

GEISSELMODELLE UND ADENOSINTRIPHOSPHAT (ATP)

VON

HARTMUT HOFFMANN-BERLING

*Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Institut für Physiologie,
Heidelberg (Deutschland)*

I

Die Entscheidung darüber, ob das vorhandene ATP Kontraktion oder Erschlaffung bewirkt, ist im lebenden Muskel einem Membranmechanismus übertragen, der durch unbekannte Zwischenreaktionen die ATP-Spaltung zu enthemmen und dadurch die Kontraktion freizugeben vermag. Die rhythmische Tätigkeit der lebenden Muskelfaser bei tetanischer Kontraktion ist Ausdruck rhythmisch ablaufender Membranprozesse. Werden diese durch Zerstörung der Zellmembran ausgeschaltet, so ist je nach den Bedingungen anhaltende Kontraktion oder anhaltende Erschlaffung die Folge, wenn das kontraktile Protein mit ATP zusammengebracht wird¹. Das beweisen die sog. Faser-² und Fadenmodelle¹, die aus Muskeln hergestellt sind.

Die durch Extraktion mit Glycerin-Wassermischungen hergestellten Modelle von Zellen und Zellteilen³ zeigen, dass die Einzelzelle das Zusammenspiel von Kontraktion, Erschlaffung und Streckung auch noch auf andere Weise regulieren kann. So erklärt sich die Gleichzeitigkeit von Plasmadurchschnürung und Zellstreckung während der Telophase durch lokale Unterschiede in den Eigenschaften der beteiligten funktionellen Proteine⁴.

Auch Spermatozoengeisseln und *Trypanosomen* können mit wässrigem Glycerin extrahiert und dadurch ihrer löslichen Eiweisse, Fermente und Betriebsstoffe beraubt werden. Solche Geisselmodelle arbeiten trotz der Membranzerstörung rhythmisch: wird ATP zugesetzt, so wechseln in ihnen Kontraktion und Erschlaffung und laufen als Wellenbewegung über die Modelle hin⁵.

Soweit untersucht, lassen sich funktionsfähige Geisselmodelle aus *Trypanosomen** und aus den Spermatozoen von Vertebraten (Maus, Hahn) wie von Wirbellosen (Schmeißfliegen*, Heuschrecken) herstellen. Für quantitative Untersuchungen besonders geeignet sind die riesigen Spermiengeisseln grosser Heuschreckenarten (*Tachycines**), die ihre Kontraktilität in den Extraktionslösungen bei -18°C bis zu 40 Tagen bewahren**.

* Herrn Prof. KRAUSE, Tübingen, danke ich für die freundliche Überlassung von Heuschrecken, Herrn Prof. PRIGGE, Frankfurt a.M., für *Trypanosoma brucei*-infizierte Mäuse, Herrn Prof. STEINER, Heidelberg, für die Überlassung von *Phormia regina*.

** Dass ATP Betriebsstoff der Cilien- und Geisselbewegung sei, ist schon von ENGELHARDT⁶ vermutet worden. Versuche, eine Wirkung des ATP auf abgetrennte Cilien nachzuweisen⁷, blieben jedoch umstritten, und auch die Beschleunigung, die die Geissel⁸- und Ciliarbewegung⁹ lebender Zellen durch ATP erfährt, ist vieldeutig, denn es kann sich um einen Einfluss des ATP auf die Zellmembran oder die ganze Zelle handeln.

II

An Geisselmodellen laufen rhythmische Bewegungen selbst dann ab, wenn die Geisseln von Mittelstück und Kopf abgetrennt sind: also muss in Geisselmodellen das kontraktile Protein selbst die Bewegung steuern. Da jedoch die terminalen Abschnitte von Spermiengeisseln an den Bewegungen mehr passiv teilnehmen, führt ein abgetrenntes Geisselende unter ATP Bewegungen nur aus, wenn die Abtrennung nicht weiter distal als zwischen mittlerem und letztem Drittel der Geissel erfolgte. — Werden die drei lichtmikroskopisch gut sichtbaren Fibrillen, die in den Spermiengeisseln von *Tachycines* umeinander gewunden sind, durch Behandlung mit hoher Ionenstärke bei schwach alkalischem pH voneinander getrennt, so bewegt sich jede einzeln liegende Fibrille ebenfalls noch rhythmisch.

Diese Beobachtungen sind beschränkt auf die Geisseln der Spermien von *Tachycines*^{*}, denn nur diese grossen Geisseln können an beliebiger Stelle durchschnitten und aufgespalten werden. Für *Trypanosomengeisseln* sind analoge Verfahren noch nicht gefunden worden.

Die Umschaltung von Kontraktion auf Erschlaffung (oder Streckung) wird anscheinend lokal ausgelöst durch die jeweilige Verformung der Geissel an der betreffenden Stelle. Bewegung und Gegenbewegung scheinen sich gegenseitig auszulösen. Für diese These sprechen die Wirkungen, die bei Behinderung der Bewegung auftreten: werden Geisseln an umschriebener Stelle mechanisch festgelegt, so findet man häufig zu beiden Seiten des Fixierungspunktes einen verschiedenen Rhythmus. Geisseln, die durch Retraktion des von der Unterlage abgelösten Einbettungsmediums (vgl. im method. Teil) gestaucht und in enge Windungen gelegt sind, bewegen sich nicht mehr.

