Der Einfluß von 2.3.5-Trisaethyleniminobenzochinon (1.4) auf den Einbau von ^{14}C -markierten Aminosäuren in das Protein anaerob glykolisierender Yoshida-Ascites-Tumorzellen

Von FRITZ HÖLZEL

Aus der Universitäts-Frauenklinik Hamburg-Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. G. SCHUBERT)

(Z. Naturforschg. **16 b**, 792—801 [1961]; eingegangen am 2. Mai 1961)

Vergleichend wurden die anaerobe Glykolyse, der Adenylsäuregehalt und der Einbau von ^{14}C -markierten Aminosäuren in das Zellprotein von YAS-Zellen untersucht. Unter der Einwirkung von 2.3.5-Trisaethyleniminobenzochinon (1.4) kommt es nach dem Zeitpunkt 60 min der Inkubation zu einer Hemmung der anaeroben Glykolyse und des ^{14}C -Alanineinbaus. Der ATP-Gehalt der Zellen fällt gleichzeitig auf ca. $\frac{1}{5}$ der unbehandelten Kontrollen ab, während der AMP-Gehalt leicht ansteigt (Zeitpunkt 120 min). Im weiteren Verlauf der Inkubation sinkt der Gesamt-Adeninnucleotid-Gehalt ab.

In Versuchen, die in der Technik der Vorinkubation mit TRIS durchgeführt wurden (Substratzusatz nach 5, 10, 20 und 40 min), läßt sich indirekt der Beginn der Wirkung des TRIS auf den Zeitpunkt 10 min vor der Inkubation festlegen. Bei längerer Vorinkubation (20 und 40 min) scheint der Alanineinbau gegenüber der Einwirkung des TRIS im Substratmangel empfindlicher zu sein als die anaerobe Glykolyse. Dieser Befund wird mit ähnlichen Untersuchungen an röntgenbestrahlten YAS-Zellen verglichen.

In den Versuchen mit Nicotinsäureamid (NSA) läßt sich die Hemmung der Glykolyse und der Abfall des ATP-Gehalts verhindern bzw. wieder rückgängig machen. Der ^{14}C -Glycineinbau in das Protein ist jedoch irreversibel geschädigt. Die 10-fach höhere Konzentration des NSA bewirkt eine Hemmung des Glycineinbaus in Abwesenheit von TRIS.

Liste der verwendeten Abkürzungen:

2.3.5-Trisäthyleniminobenzochinon (1.4), Bayer-Präparat „3231“ oder „Trenimon“,	TRIS
Nicotinsäureamid,	NSA
Triosephosphatdehydrogenase,	TPD
Diphosphopyridinnucleotid,	DPN
reduziertes Diphosphopyridinnucleotid,	DPN-H
Adenosintriphosphat,	ATP
Adenosindiphosphat,	ADP
Adenosinmonophosphat,	AMP
3-Phosphoglycerinsäure,	3-PGS
Phosphoglyceratkinase,	PGK
1.3-Diphosphoglycerinsäure,	1.3-Di-PGS
Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase,	GAPDH
Phosphoglycerinaldehyd,	PGA
Phosphoenolbrenztraubensäure,	PBTS
Pyruvatkinase,	PK
Brenztraubensäure,	BTS
Lactatdehydrogenase,	LDH
Myokinase,	MK
Ribonucleinsäure,	RNS
Desoxyribonucleinsäure.	DNS

Die Hemmung der aeroben Glykolyse ist nach WARBURG¹ ein wesentliches Ziel der Chemotherapie maligner Tumoren. Gelänge es, die Glykolyse ausreichend zu hemmen, so könnte man dadurch wahr-

scheinlich auch das Wachstum der Tumoren im Körper hemmen. Seit einigen Jahren sind alkylierende Substanzen in Gebrauch, die tierexperimentell diese geforderte Voraussetzung sehr gut erfüllen. Es handelt sich dabei einerseits um Derivate des *N*-Lost, andererseits um Äthylenimin-Verbindungen. Für diese letzteren ist die Hemmung von Atmung und Glykolyse von JÜHLING² nachgewiesen. ROITT³ und andererseits HOLZER und Mitarbb.^{4,5} konnten den Mechanismus der Glykolysehemmung weitgehend aufklären. Sie zeigten, daß die Hemmung auf der Stufe der Triosephosphatdehydrogenase (TPD) durch das vorherige Absinken der DPN-Konzentration erfolgt. Den Abfall des DPN-Gehalts in den Zellen kann man durch den Zusatz von Nicotinsäureamid (NSA) über eine Hemmung der DPNasen bzw. die gesteigerte Neusynthese verhindern (s. auch KAPLAN^{6,7}: In diesem Fall bleibt die Glykolysehemmung aus oder läßt sich wieder rückgängig machen. HOLZER und KRÖGER halten die Glykolysehemmung für die Hauptursache der cytostatischen Wirksam-

¹ O. WARBURG, Ideen zur Fermentchemie der Tumoren, Abh. dtsh. Akad. Wiss., Berlin 1947.

² L. JÜHLING, Verh. dtsh. Ges. Pathol., Hamburg 1954, S. 349.

³ I. M. ROITT, Biochem. J. **63**, 300 [1956].

⁴ H. HOLZER, G. SEDLMAYR u. A. KEMNITZ, Biochem. Z. **328**, 163 [1956].

⁵ H. HOLZER, P. GLOGNER u. G. SEDLMAYR, Biochem. Z. **330**, 59 [1958].

⁶ N. O. KAPLAN, A. GOLDIN, S. R. HUMPHREYS, M. M. CIOTTI u. J. M. VENDITTI, Science [Washington] **120**, 437 [1954].

⁷ N. O. KAPLAN, A. GOLDIN, S. R. HUMPHREYS, M. M. CIOTTI u. F. E. STOLZENBACH, J. biol. Chemistry **219**, 287 [1956].

keit der Äthylenimin-Verbindungen und schreiben dem NSA eine „anticancerostatische Wirkung“ zu ⁸. Wie frühere Untersuchungen von HOLZER und Mitarbb. ergeben hatten, wirkt sich eine Hemmung der TPD erst in höherer Konzentration des verwendeten Cytostaticums aus ⁴.

Was die Ursache des DPN-Abfalls angeht, so wird einesteils die Alkylierung des NSA am Pyridin-N angenommen ^{9, 10}. NSA und Nicotinsäure wären damit der DPN-Synthese entzogen. Zum anderen werden Störungen im DPN-Abbau ¹¹ und in der Biosynthese des DPN beobachtet ¹².

