

Über die Wirkung polycyclischer, aromatischer Kohlenwasserstoffe auf isolierte Mitochondrien der Mäuseleber

M. WILK und E. L. WYNDER

Sloan-Kettering-Institute for Cancer Research, New York

(Z. Naturforsch. 21 b, 161—166 [1966]; eingegangen am 10. August 1965)

In wäßrig gepufferten Mitochondrien-Suspensionen konnte ein selektives Lösungsvermögen für carcinogene Kohlenwasserstoffe mit Hilfe fluoreszenz-spektroskopischer Messungen festgestellt werden. Gleichzeitig wird eine starke Verminderung der Atmung der Mitochondrien durch die Einwirkung der gelösten, polycyclischen Aromaten beobachtet. Nicht carcinogene Kohlenwasserstoffe werden weder gelöst, noch zeigen sie einen Einfluß auf die Atmung. Sehr schwer lösliche Carcinogene und schwächer wirksame Kohlenwasserstoffe werden in den angewandten Versuchszeiten weder gelöst, noch vermindern sie die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs.

Mitochondrien älterer, oder mit Vitamin B₂-Mangel behafteter Tiere zeigen erhöhte Depression der Atmung bei Zugabe von DMBA bzw. 3.4-Benzpyren.

Es wird versucht, diese Effekte einer reinen Promotor-Aktivität der polycyclischen, aromatischen Kohlenwasserstoffe zuzuschreiben, die an den Strukturelementen der Zellatmung (Mitochondrien) einsetzt.

Frühere Untersuchungen von GRAFFI^{1, 2} haben gezeigt, daß an den Mitochondrien der Zellen der Mäusehaut 3.4-Benzpyren in gelöster Form (blaue Fluoreszenz) vorübergehend fixiert wird, wobei unter anderem Proteine^{3, 4} und Purinbasen^{5, 6} als Lösungsvermittler dienen können. In Verfolgung einer Arbeitshypothese, wonach ein komplettes Carcinogen sowohl Initiator-, als auch Promotoreigenschaften besitzen sollte, wurden die Einwirkungen von vierzehn carcinogenen oder inerten polycyclischen, aromatischen Kohlenwasserstoffen auf isolierte Lebermitochondrien der Maus studiert und folgende Ergebnisse gefunden:

1. Die stark carcinogenen, polycyclischen, aromatischen Kohlenwasserstoffe werden aus einer mikrokristallinen Verteilung von Mitochondrien-Suspensionen spezifisch aufgelöst, während die schwach oder nicht carcinogenen, chemisch sehr ähnlich gebauten Aromaten, nicht in die monomolekular-disperse Form überführt werden.
2. Nur die gelösten, carcinogenen Kohlenwasserstoffe verringern die Geschwindigkeit des O₂-Verbrauchs, besonders während der Phase der

AN SCHRIFTEN: MANFRED WILK, Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt am Main, Robert-Mayer-Str. 7—9. E. L. WYNDER, Sloan-Kettering-Institute for Cancer Research, 425 East 68 Street, New York, 7. Y., USA.

oxydativen Phosphorylierung. Bei den inerten und schwach aktiven Kohlenwasserstoffen bleibt die Beeinflussung der Atmung innerhalb der Wirkung des beigemischten organischen Lösungsmittels (Aceton). Lediglich bei den äußerst schwer löslichen Dibenzpyrenen (Nr. 11—14, Tab. 1) ist das unter 1. beschriebene Verhalten nur angedeutet, die Beeinflussung der Atmung nimmt hierbei wahrscheinlich eine zu lange Inkubationszeit in Anspruch, in deren Verlauf die isolierten Mitochondrien nicht mehr normal arbeiten. Beim 10.11-Benzfluoranthren sind die Unterschiede im hier verwendeten, optischen Analysenverfahren zu gering, um eine Lösungsvermittlung zu erkennen. Eine mögliche Beeinflussung der Atmung liegt bei dieser Substanz nur innerhalb der Fehlergrenzen. Nach HOFFMANN und WYNDER⁷ zeigt die Verbindung mittlere carcinogene Wirksamkeit, nach DOMAGK⁸ ist sie inaktiv.

3. Lebermitochondrien älterer Mäuse (10 Monate) erwiesen sich anfälliger bei der Behandlung mit DMBA in bezug auf die unter 2. beschriebene Wirkung. Im gleichen Sinne reagierten Lebermitochondrien von Mäusen, die unter starkem Vitamin B₂-Mangel standen (WYNDER und KLEIN⁹).

¹ A. GRAFFI, Z. Krebsforsch. 50, 196 [1940].

² A. GRAFFI, Z. Krebsforsch. 52, 165 [1941].

³ M. WILK, Biochem. Z. 333, 167 [1960].

⁴ J. STAUFF u. G. RESKE, Z. Naturforsch. 15 b, 578 [1960].

⁵ H. WEIL-MALHERBE, Biochem. J. 40, 351 [1946].

⁶ M. WILK u. H. SCHWAB, An gew. Chem. 75, 1128 [1962].

⁷ E. L. WYNDER u. D. HOFFMAN, Cancer 12, 1194 [1959].

⁸ G. DOMAGK, Medizin und Chemie Bd. 3, S. 284, Leverkusen 1936.

⁹ E. L. WYNDER u. U. E. KLEIN, Cancer 18, 168 [1965].

Nr.	Kohlenwasserstoff	Relativer Carcinogenitäts-Index *	Lösungsvermittlung nach 1.	% Änderung der Geschwindigkeit des O ₂ -Verbrauchs	
				Substrat	Substr. + ADP
1	Anthracen	—	—	+ 1	— 3
2	Pyren	—	—	+ 2	+ 3
3	Chrysen	— (+)	—	— 4	0
4	1.2-Benzanthracen	—	—	— 3	— 2
5	7.12-Dimethylbenz(a)anthracen	+++	+	— 37	— 42
6	10.11-Benzfluoranthren	++	unentscheidbar	— 4	— 3
7	11.12-Benzfluoranthren	—	—	— 1	— 4
8	20-Methylcholanthren	+++	+	— 36	— 44
9	1.2-Benzpyren	—	—	— 4	— 4
10	3.4-Benzpyren	+++	+	— 41	— 46
11	1.2.4.5-Dibenzpyren	+	schwach	— 2	— 4
12	3.4.9.10-Dibenzpyren	++	—	+ 3	— 1
13	3.4.8.9-Dibenzpyren	++	deutlich	— 14	— 19
14	1.2.6.7-Dibenzpyren	—	—	— 3	+ 2

* carcinogene Aktivität: +++ stark, ++ mittel, + schwach, — keine.

Tab. 1. Löslichkeitsvermittlung von wäßrigen Mitochondrien-Suspensionen an Kohlenwasserstoffen und die hierbei auftretende prozentuale Änderung der Geschwindigkeit des O₂-Verbrauchs (Substrat = β -Hydroxybutyrat).

1. Löslichkeit polycyclischer, aromatischer Kohlenwasserstoffe in wäßrig-isotonischen Mitochondrien-Suspensionen

Die signifikanten Unterschiede zwischen Festkörper- und Lösungs-Emissionsspektrum aromatischer Kohlenwasserstoffe^{2,3} lassen es zu, den Lösungsvorgang ihrer mikrokristallinen Suspensionen durch Zugabe von Mitochondrien-Aufschwemmungen leicht zu erfassen. Weder die Trübung der Mitochondrien-Suspensionen, noch ihre Eigenfluoreszenz (Coenzyme und Proteine) machen sich hierbei sonderlich störend bemerkbar; lediglich die Fluoreszenzintensität der Kohlenwasserstoffe nimmt durch Absorption an den Partikeln der Mitochondrien um etwa 10–25% ab, ohne jedoch den charakteristischen Verlauf der Festkörperfluoreszenz zu verändern, wenn keine Löslichkeitsvermittlung stattfindet (Abbn. 1 und 4). Im Falle eines Übergangs von der kristallinen Phase des Kohlenwasserstoffs zur monodispersen Lösung, hebt sich das Lösungsspektrum deutlich aus der Festkörperemission heraus (Abbn. 2, 3 und 5). Beim 10.11-Benzfluoranthren sind die Fluoreszenzunterschiede zwischen beiden Zuständen nur sehr gering, womit der Nachweis einer Lösungsvermittlung nach diesem Verfahren nicht mehr möglich wird.

Die zeitliche Veränderung der „Lösungsemission“ (Abbn. 3 und 5) erlaubt ferner kinetische Untersuchungen des Lösungsprozesses.

In der Meßküvette wurden Kristallsuspensionen vorgelegt, die jeweils 10 γ Kohlenwasserstoff pro ml

Lösungsmittel A (= wäßrige Lösung von 0,25 Mol Rohrzucker, 10 mMol Triäthanolamin-HCl-Puffer 5 mMol MgCl₂, 5 mMol KH₂PO₄ und 0,2 mMol Äthylendiamin-tetraacetat mit einem p_H-Wert von 7,2 bei 25 °C) enthielten. Die zugesetzte Menge Mitochondrien-Suspension betrug stets 0,1 ml mit einem Gesamtgehalt von 100 γ Protein. Das Ver-

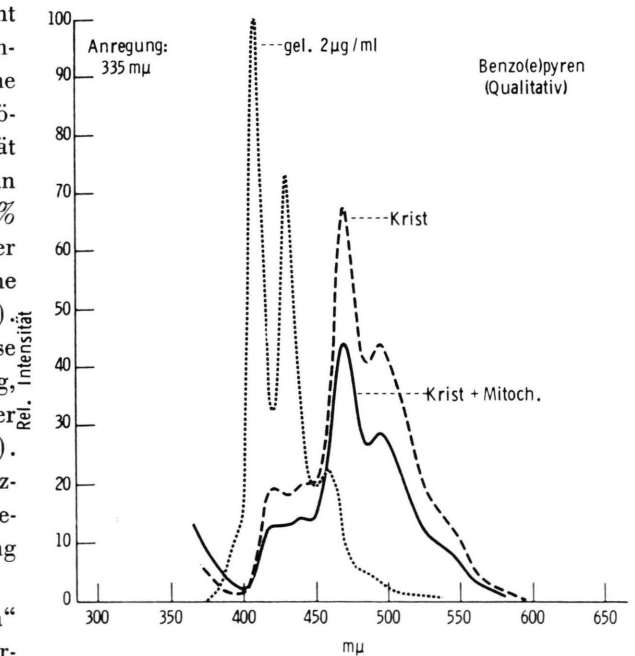
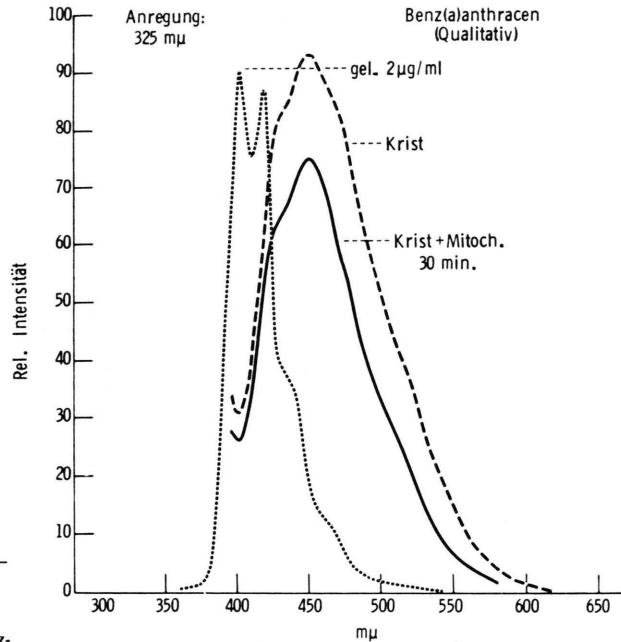
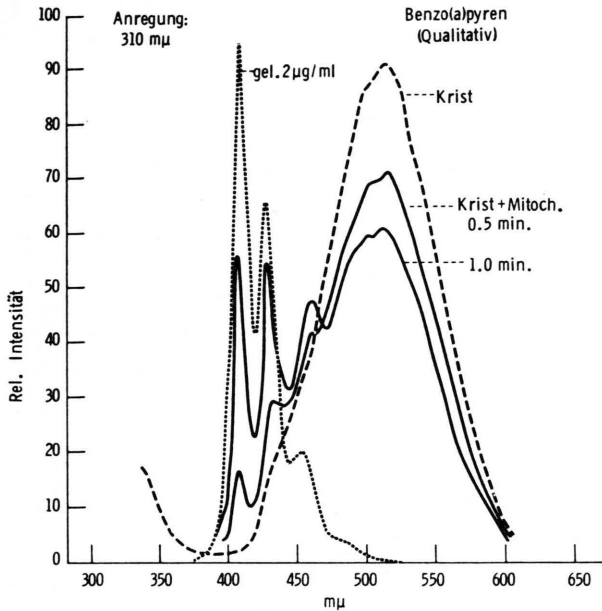


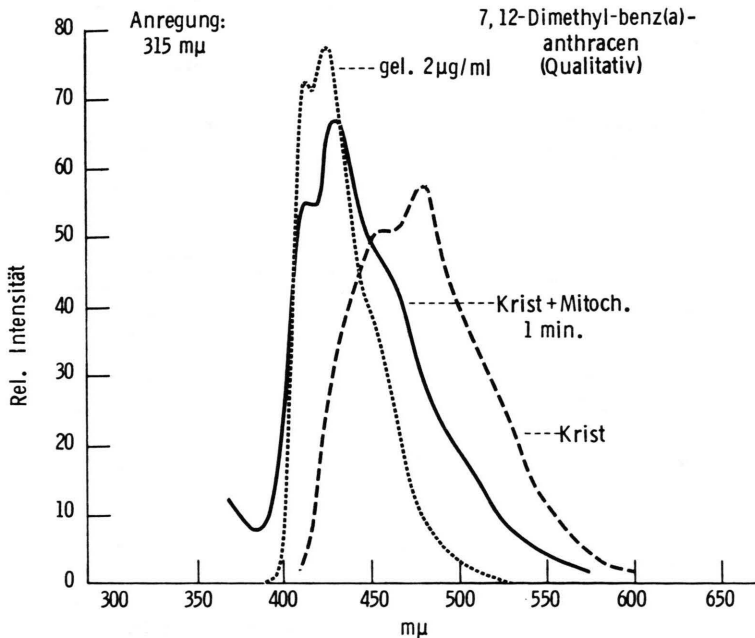
Abb. 1. — Festkörper- und ···· Lösungsfluoreszenz von 1.2-Benzpyren; Anregung bei 335 m μ . Die ausgezogene Kurve entsteht durch Zusatz von Mitochondrien-Suspension zur Kristallsuspension des Kohlenwasserstoffs.



gleichsspektrum der reinen methanolischen Lösung der Kohlenwasserstoffe wurde mit einer Konzentration von 2 γ /ml aufgetragen.

Die resultierenden Löslichkeiten der Aromaten liegen um eine bis zwei Zehnerpotenzen höher, als

in wässrigen β -Lactoglobulin-Lösungen¹⁰, wo allerdings auch deutliche Unterschiede zwischen 1,2- und 3,4-Benzopyren gefunden wurden. Wässrige ATP-Lösungen⁶ sind ebenfalls nicht in der Lage, ähnliche Kohlenwasserstoffmengen zu lösen.



¹⁰ G. RESKE u. J. STAUFF, Z. Naturforschg. 19 b, 716 [1964].

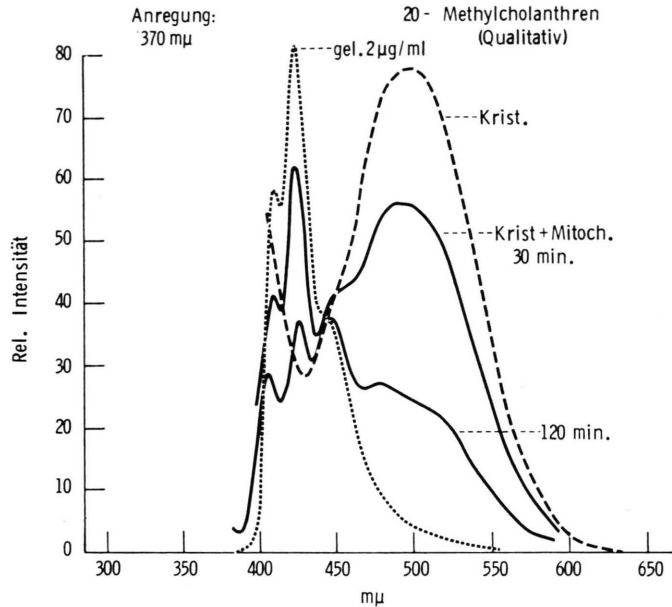


Abb. 5. Festkörper- und Lösungs-Fluoreszenz von 20-Methylcholanthren; Anregung bei 370 mμ. (Vgl. Lebende Abb. 1.)

2. Beeinflussung der Geschwindigkeit des O₂-Verbrauchs von isolierten Mitochondrien durch polycyclische, aromatische Kohlenwasserstoffe

Äquivalente Mengen der nach SCHNEIDER¹¹ präparierten Mitochondrien von 8 Wochen alten Swiss-Millerton-Mäusen in Lösungsmittel A wurden mit 0,1 ml Aceton bzw. 0,1 ml einer acetonischen Lösung versetzt, die pro ml 1 mg Kohlenwasserstoff

enthielt. Unmittelbar nach der Zugabe wurden die Mischungen 1 Min. lang geschüttelt und 30 Min. bei 0 °C aufbewahrt. Danach wurden aufeinanderfolgend an den nur mit Aceton behandelten und den mit Kohlenwasserstoff inkubierten Proben die Geschwindigkeiten des O₂-Verbrauchs nach Zugabe von Substrat (β-Hydroxybutyrat) bzw. Substrat + ADP gemessen.

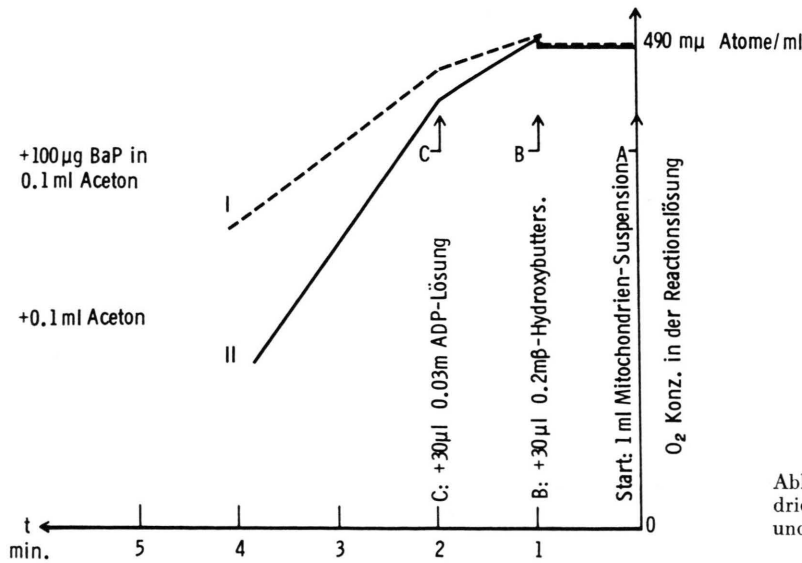


Abb. 6. Atmungsdiagramm einer Mitochondrien-Suspension, die mit 0,1 ml Aceton (II) und 100 γ 3.4-Benzpyren (BaP) in 0,1 ml Aceton (I) versetzt wurde.

¹¹ W. C. SCHNEIDER, J. biol. Chemistry 176, 295 [1948].

Die zeitliche Verfolgung der Konzentration des freien O_2 in der Lösung erfolgte polarographisch bei 0,6 V an einer vibrierenden Platinelektrode nach CHANCE und WILLIAMS^{12, 13}, wobei ein Collodium-Überzug nach HAGIHARA¹⁴ verwendet wurde. Unter diesen Bedingungen werden die eingesetzten Kohlenwasserstoffe im Lösungsmittel A nicht reduziert.

In Tab. 1 sind die prozentualen Abnahmen der Geschwindigkeiten des O_2 -Verbrauchs zwischen unbehandelten und inkubierten Mitochondrien der jeweils gleichen Präparierung angegeben und zwar für die Veratmung von Substrat mit und ohne Zugabe von ADP. Die größte Abnahme der Geschwindigkeit zeigen die mit stark carcinogenen Kohlenwasserstoffen behandelten Proben Nr. 5, 8, 10 und 13, bei denen auch gleichzeitig nach 1. ein Lösungsvorgang nachgewiesen wurde. Auf die Ausnahmen von Nr. 6, 11 und 12 wurde schon hingewiesen.

Abb. 6 zeigt schematisch am Beispiel des 3.4-Benzpyrens den Verlauf eines Atmungsdiagramms.

3. Einfluß des Alters der Mäuse und Wirkung von Vitamin B_2 -Mangel auf die Verminderung der Atmung von Lebermitochondrien durch Inkubation mit polycyclischen, aromatischen Kohlenwasserstoffen

Wie unter 2. wurde der Einfluß des Alters und die Wirkung von Vitamin B_2 -Mangel an Lebermitochondrien der Maus untersucht.

Die Proben 10 Monate alter Mäuse erwiesen sich nach Inkubation mit DMBA deutlich anfälliger, besonders in der Phosphorylierungsphase, als vergleichbare Präparate 8 Wochen alter Tiere (vgl. Tab. 2, A). In gleicher Richtung liegt die Wirkung von 3.4-Benzpyren auf Lebermitochondrien aus

Mäusen mit Vitamin B_2 -Mangel (10 Tage B_2 -frei ernährt). Schon der Vitamin B_2 -Mangel allein führt zu einer Reduktion der Atmung um ca. 20–25% in 10 Tagen. Die Zugabe von 3.4-Benzpyren verursacht einen stärkeren Rückgang der Atmung an B_2 -Mangelproben, als an Mitochondrien normal ernährter Tiere (Tab. 2, B).

Diskussion

Die vielfach bestätigten Ergebnisse von BERENBLUM^{15–17} lassen vermuten, daß einem kompletten Carcinogen, wie etwa den bekannten polycyclischen, aromatischen Kohlenwasserstoffen, sowohl eine Initiator-, als auch eine Promotor-Aktivität zuzuschreiben ist. Der irreversible Angriff der Initiatorwirkung erfolgt wohl an den Bereichen der Gensubstanzen^{18–21}, über reine Promotorreaktionen hat man dagegen bis heute keinerlei feste Vorstellungen.

Als Modellbetrachtung können nun aber die oben beschriebenen, bisher weitestgehend spezifischen Wirkungen polycyclischer, aromatischer Kohlenwasserstoffe auf isolierte Mitochondrien für die Einkreisung einer möglichen Angriffsstelle der Promotor-Aktivität in der Zelle brauchbar sein.

Die unter 1. angeführte selektive Auflösung carcinogener Kohlenwasserstoffe an isolierten Mitochondrien, mit dem damit verbundenen Rückgang der Atmung, deutet darauf hin, daß bei diesen Aromaten, neben den „Initiatorreaktionen“ an den Gensubstanzen, ein Promotor-Angriff auf die Atmungs-partikel der Zelle erfolgt. Diese Vorstellung wird noch erhärtet durch Beobachtungen, wonach auch reine Cocarcinogene (Promotoren), wie Croton-Öl

	Alter bzw. Zustand der Tiere	Inkubierter Kohlenwasserstoff	% Änderung des Sauerstoffverbrauchs Substrat	% Änderung des Sauerstoffverbrauchs Substrat + ADP
A	8 Wochen	DMBA	– 48	– 48
	10 Monate	DMBA	– 60	– 100
B	normal ernährt	3.4-Benzpyren	– 41	– 46
	Vitamin B_2 -Mangel (10 Tage)	3.4-Benzpyren	– 52	– 58

Tab. 2. Einfluß des Alters der Tiere oder eines Vitamin B_2 - Mangels auf die Atmungs-hemmende Wirkung von DMBA und 3.4-Benzpyren (Substrat = β -Hydroxybutyrat).

¹² B. CHANCE u. G. R. WILLIAMS, Nature [London] **175**, 1120 [1955].

¹³ B. CHANCE u. G. R. WILLIAMS, J. biol. Chemistry **217**, 383 [1955].

¹⁴ B. HAGIHARA, Biochem. biophys. Acta **46**, 134 [1961].

¹⁵ I. BERENBLUM, Cancer Res. **1**, 44 [1941].

¹⁶ I. BERENBLUM u. P. SHUBKIN, Brit. J. Cancer **1**, 384 [1947].

¹⁷ I. BERENBLUM u. P. SHUBKIN, Brit. J. Cancer **3**, 109 [1949].

¹⁸ H. V. GELBOIN u. M. KLEIN, Science [Washington] **145**, 1321 [1964].

¹⁹ H. V. GELBOIN u. N. BLACKBORN, Cancer Res. **24**, 356 [1964].

²⁰ H. V. GELBOIN u. N. BLACKBORN, Biochem. Biophys. Acta **72**, 657 [1960].

²¹ H. V. GELBOIN u. L. SOKOLOFF, Science [Washington] **134**, 611 [1961].

oder dessen aktive Fraktionen, in bestimmten Konzentrationen ähnliche Depressionen der Atmungsgeschwindigkeit an isolierten Mitochondrien hervorrufen²².

Mithin zeigt sich nun auch die von HAMPERL, GRAFFI und LANGER²³ postulierte „Mitochondrien-Theorie“ der Krebsentstehung in einem neuen Licht, wobei jetzt nur die Promotorwirkung eines kompletten Carcinogens (bzw. eines Promotors) eine – möglicherweise reversible – Schädigung dieser Zellpartikel auslöst. Damit soll jedoch nicht gesagt werden, daß eine beliebige Promotor-Aktivität ausschließlich an den Strukturen der Mitochondrien einsetzen muß.

Für die präventive Medizin ergeben sich hierdurch neue Antriebe zur Festigung und Stärkung der Mitochondrien. Auf die Möglichkeit einer Beeinflussung dieser Zellpartikel von „außen“ weisen schon Ergebnisse von KENSLE und Mitarb.²⁴, denen es gelang, die Schutzwirkung von Riboflavin in Verbindung mit Casein gegen die durch Buttergelb verursachte Hepatombildung nachzuweisen. Verzögerungen der Tumorbildung wurden auch von MATSUYAMA und NAGOYA²⁵ beobachtet, wenn die Ratten vor der Methylcholanthren-Pinselung mit DPN oder Nicotinamid inkubiert wurden.

