

ADENOSINTRIPHOSPHAT ALS BETRIEBSSTOFF VON ZELLBEWEGUNGEN

von

HARTMUT HOFFMANN-BERLING

*Physiologisches Institut der Universität Tübingen und Institut für Virusforschung
in Heidelberg (Deutschland)*

I

Weil die Energie aller bekannten energieliefernden Stoffwechselprozesse im energiereichen Phosphat des Adenosintriphosphats (ATP) eingefangen wird, wird meist angenommen, dass die ATP-Spaltung die unmittelbare Energiequelle der vitalen chemischen, mechanischen und osmotischen Arbeit sei¹. Diese Annahme ist für den Arbeitsaufwand chemischer Synthesen und Reduktionen vielfältig bewiesen¹.

Erst in jüngster Zeit ist es dagegen gelungen, zu zeigen, dass auch für die mechanische Arbeit des Muskels der ganze energieliefernde Stoffwechsel entbehrlich ist, falls den kontraktilen Muskelproteinen ATP angeboten wird^{2,3,4}.

Es ist von Interesse zu erfahren, ob das gleiche auch für die übrigen Formen vitaler mechanischer Arbeit gilt. Deshalb wurde geprüft, ob es möglich sei, ATP als Betriebsstoff für die folgenden 4 typischen Fälle zu verwenden: 1. für die Zellkontraktion, durch die sich epitheliale wie fibroblastische Gewebekulturzellen auf die Teilung vorbereiten; 2. für die Chromosomenbewegung in der Anaphase; 3. für die Zyttoplasmadurchschnürung nach abgeschlossener Kernteilung; 4. für Geisselbewegungen.

Diese Prüfung ist auch deshalb wichtig, weil schon sehr lange erörtert wird, wie weit den Bewegungen der Zellen und der Muskeln der gleiche Fundamentalprozess zugrunde liegt (HEIDENHAIN⁵, HILL⁶, BRACHER⁷). Dass nicht nur die Muskelkontraktion sondern auch manche Zellbewegungen durch hohen mechanischen Druck beeinflusst werden, ist von MARSLAND⁸ beobachtet worden. Ebenfalls aus den letzten Jahren stammen Untersuchungen mit dem Ziel, für die Zellbewegung eine ähnliche Bedeutung des ATP wahrscheinlich zu machen wie für die Muskelbewegung—and zwar von GOLDACRE UND LORCH⁹ und besonders von LETTRÉ¹⁰. LETTRÉ verwendete wahlweise und kombiniert Atmungs- und Glykolysegefäße, um Fibroblastenkontraktionen herbeizuführen oder unmöglich zu machen. Er ordnete auf Grund der bekannten Zusammenhänge zwischen Atmung, Glykolyse und ATP-Resynthese den Giftwirkungen in plausibler Weise Minderung oder Vernichtung des zellulären ATP-Bestandes zu. Er kam so zu der Folgerung, dass die Abrundung von ausgebreiteten Fibroblasten zu kuglichen Zellen durch eine Herabsetzung der ATP-Spiegels bewirkt werde, während vollständige Vernichtung des ATP-Bestandes die Zellen unbeweglich mache.

Doch lässt sich auch direkt zeigen, dass für die Zellbewegungen der ganze energieliefernde Stoffwechsel ebenso entbehrlich ist wie für die Muskelkontraktion, falls nur ATP anwesend ist.

II

Denn die Motilität der Zellen überdauert den Tod der Zellen wie die Motilität der Muskeln deren Tod überdauert, falls bei der Tötung die kontraktile oder motorisch wirksamen Strukturen intakt bleiben. Werden Gewebekulturen durch Extraktion mit wässrigen Glycerinlösungen abgetötet und von ihren Kristalloiden und einem Teil ihrer Kolloide befreit, so bleiben sie bei Aufbewahrung in 50%igem Glycerin (Vol. %) über Monate fähig, auf ATP-Zusatz bestimmte Zellbewegungen auszuführen.

Dies gilt für 1. Hühnerfibroblasten aus Amnion, Sclera, Milz, subcutanem Bindegewebe, Skelett- und Herzmuskel sowie Osteoblasten; 2. für Fibroblasten aus lymphogranulomatösem Lymphknoten des Menschen; 3. für Epithelzellen aus Amnion, Retina und Epidermis des Huhnes und 4. in der

Literatur S. 194.

Kultur überlebende Zellen aus Ehrlich-Ascitestumor der Maus. Modelle aus Epithelzellen sind nur beweglich, wenn sie nicht im Verband liegen.

Die Zahl der voraufgegangenen Passagen des betreffenden Gewebestammes *in vitro* ist ohne Einfluss.

Wir bezeichnen die in dieser Weise extrahierten Zellstrukturen fernerhin als Zellmodelle — in Analogie zu den Fasermodellen aus quergestreiften oder glatten Muskeln.

III

In Modellen, die aus Zellen in den mittleren Stadien der Anaphase hergestellt sind (vergl. Fig. 1a), bewegen sich die Chromosomensätze in einer geeigneten z.B. $1.5 \cdot 10^{-3} M$ ATP-Lösung (0.21μ , pH 7.1) auseinander (Fig. 1b) — nicht selten weit über das physiologische Mass hinaus. Infolgedessen reisst die Zelle nicht selten bis auf den Spindelkörper durch. Solche exzessiven Anaphasenbewegungen finden sich allerdings nur, wenn eine gewisse Verfestigung des umgebenden Cytoplasma aufgehoben wird, die sich während der Glycerinextraktion einstellt. Art und Ausmass der Bewegung sprechen dafür, dass das hier beobachtete Auseinanderweichen der Chromosomensätze nicht

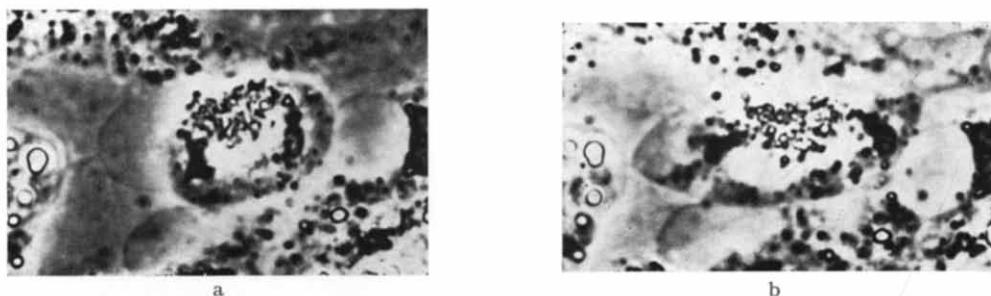


Fig. 1. Anaphasebewegung am Zellmodell durch ATP. (Subcutisfibroblast). Ionenstärke 0.21μ , pH 7.1, $37^\circ C$. a. ohne ATP; b. 5 min. nach Zugabe von $1.5 \cdot 10^{-3} M$ ATP.

durch einen Zug von den Spindelpolen her erfolgt, sondern durch einen Druck des interchromosomalen Anteils des Spindelapparates. Dies steht in Übereinstimmung mit den Folgerungen, die BELAR¹¹ schon vor langer Zeit aus gewissen Beobachtungen an lebenden Zellen zog.

