

Zur Wirkung von N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin und seinem Benzaldehydhydrazon auf die RNA- und Proteinsynthese sowie Stoffwechsel von synchronisierten Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*)

Effect of N-Methyl-N- β -chloroethylhydrazine and Its Benzaldehydhydrazone on RNA-
and Protein Synthesis as Soon as Metabolism of Synchronously Growing Yeast Cells
(*Saccharomyces cerevisiae*)

R. Braun, H. Lange, U. Mangold und R. Mangold

Institut für Pharmakologie und Toxikologie Marburg, Lahnberge

(Z. Naturforsch., **31 c**, 298–303 [1976]; eingegangen am 1. Juli/17. November 1975)

N-Methyl-N- β -chloroethylhydrazine, Yeast Cells, RNA Synthesis, Protein Synthesis, Metabolism

N-methyl-N- β -chloroethylhydrazine and its benzaldehydhydrazone inhibit the influx of [$6\text{-}^3\text{H}$]-uracil and L-[$U\text{-}^{14}\text{C}$]leucin in yeast cells as well as the incorporation in RNA and protein. Experiments with synchronously and asynchronously growing cells showed the N-methyl-N- β -chloroethylhydrazine essentially influences the dividing phase while the benzaldehydhydrazone is more effective in the growthphase. The effect of these two substances on respiration, glycolysis and the concentration of fructose-1,6-diphosphate, triose phosphate, and adenosine triphosphate is small.

Vorstehend konnten wir über die wachstumsverzögernde und vermehrungshemmende Wirkung von N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin* und seinem Benzaldehydhydrazon** bei synchron wachsenden Hefezellen berichten¹. Es war nun von Interesse, genaueres über die Syntheserate bei der RNA- und Proteinbildung zu erfahren. Wir bestimmten daher die Aufnahme von [$6\text{-}^3\text{H}$]Uracil und L-[$U\text{-}^{14}\text{C}$]Leucin unter dem Einfluß der beiden Testsubstanzen, wobei N,N-Dimethylhydrazin als Vergleichssubstanz mituntersucht wurde. Die Gesamtaufnahmerate wurde nach Einbau in den hochmolekularen Bereich und nach Aktivität im säurelöslichen Zellpool differenziert untersucht. Da, wie oben beschrieben¹, die DNA-Synthese von den Testsubstanzen über längere Zeit total gehemmt wird, verzichteten wir auf die bei Hefe umständliche DNA-Markierung. Weiterhin untersuchten wir die Verteilung der im säurelöslichen Zellpool vorhandene Aktivität bezüglich ihrer Verteilung auf die einzelnen Phosphorylierungsstufen des Uracils.

Da cytotatische Verbindungen oft durch Eingriff in die glycolytischen Abbauewege zum Anstau von Fructosediphosphat und Triosephosphat führen, untersuchten wir auch den Einfluß von ‚Hydrazin‘

und ‚Hydrazon‘ auf die Konzentrationen dieser Metaboliten in der Hefe sowie auf aerobe Glykolyse und Atmung. Hier dienten einige einfache Alkylhydrazine als Vergleichssubstanzen.

Material und Methoden

Bezüglich der verwendeten Hefe, der Testsubstanzen und der Nährlösung s. l. c.¹.

Markierte Verbindungen

[$6\text{-}^3\text{H}$]Uracil 190 mCi/mg; L-[$U\text{-}^{14}\text{C}$]Leucin 348 mCi/mmol. Fa. Amersham Buchler, Braunschweig.

Synchronisation

Es wurden nach einem von uns beschriebenen Verfahren³ durch fraktionierte Zentrifugation kleine Hefezellen mit einem Durchmesser von $3,5\text{ }\mu\text{m}$ gewonnen.

Versuchsansatz zur Bestimmung der Einbauhemmung

Die erhaltenen kleinen Hefezellen wurden 0,1-prozentig (ca. $1,5 \times 10^4$ Zellen/ mm^3) in Glucose-Salzlösung nach Williamson und Scopes bei 30°C unter kräftiger Luftdurchperlung bei Vorschaltung einer Waschflasche gehalten. Die Vermehrungsfaktoren Vitamin B_1 , B_6 und Biotin wurden zu Versuchsbeginn der Nährlösung zugesetzt. Unter diesen Bedingungen beginnt nach 3 Stunden bei der Kontrolle die DNA-Synthese. Nach Abnahme eines Ausgangs-

Sonderdruckanforderungen an Dr. R. Braun, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Lahnberge, D-3550 Marburg.

