

Über den Mechanismus der bei *Ehrlich*-Ascites-Tumorzellen durch Hydroxypentalal bewirkten Atmungshemmung, 2. Mitt.

Von

E. Schauenstein und E. Kapfer

Aus dem Institut für Biochemie der Universität Graz, Österreich

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 14. Juni 1971)

Mechanism of the Inhibition of Oxygen Uptake of Ehrlich Ascites Tumor Cells by Hydroxypentalal

Incubation of native Ehrlich Ascites-tumor cells in hydroxypentalal ($3 \cdot 10^{-3}$ moles/l) leads within 30 min. to an nearly complete respiration stop.

Besides of the hitherto already well known lowering of the cytoplasmatic NAD level and inhibition of the GAPDH and LDH, considerable inactivation of the intramitochondrial SDH, MDH and ICDH contribute substantially to this effect.

The extramitochondrial MDH, however, does not show any measureable inhibition. The observed inactivations are explained in terms of a reaction between the inhibitor and functional SH-groups of the said enzymes.

Die Einwirkung $3 \cdot 10^{-3}$ molarer Hydroxypentalal-Lösung führt innerhalb von 30 Min. zum praktisch vollständigen Stillstand der Atmung nativer Ehrlich Ascites-Tumorzellen.

An diesem Effekt ist — außer der bereits festgestellten Senkung des cytoplasmatischen NAD-Spiegels und Hemmung der GAPDH und LDH — eine erhebliche Inaktivierung der intramitochondrialen SDH, MDH und ICDH maßgeblich beteiligt. Die beobachteten Inaktivierungen werden durch Reaktion zwischen dem Inhibitor und funktionellen SH-Gruppen der genannten Enzyme erklärt. Die extramitochondriale MDH dagegen wird nicht meßbar gehemmt.

Problemstellung

Auf Grund der bisherigen Untersuchungen¹ ergab sich, daß Hydroxypentalal (*HPE*) die Atmung von *Ehrlich*-Ascites-Tumorzellen (*EATZ*) durch Senkung des NAD-Spiegels sowie Blockade von SH-funktionellen Dehydrogenasen und der Atmungskette hemmt.

* Herrn Prof. Dr. *Erich Ziegler* zum 60. Geburtstag mit den besten Wünschen gewidmet.

Von den genannten Dehydrogenasen wurden bisher lediglich die cytoplasmatischen Gärungsenzyme GAPDH und LDH untersucht, während eine Inaktivierung der SH-funktionellen Dehydrogenasen des Tricarbonsäurecyclus bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Die oben genannten Untersuchungen^{1c} machten jedoch eine Blockierung der Succino-Dehydrogenase sehr wahrscheinlich. In der vorliegenden Arbeit soll diese Annahme experimentell geprüft und außerdem ein etwaiger Einfluß auch auf die übrigen Dehydrogenasen des Cyclus untersucht werden.

Material

4-Hydroxy-2-trans-pentalal, synthetisiert nach Esterbauer und Weger² ($n_D = 1,47257$, Sdp._{0,4} 50–52 °C, Absorptionsmaximum bei γ 44 800, $\epsilon_{\max} = 13\ 800$); *EATZ*, Stamm Heidelberg-Lettré, aus denen auch die Mitochondrien (s. Methoden) gewonnen wurden (Versuchstiere: *NMRI*-Mäuse).

Bestimmung der Succinat-(Akzeptor-)Oxydoreductase 1.3.99.1 (SDH).

a) Cytochemisch: Substrat: Dinatriumsuccinat · 6 H₂O (Fa. Boehringer, Mannheim); H₂-Akzeptor: *MTT* [3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenylmonotetrazoliumbromid], Fa. BDH, England. Zum Schutz der Feinstruktur der Zellen: Polyvinylpyrrolidon (Schuchardt, München); PO₄-Puffer nach Sørensen 0,06 Mol/l, pH 7,4.

b) Durch Messung des Succinatgehaltes: Metaphosphorsäure, PO₄-Sørensen-Puffer 0,1, 0,01 und 0,05 Mol/l, pH 6,8. *TTC*: 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Fa. Merck, Darmstadt). Homogenat aus der Leber gesunder Ratten (Mischstamm).

