nachweisbar. Dieser Reflex bleibt ferner bei der Aufnahme von orientierten Schichten als einziger Kleinwinkelreflex ringförmig. Alle anderen Kleinwinkelreflexe sind unter diesen Bedingungen im Meridian verstärkt. Die Kristalle, an denen diese Reflexe entstehen, sind also so orientiert, daß ihre großen Netzebenen etwa parallel zur Oberfläche der angetrockneten Schicht und zu den Proteidlamellen orientiert sind. In gefriergetrockneten Chloroplasten liegen die Verhältnisse für die Bildung von Kristallen wegen der höheren Dispersität der Präparate begreiflicherweise ungünstiger.

Durch die hier nachgewiesenen, bei Wasserverlust erfolgenden Entmischungsvorgänge findet auch eine bisher unverständliche polarisationsoptische Beobachtung ihre Deutung. Chloroplasten sind bekanntlich doppelbrechend und schwach dichroitisch⁴. Angetrocknete Schichten von Chloroplasten sind ebenfalls doppelbrechend, nicht aber dichroitisch. Der Verlust des Dichroismus beim Antrocknen erfolgt nun, weil die Chlorophyllmoleküle bei der Entmischung der Lipide ihre bevorzugte Orientierung verlieren. Die positive Doppelbrechung der angetrockneten Schichten dürfte hauptsächlich durch orientierte Kristalle hervorgerufen werden.

Daß Wasserentzug zur Entmischung und Kristallisation von Lipiden in lebenden Pflanzenzellen führen kann, beweist ein Versuch mit Sporen von *Mnium hornum*. Diese gaben gleich nach der Entnahme aus den reifen Kapseln nur einen sehr schwachen Reflex bei 60–61 Å. An der Luft getrocknete, aber noch keimfähige Sporen ergaben zwei starke Reflexe bei 52 und 83 Å und einen sehr schwachen bei 62 Å. Beim Aufenthalt der getrockneten Sporen in wasserdampfgesättigter Luft verschwinden im Laufe mehrerer Tage die Interferenzen bei 52 und 83 Å, während der Reflex bei 62 Å noch schwächer wird.

Auch Änderung der Oberflächenspannung kann, wie LIEBALDT⁹ schon vor längerer Zeit nachgewiesen hat, eine Entmischung der Lipide in Chloroplasten bewirken. Das Lipoproteidsystem der Chloroplasten ist offenbar sehr labil und nur in Gegenwart von Wasser beständig.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung des Bundesministeriums für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.

Über das erste phosphorylierende Ferment der Gärung im normalen Stoffwechsel und im Krebsstoffwechsel

Von LUTZ KIESOW

unter Mitwirkung von W. KATTNER und U. SCHMITZ

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem

(Direktor: Professor Dr. Dr. ERNST SCHÜTTE)

(Z. Naturforsch. 15 b, 487–494 [1960]; eingegangen am 9. Mai 1960)

In lebenden, normalen und embryonalen Zellen ist die Reaktionsgeschwindigkeit des ersten phosphorylierenden Ferments der Gärung langsam.

Diese Reaktion ist in Krebszellen sehr wirksam und es entsteht aus der langsamen Reaktion normaler Zellen die schnelle Reaktion der Krebszellen, wenn normale Zellen in vitro wachsen und dabei Krebsstoffwechsel bekommen.

Seit dem Jahre 1923 weiß man durch die Entdeckung OTTO WARBURGS¹ von der aeroben Gärung der Tumoren, einer Eigenschaft, die die Krebszellen von allen anderen normalen Körperzellen, auch von den embryonalen², unterscheidet. Besonders die methodischen Fortschritte der letzten Jahre, die zu zahlreichen neuen und günstigen Versuchsobjekten geführt haben, stellen das Problem des Gärungs-

stoffwechsels klar und unwiderlegbar als das Problem des Krebsstoffwechsels und seiner Entstehung in den Vordergrund. Deshalb ist jedes Experiment wichtig, das Neues zum Verständnis der Gärung der Tumoren beiträgt.

Wir haben im vergangenen Jahre mit dem ersten phosphorylierenden Ferment der Gärung an der lebenden Zelle experimentiert^{3, 4, 5} und beobachteten

¹ O. WARBURG, Biochem. Z. 142, 317 [1923]; O. WARBURG, K. POSENER u. E. NEGELEIN, Biochem. Z. 152, 309 [1924].

² E. NEGELEIN, Biochem. Z. 165, 122 [1925].

³ L. KIESOW, Z. Naturforsch. 14 b, 492 [1959].

⁴ L. KIESOW, Z. Naturforsch. 15 b, 171 [1960].

⁵ L. KIESOW, Z. Naturforsch. 15 b, 293 [1960].

dabei immer einen Zusammenhang zwischen der Gärungsgröße unserer Versuchsobjekte und der Aktivität dieses Fermentes. Wir fanden dann weiter, daß sich die Wirksamkeit dieses Enzyms in den normalen und embryonalen Zellen einerseits und in den Tumorzellen andererseits unterscheidet⁶, und zwar so, daß das Ferment im Leben immer dann sehr wirksam ist oder wird, wenn der Gärungsstoffwechsel vorhanden ist oder entsteht. Unsere Versuche haben uns gezeigt, daß das aerob langsam wirkende erste phosphorylierende Ferment der Gärung eine Angelegenheit der intakten, lebenden, normalen und embryonalen Zelle ist. Demnach ist die Hexokinase in diesen Zellen nur schwach wirksam geworden und sie wird wieder stark wirksam, wenn man die Zellen zerstört, sie z. B. auffriert oder zerreibt. Das Ferment wird aber auch in lebenden, normalen Zellen stark wirksam, wenn aus ihnen beim Wachstum in vitro Zellen mit dem Gärungsstoffwechsel der Krebszellen entstehen. Die Versuche, die das belegen, sind der Inhalt der vorliegenden Arbeit. Sie waren möglich geworden durch Anwendung der Desoxyglucose-Methoden und durch neue Versuchsobjekte, die OTTO WARBURG in die Zellphysiologie eingeführt hat.

