle Ursache für die Glykolysehemmung durch *HPE* dürfte in der Inaktivierung der *GAPDH* zu suchen sein. *GAPDH* wird auch im Modellversuch i. Vgl. zu 5 anderen kristallisierten SH-Enzymen mit hoher Selektivität durch *HPE* inaktiviert. Auf die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener SH-Enzyme gegenüber einem oder mehreren Inhibitoren wurde in der Literatur mehrfach hingewiesen<sup>30-32</sup>. Die Inaktivierung der *GAPDH* durch *HPE* wurde durch chemische Reaktion der 4 funktionellen Enzym-SH-Gruppen mit der Doppelbindung des Aldehyds erklärt und ist gegen *GSH* oder *CySH* voll reversibel.

Die hohe Empfindlichkeit der kristallisierten *GAPDH* gegen *HPE* ließe allerdings zunächst bei 0,5 mM eine höhere Glykolysehemmung erwarten als tatsächlich beobachtet (50%, vgl. Tab. 1). Für diese scheinbare Diskrepanz bieten sich zwei Erklärungsmöglichkeiten:

a) *HPE* dringt in bestimmtem Anteil in die Zelle ein und reagiert dort mit vielen anderen, auch nicht-funktionellen SH-Verbindungen; dadurch wird die für eine sofortige Maximalhemmung erforderliche intrazelluläre *HPE*-Konzentration nicht erreicht.

<sup>30</sup> P. D. Boyer, in P. D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck, The Enzymes, Vol. 1, Academic Press, New York (1959), p. 511.

<sup>31</sup> R. M. Johnstone, in R. M. Hochster und J. H. Quastel, Metabolic Inhibitors, Vol. 2, Academic Press, New York (1963), p. 99.

<sup>32</sup> J. L. Webb, Enzymes and Metabolic Inhibitors, Vol. 2, Academic Press, New York (1966), p. 635.

b) Die intrazelluläre Konzentration an ursprünglichen Substraten und Cofaktoren ist ausreichend hoch, um einige Reaktionen noch eine Zeitlang weiterlaufen zu lassen, auch wenn mehrere Enzyme bereits maximal gehemmt worden sind.

Wahrscheinlich werden beide Möglichkeiten die intrazelluläre Wirkung von *HPE* modifizieren. Die durch *GAPDH* katalysierten Reaktionen scheinen die empfindlichste Stelle der Glykolysekette darzustellen und werden in verschiedenem Ausmaß durch verschiedene SH-Reagentien und andere Glykolysehemmer beeinflusst. Hemmungen können auf verschiedene Weise verhindert oder aufgehoben werden. Die Hemmung durch p-Cl-Mercuribenzoat wird durch hohe Substratkonzentration verhindert und durch *CySH* aufgehoben<sup>33</sup>, nicht aber die Hemmung durch Jodacetat oder Jodbenzoat<sup>20, 33</sup>. Die Hemmungen durch Triäthylenimine und Carcinophilin werden durch Nicotinamid verhindert und aufgehoben<sup>17-20</sup>. Die Hemmung durch *HPE* kann durch *GSH* oder *CySH* verhindert und aufgehoben werden, nicht jedoch durch Nicotinamid.

Völlig überraschend ist die gleichzeitige Hemmung von Glykolyse und Atmung durch *HPE*: Jodacetat, DL-Glycerinaldehyd, Carcinophilin stimulieren nämlich — zumindest bei Tumorzellen — die Atmung bei Konzentrationen, bei denen die Glykolyse nahezu vollständig gehemmt wird (Umkehrung des *Crabtree*-Effektes<sup>10, 20</sup>) und beginnen die Atmung erst bei beträchtlich höheren Konzentrationen zu hemmen. Ähnliche vergleichende Untersuchungen über die Wirkung anderer SH-Inhibitoren auf Glykolyse und Atmung scheinen in der Literatur zu fehlen, doch gibt es zahlreiche Berichte über Hemmeffekte verschiedener SH-Inhibitoren auf viele Reaktionen des Tricarbonsäurecyclus<sup>30-32</sup>. Wieweit die beobachteten Hemmeffekte das Ergebnis blockierter Enzyme oder, wie bei der Oxydation von Pyruvat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Fettsäuren und der meisten Aminosäuren, auf die Inaktivierung von Liponsäure und Coenzym A zurückzuführen sind, ist noch nicht eindeutig erwiesen. Andererseits bewirkt *HPE* einen drastischen Abfall des *NAD*-Niveaus, was gewiß für die Hemmung von Atmung und Glykolyse von Bedeutung sein wird<sup>3, 21, 22</sup>.