Die vorliegenden Untersuchungen hatten zum Ziel, die Wirkung einer Äthyleniminverbindung (2.3.5-Trisäthyleniminobenzochinon (1.4), Präparat 3231 oder Trenimon der Bayer-Werke ¹³, im folgenden kurz TRIS genannt) auf Glykolyse, ATP-Gehalt und den Einbau von ^{14}C -Aminosäuren in Tumorzellen zu vergleichen und ihre Beziehungen zueinander zu klären. Dabei wurde immer die gleiche Konzentration an TRIS verwendet, der klaren Versuchsbedingungen wegen kam die anaerobe Inkubation zur Anwendung.

Methodik

Es wurden Wistarratten eines ingezüchteten Stammes verwendet, die mit einer Standardkost ernährt wurden. Die Überimpfung der Yoshida-Ascites Sarkom-Zellen geschah in der üblichen Weise alle 5 Tage mit gelegentlichen Zwischenpassagen von festem Tumor. Die Ascitesflüssigkeit wurde sofort nach dem Dekapitieren der Tiere in eisgekühlte gradierte Zentrifugenröhrchen gegeben, mehrere Male mit Bicarbonat-Ringer-Lösung gewaschen, schließlich 5 Min. scharf zentrifugiert und 1:1 verdünnt in vorbereitete doppelarmige Warburg-Gefäße pipettiert. Die Gefäße erhielten durchweg jeweils 0,2 ml der verdünnten Ascites-suspension bei einem Gesamtflüssigkeits-Volumen von 5,0 Milliliter. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im neutralen pH-Bereich, die Gasphase enthielt N_2 mit 5% CO_2 . Die Reaktion wurde nach dem Temperaturausgleich gestartet durch Einkippen von Glucose aus einem Seitenarm des Warburg-Gefäßes (Endkonz.

480 mg-%). Die manometrischen Messungen der anaeroben Glykolyse wurden wie üblich durchgeführt ¹⁴.

Der Stop der Reaktion erfolgte mit HClO_4 (Endkonz. ca. 10%). Im Falle der anschließenden Bestimmung der Adeninnucleotide wurde in der Kältemischung gestoppt, die Zellen dann in der Kühlzentrifuge bei 2000 UpM sedimentiert, um erst dann mit Perchlorsäure aufgeschlossen zu werden. Dies geschah, um die Konzentration des Cytostaticums wegen der Beeinträchtigung der enzymatischen Tests möglichst zu verringern.

Das TRIS äthyleniminobenzochinon (Bayer-Werke, Leverkusen *) und das Nicotinsäureamid (E. Merck AG, Darmstadt) wurden in Bicarbonat-Ringer-Gemisch gelöst und zum angemerkten Zeitpunkt aus verschiedenen Seitenarmen der Warburg-Kegelgefäße zugegeben (Endmolarität von TRIS $7,5 \cdot 10^{-5}$, von NSA 10^{-2} , falls im Text nicht anders angegeben. Die „Birnen“ wurden nach dem Einkippen jeweils mit der im Hauptraum befindlichen Inkubationsflüssigkeit umgespült. Die Lösungen von TRIS und NSA sind zu jedem Versuch frisch bereitet worden. $1\text{-}^{14}\text{C}$ -DL-Alanin (10^{-4}-m. , 0,14 $\mu\text{C/ml}$ Versuchsansatz) und $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Glycin ($0,4 \cdot 10^{-4}\text{-m.}$, 0,155 $\mu\text{C/ml}$) wurden trägerfrei verwendet.

Die Aufarbeitung des durch HClO_4 denaturierten Eiweißes erfolgte nach der Methode von SIEKEVITZ ¹⁵. Das am Ende entstandene trockene Proteinpulver wurde im Falle der Alaninversuche auf vorher gewogene Meßplättchen übertragen und die Zahl der Impulse im Methandurchflußzähler bestimmt. Im Falle der Glycinversuche wurde das trockene Eiweißpulver nochmals in Aceton gelöst und mit 0,5 ml einer 2,12-proz. Lösung von Schießbaumwolle in Aceton (Colloidumwolle E 950 der Fa. Wolff & Co., Walsrode) versetzt auf die Meßplättchen von bekanntem Gewicht dekantiert. Nach dem Verdunsten des Acetons entsteht ein dünner lackartiger Belag, in dem das Protein fest haftend enthalten ist. Die Impulszahlen der Glycinproben wurden im FHZ 15 mit automatischem Probenwechsler bestimmt (beide Zählgeräte Fa. Friessecke & Höpfner, Göttingen). Die Aktivitäten aller Proben sind auf mg Proteinpulver unter Anwendung der entsprechenden Korrekturfaktoren für die Eigenabsorption bezogen.

Die Adeninnucleotid-Konzentrationen im sauren Extrakt wurden enzymatisch bestimmt ¹⁶. Als Maß für die Konzentration diente hierbei die Extinktionsänderung des DPN-H, bei 366 m μ im Photometer Eppendorf

⁸ H. HOLZER u. H. KRÖGER, Klin. Wschr. **36**, 677 [1958].

⁹ H. HOLZER, W. DUNTZE u. S. FRANK, Angew. Chem. **70**, 746 [1958].

¹⁰ H. HOLZER, Verh. Med. Ges. Freiburg i. Br., zit. Klin. Wschr. **37**, 678 [1959].

¹¹ H. KRÖGER, H. W. ROTTHAUWE, B. ULRICH u. H. HOLZER, Tag. Ges. physiol. Chem., Berlin 1959, S. 37.

¹² H. KRÖGER, H. W. ROTTHAUWE, B. ULRICH u. H. HOLZER, Biochem. Z. **333**, 148 u. 155 [1960].

¹³ W. GAUSS, Chem. Ber. **91**, 2216 [1958].

¹⁴ W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS u. J. F. STEUFER, Manometric Techniques and Tissue Metabolism, 2. ed. 1949, Burgess Publish. Co., Minneapolis.

* Der Pharm.-Wiss. Abteilung der Hamburger Niederlassung der Bayer-Werke AG sei für die Überlassung von Versuchsmengen von cytostatischen Substanzen herzlich gedankt.

¹⁵ P. SIEKEVITZ, J. biol. Chemistry **195**, 549 [1952].

¹⁶ G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, T. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT u. G. PFLEIDERER, Z. Naturforsch. **8b**, 555 [1953].

gemessen, in Reaktionen, in denen äquimolare Mengen Adeninnucleotide umgesetzt werden. Alle Tests erfolgten unmittelbar im Anschluß an die Inkubationen, um ein längeres Stehenbleiben der Extrakte zu vermeiden und um einem eventuellen Schwund an Nucleotiden vorzubeugen.