1. Normale Körperzellen und Krebszellen

Da normale Körperzellen, wenn man unter physiologischen Bedingungen mißt, keine, die Krebszellen, aber eine beträchtliche aerobe Gärung haben⁷, muß es mindestens eine Reaktion geben, die sich genauso verhält wie die Gärung und es ist mehr als wahrscheinlich, daß diese Reaktion ein fermentativer Vorgang ist. Dieser Unterschied zwischen den normalen Zellen und den Krebszellen ist an das Leben der Zellen gebunden, denn er verschwindet weitgehend, wenn man normale Zellen schädigt oder zerstört. Man muß seine enzymchemische Ursache also im Leben messen und das ist ein Problem, das man heute nur bei einem Ferment der Gärung experimentell angehen kann, nämlich bei dem ersten phosphorylierenden Ferment, der Hexokinase. Die Aktivität dieses Fermentes kann man in der lebenden Zelle durch einen Zucker messen, der durch Hexokinase phosphoryliert wird, der aber darüberhinaus keine weiteren Umsetzungen erfährt. Solch ein Zucker ist z. B. die 2-Desoxy-D-glucose. Mißt man die Phosphorylierungs-Geschwindigkeit dieses Zuckers

durch normale Zellen, wie Leber (2) und Niere (3) und durch Krebszellen (1), so findet man, wenn man die Anfangsgeschwindigkeiten in Abb. 1 vergleicht,

Abb. 1. Phosphorylierung von 2-Desoxy-D-glucose durch lebende Zellen in inaktiviertem Mäuse-Ascites-Serum. Trypsinierte Organzellen bzw. Ascites-Krebs-Zellen sind in 3 cm³ Serum suspendiert und befinden sich in einem kastenförmigen Manometriegefäß. Die Gasphase enthält 5 Vol.-% CO₂-O₂ und die Thermostatentemperatur beträgt 38 °C. Zur Zeit t_0 wird die Reaktion durch Zugabe von 6 mg 2-Desoxy-D-glucose gestartet und zu den Zeiten $t_1, t_2 \dots t_n$ werden je 0,3 cm³ Suspension abgenommen und in 3 cm³ eiskalte 3,3-proz. Perchlorsäure pipettiert, von der nach dem Abzentrifugieren der Fällung 0,20 cm³ zur fermentativen Desoxyglucose-Bestimmung eingesetzt werden. Die genaue 2-Desoxyglucose-Konzentration zur Zeit t_0 erhält man durch 3 cm³ Zellsuspension, die 15 min auf 60 °C erwärmt wurden. Die Ordinate zeigt die von 10 mg Zelltrockengewicht phosphorylierte Desoxyglucose ($C_{t_0} - C_{t_x}$), die Abszisse markiert die Zeit. Versuch 1: 6 Tage alte Ascites-Krebszellen, Versuch 3: Mäuse-Niere, Versuch 2: Mäuse-Leber.

den gleichen großen Unterschied, den man von der Gärungsmessung mit der manometrischen Methode her kennt. Wie die Abbildungslegende und das Protokoll zeigen, ist der Unterschied in der Zuckerphosphorylierung zwischen normalen Zellen und Krebszellen groß. Der Unterschied wird bei diesem Versuch besonders deutlich, weil er, wie die Gärung bei der Manometrie an intakten, lebenden Zellen in homologem Serum gemessen wurde. Um mit den Organen genauso sicher und einfach experimentieren zu können wie z. B. mit Ascites-Krebszellen, haben wir sie mit Trypsin in Einzelzellen aufgelöst und in inaktiviertem Mäuse-Ascites-Serum für die Messung suspendiert. Das Ascites-Serum hat dabei den Vorteil, daß man es leicht in großen Mengen gewinnen kann, daß es für Mäuseorgane homolog ist und daß es keine Glucose enthält und somit die zum Beginn der Reaktion zugesetzte Desoxyglucose der einzige Zucker ist, der den im Serum suspendierten Zellen zur Aufnahme und Phosphorylierung zur Verfügung

⁶ L. KIESOW, Vortrag auf der Tagung d. Gesellschaft f. Physiol. Chemie, Berlin, September 1959.

⁷ O. WARBURG, K. GAWEHN u. A. W. GEISSLER, Z. Naturforschg. 12b, 115 [1956].

steht. Man wird sich bei solchen Versuchen für jede Zellart aber davon überzeugen müssen, ob die Desoxyglucose tatsächlich *nur* den Reaktionsschritt des ersten phosphorylierenden Gärungsfermentes durchläuft. Wir haben das stets getan, indem wir die Glykolyse mit Desoxyglucose gemessen haben, sie war immer Null, und wir haben durch chromatographische Analyse die Reaktionsprodukte des Desoxyzuckers in den Zellen bestimmt. Dabei fanden wir nur Desoxyglucose und ihren 6-Phosphorsäureester*.

