

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität
Freiburg i.Br., Direktor: Professor Dr. Helmut H o l z e r

VERSUCHE ZUM BIOCHEMISCHEN WIRKUNGSMECHANISMUS
VON CARCINOSTATISCH WIRKSAMEN ÄTHYLENIMIN-
VERBINDUNGEN

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Doktorgrades
einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von

Peter S c r i b a
aus Hamburg

Freiburg im Breisgau, im Juli 1959

G/60/2022

Dekan: Professor Dr.med.Hanns R u f f i n

Referent: Professor Dr.rer.nat.Helmut H o l z e r

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 15. September 1957 bis zum September 1958 im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Freiburg im Breisgau angefertigt.

Es ist mir ein ehrliches Bedürfnis, Herrn Professor Dr. H o l z e r meinen aufrichtigen Dank zu sagen für die Erlaubnis, in seinem Institut arbeiten zu dürfen, für die Überlassung des Themas und für die jederzeit freundliche Hilfsbereitschaft und die vielen wertvollen Ratschläge.

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit zugeeignet.

INHALTSVERZEICHNIS.

	<u>Seite</u>
EINLEITUNG.	7
LISTE DER ABKÜRZUNGEN.	9
PRÄPARATE.	10
METHODEN.	12
I. Tumorzellen.	12
II. Manometrie.	13
III. DPN-Bestimmung und dazugehörige Vorversuche.	13
1. im optischen Test nach WARBURG	13
2. mit der Cyanidmethode.	17
3. mit der fluorimetrischen Methode.	18
IV. TPN-Bestimmung.	20
V. Bestimmung von DPN-H.	21
VI. Bestimmung von ATP.	21
VII. Enzymextrakt aus Asciteszellen.	22
VIII. Bestimmung der DPN-ase-Aktivität.	22
IX. DPN-pyrophosphorylase aus Rattenleber.	24
1. Enzymextrakt, 2. Test.	
X. Anreicherung von DPN-pyrophosphorylase aus Schweineleber.	25
VERSUCHE UND ERGEBNISSE.	26
I. Versuche zur Hemmung der Glykolyse durch Äthylenimin-Verbindungen.	26
1. Beeinflussung von Glykolyse und Atmung durch A 139 mit und ohne NSA.	26
2. TPN-Bestimmung in Asciteszellen.	28
3. Wirkung weiterer Äthylenimin-Verbindungen auf die DPN-Konzentration in und die Gly- kolyse von EHRlich-Mäuse-Ascites-Carino- zellen.	29
II. Versuche zur Frage des Angriffspunktes der Äthylenimin-Verbindungen am DPN-Stoffwechsel.	31
1. Untersuchungen über eine eventuelle di- rekte Reaktion von DPN und A 139.	31
2. Untersuchungen über eine eventuelle Reak- tion zwischen DPN-H und Äthyleniminchinonen. DPN- und DPN-H-Bestimmungen in Ascites-Zellen.	32

3. Untersuchungen über eine eventuelle Reaktion des NSA mit den Äthyleniminchinonen.	34
4. Bestimmung der ATP-Konzentration in mit A 139 inkubierten Ascites-Zellen.	35
5. Einfluß von A 139 auf die DPN-ase.	36
6. Einfluß von A 139 auf die DPN-pyrophosphorylase.	45
7. Wirkung von A 139 auf DPN- und DPN-H-Pyrophosphatase.	48
III. Versuche zum Zusammenhang zwischen DPN-senkender und therapeutischer Wirkung der Äthylenimin-Verbindungen.	50
1. Versuche mit dem therapieresistenten DS-Tumor.	50
2. Reinoculationsversuche.	52
3. Behandlung von Jensen-Sarkom-tragenden Ratten mit verschiedenen Carcinostatica, DPN-Bestimmung im Tumor.	53
DISKUSSION.	54
ZUSAMMENFASSUNG.	59
LITERATURVERZEICHNIS.	60
LEBENS LAUF.	63

VERSUCHE ZUM BIOCHEMISCHEN WIRKUNGSMECHANISMUS VON
CARCINOSTATISCH WIRKSAMEN ÄTHYLENIMINVERBINDUNGEN *)

EINLEITUNG.

Der Abbau der Kohlenhydrate ist die Hauptquelle für den Energiebedarf der Zelle. Darüber hinaus liefert der Kohlenhydratabbau Bausteine für den Aufbau neuer zelleigener Substanzen beim Wachstum der Zelle. Man unterscheidet den oxydativen Kohlenhydratabbau, die sogenannte Atmung, von der ohne Beteiligung von Oxydationsprozessen verlaufenden Glykolyse, deren Endprodukt Milchsäure ist.

1923 zeigte O.WARBURG, daß das Wachstum, und zwar insbesondere das maligne Wachstum, durch eine hohe aerobe Glykolyserate gekennzeichnet ist, während Normalgewebe bei Anwesenheit von Sauerstoff Kohlenhydrate fast ausschließlich zu Kohlendioxyd und Wasser abbauen (1). Nach O.WARBURG (4) ist der Zusammenhang zwischen Wachstum und aerober Glykolyse derartig eng, daß "eine Tumorzelle keine Tumorzelle mehr wäre, wenn man sie ihrer aeroben Glykolyse berauben könnte". Diese Hypothese von O.WARBURG konnte in Versuchen mit Monojodessigsäure experimentell unterbaut werden (2,3). Man weiß aus diesen Versuchen, daß Jodessigsäure die aerobe und anaerobe Glykolyse von EHRlich-Mäuse-Ascites-Carcinomzellen hemmt, und daß parallel zu dieser Glykolysehemmung auch eine Hemmung der Vermehrung und des Wachstums der Mäuse-Ascites-Tumorzellen zu beobachten ist (3). Man hätte annehmen

*) Über einen Teil der vorliegenden Versuche wurde von P.SCRIBA beim IV.Internationalen Biochemie Kongreß in Wien am 2.September 1959 unter dem Thema: "Wirkungsmechanismus carcinostatistischer Äthyleniminverbindungen und N-Lost-Verbindungen" (33) und vor der Medizinischen Gesellschaft Freiburg im Breisgau am 27.1.1959 unter dem Thema: "Hemmung der Glykolyse von Ascites-Tumorzellen durch Äthyleniminverbindungen" (45) vorge-
tragen.

können, daß eine derartige Hemmung des Wachstums durch Glykolysehemmung auch zu therapeutischen Zwecken ausnützlich sei; Monojodessigsäure hat sich jedoch schon bei Versuchen von LUNDGAARD (5) als derart allgemeintoxische Substanz erwiesen, daß keine spezifischen Wirkungen auf Tumoren erzielt werden können.

Nach diesen Befunden lag die Idee nahe, zu prüfen, ob es nicht andere Substanzen gäbe, die durch Glykolysehemmung eine selektive Beeinflussung des Tumorstwachstums ermöglichen. Für diese Versuche boten sich insbesondere Äthyleniminverbindungen an, deren carcinostatische Wirksamkeit empirisch festgestellt worden war. Von diesen Substanzen konnte in Versuchen von ROITT (6) und von HOLZER und Mitarbeitern (7,38) gezeigt werden, daß sie ebenso wie Jodessigsäure weitgehend spezifisch die Glykolyse von Ascites-Tumorzellen hemmen. Die Versuche der beiden Arbeitskreise zeigten, daß die Glykolysehemmung durch Äthyleniminverbindungen auf Grund einer Senkung der DPN-Konzentration in den Tumorzellen zustandekommt.

In der vorliegenden Arbeit wird erstens geprüft, ob verschiedene neu entwickelte, carcinostatisch wirksame Äthyleniminverbindungen (39,40) ebenfalls eine spezifische Glykolysehemmung bewirken und ob der Mechanismus dieser Glykolysehemmung gleichfalls auf eine Senkung der stationären DPN-Konzentration zurückzuführen sei. Weiter wird die Frage nach dem detaillierten Angriffspunkt dieser Verbindungen in den DPN-Stoffwechsel studiert und schließlich beschäftigen sich einige Versuche mit der Frage nach dem Zusammenhang zwischen der die DPN-Konzentration senkenden, und damit die Glykolyse hemmenden, Wirkung der Äthyleniminverbindungen einerseits und der heilenden Wirkung dieser Verbindungen andererseits.

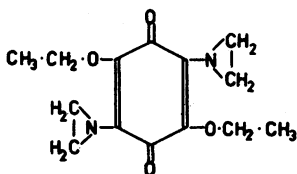
LISTE DER ABKÜRZUNGEN.

ADH	=	Alkoholdehydrogenase
ATP	=	Adenosintriphosphat
DPN	=	Diphosphopyridinnucleotid
DPN-ase	=	Diphosphopyridinnucleosidase
DPN-H	=	reduziertes DPN
DS-Tumor		siehe: Tumorzellen im Kapitel Methoden
GAPDH	=	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GDH	=	α -Glycerophosphatdehydrogenase
G1-6-ph	=	Glucose-6-phosphat
MDH	=	Milchsäuredehydrogenase
NE ₂	=	Di-äthylenimino-naphthochinon-1,4
NMN	=	Nikotinsäureamidmononucleotid
NSA	=	Nikotinsäureamid
PGK	=	Phosphoglyceratkinase
3-PGS	=	3-Phosphoglycerinsäure
PP	=	Pyrophosphat
QE ₄	=	Tetra-äthylenimino-benzochinon-1,4
TCE	=	Trichloressigsäure
TEM	=	Tri-äthylenimin-melamin
TPD	=	Triosephosphatdehydrogenase = GAPDH
TPN	=	Triphosphopyridinnucleotid
TRAP	=	Triäthanolaminpuffer
TRIS	=	Trishydroxymethylaminomethanpuffer
ΔE	=	Extinktionsdifferenz

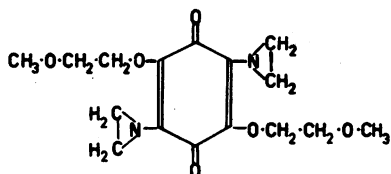
PRÄPARATE.

1. Von der Firma BAYER-Leverkusen wurden uns freundlicherweise die Substanzen E 39 (2,5-Di-n-propoxy-3,6-bisäthylenimino-benzochinon-1,4) und A 139 (2,5-Di-methoxy-äthoxy-3,6-bisäthylenimino-benzochinon-1,4) zur Verfügung gestellt. Wir möchten auch an dieser Stelle der Firma und insbesondere den Herren Professor Dr.G.DOMAGK und Dr.W.GAUSS für die Überlassung der Präparate danken.

Abb. 1



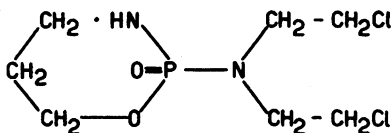
2,5-Bis-n-propoxy-3,6-bis-äthylenimino-benzochinon-(1,4) = BAYER E 39



2,5-Bis-methoxyäthoxy-3,6-bis-äthylenimino-benzochinon-(1,4) = BAYER A 139

2. Von den ASTA-Werken erhielten wir das Präparat B 518 (N,N-Bis-(β-chloräthyl)-N',O-propylenphosphorsäure-ester-diamid).

Abb. 2



N,N-Bis-(β-chloräthyl)-N',O-propylenphosphorsäure-esterdiamid = B 518

3. Glucose-6-phosphat.

G-6-ph-Ba-salz der Fa.BOEHRINGER wurde mit verdünnter HCl gelöst, mit ges. Na₂SO₄ wurde das Ba als BaSO₄ ausgefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit NaOH neutralisiert.

4. Triosephosphat wurde nach der von MEYERHOF angegebenen Methode (8) mit Aldolase aus Fructosediphosphat bereitet.
5. 3-Phosphoglycerinsäure.
3-PGS-Ba-salz, krist. der Fa.BOEHRINGER wurde in 2n HCl gelöst, Ba als BaSO₄ ausgefällt und abzentrifugiert, der Überstand mit 2n NaOH ad pH 7,4 neutralisiert.
6. DPN-H.
DPN der Fa.BOEHRINGER wurde mit Natriumdithionit nach (9) hydriert.
7. DPN etwa 80 % "reinst".
8. ADH Kristallsuspension in Ammonsulfat-Lösung,
30 mg/ml Protein, 1:5 verdünnt.
9. GDH Kristallsuspension in Ammonsulfat-Lösung,
5 mg/ml Protein.
10. GAPDH Kristallsuspension in Ammonsulfat-Lösung,
10 mg/ml Protein.
11. PGK Kristallsuspension in Ammonsulfat-Lösung,
2 mg/ml Protein.

Die Präparate 7-11 wurden von der Firma BOEHRINGER bezogen.

METHODEN.

I. Tumorzellen.

Der größte Teil der in vitro Versuche wurde an einem Stamm des EHRLICHschen Mäuse-Ascites-Carcinoms durchgeführt, den uns freundlicherweise Herr Professor O. WARBURG überlassen hat und der an anderer Stelle beschrieben ist (7). Darüber hinaus verwandten wir ein YOSHIDA-Sarkom und ein durch Dimethyl-amino-stilben-Fütterung hervorgerufenen Carcino-Sarkom der Ratte, dessen Charakterisierung unten folgt (10). Die letztgenannten Tumoren stellte uns freundlicherweise Herr Professor DRUCKREY zur Verfügung.

Die Tiere wurden durch Genickschlag getötet, der Ascites wurde nach Präparation der muskulären Bauchdecke punktiert und die Zellen wurden 5 min. bei 1200 g (Fixette) sedimentiert. Dann wurden die Zellen in Krebs-Ringer-Puffer-Lösung gewaschen und schließlich suspendiert. Die Bestimmung des Zellgehaltes erfolgte im Eiweißrelationröhrchen nach KAFKA.

Wenn der Ascites bluthaltig war, wurden nach einer Variante der von ROITT (6) angegebenen Methode die Erythrozyten herausgewaschen. Man zentrifugiert, u.U. mehrfach, die in Krebs-Ringer-Puffer-Lösung suspendierten Zellen kurz (etwa 20 sek.) bei 1200 g (Fixette 3000 Touren) und saugt die dann im Überstand befindlichen Erythrozyten ab.

Die mikroskopische Untersuchung (Peroxydase-, GIEMSA-gegenfärbung und Färbung nach PAPPENHEIM) und Auszählung von Ausstrichen von blutigem Ascites, gereinigtem Ascites und Mäuseblut ergab, daß der so gewaschene Ascites praktisch frei von fremden Zellen ist.