Für das Zustandekommen der Atmungshemmung sind ferner die Inaktivierung weiterer, bisher noch nicht näher identifizierter Dehydrogenasen mit funktionellen SH-Gruppen sowie schließlich die Blockade der Elektronentransportkette verantwortlich zu machen<sup>21</sup>. In den meisten Fällen können die durch SH-Inhibitoren bewirkten Hemmungen der Oxydationsprozesse des Tricarbonsäurecyclus durch *GSH* und *CySH* verhindert und gelegentlich auch aufgehoben werden<sup>30-32</sup>. Die Hemmung der Succinatdehydrogenase durch SH-Inhibitoren kann durch Succinat

---

<sup>33</sup> S. F. Velick und C. Furfine, in P. D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck, *The Enzymes*, Vol. 7, Academic Press, New York (1963), p. 243.



oder Malonat aufgehoben werden<sup>34</sup>. Dagegen kann die Atmungshemmung durch *HPE* weder durch Pyruvat, Glutamat, Succinat, Fumarat noch durch Nicotinamid aufgehoben werden. Anwesenheit von *GSH* im Inkubationsmedium verhindert jedoch die Atmungshemmung vollständig und sie kann auch durch nachträglichen Zusatz von *CySH* zu *HPE*-behandelten und dreimal gewaschenen Zellsuspensionen praktisch vollkommen aufgehoben werden<sup>21</sup>. Dies weist darauf hin, daß auch die Atmungshemmung durch Reaktion von *HPE* mit funktionellen SH-Gruppen zustande gekommen ist.

*HPE* hemmt, zum Unterschied von p-Cl-Mercuribenzoat<sup>35</sup> und Jodacetat<sup>23</sup> die Oxydationen des Pentosephosphatcyclus nicht meßbar.

*HPE* hemmt ferner wirksam die Proteinbiosynthese. Die Aktivierung von Aminosäuren sowie die Polymerisationsschritte sind stark abhängig von freien SH-Gruppen<sup>36-38</sup>; aminosäureaktivierende Enzyme werden durch p-Cl-Mercuribenzoat gehemmt<sup>36</sup> (reversibel gegen *GSH*!); SH-Inhibitoren hemmen die *GTP*-ase und in der Folge daher die Polyphenylalaninsynthese<sup>37</sup>; Ribosomen werden durch mehrere SH-Inhibitoren partiell inaktiviert, wobei die Inaktivierung durch Mercaptoäthanol, nicht aber durch Jodacetat und Jodacetamid aufgehoben werden kann<sup>38</sup>. Es ist daher anzunehmen, daß *HPE* auch die Proteinbiosynthese über eine Reaktion mit einer oder mehreren der SH-abhängigen Komponenten dieses Systems hemmt. Hierfür spricht insbesondere auch die Verhinderung der Hemmung durch *GSH*.

Den stärksten Hemmeffekt zeigt *HPE* auf den Einbau von 8-<sup>14</sup>C-Adenin in die *DNS*, während der Einbau in die *RNS* viel schwächer beeinflußt wird. Über die Wirkung von SH-Inhibitoren auf die Nucleinsäuresynthesen scheinen wenig Berichte in der Literatur vorzuliegen. 0,1 mM-Jodacetat hemmt unter anaeroben Bedingungen den Einbau von 8-<sup>14</sup>C-Adenin in *DNS* und *RNS* von *EATZ* gleichermaßen um 90%. Aerob, wenn der Verlust an Energie (*ATP*) aus der gehemmten Glykolyse durch gesteigerte Atmung fast vollständig kompensiert wurde<sup>10</sup>, belüftet sich die Hemmung der Inkorporierung in die *DNS* auf etwa 50%, in die *RNS* nur auf 20 bis 30%. 1 mM *GSH* ist praktisch ohne Einfluß<sup>20</sup>. *Sung* und *Quastel*<sup>39</sup> berichten über die Wirkung von Sarkomyein auf die Synthese von *DNS* und *RNS* in *EATZ* und zellfreien Systemen. Die *DNS*-

<sup>34</sup> T. P. Singer und E. B. Kearney, in P. D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck, The Enzymes, Vol. 7, Academic Press, New York (1963), p. 383

<sup>35</sup> G. E. Glock und P. MacLean, Biochem. J. **55**, 400 (1953).