Die Einbettung der Spermatozoen und *Trypanosomen* in ein dünnes Fibrinkoagulum, die es ermöglicht, das gleiche Modell unter wechselnden Bedingungen zu beobachten, erlaubt der fixierten Geissel nur wellenförmige Kontraktionen. Gelegentlich wurden freischwimmende Modelle untersucht, um die Wirksamkeit der Geisseltätigkeit für die Fortbewegung zu prüfen. Nur bei kurz extrahierten Zellen findet eine — wenn auch wenig gerichtete — Lage- und Ortsänderung statt, bei lang extrahierten Modellen ist der Geisselapparat hierfür zu starr. Bei kurz extrahierten *Trypanosomen*-Modellen sind die für die lebende Zelle charakteristischen schnellenden Körperbewegungen zu beobachten, an viertägig extrahierten Modellen laufen nur noch wellenförmige Kontraktionen an Geissel und undulierender Membran ab^{**}.

Auch unter optimalen Bedingungen bleibt die Bewegung der Modelle hinter den Bewegungen lebender Geisseln zurück. Sie kommt diesen umso näher, je kürzer die Modelle extrahiert und je länger sie mit ATP behandelt werden. Ursache der regressiven Veränderungen sind anscheinend Denaturierung und zunehmende Verfestigung, die sich ähnlich auch bei anderen Modellen einstellt¹⁰.

III

Alle quantitativen Angaben der Figs. 1–7 beziehen sich auf Modelle aus den Spermiengeisseln von *Tachycines*, da diese über Stunden gleichmäßig reagieren. Jede Kurve gibt das Verhalten einer Geissel wieder. Da Schlagfrequenzen > 8/sec nicht mehr sicher auszuzählen sind, wurden die Kurven in den hohen Frequenzbereichen nur gestrichelt und das Einsetzen von Messwerten wurde zumeist unterlassen.

Die minimale ATP-Konzentration, die in Suspensionen von Muskelfibrillen mit einem Fibrillendurchmesser von 1–1,5 μ maximale Kontraktion erzeugt, d.h. gerade

* Der Durchmesser des Spermatozoenkopfes ist bei *Tachycines* nicht grösser als der Geisseldurchmesser; Kopf und Geisselende der Spermien sind jedoch durch ihre unterschiedliche Zuspitzung auseinanderzuhalten.

** Auch eine von der Membran abgerissene Geissel bewegt sich noch; gänzlich aus dem Körper herausgelöste *Trypanosomengeisseln* wurden nicht beobachtet.

gross genug ist, um trotz der Spaltung des eindringenden ATP auch die zentralen Anteile der Fasern zu durchtränken, ist wenig grösser als $10^{-5} M^{11}$ und beträgt für *Tachycines*-geisseln mit einem Durchmesser von 0.9μ etwa $5 \cdot 10^{-6} M$. Schon hierin findet sich eine Übereinstimmung entwicklungsgeschichtlich weit auseinanderliegender Prozesse.

Die Bewegungsgeschwindigkeit der Geisselmodelle ist temperaturabhängig und verdoppelt sich jeweils zwischen 0° und 10° und zwischen 10° und $20^\circ C$ (Fig. 1). Ähnlich verhalten sich Muskelmodelle, deren Verkürzungsgeschwindigkeit mit der Temperatur zunimmt, weil sie ATP bei höheren Temperaturen schneller spalten¹. Vermutlich dürfte dieselbe Erklärung auch für Geisselmodelle zutreffen. Dazu passen die Angaben NELSON's¹², der in isolierten Spermiengeisseln eine wirksame, strukturgebundene ATPase auffand.

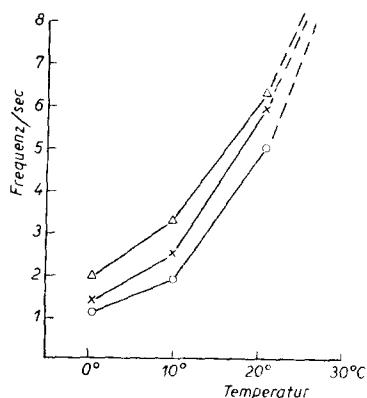


Fig. 1. Schlagfrequenz und Temperatur. 10 Tg.
extr. Modelle, $10^{-3} M$ ATP, pH 7.2, I = 0.18μ .

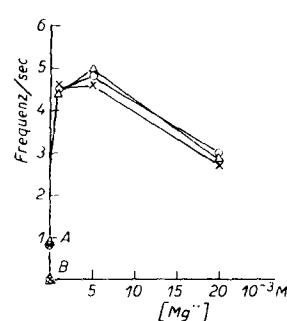


Fig. 2. Schlagfrequenz und Mg^{++} -Konzentration.
2 Tg. extr. Modelle, $10^{-4} M$ ATP, pH 6.8, I = 0.20μ . A = ohne Mg^{++} -Zusatz; B = mit $5 \cdot 10^{-3} M$ Äthylenediaminetetraacetat.

