

## DAS KONTRAKTILE EIWEISS UNDIFFERENZIERTER ZELLEN

von

HARTMUT HOFFMANN-BERLING

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

## I

Das Verhalten glycerin-wasserextrahierter Zellen — sog. Zellmodelle — führt zu der Vorstellung, dass Formänderung, Fortbewegung und Zytoplasmateilung tierischer Zellen durch ein kontraktiles System zustandekommen<sup>1, 2, 3.</sup> Die Folgerung, die Reaktion dieses Systems mit dem Betriebsstoff Adenosintriphosphat (ATP) sei ähnlich derjenigen zwischen kontraktilem Muskeleiweiß und ATP, wird bestärkt durch die gleichen Abhängigkeiten beider Prozesse<sup>1</sup>. Wieweit die Ähnlichkeit reicht, kann nur entschieden werden, wenn man isoliertes kontraktiles Zelleiweiß mit Aktomyosin aus Muskeln vergleicht.

Die Isolierung des kontraktilen Zelleiweiß erfordert grössere Mengen unendifferenzierter Zellen. Infolgedessen sind Impfsarkome ein geeignetes Ausgangsmaterial. Nicht infiltrierend gewachsene Sarkome oder Sarkom-Asciteszellen werden nach sauberer Isolierung und Entfernung der Nekrosen mit dem Waring Blender so weitgehend zertrümmert, dass intakte Zellen nicht mehr vorhanden sind. Die Zelltrümmer werden mit neutraler 0.6 M KCl-Lösung extrahiert und die unlöslichen Strukturen niederzentrifugiert.

Der Extrakt enthält dann alle löslichen Zellproteine, einen Teil des Nucleohistons aus den Zellkernen neben einer ungeheuren Zahl granulärer Elemente. Die Entfernung des Nucleohistons erfolgt durch Verdünnung des Extrakts auf eine Ionenstärke  $I = 0.35 \mu$ . Zugabe von  $5 \cdot 10^{-4}$  MATP hält das kontraktile Zelleiweiß in Lösung. Bei weiterer Erniedrigung der Ionenstärke auf  $0.05 \mu$  fällt das kontraktile Protein aus, während die anderen löslichen Zelleiweisse mit dem Überstand verworfen werden. Die granulären Beimengungen, die von dem kontraktilen Protein mitgerissen wurden, werden nach Wiederauflösen und Umfällen des kontraktilen Eiweiß durch Zentrifugation 2 Stunden bei 33,000 g, die kleinsten Elemente durch eine Zentrifugation 45 min bei 100,000 g entfernt (s. im method. Teil!).

## II

Das kontraktile Zelleiweiß, das in solcher Art abgetrennt ist, gleicht dem Aktomyosin aus Skelettmuskeln in allen bisher untersuchten Eigenschaften.

Schon das Isolationsverfahren zeigt, dass die Extrahierbarkeit des kontraktilen Zelleiweiß den entsprechenden Eigenschaften des Aktomyosin<sup>4</sup> gleicht: volle Extrahierbarkeit bei  $\text{pH} \sim 7$ , wenn die Ionenstärke  $0.6 \mu$  beträgt und ATP zugegen. *Literatur S. 463.*

ist (ATP muss zugesetzt werden, weil der ATP-Gehalt der Zellen geringer ist als der von Muskeln), volle Löslichkeit des kontraktilen Zelleiweiss bei  $0.3 \mu$  nur wenn ATP zugegen ist, volle Unlöslichkeit bei  $0.05 \mu$  auch in ATP-Gegenwart. Die Übereinstimmung geht noch weiter. Ebenso wie das Aktomyosin des Muskels bei  $I = 0.3 \mu$  nur sehr schlecht extrahierbar ist, wenn ATP fehlt, aber bei der gleichen Ionenstärke vollständig löslich ist, nachdem es einmal isoliert wurde, löst sich auch das isolierte kontraktile Zelleiweiss bei  $0.3 \mu$  mit und ohne ATP vollständig. Und schliesslich wird auch die Löslichkeit des Zelleiweiss bei niedriger Ionenstärke durch ATP ähnlich erhöht wie die Löslichkeit des Aktomyosin (vgl. Fig. 3).

### III

Die Untersuchung der Aktomyosine der Muskeln hat die Ansicht von SZENT-GYÖRGYI<sup>5</sup> bestätigt, dass die Schrumpfung und Superpräcipitation von Aktomyosin-Flocken auf der gleichen Reaktion zwischen kontraktilem Protein und ATP beruhen wie die Kontraktion geordneter Aktomyosinfäden und extrahierter Muskelfibrillen. Denn es hat sich gezeigt, dass beide Vorgänge bedingungsgleich sind.

Auch Flocken aus dem isolierten kontraktilen Eiweiss von Sarkomzellen superpräcipitieren und schrumpfen unter ATP in ähnlichem Umfang wie Aktomyosinflocken, wenn die Ionenstärke niedrig ist. Ein Vergleich der Fig. 1a und 1b zeigt, dass das (dunkel abgezeichnete) Volumen der Flocken durch ATP-Zugabe stark abnimmt. Ebenso zeigt die Vermehrung des Kontrasts zwischen den dunklen Flocken und ihrem hellen Hof, dass die optische Dichte der Flocken durch das ATP erhöht wird. Die optische Dichte der Flocken aber ist auch phasenkontrastmikroskopisch in erster Näherung ein Mass ihrer Eiweisskonzentration.