IV

Für den hier beschriebenen zweiten Teil der Anaphasebewegung ist also ATP der unmittelbare Betriebsstoff. Der oxydative oder glykolytische Zellstoffwechsel, der für den Ablauf dieser Bewegungen in der lebenden Zelle unentbehrlich ist, dient offenbar nur der notwendigen Synthese oder Resynthese des ATP.

Ferner beweist der Modellversuch, dass die geschilderte Bewegung auf der Erzeugung eines vektoriellen Drucks durch eine Reaktion zwischen kolloidaler Struktur und ATP beruht, und nicht auf einem Wachstum des interchromosomalen Spindelanteils durch Einbau von Protein, wie es bisher für möglich gehalten wurde. Dies bedeutet aber gleichzeitig, dass der Mechanismus des zweiten Teils der Anaphasebewegung von dem Mechanismus der Muskel- und Zellkontraktion verschieden sein muss.

V

Der Anaphasebewegung des Modells unter ATP folgt nicht selten der Beginn der Durchschnürung des Cytoplasma (Fig. 2a, b). Hier mag es sich um eine Kontraktion zirkulärer äquatorialer Fäden handeln. Doch ist diese Modellbewegung noch nicht näher analysiert.

Auch die abgetrennten Schwänze durch Saponin oder durch Extraktion abgetöteter Spermatozoen führen noch nach 2-wöchiger Aufbewahrung in Glycerin ihre typischen Geisselbewegungen aus, wenn sie mit ATP durchtränkt werden. Die Frequenz der Bewegungen, nicht die Bewegungsgröße nimmt dabei mit steigender ATP-Konzentration zu. Es ist eine spezielle Fähigkeit dieses Modells — und nur dieses Modells — unter ATP spontan rhythmische Bewegungen auszuführen statt einer einmaligen Kontraktion. Das Proteinsystem scheint hier komplexer zu sein. Infolgedessen ist die Flagellabewegung nicht unmittelbar mit der Bewegung der Muskelmodelle zu vergleichen. Auf jeden Fall handelt es sich aber um eine Bewegung durch ATP.

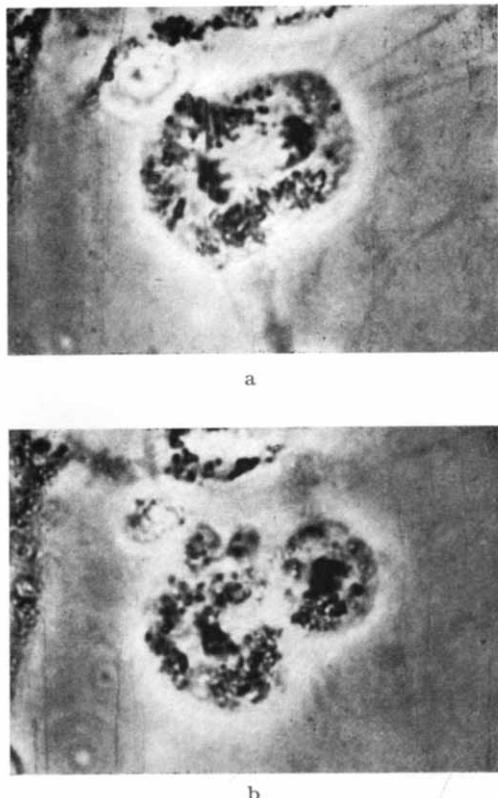


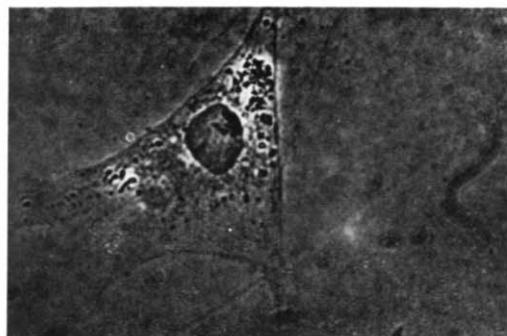
Fig. 2. Cytokinese am Zellmodell durch ATP (Sclerafibroblast). Ionenstärke 0.12μ , pH 7.1, 37°C . a. ohne ATP; b. 5 min. nach Zugabe von $1.5 \cdot 10^{-3} M$ ATP.

VI

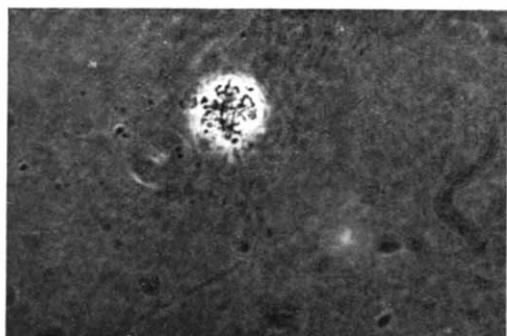
Die Bewegung, durch die aus der immer flachen und häufig sehr langen Interphaseform der Fibroblasten kurz vor der Kernteilung eine fast kugelförmige Zelle wird, sieht wie eine Kontraktion aus. Doch ist keineswegs allgemein anerkannt, dass die kontraktile Strukturen selbst sich gerade in diesem Augenblick zusammenziehen. So vertritt LETTRÉ¹⁰ die Meinung, dass der Übergang von der ausgetretenen in die Kugelform auf der Erschlaffung der kontraktile Elemente beruhe. Er zieht diesen Schluss, um zu erklären, dass die Abkugelung der Zelle gerade durch solche Stoffwechselbedingungen ausgelöst werden kann, unter denen ein Absinken des ATP-Spiegels zu erwarten ist. Er nimmt deshalb an, dass die kontraktile Elemente den Zellinhalt einhüllen und durch seitlichen Druck während der Interphase die Zelle strecken. Eine solche Mechanik bereitet der Vorstellung keine Schwierigkeiten, wenn die Zelle in der Interphase die Form einer Spindel mit rundem Querschnitt hat. Die von LEWIS¹² vorgeschlagene und von LETTRÉ übernommene Art der Mechanik ist aber schwer vorstellbar, wenn die Zelle in der Interphase die Form einer flachen, angenähert isoradialen Scheibe hat (vgl. Fig. 3a).

Der Modellversuch zeigt, dass auf ATP-Zusatz alle Zellmodelle aus der Interphaseform in die Kugelform übergehen — gleichgültig, ob sie in der Interphaseform mehr längliche oder mehr runde Scheiben waren (vgl. Fig. 3, 4).

Werden die Modelle durch Einbettung in fibrinreiches Medium in der Ausgangsform festgehalten, so werden die Zellmodelle durch die Gewalt der Kontraktion zerrissen



a



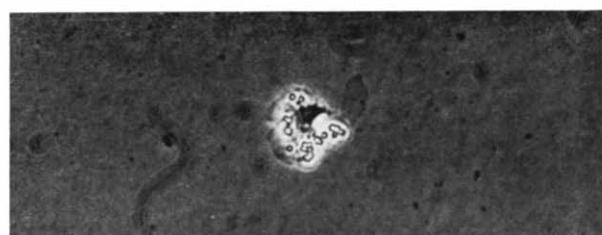
b

(Fig. 5). Und selbst bei Einbettung in verdünntes Plasma bleibt bei der Kontraktion sehr häufig die Zellmembran zurück, sodass auf dem Weg der kontrahierten Zelle der ursprüngliche Zellumriss noch schattenhaft sichtbar ist. Die Formänderung der Zelle erfolgt also mit einer Kraft, die gut durch eine aktive Kontraktion, aber nur schwer durch eine Erschlaffung kontraktiler Elemente erklärbar ist. Da bekanntlich auch viele Arten von Muskelmodellen sich bei der Entwicklung der isometrischen Maximalspannung selbst zerreißen, scheint das Verhältnis von isometrischer Maximalspannung zur Zerreissfestigkeit für Muskel- und Zellmodelle gleich zu sein.

