

Lipoamidase Activity in Virus Induced Tumours and in the Corresponding Normal Tissue

H. DIRINGER

Max-Planck-Institut für Virusforschung, 74 Tübingen,
Abteilung V, Spemannstraße 37/39

(Z. Naturforsch. 26 b, 1201—1202 [1971]; received September 8, 1971)

Increased glycolysis in tumour tissue has first been observed by WARBURG in 1923 and has since been postulated to be the origin of tumour formation¹. One possibility to increase the production of lactate, is to prevent the conversion of pyruvate, which is derived from glucose via the Emden-Meyerhof pathway, into acetyl-CoA. Pyruvate will then function as a hydrogen acceptor from NADH, resulting in the formation of lactic acid.

The conversion of pyruvate into acetyl-CoA is catalysed by the pyruvate dehydrogenase complex which contains covalently bound lipoic acid as cofactor². This cofactor can be released by lipoamidase³ causing inactivity of the pyruvate dehydrogenase complex.

Since virally induced tumours also have an increased glycolytic activity⁴, it was investigated whether tumour viruses can induce lipoamidase activity. ³⁵S-proteins from *E. coli* including lipoic acid were, therefore, incubated with homogenates of yeast, known to contain lipoamidase⁵. They served as a control. In addition, extracts of SV 40 — and RSV — induced tumours and homogenates of hamster kidney and chicken muscle (corresponding normal tissues) were tested. The released radioactive lipoic acid was extracted with benzene and identified by thinlayer chromatography. The radiochromatogram (see Fig. 1) shows the results obtained with the tumour induced by the DNA containing SV 40 virus. It can be seen that lipoamidase activity is present in yeast but neither in the tumour nor in the kidney tissue. The same result was obtained when a tumour induced by the RNA virus RSV was compared with chicken muscle. In both cases lipoamidase activity was absent. An increased glycolysis in virus induced tumours via an induction of lipoamidase can therefore be excluded.

The observations of REED and co-workers^{6,7} offer an alternative for viruses to influence the pyruvate dehydrogenase complex via the induction or repression of a single enzyme. They showed that the regulation of the pyruvate dehydrogenase complex in a variety of tissues is effected by a kinase and a phosphorylase. The first enzyme phosphorylates the pyruvate dehydro-

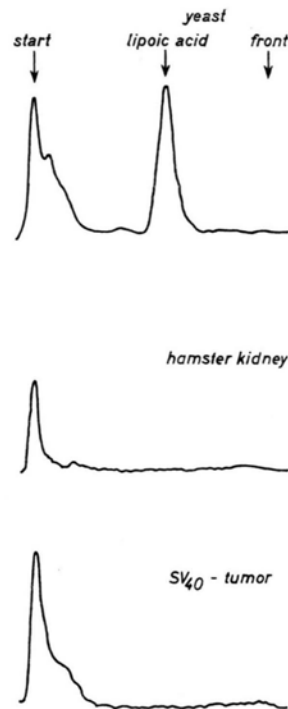


Fig. 1. Lipoamidase activity in virus tumors and tissue of origin.

genase complex and thus prevents the formation of acetyl-CoA. This block can be released by the action of the phosphorylase.

The induction of the proper kinase or the repression of phosphorylase activity by viruses would produce the same effect as the induction of lipoamidase i. e. an increased glycolysis of the infected cell.

Methods

Protein was estimated by the FOLIN-LOWRY method using bovine serum albumine as a standard⁸.

Growth of *E. coli* and Isolation of ³⁵S-protein

E. coli was grown in 600 ml M 9 medium⁹ containing only 1/3 of the usual amount of sulphate and 10 mCi of carrier-free Na₂³⁵SO₄ (Radiochemical Center, Amersham). The bacteria were collected by centrifugation, washed twice with 0.1 M potassium phosphate buffer, pH = 7.0, 0.005 M Na₂SO₄, and were disrupted

Requests for reprints should be sent to Dr. H. DIRINGER, MPI für Virusforschung, D-7400 Tübingen, Abt. V, Spemannstr. 37/39.

¹ A. C. AISENBERG, *The Glycolysis and Respiration of Tumours*, Academic Press, New York-London 1961.

² L. J. REED, *Compr. Biochem.* 14, 99 [1966].

