

Untersuchung der Proteinbildung durch Gewebekulturen mit Hilfe von Radiokohlenstoff*

Von

G. Manner und E. Broda

I. Chemisches Institut der Universität Wien

und

G. Kellner

Histologisch-embryologisches Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 24. Juli 1957)

Der Einbau von Radiokohlenstoff aus Glukose, Glykokoll, Alanin und Tyrosin in die löslichen Proteine von Hühnermesenchym- und (menschlichem) HeLa-Tumorgewebe bei Bebrütung mit Nährmedium wurde untersucht. Das Medium bestand aus einer Mischung von Geyscher Salzlösung, Aszitesflüssigkeit, Nabelstrangserum und Extrakt von Hühnerembryonen. Die Proteine wurden durch Ultrafiltration unter Druck abgeschieden, durch Hochspannungselektrophorese in Stärke-Gel aufgetrennt und nach Verbrennung im Gas-Geiger-Zählrohr auf Aktivität geprüft. Auch gewebefreies Medium nimmt Radiokohlenstoff in Eiweiß auf, doch handelt es sich dabei, wie Kontrolle durch die Ninhydrinprobe ergab, nicht um echten Einbau von Aminosäureresten in peptidischer Bindung. Hingegen bewirkt das Gewebe echten Einbau. Dieser kann auf die Zahl oder Masse der Zellen bezogen werden und ist bei Mesenchym- und Tumorgewebe von der gleichen Größenordnung. Den größten Einbau an Radiokohlenstoff weisen die Albumin- sowie die γ -Globulinfraktion (beide durch das elektrophoretische Verhalten definiert) auf. HeLa nimmt mehr Kohlenstoff aus Glykokoll in γ -Globulin auf als Mesenchym. Da im Gegensatz zu Untersuchungen an Organismen oder Gewebeschnitten mit isoliertem Gewebe gearbeitet wird, besteht keine Möglichkeit der Störung durch Wechselwirkung von Geweben miteinander, insbesondere von Tumorgewebe mit gesundem Gewebe.

* Herrn Prof. Dr. F. Wessely in Verehrung zum 60. Geburtstag gewidmet

Einleitung

Im Krebsgewebe wird mit großer Geschwindigkeit neues Eiweiß gebildet. Daher hat man den Eiweißhaushalt tumortragender Tiere untersucht und mancherlei Unterschiede gegenüber dem gesunden Tier gefunden^{1, 2}. Für die Untersuchung eignen sich besonders die löslichen Proteine, da sie gut gekennzeichnet werden können. So kann man bei den Serumproteinen nicht nur die Konzentrationen analytisch bestimmen, sondern man kann auch mit Hilfe der markierten Atome die Geschwindigkeiten ihres Umsatzes messen.

Die Umsatzgeschwindigkeiten werden ermittelt, indem man dem Versuchstier markiertes Substrat (Aminosäure) zuführt, in gewissen Zeitabständen die einzelnen Proteine isoliert und auf Gehalt an markierten Atomen prüft. Zur Markierung hat man ursprünglich meist schweren Wasserstoff und Stickstoff, später auch radioaktiven Schwefel und Kohlenstoff verwendet^{3, 4, 5, 6, 7}.

Jedoch bleibt dabei unbekannt, inwieweit Unterschiede zwischen gesunden und tumortragenden Tieren unmittelbar auf die Erzeugung von Proteinen durch Krebsgewebe oder aber indirekt auf eine Reaktion gesunden Gewebes auf die Anwesenheit des Fremdkörpers zurückzuführen sind. Diese Schwierigkeit bleibt auch bei der Arbeit mit überlebenden Organen und Gewebeschnitten bestehen. In allen Fällen stehen die Tumorzellen mit gesunden Zellen in Wechselwirkung. Selbst bei Homogenaten treten ähnliche Probleme auf.

Die Erzeugung von Eiweißkörpern durch einheitliches Gewebe läßt sich nur unter Verwendung von Gewebekulturen prüfen. Dabei genießt man den weiteren Vorteil, daß die Gewebe lange — oft jahrelang — weiterleben. Freilich weisen Kulturen von tierischem Gewebe immer nur kleine Masse auf, so daß auch die Masse der Stoffwechselprodukte gering und ihre analytische Erfassung schwierig ist. Erst unter Einsatz radioaktiv markierter Substrate haben sich ins einzelne gehende Arbeiten über den Stoffwechsel von Gewebekulturen ausführen lassen. So wurden

¹ Siehe *R. J. Winzler*, *Adv. Cancer Res.* **1**, 506 (1953).

² Siehe *J. Greenstein*, *Biochemistry of Cancer*. New York. 1954.

³ *R. Schönheimer*, *The Dynamic State of Body Constituents*. Cambridge, Mass. 1949.

⁴ Siehe *D. Rittenberg*, *Dynamic Aspects of the Metabolism of Amino Acids*. Harvey Lectures **44**, 200 (1948/49)

⁵ Siehe *D. M. Greenberg* (Herausgeber), *The Amino Acids and Proteins*. Springfield. 1951.

