

# Der Einfluß von 4-Hydroxy-2,3-pentenal (HPE) auf die Vermehrung von Vaccinia-Virus in Hühnerfibroblastenkulturen

Influence of 4-Hydroxy-2,3-pentenale (HPE) on the Multiplication of Vaccinia-virus in Chick-embryo Fibroblast Cultures

V. Dostal, E. Schauenstein, P. Kulnigg und E. Schmeller

Institut für Krebsforschung der Universität Wien (Vorstand: Prof. Dr. H. Wrba), Abteilung für Virologie und Institut für Biochemie der Universität Graz (Vorstand: Prof. Dr. E. Schauenstein)

(Z. Naturforsch. **29 c**, 76–81 [1974]; eingegangen am 2. Januar/30. Juli 1973)

Vaccinia-virus, Inhibition of DNA Synthesis, 4-Hydroxy-2,3-pentenale

The influence of 4-hydroxy-2,3-*trans*-pentenale (HPE) on multiplication of Vaccinia virus in chick fibroblast cultures has been investigated. The cytotoxicity of HPE has been estimated by incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine, [<sup>3</sup>H]uridine, [<sup>3</sup>H]leucine and by morphological tests. The greatest influence of HPE was seen after incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine.

Chick-embryo cultures infected with Vaccinia virus showed a marked increase of DNA synthesis in contrast to the controls. This increase averaged 180% after 16 to 14 hours. HPE  $0.05 \cdot 10^{-3}$  M caused a reduction of 72% in [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in virus infected cultures. At the same time virus concentration decreased by 76%. HPE  $0.1 \cdot 10^{-3}$  M, a concentration which inhibits the normal cell DNA synthesis by 50%, caused about 90% inhibition in infected cultures; virus multiplication was 99% inhibited. These findings have been attributed to a selective inhibition of virus DNA synthesis by HPE, and possible mechanisms are discussed.

4-Hydroxy-2,3-*trans*-enale stellen eine Gruppe von Aldehyden dar, deren erster Vertreter – Hydroxyoctenal – aus den wasserlöslichen Autoxydationsprodukten von 9,12-Methylinoleat isoliert wurde<sup>1</sup>.

4-Hydroxy-enale entfalten starke und sehr gezielte Hemmeffekte im Energie- und Synthesestoffwechsel, wobei im allgemeinen hochproliferative Zellen (z. B. maligne Zellen) viel stärker betroffen werden als normale<sup>2</sup>.

Alle bisher bekanntgewordenen biochemischen und biologischen Hemmwirkungen der Hydroxyenale beruhen auf demselben Wirkungsmechanismus: Der Reaktion mit funktionellen Thiolen, wobei es unter Addition der SH-Gruppe an die C<sub>2</sub>=C<sub>3</sub>-Gruppe des Aldehyds zur Ausbildung von Thioäthern kommt<sup>3</sup>.

In der bereits synthetisch zugänglichen, homologen Reihe der Hydroxyenale (4-C bis 14-C)<sup>4</sup> besitzt das 5-C-homologe Hydroxy-pentenal (HPE) den Vorteil hoher Hemmwirksamkeit verbunden mit guter Wasserlöslichkeit und wurde deshalb für die meisten der bisherigen Untersuchungen verwendet.

Unter dem Einfluß von HPE wird, nach Bickis u. Mitarb.<sup>5</sup>, der Einbau von Adenin in die DNA

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. E. Schauenstein, Institut für Biochemie der Universität Graz, A-8010 Graz, Halbährtgasse 5/I.

von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen wesentlich stärker gehemmt als der Einbau von Adenin in die RNA bzw. von Leucin in die Proteine. Weiters wurde gefunden, daß die DNA-Synthese in Ehrlich-Tumorzellen und Sarkom-37-Zellen um ein Vielfaches stärker gehemmt wird als in Normalgeweben.

Auch Seeber u. Mitarb.<sup>6</sup> fanden, daß der Einbau von Thymidin in die Ehrlich-Tumorzellen durch HPE deutlich stärker gehemmt wird, als der von Uridin und Leucin, und daß die DNA-Polymerase im zellfreien System stärker gehemmt wird als die DNA-abhängige RNA-Polymerase. Außerdem ließ sich in HPE-behandelten Ehrlich-Tumorzellen eine Anhäufung der Nukleosid-mono- und -diphosphate unter gleichzeitiger Abnahme der Triphosphate nachweisen.

Scaife<sup>7</sup> berichtete über Mitosehemmungen und morphologische Schäden durch HPE bei Zellen unter verschiedenen Proliferationsbedingungen, wobei sich zeigte, daß die cytotoxische Wirkung von HPE bei lebhaft proliferierenden Zellen viel stärker in Erscheinung tritt als bei kontaktgehemmten.