Bei der Bestimmung des ATP wurde die Reaktion der 3-PGS mit ATP in Gegenwart von PGK und Mg^{2+} verwendet. Die entstehende 1,3-Di-PGS wird mit Hilfe von DPN-H und GAPDH zu PGA dephosphoryliert, wobei Semicarbacid als Aldehydfänger dient. Der Ansatz war im einzelnen folgender, bezogen auf den Küvetteninhalt von 6,0 ml ($d=40$ mm): 0,47 ml $m/5$ -3-PGS, 0,08 ml 1- m . $MgSO_4$, 0,07 ml 1- m . Semicarbacid-HCl, 0,06 ml Trilon, pH 7,4, 0,02 ml 2- n . KOH. Diese Lösungen wurden jeweils einem größeren Vorrat der aus gleichen Teilen bestehenden sog. „Stamm-lösung“ entnommen. Der perchlorsaure Extrakt wurde mit 2- n . KOH auf pH 7,4 gebracht, das $KClO_4$ abzentrifugiert, und der Überstand mit $m/2$ -Trap, pH 7,4, auf 5,0 ml aufgefüllt. An DPN-H wurden 0,02 ml einer Lösung von 50 mg in 2,0 ml quartzdest. H_2O verwendet. Der Testansatz wurde mit 0,26 ml der $m/2$ -Trap-lösung auf das Volumen von 5,98 gebracht. Nach Ermittlung des Blindganges, der stets unter 0,00 l/min lag, wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,01 ml PGK und 0,01 ml GAPDH in Gang gebracht. Die Extinktionsänderung wurde wegen des Blindganges durch Extrapolation ermittelt.

Die Bestimmungen der ADP und der AMP erfolgten in einem Ansatz. Dabei wurde die Reaktion der PBTS mit ADP und PK zu BTS und ATP benutzt. Als Hilfsreaktion diente die Reduktion der BTS mit DPN-H und LDH zu Lactat sowie die Myokinase-Reaktion, in der aus der vorhandenen AMP und ATP äquimolar 2 ADP entstehen. Es wurden nacheinander folgende Lösungen in die Küvette ($d=20$ mm) pipettiert: 0,76 $m/2$ -Trap, pH 7,4, 0,05 Trilon, 0,05 $m/2$ - $MgSO_4 \cdot KCl$, 0,02 ml DPN-H (50 mg in 2,0 ml H_2O), 0,10 ml PBTS (37 mg/ml) der neutralisierte und mit Trap auf 4,0 ml aufgefüllte Gesamtüberstand, sowie 0,01 ml LDH. Nach Feststellung des Blindganges erfolgte die Zugabe von 0,005 ml PK, nach Ablauf der Reaktion mit ADP wurde MK zugegeben, und das aus der Myokinase-Reaktion gebildete ADP erneut umgesetzt. Die wahre Extinktionsänderung wurde auch hierbei wieder durch Extrapolation ermittelt.

Die gefundenen Werte für den Adeninnucleotid-Gehalt und für die Raten der anaeroben Glykolyse sind auf die Zellmenge bezogen, die 100 γ N entspricht (Mikro-Kjeldahl-Bestimmung modifiziert nach KLINGMÜLLER¹⁷).

Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden der besseren Übersicht wegen graphisch dargestellt. Die verwendete Endkonzentration an „TRIS“ ist stets die gleiche, nämlich

$7,5 \cdot 10^{-5}$ -molar. Sämtliche Versuche sind unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Wie aus Abb. 1 hervorgeht, sinken die Glykolyseraten der Yoshida-Asciteszellen ohne Einwirkung von TRIS von ca. 5 μ l CO_2 /10 min/100 γ N in der 1. Stde. der Inkubation allmählich auf ca. 2 μ l CO_2 /10 min/100 γ N in der 6. Stde. ab. Die Ursache dafür ist

Abb. 1. Glykolyseraten in Yoshida-Asciteszellen nach Einwirkung von Trisaethyleniminobenzochinon ($7,5 \cdot 10^{-5}$ m.).

möglicherweise eine Schädigung der Zellen durch die lange Dauer der Inkubation in dem unphysiologischen Medium. Es könnte zu Fermentaustritten durch die Zellmembran kommen. Wahrscheinlich aber ist der Bicarbonat-Puffer mit der Dauer der Inkubation vorzeitig verbraucht, so daß keine stöchiometrische Umsetzung mit der anfallenden Milchsäure mehr erfolgt. In diesem Falle war zu erwarten, daß die Milchsäure eine pH -Verschiebung nach dem Säuren verursacht. Tatsächlich ergaben pH -Messungen nach der Inkubation, daß die pH -Werte in den Gefäßen mit den unbehandelten Kontrollen abgesunken waren (teilweise bis pH 5,4 nach 360 min). Je länger die Inkubation dauerte, desto niedriger lag erwartungsgemäß der pH -Wert. Entsprechend der oben gemachten Annahme blieben die pH -Werte in den Ansätzen, die mit TRIS behandelt waren, auch nach der 6-stdg. Inkubation im neutralen Bereich.

Die Glykolyseraten der mit TRIS behandelten Versuchsansätze verhalten sich in der 1. Stde. der Inkubation wie die unbehandelten Kontrollen. Nach 60 min jedoch beginnen sie steil abzusinken und erreichen bei 120 min den Wert von 0,75 μ l CO_2 /10 min/100 γ N. Im Verlauf der nächsten Stde. fallen sie noch um ein Geringes auf ca. 0,25 μ l CO_2 /10 min und bleiben für die restliche Dauer der Inkubation unverändert.

Abb. 2 zeigt den Adeninnucleotid-Gehalt unter den gleichen Versuchsbedingungen. Wie man

¹⁷ V. KLINGMÜLLER, Z. analyt. Chem. **131**, 17 [1950].

aus der rechten Seite der Abb. 2 ersehen kann, kommt es bei der Inkubation mit Glucose (Endkonz. 480 mg-%), parallel zur Hemmung der Glykolyse,

Abb. 2. Adeninucleotid-Gehalt in anaerob glykolysierenden YAS-Zellen unter der Einwirkung von Trisaethyleniminobenzochinon ($7,5 \cdot 10^{-5} \text{ m.}$). — Kontrollen, --- mit Tris $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ m.}$

unter der Einwirkung von TRIS zu einem raschen Abfall des ATP-Gehaltes, beginnend nach 60 Minuten. Dieser Abfall erreicht bei 120 min ein Minimalplateau von etwa $15 \mu\text{Mole} \cdot 10^{-4} / 100 \gamma \text{ N.}$ Der ATP-Gehalt der unbehandelten Kontrollen hält sich, wenn auch mit größeren Schwankungen, erstaunlich hoch im Verlauf der 6 Stdn., nämlich um $70 \mu\text{Mole} \cdot 10^{-4} / 100 \gamma \text{ N.}$ Ein Vergleich mit dem Verhalten der Glykolyseraten der unbehandelten Kontrollen zeigt (Abb. 1), daß diese im Verlauf der Inkubation bis unter 50% der anfänglichen Raten absinken. Die Tatsache, daß der ATP-Spiegel während der Inkubationszeit gleichbleibt, spricht für die oben gemachte Annahme, daß die geringere Glykolyse-Rate lediglich eine Folge des Bicarbonat-Mangels im Inkubations-Medium ist. Man könnte außerdem eine Hemmung von ATP-verbrauchenden Reaktionen vermuten.