⁶ Siehe *W. D. McElroy* und *B. Glass* (Herausgeber), *A Symposium on Amino Acid Metabolism*. Baltimore. 1955.

⁷ Siehe *E. Broda*, *Radioaktive Isotope in der Biochemie*. Wien, im Druck.

die Vergärung und Veratmung von Kohlehydraten^{8, 9, 10, 11} sowie die Veratmung von Aminosäuren^{10, 12} durch Kulturen von gesundem und Krebsgewebe unter Verwendung von Radiokohlenstoff gemessen.

Auch der Aufbau von Proteinen aus markierten Aminosäuren oder Glukose durch Gewebekulturen wurde untersucht; dabei wurde das Protein zunächst noch nicht aufgetrennt^{13, 14, 15, 16}. Schließlich wurde die Aufnahme von Radiokohlenstoff aus markierter Glukose in die einzelnen Proteinfractionen eines der Gewebezüchtung dienenden Nährbodens geprüft¹⁷. Nunmehr sollte die in den genannten früheren Arbeiten dieses Laboratoriums entwickelte Methodik auf das Studium des Einbaues von Radiokohlenstoff in Eiweißkörper, die durch gesundes und Tumorgewebe gebildet werden, ausgedehnt werden. Da sich nur die Fraktionen löslicher Proteine voneinander trennen lassen, wurde die Untersuchung auf diese beschränkt.

Material

Gesundes Gewebe wurde den Extremitäten von 10 Tage alten Hühnerembryonen entnommen, in Hühnerplasma eingebettet und nach der Trypsinmethode in Roller-Röhren bis zur weitgehenden Entdifferenzierung gezüchtet. Die Zellen zeigten dann morphologisch nur geringfügige Abweichungen voneinander, so daß die Kulturen als gleichartig angesehen werden konnten¹⁸. Solche Mesenchymkulturen werden auch Fibroblastenkulturen genannt, obwohl diese Bezeichnung streng nur für reine Bindegewebskulturen gilt. Als typisches bösartiges Tumorgewebe wurden Kulturen des Stammes HeLa verwendet, der von einem menschlichen Cervixkarzinom abgeleitet ist und seit Jahren in vielen Laboratorien bearbeitet wird¹⁹.

Ein Nährmedium aus 20% glukosefreier Geyscher Salzlösung, 20% Embryonalextrakt (20%), 30% Aszitesflüssigkeit und 30% Nabelstrangserum

⁸ L. Sverak, O. Suschny, G. Manner, E. Broda, R. Stark, L. Stockinger und H. Enzl, Mh. Chem. **86**, 124 (1955).

⁹ H. Perschke, E. Broda, O. Hoffmann-Ostenhof, L. Stockinger, H. Enzl und G. Kellner, Mh. Chem. **87**, 235 (1956).

¹⁰ E. Broda, O. Hoffmann-Ostenhof, H. Perschke, G. Kellner und L. Stockinger, Z. Krebsforsch. **61**, 504 (1957).

¹¹ G. Kellner, L. Stockinger, O. Suschny, E. Broda und P. Uccusić, Naturwiss. **43**, 472 (1956).

¹² L. Stockinger, G. Kellner, E. Broda, H. Perschke und O. Hoffmann-Ostenhof, Exptl. Cell Res. **11**, 210 (1956).

¹³ H. W. Gerarde, M. Jones und T. Winnick, J. Biol. Chem. **196**, 51 (1952).

¹⁴ M. D. Francis und T. Winnick, J. Biol. Chem. **202**, 273 (1953).

¹⁵ R. E. Winnick und T. Winnick, J. Natl. Cancer Inst. **14**, 519 (1953).

¹⁶ A. Fischer, G. Fischer, C. Landschütz, G. Ehrensward, M. Rafelson und R. Stjernholm, Acta Physiol. Scand. **27**, 247 (1953).

¹⁷ H. Schönfellingner, E. Broda und L. Stockinger, Mh. Chem. **86**, 318 (1955).

¹⁸ G. Kellner, Z. mikroskop.-anatom. Forsch., im Druck.

¹⁹ G. O. Gey, W. D. Coffman und M. T. Kubicek, Cancer Res. **12**, 264 (1952).

unterhält das Wachstum beider Gewebearten¹⁸. Zur Gewinnung des Embryonalextrakts wurden 10 Tage alte Hühnerembryonen mechanisch zerkleinert, durch ein Sieb von 144 Maschen/cm² gepreßt und 15 Min. bei 3500 rpm zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde als Embryonalextrakt (100%) bezeichnet. Der Rückstand wurde noch zweimal mit der doppelten Menge *Geyscher* Lösung extrahiert und die vereinigten Extrakte auf die Konzentration 20% eingestellt. Die Aszitesflüssigkeit wurde durch Punktion gewonnen und stammte meist von Frauen mit Ovarialkarzinomen. Das Serum wurde menschlichen Nabelsträngen entnommen. Die Mischung der drei biogenen Komponenten war, luftdicht abgeschlossen und im Kühlschrank aufbewahrt, 6 bis 8 Wochen haltbar.