Tab. 1

	ASCITES		BLUT + ASCITES
	blutig	gewaschen	
Tumorzellen	100	100	++
Erythrozyten	121	< 1	++
Leukozyten	keine	keine	+

II. Manometrie.

Die übliche Technik der Manometrie mit der WARBURG-Apparatur wurde angewandt (7).

Die Bedingungen für die Messung der anaeroben Glykolyse waren folgende:

Die Zellen wurden in Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung, die durch CO₂-Begasung auf ein pH von 6,0 eingestellt war (7), inkubiert, die Glucose-Konzentration war 0,025 m, die Zellkonzentration war 30-50 mm³ Zellen pro ml Ansatz, die Temperatur 37° C; um die Glykolyse zu starten, wurden die Zellen oder die Glucose aus der Birne des WARBURG-Gefäßes in den Hauptraum gekippt.

Bei der Manometrie der Atmung wurden die Zellen in Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung pH 6,0 suspendiert, Glucose- und Zellkonzentrationen wie oben. Im Einsatz des Gefäßes befanden sich 0,15 ml 2n NaOH, um das gebildete CO₂ zu binden. Im Gasraum war Luft.

III. DPN-Bestimmung und dazugehörige Vorversuche.

Die DPN-Bestimmung erfolgte

1. im optischen Test nach WARBURG.

Dabei wurde bei 366 mμ im Photometer-Eppendorf die Extinktionszunahme bei Reduktion des DPN mit Alkohol und Alkohol-dehydrogenase, in Anwesenheit von Semicarbazid-HCl, gemessen. Puffer war in der Mehrzahl der Versuche ein Glykokoll-Na Puffer pH 9,0 (nach der Vorschrift im D'ANS-LAX: (11) hergestellt), oder seltener auch TRAP pH 7,5. Die Berechnung der umgesetzten Mole DPN erfolgte mit Hilfe des von BÜCHER angegebenen Extinktionskoeffizienten (12).

Die Alkohol-dehydrogenase wurde, sofern nicht ADH von der Firma BOEHRINGER verwandt wurde, aus getrockneter Bäckerhefe nach einer Modifikation (41) der von RACKER (13) angegebenen Methode kristallisiert.

Der Aufschluß der Zellen für die DPN-Bestimmung erfolgte mit Trichloressigsäure (TCE) in etwa 10 % Endkonzentration. Nach Sedimentierung durch 10 min. Zentrifugieren

bei 1200 g wurde eine definierte Menge des klaren Überstandes in der Cuvette in Anwesenheit von Puffer mit 2n NaOH auf das pH des vorliegenden Puffers gebracht. Dann folgte die DPN-Bestimmung wie oben beschrieben.

Die vergleichende Bestimmung der DPN-Konzentration in Asciteszellen nach Aufschluß dieser durch TCE und durch HClO_4 (7) ergab die in der Tabelle 2 niedergelegten Werte für DPN.

Tab. 2

Aufschluß der Zellen durch:	TCE	HClO_4
Endkonzentration:	~8,5 %	~8 %
$\frac{\mu\text{Mole DPN}}{\text{mm}^3 \text{ Zellen}} \times 10^4$	3,6	3,2

Homogenisieren der Zellen mit TCE oder HClO_4 hatte keinen Einfluß auf dieses Ergebnis.

Die HClO_4 -sauren Extrakte wurden mit KOH neutralisiert, nach 30 min. Stehen im Eisbad wurde das ausgefallene KClO_4 abzentrifugiert und dann DPN wie oben beschrieben bestimmt.

Trichloressigsäure hemmt, nach Neutralisation mit 2n NaOH in der Cuvette, die Aktivität der ADH. Unter den oben beschriebenen Bedingungen ist die DPN-Bestimmung jedoch nach weniger als 10 min. quantitativ abgelaufen.

DPN ist in TCE-saurer Lösung nach 80 std. Stehen im Kühlraum ($1-5^\circ \text{C}$) noch nahezu quantitativ nachzuweisen.

Tab. 3

100 g DPN nach	0h	0h	80h	80h
TCE 5 %	+++	---	+++	---
$\Delta E_{366} \times 10^3$	151	151	138	146

IV = 3 ml, d = 1

Die Anwesenheit von A 139 in höheren Konzentrationen

erlaubt eine DPN-Bestimmung im TCE-sauren Extrakt nicht, da TCE eine Veränderung des Absorptionsspektrums von A 139 bewirkt, derart, daß eine Absorptionsbande mit dem Maximum bei 358 m μ entsteht, also in dem Spektralbereich wo die Absorption von DPN-H gemessen wird (366 m μ).

Um diese Verhältnisse näher zu studieren, wurden die Absorptionsspektren von A 139 unter folgenden Bedingungen aufgenommen.

1. Zu A 139 wurde TCE gegeben und die saure Lösung dann, wie bei der DPN-Bestimmung im TCE-sauren Extrakt, in der Cuvette mit 2n NaOH auf das pH des vorliegenden Puffers gebracht.
2. A 139 wurde zu in der Cuvette neutralisierter Tri-chloressigsäure nachträglich hinzugegeben.
3. A 139 wurde einfach in Puffer gelöst.

Der Puffer war m/10 Glykokoll-Na Puffer pH 9,0, ZV war 2,0 ml, die Absorptionsspektren wurden im Beckman DK 2 Spektrophotometer aufgenommen. Die Messungen erfolgten in Quarzcuvetten gegen Cuvetten mit Puffer-Lösung.

In Tabelle 4 und in Abbildung 3 sind die Ergebnisse des eben beschriebenen Versuches zusammengefaßt.

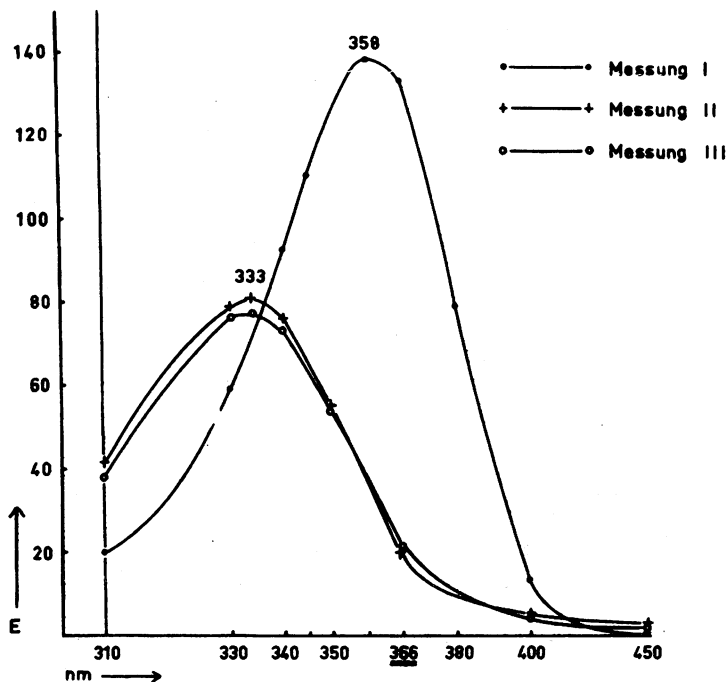
Tab. 4

im Ansatz sind enthalten:

A 139 60 mg %	0,1	0,1 *	0,1
TCE 10 %	1,0	1,0	---
NaOH 2n	0,31	0,31	---
Messung-Nr.	I	II	III

* A 139 wurde nach Neutralisation der TCE hinzugegeben.

Abb. 3



Wirkung von TCE auf das Absorptionsspektrum von A 139

Die Abbildung zeigt:

1. TCE erhöht die Absorption von A 139 bei 366 m μ um etwa 700 %; wir haben mit Erfolg versucht, darauf eine Bestimmungsmethode für A 139 aufzubauen.
2. Die Bestimmung von DPN in Anwesenheit von A 139 ist im TCE-sauren Extrakt nahezu maximal ungünstig, weil zu hohe Ausgangsabsorptionen erhalten werden (s.o.).

Diese Absorptionsänderungen des A 139 bei 366 m μ sind wohl nicht als spezifischer TCE-Effekt aufzufassen. So erhöht auch Semicarbazid-HCl, wenn es A 139 haltigen Puffer-Lösungen zugesetzt wird, dessen Absorption.

Dagegen war die DPN-Bestimmung in Anwesenheit von A 139 in 0,1^m TRAP-Puffer pH 7,4 im enzymatisch-optischen Test mit ADH und Alkohol quantitativ richtig möglich. Die A 139 Konzentration in der Cuvette betrug 6 mg %; um die Zunahme der Extinktion bei 366 m μ von der gleichen Ausgangsextinktion aus zu messen, wurden Korrektionscuvetten mit der gleichen A 139 Konzentration vor die Kontrollcuvetten gesetzt.

Nach 2 std. Inkubation von DPN und 6 mg % A 139 in $\Sigma V = 3$ ml bei Zimmertemperatur betrugen die für 0,04 ml DPN (2 mg/ml) = 80% DPN gemessenen Mittelwerte der Extensionszunahme nach Start mit ADH 0,121 ohne A 139 und 0,113 mit A 139.

Die Möglichkeit, DPN enzymatisch in Anwesenheit von A 139 zu bestimmen, wurde erst spät gefunden. Bei den vorher durchgeführten Versuchen wurde die fluorimetrische Bestimmungsmethode (s.u.) benutzt.

Die DPN-Bestimmung erfolgte

2. mit der von KAPLAN, N.O. et al. (14) angegebenen Cyanidmethode.

Das Absorptionsspektrum des DPN-Cyanid Komplexes wurde im Recording-Spektrophotometer (Beckman DK 2) aufgenommen. Das Absorptionsmaximum liegt bei 325 m μ , die Messung ist günstig bei 334 m μ im Photometer Eppendorf durchzuführen. Ansatz für die Aufnahme der Absorptionsspektren in Tabelle 5:

Tab. 5

0,1 ^m phos. pH 7,2	0,3	0,3
10 mg/ml DPN	0,04	-
H ₂ O	0,26	0,3
KCN 1 m	2,4	2,4

Der millimolare Extinktionskoeffizient ist bei 325 m μ 6,3 , für 334 m μ berechneten wir ihn zu 5,6 (14).

Eine Eichkurve wurde für diese Methode aufgestellt und zeigte eine gute Proportionalität zwischen eingesetzter DPN-Menge und Extinktion bei 334 m μ .

Die vergleichende Bestimmung von 100 γ DPN in $\Sigma V = 3$ ml ergab ein ΔE_{334} für 0,137 $\frac{\mu\text{Mole}}{\text{ml}}$ nach der Cyanidmethode und ΔE_{366} für 0,138 $\frac{\mu\text{Mole}}{\text{ml}}$ DPN nach der enzymatisch-optischen Methode.

In Gegenwart von höheren Konzentrationen von A 139 ist die DPN-Bestimmung mit der Cyanidmethode nicht möglich, da Cyanid eine Abnahme der Absorption des A 139 bei 334 m μ bewirkt.

Die DPN-Bestimmung erfolgte

3. mit der von KAPLAN, N.O. et al. (15 u. 16) angegebenen fluorimetrischen Methode.

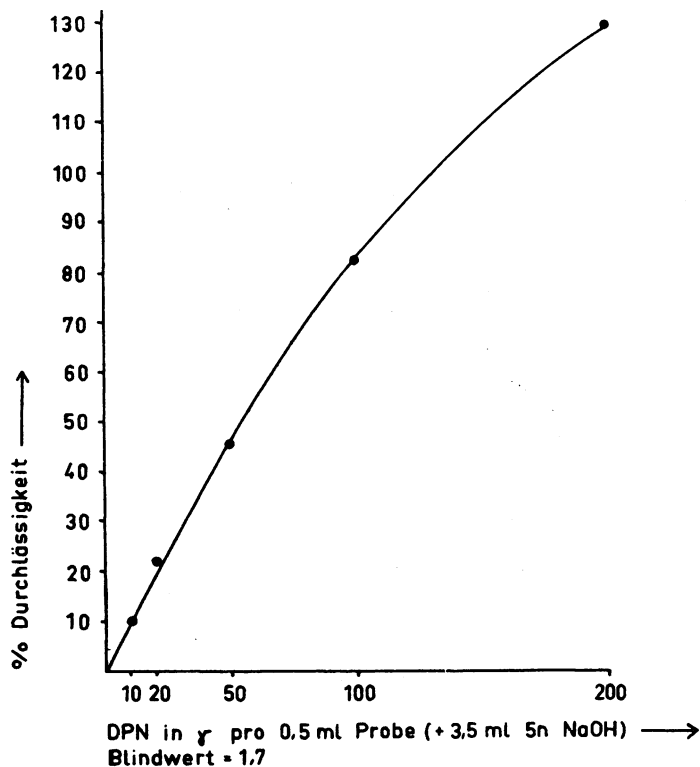
Konzentriertes Alkali bildet mit DPN, nicht aber mit DPN-H eine Fluoreszenz-gebende Verbindung; diese tritt nur bei intakter, nicht reduzierter NSA-Ribose Bindung auf, so fluoresciert z.B. auch Nikotinsäureamidmononucleotid auf Alkali-Zusatz hin im UV-Licht. DPN-H und der DPN-CN Komplex fluorescieren selbst, aber nur 1/10 bzw. 1/40 der Intensität der DPN-Alkali-Fluoreszenz wird erreicht (15).

Für die Messung der Fluoreszenz wird die DPN-haltige Probe, abweichend von der in (15) beschriebenen Methode, mit dem siebenfachen Volumen 5n NaOH im Wasserbad 30 min. bei 90° C und dann nach weiteren 10 min. bei 25° C inkubiert. Darauf wird in geeichten Cuvetten gemessen.

Die Fluoreszenz wird, als Emissionsstrahlung, in $\frac{1}{2}$ -Durchlässigkeit mit Hilfe des Zusatzgerätes für Fluoreszenzmessung zum Photometer-Eppendorf gemessen. Der Fluoreszenzstandard Nr. 4587 dieses Gerätes ist gleich 100 % Durchlässigkeit. Die fluoreszenzanregende Strahlung wird von einem Filter mit der Durchlässigkeit von 300 bis 400 m μ geliefert. Dabei ist zu beachten, daß ultraviolettes Licht den Fluoreszenz-gebenden DPN-Alkali Komplex (nach(15)) in 20 min. vollständig zerstört, so daß die Proben nur jeweils sehr kurz in den Strahlengang gebracht werden dürfen.

Die Intensität der Fluoreszenz eines fluoreszierenden Stoffes nimmt bei steigender Konzentration dieser Substanz relativ zu ihrer Konzentration laufend ab. (Konzentrationslöschung s.a. (17)). Will man daher Konzentrationsbestimmungen mit Hilfe der Fluoreszenz durchführen, so muß man eine Eichkurve haben.

