

# Intracelluläre Wirkung von Hydroxyalkenalen auf tierische Tumoren

Intracellular Effect of Hydroxyalkenals on Animal Tumors

G. Khoschsorur, R. J. Schaur, E. Schauenstein, H. M. Tillian und M. Reiter

Institut für Biochemie, Universität Graz

Z. Naturforsch. **36 c**, 572–578 (1981); eingegangen am 24. Oktober 1980/5. Februar 1981

Cytoplasm, Nucleus, Protein Thiols, Transplantable Tumors

When incubated for 30 min *in vitro*, 4-hydroxyalkenals in a  $5 \times 10^{-3}$  M solution react with SH-groups of soluble cytoplasmic and nuclear proteins (Prot<sub>L</sub>-SH) of Morris hepatomas 9618 A and 5123 tc, and of Ehrlich ascites tumor (EAT) cells. The extent of the reaction strongly increases with decreasing doubling time of the respective tumors. Former experiments with EAT cells have shown that the reaction with cytoplasmic Prot<sub>L</sub>-SH causes inhibition of respiration, glycolysis, and probably of other SH-controlled processes associated with cell division. The intranuclear reaction leads to an inhibition of DNA- and RNA-synthesis. In a  $2 \times 10^{-4}$  M solution of hydroxyalkenals, however, the reaction with cytoplasmic Prot<sub>L</sub>-SH diminishes almost completely so that no measurable inhibition of respiration and only 3% inhibition of glycolysis are observed, while 20 to 30 percent of the nuclear Prot<sub>L</sub>-SH are still blocked. This corresponds well with a previous observation that a  $2 \times 10^{-4}$  M solution of hydroxypentenal inhibits DNA-synthesis by 90 percent.

## Einleitung

Läßt man Hydroxypentenal (HPE) in  $5 \times 10^{-3}$  M Lösung *in vitro* auf Tumorzellen einwirken und isoliert danach die Gesamtfraction der löslichen Proteine, so findet man eine Abnahme ihres SH-Gehaltes, deren Größe mit der Wachstumsgeschwindigkeit der betreffenden Tumoren hochsignifikant positiv korreliert [1]. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß HPE mit solchen Thiolen der löslichen Zellproteine (Prot<sub>L</sub>-SH) chemisch reagiert, die für das Wachstum von funktioneller Bedeutung sind. Es ergibt sich die Frage nach der intracellulären Lokalisation dieser Prot<sub>L</sub>-SH.

## Material und Methoden

### Gewinnung der Gewebe und Zellen

Morris Hepatome 9618 A und 5123 tc

Die Morris Hepatome 9618 A und 5123 tc wurden in dankenswerter Weise vom Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg zur Verfügung gestellt. Am hiesigen Institut wurden die Hepatome 9618 A und 5123 tc durch Inokulation in die hinteren Extremitäten von Buffalo Ratten transplantiert. Das Hepatom 9618 A mit einer Volumenverdoppelungszeit ( $t_D$ ) von 10 Tagen [2] wurde nach 5–6 Monaten,

das Hepatom 5123 tc,  $t_D = 5$  Tage [3], nach 4 Wochen gewonnen. Die Ratten (Körpergewicht 200–300 g) wurden durch Genickbruch getötet und das frisch excidierte Tumorgewebe in einer eiskalten, isotonen NaCl-Lösung aufgenommen. Nach Entfernung äußerer Blutgerinnsel, nekrotischer und muskulärer Teilchen wurde das Gewebe (1–4 g je Ansatz) mit einer Schere in ca. 2 mm dicke Schnitte zerkleinert und mehrmals mit NaCl-Lösung gewaschen.

### Ehrlich Ascites Tumor (EAT)

Ca.  $10 \times 10^6$  EAT-Zellen, Stamm Heidelberg-Létré, mit einer Verdoppelungszeit von 2,5 Tagen, ursprünglich ebenfalls vom Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, wurden NMRI-Mäusen intraperitoneal appliziert. Am 7. Tag nach Transplantation wurden die Tiere durch Genickbruch getötet und die Zellsuspension dem Bauchraum entnommen. Zu 15 ml Suspension wurde 0.1 ml Heparin zugesetzt und 5 min bei  $340 \times g$  zentrifugiert. Zur Entfernung der Erythrocyten wurde das Pellet 2–3 mal mit isotoner NaCl-Lösung gewaschen, wobei nach jeder Zentrifugation neben dem Überstand auch die oberste Zellschicht, in der sich die meisten Erythrocyten befanden, abgesaugt wurde. Die Zellzahl wurde mittels Hämatokrit-Röhrchen bestimmt. Ein Hämatokrit-Wert von 0,3% entsprach  $1 \times 10^6$  Zellen/ml [4]. Für  $1 \times 10^6$  Zellen wurde von Rindler [5] ein Feuchtgewicht von 2,89 mg ermittelt.