Für die rhythmische Bewegung der Geisselmodelle sind geringe Mengen Mg^{++} erforderlich — wie für die Kontraktion von Muskel- und Fibroblastenmodellen. Die Kontraktilität aller Modelle erlischt, wenn diese Spuren durch $5 \cdot 10^{-3} M$ Äthylenediaminetetraacetat gebunden werden. Regelmässigkeit und Frequenz der Geisselbewegung werden durch Zugabe von $10^{-3} M$ Mg^{++} gesteigert und durch Konzentrationen $> 10^{-2} M$ gehemmt (Fig. 2).

$5 \cdot 10^{-5} M$ Salyrgan^{*} unterdrückt die Bewegung der Geisselmodelle und $10^{-2} M$ Monojodacetat verringert zwar die Bewegungsgeschwindigkeit, hebt die Beweglichkeit aber nicht auf. Die Giftempfindlichkeit der Geisselmodelle ist also ähnlich abgestuft wie die Empfindlichkeit der Muskelmodelle. Dagegen kann bei Geisselmodellen das Salyrgan nur unvollkommen durch $2 \cdot 10^{-2} M$ Cystein entgiftet werden.

Die Intensität der Kontraktion aller Muskel-^{13, 14} und Zellmodelle⁵ nimmt ab, wenn die ATP-Konzentration über ein Optimum hinaus erhöht wird, das je nach der Art des Modells (und der Extraktionsdauer, Ionalität und Temperatur) verschiedene Werte hat. Diese Optima liegen in der Regel zwischen $10^{-3} M$ und $> 10^{-2} M$ ATP. Die *Trypanosomen*-modelle stellen bei Gegenwart von $5 \cdot 10^{-3} M$ ATP ihre Bewegungen sogar vollständig ein. Spermatozoengeisseln sind dagegen durch ATP-Konzentrationen bis $2.5 \cdot 10^{-2} M$ nicht zu lähmen (bei Ionenstärken bis 0.3μ).

* Salicyl (hydroxymercuri-methoxypropyl-)amidoorthoacetat.

Es ist bisher nicht gelungen, an Geisselmodellen Kontraktion ohne Erschlaffung ablaufen zu lassen. Dauerkürzung der Geisseln wird auch dann nicht erreicht, wenn durch niedrige Ionenstärken (um 0.10μ) und ein schwach saures pH Bedingungen eingestellt werden, die nach den Erfahrungen an anderen Modellen kontraktile Prozesse begünstigen und Erschlaffung oder Streckung ausschalten⁵. Allerdings könnte die Stauchung der elastischen Geisselanteile, die durch symmetrische Anspannung der kontraktilen Geisselanteile bewirkt wird, zu gering sein, um erkennbar zu werden — während asymmetrisch auftretende kontraktile Kräfte durchaus in der Lage sein mögen, die elastischen Elemente rhythmisch zu verbiegen.

IV

Das kontraktile Protein der Spermatozoengeissel ist schwerer zu extrahieren als das kontraktile Protein des Muskels¹⁰ und der Fibroblastenzelle. Zwar wird die Kontraktilität der Spermatozoenmodelle durch Ionenstärken $> 0.4 \mu$ aufgehoben, doch ist dieser Effekt durch Verdünnen selbst dann noch reversibel, wenn eine Lösung von $1 M$ KCl + $2 \cdot 10^{-2} M$ Pyrophosphat ($I \approx 1.1 \mu$) 30 min bei $0^\circ C$ auf die Modelle einwirkt. Also kommt die durch hohe Ionenstärken erzeugte Kontraktionshemmung nicht deshalb zustande, weil das kontraktile Protein in Lösung geht. Das Verhalten der Geisselmodelle bestätigt die an Muskelmodellen gemachte Erfahrung¹⁰, dass ein Intervall der Ionenstärke existiert, in dem das kontraktile Protein unfähig zur Kontraktion (bezw. Superpräzipitation) ist, aber noch im Gelzustand verharrt.

Erst durch mehrstündige Behandlung mit Lösungen einer Ionenstärke von 1μ wird die Beweglichkeit der Spermatozoenmodelle irreversibel zerstört. Trypanosomenmodelle sind empfindlicher, in $0.4 M$ KCl-Lösung verlieren sie schon in kürzester Zeit die Fähigkeit, in verdünnten Lösungen auf Zusatz von ATP mit Bewegung zu reagieren.

