

Über den Mechanismus der durch 4-Hydroxypentenal bei Tumorzellen bewirkten Atmungshemmung

Von

E. Schauenstein, H. Verdino und M. Taufer

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Graz, Österreich

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 10. Februar 1970)

Einleitung und Problemstellung

4-Hydroxypentenal ist — wie alle 4-Hydroxy-2-*trans*-enale — ein vielseitig wirksames Zellgift. Während der Mechanismus der durch diese Substanzen bewirkten Hemmung der Gärung¹, der Biosynthesen von Proteinen und Nucleinsäuren bereits einigermaßen aufgeklärt werden konnte^{2, 3}, waren bisher über den Mechanismus der Atmungshemmung nur Vermutungen möglich. In der vorliegenden Untersuchung soll zu dieser noch offenen Frage ein erster experimenteller Beitrag geleistet werden.

Material

4-Hydroxy-2-pentenal (HPE) synthetisiert von Esterbauer⁴; Ehrlich-Ascites-Tumorzellen der Maus (EATZ), Stamm Heidelberg-Létré, aus denen auch die Mitochondrien (s. Methoden) gewonnen wurden.

Substrate: Glucose, 55 μ Mol pro Ansatz; Glucose, 55 μ Mol + 5 μ Mol NAD; NADH, 10 μ Mol; Natriumpyruvat, Trinatriumcitrat, Dinatriumoxalacetat, -fumarat, -succinat und -ketoglutarat, je 20 μ Mol.

Cysteinzusätze: 25 bzw. 150 μ Mol.

Phosphatpuffer (PBS): Lösung A: NaCl 40 g, KCl 1 g, Na₂PO₄ 5,75 g, KH₂PO₄ 1 g, H₂O 4 l.

Lösung B: MgCl₂ · 6 H₂O 0,5 g, H₂O 0,5 l.

Lösung C: CaCl₂ 0,5 g, H₂O 0,5 l.

A : B : C im Verhältnis 40 : 5 : 5 gemischt; PBS.

Methoden

EATZ wurden zwischen dem 7. und 10. Tag post transplantationem der Maus aus der Bauchhöhle entnommen, bei 200 g zentrifugiert, mehrmals mit

¹ E. Schauenstein, J. Lipid Res. **8**, 417 (1967).

² I. J. Bickis, E. Schauenstein und M. Taufer, Mh. Chem. **100**, 1077 (1969).

³ S. Seeber, P. Warnecke und U. Weser, Z. Krebsforsch. **72**, 137 (1969).

⁴ H. Esterbauer und W. Weger, Mh. Chem. **98**, 1884, 1994 (1967).

isotoner NaCl-Lösung gewaschen, in *Krebs—Ringer*-Phosphatpuffer aufgenommen und Zellzahl mittels Hämatokrit bestimmt.

Ansatz eines Warburg-Kolbens für Messungen an kompletten Zellen

Einsatz: 0,2 ml 10proz. KOH.

Hauptraum: 1,0 ml *Krebs—Ringer*-Phosphatpuffer + 45 μ l Zellsuspension, entsprechend $15 \cdot 10^6$ Zellen. 1,0 ml isotone Kochsalzlösung (Kontrollansatz) bzw. 1,0 ml isotone Kochsalzlösung + *HPE*-Endkonzentration $1 \cdot 10^{-3}$ bzw. $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l (Testansatz).

Kontroll- und Testansatz wurden zunächst 30 Min. bei 37° C aerob geschüttelt („Vorinkubation“). Hierauf wurde 2 Min. mit 95% O₂ + 5% CO₂ gegast und das jeweilige Substrat, gelöst in 0,5 ml *Krebs—Ringer*-Phosphatpuffer aus dem Seitenarm zugekippt. Temperaturgleich 5 Min., Meßzeit: 40. bis 100. Minute.

Auswaschen des Hemmstoffes

Nach 30 Min. Vorinkubation mit *HPE* (bzw. isotoner NaCl-Lösung, Kontrollen), Zellen 3mal bei 0° C und 200 g mit eiskalter isotoner NaCl-Lösung zentrifugieren und sogleich in den Atmungsversuch einsetzen. Hierdurch wird der freie Aldehyd im Medium und der in den Zellen locker adsorptiv gebundene Aldehyd entfernt und erreicht, daß Cysteinzusätze nur mehr auf den chemisch gebundenen Aldehydanteil einwirken.

Aufarbeitung der Zellen für Messungen an Mitochondrien

EATZ werden nach Entnahme 3mal mit eiskalter isotoner Kochsalzlösung gewaschen und auf die Zelldichte von 15 Mio pro ml gebracht. 30 ml Zellsuspension mit 30 ml isotoner Kochsalzlösung (Kontrollen) bzw. mit 30 ml isotoner Kochsalzlösung + *HPE* (Testansatz) 30 Min. bei 37° C schütteln, sodann an einer Aliquote die Atmung mit Glucose als Substrat messen und den Rest, wie im folgenden beschrieben, auf isolierte Mitochondrien aufarbeiten.