Bestimmung der L-Malat:NAD-Oxydoreduktase 1.1.1.37 (MDH):

Mitochondrienisolierung: *PBS*-Lösung: Lösung A: 40 g NaCl, 1 g KCl, 5,75 g Na₂HPO₄, 1 g KH₂PO₄, ad 4 l H₂O; Lösung B: 0,5 g MgCl₂ · 6 H₂O, ad 0,5 l H₂O; Lösung C: 0,5 g CaCl₂ ad 0,5 l H₂O; A : B : C im Verhältnis 40 : 5 : 5 gemischt = *PBS*; Substrat: Dinatriumsalz der Oxalessigsäure (Fa. Boehringer Mannheim), Co-Enzym: NADH (Fa. Boehringer, Mannheim), K—P—PI: Kalium-PO₄-Puffer 0,1 Mol/l, pH 7,5.

Bestimmung der threo-D₅-Isocitrat:NAD-Oxydoreduktase 1.1.1.41 (ICDH). Substrat: DL-Trinatriumisocitrat · 2 H₂O, puriss. A. R. (Fa. Koch-Light, England); ADP (Fa. Boehringer, Mannheim); Glycylglycin, für biochemische Zwecke (Fa. Merck, Darmstadt); K—P—P II: Kalium-PO₄-Puffer pH 7,2, 1,0 und 0,5 Mol/l. Co-Enzym: NAD (Fa. Boehringer, Mannheim).

Methoden

EATZ wurden zwischen dem 7. und 9. Tag post transplant. aus der Bauchhöhle entnommen, bei 200 g zentrifugiert, mehrmals mit eiskalter isotoner NaCl-Lösung gewaschen, in eiskalter NaCl-Lösung aufgenommen und die Zellzahl mittels Hämatokrit bestimmt.

Bestimmung der SDH

a) Cytochemisch: 20 Mio Tumorzellen werden in 0,7 ml isotoner *HPE*-Lösung (Konz. 0,001 und 0,003 Mol/l, Test) bzw. isotoner NaCl-Lösung

(Kontrolle) 30 Min. bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend werden die Zellen bei 600 g abzentrifugiert, einmal mit eiskalter isotoner NaCl-Lösung gewaschen und schließlich, im zehnfachen Volumen der ursprünglichen Suspension, in isotoner NaCl-Lösung aufgenommen. Hievon wird ein Tropfen auf Objektträger aufgetragen und im Stickstoffstrom getrocknet. Darauf wird in *MTT*-Co-Lösung nach *Pearse*³ 30 Min. bei 37 °C inkubiert; nach Spülen mit 1proz. HCl fixiert man in 10proz. Ca-Formol, wässert kurz, benetzt die luftgetrockneten Objektträger mit Glyceringelatine (0,5 molar an CoCl_2) und deckt ein. Zur Untersuchung der Frage, ob die Wirkung von *HPE* auf die *SDH* durch Cystein rückgängig gemacht werden kann, wurden 20 Mio Tumorzellen nach Vorinkubation in $3 \cdot 10^{-3}$ molarer *HPE*-Lösung einmal mit eiskalter isotoner NaCl-Lösung gewaschen und 30 Min. in 0,7 ml Cysteinlösung nachinkubiert, bei 600 g abzentrifugiert, weiterbehandelt, wie eingangs beschrieben, und auf *SDH*-Aktivität gefärbt.

b) Bestimmung durch Messung des Succinatgehaltes: Je 1500 Mio Zellen des *EAT* wurden in 15 ml *Ringer*-Phosphat-Puffer pH 7,35 + 37,5 ml isotoner *HPE*-Lösung ($3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, Test) bzw. isotoner NaCl-Lösung (Kontrolle) 30 Min. bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, in 10 ml PO_4 -Puffer (0,1 Mol/l) aufgenommen und 1 Min. mit dem Ultraturrax unter Kühlung homogenisiert.

