

10 days and 18 days of incubation. The values for the K_m are about 1.0 mM phenylphosphate in the absence and presence of EDTA. The constancy of the K_m values for activity with phenylphosphate and β -glycerophosphate during growth and regression in the presence or absence of EDTA lends no support to the idea that these 2 substrates are hydrolyzed by 2 different enzymes.

The effect of β -glycerophosphate on the hydrolysis of phenylphosphate was also studied in order to determine if the hydrolyses of these 2 substrates are independent reactions or dependent reactions in some way. If the same enzyme molecule hydrolyzes 2 different substrates, the activity towards one substrate may be inhibited by the presence of the other. It is possible, then, to determine this inhibition by application of the Michaelis-Menten equation and the Lineweaver-Burk plotting method (DIXON and WEBB⁸). Fig. 2 indicates that the enzymatic liberation of phenol from phenylphosphate is competitively inhibited by β -glycerophosphate during growth (12 days of incubation). This was also observed at 17 days of incubation which is during mesonephric regression. The interpretation of these data is that the inhibitor (β -glycerophosphate) and the substrate (phenylphosphate) are competing for the same site on the same enzyme molecule.

Thus, from the above studies, it seems reasonable to assume that acid phenylphosphatase and acid β -glycero-

phosphatase activities are associated with the same enzyme molecule in homogenates of growing and regressing mesonephroi in chick embryos⁹.

Résumé. L'activité de la phosphatase acide envers le β -glycérophosphate et le phénylphosphate a été comparée sous des conditions variées afin de constater si ces deux actions reflètent celle de molécules enzymatiques paires ou différentes pendant la croissance et la régression du mésonéphros chez l'embryon de poulet. Pour élucider cette question, on a étudié les effets de la température au pH 5, et du versène, et l'influence d'un substratum sur l'hydrolyse. Les résultats de ces recherches indiquent que la même enzyme pourrait être responsable de l'hydrolyse de ces 2 substrats.

VIRGINIA BROADDUS PATEL¹⁰

Biology Department, Washington University, St. Louis (Missouri USA), 13th April 1967.

⁸ M. DIXON and E. C. WEBB, *Enzymes*, 2nd edn (Academic Press Inc., New York 1964).

⁹ The author wishes to thank Dr. FLORENCE MOOG for her guidance during the research.

¹⁰ Present address: Department of Biology, State University of New York at Buffalo, Buffalo (New York, USA).

Der Einfluss von 2-Deoxy-D-glucose auf die Substratoxydation in Ascites-Tumorzellen

Deoxyglucose hemmt das Wachstum und die Glykolyse¹ von Tumorzellen. Versuche mit Ascites-Carcinomzellen ergaben, dass Deoxyglucose in Anwesenheit hoher Glucosekonzentrationen die Milchsäurebildung partiell hemmt, die der Glykolyse folgende, über den Zitronensäure-Zyklus verlaufende Oxydation des Glucose-Kohlenstoffes hingegen stimuliert^{2,3}. Die folgenden Experimente wurden mit der Absicht durchgeführt, einen Einblick in den Mechanismus zu erhalten, der bedingt, dass Glucose als oxydatives Substrat bevorzugt wird. Es wurde untersucht, in welcher Weise Deoxyglucose in Anwesenheit hoher Glucosekonzentrationen die Oxydation ¹⁴C-markierter Substrate des Zitronensäure-Zyklus beeinflusst.

Experimentelles. Die Versuche wurden in der gleichen Weise durchgeführt, wie sie an anderer Stelle beschrieben wurde³.

Resultate und Diskussion. Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss Deoxyglucose in Anwesenheit von Glucose auf die Oxydation von (2-¹⁴C)- und (3-¹⁴C)-Pyruvat hat. Glucose setzt, wie bekannt und wie auch aus Tabelle I zu ersehen ist, als kompetitives Substrat die Oxydation von exogenem Pyruvat herab. Sie hemmt auch die O₂-Aufnahme der Tumorzellen^{4,5}. Wenn von jenen Werten ausgegangen wird, die bei Anwesenheit von Glucose und Pyruvat vorliegen, so zeigt sich, dass Deoxyglucose die Oxydation von Pyruvat C-2 und C-3 verhältnismässig mehr als die O₂-Aufnahme steigert. Deoxyglucose beeinflusst also die Oxydation von Pyruvat in gleichem Sinne wie die Oxydation von Glucose C-6 (ref. ³) (Tabelle IV).