* Im folgenden Text als ‚Hydrazin‘ bezeichnet.

** Im folgenden Text als ‚Hydrazon‘ bezeichnet.

wertes bei der Kontrolle und den Testansätzen wird soviel Testsubstanz zugesetzt, daß eine 10^{-3} M Endkonzentration entsteht. In bestimmten Zeitabständen (s. Ergebnisse) werden je Ansatz 2mal 3 ml Suspension entnommen und 5 min mit 5 μ Ci [$6\text{-}^3\text{H}$]Uracil bzw. 0,1 μ Ci L-[U- ^{14}C]Leucin bei 30 °C im Schüttelbad inkubiert. Anschließend wird unter Eiskühlung mit 7 ml eiskalter isotonischer NaCl-Lösung versetzt, 3 min bei $3000 \times g$ in der Kälte zentrifugiert, das Sediment mit 10 ml kalter NaCl-Lösung 2 min resuspendiert und erneut bei $3000 \times g$ zentrifugiert. Im Überstand befinden sich die säurelöslichen Nukleobausteine. Er wird vollständig abgehoben, mit Kalilauge neutralisiert und nach Abzentrifugieren des ausgefallenen Perchlorates 1 ml der Lösung nach Zusatz von 10 ml Bray-scher Lösung⁴ zur Aktivitätsbestimmung im N.C. Mark II verwendet.

Das HClO_4 -Sediment wird mit 3 ml 0,5 N Natronlauge bei Zimmertemperatur gerührt und 1 ml analog dem HClO_4 -Überstand zur Aktivitätsbestimmung verwendet.

Zur Beurteilung der Hemmwirkung wird zu jedem gemessenen Zeitpunkt die Aktivitätsrate der Probe zum Meßergebnis der Kontrolle in Prozent ausgedrückt. Die Summe der HClO_4 -löslichen und der in Natronlauge löslichen Aktivität ergibt die aufgenommene Gesamtaktivität.

RNA- und Proteinbestimmung

Die RNA wurde mit der Orcinmethode nach Barrenheer und Peham sowie das Protein nach Weichselbaum bestimmt. Näheres über die Methode s. l. c.³.

Verteilung der säurelöslichen Aktivität auf U, UMP, UDP und UTP

Zur Bestimmung der Aktivitätsverteilung auf Uracil sowie seinem Mono-, Di- und Triphosphat wurde der neutralisierte säurelösliche Extrakt an einer PEI-Cellulose-Säule nach Pflüger⁵ aufgetrennt. Dieses Verfahren erlaubt es, den Säureextrakt in Basen, Nukleoside und die einzelnen Mono-, Di- und Triphosphate aufzutrennen. Zur Gewinnung des Säureextraktes wurden 150 ml der Hefesuspension 2 Stunden mit der jeweiligen Testsubstanz inkubiert, anschließend für 15 min mit 150 μ Ci [$6\text{-}^3\text{H}$]Uracil versetzt und dann, wie oben beschrieben, der Säureextrakt gewonnen. Der HClO_4 -Extrakt wurde vorsichtig mit Kalilauge neutralisiert, der Überstand lyophilisiert, der Rückstand in 2 ml Aqua dest. aufgenommen und zur Säulenchromatographie verwendet.

Messung von Atmung und aerobe Glykolyse

Atmung und aerobe Glykolyse wurden mit einer üblichen Warburg-Apparatur untersucht⁶. Zur Messung wurden die synchronisierten Hefezellen in 0,3-prozentiger Suspension 1 Stunde im Nährmedium mit der jeweiligen Testsubstanz vorinkubiert. Die Meßzeit betrug 1 Stunde. Zu Beginn und am Ende der Meßzeit wurde im Inkubationsansatz das Hefegewicht bestimmt und der O_2 -Verbrauch bzw. die CO_2 -Bildung auf das Hefegewicht bezogen. Die bei der behandelten Hefe gefundenen Werte wurden zur Kontrolle in Relation gesetzt.

Bestimmung von Fructose-1,6-diphosphat und Triosephosphat

300 mg synchronisierte Hefezellen wurden in 100 ml Nährlösung mit Vermehrungsfaktoren 20 min bei 30 °C inkubiert und die erste Probe entnommen (O-Wert). Dann erfolgte der Substanz-zusatz, so daß eine Konzentration von 10^{-3} mol/l vorlag.

