

enzyme of brain, normal liver and liver of rats which had been injected with triiodothyronine (2.5 mg/kg body weight) for 3 consecutive days prior to sacrifice in order to increase the level of this enzyme, are identical. The same two-band pattern was also obtained after 2M urea treatment of  $\alpha$ -GPDH obtained from mitochondria of the following tissues: mouse liver, rat kidney, spleen, and testis and also Hepatoma 5123A.

The effects of urea on the enzyme do not appear to be time dependent since the same two-band pattern was obtained after 2 min of exposure of the enzyme to 2M urea as after an exposure of 48 h. The pattern also did not change when the concentration of urea was varied from 1-5M although considerable decrease in activity was noted in both the spectrophotometric assays (Figure 3) and in visual estimation of the formazan formed in the

gels. Both bands, however, appeared to be inhibited to the same extent. Removal of urea from the enzyme by dialysis against 0.03M phosphate buffer, pH 7.5, leads to a reversion of two-band pattern to the basic one-band pattern. Addition of urea again causes a two-band pattern, and the cycle can be repeated, indicating the reversible nature of the dissociation.

The results with  $\alpha$ -GPDH presented in this paper may be of more general interest since the same method can in all probability, be applied to electrophoretic investigations of other large proteins or protein complexes. Preliminary results in fact indicate that succinic dehydrogenase activity solubilized from rat liver mitochondria by action of snake venom can be resolved into 3 active bands on 2.5% gels<sup>14</sup>.

**Zusammenfassung.** Es wird ein Verfahren zur elektrophoretischen Trennung am Polyacrylamid der an die Mitochondrien gebundene  $\alpha$ -L-Glyzeraldehydphosphat-Dehydrogenase in 2 aktive Bestandteile beschrieben: Partielle Spaltung der Eiweißmoleküle mit Harnstoff. Die Auflösung der Enzyme in 2 aktive Komponenten wurde mit Extrakten aus Mitochondrien verschiedener Rattenorgane (Leber, Niere, Hirn, Hoden und Hepatoma 5123 A) sowie Mäuseleber verfolgt.

E. S. FIALA

Laboratory of Cell Physiology, Veterans Administration Hospital, San Fernando, and Department of Biochemistry, University of Southern California, Los Angeles (California 91342, USA), 27th January 1967.

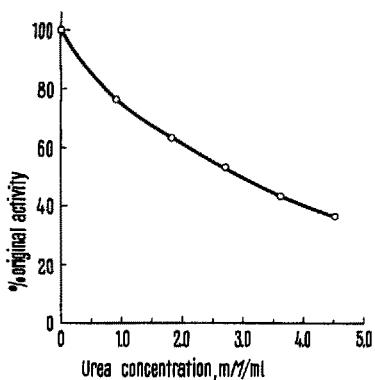


Fig. 3. Inhibition of rat liver mitochondrial  $\alpha$ -GPDH by urea. Spectrophotometric assays in a total volume of 1 ml were performed according to LEE and LARDY<sup>5</sup>.

<sup>14</sup> The author is grateful to Mr. B. DIXON for excellent technical assistance.

### Über die Stabilitätskonstanten von Pyrimidinderivaten mit Kupfer

Über die biologische Wirkung von Halogenpyrimidinen ist viel gearbeitet worden. Die meisten Untersuchungen befassten sich mit chemotherapeutischen Wirkungen bei Carcinomen<sup>1</sup> und ihren Anwendungen als Radiosensibilisatoren.