Es wurde in Betracht gezogen, dass Deoxyglucose durch Einflussnahme auf das NAD-abhängige Redoxsystem auf die Regulation der Substratoxydation einwirkt. Daher

wurde untersucht, in welcher Weise Deoxyglucose die Oxydation des Succinats beeinflusst, eines Substrates, dessen Redoxreaktion im Zitronensäure-Zyklus an das Flavoprotein gekoppelt ist. Die Ergebnisse der Tabelle II zeigen, dass die Oxydation des Succinats C-1,4 zu CO₂ durch Deoxyglucose nicht stimuliert wird.

Tabelle I. Der Einfluss von Deoxyglucose auf die Pyruvatoxydation in Anwesenheit von Glucose

Zusätze	O ₂ -Aufnahme (μ Mole) ^a	μ Atome Pyruvat zu CO ₂ ^a C-2	C-3
Keine	15.6	2.63	1.96
Glucose	11.0	0.81	0.62
Glucose + Deoxyglucose	11.7 (+ 6%)	1.17 (+ 45%)	0.96 (+ 55%)

Pro Ansatz wurden 10⁸ Ehrlich-Lettré-Ascites-Tumorzellen der Maus in Ca²⁺-freiem Krebs-Ringer-Puffer (30 mM Phosphat, pH 7.4) im Warburg-Apparat inkubiert. Gasphase, Luft, Temperatur 37°C. Endvolumen, 3 ml. Die Reaktion wurde durch Zukippen einer Lösung, welche die Substrate und die Deoxyglucose enthielt, gestartet und durch Zugabe von Säure beendet. Alle Ansätze enthielten 10 mM Pyruvat. Endkonzentration der übrigen Zusätze: 10 mM D-Glucose, 15 mM 2-Deoxy-D-glucose. ^a In Klammer: Änderung gegen die glucosehaltigen Ansätze.

¹ G. E. WOODWARD und F. B. CRAMER, J. Franklin Inst. 254, 259 (1952).

² E. CHRISTENSEN, J. L. BROOKS, C. J. STEWART und A. N. WICK, Biochem. biophys. Res. Commun. 5, 209 (1961).

³ G. SAUERMAN, Z. Krebsforsch. 69, 44 (1967).

⁴ H. G. CRABTREE, Biochem. J. 23, 536 (1929).

⁵ B. CHANCE und B. HESS, J. biol. Chem. 234, 2421 (1959).

Experimente, die in Abwesenheit von Glucose durchgeführt worden waren, hatten ergeben, dass Deoxyglucose die Oxydation von exogenem Palmitat stark hemmt⁶ (Tabelle III). Nun wurde untersucht, wie Deoxyglucose die Palmitinsäureoxydation beeinflusst, wenn Glucose zugegen ist. Die Ergebnisse der Tabelle III zeigen, dass unter dieser Bedingung die Oxydation von Palmitinsäure C-1 zu CO₂ durch Deoxyglucose stimuliert wird. Bei Vergleich der vorliegenden Werte, die mit (1-¹⁴C)-Palmitinsäure erhalten wurden, mit den Daten, die mit (6-¹⁴C)-Glucose erhalten worden waren³, fiel auf, dass Deoxyglucose die Oxydation von Palmitat C-1 um einen geringeren Prozentsatz als die Oxydation von Glucose C-6 erhöht. Dies zeigen auch die Resultate des in Tabelle IV angeführten Versuches, in dem alle Ansätze Glucose und

Tabelle II. Der Einfluss von Deoxyglucose auf die Succinatoxydation

Zusätze	O ₂ -Aufnahme (μMole)	μAtome Succinat C-1,4 zu CO ₂
Keine	16.1	2.35
Deoxyglucose	9.6	2.40
Glucose	10.0	3.8
Glucose + Deoxyglucose	11.2	3.6

Bedingungen wie in Tabelle I. Alle Ansätze enthielten 20 mM Succinat. Endkonzentration der Zusätze: 15 mM 2-Deoxy-D-glucose, 10 mM D-Glucose.