Weil Zellextrakte zerstört, normaler Körperzellen aerob gären, haben wir das erste phosphorylierende Ferment der Gärung mit dem optischen Test Warburgs in durch flüssigen N_2 aufgefrorenen und zerriebenen Zellen gemessen. Dabei war das Ferment mit Co-faktoren und Substrat gesättigt. Die Ergebnisse waren:

Hexokinase von:	$[A] = \left[\frac{\mu\text{Mole Glucose}}{\text{mg Trockengew. Stde.}} \right]$
Nierenzellen	$0,48 \pm 0,02$
Ascites-Krebszellen	$2,12 \pm 0,07$

Wie man sieht, zeigen die normalen Körperzellen schon bei 25°C eine beträchtliche Fermentaktivität, die zwar kleiner ist als die der zum Vergleich gemessenen Ascites-Krebszellen, die aber sehr viel größer ist als die Aktivität dieses Fermentes bei 25°C im Leben, denn bei dieser Temperatur findet man mit der Desoxyglucose-Methode praktisch keine Zuckerphosphorylierung durch normale lebende Körperzellen. Nur die Krebszellen vermögen auch noch bei dieser Temperatur Zucker zu phosphorylieren.

In normalen Körperzellen ist also mit anderen Worten das erste phosphorylierende Ferment der Gärung in erheblicher Menge vorhanden, aber es ist schwach wirksam, wenn man es im Leben mißt und es wird stark wirksam, wenn man die Zellen schädigt oder zerstört. Dieses Ferment ist aber in den lebenden Tumorzellen von vornherein sehr wirksam.

2. Embryonale Zellen und embryonale Zellen in der Gewebekultur

Das Verhalten der embryonalen Zellen bei der aeroben Zuckerphosphorylierung ist aus zweierlei Gründen von Interesse. Erstens handelt es sich bei diesen Zellen ebenfalls um schnell wachsende Zellen, die aber in vivo ohne aerobe Glykolyse wachsen

und zweitens bekommen diese Zellen, wenn man sie in der Gewebekultur züchtet, schon innerhalb 48 Std. den Gärungsstoffwechsel der Krebszelle mit allen seinen Eigentümlichkeiten. Dieses Verhalten in der Gewebekultur hat WARBURG** an trypsinisierten Hühnerembryonen entdeckt und mir gestattet, dieses Ergebnis zu benutzen und im Zusammenhang mit meinen Versuchen darüber zu berichten. Ich bin Herrn Professor WARBURG dafür großen Dank schuldig, denn dieses Material, das er mir empfahl, hat die Versuche über die Wirkung des ersten phosphorylierenden Gärungsfermentes in lebenden, embryonalen Zellen überhaupt erst ermöglicht und darüber hinaus gestattet, die Veränderungen dieses Fermentes bei der Entstehung des Krebsstoffwechsels in diesen Zellen bei der in vitro-Züchtung zu messen.

Löst man 10 Tage alte Hühnerembryonen durch Behandlung mit Trypsin in Einzelzellen auf (siehe Abschnitt 4) und mißt man ihren Stoffwechsel in inaktiviertem Serum, das im cm^3 2 mg Glucose enthält, so findet man bei 38°C mit der Zweigefäßmethode der Manometrie z. B. die folgenden Stoffwechselquotienten:

Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_M^O	Q_M^{Argon}	Q_{MEYERHOF}
— 8,8	7,6	0	15,6	1,8

Abb. 2. Die Phosphorylierung von 2-Desoxyglucose durch frische embryonale Zellen und embryonale Zellen aus der Zellkultur. Versuchsanordnung wie in Abb. 1. Kurve 2 zeigt die Desoxyzucker-Phosphorylierung durch frische trypsinisierte 10 Tage alte Hühnerembryonen. Kurve 1 die Phosphorylierung durch die gleichen Zellen nach 48-stdg. Zellkultur. Beide Kurven beziehen sich auf 10 mg Zelltrockengewicht.

* Über diese Versuche wird Herr W. KATTNER noch an anderer Stelle berichten.

** Anm. b. d. Korr.: Dieses Ergebnis ist in der Zwischenzeit von O. WARBURG, K. GAWEHN u. A. W. GEISSLER, Z. Naturforsch. 15b, 378 [1960] veröffentlicht worden.

Wir haben zahlreiche solcher Messungen gemacht und haben in Übereinstimmung mit WARBURG niemals aerobe Gärung beobachtet. Mißt man in diesen Zellen die Phosphorylierung der 2-Desoxyglucose, also die Reaktion des ersten phosphorylierenden Fermentes, so findet man die langsame Reaktion der normalen Zellen (s. Abb. 2, Kurve 2).

Bringt man die frischen, trypsinisierten embryonalen Zellen in Lactalbumin-Nährlösung, gießt diese homogene Suspension in Petrischalen aus und läßt sie 48 Stdn. bei 38 °C im Brutschrank stehen, wobei die Zellen gut wachsen — was ein Beweis dafür ist, daß die durch die Trypsinbehandlung erhaltenen Zellen leben —, so entstehen Zellen, die in glucosehaltigem Serum bei 38 °C folgende Stoffwechselquotienten haben:

Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_M^O	Q_M^{Argon}	$Q_{MEYERHOF}$
—5,3	17	11,7	46	6,5

Wie man sieht, ist in sehr kurzer Zeit der Gärungsstoffwechsel der Krebszellen entstanden, nämlich die hohe Gärung, die zu kleine Atmung und die daraus resultierende aerobe Gärung*. Der hohe Meyerhof-Quotient dieser Zellen zeigt außerdem, daß die Atmung genau so wie die der Ascites-Krebszellen² und der Kulturhefezellen⁸ sehr wirksam ist. Wie im nachfolgenden Kapitel über Crabtree-Effekte ausgeführt wird, ist die kleine Atmung der embryonalen Zellen aus der Gewebekultur nichts Primäres, sondern sie ist eine Folge des Gärungsstoffwechsels, denn man beobachtet sie nur in Anwesenheit von Zucker.