Abb. 4



Eichkurve für Fluorimetrische DPN - Bestimmungen

Wenn die Intensität der Fluoreszenz größer als die des Fluoreszenzstandard = 100 % Durchlässigkeit ist, so muß für die Messung die Stufenschaltung des Photometer-Eppendorf benützt werden. Diese ist jedoch an die logarithmische Funktion der Extinktionskala gekoppelt. Man muß also von der Extinktion (eine Stufe ist gleich $0,25 = \log \frac{I_0}{I}$) auf % Durchlässigkeit umrechnen.

Die LAMBERT-BEERSche Gleichung lautet (17):

$E = \log \frac{I_0}{I}$ worin $I_0 = 100$ (nämlich % Durchlässigkeit) und $I = D$ (Durchlässigkeit der Probe) ist.

Dann ist

$$\frac{100}{D} = 10^E \quad \text{und} \quad D = 10^{2-E} \quad (\text{Gleichg. 1})$$

Man liest jetzt mit Hilfe der Stufenschaltung (Subtraktion von 0,25) den negativen E - Wert ab und setzt diesen in Gleichg. 1 ein und sieht den Numerus von $2-E$ nach.

Die Substanzen BAYER A 139 und E 39 geben keine Fluoreszenz mit 5n NaOH, so daß eine DPN-Bestimmung in ihrer Anwesenheit gut möglich ist.

IV. TPN-Bestimmung.

Die Bestimmung erfolgte im optischen Test nach WARBURG mit $0,7 \times 10^{-3}$ m Glucose-6-phosphat und Zwischenferment, welches wir nach einer von A.KORNBERG (18) angegebenen Methode präparierten. Ausgangspunkt für die Anreicherung war getrocknete Bierhefe, Ausbeute 22 % und Anreicherung 5,4-fach. Diese Angaben gelten ohne den letzten Schritt der Vorschrift (Acetat pH 4,5 Fällung).

$MgSO_4$ war in 0,0033 m Konzentration vorhanden.

Die Asciteszellen wurden, wie oben beschrieben, mit $HClO_4$ oder TCE aufgeschlossen, der Puffer in dem Test war 0,1 m TRAP-Puffer pH 7,5. Mit eingesetztem TPN lief der Test auch in Gegenwart von neutralisierter TCE. (366 mp).

V. Bestimmung von DPN-H.

Die Bestimmung von DPN-H erfolgte im optischen Test mit 0,001 m Triosephosphat und GDH der Firma BOEHRINGER (vgl. auch (19)).

DPN-H wird in heißer 1n NaOH aufgenommen und mit 1 m KH_2PO_4 auf pH 7,4 neutralisiert. DPN-H wurde im Vorversuch eingesetzt und wurde quantitativ und proportional der eingesetzten Menge wieder gefunden.

Für die DPN-H Bestimmung in Asciteszellen (19) wurden die Zellen in heißer 1n NaOH im POTTER-ELVEJHEM homogenisiert, das Homogenat wurde bei 1200 g zentrifugiert und wie oben mit 1 m KH_2PO_4 neutralisiert. Nach 15 min. Zentrifugieren auf der Ultrazentrifuge bei 30 000 Touren = 60 000 g wird am klaren Überstand wie oben mit Triosephosphat und 0,06 ml GDH (BOEHRINGER) 1:3 verdünnt in $\Sigma V = 8$ ml mit $d = 4$ cm-Cuvetten DPN-H bestimmt. Gemessen wird die Extinktionsabnahme bei 366 m μ .

VI. Bestimmung von ATP.

Die ATP-Bestimmung erfolgte im zusammengesetzten optischen Test. Diese Bestimmung ist genau in (20) beschrieben.

Lösungen für die ATP-Bestimmung:

1. Reaktionsgemisch nach P.GLOGNER

Darin sind 0,1 m TRAP pH 7,4, 0,005 m

MgSO_4 , 0,0034 m Cystein-HCl.1 H_2O ,

0,006 m 3-PGS als Na-salz, mit NaOH
neutralisiert.

2. DPN-H wurde chemisch reduziert (20).

3. Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase (TPD) und Phosphoglycerinsäurekinase (PGK) wurden als Kristallsuspensionen von der Firma BOEHRINGER bezogen.

Ansatz für den ATP-Test (Vorversuch):

2,0 ml RG (Reaktionsgemisch 1), 0,07 ml DPN-H (etwa 10 mg/ml), 0,01 GAPDH, 0,01 PGK, ad 3 ml H_2O . 366 m μ , $\Sigma V = 3$ ml, $d = 1$ cm.

Tab. 6

Über die Bestimmung von eingesetzten ATP-Mengen

etwa $\frac{m}{100}$ ATP PABST	0,01 ml	0,02 ml
$\Delta E_{366} \times 10^3$	121	247
μM ATP eingesetzt:	0,1	0,2
μM ATP wiedergefunden:	0,11	0,224

Bei dieser Bestimmung fanden wir also etwas mehr ATP wieder, als vorher vermeintlich eingesetzt worden war.

Die ATP-Bestimmung in Asciteszellen erfolgte nach Aufschluß der Zellen mit TCE, wie oben für die DPN-Bestimmung beschrieben, und Neutralisation des klaren Überstandes in der Cuvette.

VII. Enzymextrakt aus Asciteszellen.

Die Zellen wurden 10 min. bei 1200 g abzentrifugiert und das Sediment wurde in etwa zehnfachem Volumen kalten Aqua bidest. suspendiert, dreimal in dem Colora-Thermostat (-15° C) gefroren und dreimal bei 37° C im Wasserbad getaut (7).

VIII. Bestimmung der DPN-ase-Aktivität.

Der eben beschriebene Enzymextrakt wurde ohne jede weitere Sedimentierung benutzt, da die DPN-ase-Aktivität strukturgebunden ist (KRÖGER).

Ansatz für die Bestimmung der DPN-ase-Aktivität:

200 μ DPN in 0,3 ml 0,1 m Phosphat-Puffer, pH 6,0 oder 7,2, 0,3 ml "DPN-ase"-Extrakt nach (VII), Inkubation bei 37° C mit Zentrifugenglasschüttelinsatz für die WARBURG'sche Apparatur. Stop der Reaktion nach 10 min. mit 0,4 ml 12,5 % TCE.

Es wurden die im folgenden beschriebenen Voruntersuchungen zum DPN-ase-Test angestellt:

Die Proportionalität von DPN-Abbau und eingesetzter Enzymmenge wurde untersucht. Ansatz wie oben, $t = 30$ min., Neutralisation der TCE-sauren Probe mit NaOH, dazu 5 Volumen 1 m KCN.

Tab. 7

eingesetzte Enzymmenge	0,1	0,2	0,3
DPN-Abbau gegen Kontrolle in $\Delta E_{334} \times 10^3$	92	148	245

Die DPN-Bestimmung erfolgte bei diesem Versuch mit der oben beschriebenen Cyanidmethode.

Auch bei DPN-Bestimmung mit der Fluorimetrie des Alkali-DPN Komplexes - (Methode wie oben) - fanden wir Proportionalität von DPN-Abbau und eingesetzter Enzymmenge (VII).

Durch Nikotinsäureamid, in 0,06 m Konzentration, wurde die DPN-spaltende Aktivität des Enzymextraktes vollständig gehemmt (21). Wir nennen also mit einigem Recht den Enzymextrakt (VII) "DPN-ase"-Extrakt.

Um den Einfluß des pH auf die DPN-ase-Aktivität zu prüfen, wurde diese bei pH 6,0 und 7,0 vergleichend gemessen (22).

Tab. 8

(Ansatz wie oben)

	0,1 m Phosphat		A 139 *) 6 mg %
	pH 6,0	pH 7,2	
DPN-ase-Aktivität als DPN-Abbau gegen Kontrolle (Fluoreszenzstandard 4587 = 100 % Durchlässigkeit)	32,8	33,6	-
	27,9	27,8	+

Ohne Ferment lief der Test (mit und ohne A 139 *) +1,2 , -2,7 gegen die Kontrollen im Mittel. Das heißt, wir hatten

*) Vergleiche auch mit den weiteren DPN-ase-Versuchen mit A 139.

eine Genauigkeit von $\pm 3\%$ für unsere Messungen (Mittelwert der DPN-bedingten Fluoreszenz war etwa 80).

Bei einem Teil der Versuche mit DPN-ase-Extrakten erfolgte die DPN-Bestimmung mit dem optisch-enzymatischen Test.

Ansatz: 0,1 ml DPN (2 mg/ml) = 200 μ DPN wurden in $\Sigma V = 3$ ml mit 0,08 m TRAP pH 7,4 und 0,6 ml DPN-ase-Extrakt (VII) bei 37° C inkubiert. A 139 war bis zu 18 mg % Konzentration anwesend. Die Reaktion wurde durch genau 5 min. langes Kochen im Wasserbad von 100° C abgestoppt. Die Proben wurden im Eisbad gekühlt und dann 15 min. bei 6000 g (6000 Touren auf der kleinen Christzentrifuge) sedimentiert. Die DPN-Bestimmung erfolgte im neutralen Überstand mit TRAP pH 7,4, Alkohol und ADH wie oben beschrieben. (Korrektionscuvetten).

IX. DPN-pyrophosphorylase aus Rattenleber.

Herstellung des Enzymextraktes (23):

1 g ganz frische Rattenleber wurde in 9 ml kalter (0,25 m Saccharose, 0,0018 m CaCl_2) Lösung bei Kühlung im Eisbad im POTTER-ELVEJHEM homogenisiert. Die DPN-pyrophosphorylase-Aktivität war mehr als 6 std. haltbar.

Die DPN-pyrophosphorylase-Aktivität wurde in Abänderung von (23) in folgendem Test bestimmt:

In $\Sigma V = 3$ ml sind $1,00 \times 10^{-4}$ m DPN, $2,2 \times 10^{-3}$ m Pyrophosphat - dieses wurde mit 1n HCl neutralisiert -, $0,49 \times 10^{-3}$ m MgCl_2 , 0,191 m NSA - dieses hemmte die anwesende DPN-ase -, 0,08 m TRAP- oder Phosphat-Puffer pH 7,4.

Gestartet wurde die Reaktion mit 0,3 ml Enzymextrakt (s.o.). $T = 37^\circ \text{C}$. Die Inkubation erfolgte im Schüttelleinsatz für Zentrifugengläser in der WARBURG'schen Apparatur. Abgestoppt wurde mit 1,0 ml 20 % TCE. DPN wurde mit dem optisch-enzymatischen Test bestimmt. Nach folgendem Schema wurden die DPN-spaltenden Enzyme getestet:

Tab. 9

Schema:

DPN-spaltendes Enzym :	im Ansatz:	
	NSA	PP
DPN-ase + DPN-pyrophosphatase	-	-
DPN-pyrophosphatase	+	-
DPN-pyrophosphatase + DPN-pyrophosphorylase	+	+

X. Anreicherung von DPN-pyrophosphorylase aus Schweineleber.

Die Anreicherung wurde wie in ((23) und (24)) angegeben ausgeführt. Dabei mußte die Anreicherung blind, d.h. ohne kinetischen Test erfolgen, da das KORNBERG-Enzym DPN und DPN-H umsetzt und Nikotinamidmononucleotid nicht zur Verfügung stand. Auf den letzten Schritt der Anreicherungsvorschrift (24), die Adsorption an Gel, wurde verzichtet; das Protein war in klarer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung.

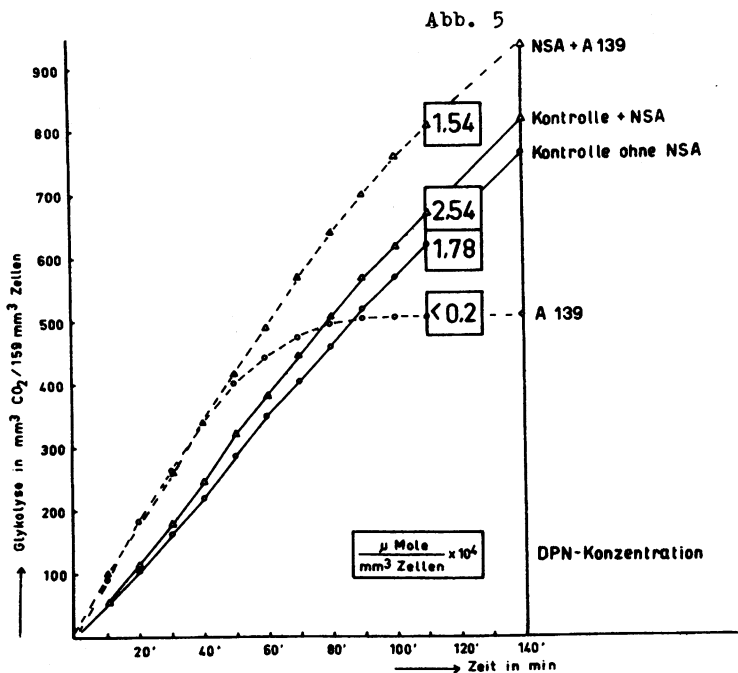
Die DPN-spaltenden Aktivitäten wurden mit dem in (IX) beschriebenen Test und nach dem gleichfalls dort angegebenen Schema bestimmt.

VERSUCHE UND ERGEBNISSE.

I. Versuche zur Hemmung der Glykolyse durch Äthylenimin-Verbindungen.

1. Beeinflussung von Glykolyse und Atmung durch A 139 mit und ohne NSA:

Es wurden die anaerobe Glykolyse und die DPN-Konzentration von EHRLICH-Ascites-Tumorzellen mit und ohne A 139 und NSA bestimmt. Wie in früheren Versuchen bereits festgestellt wurde (7), hemmt A 139 die Glykolyse von EHRLICH-Ascites-Tumorzellen. Aus Abbildung 5 ist zu ersehen, daß die DPN-Konzentration bei eingetretener Hemmung der Glykolyse in den Zellen durch 6 mg % A 139 um mehr als 90 % gesenkt wurde und daß 2 mg/ml Nikotinsäureamid die DPN-Konzentration ohne A 139 gegenüber der Kontrolle erhöhten (42) und mit A 139 in der Höhe der Kontrolle hielten. Wie zu erwarten, verhinderten 2 mg/ml NSA die Glykolysehemmung durch A 139.