Tabelle III. Der Einfluss von Deoxyglucose auf die Palmitatoxydation

Zusätze	O ₂ -Aufnahme (μMole) ^a	nmAtome Palmitat C-1 zu CO ₂ ^a
Keine	14.0	196
Deoxyglucose	4.8	14
Glucose	7.2	39
Glucose + Deoxyglucose	7.8 (+ 8%)	53 (+ 36%)

Bedingungen wie in Tabelle I. Die Palmitinsäure wurde als Komplex mit dialysiertem Placenta-Serum zugesetzt (1 ml/Ansatz). Alle Ansätze enthielten 0.28 mM Palmitat. Endkonzentration der Zusätze: 15 mM 2-Deoxy-D-glucose, 15 mM D-Glucose. ^a In Klammer: Änderung gegen die glucosehaltigen Ansätze.

Tabelle IV. Vergleich des Einflusses von Deoxyglucose auf die Oxydation von Glucose und von Palmitat

Zusätze	O ₂ -Aufnahme (μMole) ^a	Glucoseoxydation nmAtome Glucose C-6 zu CO ₂ ^a	Palmitatoxydation nmAtome Palmitat C-1 zu CO ₂ ^a
Keine	7.8	190	41
Deoxyglucose	9.1 (+ 17%)	330 (+ 74%)	55 (+ 34%)

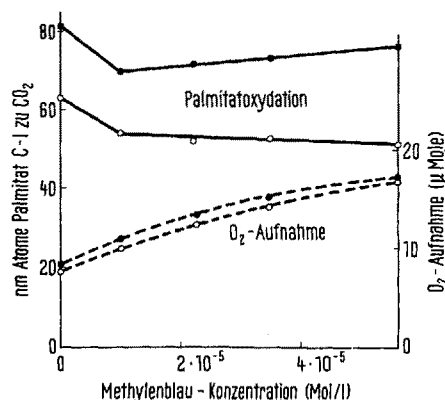
Bedingungen wie in Tabelle I. Die Palmitinsäure wurde als Komplex mit Rinder-Serum-Albumin zugegeben. Endkonzentration des Albumins: 1%. Alle Ansätze enthielten 10 mM D-Glucose, 0.28 mM Palmitat. Endkonzentration der 2-Deoxy-D-glucose: 15 mM. ^a In Klammer: Änderung gegen die Kontrolle.

Palmitinsäure enthielten. In der einen Hälfte der Ansätze war die Glucose, in der anderen Hälfte die Palmitinsäure markiert.

Versuche mit ¹⁴C-markierter Glucose hatten ergeben, dass Deoxyglucose die Oxydation von Glucose C-6 zu CO₂ auch dann noch zusätzlich stimuliert, wenn die Oxydation von Glucose C-6 bereits durch den Elektronenakzeptor Methylenblau erhöht ist⁸. Die Figur zeigt, dass Methylenblau in Anwesenheit von Glucose und Palmitinsäure die O₂-Aufnahme, nicht jedoch die Palmitinsäureoxydation, steigert. Die Oxydation von Palmitinsäure C-1 zu CO₂ wird jedoch, ähnlich wie die Oxydation von Glucose C-6, durch zusätzliche Vorgabe von Deoxyglucose stimuliert.

Es fällt auf, dass die Palmitinsäureoxydation in Abwesenheit von Glucose durch Deoxyglucose gehemmt wird, in Anwesenheit von Glucose hingegen stimuliert wird. Ursache der Hemmung der Palmitinsäureoxydation dürfte sein, dass ATP bevorzugt für die Phosphorylierung der Deoxyglucose in der Hexokinase-Reaktion⁷ verwendet wird. ATP dürfte in Abwesenheit von Glucose für die Aktivierung der Oxydation der exogenen langkettigen Fettsäure mangeln. Die Beobachtung, dass in Abwesenheit von Glucose der intrazelluläre ATP-Spiegel durch Deoxyglucose stark gesenkt wird^{8,9}, zeigt, in welchem Ausmass Deoxyglucose das ATP-System beeinflusst.

