

[A 898, 21]

Abb. 21. Glycerin 1-P + $\frac{1}{2}$ O₂ → Dihydroxyaceton-P + H₂O in Lebermitochondrien in Gegenwart von ADP (1,5 mM) und P (4 mM). Differenzspektren im stationären Zustand (0–3 Min) nach Substratzugabe und anaerob (15 min nach Zugabe)⁸⁸⁾. Die Atmung mit endogenem Substrat wurde mit Amytal (Isoamyl-äthyl-barbiturat) (2 mM) blockiert. Vergleichslösung und Meßlösung unterscheiden sich durch den Substratzusatz, die beiden Kurven durch den Zeitpunkt der Registrierung. Die Bande der Pyridinnucleotide fehlt, da diese unter Amytal bereits in der Vergleichslösung reduziert ist.

der Abb. 21 demonstrieren, wie Glycerin 1-P mit der Atmungskette der Lebermitochondrien reagiert. Im stationären Zustand erscheint nur die Bande des Cytochrom b. Nach Verbrauch des Sauerstoffs werden die Komponenten der Atmungskette durch Glycerin 1-P völlig reduziert. Die Absorptionsbande der Pyridin-nucleotide ist im Differenzspektrum nicht sichtbar, da diese durch die Anwesenheit von Amytal in der Meß- und Vergleichsküvette von endogenem Substrat in gleicher Weise reduziert sind. Der Versuch, die Atmungsgröße der Lebermitochondrien auf das Frischgewicht des Gewebes zu beziehen, wie wir ihn in

Tab. 7 durchgeführt haben, begegnet der Schwierigkeit, daß der Cytochrom c-Gehalt, auf den wir die Atmungsgröße der Mitochondrien beziehen, für das ganze Gewebe wegen der Interferenz des Haemoglobins nicht sicher gemessen werden kann. Die Daten in den letzten Spalten der Tabelle sind daher nur in der Größenordnung zu werten. Der Glycerin 1-P-Gehalt der Leber läßt auf einen Spiegel von mindestens der gleichen Höhe schließen, wie er in den Atmungsversuchen mit Mitochondrien angewendet wurde. Ziehen wir den Vergleich zwischen der Leber und den Flugmuskeln, dann ergibt sich, daß die Relation zwischen mitochondrialer Glycerin 1-P-Atmung und Gesamtatmung im Lebergewebe etwa halb so hoch ist wie im Flugmuskel. Sie entspricht sich also in der Größenordnung, während die Relationen der absoluten Atmungsgrößen der verschiedenen Substrate auf qualitativ wesentlich unterschiedliche Verhältnisse hindeuten.

Eingegangen am 18. August 1958 [A 898]

Berichtigung

Im Aufsatz „Reaktionen des Schwefels mit araliphatischen sowie aliphatischen Verbindungen“ von R. Wegler, E. Kühle und Werner Schäfer, diese Ztschr. 70, 351 [1958], muß es auf Seite 362, linke Spalte, Zeile 18 heißen: „... und führen in sehr guten Ausbeuten zu Malonsäure-dithioamiden (Ruhrchemie AG., Erf. H. Feichtinger, DAS. 1003212 vom 22. 1. 1955).“ und in Zeile 41: „... Umsetzung von N-(ε-Chlor-n-ämyl)-benzoesäureamid mit Schwefel und Ammoniumpolysulfid (Ruhrchemie AG., Erf. H. Feichtinger und H. Tummes, DBP.-Anm. R 8460 vom 1. 3. 1952)“.

Werner Schäfer [A 897]

Zuschriften

Zum Mechanismus der Wirkung von Röntgenstrahlen auf Krebszellen

Von Prof. Dr. H. HOLZER und Dr. S. FRANK

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Freiburg/Brsq.

Vor kurzem zeigten O. Warburg und Mitarbeiter¹⁾, daß die Hemmung der Glykolyse von Ascitestumorzellen durch Röntgenstrahlen quantitativ durch Einwirkung des entstehenden Wasserstoffperoxyds auf die Krebszellen zu erklären ist. Da H. Maass und Mitarbeiter²⁾ fanden, daß Röntgenstrahlen die stationäre DPN-Konzentration in Ascitestumorzellen erniedrigen, lag die Vermutung nahe, daß das durch Röntgenstrahlen entstehende H₂O₂ die DPN-Senkung bewirke und so die Glykolyse hemme.