Die beschriebenen Befunde veranlaßten uns nachzuprüfen, ob HPE in bestimmten Konzentrationen in der Lage ist, die Vermehrung des DNA-haltigen Vaccinia-Virus in der Gewebekultur zu beeinflussen, ohne auf die Wirtszelle toxisch zu wirken<sup>8</sup>.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

## Material und Methoden

### Gewebekulturen

Die Untersuchungen wurden mit Hühnerfibroblasten (HF)-Kulturen, die von 9 Tage alten Hühnerembryonen gewonnen wurden, vorgenommen. Der Gewebeaufschluß erfolgte nach Youngner<sup>9</sup>, die Aussaat der Zellen in Liquid-Scintillation (LS)-Fläschchen<sup>10</sup>. Als Wachstumsmedium verwendeten wir 0,5% Lactalbumin-Hydrolysat in Hanks-BSS mit 10% Kälberserum (KS), für die Inkubation der Zellen mit 4-Hydroxy-2,3-trans-pentenal (HPE) Minimum Essential Medium (Eagle) mit Hanks Salzen (MEM), für die Verdünnung der radioaktiven Substanzen Minimum Essential Medium (Eagle) mit Earle-Salzen (MEME).

### Virus

Vaccinia-Virus, Stamm Elstree, lyophilisiert. Die HF-Kulturen wurden mit 10 pock-forming-units (p.f.u.) pro Zelle (0,1 ml Virussuspension pro LS-Fläschchen) infiziert; Adsorptionszeit 2 Stunden bei 37 °C. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen mit je 2 ml Hanks-BSS. Kulturen, bei denen die Viruskonzentration ermittelt werden sollte, wurden zunächst bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mechanisch von der Glasoberfläche gelöst und anschließend durch Ultraschall (90 W, 1 min unter Eiskühlung) homogenisiert. Die Bestimmung der Viruskonzentration erfolgte durch Beimpfung der Chorioallantoismembran (CAM) bebrüteter Hühnereier. Für die Herstellung der Verdünnungsreihen zur Viruskonzentrationsbestimmung verwendeten wir McIlvaine-Puffer (Phosphatkonzentration 0,004 M), pH 7,4 mit einem Zusatz von 3% Meerschweinchenserum (weitere Methodik siehe bei Grist u. Mitarb.<sup>11</sup>).

4-Hydroxy-2,3-trans-enale stellen eine Gruppe von Aldehyden dar, deren erster Vertreter – Hydroxyoctenal – aus den wasserlöslichen Autoxydationsprodukten von 9,12-Methylolinoleat isoliert wurde<sup>1</sup>.

### HPE

4-Hydroxy-2,3-trans-pentenal wurde nach Esterbauer u. Mitarb.<sup>4</sup> synthetisiert. Die Stammlösung (ca. 10<sup>-2</sup> M) wurde mit isotoner NaCl-Lösung auf das 10-fache verdünnt und aus dieser Lösung durch Zusatz von MEM die erforderlichen Arbeitskonzentrationen hergestellt.

### <sup>3</sup>H-markierte Verbindungen

L-[4,5-<sup>3</sup>H]Leucin (Aktivität 5 Ci/mMol), [<sup>3</sup>H]Methyl-thymidin (15 Ci/mMol) und [5-<sup>3</sup>H]Uridin

(20 Ci/mMol); Fa. NEN-Chemicals, BRD. Die markierten Vorstufen wurden in MEME auf 1 µCi/ml verdünnt.

### Inkubation mit HPE

Das Medium der HF-Kulturen wurde entfernt, der Zellrasen zweimal mit je 2 ml Hanks-BSS gewaschen. Die Kontrollen erhielten MEM mit 10% (V/V) Zusatz physiologischer NaCl-Lösung, die Versuchskulturen MEM mit 10% (V/V) HPE der entsprechenden Konzentration; zugesetztes Volumen 2 ml pro LS-Fläschchen (Inkubation 1 Stunde bei 37 °C).

Zur Überprüfung einer eventuellen *Inaktivierung* von Vaccinia-Virus (Abschnitt 3) durch HPE wurde lyophilisiertes Virus in MEM in einer Konzentration von 5 · 10<sup>7</sup> p.f.u./ml suspendiert und HPE-Lösung zugesetzt (Endkonzentration an HPE 0,05 · 10<sup>-3</sup> bzw. 0,1 · 10<sup>-3</sup> M). Den Kontrollansätzen wurden entsprechende Volumina von 0,9-proz. NaCl-Lösung zugefügt. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Inkubate bei 109 000 × g zentrifugiert, die Sedimente durch Ultraschall im ursprünglichen Volumen Hanks-BSS resuspendiert und zur Infektion der HF-Kulturen verwendet.

