

TABLE II

THE INCORPORATION INTO RAT-LIVER MICROSONES OF ^{14}C FROM LABELED DAB, MAB, AND ANILINE

Labeled compound	Specific activity (counts/min/mg protein)	
	Unincubated flasks	20 min incubation
[2':3':5':6'- $^{14}\text{C}_4$] DAB	0	11
[2':3':5':6'- $^{14}\text{C}_4$] MAB	0	20
[2:3:5:6- $^{14}\text{C}_4$] Aniline	3	40

Each flask contained the microsomes from 240 mg of normal adult rat liver, 3 μmoles TPNH, and 0.25 μmole of labeled compound ($4.6 \cdot 10^5$ counts/min/flask). Other flask additions and treatments were those described by HULTIN⁵.

acid solution⁴ unequivocally demonstrate the enzymic formation of protein-bound dye by rat liver preparations.

H. V. GELBOIN*

J. A. MILLER

E. C. MILLER

McArdle Memorial Laboratory for Cancer Research, Medical School,
University of Wisconsin, Madison, Wis. (U.S.A.)

¹ E. C. MILLER AND J. A. MILLER, *Cancer Research*, 7 (1947) 468.

² E. C. MILLER AND J. A. MILLER, *J. Natl. Cancer Inst.*, 15 (1955) 1571.

³ A. H. CONNEY, E. C. MILLER AND J. A. MILLER, *Cancer Research*, 16 (1956) 450.

⁴ J. A. MILLER, R. W. SAPP AND E. C. MILLER, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 3458.

⁵ T. HULTIN, *Exptl. Cell Research*, 13 (1957) 47.

⁶ G. C. MUELLER AND J. A. MILLER, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 1125.

⁷ C. MITOMA, H. S. POSNER, H. C. REITZ AND S. UDENFRIEND, *Arch. Biochem. Biophys.*, 61 (1956) 431.

⁸ J. BOOTH AND E. BOYLAND, *Biochem. J.*, 66 (1957) 73.

⁹ J. C. MACDONALD, J. A. MILLER AND E. C. MILLER, *Proc. Am. Assoc. Cancer Research*, 1 (1953) 35.

Received November 13th, 1957

* Public Health Research Fellow of the National Cancer Institute.

Beeinflussung der Tumorglykolyse durch Mitochondrien verschiedenem Ursprungs

Bei der Untersuchung von Stoffwechselvorgängen an Embryonen unter anaeroben Bedingungen zogen wir zum Vergleich auch den Ehrlich-Ascitestumor der Maus heran. Dieser Tumor hat wie andere Tumoren nach WARBURG u. Mit.¹ eine grosse aerobe und anaerobe Glykolyse. Embryonen bilden dagegen nur unter anaeroben Bedingungen grössere Mengen Milchsäure^{2,3}.

In weiteren Versuchen wurde die Glykolyse verschiedener Zellfraktionen aus Ascitestumor, 3½ Tage alten Hühnerembryonen und Mäuseleber gemessen. Nach dem Homogenisieren der Gewebe im Potter-Elvehjem-Homogenisator mit isotoner Saccharoselösung wurden durch fraktionsiertes Zentrifugieren aus dem Homogenat die Mitochondrien und nach dem Abzentrifugieren aller Strukturbestandteile die Überstände gewonnen. Die Ausbeute an Mitochondrien war bei den einzelnen Geweben verschieden. Bei Leber war sie etwa 4× grösser als beim Ascitestumor und bei Hühnerembryonen. — Die Fraktionen wurden einzeln oder in verschiedenen Kombinationen für die Untersuchung verwendet. Die Versuchsansätze enthielten vom Tumorüberstand die ursprünglich in 100 mg intakter Zellen enthaltene Menge (= 0.1 g-Äquivalent), von den Mitochondrien die in 100–600 mg enthaltene Menge (= 0.1–0.6 g-Äquivalente)*. Außerdem wurden $3 \cdot 10^{-3} M$ MgCl_2 , $1 \cdot 10^{-3} M$ ATP**, $0.6-1.0 \cdot 10^{-3} M$ DPN**, $2 \cdot 10^{-3} M$ Phosphat, $0.5 \cdot 10^{-4}-1.0 \cdot 10^{-2} M$ Nicotinsäureamid, $2.5 \cdot 10^{-2} M$ KHCO_3 (für Atmungsversuche KCl) zugefügt und die Lösung durch Zugabe von Saccharose isoton gemacht. Die Versuche wurden unter aeroben Bedingungen ausgeführt. (Gasraum 5% CO_2 /Luft). Das Substrat war entweder Glucose ($1 \cdot 10^{-2} M$) oder K-Hexosediphosphat ($1 \cdot 10^{-2} M$). Gesamtvolume 2.2 ml.

Bei allen Versuchen wurden die Druckänderungen im Warburg-Apparat gemessen und die Reaktion dann durch Kühlen abgestoppt. Nach Abzentrifugieren der Mitochondrien und Ent-

* 0.1 g-Äquivalent = Menge an Überstand bzw. an Mitochondrien enthalten in 100 mg intakter Zellen.