<sup>36</sup> E. H. Allen, E. Glassmann und R. S. Schweet, J. Biol. Chem. **235**, 1061 (1960).

<sup>37</sup> Y. Nishizuka und F. Lipmann, Arch. Biochem. Biophys. **116**, 344 (1966).

<sup>38</sup> R. R. Traut und A. L. Haenni, Europ. J. Biochem. **2**, 64 (1967).

<sup>39</sup> S. C. Sung und J. H. Quastel, Cancer Res. **23**, 1546 (1963).

Synthese wird viel stärker betroffen als die *RNS*-Synthese. Beide Hemmungen werden durch *GSH* oder *CySH* verhindert; kein Einfluß auf Einbau von 8-<sup>14</sup>C-Adenin und 2-<sup>14</sup>C-Thymidin auf die säurelöslichen Nucleotide. Die Autoren schließen auf eine spezifische Hemmung der *DNS*-Polymerase. Aus der auffallenden Ähnlichkeit der Hemmeffekte von *HPE* und Sarkomyein ergibt sich ein Hinweis auf den gleichen Angriffspunkt beider Substanzen. Aus bisher unbekanntem Gründen erweist sich die *DNS*-Polymerisation gegenüber *HPE* und anderen SH-Inhibitoren empfindlicher als die *RNS*-Synthese.

Die Wirkungen von *HPE* auf den Einbau von <sup>14</sup>C aus 1-<sup>14</sup>C- und 6-<sup>14</sup>C-Glucose in die *RNS* sind ähnlich den mit 8-<sup>14</sup>C-Adenin beobachteten Effekten, der Einbau von <sup>14</sup>C aus Glucose in die *DNS* erwies sich als viel weniger empfindlich. Obgleich eine gewisse Radioaktivität der Glucose schließlich in den Purinen und Pyrimidinen erscheint, befindet sich der größte Aktivitätsanteil nach einer Stunde Inkubation wahrscheinlich in der Ribose und Desoxyribose. Die Aktivität der Nucleotidfraktion konnte in unserem Experiment nicht gemessen werden, da für die vollständige Sammlung des respiratorischen CO<sub>2</sub> dem Inkubationsmedium Säure zugesetzt wurde. Gleichwohl findet die Reduktion der Ribose zur Desoxyribose nur auf dem Nucleosid-diphosphat-Niveau statt<sup>40</sup>. Infolgedessen würde die Radioaktivität in den *DNS* stärker betroffen sein als in den *RNS*, wenn *HPE* bereits die Synthese von Ribose-Nucleotiden gehemmt hat. Tatsächlich aber wurde experimentell das Gegenteil beobachtet — wahrscheinlich deswegen, weil die gehemmte *RNS*-Synthese mehr Ribonucleoside für die Synthese von Desoxyribonucleotiden verfügbar gelassen hat. Der nicht betroffene Pentosephosphat-Cyclus bei gleichzeitiger Hemmung der Glykolyse und des Citratcyclus führt wahrscheinlich zu einer Erhöhung des *NADPH*, das die Synthese von Desoxyribonucleotiden auch steigern dürfte. Somit ist die offensichtlich höhere Resistenz der *DNS*-Synthese gegen *HPE* (gemessen durch Einbau von <sup>14</sup>C aus radioaktiver Glucose) wahrscheinlich nur das Resultat einer verstärkten Aktivität im Desoxyribonucleotid-Pool. Unsere Ergebnisse zeigen an, daß die Reaktionen, die zum Einbau von C-6 in die Ribose führen, um einiges empfindlicher gegenüber *HPE* sind als jene für den Einbau von C-1. Beide C-Atome sind in gleichem Maße betroffen, wenn sie in Lipide und Proteine eingebaut werden.