0341-0382/81/0700-0572 \$ 01.00/0



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 digitalized 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.

*Inkubation mit Hydroxy-enalen*

Die Synthese von 4-Hydroxypentenal bzw. 4-Hydroxynonenal (HNE) erfolgte nach etablierten Methoden [6]. Die Inkubation der Hepatome und EAT-Zellen mit Hydroxy-enalen erfolgte nach einer bereits publizierten Methode [7, 8]. Die Gewebestückchen bzw. Zellen wurden in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer suspendiert. Nach Zusatz von HPE bzw. HNE in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-4}$  M bzw.  $5 \times 10^{-3}$  M wurde der Ansatz 30 min bei 37 °C geschüttelt. Der Kontrollansatz enthielt isotone NaCl-Lösung.

*Extraktion der löslichen Proteine aus Hepatom- bzw. EAT-Zellen*

Nach Inkubation und Waschen mit isotoner NaCl-Lösung wurden das Gewebe bzw. die Zellen in einer Reibschale unter flüssigem Stickstoff pulverisiert, das gefrorene Pulver in ein Zentrifugenröhrchen eingebracht, das Gewicht ermittelt und 5 ml Phosphat-Puffer hinzugefügt. Der Puffer bestand aus 9 Teilen EDTA (1 mM) in isotoner NaCl-Lösung und 1 Teil Phosphat-Puffer (2 mM, pH 8,0). Nach Schütteln mit ca. 5 ml eisgekühlten, peroxidfreien Äthers wurde 30 min bei  $400 \times g$  zentrifugiert, die Ätherschicht abgesaugt und 30 min bei  $20\,000 \times g$  zentrifugiert.

*Fraktionierung der Hepatome*

Die von Lynch [9] angegebene Methode wurde in folgender Weise modifiziert: Nach der Inkubation wurde das Hepatomgewebe mit 5 ml eisgekühlter, isotoner NaCl-Lösung gewaschen, mit Filterpapier getrocknet und gewogen. Anschließend wurde das Gewebe in einer Sucrose (0,3 M)-CaCl<sub>2</sub> (4 mM) Lösung aufgenommen, ca. 10 min bei 4 °C stehengelassen und vorsichtig mit einem Teflon-Potter mit 8 bis 12 Schüben unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde durch ein Nylonsieb (100 mesh) filtriert, das im Sieb haftende Gewebe gewogen und von der Gewebseinwaage abgezogen. Das Filtrat, nach Volumensbestimmung, wurde 10 min bei  $1000 \times g$  zentrifugiert. Die überstehende cytoplasmatische Fraktion wurde 20 min bei  $9000 \times g$  zentrifugiert. Nach Schütteln mit ca. 5 ml peroxidfreien Äthers wurde 20 min bei  $400 \times g$  und, nach Absaugen der Ätherschicht, 20 min bei  $20\,000 \times g$  zentrifugiert.

Zur Reinigung der Kernfraktion wurde das bei der ersten Zentrifugation erhaltene Pellet zweimal

mit Sucrose (1 M)-TKMM (TKMM = Tris-HCl (0,05 M, pH 7,5), KCl (25 mM), MgCl<sub>2</sub> (5 mM) und Mercaptoäthanol (1 mM))-Lösung gewaschen und anschließend jeweils 10 min bei  $3200 \times g$  zentrifugiert. Dann wurde mit Sucrose (0,25 M)-TKMM-Lösung gewaschen und 10 min bei  $1250 \times g$  zentrifugiert. Das fast erythrocytenfreie Pellet wurde in Sucrose (2,0 M)-CaCl<sub>2</sub> (3 mM)-Lösung suspendiert (ca. 12 ml/g) und je 12 ml dieser Suspension wurden in Zentrifugenbechern mit je 5 ml Sucrose (2,2 M)-CaCl<sub>2</sub> (1 mM)-Lösung unterschichtet. Nach Zentrifugation bei  $10\,000 \times g$  15 min wurde die aus Membranteilen, Kernbruchstücken und Erythrocyten bestehende obere Phase bis zur an der Phasengrenze liegenden Kernschicht abgesaugt. Die verbleibende dichtere Phase wurde mit derselben Menge Wasser verdünnt und 20 min bei  $9000 \times g$  zentrifugiert. Die reinen Kerne wurden in Sucrose (0,3 M)-Lösung aufgenommen und durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen.

Die Extraktion der löslichen Proteine erfolgte, wie für die Gewebe bzw. Zellen beschrieben. Sämtliche Arbeiten wurden bei + 4 °C durchgeführt.

*Fraktionierung der EAT-Zellen*

Zur Herstellung der cytoplasmatischen Fraktion von EAT-Zellen wurde die Methode von Mamaril [10] in der folgenden Weise modifiziert. Das gewaschene Pellet von  $1 \times 10^9$  Zellen wurde im dreifachen Volumen einer isotonen NaCl-Lösung suspendiert und 5 min bei  $350 \times g$  zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde 10 min mit dem zwölffachen Volumen einer gepufferten EDTA-Lösung (2 mM in Tris-HCl (0,2 M), pH 7,0) inkubiert. Aliquoten von je 15 ml wurden in einem Dounce-Homogenisator (Pistill B) mit 10 bis 12 Schüben homogenisiert. Die wiedervereinigten Aliquoten wurden mit 4 ml einer gepufferten NaCl-Lösung (90 ml NaCl (4,5% w/v) + 10 ml Phosphat-Puffer (0,33 M), pH 8,0) gemischt und 10 min bei  $1200 \times g$  zentrifugiert. Die überstehende cytoplasmatische Fraktion wurde dekantiert, mit einigen ml peroxidfreien Äthers geschüttelt und 20 min bei  $400 \times g$  zentrifugiert. Nach Absaugen der Ätherschicht wurde die wässrige Schicht 20 min bei  $20\,000 \times g$  zentrifugiert.

Für die Präparation der Kerne wurde das gewaschene Pellet im dreifachen Volumen einer isotonen NaCl-Lösung suspendiert, 5 min bei  $350 \times g$  zentrifugiert und im 24-fachen Volumen der Lösung I

(EDTA (2 mM) in Tris-HCl (0,2 M), pH 7,0) suspendiert. Nach Zentrifugation bei  $1200 \times g$  für 15 min wurden die Zellen 10 min im zwölffachen Volumen der Lösung I inkubiert. Aliquoten von je 15 ml wurden im Dounce-Homogenisator mit 15 Schüben homogenisiert. Die wiedervereinigten Aliquoten wurden mit einem Zehntel des Volumens der Lösung II (Sucrose (0,2 M),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (9,4 mM),  $\text{MgCl}_2$  (10 mM),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (12,5 mM), EDTA (2,0 mM),  $\text{NaHCO}_3$  (0,3 mM),  $\text{CaCl}_2$  (4 mM), pH 7,0) inkubiert und 10 min bei  $1200 \times g$  zentrifugiert. Das Pellet wurde im achtfachen Volumen der Lösung III (Sucrose (0,3 M), EDTA (2,0 mM) und zweifachen Volumen der Lösung IV (identisch mit Lösung II, jedoch ohne  $\text{CaCl}_2$ ) suspendiert. Nach 10 min Zentrifugation bei  $1800 \times g$  wurde das Pellet im zwölffachen Volumen der Lösung III aufgenommen und in einem Zentrifugenbecher mit Lösung V (Sucrose (1 M), EDTA (2,0 mM)) unterschichtet (4 ml Lösung V pro 13 ml Suspension). 10 min Zentrifugation bei  $12000 \times g$  lieferte mikroskopisch reine und intakte Kerne, die nach Suspendierung in isotoner NaCl-Lösung durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen wurden. Die Extraktion der löslichen Proteine erfolgte, wie für die Gewebe bzw. Zellen beschrieben. Sämtliche Arbeiten wurden bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt.

#### Marker-Enzym Bestimmung

Um die Verunreinigung der cytoplasmatischen Fraktion durch Kernbestandteile abzuschätzen, wurde bei den EAT-Zellen die Aktivität der ausschließlich im Kern lokalisierten NAD-Pyrophosphorylase im Homogenat ganzer Zellen und in der cytoplasmatischen Fraktion nach der Methode von Bergmeyer [12] bestimmt.

#### Ermittlung der Kernaussbeute

Um die Ausbeute an Kernen der Hepatome bzw. EAT-Zellen zu bestimmen, wurden stets DNA-Bestimmungen sowohl in einer Aliquote des Homogenates ganzer Zellen bzw. Gewebe als auch in einer Aliquote der Suspension reiner Kerne durchgeführt. Dazu wurde die von Rendina [12] angegebene Vorschrift zur Methode von Burton [13] herangezogen.

#### Analysen

Die Abtrennung niedermolekularer Thiol-Verbindungen durch Gel-Permeationschromatographie (Se-

phadex G 25, Pharmacia) und die Bestimmung der löslichen Proteine (Folin-Reaktion) und deren Thiole (DTNB-Reaktion) [14] erfolgte wie bereits beschrieben [7, 8].