Das Homogenat wurde mit HPO_3 enteiweißt, zentrifugiert und der Überstand mit Äther (peroxydfrei) 3 Stdn. im Perforator extrahiert. Zum Ätherextrakt gibt man 1 ml *Sörensen*- PO_4 -Puffer 0,5 Mol/l pH 6,8 und 1 ml Na_2HPO_4 -Lösung 0,5 Mol/l, dampft den Äther ab und setzt die wäbr. Lösung in die Succinatbestimmung ein. Das Succinat wurde mit jeweils frischem Leberhomogenat und *TTC* nach *Bril*⁴ bestimmt.

Hiezu wurde blutfrische Rattenleber gewogen, mit dem Skalpell verzerkleinert, in 0,01molarem PO_4 -Puffer pH 6,8 aufgenommen und mit dem Ultraturrax 1 Min. bei 0 °C homogenisiert. Das Homogenat wurde mit Puffer auf einen Gehalt von 150 mg Feuchtgewicht/ml gebracht; je 1 ml hiervon wurde mit 1 ml der *TTC*-Lösung und 1 ml Puffer bekannter Succinatkonzentration versetzt und 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Man setzt 5 ml Aceton zu, läßt 10 Min. in Eiswasser stehen, schüttelt gut durch, zentrifugiert und photometriert den klaren Überstand mit 1 cm Schichtdicke bei 480 nm. Die gemessenen Extinktionen (im Bereich von 0,1 bis 1,6) standen zu den eingesetzten Succinatmengen in linearer Beziehung, der sodann die im Untersuchungsgut enthaltene Succinatmenge interpolativ entnommen wurde. Mit jeder verwendeten Charge von Leberhomogenat wurde eine eigene Eichkurve aufgenommen.

Um zu prüfen, ob die gegen den Blindwert gemessene Extinktion tatsächlich dem Succinat zuzuordnen oder etwa durch im Ätherextrakt vorhandene Störmetaboliten oder im Leberhomogenat anwesende NAD-pflichtige Dehydrogenasen (+ Co-Enzyme) beeinflusst war, wurden folgende Kontrollen durchgeführt:

A. Ätherextrakte aus *EATZ* wurden sowohl mit gewaschenem als auch ungewaschenem Leberhomogenat zur Reaktion gebracht.

B. Zum ungewaschenen Leberhomogenat wurden zugesetzt: Na-Ketoglutarat, -Isocitrat, -Malat und -Succinat in Mengen von 100 bis 1000 γ (bei Ketoglutarat 2000 γ) einzeln sowie auch eine Mischung von Ketoglutarat und Succinat im Verhältnis 5:1 und 10:1 zugesetzt und die Extinktionen bei 480 nm gemessen.

C. Der succinathaltige Extrakt aus *EATZ* wurde mit Semicarbazid (0,05 mMole/0,1 ml) 2 Stdn. bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, sodann mit *TTC* und Leberhomogenat auf Succinat untersucht und die Extinktion mit der bei dem unbehandelten Extrakt erhaltenen verglichen.

Bestimmung der MDH

a) Mitochondriale MDH: Mitochondrienpräparation: Für die Bestimmung der MDH in Mitochondrien der *EATZ* wurden die Mitochondrien nach *Martin*⁵ isoliert, wobei pro Ansatz 2000 bis 3000 Mio Zellen eingesetzt wurden.

Präparation des Enzymextraktes aus dem Acetontrockenpulver

Aus den Mitochondrien wird nach der Methode von *Plaut* und *Sung*⁶ das Acetontrockenpulver gewonnen. Das im Vak. getrocknete, gelblich-weiße Pulver wird in einer Konzentration von 50 mg/ml in K—P—P I aufgenommen, zu einer homogenen Suspension verrührt und 1 Stde. extrahiert. Man zentrifugiert vom Ungelösten ab und setzt den Überstand nach Feststellung der Proteinkonzentration zur enzymatischen Messung ein (= Enzymextrakt). Der Proteingehalt des Enzymextraktes wurde mit der Biuret-Methode⁷ bestimmt, wobei Rinderserumalbumin als Standard diente. Gemessene Extinktion $\times 43,5 = \text{mg Protein}/10 \text{ ml Enzymextrakt}$ (546 nm, 1 cm Schichtdicke).