Tabelle 1 zeigt, daß H₂O₂-Konzentrationen, wie sie nach der Einwirkung von Röntgenstrahlen auf in Manometrie-Gefäßen suspendierte Asciteszellen gefunden wurden¹⁾, die Glykolyse stark hemmen und die DPN-Konzentration in den Zellen auf etwa $\frac{1}{6}$ des Kontrollwertes senken. Der Aufstau von Triosephosphat und

	Glykolyse (mm ³ CO ₂ /h/mm ³ - Zellen)	DPN in μM/mm ³ Zellen × 10 ⁴	TP	FDP
Kontrolle	2,2	3,1	5,8	7,2
+ Nicotinsäureamid	1,6	3,0	—	—
+ H ₂ O ₂	0,3	0,5	9,1	21,6
+ Nicotinsäureamid + H ₂ O ₂	1,4	2,1	—	—

Tabelle 1. Glykolyse, Diphosphopyridinnucleotid (DPN)-, Triosephosphat (TP = Dihydroxy-acetonphosphat + Phosphoglycerinaldehyd)- und Fructose-diphosphat (FDP)-Konzentrationen nach 60 min. Inkubation von Ascitestumorzellen unter anaeroben Bedingungen (Gasraum 100% CO₂; p_H = 6,0) in Glucose-haltiger Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung. Die Bedingungen der Manometrie und die Analysenmethoden sind bei ³⁾ beschrieben. Endkonzentration an H₂O₂ 5,6 × 10⁻⁵ Mole/l und an Nicotinsäureamid 1,6 · 10⁻³ Mole/l

Fructosediphosphat in den mit H₂O₂ behandelten Zellen zeigt, daß das abgesunkene DPN eine Hemmung der Triosephosphat-Dehydrierung bewirkt und so die Glykolyse hemmt. Es liegt demnach ein völlig gleichartiger Eingriff des H₂O₂ (und damit der Röntgenstrahlen) in den Kohlenhydratstoffwechsel der Ascitestumorzellen vor, wie wir ihn für carcinostatisch wirksame Äthylenimin-Verbindungen und N-Lost-Derivate beschrieben haben^{3, 4)}. Der gleichartige Wirkungsmechanismus von Röntgenstrahlen und Carcinostatica wird noch dadurch unterstrichen, daß in beiden Fällen die Glykolyse-Hemmung durch Zusatz von Nicotinsäureamid aufgehoben werden kann (Tabelle 1), da diese Substanz dem Absinken des DPN-Spiegels durch Förderung der DPN-Synthese und Hemmung des DPN-Abbaues entgegenwirkt. Bei den carcinostatischen Äthylenimin- und N-Lost-Verbindungen verhindert Nicotinsäureamid das Absinken der DPN-Konzentration und bewirkt so ein Ausbleiben der Heilung Jensen-Sarkom tragender Ratten⁴⁾; man könnte deshalb auf Grund der gleichartigen Wirkung von Carcinostatica und Röntgenstrahlen eine Strahlenschutz-wirkung des Nicotinsäureamids verstehen.

Die Versuche der Tab. 1 sprechen für eine Glykolyse-Hemmung durch Erniedrigung des DPN-Spiegels. Da das Enzym Triosephosphat-Dehydrogenase sehr empfindlich gegen H₂O₂ ist⁵⁾, wäre

	Glykolyse mm ³ CO ₂ je h je mm ³ Zellen	In % der Kontrolle	Aktivität d. Tri- osephosphat- Dehydrogenase in % d. Kontrolle
Kontrolle	2,1	100 %	100 %
+ H ₂ O ₂ (7,9 × 10 ⁻⁵ Mole/l)	0,55	26 %	63 %
+ Jodessigsäure (2,5 × 10 ⁻⁵ Mole/l)	0,26	12 %	<5 %

