

Stoffwechselprodukte einzelner Gewebekulturen.

Von

L. Stockinger und **H. Enzl**,

Histologisches Institut der Universität Wien,

und

E. Broda, **L. Sverak** und **O. Suschny**,

I. Chemisches Laboratorium und II. Physikalisches Institut der Universität
Wien.

(Eingelangt am 20. November 1953.)

Es wird ein Verfahren beschrieben, unter Verwendung von radioaktivem Zucker den Stoffwechsel einzelner tierischer Deckglas-Gewebekulturen zu erforschen. Die Mengen an freien Stickstoffbasen und Aminosäuren, Eiweißkörpern, Fettstoffen und Kohlendioxyd, die durch die Kultur im Laufe eines zweektägigen Wachstums gebildet werden, wurden bestimmt. Auch ein Teil der freien Karbonsäuren wurde erfaßt. Insgesamt wurden im Durchschnitt pro Kultur aus den dargebotenen $2 \cdot 10^{-6}$ g Zucker etwa $2 \cdot 10^{-8}$ g in Form der bisher erfaßten Stoffwechselprodukte assimiliert.

Einleitung.

Wir haben früher über eine Methode¹ berichtet, mit deren Hilfe der Stoffwechsel einzelner Deckglas-Gewebekulturen tierischen Ursprungs gemessen werden kann, obgleich die Trockenmasse einer solchen Kultur größenordnungsmäßig nur $\frac{1}{100}$ mg beträgt. Nach dieser Methode wird der Kultur mit Radiokohlenstoff markierter Zucker besonders hoher spezifischer Aktivität zugeführt. Nach Abschluß einer Wachstumsperiode (48 Stdn.) wird die Kultur — gegebenenfalls unter Trägerzusatz — chemisch in Fraktionen zerlegt und die Radioaktivität der Fraktionen einzeln bestimmt. Zu diesem Zweck werden die Fraktionen nach *van Slyke* naß verascht und der Radiokohlenstoff in die Form von Bariumkarbonat

¹ O. Suschny, E. Broda, L. Sverak, H. Bilek, O. Feldstein, L. Stockinger und H. Madl, Mh. Chem. 83, 1091 (1952).

gebracht. Aus diesem wird die zur Füllung des Gas-Geiger-Zählrohres notwendige Kohlensäure entwickelt. Die Radioaktivität jeder einzelnen Fraktion zeigt dann an, in welchem Maß das Gewebe den dargebotenen Zucker in die Substanzen umgewandelt hat, die der betreffenden Fraktion angehören.

Seither ist ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von Zuckern hoher spezifischer Aktivität beschrieben worden². Schließlich wurde in der Zwischenzeit auch das für diese Untersuchungen angewandte Verfahren zur Messung sehr kleiner spezifischer Aktivitäten mit dem Gas-Geiger-Zählrohr veröffentlicht³.

Unsere ersten Versuche¹ hatten dem Nachweis gedient, daß das Gewebe während der zweitägigen Wachstumsperiode tatsächlich eine meßbare Menge Radiokohlenstoff aufnimmt und in Gewebebestandteile einbaut. Es wurden dabei damals, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch zurückgehaltenen Zucker mit Sicherheit zu verhindern, nur die in Wasser unlöslichen Gewebebestandteile erfaßt.

In vorliegender Arbeit soll nun über weitere Versuche berichtet werden, bei denen auch wasserlösliche Stoffwechselprodukte der Analyse unterworfen wurden. Im gegenwärtigen Stadium, in dem hauptsächlich das Arbeitsverfahren weiter entwickelt werden sollte, wurden Bestimmungen wohldefinierter individueller Stoffe noch nicht vorgenommen; vielmehr wurden Gruppen von Stoffwechselprodukten, wie sie bei der Auftrennung in Fraktionen zunächst anfallen, gemeinsam bestimmt.

Die Gruppen sind in unserer vorläufigen Bezeichnungsweise 1. die freien Basen und Aminosäuren, 2. die Fettstoffe, 3. die freien Kohlen-säuren und 4. die Eiweißkörper. Unter dem Begriff „Fettstoffe“ soll in diesem Zusammenhang die Gesamtheit der in den Geweben vorkommen-den, in Fettlösungsmitteln wesentlich besser als in Wasser löslichen Stoffe verstanden werden. Außerdem wurde die im Stoffwechsel gebildete Kohlensäure bestimmt.

Gewebezüchtung.