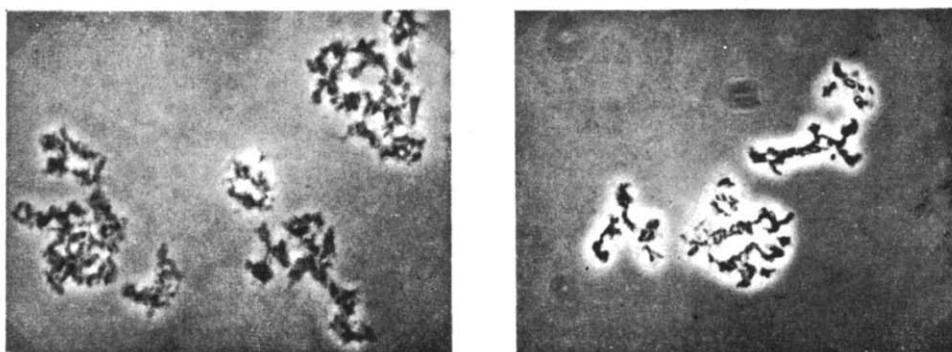


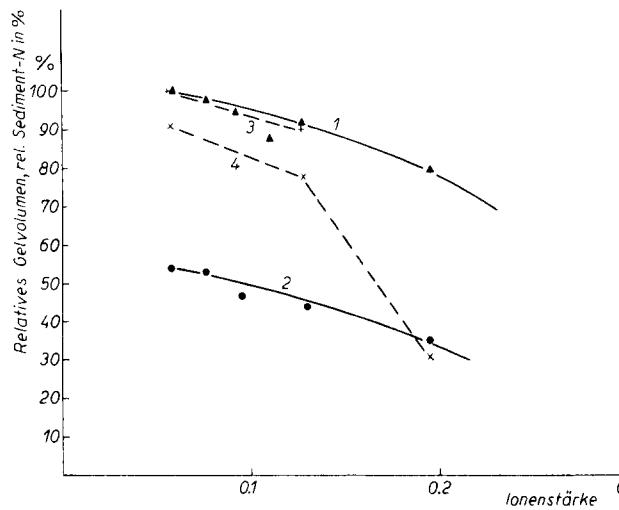
Fig. 1. Flockenkontraktion eines Gels aus kontraktilem Zelleiweiss bei  $22^\circ C$ ,  $I = 0.08 \mu$ , pH 6.9. (a) Kontrolle ohne ATP-Zusatz. (b) 45 min nach Zugabe von  $5 \cdot 10^{-4} M$  ATP. — Abb. Masstab 800:1. — Die hellen Höfe um die kontrahierten Flocken sind bedingt durch die veränderten optischen Eigenschaften des kontrahierten Eiweiss. Ihre Innenkonturen bezeichnen den Umfang der Objekte.

Fig. 2 zeigt, dass bei einer Ionenstärke ähnlich  $0.1 \mu$  das Volumen zentrifugierter Flocken nach ATP-Zugabe nur etwa halb so gross ist, wie es vorher war. Ein Vergleich der Kurven 3 und 4 der Fig. 2 zeigt ferner, dass die Volumenabnahme der sedimentierten Flocken bis hinauf zu einer Ionenstärke von  $0.13 \mu$  nur unwesentlich dadurch beeinträchtigt wird, dass bei ATP-Zusatz eine kleine Menge

des Proteins in Lösung geht. Bei  $0.2 \mu$  dagegen ist der Eiweissgehalt der Flocken unter ATP stärker abgesunken als das Gelvolumen; die Kurven 2 und 4 überschneiden sich infolgedessen bei einer Ionenstärke von  $0.18 \mu$ . Das aber bedeutet, dass bei  $0.18 \mu$  keine Superpräcipitation oder Flockenschrumpfung mehr stattfindet und dass bei höheren Ionenstärken der noch nicht in Lösung gegangene Anteil der Flocken sogar etwas quillt. Die Abhängigkeit der Superpräcipitation und Schrumpfung von der Ionenstärke ist also ungefähr die gleiche für das kontraktile Zelleiweiss wie für das Aktomyosin des Muskels<sup>4</sup>.

Auch ihre Giftempfindlichkeit ist gleich.  $5 \cdot 10^{-4} M$  Salyrgan\* und  $2 \cdot 10^{-4} M$  Germanin\*\* unterdrücken die Superpräcipitation und Schrumpfung der Flocken aus kontraktilem Zelleiweiss ebenso wie die von Aktomyosingelen. Das isolierte Protein ist also tatsächlich das kontraktile Protein der Zelle.

Die Schrumpfung der Flocken aus kontraktilem Zelleiweiss ist bei Zimmertemperatur erst nach 30 min maximal. Sie läuft viel langsamer ab als die Kontraktion von Aktomyosingelen und etwa ebenso schnell wie die Kontraktion der glycerin-extrahierten Modelle aus Einzelzellen<sup>1</sup>.



schreitende Auflösung des Gels mit steigender Ionenstärke. 3. (+) bei Abwesenheit von ATP; 4. (x) nach 45 min Behandlung mit  $5 \cdot 10^{-4} M$  ATP bei  $22^\circ C$ . Die Differenz zwischen den Kurven 4 und 3 gibt die Volumenabnahme durch Auflösung, die Differenz zwischen den Kurven 4 und 2 die Volumenabnahme durch Kontraktion des Gels.

Fig. 2. Schrumpfung (Superpräcipitation) eines Gels aus kontraktilem Zelleiweiss durch ATP. Auflösung des Gels durch steigende Ionenstärke ohne Zusatz und bei gleichzeitigem Zusatz von ATP (pH 6.8,  $5 \cdot 10^{-4} M$   $MgCl_2$ ). Die Angaben sind relative Werte. Sie beziehen sich auf das Gelvolumen und den abzentrifugierbaren Gelstickstoff des ATP-freien Ansatzes der Ionenstärke  $I = 0.058 \mu$ , die gleich 100% gesetzt werden. Kurve 1 und 2: Abhängigkeit des Gelvolumens von der Ionenstärke. 1. (▲) bei Abwesenheit von ATP; 2. (●) nach 45 min Behandlung mit  $5 \cdot 10^{-4} M$  ATP bei  $22^\circ C$ . Kurve 3 und 4: Änderung des Sedimentstickstoffs durch fort-

#### IV

Wird eine Lösung des gereinigten kontraktilen Zelleiweiss mit  $2 \cdot 10^{-4} M$  ATP versetzt, so fällt ihre Viscosität stark ab und kehrt auf den Ausgangswert zurück, nachdem das ATP durch das Protein gespalten ist (Fig. 3). Errechnet man nach PORTZEHLD, SCHRAMM UND WEBER<sup>6</sup> die ATP-Empfindlichkeit\* der Präparate, so ist sie etwa 68, d.h. die (von der Eiweisskonzentration unabhängige) Viscositätszahl  $Z\eta$ <sup>§</sup> ist vor der ATP-Zugabe 68% grösser als nach ATP-Zugabe.

\* Salicyl-( $\lambda$ -hydroxymercuri- $\beta$ -methoxypropyl)-amidoorthoacetat.

\*\*  $Na_6$ -bis(*m*-aminobenzol-*m*-amino-*p*-methylbenzoyl-*l*-naphthyl-aminotrisulfonat).

\*\*\*  $\frac{Z\eta}{Z\eta_{ATP}} \cdot 100 = \frac{\log \eta_{rel} - \log \eta_{relATP}}{\log \eta_{relATP}} \cdot 100$ .      §  $Z\eta = \lim \frac{\eta_{spez}}{c}$  für  $c = 0 = \frac{\ln \eta_{rel}}{c}$ .

Es sei hervorgehoben, dass sich andere Zellelemente, z.B. Mikrosomen, völlig anders verhalten; die Viscosität von Mikrosomensuspensionen steigt auf ATP-Zusatz nicht unbeträchtlich und ausserdem irreversibel an. Das Mikrosomenvolumen nimmt also offenbar unter ATP zu (Fig. 3).