Zur Messung wurden 9 ml der Suspension direkt in 1 ml 60-prozentige eisgekühlte Perchlorsäure gequirlt und die Mischung 5 min gerührt. Anschließend wurde 9 min mit Ultraschall unter Eiskühlung beschallt, erneut 15 min unter Kühlung gerührt und bei $4000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die Metaboliten bestimmt⁷.

ATP-Bestimmung

Zur ATP-Messung wurde der Perchlorsäureüberstand abgehoben, auf pH 3,5 eingestellt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 1 ml Aq. dest. aufgenommen, bei $2000 \times g$ zentrifugiert und aus dem Überstand das Triphosphat bestimmt⁸.

Ergebnisse

Aufnahme von [$6\text{-}^3\text{H}$]Uracil in synchronisierte Hefe

Das ‚Hydrazon‘ übt einen sehr schnell eintretenden Effekt auf die RNA-Einbaurate aus. Bereits nach 30 min ist mit 80 Prozent die Hemmung fast maximal. Dagegen stellt sich unter ‚Hydrazin‘ erst nach Ablauf der ersten Stunde ein deutlicher Unterschied zur Kontrolle ein, der gegen Versuchsende den das ‚Hydrazons‘ in etwa erreicht. Beim N,N-Dimethylhydrazin tritt zwar auch eine rasch eintretende Hemmung auf, sie erreicht aber nicht die des ‚Hydrazons‘ und ist nach 2 Stunden völlig abgeklungen (Abb. 1).

Auf den säurelöslichen Pool übt ebenfalls das ‚Hydrazon‘ den größten Einfluß aus. Die maximale

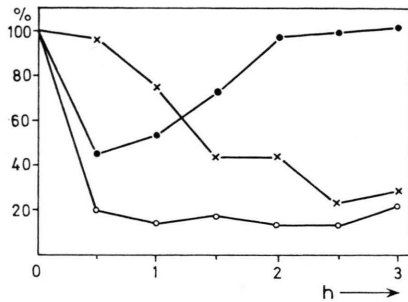


Abb. 1. Einbaureate von $[6\text{-}^3\text{H}]\text{Uracil}$ in die RNA synchron wachsender Hefe unter dem Einfluß von 10^{-3} mol/l. N-Methyl-N'-β-chloräthylhydrazin-HCl (x-x); N-Methyl-N'-β-chloräthylbenzaldehydhydrazon-HCl (o-o); N,N-Dimethylhydrazin (●-●).

Hemmung wird nur etwas später erreicht. Beim 'Hydrazin' und Dimethylhydrazin kommt es sogar zunächst zu einer leichten Aktivitätsanhäufung, die beim Dimethylhydrazin bis zum Versuchsende bestehen bleibt (Abb. 2).

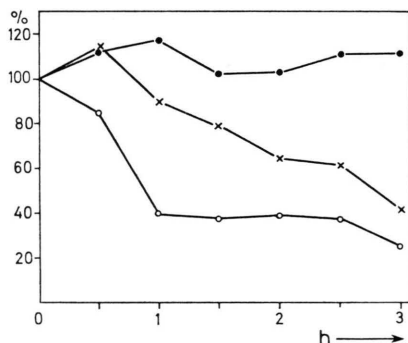


Abb. 2. Gehalt an markierten Nucleo-Precursoren im HClO_4 -löslichen Zellpool synchron wachsender Hefe nach Markierung mit $[6\text{-}^3\text{H}]\text{Uracil}$ (weitere Erklärung s. Legende Abb. 1).

Aufnahme von $[6\text{-}^3\text{H}]\text{Uracil}$ in unsynchronisierte Hefe

Da bei der synchron wachsenden Hefe die Kontrolle ab der dritten Stunde in die Sprossungsphase mit DNA-Replikation übergeht, ist ein Vergleich über diesen Zeitpunkt hinaus mit sich nicht teilender Hefe unsinnig. Folglich wurde die Beobachtung über einen längeren Zeitraum an unsynchronisierter Hefe durchgeführt, wobei wir die Untersuchungen auf 'Hydrazin' und 'Hydrazon' beschränkten. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, wirkt auch hier das 'Hydrazon' am stärksten. Der maximale Hemmeffekt wird jetzt aber erst nach 1,5 Stunden erreicht und bis zum Versuchsende aufrecht erhalten. Der Einfluß des