Aszitesflüssigkeit und Nabelstrangserum zeigten bei der Elektrophorese die gleichen Proteinfraktionen wie gewöhnliches Serum, jedoch in anderen Mengenverhältnissen. Insbesondere war der γ -Globulingehalt des Nabelstrangserums gering. Daß das Serum von Neugeborenen wenig γ -Globulin enthält, ist bekannt²⁰. Der Proteingehalt des Embryonalextrakts war niedrig.

Die radioaktiven Substrate wurden aus Amersham bezogen. Sie waren biosynthetisch gewonnen worden und waren an allen Kohlenstoffatomen annähernd gleichmäßig markiert. Vor der Verwendung wurden sie papierchromatographisch gereinigt. Das in freier Form schwer lösliche Tyrosin wurde in Form des Hydrochlorids eingesetzt. Die spezifischen Aktivitäten (dpm = Zerfälle/Min.) betragen:

D-Glukose	0,01 mC/0,13 mg	= 1,7 · 10 ⁸ dpm/mg,
Glykokoll	0,01 mC/0,2 mg	= 1,1 · 10 ⁸ dpm/mg,
L-Alanin	0,01 mC/0,3 mg	= 7,3 · 10 ⁷ dpm/mg,
L-Tyrosin	0,01 mC/0,13 mg	= 1,7 · 10 ⁸ dpm/mg.

Arbeitsweise

Um möglichst gleichartige und homogene Kulturen zu erhalten, wurden die Gewebe in Schleierform gezüchtet^{18, 21}. Die bei der Explantation erhaltenen „Stückkulturen“ wurden kurze Zeit mit verdünnter Trypsinlösung behandelt. Dabei werden das Fibrinnetzwerk, in das die Kulturen eingebettet sind, und der Zellverband gelöst. Wenn die Einwirkung des Trypsins rechtzeitig unterbrochen wird, bleibt ein Teil der Zellen vermehrungsfähig. Aliquote Anteile der erhaltenen Zellsuspension wurden nun in mehrere mit Plasma ausgekleidete Proberöhrchen übertragen. Die Zellen werden durch das Plasma an der Wand fixiert und wachsen dort weiter.

Die Röhren wurden mit je 1 ml Nährmedium beschickt und in einer langsam gedrehten Trommel (12 rph) bei 37° bebrütet. Zunächst sank die Zahl der Zellen ab, da viele der geschädigten Zellen (etwa 70% der Gesamtzahl) sich auflösen. Nach 3 oder 4 Tagen aber war der Einsatzwert der Zellzahl wieder erreicht. Die Zahl der Zellen kann jederzeit bestimmt werden, indem man sie mit Trypsin ablöst und die Suspension im Hämozytometer auszählt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zellzahl nicht an den radioaktiven Kulturen selbst, sondern jeweils an einer größeren Zahl Parallelkulturen bestimmt. Aus der Zellzahl konnte auch die Menge an Protein und die Zellmasse abgeschätzt werden, da eine Bestimmung des Stickstoffs

²⁰ A. Polson, Nature 152, 413 (1943).

²¹ G. Kellner und L. Stockinger, Arch. internat. pharmacodyn. 90, 259 (1957).

nach *Kjeldahl* ergeben hatte, daß 10^6 Mesenchymzellen $60 \mu\text{g}$ und 10^6 HeLa-Zellen $92 \mu\text{g}$ N enthielten. Das berechnete Frischgewicht jeder Kultur betrug größenordnungsmäßig 1 mg.

Die Bebrütung mit dem radioaktiven Substrat dauerte stets 4 Tage. Zur Gewinnung der löslichen Proteine wurde die Nährlösung abgessogen, das Gewebe eingefroren, wieder aufgetaut und darauf durch einen motorisch angetriebenen Glaspistill unter Zusatz von Boratpuffer nach *Smithies* ($\text{pH} = 8,5$)²² und Quarzsand mechanisch zerkleinert. Mikroskopische Betrachtung zeigte, daß keine intakten Zellen mehr vorhanden waren. Zur Entfernung von Sand und Zellresten wurde zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit mit der abgessogenen Nährlösung vereinigt.