Messung der MDH im Enzymextrakt

Vorschrift: Biochemica-Boehringer Informationen. Meßanordnung: nacheinander in die 1 cm Küvette pipettieren: 2,84 ml Kaliumphosphatpuffer (pH = 7,5, 0,1 Mol/l), 0,10 ml Oxalessigsäure (2 mg/ml), 0,05 ml NADH (10 mg/ml); gut durchmischen, Anfangsextinktion bei 366 nm gegen K—P—P messen, Zusatz von 0,01 ml Enzymextrakt (unverdünnt), 3,00 ml Gesamtvolumen (Spektralphotometer PMQ II Zeiss).

Auswertung

Nach Zugabe des Enzymextraktes wurde die Extinktion alle 15 Sek. abgelesen, gewartet, bis eine Abnahme um 0,025 eingetreten war, und nun die Zeit *t* ermittelt, die zur weiteren Extinktionsabnahme von 0,025 erforderlich war.

Die Errechnung der Enzymaktivität erfolgte nach *Racker*, wonach eine Einheit (*U*) der Enzymaktivität definiert ist als die Enzymmenge, die in 1 Min. 1 μMol Substrat reduziert.

$$U/\text{mg} = \frac{\mu\text{Mol}}{\text{min} \cdot \text{mg Protein}}$$

b) Cytoplasmatische MDH: Nach dem Zellaufschluß werden Kerne, Zellmembranen und unaufgebrochene Zellen durch Zentrifugieren abgetrennt⁵, die im Überstand befindlichen Mitochondrien ebenfalls zur Sedimentation gebracht und der nun erhaltene Überstand 6 Stdn. gegen *EDTA*-Lösung (10^{-4} Mol/l) bei + 4 °C dialysiert und schließlich lyophilisiert. Das Trockenpulver wird in dest. Wasser aufgenommen (100 mg/ml) und der Enzymextrakt, nach dem Abtrennen des Ungelösten, zur Messung auf MDH-Aktivität, wie oben beschrieben, eingesetzt.

Die Auswertung erfolgte ebenso wie oben beschrieben.

Bestimmung der ICDH

Die Mitochondrien wurden wiederum, wie bereits beschrieben⁵, isoliert; daraus wurde das Acetonrockenpulver hergestellt (vgl. MDH-Bestimmung), das mit K—P—P II 1 Mol/l 1 Stde. extrahiert wurde (50 mg/ml). Man zentrifugiert vom Ungelösten ab, bringt das pH mit Eisessig auf 6,5 und fraktioniert im Bereich zwischen 0,27 und 0,37 Sättigungsgrad an Ammoniumsulfat. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, in 1 ml K—P—P II-Puffer 0,5 Mol/l gelöst, diese Suspension 4 Stdn. gegen EDTA-Lösung dialysiert und dann zur Messung eingesetzt.

Meßgröße für die Aktivitätsbestimmung ist wieder die Absorption des gebildeten NADH bei 1 cm Schichtdicke.

Die Standardreaktionsmischung enthält in μ Molen/ml Endlösung: Isocitrat 2,5, NAD 0,7, $MnCl_2$ 0,3, K-Phosphat 5,0 pH 7,2, Glycylglycin 25,0 pH 7,2, ADP 1,0.

Die Errechnung der Enzymaktivität erfolgte wiederum nach *Racker*.

Ermittelt wurde die Zeit, die für eine Extinktionsänderung von 0,050 nötig ist, nach primärer Extinktionszunahme von 0,05.

Ergebnisse

Bestimmung der SDH

a) *Cytochemisch*

In 5 Versuchsreihen mit je 4 Einzelpräparaten zeigten die Kontrollen gefärbte Formazan-Granula im Cytoplasma, während die Kerne ungefärbt blieben.

