

Über die Wirkung von 7,12-Dimethylbenz(a)-anthrazen auf die Synthese der Lactatdehydrogenase-Isoenzyme in menschlichen Fibroblasten

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob dem «multistage»-Prozess der Kanzerogenese auch bei der Induktion des Krebses durch ein bestimmtes Agens eine Vielfalt von Stoffwechseländerungen entspricht, haben wir einige Regulationssysteme der Zelle näher untersucht. Zunächst wurde an menschlichen Fibroblasten in Gewebekultur der Einfluss der kanzerogenen Substanz 7,12-Dimethylbenz(a)anthrazen (DMBA) auf die Lactatdehydrogenase(LDH)-Isoenzyme geprüft. Die Aktivität dieses Enzyms wird im Blut familiär tumorbelasteter Familien oft erhöht gefunden¹ und auch die Verteilung der Isoenzyme zeigt deutliche Abweichungen von der Norm². Ausserdem wird die LDH-Isoenzymaktivität präoperativ für die Beurteilung der Bösartigkeit eines Tumors herangezogen³.

Material und Methode. Als Zellmaterial dienten menschliche Fibroblasten, die als «monolayer» in Kulturflaschen aus G 20-Glas kultiviert wurden. Die Temperatur betrug 37°C, die Adaptationsdauer 72 h in der Nährlösung (Parker M 199 + 10% «human cord serum»), die Inkubationsdauer 24 h, wobei aber für die Versuche anstelle der serumhaltigen Nährlösung eine Salzlösung verwendet wurde (0,9% NaCl, 0,02% KCl, 0,02% CaCl₂). Im Hauptversuch gelangten 60 Flaschen mit je 3,25 Mill. Zellen in 10 ml Salzlösung und einer Konzentration von 0,1 µg/ml DMBA zum Einsatz (30 Flaschen Kontrolle, 30 Flaschen mit DMBA). Als markierte Aminosäure zur Bestimmung der Einbaurate in die Proteine wurde ein Chlorella-Protein-Hydrolysat der Firma «The Radiochemical Centre, Amersham» verwendet, das durch Ionenaustausch und Papierchromatographie gereinigt und kristallisiert worden war, und eine spezifische Aktivität von 54 mC/mAtom C aufwies. Der Aminosäurepuls erfolgte 20 h nachdem die Kulturen auf Salzlösung umgesetzt waren bzw. nach Zugabe von DMBA. Die Dauer des Pulses war 20 min; pro Flasche wurden 5 µC Aminosäuregemisch zugesetzt. Nach Beendigung des Versuches wurden die Zellen mechanisch von den Flaschenböden gelöst. Anschliessend wurden die Zellen mit gleichem Volumen 0,028-m-Tris-HCl-Puffer versetzt (pH 7,5) und in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator unter Eiskühlung 5 min homogenisiert. Nach dem Ultrazentrifugieren (1 h bei 100 000 × g) wurden von dem Überstand je 5 µl auf ein Polyacrylamidröhrchen zur Elektrophorese nach ORNSTEIN⁴ gebracht. Die Anfärbung der LDH-Isoenzymbande geschah mittels Nitrobluetetrazolium, wobei N-methylphenazoniummethosulfat als Elektronenakzeptor diente, NAD als Koenzym und das Na-Salz der Milchsäure als Substrat zugesetzt wurde. Von je einem Gel der Kontrolle und der Versuchsgruppe wurden die LDH-Isoenzymbande mit einem scharfen Skalpell herausgeschnitten, je eine Bande mit 30% H₂O₂ versetzt, wobei das Gel farblos wurde. Anschliessend wurde mit dem Szintillatormischung (4 g/l PPO, 0,1 g/l POPOP und 10 ml/l Hyamin in Toluol) versetzt und in einem Packard Tricarb-Flüssigkeitsszintillationsspektrometer die ¹⁴C-Aktivität gemessen.

Für die Enzymaktivitätsmessung wurde das ungefärbte Gelröhrchen in eine temperierte Küvettenhalterung gegeben, die mit einem Lauda-Ultrathermostaten verbunden war, mit den oben angeführten Substratgemischen inkubiert und auf einem Joice-Löbl-Chromoscan-Densitometer in einem zeitlichen Abstand von je 2 min der Aktivitätsanstieg aufgezeichnet.

Ergebnisse und Diskussion. Die Auswertung der LDH-Isoenzyme mittels der Acrylamidgelelektrophorese, Den-

sitometrie und Messung der Radioaktivität sind in den Figuren und in der Tabelle dargelegt.

Gegenüber der Kontrolle fand sich in den für 20 h mit DMBA behandelten Fibroblasten eine Verminderung der Enzymaktivität in der am weitesten gewanderten Fraktion, während in den beiden anderen dargestellten Fraktionen keine sicheren Aktivitätsunterschiede nachweisbar waren. Man hat allerdings den Eindruck, dass auch in der ersten Fraktion ein geringes Absinken der im Chromoscan registrierten Höhe zu beobachten ist. Obwohl bei der Messung der Radioaktivität in den Isoenzymbanden auch andere Proteinsynthesen mitgemessen werden, zeigten die Radioaktivitätswerte doch den gleichen Trend wie die Enzymaktivitätswerte, nämlich die stärkste Aktivitätsverminderung in der dritten Fraktion, eine etwas geringere in der ersten und keine signifikante Veränderung in der mittleren.

In der uns zugänglichen Literatur finden sich wohl eine Reihe von Arbeiten mit dem Kanzerogen DMBA in seiner Wirkung auf Gewebekulturen⁵⁻⁷, nicht aber solche in Zusammenhang mit Isoenzymbestimmungen. Von HIAI⁸ wurde nachgewiesen, dass DMBA an Nukleinsäuren gebunden wird. Seine Untersuchungen zeigten, dass konstant 0,6 M DMBA je M DNS (= 20 000 Nukleotide) eingebaut werden. Es war nicht möglich, durch Erhöhung der Konzentration eine grössere Einbaurate von DMBA zu erzielen. Dies spricht dafür, dass der Einbau an einer spezifischen Stelle eines Gens stattfindet. Dabei steht noch nicht fest, ob das DMBA-Molekül selbst für die Wirkung verantwortlich ist, oder ob dies ein metabolisiertes DMBA-Derivat ist. Solche Produkte sind meist phe-

Radioaktivität der Proteine innerhalb der LDH-Isoenzymbande aus der Gelelektrophorese (Proteinsynthese, Mittelwerte aus drei Versuchen).

Fraktion-Nr.	Radioaktivität in in Impulsen/min	% der LDH- Gesamt- radioaktivität
a) Kontrolle		
1	183 ± 21	34
2	128 ± 17	23
3	231 ± 24	43
b) DMBA-behandelt		
1	58 ± 12	26
2	103 ± 14	45
3	67 ± 14	29

¹ R. D. GOLDMAN, N. O. KAPLAN and T. C. HALL, *Cancer Res.* 24, 389 (1964).

² D. M. DAWSON, T. L. GOODFRIEND and N. O. KAPLAN, *Science* 143, 929 (1964).

³ K. WIDY-KIERSKA and I. ROSZKOWSKI, *Obstet. Gynecol.* 31, 243 (1968).

⁴ L. ORNSTEIN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321 (1964).

⁵ L. J. ALFRED, *Nature* 214, 732 (1967).

⁶ L. DIAMOND, V. DEFENDI and P. BROOKES, *Cancer Res.* 27, 890 (1967).

⁷ S. F. DACHI, J. SANDERS and E. URIS, *Cancer Res.* 27, 1183 (1967).

⁸ S. HIAI, *J. molec. Biol.* 11, 672 (1965).

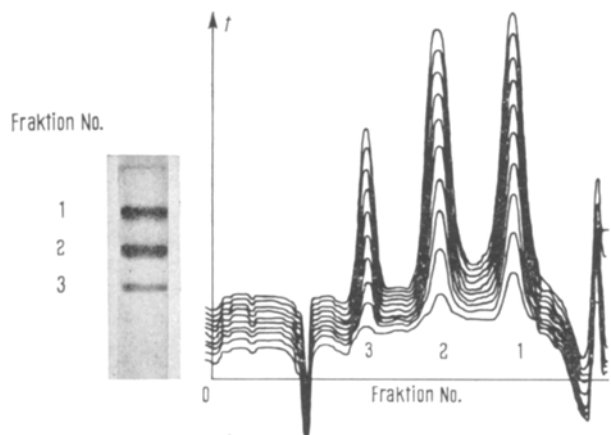


Fig. 1. LDH-Isoenzyme aus menschlichen Fibroblasten (Kontrolle). Acrylamidgelelektrophorese Densitometrie

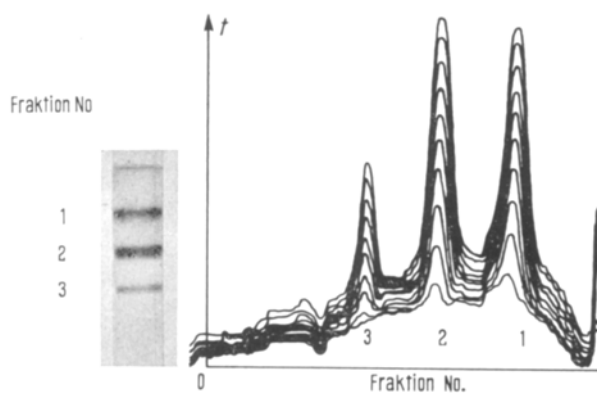


Fig. 2. LDH-Isoenzyme aus menschlichen Fibroblasten (DMBA-behandelt, 0,1 µg/ml). Acrylamidgelelektrophorese Densitometrie

nolischer oder chinoider Natur; in ihrer Wirkung sind sie jedoch meist geringer als ihr Ausgangsprodukt⁹.

In unseren Versuchen wurde das LDH-Isoenzymmuster durch DMBA nicht verändert, doch traten Enzymaktivitätsverminderungen in den einzelnen Banden unterschiedlich auf. Parallel dazu war auch die Proteinsynthese innerhalb der LDH-Isoenzymbande vermindert. Ob eine spezifische Regulationsstörung durch kanzerogene Substanzen auftritt, soll in weiteren Untersuchungen an anderen Enzymsystemen geprüft werden¹⁰.

Summary. The effect of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) on the activity of lactate dehydrogenase (LDH)-isoenzymes was studied in human fibroblast cultures. 3 isoenzyme components were separated by disc electrophoresis. A clear reduction in the enzyme-activity of the first and third component was observed, while the other fraction was little or not affected. The

incorporation of radioactive amino acids in proteins of the LDH-isoenzyme bands shows the same trend.

D. ADAMIKER, H. ALTMANN,
H. FRISCHAUF, G. KELLNER und
O. H. SCHERBAUM

*Institut für Biologie, Reaktorzentrum Seibersdorf und
Histologisch-Embryologisches Institut der Universität
Wien, A-2444 Seibersdorf (Austria),
12. Dezember 1968.*

⁹ E. BAYLAND, in *Endogenous Factors Influencing Host-Tumor balance* (Ed. R. W. EISLER, T. L. DAO and E. WOOD JR.; Univ. Chicago Press, Chicago and London 1967).

¹⁰ Zum Teil unterstützt vom U.S. Public Health Service No. GM-06461, Washington D.C. USA.

Influence of Diuretics on Renal Calcium Excretion

Since under conditions of osmotic diuresis renal Ca clearance is a function of Na clearance (WALSER¹), it may be expected that diuretics also influence calcium excretion. A number of publications show evidence of changes in Ca excretion after administration of various diuretics (LAMBERG and KULHÄCK², SCHIRMEISTER and WILLMANN³, HÄNZE and SEYBERTH⁴, DUARTE⁵). Diuretics may affect Ca excretion by acting on Na excretion or by affecting directly the tubular Ca transport. In our paper we are trying to answer the question to what extent the elevated Ca excretion found after a single dose of various diuretics is conditioned by their natriuretic effect.

The investigations were made in 50 healthy subjects under the conditions of maintained water diuresis. The initial water load was 20 ml/kg body weight. The urine was collected by spontaneous micturition after 10–15 min intervals. After stabilization of the diuresis during the

control period, the diuretic was administered. The following diuretics were tested: acetazolamide (i.v. 250 mg), aminophylline (i.v. 0.24 g or orally 0.3 g), ethacrynic acid (i.v. 1–10 mg), furosemide (i.v. 1–20 mg) and chlorothiazide (i.v. 250 mg).

In addition, in another group of 10 healthy subjects, the Ca and Na excretion was investigated after a single water load and after infusion of a 10% mannitol solution.

¹ M. WALSER, *Am. J. Physiol.* 5, 200 (1961).

² B. A. LAMBERG and B. KULHÄCK, *Scand. J. clin. Invest.* 4, 11 (1959).

³ I. SCHIRMEISTER and H. WILLMANN, *Klin. Wschr.* 1, 42 (1964).

⁴ S. HÄNZE and H. SEYBERTH, *Klin. Wschr.* 6, 45 (1967).

⁵ C. G. DUARTE, *Metabolism* 5, 17 (1968).