Glykolyse von EHRLICH-Ascites und DPN-Konzentration ± 6 mg % A 139 - BAYER
± 2 mg/ml Nikotinsäureamid (NSA)

Wie aus Abbildung 5 und besser noch aus Abbildung 8 zu ersehen ist, fanden wir regelmäßig eine gegenüber der Kontrolle erhöhte CO_2 -Produktion in den A 139 enthaltenden Gefäßen in den ersten 20-30 min. nach dem Start der anaeroben Glykolyse. Dieser Befund konnte noch nicht erklärt werden.

In einem orientierenden Nebenversuch wurde untersucht, ob die anaerobe Glykolyse (und die Atmung) von Hefe-Zellen durch A 139-Einwirkung ebenso wie die Glykolyse von tierischen Ascites-Tumorzellen beeinflusst würden. A 139 hatte in 40 mg % Konzentration auf frische Bäckerhefe (0,05 ml 20 % Hefe, 0,1 m Glucose, 0,1 m Phosphat-Puffer pH 6,0, $T = 25^\circ \text{C}$, $\Sigma V = 2 \text{ ml}$, Gasraum N_2 bzw. Luft) keinen Einfluß hinsichtlich der Glykolyse und der Atmung. Bei noch höheren Konzentrationen (200 mg %) wurde die Glykolyse um 30 % gehemmt, aber diese Hemmung war nicht durch NSA aufzuheben und die DPN-Konzentration in den Zellen war auch nicht vermindert, so daß wir annehmen, daß es sich bei dieser Glykolysehemmung um eine unspezifische Beeinträchtigung der Glykolyse infolge der extrem hohen A 139-Konzentration gehandelt hat. Die vorgenannten manometrischen Versuche mit Hefe wurden von Frl. S. SCHNEIDER durchgeführt.

In zwei weiteren Vorversuchen setzten wir einmal nachträglich NSA zu mit A 139 inkubierten Ascites-Zellen zu. Noch wenige Minuten vor Eintritt der Hemmung der anaeroben Glykolyse in parallelen Kontrollgefäßen vermögen 2 mg/ml NSA nachträglich aus der zweiten Birne der Doppelkippergefäße zugesetzt die Glykolysehemmung zu verhindern. Dieselben Ergebnisse erhielt ROITT bei Versuchen mit TEM (6). Der Versuch zeigt, daß zu einem Zeitpunkt, wo (s. Abb. 8) die DPN-Konzentration sicher schon um mehr als 80 % gesenkt ist, der nachträgliche NSA-Zusatz den Eintritt der Glykolysehemmung noch zu verhindern vermag.

Und zweitens führten wir die Manometrie der anaeroben Glykolyse mit und ohne A 139 und die Manometrie der Atmung mit und ohne A 139 und mit und ohne Glucose durch.

Die anaerobe Glykolyse wird durch 8 mg % A 139 vollständig gehemmt, die Atmung dagegen nur unvollständig, und zwar mit und ohne Glucose. Die Atmung der Kontrolle

ist ohne Glucose erhöht gegenüber der Kontrolle mit Glucose (CRABTREE Effekt).

Tab. 10

Anaerobe Glykolyse \pm A 139 und Atmung \pm Glucose und \pm A 139

	Atmung				Glykolyse	
	$\text{mm}^3 \text{ O}_2 / 62 \text{ mm}^3 \text{ Zellen}$				$\text{mm}^3 \text{ CO}_2 / 62 \text{ mm}^3 \text{ Zellen}$	
m/40 Glucose	+	+	-	-	+	+
8 mg% A 139	-	+	-	+	-	+
90-120 min	21,1	13,4	25,5	12,0	59,5	0
210-240 min	14,4	5,6	21,4	7,8	35,2	0

Es wurden Zellen des EHRLICH-Mäuse-Ascites-Carcinoms untersucht, Methodik der Manometrie wie oben beschrieben.

2. TPN-Bestimmung in Ascites-Zellen.

In gewaschenen EHRLICH-Mäuse-Ascites-Tumorzellen, wie auch in Ascites-Zellen, die mit 6 mg % A 139 im manometrischen Ansatz inkubiert waren, lagen TPN-Konzentrationen vor, die zu niedrig waren, um sie mit dem enzymatisch-optischen Test exakt zu bestimmen.

In gewaschenen Ascites-Zellen fanden wir:

Tab. 11

	TPN	DPN
$\frac{\mu\text{Mole}}{\text{mm}^3 \text{ Zellen}} \times 10^4$	<0,05	3,36

Methodik wie oben beschrieben (26).

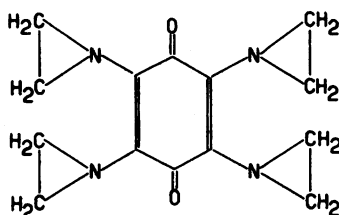
Demnach kann nicht entschieden werden, ob Äthyleniminverbindungen neben der DPN-Konzentration auch die TPN-Konzentration senken.

3. Wirkung weiterer Äthyleniminverbindungen auf die DPN-Konzentration in und die Glykolyse von EHRLICH-Mäuse-Ascites-Carcinomzellen.

Wir untersuchten die Wirkung von QE_4 auf die anaerobe Glykolyse und die DPN-Konzentration von Ascites-Zellen mit und ohne NSA.

Das von WALLENFELS und DRABER (25) synthetisierte Tetraäthylenimino-benzochinon wurde auf seine carcinostatische Wirksamkeit hin untersucht (27).

Abb. 6



Tetraäthyleniminobenzochinon = QE_4

Dabei hatte es im in vitro Versuch den Einflüssen der untersuchten BAYER-Äthyleniminchinone analoge Wirkungen. Die anaerobe Glykolyse der Ascites-Zellen wurde gehemmt, die DPN-Konzentration sank, wie aus der Tabelle ersichtlich, um über 80 %, 2 mg/ml NSA verhinderten die Hemmung der anaeroben Glykolyse (27).

Tab. 12

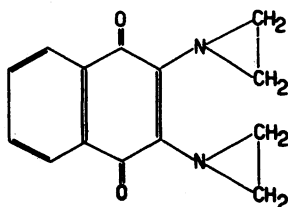
DPN-Konzentration 50 min. nach dem Start der Glykolyse

QE_4	-	1 mg %
$\frac{\mu\text{Mole DPN}}{\text{mm}^3\text{Zellen}} \times 10^4$	2,34	0,35

In derselben Weise wurde die Wirkung von NE_2 (Di-(äthylenimino-)-naphthochinon-1,4) auf die anaerobe Glykolyse von Ascites-Zellen untersucht.

Diese ebenfalls von WALLENFELS und DRABER (25)

Abb. 7



Di-äthylenimino-naphthochinon-1,4 = NE₂

synthetisierte Substanz bewirkte im manometrischen Ansatz (Methodik wie oben beschrieben) eine Hemmung der anaeroben Glykolyse von Ascites-Zellen, und diese ist durch 2 mg/ml NSA zu verhindern.

In einem weiteren Versuch bestimmten wir vergleichend die Wirksamkeit verschiedener Konzentrationen von A 139, E 39, QE₄ und NE₂ durch Manometrie der anaeroben Glykolyse. Dabei wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen die Hemmung der anaeroben Glykolyse durch die genannten Substanzen gemessen.

Tab. 13

Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Äthyleniminchinone

Substanz	Konzentration in mg %	Zeit in Min. bis zum Eintritt der Hemmung der anaeroben Glykolyse um >66 % gegenüber den Mit- telwerten der Kontrolle
QE ₄	1,0	50
	0,5	60
	0,1	110
E 39	1,0	80
	0,5	100
	0,1	>150
A 139	6,0	70
NE ₂	5,0	50
	1,0	90
	0,1	>150

Aus der Tabelle 13 geht hervor, daß QE_4 und BAYER E 39 im in vitro Versuch verschieden wirksam sind, und zwar erreicht QE_4 in etwa $1/5$ der Konzentration von E 39 die gleiche Wirkung auf die anaerobe Glykolyse von Ascites-Zellen. Dies steht in Analogie zu Versuchen am Tier von KRÖGER, der in vergleichenden Versuchen an der Tumortragenden Ratte eine um ein Vielfaches kleinere CD_{50} und LD_{50} fand (27). Darüber hinaus kann man die höhere Wirksamkeit der vierfach mit Äthyleniminingruppen substituier-ten Verbindung QE_4 gegenüber der Bis-äthylenimin-Verbindung E 39 vielleicht als einen Hinweis auf die Rolle des Äthyleniminrestes als Wirkgruppe der untersuchten Substanzgruppe deuten.

II. Versuche zur Frage des Angriffspunktes der Äthylenimin-Verbindungen am DPN-Stoffwechsel.

1. Untersuchungen über eine eventuelle direkte Reaktion von DPN und A 139.

Die einfachste Lösung der Frage nach dem Grund für das Absinken der DPN-Konzentration in Ascites-Zellen nach Zusatz von Äthylenimin-Verbindungen wäre der Nachweis einer direkten Reaktion dieser Verbindungen mit DPN. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden die im folgenden beschriebenen Versuche gemacht:

Um ein solches Reaktionsprodukt eventuell nachzuweisen, wurden im Beckman DK 2 Spektrophotometer die Absorptionsspektren von DPN und die Differenzmessung von DPN und A 139 gegen A 139 aufgenommen und verglichen. DPN und A 139 waren bei diesen Messungen in $m/10\ 000$ Konzentration und wurden in $m/10$ Phosphat-Puffer pH 6,0 (und pH 7,2) bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach 30 min., 4 std. und 26std. wurden die Absorptionsspektren aufgenommen.

Die Absorptionsspektren von DPN und A 139 gegen A 139 und von DPN gegen Puffer gemessen waren dabei identisch. Vor allem zeigte sich bei $340\ m\mu$ keine Absorptionsbande, die ein Hinweis auf eine Reaktion an dem quaternären Stickstoff des Nikotinamids des DPN-Moleküls gewesen wäre.

Weiter sollte die Bestimmung von DPN nach Inkubation mit A 139 eventuell Aufschluß über die oben gestellte Frage ergeben.

Nach 2 std. Inkubation von 80 γ DPN mit und ohne 6 mg % A 139 in $\Sigma V = 3$ ml 0,1 m TRAP pH 7,4 bei Zimmertemperatur betrug die Extinktionszunahme nach Start mit ADH im optisch-enzymatischen Test:

ohne	A 139	:	0,121	und
mit	A 139	:	0,113.	

Das heißt, daß etwa 7 % der vorgelegten DPN-Menge nach zwei Stunden Inkubation nicht mehr nachweisbar waren. Dieser regelmäßig erhobene Befund ist noch nicht erklärbar, spielt aber wohl für die oben gestellte Frage keine Rolle.

2. Untersuchungen über eine eventuelle Reaktion zwischen DPN-H und Äthyleniminchinonen. DPN- und DPN-H-Bestimmungen in Ascites-Zellen.

Eine solche Reaktion hätte ohne Zweifel Einfluß auf die DPN-Konzentration in der Zelle (28). Daher wurde zunächst orientierend in Ascites-Zellen die Konzentration von DPN und DPN-H bestimmt. Wir fanden in Ascites-Zellen, die wie oben beschrieben mit Krebs-Ringer-Puffer-Lösung gewaschen wurden, folgende Konzentrationen an DPN und DPN-H:

Tab. 14

	DPN	DPN-H
$\frac{\mu\text{Mole}}{\text{mm}^3\text{Zellen}} \times 10^4$	3,03	0,91
% der Gesamt-Diphosphopyridin-nucleotide (oxyd. + red.)	77	23

In darauf folgenden Versuchen fanden wir nach Inkubation in WARBURG-Gefäßen mit und ohne 6 mg % A 139 und Manometrie der anaeroben Glykolyse, die in Parallelgefäßen 70 min. nach Start der Glykolyse um 70 % gegenüber dem Kontrollgefäß gehemmt war, 50 min. nach dem Start der Gly-

kolyse folgende Konzentrationen von Diphosphopyridinnucleotiden in den Ascites-Zellen:

Tab. 15

Konzentrationen an DPN und DPN-H in Asciteszellen nach
Manometrie \pm 6 mg % A 139

	DPN		DPN-H	
	-	+	-	+
6 mg % A 139	-	+	-	+
$\frac{\mu \text{ Mole}}{\text{mm}^3 \text{ Zellen}} \times 10^4$	2,36	0,46	1,17	0,57
% der Gesamt-diphosphopyridinnucleotide (oxyd. + red.)	67	45	33	55

Die Methodik der Manometrie, und der DPN- und DPN-H-Bestimmung wurde oben beschrieben.

Es werden also die Konzentrationen von DPN und DPN-H vermindert, jedoch die DPN-H-Konzentration relativ weniger als die DPN-Konzentration, und dies spricht gegen eine Reaktion des DPN-H mit dem A 139 als Ursache für das Absinken der DPN-Konzentration (28). Die Summe der Diphosphopyridinnucleotide (oxydierte und reduzierte Form) beträgt 50 min. nach dem Start der anaeroben Glykolyse $3,53 \times 10^{-4} \frac{\mu \text{Mole}}{\text{mm}^3 \text{Zellen}}$ in der Kontrolle und

$1,03 \times 10^{-4} \frac{\mu \text{Mole}}{\text{mm}^3 \text{Zellen}}$ bei Inkubation mit 6 mg % A 139.

Der Abfall der DPN-H-Konzentration schließt ferner eine erhöhte Reduktionsrate des DPN als Ursache für das Absinken der DPN-Konzentration aus (7); (siehe auch Diskussion: DPN-H und GDH in Ascites-Zellen (7, 29)).

An dieser Stelle ist noch zu bemerken, daß Fräulein S. SCHNEIDER DPN-H und A 139 in Puffer in Cuvetten inkubiert hat und keinen Anhalt für eine chemische Reaktion der beiden Substanzen fand.

Das DPN-H war in jedem Falle enzymatisch quantitativ nachweisbar (ADH katalysierte Hydrierung von Acetaldehyd).

3. Untersuchungen über eine eventuelle Reaktion des NSA mit den Äthyleniminchinonen.

Die Schutzwirkung des hinzugesetzten NSA gegen den DPN-senkenden Mechanismus der Äthyleniminchinone wäre durch eine direkte Reaktion des NSA mit diesen zu erklären. Darüber hinaus würde eine solche Reaktion der Zelle das den DPN-Abbau hemmende und die DPN-Synthese fördernde (42, 43) NSA entziehen und käme so als Ursache der DPN-Senkung in Frage. Mit dieser Fragestellung beschäftigt sich der folgende Versuch.