** ATP = Adenosintriphosphat; DPN = Diphosphopyridinnucleotid; ADH = Alkohol-dehydrogenase.

TABELLE I

EINFLUSS VON MITOCHONDRIEN VERSCHIEDENEN URSPRUNGS
AUF DIE GLYKOLYSE DES TUMORÜBERSTANDESAngabe von Überstand und Mitochondrien in g Äquivalenten. Temperatur 37°. 5% CO₂/Luft.

	Tumor- Überstand o.r. —	—	Überstand o.r. Tumor-Mit. o.3	Überstand o.r. Tumor-Mit. o.4	Überstand o.r. Tumor-Mit. o.6	Überstand o.r. Leber-Mit. o.1	Überstand o.r. Embryonen-Mit. o.4	Überstand o.r. Leber-Mit. o.3
Druckänderung								
h (20')	+ 46	+ 25	+ 113	+ 146	+ 54	+ 61	+ 3	
Milchsäure (35') γ	143	12	843	1100	207	398	11	
Anorgan. P (γ)	60	200	8	12	89	63	229	
Säurelabil. P (γ)	138	7	167	146	130	127	32	

eiweissen mit Trichloressigsäure oder nach Enteiweissen der Gesamtansätze wurden das anorganische Phosphat, das säurelabil Phosphat, DPN nach der ADH**-Methode, sowie die gebildete Milchsäure nach Summerson und Barker bestimmt.

Versuche, bei welchen Glucose das Substrat war, führten zu folgenden Ergebnissen. (Tabelle I enthält ein Versuchsbeispiel.) (1) Der aus Ascitestumor gewonnene Überstand bildete allein nur wenig Milchsäure. Mitochondrien allein produzierten praktisch keine Milchsäure. (2) Nach Zugabe von Tumormitochondrien zum Überstand wurde die Glykolyse sehr erheblich gesteigert. Mit Erhöhung der Mitochondrienmenge nahm die Glykolyse unter unseren Bedingungen weiter zu. (3) Mitochondrien aus Hühnerembryonen und aus Mäuseleber steigerten die Glykolyse des Überstandes weniger. (4) Nach Zugabe grösserer Mengen Lebermitochondrien war die Milchsäurebildung wesentlich geringer als im Überstand allein. (5) 5' auf 90° erhitze Tumormitochondrien waren wirkungslos.

Mitochondrien aus Leber-Gewebe in grösseren Mengen zugefügt, verhielten sich also im Hinblick auf die Milchsäurebildung des Überstandes umgekehrt wie Tumormitochondrien.

Die aus Tabelle I ersichtlichen Verschiebungen innerhalb der Phosphatfraktionen sind nicht die Ursache, sondern wahrscheinlich eine Folge des unterschiedlichen Verhaltens der Mitochondrien aus normalem und malignem Gewebe. Wurden Versuchsansätze zuerst mit Lebermitochondrien incubiert, diese abzentrifugiert und dann Tumormitochondrien zugefügt, so trat sofort die für Tumormitochondrien charakteristische Steigerung der Glykolyse ein.

Die Diphosphopyridinucleotid-Analysen bei den einzelnen Versuchsansätzen ergaben keine grösseren Unterschiede.

Bei weiteren, unter aeroben Bedingungen durchgeführten Versuchsreihen setzten wir statt Glukose K-Hexosediphosphat als Substrat zu. Die Milchsäurebildung wurde dann durch Tumormitochondrien und durch Lebermitochondrien stark gesteigert, während bei Verwendung von Glukose nur der Zusatz von Tumormitochondrien zu einer starken Erhöhung der Milchsäurebildung geführt hatte.

LE PAGE UND SCHNEIDER⁴ untersuchten die Glykolyse verschiedener Fraktionen von normalem und Tumorgewebe unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Hexosediphosphat und Fluorid. Sie fanden, dass bei Zugabe von Mitochondrien und Mikrosomen zum Überstand die Milchsäurebildung zunahm. Nach Abschluss unserer Versuche kamen uns Experimente von GRAFFI⁵ zur Kenntnis, der fand, dass Tumormitochondrien, Tumormikrosomen und Myeloblastosevirus die Glykolyse des hochtourig abzentrifugierten Überstandes steigern.

Herrn Professor Dr. H. LANGENDORFF und Herrn Doz. Dr. R. KOCH danken wir bestens für die Überlassung des Tumormaterials.

Die Versuche wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft ausgeführt.

Heiligenberg-Institut, Abt. O. Mangold, Heiligenberg, Bodensee (Deutschland)

H. TIEDEMANN
J. BORN

¹ O. WARBURG UND E. HIEPLER, *Z. Naturforsch.*, 76 (1952) 193.

² O. WARBURG, *Klin. Wochschr.*, 5 (1926) 796.

³ H. TIEDEMANN UND H. TIEDEMANN, *Z. Naturforsch.*, 11b (1956) 666.

⁴ G. A. LE PAGE UND W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 1021.

⁵ A. GRAFFI, *Berlin. Med.*, 7 (1956) 418.