*Isolierung der Mitochondrien*⁵

EATZ wurden 2mal mit *PBS*, einmal mit Lösung A (5:1 mit Wasser verdünnt) gewaschen, dann in Rohrzucker (0,125 Mol/l)—KCl (0,075 Mol/l) suspendiert und Zellzahl bestimmt. Ungefähr $3 \cdot 10^8$ Zellen 5 Min. mit 2200 g bei 0° C zentrifugieren, in 5 ml eiskaltem Wasser aufnehmen und wie oben 3 Min. zentrifugieren, suspendieren in 20 ml Wasser, vorsichtig händisch homogenisieren im *Potter—Elvehjem*-Homogenisator; Zugabe von 1,5molarer Rohrzuckerlösung, so daß die Endkonzentration an Rohrzucker 0,1 Mol/l beträgt.

Die Suspension wird 10 Min. stehengelassen, mit dem Ultra-Turrax homogenisiert (1 Min. unter Kühlung bei einer Spannung von 70 V), Zugabe von Rohrzucker (0,75 Mol/l)—KCl (0,5 Mol/l), bis die Endkonzentration an

⁵ W. C. Schneider, J. Biol. Chem. **176**, 259 (1948); E. M. Martin, J. Malec, J. L. Coote und T. S. Work, Biochem. J. **80**, 606 (1961); K. B. Freeman, J. Biochem. **94**, 494 (1965); G. H. Hers, J. Berthet, L. Berthet und Chr. de Duve, Bull. Soc. Biol. Paris **88**, 21 (1951); F. L. Crane, J. L. Glenn und D. L. Green, Biochim. Biophys. Acta **22**, 475 (1956); J. B. Clarc, A. L. Greenbaum und T. F. Slater, Biochem. J. **94**, 651 (1965).

KCl 0,1 Mol/l beträgt. 10 Min. bei 600 g zentrifugieren. Den Überstand mit den 2 Waschflüssigkeiten des Sedimentes vereinigen (0,25 Mol/l Rohrzucker) und 15 Min. bei 0° C bei 10 000 g zentrifugieren. Sediment in *PBS*, pH 7,4, aufnehmen und zur Messung bringen.

Ansatz eines Warburg-Kolbens für Messungen an Mitochondrien

Einsatz: 0,2 ml 10proz. KOH.

Hauptraum: 1,0 ml Mitochondriensuspension in Puffer* pH 7,4, 1,5 ml des gleichen Puffers mit 30 μ Mol NaF, 20 μ Mol $MgCl_2$, 5 μ Mol *ATP*, 0,5 mg Cytochrom C, 90 μ Mol Glucose und Hexokinase.

Seitenarm: 0,5 ml *Sörensen*-Phosphatpuffer + Substrat: 40 μ Mol Succinat bzw. 10 μ Mol *NADH*.

Eine Proteinbestimmung ist in jedem Falle notwendig, da die Mitochondrienproteinmenge nie konstant ist und außerdem aus *HPE*-inkubierten Zellen nur 30—50% der Kontrollen gewonnen werden konnten. Bestimmungsmethode: Biuret.

NAD-Bestimmung

Gearbeitet wurde nach den Angaben von *Holzer*⁶, die für unsere Versuchsanordnung geringfügig modifiziert wurden (Volumina). Der 14fache Ansatz eines *Warburg*-Kolbens (für komplette Zellen) wurde 30 Min. im Brutschrank bei 37° C geschüttelt. Hierauf wurden 5 ml Suspension entnommen und daran in 2 Parallelbestimmungen im *Warburg*-Apparat die Atmung gemessen. Die übrige Suspension wurde zentrifugiert, die Zellen 2mal mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen, der Überstand abgegossen und zum Zellsediment 2 ml 6proz. $HClO_4$ hinzugefügt (Eiweißfällung); Abzentrifugieren des Sedimentes, Neutralisieren des Überstandes mit KOH. Nachdem auf 3 ml aufgefüllt worden war, wurde $KClO_4$ abzentrifugiert und 1,0 ml der nunmehr klaren Lösung in den optischen Test eingesetzt. Vermessen wurde die Extinktionsänderung bei 366 nm, Schichtdicke 1 cm.

Optischer Test: 0,01 ml 2*n*-NaOH
 0,05 ml 96proz. Äthanol
 0,02 ml 1*m*-Semicarbazid-HCl-Lösung
 1,67 ml Glykokollpyrophosphatpuffer (pH = 8,7) 0,2*m*
 1,0 ml Testlösung
 2,75 ml

Bestimmung der Anfangsextinktion (E_1), Zugabe von 0,05 ml Alkoholdehydrogenase (0,01 mg), Ablesen der Extinktionsänderung nach 5 Min. (E_2)

Ergebnisse

Messungen an kompletten Zellen

a) *HPE*-Konzentration im Inkubationsmedium $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l.

Aus Tab. 1 ersieht man, daß *HPE* den intrazellulären *NAD*-Spiegel drastisch erniedrigt; die Senkung ist merklich schwächer als bei dem früher untersuchten homologen 4-Hydroxy-octenal⁷, bei dem sie etwa 85% betrug.

* *Sörensen*-Phosphat

⁶ *H. Holzer, P. Glogner und G. Sedlmayr, Biochem. Z. 330, 59 (1958).*

⁷ *E. Schauenstein, J. Zangger und M. Ratzenhofer, Z. Naturforsch. 19b, 923 (1964).*

Tabelle 1. Beeinflussung des NAD-Spiegels

| E_1 | Kontrolle | | Test | | | NAD-Abfall, % |
|-------|-----------|------------|-------|-------|------------|------------------|
| | E_2 | ΔE | E_1 | E_2 | ΔE | |
| 0,039 | 0,056 | 0,017 | 0,033 | 0,038 | 0,005 | 71 |
| 0,039 | 0,054 | 0,015 | 0,040 | 0,044 | 0,004 | 73 |
| 0,043 | 0,060 | 0,017 | 0,038 | 0,043 | 0,005 | 71 |
| 0,057 | 0,075 | 0,018 | 0,037 | 0,042 | 0,005 | 72 |
| 0,036 | 0,058 | 0,022 | 0,027 | 0,034 | 0,007 | 68 |

Durchschnitt 71%

Beeinflussung des O₂-Verbrauches unter Verwendung verschiedener Substrate

Tab. 2 beinhaltet sämtliche Ergebnisse eines einzelnen, aus 30 Ansätzen beliebig herausgegriffenen Versuchsansatzes und soll über die tatsächlich verbrauchten $\mu\text{l O}_2$ sowie über die durchwegs eingehaltene rechnerische Auswertung orientieren. Die Gesamtauswertung ist in Säule II der Abb. 1 graphisch dargestellt. In allen Abbildungen stellen die Höhen der Säulen die Mittelwerte aus sämtlichen Einzelwerten aller Einzelversuche dar; die darübergesetzten Zahlen geben die Anzahl der jeweils durchgeführten Einzelversuche an, die Keile symbolisieren die mittleren Fehler der Mittelwerte. Die geringen Streuungen der mittleren Hemmprozente erklären sich daraus, daß es sich hier ja um Streuungen von Relativwerten handelt, während die Absolutwerte (μl verbrauchter Sauerstoff) in den verschiedenen Einzelversuchen natürlich eine vielfach größere Streuung zeigen.

Tabelle 2. Substrat: Glucose (Einzelansatz)

| Min. | Kontrolle, $\mu\text{l O}_2$ | Test, $\mu\text{l O}_2$ | % Hemmung |
|------|---------------------------------|----------------------------|-----------|
| 50. | 4,4 | 1,2 | 73 |
| 60. | 11,3 | 3,0 | 73,4 |
| 70. | 16,7 | 4,3 | 73,5 |
| 80. | 24,5 | 6,8 | 72 |
| 90. | 31,7 | 7,8 | 75 |
| 100. | 36,0 | 7,8 | 78 |

Tabelle 3. Substrat: Glucose

(Messung nach Auswaschen des Hemmstoffes)

Abb. 1, Säule IIa

| Versuch | $\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|----------|-----------|-----------------|
| | Kontrollen | HPE-beh. | | |
| 1 | 45 | 16 | 64 | $F_m = \pm 3\%$ |
| 2 | 44 | 18 | 59 | |
| 3 | 54 | 12 | 78 | |
| 4 | 39 | 18 | 54 | |
| 5 | 37 | 16 | 57 | |

Tabelle 4. Substrat: Glucose + *NAD*

Abb. 1, Säule III

| Versuch | $\mu\text{l O}_2\text{-Verbrauch}$ pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|------------------|-----------|------------------------|
| | Kontrollen | <i>HPE</i> -beh. | | |
| 1 | 28 | 14 | 50 | $F_m = \pm 3\%$ 58% |
| 2 | 38 | 18 | 52 | |
| 3 | 42 | 15 | 64 | |
| 4 | 34 | 12 | 65 | |

Tabelle 5. Substrat: Glucose + *NAD*
(Messung nach Auswaschen des Hemmstoffes)
Abb. 1, Säule IIIa

| Versuch | $\mu\text{l O}_2\text{-Verbrauch}$ pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|------------------|-----------|------------------------|
| | Kontrollen | <i>HPE</i> -beh. | | |
| 1 | 40 | 17 | 58 | $F_m = \pm 2\%$ 56% |
| 2 | 42 | 19 | 54 | |

Tabelle 6. Substrat: *NADH*
Abb. 1, Säule IV

| Versuch | $\mu\text{l O}_2\text{-Verbrauch}$ pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|------------------|-----------|------------------------|
| | Kontrollen | <i>HPE</i> -beh. | | |
| 1 | 57 | 26 | 54 | $F_m = \pm 2\%$ 47% |
| 2 | 59 | 38 | 35 | |
| 3 | 53 | 28 | 46 | |
| 4 | 52 | 26 | 50 | |
| 5 | 48 | 23 | 52 | |

Tabelle 7. Substrat: *NADH*
(Messung nach Auswaschen des Hemmstoffes)
Abb. 1, Säule IVa

| Versuch | $\mu\text{l O}_2\text{-Verbrauch}$ pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|------------------|-----------|------------|
| | Kontrollen | <i>HPE</i> -beh. | | |
| 1 | 60 | 60 | 0 | 0% |
| 2 | 85 | 86 | 0 | |

Tabelle 8. Substrat: Glucose + Cystein

(Messung nach Auswaschen des Hemmstoffes)

Abb. 1, Säule Va

| | + 25 μ Mol Cystein | | + 150 μ Mol Cystein | |
|--|------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| | Kontrollen | <i>HPE</i> -beh. | Kontrollen | <i>HPE</i> -beh. |
| μ l O ₂ -Verbrauch pro 60 Min. | 130* | 58 | 172** | 179 |
| % Hemmung | | 56 | | 0 |

* Bei Cysteinzusatz ergeben sich, wie diese sowie Tab. 18 zeigt, bei den Kontrollen Sauerstoffverbrauchswerte, die wesentlich höher sind als bei Verwendung von Glucose ohne Cystein und von der Cysteinmenge abhängig sind. Der Grund hierfür dürfte in einer Stimulierung der atmungsbeteiligten SH-Enzyme liegen.

Tabelle 9. Substrat: Pyruvat

Abb. 1, Säule I

| Versuch | μ l O ₂ -Verbrauch pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|--|------------------|-----------|-----------------|
| | Kontrollen | <i>HPE</i> -beh. | | |
| 1 | 45 | 11 | 75 | $F_m = \pm 2\%$ |
| 2 | 41 | 11 | 74 | |
| 3 | 33 | 8 | 76 | |
| 4 | 27 | 4 | 85 | |
| 5 | 45 | 11 | 75 | |
| 6 | 41 | 13 | 68 | |

Tabelle 10. Substrat: Trinatriumcitrat

Abb. 1, Säule I

| Versuch | μ l O ₂ -Verbrauch pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|--|------------------|-----------|-----------------|
| | Kontrollen | <i>HPE</i> -beh. | | |
| 1 | 30 | 7 | 77 | $F_m = \pm 2\%$ |
| 2 | 27 | 5 | 83 | |
| 3 | 36 | 7 | 81 | |
| 4 | 44 | 12 | 73 | |

Der Kürze halber und um die vorhin erwähnte Streuung der Absolutwerte für μ l O₂ zu zeigen, enthalten die Tabellen 3—21 nur mehr die nach 60 Min. Meßdauer verbrauchten μ l O₂ sämtlicher Einzelversuche mit den betreffenden Substraten.

Tabelle 11. Substrat: α -Ketoglutarat
Abb. 1, Säule I

| Versuch | $\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|----------|-----------|------------------------|
| | Kontrollen | HPE-beh. | | |
| 1 | 34 | 7 | 80 | $F_m = \pm 3\%$ 79% |
| 2 | 40 | 6 | 85 | |
| 3 | 48 | 17 | 65 | |
| 4 | 44 | 9 | 80 | |
| 5 | 35 | 4 | 88 | |
| 6 | 42 | 10 | 76 | |

Tabelle 12. Substrat: Na-Succinat
Abb. 1, Säule I

| Versuch | $\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|----------|-----------|------------------------|
| | Kontrollen | HPE-beh. | | |
| 1 | 48 | 18 | 63 | $F_m = \pm 3\%$ 71% |
| 2 | 55 | 9 | 84 | |
| 3 | 50 | 16 | 68 | |
| 4 | 47 | 17 | 64 | |
| 5 | 35 | 8 | 77 | |

Tabelle 13. Substrat: Na-Fumarat
Abb. 1, Säule I

| Versuch | $\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|----------|-----------|------------------------|
| | Kontrollen | HPE-beh. | | |
| 1 | 29 | 4 | 86 | $F_m = \pm 3\%$ 82% |
| 2 | 27 | 6 | 78 | |

Tabelle 14. Substrat: Oxalacetat
Abb. 1, Säule I

| Versuch | $\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|----------|-----------|------------------------|
| | Kontrollen | HPE-beh. | | |
| 1 | 35 | 5 | 86 | $F_m = \pm 3\%$ 83% |
| 2 | 26 | 5 | 80 | |

b) HPE-Konzentration im Inkubationsmedium $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l.

Tabelle 15. Substrat: Glucose
Abb. 2, Säule II

| Versuch | $\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|----------|-----------|---------------------------|
| | Kontrollen | HPE-beh. | | |
| 1 | 35 | 4,5 | 87 | 92% $F_m = \pm 1\%$ |
| 2 | 33 | 3,0 | 91 | |
| 3 | 41 | 2,1 | 95 | |
| 4 | 35 | 2,5 | 93 | |
| 5 | 40 | 3,2 | 92 | |

Tabelle 16. Substrat: Glucose
(Messung nach Auswaschen des Hemmstoffes)
Abb. 2, Säule IIa

| Versuch | $\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|----------|-----------|---------------------------|
| | Kontrollen | HPE-beh. | | |
| 1 | 35 | 2,5 | 93 | 92% $F_m = \pm 1\%$ |
| 2 | 38 | 3,4 | 91 | |
| 3 | 39 | 4,2 | 90 | |
| 4 | 54 | 2,8 | 95 | |
| 5 | 48 | 4,2 | 91 | |
| 6 | 47 | 4,7 | 90 | |

Tabelle 17. Substrat: NADH
(Messung nach Auswaschen des Hemmstoffes)
Abb. 2, Säule IV a

| Versuch | $\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|----------|-----------|-----------------|
| | Kontrollen | HPE-beh. | | |
| 1 | 65 | 25 | 62 | 59% |
| 2 | 75 | 33 | 56 | $F_m = \pm 3\%$ |

Tabelle 18. Substrat: Glucose + Cystein
(Messung nach Auswaschen des Hemmstoffes)
Abb. 2, Säule Va

| | + 25 μ Mol Cystein | | + 150 μ Mol Cystein | |
|---|------------------------|----------|-------------------------|----------|
| | Kontrollen | HPE-beh. | Kontrollen | HPE-beh. |
| $\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch pro 60 Min. | 130** | 55 | 172** | 156 |
| % Hemmung | | 58 | | 9 |

Messungen an isolierten Mitochondrien

Tabelle 19. Substrat: *NADH*
Abb. 3, Säule IV a; $\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch pro 60 Min.

| Versuch | Kontrollen | <i>HPE</i> -behandelt * | % Hemmung Mittelwert |
|---------|------------|-------------------------|-------------------------|
| 1 | 31,5 | 36 | 0 |
| 2 | 39,5 | 40,5 | 0 |
| 3 | 28,3 | 29,7 | 0 |
| 4 | 31,5 | 31 | 0 |
| 5 | 28,6 | 28,8 | 0 |

Tabelle 20. Substrat: Succinat
Abb. 3, Säule Ia

| Versuch | $\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|--------------------|-----------|-----------------|
| | Kontrollen | <i>HPE</i> -beh. * | | |
| 1 | 70 | 22 | 68 | $F_m = \pm 2\%$ |
| 2 | 86 | 22 | 74 | |
| 3 | 85 | 26 | 70 | |
| 4 | 76 | 27 | 64 | |
| 5 | 80 | 26 | 68 | |

Tabelle 21. Substrat: *NADH*
Abb. 3, Säule IV a

| Versuch | $\mu\text{l O}_2$ -Verbrauch pro 60 Min. | | % Hemmung | Mittelwert |
|---------|---|--------------------|-----------|-----------------|
| | Kontrollen | <i>HPE</i> -beh. * | | |
| 1 | 36 | 15 | 58 | $F_m = \pm 1\%$ |
| 2 | 34 | 13 | 62 | |

* Die Werte sind auf die mg Protein im Kontrollansatz berechnet.

Diskussion

Messungen an kompletten Zellen

a) *HPE*-Konzentration im Inkubationsmedium $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l.

Die mit den verschiedenen Substraten festgestellten Atmungshemmungen sind in Abb. 1 übersichtlich zusammengestellt. Daraus lassen sich folgende Aussagen ableiten:

1. Die durch *HPE* bewirkte starke Senkung des intrazellulären *NAD*-Spiegels ist am Zustandekommen der Atmungshemmung sicher

wesentlich beteiligt, wie die Atmungsmessung mit Glucose + *NAD*-Zusatz zeigt (vgl. Säule II und III, Abb. 1, Tab. 4).

2. Auch wenn der durch *HPE* bewirkte *NAD*-Abfall durch *NAD*-Zusatz kompensiert wird, verbleibt eine beträchtliche Resthemmung von 58%, die durch Blockaden *NAD*-abhängiger Dehydrogenasen sowie der Atmungskette bewirkt sein könnte.

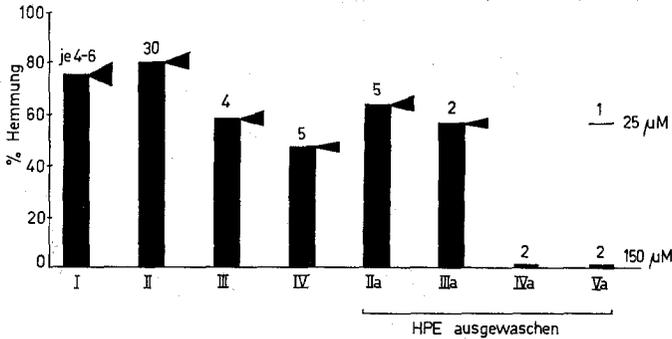


Abb. 1. Atmungshemmwerte nach Inkubation kompletter *EATZ* in $1 \cdot 10^{-3}m$ -*HPE*-Lösung. I: Substrate: Pyruvat bzw. Citrat, Ketoglutarat, Fumarat, Oxalacetat; II: Substrat: Glucose; III: Substrat: Glucose + *NAD*; IV: Substrat: *NADH*; Va: Substrat: Glucose + Cystein. a bedeutet stets, daß der Hemmstoff nach Vorinkubation ausgewaschen wurde. Die eingesetzten Substrate sind durch die gleichen römischen Zahlen symbolisiert

Tatsächlich wurde gefunden, daß bereits bei $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/l *HPE* die Aktivitäten der intrazellulären *GAPDH* um nahezu 100%, der *LDH* um etwa 90% abgenommen haben⁸.

Daß trotz dieser drastischen Aktivitätsverluste eine Zellatmung von immerhin noch 20 bzw. 42% der Kontrollen möglich ist, erklärt sich daraus, daß das *NAD* die Leistung der *GAPDH* limitiert und wenige Prozente der Aktivität des Enzyms hierfür noch ausreichen können.

Versuche mit kristallisierter *GAPDH*⁸ zeigten, daß die Inaktivierung durch direkte chemische Reaktion zwischen *HPE* und den funktionellen SH-Gruppen des Enzyms realisiert wird, indem sich die SH-Gruppen an die Doppelbindung des *HPE* unter Ausbildung eines Thioäthers addieren⁹. Bei der Inaktivierung der intrazellulären Enzyme ist die gleiche Reaktion anzunehmen. Daher bleibt auch die nach Zusatz von *NAD* beobachtete Resthemmung nach Auswaschen des Hemmstoffes bestehen (Tab. 5, Abb. 1, Säule IIIa).

⁸ E. Schauenstein, H. Esterbauer, M. Taufer, A. Kylianek und Th. Seelich, in Vorbereitung.

⁹ F. Dorner, Dissertat. Univ. Graz 1967; A. Kylianek, Dissertat. Univ. Graz 1968.

3. Die Blockade der Atmungskette (bzw. des *NADH*-Transportes in die Mitochondrien) tritt bei Verwendung von *NADH* als Substrat eindeutig zutage. Im Rückgang der Atmungshemmung von 58 auf 47% dürfte sich die nun wirkungslos gewordene Hemmung der *NAD*-abhängigen Dehydrogenasen äußern (Tab. 6, Abb. 1, Säule IV). Diese Blockade ist jedoch durch Auswaschen des Hemmstoffes voll aufhebbar und wird somit — zum Unterschied von der Inaktivierung der Dehydrogenasen — nicht durch chemische Reaktion, sondern vermutlich nur durch lockere Anlagerung des Hemmstoffes (Adsorption oder Ähnliches) bewirkt (Tab. 7, Abb. 1, Säule IVa).

4. Die mit Glucose als Substrat beobachtete 80proz. Atmungshemmung ist vollständig reversibel, wenn nach Auswaschen des Hemmstoffes Cystein in ausreichender Menge zugesetzt wird (Tab. 8, Abb. 1, Säule Va). Da nach den Versuchsbedingungen hier nur die Wirkung des chemisch gebundenen Aldehydanteils aufgehoben wird, bestätigt dieser Befund die Annahme, daß der Aldehyd mit den funktionellen SH-Gruppen für die Atmung verantwortlicher Enzyme (Dehydrogenasen) in Reaktion getreten ist.

In bester Übereinstimmung mit dieser Interpretation stehen folgende Befunde:

Kristallisierte *GAPDH*, die bekanntlich 4 funktionelle SH-Gruppen pro Molekül enthält, bindet bei vollständiger Inaktivierung in $4 \cdot 10^{-4}m$ -*HPE*-Lösung 4,6 Mole *HPE* pro Molekül und verliert hierbei 3,2 SH-Gruppen pro Molekül⁸. Das dadurch inaktivierte Enzym kann durch Cysteinzusatz innerhalb von Sekunden wieder voll aktiviert werden.

Nach Inkubation von *EATZ* in $5 \cdot 10^{-3}m$ -*HPE*-Lösung verlieren die Zellen 50% der proteingebundenen SH-Gruppen, 100% der nicht-proteingebundenen SH-Gruppen¹⁰ und etwa 80% der an Strukturproteine gebundenen SH-Gruppen¹¹. Dabei kann die intrazelluläre chemische Bindung des Aldehyds mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin histochemisch und mikrospektrometrisch nachgewiesen werden.

5. Zusätze von Metaboliten des Citratzyklus und von Brenztraubensäure vermögen die durch *HPE* bewirkte Atmungshemmung weder aufzuheben noch wesentlich zu vermindern (Tab. 9—14, Abb. 1, Säule I), woraus in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Bickis* et al.² geschlossen werden kann, daß die Atmungshemmung nicht etwa durch eine beschränkte Verfügbarkeit von Substraten des Tricarbonsäurecyclus bewirkt wird.

¹⁰ R. Rindler und E. Schauenstein, Z. Naturforsch. (1970); i. Dr.

¹¹ 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.

b) *HPE*-Konzentration im Inkubationsmedium $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l.

Untersucht man die karzinostatische Wirkung von *HPE* auf *EATZ* in vitro, so stellt man nach Inkubation mit $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l *HPE* und nachfolgender Transplantation in gesunde Mäuse eine erst teilweise Wachstumshemmung des Tumors fest. Vollständige Verhinderung des Tumorwachstums tritt erst bei *HPE*-Konzentrationen ab $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l auf¹². Daher schien es von Interesse zu untersuchen, ob die Erhöhung

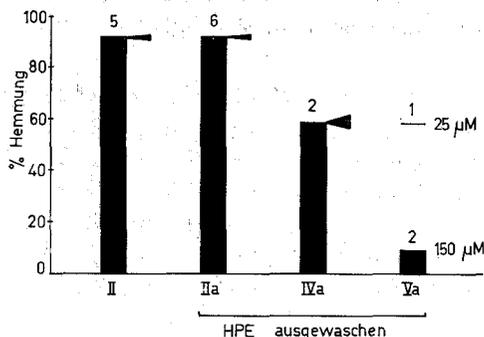


Abb. 2

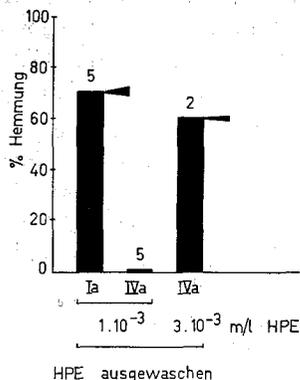


Abb. 3

Abb. 2. Atmungshemmwerte nach Inkubation kompletter *EATZ* in $3 \cdot 10^{-3}$ m-*HPE*-Lösung. II: Substrat: Glucose; IVa: Substrat: *NADH*; Va: Substrat: Glucose + Cystein (nach Auswaschen des Hemmstoffes)

Abb. 3. Atmungshemmwerte der Mitochondrien aus kompletten, mit *HPE* vorinkubierten *EATZ*. Ia: Substrat: Succinat; IVa: Substrat: *NADH* (nach Auswaschen des Hemmstoffes)

der *HPE*-Konzentration im Inkubationsmedium zu faßbaren Änderungen auch im Mechanismus der Atmungshemmung führt.

Im einzelnen ergibt sich:

1. Die Konzentrationserhöhung führt zu einem weiteren Anstieg der Atmungshemmwerte von $80 \pm 3\%$ auf $92 \pm 1\%$ (Tab. 15, Abb. 2, Säule II).

2. Die Hemmung bleibt auch nach Entfernung des locker angelagerten Aldehyds (Auswaschen) voll bestehen, d. h., daß die Blockierung des *NADH*-Transports oder der Atmungskette nicht mehr vollständig rückgängig zu machen ist (Tab. 16, Abb. 2, Säule IIa).

3. Dies äußert sich überzeugend darin, daß die Atmungshemmung mit *NADH* als Substrat nach Auswaschen des Aldehyds nur mehr teilweise aufhebbar ist (Tab. 17, Abb. 2, Säule IVa).

¹² M. Taufer und E. Schauenstein, in Vorbereitung.

4. Da *NADH* als Substrat die Atmungshemmung nicht mehr vollständig beseitigen kann, wäre zu fragen, ob die Schädigung von *NADH*-Transport oder Atmungskette durch chemische Bindung des Aldehyds bewirkt wurde oder etwa durch eine triviale Denaturierung von Enzymproteinen. Die Versuche mit Glucose als Substrat und Cysteinzusatz nach Auswaschen des Hemmstoffes ergeben, daß 150 μMol Cystein pro Ansatz die Atmung zwar nicht mehr vollständig, aber doch sehr weitgehend wiederherstellen können (Tab. 18, Abb. 2, Säule Va). Dies spricht eindeutig gegen eine ins Gewicht fallende Denaturierung der Proteine der Atmungskette, sondern vielmehr dafür, daß die bei $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l *HPE* noch lockere, vermutlich adsorptive Bindung des Aldehyds im Bereich von $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l in eine echte chemische Bindung mit funktionellen SH-Gruppen der Atmungskette (bzw. Enzymen des *NADH*-Transportes) übergeht.

Messungen an isolierten Mitochondrien

Die nach Inkubation der kompletten Zellen in $1 \cdot 10^{-3}$ und $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l *HPE*-Lösung an den daraus isolierten Mitochondrien festgestellten Atmungshemmungen sind in Abb. 3 zusammengestellt. Auf Grund der Präparationsmethodik ist klar, daß die an den isolierten Mitochondrien beobachteten Effekte den Versuchen mit kompletten Zellen entsprechen, bei denen der freie Hemmstoff im Medium entfernt und damit der locker gebundene Aldehyd aus den Zellen ausgewaschen wurde (vgl. hierzu die Säulen IV a der Abb. 1 und 2!).

Die Befunde mit *NADH* als Substrat ergeben in bester Übereinstimmung mit den bisher an den kompletten Zellen gewonnenen Erkenntnissen, daß die Atmungskette in $1 \cdot 10^{-3}m$ -*HPE*-Lösung noch vollständig reversibel durch locker gebundenen Hemmstoff blockiert wird, während in $3 \cdot 10^{-3}m$ -*HPE*-Lösung auch nach Auswaschen des Hemmstoffes eine Teilblockade bestehen bleibt* (Tab. 19 und 21, Abb. 3, Säule IV a). Die Versuche mit Cystein an den kompletten Zellen (Säulen Va der Abb. 1 und 2) zeigten, daß der Hemmstoff dabei mit SH-Gruppen, die für das Funktionieren der Atmungskette essentiell sind, in chemische Reaktion tritt.

Die Versuche mit Succinat-Zusatz weisen — in Übereinstimmung mit den an den kompletten Zellen erhobenen Befunden — eindeutig auf eine Blockade der SH-funktionellen Succinohydrogenase hin, die inzwischen

* Die Tatsache, daß *NADH* von den Mitochondrien veratmet wurde, deutet wohl auf eine, durch die Präparation bedingte Schädigung der äußeren Mitochondrienmembran, was aber für die gegenständliche Fragestellung ohne Belang ist.

histochemisch und auf Grund des Succinat-Anstauens bewiesen werden konnte¹³ (Tab. 20, Abb. 3, Säule Ia).

Zusammenfassend erscheinen somit hinsichtlich der bei *EATZ* durch *HPE* bewirkten Atmungshemmung folgende Mechanismen verantwortlich:

Drastischer Abfall des cytoplasmatischen *NAD*-Spiegels;

Inaktivierung von SH-Enzymen (Dehydrogenasen: *GAPDH*, *LDH*, *SDH*, vielleicht noch andere) durch chemische Bindung des Aldehyds an die funktionellen SH-Gruppen dieser Enzyme;

Teilweise Blockade der Atmungskette.

Bei Erhöhung der *HPE*-Konzentration im Inkubationsmedium von $1 \cdot 10^{-3}$ auf $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l tritt folgendes ein:

Die Atmungshemmung steigt von 80 auf über 90%; der bislang nur locker, vermutlich adsorptiv an die Atmungskette gebundene Hemmstoff geht nun mit funktionellen SH-Gruppen der Atmungskette eine echte chemische Bindung ein; die bislang teilweise Hemmung des Wachstums des Tumors wird vollständig.

Die vorliegenden ersten Einblicke in den Mechanismus der durch *HPE* bewirkten Atmungshemmung sollen als Grundlage für Untersuchungen über die biologisch interessante Frage dienen, wodurch die bemerkenswert ausgeprägten Unterschiede in der Empfindlichkeit der Atmung verschiedener Zellarten (z. B. maligne, nichtmaligne)^{2, 10} gegenüber *HPE* bedingt sind.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Wien, durchgeführt.

¹³ E. Kapfer, Dissertat. Univ. Graz.