Mit dem Beckman-DK 2 Spektrophotometer wurden die Absorptionsspektren von A 139 und von QE_4 , = Tetra-äthylenimin-benzochinon 1,4 von Professor WALLENFELS, (25), mit dem Differenzabsorptionsspektrum von A 139 bzw. von QE_4 mit NSA gegen NSA verglichen. Die Messungen erfolgten in Phosphat-Puffer von definiertem pH (das pH ist von großem Einfluß auf das Absorptionsspektrum von Äthyleniminchinonen, siehe "TCE-Wirkung auf A 139" im Kapitel Methoden III, 1).

A 139 hat (in Phosphat-Puffer pH 6,0) eine Absorptionsbande von 300-400 m μ , mit dem Maximum bei 335 m μ , ferner ein weit schwächeres Absorptionsmaximum bei 515 m μ . NSA absorbiert im ultravioletten Bereich ab 290 m μ . Die Absorptionskurven von A 139 und von NSA mit A 139 gegen NSA sind nach 2 std. Inkubation in 0,1 m Phosphat-Puffer pH 6,0 bei 37° C in dem untersuchten Bereich von 300-700 m μ identisch. Die Molaritäten verhielten sich

$$NSA : A\ 139 = 100 : 1 .$$

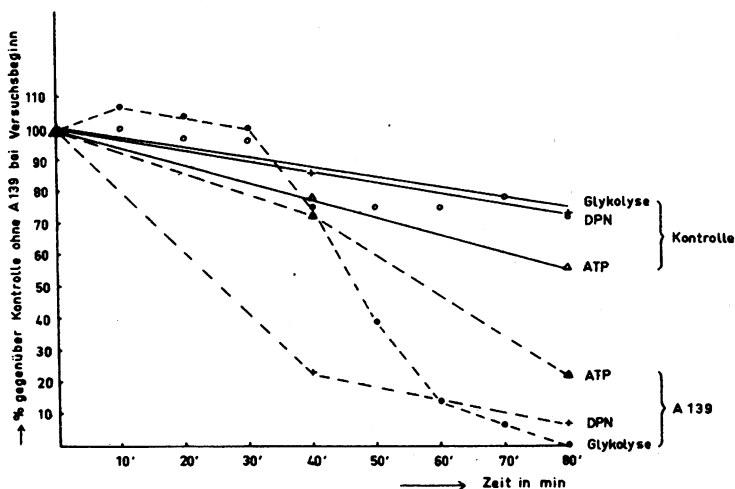
Für QE_4 und NSA ergaben die Untersuchungen das analoge Ergebnis. Das heißt, daß eine direkte Reaktion des NSA mit den Äthyleniminchinonen, die die Lichtabsorption verändert hätte, nicht festgestellt werden konnte.

4. Bestimmung der ATP-Konzentration in mit A 139 inkubierten Ascites-Zellen.

Es war die Frage, ob die Senkung der DPN-Konzentration in Ascites-Zellen durch Äthyleniminchinone vielleicht auf einer Verminderung der für die DPN-Synthese notwendigen ATP-Konzentration durch diese Verbindungen beruhe. Zu dieser Fragestellung wurden die im folgenden beschriebenen Versuche gemacht.

Die anaerobe Glykolyse und deren Hemmung durch 6 mg % A 139 haben wir, wie oben beschrieben, an EHRLICH-Ascites-Zellen gemessen. In dazu parallelen Ansätzen haben wir die stationären Konzentrationen von DPN und ATP bestimmt, und zwar 40 min. nach dem Start (d. Kippen der Ascites-Zellen) und bei eingetretener Hemmung der Glykolyse.

Abb. 8



Glykolyse und Konzentration an DPN und ATP von Asciteszellen mit und ohne A 139

Aus der Abbildung ist zu ersehen, daß die durch 6 mg % A 139 verursachten Veränderungen des Stoffwechsels der Ascites-Zellen in folgender Reihenfolge eintreten:

1. Abfall der DPN-Konzentration.
2. Hemmung der Glykolyse.
3. Abfall der ATP-Konzentration.

Die Verminderung der ATP-Konzentration in den Zellen dürfte demnach nicht Ursache, sondern Folge des Abfalls der DPN-Konzentration und der damit verbundenen Glykolysehemmung sein.

Tab. 16

Glykolyse und Konzentrationen an DPN und ATP von
Asciteszellen mit und ohne 6 mg % A 139

min nach dem Start		40		80	
6 mg % A 139		-	+	-	+
Glykolyse pro 10 min in $\frac{\text{mm}^3 \text{ CO}_2}{80 \text{ mm}^3 \text{ Zellen}}$		24	21	20	0
$\frac{\mu \text{ Mole}}{\text{mm}^3 \text{ Zellen}} \times 10^4$	DPN	2,07	0,54	1,76	<0,2
	ATP	9,25	8,57	6,65	2,57

Die Methodik der DPN- und ATP-Bestimmung wurde im methodischen Teil der Arbeit beschrieben.

Analoge Ergebnisse erhielten wir bei der Untersuchung der Ascitesform eines YOSHIDA-Sarkoms, für dessen freundliche Überlassung wir an dieser Stelle Herrn Professor DRUCKREY danken möchten.

5. Einfluß von A 139 auf die DPN-ase.

Eine Aktivierung des Enzyms DPN-ase, das NSA aus DPN abspaltet und durch NSA-Zusatz hemmbar ist (37, 21, 22), käme sehr wohl als Ursache für den Abfall der DPN-Konzentration in Betracht. Die zu dieser Fragestellung unternommenen Versuche sind in drei Abschnitte zu teilen: einmal wurde A 139 zu DPN-ase-Extrakten hinzugesetzt (A.), dann wurden DPN-ase-Extrakte aus Zellen, deren anaerobe Glykolyse bei Inkubation mit A 139 vorher im manometrischen

Ansatz gemessen worden war, getestet (B.), und schließlich wurde DPN-ase-Extrakten aus vorher anaerob mit und ohne A 139 im WARBURG-Apparat inkubierten Zellen bei der Bestimmung ihrer DPN-spaltenden Aktivität weiteres A 139 hinzugesetzt (C.).

A. Zusatz von A 139 zu DPN-ase Extrakten.

Der Enzymextrakt aus Ascites-Zellen wurde in dem Kapitel Methoden VII beschrieben. Der Test für die DPN-ase Aktivität wurde, wie in Methoden VIII angegeben, benutzt; die Inkubation erfolgte bei 37°C im Wasserbad ohne den Schütteleinsatz für Zentrifugengläser, die DPN-Konzentration war $0,5 \times 10^{-3}\text{ m}$, die DPN-Bestimmung erfolgte fluorimetrisch gegen den Fluoreszenzstandard 4587 = 100 % Durchlässigkeit.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle 17 (Seite 38) zusammengestellt.

Eine Aktivierung der DPN-ase war bei der großen Schwankungsbreite der DPN-ase Aktivität nicht sicher festzustellen.

Im folgenden seien einige weitere Versuche beschrieben, die Fräulein S. SCHNEIDER zu dieser Fragestellung durchführte.

In einem optischen Test wurde ein DPN-ase Extrakt aus Jensen-Sarkom (1 g Tumor in 3 ml $0,02\text{ m NaHCO}_3$ im Ultraturrax homogenisiert, 10 min. Stockzentrifuge bei 2000 g, Überstand 15 min. in der Kühlzentrifuge bei 18000 Touren sedimentiert, Sediment in 2 ml $0,02\text{ m NaHCO}_3$ aufnehmen, 1 min. bei 1800 Touren zentrifugieren, Überstand in den Test einsetzen) untersucht.

Im Ansatz befanden sich 0,1 ml DPN (10 mg/ml), 1,0 ml $0,2\text{ m}$ Phosphat-Puffer pH 8,0, H_2O ad $\Sigma V = 2\text{ ml}$, 0,02 ml ADH, 0,032 ml absoluter Alkohol; die Schichtdicke der Cuvetten war $d = 1\text{ cm}$, Temperatur = 37°C ; vor dem Start mit 0,4 ml Tumorextrakt ist die Extinktion konstant, nach dem Start wird die Extinktionsabnahme bei 366 μ gemessen, die Reaktion kann durch 100 mg % NSA abgestoppt werden.

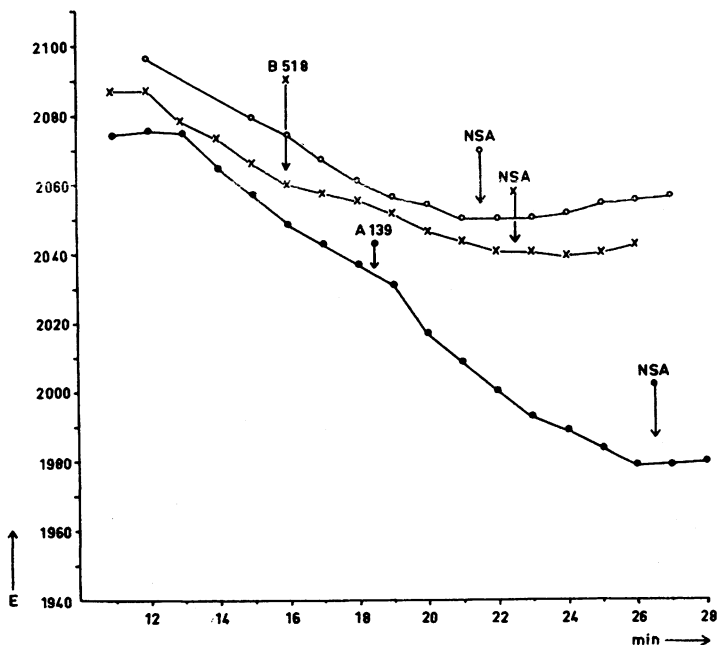
Die Wirkung von A 139 und B 518 (Endoxan-ASTA) auf diese Testanordnung ist in Abbildung 9 dargestellt (Seite 39).

Tab. 17

Einfluß von A 139 auf DPN-ase Extrakte aus Ascitescellen

DPN-ase Extrakt	-			+				+			+	
Inkubationszeit min	30			10				10			10	
Phosphatpuffer pH	6,0			7,0		6,0		6,0			6,0	
A 139 in mg %	-	6	30	-	6	-	6	-	6	30	-	30
DPN-ase Aktivität als DPN-Abbau gegen Kontrolle	-1,2	1,5	2,7	32,8	27,9	53,6	27,8	20,6	23,6	29,0	8,2	4,8
Aktivierung bsw. Hemmung der DPN- ase in % gegenüber der Kontrolle	kein DPN-Abbau			-	-15%	-	-17%	-	+15%	(+40%)	-	(-41%)

Abb. 9

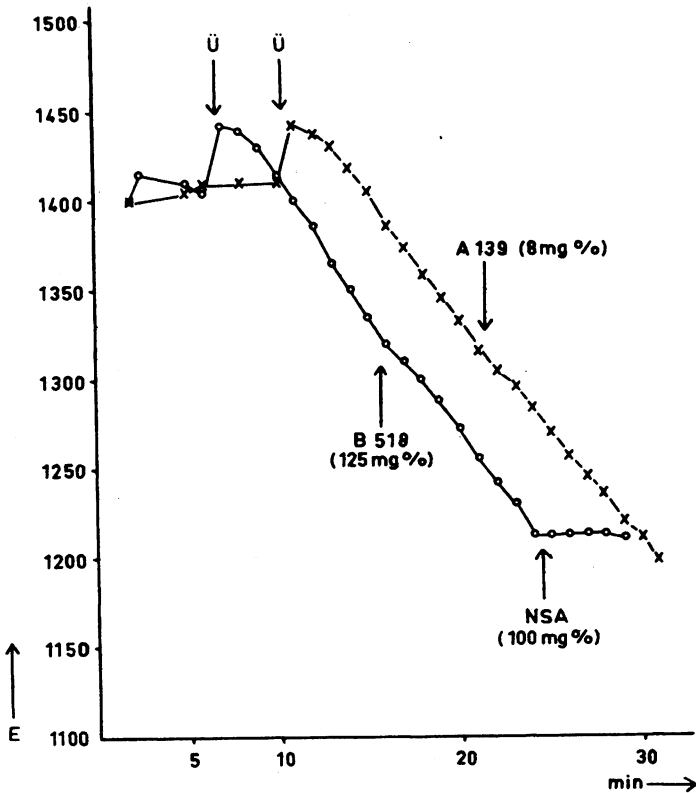


Wirkung von A 139 und B 518 auf DPN-ase Extrakt aus Jensen Sarkom

In weiteren Versuchen wurde eine angereicherte Milz DPN-ase in diesem optischen Test mit und ohne A 139 (8 mg %), B 518 (125 mg %) und NSA (100 mg %) untersucht. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 10 dargestellt. (Seite 40).

Die vollständige Hemmung des DPN-Abbaues durch NSA zeigt, daß der optische Test zur Bestimmung der DPN-ase in Ordnung ist. Ein beschleunigender Einfluß der untersuchten Carcinostatika auf den DPN-Abbau war nicht festzustellen.

Abb. 10



Wirkung von A 139 und B 518 auf DPN-ase aus Milz (Ü)

B. DPN-ase Extrakte aus Ascites-Zellen nach Manometrie der anaeroben Glykolyse mit und ohne A 139.

Die DPN-ase Extrakte wurden, wie oben (Methoden VII) beschrieben, gewonnen. Bestimmung der DPN-ase Aktivität wie oben, DPN-Bestimmung nach Neutralisation des TCE-sauren Überstandes mit NaOH mit der Cyanidmethode. (Methoden VIII).

Wir untersuchten folgende DPN-ase-Extrakte:

A = von frischen, ungewaschenen Ascites-Zellen.

B = von gewaschenen Ascites-Zellen.

C = von 90 min. im manometr. Ansatz ohne A 139 inkubierten Zellen.

D = von 90 min. im manometr. Ansatz mit 6 mg % A 139 inkubierten Zellen.

Die Hemmung der Glykolyse in D gegenüber C betrug 94 % und die DPN-Konzentration war um mehr als 90 % vermindert. Wir fanden folgende DPN-ase-Aktivitäten (nach 10 min. Inkubation):

Tab. 18

Enzymextrakte (mit gleichen Zellmengen)	A	B	C	D
DPN-Abbau in $\Delta E_{334} \times 10^3$ gegen Kontrolle	128	134	99	85

Da nach 90 min. Einwirkungszeit von A 139 auf glykolyisierende Ascites-Zellen in dem DPN-ase-Extrakt keine Aktivierung festzustellen war und der Grund dafür eventuell sein konnte, daß nach eingetretener Glykolysehemmung eine etwaige primäre DPN-ase-Aktivierung jetzt nicht mehr nachzuweisen war, untersuchten wir DPN-ase-Extrakte von Zellen nach 20 min. Inkubation im manometrischen Ansatz mit und ohne 6 mg % A 139. Eine Glykolysehemmung war dabei noch nicht eingetreten, aber die DPN-Konzentration war schon um 20 % abgesunken.