Fig. 3. Kontraktion von Zellmodellen durch ATP (Amnionfibroblasten). Ionenstärke 0.14 μ , pH 7.0, 37° C. a. ohne ATP; b. 12 min. nach Zugabe von $2 \cdot 10^{-3} M$ ATP.



a



b

Fig. 4. Wie Fig. 2. a. ohne ATP; b. 12 min. nach Zugabe von $2 \cdot 10^{-3} M$ ATP.

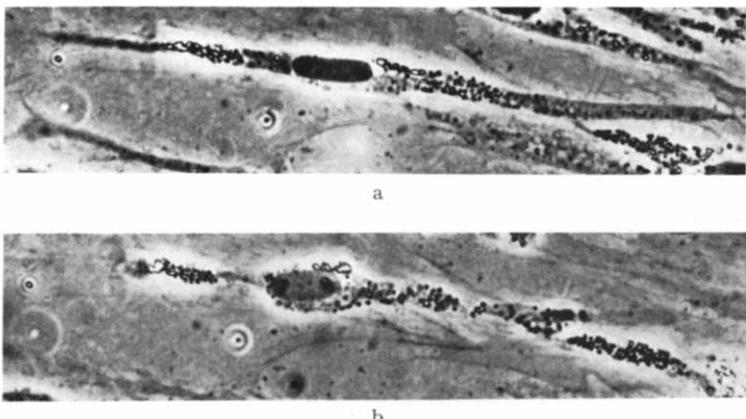


Fig. 5. Isometrische Kontraktion von Zellmodellen durch ATP (Sclerafibrobl.). Die Zellmodelle werden durch Erhöhung des Plasmagehalts im Züchtungsmedium an der Verkürzung gehindert. Ionenstärke 0.17μ , pH 7.2, 37° C. a. ohne ATP; b. 12 min. nach Zugabe von $8 \cdot 10^{-3} M$ ATP.

VII

Da die maximale isometrische Spannung der Zellmodelle nicht gemessen werden kann, wurden die quantitativen Angaben durch Messung der relativen Verkürzung ($AL \times 100/L$, L = Ausgangslänge) an langgestreckten Zellmodellen gewonnen. Die Messung der Verkürzung statt der Spannungszunahme hat allerdings einen Nachteil: Da die Zellmodelle ebenso wie Muskeln²¹ und Muskelmodelle²² nicht in der Lage sind aktiv zu verlängern, kann nicht fest gestellt werden, wie weit die Zellkontraktion reversibel ist.

Quantitative Angaben über die Abhängigkeit der Verkürzung der Zellmodelle von den unabhängigen Variablen (Konzentration des ATP, der Ionen, der Gifte usw.) sind nur dann richtig, wenn die Diffusionsstrecke des ATP kleiner ist als die WARBURG'sche Grenzschichtdicke. Diese Bedingung ist für die Zellmodelle (vertikaler Durchmesser $< 5 \mu$) offenbar gewahrt, solange die ATP-Konzentration nicht kleiner ist als $1 \cdot 10^{-3} M$. Denn das Ausmass der Verkürzung wird durch Steigerung der ATP-Konzentration über $1 \cdot 10^{-3} M$ hinaus nicht mehr erhöht. Das aber sollte der Fall sein, wenn das ATP in der Konzentration $1 \cdot 10^{-3} M$ den Mittelpunkt der Zelle nicht erreicht, weil das ATP bereits unterwegs restlos gespalten wird. Ergebnisse für ATP-Konzentrationen kleiner als $10^{-3} M$ werden infolgedessen in der Regel nicht angeführt.

Die Verkürzung der Zellmodelle hängt in der gleichen charakteristischen Weise von der ATP-Konzentration ab wie die Verkürzung, die Spannung und die ATP-Spaltungsrate der Muskelmodelle. Alle diese Aktivitäten aller dieser Modelle fallen oberhalb einer bestimmten ATP-Konzentration durch Eigenhemmung des Substrates ATP steil ab. Dieser Bereich der Eigenhemmung, der sogenannte überoptimale Bereich der ATP-Konzentration beginnt für Modelle aus Fibroblasten und Skelettmuskeln bei 20° C, neutraler Reaktion und annähernd physiologischer Ionenstärke etwa bei Überschreitung einer ATP-Konzentration von $10^{-2} M$. Mit wachsendem pH, wachsender Ionenstärke und fallender Temperatur verschiebt sich diese Grenze für Zell- und Muskelmodelle in gleicher Weise auf niedrigere Werte der ATP-Konzentration (Fig. 6).

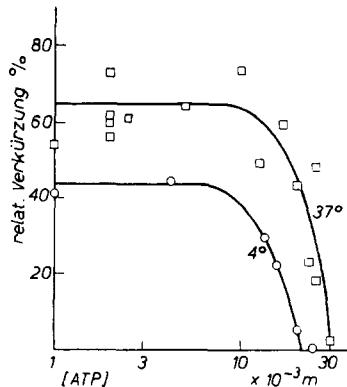


Fig. 6. Abhängigkeit der Kontraktion von der Temperatur: $+ 37^\circ$ C (□); $+ 4^\circ$ C (○). Ionenstärke 0.13μ , pH 7.2, Sclerafibroblasten Huhn, 8 Tage extrahiert.

Im Bereich optimaler ATP-Konzentrationen ist die maximale Verkürzung der Zellmodelle der maximalen Verkürzung der Muskelmodelle gleich. Sie beträgt bei Temperaturen zwischen etwa 20 und 37° C bei beiden Objekten 70–80 % der Ausgangslänge (vgl. Fig. 9). Bei Erniedrigung der Temperatur auf 0° C sinkt der Betrag der maximalen Verkürzung für die Zellmodelle wie für Muskelmodelle² und lebende Muskeln² auf ungefähr drei Viertel der maximalen Verkürzung, die bei 20–37° C erreicht wird (Fig. 6).

Auch mit optimaler ATP-Konzentration nimmt die maximale Verkürzung steil ab, sowie die Reaktion der Lösung deutlich von pH 7 abweicht (Fig. 7). Auch dies ist bei Faser- wie Fadenmodellen des Muskels ähnlich.

Nur die Geschwindigkeit der Verkürzung ist für die Zellmodelle viel kleiner als für Muskelmodelle. Verkürzen sich die Zellen in einem Koagulum, das 25 % Hühnerplasma enthält, so ist die Abrundung der Zellmodelle bei 20 C° in 35 min (Halbwertzeit etwa 7 min), bei 37° C in knapp 10 min abgeschlossen. Der Temperaturkoeffizient der Verkürzungsgeschwindigkeit scheint demnach — ähnlich wie der der Muskelkontraktion — etwa 2 zu betragen.