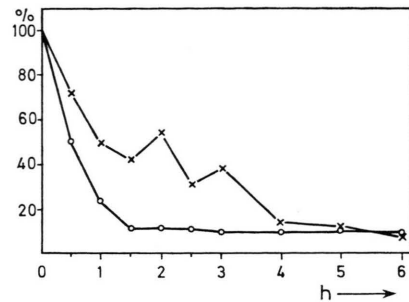


Abb. 3. Einbaureate von $[6\text{-}^3\text{H}]\text{Uracil}$ in die RNA unsynchron wachsender Hefe (weitere Erklärung s. Legende Abb. 1).

'Hydrazins' dagegen wird gegenüber synchron wachsenden Hefezellen schneller manifest und erreicht nach 4 Stunden etwa seine größte Wirkung.

Aufnahme von $\text{L-}[U\text{-}^{14}\text{C}]\text{Leucin}$ in synchronisierte Hefe

Wie beim Uracil-Einbau wird auch die Proteinmarkierung vom 'Hydrazon' am stärksten unterdrückt. Die Wirkung tritt jedoch verzögert und in abgeschwächter Form ein. Die größte Hemmrage ist nach 1,5 Stunden erreicht. Der Hemmeffekt des 'Hydrazins' stellt sich analog der RNA-Hemmung langsamer ein und ist weniger stark ausgeprägt als beim 'Hydrazon'. Das Dimethylhydrazin ist praktisch ohne Einfluß auf die Proteinsynthese (Abb. 4).

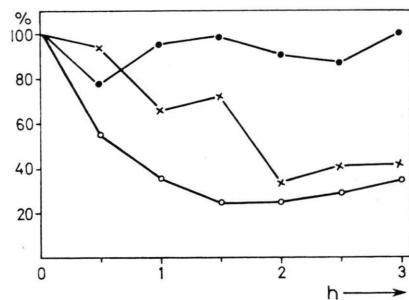


Abb. 4. Einbaureate von $\text{L-}[U\text{-}^{14}\text{C}]\text{Leucin}$ in das Protein synchron wachsender Hefezellen (weitere Erklärung s. Legende Abb. 1).

Die Aktivitätsaufnahme in den Zellpool zeigt einen weitgehend analogen Verlauf zu den Einbaureaten in das Protein. Allerdings ist hier zwischen 'Hydrazin' und 'Hydrazon' bezüglich der Wirkung kein Unterschied festzustellen (Abb. 5).

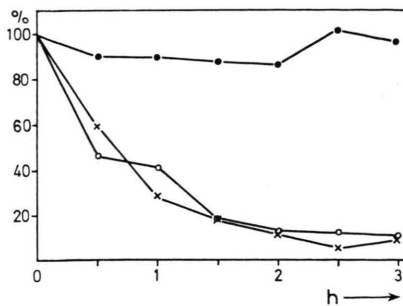


Abb. 5. Aufnahme von L-[U-¹⁴C]Leucin in den HClO₄-löslichen Zellpool synchron wachsender Hefe (weitere Erklärung s. Legende Abb. 1).

Aufnahme von L-[U-¹⁴C]Leucin in unsynchronisierte Hefe

Auch hier kommt es beim ‚Hydrazon‘ ähnlich der RNA-Synthese zu einer gewissen Verzögerung des Wirkungseintritts gegenüber dem unter synchronen Verhältnissen. Nach 3 Stunden ist die Hemmung aber unter beiden Bedingungen nahezu gleich. Beim ‚Hydrazin‘ finden sich ebenfalls der RNA-Synthese vergleichbare Verhältnisse. Die Wirkung tritt etwas schneller ein und ist stärker ausgeprägt. (Abb. 6).

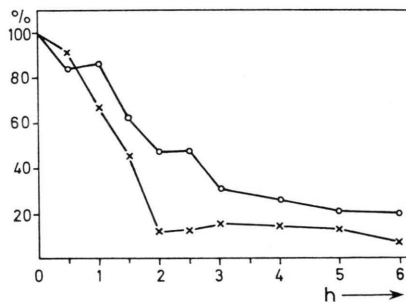


Abb. 6. Einbauraten von L-[U-¹⁴C]Leucin in das Protein unsynchron wachsender Hefe (weitere Erklärung s. Legende Abb. 1).