### Bestimmung der Radioaktivität

Der Einbau der radioaktiven Verbindungen wurde durch Zusatz von 5 ml kalter 10-proz. Trichloressigsäure (TCE) pro Kulturflasche gestoppt. Nach Auswaschen des säurelöslichen Materials<sup>12</sup> wurden die Zellen mit 0,5 ml Soluene (Packard) über Nacht bei 37 °C Toluol-löslich gemacht. Anschließend Zusatz von 5 ml Toluol-Scintillator (0,4-proz. Lösung von Omniflour – 98% PPO und 2% MSB in Toluol) und Bestimmung der counts per minute (cpm) im Packard-Scintillationszähler, Typ 3375.

## Ergebnisse

### 1. Einfluß von HPE auf nicht-infizierte Hühnerfibroblastenkulturen, morphologische Veränderungen

Zunächst wurde geprüft, in welcher Weise sich der Zusatz verschiedener Konzentrationen von HPE auf das morphologische Verhalten der Zellen und ihre Anfärbbarkeit mit Trypanblau auswirkt. Die Versuche wurden in der Weise durchgeführt, daß wir die HF-Kulturen mit den entsprechenden HPE-Konzentrationen 1 Stunde bei 37 °C inkubierten, anschließend das Medium durch MEME ersetzen und 24 Stunden bei 37 °C inkubierten.

Das morphologische und färberische Verhalten der Zellen nach Einwirkung der verschiedenen HPE-Konzentrationen kann aus Tab. I entnommen werden. Bis zu einer Konzentration von  $0,15 \cdot 10^{-3}$  M verhielten sie sich normal, danach traten ab der Konzentration von  $0,2 \cdot 10^{-3}$  M Granula im Cytoplasma auf, verschiedene Zellen traten aus dem Zellverband hervor, waren abgerundet und kleiner als die übrigen. 20–30% der Zellen nahmen Trypanblau auf. Bei höheren Konzentrationen, z.B.  $0,4 \cdot 10^{-3}$  M war der Zellrasen praktisch von der Glasoberfläche gelöst, die Zellen vollständig zerstört, Trypanblau wurde praktisch von allen Zellen gespeichert.

Tab. I. Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen (Beobachtungszeit 24 Stunden).

HPE-Konzentration [mol/l]	Morphologische Beobachtung	Trypanblau-aufnahme der Zellen [%]
Kontrolle	langgestreckte ungranulierte Fibroblastenzellen, Kern deutlich erkennbar, einschichtige, voll ausgewachsener Zellrasen	5–8
$0,05 \cdot 10^{-3}$	siehe Kontrolle	5–8
$0,1 \cdot 10^{-3}$	siehe Kontrolle	5–8
$0,15 \cdot 10^{-3}$	siehe Kontrolle	5–8
$0,2 \cdot 10^{-3}$	Auftreten von Granula im Cytoplasma, einzelne Zellen abgerundet, verkleinert, dichter Zellrasen	20–30
$0,3 \cdot 10^{-3}$	starke Granulierung im Cytoplasma, viele Zellen abgerundet, stark lichtbrechend, teilweise im Nährmedium schwimmend, Zellrasen stellenweise bereits abgelöst	80–90
$0,4 \cdot 10^{-3}$	siehe Konzentration $0,3 \cdot 10^{-3}$ , Zellrasen löst sich weiter ab	90–100
$0,5 \cdot 10^{-3}$	Zellrasen praktisch vollständig zerstört	Zellen bereits abgelöst

## 2. Einfluß von HPE auf den Einbau radioaktiver Vorstufen in nicht-infizierte Hühnerfibroblastenkulturen

Aus den bereits genannten Arbeiten von Bickis u. Mitarb.<sup>5</sup> und Seeber u. Mitarb.<sup>6</sup> war zu entnehmen, daß die DNA-Synthese durch HPE stärker beeinflußt wird als andere Biosynthesen (z.B. RNA- und Proteinsynthese). Wir haben daher den Einfluß von HPE auf den Einbau von  $[^3\text{H}]$ Thymidin in HF-Zellen eingehend untersucht, um die Hemmungsgrenzen genau bestimmen zu können.

Abb. 1 a zeigt den Zusammenhang zwischen  $[^3\text{H}]$ Thymidineinbau in %, bezogen auf die Kontrollen (= 100%), und verschiedenen HPE-Konzentrationen.