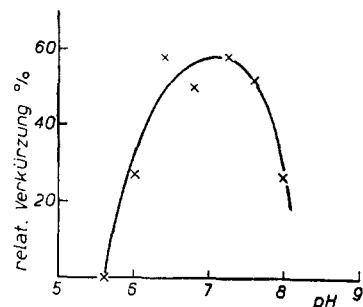


Fig. 7. Abhängigkeit der Kontraktion von der Wasserstoffionenkonzentration. Sclerafibroblasten Huhn, 10 Tage extrahiert. Ionenstärke 0.13μ , $37^\circ C$, $[ATP] = 2.5 \cdot 10^{-3} M$.

VIII

Ausser durch ATP kann die Kontraktion der Zellmodelle — wie die Kontraktion der Muskelmodelle^{2,3} — nur durch ITP (Inosintriphosphat) betrieben werden. Pyrophosphat bis zu einer Konzentration $2 \cdot 10^{-2} M$, Adenosin-3-phosphat und m-Inositolhexaphosphat bis $1 \cdot 10^{-2} M$ sowie Triphosphat und sog. Hexametaphosphat bis $5 \cdot 10^{-3} M$ sind als wirkungslos erprobt.

Völlig gleichartig ist für die Kontraktion der Muskel- und Zellmodelle auch die Art, wie einerseits ITP und Mg^{+2} und andererseits ATP und Mg^{+2} zusammen wirken. Es ist vom Muskel schon lange bekannt, dass eine Modellkontraktion durch ITP nur dann auftritt, wenn Mg -Ionen in höherer Konzentration zugegen sind. Die volle Aktivierung wird erst durch $M/50 Mg^{+2}$ erreicht¹⁸. Fig. 8 zeigt, dass der Mg^{+2} -Bedarf der ITP-Kontraktion der Zellmodelle quantitativ der gleiche ist: auch die Verkürzung der Zellmodelle erreicht unter ITP den gleichen Wert wie unter ATP erst dann wenn $M/50 Mg^{+2}$ zugegen ist (Fig. 8 + 9).

Ersatz des Mg^{+2} durch Ca^{+2} ist völlig wirkungslos (Fig. 8). Auch für die Kontraktion der Muskelmodelle ersetzen Ca -Ionen die Mg -Ionen nicht, obwohl sie die ITP-Spaltung wieder in Gang bringen¹⁸.

Wenn die ITP-Wirkung durch Mg^{+2} voll aktiviert ist, hängt die maximale Verkürzung der Zellmodelle von der ITP-Konzentration in genau der gleichen Weise und genau dem gleichen Umfang ab wie von der ATP-Konzentration (vgl. Fig. 9). Neuere Untersuchungen zeigen, dass das beim Muskelmodell ebenso ist (vgl. II der folgenden Mitteilung von PORTZEHLL). Sie zeigen darüber hinaus, dass die absoluten Werte der maximalen Verkürzung für Muskel und Zellmodelle im überoptimalen wie im optimalen Bereich der ITP und ATP-Konzentration völlig identisch sind.

Unter ATP kontrahieren sich die Muskelmodelle auch ohne Mg^{+2} -Zusatz, aber diese Kontraktion wird durch Zusatz von 10^{-4} bis $10^{-2} M$ Mg^{+2} vergrössert² und durch Vorbehandlung mit Lösungen von Enthärtungsmitteln (Hexametaphosphat und Trilon B = Äthylendiaminotetraacetat-Na) ganz oder fast ganz unterdrückt²². Durch Mg^{+2} -Zusatz wird die Kontraktionsfähigkeit²⁵ wieder hergestellt (vgl. folgende Mitteilung, III).

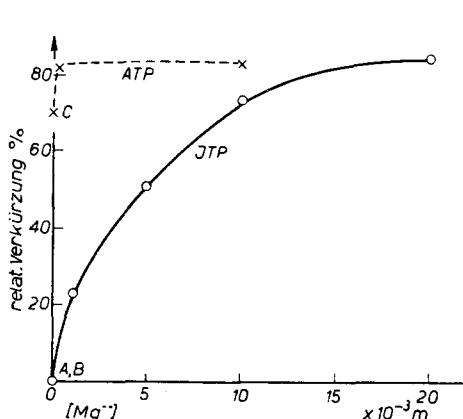


Fig. 8. Abhängigkeit der Kontraktion 32 Tage extrahierter Modelle von der Gegenwart von Mg^{+2} und Ca^{+2} . Bei Kontraktion durch ATP $2 \cdot 10^{-3} M$ (x); bei Kontraktion durch ITP $2 \cdot 10^{-3} M$ (o). Amnionfibroblasten Huhn, Ionenstärke 0.15 μ , pH 7.2, 37° C. Punkt A: $2.5 \cdot 10^{-3} M$ ITP ohne Mg^{+2} , ohne Ca^{+2} -Zugabe. Punkt B: wie A mit $20 \cdot 10^{-3} M$ Ca^{+2} . Punkt C: $2.5 \cdot 10^{-3} M$ ATP ohne Mg^{+2} , ohne Ca^{+2} -Zugabe.

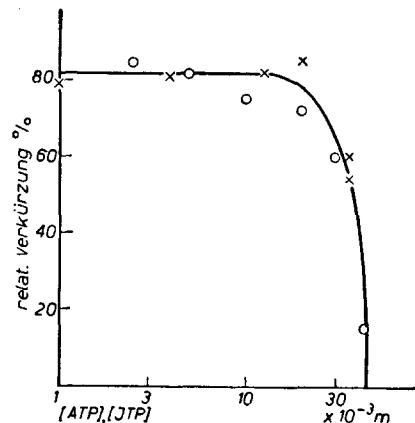


Fig. 9. Abhängigkeit der Kontraktion 39 Tage extrahierter Modelle von der [ATP] (x) und [ITP] (o). Amnionfibroblasten Huhn, Ionenstärke bis zu [ATP] bzw. [ITP] $10 \cdot 10^{-3} M = 0.15 \mu$, bei höheren Konzentrationen bis 0.35 μ ansteigend, pH 7.2, 37° C. [Mg²⁺] bei ATP-Zugabe = $5 \cdot 10^{-3} M$, bei ITP-Zugabe = $15 \cdot 10^{-3} M$.

Genau das gleiche gilt für die Zellmodelle, deren ATP-Kontraktion auch in erdalkalifreien Lösungen stattfindet, durch Mg^{+2} -Zusatz erhöht und durch den Enthärter Trilon B unterdrückt wird (vgl. Tabelle I).

TABELLE I

MAXIMALE VERKÜRZUNG UNTER DEM EINFLUSS DER Mg^{+2} -KONZENTRATION
BEI DER ATP-KONTRAKTION DER ZELLMODELLE

Mg ²⁺ -Konzentration	max. Verkürzung. %
$10^{-2} M$ Mg^{+2}	84
$10^{-4} M$ Mg^{+2}	82
Kein Zusatz	70
$5 \cdot 10^{-3} M$ Trilon B + $2.5 \cdot 10^{-3} M$ Mg^{+2}	45
$5 \cdot 10^{-3} M$ Trilon B	0

Offenbar ist Mg^{+2} für die ATP- wie für die ITP-Kontraktion der Zellmodelle ebenso unentbehrlich wie für die Kontraktion der Muskelmodelle. Und offenbar ist der Mg^{+2} -Bedarf der ITP-Kontraktion bei beiden Modellarten um den gleichen, sehr hohen Betrag grösser als der Mg^{+2} -Bedarf der ATP-Kontraktion. Die völlige Gleichheit in den komplizierten und spezifischen Wechselwirkungen zwischen Mg^{+2} , ATP, ITP und der kontraktionsfähigen Substanz ist also bestätigt.

tilen Struktur der Zelle einerseits und der Muskeln andererseits ist ein besonders starkes Argument für die Identität des Fundamentalprozesses der Muskel- und der Zellkontraktion.

IX

Es zeigt sich, dass die Modelle bei der Kontraktion bisweilen auch im weichen und verhältnismässig plasmaarmen Normalmedium zerreissen. Dies tritt ein 1. wenn die ATP-Konzentration überoptimal ist ($20 \cdot 10^{-3} M$), 2. wenn die Modelle unmittelbar vor der Kontraktion längere Zeit mit $2 \cdot 10^{-2} M$ Pyrophosphat vorbehandelt waren. Außerdem wird durch die Vorbehandlung mit Pyrophosphat die Verkürzungsgeschwindigkeit der ATP-Kontraktion besonders dann gesteigert, wenn die ATP-Konzentration nicht allzu hoch ($< 10^{-3} M$) ist. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die organischen und anorganischen Polyphosphate — ebenso wie für den Muskel und die Muskelmodelle³ — auch für die Zellmodelle "Weichmacher" sind.

Diese Weichmacherwirkung ist mit Sicherheit nicht die Ursache der Zellkontraktion — etwa durch eine gewisse Verflüssigung der Modelle und eine resultierende Freisetzung von Oberflächenkräften. Denn eine Kontraktion lässt sich durch hohe Pyrophosphatkonzentrationen (ohne ATP) nicht hervorrufen und bleibt unter ATP gerade dann aus, wenn die ATP-Konzentration überoptimal und die Weichmacherwirkung durch ATP deutlich wird.

X

Der Ähnlichkeit oder Identität der physiologischen Faktoren, welche die Kontraktion von Zell- und Muskelmodellen beeinflussen, entspricht eine ebenso grosse Gleichartigkeit der toxikologischen Einflüsse (vgl. die folg. Mitt.): das heisst, auch die Kontraktion der Zellmodelle wird bei allen Temperaturen und ATP-Konzentrationen durch $5 \cdot 10^{-4} M$ Salyrgan* und $5 \cdot 10^{-4} M$ Oxarsan** unterdrückt. Eine Konzentration von $7.5 \cdot 10^{-6} M$ Salyrgan hemmt die Verkürzung durch $2 \cdot 10^{-3} M$ ATP nicht oder fast nicht, sie hemmt sie dagegen merklich wenn die ATP-Konzentration auf $15 \cdot 10^{-3} M$ erhöht wird. Die Hemmung der Kontraktion durch Schwermetallgifte wird aufgehoben, wenn eine wesentlich höhere — z.B. die zwanzigfache — Konzentration an Cystein gleichzeitig zugesetzt wird.

Ebenso wie mit metallhaltigen organischen Verbindungen kann die Kontraktion der Zell- wie Muskelmodelle (vgl. die folg. Mitt., IV) auch durch Gifte mit mehreren Sulfogruppen unterdrückt werden: Fuadin, Trypanblau, Trypanrot, Germanin und Liquoid Roche. Fuadin*** ist gleichzeitig auch ein metallhaltiges Gift. Da aber die Giftwirkung durch Cystein nicht aufgehoben werden kann§, sondern nur durch Ca^{+2} oder Auswaschen, scheint die Wirkung nicht auf einer Blockierung der SH-Gruppen durch das Metall, sondern ebenso wie bei den genannten andern Substanzen auf einer Reaktion der Sulfogruppen mit dem kontraktilen Protein zu beruhen (Fig. 10).

Die Giftkonzentrationen gleicher Wirkung fallen mit steigender Zahl der Sulfogruppen in der oben angegebenen Reihenfolge ab. So hemmt $5 \cdot 10^{-4} M$ Germanin ebenso

* Salicyl-(λ -hydroxymercuri- β -methoxypropyl-)amidoorthoacetat.

** m -Amino- p -oxyphenylarsen(III)oxyd.

*** Komplexverbindung von Antimon(III) mit 2 Molekülen Brenzatechindisulfosäure.

§ Durch das SH-Reagens BAL kann die Fuadinwirkung aufgehoben werden¹⁴. Doch kommt diese Entgiftung offenbar zustande, weil BAL das Fuadin fällt und aus der Lösung entfernt. Dagegen ist Fuadin- Ca^{+2} wasserklar löslich.

vollständig wie $2 \cdot 10^{-2} M$ Fuadin. Niedrigere Fuadinkonzentrationen unterdrücken die Kontraktion nur in relativ hochkonzentrierten ATP-Lösungen (vgl. Fig. 10). Alles dies ist beim Muskel ebenso (vgl. die folgende Mitteilung, IV).

Die höher sulfonierten Körper — Trypanrot, Germanin, Liquoid Roche — können ebenfalls durch Auswaschen entgiftet werden. Da diese Körper enorm quellend wirken, kann nicht beurteilt werden, ob auch hier die Hemmung mit der ATP-Konzentration zunimmt.

Die von BOZLER¹⁵ entdeckte reversible Hemmung der Kontraktion von Muskelmodellen durch 1 bis 2 molare Harnstofflösungen findet sich auch bei den Zellmodellen. Die quantitative Analyse ergibt, dass die Hemmung der Zell- wie der Muskelmodelle (vgl. die folg. Mitt., IV) unvollständig ist. Außerdem scheint die Harnstoffhemmung der Zellkontraktion an der Grenze zur optimalen ATP-Konzentration stärker zu sein als bei niedrigen ATP-Konzentrationen (Fig. 10). Die Harnstoffhemmung ist — unabhängig von der ATP-Konzentration — durch Auswaschen, aber nicht durch Ca-Ionen aufzuheben. Doch dürfen die Harnstoffkonzentrationen und die Ionenstärke des Systems nicht zu hoch und die Dauer der Harnstoffeinwirkung nicht zu lang sein.

Wie die Kontraktion der Muskelmodelle¹⁶ wird auch die Verkürzung der Zellmodelle durch Monojodacetat bis zu einer Konzentration von $10^{-2} M$ und durch Colchicin bis zu einer Konzentration von 0.1 mg/ml nicht beeinflusst. Diese Colchicinkonzentration ist mehr als tausendmal so hoch wie die Konzentration, die die Mitose lebender Fibroblasten vollständig hemmt.

XI

BOZLER¹⁷ hat entdeckt, dass sehr kurz extrahierte Muskelmodelle sich in ATP-Lösungen etwa physiologischer Konzentration wenig oder gar nicht kontrahieren. Dagegen kontrahieren sich auch solche Muskelmodelle sofort mit normaler Stärke, wenn noch Ca^{+2} hinzugegeben wird. Aus den Befunden von MARSH²⁰ und BENDALL¹⁸ sowie HASSELBACH und WEBER¹⁹ ergibt sich, dass die von BOZLER entdeckte Sonderstellung kurz extrahierte Muskelmodelle auf ihrem Gehalt an MARSH-BENDALL-(M.B.-)Faktor²⁰ beruht. Der M.B.-Faktor hemmt die ATP-Kontraktion der Muskelmodelle umso vollständiger, je höher seine Konzentration und je höher die ATP-Konzentration ist. Die Kontraktion durch sehr niedrige ATP-Konzentrationen hemmt er überhaupt nicht. Er verschiebt also mit anderen Worten die Grenze der überoptimalen ATP-Konzentration, der Eigenhemmung des ATP, nach unten. Die Wirkung des MB-Faktors wird durch sehr niedrige Konzentrationen von Ca^{+2} und auch von Coffein sofort aufgehoben^{19, 24}.

Die Verkürzung sehr kurz extrahierte Zellmodelle ist ebenfalls kleiner als die Verkürzung mässig oder lang extrahierte Modelle (Fig. 11). Dies gilt besonders für ATP-Konzentrationen grösser als $10^{-2} M$. Dies sieht ähnlich aus wie die Wirkung eines zelleigenen M.B.-Faktors. Aber es gilt auch in geringerem Umfang für Konzentrationen

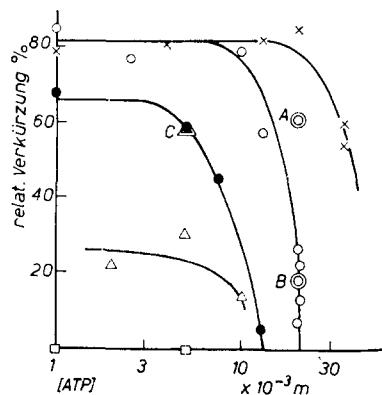


Fig. 10. Wirkung von Fuadin und Harnstoff auf die Kontraktion 35 bis 39 Tage extrahierte Modelle. Amnion-fibroblasten Huhn, Ionenstärke 0.16μ , bei $[ATP] > 10^{-2} M$ ansteigend bis zu 0.32μ , pH 7.2, 37° C. Ohne Zusätze (x); mit $5 \cdot 10^{-3} M$ Fuadin (○); mit $10 \cdot 10^{-3} M$ Fuadin (△); mit $20 \cdot 10^{-3} M$ Fuadin (□). Punkt A: $5 \cdot 10^{-3} M$ Fuadin + $15 \cdot 10^{-3} M$ $CaCl_2$. Punkt B: $5 \cdot 10^{-3} M$ Fuadin + $50 \cdot 10^{-3} M$ Cystein. Punkt C: $10 \cdot 10^{-3} M$ Fuadin + $30 \cdot 10^{-3} M$ $CaCl_2$ (Punkt A, B, C sind Mittelwerte aus je drei Bestimmungen); mit 1 M Harnstoff (●).

kleiner als $10^{-2} M$; und ausserdem ist die Hemmung der sehr kurz extrahierten Zellen von der ATP-Konzentration innerhalb der Grenzen 10^{-3} bis $10^{-2} M$ vollständig unabhängig (Fig. 11). Das ist anders als die Wirkung des M.B.-Faktors aus Muskeln.

Die Kontraktionshemmung der kurz extrahierten Zellmodelle wird weitgehend aufgehoben bei Gegenwart von $5 \cdot 10^{-3} M$ Ca^{+2} (Fig. 11). Das passt zu der Wirkung eines M.B.-Faktors. Die Hemmung wird nicht beeinflusst durch Coffein (Fig. 11). Das wäre ein Gegensatz zum M.B.-Faktor des Muskels²⁴.

M.B.-Faktor, der aus Kaninchenmuskeln gewonnen ist, hemmt die Kontraktion auch von Modellen aus Froschmuskeln und von Modellen aus Adduktor von Anodonta⁴. Er hemmt dagegen die Kontraktion der Zellmodelle nicht.

Wird Brei aus Embryonalgewebe statt aus Muskeln nach dem Verfahren extrahiert, das sich für die Extraktion des M.B.-Faktors bewährt hat, so hemmt auch dieser Embryonalextrakt die Verkürzung der Modelle nicht — auch dann nicht, wenn durch fort dauernde Zugabe von ATP hohe ATP-Konzentrationen gegen die ATP-Spaltung durch den Extrakt aufrecht erhalten werden.

Fig. 11. Abhängigkeit der Kontraktion von der [ATP], Extraktionsdauer der Zellmodelle und Ca^{+2} -Gegenwart. Kurve 1: 1 Stunde extrahiert, ohne Ca^{+2} (Δ), mit $5 \cdot 10^{-3} M$ Coffein (\bullet). Kurve 2: 2 bis 10 Tage extrahiert, ohne Ca^{+2} (\square). Kurve 3: 1 Stunde extrahiert mit $5 \cdot 10^{-3} M$ Ca^{+2} (\blacktriangle), 2 bis 10 Tage extrahiert mit $5 \cdot 10^{-3} M$ Ca^{+2} (\blacksquare). Kurve 4: 39 Tage extrahiert ohne Ca^{+2} (\times), mit $5 \cdot 10^{-3} M$ Ca^{+2} (+).

Die ATP-Kontraktion der Zellmodelle ist vollständig unterdrückt, wenn die Kulturen nur wenige Minuten in Glycerin extrahiert oder aber statt dessen durch Zerstörung der Membran mit Saponin getötet werden. Diese Anfangshemmung der ATP-Kontraktion dehnt sich in den Monaten Februar und März sogar auf Kulturen aus, die einige Tage extrahiert sind. Diese Form der Anfangshemmung wird durch Ca -Ionen nicht beeinflusst. Dagegen verschwinden alle diese physiologischen Anfangshemmungen vollständig, wenn die Modelle mehrere Wochen in 50%iger wässriger Glycerinlösung aufbewahrt werden.

Es sieht also so aus, als wenn die Zelle über mindestens 2 Hemmfaktoren verfügte, einen, der Ca^{+2} -unempfindlich und einen anderen, der Ca^{+2} -empfindlich ist. Wieweit der zweite mit dem M.B.-Faktor verwandt ist, muss offen bleiben (Tabelle II).

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass für alle untersuchten Zellbewegungen der ganze Energiestoffwechsel der Zelle entbehrlich ist, wenn nur dafür gesorgt wird, dass der ATP-Spiegel auf der richtigen Höhe bleibt. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass der Zelle verschiedene Mechanismen zur Verfügung stehen, um mit Hilfe des ATP Bewegungen auszuführen und mechanische Arbeit zu leisten.

So wird im zweiten Teil der Anaphase ATP zur Erzeugung eines Druckes benutzt, der die Chromosomensätze auseinandertreibt.

Dagegen beruht die Zellkontraktion, die die Fibroblastenteilung einleitet, auf einem durch ATP erzeugten Zug kontraktiler Elemente. Das Auftreten dieser Kontraktion allein auf ATP und ITP, die quantitative Übereinstimmung der Kontraktion der Zell- und Muskelmodelle in Abhängigkeit von der ATP-, ITP- und der jeweils benötigten

TABELLE II
ÜBERSICHT ÜBER DAS VERHALTEN VON ZELL- UND MUSKELMODELLEN

	Hemmt die Kontraktion		Erniedrigt die über-optimale [ATP]		Wirkung ist reversibel	
	d. Zelle	d. Muskels	für d. Zelle	für d. Muskel	bei der Zelle durch	beim Muskel durch
Hohe [ATP]	+	+				Auswaschen
Kurzfrist. Extrakt.	+	+	+	+	Ca^{+2} (teilw.)	Ca^{+2}
M.B.-Faktor	—	+	—	+		Ca^{+2}
Pyrophosphat $2 \cdot 10^{-2} M$	—	—	—	—		
Temperatur $< 10^\circ \text{C}$	+	+	+	+	Wiedererwärmung $> 10^\circ \text{C}$	
$\text{H} < 6.5$	+	+	—	—	Neutralisieren	
$\text{pH} > 7.5$	+	+	+	+	Neutralisieren	
Ionenstärke $> 0.2 \mu$	+	+	+	+	Verdünnen	
Monojodessigs. Na $1 \cdot 10^{-2} M$	—	—	—	—		
Salyrgan $5 \cdot 10^{-4} M$	+	+	—	—	$\text{Cystein } 2 \cdot 10^{-2} M$	
Oxarsan $5 \cdot 10^{-4} M$	+	+	—	—	$\text{Cystein } 2 \cdot 10^{-2} M$	
Fuadin $5 \cdot 10^{-3} M$	—	—	+	+	Auswaschen	
Germanin $5 \cdot 10^{-4} M$	+	+	?	?	Ca^{+2}	—
Harnstoff $1 M$	+	+	+	+	Auswaschen	
Colchicin 0.1 mg/ccm	—	—	—	—	Auswaschen	

Mg^{+2} -Konzentration, die Gleichheit in der Konzentration und Wirkungsart der verschiedenen Gifte, die Gleichheit der maximalen Verkürzung, das gleiche Verhältnis von kontraktilem Spannung zur Zerreißfestigkeit, die Gleichartigkeit des Temperatureinflusses und mancherlei weitere Einwirkungen (vgl. Tabelle II) zeigen, dass die fundamentale Reaktion zwischen kontraktilem Protein und ATP für Zell- und Muskelbewegung gleich ist. Die Muskelbewegung ist phylogenetisch offenbar aus ganz bestimmten elementaren und uralten Zellbewegungen hervorgegangen, von denen eine — aber nicht die einzige — in Betracht kommende Form hier ausführlicher beschrieben ist.

Dagegen ist sehr zweifelhaft, wieweit für Muskel- und für Zellbewegungen die Auslöse- und Hemmungsvorgänge identisch sind, durch die der Übergang von der Ruhe zur Kontraktion und von der Kontraktion zur Erschlaffung der kontraktilem Elemente bewirkt wird.

TECHNIK

Gewebezüchtung: Verwendet wurden Deckglaskulturen. Die Kulturen wurden 24 bis 48 Stunden in einem Gemisch aus 25% Hühnerplasma, 25% Embryonalextrakt und 50% Tyrodelösung bebrütet. Zur Herstellung des Embryonalextraks wurde zerkleinertes, abzentrifugiertes und vom Überstand abgetrenntes Gewebe 9-tägiger Hühnerembryonen mit dem gleichen Volumen Tyrodelösung 20 min. bei 37°C bebrütet und danach das Gewebe durch erneutes Zentrifugieren entfernt.

Da sich längere Zeit in vitro gehaltenes und durch mehrere Passagen fortgezüchtetes Gewebe in den geschilderten Versuchen vom frisch ausgepflanztem Gewebe nicht unterscheidet, wurde vorwiegend frisch ausgepflanztes Gewebe aus 8 bis 9-tägigen Hühnerembryonen verwendet.

Extraktion: Die lebende, auf 0°C vorgekühlte Kultur wird zusammen mit dem Deckglas, auf dem sie wächst, in die gekühlte Extraktionslösung versenkt.

Extraktionslösung: $\text{KCl } 0.12 M$; $\text{K-Na-Phosphat-Puffer prim./sec. Phosphat } 2/3 \text{ } 0.01 M$; $\text{Cystein } 0.004 M$ in 45 vol.%iger Glycerinlösung. Ionenstärke der Lösung 0.15μ , $\text{pH} \sim 7$. — In späteren Versuchen wurde Cystein durch Äthylendiaminotetraessigs.- Na_3H als Schwermetallschutz ersetzt und die Ionenstärke durch Herabsetzen der KCl -Konzentration wieder auf 0.15μ gebracht. Doch sind mässige Abweichungen von dieser Ionenstärke nach oben und unten bedeutungslos.

Die Extraktion erfolgt im allgemeinen bei 0° C. Niedrigere Temperatur verlangsamt sie und hemmt die Zerstörung der Zellmembran. Mehrstündige Erwärmung der Präparate auf Zimmertemperatur wird in den Glycerinlösungen ohne erkennbare Schädigung vertragen. Die Rückführung der extrahierten Präparate in die rein wässrigen Versuchslösungen geschieht schrittweise.

Versuchsanordnung: Die Beobachtung der Präparate erfolgt im Phasenkontrastmikroskop. Die Kulturen tauchen in eine mit den Versuchslösungen gefüllte Kammer mit seitlichem Zu- und Abfluss. Die gleichen Zellen wurden vor und nach der Kontraktion auf Mikrophotogrammen ausgemessen. Aus der Summe ihrer Längen und der Änderung dieser Summe nach der Kontraktion ergibt sich die relative Verkürzung der Zellen in Prozent der Ausgangslänge nach $\Delta L \times 100/L$ (L = Ausgangslänge).

Die Ionenstärke der Lösungen wurde durch Variation der KCl-Konzentration eingestellt und lag bei den Kontraktionsversuchen zwischen 0.12 und 0.16 μ . Die Lösungen enthielten als Puffer $1 \cdot 10^{-2} M$ Phosphat, Ca^{+2} -haltige Lösungen statt dessen $2 \cdot 10^{-2} M$ Cystein, in späteren Versuchen ein Gemisch aus $1 \cdot 10^{-2} M$ Na_2 -Glycerinophosphat und Salzsäure, das unter den Versuchsbedingungen mit Ca^{+2} keine Fällungen ergibt. Den Lösungen wurde 1.5 bis $10 \cdot 10^{-3} M$ $MgCl_2$ zugesetzt, der pH anschliessend mit der Glaselektrode kontrolliert.

Im Gegensatz zum eingespannten Muskelfasermodell können verkürzte Zellmodelle nicht wieder gestreckt werden. Jede Kultur ist daher nur für einen Versuch brauchbar. Die Versuchspunkte der Kurven sind jeder an einem anderen Objekt gewonnen worden. Doch reagieren Kulturen mit gleicher Vorgeschichte genügend einheitlich, um den Vergleich miteinander zu gestatten.

Gifte wurden vor der ATP-Lösung den Präparaten zugesetzt. Substanzen, die die Wirkung von Giften aufheben, wurden mit dem Gift vor Zugabe zum Präparat gemischt oder nach Giftvorbehandlung der Präparate mit der ATP-Lösung zugesetzt.

Na_4 -ATP verdanken wir der Firma Henning, Berlin, und den Zellstoffwerken Waldhof, Mannheim. Beide Präparate enthielten 80-90 % ATP und als Verunreinigungen ADP, AMP, anorganisches Phosphat, geringe Mengen Pyrophosphat und Kohlehydrat. Der ATP-Gehalt der Versuchslösungen wurde durch Analysen kontrolliert.

Oxarsan und theophyllinfreies Salyrgan wurde uns von den Farbwerken Höchst freundlich zur Verfügung gestellt. Fuadin verwandten wir als injektionsfertige Lösung der Farbenfabriken Bayer. Die Stammlösungen enthalten geringe Bisulfitzusätze, die die Modellkontraktion nicht beeinflussen. Germanin wurde ebenfalls von den Farbenfabriken Bayer, Elberfeld, bezogen. Trilon B überliess uns die Badische Anilin- und Soda-fabrik in Ludwigshafen.

Herrn Regierungsrat Dr. G. A. KAUSCHE danke ich für sein förderndes Interesse, Herrn Prof. Dr. H. H. WEBER für seine Einladung an das Physiologische Institut der Universität Tübingen und seine Beratung, Herrn Prof. Dr. BICKENBACH und Frl. Dr. GÄRTNER für die Überlassung von Gewebekulturen der Universitätsfrauenklinik Tübingen, der Firma Zeiss-Winkel schliesslich für die Leihgabe eines ihrer Forschungsmikroskope.

ZUSAMMENFASSUNG

Werden epitheliale oder mesenchymale Zellen aus Gewebekulturen durch Extraktion mit Wasser-Glycerinmischungen von ihren Kristalloiden und einem Teil der globären Proteine befreit, so entstehen Zellmodelle, die den Fasermustern des Muskels analog sind. In der Interphase extrahierte Zellen kontrahieren sich auf ATP-Zusatz qualitativ und—soweit prüfbar—auch quantitativ ebenso wie die Fasermustern aus Muskeln. Die Kontraktion der Zellmodelle hängt ausserdem von allen Versuchsbedingungen in gleicher Weise ab wie die Kontraktion der Fasermustern aus Muskeln.

Auch der zweite Teil der Anaphasenbewegung läuft im Modell unter ATP ebenso ab wie in der lebenden Zelle. Doch handelt es sich hier—im Gegensatz zur Kontraktion der Zell- und Muskelmodelle—nicht um eine Zug-, sondern um eine Druckmechanik.

Auch die äquatoriale Einschnürung des Cytoplasma telophasischer Zellen findet bei Zugabe von ATP im Modellversuch statt.

Modelle aus Schwänzen von Spermatozoen schlängeln sich in ATP-haltigen Lösungen. Die Frequenz der Bewegungen nimmt mit steigender ATP-Konzentration zu.

SUMMARY

If epithelial cells or mesenchymatous cells of cultured tissues are freed of their crystalloids and a part of their globular proteins by extraction with water/glycerol solvent, cellular models are formed which contract qualitatively and—so far as can be tested—quantitatively in the same way as the muscle fiber models. The contraction of the cellular models depends also on all experimental conditions in the same way as the contraction of the muscle fiber models.

obtained analogous to fibre models prepared from muscles. During the interphase the extracted cells contract after addition of ATP, qualitatively and, as far as it could be examined, quantitatively just like the models of muscles. The different experimental conditions influence in the same way the contraction of cellular models and that of muscular models. The development of the second part of the anaphase movements, in the presence of ATP, is the same for the models as for living cells. However, in this case—in contrast to the contraction of cellular as well as muscular models—a pressure and not a pulling is concerned.

The equatorial shrinking of cytoplasm in cells in telophase is also obtained by the addition of ATP to the model.

The models prepared from tails of spermatozoa show undulatory movements in ATP solutions. The frequency of the movements increases with increasing ATP concentration.

RÉSUMÉ

Si l'on débarrasse de leurs cristalloïdes et d'une partie de leurs protéines globulaires par extraction à l'eau glycérinée des cellules épithéliales ou mésenchymateuses de tissus en culture, on obtient des modèles cellulaires analogues aux modèles fibrillaires des muscles. Pendant l'interphase, des cellules extraites se contractent, après addition d'ATP, qualitativement et — autant qu'il était possible de contrôler — aussi quantitativement comme des modèles fibrillaires préparés des muscles. Les diverses conditions expérimentales influent en outre de la même façon sur la contraction des modèles cellulaires et sur celle des modèles musculaires. Le déroulement de la deuxième partie des mouvements anaphasiques, en présence d'ATP, est le même pour les modèles que pour les cellules vivantes. Cependant il s'agit dans ce cas — à l'inverse de la contraction des modèles cellulaires ou musculaires — non d'un phénomène de traction, mais d'un phénomène de pression.

Le rétrécissement équatorial du cytoplasme chez les cellules en télophase est également entraîné par l'addition d'ATP au modèle.

Des modèles constitués par des queues de spermatozoïdes sont animés de mouvements ondulatoires dans des solutions d'ATP. La fréquence des mouvements augmente parallèlement à la concentration en ATP.

LITERATUR

- 1 K. FELIX, *Naturwissenschaften*, 40 (1953) 44.
- 2 A. SZENT-GYÖRGYI, *Chemistry of muscular contraction*, New York, 1951.
- 3 H. H. WEBER UND H. PORTZEL, *Progr. Biophys.*, 4 (1954) 60.
- 4 H. H. WEBER, *Biochim. Biophys. Acta*, Warburg-Festschrift, 12 (1953) 150.
- 5 M. HEIDENHAIN, *Plasma und Zelle*, Jena 1907.
- 6 A. V. HILL, *Proc. Roy. Soc. B.*, 100 (1926) 87, 108.
- 7 J. BRACHET, *Embryologie Chimique*, Paris-Liège 1947.
- 8 D. MARSLAND, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 36 (1950) 205.
- 9 R. GOLDACRE UND J. LORCH, *Nature*, 166 (1950) 497.
- 10 H. LETTRÉ, *Naturwiss.*, 38 (1951) 490.
- 11 K. BELAR, *Arch. Entw. mechan.*, 118 (1929) 347.
- 12 W. LEWIS, *Biol. Bull.*, 87 (1944) 154.
- 13 S. SPICER UND W. BOWEN, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 741.
- 14 F. TURBA UND G. KUSCHINSKY, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 76.
- 15 E. BOZLER, *Am. J. Physiol.*, 171 (1952) 359.
- 16 W. HASSELBACH, *Naturforschg.*, 8b (1953) 212.
- 17 E. BOZLER, *Am. J. Physiol.*, 167 (1951) 276.
- 18 J. BENDALL, *Proc. Roy. Soc. B.*, 139 (1952) 523.
- 19 W. HASSELBACH UND H. H. WEBER, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 160.
- 20 B. MARSH, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 247.
- 21 A. V. HILL, *Nature*, 166 (1950) 646.
- 22 H. H. WEBER UND H. PORTZEL, *Ergebn. Physiol.*, 47 (1952) 369.
- 23 W. HASSELBACH, *Naturforschg.*, 7b (1952) 164.
- 24 W. HASSELBACH, unveröffentlichte Versuche.
- 25 H. H. WEBER, *Z. Elektrochem.*, 55 (1951) 511.

Eingegangen den 8. Januar 1954