Die mit *HPE* vorinkubierten Zellen ergaben bei einer *HPE*-Konzentration von $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l keinen sicher erkennbaren Unterschied gegenüber den Kontrollen, bei $3 \cdot 10^{-3}$ Mol *HPE*/l dagegen nur sehr schwache Farbintensitäten (vgl. hierzu Abb. 1 a, b). Bei den nach *HPE*-Behandlung mit Cystein nachinkubierten Zellen zeigten sich keine Unterschiede in der SDH-Färbung im Vergleich mit den diesbezüglichen Kontrollen (NaCl-Vorinkubation, Cystein Nachinkubation).

b) *Succinatbestimmung*

Zunächst mußte sichergestellt werden, daß die mit dem Untersuchungsmaterial erhaltenen Extinktionswerte tatsächlich dem darin enthaltenen Succinat zuzuordnen waren.

Bei Kontrolle A (vgl. Methoden) ergab sich, daß bei Einsatz von gewaschenem bzw. ungewaschenem Leberhomogenat praktisch keine Unterschiede auftraten: 1000 Mio *EATZ* ergaben in 5 Einzelansätzen Extinktionswerte, die, aus der jeweiligen Eichgeraden auf Succinat umgerechnet, im ersten Fall 395, im zweiten 392 γ entsprechen.

Bei Kontrollversuch B ergaben sich bei verschieden großen Zusätzen von Ketoglutarat, Isocitrat und Malat Extinktionswerte, die zwischen

0 und maximal 0,1 lagen und keinen Zusammenhang mit der Größe des Zusatzes zeigten. Demgegenüber lagen die bei den untersuchten Zellen

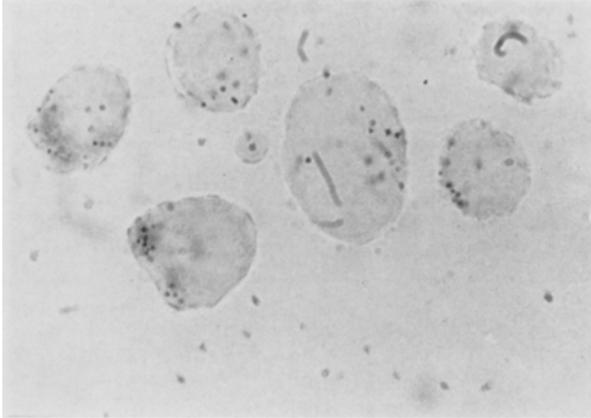


Abb. 1a

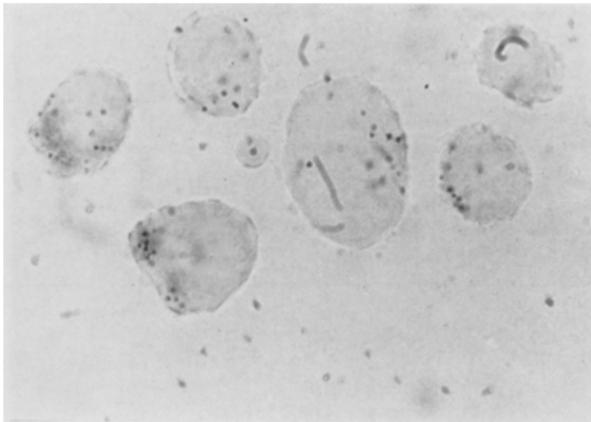


Abb. 1b

Abb. 1. Vitale *EATZ*, 7. bis 9. Tag p. transpl., angefärbt mit *MTT* auf Aktivität der *SDH*. a) Nach halbstündiger Inkubation bei 37 °C in 0,9% *NaCl*; b) nach halbstündiger Inkubation bei 37 °C in $3 \cdot 10^{-3}$ molarer *HPE*-Lösung

gefundenen Extinktionswerte zwischen 0,4 und 1,5, so daß im ungünstigsten Fall eine etwa durch extrem hohen Ketoglutaratgehalt bedingte Korrektur etwa 25% betragen könnte. Um auch diese Möglichkeit zu prüfen, wurde Kontrollversuch C angesetzt (vgl. Methoden).