Das Viscositätsverhalten des isolierten, gelösten kontraktilem Zelleiweiss ändert sich auf ATP-Zugabe also in der gleichen Weise wie das Viscositätsverhalten von Aktomyosinlösungen. Dies steht in einem gewissen Gegensatz zu den Befunden, die LOEWY<sup>7</sup> an ungereinigten Extrakten aus Schleimpilzplasmoiden gewonnen hat. Vor allem aber legt es den Gedanken nahe, dass auch das kontraktile Protein der Zelle — ebenso wie das Aktomyosin — ein Komplex aus zwei Proteinen ist, die in gelöstem Zustand unter ATP dissoziieren<sup>5,8</sup>.

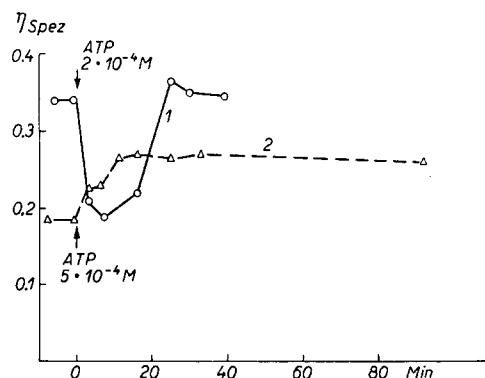


Fig. 3. Änderung der spezifischen Viscosität einer Lösung von kontraktilem Zelleiweiss (1 mg N/ml) und einer Mikrosomensuspension (2.9 mg N/ml) durch ATP. Material aus Jensen-Tumor,  $I = 0.6 \mu$ , pH 7.2, kein  $Mg^{2+}$ -Zusatz,  $22^\circ C$ . 1. (○) kontraktiles Zelleiweiss; 2. (△) Mikrosomensuspension.

## V

Ebenso wie das isolierte und gereinigte Aktomyosin des Muskels ATP spaltet, spaltet auch das isolierte kontraktile Protein der Sarkomzelle ATP. Da die mechanische Leistung der kontraktilen Zellstrukturen — schon durch die Langsamkeit der Zellkontraktion — hundert bis tausend mal kleiner ist als die mechanische Leistung der Muskelmodelle, ist auch die Spaltungsrate etwa hundert mal kleiner. Während Aktomyosin aus dem Skelettmuskel der Säugetiere etwa  $2.3 \mu\text{Mol ATP}/\text{mg N min}$  spaltet, wird durch das isolierte Zelleiweiss unter den gleichen Bedingungen nur  $\sim 0.015 \mu\text{Mol ATP}$  gespalten (Tab. I).

TABELLE I

VERGLEICH DER ATP-SPALTUNGEN DURCH ISOLIERTES KONTRAKTILES EIWEISS  
AUS RATTEN-SARKOMZELLEN UND MUSKELN

ATP-Spaltung in  $\mu\text{M P}/\text{mg N min}$  bei  $22^\circ C$  von isoliertem kontraktilem Eiweiss aus

Yoshida-Sarkom, solide	0.015 (0.009–0.024)
Yoshida-Sarkom, Asciteszellen	0.014
Jensen-Sarkom	0.020
Skelettmuskel (Kaninchen)	2.3

Diese Spaltungsrate ist viel kleiner als die Spaltungsrate der wasser-glycerinextrahierten Gesamtzellen (Fig. 4). Das ist zu erwarten, da bei der Wasser-Glycerinextraktion der lebenden Zellen die strukturgebundenen ATPasen der Zellkerne, der Mitochondrien und Mikrosomen im Zellmodell zurückbleiben.

Da die Aktivität der anderen ATPasen wesentlich höher ist als die ATPase-Aktivität des kontraktilem Zellproteins, besteht die Gefahr, dass die ATPase-Eigenschaften des isolierten kontraktilem Proteins schon durch Beimengung von Spuren

der anderen ATPasen stark verfälscht werden. Dass dies in Wirklichkeit nicht der Fall ist, ergibt sich aus Studien über die verschiedenartige Giftempfindlichkeit der verschiedenen Zell-ATPasen. Die isolierte kontraktile Zell-ATPase wird sowohl durch  $2-5 \cdot 10^{-4} M$  Salyrgan wie Germanin praktisch vollständig gehemmt (Fig. 4). Das ist genau die gleiche Konzentration beider Gifte, die auch die Zellkontraktion<sup>1</sup> und die ATP-Spaltung durch das Aktomyosin der Muskeln<sup>9</sup> vollständig unterdrückt. Dagegen zeigt sich, dass die Geschwindigkeit der ATP-Spaltung der ganzen wasser-glycerinextrahierten Zellen (Zellmodelle) durch die gleiche Konzentration an Salyrgan nur um etwa 20% und durch die gleiche Konzentration an Germanin nur um 70% herabgesetzt wird. Außerdem nimmt die Germaninhemmung auch durch Steigerung der Germanin-Konzentration auf das fünf- bis zehnfache nicht weiter zu, während entsprechende Steigerungen der Salyrgankonzentration ebenfalls nur verhältnismässig geringe Verstärkung der Hemmung bewirken (Fig. 4).

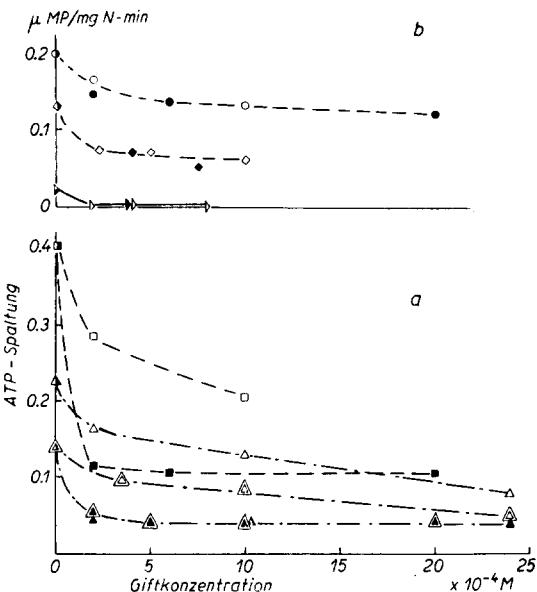


Fig. 4. Aktivität und Hemmbarkeit der ATP-Spaltung glycerinwasserextrahierter, ganzer Zellen und isolierter Zellfraktionen durch Salyrgan und Germanin.  $I = 0.08 \mu$ , pH 6.8, 22°C. Leere Symbole: Salyrgan; gefüllte Symbole: Germanin.

a.  $\triangle$   $\blacktriangle$  = glycerinextr. Fibroblasten;  $\square$   $\blacksquare$  = glycerinextr. Leberzellen;  $\square$   $\blacksquare$  = glycerinextr. Leberzytoplasma. b.  $\circ$   $\bullet$  = glycerinextr. Leberzellkerne;  $\diamond$   $\blacklozenge$  = in 0.6 M KCl isol. Mikrosomen (aus Yoshida-Sa.);  $\triangle$   $\blacktriangle$  = isol. kontrakt. Zelleiweiss (aus Yoshida-Sa.).