Tabelle 2. Aktivität von Triosephosphat-Dehydrogenase in Asciteszellen nach Hemmung der Glykolyse mit H₂O₂ bzw. Jodessigsäure. Inkubationsbedingungen wie bei Tabelle 1. Die Methode zur Bestimmung der Triosephosphat-Dehydrogenase-Aktivität ist bei ³⁾ angegeben

auch an eine Hemmung der Triosephosphat-Dehydrierung durch Inaktivierung des Enzymproteins zu denken gewesen. Die in Tab. 2 dargestellten Versuche demonstrieren jedoch, daß die H_2O_2 -Konzentrationen bei intakten Zellen eine nur geringfügige Hemmung der Triosephosphat-Dehydrogenase-Aktivität bewirken, die nicht zur Erklärung der Glykolyse-Hemmung ausreicht. Wiederum besteht völlige Analogie zu den carcinostatisch wirksamen Äthylimin-Verbindungen, die zwar in vitro Triosephosphat-Dehydrogenase hemmen⁶⁾, jedoch in vivo die Enzymaktivität nur wenig beeinflussen und die Glykolyse-Hemmung durch Senkung des DPN-Spiegels bewirken⁷⁾. Im Gegensatz dazu üben Glykolyse-Hemmstoffe wie Jodessigsäure auf die DPN-Konzentration keinen Einfluß aus und hemmen die Glykolyse durch Inaktivierung des Enzyms Triosephosphat-Dehydrogenase³⁾ (s. Tab. 2).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß H_2O_2 ein Absinken der DPN-Konzentration in Ascitestumorzellen verursacht und dadurch die Triosephosphat-Dehydrierung und damit die Glykolyse hemmt. Bei Zusatz von Nicotinsäureamid bleiben diese Wirkungen des H_2O_2 aus. Eingegangen am 29. August 1958 [Z 667]

¹⁾ O. Warburg, W. Schröder, H. Gewitz u. W. Völker, *Naturwissenschaften* 45, 192 [1958]; vgl. diese Ztschr. 70, 324 [1958]. — ²⁾ H. Maass u. G. H. Rathgen, *Strahlentherapie* 103, 668 [1957]. — ³⁾ H. Holzer, P. Glogner u. G. Sedlmayr, *Biochem. Z.* 330, 59 [1958]. — ⁴⁾ H. Holzer u. H. Kröger, *Klin. Wschr.* 36, 677 [1958]. — ⁵⁾ G. Beisenherz, H. J. Bollte, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfeleiderer, *Z. Naturforsch.* 8b, 555 [1953]. — ⁶⁾ H. Holzer, *Die Medizinische* 1956, 576. — ⁷⁾ I. M. Roitt, *Biochem. J.* 63, 300 [1956].

N-Oxyde der Adenosin-phosphate

Von Dr. F. CRAMER und Dr. K. RANDERATH

Chemisches Institut der Universität Heidelberg

Nach G. B. Brown¹⁾ kann man Adenin und Adenosin mit Hydrogenperoxyd in Eisessig in die entsprechenden 1-N-Oxyde überführen. Diese Reaktion gelingt auch in schwach saurer, wäßriger Lösung (p_H 4) und kann dann auf Adenosin-5'-monophosphat (AMP), -diphosphat (ADP) und -triphosphat (ATP) übertragen werden. Man erhält so unter schonenden Bedingungen und in guten Ausbeuten AMP-1-N-oxyd (λ_{max} 232 m μ , R_f 0,37²⁾), ADP-1-N-oxyd (λ_{max} 232 m μ , R_f 0,12) und ATP-1-N-oxyd (λ_{max} 233 m μ , R_f 0,04). Wir prüfen gegenwärtig, ob der Nucleotid-Rest des ADP-N-oxydes durch Polynucleotid-Phosphorylase³⁾ in Polynucleotide eingebaut wird.

ADP-1-N-oxyd: 200 mg ADP- Na_3 werden in 10 ccm Wasser gelöst und je 1 ccm 2n Essigsäure und 30proz. Hydrogenperoxyd hinzugefügt. Die Lösung wird mit etwas Na-acetat auf p_H 4 gepuffert und 4 Tage bei 20 °C belassen. Dann wird in der üblichen Weise wie auf ADP aufgearbeitet und das ADP-N-oxyd isoliert.

Eingegangen am 11. August 1958 [Z 662]

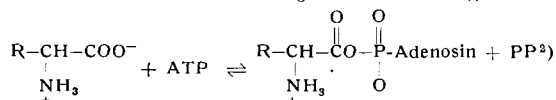
¹⁾ M. A. Stevens, D. I. Magrath, H. W. Smith u. G. B. Brown, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 2755 [1958]; M. A. Stevens u. G. B. Brown, *ebenda* 80, 2759 [1958]. — ²⁾ R_f -Werte in Isopropanol(60)-1proz. wäßr. Ammonsulfat(40), aufsteigend. — ³⁾ M. Grunberg-Manago, P. J. Ortiz u. S. Ochoa, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] 20, 269 [1956].