In 2 Einzelversuchen (I und II) ergaben sich folgende Extinktionswerte:

Tabelle 1. Metabolitextrakt

	Ohne Semicarbazid- behandlung	Mit Semicarbazid- behandlung
I	0,672	0,714
II	0,670	0,650

Tabelle 2. Succinatanstau in nativen *EATZ* nach 30min. Vorinkubation in $3 \cdot 10^{-3}$ molarer *HPE*-Lösung (die Mittelwerte der Kolonne 2 und 4 sind mit Standardfehlern angegeben)

Versuchsansatz	Succinatmenge in γ/g Kontrolle	Feuchtgewicht Test	Paardifferenz in %
1	135	287	112,5
2	138	286	107,0
3	124	223	80,0
4	128	248	94,0
5	158	287	81,5
	Mittel: 137 ± 6		Mittel: $95 \pm 6,5$

Tabelle 3. MDH-Aktivitäten der Mitochondrien NaCl- bzw. *HPE*-behandelter Tumorzellen

(t = Sekunden, die für das Absinken der NADH-Extinktion um 0,025 benötigt wurden, nachdem die Ausgangsextinktion um 0,025 gesunken war; U/mg siehe Methoden)

Vorbehandlung der Zellen	mg Protein in 0,01 ml Enzymextrakt	t	U/mg
30 Min bei 37 °C in 0,9% NaCl (Kontrolle)	1 $5,64 \cdot 10^{-2}$	7	3,48
	2 $5,52 \cdot 10^{-2}$	7	3,49
	3 $7,50 \cdot 10^{-2}$	5,8	3,14
	4 $6,12 \cdot 10^{-2}$	7	3,18
	5 $6,68 \cdot 10^{-2}$	6	3,40
	6 $6,36 \cdot 10^{-2}$	7	3,08
Wie oben, jedoch in $3 \cdot 10^{-3}$ Mol <i>HPE</i> /l (Test)	1 $3,80 \cdot 10^{-2}$	17	2,11
	2 $4,64 \cdot 10^{-2}$	16	1,84
	3 $4,56 \cdot 10^{-2}$	14	2,15
	4 $4,66 \cdot 10^{-2}$	16	1,83
	5 $5,80 \cdot 10^{-2}$	8	2,93
	6 $5,57 \cdot 10^{-2}$	9	2,71
	7 $5,96 \cdot 10^{-2}$	8	2,86

Für den Unterschied der Mittelwerte aus Kontroll- und Testansätzen ergibt sich nach dem zweiseitigen Studenttest eine Signifikanzwahrscheinlichkeit von $2P < 0,001$.

Tabelle 4. MDH-Aktivitäten des Cytoplasmas NaCl- bzw. HPE-behandelter Tumorzellen

Vorbehandlung der Zellen	mg Protein in 0,01 ml Enzymextrakt	<i>t</i>	<i>U</i> /mg
30 Min bei 37 °C in 0,9% NaCl (Kontrolle)	1 25,9 · 10 ⁻²	6	0,96
	2 20,3 · 10 ⁻²	7	0,88
	3 19,0 · 10 ⁻²	5,25	1,37 Mittel: 1,18 ± 0,106
	4 17,1 · 10 ⁻²	6	1,33
	5 18,4 · 10 ⁻²	5,5	1,35
Wie oben, jedoch in 3 · 10 ⁻³ Mol HPE/l (Test)	1 16,5 · 10 ⁻²	6	1,38
	2 26,4 · 10 ⁻²	5	1,04 Mittel: 1,18 ± 0,073
	3 27,0 · 10 ⁻²	4,5	1,12
	4 20,2 · 10 ⁻²	5,75	1,18

Tabelle 5. Aktivitäten der ICDH aus den Mitochondrien NaCl- bzw. HPE-behandelter Tumorzellen

(mU = milli-Units; Definition von *U*/mg wie bei MDH-Bestimmungen; *t* = Sekunden, die für die Extinktionszunahme von 0,05 erforderlich sind nach primärer Extinktionszunahme von 0,05)