zerlegt, so wird die ATP-Spaltung durch die Stickstoffeinheit der Zytoplasmastruktur grösser und giftempfindlicher gefunden als die ATP-Spaltung durch die Stickstoffeinheit der Kernstruktur oder des kompletten Zellmodells. Doch wird auch die ATP-Spaltung der Zytoplasmastruktur durch  $2-5 \cdot 10^{-4} M$  Salyrgan nur um etwa 40%, durch  $2-5 \cdot 10^{-4} M$  Germanin um etwa 70% herabgesetzt. Die ATPase des Kerns ist durch Salyrgan und Germanin sogar so wenig hemmbar, dass die beobachtete fermentative Hemmung leicht auf Verunreinigungen mit unzerstörten Zellen bezogen werden kann, die bei Aufarbeitung in Glycerin nicht auszuschliessen sind (Fig. 4). Die Kern-ATPase unterscheidet sich also von der kontraktilen ATPase durch ihre weitgehende Unempfindlichkeit gegen die beiden Standardgifte.

Unterteilt man die ATPasen des Zytoplasma weiter, indem man durch hohe Zentrifugalkräfte (45 min 100,000 g) aus den vorgereinigten Lösungen des kontraktilen Eiweiss (von Sarkomzellen) die noch vorhandenen Mikrosomen abtrennt, so findet man, dass die ATPasen dieser zuletzt sedimentierenden Mikrosomenfraktion 5-10 mal aktiver sind als die kontraktile ATPase. Ihre Spaltungsrate wird durch Salyrgan und Germanin in etwa dem gleichen — recht geringen — Umfang herabgedrückt. Sie sinkt bei Gegenwart von  $2 \cdot 10^{-4} M/l$  der beiden Gifte nur um etwa ein Drittel,

während die Aktivität der kontraktilen ATPase durch diese Giftkonzentrationen praktisch vernichtet ist (Fig. 4).

Die mitgeteilten Befunde sprechen dafür, dass die hohe Spaltungsrate des kompletten Zellmodells und ihre so sehr verschiedene Empfindlichkeit gegen Salyrgan und Germanin auf der ATP-Spaltung durch die Mitochondrien beruhen, da alle anderen Strukturelemente gegen diese beiden Gifte gleich stark (kontraktiles Protein) oder gleich schwach (Mikrosomen und Kerne) empfindlich sind. Besondere Aufmerksamkeit verdient das Verhalten der Mikrosomen-ATPasen, da Mikrosomen die wichtigste Beimengung zu den gereinigten Lösungen des kontraktilen Zelleiweiss bilden. Dagegen wurden isolierte Mitochondrien nicht untersucht, weil sie aus den Rohextrakten leicht abzentrifugieren sind. Eine Verunreinigung des kontraktilen Zelleiweiss durch diese Strukturelemente ist daher unwahrscheinlich.

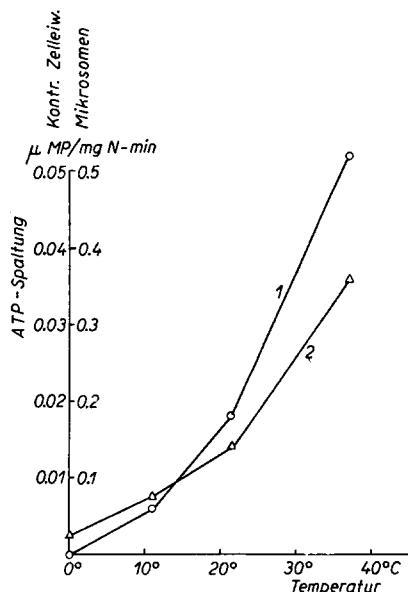


Fig. 5. Temperaturabhängigkeit der ATP-Spaltung von kontraktilem Zelleiweiss und Mikrosomen.  $I = 0.08 \mu$ , pH 6.9,  $1 \cdot 10^{-3} M$   $Mg^{2+}$ , Material aus Yoshida-Sa. Die Spaltung der Mikrosomen ist gegenüber der des kontraktilen Zelleiweiss  $10:1$  verkleinert aufgetragen. 1. (○) kontraktiles Zelleiweiss; 2. (△) Mikrosomen.

Der Temperaturkoeffizient der ATP-Spaltung des kontraktilen Zelleiweiss liegt bei Temperaturen  $> 12^\circ C$  zwischen 2 und 3. Er ist deutlich grösser als der Temperaturkoeffizient der ATP-Spaltung durch die Mikrosomen (Fig. 5).

Wie Fig. 6 zeigt, wird bei niedriger Ionenstärke mit steigender  $Mg^{2+}$ -Konzentration die ATP- und ITP-Spaltung durch Gele des kontraktilen Zelleiweiss bis zu einem Optimum gefördert. Nach Überschreitung der optimalen  $Mg^{2+}$ -Konzentration nimmt die ATP-Spaltung deutlich wieder ab. Bei Ionenstärken  $< 0.2 \mu$ , d.h. im Sol, ist

\* Inosintriphosphat.

Die grossen Unterschiede der ATPase-Aktivität und Giftempfindlichkeit des kontraktilen Proteins einerseits und der anderen ATPasen andererseits gestattet eine Abschätzung der Verunreinigung der kontraktilen Präparate durch fremde ATPasen. Denn die kontraktile ATPase wird durch  $2 \cdot 10^{-4} M$  Salyrgan nur praktisch vollständig gehemmt. Tatsächlich bleibt ein kleiner Spaltungsrest — ähnlich 10% — der sich durch Erhöhung der Giftkonzentration auf das zehnfache nicht weiter vermindert. Dieser Spaltungsrest würde durch eine Beimengung von 1-3% Mikrosomenstickstoff erzeugt werden. Das stellt die obere Grenze der Verunreinigung durch Mikrosomen dar.

## VI

Wird die Abhängigkeit der ATP- und ITP\*-Spaltung durch das kontraktile Protein von der Temperatur, der  $Mg^{2+}$ -Konzentration und der Ionenstärke untersucht und mit den entsprechenden Abhängigkeiten der ATP- und ITP-Spaltung durch das Aktomyosin des Sägermuskels<sup>10</sup> verglichen, so ergeben sich qualitative Übereinstimmungen und quantitative Differenzen, die allerdings wohl nicht grösser sein mögen als zwischen den kontraktilen ATPasen der verschiedenen Muskelarten.

Der Temperaturkoeffizient der ATP-Spaltung

die Spaltungsrate des ATP mit und ohne  $Mg^{++}$  kleiner als im Gelzustand (Fig. 7). Dies stimmt überein mit den Besonderheiten der ATP-Spaltung durch Aktomyosin<sup>11</sup>.