Wir haben nun in den Zellen, die in der Gewebekultur mit Krebsstoffwechsel wachsen, wieder die Reaktionsgeschwindigkeit des ersten phosphorylierenden Gärungsfermentes im Leben gemessen und erhalten dabei Kurven wie die Kurve 1 der Abb. 2. Jetzt ist aus der langsamen Hexokinase-Reaktion der normalen, embryonalen Zellen die schnelle Zuckerphosphorylierung der Krebszellen entstanden. Dieses Verhalten der Hexokinase-Reaktion mußte man nach den Versuchen an normalen Körperzellen und Krebszellen erwarten, wenn man annimmt, daß

der Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit des ersten phosphorylierenden Fermentes der Gärung in der lebenden Zelle die Ursache für das Zustandekommen des Gärungsstoffwechsels der Krebszellen ist. Vergleicht man die Geschwindigkeiten der Zuckerphosphorylierung in lebenden und in zerstörten embryonalen Zellen vor und nach dem Wachstum in vitro, d. h. vergleicht man Abb. 2 mit der folgenden Tabelle:

Hexokinase von:	$[A] = \left[\frac{\mu\text{Mole Glucose}}{\text{mg Trockengew.} \cdot \text{Stde.}} \right]$
Embryonalen Zellen	$0,95 \pm 0,04$
Embryonalen Zellen nach in vitro-Wachst.	$0,99 \pm 0,04$

so findet man die gleichen Verhältnisse wie bei den normalen Körperzellen und bei den Ascites-Krebszellen, nämlich die latente Hexokinase in lebenden embryonalen Zellen, die auf zwei Wegen wirksam werden kann: 1. in den lebenden Zellen bei der „Carcinogenese“ in der Gewebekultur und 2. in den zerstörten Zellen, bei Auffrieren und Homogenisieren.

3. Atmung und Crabtree-Effekt

Seit der Beobachtung CRABTREES⁹ ist bekannt, daß man die Atmung von Tumorzellen durch Glucose hemmen kann. Wir haben diese Versuche an Nieren- und Leberzellen und an embryonalen Zellen, die wir durch Trypsinbehandlung aus den Mäuseorganen erhielten und in inaktiviertem Ascites-Serum suspendierten, wiederholt und haben bei den normalen Körperzellen keine Crabtree-Effekte gefunden**. Nur die Ascites-Krebszellen zeigten mit Glucose und Desoxyglucose gleich große Crabtree-Effekte (wie auch K. IBSEN, E. COE und R. McKEE¹⁰ beobachteten). Da ich durch Anwendung der Desoxyglucose an Kulturhefezellen zeigen konnte^{3,4}, daß es nur eine Reaktion der Gärung ist, die die Atmung der Zellen hemmt, nämlich die des ersten phosphorylierenden Fermentes und daß weiter die Bindung der Orthophosphorsäure die Ursache des Crabtree-Effektes ist⁵,

* Anm. b. d. Korr.: Wir haben in der Zwischenzeit gefunden, daß diese Zellen nicht nur „Krebsstoffwechsel“ besitzen, sondern auch Krebszellen sind. Denn wenn man sie nach 48-stdg. Zellkultur Tieren, unter geeigneten Bedingungen, reimplantiert, wachsen sie als Krebszellen weiter und erzeugen Tumoren. Wir werden darüber demnächst berichten.

⁸ L. KIESOW, Z. Naturforschg. **14b**, 224 [1959].

⁹ H. G. CRABTREE, Biochem. J. **23**, 536 [1929].

** Aus der noch unveröffentlichten Dissertation von W. KATTNER.

¹⁰ K. H. IBSEN, E. L. COE u. R. W. McKEE, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **30**, 384 [1958].

waren die trypsinierten Hühnerembryonen ein ideales Objekt, diese Vorstellungen an tierischen Zellen zu überprüfen.

Frische, embryonale Zellen, die wie aus vorangehendem Abschnitt hervorgeht, keine aerobe Glykolyse und die langsame Hexokinase-Reaktion haben, dürften also keinen Crabtree-Effekt zeigen. Die gleichen Zellen besitzen aber nach der in vitro-Züchtung eine beträchtliche aerobe Glykolyse und die schnelle Hexokinase-Reaktion der Krebszellen. Man muß deshalb bei ihnen sowohl mit Glucose als auch mit Desoxyglucose Atmungshemmung finden. Wir haben diese Versuche mit den entsprechenden Hühner-Embryonalzellen durchgeführt. Die Zellen werden dazu in inaktiviertem Ascites-Serum suspendiert, das für diese Zwecke sehr geeignet ist, weil es keine Glucose, sondern nur Milchsäure enthält, so daß man den Stoffwechsel ohne und mit Zucker unter den gleichen physiologischen Bedingungen mit der Zweigefäßmethode der Manometrie an ein und derselben Zellsuspension messen kann. Wir erhielten z. B. diese Ergebnisse:

Frische, trypsinierte Hühnerembryonen	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	$Q_{\frac{O_2}{CO_2}}$
in glucosefreiem Ascites-Serum	-8,6	6,9	—
in Ascites-Serum mit 2 mg Glucose/cm ³	-8,8	7,6	0

Die gleichen Zellen zeigten nach 48stdg. Wachstum in vitro folgende Stoffwechselquotienten:

48 Stdn. in vitro gewachsene Hühnerembryonalzellen	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	$Q_{\frac{O_2}{CO_2}}$
in glucosefreiem Ascites-Serum	-9,0	9,0	—
in Ascites Serum mit 2 mg Glucose/cm ³	-3,0	17,1	14,1

Bei diesen Messungen enthielten die Haupträume eines kastenförmigen Gefäßpaares je 7 cm³ der jeweiligen Zellsuspension und die Birnen 0,2 cm³ Serum mit 14 mg Glucose. Erst wurde der Stoffwechsel ohne und dann mit dem Zucker gemessen. Wie man sieht, zeigen nur die embryonalen Zellen, die durch die in vitro-Züchtung Krebsstoffwechsel erhalten haben, die Atmungshemmung durch Glucose. Man sieht ferner, daß die kleine Atmung dieser Zellen — genauso, wie man es an Ascites-Zellen zeigen kann — eine Folge des aeroben Gärungsstoffwechsels ist und somit eine Schädigung der Atmung a priori bei der Carcinogenese nicht notwendig ist.

Da sich embryonale Zellen aus der Gewebekultur in bezug auf das erste phosphorylierende Ferment der Gärung genauso verhalten wie Krebszellen und Kulturhefe, haben wir geprüft, ob auch bei ihnen die 2-Desoxyglucose gleich großen Crabtree-Effekt erzeugt. Der Versuch war dazu, wie oben beschrieben, angeordnet, nur wurde die Zellsuspension auf 2 Gefäßpaare aufgeteilt, von denen das eine Glucose, das andere 2-Desoxyglucose in den Birnen enthielt. Dabei fanden wir z. B.:

1. in glucosefreiem Serum: $Q_{O_2} = -13,4$ $Q_{CO_2} = 8,7$			
2. mit 2 mg Glucose pro cm ³ : $Q_{O_2} = -5,8$ $Q_{CO_2} = 17$ $Q_{\frac{O_2}{CO_2}} = 11,5$		3. mit 2 mg 2-Desoxyglucose pro cm ³ : $Q_{O_2} = -6,3$ $Q_{CO_2} = 4,9$ —	

Aus den Werten geht hervor, daß auch bei den Zellen aus der Gewebekultur die 2-Desoxyglucose einen mit der Glucose gleichgroßen Crabtree-Effekt verursacht, daß also mit anderen Worten, auch bei diesen Zellen das Zustandekommen einer schnellen Zuckerphosphorylierung im Leben ausreicht, um Atmungshemmung zu erzeugen und sie auch gleichzeitig erklärt.

Diese Versuche mit der Desoxyglucose zeigen im Vergleich mit dem Verlauf der Zuckerphosphorylierung noch etwas anderes. Analysiert man nämlich den Kurvenverlauf der Phosphorylierung der Desoxyglucose, wie ich es z. B. an Kulturhefezellen und wie KATTNER* es an Ascites-Krebszellen getan hat, so findet man nach der schnellen Anfangsphase einen scheinbaren Stillstand der Reaktion, der aber in Wirklichkeit nur ein stationärer Zustand ist. Er setzt sich aus der Zuckerphosphorylierung und der Zuckerphosphat-Spaltung durch Phosphatase zusammen. Hemmt man z. B. die Phosphorylierung durch Anaerobiose, Blausäure oder Entkoppler, so überwiegt die Dephosphorylierung. Das Hexosephosphat wird gespalten und der freie Desoxyzucker läuft wieder aus den Zellen heraus³. Dieser stationäre Zustand, in dem man gleichzeitig den Crabtree-Effekt mißt, lehrt also zwei Dinge: Nämlich, daß der Reaktion des ersten phosphorylierenden Fermentes der Gärung in lebenden Zellen, die Krebsstoffwechsel haben, erhebliche Mengen ATP zur Verfügung stehen müssen und daß im Gleichgewicht ständig ADP gebildet wird. Trotz dieser ADP-Bildung beobachtet

* W. KATTNER, unveröffentlichte Dissertation.

man aber Atmungshemmung, so daß es sehr unwahrscheinlich wird, daß ADP-Mangel am Ort der oxydativen Phosphorylierung die Ursache für den Crabtree-Effekt ist (z. B. l. c.¹¹), sondern es ist wahrscheinlicher, daß im Sinne von LYNEN, die Bindung der Orthophosphorsäure die Atmungshemmung verursacht, so wie man es z. B. isoliert für die Reaktionen der Chinonkatalyse zeigen kann⁵.

4. Material, Methoden und Protokolle

Trypsinbehandlung der Organe

Um die Stoffwechselgrößen von Organzellen in homogenen Zellsuspensionen messen zu können, haben wir die Mäuseorgane nach der Entnahme aus dem Tier in kleine Stückchen geschnitten und nach Dulbecco-Vogt in einer Lösung (nach l. c.¹²) von: 8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,2 g KH_2PO_4 ; 0,1 g $\text{MgCl}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$ und 2,5 g Trypsin „Difco 1 : 250“ im l bidest. Wasser bei 25 °C trypsinisiert. Die abgegossenen Zellen werden gekühlt zentrifugiert und in inaktiviertem Ascites-Serum in geeigneter Verdünnung zur jeweiligen Messung aufgenommen. Sollte die Hexokinase-Aktivität aufgeschlossener Zellen gemessen werden, so wurden die freigesetzten Zellen nach dem Abzentrifugieren in flüssigen N_2 eingetragen und darin aufgefroren.