Der ADP-Gehalt zeigt im Verlauf der 6-stdg. Inkubation kaum Veränderungen. Der AMP-Gehalt ist unter der TRIS-Behandlung bei 120 min gegenüber dem der Kontrollen um rund das 3-fache erhöht. Die Konzentration der 3-Adeninucleotide wird in den mit TRIS behandelten Versuchsansätzen offenbar bis zum Zeitpunkt 120 min durch die Myokinase-Reaktion eingestellt. Zu späteren Zeitpunkten (180 min und folg.) ist die Summe der Adeninucleotide abgesunken, das Myokinase-Gleichgewicht ist gestört.

Auf Abb. 2 ist außerdem noch der Adeninucleotid-Gehalt bei der Inkubation ohne Glucose und ohne TRIS dargestellt. Vergleichende Inkubationen ohne Glucose aber mit Zusatz von TRIS zum Zeitpunkt 0 min ergaben keine Unterschiede gegenüber den Ansätzen, die nicht mit TRIS behandelt waren. Dies ist in der Abb. 2 der einfacheren Darstellung halber nicht berücksichtigt. Der ATP-Gehalt sinkt beim Fehlen von Substrat innerhalb von 10 min, also während der Zeit des Temperaturangleichs im Wasserbad ($-10 \text{ min bis } 0 \text{ min}$) auf ca. $30 \mu\text{Mole} \cdot 10^{-4} / 100 \gamma \text{ N.}$ ADP und mehr noch AMP steigen währenddessen an, um nach dem Zeitpunkt 0 min wieder langsam abzufallen. Beim Zusatz von Glucose schnellte der ATP-Gehalt auf $90 \mu\text{Mole} \cdot 10^{-4}$ hoch, während ADP und AMP absanken, AMP dabei auf extrem niedrige Werte. Es muß betont werden, daß der hohe Ausgangs-ATP-Gehalt von $80 \mu\text{Mole} \cdot 10^{-4}$ verbunden mit den niedrigen ADP- und AMP-Werten vor Beginn der Inkubation — bei -10 min also — nur erzielt werden kann, wenn die Asciteszellen nach der Entnahme möglichst rasch in vorgekühlte Gefäße gebracht werden und der Waschvorgang sorgfältig in der Kälte vorgenommen wird.

Abb. 3. ^{14}C -Aktivität im Protein von Yoshida-Ascitessarkomzellen nach Einwirkung von Trisaethyleniminobenzochinon ($7,5 \cdot 10^{-5} \text{ m.}$), (Mittelwerte mit Extremwerten).

Der Einbau von ^{14}C -Alanin in das Gesamtprotein der Zellen (Abb. 3) sistiert bei den TRIS-behandelten Ansätzen ebenfalls nach 60 min, parallel zur Hemmung der anaeroben Glykolyse und des Absinkens des ATP-Gehaltes. Die bis dahin eingebaute Menge an ^{14}C -Alanin bleibt unverändert. Die Einbaukurve erreicht bei den unbehandelten Zellen nach 4-stdg. Inkubation ein Maximum, um dann

wieder gering abzufallen, sicherlich Ausdruck des Überwiegens katabolischer Prozesse im Proteinstoffwechsel.

Versuche der Vorinkubation

Abb. 4 und 5 zeigen Versuche, die nach Vorinkubation mit TRIS vorgenommen wurden. Der Glucosezusatz erfolgte 0, 5, 10, 20 und 40 min nach Beginn der Inkubation mit TRIS. Abb. 4 zeigt die

Abb. 4. Anaerobe Glykolyse in YAS-Zellen nach Vorinkubation mit TRIS ($7,5 \cdot 10^{-5} m.$), Glucose bei 0, 5, 10, 20 und 40 Minuten.

Abb. 5. ^{14}C -Aktivität im Protein von YAS-Zellen nach Vorinkubation mit TRIS ($7,5 \cdot 10^{-5} m.$), Glucose bei 0, 5, 10, 20 und 40 Minuten.

CO_2 -Entwicklung im Verlauf der 6-stdg. Inkubation, nicht also wie in Abb. 1 die Glykolyseraten/10 Minuten. Aus den Kurvenbildern läßt sich erkennen, daß die Hemmung der anaeroben Glykolyse um so deutlicher ausgeprägt ist, je länger vorinkubiert wurde.

Deutlich bemerkbar als verminderte CO_2 -Entwicklung macht sich die Einwirkung des TRIS bereits bei 10-minütiger Vorinkubation, d. h. die cytotoxische Substanz muß sich nach 10 min schon in der Zelle befinden, wenn man von einem Membraneffekt absehen will. Der Zeitpunkt der beginnenden Hemmung verschiebt sich von 60 min bei 0,5 und 10-minütiger Vorbehandlung auf 50 min, bei 20-minütiger Vorbehandlung (vgl. das Abbiegen der ausgezogenen Kurven von den zugehörigen Kontrollen). Werden die Zellen 40 min mit TRIS in Abwesenheit von Glucose inkubiert, dann tritt die Hemmung sofort in Erscheinung. Die Hemmung der Glykolyse scheint bei längerer Vorinkubation zu einem früheren Zeitpunkt einzutreten. Die 6-stdg. Inkubation von Tumorzellen ganz ohne Glucose mit TRIS unterscheidet sich nicht von der Kontrolle ohne TRIS und ohne Glucose.