Synthese von Aminosäure-Adenylsäure-Anhydriden*)

Von Dr. R. LAMBERT, Ass. Prof. Dr. F. ZILLIKEN und Prof. Dr. S. GURIN

Department of Biochemistry, University of Pennsylvania, Philadelphia/USA

Gemischte Anhydride von α -Aminosäuren und 5'-Mononucleotiden, die als erste Stufe in der biologischen Aktivierung von Aminosäuren wahrscheinlich gemacht wurden¹⁾, sind bisher



in geringer Ausbeute und wechselndem Reinheitsgrade aus den α -Aminosäurechloriden und dem Disilbersalz des AMP²⁾ oder aus den freien Aminosäuren und Adenylsäure mit Hilfe des Khoranaschen Reagens dargestellt worden³⁾. Die Synthese von α -Leucyladenylat aus α -Acidoisocaprolyladenylat ist kürzlich angedeutet⁴⁾ und daraufhin beschrieben⁵⁾ worden. Eine jüngst erschienene Mitteilung über die Synthese dieser energiereichen Anhydride aus den Carboxy-Verbindungen⁷⁾ veranlaßt uns, schon jetzt über unsere Ergebnisse zu berichten.

Die N-Cbz-Aminosäuren wurden in wässrigem Pyridin mit Khoranaschem Reagens mit einem 5'-Mononucleotid bei 0 °C zur Reaktion gebracht. Die so erhaltenen Cbz-aminosäure-adenylate

ließen sich in saurer Lösung bei 0 °C mit dem von R. Kuhn⁸⁾ für die Halbhydrierung von N-substituierten Aminosäure-nitrilen vorgeschlagenen Katalysator glatt und unter Erhaltung der Anhydrid-Bindung in die Monochlorhydrate der freien Aminosäure-adenylate verwandeln. Das in 90proz. Reinheit anfallende Hydrierungsprodukt enthält, offenbar durch Eigenzerfall, wenig AMP und Aminosäure. Zur chemischen Charakterisierung dienten die nachfolgenden Kriterien: 1. Kathodische Wanderung bei p_H 1,9, Stillstand bei p_H 6,8 im Elektropherogramm. In neutraler Lösung trotz starker Kühlung rascher Zerfall. 2. Mit Hydroxylamin spontane Bildung von Hydroxamsäuren. 3. Unveränderte Amino-Gruppe in 6-Stellung des Purin-Anteils an Hand des UV-Spektrums. 4. Periodatverbrauch (1 mol JO_4^- /1 mol Adenylat) zwecks Ausschluß weiterer Substitution im Riboseanteil. 5. Gesamtposphor-Bestimmungen.

347 mg AMP (1 mMol) und 2,51 g N-Cbz-D,L-Valin (10 mMol) werden in 4,0 ccm Pyridin und 1,2 ccm Wasser gelöst, auf 0 °C gekühlt und unter beständigem Rühren mit einer auf 0 °C vorgekühlten Lösung von 1,03 g (5 mMol) N-N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 3 ccm Pyridin versetzt. Nach 45 min wird mit Eiswasser auf 25 ccm verdünnt und nach weiteren 5 min der N,N'-Dicyclohexylharnstoff rasch in der Kälte abgesaugt. Das klare Filtrat wird fünfmal mit dem doppelten Volumen Äther bei 0 °C extrahiert. Die gegen Ende der Extraktion leicht trübe, wässrige Phase wird sodann der Gefrier-trocknung unterworfen. Ausbeute: 531 mg (91 % d.Th.) eines farblosen, amorphen Pulvers, welches frei von Cbz-Aminosäuren ist, aber noch etwa 2,5 % AMP und eine geringe Menge des symmetrischen Dinucleotides der Adenylsäure enthält. Das Cbz-aminosäure-adenylat wandert im Elektropherogramm bei p_H 6,8 zur Anode, etwa halb soweit wie AMP unter gleichen Bedingungen.