In Anwesenheit von Glucose hingegen wird zur Phosphorylierung der Deoxyglucose weniger ATP verbraucht. Da Glucose und Deoxyglucose kompetitive Substrate für die Hexokinase sind⁷, sinkt die Umsatzrate der Deoxyglucose-Phosphorylierung¹⁰. Dazu kommt, dass in Anwesenheit von Glucose auch auf glykolytischem Wege ATP gebildet wird. Die Aktivierung der Oxydation des exogenen Palmitats dürfte also nicht mehr durch ATP-Mangel beeinträchtigt sein, wenn neben Deoxyglucose auch Glucose anwesend ist. Unter dieser Bedingung wird, wie die Versuche zeigen, die Palmitinsäureoxydation, ähnlich wie die Oxydation von Glucose und von Pyruvat, durch Deoxyglucose stimuliert.



Der Einfluss von Deoxyglucose auf die Palmitatoxydation in Anwesenheit von Glucose und Methylenblau. Bedingungen wie in Tabelle I und Tabelle III. Alle Ansätze enthielten 0.28 mM Palmitinsäure und 10 mM D-Glucose. Endkonzentration der 2-Deoxy-D-glucose: 15 mM. o—o ohne Deoxyglucose, ●—● mit Deoxyglucose.

⁶ G. SAUERMANN, Archs Biochem. Biophys. 104, 208 (1964).

⁷ G. E. WOODWARD und M. T. HUDSON, J. Franklin Inst. 259, 543 (1955).

⁸ K. H. IBSEN, E. L. COE und R. W. MCKEE, Cancer Res. 22, 182 (1962).

⁹ N. V. YELTSINA und N. A. VERESOTSKAYA, 8th Int. Cancer Congr. Moscow 1962, abstracts of papers p. 103.

¹⁰ K. LETNANSKY, Biochem. Z. 341, 74 (1964).

Summary. The effect of the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose on the oxidation of ^{14}C -labelled substrates of the tricarboxylic acid cycle was investigated in ascites carcinoma cells of the mouse. In the presence of high concentrations of glucose, deoxyglucose stimulates the oxidation of pyruvate C-2 and C-3 to CO_2 , but not the oxidation of succinate C-1,4 to CO_2 . While deoxyglucose causes, in the absence of glucose, an inhibition of the oxidation of exogenous palmitate C-1 to CO_2 , it causes,

in the presence of glucose, a stimulation of the palmitate oxidation. There is a possible correlation between the effect of deoxyglucose on the intracellular ATP metabolism and the effect of deoxyglucose on the palmitate oxidation.

G. SAUERMAN

*Institut für Krebsforschung der Universität Wien,
Wien 9 (A-1090 Österreich), 3. April 1967.*

A New Method for the Determination of α -Amylase

The significance of serum amylase as a diagnostic indicator of pancreatic and other diseases has prompted the development of numerous techniques for the determination of this enzyme during the past 40 years. The methodology which includes viscosimetric, turbidimetric and saccharogenic procedures and assays based on the starch-iodine reaction has been reviewed recently by SEARCY, WILDING and BERK¹.

In this communication we report a new method for the determination of α -amylase which we believe to be superior in simplicity and specificity to those published to date. It is based on the use of a starch substrate labeled covalently with Remazolbrilliant Blue R (RBB)² as represented in Figure 1.