Bis zur Konzentration  $0,05 \cdot 10^{-3}$  M zeigt sich kein signifikanter Einfluß (Vertrauensgrenze 95%) gegenüber den Kontrollen. Bei höheren HPE-Konzentrationen weichen die Meßpunkte von dem bei einfachen Dosis-Effekt-Kurven üblichen, symmetrischen Kurvenverlauf deutlich ab.

Für die weiteren Versuche ergibt sich als wichtigste Aussage, daß die mittleren Meßwerte bei einer HPE-Konzentration von  $0,05 \cdot 10^{-3}$  M von den Werten der Kontrolle (100%) nicht signifikant abweichen.

Der Einbau von  $[^3\text{H}]$ Uridin in säureunlösliches Material in Abhängigkeit von der HPE-Konzentration wird in Abb. 1 b, von  $[^3\text{H}]$ Leucin in Abb. 1 c wiedergegeben. Wie aus den Kurven zu ersehen ist,

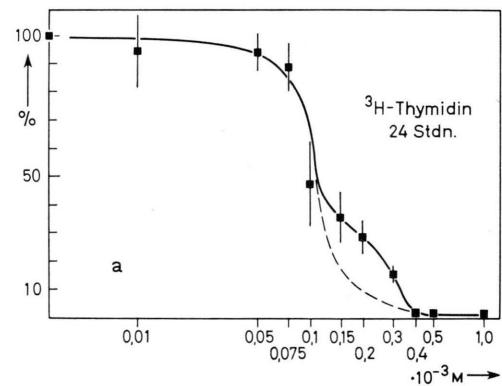


Abb. 1 a

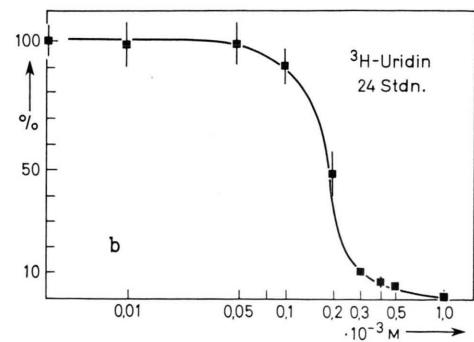


Abb. 1 b

wird der Einbau von  $[^3\text{H}]$ Uridin und  $[^3\text{H}]$ Leucin durch HPE schwächer gehemmt als der von  $[^3\text{H}]$ -

Thymidin (halbmaximale Hemmstoffkonzentration bei  $0,2 \cdot 10^{-3}$  M).

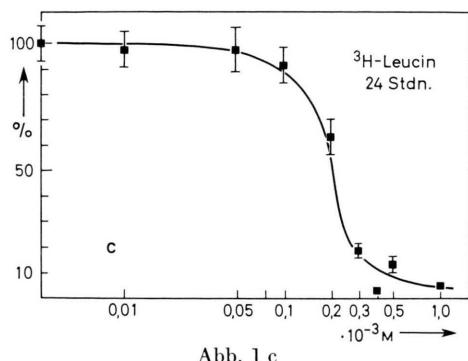


Abb. 1 c

Abb. 1 a–c. Einfluß von HPE verschiedener Konzentrationen auf die Einbaurate von  $[^3\text{H}]$  Thymidin,  $[^3\text{H}]$  Uridin und  $[^3\text{H}]$  Leucin in Hühnerfibroblastenkulturen. Einstündige Inkubation mit HPE; Konzentrationen  $0,01 \cdot 10^{-3}$  bis  $1,0 \cdot 10^{-3}$  M. Anschließend Zusatz von  $[^3\text{H}]$  Thymidin,  $[^3\text{H}]$  Uridin bzw.  $[^3\text{H}]$  Leucin ( $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$  MEME). Danach Inkubation 24 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$ . Beendigung des Versuches durch Zugabe von TCE. Cpm-Bestimmung, %-Angabe bezogen auf Kontrolle = 100%. Streubreite (s) der Einzelmessungen durch zur Ordinate parallele Striche dargestellt. a. Einbau von  $[^3\text{H}]$  Thymidin. Der gestrichelte Teil stellt den theoretischen Kurvenverlauf dar. b. Einbau von  $[^3\text{H}]$  Uridin. c. Einbau von  $[^3\text{H}]$  Leucin.