Zur Reinigung und Konzentrierung der Eiweißlösung wurde unter Druck ultrafiltriert²³. Das verwendete Gerät nahm 5 ml auf und die Fläche der mit einer seichten Mulde versehenen Siebplatte betrug $3,3 \text{ cm}^2$. Das Ultrafilter LSG 60 (Membranfiltergesellschaft Göttingen) ruhte auf einer porösen, aber kaum quellenden Zwischenschicht aus Nylon (Müllergaze). Der Druck betrug 15 Atmosphären (Stickstoff). Die Filtration erfolgte unter Eiskühlung und benötigte samt Waschen 10—12 Stdn. Zu Beginn betrug die Geschwindigkeit 2 ml 2%iger Eiweißlösung/Std. Die Eiweißlösung wurde auf 30% angereichert; das Konzentrat wurde 4mal mit dem Boratpuffer ausgewaschen. Besondere Versuche unter Einsatz einer Nährlösung mit Gehalt an Radioglukose sowie (zur Verdrängung) von 20 mg inaktiver Glukose hatten gezeigt, daß im 3. Waschwasser nur mehr 0,27, im 4. Waschwasser nur mehr 0,01 und im Eiweißkonzentrat 0,03% des Radiokohlenstoffs vorlagen.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Hochspannungselektrophorese. Die selbstgebaute Spannungsquelle bestand aus einem Regeltransformator und einem Hochspannungstransformator mit Gleichrichterröhre und lieferte sekundärseitig bis zu 4000 Volt bei einer Leistung bis zu 260 Watt. Die Elektrophorese wurde in einer geschlossenen Kammer aus Plexiglas mit einer Trennstrecke von 23 cm durchgeführt. Als Trägermaterial dienten Gele aus 14 bis 15 g löslicher Stärke — und zwar hier analysenreiner Stärke von Riedel-de Haen — in 100 ml verd. Boratpuffers²². Die Gele wurden auf dünne hydrophobierte Glasplatten gegossen und während der Elektrophorese (Dauer 3 bis 4 Stdn.) durch Auflegen auf einen wasserdurchströmten Blechbehälter gekühlt. Die Elektroden waren reversible Kupfer-Kupfersulfat-Elektroden. Die leitende Verbindung zu den Gelen wurde durch Stromschlüssel aus 6%iger KCl-Lösung mit 2% Agar und puffergetränkte Dochte aus mehreren Lagen saugfähigen Filterpapiers hergestellt. Zwischen den Dochten und dem Gel befanden sich Strömungsbarrieren aus Dialysierschläuchen²⁴. Die Spannungen betragen 700 bis 800 V, entsprechend Feldstärken von 30 bis 35 V cm^{-1} . Die Breite der Stärkeplatte war 14 cm.

Die Proteine wurden auf einem Längsstreifen des Gels durch Anfärbung mit einer kalten gesättigten Lösung von Amidoschwarz 10 B in Wasser-Methanol-Eisessig (50 : 50 : 10) und Elution des überschüssigen Farbstoffs mit dem gleichen Lösungsmittel lokalisiert²². Ein anderer (breiterer) Längsstreifen wurde für die Radioaktivitätsbestimmung verwendet.

Die Zonen des letzteren Streifens, in denen sich die radioaktiven Proteine befanden, wurden mit dem Spatel voneinander getrennt und eluiert. Dazu

²² O. *Smithies*, *Biochemic. J.* **61**, 629 (1955).

²³ R. *Zsigmondy*, *Angew. Chem.* **26**, 447 (1913).

²⁴ H. *Michl*, *Mh. Chem.* **83**, 737 (1952).

wurde die Stärke auf den Boden von Zentrifugenröhrchen gebracht, ihre Gelstruktur durch Einfrieren und nachfolgendes Auftauen mit Puffer zerstört und die nun in Suspension vorliegende Stärke durch 2stündiges Stehen in Eiswasser und Zentrifugieren von der Proteinlösung getrennt. Stickstoffbestimmungen zeigten, daß 90% des Proteins wiedergewonnen wurden. Sodann wurden die Proteine mit Trichloressigsäure ausgefällt, durch Zentrifugieren abgeschieden, naß zu CO₂ verbrannt, dieses in Lauge aufgefangen und mit Bariumion gefällt²⁵. Schließlich wurde die Aktivität mit dem Gas-Geiger-Zählrohr bestimmt²⁶. Die Leerwerte von etwa 50 min⁻¹ wurden von den an den Proben gemessenen Aktivitäten abgezogen; Differenzen von weniger als 10 min⁻¹ wurden nicht als signifikant betrachtet.

Die einzelnen Proteinfractionen wurden durch zweidimensionale Elektrophorese identifiziert²⁷. Dazu wurde die Proteinlösung zuerst in üblicher Weise der Papierelektrophorese mit einer Trennstrecke von 10—12 cm unterworfen²⁸. Der Papierstreifen wurde dann der Länge nach auseinandergeschnitten und die eine Hälfte mit Amidoschwarz anfärbt, so daß die Orte der verschiedenen Proteinbanden bekannt waren²⁹. Aus der anderen Hälfte wurde ein Längstreifen von etwa 3 mm Breite ausgeschnitten, in einem Stück quer in eine Stärkegelplatte gesteckt und der Elektrophorese unterzogen. Dadurch ließ sich das Verhalten der Proteinfractionen bei Papier- und Stärkeelektrophorese vergleichen. Bei 23 cm Trennstrecke in der Stärke wurden 7 bis 8 Banden verschiedener Intensität erhalten. Zwischen Anode und Kathode folgten einander:

1. Die Präalbumine^{22, 30, 31}, deren Menge gering war.
2. Eine breite Albuminzone ohne ausgeprägte Feinstruktur.
3. Eine schmale Linie, die den α_1 -Globulinen zugeschrieben wurde.
4. Ein breiterer Streifen von α_2 -Globulinen, der bei längeren Trennstrecken noch in 2 bis 3 Unterfractionen aufgespalten wurde.
5. Zwei nahe aneinander liegende, meist ineinander verfließende Linien, deren Zuordnung nicht mit Sicherheit gelang. Die Proteine wurden als α, β -Globuline bezeichnet.
6. Eine scharfe und intensive Linie des β -Globulins.
7. Bei Erwachsenenenserum eine schwache Bande, die ebenfalls zu den β -Globulinen gehörte. Diese Zone fehlte bei Aszitesflüssigkeit und Nabelstrangserum.
8. Auf der Startlinie oder etwas zur Kathode verschoben die breite, meist diffuse γ -Globulinzone.

Ergebnisse

Um den Einbau von Radiokohlenstoff in Protein durch die Gewebe bestimmen zu können, mußten auch Versuche über die Aufnahme von Radiokohlenstoff durch das Nährmedium für sich allein („Blindwert“)

²⁵ D. D. van Slyke und J. Folch, J. Biol. Chem. **136**, 509 (1940).

²⁶ E. Broda und G. Rohringer, Z. Elektrochem. **58**, 634 (1954).

²⁷ O. Smithies und M. D. Poulik, Nature **177**, 1033 (1956).

²⁸ W. Grassmann und K. Hannig, Dtsch. med. Wschr. **76**, 333 (1951).

²⁹ Z. Pučar, Z. physiol. Chem. **296**, 62 (1954).

³⁰ E. A. Kabat, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **49**, 260 (1942).

³¹ H. E. Schultze, M. Schönenberger und G. Schwick, Biochem. Z. **328**, 267 (1956).

angestellt werden. Tatsächlich war schon früher eine wenn auch geringe Aufnahme durch Proteine des Mediums festgestellt worden¹⁷. Als Aufnahmeleistung des Gewebes selbst ist dann die Differenz zwischen der in Anwesenheit des Gewebes festgestellten Aktivität des Eiweißes und dem Blindwert zu betrachten. Daher wurde parallel zu jeder mit Gewebe ausgeführten Versuchsserie eine Reihe von Versuchen mit Nährmedium ohne Gewebe laufen gelassen.

Für jeden Versuch wurden Substrate mit Aktivitäten von je einigen Zehntel Mikrocurie (also einigen 10^5 dpm) eingesetzt. Zur Berechnung der in die Proteine aufgenommenen Kohlenstoffmenge mußte nun auch die spezifische Aktivität des Substrats bekannt sein. Die effektive spezifische Aktivität war stets kleiner als die spezifische Aktivität der zugesetzten markierten Verbindungen, da der Nährboden von vornherein Glukose und Aminosäuren enthielt. Die effektive spezifische Aktivität der Glukose wurde ermittelt, indem die Glukose des Nährbodens (der „Träger“) nach der Methode von *Kowarski*³² bestimmt wurde. Ihre Menge betrug 0,6 mg/ml. Demgegenüber war die Menge der zugesetzten radioaktiven Glukose zu vernachlässigen. Hingegen können die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren im Medium ohne großen experimentellen Aufwand nicht bestimmt werden. Daher wurde dem Medium jeweils zusammen mit der markierten Aminosäure die gleiche Aminosäure in unmarkiertem Zustand und in solcher Menge (einige Zehntel mg je Versuch) als Träger zugesetzt, daß die Gesamtkonzentration praktisch nur von diesem Zusatz abhing.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle I zusammengestellt. Jeder einzelne Zahlenwert ist das Mittel aus 2 bis 3 Parallelversuchen. Die Spalten „mit Zellinhalt“ unterscheiden sich von den Spalten „ohne Zellinhalt“ dadurch, daß im ersteren Falle der lösliche Teil des Inhaltes der zerkleinerten Zellen von je 3 Kulturen mit dem abgießbaren Medium vereinigt worden war, im letzteren Falle aber nicht. Die Aktivitäten der oben aufgezählten α - und β -Globulinfraktionen wurden zwar bestimmt³³, doch wurde in die Tabelle I nur die Summe dieser Aktivitäten aufgenommen, da diese Aktivitäten stets relativ gering waren und daher nicht klar ist, inwieweit sie reell sind. Schon eine bescheidene Verschmierung des fast immer wesentlich stärker aktiven γ -Globulins und insbesondere des Albumins über den Streifen hätte Aktivitäten bei den Mittelfractionen vortäuschen können. Das Präalbumin, dessen Aktivität stets gering war, ist in Tabelle I mit dem Albumin zusammengezogen. In Tabelle Ia ist auch die Aktivität des α_1 -Globulins im Albumin enthalten, da in diesem Fall experimentell keine klare Trennung erfolgte.