V

Als Betriebssubstanz der Geisselbewegung wirkt ATP spezifisch und ist weder durch Adenosinmonophosphat, Creatinphosphat noch durch anorganisches Pyrophosphat, Triphosphat und sog. Hexametaphosphat zu ersetzen. Bereits $5 \cdot 10 \cdot 10^{-6} M$ ATP genügen, um Geisselmodelle aus Spermatozoen in Bewegung zu setzen. Wird die ATP-Konzentration erhöht, so steigt die Bewegungsgeschwindigkeit, — und zwar bei kurz extrahierten Modellen rascher als bei lang extrahierten Modellen (Fig. 3). Diese ATP-Wirkung ist unspezifisch und durch Erhöhung der Ionenstärke (Fig. 4), durch Zusätze von Pyrophosphat (Fig. 5), Polysulfosäuren (Fig. 5 und 6) oder allgemein durch solche Massnahmen zu imitieren, die Muskelmodelle "weichmachen", d.h. ihren Dehnungswiderstand senken. Hochfrequente Geisselbewegung ist mithin auch bei niedriger ATP-Konzentration möglich, wenn die mangelhafte Plastizität der Modelle durch hohe Ionenstärken (Fig. 4) oder durch Weichmacher (Fig. 6) verbessert wird. Ähnlich wird in mehrwöchig extrahierten und daher verfestigten Modellen durch ATP-Konzentrationen $> 10^{-4} M$ Bewegung vielfach erst dann erzeugt, wenn Pyrophosphat oder $2 \cdot 10 \cdot 10^{-6} M$ Germanin zugesetzt werden (Fig. 5). Zwischen Schwelle und Optimum beruht die frequenzfördernde Wirkung des ATP offenbar auf seiner Wirksamkeit als Weichmacher.

Die Amplitude der Geisselbewegung steht in umgekehrtem Verhältnis zur Bewegungsfrequenz (Fig. 3). Diese Tatsache macht es unmöglich, an den Spermienmodellen von *Tachycines* zu beurteilen, ob der Elementarvorgang der Bewegung bei Anwesenheit hoher ATP-Konzentrationen und Ionenstärken ebenso wieder nachlässt, wie dies bei allen anderen Modellen^{5,14} beobachtet wird. Denn die mittlere Geschwindigkeit der

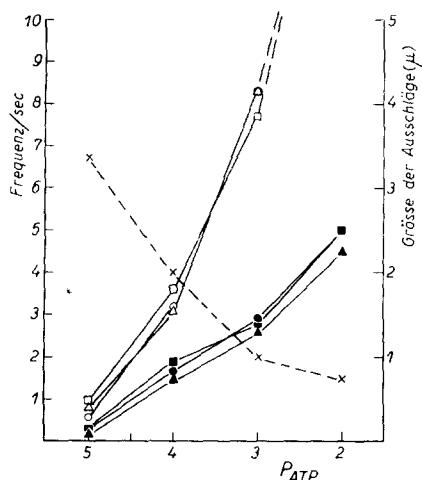


Fig. 3. Abhängigkeit der Schlagfrequenz und der Bewegungsgrösse von der ATP-Konzentration. $\circ \triangle \square$ 2 Tg. extr. Modelle; $\bullet \blacktriangle \blacksquare$ 16 Tg. extr. Modelle. Schlagfrequenz = ausgezogene Kurven; Bewegungsgrösse = gestrichelte Kurve (Mittelwerte der 2 Tg. extr. Modelle) pH 7.2, $I = 0.20 \mu$.

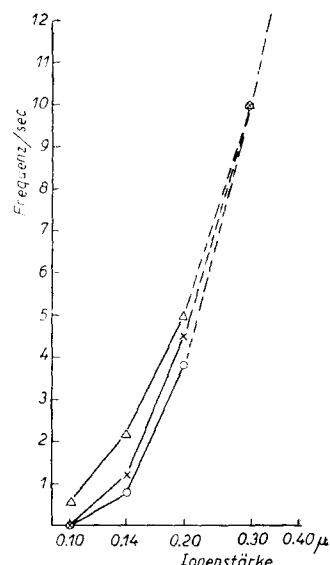


Fig. 4. Schlagfrequenz und Ionenstärke. 9 Tg. extr. Modelle; $5 \cdot 10^{-4} M$ ATP, pH 7.2.

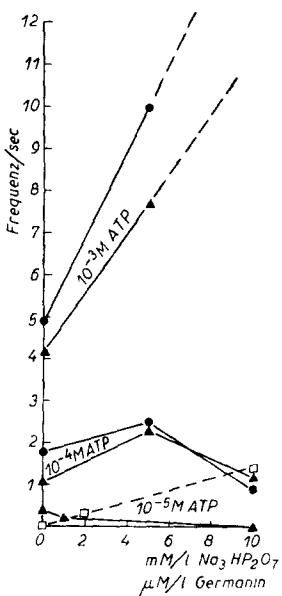


Fig. 5. Wirkung von Pyrophosphat bei verschiedenen ATP-Konzentrationen und von Germanin bei $10^{-5} M$ ATP. 11 Tg. extr. Modelle, pH 6.8, $I = 0.15 \mu$. $\bullet \blacktriangle \blacksquare$ bei Pyrophosphatzzusatz; \square bei Germaninzusatz. Abscisse: Konzentration von $\text{Na}_3\text{HP}_2\text{O}_7$ in mMol/liter, Konzentration von Germanin in $\mu\text{Mol/liter}$.