Reimplantationstest zum Nachweis der Lebensfähigkeit vorinkubierter Tumorzellen: In der vorliegenden Versuchsreihe wurden EAT-Zellen jeweils 30, 60 und 120 min in  $5 \times 10^{-4}$  M HNE-Lösung inkubiert und anschließend 2–3 Mäusen intraperitoneal implantiert. Dieser Versuchsansatz wurde 2–3 mal wiederholt, so daß insgesamt 6–9 Mäuse pro Inkubationsansatz eingesetzt wurden. Die Zellmenge pro Tier betrug dabei ca.  $10^6$ .

Zur Kontrolle wurden zu Beginn und zu Ende der Inkubationszeit in isotoner NaCl-Lösung inkubierte Zellen reimplantiert.

Nach 7–10 Tagen wurden die Tiere getötet und das Ascitesvolumen, die ungefähre Zellzahl pro Milliliter (mittels Hämatokrit-Röhrchen) und solide Tumorbildung registriert. Ein verzögertes Angehen des Tumors wäre damit festzustellen gewesen. Es wurden jedoch nur Tiere gefunden, die entweder tumorfrei waren oder bei denen der Tumor ungehindert angegangen war.

### Ergebnisse

Zur Überprüfung der Verunreinigung der Plasmafraktion durch Proteine aus dem Zellkern wurde die Aktivität des Kern-Marker-Enzyms NAD-Pyrophosphorylase in der Plasmafraktion von EAT-Zellen bestimmt. 15% der Aktivität des Homogenats der kompletten Zellen wurden in der Plasmafraktion nachgewiesen.

Außerdem wurde in der reinen Kernfraktion von EAT-Zellen und im Zellhomogenat die DNS bestimmt, um die Kernaussbeuten zu ermitteln. Dabei ergaben sich im Mittel 88%. Bei den Hepatomen 9618 A und 5123 tc lagen die Kernaussbeuten dagegen zwischen 30 und 40%.

Aus Tab. I, II, und III geht hervor, daß die löslichen Kernproteine bei den untersuchten Tumoren nur 1 bis 4% der löslichen Proteine des Cytoplasmas ausmachen.

Die aus den kompletten Zellen isolierten Gesamt- $\text{Prot}_L$  zeigen, den bisherigen Ergebnissen entsprechend, SH-Gehalte die mit steigender Wachstumsrate der Tumoren ansteigen. Das gleiche gilt für die durch  $5 \times 10^{-3}$  M HPE bewirkte Abnahme der  $\text{Prot}_L$ -SH.

Tabelle I. Lösliche Proteine und deren SH-Gruppen des Morris Hepatoms 9618 A nach 30 min Inkubation in 0,9% NaCl (K), bzw. isotoner  $5 \times 10^{-3}$  M HPE-Lösung.  $n$  = Zahl der Einzelversuche;  $\pm$  = Standardabweichung. Die Werte für die kompletten Zellen stammen von Kharrazi [22].

	Plasma			Kern			Komplette Zelle		
	Prot <sub>L</sub>		Prot <sub>L</sub> -SH	Prot <sub>L</sub>		Prot <sub>L</sub> -SH	Prot <sub>L</sub>		Prot <sub>L</sub> -SH
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
K	35,0 $\pm 7,3$	4,56 $\pm 0,95$	121,7 $\pm 8,7$	0,36 $\pm 0,14$	0,03 $\pm 0,01$	84,6 $\pm 15,2$	52,5 $\pm 17,7$	5,55 $\pm 1,83$	105,7 $\pm 4,8$
HPE	37,2 $\pm 7,3$	3,88 $\pm 0,89$	110,4 $\pm 6,8$	0,31 $\pm 0,15$	0,02 $\pm 0,02$	58,0 $\pm 3,2$	52,7 $\pm 17,8$	4,94 $\pm 1,81$	94,2 $\pm 5,2$
- $\Delta$			11,3			26,6			11,5
- $\Delta\%$			9,2			29,9			10,9
$n$	6	6	6	5	5	5	6	6	6

Dimension a: mg/g Feuchtgewicht; b:  $10^{-6}$  m/g Feuchtgewicht; c:  $10^{-9}$  m/mg Prot.

Tabelle II. Prot<sub>L</sub> und Prot<sub>L</sub>-SH-Werte des Morris Hepatoms 5123 tc nach 30 min Inkubation in 0,9% NaCl (K), bzw. in isotoner  $5 \times 10^{-3}$  M HPE-Lösung.  $n$  = Zahl der Einzelversuche;  $\pm$  = Standardabweichung.