³ K. SUZUKI and L. J. REED, *J. biol. Chemistry* 238, 4021 [1963].

⁴ H. M. TEMIN, *Internat. J. Cancer* 3, 491 [1968].

⁵ G. R. SEAMAN, *J. biol. Chemistry* 234, 161 [1958].

⁶ T. C. LINN, F. H. PETTIT, and L. J. REED, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 62, 234 [1968].

⁷ T. C. LINN, F. H. PETTIT, F. HUCHO, and L. J. REED, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 64, 227 [1969].

⁸ E. LAYNE, *Methods in Enzymology*, p. 448, Vol. III, Academic Press, New York-London 1957.

⁹ G. KOCH u. W. WEIDEL, *Z. Naturforsch.* 11 b, 345 [1956].

(4 min) at 10 kcal with the Branson sonifier in 10 ml of the same buffer. Differential centrifugation for 15 min at 20,000 *g* and 2 hrs at 110,000 *g* gave a high speed sediment which was dissolved overnight in 5 ml of the former buffer and again dialysed. A second differential centrifugation yielded 20 mg protein of high speed sediment which was dissolved in 10 ml 0.02 M potassium phosphate, pH = 7.0. DPM/mg protein = $7.17 \cdot 10^7$. It was stored at -25°C until use. 0.3–0.5% of the total radioactivity was ^{35}S lipoic acid, as estimated after 12 hrs hydrolysis in 6 N HCl at 110°C and isolation of lipoic acid by thinlayer chromatography.

Preparation of extracts for lipoamidase tests

Tissues and tumours were homogenized in 2 parts of 0.02 M potassium phosphate buffer, pH=7.0, and disrupted for 30 sec at 10 kcal. Yeast was treated for 30 min⁵. The suspensions were centrifugated at 10,000 *g* for 30 min, the supernatant solution dialysed against the buffer. Aliquots were taken for protein estimation. The rest was stored at -25°C until use.

¹⁰ S. K. MITRA, R. K. MANDAL, and D. P. BURMA. *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **107**, 131 [1965].

Lipoamidase assay

1 ml of homogenate, containing 25–30 mg of protein, was incubated for 2–4 hrs at 37°C with 0.3 ml of ^{35}S -*E. coli* protein. Afterwards the protein was precipitated with 4 ml of ethanol containing 100 μg of inactive lipoic acid. The supernatant was evaporated to dryness, dissolved in 1 ml of 5% NaHCO_3 and extracted twice with 1 ml benzene, which was discarded. The water phase was acidified with 3 N HCl and twice extracted with 1.5 ml benzene. The combined benzene fractions were evaporated to dryness, the residue again dissolved in a small amount of benzene and 1/3 was chromatographed on cellulose plates (Merck, Darmstadt) with *n*-butanol saturated with 0.5 N NH_4OH ¹⁰. The radioactivity was estimated in the Packard strip counter. Lipoic acid was located by iodine vapour or by sodium nitroprusside-sodium cyanide¹¹.

The skillful technical assistance of Miss DAGMAR TROMM is gratefully appreciated.

¹¹ I. M. HAIS u. K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie I*, p. 935, Gustav Fischer Verlag, Jena 1963.

Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung

Relationship between Dose and Effect

ARNULF SIPPEL

Freiburg im Breisgau

(Z. Naturforsch. **26 b**, 1202–1203 [1971]; eingegangen am 22. Juni 1971, revidiert am 5. September 1971)

In einer vorausgegangenen Notiz¹ ist gezeigt worden, daß die Lebensdauerverteilung einer Population durch eine einzige unbekannte Konstante ε charakterisiert werden kann.

Wertet man die Sterbetafeln von mehreren Tierversuchsreihen mit verschiedenen hohen (täglichen, gleichbleibenden) Dosen D eines (carcinogenen) Giftes aus, so wird ein linearer Zusammenhang zwischen D und ε entsprechend folgender Gleichung gefunden:

$$\varepsilon = \varepsilon_0 + \varphi D. \quad (1)$$

In dieser Gleichung bedeutet ε_0 den zur (giftfreien) Kontrollversuchsreihe gehörigen Wert der Konstanten ε und φ einen Faktor, welcher möglicherweise geeignet ist die (tödliche) Giftwirkung (ohne Angabe einer Dosis) spezifisch zu charakterisieren.