Tab. 19

Enzymextrakt	DPN-Abbau in $\Delta E_{334} \times 10^3$ gegen Kontrolle
aus ohne A 139 inkubierten Zellen	148
aus mit 6 mg % A 139 inkubierten Zellen	147

Auch hier war also keine DPN-ase-Aktivierung festzustellen.

Weiter untersuchten wir DPN-ase-Extrakte aus Zellen, die 40 min. im manometrischen Ansatz mit und ohne 6 mg % bzw. 18 mg % A 139 inkubiert worden waren, in folgendem Ansatz:

0,1 ml DPN (2 mg/ml) = 200 μ DPN werden in $\Sigma V = 3$ ml 0,08 M TRAP-Puffer pH 7,4 mit 0,6 ml Enzymextrakt 15 min. bei 37° C inkubiert. Der Test ist in dem Abschnitt Methoden VIII beschrieben. Die DPN-Bestimmung erfolgte im enzymatisch-optischen Test (Methoden III,1). Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tab. 20

Glykolysehemmung bei 40 min. Inkub.	noch keine		
A 139 mg % im manometrischen Ansatz	-	6	18
$\frac{\mu\text{Mole DPN}}{\text{mm}^3 \text{Zellen}} \times 10^4$ (in Parallelansätzen)	2,84	1,31	0,59
DPN-ase-Aktivität als DPN-Abbau in $\Delta E_{366} \times 10^3$ gegen Kontrolle (=62)	37	35	37

Eine Hemmung der Glykolyse um 90 % wurde für 6 mg % A 139 in Parallelgefäßen 80 min. nach dem Start der Glykolyse gemessen.

Nach diesen Versuchen kann man sagen, daß eine Aktivierung der DPN-ase durch A 139 in dieser Versuchsanordnung nicht nachzuweisen war.

C. DPN-ase-Extrakte aus Ascites-Zellen nach Manometrie der anaeroben Glykolyse mit und ohne A 139 im DPN-ase-Test mit und ohne weiteres A 139 untersucht.

Diese Versuche wurden angestellt, um die Möglichkeit, daß eine zunächst im manometrischen Ansatz bei Anwesenheit von A 139 vorhandene Aktivierung der DPN-ase beim Aufschluß

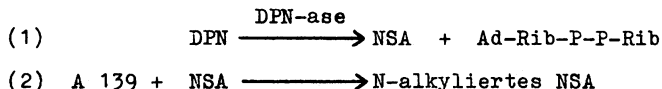
der Zellen mit H_2O bidest. (s.o.) und durch die dabei auftretende Verminderung der A 139-Konzentration wieder verloren gehen könnte, auszuschließen.

Die DPN-ase-Extrakte wurden wie in dem Kapitel Methoden VII beschrieben gewonnen. Die DPN-ase-Aktivität wurde mit den angegebenen Testen bestimmt, die DPN-Bestimmungen erfolgten dabei fluorimetrisch an dem TCE-sauren Überstand, oder mit dem enzymatisch-optischen Test am neutralen Überstand der durch Kochen abgestoppten Probe.

Die Ergebnisse von fünf, als repräsentativ zu bezeichnenden, Versuchen sind in der auf Seite 44 stehenden Tabelle zusammengefaßt. Die Manometrie der Glykolyse erfolgte bis 40 min. nach dem Start. In den DPN-ase-Ansätzen wurde die gleiche A 139 Konzentration, die vorher bei der Manometrie eingesetzt war, durch A 139 Zusatz wiederum eingestellt.

Die Schwankungsbreite der DPN-ase-"Aktivierung" von 0 % bis 26 % gegenüber den Kontrollen läßt einen sicheren Schluß dahingehend, daß A 139 in 6 mg % Konzentration eine signifikante Aktivierung der DPN-ase unter den im Vorhergehenden geschilderten Bedingungen verursache, nicht zu. Wir fanden zwar die DPN-ase-Aktivität mit A 139 bei den unter C. zusammengefaßten Versuchen immer größer oder gleich, und niemals kleiner als die Kontrolle, doch wir scheuen uns, diese Befunde als die Ursache für die Verminderung der stationären DPN-Konzentration in Ascites-Zellen anzusprechen.

Neuesten Befunden von HOLZER, DUNTZE u. FRANK zufolge (44) könnte eine geringe DPN-ase-Aktivierung durch Abfangen des bei der Reaktion entstehenden NSA nach den Gleichungen



zustande kommen. Da NSA die DPN-ase hemmt, wäre so durch Wegnahme des sich während der Reaktion (allerdings nur in geringer Konzentration) anstauenden NSA eine geringe Aktivierung verständlich.

Tab. 21

DPN-ase Extrakte aus \pm A 139 inkubierten Ascitessellen mit und ohne
weiteres A 139 nach dem Aufschluß der Zellen

A 139 Konzentration bei der Manometrie und im DPN-ase-Ansatz mg %	-	6	-	6	-	6	18	-	6	-	6
Eintritt der Hemmung der Glykolyse in Parallelgefäßen: min nach dem Start	-	80	-	90	-	90	?	-	100	-	80
Abnahme der DPN-Konzentration nach 40 min Manometrie in % gegenüber Kontrolle	-	74	-	30	-	54	90	-	35	-	52
Puffer des DPN-ase-Ansatzes, pH:	phos. pH 7,2		phos. pH 6,0		trap pH 7,4			trap pH 7,4		trap pH 7,4	
Inkubationszeit min:	10		10		15			10		10	
DPN-Bestimmung nach Abstoppen der DPN-ase-Reaktion, Methode:	fluorimetrisch				mit Alkohol und ADH						
DPN-ase-Aktivität als DPN-Abbau, gegen Kontr., Mittelwerte mehrerer Proben (je 2-3)	27,2	34,2	23,1	22,6	58	68	65	61	71	73	73
Aktivierung der DPN-ase in % gegen Kontrolle	-	+26%	-	±0	-	+17%	+12%	-	+16%	-	±0

6. Einfluß von A 139 auf die DPN-pyrophosphorylase.

Das Enzym katalysiert die Reaktion



Die Aktivität des Enzyms wurde in der DPN-Spaltungs-Reaktion untersucht. In Vorversuchen sollte die DPN-pyrophosphorylase in Rattenleberhomogenaten bestimmt werden. Der oben, im Kapitel Methoden IX, beschriebene rohe Rattenleberextrakt wurde mit dem gleichfalls dort angegebenen Test untersucht. Dabei fanden wir die folgenden, in der Tabelle als DPN-Abbau in $\Delta E_{366} \times 10^3$ erscheinenden, DPN-spaltenden Aktivitäten. Der Kontrollwert war 74.

Tab. 22

Inkubationszeit	6 min.	15 min.
DPN-ase + DPN-pyrophosphatase	66	74
DPN-pyrophosphatase	1	2
DPN-pyrophosphatase + DPN-pyrophosphorylase (=KORNBERG-Enzym)	0	8

Diese Messung erfolgte in Phosphat-Puffer pH 7,4.

Die Wiederholung dieser Versuche in TRAP- und Phosphat-Puffer ergab Unregelmäßigkeiten. Diese beruhen darauf, daß in den rohen Rattenleberhomogenaten eine sehr hohe Pyrophosphat-spaltende Aktivität vorhanden ist. Wenn man eine der PP-Konzentration in dem oben beschriebenen Test entsprechende Pyrophosphatmenge 20 min. mit Rattenleberhomogenat (wie oben) in TRAP-Puffer pH 7,4 bei 37° C inkubiert, so ergibt die Bestimmung von anorganischem Phosphat mit und ohne vorherige 7 min. Säurehydrolyse gleiche Werte. Das aber heißt, daß unter den genannten Bedingungen nach weniger als 20 min. das vorliegende Pyrophosphat gespalten ist und für die DPN-Spaltung durch das KORNBERG-Enzym nicht mehr zur Verfügung steht.

Anorganisches Phosphat und 7 min.-Phosphat wurden nach einer Variante der in (30) angegebenen Methode bestimmt. Diese Variante ist in (20) beschrieben.

In weiteren Vorversuchen sollte die DPN-pyrophosphorylase in Ascites-Zellen bestimmt werden. Der Enzymextrakt wurde wie im methodischen Teil der Arbeit beschrieben (VII) gewonnen. Der im Kapitel Methoden IX angegebene Test wurde dahingehend abgeändert, daß die Enzymextraktmenge im Ansatz verzehnfacht und die Inkubationsdauer auf 20 min. verlängert war.

Nach 20 min. waren 87 % des vorgelegten DPN durch die vorhandene DPN-ase abgebaut, während DPN-pyrophosphatase und DPN-pyrophosphorylase keinen signifikanten DPN-Abbau bewirkten.

Dieses Ergebnis ist verständlich, da nach (31) das KORNBERG-Enzym nur in sehr geringer Menge im Tumor vorhanden ist.

Um deutlichere, Pyrophosphat abhängige, DPN-spaltende Aktivitäten zu erhalten, wurde DPN-pyrophosphorylase aus Schweineleber angereichert. Die Anreicherung ist in dem methodischen Teil der Arbeit beschrieben (X). Die Bestimmung der DPN-spaltenden Aktivitäten erfolgte, in Abänderung des im Kapitel Methoden IX angegebenen Testes, mit DPN in $2,0 \times 10^{-4} \text{ m}$ Konzentration (= etwa zweifache Enzymsubstratsättigung) und 0,2 ml Enzymextrakt (Methoden X) in $\Sigma V = 3 \text{ ml}$. Nach 15 min. Inkubationszeit wurde die Reaktion mit TCE in 5 % Endkonzentration abgestoppt. Unter diesen Bedingungen fanden wir folgende, in der Tabelle 23 als DPN-Abbau in $\Delta E_{366} \times 10^3$ gegenüber der Kontrolle (= 151) angegebenen, DPN-spaltende Aktivitäten in dem angereicherten KORNBERG-Enzymextrakt:

Tab. 23

Enzym	$\Delta E_{366} \times 10^3$
DPN-ase + DPN-pyrophosphatase	36
DPN-pyrophosphatase	15
DPN-pyrophosphorylase + DPN-pyrophosphatase	79
DPN-pyrophosphorylase (berechnet)	64

Wir fanden ausreichende Proportionalität von DPN-Abbau und Menge an eingesetztem Enzymextrakt.

Tab. 24

Menge an angereichertem KORNBERG-Enzym in ml	0,1	0,15	0,2	0,3
DPN-Abbau in $\Delta E_{366} \times 10^3$ durch KORNBERG-Enzym + (DPN-pyrophosphatase)	48	65	79	94

Nach diesen Vorversuchen konnten wir darangehen, die Wirkung von A 139 auf die aus Schweineleber angereicherte DPN-pyrophosphorylase zu untersuchen.

Die DPN-spaltende Aktivität wurde mit dem zuletzt beschriebenen Test bestimmt. Die Enzymmenge war 0,15 ml in $\Sigma V = 3$ ml, nach 15 min. Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch 5 min. Kochen im Wasserbad von 100°C abgestoppt. Die Kontrollwerte wurden mit Enzym sofort gekocht; in einem Vorversuch erhielten wir für mit Enzym gekochte Kontrollen bei der DPN-Bestimmung ein ΔE_{366} von 0,130, ohne Enzym ein ΔE_{366} von 0,131. In den sofort nach Enzymzusatz gekochten Kontrollen fand demnach kein DPN-Abbau statt. Nach Abkühlen und Sedimentierung bei 6000 g erfolgte die DPN-Bestimmung wie in dem Kapitel Methoden VIII beschrieben. (Korrektionscuvetten gleichen die Ausgangsabsorption aus).

A 139 in 6 mg % bzw. 18 mg % Konzentration bewirkt, wie aus der Tabelle 25 zu ersehen ist, eine kaum als signifikant zu bezeichnende Hemmung der DPN-spaltenden Aktivität der aus Schweineleber angereicherten DPN-pyrophosphorylase, und zwar mit und ohne NSA, das die noch vorhandene DPN-ase-Aktivität hemmen sollte.

In diesen Versuchen betrug die DPN-spaltende Aktivität, als DPN-Abbau in $\Delta E_{366} \times 10^3$ angegeben, von DPN-ase und DPN-pyrophosphatase zusammen 40; der Kontrollwert (Stop bei 0 min.) war 126.

Tab. 25

Wirkung von A 139 auf DPN-pyrophosphorylase aus Schweineleber

Enzym	NSA	A 139		
	0,191 m	-	6 mg %	18 mg %
DPN-pyrophosphorylase + DPN-pyrophosphatase	+++	77	71	73
DPN-pyrophosphorylase berechnet	+++	45	39	41
DPN-pyrophosphorylase + DPN-pyrophosphatase + DPN-ase	---	99	94	91
DPN-pyrophosphorylase berechnet	---	57	52	49

7. Wirkung von A 139 auf DPN- und DPN-H-Pyrophosphatase.

Beide Enzyme spalten hydrolytisch die Pyrophosphatbindung des oxydierten bzw. reduzierten DPN. Eine Änderung ihrer Aktivitäten durch Äthylenimin-Verbindungen hätte zweifellos Einfluß auf die DPN-Konzentration in den Ascites-Zellen. Daher wurden von FrI. S.SCHNEIDER die im folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt.

A. DPN-pyrophosphatase.

Es wurden Nierenhomogenate (0,5 g Niere in 2,5 ml m/5 TRIS-Puffer pH 7,5 im POTTER-ELVEJHEM homogenisiert) und analog gewonnene Tumorphomogenate (Jensen-Sarkom) untersucht.

Im Ansatz waren 0,4 ml m/5 TRIS-Puffer pH 7,5, 0,2 ml 0,1 m $MgSO_4$, 0,06 ml DPN (10 mg/ml), 0,1 ml 10 % NSA, 0,1 ml Enzymextrakt und H_2O ad $\Sigma V = 2$ ml. Nach 15 min. Inkubation bei $37^{\circ} C$ wurde die Reaktion mit 0,2 ml 50 % TCE abgestoppt. Die DPN-Bestimmung erfolgte im optisch-enzymatischen Test.