	Plasma			Kern		
	Prot <sub>L</sub>		Prot <sub>L</sub> -SH	Prot <sub>L</sub>		Prot <sub>L</sub> -SH
	a	b	c	a	b	c
K	33,1 $\pm 1,5$	3,88 $\pm 0,6$	117,4 $\pm 15,0$	1,29 $\pm 0,7$	0,147 $\pm 0,08$	109,1 $\pm 17,3$
HPE	33,8 $\pm 3,1$	2,63 $\pm 0,5$	80,0 $\pm 21,8$	0,97 $\pm 0,2$	0,08 $\pm 0,01$	84,1 $\pm 10,6$
- $\Delta$			38,5 $\pm 20,1$			25,0 $\pm 8$
- $\Delta\%$			32,7 $\pm 15,0$			22,5 $\pm 4$
$n$	6	6	6	5	5	5

Dimension: wie bei Tabelle I.

Tab. IV bringt die nach Inkubation von EAT-Zellen in  $2 \times 10^{-4}$  M HPE erhaltenen Werte. Im Vergleich zur Inkubation in  $5 \times 10^{-3}$  M HPE (Tab. III) erkennt man, daß bei Einwirkung der  $2 \times 10^{-4}$  M HPE-Lösung erheblich weniger Prot<sub>L</sub>-SH im Cytoplasma reagieren: Waren es bei Inkubation in der  $5 \times 10^{-3}$  M Lösung 66,7, so sind es nun 10 nmol/mg Prot<sub>L</sub>. Der relative Prot<sub>L</sub>-SH-Verlust fällt von 49 auf 7%. Im Kern kommt es wohl auch zu einem Rückgang der Zahl der durch HPE blockierten Prot<sub>L</sub>-SH, jedoch nur von 69 auf 26 nmol/mg Prot<sub>L</sub>, das heißt, von 52% relativer Abnahme auf 21%.

Wie man aus Tab. V ersieht, greift das lipophile HNE in  $5 \times 10^{-3}$  M Lösung die Prot<sub>L</sub>-SH von Plasma und Kern gleich stark an, jedoch ist die Wirkung etwas schwächer als jene von HPE bei gleicher Konzentration. In  $2 \times 10^{-4}$  M Lösung hingegen werden die cytoplasmatischen Prot<sub>L</sub>-SH praktisch nicht mehr

Tabelle III. Prot<sub>L</sub> und Prot<sub>L</sub>-SH-Werte in EAT-Zellen nach 30 min Inkubation in 0,9% NaCl (K), bzw. in isotoner  $5 \times 10^{-3}$  M HPE-Lösung.  $n$  = Zahl der Einzelversuche;  $\pm$  = Standardabweichung.

	Plasma			Kern			Komplette Zelle		
	Prot <sub>L</sub>		Prot <sub>L</sub> -SH	Prot <sub>L</sub>		Prot <sub>L</sub> -SH	Prot <sub>L</sub>		Prot <sub>L</sub> -SH
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
K	30,6 $\pm 3,9$	4,1 $\pm 0,2$	136,5 $\pm 21,0$	1,4 $\pm 0,7$	0,20 $\pm 0,1$	133,9 $\pm 21,8$	26,5 $\pm 1,7$	3,34 $\pm 0,05$	126,0 $\pm 2,0$
HPE	16,6 $\pm 6,5$	1,1 $\pm 0,4$	69,8 $\pm 15,0$	0,9 $\pm 0,2$	0,05 $\pm 0,03$	64,6 $\pm 14$	19,4 $\pm 9,5$	1,24 $\pm 0,08$	64,0 $\pm 8,0$
- $\Delta$			66,7 $\pm 9,8$			69,3 $\pm 8,0$			62,0
- $\Delta\%$			49,0 $\pm 6,8$			52,0 $\pm 2,7$			49
$n$	6	6	6	4	4	4	8	8	8

Dimension: wie bei Tabelle I.



angegriffen, die nuklearen jedoch zu nahezu 30% (Tab. VI).

Tab. VII zeigt, daß bei Inkubation in  $5 \times 10^{-4}$  M HNE rund 50% der EAT-Zellen morphologisch intakt erscheinen. 20 bis 40% weisen morphologische Veränderungen im Sinne einer „Stalagmose“ [15] auf und mit zunehmender Inkubationsdauer werden 11 bis 40% der Zellen mit Trypanblau anfärbbar. Gleichwohl ist bei einer Re-Implantation der mindestens 60 min inkubierten Zellen kein Tumorstadium festzustellen.

