Messungen zur Abhängigkeit der Hexokinase-Aktivität von p_H -Wert und Temperatur

M. VON ARDENNE und W. KRÜGER

Forschungsinstitut MANFRED VON ARDENNE, Dresden-Weißer Hirsch

(Z. Naturforsch. **21 b**, 373–375 [1966]; eingegangen am 31. Dezember 1965)

Es wird eine Methode zur Messung der Hexokinase-Aktivität in Abhängigkeit von p_H -Wert und Temperatur beschrieben, welche den Vorzug hat, daß das gebildete Glucose-6-phosphat in einer isolierten Reaktion unter optimalen Bedingungen gemessen wird. Mit dieser Methode gefundene Aktivitätswerte im p_H -Bereich zwischen 5 und 8 und bei den Temperaturen 44°, 38° und 25 °C werden mitgeteilt.

Der Gärungsstoffwechsel der Krebszellen führt bekanntlich infolge der Milchsäurebildung zu einem gegenüber gesunden Zellen signifikanten Absinken des p_H -Wertes in den Krebszellen. Da die Milchsäure, wie auch eigene Messungen gezeigt haben, schnell ($\approx$ eine Min.) aus den Krebszellen austritt, ergibt sich in Krankheitsherden hoher Krebszellendichte im extrazellulären Raum ebenfalls eine Übersäuerung, die durch den Flüssigkeitsaustausch nur wenig gemildert wird und das Absinken des p_H -Wertes innerhalb der Krebszellen noch verstärken kann¹. Das erhebliche intrazelluläre und etwas geringere extrazelluläre Absinken des p_H -Wertes erscheinen als mögliche Ausgangspunkte für den selektiven therapeutischen Angriff auf die Krebszellen. Bei der „Krebs-Mehrschritt-Chemotherapie“² wird insbesondere beim ersten Therapieschritt mit Extrem-Hyperthermie³ nach unseren gegenwärtigen Vorstellungen versucht, die intrazelluläre Übersäuerung der Krebszellen zu ihrer selektiven Vernichtung mit auszunutzen.

Um den Anteil der zur intrazellulären Übersäuerung beitragenden Einflußgrößen abschätzen zu können und um den Mechanismus der Krebszellen-Abtötung durch Extrem-Hyperthermie aufzuklären, ist es notwendig, durch Messungen zahlenmäßige Unterlagen über die Abhängigkeit der mitwirkenden Größen, insbesondere von Temperatur und p_H -Wert, zu gewinnen. Diesem Ziel dienen eine Reihe spezieller Untersuchungen^{4–7}. So lehrten uns Messungen über die Abhängigkeit des Glucoseverbrauches der

Krebszellen in Abhängigkeit von der Temperatur^{4, 6}, daß beim Übergang von 38 °C zu 44 °C und Glucoseüberschuß der Glucosestoffwechsel anaerob lebender Ehrlich-Mäuse-Ascites-Krebszellen nur etwa im Verhältnis 1 : 1,4 ansteigt (Anfangswert, ohne Abtötungseinfluß). Daß der Glucosestoffwechsel mit der Temperatur nicht noch stärker ansteigt, erklärt sich durch biochemische Regelvorgänge, an denen insbesondere das Ferment Hexokinase und die intrazelluläre p_H -Wertsenkung infolge der Milchsäurebildung beteiligt sind.

Hexokinase ist dasjenige Ferment, welches bekanntlich die Startreaktion des Glucosestoffwechsels katalysiert⁸. Die absolute Größe des sich einstellenden Glucosestoffwechsels hängt in dem uns interessierenden p_H -Bereich (6,3 bis 7,5) außer von dem Glucoseangebot⁴ usw. entscheidend von der Aktivität der Glykolysekette in Abhängigkeit vom p_H -Wert bei der Arbeitstemperatur ab. Um den Anteil der Hexokinase-Reaktion an der p_H -Abhängigkeit der Glykolysekette zu studieren, wurde die Abhängigkeit der maximalen Hexokinase-Aktivität von p_H -Wert und Temperatur isoliert gemessen.