Sehr ähnlich verläuft der in der gleichen Versuchsanordnung geprüfte Einbau von ^{14}C -Alanin, das zum Zeitpunkt 0 min den Zellen zugesetzt wurde. Die Säulen in Abb. 5 stellen die ^{14}C -Aktivität im Protein der YAS-Zellen dar. Die 1. Säulengruppe (Glucose bei 0 min) ist der Abb. 3 entnommen, ebenso wie die Werte der entsprechenden Versuchsansätze dieser Versuchsreihe in Abb. 3 enthalten sind. Man erkennt, wie die Mengen an eingebautem Alanin mit der Dauer der Vorinkubation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen abnehmen. Dieses Verhalten deckt sich mit den Ergebnissen der anaeroben Glykolyse (Abb. 4). Jedoch hat es den Anschein, als ob bei längerer Vorinkubation (20 und 40 min), also bei längerer Abwesenheit von energielieferndem Substrat der Alanin-Einbau bei beiden Versuchsanordnungen (behandelt mit TRIS bei 0 min und Kontrollen ohne TRIS) geringer sei als bei keinem oder kürzer dauerndem Substratmangel. Dies wird besonders deutlich bei der 5. Säulengruppe in Abb. 5 (Glucose bei 40 min). Offenbar ist der Mechanismus des Alanin-Einbaues gegenüber einem längeren Substratmangel empfindlicher als der der anaeroben Glykolyse. Diese Frage bedarf aber einer weiteren Nachprüfung. Bei der 6-stdg. Inkubation ohne Glucose wird kein Alanin eingebaut.

Versuche mit Nicotinsäureamid (NSA)

Des weiteren wurden in Anlehnung an die Untersuchungen von ROIT³ und von HOLZER und Mitarbb.⁵ Inkubationen mit NSA vorgenommen (End-

molaritäten 10^{-2} und 10^{-1}). Abb. 6 zeigt die Glykolyseraten pro 10 min unter den gleichen Bedingungen wie die vorher beschriebenen Versuche (vgl.

Abb. 6. Glykolyseraten anaerob glykolysierender YAS-Zellen unter dem Einfluß von Trisaethyleniminobenzochinon und Nicotinsäureamid.

Abb. 1). Wie aus Abb. 6 hervorgeht, wurde NSA (Endkonz. 10^{-2}) zu den unbehandelten Kontrollen bei 0 min zugesetzt. Die Kurve unterscheidet sich kaum von der Kontrollkurve. Bei Zugabe von NSA (10^{-2} -m. zum Zeitpunkt 0 min) zu den mit TRIS behandelten Zellen wird die Glykolysehemmung verhindert. Die Kurve unterscheidet sich geringfügig von der Kontrollkurve. Zum Zeitpunkt 120 min wurde NSA (10^{-2} -m. und 10^{-1} -m.) zu den mit TRIS behandelten Versuchsansätzen zugesetzt. In diesen Fällen klettern die Glykolyseraten innerhalb einer Stde. auf die ungefähre Höhe der Kontrollkurve. Die Glykolysehemmung läßt sich also durch nachträglichen Zusatz von NSA wieder aufheben bzw. durch Zugabe bei 0 min verhindern. Dieser Effekt wurde bereits von ROITZ³ und von HOLZER und Mitarbb.⁵ eingehend beschrieben.

Abb. 7. ATP-Gehalt in anaerob glykolysierenden YAS-Zellen unter der Einwirkung von Trisaethyleniminobenzochinon und Nicotinsäureamid.

In Abb. 7 sind die Ergebnisse aus Bestimmungen des ATP-Gehalts unter den gleichen Versuchsbedingungen dargestellt. Die Kontrollkurve und die Kurve des ATP-Gehalts der mit nur TRIS behandelten Zellen sind aus Abb. 2 übernommen. NSA in den Endmolaritäten 10^{-2} und 10^{-1} wurde in diesen Versuchsansätzen bei 120 min sowohl den Kontrollen ohne TRIS als auch den mit TRIS behandelten Zellen zugesetzt.

Es zeigt sich, daß die Depression des ATP-Spiegels ebenfalls durch Zusatz von NSA bei 120 min reversibel ist, analog dem Verhalten der anaeroben Glykolyse. Allerdings steigt der ATP-Gehalt bei Verwendung von NSA 10^{-2} -m. nicht ganz auf die Höhe der vergleichbaren Kontrollen an. Beim Zusatz der 10-fach höher konzentrierten NSA-Lösung (10^{-1} -m.) liegt der ATP-Gehalt bei 180 min über der Kontrolle und fällt im Verlauf der weiteren Inkubation wieder etwas ab. Beim Vergleich mit den Glykolyseraten findet man (Abb. 6), daß auch diese bei NSA 10^{-1} -m. leicht erhöht sind. Die Unterschiede der verschiedenen NSA-Konzentrationen sind aber nicht so ausgeprägt wie bei den ATP-Werten. Die Wirkungsweise des NSA erscheint in diesen Befunden nicht ganz eindeutig.

Besonders gilt dies für die Versuche zum Einbau von ^{14}C -Glycin in das Protein der YAS-Zellen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in % der Kontrollen dargestellt, weil ^{14}C -Glycin verschiedener Fabrikation verwendet wurde. Es wurden jedoch, wie in allen Versuchen übrigens, parallel laufende Inkubationen (unbehandelte und mit TRIS behandelte) vorgenommen, so daß jeweils die Ergebnisse eines Versuchs in Beziehung zueinander gesetzt werden konnten.

In Abb. 8 ist der ^{14}C -Glycineinbau in das Protein der YAS-Zellen während 3-, 4-, 5- und 6-stdg. Inkubation dargestellt. ^{14}C -Glycin wurde in allen Fällen bei 120 min zugesetzt. Zu diesem Zeitpunkt trifft man gerade die Bedingungen an, die die Erholung der Glykolyse und das Wiederansteigen des ATP-Gehalts nach Zusatz von NSA bei 120 min ermöglichen, bzw. die bei der aufgehobenen Glykolysehemmung (NSA bei 0 min) vorliegen.

Im oberen Teil der Abb. 8 ist der Glycineinbau nach Zugabe von NSA bei 120 min der Inkubation dargestellt. Man erkennt, wie in den Kontrollansätzen mit NSA in der Endkonzentration 10^{-2} -m. die Einbauwerte sich in Höhe der vollkommen unbehandelten Kontrollen bewegen. Dagegen scheint NSA in

Abb. 8. ^{14}C -Glycin-Einbau in das Protein anaerob glykolyisierender YAS-Zellen unter der Einwirkung von Trisaethyleniminobenzochinon in % der Kontrollen (^{14}C -Glycin-Zugabe 120 Min. nach Zusatz von Glucose und TRIS). a) Nicotinsäureamid-Zusatz 120 Min. nach Start mit Glucose. b) Nicotinsäureamid-Zusatz gleichzeitig mit Glucose und TRIS bei 0 Minuten.