Züchtung embryonaler Zellen in der Zellkultur

Dazu haben wir nach dem Vorschlag von WARBURG 10 Tage alte Hühnerembryonen nach dem Entfernen der Augen zerstückelt und die gesamten Embryonen in der Trypsin-Salzlösung gerührt. Die freigesetzten Zellen wurden abgegossen und bei niedriger g -Zahl gekühlt zusammenzentrifugiert. Für die Messung des normalen, embryonalen Stoffwechsels wurden diese Zellen in Ascites-Serum aufgenommen. Für die Züchtung in der Gewebekultur war das Medium die Lactalbumin-Nährlösung nach l. c.¹². Die in diesem Medium suspendierten Zellen wuchsen auf dem Boden von Petrischalen, die sich im Brutschrank bei 38 °C befanden. Die Nährlösung wurde im allgemeinen nach 48 Stdn. abgegossen und die durch sehr verdünnte Trypsin-Salzlösung (12,5 mg-% „Difco 1 : 250“) abgelösten Zellen abzentrifugiert und zur Messung im jeweiligen Medium suspendiert.

Bestimmung der 2-Desoxy-D-glucose

Will man die Phosphorylierung der 2-Desoxyglucose durch tierische Zellen, die in glucosefreiem Ascites-Serum suspendiert sind, messen, so wird man nicht die von uns früher angewandte quantitative Methode, der

die Stollische qualitative Bestimmung von Desoxyzucker zugrunde liegt, verwenden, sondern man wird das gelbe Ferment Glucoseoxydase benutzen, das mit 2-Desoxyglucose zwar langsamer, aber genauso stöchiometrisch wie mit Glucose reagiert (s. Abb. 3). 2-Desoxyglucose-6-phosphat gibt wie Glucose-6-phosphat mit dem Ferment keine Reaktion. Zur Bestimmung der

Abb. 3. Proportionalität von Desoxy-D-glucose-Konzentration und dem Logarithmus der Lichtschwächung bei $\lambda = 436 \text{ m}\mu$. Zu 0,2 cm³ der jeweiligen 2-Desoxyglucose-Lösung werden 5 cm³ Glucose-Reagenz „Boehringer“ gegeben. Das sind 5 cm³ 0,12-m. Phosphatpuffer pH 7 mit 1,25 mg Glucoseoxydase, 50 µg Peroxydase und 250 µg *o*-Dianisidin. 60 min wird bei 35 °C inkubiert und dann die Lichtschwächung bei $\lambda = 436 \text{ m}\mu$ und $d = 1 \text{ cm}$ gegen einen Reagenzienleerwert gemessen.

2-Desoxy-D-glucose benutzen wir die Testkombination zur Glucosebestimmung von „Boehringer“ und lassen die Reaktionen bei 35 °C ablaufen. Die Enteiweißung und Extraktion der Zellen im Medium erfolgt durch Perchlorsäure in einer Endverdünnung von 3 Vol.-Prozent.

Auf diese Weise kann man sehr kleine Mengen 2-Desoxyglucose in eiweißhaltigem Material bestimmen.

Bestimmung der Hexokinase-Aktivität

Die Organe wurden, wie oben beschrieben, trypsinisiert, die zusammenzentrifugierten Zellen zweimal in flüssigem N_2 eingefroren, und mit Salzlösung, die im l bidest. Wasser 8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ und 0,2 g KH_2PO_4 enthielt auf ca. das 10-fache Volumen verdünnt. Diese Suspension wurde im Glashomogenisator mit der Hand zerrieben und die Aktivität des ersten phosphorylierenden Fermentes in dem Überstand dieses Homogenats bestimmt. Um den Überstand zu erhalten, haben wir das Homogenat 2 min lang in einer kleinen Winkelzentrifuge (20 000 U/min., Rotationsradius $r = 3 \text{ cm}$) zentrifugiert. Die Aktivität des Fermentes wurde auf das Trockengewicht der äquivalenten Menge des Gesamt-Homogenats bezogen. Der optische Test nach Warburg wurde in spaltförmigen Mikroküvetten bei $t = 25 \text{ °C}$, $\lambda = 366 \text{ m}\mu$ und $d = 1 \text{ cm}$ durchgeführt.

Die Küvetten enthielten:

- 260 µl 0,1-m Tris-Puffer pH 7,2, der $2,5 \cdot 10^{-2}$ -m-Glucose und $2,5 \cdot 10^{-2}$ -m- MgCl_2 enthielt,
- 10 µl $3 \cdot 10^{-2}$ -m-TPN,
- 10 µl $3 \cdot 10^{-1}$ -m-ATP,

¹¹ B. HESS u. B. CHANGE, *Naturwissenschaften* **46**, 248 [1959].

¹² O. WARBURG, K. GAWEHN u. A. W. GEISSLER, *Z. Naturforsch.* **13b**, 588 [1958].

2 μ l Zwischenferment „Boehringer“,
20 μ l Enzymlösung.

Die Lösungen haben wir mit Konstriktions-Pipetten¹³ hinreichend genau pipettiert. Durch Variation der Testlösungsmenge wurde die Proportionalität zur Fermentmenge für jeden Versuch mehrmals überprüft.