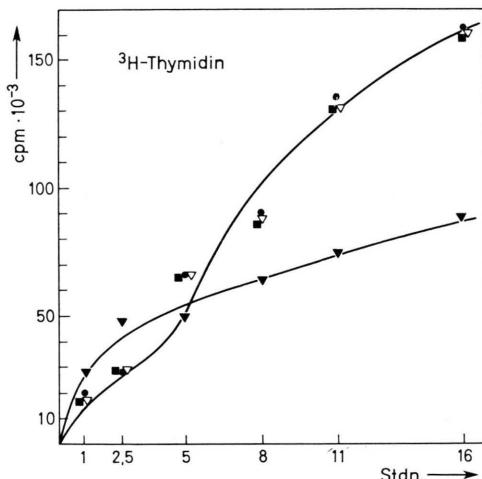


Abb. 2. Beeinflussung von Vaccinia Virus-Suspensionen durch HPE. Vaccinia Virus-Suspensionen wurden mit  $0,05 \cdot 10^{-3}$ ,  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M HPE, bzw. 0,9% NaCl versetzt und 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden nach Zentrifugation ( $109\,000 \times g$ ) und Resuspension des Virus im ursprünglichen Volumen HF-Kulturen mit demselben beschickt (10 p.f.u./Zelle). Die Kontrolle wurde mit 0,9% NaCl-Lösung scheininfiziert, Inkubation 2 Stunden. Nach Entfernung des Überstandes Zugabe von  $[^3\text{H}]$  Thymidin ( $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$  MEME). Beendigung des Versuches zu den angegebenen Zeiten durch Zugabe von TCE, cpm-Bestimmung. ▽ Kontrolle; Virus inkubiert mit □ NaCl 0,9%, ● HPE  $0,05 \cdot 10^{-3}$  M, ■ HPE  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M.

### 3. Beeinflussung von Vaccinia-Virus durch HPE

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, ob HPE in den verwendeten Konzentrationen das Vaccinia Virion inaktiviert (soweit es dessen Einfluß auf die DNA-Synthese betrifft). Dabei wurde die Virus-Suspension zusammen mit einer Kontrolle (0,9-proz. NaCl-Lösung statt HPE) 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend wie in „Material und Methoden“ beschrieben zur Infektion der HF-Kulturen verwendet. Das Medium der HF-Kulturen enthielt  $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$   $[^3\text{H}]$  Thymidin.

Aus der Abb. 2 ist der Verlauf des  $[^3\text{H}]$  Thymidineinbaues der Zell-Kontrolle, desgleichen der von Vaccinia-infizierten HF-Kulturen zu ersehen, wobei das Vaccinia-Virus entweder mit NaCl oder HPE ( $0,05 \cdot 10^{-3}$  M bzw. HPE  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M) vorbehandelt wurde.

Wie aus dem Kurvenverlauf zu entnehmen ist, zeigt HPE keinen Einfluß auf das geprüfte Verhalten des Vaccinia-Virion. Der  $[^3\text{H}]$  Thymidineinbau ist im Vergleich zur unbehandelten Vaccinia-Virus-suspension (NaCl) unbeeinflußt.

### 4. Vaccinia-Virus-infizierte Kulturen. Einfluß von HPE auf $[^3\text{H}]$ Thymidineinbau und Virusvermehrung

Auf Grund der bisher beschriebenen Ergebnisse wurden Vaccinia-Virus-infizierte HF-Kulturen bei HPE-Konzentrationen von  $0,05$  und  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M untersucht. Außer dem  $[^3\text{H}]$  Thymidineinbau wurde die Vermehrung des Virus verfolgt (Bestimmung der p.f.u./ml). Nach der Infektion der HF-Zellen mit 10 p.f.u./Zelle fanden wir primär eine Reduktion, nach 5–6 Stunden jedoch eine starke Stimulierung der Einbaurate von  $[^3\text{H}]$  Thymidin (Abb. 3). Nach 16 Stunden lag sie 70% über dem Wert der Kontrollen. Dagegen fand sich bei den erst mit Vaccinia-Virus-infizierten und dann mit HPE  $0,05 \cdot 10^{-3}$  M behandelten Zellen eine Reduktion der Einbaurate von  $[^3\text{H}]$  Thymidin um etwa 50% – verglichen mit den unbehandelten Zellen – und um 74% verglichen mit den infizierten Zellen.

Die zwei weiteren Kurven in Abb. 3 zeigen den Verlauf des  $[^3\text{H}]$  Thymidineinbaues in Gegenwart von  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M HPE. Hier reduziert HPE ihn bei nicht-infizierten Fibroblasten, wie nach dem in Abb. 1 a dargestellten Versuch zu erwarten, bereits um 50% gegenüber denjenigen der Kontrollen, während die infizierten und dann mit HPE behandelten

Zellen eine Hemmung des [<sup>3</sup>H]Thymidineinbaus um 88% aufweisen.