10-fach stärkerer Konzentration (10^{-1}m.) eine hemmende Wirkung auf den Einbau auszuüben. Die entsprechenden Kurven der mit TRIS behandelten Versuchsansätze bewegen sich unter 10% der Kontrollwerte, obwohl der Vergleich mit den Kurven der Glykolyse und des ATP-Gehalts (Abb. 6 und 7) zeigen, daß diese fast auf die Höhe der vergleichbaren Kontrollen angestiegen sind. Die Wirkung des NSA erscheint sogar als eine paradoxe, denn bei der höheren NSA-Konzentration (10^{-1}m.) ergibt sich in Abb. 6 und 7 eine bessere Erholung von Glykolyse und ATP-Gehalt. Die entsprechende Glycineinkaukurve der nicht mit TRIS behandelten Kontrollen (Abb. 8 oben) zeigt aber Werte, die um mehr als 50% niedriger liegen.

Im unteren Teil der Abb. 8 ist der ^{14}C -Glycin-einbau der Versuche dargestellt, in denen NSA schon bei 0 min zugesetzt wurde. In diesem Falle kommt es gar nicht erst zur Hemmung der Glykolyse (vgl. Abb. 6). ^{14}C -Glycin wurde bei 120 min zugesetzt,

zu dem Zeitpunkt also, zu dem ohne Anwesenheit von NSA die Glykolysehemmung manifest gewesen wäre. Auch hierbei ist der Einbau in den mit TRIS behandelten Ansätzen gehemmt. Die Kontrolle NSA 10^{-1}m. ist noch weiter abgesunken als beim Zusatz der gleichen Konzentration zum Zeitpunkt 120 Minuten.

Interessanterweise zeigen die Kurven aller mit NSA behandelten Kontrollansätze jeweils bei 180 min einen Gipfel. Der Glycineinbau scheint unter dem Einfluß von NSA in der 1. Stde. beschleunigt, später mit einigermaßen gleichbleibender Geschwindigkeit vorstatten zu gehen.

Mit steigender Konzentration kann dem NSA unter diesen Versuchsbedingungen eine hemmende Wirkung auf den Glycineinbau zugeschrieben werden. In Verbindung mit TRIS ist der Einbau auch in geringerer Konzentration stark behindert. Eine befriedigende Erklärung dafür kann zur Zeit nicht gegeben werden.

Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen decken sich in bezug auf das Verhalten der anaeroben Glykolyse weitgehend mit früheren Befunden anderer Autoren. Die Messung der Glykolyse diente in diesen Untersuchungen auch lediglich als Kontrolle der übrigen Befunde. Das Verhalten der Adeninnucleotide war zu erwarten. Unter anaeroben Versuchsbedingungen kommt als einzige Möglichkeit der Energiegewinnung für die Zellen der glykolytische Abbau zugesetzter Substrate, in diesem Falle Glucose, bis zur Milchsäure in Betracht. Beim Fehlen des Substrats sinkt mit Beginn der Temperaturangleichung der anfänglich recht hohe Gehalt der Zellen an ATP rasch ab (vgl. die linke Seite der Abb. 2). Es kommt zum Anstieg von ADP und AMP, die bei den energieverbrauchenden Reaktionen anfallen. Die Summe der Adeninnucleotide und somit das Myokinase-Gleichgewicht ist zum Zeitpunkt 0 min noch erhalten. Später sinken ADP und AMP bis auf geringe Reste ab. Damit ist die Summe der Adeninnucleotide verringert, das Myokinase-Gleichgewicht kann sich nicht mehr einstellen.

Bei Hemmung der anaeroben Glykolyse ist zu erwarten, daß der ATP-Gehalt der Zellen ebenfalls stark abnimmt. Tatsächlich hat sich zeigen lassen¹⁸, daß das Absinken des ATP-Gehaltes erst nach der Hemmung der Glykolyse und diese wiederum erst

nach dem Absinken des DPN-Gehalts statthabte. Der Abfall des ATP-Gehalts ist also die Folge der Glykolysehemmung, nicht deren Ursache. In den vorliegenden Untersuchungen wurde infolgedessen dem ATP-Spiegel mehr im Zusammenhang mit dem Einbau der Aminosäuren in das Zellprotein Beachtung geschenkt.

Soweit bisherige Untersuchungen ergeben haben (zusammenfassende Übersicht s. 10. Koll. Ges. Phys. Chem. 1959¹⁹) bewirkt ATP im Verein mit dem spezifischen Enzym für jede einzelne Aminosäure die Aktivierung dieser Aminosäure. Es entsteht ein Enzym-Aminosäure-Adenylat, die „aktivierte Aminosäure“. Diese wird, übertragen auf eine lösliche Fraktion der RNS, zu den Mikrosomen transportiert. Hier erfolgt die eigentliche Synthese der Proteine, nämlich die spezifische Knüpfung der Säureamidbindungen an den Ribonucleoprotein-Partikeln der Mikrosomen, deren RNS vielleicht in den Nukleolen der Kerne gebildet wird, wobei die Information von der DNS stammen könnte. Es ist leicht einzusehen, daß nur in einem dieser komplizierten Schritte eine geringe Störung vonnöten ist, um die Synthese fehlerhaft oder gar nicht zu gestalten. Es sind nur wenige Hinweise darauf vorhanden, an welcher Stelle Störungen durch cytotoxische Äthylennitros-Verbindungen auftreten könnten.

In den Versuchen der Vorinkubation sollte die Frage geprüft werden, ob sich ein Zeitpunkt für den Beginn des Wirksamwerdens des TRIS in den YAS-Zellen festlegen lasse. Dabei bestand die Annahme, daß die Hemmung von Glykolyse und Aminosäureeinbau im Substratmangel wesentlich früher einträte. Diese Annahme erwies sich als falsch. Die Hemmung der Glykolyse tritt nur in geringem Maße früher auf (Abb. 4, vgl. das Abbiegen der entsprechenden Kurven). Aber es zeigte sich, daß die Hemmung der anaeroben Glykolyse und des ^{14}C -Alanineinbaus wesentlich ausgeprägter ist mit der Dauer der Vorinkubation. Dabei ergaben sich Unterschiede im Verhalten von Glykolyse und Alanineinbau. Bei längerer Vorbehandlung mit TRIS (20 und 40 min) scheint der Alanineinbau stärker gehemmt zu sein als die Glykolyse (Abb. 5, 4. und 5. Säulchengruppe). Besonders deutlich ist dies beim Vergleich der 60-min-Werte zu sehen. Dies steht im Gegensatz

zu früheren Untersuchungen über den Einfluß von Röntgenstrahlen auf die Proteinsynthese in YAS-Zellen^{20, 21}. Hierbei wurde ^{14}C -Alanin 40 min nach Beginn der anaeroben Glykolyse zugesetzt, zu einem Zeitpunkt, an dem die Glykolysehemmung als Folge der Strahlenwirkung in den YAS-Zellen weitgehend aufgehoben ist. Es konnte kein verminderter Alanineinbau nachgewiesen werden. Diese Versuche zeigen, daß durch Röntgenstrahlen von 25 kr der Alanineinbau nicht direkt, sondern als Folge der Hemmung der energieliefernden anaeroben Glykolyse geschädigt wird. Hierin scheint ein wesentlicher Unterschied in der Wirkungsweise der Röntgenstrahlen und der „radiomimetischen“ Substanzen vom Typ des TRIS zu liegen. In fast der gleichen Versuchsanordnung bewirkt das TRIS offenbar direkt eine Schädigung des Alanineinbaus, während die Wirkung der Röntgenstrahlen in diesem Fall eine indirekte zu sein scheint.