Die Kulturen stammten ausnahmslos von embryonalen Hühnchen. Nach 8- bis 10tägiger Bebrütung der Eier wurden Gewebe aus dem Herzen, den Extremitäten oder der Schädelkapsel explantiert. Das Explantat wurde in den letzten beiden Fällen durch mehrere Passagen bis zur morphologischen Entdifferenzierung gezüchtet. Diese Kulturen wurden bei der Umbettung in zwei gleiche Teile geschnitten. Der eine Teil diente als Versuchs-, der andere als Kontrollkultur. Durch Vergleich mit den Kontrollen sollte festgestellt werden, ob die radioaktive Lösung auf Grund eines eventuellen Gehaltes an Verunreinigungen die Kultur schädigte.

² L. Sverak, O. Suschny und E. Broda, Mh. Chem. 84, 931 (1953).

³ G. Rohringer und E. Broda, Z. Naturforsch. 8 b, 159 (1953).

Der radioaktive Zucker (gleiche Teile Glukose und Fruktose) gelangte in Ringerlösung zur Anwendung; als Vergleichslösung diente Ringerlösung mit inaktiver Glukose.

Die Herzkulturen dagegen wurden sofort bei der Explantation zum Teil mit der radioaktiven Versuchslösung angelegt, wobei gleichartige, mit der inaktiven Ringerlösung angesetzte Kulturen als Kontrollen dienten.

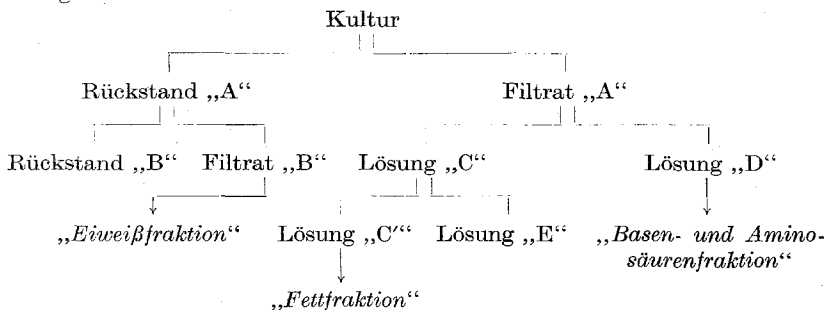
Bei der hier angewendeten Deckglas-Methode werden immer nur 1 Tropfen Hühnerplasma und 1 Tropfen Embryonalextrakt als Kulturmedium verwendet. Für Versuche mit derartigen Kulturen wird noch ein 3. Tropfen mit der Versuchs- bzw. Kontrollösung zugesetzt. Wir nennen daher solche Kulturen „Dreitropfenkulturen“. Die Explantate wachsen also in einer sehr kleinen Menge von Kulturmedium.

In einer Reihe von Vorversuchen wurde die Unschädlichkeit der radioaktiven Lösung geprüft. Erst nach Ausschaltung aller Begleitstoffe, die schädlich wirken können, wurden die Kulturen hergestellt, deren Analyse im folgenden beschrieben ist; die nach unserem Verfahren² hergestellten Zuckerlösungen sind unschädlich. Die Beurteilung des Wachstums bzw. der Schädigung der Kulturen erfolgte bei den bisherigen Versuchen stets durch Vergleich mit den Kontrollen. Es wurde die Größe des Randschleiers abgeschätzt, den die auswachsenden Bindegewebszellen bilden, weiter die Dichte der Lagerung der einzelnen Zellen sowie auch deren Zustand (Verfettung, Vakuolisierung usw.). Von einer quantitativen Auswertung wurde im gegenwärtigen Stadium abgesehen.

Nach 48- bis 72stündigem Aufenthalt im Brutschrank stellen die Kulturen ihr Wachstum ein. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Kulturen zur chemischen Verarbeitung weitergegeben, da bei längerer Inkubationszeit Degenerationserscheinungen auftreten.

Chemische Aufarbeitung.

Nach beendeter Inkubation wurden die Kulturen gemeinsam mit dem gesamten Kulturmedium, das derart insbesondere für Eiweißkörper und Aminosäuren als Träger dient, homogenisiert und in ein Gemisch von Alkohol (10 ccm) und Äther (3 ccm) eingebracht. In diesem Gemisch können die Kulturen längere Zeit aufbewahrt werden. Die Aufarbeitung der Kulturen erfolgte nach dem Schema:



Die homogenisierte Aufschlemmung der Kultur wurde 1 Std. bei 50° C am Rückfluß erwärmt. Dann wurde die Außentemperatur gesteigert, bis die Hauptmenge des Äthers entfernt war. Nun wurden 2 ccm einer Lösung von 5 g Fett pro Liter CCl₄ zugesetzt und weitere 14 Stdn. am Rückfluß erhitzt. Schließlich wurde vom Rückstand abfiltriert, dieser Rückstand „A“ noch 2mal mit je 1 ccm Alkohol nachgewaschen und der Waschkalkohol dem Filtrat zugefügt. Der Rückstand „A“ enthält neben geringen Mengen adsorptiv festgehaltenen hochaktiven Zuckers hauptsächlich Eiweiß.