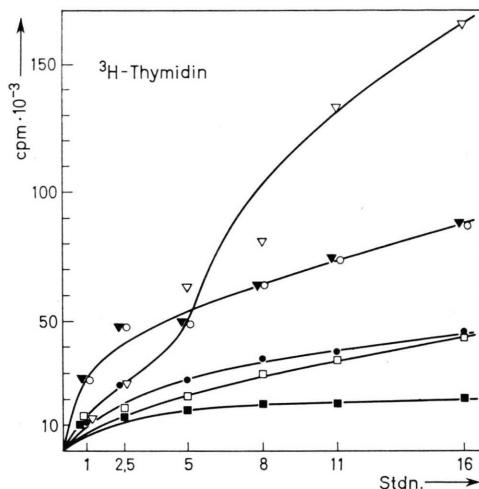


Abb. 3. [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau bei Vaccinia Virus-infizierten Kulturen. Infektion von HF-Kulturen (10 p.f.u./Zelle) mit Vaccinia-Virus bzw. Scheinfektion mit 0,9% NaCl-Lösung, Inkubation 2 Stunden bei 37 °C. Nach Entfernung des Überstandes Zugabe von HPE ( $0,05 \cdot 10^{-3}$ ,  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M) bzw. MEME, Inkubation 1 Stunde bei 37 °C. Nach Entfernung des Überstandes Zugabe von [<sup>3</sup>H]Thymidin (1  $\mu$ Ci/ml MEME). Beendigung des Versuches zu den angegebenen Zeiten durch Zugabe von TCE; cpm-Bestimmung. ▼ Kontrolle; ▽ Virus; ○ HPE  $0,05 \cdot 10^{-3}$  M; □ HPE  $0,05 \cdot 10^{-3}$  M und Virus; ● HPE  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M; ■ HPE  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M und Virus.

Eine Trennung von [<sup>3</sup>H]Thymidin-markierter zellulärer und viraler DNA wurde in diesen Versuchen nicht durchgeführt. Nach den beschriebenen Befunden kann man jedoch annehmen, daß die Steigerung des [<sup>3</sup>H]Thymidineinbaus (vgl. zur Zellkontrolle) durch die Vaccinia-Virusinfektion bedingt ist.

Ebenso wie der [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau wird auch die Bildung von Vaccinia-Virus durch HPE drastisch reduziert. Wie Tab. II ausweist, reduzierten  $0,05 \cdot 10^{-3}$  M HPE die Virusausbeute um 76% und  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M HPE diese um über 99%.

Tab. II. Einfluß von HPE auf die Vermehrung von Vaccinia-Virus.

HF-Zellen mit Vaccinia Virus	Viruskonzentration in p.f.u./ml	Reduktion [%]
Vaccinia Virus ohne HPE = Viruskontrolle	$3,4 \cdot 10^5$	—
Vaccinia Virus mit $0,05 \cdot 10^{-3}$ M/HPE	$8,3 \cdot 10^4$	76
Vaccinia Virus mit $0,1 \cdot 10^{-3}$ M/HPE	$2,2 \cdot 10^3$	> 99

In Abb. 4 sind die bei den beiden Versuchsanordnungen ([<sup>3</sup>H]Thymidineinbau und Virus-Infektionstest) ermittelten Werte einander gegenübergestellt.

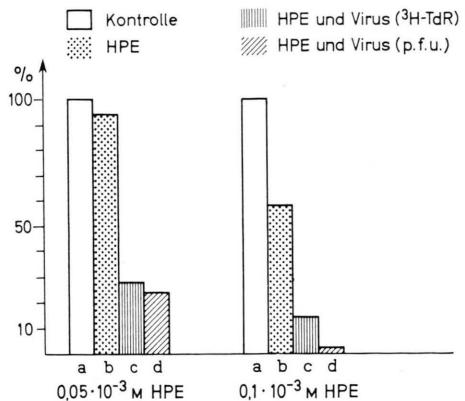


Abb. 4. Einfluß von HPE auf nicht-infizierte und Vaccinia-Virus-infizierte HF-Kulturen ausgedrückt in Prozent. a. [<sup>3</sup>H]Tdr Einbaurate in nicht HPE behandelte, nicht Vaccinia-infizierte HF-Kulturen = Kontrolle (100%). b. Reduktion der [<sup>3</sup>H]Tdr Einbaurate nach Einfluß von HPE ( $0,05 \cdot 10^{-3}$  bzw.  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M). c. Reduktion der [<sup>3</sup>H]Tdr Einbaurate nach Vaccinia-Virusinfektion und HPE Behandlung ( $0,05 \cdot 10^{-3}$  bzw.  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M). d. Reduktion der Viruskonzentration (bezogen auf p.f.u. der Viruskontrolle = 100%) nach Infektion und anschließender HPE-Behandlung ( $0,05 \cdot 10^{-3}$  bzw.  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M), siehe auch Tab. II.