Die Hexokinase-Aktivität haben wir folgendermaßen angegeben:

$$[A_{\text{Hexokinase}}] = \frac{\mu\text{Mole Glucose}}{\text{mg Trockengewicht} \cdot \text{Std.}},$$

wobei μ Mole Glucose die phosphorylierte Glucosemenge ist, die man durch die optisch gemessenen TPN-Reduktion erhält.

Manometrie

Die manometrischen Messungen wurden bei 38 °C in kastenförmigen Gefäßpaaren

$$(v' = 16,38 \text{ cm}^3; v = 22,03 \text{ cm}^3 \text{ und } v' = 17,48 \text{ cm}^3; v = 28,84 \text{ cm}^3)$$

durchgeführt. Die übrigen manometrischen Daten waren: $v_F = 7,2 \text{ cm}^3$; $v = 200/\text{min}$ und $\varepsilon = 10 \text{ mm}$. Unter diesen Bedingungen waren die Ausschläge immer unabhängig von der Schüttelfrequenz. CO_2 -Retention und Säure-Retention wurden für jeden Versuch und für die 7 cm^3 des jeweiligen Serums in Kästchen mit siamesischer bzw. einfacher Birne gemessen. Die Zellen (etwa 10–20 mg Trockengewicht) wurden zur Messung in inaktiviertem Ascites-Serum suspendiert, so daß homogene Suspensionen von Organzellen in die Gefäße pipettiert werden konnten. Damit war die Voraussetzung der Gefäßpaarmethode, die chemische und biologische Gleichheit der beiden Gefäßinhalte immer erfüllt.

Protokoll 1.

Der Stoffwechsel tryptinierter
10 Tage alter Hühnerembryonen

1. Aerober Versuch

Medium: Mäuse-Ascites-Serum. Temperatur: 38 °C. Gasphase: 5 Vol.-% CO_2 – O_2 . Zelltrockengewicht: 26,4 mg in jedem Gefäß. CO_2 -Retention von 7,2 cm^3 Serum: 0,557 $\text{mm}^3 \text{ CO}_2/\text{mm}$ Brodie. Die Haupträume des Gefäßpaares enthalten 7 cm^3 Zellsuspension; die Birnen 0,2 cm^3 Serum mit 14 mg Glucose. $v = 200/\text{min}$, $\varepsilon = 10 \text{ mm}$.

$$\begin{array}{ll} v' = 17,48 \text{ cm}^3 & v = 28,84 \text{ cm}^3 \\ k'_{\text{O}_2} = 0,919 \text{ mm}^2 & k_{\text{O}_2} = 1,917 \text{ mm}^2 \\ k_R^{\text{CO}_2} = 1,848 \text{ mm}^2 & k_R^{\text{CO}_2} = 2,846 \text{ mm}^2 \end{array}$$

Gefäßpaarformeln:

$$\begin{array}{l} x_{\text{O}_2} = H' \cdot 3,51 - H \cdot 5,4, \\ x_{\text{CO}_2} = -H' \cdot 5,19 + H \cdot 10,84. \end{array}$$

a) ohne Glucose

Δt [min]	$\Delta H'$ [mm]	ΔH [mm]
10	–27,5	–11
10	–27,5	–11
10	–27,5	–11
	–82,5	–33

$$\begin{array}{l} x_{\text{O}_2} = -111,7 \text{ mm}^3 \text{ O}_2; Q_{\text{O}_2} = -8,5, \\ x_{\text{CO}_2} = 70 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2; Q_{\text{CO}_2} = 5,3. \end{array}$$

b) Glucose eingekippt

Δt [min]	$\Delta H'$ [mm]	ΔH [mm]
10	–25	–9,0
10	–25	–8,0
10	–23,5	–8,5
10	–24	–8,5
10	–22,5	–8
	–120	–42

$$\begin{array}{l} x_{\text{O}_2} = -194,5 \text{ mm}^3 \text{ O}_2; Q_{\text{O}_2} = -8,8, \\ x_{\text{CO}_2} = 167,7 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2; Q_{\text{CO}_2} = 7,6, \\ Q_M^{\text{O}_2} = 0. \end{array}$$

2. Anaerober Versuch

Medium: Mäuse-Ascites-Serum mit 2 mg Glucose/ cm^3 . Temperatur: 38 °C. Gasphase: 5 Vol.-% CO_2 –Argon. Zelltrockengewicht: 11 mg. Milchsäure-Retention von 3,6 cm^3 Serum: 0,567 $\text{mm}^3 \text{ CO}_2/\text{mm}$ Brodie. $v = 29,76 \text{ cm}^3$; $v_F = 3,6 \text{ cm}^3$; $k_R^{\text{CO}_2} = 3,057 \text{ mm}^2$.

Δt [min]	Δh [mm]
10	+9,5
10	+9,5
10	+9,5
	+28,5

$$x_{\text{CO}_2} = 87,1 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2; Q_M^{\text{Argon}} = 15,8,$$

$$Q_{\text{Meyerhof}} = \frac{15,8 - 0}{8,8} = 1,8.$$

Die Zellen zeigen durch Glucose keine Atmungs-hemmung.

Protokoll 2.