300 mg frisches Palladium-oxyd-hydrat/Bariumsulfat werden in 5 ccm 50proz. Äthanol für 40 min bei Zimmertemperatur vorhydriert. Alsdann werden 150 mg N-Cbz-D,L-Valin-Adenylat in 10 ccm 50proz. Äthanol und 0,6 ccm konz. Salzsäure gelöst. Die Lösung wird zum vorhydrierten Katalysator gegeben, auf 0 °C gekühlt und bei Normaldruck 10–15 min unter Schütteln hydriert. Nach Abzentrifugieren des Katalysators in der Kälte wird das Adenylat mit dem zehnfachen Volumen kalten Acetons ausgefällt, aus 10 ccm kaltem 50proz. Äthanol mit Aceton umgefällt, mit abs. Äther gewaschen und über P_2O_5 bei 0,1 Torr bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausbeute: 92 mg (73 % d.Th.); P gefunden 6,41 %, berechnet 6,28 %. Periodat-Verbrauch: 0,92 Mol, berechnet: 1,0 Mol. Das UV-Spektrum war identisch mit demjenigen des AMP (λ_{max} 257 m μ , p_H 1,0 und λ_{max} 259 m μ , p_H 11). Das Präparat enthält etwas weniger als 3,3 % freies AMP. Die Hydroxamsäure-Bildung betrug 0,92 mMol per mMol Valin-Adenylat. Die Substanz enthält 7,60 % Cl, berechnet für das Monochlorhydrat 7,39 %.

Ebenso wurden die Cbz-Aminosäure-Adenylate sowie die freien Aminosäure-Adenylate des Glycins, des D-Valins und der nachfolgenden D,L-Aminosäuren dargestellt: Alanin, Phenylalanin, Tryptophan, Leucin, Lysin und Asparagin. An Abweichungen sind erwähnenswert: kürzere Reaktionszeit (25 min) zur Darstellung von Cbz-Alanin-Adenylat, -Lysin-Adenylat und -Tryptophan-Adenylat und ein Lösungsmittelverhältnis von Pyridin:Wasser = 6:1,2 pro mMol AMP. Cbz-Tryptophan wurde in Tetrahydrofuran/Wasser (2:3) hydriert. Im Falle des D-Valin-Adenylates haben wir uns vergewissert, daß im Laufe der Synthese keine Racemisierung eingetreten ist. $[\alpha]_D = -22,0^\circ$ ($c = 2,5$; 20 °C HCl).

Eingegangen am 22. Juli 1958 [Z 655]

*) Kurze Originalmitteilung, die anderwärts nicht mehr veröffentlicht wird. — Die Untersuchungen wurden ausgeführt mit Mitteln der National Science Foundation. — ¹⁾ M. B. Hoagland, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] 16, 288 [1955]. — ²⁾ Abkürzungen: ATP = 5'-Adenosin-triphosphat; AMP = 5'-Adenosin-monophosphat; PP = Pyrophosphat; Cbz = Carbobenzoxy. — ³⁾ J. A. De Moss, S. M. Genuit u. G. D. Novelli, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 42, 325 [1956]. — ⁴⁾ P. Berg, *Fed. Proc.* 16, 152 [1957]. — ⁵⁾ Th. Wieland, diese Ztschr. 70, 81 [1958]. — ⁶⁾ Th. Wieland, F. Jaenicke, H. Merz u. M. Ossario, *Liebigs Ann. Chem.* 613, 95 [1958]. — ⁷⁾ M. A. Karasek, P. Castelfranco u. A. Meister, *Fed. Proc.* 17, 996 [1958]; P. Castelfranco, K. Moldave u. A. Meister, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 2335 [1958]. — ⁸⁾ R. Kuhn u. H. J. Haas, diese Ztschr. 67, 785 [1955].

Reaktionen des Pyrimidins

Von Prof. Dr. H. BREDERECK, Dr. R. GOMPPER und Dipl.-Chem. H. HERLINGER

Institut für Organische Chemie und Organisch-chemische Technologie der T. H. Stuttgart

Acetale des Malondialdehyds (z. B. 1-Methoxy-1.3.3-triäthoxypropan) geben mit Formamid in guter Ausbeute Pyrimidin¹⁾. Wir konnten aus dieser Reaktion durch Anwendung heterogener Katalyse ein kontinuierliches Verfahren entwickeln.

Pyrimidin addiert bereits bei Raumtemperatur Phenylmagnesiumbromid in 3.4-Stellung. Anschließend Hydrolyse und Oxydation (mit $KMnO_4$) liefert 4-Phenylpyrimidin. Noch leichter (bei –20 bis –30 °C) werden lithium-organische Verbindungen addiert, z. B.:

