

In-vivo-Wachstumsverhalten von Zajdela-Asciteshepatomzellen nach in-vitro-Behandlung mit Trypsin und Pronase

Growth of Zajdela ascites hepatoma cells in vivo following treatment with trypsin and pronase in vitro

WINFRIED KRÜGER und STEPHAN SCHNITZLER

Forschungsinstitut Manfred von Ardenne, Dresden-Weißer Hirsch, und Institut für gerichtliche Medizin der Humboldt-Universität, Berlin

(Z. Naturforsch. 26 b, 169—170 [1971]; eingeg. am 2. November 1970)

Im Rahmen einer breit angelegten Untersuchungsreihe über Antigenstrukturen an Tumorzelloberflächen behandelten wir unter anderem Zajdela-Asciteshepatomzellen in vitro mit geringen Konzentrationen an Trypsin und Pronase und prüften das Angehen der Tumoren nach Wiederverimpfung dieser Zellen an Ratten im Vergleich zu nicht enzymierten Kontrollzellen.

Veranlassung für die Publikation dieser Teilergebnisse ist eine kürzlich von BURGER¹ erschienene Arbeit, in der über die Stimulierung der Zellteilung und die Aufhebung der Kontakthemmung in Fibroblastenkulturen nach Behandlung der Zellen mit Trypsin, Ficin und Pronase berichtet wird. Daneben liegen von CURRIE und BAGSHAWE² Ergebnisse vor, denen zufolge das Wachstum des Landschütz-Ascitestumors durch Behandlung mit Trypsin nicht beeinträchtigt wird, wohl aber nach Einwirkung von Neuraminidase aus *Vibrio cholerae*. Schließlich beschäftigt sich der Arbeitskreis um UHLENBRUCK seit Jahren unter anderem mit der

Einwirkung proteolytischer und anderer Enzyme auf die Zelloberfläche, speziell von Erythrocyten³⁻⁵.

Unsere vorläufigen Resultate sind in der folgenden Tab. 1 zusammengefaßt:

Erläuterungen: Enzymbehandlung 1 Stde. bei 37 °C in KRB mit 0,1% Glucose bei pH 7,2 unter gelindem Schütteln und Begasen mit 95% O₂ – 5% CO₂. Vitalitätsprüfung mit Trypanblau; Anfärberate bei Kontrollen und enzymbehandelten Zellen < 10 Prozent. Verimpfung von 1 ml einer 8–10-proz. Zellsuspension (Kontrollen und Versuche gleiche Zellmengen) i.p. an ca. 200 g schwere ♂ Ratten eines Wistar-Stammes. Tägliche Gewichtskontrolle der Tiere. Ein Teil der Tiere wurde am 17. Tage nach Überimpfung getötet, die Ascitesmenge und dessen Zellanteil bestimmt und daraus die gebildete Tumorzellmenge berechnet. Der andere Teil der Tiere wurde bis zum Spontanod beobachtet und der Ascites wie oben untersucht. Die für die biologischen Daten angegebenen Zahlen sind Mittelwerte für *N* Tiere ± Standardabweichung. Die Differenzen zwischen Kontrollen und Versuchen sind nicht signifikant. Bestimmung der *N*-Acetylneuraminsäure nach AMINOFF⁶; Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen jeder Ascitesprobe. Bestimmung der Stoffwechselquotienten nach der neuen Zweifachmethode von WARBURG⁷.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Behandlung der Zajdela-Zellen mit Trypsin und Pronase unter den angegebenen Bedingungen eine Wachstumsverzögerung in vivo nicht bewirkt. Diese hätte man erwarten können, wenn die proteolytische Abspaltung von Membran-

	Kontrollen	0,01% Trypsin	0,01% Pronase
Gebildete Tumorzellmenge (17 Tage nach Impfung)	4,8 ± 1,4 ml (N=5)	—	6,1 ± 1,2 ml (N=5)
Gebildete Tumorzellmenge (bei Spontanod)	7,0 ± 3,8 ml (N=5)	5,9 ± 2,7 ml (N=5)	—
Mittlere Überlebenszeit (Tage)	19 ± 10	17 ± 8	—
Gehalt an <i>N</i> -Acetylneuraminsäure (NANA) der verimpften Zellen [μ g/ml Zellen]	207	144	146
Gehalt an <i>N</i> -Acetylneuraminsäure der in vivo gewachsenen Zellen [μ g/ml Zellen]	201	243	188
Stoffwechselquotienten in vitro 1 Stde. nach Enzymzugabe	Zum Versuch mit		
<i>Q</i> _{CO₂}	Trypsin 41,5	Pronase 43,3	55,9
<i>Q</i> _{O₂}	–6,4	–2,4	–10,3
<i>Q</i> _M	35,1	41,0	45,6
			52,4
			–3,9
			48,5

Tab. 1. Wachstum, *N*-Acetylneuraminsäuregehalt und Stoffwechsel von Zajdela-Zellen nach Trypsin- und Pronasebehandlung.

Sonderdruckanforderungen an Dr. W. KRÜGER, Forschungsinstitut Manfred v. Ardenne, DDR-8051 Dresden-Weißer Hirsch, Zeppelinstr. 7.

¹ M. M. BURGER, Nature [London] 227, 170 [1970].

² G. A. CURRIE u. K. D. BAGSHAWE, Brit. J. Cancer 22, 843 [1968].

³ G. UHLENBRUCK, Folia haematol. [Leipzig] 85, 362 [1966].

⁴ G. UHLENBRUCK, A. ROTHE u. G. I. PARDOE, Z. Immunitätsforsch. exp. Therap. 136, 79 [1968].

⁵ G. UHLENBRUCK, Ärztl. Lab. 15, 174 [1969].

⁶ D. AMINOFF, Biochem. J. 81, 384 [1961].

⁷ O. WARBURG, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 1677 [1967].

strukturen, die sich im verminderten NANA-Gehalt der behandelten Zellen ausdrückt, Friedenreich-Antigene freigesetzt hätte^{8,9}, gegen die Antikörper vorliegen bzw. gebildet werden können. Durch die Abspaltung neuraminsäurehaltiger Glykopeptide müßte auch eine Erniedrigung der negativen Oberflächenladung der Zellen eingetreten sein, die nach l. c.¹⁰ eine maßgebliche Rolle bei der körpereigenen zellulären Immunabwehr von Krebszellen spielen soll. Die nach Neuraminidase-Behandlung feststellbare Verhinderung des Tumoranges bzw. die damit erzeugte Immunität gegen neuerlich verimpfte unbehandelte Tumorzellen ist für Landschütz-Asciteszellen sowie die Leukämie L 1210 gesichert^{2,11}. Zajdela-Zellen zeigen diesen Effekt nach Trypsin oder Pronase offenbar nicht. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß der NANA-Gehalt der in vivo gewachsenen Zellen den Ausgangswert der unbehandelten Kontrollzellen (vor und auch nach der Verimpfung) nahezu wieder erreicht. Die Differenzen zwischen 188 bzw. 243 gegenüber 207 µg NANA/ml gepackte Zellen sind bei der geringen Tierzahl statistisch nicht zu sichern. Hingegen ist der Unterschied zwischen Kontrollen und mit Trypsin bzw. Pronase behandelten Zellen in vitro vor der Überimpfung mit $p = 0,001$ statistisch signifikant.

Die leicht erhöhten Stoffwechselquotienten der Zajdela-Zellen nach Enzymbehandlung kann man entweder als Folge eines gesteigerten Stoffaustausches durch die geschädigte Membran oder als eine allgemeine Stoffwechsellagerung als Ausdruck erhöhter Malignität im Sinne BURKS¹² deuten.

Versuche zur Herabsetzung der negativen Oberflächenladung von Tumorzellen durch Veresterung der Carboxylgruppe der *N*-Acetylneuraminsäure und zur Erforschung der damit zusammenhängenden sterischen Probleme, wie sie von UHLENBRUCK¹³ sowie von CURRIE und BAGSHAWE^{2,14} diskutiert werden, sind im Gange. Darüber wird zu gegebener Zeit an anderer Stelle ausführlich berichtet.

Die Durchführung vorliegender Arbeit erfolgte im Auftrag und mit Unterstützung des Ministeriums für Gesundheitswesen der DDR, Berlin, im Rahmen des Komplexthemas *Krebs-Mehrschritt-Therapie* (Thementräger Forschungsinstitut M. von Ardenne). Für technische Assistenz danken wir Fr. G. BINDER, Fr. CH. LOSE, Frau H. STEPHAN und Herrn G. TRAUTMANN.

⁸ G. UHLENBRUCK, Mitt. Max-Planck-Ges. **4**, 227 [1965].

⁹ G. UHLENBRUCK u. H.-J. SEHRBUNDT, Bibl. haematol. Nr. **32**, 337 [1969].

¹⁰ G. A. CURRIE, Lancet **2**, 1336 [1967].

¹¹ K. D. BAGSHAWE u. G. A. CURRIE, Nature [London] **218**, 1254 [1968].

¹² D. BURK u. M. WOODS, Arch. Geschwulstforsch. **28**, 305 [1967].

¹³ G. UHLENBRUCK, Internist **10**, 33 [1969].

¹⁴ G. A. CURRIE u. K. D. BAGSHAWE, Lancet **1**, 708 [1967].