Es wurde kein Einfluß des A 139 auf die DPN-spaltende Aktivität der DPN-pyrophosphatase in Rattennierenhomogenaten festgestellt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Jensen-Sarkom-homogenaten sind in der Tabelle 26 zusammengefaßt:

Tab. 26

Wirkung von Carcinostatika auf DPN-pyrophosphatase
Extrakt aus Jensen Sarkom

eingesetzte Mol DPN $\times 10^6$	Verbrauch an Mol DPN $\times 10^6$ bei Inkubationszeit von		ml Homogenat	zugesetztes Carcinostatikum
	20 min	40 min		
1,55	-	-	-	-
1,55	0,095	0,195	0,1	-
1,55	0,19	0,363	0,2	-
1,55	0,082	0,17	0,1	125 mg% B 518 *
1,55	0,135	0,2	0,1	8 mg% A 139

* B 518 ist die N-Lost-Verbindung Endoxan-ASTA

Es ist zu fragen, wie weit die geringe Aktivierung des Enzyms (s. letzte Zeile Tab.26) durch A 139 als signifikant gelten darf.

B. DPN-H-pyrophosphatase.

Die DPN-H-spaltende Aktivität von Rattennierenhomogenaten wurde im optischen Test bei 366 m μ gemessen. Im Ansatz befanden sich 0,4 ml 0,2 m TRIS-Puffer pH 7,5, 0,2 ml 0,1 m MgSO₄, 0,04 ml 0,5 m KCN, 0,06 ml DPN-H, welches im Vorversuch mit ADH und Acetaldehyd bestimmt wurde, und H₂O ad Σ V = 2 ml. Der Ansatz befand sich in diesen Versuchen in Cuvetten mit der Schichtdicke d = 1 cm. Gestartet wurde mit 0,1 ml Homogenat. Der Versuch wurde mit Acetaldehyd und ADH abgestoppt und gemessen, die Temperatur war 37° C während der Inkubationszeit. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle 27 dargestellt:

Tab. 27

Wirkung von B 518 auf DPN-H-pyrophosphatase
Extrakt aus Rattennieren

eingesetzte Mol DPN-H x 10 ⁶	verbrauchte Mol DPN-H x 10 ⁶	Inkubationszeit in min	ml Extrakt	zugesetztes Carcinostatikum
0,626	0,056	10	0,1	-
0,626	0,086	10	0,2	-
0,626	0,12	30	0,1	-
0,626	0,063	10	0,1	125 mg% B 518
0,626	0,119	10	0,2	125 mg% B 518
0,5725	0,0455	15	0,1	-
0,5725	0,0465	15	0,1	125 mg% B 518

III. Versuche zum Zusammenhang zwischen DPN-senkender und therapeutischer Wirkung der Äthylenimin- Verbindungen.

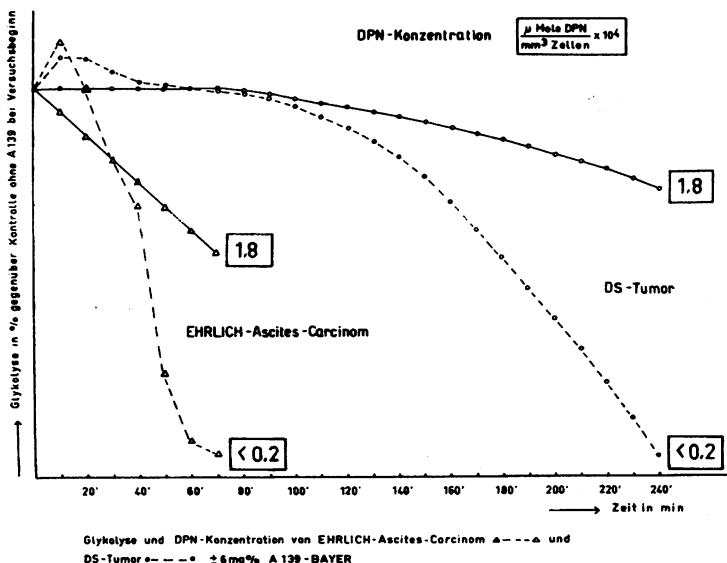
1. Versuche mit dem therapieresistenten DS-Tumor.

Der von Herrn Professor DRUCKREY freundlicherweise zur Verfügung gestellte DS-Tumor, ein durch Diaminomethyl-Stilben-Fütterung hervorgerufenes Carcino-Sarkom, zeigt gegen Carcinostatika eine weitgehende Resistenz (32). Der Tumor wurde in der Form eines Ascites-Tumors untersucht, man vergleiche damit die Befunde an der soliden, subcutan verimpften Form des Tumors (33).

Die in vitro Versuche mit diesem Tumor brachten folgende Ergebnisse:

Die Manometrie der anaeroben Glykolyse - wie im methodischen Teil der Arbeit beschrieben - mit 6 mg % bzw. 40 mg % A 139 ergab, daß bei 6 mg % A 139 die Hemmung der Glykolyse erst nach etwa vier Stunden eintrat, während die Glykolyse von EHRLICH-Ascites-Tumorzellen unter den gleichen Bedingungen etwa nach 80 min. gehemmt war. Dieses Ergebnis und die dazugehörigen DPN-Konzentrationen sind in der Abbildung 11 dargestellt.

Abb. 11



NSA vermag auch bei diesem Tumor die Wirkungen des A 139 aufzuheben. Die folgende Tabelle faßt die Untersuchungen von Glykolyse und DPN-Konzentration beim DS-Tumor mit und ohne 6 mg % A 139 und 2 mg/ml NSA zusammen:

Tab. 28

Glykolyse und DPN-Konzentration von DS-Tumor
 $\pm 6 \text{ mg\% A 139}$ und $\pm 2 \text{ mg/ml NSA}$

A 139 6 mg%	-	+	-	+
NSA 2 mg/ml	-	-	+	+
$\mu\text{Mole DPN}$ $\text{mm}^3 \text{ Zellen} \times 10^4$				
nach Inkuba- tionszeit				
von 80 min	2,73	1,67	3,18	2,38 *
240 min	1,75	0,2	2,45	1,67 *
$\text{mm}^3 \text{ CO}_2/162 \text{ mm}^3 \text{ Zellen}$ von 210 bis 240 min	84	18	82	72

* zwei verschiedene Versuche

Merkwürdigerweise bewirkten 40 mg % A 139 (also die 6 1/2-fache Konzentration gegenüber den Versuchen von Tabelle 28) auch nach 360 min. Inkubation im manometrischen Ansatz keine Hemmung der anaeroben Glykolyse, und auch die DPN-Konzentration war nach 240 min. nur um 50 % gegenüber der Kontrolle abgesunken. Diesen Befund zu erklären, war bis jetzt nicht möglich.

Wir sehen die Therapieresistenz und die relative Unempfindlichkeit der Glykolyse des DS-Tumors gegen Äthylenimin-Verbindungen als ein weiteres Argument für unsere Annahme, daß der carcinostatische Wirkungsmechanismus dieser Substanzen in einem Eingriff in die Glykolyse, bzw. den DPN-Stoffwechsel besteht, an.

2. Reinoculationsversuche.

Zellen des EHRLICH-Mäuse-Ascites-Tumors wurden im manometrischen Ansatz inkubiert. Anaerobe Glykolyse und DPN-Konzentration in den Zellen bei Ende der Manometrie wurden wie oben beschrieben gemessen. Die Hälfte der inkubierten Zellen wurde in Krebs-Ringer-Lösung gewaschen und dann zu gleichen Teilen (je etwa 60 mm³ Zellen) auf je vier Mäuse wieder überimpft. Die Ergebnisse dieser Reinoculationsversuche sind in Tabelle 29 (Seite 53) dargestellt.

2 mg % B 518 (= Endoxan ASTA) und 2 mg % Benzo-
chinon-1,4 verhinderten, mit und ohne 2 mg/ml NSA, das
Wiederangehen der reinoculierten Ascites-Zellen nicht.
Glykolyse und DPN-Konzentration waren gegenüber der Kon-
trolle wenig verändert, Die Tiere starben nach Gewichts-
zunahme alle.

Tab. 29

Reinoculationsversuche mit Asciteszellen nach Inkubation mit
± A 139 und ± NSA

A 139 in mg%	-	-	6	6	6	0,6
NSA 2 mg/ml	-	+	-	+	+	-
Hemmung der Glykolyse in % gegenüber der Kontrolle	-	-	>95%	-	-	-
$\frac{\mu\text{Mole DPN}}{\text{mm}^3 \text{ Zellen}} \times 10^4$	0,87	2,06	<0,1	0,87		0,69
Zahl der beimpften Tiere	8	3	8	8	4	4
Tiere gestorben	alle	alle	1	-	-	-
nach Tagen	20	20	28	-	-	-
Überlebende Tiere	-	-	7	alle	alle	alle
Beobachtungszeit	-	-	mehr als zwei Monate			
Gewichtszunahme bis zum 20. Tag, Mittelwerte in % des Ausgangsgewichtes	25%	25%	-	-	-	-

*) Diesen vier Tieren wurden Asciteszellen überimpft, die mit 2 mg/ml NSA-haltiger Krebs-Ringer-Lösung gewaschen worden waren. Darüber hinaus wurden den Tieren 4 Tage lang täglich 100 mg/kg NSA intraperitoneal gespritzt.

3. Behandlung von Jensen-Sarkom-tragenden Ratten mit verschiedenen Carcinostatica, DPN-Bestimmung im Tumor.

Wir verweisen an dieser Stelle ausdrücklich auf die von HOLZER und KRÖGER angestellten Untersuchungen am Jensen-Sarkom. Man fand in diesen Versuchen bei Behandlung der Tumoren einen Abfall der DPN-Konzentration gegenüber der Kontrolle, NSA-Gaben verhinderten diesen Abfall und verschlechterten die Heilungsquote der Behandlung. Diese Versuche sind in (34) veröffentlicht.

DISKUSSION.

Ausgehend von früheren Beobachtungen (7), in denen festgestellt worden war, daß die Glykolyse von Tumor-Zellen durch Äthylenimin-Verbindungen gehemmt wird und der Grund dafür in einer markanten Erniedrigung der stationären DPN-Konzentration zu suchen ist, war es das eigentliche Hauptthema dieser Arbeit, den DPN-senkenden Mechanismus der genannten Verbindungen näher zu untersuchen.

Der erste Hauptteil der Arbeit beschäftigte sich mit der Glykolysehemmung als solcher. Die frühere Beobachtung (7), daß die Glykolysehemmung eintritt, ohne daß die in Parallelversuchen untersuchte Atmung derartig eingreifend gestört ist, wurde bestätigt. Ferner konnten wir den generell in Tumor-Zellen die DPN-Konzentration erhöhenden Effekt des Nikotinsäureamids und die Aufhebung der Glykolysehemmung durch NSA im Versuch reproduzieren (6, 7). Dieser Schutzeffekt des NSA ist noch wenige Minuten, bevor in Parallelgefäßen die Glykolyse gehemmt wird, durch Nachkippen von NSA zu zeigen (6).

Einige neue Äthylenimin-Verbindungen von WALLENFELS (25, 27) haben auf die DPN-Konzentration und die Glykolyse von Ascites-Zellen im Prinzip die gleiche Wirkung wie die früher untersuchten Verbindungen. Die Tatsache der höheren Wirksamkeit (27) des vierfach mit Äthyleniminingruppen substituierten Tetraäthylenimino-benzochinon-1,4 (= QE_4) unterstützt die Anschauung (38), daß die Wirkung auf den DPN-Stoffwechsel eine Funktion der Äthylenimingruppen ist.

Der zweite Hauptteil der Versuche galt der Frage nach dem Mechanismus der Senkung der DPN-Konzentration in Tumor-Zellen bei Inkubation mit Äthylenimin-Verbindungen.

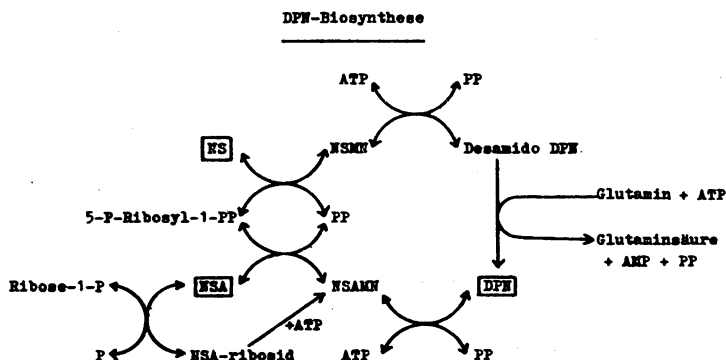
Die beschriebenen Versuche schließen eine direkte Reaktion des DPN mit BAYER A 139 nicht mit Sicherheit aus. Diese Reaktion verläuft in vitro jedoch sehr langsam, im Gegensatz zu der Geschwindigkeit der in Tumor-Zellen eintretenden Abnahme der DPN-Konzentration, sodaß sie für den Wirkungsmechanismus kaum in Frage kommen dürfte.

Die Bestimmung der Konzentration an reduziertem DPN ergab im Gegensatz zu (7) meßbare Konzentrationen an DPN-H in der Höhe von 30 % der Gesamt-Diphosphopyridinnucleotide (DPN + DPN-H) in den Zellen des von uns verwandten Stammes (-WARBURG) des EHRLICH-Mäuse-Ascites-Carcinoms. Dieser Befund weist daraufhin, daß die DPN-H-Konzentration vielleicht von der GDH-Konzentration (BARANOWSKI-Ferment) in der Tumor-Zelle abhängig sein könnte, denn der von uns verwandte Stamm WARBURG enthält nach (7) GDH im Verhältnis zu MDH wie 1 : 100, während der Stamm, an dem (7) die DPN-H-Bestimmungen durchführten, GDH : MDH = 1 : 3 enthielt. Da die DPN-H-Konzentration, wenn auch verhältnismäßig weniger als die DPN-Konzentration, in der Zelle bei Äthyleniminchinon-Behandlung absinkt, schließt diese Beobachtung zwei weitere mögliche Ursachen für die beobachtete Erniedrigung der stationären DPN-Konzentration aus:

1. ein stationäre erhöhter Prozentsatz an DPN-H;
2. eine Reaktion des DPN-H mit BAYER A 139 in der Zelle.

An einem Schema sei der Stoffwechsel des DPN, seine Synthese- und Abbauwege, soweit sie für das Verständnis unserer Versuche vonnöten sind, aufgezeichnet:

Abb. 12



DPN = Diphosphopyridinnucleotid; NS = Nicotinsäure;
 NSA = Nicotinsäureamid; MN = Mononucleotid;
 P = Orthophosphat; PP = Pyrophosphat.