³² *M. Klopstock* und *A. Kowarski*, Praktikum der klinischen Untersuchungsmethoden. Berlin. 1938.

Tabelle 1. Aufnahme von Radiokohlenstoff aus verschiedenen Substraten durch die löslichen Proteine (dpm)

Proteinfraktion	Blindwert	Aktivität des Proteins			
		ohne Zellinhalt		mit Zellinhalt	
		Mesenchym	HeLa	Mesenchym	HeLa

a) Glukose

(Einsatz: $3,4 \cdot 10^5$ dpm, Träger: 0,6 mg/Röhrchen)

Albumin	235	870	690	1350	1140
γ -Globulin	50	190	155	270	280
Gesamt	370	1300	940	2080	1700
Prozent des Einsatzes ...	0,11	0,38	0,27	—	—
Zellzahl/Röhrchen ($\times 10^{-3}$)					
Anfang	—	488	176	488	176
Ende	—	554	238	554	238

b) Glykokoll

(Einsatz: $4,4 \cdot 10^5$ dpm, Träger: 0,4 mg/Röhrchen)

Albumin	155	415	295	940	1120
γ -Globulin	0	280	160	520	1560
Gesamt	190	1090	540	2250	3040
Prozent des Einsatzes ...	0,043	0,25	0,12	—	—
Zellzahl/Röhrchen ($\times 10^{-3}$)					
Anfang	—	655	166	655	166
Ende	—	670	175	670	175

c) Alanin

(Einsatz: $1,0 \cdot 10^6$ dpm, Träger: 0,5 mg/Röhrchen bei Blindwert;
Einsatz: $2,0 \cdot 10^5$ dpm, Träger: 0,4 mg/Röhrchen bei Gewebe)

Albumin	375	170	32	345	990
γ -Globulin	0	165	32	210	640
Gesamt	375	520	210	940	3050
Prozent des Einsatzes ...	0,038	0,26	0,11	—	—
Zellzahl/Röhrchen ($\times 10^{-3}$)					
Anfang	—	346	504	346	504
Ende	—	850	770	850	770

d) Tyrosin

(Einsatz: $8,8 \cdot 10^5$ dpm, Träger: 0,4 mg/Röhrchen bei Blindwert;
Einsatz: $3,5 \cdot 10^5$ dpm, Träger: 0,4 mg/Röhrchen bei Gewebe)

Albumin	1200	8590	3910	13800	8000
γ -Globulin	285	460	250	870	710
Gesamt	2150	10000	4940	19200	9850
Prozent des Einsatzes ...	0,25	2,9	1,4	—	—
Zellzahl/Röhrchen ($\times 10^{-3}$)					
Anfang	—	646	347	646	347
Ende	—	1400	417	1400	417

Hingegen sind in den Tabellen 2 und 3 auch die Einzelwerte der Mittelfractionen aufgenommen³³.

In Tabelle 2 wird die Aufnahme des Radiokohlenstoffs in die einzelnen Fraktionen durch Gewebe in Prozent des eingesetzten Radiokohlenstoffs ausgedrückt. Dabei sind die Blindwerte bereits abgezogen. Hier mußte berücksichtigt werden, daß für die unter „mit Zellinhalt“ angegebenen Werte das Zellmaterial von je 3 Kulturen gemeinsam aufgearbeitet wurde. Die in Tabelle 2 angeführten Werte sind bereits auf das Zellmaterial von je einer Kultur berechnet.

Tabelle 2. Aufnahme von Radiokohlenstoff in die Fraktionen (mit Zellinhalt) (Prozent des Einsatzes)

Fraktion	Glukose		Glykokoll		Alanin		Tyrosin	
	Mesen- chym	HeLa	Mesen- chym	HeLa	Mesen- chym	HeLa	Mesen- chym	HeLa
Präalbumin + Albumin	} 0,24	0,18 {	0,10	0,10	0,08	0,14	2,8	1,4
α_1 -Globulin . . .			0,02	0,012	0,015	0,06	0,23	0,05
α_2 -Globulin . . .	0,015	0	0,025	0,007	0,05	0,07	0,15	0,06
α, β -Globulin . .	0,025	0,03	0,03	0,005	0,03	0,06	0,09	0,01
β -Globulin	0,025	0,005	0,04	0,01	0,03	0,08	0,09	0,05
γ -Globulin	0,05	0,04	0,08	0,14	0,09	0,12	0,14	0,08
Summe	0,35	0,25	0,29	0,27	0,29	0,53	3,50	1,65
Einbau, gerech- net als μg Substrat .	2,1	1,5	1,2	1,1	1,2	2,1	14,0	6,6

Tabelle 3. Einbau von Radiokohlenstoff je Einheit der Zellmasse (μg Substrat je mg Stickstoff)