Wie kann man sich nun im Modellfall die Promotorwirkung auf Mitochondrien als treibende Kraft zur Tumorbildung vorstellen? Der Ausfall an ATP-Produktion, durch Schädigung der Atmungsketten-Phosphorylierung, zwingt die Zelle zum Einsatz anderer Energiequellen, was bekanntermaßen zunächst durch Übergang zu erhöhter Glykolyse versucht wird. Die hiermit verbundene Entdifferenzierung der Zelle wird nach WARBURG^{26–28} durch Entzug des O₂ während der Zellteilungsperiode ausgelöst. Ob weitere Schritte folgen, wie etwa die ver-

gebliche, erhöhte Synthese von Atmungsfermenten oder eine vermehrte Zellenproduktion, um der inneren Atemnot des Organismus auszuweichen, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Beschreibung der Versuche

Zu 1.: Löslichkeit polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe in wäßrigen Mitochondrien-Suspensionen

In einer Fluoreszenzküvette wurden 2 ml einer Kohlenwasserstoff-Suspension (Konz.: 10 γ /ml) vorgelegt. Die Suspensionen erhält man durch schnelles Vermischen von 1 ml einer acetonischen Lösung der Kohlenwasserstoffe (Konz.: 1 mg/ml) mit 100 ml Lösungsmittel A (s.o.). Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren diente ein Aminco-Keirs-Spektrofluorometer. Die Anregung erfolgte möglichst kurzzeitig, um Streulichteffekte zu vermeiden. Das Vergleichsspektrum der gelösten Kohlenwasserstoffe wurde bei einer Konzentration von 2 γ /ml in Methanol vermessen. Zu diesen Kohlenwasserstoff-Suspensionen wurden je 0,1 ml Mitochondrien-Aufschwemmung nach SCHNEIDER¹¹ gegeben (Proteingehalt 100 γ /0,1 ml), kurz umgeschüttelt und das Emissionsspektrum registriert.

Zu 2. und 3.: Messung der Geschwindigkeit des O₂-Verbrauchs

Zur polarographischen O₂-Bestimmung diente eine vibrierende Platinelektrode nach CHANCE und WILLIAMS^{12, 13}, die in ein Meßgefäß eintauchte, welches mit Gummi überkappte Injektionsöffnungen für die Zugabe von Substrat und ADP besaß (Gesamtvolumen 2 ml). Die Platinkathode wurde täglich frisch mit Colloidium überzogen¹⁴ und auf ihre Einstellgeschwindigkeit hin kontrolliert. Die bei jeder Messung beibehaltenen Substrat-(= β -Hydroxybutyrat) und ADP-Mengen können aus Abb. 6 entnommen werden. Während der Inkubation und Polarographie waren die Ansätze sorgfältig vor Belichtung geschützt, um eine Photooxydation der Kohlenwasserstoffe zu unterbinden.

²² M. WILK u. E. L. WYNDER, in Vorbereitung (diese Zeitschrift).

²³ H. HAMPERL, A. GRAFFI u. E. LANGER, Z. Krebsforsch. **53**, 133 [1942].

²⁴ C. J. KENSLE, K. SUGIURA, N. F. YOUNG, C. V. HALTER u. C. P. RHOADS, Science [New York] **93**, 308 [1941].

²⁵ M. MATSUYAMA u. T. NAGOYA, Nature [London] **189**, 673 [1961]; vgl. auch GANN, **51**, 265 [1960].

²⁶ O. WARBURG, K. GAWEHN u. A. W. GEISSLER, Z. Naturforsch. **15b**, 378 [1960].

²⁷ O. WARBURG, K. GAWEHN, A. W. GEISLER u. S. LORENZ, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **321**, 252 [1960].

²⁸ O. WARBURG, K. GAWEHN, A. W. GEISSLER, D. KAYSER u. S. LORENZ, Klin. Wschr. **43**, 289 [1965] (Zusammenfassung).