Meßmethodik

Die Messung der Hexokinase-Aktivität als Funktion des p_H -Wertes ist bereits Gegenstand mehrerer Untersuchungen, vor allem an Blutzellen, gewesen. Man bestimmte entweder die maximale Hexokinase-Aktivität aus dem Glucoseschwund⁹, oder durch Nachschaltung einer zweiten enzymatischen Reaktion, die das gebil-

¹ M. VON ARDENNE, Naturwissenschaften **52**, 645 [1965].

² M. VON ARDENNE, Syncarcinokolyse in Gestalt der Mehrschritt-Chemotherapie. Vortrag im Heidelberger Krebsforschungszentrum am 25. 9. 1965.

³ M. VON ARDENNE u. R. KIRSCH, Dtsch. Gesundheitswesen **20**, 1935, 1980 [1965].

⁴ M. VON ARDENNE, J. ELSNER, W. KRÜGER, P. G. REITNAUER u. F. RIEGER, Klin. Wschr. **53**, im Druck, 1966.

⁵ M. VON ARDENNE u. F. RIEGER, Z. Naturforsch. **21 b**, im Druck, 1966.

⁶ M. VON ARDENNE u. P. G. REITNAUER, Z. Naturforsch. **21 b**, im Druck, 1966.

⁷ M. VON ARDENNE u. W. KRÜGER, Z. Naturforsch. **21 b**, im Druck, 1966.

⁸ D. BURK, Klin. Wochenschr. **35**, 1102 [1957].

⁹ D. BURK, Klin. Wochenschr. **35**, 1102 [1957].

dete Glucose-6-phosphat verbraucht¹⁰. Diesen beiden Meßmethoden haftet jedoch der Nachteil an, daß sie die p_H -Abhängigkeit der Enzyme, welche die nachfolgenden Umsetzungen katalysieren, unberücksichtigt lassen. Bei ihrer Anwendung wird daher stillschweigend vorausgesetzt, daß die Hexokinase-Reaktion bei jedem gemessenen p_H -Wert der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Glucoseverbrauches ist. Für Erythrozyten trifft dies im interessierenden p_H -Bereich zu¹¹, braucht aber bei der Vielzahl der am Glucoseumsatz beteiligten Enzyme durchaus nicht allgemein bei Krebszellen erfüllt zu sein, wie auch unsere im letzten Abschnitt gebrachten Messungen andeuten.

Wir entwickelten daher folgende *Meßmethodik*: Zuerst wurde die Hexokinase-Reaktion in Veronalpuffern vom p_H 5,0, 6,0, 7,0, 7,5 und 8,0 bei jeweils 25°, 38° und 44° während 10 Min. unter solchen Substratkonzentrationen ablaufen gelassen, daß optimale Reaktionsbedingungen vorherrschten (Substratüberschuß, Hexokinase-Reaktion gesättigt). Die Reaktion wurde, da ein Kochen von 2 Min. Dauer die Hexokinase nicht vollständig inaktivierte und eine längere Dauer die Gefahr der Spaltung des Reaktionsproduktes brachte, durch Zugabe von Perchlorsäure abgestoppt, die überschüssige Perchlorsäure als $KClO_4$ abgetrennt und ein aliquoter Teil dieses Ansatzes zur Bestimmung des gebildeten Glucose-6-phosphats verwendet. Für diese unter Verwendung des Enzyms Glucose-6-phosphat-dehydrogenase ablaufende Reaktion wurden solche Bedingungen gewählt, daß der Umsatz des Substrates innerhalb 10 Min. vollständig war (optimaler p_H -Wert, Enzymüberschuß, 25 °C). Unter diesen Bedingungen wird die p_H -Abhängigkeit der Indikator-Reaktion ausgeschaltet, so daß dieser Schritt unter optimalen Bedingungen abläuft.