Da sich einerseits der Zucker aus dem Eiweißniederschlag schwer vollständig entfernen läßt, andererseits aber schon geringste Spuren des Radiozuckers die Resultate verfälschen würden, wurde das Eiweiß nicht direkt bestimmt, sondern vorerst zu Aminosäuren abgebaut. Zu diesem Zwecke wurde der Rückstand „A“ 16 Stdn. in 5 ccm 6 n HCl am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Von den dabei entstandenen Huminstanzen wurde abfiltriert. Dieser Rückstand „B“, in dem sich fast keine Aktivität mehr nachweisen ließ, wurde verworfen.

Das Filtrat „B“ wurde zunächst bei niedriger Temperatur im Vakuum von HCl befreit und sodann auf eine aus zwei mit je zirka 2 g Kationenaustauscher (Dowex 50) gefüllten Segmenten bestehende Säule aufgebracht. Nun wurde mit Wasser nachgewaschen, bis im letzten Waschwasser keine störende Aktivität mehr nachzuweisen war. Erst dann wurden beide Segmente getrennt mit 1 n HCl behandelt. Mit 100 ccm HCl konnten im Laufe von 18 bis 24 Stdn. etwa 90 bis 95% der Hydrolyseprodukte eluiert werden. Im unteren Segment („Kontrollsegment“) wurde nur etwa ein Zehntel der Gesamtaktivität gefunden. Die Aktivität des Eluats wurde als die der „Eiweißfraktion“ bezeichnet.

Das Filtrat vom Rückstand „A“ (Filtrat „A“) enthielt neben der Hauptmenge des nicht aufgenommenen Radiozuckers („Restzucker“) die freien Aminosäuren und alkohollöslichen Peptide sowie die Fettstoffe und freien Karbonsäuren, schließlich auch die Stickstoffbasen der Kultur. Zur Trennung der Fettstoffe von den wasserlöslichen Stoffen wurde wiederholt zwischen organischer und wäßriger Phase geschieden. Zwischendurch wurde, um die Herstellung des Verteilungsgleichgewichtes und insbesondere den Austausch noch zurückgehaltenen Radiozuckers gegen inaktiven Zucker zu gewährleisten, in homogene Phase überführt.

Dazu wurde dem Filtrat „A“ in einem Scheidetrichter zunächst 2 ccm 0,5%iger inaktiver wäßriger Glukoselösung (als Rückhalteträger) zugefügt; die Flüssigkeit bleibt dabei noch homogen. Dann wurde zur Entmischung mit 10 ccm Wasser versetzt. Die untere, organische Phase „C“ wurde abgelassen, die wäßrige Phase „D“ 2mal mit je 1 ccm CCl₄ nachgewaschen und die Waschflüssigkeit der Lösung „C“ hinzugefügt. Diese wurde sodann selbst noch mit 10 ccm Wasser gewaschen und das Waschwasser mit Lösung „D“ vereinigt. Nun wurden zur Lösung „C“ 4 ccm der wäßrigen Glukoselösung zugesetzt und das Ganze mit 20 ccm Alkohol wieder in eine homogene Phase gebracht. Dann wurde wieder mit 20 ccm Wasser entmisch. Die so erhaltenen Lösungen C' und E wurden wie oben gewaschen. Das letzte Waschwasser der Lösung C' muß praktisch inaktiv sein. Diese Lösung enthält nur noch die Fettstoffe der Kultur und Trägerfett. Durch Verdampfen des Lösungsmittels erhält man also die „Fettstoff-Fraktion“. Die Verluste an Fettstoffen kann man angenähert bestimmen, indem man die Ausbeute an Gesamtfett mit der Menge des zugesetzten Trägerfettes vergleicht; sie erwiesen sich als unbedeutend. Die Lösung „E“ muß einen

Teil der freien Fettsäuren neben Spuren Zucker enthalten haben. Sie wurde nicht weiter untersucht.