Fraktion	Glukose		Glykokoll		Alanin		Tyrosin	
	Mesen- chym	HeLa	Mesen- chym	HeLa	Mesen- chym	HeLa	Mesen- chym	HeLa
Eingebautes Substrat (μg)	2,1	1,5	1,2	1,1	1,2	2,1	14,0	6,6
Zellmasse (μg N):								
Anfang	29	16	39	15	21	46	39	32
Ende	33	22	40	16	51	71	84	38
Spezifischer Einbau (bezogen auf								
Anfang	73	92	31	73	57	46	360	210
Ende)	64	67	30	69	23	29	167	174

³³ Siehe G. Manner, Dissertation Univ. Wien (1957).

In Tabelle 3 wird die Aufnahme auf die relativen Zellmassen, die als mg Stickstoff ausgedrückt werden, bezogen („Spezifische Aufnahme“). Die spezifische Aufnahme wurde nicht auf den Zuwachs an Zellmasse berechnet, zum Teil deshalb, weil die Daten zu ungenau geworden wären, hauptsächlich aber, weil zweifellos parallel mit dem Einbau von Aminosäure in zugewachsenes Eiweiß eine Erneuerung des ursprünglich vorhandenen Eiweißes erfolgt.

Schließlich wird in Tabelle 4 die Verteilung des aufgenommenen Radiokohlenstoffs über die einzelnen Proteinfractionen in Prozent der Gesamtaufnahme angegeben.

Tabelle 4. Verteilung des eingebauten Radiokohlenstoffs über die Fraktionen (%)

Fraktion	Glukose		Glykokoll		Alanin		Tyrosin			
	Mesen- chym	HeLa	Mesen- chym	HeLa	Mesen- chym	HeLa	Mesen- chym	HeLa		
Präalbumin + Albumin	} 68	75 {	35	37	28	26	80	85		
α_1 -Globulin			7	4,5	5	11	6,5	3		
α_2 -Globulin			4	0	9	2,5	17	13	4,5	3,5
α, β -Globulin			7	12,5	10	2	10	11	2,5	0,5
β -Globulin			7	2	14	4	10	15	2,5	3
γ -Globulin	14	17	28	52	31	22	4	5		

Mit der „Ninhydrinprobe“ wurde aufgeklärt, ob der aufgenommene Radiokohlenstoff wirklich in der peptidisch verknüpften Kette des Eiweißes enthalten ist. Die Existenz von Blindwerten (also einer Radioaktivität von Protein unter Umständen, unter denen die Bildung von Peptidbindungen nicht in Frage kommt) zeigt, daß eine andersartige Aufnahme von Radiokohlenstoff möglich ist; dies ist auch von anderen Autoren festgestellt worden. Ninhydrin entwickelt nur mit freien Carboxylgruppen, die Aminogruppen benachbart sind, Kohlendioxyd. An den Carboxylgruppen markiertes Protein kann daher erst nach Hydrolyse bei Behandlung mit Ninhydrin nennenswerte Mengen radioaktives Kohlendioxyd liefern. Nach *Brunish* und *Luck* versagt die Ninhydrinprobe bei bestimmten konjugierten Proteinen (Nukleohistonen), nicht aber bei Albuminen und Globulinen³⁴.

Zur Durchführung wurden die löslichen Proteine von (1) Mesenchym, (2) HeLa und (3) Nährmedium für sich allein nach Bebrütung mit radioaktiver Glukose nach der Vorschrift von *Winnick*^{35, 36} mit Ninhydrin be-

³⁴ R. *Brunish* und J. M. *Luck*, J. Biol. Chem. **184**, 529 (1950).

³⁵ T. *Winnick*, Arch. Biochem. Biophysics **27**, 65 (1950).

³⁶ Vgl. E. A. *Peterson* und D. M. *Greenberg*, J. Biol. Chem. **194**, 359 (1952).

handelt und die Radioaktivität des CO_2 geprüft. Andere Anteile der gleichen Proteinproben wurden zuerst mit Salzsäure hydrolysiert und dann erst der Behandlung mit Ninhydrin unterworfen. In dritten Anteilen schließlich wurde der gesamte Radiokohlenstoff der Proteinproben bestimmt.

Die Proteine des Nährmediums ergaben auch nach Hydrolyse keine signifikante Radioaktivität des mit Ninhydrin entwickelten CO_2 . Im Falle des Mesenchyms und des HeLa wurde größenordnungsmäßig ohne Hydrolyse 1%, mit Hydrolyse aber 10 bis 20% des Radiokohlenstoffs des Proteins im CO_2 aufgefunden.