Dagegen ist die Abnahme der ATPase-Aktivität bei der Umwandlung des Gels in ein Sol sehr viel kleiner als die entsprechende Aktivitäts-Abnahme der Aktomyosin-ATPase<sup>11</sup>. Und auch der  $Mg^{++}$  Bedarf des kontraktiles Zelleiweiss ist offenbar geringer als der des kontraktiles Muskeleiweiss, denn es bleibt eine beträchtliche Restspaltung selbst dann erhalten, wenn dass  $Mg^{++}$  der Präparationen durch  $4 \cdot 10^{-3} M$  Äthylendiaminotetraacetat (EDTA) weitgehend komplex gebunden ist (Fig. 6).

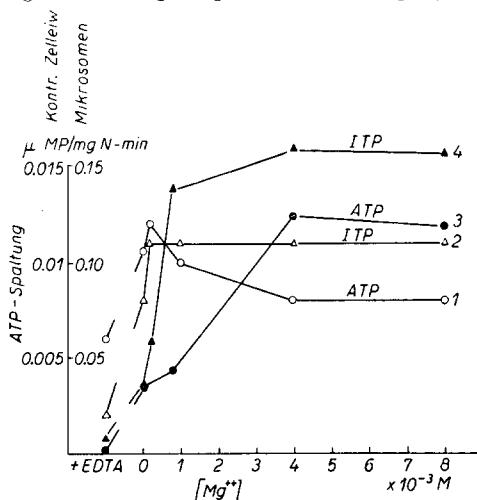


Fig. 6. Abhängigkeit der ATP- und ITP-Spaltung von kontraktilem Zelleiweiss und Mikrosomen von der  $Mg^{++}$ -Konzentration. Yoshida-Sa,  $I = 0.08 \mu$ ,  $pH \sim 7.0$ . Angegeben sind außer Werten ohne  $Mg^{++}$ -Zusatz auch Werte ohne  $Mg^{++}$ -Zusatz bei gleichzeitiger Zugabe von  $4 \cdot 10^{-3} M$  Äthylendiaminotetraacetat (EDTA). Die Spaltung der Mikrosomen ist gegenüber der Spaltung des kontraktilen Zelleiweiss 10:1 verkleinert aufgetragen. 1. (○) kontraktiles Zelleiweiss + ATP; 2. (△) kontraktiles Zelleiweiss + ITP; 3. (●) Mikrosomen + ATP; 4. (▲) Mikrosomen + ITP.

Trotz des verschiedenen Absolutbedarfs an  $Mg^{++}$ -Ionen gleichen sich aber kontraktiles Zell- und Muskeleiweiss darin, dass der  $Mg^{++}$ -Bedarf der ITP-Spaltung deutlich grösser ist als derjenige der ATP-Spaltung: in Gelen ohne  $Mg$ -Zusatz sowohl wie in Gelen, in denen das "natürliche"  $Mg^{++}$  mit EDTA blockiert ist, bleibt die ITP-Spaltung viel stärker hinter der ATP-Spaltung zurück als bei optimaler oder überoptimaler  $Mg^{++}$ -Konzentration (Fig. 6).

Ganz anders — quantitativ wie qualitativ — als die kontraktile ATPase verhält sich die an Mikrosomen gebundene ATPase der Zellen. Sie wird — ähnlich wie die von KJELLEY UND MEYERHOF<sup>12</sup> beschriebene granulagebundene ATPase des Muskels — durch  $Mg^{++}$  stark und ohne deutlichen optimalen Gipfel gefördert. Außerdem ist der  $Mg^{++}$ -Bedarf der ITP-Spaltung durch Mikrosomen kleiner als der  $Mg^{++}$ -Bedarf der ATP-Spaltung (Fig. 6).

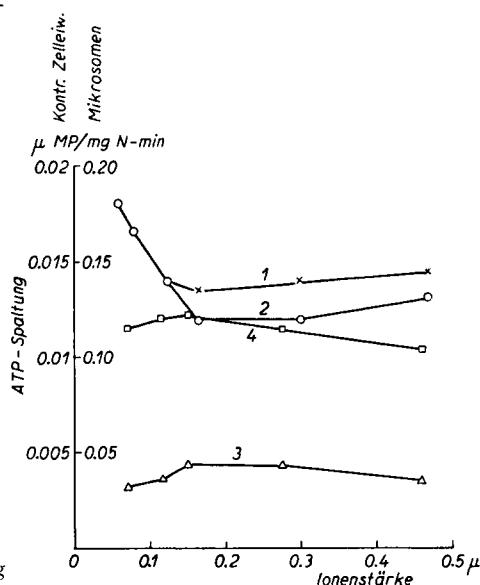


Fig. 7. Abhängigkeit der ATP-Spaltung durch kontraktiles Zelleiweiss und Mikrosomen von der Ionenstärke. pH 6.9;  $22^\circ C$ . 1. (×) kontraktiles Zelleiweiss ohne  $Mg^{++}$ -Zusatz; 2. (○) kontraktiles Zelleiweiss mit  $1 \cdot 10^{-3} M$   $Mg^{++}$ ; 3. (△) Mikrosomen mit  $1 \cdot 10^{-3} M$   $Mg^{++}$  (4 Tg. alte Präparationen); 4. (□) Mikrosomen mit  $5 \cdot 10^{-3} M$   $Mg^{++}$ . Die Spaltungsrate der Mikrosomen ist gegenüber der Spaltung des kontraktilen Zelleiweiss 10:1 verkleinert aufgetragen.

Für eine Verwandschaft der ATPase von KJELLEY UND MEYERHOF mit der Mikrosomen-ATPase spricht ferner die Tatsache, dass die durch  $5 \cdot 10^{-3} M$   $Mg^{++}$  aktivierte ATP-Spaltung der Mikrosomen bei Zugabe der gleichen Konzentration an Ca-Ionen von  $\sim 0.15 \mu M$  auf  $\sim 0.03 \mu M$  P/mg N min herabgesetzt wird (bei frischen Mikrosomenpräparaten), während unter den gleichen Bedingungen die ATP-Spaltung durch das kontraktile Zelleiweiss nicht beeinflusst wird. Die  $Ca^{++}$ -Hemmung der  $Mg^{++}$ -aktivierten Mikrosomen-ATPase entspricht der Hemmung der analogen ATPase des Muskels, während die Unbeeinflussbarkeit der  $Mg^{++}$ -aktivierten kontraktile ATPase der Zelle mit der gleichen Eigenschaft der kontraktile Muskel-ATPase übereinstimmt. Das Verhältnis der granulär gebundenen ATPase des Muskels einerseits und der Sarkomzelle andererseits zu den kontraktile ATPasen beider Gewebe scheint zu korrespondieren.

ANHANG: ÜBER DIE ERSCHLAFFUNG DER KONTRAKTILEN ZELLSTRUKTUREN.  
Nach Versuchen von HILDEGARD DÜRWALD

Es ist bekannt, dass die Aktomyosinstrukturen des Muskels sich kontrahieren, wenn zugesetztes ATP gespalten wird, und dass sie erschlaffen, sobald die ATP-Spaltung unterdrückt wird<sup>13</sup>. Da die Erschlaffung kein aktiver Prozess ist, kann dieser Zusammenhang nur gezeigt werden, wenn die kontraktile Struktur in ein Tensiometer<sup>14</sup> eingespannt werden kann. Dann geht die aktive Spannung während der ATP-Spaltung herauf und verschwindet wieder, wenn die Spaltung durch Inhibitoren aufgehoben wird.

Im Gegensatz zu Aktomyosin-Fäden oder Muskelfasermodellen können einzelne wasser-glycerinextrahierte Zellen (Zellmodelle) nicht in ein Tensiometer eingespannt werden. Dagegen ist es möglich, einen Zellfilm aus (in Flaschenkulturen gewachsenen) Fibroblasten nach Glycerin-Wasserextraktion in Streifen zu schneiden und solche Streifen in ein Tensiometer einzuspannen. Durch das Einspannen und durch eine geringe Vordehnung rollt sich der Zell-Film zu einem Zylinder zusammen, dessen Dicke grob abschätzbar ist. Dabei werden die Längsachsen der spindelförmigen Zellen in einem gewissen Umfang in der Zugrichtung orientiert und bleiben einigermassen in dieser neuen Lage, wenn der Streifen wieder entspannt wird.

Wird nun ATP zu Lösungen der üblichen Ionenstärke ( $0.08 \mu$ ) und Reaktion (pH 6.8) hinzugefügt, so entwickeln solche Zellstreifen Spannung. Der Betrag der Spannung fällt sehr stark mit steigendem Durchmesser der Streifen (Fig. 8), weil offensichtlich die Warburg'sche Grenzschichtdicke für das eindiffundierende ATP<sup>15</sup> mit steigender Streifendicke mehr und mehr unterschritten wird\*.

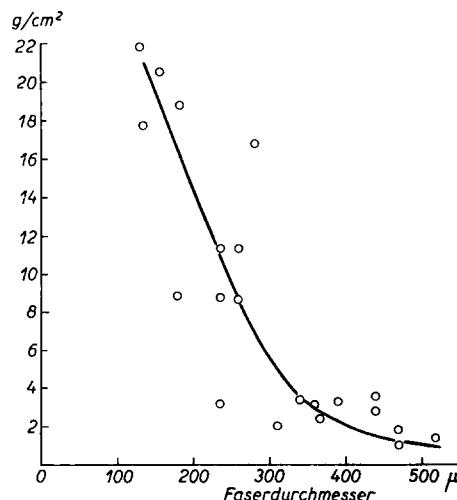


Fig. 8. Abhängigkeit der Maximalspannung von der Dicke der Zellmodell-Streifen.

\* Bei einer ATP-Konzentration von  $5 \cdot 10^{-3} M$  ist eine Überschreitung der Grenzschichtdicke zu erwarten, wenn der Durchmesser der eingespannten Präparate  $> 130 \mu$  wird; denn nach der Literatur S. 463.

Es ist anzunehmen, dass auch die höchsten beobachteten Spannungen der Zellmodell-Streifen viel niedriger sind als die Maximalspannungen, die in der lebenden Zelle auftreten können. Denn die Nachgiebigkeit der Kittsubstanz gestattet Verschiebungen der Zellen gegeneinander, und die vielgestaltigen Zellen werden durch die Vorbehandlung der Streifen nur mangelhaft mit ihren Längsachsen in der Zugrichtung orientiert. Es ist aber von Untersuchungen an Aktomyosin-Fäden aus Säugermuskulatur bekannt, dass die aktive Spannung stark abnimmt, wenn die

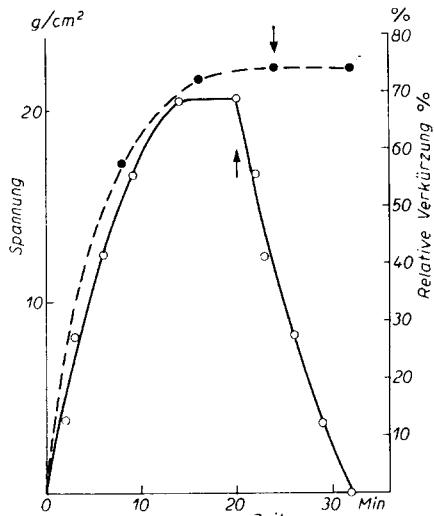


Fig. 9. Spannungsentwicklung von Zellmodell-Streifen (O) und freie Verkürzung des Modells einer Einzelzelle (●) mit der Zeit. Die Pfeile bezeichnen die Zugabe von  $2 \cdot 10^{-3} M$  Salyrgan.

Wichtig ist dagegen, dass die vom Zellmodellstreifen entwickelte Spannung wieder auf Null absinkt, wenn durch Salyrgan die ATP-Spaltung des kontraktilem Zelleiweiss vergiftet wird (Fig. 9). Mit dieser Beobachtung dehnt sich die funktionelle Gleichheit der kontraktilem Zell- und Muskelproteine auch auf die Bedingungen aus, unter denen Erschlaffung stattfindet.

## TECHNIK

### 1. Kontraktiles Zelleiweiss

Jensen- oder Yoshida-Sarkome wurden durch Injektion von Tumor-Suspensionen bzw. Yoshida-Asciteszellen in die Hautfalte zwischen Oberschenkel und Abdomen von Ratten fortgezüchtet. Bei dieser Lokalisation sind die Tumoren gut gekapselt und infiltrieren spät. (Infiltrierend gewachsene Tumoren enthalten Muskelgewebe und sind als Ausgangsmaterial unbrauchbar.) Die Formel von MEYERHOF UND SCHULZ für zylindrische Objekte<sup>16</sup> berechnet sich für diese ATP-Konzentration die Grenzschichtdicke zu  $\sim 130 \mu$ , wenn die gemessene Spaltung der Fibroblastenmodelle von  $1.5 \cdot 10^{-8} M$  P/ml Modell sec eingesetzt wird und wenn angenommen wird, dass die Diffusionskonstante des ATP in Zellmodellen den gleichen Wert ( $3 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{sec}$ ) hat, den HASSELBACH<sup>17</sup> an Muskelmodellen gefunden hat.

\*\* Dies gilt für Fibroblasten-<sup>1</sup> und besonders für Amöbenmodelle. Die Selbstzerreissung macht es sogar unmöglich, Amöbenmodelle im ATP-Bad ihre Pseudopodien einziehen zu lassen. Die Wasser-Glycerinextraktion härtet offenbar die Zellmembran. Deshalb ziehen sich im ATP-Bad die kontraktile Strukturen des Pseudopodiums, die fest an der Membran haften, in die Spitze des Pseudopodiums zurück und durchreissen das Pseudopodium an seiner Basis. Die proximalen Anteile der Zelle kontrahieren sich gleichzeitig im Zentrum der Zelle zu einer Kugel.

Tumoren werden von Nekrosen befreit, eisgekühlt (nicht eingefroren!), zerschnitten und mit 2 Teilen  $0.1\text{ M}$   $\text{KCl} + 0.005\text{ M}$   $\text{NaHCO}_3$  2 min im Waring Blender zerkleinert. Es wird 1 Teil  $1.6\text{ M}$   $\text{KCl} + 2 \cdot 10^{-3}\text{ M}$  ATP zugegeben, durchgemischt und das entstehende Gel nach 5 min durch mehrmaliges kurzes Anstellen des Blenders aufgebrochen. Die Ionenstärke des Homogenats ist dann  $\sim 0.55\text{ }\mu$ . Nach 3 Stunden wird nochmals  $2 \cdot 10^{-3}\text{ M}$  ATP/l zugegeben, nach einer weiteren Stunde kurz homogenisiert, 60 min bei  $33,000\text{ g}$  zentrifugiert und die Ionenstärke des abgegossenen Überstandes durch Zugabe des gleichen Volumens einer Lösung von  $2 \cdot 10^{-3}\text{ M}$   $\text{MgCl}_2 + 5 \cdot 10^{-4}\text{ M}$  ATP auf etwa  $0.3\text{ }\mu$  gebracht. Ein Niederschlag (vorwiegend aus gefälltem Nukleohiston) wird durch kurzes Zentrifugieren abgetrennt. Der Überstand wird mit Wasser auf  $I \approx 0.05\text{ }\mu$  verdünnt, die auftretende Flockung 5 min bei  $33,000\text{ g}$  abzentrifugiert und das Sediment mit soviel  $1\text{ M}$   $\text{KCl} + 0.005\text{ M}$   $\text{NaHCO}_3$  aufgenommen, dass die Lösung eine Ionenstärke von  $0.6\text{ }\mu$  hat. Die Fällung wird etwa zweimal wiederholt, das wiedergelöste letzte Sediment noch einmal 60 min bei  $33,000\text{ g}$  zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wird in der Spinco-Zentrifuge (45 min bei  $100,000\text{ g}$ ) in das beschriebene Mikrosomensediment und die gereinigte Lösung des kontraktilem Zelleiweiss getrennt. Alle Schritte erfolgen im Kälterraum bei Temperaturen nicht  $> 2^\circ\text{ C}$ . Die gewonnenen Lösungen des kontraktilem Zelleiweiss sind 2-3 Tage haltbar. Sie enthalten einzelne lichtmikroskopisch erkennbare Granula und keine Beimengungen von Desoxyribonukleinsäure, die mit der Reaktion von Dische fassbar sind.

Das Mikrosomensediment wird in gröbere Stücke zerbrochen, mit  $0.6\text{ M}$   $\text{KCl}$  1  $\times$  abgespült und mit Hilfe des Glashomogenisators suspendiert.

Die untersuchten Zellfraktionen wurden aus Lebergewebe durch Homogenisieren in neutraler 50%iger Glycerin-Wassermischung mit Zusatz von  $0.12\text{ M}$   $\text{KCl}$ , Differentialzentrifugation und nachfolgendes Waschen gewonnen.

Zur Viscositätsmessung benutzten wir Ostwald-Viscosimeter mit Durchlaufzeiten von etwa 2 min bei  $22^\circ\text{ C}$ .

Die Superpräcipitation und Sol-Gelumwandlung von kontraktilem Zelleiweiss wurde in 6-ml-Ansätzen mit je 7 mg Eiweiss untersucht. Nach der Reaktion wurden die Ansätze durch Zentrifugieren und durch Abpipettieren von 5 ml des Überstandes eingeengt und das Volumen des resuspendierten Sediments in Hämatokritkapillaren gemessen.

Die ATP-Spaltung wurde bei  $\text{pH} \sim 7.0$  in  $0.2\text{ M}$  Boratpuffer mit Zusatz von  $10^{-4}$  bis  $10^{-3}\text{ M}$   $\text{MgCl}_2$  bestimmt. Die Ionenstärke der Ansätze lag zwischen 0.07 und  $0.08\text{ }\mu$ , die Spaltungsdauer bei 10 bis 20 min (bei  $22^\circ\text{ C}$ ). Die ATP-Konzentrationen betragen  $5 \cdot 10^{-4}$  und  $10^{-3}\text{ M}$ ; die Spaltung wurde auf  $10-15\%$  des Substrats begrenzt und durch eine Lösung von 3 g  $\text{HgCl}_2$  in 100 ml 5%iger Trichloressigsäure (2 Teile auf 5 Teile Ansatz) unterbrochen.

## 2. Zellmodellstreifen

Gewebezüchtung modifiziert nach DULBECCO<sup>18</sup>: 9 Tage alte dekapitierte Hühnerembryonen oder Jensen-Tumorgewebe werden zerquetscht, in 0.5%iger Trypsin-Tyrodelösung (3 ml je Embryo) 15 min bei  $37^\circ\text{ C}$  verdaut, mit Glasperlen geschüttelt, 2  $\times$  in Tyrodelösung (TL) gewaschen, in TL suspendiert ( $3.5 \cdot 10^6$  Zellen/ml, eingestellt mit Hilfe einer Leukozyten-Zählkammer). Je 4 ml Zellsuspension werden in 80 mm Carrelflaschen oder Schalen mit eingeschliffenem Deckel eingespiert, dazu 4 ml Nährmedium (10% Embryonalextrakt, 20% Pferdeserum, 70% TL, darin je ml  $2 \cdot 10^{-5}\text{ g}$  Phenolrot, 100 E Penicillin, 100  $\gamma$  Streptomycin. — Embryonalextrakt: Hühnerembryonenbrei + 25% Pferdeserum + 25% TL 12 Stunden bei  $37^\circ\text{ C}$  bebrütet und durch Zentrifugieren abgetrennt). Die Züchtungsgefäße müssen gasdicht verschlossen werden. Bebrütet wurde 3 Tage bei  $37^\circ\text{ C}$ , nach dem 2. Tag das Medium gewechselt, die Antibiotica dabei fortgelassen. Zur Extraktion werden die Kulturen eisgekühlt, mit Kochsalzlösung abgespült und mit eiskalter Extraktionslösung übergossen. Extraktionslösung: 50 vol. %ige Glycerin-Wassermischung, darin  $10^{-2}\text{ M}$  Phosphatpuffer prim./sec = 1:1,  $10^{-3}\text{ M}$  Cystein,  $3 \cdot 10^{-3}\text{ M}$   $\text{CaCl}_2$ .  $\text{Ca}^{+2}$ -Zusätze sind am besten geeignet, die Zerreißfestigkeit der Präparate zu steigern und Zusätzen von  $10^{-5}\text{ g/ml}$  Protaminsulfat — das in dieser Konzentration die Kontraktion nicht beeinträchtigt<sup>2</sup> — überlegen. Extraktion 8 Tage bei  $0^\circ\text{ C}$ , dann bis 14 Tage bei  $-18^\circ\text{ C}$ .

Zur Spannungsmessung werden die Kulturen schonend abgelöst, in 80%igem Glycerin mit Zusatz von  $5 \cdot 10^{-3}\text{ M}$   $\text{CaCl}_2$  in Streifen geschnitten, in die Tensiometer eingezogen und gewaschen. Die Versuchslösungen enthielten  $10^{-2}\text{ M}$  Phosphatpuffer 1:1 und  $10^{-3}\text{ M}$   $\text{CaCl}_2$ ; die ATP-Zusätze brachten die Ionenstärke auf etwa  $0.08\text{ }\mu$ . Der Durchmesser der eingespannten Zellstreifen wurde mit dem Okularmikrometer bestimmt.

Für die Spaltversuche wurde das  $\text{Ca}^{+2}$  fortgelassen und der Phosphatpuffer durch Boratpuffer ersetzt. Die Kulturen wurden aus den Flaschen durch Glasperlen herausgelöst und durch kurze Homogenisation in Suspension gebracht. Das Material für die Spaltversuche wurde nicht mehr als 48 Stunden extrahiert.

Herrn PROF. LETTRÉ danken wir für die freundliche Überlassung der beiden Tumorstämme, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für wertvolle Sachbeihilfen.

## ZUSAMMENFASSUNG

Aus Sarkomzellen wurde das kontraktile Zelleiweiss extrahiert und durch Umfällen und Zentrifugation gereinigt. Sein Anteil am Frischgewicht der Zellen beträgt etwa 0.1–0.2 %. Seine Löslichkeit hängt von der Ionenstärke und der Gegenwart von ATP ebenso ab wie die Löslichkeit des Aktomyosin. Wird den Gelen des kontraktilen Zelleiweiss bei Ionenstärken ähnlich 0.1  $\mu$  ATP zugesetzt, so schrumpfen sie und superpräcipitieren. Das kontraktile Zelleiweiss ist eine ATPase deren Aktivität zwar viel kleiner ist als die ATPase-Aktivität des Aktomyosin, aber ähnlich von der  $Mg^{++}$ -Konzentration und der Ionenstärke abhängt und durch die gleichen Gifte unterdrückt wird, die die ATP-Spaltung durch das Aktomyosin aufheben. Die Viskosität der Sole des kontraktilen Zelleiweiss wird durch ATP reversibel erniedrigt — ebenso wie die Viskosität der Sole des Aktomyosin.

Streifen aus glycerin-wasserextrahierten Gewebekulturen entwickeln Spannungen bis 22 g/cm<sup>2</sup>. Die Spannungen verschwinden und die Modelle erschlaffen ebenso wie Muskelmodelle, wenn ihre ATP-Spaltung vergiftet wird.

## SUMMARY

The contractile protein was extracted from sarcoma cells and purified by precipitation and centrifugation. It accounts for about 0.1–0.2 % of the fresh weight of the cells. The solubility depends on the ionic strength and on the presence of ATP just as in the case of actomyosin. If ATP at an ionic strength about 0.1  $\mu$  is added to gels of a contractile protein, they shrink and superprecipitate. The contractile protein is an ATPase, the activity of which is much less than that of actomyosin, but similarly depends on the  $Mg^{++}$  concentration and the ionic strength and is inhibited by the same poisons which suppress ATP-splitting by actomyosin. The viscosity of the solution of contractile protein, like that of a solution of actomyosin, is lowered reversibly by ATP.

Fibres from glycerine-water-extracted tissue-cultures develop tensions up to 22 g/cm<sup>2</sup>. The tensions disappear and the models relax, like muscle-models when their hydrolysis of ATP is inhibited.

## RÉSUMÉ

La protéine contractile a été extraite des cellules de deux sarcomes et purifiée par précipitation et centrifugation. Elle représente environ 0.1–0.2 % du poids frais des cellules. La solubilité dépend de la force ionique et de la présence d'ATP dans la même mesure que celle de l'actomyosine. Si l'on ajoute de l'ATP à un gel de protéine contractile à la force ionique de 0.1  $\mu$ , elle se contracte et surprécipite. La protéine contractile est une ATPase, dont l'activité est d'ailleurs beaucoup plus faible que celle de l'actomyosine, mais qui dépend également de la concentration en  $Mg^{++}$  et de la force ionique et qui est inhibée par les mêmes inhibiteurs qui suppriment l'hydrolyse de l'ATP par l'actomyosine. La viscosité d'un sol de la protéine contractile diminue réversiblement en présence d'ATP, de la même façon que celle d'un sol d'actomyosine.

Des filaments préparés à partir de cultures de tissus extraits à l'eau glycerinée développent des tensions atteignant 22 g/cm<sup>2</sup>. La tension disparaît et le modèle se relâche comme un modèle musculaire, quand son activité ATPasique est inhibée.

## LITERATUR

- 1 H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 182.
- 2 H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 146.
- 3 H. HOFFMANN-BERLING, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 332.
- 4 W. HASSELBACH, H. HOFSCHEIDER, E. KASPER, R. LUTZ, *Z. Naturforsch.*, 8b (1953) 204.
- 5 A. SZENT-GYÖRGYI, *Chemistry of Muscular Contraction*, Academic Press, New York, 1951.
- 6 H. PORTZEL, G. SCHRAMM UND H. H. WEBER, *Z. Naturforsch.*, 5b (1950) 61.
- 7 A. LOEWY, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 40 (1952) 127.
- 8 A. WEBER, unveröffentlicht.
- 9 Zusammenfassung s. bei H. H. WEBER, *Harvey Lectures* XIL (1953/54), 37.
- 10 S. SPICER UND W. BOWEN, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 741.
- 11 W. HASSELBACH, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 163.
- 12 W. KJELLEY UND O. MEYERHOF, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 591.
- 13 Siehe z.B. H. H. WEBER UND H. PORTZEL, *Progr. Biophys. and Biophys. Chem.*, 4 (1954) 60.
- 14 A. WEBER, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 214.
- 15 W. HASSELBACH, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 338.
- 16 O. MEYERHOF UND W. SCHULZ, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 217 (1927) 547.
- 17 W. HASSELBACH, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 334.
- 18 R. DULBECCO, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 38 (1952).

Eingegangen den 28. Juli 1955