5-Fluoruracil erwies sich von den genannten Verbindungen zur Anwendung bei festen menschlichen Tumoren in Verbindung mit Bestrahlung am wirkungsvollsten<sup>2</sup>. Über den Einbau von Halogenpyrimidinen in Nucleinsäuren und deren mutagene Wirkung wurde verschiedentlich berichtet<sup>3</sup>. Auch als Inhibitoren bei enzymatischen Reaktionen können sie zielgerichtet eingesetzt werden<sup>4</sup>. Der vergrößerte van-der-Waals-Radius der Halogene im Vergleich zur Methylgruppe am Pyrimidin verursacht keine sterische Hinderung in der Doppelhelix<sup>5</sup>. Halogendeoxyuridin kann an Stelle von Thymidin in DNS eingebaut werden, z.B. auch in Tumorzellen, wie OEHLLERT zeigte<sup>6</sup>. Es zeigt sich sogar, dass sich die Bindungsstärke der DNS-Doppelhelix erhöht, wie sich durch thermische Denaturierungsversuche an DNS mit eingebautem Bromodeoxyuridin herausstellte<sup>7</sup>.

5-Fluoruracil kann aber auch durch seinen Einbau in die m-RNS zu veränderten Proteinen und damit auch zu Enzymen mit geringerer oder keiner biologischen Aktivität führen. Die Anwendung neuer empfindlicher Methoden zum Nachweis dieser Substanzen in subzellulären Partikeln und Makromolekülen<sup>8</sup> brachten neue Gesichtspunkte über ihren Wirkungsmechanismus her-

<sup>1</sup> G. H. HITCHINGS, *Antimetabolites and Cancer* (Ed. C. P. RHOADS; A.A.S. Washington, D.C. 1955) p. 231.

<sup>2</sup> A. R. CURREN, J. ANSFIELD, F. A. McIVER, H. A. WAISMAN und C. HEIDELBERGER, *Cancer Res.* 18, 478 (1958).

<sup>3</sup> F. HUTCHINSON, *Biochim. biophys. Acta* 97, 527 (1964).

<sup>4</sup> F. HUTCHINSON, *Biochim. biophys. Acta* 97, 527 (1964); S. L. COMMERFORD, *Nature* 206, 949 (1965).

<sup>5</sup> B. ROSEN, *J. molec. Biol.* 11, 845 (1965).

<sup>6</sup> W. H. PRUSOFF, *Cancer Res.* 23, 1246 (1963).

<sup>7</sup> W. OEHLLERT und B. MAGNUSSON, *Z. Krebsforschung* 66, 455 (1965).

<sup>8</sup> S. KIT und T. C. RSU, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 5, 120 (1961).

<sup>9</sup> H. ALTMANN, *J. Radiat. Biol.* 10, 294 (1966).

vor<sup>9</sup>. Bei unseren Untersuchungen über die Metallionengehalte in neoplasmatischen Geweben<sup>10</sup> war es von Interesse, die relativen Stabilitätskonstanten von Uracilderivaten mit Cu-Ionen zu bestimmen. Zur Bestimmung der relativen Bindungsstärken verwendeten wir die Kationenaustauschermethode in Anlehnung an SCHUBERT und FRONAEUS<sup>11,12</sup>.

Verschiedene Mengen des Komplexbildners, in unserem Fall des Halogenpyrimidins, wurden in 50 ml 0,2 molaren Ammoniumformiatpuffer gelöst. Diese Lösungen füllten wir in Schütteltrichter, in denen sich 5 g Dowex W 50 Kationenaustauscherharz befand. Das Harz war mit NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionen beladen. Hierzu wurde eine 10<sup>-5</sup> molare Lösung von Cu<sup>64</sup>-acetat hinzugefügt. Der pH-Wert wurde bei allen Versuchen auf 7 gehalten, ebenso blieben Metallionenmenge und Ionenstärke immer gleich. Das Komplex-Austauschergemisch wurde 2 h geschüttelt, so dass sich ein Gleichgewicht einstellen konnte. Hiernach wurde die flüssige Phase von der festen getrennt und die Radioaktivität beider Phasen gemessen. Auf diese Weise erhielt man zwei Verteilungsgrößen  $l$  und  $l_0$ , wobei  $l$  das Verhältnis der Metallionenkonzentration im Harz zu der in der flüssigen Phase darstellt, multipliziert mit einem Faktor  $v$ , der das Verhältnis zwischen Volumen der Flüssigkeit (in ml) zu der Menge Harz (in g) angibt.