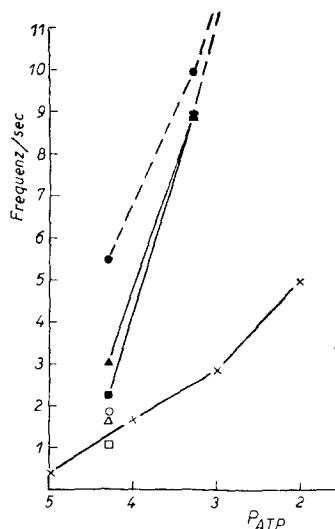


Fig. 6. Wirkung der gleichen Germaninkonzentration bei verschiedenen ATP-Konzentrationen. 28 Tg. extr. Modelle, pH 7.2, $I = 0.12 \mu$. $\circ \triangle \square$ ohne Germanin; $\bullet \blacktriangle \blacksquare$ mit $2 \cdot 10^{-6} M$ Germanin. Die Kontrollkurve ohne Germanin (\times) ist Fig. 3 entnommen (16 Tg. extr. Modelle).

Bewegung des einzelnen Geisselquerschnitts ergibt sich als Produkt aus Frequenz und Amplitude. Bei ATP-Konzentrationen $> 10^{-3} M$ kann zwar die Amplitude des Geisselausschlags noch gemessen werden, aber die Frequenz wird zu gross, um ausgezählt werden zu können (vgl. Fig. 3 und method. Teil). Infolgedessen lässt sich nur sagen, dass bis zur Konzentration $10^{-3} M$ ATP die Geschwindigkeit der Querschnittsbewegung zunimmt. Das gleiche gilt für die Steigerung der Ionenstärke über das optimale Mass hinaus, das — jeweils verschieden — bei allen anderen Modellen eine Abnahme der Bewegung zur Folge hat. Andererseits steht fest, dass durch Ionenstärken $> 0.4 \mu$ *Tachycines*-geisseln (ähnlich wie Muskel- und Zellmodelle) völlig stillgelegt werden — ohne dass mit der Annäherung an diesen Wert eine Frequenzabnahme und eine Vergrösserung der unmessbar klein gewordenen Bewegungen zu beobachten wären.

Dies gilt für langextrahierte Spermatozoenmodelle (Fig. 4). Dagegen ist bei kurz (< 2 Tage) extrahierten Spermatozoenmodellen und bei allen *Trypanosomen*-modellen starke Erweichung durch hohe ATP-Konzentrationen oder Ionenstärken von Unregelmässigkeiten der Bewegung und Frequenzabfall gefolgt bevor die Modelle vollständig gelähmt sind.

Nicht unter allen Bedingungen scheint Pyrophosphat auf Spermienmodelle nur als Weichmacher zu wirken. Ist die molare Konzentration des ATP *romal* kleiner als die des Pyrophosphat, so verlangsamt Pyrophosphat die Bewegung oder unterdrückt sie vollkommen. Diese Hemmung wird sofort beseitigt, wenn die ATP-Konzentration erhöht wird (Fig. 5). Sie kann also nicht durch übermässige Erweichung des Modells zustande kommen, denn solche Hemmungen werden durch Erhöhung der ATP-Konzentration verstärkt. Offenbar unterdrückt Pyrophosphat, wenn es in sehr viel höherer Konzentration als ATP anwesend ist, die Kontraktion durch kompetitive Hemmung der ATP-Bindung an das kontraktile Eiweiss. Giftwirkungen des Pyrophosphat sind auch an den Modellen von glatten¹⁵ und quergestreiften¹⁶ Muskeln beobachtet worden.

VI

Polysulfosäuren (Trypanrot, Germanin (Bayer 205)*, Heparin, Liquoid Roche) hemmen die Bewegung von Geisselmodellen ähnlich wie sie die Kontraktion von Zell- und Muskelmodellen hemmen. $2\text{--}5 \cdot 10^{-6} M$ Germanin genügt, um kurz extrahierte Trypanosomenmodelle unbeweglich zu machen, $5 \cdot 10^{-5} M$ Germanin und $5 \cdot 10^{-5} g/ml$ Heparin sind erforderlich, um die gleiche Wirkung an kurzextrahierten Spermatozoenmodellen zu erzielen. Die Germaninwirkung ist bei Spermatozoenmodellen völlig, bei *Trypanosomen*-modellen nur schlecht durch Auswaschen reversibel.

Polysulfosäuren sind zugleich wirksame Weichmacher¹⁷. Sie beschleunigen daher zunächst die Bewegung solcher Geisselmodelle, die durch lange Extraktion verfestigt sind. Um diese Modelle unbeweglich zu machen, sind *romal* höhere Germaninkonzentrationen erforderlich, als sie für kurz extrahierte Modelle genügen. Mit zunehmender ATP-Konzentration steigt die Gift-Wirksamkeit aller Germaninkonzentrationen beträchtlich an (Fig. 6).

Germanin wirkt auch auf andere Modelle je nach der Extraktionsdauer verschieden: $10^{-5} M$ Germanin hemmt die Kontraktion einstündig extrahierter Fibroblastenmodelle und beschleunigt die Kontraktion viertätig extrahierter Modelle auf das 4-8fache.