### Besprechung der Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung bemerkt, hemmt HPE unter den bisher untersuchten Stoffwechselgrößen am stärksten die Biosynthese von DNA, schwächer die der RNA und Proteine und den Energiestoffwechsel<sup>5, 6</sup>. Es lag daher nahe, die Hemmwirkung des HPE auf die Synthese von Virus-DNA zu prüfen. Im ersten Teil der Untersuchungen wurden jene Konzentrationen von HPE ermittelt, die keine meßbare Schädigung des verwendeten Zellsystems bewirken.

Aus den mikroskopischen Untersuchungen geht hervor, daß HPE bis zu einer Konzentration von  $0,15 \cdot 10^{-3}$  M den normalen Prozentsatz trypanpositiver Zellen (5–8%) nicht verändert und auch keine sonstigen erkennbaren morphologischen Veränderungen an den Zellen hervorruft.

Empfindlicher reagiert jedoch die DNA-Synthese auf HPE.  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M HPE hemmen sie bereits zu 50%. Die RNA- und Proteinsynthesen werden erst durch  $0,2 \cdot 10^{-3}$  M HPE zu 50% gehemmt.

Für unsere Fragestellung war besonders die HPE-Konzentration  $0,05 \cdot 10^{-3}$  M von Interesse, da sie

keinen meßbaren Einfluß auf HF-Zellen ausübte. Diese, sowie die doppelte verwendete Konzentration haben wir verwendet, um bei Vaccinia-Virus-infizierten Kulturen einmal den Einfluß auf den [<sup>3</sup>H]Thymidineinbau, zum anderen auf die Virusvermehrung, zu messen. Einen direkten Einfluß von HPE ( $0,05 \cdot 10^{-3}$  und  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M) auf das Vaccinia-Virion (Abb. 2) konnten wir ausschließen. Dies ist um so mehr von Bedeutung, da z. B. Formaldehyd in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^{-3}$  M zur Inaktivierung von Viren bei Herstellung von Virusimpfstoffen Verwendung findet. Es ist jedoch möglich, daß höhere HPE-Konzentrationen mit den SH-Gruppen der Proteinhülle des Virions in Reaktion treten und die Infektiosität herabsetzen können.

Bei einer HPE-Konzentration von  $0,05 \cdot 10^{-3}$  M fanden wir eine beträchtliche (74-proz.) Verminde rung des [<sup>3</sup>H]Thymidineinbaues in Vaccinia-Virus-infizierten Kulturen. Es ist bekannt<sup>13</sup>, daß unmittelbar nach der Infektion, unter der Kontrolle des Virusgenoms, eine Stimulierung der zellulären DNA-Synthese erfolgt, die jedoch bald von einer Hemmung des DNA-Synthesystems abgelöst wird. Wir haben die Einbauraten für die Virus-infizierten Zellen während der ersten Stunden stets niedriger gefunden, als in der parallel mitgeführten Zellkontrolle. Es kann daher geschlossen werden, daß die erste Messung zu einem Zeitpunkt erfolgte, an dem die zelluläre DNA-Synthese bereits reprimiert war (4 Stunden nach Zugabe von Virus).

- <sup>1</sup> E. Schauenstein, H. Esterbauer, G. Jaag u. M. Taufer, Mh. Chem. **95**, 180 [1964].
- <sup>2</sup> E. Schauenstein, J. Lipid Res. **8**, 417 [1967].
- <sup>3</sup> E. Schauenstein, F. Dorner u. J. Sonnenbichler, Z. Naturforsch. **23 b**, 316 [1968].
- <sup>4</sup> H. Esterbauer u. W. Weger, Mh. Chem. **98**, 1994 [1967].
- <sup>5</sup> I. J. Bickis, E. Schauenstein u. M. Taufer, Mh. Chem. **100**, 1077 [1969].
- <sup>6</sup> S. Seeber, P. Warnecke u. U. Weser, Z. Krebsforsch. **72**, 137 [1969].
- <sup>7</sup> J. F. Scaife, Naturwissenschaften **57**, 250 [1970].
- <sup>8</sup> V. Dostal, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg. I. Abt., Ref. **229**, 310 [1972].
- <sup>9</sup> J. S. Youngner, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **85**, 202 [1954].
- <sup>10</sup> C. M. Freienstein, S. Freienstein, V. Kinzel u. R. Süss, Experientia [Basel] **28**, 243 [1972].
- <sup>11</sup> N. R. Grist, Constance A. C. Ross, Eleanor J. Bell, E. J. Stott, Diagnostische Methoden in der Klinischen Virologie, übers. V. Dostal u. E. P. Tilz, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1969.
- <sup>12</sup> C. R. Ball, R. W. Poynter u. H. W. van den Berg, Analyt. Biochem. [New York] **46**, 101 [1972].
- <sup>13</sup> O. P. Peterson, Intern. Virology **1**, p. 64, Karger-Verlag, Basel 1969.
- <sup>14</sup> N. P. Salzman, Virology **10**, 150 [1960].
- <sup>15</sup> A. J. Shatkin u. N. P. Salzman, Virology **19**, 551 [1963].