Die Lösung „D“ enthält die Hauptmenge des Restzuckers, die freien Aminosäuren und Stickstoffbasen, die alkohollöslichen Peptide sowie einen Teil der Karbonsäuren. Die Lösung wurde nach dem Einengen auf ein kleines Volumen analog dem Filtrat „B“ behandelt. Es werden also nach dem Aufsetzen auf eine Kationenaustauschersäule die nichtionisierten Stoffe und die Karbonsäuren durch reichliches Durchwaschen entfernt. Sobald im letzten Waschwasser keine störende Aktivität mehr nachzuweisen war, wurde mit 1 n HCl eluiert („Basen- und Aminosäurefraktion“). Im gleichen Arbeitsgang können auch die Karbonsäuren durch eine Anionenaustauschersäule erfaßt werden, doch sind solche Versuche erst in Angriff genommen.

Einstweilen wurden jene freien Karbonsäuren, die unlösliche Bariumsalze liefern, nebenher in einer weiteren Versuchsreihe bestimmt, die hauptsächlich der Messung der Atmung der Kulturen diene. Einige Kulturen wurden zur Inkubation mit dem radioaktiven Zucker in abgeschlossenem Gefäß über NaOH in den Brutschrank eingeführt, um CO₂-Verluste zu vermeiden. Nach der Inkubation wurde jedes Gefäß unter Lauge geöffnet, die Kultur in 20 ccm 0,05 n NaOH homogenisiert und dann filtriert. Im Filtrat wurden durch Zusatz von BaCl₂ das gelöste Karbonat und ein Teil der Karbonsäuren ausgefällt. Mitgerissene Fettstoffe wurden durch Auswaschen des Niederschlages mit Alkohol und Äther entfernt. Nun wurde in dem Versuchskolben des Gerätes nach *van Slyke* im Vakuum mit Perchlorsäure versetzt. Das entstehende CO₂ wurde im Auffangkolben in NaOH aufgenommen und seine Aktivität bestimmt. Die perchlorsaure Lösung wurde nun mit Äther ausgeschüttelt, der Äther nach gründlichem Waschen mit Wasser verdampft und die so gewonnene Säurefraktion auf Aktivität geprüft.

Ergebnisse.

Jeder einzelnen Kultur waren im Mittel etwa 0,002 mg Zucker in Form von Ringerlösung mit 0,01% Zuckergehalt zugesetzt worden. Der Zucker hatte eine spezifische Aktivität von $2,5 \cdot 10^8$ Zerfällen/Min. mg (= 113 Mikrocurie/mg). Insgesamt wurden 13 Versuche ausgeführt. Die erhaltenen individuellen Aktivitätswerte waren je nach Größe und Vitalität der Kulturen starken Schwankungen unterworfen. Daß es sich dabei aber hauptsächlich um echte Variabilität und nicht um Versuchs-

Tabelle 1. Aktivitäten der Fraktionen.

Fraktion	Aktivität min ⁻¹	Zuckeraufnahme	
		mg	% der zugesetzten Menge
Freie Basen und Aminosäuren	730	$2,9 \cdot 10^{-6}$	0,15
Eiweiß	440	$1,8 \cdot 10^{-6}$	0,09
Fettstoffe	150	$0,6 \cdot 10^{-6}$	0,03
Freie Karbonsäuren (Teilwert)	1050	$4,1 \cdot 10^{-6}$	0,21
Kohlendioxyd	2200	$8,8 \cdot 10^{-6}$	0,44
Summe	4570	$18,2 \cdot 10^{-6}$	0,92

fehler handelt, wird durch die Beobachtung nahegelegt, daß die Aktivitätsverhältnisse in den verschiedenen Fraktionen von Kultur zu Kultur nicht allzusehr verschieden sind. Im Mittel erhielten wir in den erfaßten Fraktionen die Ergebnisse laut Tabelle 1.

Legt man den Berechnungen ein Gewicht der wasserfreien Kultur der Größenordnung von 0,01 mg zugrunde, dann beträgt die Gesamtaufnahme an dargebotenem Zucker zirka 0,2% des Eigengewichtes, entspricht also etwa dem 20fachen der zum Aufbau von wasserunlöslichen Gewebestandteilen verwendeten Zuckermenge¹. Die erhaltene Aktivität reicht auch für die wenigstens teilweise Zerlegung der Fraktionen in einzelne wohldefinierte Verbindungen hin.

Wir danken den Österreichischen Stickstoffwerken, Linz, sowie der *Sonnleithner-* und der *van 't Hoff-*Stiftung für finanzielle Unterstützung unserer Arbeiten.