Bei cytotostisch wirksamen Substanzen werden möglichst große Unterschiede der cytotoxischen Effekte auf Tumorzellen und Normalgewebe gewünscht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß *HPE* dieser Forderung in einem bemerkenswerten Ausmaß entspricht: um etwa gleich

---

<sup>40</sup> P. Reinhard, A. Balenstein und L. Rutberg, J. Biol. Chem. **236**, 1150 (1961).

starke Hemmung von Atmung, *DNS*-, Protein- und *RNS*-Synthesen zu erreichen, wird bei den untersuchten Normalgeweben mindestens die vierfache *HPE*-Konzentration benötigt wie bei den Tumorzellen. Läßt man *HPE* auf Zellen und Gewebe zunächst ohne Zusatz von Glucose einwirken und setzt diese erst bei Meßbeginn zu, so tritt die unterschiedliche Schädigung von Atmung und Glykolyse bei Tumorzellen und Normalgewebe noch um ein Vielfaches deutlicher hervor: um etwa gleiche Hemmwerte zu erreichen, sind bei Leukocyten, Leber- und Nierenschnitten 10- bis 20fach höhere Aldehydkonzentrationen notwendig als bei *EATZ*<sup>22</sup>. Die viel geringere Empfindlichkeit der Normalzellen gegenüber der Wirkung von *HPE* dürfte auf mehrere Faktoren zurückzuführen sein:

Cytochemische und spektrometrische Untersuchungen<sup>41, 42</sup> ergaben, daß *HPE* grundsätzlich sowohl in nichtmaligne wie maligne Zellen eindringt, daß aber die intrazelluläre *HPE*-Konzentration in Normalzellen tiefer liegen dürfte.

Weiters begründet der bekanntlich höhere Spiegel an Sulfhydrylgruppen in Normalzellen<sup>43</sup> die Möglichkeit einer wirksameren Abschirmung funktioneller SH-Enzyme. Auch die ungleich höhere Bedeutung der Gärung für die Energieversorgung der Tumorzellen könnte die höhere Empfindlichkeit gegenüber *HPE* miterklären.

Schließlich wäre daran zu denken, daß Normalzellen über Mechanismen verfügen, die *HPE* rasch zu nicht-toxischen Umwandlungsprodukten metabolisieren könnten.

Wie immer er auch erklärt werden kann, läßt der große Empfindlichkeitsunterschied zwischen Normal- und Tumorzellen prinzipiell an eine Verwendbarkeit von *HPE* in der Chemotherapie denken.

Allerdings verhindert die hohe Affinität der Substanz gegenüber SH-Gruppen eine nennenswerte therapeutische Wirkung bei systemischer Verabreichung. Dagegen konnten bei peritumorale Applikation bis zu 8 Tage angegangene Ehrlich-Solidtumoren der Maus mit einem therapeutischen Wirkungsindex von etwa 0,22 behandelt werden, was nach internationalem Übereinkommen einer deutlichen und guten Tumorchemmung entspricht<sup>44</sup>.

Weiters wurden in ersten orientierenden Versuchen mit menschlichen Tumoren, insbesondere zunächst bei Basaliomen, klinische Abheilung bei

---

<sup>41</sup> W. Burkl, I. Kramer und E. Schauenstein, Z. Naturforsch. **22 B**, 763 (1967).

<sup>42</sup> E. Schauenstein und W. Wöhl, Jahrestagung 1968, Deutsche Ges. f. Biophysik, Österr. Ges. f. reine u. angewandte Biophysik, Baden bei Wien 1968, Verlag Wien. Med. Akademie.

<sup>43</sup> G. Calcutt, Brit. J. Canc. **15**, 673 (1961).

<sup>44</sup> E. Schauenstein, B. Wünschmann und H. Esterbauer, Z. Krebsforsch. **72**, 325 (1969).

weitgehender Erhaltung des umgebenden gesunden Gewebes beobachtet<sup>45</sup>.

Gleichwohl läßt sich heute noch nichts Endgültiges darüber aussagen, ob *HPE* — zumindest in der bisherigen Form — signifikante klinische Bedeutung in der Chemotherapie erlangen wird; als hochselektives Reagens auf SH-Gruppen ermöglicht es aber jedenfalls neue Einblicke und Eingriffe in den SH-Stoffwechsel, der heute zu den aussichtsreichsten Zielen der Tumorforschung zählt.

Die Untersuchungen wurden teilweise mit Unterstützung des National Cancer Institute of Canada und des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Wien, durchgeführt.

---

<sup>45</sup> *W. Widder* und *M. Ratzenhofer* bzw. *A. Musger*, Wien. Med. Wschr. 1969, im Druck.