Vorbehandlung der Zellen	mg Protein in 0,2 ml Enzymextrakt	<i>t</i>	mU/mg
30 Min bei 37 °C in 0,9% NaCl (Kontrolle)	1 10,0 · 10 ⁻¹	60	9,64
	2 5,1 · 10 ⁻¹	139	8,13
	3 5,3 · 10 ⁻¹	117	9,33 Mittel: 8,97 ± 0,33
	4 5,4 · 10 ⁻¹	121	8,79
Wie oben, jedoch in 3 · 10 ⁻³ Mol HPE/l (Test)	1 2,16 · 10 ⁻¹	458	5,85
	2 2,40 · 10 ⁻¹	423	5,70 Mittel: 5,32 ± 0,28
	3 4,40 · 10 ⁻¹	256	5,15
	4 8,10 · 10 ⁻¹	156	4,58

Da durch die Semicarbazidbehandlung ein ggf. vorhandener Anteil an Ketoglutarat ausgeschaltet würde, schließen die Ergebnisse einen ins Gewicht fallenden Ketoglutaratgehalt im Metabolitextrakt aus.

Zusammenfassend ergibt sich aus den drei Kontrollversuchen, daß die bei den Zellextrakten festgestellten Extinktionswerte (vgl. Tab. 2) im wesentlichen dem anwesenden Succinat zugeordnet werden dürfen.

Die Ergebnisse der Aktivitätsmessung an der mitochondrialen MDH bringt Tab. 3, an der cytoplasmatischen MDH Tab. 4. Man erkennt aus Tab. 3, daß die mitochondriale MDH durch HPE im Mittel um 28,5 ± 6% gehemmt wird.

Tab. 5 enthält die gemessenen ICDH-Aktivitäten, aus denen eine durchschnittliche Hemmung von 40,2 ± 4% hervorgeht.

Diskussion

Der mit *HPE*-behandelten *EATZ* gemessene Anstau an Succinat liefert im Vergleich zu den Kontrollen in Verbindung mit der Intensitätsabnahme der cytochemischen Färbung auf SDH-Aktivität den Beweis für die in der vorangegangenen Arbeit^{1c} ausgesprochene Vermutung, daß *HPE* die SDH blockiert.

Bei $1 \cdot 10^{-3}$ Mol *HPE*/l setzt die Hemmung offenbar ein und ist bei $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l bereits erheblich, da bei dieser Konzentration der intrazelluläre Succinat Spiegel in den *HPE*-behandelten Zellen etwa doppelt so hoch liegt wie in den Kontrollen. Die Empfindlichkeit der SDH gegenüber *HPE* wird erklärlich, wenn man berücksichtigt, daß für die Aktivität des Enzyms Thiolgruppen von funktioneller Bedeutung sind⁸ und daß *HPE* gegenüber SH-Gruppen sehr reaktiv ist⁹. Die Befunde an mit *HPE* vorbehandelten und mit Cystein nachbehandelten Zellen zeigten deutlich, daß die durch *HPE* bewirkte Hemmung der SDH durch Cystein aufgehoben werden kann, was für die Reaktion von *HPE* mit den funktionellen SH-Gruppen der SDH spricht.

Die an der SDH erhobenen Befunde legten nahe zu untersuchen, ob auch andere Dehydrogenasen des Tricarbonsäurecyclus der Tumorzellen durch *HPE* betroffen werden.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß dies sowohl bei der MDH als auch bei der ICDH der Fall ist. Die intramitochondriale MDH wird zu nahezu 30% gehemmt, die ICDH zu etwa 40%.

Von besonderem Interesse erscheint der Befund, daß die cytoplasmatische MDH durch *HPE* nicht meßbar inaktiviert wird. Ganz ähnlich verhält sich nach *Englard* und *Siegel*¹⁰ die MDH aus Rinderherzmuskelzellen gegenüber einem anderen, bekanntlich hochaktiven SH-Reagens, nämlich p-Chlormercuribenzoat (*PMB*):

Das mitochondriale Enzym enthält 12—13 SH-Gruppen und wird durch 3 Äquivalente *PMB* vollständig inaktiviert, während die MDH des Cytoplasmas nur 6 SH-Gruppen enthält (davon 3 *PMB*-sensitiv) und durch *PMB* nicht inaktiviert wird. Daraus ist zu schließen, daß beide Enzyme funktionelle SH-Gruppen besitzen, die jedoch in der cytoplasmatischen MDH gegen Einwirkung von SH-Reagentien besonders geschützt eingebaut vorliegen.