* $\text{Na}_6\text{-sym.-bis}(m\text{-aminobenzoyl}-m\text{-amino}-p\text{-methylbenzoyl}-l\text{-naphthyl-amino-}4,6,8\text{-trisulfonat})$.

Ähnlich wie Germanin verhalten sich Heparin und Liquoid Roche. $5 \cdot 10^{-5}$ g/ml Heparin beschleunigen die Geisselbewegung lang extrahierter Spermatozoenmodelle und höhere Heparinkonzentrationen bringen sie zum Stillstand.

Vermutlich bestehen Beziehungen zwischen der Wirksamkeit der Polysulfosäuren als Kontraktionsgifte und ihrer Wirksamkeit als Weichmacher. Weil etwa physiologische ATP-Konzentrationen genügen, um kurz extrahierte Geisselmodelle optimal oder fast optimal plastisch zu machen, hemmen schon Schwellenkonzentrationen Germanin in kurz-extrahierten Modellen die Kontraktion. Dagegen werden die gleichen Germaninkonzentrationen bei lang-extrahierten Modellen benötigt, um die Weichheit der Präparate den Verhältnissen in kurzextrahierten Modellen anzugeleichen⁹. Und erst wenn die Germaninkonzentration weiter gesteigert wird, lockert sich das Gefüge der Modelle so sehr, dass die Kontraktilität leidet.

Die hohe Germaninempfindlichkeit der *Trypanosomen*-modelle hängt offenbar zusammen mit ihrer hohen Empfindlichkeit gegen alle Weichmacher (z.B. auch das ATP). Lähmung der *Trypanosomen*-modelle tritt schon bei Germaninkonzentrationen ein, die kleiner sind als diejenigen, die sich bei der Umrechnung therapeutischer Dosen auf das menschliche Körpervolumen ergeben. Daher ist die therapeutische Wirkung des Germanin vielleicht unter anderem eine Wirkung auf den Geisselapparat — wie dies von früheren Untersuchern schon vermutet wurde¹⁸. Doch ist seine therapeutische Wirkung spezifisch, seine Wirkung auf das Geisselmodell dagegen nur an seinen Charakter als Polysulfosäure gebunden.

Die allgemeine Vergiftung aller Kontraktionsprozesse durch Polysulfosäuren scheint im besonderen Fall der Geisselbewegung auch eine biologische Bedeutung zu haben. Für die Besamung von Seeigelleiern ist die Agglutination der Spermien an der Eioberfläche Voraussetzung. Sie wird erreicht durch — dem Heparin ähnliche — Polysulfosäuren, die das Ei aus seinen äusseren Hüllen (jelly coat) abscheidet¹⁹. Unter der Voraussetzung, dass die Polysulfosäure in die Spermiengeisseln wirklich eindringt, ist deren Stillegung auf Grund der Modellbeobachtungen zu fordern.

Der Wirkung von Weichmachern entgegengesetzt ist die Wirkung von Protamin¹⁷. Protamin verfestigt die Geisselmodelle wahrscheinlich ebenso, wie es Zellmodelle verfestigt: daher verlangsamt es in Konzentrationen $< 2 \cdot 10^{-5}$ g/ml (als Sulfat) die Bewegung und verringert — insbesondere bei langextrahierten Modellen — die Bewegungsgrösse. Dieser Effekt kann nicht durch Auswaschen, wohl aber durch Steigerung der ATP-Konzentration oder Ionenstärke bei solchen Modellen ausgeglichen werden, die noch nicht vollständig gelähmt waren (Fig. 7). Die Reaktivierung bewegungslos gewordener Modelle gelingt nur selten. Konzentrationen $> 5 \cdot 10^{-5}$ g/ml lähmen alle Modelle irreversibel. Die Protaminwirkung ist durch Arginin bis 10^{-3} M und durch Polyaminovinylalkohol* bis $5 \cdot 10^{-4}$ g/ml nicht zu imitieren.

Ähnlich wie Protamin wirken Ca-Ionen auf Geisselmodelle. $5 \cdot 10^{-3}$ M Ca⁺⁺ verringert ihre Bewegungsgeschwindigkeit und Bewegungsgrösse. Auch diese Wirkung ist durch Steigerung der ATP-Konzentration auszugleichen. Im Gegensatz zu der Wirkung des Protamin ist der Ca⁺⁺-Effekt durch Auswaschen reversibel.

Hemmende Verbindungen mit unbekanntem Wirkungsmodus sind Strophanthin und Diäthylstilbostrol. $5 \cdot 10^{-5}$ g/ml Strophanthin senken die Schlagfrequenz und Bewegungsgrösse von Spermienmodellen auf etwa die Hälfte, 10^{-4} M Diäthylstilbostrol hemmt die Bewegung vollständig. Auswaschen hebt die Wirkung beider Stoffe auf.

TECHNIK

Zur Herstellung der Modelle und um das Verhalten des gleichen Modells gegenüber varierten Bedingungen zu prüfen, empfiehlt es sich, vor der Extraktion die geisseltragenden Zellen durch ein dünnes Fibrinogagulum auf Deckgläsern zu fixieren. Die eingebetteten Modelle ragen während des

* Das Präparat verdanke ich Herrn Dr. GRUBHOFFER, Heidelberg.

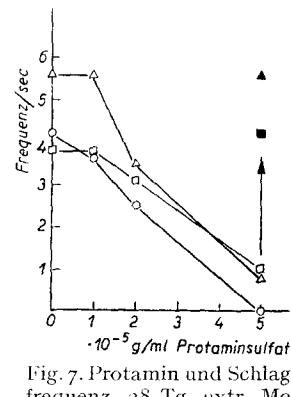


Fig. 7. Protamin und Schlagfrequenz. 28 Tg. extr. Modelle; pH 7.4, I = $0.20 \mu\text{M}$; $\triangle \square$ $5 \cdot 10^{-2} \text{ M ATP}$; $\blacktriangle \blacksquare$ Reaktivierung durch $2.5 \cdot 10^{-2} \text{ M ATP}$.

Versuchs in eine mit der Versuchslösung gefüllte Kammer mit seitlichem Zu- und Abfluss und werden in dieser Anordnung mikroskopiert.

Heuschreckenhoden sind das Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Spermatozoen. Sie werden im Einbettungsmedium zerzupft und als Suspension mit einer Pipette auf Deckgläsern aufgestrichen. — *Trypanosomen* enthaltendes Blut infizierter Mäuse (gewonnen durch Kupieren der Schwanzspitze) wird mit dem Einbettungsmedium 1:20 bis 40 gemischt und wie die Hodensuspension ausgestrichen. Nach Gerinnen des Mediums in einer feuchten Kammer werden die Deckgläser in Gefäße mit Extraktionslösung versenkt. Sterile Arbeitsbedingungen erübrigen sich bei der Einbettung. Geprüft und verwendbar für die Herstellung von *Trypanosomen*-modellen sind *Tr. brucei* und *Tr. gambiense*.

Das Einbettungsmedium für die Spermatozoen besteht aus 10% Hühnerplasma (gewonnen aus der A. carotis in paraffinierten Gläsern ohne Zusätze) und 80% Tyrodelösung. Unmittelbar vor dem Ausstreichen werden 10% Hühnerembryonalextrakt (1:3) zugegeben, um die Gerinnung des Mediums in Gang zu bringen. Bei der Herstellung von *Trypanosomen*-modellen wird die Tyrodelösung durch Pferdeserum ersetzt. Die eintretende Agglutination der Mäuseerythrozyten ist belanglos. Freischwimmende Modelle sind am besten durch Zerzupfen des Fibrinkoagulum eingebetteter Modelle zu erhalten.

Alle Extraktionslösungen enthielten KCl zur Einstellung der Ionenstärke, $10^{-2} M$ Phosphatpuffer und $2 \cdot 10^{-3} M$ $\text{Na}_3\text{H}\text{-Äthylendiaminotetraacetat}$ in 50 vol-%iger Glycerinlösung. Die Ionenstärke betrug einheitlich 0.15 μ , das Verhältnis prim/sec Phosphat 35/65 oder 40/60. Extrahiert wurde 24 Stunden bei 0° bis -5° C, danach wurden die Präparate in den Extraktionslösungen bei -18° C, Spermienmodelle gelegentlich auch bei 0° C aufbewahrt. Für die Zusammensetzung der Versuchslösungen, die Extraktionsdauer, die Extraktionstemperatur und ihren Einfluss auf die Verfestigung der Präparate gilt das früher gesagte¹⁷.

Alle Versuchslösungen enthielten KCl zur Einstellung der Ionenstärke, $10^{-2} M$ Phosphatpuffer, 5 bis $10 \cdot 10^{-2} M$ MgCl_2 und $2 \cdot 10^{-3} M$ Cystein. In den Versuchen mit Ca^{++} wurde der Phosphatpuffer durch einen $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{Glycerinophosphatpuffer}$ ersetzt. Spermienmodelle reagieren gleichmässiger, wenn sie vor Versuchsbeginn 30 min bei 0° C mit ATPhaltigen Lösungen (etwa $10^{-3} M$ ATP) vorbehandelt werden. Die Modelle bleiben über Stunden funktionsfähig, wenn extreme Bedingungen vermieden werden. *Trypanosomen*-modelle sind empfindlicher und sollen bald nach der Rückführung in rein wässrige Lösungen in den Versuch genommen werden.

Die Schlagfrequenz wurde im Phasenkontrastmikroskop durch Auszählen bestimmt, die Bewegungsgrösse durch Ausmessen der Fibrillenunschärfe auf langfristig belichteten Mikrophotos und Abzug des Durchmessers der ruhenden Fibrille von dem gefundenen Wert. Alle Versuche fanden bei Zimmertemperatur statt.

Na_4ATP verdanken wir der Firma Homburg (Frankfurt), Salyrgan den Farbwerken Hoechst. Germanin wurde von den Farbenfabriken Bayer (Elberfeld), Heparin-Na (als Liquemin) und Liquoid Roche von der Firma Hoffmann-La Roche, Protaminsulfat von der Firma Schuchardt (München) bezogen.

Herrn Prof. H. H. WEBER danke ich für zahlreiche, anregende Diskussionen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für grosszügige Sachbeihilfen.

ZUSAMMENFASSUNG

Glycerin-wasserextrahierte Geisseln von Spermatozoen und *Trypanosomen* (Geisselmodelle) schlängeln sich unter ATP. In allen ihren Abhängigkeiten entspricht diese Bewegung der Kontraktion von Fibroblasten- und Muskelmodellen, doch ist es eine Besonderheit des kontraktilen Apparats der Geisseln, auch unter konstanten Aussenbedingungen zwischen Kontraktion und Erschlaffung zu wechseln. Diese Spontaneität muss dem kontraktilen Apparat selbst zugeschrieben werden, weil sie in abgetrennten Teilen der Geissel ebenfalls auftritt und weil die Membranen der Zellen und ihre selektive Permeabilität bei der Herstellung der Modelle zerstört werden.

ATP hat für die Geisselbewegungen doppelte Bedeutung. Es ist spezifischer Betriebsstoff und wirkt unspezifisch als Weichmacher. Da die Weichheit der Modelle ihre Bewegungsgeschwindigkeit bestimmt, regelt die ATP-Konzentration die Schlagfrequenz. Germanin ist für die Bewegung von *Trypanosomen*-modellen ein äusserst wirksamer Inhibitor.

SUMMARY

Flagella of spermatozoa and *trypanosomes* extracted in glycerine-water (flagellum models), undulate in the presence of ATP. These movements correspond in all respects to the contraction of fibroblast- and muscle-models, but it is a peculiarity of the contractile system of the flagella to

Literatur S. 154.

alternate between contraction and relaxation under constant external conditions. This spontaneity must be attributed to the contractile apparatus itself, because it occurs even in separated parts of the flagellum and because the cell membranes and their selective permeability are destroyed in the preparation of the models.

ATP has a double function in flagellar movement. It works specifically to cause contraction and unspecifically as a plasticiser. Since the plasticity of the models determines the speed of their movement, the ATP concentration controls the frequency of the beat. Germanin is an extremely effective inhibitor of the movement of *trypanosome* models.

RÉSUMÉ

Des flagelles de spermatozoïdes et de *trypanosomes* extraits à l'eau glycinée (flagelles modèles) sont animés de mouvements ondulatoires en présence d'ATP. Ces mouvements correspondent à tous égards à la contraction des modèles de fibroblastes et de muscles; cependant, le système contractile des flagelles présente la particularité de passer de l'état contracté à l'état décontracté dans des conditions de milieu extérieur constantes. Cette spontanéité est une propriété du système contractile lui-même, puisqu'elle se manifeste en même temps dans des régions séparées du flagelle et puisque les membranes cellulaires et leur perméabilité sélective sont supprimées au cours de la préparation des modèles.

L'ATP intervient de deux façons dans le mouvement des flagelles: il provoque spécifiquement la contraction et il contrôle non spécifiquement la plasticité. Puisque la plasticité du modèle détermine la vitesse de ses mouvements, c'est la concentration en ATP qui règle la fréquence des ondulations. La germanine est un inhibiteur extrêmement efficace du mouvement des flagelles modèles de *trypanosome*.

LITERATUR

- ¹ Zus. fassg. s. bei H. H. WEBER, H. PORTZEL, *Progr. Biophysics*, 4 (1954) 60.
- ² A. SZENT-GYÖRGYI, *Chemistry of muscular contraction*, New York 1951.
- ³ H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 628.
- ⁴ H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 332.
- ⁵ H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 182.
- ⁶ V. ENGELHARDT, *Bull. Acad. Sci. USSR, Ser. biol.*, (1954) 182. zit. nach L. NELSON¹².
- ⁷ E. DE ROBERTIS, G. M. FRANCHI, *J. Appl. Phys.*, 23 (1952) 161.
- ⁸ T. MANN, *Biochem. J.*, 39 (1945) 451.
- ⁹ E. VORHAUS, I. DEVRUP, *Science*, 118 (1953) 553.
- ¹⁰ W. HASSELBACH, H. HOFSCHEIDER, E. KASPER, R. LUTZ, *Naturforsch.*, 8b (1953) 204.
- ¹¹ W. HASSELBACH, *Naturforsch.*, 7b (1952) 338.
- ¹² L. NELSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 312.
- ¹³ E. BOZLER, *Am. Journ. Physiol.*, 167 (1951) 267.
- ¹⁴ H. PORTZEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 195.
- ¹⁵ D. DOERR, H. PORTZEL, *Naturforsch.*, 1954 (im Druck).
- ¹⁶ J. BENDALL, *Nature*, 172 (1953) 586.
- ¹⁷ H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 226.
- ¹⁸ ROEHL, *Arch. exp. Pathol.*, Beih. 26, (1927), zit. nach TH. WAGNER-JAUREGG, *Allg. Therapie der Infektionskrankheiten*, Berlin 1948.
- ¹⁹ Zus. fassg. s. bei J. RUNNSTRÖM, *Adv. Enzymol.*, 9 (1949) 241.

Eingegangen am 14. September 1954