Tabelle IV. SH-Gehalt der löslichen Proteine aus Plasma und Kern von EAT-Zellen nach 30 min Inkubation mit  $2 \times 10^{-4}$  M HPE-Lösung. K = Kontrollen, inkubiert in 0,9% NaCl.

Prot <sub>L</sub> -SH [ $10^{-9}$ m/mg Prot]		
	Plasma	Kern
K	143,5	125,3
HPE	133,3	98,9
– $\Delta$	$10,2 \pm 1,2$	$26,4 \pm 1,5$
– $\Delta\%$	$7,1 \pm 0,8$	$21,1 \pm 0,8$
n	4	4

Tabelle V. SH-Gehalt der löslichen Proteine aus Plasma und Kern von EAT-Zellen nach 30 min Inkubation in  $5 \times 10^{-3}$  M HNE-Lösung. K = wie in Tabelle IV.

Prot <sub>L</sub> -SH [ $10^{-9}$ m/mg Prot <sub>L</sub> ]		
	Plasma	Kern
K	141,1	151,8
HNE	87,4	90,5
– $\Delta$	$54,0 \pm 1,2$	$61,3 \pm 2,8$
– $\Delta\%$	$38,2 \pm 0,3$	$40,3 \pm 0,7$
n	3	3

Tabelle VI. SH-Gehalt der löslichen Proteine aus Plasma und Kern von EAT-Zellen nach 30 min Inkubation in  $2 \times 10^{-4}$  M HNE. K = wie in Tabelle IV.

Prot <sub>L</sub> -SH [ $10^{-9}$ m/mg Prot]		
	Plasma	Kern
K	130,0	162,8
HNE	127,7	118,0
– $\Delta$	$2,3 \pm 0,5$	$44,8 \pm 1,0$
– $\Delta\%$	$1,7 \pm 0,3$	$27,4 \pm 0,6$
n	4	3

Tabelle VII. Wirkungen von  $5 \times 10^{-4}$  M HNE auf EAT-Zellen *in vitro*.

Inkub. Zeit [min]		
30	Intakt	49
	Stal	40
	Trypan	11
	Re-Impl.	5/0/1
60	Intakt	45
	Stal	27
	Trypan	26
	Re-Impl.	9/0/0
120	Intakt	40
	Stal	20
	Trypan	40
	Re-Impl.	6/0/0

Intakt, % morphologisch intakt erscheinender Zellen; Stal, % „stalagmotischer“ Zellen. („Stalagmose“ (Ratzenhofer) bedeutet die Extrusion kugelförmiger Tröpfchen [15]); Trypan, % mit Trypanblau angefärbter, nicht mehr vitaler Zellen; Re-Impl., Beobachtungen nach Re-Implantation der vorinkubierten Zellen: 1. Ziffer, Zahl der Tiere ohne makroskopisch erkennbaren Solidtumor und ohne Tumorzellen im Ascites; 2. Ziffer, Zahl der Tiere mit verminderter Tumorbildung; 3. Ziffer, Zahl der Tiere mit im Vergleich zu den Kontrollen unverändertem Solid- und Ascitestumor.

## Diskussion

Zur Frage der Kontamination der Plasmafraktion durch Kern-Proteine lieferten die Bestimmung der Kernausscheiden und der Marker-Enzymaktivität bei EAT-Zellen übereinstimmende Werte:

Einerseits wurden 15% der Enzymaktivität im Plasma gefunden, andererseits gingen etwa 12% der Kerne bei der Isolierung verloren. Bei den Hepatomen waren die Verluste an Kernen bei der Isolierung wesentlich höher, was mit den unterschiedlichen Isolierungsmethoden und Stabilitäten der Kern-Arten zusammenhängen dürfte. So postulierten Ove *et al.* [16] einen Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Schwellungseigenschaften von Leber- bzw. Hepatom-Kernen und dem Phospholipidgehalt der jeweiligen Kernmembranen.

Die an der Plasmafraktion gemessenen Prot<sub>L</sub>- und Prot<sub>L</sub>-SH-Werte werden, weder bei EAT-Zellen noch bei den Hepatomen, durch ausgetretene Kernproteine wesentlich beeinflusst, da die löslichen Kernproteine nur wenige Prozente der löslichen Plasmaproteine ausmachen.

Isoliert man, wie dies bisher geschah [7, 8] die löslichen Proteine aus den kompletten Zellen, so erhält man daher im wesentlichen die löslichen Plasmaproteine.