Both soluble and insoluble starches can be labeled by the following procedure³. Potato or corn starch (50 g) is suspended in 500 ml of water and stirred vigorously at 50°C. A solution of 5.0 g of Remazolbrilliant Blue R in 500 ml of water is added to the suspension. During the following 45 min, 100 g of sodium sulfate is added in several portions. The reaction mixture is then treated with a solution of 5.0 g of trisodium phosphate in 50 ml of water and stirring at 50°C is continued for a further 75 min. The mixture is centrifuged and the supernatant discarded. The dark blue RBB-starch is resuspended in water and again centrifuged. Washing in this manner is continued until the supernatant is completely colorless. The product is now rinsed twice with methanol and dried in a vacuum desiccator over phosphorus pentoxide. If a soluble starch is used in the labeling process the final reaction mixture is subjected to exhaustive dialysis against tap water in order to remove excess dye, salts, and other low molecular products.

The new amylase assay is illustrated by the following procedure. A suspension of RBB-starch (2%) in 4.5 ml of 0.02M sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.05M sodium chloride is placed in a 15 ml wide-mouth vial with a plastic closure. A solution (0.5 ml) of porcine pancreatic α -amylase⁴ containing 0-1200 Somogyi units/100 ml is added to the suspension and the vial is

stoppered and placed in a Dubnoff shaker at 37°C. After shaking for 15 min, enzyme action is terminated by addition of 2 ml of dilute acetic acid, reducing the pH to 4. The mixture is filtered and the filtrate assayed colorimetrically at 595 nm against a blank prepared similarly but with omission of α -amylase. Figure 2 summarizes the results obtained with serial dilutions of α -amylase ranging from 0-1200 Somogyi units/100 ml. A near-linear relationship between enzyme concentration and optical density readings exists within a concentration range of 0-250 Somogyi units/100 ml, covering the values encountered in normal sera.

Development of a micromethod and clinical-chemical evaluation of the new technique are in progress. Automated procedures using RBB-starch in conjunction with dialysis are also under investigation⁵.

Zusammenfassung. Es wird eine einfache und empfindliche Methode zur Bestimmung der α -Amylase mit Hilfe eines durch Remazolbrilliantblau R kovalent markierten Stärkesubstrates beschrieben. Die Bestimmung der Enzymwirkung erfolgt durch colorimetrische Messung der Spaltprodukte nach Entfernung des überschüssigen Substrates.

H. RINDERKNECHT, P. WILDING
and B. J. HAVERBACK

*University of Southern California, School of Medicine,
Los Angeles (California 90033, USA), 2nd May 1967.*

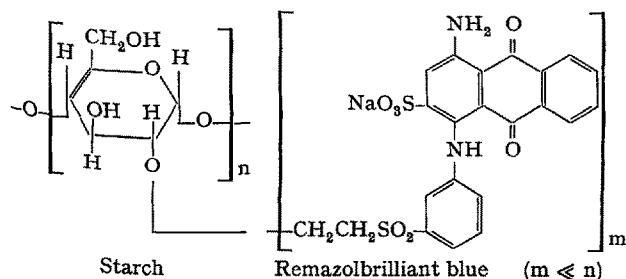


Fig. 1.

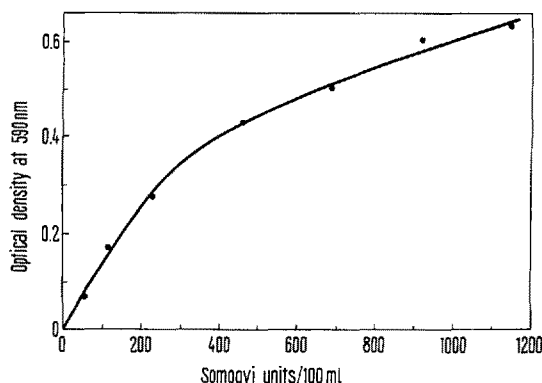


Fig. 2. Colorimetric determination of α -amylase with RBB-starch.

¹ R. L. SEARCY, P. WILDING and J. E. BERK, *Clinica chim. Acta* 15, 189 (1967).

² Remazolbrilliant blue R was a gift from Farbwerke Hoechst A.G., Frankfurt (M)-Hoechst.

³ O. A. STAMM, *Helv. chim. Acta* 46, 3008 (1963).

⁴ Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N.J.

⁵ This work was supported by USPH grants No. AM 04683-07 and AM 08293-04.