Wie oben schon erwähnt, ist die Hemmwirkung des TRIS mit der Dauer der Vorinkubation stärker ausgeprägt. Da aber die Anwesenheit des TRIS in den Zellen zur Hemmung von Glykolyse und Alanineinbau erforderlich ist, kann aus der verstärkten Hemmung indirekt auf den Zeitpunkt der Permeation und — was noch wichtiger erscheint — auf den Beginn der Wirkung geschlossen werden. Dieser Zeitpunkt ist zwischen 5 und 10 min nach dem Start der Inkubation (mit TRIS) gegeben. Allerdings muß ein Vorbehalt dabei gemacht werden. Die Aussagen gelten vorerst nur für Untersuchungen in der Technik der Vorinkubation. Es wäre denkbar, daß die Permeation und die Toxizität des TRIS im Substratmangel wesentlich gesteigert wären. Diese Fragen sollen weiter untersucht werden.

Die Versuche mit NSA (Abb. 6, 7 und 8) zeigen, daß der ^{14}C -Glycineinbau in Anwesenheit von TRIS und NSA irreversibel geschädigt werden kann. Vorversuche mit ^{14}C -Alanin hatten das gleiche ergeben. Die Hemmwirkung der höheren NSA-Konzentration auf den Glycineinbau in Abwesenheit des TRIS ist z. Zt. schwer zu deuten und bedarf noch einer eingehenden Nachprüfung. Im Schrifttum fanden sich keine Hinweise auf etwaige Zusammenhänge des NSA mit der Proteinsynthese in isolierten Zellen. Es kann hier nur auf einige andere interessante

¹⁸ P. SCRIBA, Dissertation, Freiburg i. Br. 1959.

¹⁹ 10. Koll. Ges. physiol. Chem. 1959 in Mosbach/Baden, Springer-Verlag 1960.

²⁰ G. BETTENDORF u. H. MAASS, Strahlentherapie **106**, 263 [1958].

²¹ G. SCHUBERT, G. BETTENDORF, H. A. KÜNKEL, H. MAASS u. G. H. RATHGEN, Strahlentherapie **106**, 483 [1958].

Beobachtungen hingewiesen werden. FEIGELSON, WILLIAMS und ELVEHJEM²² fanden in Rattenleber-Homogenaten eine Verminderung der endogenen Atmung bei Anwesenheit von NSA ($5 \cdot 10^{-4} m.$). Demgegenüber stellten VILLA und DIOGUARDI²³ einen vermehrten O_2 -Konsum in normalen Rattenleber-Homogenaten fest, die in einem Medium mit N-acetat und NSA inkubiert waren. ESER und Mitarb.²⁴ bestätigten die vermehrte O_2 -Aufnahme für die Leberhomogenate alloxanbehandelter Ratten, jedoch nicht für die von Normaltieren. v. BRAND und HELMREICH²⁵ fanden im Überstand von Taubenleber-Homogenat in Anwesenheit von DPN-H und NSA ($0,02 - 0,08 m.$) eine Hemmung von Fettsäure synthetisierender Enzymsystemen. Nach MISCITELLI-CORIANDOLI²⁶ bewirkt das NSA im normalen Lebergewebe eine Konzentrations-Steigerung des Co-enzym A, nicht jedoch in Hepatomgewebe. In vivo-Versuche von KAPLAN und Mitarb.⁷ mit NSA ergaben in Mäuselebern eine Erhöhung des DPN-Gehalts bis auf das 10-fache des normalen Wertes. Das Maximum lag bei 12 Stdn. p. injectionem. Die gleichzeitige Verabreichung von 6-Mercaptopurin bewirkte eine weit geringere Zunahme des DPN-Gehalts. Die gleichzeitige Gabe einer dritten Substanz, nämlich von AMP, steigerte den DPN-Gehalt wieder bis zum 10-fachen der Kontrollen. Relativ geringe Wirkung zeigte in diesen Versuchen die Verabreichung von DPN, Nicotinsäure und Tryptophan. SHUSTER und GOLDIN²⁷ konnten in vivo unter NSA-Einfluß einen vermehrten Einbau von ^{14}C -Formiat in das säurelösliche Adenin von Mäuselebern zeigen. Dagegen war der Einbau von ^{14}C -Glycin und von ^{14}C -Formiat in das Leberprotein unverändert. In früheren Untersuchungen mit ^{14}C -Glucose konnten die gleichen Autoren²⁸ in Lebern von NSA-behandelten Mäusen vermehrt ^{14}C -Ribose sowohl der freien Adenylsäuren als auch des DPN nachweisen. Der Einbau in die DPN-Ribose ist dabei größer als in die Adenin-Ribose, was auf einen größeren Umsatz der DPN-Ribose schließen läßt.

Wie man aus den vorstehenden Angaben ersehen kann, ist die Wirkungsweise des NSA im Zellstoffwechsel nicht hinreichend geklärt. Eine Koordinie-

rung der bisher gefundenen Tatsachen erscheint schwierig, zumal sich einige der Angaben widersprechen. Die jüngsten Ergebnisse deuten jedenfalls mehr auf Wirkungen im Nucleotidstoffwechsel hin. Eine Deutung der eigenen Befunde über die Wirkung des NSA auf den Glycineinbau erscheint vorerst nicht möglich.

Falls sich die vorliegenden Untersuchungen in bezug auf die Wirkung des TRIS bestätigen und noch erweitern lassen, bedürfte vielleicht die bisher geltende Anschauung über den Wirkungsmechanismus der cytostatischen Äthyleniminobenzochinon-Verbindungen einer Überprüfung. Diese Substanzen verdanken möglicherweise ihre cytostatische Eigenschaft nicht der glykolysehemmenden Wirkung, sondern anderen bisher noch nicht geklärten Wirkungen im Zellstoffwechsel, zu denen vielleicht auch eine Hemmung der Proteinsynthese gehört.