Säulenchromatographische Nucleotidauftrennung

Eine Einbauhemmung von markiertem Uracil in die laufende RNA-Synthese kann durch verminderte Syntheseaktivität oder mangelnde Möglichkeit der Verwertung des angebotenen Uracils bedingt sein. Dies wäre in Form einer Phosphorylierungshemmung denkbar.

Die Aktivitätsverteilung im säurelöslichen Zellpool auf Uracil/Uridin einerseits und Uridin-, Mono-, Di- und Triphosphat andererseits zeigt Tab. I auf.

Tab. I. Absolute und prozentuale Aktivitätsverteilung auf Uracil/Uridin und Uridin-Mono-, Di- und Triphosphat nach Markierung mit [6-³H]Uracil.

	Uracil+ Uridin	UMP	UDP	UTP
Kontrolle	9	31	8	52
	100	100	100	100
N-Methyl-N'- β-chloräthyl- hydrazin-HCl	39	30	9	22
	456	97	125	40
N'-Methyl-N'- β-chloräthyl- benzaldehyd- hydrazon-HCl	12	40	10	38
	134	132	138	72
N,N-Dimethyl- hydrazin	11	42	8	39
	133	137	100	73

Auffallend ist der Stau im Basenteil unter der Einwirkung von ‚Hydrazin‘ bei starker Verminderung des Triphosphatanteils. ‚Hydrazon‘ und Dimethylhydrazin verursachen den gleichen Effekt, aber in wesentlich geringerem Ausmaß.

Einfluß auf aerobe Glykolyse und Atmung

Wachstumshemmung und Unterdrückung von Zellteilung geht oft einher mit Beeinflussung von Glykolyse und Atmung. Folglich bestimmten wir ihre Größe unter dem Einfluß von ‚Hydrazin‘ und ‚Hydrazon‘ sowie Hydrazin und einigen Alkylhydrazinen. Da sich die Hefegewichte von Kontrolle und Probe während der Vorinkubation und der Versuchsdauer unterschiedlich entwickeln, wurde nach Versuchsende das Hefegewicht aus einem parallel laufenden Ansatz ermittelt und die gebildete CO₂-Menge bzw. der O₂-Verbrauch mit dem Faktor K/P multipliziert.

Wie aus Abb. 7 hervorgeht, tritt bei ‚Hydrazin‘ (P₁) zugunsten verstärkter Atmung eine mittlere Glykolysehemmung auf. Beim ‚Hydrazon‘ (P₂) werden Glykolyse und Atmung nur unwesentlich gesteigert und die beiden Dimethylhydrazine verhalten sich beiden Stoßwechselgrößen gegenüber inaktiv. Äthylhydrazin und einfaches Hydrazin greifen dagegen nachhaltig hemmend in die Glykolyse ein bei leichter Atmungssteigerung. Es fällt auf, daß alle diejenigen Substanzen, mit Ausnahme des asymmetrischen Dimethylhydrazins, über eine Glykolysehemmung verfügen, die gleichzeitig eine freie NH₂-Gruppe besitzen. Am Beispiel des Hydrazins (P₆ und P_{6a}) werden die unterschiedlichen Ergebnisse mit (P₆) und ohne (P_{6a}) des entwickelten Hefegewichtes aufgezeigt.

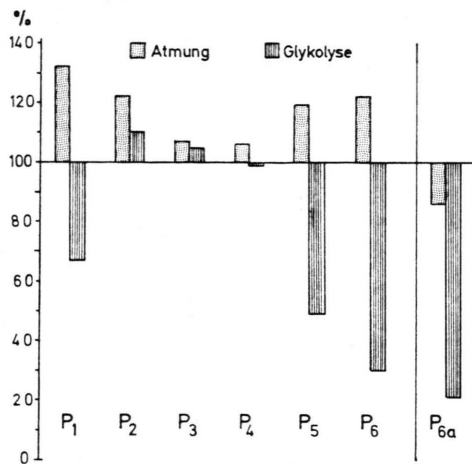


Abb. 7. Beeinflussung von Atmung und Glykolyse synchron wachsender Hefe durch: P₁, N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin; P₂, N'-Methyl-N'- β -chloräthylbenzaldehydhydrazon; P₃, N,N-Dimethylhydrazin; P₄, N,N'-Dimethylhydrazin; P₅, Äthylhydrazin; P₆, Hydrazin mit — und P_{6a}, Hydrazin ohne Berücksichtigung der Gewichtsentwicklung.