$$l = \frac{\text{Aktivität (Harz)}}{\text{Aktivität flüssig}} \cdot v.$$

Die Verteilungsgröße  $l_0$  erhält man, wenn Komplexbildnerkonzentration  $c_k = 0$  ist. Die Bruttostabilitätskonstante  $K_s$  ergibt sich dann zu

$$K_s = \frac{l_0/l - 1}{c_k}.$$

Eine ausführlichere Berechnung findet man bei<sup>13</sup>.

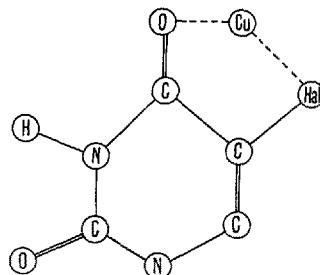
Wir erhielten folgende Ergebnisse:

Komplexbildner	$K_s$ Mol <sup>-1</sup>
5-J-Uracil	320 ± 48
5-Br-Uracil	448 ± 65
5-F-Uracil	637 ± 97

Die angewandte Methode hat den Nachteil, dass durch die geringe Menge Cu<sup>64</sup> bei der Trennung von flüssiger und fester Phase ein grösserer Fehler auftritt, der vorläufig auch durch sorgfältiges Arbeiten nicht gedrückt

werden kann. Daher betrachten wir die erhaltenen Ergebnisse als Aussage für das Verhältnis der Bindungsstärken der Halogenpyrimidine mit Cu untereinander.

Auf Grund der positiven Ladung des Kupfers ist die Anlagerung des Ions an die negativen Gruppen des Halogenpyrimidins wahrscheinlich, das heisst, dass sich das Cu-Ion zwischen dem O an der C6-Stelle und dem Halogen befindet:



Unsere Ergebnisse spiegeln nun die Tatsache wider, dass das Ansteigen der Elektronegativität vom Jod zum Fluor eine Erhöhung der Bindungsstärke zwischen dem Kupferion und dem Halogenpyrimidin mit sich bringt, womit aber wiederum ein Hinweis für die Beschaffenheit des Moleküls erhalten wird.

*Summary.* The complex-stability of certain halogenpyrimidines with copper is discussed in connection with their significance as inhibitors of enzymatic reactions in cancer-tissues.

L. KAMINSKI und H. ALTMANN

*Institut für Biologie und Landwirtschaft,  
Reaktorzentrum Seibersdorf (Österreich),  
12. Dezember 1966.*

<sup>9</sup> H. ALTMANN, Österr. Studienges. für Atomenergie, Institut für Biologie u. Landwirtschaft 16, (1965).

<sup>10</sup> H. FRISCHAUF, H. ALTMANN und G. STEHLIK, Proc. Congr. Europ. Soc. Haemat. Lisbon (S. Karger, Basel 1963).

<sup>11</sup> J. SCHUBERT und J. RICHTER, J. Am. chem. Soc. 70, 4259 (1948).

<sup>12</sup> S. FRONAEUS, Acta chem. scand. 5, 859 (1951).

<sup>13</sup> L. KAMINSKI, Dissertation (1966).

## CONGRESSUS

### Czechoslovakia

#### The 21st International Congress of Pure and Applied Chemistry

Prague (Czechoslovakia), 4th–10th September 1967

Three topical subjects have been selected which will be dealt with in three sections: (1) Automation in Analytical

Chemistry; (2) Toxicological Chemistry; (3) Chemistry of Nucleic Acid Components.

The second circular of the Congress with full information may be requested from the Organizing Committee of the XXIst International Congress of Pure and Applied Chemistry, P.O.B. 139, Praha 6-Dejvice (Czechoslovakia).

Applications by participants who intend to present papers must be received by 1st March 1967, for the other participants by 31st May 1967.