Aus den Befunden ergibt sich, daß *HPE* die Umwandlung von Oxalacetat in Malat im Cytoplasma und damit auch die Funktion der cytoplasmatischen MDH für den Transport reduzierender NADH-Äquivalente in das Mitochondrion¹¹ kaum beeinflussen dürfte.

Auch die deutliche Hemmung der ICDH läßt sich durch Reaktion des *HPE* mit der funktionellen SH-Gruppe dieses Enzyms erklären.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die Einwirkung von $3 \cdot 10^{-3}$ molarer *HPE*-Lösung auf intakte *EATZ* außer der Senkung des cytoplasmatischen NAD-Spiegels, Inaktivierung der GAPDH und LDH¹ und Blockade der Atmungskette^{1c} auch eine erhebliche Inaktivierung der Dehydrogenasen des Tricarbonsäurecyclus (SDH, MDH und ICDH) bewirkt. Damit wird das Angebot an Substratwasserstoff für die Atmungskette wesentlich herabgesetzt und man kann annehmen, daß auch dieser Effekt am Zustandekommen der durch *HPE* bewirkten Atmungshemmung maßgeblich beteiligt ist.

Demonstrierten Senkung des NAD-Spiegels und die Inaktivierung von GAPDH und LDH¹ die Wirkung des *HPE* auf den Stoffwechsel im cytoplasmatischen Raum, so zeigt die Blockade der Atmungskette^{1c} sowie der SDH klar, daß *HPE* in das Mitochondrion eintritt, in der Innenmembran eingelagerte Oxydoreduktasen erreichen und durch Reaktion mit deren funktionellen SH-Gruppen schädigen kann.

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

Literatur

¹ a) *E. Schauenstein, H. Esterbauer, M. Taufer* und *H. Jaag*, Mh. Chem. **95**, 180 (1963); b) *I. J. Bickis, E. Schauenstein* und *M. Taufer*, Mh. Chem. **100**, 1077 (1969); c) *E. Schauenstein, H. Verdino* und *M. Taufer*, Mh. Chem. **101**, 1189 (1970).

² *H. Esterbauer* und *W. Weger*, Mh. Chem. **98**, 1884, 1994 (1967).

³ *E. Pearse*, Histochemistry Bd. II, 536, 910. London: Churchill. (1960).

⁴ *C. Bril*, Biochim. Biophys. Acta **15**, 258 (1954).

⁵ *E. M. Martin, J. Malec, J. L. Coote* und *T. S. Work*, Biochem. J. **80**, 606 (1961); *A. O. Hawtrey* und *M. H. Silk*, Biochem. J. **74**, 21 (1960); *K. B. Freeman*, Biochem. J. **94**, 494 (1965); *J. B. Clare, A. L. Greenbaum* und *T. F. Slater*, Biochem. J. **94**, 651 (1965).

⁶ *G. W. Plaut* und *S. C. Sung*, J. biol. Chem. **207**, 305 (1954); *A. M. Stein* und *S. K. Kirkman*, Biochem. **6**, 3197 (1967).

⁷ *J. Legget Bailey*, Techniques in Protein Chemistry, Kap. 11, 295. Elsevier (1962).

⁸ *E. Stotz* und *M. Florkin*, Compr. Biochem. **14**, 157 (1966).

⁹ *H. Esterbauer*, Mh. Chem. **101**, 782 (1970).

¹⁰ *L. Siegel* und *S. Englard*, Biochim. Biophys. Acta **64**, 101 (1962).

¹¹ *H. A. Krebs*, in: Biochemistry of Mitochondrion, S. 105 (*C. Slater, Z. Kaviuga* und *L. Wojtczak*, Hrsg.), Acad. Press. 1967.