FDP, TP und ATP-Bestimmung

Viele cytostatische Verbindungen, vor allem Alkylantien, führen durch Eingriffe in die glykolytischen Abbauwege, zumindest bei der Krebszelle zu einem Anstau von Fructosediphosphat und Triosephosphat; so auch das Procarbazin¹¹ und einfache Alkylhydrazine¹².

Wie aus Tab. II hervorgeht, ist dies unter ‚Hydrazin‘ und ‚Hydrazon‘ bei der Hefe nicht der Fall. So

Tab. II. Konzentration von Fructose-1,6-diphosphat (FDP), Triosephosphat (TP) und Adenosintriphosphat (ATP) in synchronisierter Hefe unter 10^{-3} mol/l N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin und N'-Methyl-N'- β -chloräthylbenzaldehydhydrazon. Kontrollwerte: 1,21–1,61 μ mol/g FDP; 0,45–0,65 μ mol/g TP; 2,28–2,62 μ mol/g ATP, Hefe.

Zeit [min]	FDP [%]		Triose [%]		ATP [%]	
	‚Hy- dra- zin‘	‚Hy- dra- zon‘	‚Hy- dra- zin‘	‚Hy- dra- zon‘	‚Hy- dra- zin‘	‚Hy- dra- zon‘
0	100	100	100	100	100	100
20	108	115	124	110	96	120
40	105	112	124	88	125	156
60	100	92	93	67	112	134
80	76	81	78	78	128	129
100	76	108	86	97	119	132
120	62	121	116	140	85	121

läßt das ‚Hydrazon‘ die FDP-Konzentration nahezu unbeeinflusst und unter der Einwirkung von ‚Hydrazin‘ kommt es gegen Versuchsende sogar zu einem

mäßigen Konzentrationsabfall. Auch die Triosen bleiben, wenn man von einem intermediär auftretenden leichten Abfall unter ‚Hydrazon‘ absieht, unbeeinflusst. Der ATP-Gehalt weicht ebenfalls nicht deutlich von dem der Kontrolle ab. Unter ‚Hydrazon‘ liegt der höchste Anstieg bei 156% nach 40 min. Dieser Wert könnte in einer gewissen Relation zum tiefsten Triosegehalt (67%) unter ‚Hydrazon‘ nach 60 min stehen. Mit diesen Ergebnissen korrelierten *in vitro* Studien an der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase analog Weitzel und Schaege¹³, die zu keiner Aktivitätshemmung dieses Enzymes unter dem Einfluß von ‚Hydrazin‘ und ‚Hydrazon‘ führten.

Diskussion

Sowohl die Uracil- als auch die Leucineinbauhemmung in die Zellen synchron wachsender Hefezellen tritt unter N'-Methyl-N'- β -chloräthylbenzaldehydhydrazon-HCl (‚Hydrazon‘) rasch ein. Dies gilt für den hochmolekularen Bereich und auch für den HClO₄-löslichen Zellpool. Das N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin-HCl (‚Hydrazin‘) zeigt ein qualitativ gleiches Wirkungsbild. Allerdings tritt der Hemmeffekt später ein und die Verminderung erfolgt nicht abrupt sondern stetig. Die endgültig erreichte Hemmung ist bei Versuchsende der des ‚Hydrazons‘ vergleichbar. Die Wirkung des N,N-Dimethylhydrazins ist nur kurzfristig ausgebildet und beschränkt sich auf den hochmolekularen Bereich. Im Vergleich zu synchronisierter Hefe tritt die Beeinflussung der RNA-Synthese und auch der Proteinsynthese durch ‚Hydrazin‘ rascher ein. Umgekehrt verzögert sich der Wirkungseintritt beim ‚Hydrazon‘. Daraus muß geschlossen werden, daß das ‚Hydrazon‘ bei kleinen Zellen spezifischer in das Wachstum eingreift, während das ‚Hydrazin‘ stärker bei ausgereiften und sich in der Teilungsphase befindlichen Zellen wirksam wird. In einer gleichzeitig an Ehrlich-Ascitescarcinomzellen durchgeführten Untersuchung⁹ konnte gezeigt werden, daß das ‚Hydrazin‘ bezüglich der DNA-Synthesehemmung das ‚Hydrazon‘ übertrifft. Trifft dies auch für die Hefe zu, so ist das unterschiedliche Verhalten gegenüber synchronen und asynchronen Hefekulturen verständlich.