Die an den  $\text{Prot}_L$  der Gesamtzellen bisher bestimmten Parameter,  $\text{Prot}_L\text{-SH}$  wie auch  $\Delta \text{Prot}_L\text{-SH}$ , erweisen sich nunmehr eindeutig als Parameter des Cytoplasmas; die Kern- $\text{Prot}_L$  sind kaum beteiligt. Wenn somit bisher gefunden wurde, daß der SH-Gehalt und die Zahl der HPE-reaktiven SH-Gruppen der löslichen Zellproteine in schneller wachsenden Tumoren ansteigen [1], so kann sich diese Aussage im wesentlichen nur auf die Plasmaproteine beziehen. Das bedeutet, daß durch  $5 \times 10^{-3}$  M Lösung von HPE hauptsächlich cytoplasmatische  $\text{Prot}_L\text{-SH}$  blockiert werden, die für die Zellteilung von funktioneller Bedeutung sind. In der Tat wurde gefunden, daß durch diese HPE-Konzentration die Glycolyse und die Atmung gehemmt werden [17] und zwar durch Blockierung [18] SH-funktioneller Enzyme.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht nun erstmals auch eine Reaktion mit den Kern- $\text{Prot}_L\text{-SH}$  eindeutig hervor, die nach Inkubation in  $5 \times 10^{-3}$  M HPE keineswegs geringer ist, als die der Plasma- $\text{Prot}_L$ .

Funktionell ist sie sicher ebenso von großer Bedeutung, denn auf ihr beruht zweifellos die gleichfalls festgestellte Hemmung der DNS- und RNS-Biosynthese [18]. Die bisher mit  $5 \times 10^{-3}$  M HPE bei Tumorzellen festgestellten Wirkungen lassen sich somit folgendermaßen formulieren und lokalisieren: Im Cytoplasma führt der Verlust von rund 67 nmol SH/mg  $\text{Prot}_L$  zur 100-prozentigen Hemmung von Atmung und Glykolyse [18], möglicherweise auch zur Hemmung ribosomaler Prozesse, die für die Proteinsynthese von Bedeutung sind.

Desintegration des Cytoplasmas äußert sich in gravierenden, irreversiblen morphologischen Veränderungen („Stalagmose“, „Stalagmoptyse“), die Anzeichen des eingetretenen Zelltodes sind [15].

Im Zellkern reagieren ebenfalls knapp 70 nmol SH/mg  $\text{Prot}_L$ , woran die funktionellen SH-Gruppen der NS-Synthetasen beteiligt sind, denn sowohl DNA- als auch RNA-Synthese sind zu 100% blockiert [18, 19].

Von allen hier genannten Prozessen zeigt die DNA-Synthese die höchste Empfindlichkeit gegenüber HPE: Sie wird bereits nach halbstündiger Einwirkung von  $2 \times 10^{-4}$  M HPE zu über 90% gehemmt, während Atmung und Glykolyse noch nicht meßbar betroffen sind [18, 19].

Dies legt die Annahme nahe, daß HPE in  $2 \times 10^{-4}$  M Lösung die  $\text{Prot}_L\text{-SH}$  im Zellkern selektiv

angreift. Diese Annahme wird durch die vorliegenden Ergebnisse vollauf bestätigt, denn nach Einwirkung der genannten HPE-Konzentration beträgt der SH-Verlust im Cytoplasma nur mehr 10, im Zellkern dagegen immerhin noch 26 nmol/mg  $\text{Prot}_L$  (Tab. IV).

Die selektive Wirkung der Hydroxyalkenale auf bestimmte SH-Gruppen der löslichen Zellproteine wird durch den mehr hydro- oder lipophilen Charakter des Aldehyds beeinflusst. So zeigt das 9-C-homologe Hydroxynonenal in  $2 \times 10^{-4}$  M Lösung die Selektivwirkung auf die nuklearen  $\text{Prot}_L\text{-SH}$  noch wesentlich ausgeprägter (Tab. V).

Die Reaktion der Hydroxyalkenale mit SH-Gruppen konnte als Michael-Addition an die  $\text{trans-CH=CH}$ -Gruppe eindeutig aufgeklärt werden [20].

Zusammenfassend ergibt sich, daß Hydroxyalkenale, wenn sie *in vitro* in  $10^{-4}$  M Lösung auf vitale Tumorzellen einwirken, das Cytoplasma durchdringen, ohne für Atmung und Glykolyse funktionelle Protein-SH-Gruppen anzugreifen, im Zellkern jedoch 20–30% der SH-Gruppen blockieren, darunter diejenigen, die für die DNA-Synthese funktionell wichtig sind. Sie hemmen somit die DNA-Synthese nicht über den Energiestoffwechsel, sondern über die Synthetase-Systeme [18, 21].