Aus dem Schema ist ersichtlich, daß unter anderem ATP und NSA (42) für die DPN-Synthese notwendig sind. Die Fermente NMN-pyrophosphorylase (36), DPN-pyrophosphatase (35) und DPN-pyrophosphorylase (23) katalysieren die im Schema charakterisierten Reaktionen. Die DPN-nucleosidase (= DPN-ase) spaltet die glykosidische Bindung des Nikotinsäureamids mit der Ribose im DPN-Molekül hydrolytisch und ist durch NSA hemmbar (37, 21 u. 22).

Die Ergebnisse der Versuche, in denen Glykolyse und stationäre Konzentrationen von DPN und ATP in Ascites-tumor-Zellen bei Äthylenimin-Behandlung gemessen wurden, schließen ein Absinken der ATP-Konzentration als Ursache für die Erniedrigung der DPN-Konzentration aus. Die Veränderungen im Stoffwechsel der Tumor-Zelle treten in der Reihenfolge: 1. Absinken der DPN-Konzentration, 2. Hemmung der Glykolyse, 3. Abfall der ATP-Konzentration, auf.

Mit Nikotinsäureamid in geeigneten Konzentrationen ist es möglich, die Aktivität der DPN-ase vollständig zu hemmen (37, 22 u. 21). Es lag daher, nachdem die Schutzwirkung des NSA gegenüber der DPN-senkenden Wirkung der Äthylenimin-Verbindungen gefunden war (6, 7), nahe, zunächst die Wirkung von BAYER A 139 auf die DPN-ase in Extrakten aus Milz, Tumor-Zellen und in der Tumor-Zelle zu untersuchen. Eine signifikante Aktivierung der DPN-ase durch A 139, welche als Ursache für die Abnahme der DPN-Konzentration in Tumor-Zellen anzusprechen möglich wäre, konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchung weiterer Enzyme des DPN-Stoffwechsels ergab, daß sich DPN-pyrophosphorylase (= KORNBERG-Enzym) aus Schweineleber - dieses Ferment ist nur in sehr geringer Konzentration im Tumor vorhanden - und DPN- und DPN-H-pyrophosphatase aus Niere und Jensen-Sarkom der Ratte gegenüber A 139 Zusätzen im Test als indifferent erwiesen. Die Aktivitäten der Enzyme wurden für DPN-Spaltung gemessen.

In der vorliegenden Arbeit konnten demnach eine Reihe von Möglichkeiten für den die DPN-Konzentration senkenden Mechanismus von Äthylenimin-Verbindungen ausgeschlossen

werden. Durch Konzentrierung der Suche auf die wenigen, noch restlich bestehenden Möglichkeiten gelang es HOLZER, DUNTZE und FRANK (44) als Angriffspunkt der Äthylenimin-Verbindungen eine Alkylierung von NSA und damit dessen Fehlen für den DPN-Stoffwechsel wahrscheinlich zu machen.

Eine dritte Gruppe von Versuchen beschäftigte sich mit dem Zusammenhang zwischen DPN-senkendem Mechanismus und Glykolysehemmung einerseits und Heilwirkung der Äthylenimin-Verbindungen andererseits.

Die Untersuchung eines therapieresistenten (DRUCKREY (32)) Carcino-Sarkoms der Ratte ergab einen gegenüber anderen Tumoren um Stunden verzögerten Abfall der DPN-Konzentration, und auch die darauf beruhende Glykolysehemmung trat entsprechend spät auf. Diese Befunde sehen wir in Parallelität mit der Resistenz des Tumors gegenüber carcinostatischer Therapie (33).

In weiteren Versuchen zur Frage des Zusammenhanges zwischen Glykolysehemmung und Heilwirkung wurden Ascites-tumor-Zellen nach Manometrie der anaeroben Glykolyse mit und ohne A 139 und anschließender DPN-Bestimmung Mäusen reinoculiert. Die Zellen gingen, wie zu erwarten war, nach Inkubation ohne A 139, mit und ohne NSA wieder an, und die Tiere starben an dem sich entwickelnden Tumor. Mit A 139 inkubierte Zellen, deren Glykolyse gehemmt und deren stationäre DPN-Konzentration abgesunken war, gingen nicht an, und die Tiere überlebten um Monate. Dagegen gelang es nicht, mit NSA und A 139 inkubierte Zellen, deren Glykolyse und DPN-Konzentration unverändert waren, wieder zum Angehen zu bringen. Auch weitere intraperitoneale NSA-Gaben bewirkten kein Wiederangehen. Ferner gingen Zellen, die mit 1/10 der sonst üblichen A 139 Konzentration inkubiert wurden und deren Glykolyse und DPN-Konzentration noch nicht beeinträchtigt waren, nicht wieder an. Aus diesen orientierenden Versuchen ergeben sich folgende Fragen:

1. Mit welchen Konzentrationen von A 139 und NSA ist es möglich, den Schutzeffekt des NSA gegen die Wirkung des A 139 auf die DPN-Konzentration und die Glykolyse von Ascites-Zellen auch für die Wachstum-hemmende

Wirkung des A 139 zu zeigen, und ist das überhaupt möglich?

2. Kann man bei niedrigeren A 139 Konzentrationen bei genügend langer Manometrie doch ebenfalls eine Glykolysehemmung in vitro feststellen, und liegen die niedrigsten A 139 Konzentrationen, die die Glykolyse hemmen, noch über den A 139 Konzentrationen, die ein Wiederangehen der Tumor-Zellen bei Reinoculation verhindern?

Die Reinoculationsversuche dienten der Abgrenzung der Frage, wie weit die Parallelität zwischen unserem Modell - den in vitro Versuchen mit Ascitestumor-Zellen - und den Versuchen von HOLZER und KRÜGER am Ganztier geht. In diesen Versuchen fand man, daß Äthylenimin-Verbindungen die DPN-Konzentration im Tumor senken und die Tiere heilen; NSA hebt diese beiden Wirkungen auf (34).

Zum Abschluß sei bemerkt, daß es für alle Versuche den Wirkungsmechanismus carcinostatischer Verbindungen am Tier aufzuklären unwichtig ist, ob die untersuchte Substanz auch am Menschen carcinostatisch wirksam ist; es kommt nur darauf an, daß das Präparat als Therapeuticum am Tier Tumoren heilen kann. Wenn es gelänge den carcinostatischen Effekt am Tier in seinem Mechanismus aufzuklären, so bestünde auch die Möglichkeit durch vergleichende Betrachtung der Verhältnisse beim Menschen festzustellen, warum die Chemotherapie maligner Tumoren beim Menschen bis heute noch weitgehend versagt.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Verschiedene Äthylenimin-Verbindungen senken die DPN-Konzentration und hemmen die Glykolyse von Ascitestumor-Zellen ohne eine derartig markante Beeinflussung der Atmung. Bei Hefe-Zellen hatte A 139 keinen spezifischen Einfluß auf die DPN-Konzentration und die Glykolyse.
2. Nikotinsäureamid erhöht die DPN-Konzentration in Ascitestumor-Zellen und hebt die A 139 Wirkungen (DPN-Senkung und Glykolysehemmung) auf.
3. Eine direkte Reaktion zwischen Nikotinsäureamid und A 139, die das Lichtabsorptionsspektrum verändert, konnte nicht festgestellt werden.
4. DPN und A 139 reagieren bei Inkubation entweder sehr langsam oder gar nicht.
5. A 139 senkt die DPN-H Konzentration in Tumor-Zellen, jedoch weniger als die DPN-Konzentration.
6. Die Senkung der ATP-Konzentration in Tumor-Zellen durch A 139 ist eine Folge und nicht die Ursache des Absinkens der DPN-Konzentration.
7. A 139 bewirkt keine markante Aktivierung des Enzyms DPN-ase.
8. A 139 hat weiterhin keinen signifikanten Einfluß auf die Enzyme DPN-pyrophosphorylase, sowie DPN- und DPN-H-pyrophosphatase.
9. Der Therapieresistenz des DS-Tumors der Ratte gegen Carcinostatica geht eine Resistenz der DPN-Konzentration und der Glykolyse der Ascitesform des DS-Tumors im in vitro Versuch gegen A 139 parallel.
10. Mit A 139 inkubierte Ascitestumor-Zellen gehen bei Reinoculation im Gegensatz zur Kontrolle nicht wieder an.

LITERATURVERZEICHNIS.

- 1 WARBURG, O.: Über den Stoffwechsel der Tumoren, Springer 1926.
- 2 HOLZER, H., E.HOLZER u. G.SCHULTZ: Biochem.Z. 326, 385 (1955).
- 3 HOLZER, H., J.HAAN u. D.PETTE: Biochem.Z. 327, 195 (1955).
- 4 WARBURG, O.: Ideen zur Fermentchemie der Tumoren, Berlin Akademie Verlag 1947.
- 5 LUNDSGAARD, E.: Biochem.Z. 220, 8 (1930).
- 6 ROITT, M.: Biochem.J. 63, 300 (1956).
- 7 HOLZER, H., P.GLOGNER u. G.SEDLMAYR: Biochem.Z. 330, 59 (1958).
- 8 MEYERHOF, O.: Bull.Soc.Chim.biol. 20, 1033, 1345 (1938).
- 9 BEISENHERZ, G., H.J.BOLTZE, Th.BÜCHER, R.CZOK, K.H. GARBADE, E.MEYER-ARENDT u. G.PFLEIDERER: Z.Naturforsch. 8b, 555 (1953).
- 10 DRUCKREY, H. und Mitarbeiter: Arzneimittelforschung 6, 539 (1956).
- 11 D'ANS-LAX: Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Springer 1949.
- 12 Biochemica BOEHRINGER, Information, Januar 1957.
- 13 RACKER, E.: J. of Biol. Chem. 184, 313 (1949).
- 14 COLOWICK, S.P., N.O.KAPLAN a. M.M.CIOTTI: J. of Biol. Chem. 191, 447 (1951).
- 15 KAPLAN, N.O., S.P.COLOWICK a. C.C.BARNES: J. of Biol. Chem. 191, 461 (1951).
- 16 LOWRY, O.H., N.R.ROBERTS a. J.I.KAPPAHN: J. of Biol. Chem. 224, 1047 (1957).
- 17 KORTÜM, G. u. M.KORTÜM-SEILER:
 1. BAMANN-MYRBÄCK "Methoden der Fermentforschung", Bd.I, Seite 546 ff., Leipzig 1941;
 2. HOPPE-SEYLER/THIERFELDER "Handbuch", Bd.I, Seite 312 ff., Springer 1953.

- 18 KORNBERG, A. a. B.L.HORECKER: "Methods in Enzymology I", Seite 323 (Originalarbeit: A.KORNBERG, J. of Biol. Chem. 182, 805 (1950)).
- 19 HOLZER, H., St.GOLDSCHMIDT, W.LAMPRECHT u. E.HELMREICH: Hoppe-Seyler's Z. f. Physiol.Chem. 297, 1 (1954).
- 20 WITT, I.: Dissertation Universität Hamburg 1957.
- 21 ZATMAN, L.J., N.O.KAPLAN a. S.P.COLOWICK: J. of Biol. Chem. 200, 197 (1952).
- 22 KAPLAN, N.O., S.P.COLOWICK a. A.NASON: J. of Biol. Chem. 191, 473 (1951).
- 23 KORNBERG, A.: J. of Biol. Chem. 182, 779 (1949).
- 24 KORNBERG, A.: "Methods in Enzymology II", Seite 760 (1955).
- 25 WALLENFELS, K. u. W.DRABER: Angew.Chemie 70, 313 (1958).
- 26 GLOCK, G.E. a. P.McLEAN: Biochem. J. 65, 413 (1957).
- 27 HOLZER, H., H.KRÖGER u. P.SCRIBA und WALLENFELS, K. u. W.DRABER: Angew. Chemie 70, 439 (1958).
- 28 HOLZER, H.: 8.Mosbacher Colloquium d.Ges.f.Physiol. Chem., Seite 65, Springer 1958: Diskussionsbemerkung von K.WALLENFELS.
- 29 JEDEIKIN, L. a. S.WEINHOUSE: J. of Biol. Chem. 213, 271 (1955).
- 30 Methodenbuch zum Photometer Eppendorf.
- 31 MORTON, R.K.: Nature 181, 540 (1958); siehe auch BRANSTER, M.J. a. R.K.MORTON: Biochem. J. 63, 640 (1956).
- 32 DRUCKREY, H.: Arzneimittelforschung 6, 539-50 (1956).
- 33 SCRIBA, P., H.KRÖGER u. H.HOLZER: IV.Internationaler Biochemie-Kongress, 1.-6.Sept. Wien 1958, Section 14, 9, Autoreferat in International Abstracts of Biological Sciences, 1958.
- 34 HOLZER, H. u. H.KRÖGER: KliWo 36, 677 (1958) (siehe auch HOLZER, H. u. H.KRÖGER: Biochem. Z. 330, 579 (1958)).

- 35 KORNBERG, A. a. W.E.PRIGER: J. of Biol. Chem. 182, 763 (1950).
- 36 PREISS, J. a. P.HANDLER: J. of Biol. Chem. 225, 759 (1957).
- 37 HANDLER, P. a. J.R.KLEIN: J. of Biol. Chem. 143, 49 (1942).
- 38 HOLZER, H., G.SEDIMAYR u. A.KEMNITZ: Biochem. Z. 328, 163 (1956).
- 39 GAUSS, W. u. PETERSEN, S.: Angew. Chemie 69, 252 (1957).
- 40 BAYER: Therapeutische Berichte 9, 245 (1957).
- 41 Persönliche Mitteilung von W.CHRISTIAN an H.HOLZER.
- 42 BONSIGNORE, A. u. C.RICCI: Scientia Medica Italica VI, 698 (1958).
- 43 KAPLAN, N.O., et.al.: J. of Biol. Chem. 219, 287 (1956).
- 44 HOLZER, H., W.DUNTZE u. S.FRANK: Angew.Chemie 70, 746 (1958).
- 45 SCRIBA, P.: Klin.Woschr. 37, 678 (1959).

LEBENS LAUF.

Am 19. August 1935 wurde ich als erstes Kind des damaligen Assistenten am Pathologischen Institut des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf, Dr.med. Karl S c r i b a und seiner Ehefrau Editha, geb. Lueg in Hamburg geboren. Von 1941 bis 1946 besuchte ich die Grundschule und von 1946 bis Ostern 1954 war ich Schüler der Gelehrtenschule des Johanneums zu Hamburg. Die fünf vorklinischen Semester des Medizinstudiums und, nach Bestehen der ärztlichen Vorprüfung im August 1956, noch ein klinisches Semester verbrachte ich in Hamburg. Seit dem Sommersemester 1957 studierte ich in Freiburg im Breisgau, wo ich im Sommer 1959 mein Studium mit dem medizinischen Staatsexamen abschloß.