Da, wie die Aufnahmezeiten in den säurelöslichen Zellpool synchron wachsender Zellen ergaben, diese unter ‚Hydrazon‘ im Gegensatz zum ‚Hydrazin‘ sofort rasch absinken, ist anzunehmen, daß bereits der

Influx der Zellbausteine durch das ‚Hydrazon‘ behindert wird; die Aufnahmeraten unter ‚Hydrazin‘ dagegen fallen erst nach einer Stunde ab. Bei der Uracil-Markierung kommt es sogar zu einem Anstau. Dies läßt auf einen Angriff in der RNA-Synthese schließen; auf welcher Stufe, muß offenbleiben.

Die Auftrennung der Aktivität im Nukleotidpool erbrachte beim ‚Hydrazin‘ eine auffallend starke Senkung des Triphosphatanteils zugunsten nicht phosphorylierter Anteile. Bei den anderen Testsubstanzen wird lediglich die Triphosphatstufe in geringerem Maße gebildet.

Beim Studium von Glykolyse und Atmung fällt die gemeinsame Hemmung der Glykolyse zugunsten der Atmung bei allen Hydrazinen mit freier NH_2 -Gruppe auf. Dieser Effekt nimmt mit zunehmender Alkylierung ab. Da das ‚Hydrazin‘ im Gegensatz zum Dimethylhydrazin ebenfalls diese Erscheinung zeigt, kann geschlossen werden, daß relativ rasch aus dem ‚Hydrazin‘ eine Monoalkylhydrazinverbindung entsteht. Die Hemmung der Glykolyse ist dem-

nach eine Funktion dieser freien NH_2 -Gruppe. Entsprechend muß der Einfluß auf die RNA- und Proteinsynthese auf die N-Methyl-N- β -chloräthylgruppierung zurückzuführen sein, da das ‚Hydrazon‘, wie Untersuchungen ergaben¹⁴, über einen Zeitraum von mehreren Stunden unter Versuchsbedingungen kein Benzaldehyd in photometrisch nachweisbaren Mengen abspaltet.

Der Eingriff von Hydrazinen mit freier NH_2 -Gruppe ist nach Schmid und Müller¹² möglicherweise in der Bildung von Hydrazonen der Hexose- und Triosephosphatester zu suchen. Wir konnten allerdings eine wesentliche Veränderung dieser Metabolitkonzentrationen in den behandelten Zellen gegenüber der Kontrolle nicht feststellen. Da auch die ATP-Konzentrationen nur unwesentlich von der Kontrolle abweichen, muß der Grund für die Wachstums- und Vermehrungshemmung der Hefe durch ‚Hydrazin‘ und ‚Hydrazon‘ an anderer Stelle gesucht werden. Sie wird nicht durch einschneidende Veränderung im Stoffwechsel verursacht.

¹ R. Braun u. H. Lange, Z. Naturforsch. **31 c**, 292 [1976].

² R. Braun u. G. Wolf, Z. Krebsforsch. [1976], im Druck.

³ R. Braun, W. Schmid u. K. Stossek, Z. Naturforsch. **30 c**, 245 [1975].

⁴ G. A. Bray, Anal. Biochem. **1**, 279 [1960].

⁵ K. H. Pflüger, Humanbiologische Inaugural-Dissertation, Marburg 1975.

⁶ E. Bamann u. K. Myrbeck, Manometr. Methoden **Bd. 1**, p. 989, Thieme Verlag, Leipzig 1941.

⁷ G. Michal u. H. O. Beutler, Methoden der enzymatischen Analyse, H. U. Bergmeyer, hrsg., **Bd. II**, p. 1359, Verlag Chemie, Weinheim 1974.

⁸ D. Jaworek, W. Gruber u. H. D. Bergmeyer, *ibid.* **Bd. II**, p. 2147.

⁹ R. Braun, U. Mangold u. R. Mangold, Z. Krebsforsch. [1976], im Druck.

¹⁰ K. Weber, Humanbiologische Inaugural-Dissertation, Marburg, in Vorbereitung.

¹¹ G. Weitzel, F. Schneider, A.-M. Fretzdorff, K. Seynche u. H. Finger, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie **336**, 271 [1964].

¹² E. Müller, Med. Inaugural-Dissertation, Marburg 1960.

¹³ G. Weitzel u. W. Schaeg, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie **316**, 250 [1959].