Sonderdruckanforderungen an Dr. A. SIPPEL, D-7800 Freiburg, Weddigenstr. 3.

¹ A. SIPPEL, *Z. Naturforsch.* **26 b**, 859 [1971].

² H. DRUCKREY, *Quantitative Aspects in Chemical Carcinogenesis*. UICC Monograph Series, Vol. 7, S. 60. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967.

In Abb. 1 ist Gl. (1) anhand der Wirkung von DENA (Diäthylnitrosamin) und DAST (4-Dimethylaminostilben) auf Ratten illustriert. Sämtliche (z. T. unveröffentlichten) Daten waren dem Verfasser von Herrn Professor Dr. Hermann DRUCKREY liebenswür-

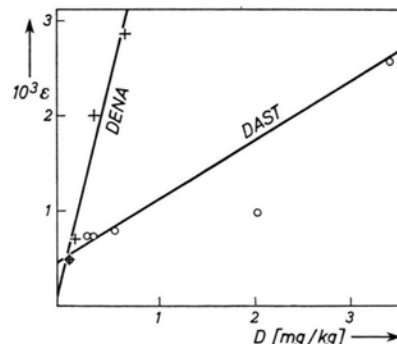


Abb. 1. Linearer Zusammenhang zwischen ε und Dosis D .

digerweise aus dessen schon mehrere Jahre zurückliegenden Untersuchungen^{2,3} zur Verfügung gestellt worden. Hierfür sowie für wertvolle Hinweise ist der

³ H. DRUCKREY, *Chloriertes Trinkwasser, Toxizitätsprüfungen an Ratten über sieben Generationen*, *Fd. Cosmet. Toxicol.* Vol. 6, p. 174. Pergamon Press 1968.

Verfasser dem Genannten zu besonderem Dank verpflichtet. Zu den ausgewerteten Versuchsreihen waren noch ausführliche Sterbedaten vorhanden gewesen.

Der aus dem Rahmen fallende DAST-Wert bei 2 mg/kg scheint deswegen nicht bedenklich zu sein, weil die zugehörige Versuchsreihe auch bei der Carcinomentwicklung etwas aus dem Rahmen fällt.

Gl. (1) hat ein Analogon bei der Materialprüfung⁴.

Bei der üblichen graphischen Prüfung der Beziehung zwischen Dosis und Wirkung (Auftragung des Prozentsatzes der Reagenten bzw. im vorliegenden Fall der Gestorbenen über der Dosis) weist die resultierende S-förmige Kurve nur eng begrenzte quasi-lineare Bereiche auf; auch bei der an sich problematischen Benutzung der G a u ß schen Verteilungsfunktion wird nur mangelhafte Linearisierung erreicht.

Wenn sich also die in Abb. 1 zum Ausdruck kommende Linearisierung an weiteren Beispielen über

große Dosis-Bereiche bestätigt, besteht Aussicht auf eine besonders rationelle Auswertung des Versuchsmaterials. Denn selbst wenn man die Frage einstweilen offen läßt, ob die gemäß der Abb. 1 erzielbare Linearisierung der Dosis-Effekt-Beziehung besser ist als die mittels der G a u ß schen Verteilungsfunktion erreichbare, so werden auf jeden Fall die experimentellen Ergebnisse besser ausgenutzt: während nämlich bei der gebräuchlichen Methode aus jeder mit einer bestimmten Dosis angestellten Tierversuchsreihe nur eine einzige Beobachtung in die nach G a u ß⁵ linearisierte S-Kurve eingeht, nämlich der Prozentsatz unter bestimmten Bedingungen gestorbener Individuen, gelten die für die Abb. 1 benutzten einzelnen ε -Werte im Prinzip für jedes einzelne Individuum der betreffenden Population.

⁴ A. SIPPEL, *Chemiefasern* **21**, 286, Abb. 2 [1971].

⁵ Der Ausdruck „nach G a u ß linearisiert“ ist hier nur der Kürze wegen gebraucht; die Anwendung seiner Verteilungsfunktion auf diesen speziellen Zweck stammt keineswegs von G a u ß.