Die mit Hilfe des NSA über den Anstieg des DPN normalisierte Glykolyse ist nicht notwendigerweise ein Kriterium für wieder erholte Tumorzellen. Denn Reinokulations-Versuche mit Ehrlich-Ascitestumorzellen, die mit A 139 (2.5-Bis-äthylenimino-3.6-methoxyäthoxy-benzochinon(1.4) = E 39 solubile) und NSA inkubiert waren, und deren Glykolyse und DPN-Gehalt unverändert war, zeigten kein Wiederangehen im Transplantationstest, wohl aber die Kontrollen ohne A 139 und mit und ohne NSA¹⁸.

Demgegenüber fanden HOLZER und KRÖGER am Jensen-Sarkom der Ratte eine Hemmung der Chemotherapie durch tägliche Gaben von 100 mg NSA/kg Körpergewicht intravenös. Allerdings verwandten sie keine Äthylenimin-Verbindung, sondern „Endoxan“, ein *N*-Lost-Abkömmling, das aber ebenfalls über den DPN-Abfall eine Glykolysehemmung herbeiführt⁸.

Im Gegensatz dazu stellt OETTEL²⁹ fest, daß die „tumorhemmende Wirkung einer prophylaktischen parenteralen Gabe von „Tetramin“ an Yoshida- oder Jensensarkom durch nachfolgende tägliche Injektion von 100 mg NSA pro kg Tier nicht aufgehoben ist“ („Tetramin“ = 1 Äthylenimino-2-hydroxybuten-(3)).

RAUEN und HESS prüften u. a. Äthylenimin-Verbindungen im Horizontalwachstums-Test bei *Neu-*

²² P. FEIGELSON, J. N. WILLIAMS, JR. u. C. A. ELVEHJEM, J. biol. Chemistry **189**, 361 [1951].

²³ L. VILLA u. N. DIOGUARDI, Experientia [Basel] **XI**, 31 [1955].

²⁴ S. ESER, S. TEKMAN u. A. ARAZ, Nature [London] **183**, 184 [1959].

²⁵ V. v. BRAND u. E. HELMREICH, Biochem. Z. **328**, 146 [1956].

²⁶ E. MISCITELLI-CORIANDOLI, Naturwissenschaften **46**, 561 [1959].

²⁷ L. SHUSTER u. A. GOLDIN, J. biol. Chemistry **234**, 129 [1959].

²⁸ L. SHUSTER u. A. GOLDIN, J. biol. Chemistry **230**, 873 [1958].

²⁹ H. OETTEL, Angew. Chem. **71**, 222 [1959].

rosopora crassa und konnten deren Wuchshemmung durch Zusatz von NSA oder DNP nicht wieder aufheben. Sie halten die Alkylierung des NSA nicht für die Hauptursache der Cytostase³⁰.

Diese Befunde sprechen sehr gegen einen einzigen Angriffspunkt der Äthylenimin-Verbindungen im Zellstoffwechsel sondern für andere, von NSA und DPN unabhängige Störungen.

HILZ und KLEMPIEN³¹ fanden eine erhebliche Aktivierung der RNasen aus Ehrlich-Ascitestumorzellen-Homogenat u. a. auch durch Äthylenimin-Verbindungen in ungemein niedrigen Konzentrationen. Merkwürdigerweise ließ sich aber die Aktivierung durch NSA in eine Hemmung verkehren. Diese Wirkung auf die RNasen wäre ein Hinweis auf eine vielleicht mögliche Wirkungsweise der Äthylenverbindungen im Zellstoffwechsel. Dabei ist allerdings der Effekt des NSA nicht mit den eigenen Befunden in Einklang zu bringen. Es wäre aber denkbar, daß die Wirkung des NSA auf isolierte Enzymsysteme eine andere ist als in ganzen Zellen.

Im Zusammenhang mit diesen Überlegungen der möglichen Aktivierung der RNasen sind die Untersuchungen von BIERLING^{32, 33} zu erwähnen, der als Früheffekt des TRIS an HeLa-Zellkulturen Veränderungen der Nukleolen schon nach 30-minütiger Einwirkung fand. Die Veränderungen äußern sich zu-

nächst in einer eigenartigen Auflockerung der Nukleolenstruktur, der später die Auflösung der Zelle folgt. Die Nukleolen gelten als das Hauptreservoir der Zellen an RNS.

Auch Hemmwirkungen von Äthyleniminobenzochinonen auf die Synthese der DNS konnten bereits früher beschrieben werden^{34, 35}. Untersucht wurde der Einbau von anorganischem ^{32}P in die DNS von YAS-Zellen. Bei einer Konzentration des Cytostatikums von $3,7 \text{ Molen/l} \cdot 10^4$ fand sich schon nach 30 min die Einbaurrate auf ca. 50% der Kontrollen herabgesetzt.

In vitro-Modellversuche (ALEXANDER und STACEY^{36, 37}) zeigen, daß so gut wie alle alkylierenden Substanzen mit den Phosphatgruppen der Nucleinsäuren oder mit Carboxylgruppen der Eiweißarten verestern können. Die Autoren vermuten, daß Vernetzungen („cross-linkings“) innerhalb und zwischen den Makromolekülen schwere Beeinträchtigungen in deren Funktionszustand hervorrufen und so die Zellen schädigen.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Ich danke Frau U. DENYS, Fräulein M. BARKOWSKI und Fräulein E. SCHMACK für die Messung der Proteinproben und der N-Bestimmungen.

³⁰ H. M. RAUEN u. G. HESS, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **317**, 10 u. 19 [1959].

³¹ H. HILZ u. E. J. KLEMPIEN, Biochem. Z. **331**, 563 [1959].

³² R. BIERLING, Verh. Med. Ges. Göttingen 1956, zit. Klin. Wschr. **35**, 743 [1957].

³³ R. BIERLING, in: Symposien aktueller therapeutischer Probleme, 3. Heft, S. 25, Ferd. Enke-Verlag, Stuttgart 1960.

³⁴ G. H. RATHGEN, H. A. KÜNKEL u. H. MAAS, Vortrag VII. Int. Krebskongreß, London 1958.

³⁵ G. H. RATHGEN, H. A. KÜNKEL u. H. MAASS, Acta union int. contre le cancer **XVI**, 725 [1960].

³⁶ P. ALEXANDER u. K. A. STACEY, in: Comparative Clinical and Biological Effects of Alkylating Agents, Ann. N. Y. Acad. Sci. **68** (3), 1225 [1958].

³⁷ K. A. STACEY, M. COBB, S. F. COUSENS u. P. ALEXANDER, Ann. N. Y. Acad. Sci. **68** (3), 682 [1958].