Der Stoffwechsel von embryonalen
Zellen,
die 48 Std. in der Zellkultur gewachsen waren

1. Aerober Versuch

Medium: Mäuse-Ascites-Serum. Temperatur: 38 °C. Gasphase: 5 Vol.-% CO_2 – O_2 . Zelltrockengewicht: 12,2 mg in jedem Gefäß. CO_2 -Retention: 0,457 $\text{mm}^3 \text{ CO}_2/\text{mm}$ Brodie. Milchsäure-Retention: 0,958 $\text{mm}^3 \text{ CO}_2/\text{mm}$ Brodie.

$$v' = 16,38 \text{ cm}^3; v = 22,03 \text{ cm}^3.$$

a) Aerober Stoffwechsel ohne Glucose

Gefäßpaarformeln:

$$\begin{array}{l} x_{\text{CO}_2} = H' \cdot 4,35 - H \cdot 5,65, \\ x_{\text{O}_2} = -H' \cdot 7,04 + H \cdot 11,28. \end{array}$$

Δt [min]	$\Delta H'$ [mm]	ΔH [mm]
10	–14	–7
10	–14	–6
10	–14	–7
	–42	–20

$$x_{\text{CO}_2} = -69,7 \text{ mm}^3 \text{ O}_2; Q_{\text{O}_2} = -11,4, \\ x_{\text{O}_2} = 69,8 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2; Q_{\text{CO}_2} = 11,4.$$

b) Aerober Stoffwechsel mit Glucose
Gefäßpaarformeln:

$$x_{\text{O}_2} = H' \cdot 3,53 - H \cdot 4,34, \\ x_{\text{CO}_2} = -H' \cdot 7,03 + H \cdot 11,27.$$

Δt [min]	$\Delta H'$ [mm]	ΔH [mm]
20	+17	+14,5
30	+25	+24
30	+23	+28
	+65	+66,5

$$x_{\text{O}_2} = -59,2 \text{ mm}^3 \text{ O}_2; Q_{\text{O}_2} = -3,5, \\ x_{\text{CO}_2} = 292,5 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2; Q_{\text{CO}_2} = 18, \\ Q_{\text{M}}^{\text{O}_2} = 14,5.$$

2. Anaerober Versuch

Medium: Mäuse-Ascites-Serum mit 2 mg Glucose/cm³.
Temperatur: 38 °C. Gasphase: 5 Vol.-% CO₂-Argon.
Zelltrockengewicht: 12,2 mg. Milchsäure-Retention:
0,958 mm³ CO₂/mm Brodie.

$$v = 22,03 \text{ cm}^3; v_F = 7,2 \text{ cm}^3; k_R^{\text{CO}_2} = 2,649 \text{ mm}^2.$$

Δt [min]	Δh [mm]
10	27,5
10	28
10	28,5
	84,0

$$x_{\text{CO}_2} = 222,3 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2; Q_{\text{M}}^{\text{Argon}} = 36,5,$$

$$Q_{\text{Meyerhof}} = \frac{36,5 - 14,5}{3,5} = \frac{22}{3,5} = 6,3.$$

Die in vitro gewachsenen Zellen zeigen mit Glucose
Atmungshemmung.

Protokoll 3. 48 Std. in vitro gezüchtete,
embryonale Zellen zeigen Crabtree-
Effekt mit 2-Desoxyglucose

Medium: Mäuse-Ascites-Serum. Temperatur: 38 °C.
Gasphase: 5 Vol.-% CO₂-O₂. Zelltrockengewicht:
12,07 mg in jedem Gefäß. CO₂-Retention; 0,302 mm³

CO₂/mm Brodie.

$$v' = 17,48 \text{ cm}^3; v = 28,84 \text{ cm}^3.$$

Gefäßpaarformeln:

$$x_{\text{O}_2} = H' \cdot 4,16 - H \cdot 6,77, \\ x_{\text{CO}_2} = -H' \cdot 5,64 + H \cdot 11,76.$$

a) Aerober Stoffwechsel ohne 2-Desoxyglucose

Δt [min]	$\Delta H'$ [mm]	ΔH [mm]
10	-17	-6
10	-17	-6,5
10	-16	-6,5
10	-16,5	-6
	-66,5	-25

$$x_{\text{O}_2} = 107,7 \text{ mm}^3 \text{ O}_2; Q_{\text{O}_2} = 13,4, \\ x_{\text{CO}_2} = 76,6 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2; Q_{\text{CO}_2} = 9,6.$$

b) Aerober Stoffwechsel mit 2 mg 2-Desoxyglucose
pro cm³

Δt [min]	$\Delta H'$ [mm]	ΔH [mm]
20	-17,5	-6,5
20	-18,5	-6,5
20	-16	-6
20	-15	-6
20	-15,5	-6,5
	-82,5	-31,5

$$x_{\text{O}_2} = -133,9 \text{ mm}^3 \text{ O}_2; Q_{\text{O}_2} = -6,7, \\ x_{\text{CO}_2} = 100,5 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2; Q_{\text{CO}_2} = 5.$$

Atmungshemmung durch 2-Desoxy-D-glucose:

$$\frac{13,4 - 6,7}{13,4} = 50 \text{ Prozent.}$$

Fräulein MARIA SCHRADER und Fräulein LISELOTTE
PETERSEN haben mir bei der Durchführung der Experi-
mente dieser Arbeit geholfen, wofür ich Ihnen vielmals
danken möchte. Der Deutschen Forschungs-
gemeinschaft gebührt unser Dank für die appa-
rative Unterstützung.

¹³ H. MATTENHEIMER u. K. BORNER, Mikrochim. Acta [Wien]
1959 (6), 916.