Die Frage ist, ob bereits dies auch zu einer Hemmung der Transplantabilität der Tumorzellen am lebenden Tier führt. Wie der Eine von uns, H. M. T., in eingehenden Untersuchungen, über die demnächst a.a.O. berichtet werden wird, zeigen konnte, verhindert bereits eine 60 min lange Einwirkung einer  $5 \times 10^{-4}$  M HNE-Lösung *in vitro* das Angehen der re-implantierten Tumorzellen vollständig (Tab. VII).

Die „Stalagmose“, sofern sie noch nicht zur vollständigen Abtrennung der Extrusion geführt hat („Stalagmoptyse“) kann als, gegebenenfalls noch reversible, Desintegration des Cytoplasmas aufgefaßt werden [15, 23]. Sie ist – wie auch der negative Ausfall der Trypanblaufärbung anzeigt – sicher noch nicht Ausdruck des eingetretenen Zelltodes.

Somit ergibt sich, daß beispielsweise bei der 60 min Inkubation über 70% der Zellen weder färberisch noch morphologisch als tote Zellen anzusprechen sind, bei der Re-Implantation jedoch nicht mehr angehen

Dies führt zu dem Schluß, daß Hydroxyalkenale, insbesondere das Hydroxynonenal, in 2 bis  $5 \times 10^{-4}$  M Lösung nach mindestens 60 min Einwirkung *in vitro* auf den EAT das Wiederangehen der Zellen

im lebenden Tier in der Hauptsache durch selektive Blockade der nuklearen SH-Gruppen der Nukleinsäure-Synthetasen verhindern, nicht aber durch die Abtötung der Zellen.

### Danksagung

Die Arbeiten wurden vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Wien, subventioniert.

- [1] E. Schauenstein, J. Gölls, H. Waltersdorfer u. R. J. Schaur, *Z. Naturforsch.* **33 c**, 79 (1978).
- [2] W. B. Looney, A. A. Mayo, P. M. Allen, J. W. Morrow u. H. P. Morris, *Brit. J. Cancer* **27**, 341 (1973).
- [3] H. P. Morris u. W. E. Griss, *Adv. Exp. Med. Biol.* **92**, 431 (1978).
- [4] R. Schindler, Dissertation, Karl-Franzens-Universität Graz, 1971.
- [5] R. Rindler, Dissertation, Karl-Franzens-Universität Graz, 1967.
- [6] H. Esterbauer u. W. Weger, *Mh. Chem.* **98**, 1884 (1967).
- [7] R. Rindler u. E. Schauenstein, *Z. Naturforsch.* **25 b**, 739 (1970).
- [8] E. Schauenstein, R. Rindler, R. Schindler u. M. Taufer, *Z. Naturforsch.* **26 b**, 788 (1971).
- [9] E. W. Lynch, R. F. Brown, T. Umeda, S. G. Langreth u. I. Lieberman, *J. Biol. Chem.* **245**, 3911 (1970).
- [10] F. P. Mamaril, A. Dobrjansky u. S. Green, *Cancer Res.* **30**, 352 (1970).
- [11] H. U. Bergmeyer, K. Gawehn u. M. Graßl, In: *Methoden der enzymatischen Analyse* (Hrsg.: H. U. Bergmeyer) 3. Aufl., **Band I**, S. 519, Verlag Chemie, Weinheim 1974.
- [12] G. Rendina, *Experimental Methods in Modern Biochemistry*, S. 118, Saunders, London 1971.
- [13] K. Burton, *Biochem. J.* **62**, 315 (1956).
- [14] G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **74**, 443–450 (1958).
- [15] E. Schauenstein, J. Zangger u. M. Ratzenhofer, *Z. Naturforsch.* **19 b**, 923–929 (1964).
- [16] P. Ove, M. L. Coetzee u. H. P. Morris, *Cancer Res.* **31**, 1389 (1971).
- [17] E. Schauenstein u. E. Kapfer, *Mh. Chem.* **103**, 1200 (1972).
- [18] I. J. Bickis, E. Schauenstein u. M. Taufer, *Mh. Chem.* **100**, 1077 (1969).
- [19] E. Schauenstein und H. Esterbauer, *Submolecular Biology and Cancer*, Ciba Foundation Series **67**, 225 (1979).
- [20] E. Schauenstein, F. Dorner u. J. Sonnenbichler, *Z. Naturforsch.* **23 b**, 316 (1968).
- [21] S. Seeber, P. Warnecke u. U. Weser, *Z. Krebsforsch.* **72**, 137 (1969).
- [22] H. Kharrazi, Dissertation, Karl-Franzens-Universität Graz 1977.
- [23] E. Schauenstein, W. Wöhl u. J. Kramer, *Z. Naturforsch.* **23 b**, 530–537 (1968).