Die Inaktivierung der Hexokinase wurde außer durch Perchlorat, dessen Indifferenz gegenüber der nachgeschalteten Zwischenferment-Reaktion in Vorversuchen geprüft wurde, auch durch Elektronenstrahlung mit einer Dosis von ca. $5 \cdot 10^5$ rad erreicht. Da jedoch diese Möglichkeit der Enzyminaktivierung nicht überall durchführbar ist, behielten wir die Ausfällung des Enzyms mit Perchlorat bei.

Die einzelnen Tests waren in Anlehnung an l. c.^{12, 13} wie folgt zusammengesetzt:

1. Hexokinase-Reaktion

0,30 ml ATP-Lösung (541 mg ATP in 15 ml Wasser mit verdünnter NaOH neutralisiert). 0,10 ml Rinderserumalbumin-Lösung (40 mg RSA in 10 ml Wasser). 0,45 ml $MgCl_2$ -Lösung (420 mg $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ in 20 ml Wasser). 2,80 ml Veronalpuffer (Zusammensetzung s.

bei l. c.¹⁴). 0,10 ml Glucose-Lösung (1,1 g Glucose in 10 ml Wasser). 0,10 ml Hexokinase-Lösung (0,1 ml Enzymsuspension „Boehringer“ in 10 ml 1:40 verdünnter RSA-Lösung). 0,40 ml 6-n. Perchlorsäure zum Enteiweißen.

2. Zwischenferment-Reaktion

3,50 ml Triäthanolamin-Puffer (p_H 7,6 mit 0,2% Chelaplex III). 0,05 ml $MgCl_2$ -Lösung (1,0 g $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ in 10 ml Wasser). 0,05 ml TPN-Lösung (49 mg $TPN \cdot NaH_2$ [≈ 82 -proz.] in 2 ml Wasser). 0,10 ml Probe (Hexokinase-Ansatz nach Auffüllen auf 10,0 ml und Zentrifugation). 0,10 ml Zwischenferment-Lösung (Enzymsuspension * 1:2 mit Wasser verdünnt).

Wellenlänge 340 nm, Schichtdicke 1,0 cm, Ablesungen im Abstand von 3 Min. bis zur Erreichung eines konstanten Endwertes (max. 10 Min.), Temperatur 25°. ΔE = Extinktionsdifferenz zwischen Anfangs- und Endwert.

Die Berechnung des gebildeten Glucose-6-phosphats als Maß für die Hexokinase-Aktivität erfolgte unter Berücksichtigung der Probenvolumina und der Verdünnungsverhältnisse nach der Formel $G-6-P = \Delta E \cdot 18,1$ [mg].

Meßergebnisse

Die *Ergebnisse unserer Messungen mit Hefe-Hexokinase* zeigt Abb. 1, in der die Hexokinase-Aktivität (Hexokinase-Reaktion gesättigt) A durch den Glucoseverbrauch, der dem gebildeten Glucose-6-phosphat unter den angegebenen Reak-

⁹ U. HINTERBERGER, E. OCKEL, W. GERISCHER-MOTHES u. S. RAPOPORT, Acta biol. med. german. 7, 50 [1961].

¹⁰ F. GRIGNANI u. G. W. LÖHR, Klin. Wochenschr. 38, 796 [1960].

¹¹ S. RAPOPORT, U. HINTERBERGER u. E. C. G. HOFMANN, Naturwissenschaften 48, 501 [1961].

¹² H. U. BERGMAYER, Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1962, S. 117.

¹³ K. THIELMANN u. E. BLUME, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 328, 164 [1962].

¹⁴ B. KEIL u. Z. ŠORMOVA (Hrsg.), Laboratoriumstechnik für Biochemiker, Akad. Verlagsgesellschaft. Geest u. Portig, Leipzig 1965, S. 820.

* Präparat aus dem Max-Planck-Institut für Zellphysiologie Berlin-Dahlem.