Es ist anzunehmen, daß der Anstieg des [<sup>3</sup>H]Thymidineinbaues durch die Synthese viraler DNA bewirkt wird<sup>14-19</sup>. Übereinstimmend wird berichtet<sup>20-32</sup>, daß zu Beginn des Vermehrungszyklus erst Proteine synthetisiert werden, die sowohl Strukturproteine als auch Enzyme darstellen. Alle diese Proteine (bzw. Polypeptide) werden gebildet, ohne daß eine Replikation viraler DNA erfolgt.

Nach Einwirkung von  $0,05 \cdot 10^{-3}$  M HPE kommt es zu einer 74-proz., mit  $0,1 \cdot 10^{-3}$  M HPE zu einer 88-proz. Reduktion des [<sup>3</sup>H]Thymidineinbaues in den HF-Kulturen, verglichen mit den infizierten Kontrollzellen, was wir mit einer Hemmung der Virus-DNA-Synthese erklären.

Unsere Befunde lassen den Schluß zu, daß HPE diese DNA-Synthese mit hoher Selektivität hemmt, wobei sich die Selektivität der Hemmwirkung gut mit der hohen Aktivität dieses DNA-Synthetase-Systems<sup>7</sup> erklären ließe.

Welche Schritte der Synthese HPE hier hemmt, ist noch nicht näher bekannt; die Befunde von Seeber u. Mitarb.<sup>6</sup> lassen aber die Annahme zu, daß auch hier einerseits das phosphorisierende System, andererseits die Virus-DNA-Polymerase selbst betroffen werden.

Versuche zu einer genaueren Abklärung der Wirkung von HPE sind im Gange.

Der eine von uns (V. D.) dankt dem Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Wien, für die Unterstützung der Arbeit.

- <sup>16</sup> J. J. Holland u. J. A. Peterson, J. molecular Biol. **8**, 556 [1964].
- <sup>17</sup> W. K. Joklik u. Y. Becker, J. molecular Biol. **10**, 452 [1964].
- <sup>18</sup> R. Kajioka, L. Siminovitch u. S. Dales, Virology **24**, 295 [1964].
- <sup>19</sup> N. P. Salzman, A. J. Shatkin u. E. D. Sebring, Virology **19**, 542 [1963].
- <sup>20</sup> J. Cairns, Virology **11**, 603 [1960].
- <sup>21</sup> S. Kit, D. R. Dubbs u. L. J. Piekarski, Biochem. biophysic. Res. Commun. **8**, 72 [1962].
- <sup>22</sup> B. R. McAuslan u. W. K. Joklik, Biochem. biophysic. Res. Commun. **8**, 486 [1962].
- <sup>23</sup> B. R. McAuslan, Virology **20**, 162 [1963].
- <sup>24</sup> B. R. McAuslan, Virology **21**, 383 [1963 b].
- <sup>25</sup> S. S. Cohen, Federat. Proc. **20**, 641 [1961].
- <sup>26</sup> M. Green u. M. Pina, Virology **17**, 603 [1962].
- <sup>27</sup> C. Jungwirth u. W. K. Joklik, Virology **27**, 80 [1965].
- <sup>28</sup> A. J. Shatkin, Nature [London] **199**, 357 [1963].
- <sup>29</sup> M. Green, M. Pina u. V. Chagoya, J. biol. Chemistry **239**, 1188 [1964].
- <sup>30</sup> T. Hanafusa, Biken's J. **4**, 97 [1961].
- <sup>31</sup> S. Kit, D. R. Dubbs u. L. J. Piekarski, Biochem. biophysic. Res. Commun. **11**, 176 [1963].
- <sup>32</sup> B. R. McAuslan, Biochem. biophysic. Res. Commun. **19**, 15 [1965].