Eine analoge Versuchsreihe wurde nach Bebrütung mit radioaktivem Glykokoll durchgeführt. Schon ein Vorversuch, in dem markiertes Glykokoll für sich allein mit Ninhydrin behandelt wurde, hatte weniger als die theoretische Menge Radiokohlenstoff im CO_2 ergeben. Auch die Aktivität des CO_2 , das nach Hydrolyse der Proteinproben erzeugt wurde, war stets geringer als erwartet. Jedoch ergab sich sowohl bei Mesenchym als auch bei HeLa eine Steigerung der Aktivität des mit Ninhydrin freigesetzten CO_2 auf das 10- bis 15fache, wenn das Protein vorher hydrolysiert worden war. Der Blindwert war im Falle der Bebrütung mit Glykokoll um eine Größenordnung niedriger als die Aktivität des durch Gewebe erzeugten Proteins; auch wies das aus den Proteinen des reinen Nährmediums durch Ninhydrin entwickelte CO_2 nicht einmal nach vorhergehender Hydrolyse nennenswerte Aktivität auf.

Im ganzen kann also aus der Ninhydrinprobe geschlossen werden, daß das Nährmedium für sich allein keine signifikante Menge Radiokohlenstoff aus Glukose oder Glykokoll in peptidischer Bindung einbaut. Die nicht geringe Menge Radiokohlenstoff, die bei Bebrütung mit Glukose aufgenommen wird und als Blindwert erscheint, liegt möglicherweise in Form einer Verbindung zwischen intakter Radioglukose und löslichem Eiweiß vor. *In vivo* ist schnelle Bildung von an der Zuckerkomponente markierten Glukoproteinen des Serums nach Zufuhr radioaktiver Glukose oder Fruktose beobachtet worden^{36a}. Bindung durch Adsorption kommt bei den vorliegenden Versuchen kaum in Frage, da ja bei der Trennung der Eiweißstoffe des Mediums von der Radioglukose unmittelbar nach deren Zusatz (also ohne Bebrütung) eine viel geringere Restaktivität des Eiweißes gefunden worden war.

Hingegen läßt das positive Ergebnis der Ninhydrinprobe — erst nach Hydrolyse — bei den Proteinen, die bei Bebrütung mit Gewebe erhalten worden waren, auf peptidischen Einbau radioaktiver Aminosäuren schließen. Eine nennenswerte Bindung von Zucker an die Gewebeproteine ist übrigens schon deshalb nicht zu erwarten, weil ihre Menge

^{36a} H. Sudhof und S. Abraham, Arch. Biochem. Biophysics **71**, 221 (1957).

viel kleiner ist als die der Proteine des Nährmediums, bei denen eine solche Bindung gefunden worden war.

Diskussion

Die Experimente zeigen, daß isolierte Gewebe von Mesenchym und HeLa-Tumor Kohlenstoff aus Glukose, Glykokoll, Alanin und Tyrosin in eine Anzahl löslicher Proteine einbauen, die durch ihr Verhalten im elektrischen Felde unterschieden werden können. Im folgenden werden die Proteine lediglich auf Grund ihres Verhaltens bei der Elektrophorese eingeteilt.

Der Radiokohlenstoff der Glukose muß zuerst in Aminosäuren übergegangen sein; ein solcher (enzymatisch katalysierter) Übergang ist nicht nur oftmals an intakten Tieren³⁷ oder Gewebeschnitten³⁸, sondern auch schon an Gewebekulturen¹⁶ beobachtet worden. Aus der Größe des Gehalts von Alanin und Asparaginsäure an Radiokohlenstoff wurde geschlossen, daß Fibroblasten ein Enzymssystem enthalten, das das aus radioaktiver Glukose glykolytisch gebildete Pyruvat transaminiert¹⁶. Dagegen konnte der Einbau von radioaktivem Alanin (oder Glykokoll) in den vorliegenden Experimenten durch Konkurrenz mit den Umwandlungsprodukten inaktiver Glukose des Mediums nicht beeinträchtigt werden, da die Pools dieser beiden Aminosäuren sehr groß waren. Beim Tyrosin kommt eine solche Konkurrenz überhaupt nicht in Frage, wie sogleich dargelegt werden wird.

Kulturen von Mesenchym und HeLa benötigen 13 verschiedene freie Aminosäuren. Unter den hier untersuchten drei Aminosäuren hat sich freies Tyrosin (im Gegensatz zu Glykokoll oder Alanin) als essentiell erwiesen. Damit war der Einbau jedenfalls einer der hier eingesetzten Aminosäuren auch nach einer anderen Methode nachgewiesen worden³⁹.

In bestimmten Zellen und Geweben ist ein enzymatisch katalysierter „Austausch“ von freien Aminosäuren mit Aminosäuren, die in Proteinen enthalten sind, nachgewiesen worden^{40, 41}. Da aber die hier untersuchten Gewebe schnell wuchsen, dürften die markierten Aminosäuren mindestens vorwiegend zum Neuaufbau von Protein verwertet worden sein. Übrigens kann eine Aminosäure offenbar nur dann essentiell sein, wenn sie zur Neubildung von Protein herangezogen wird.

³⁷ Siehe z. B. *H. R. Arnstein* und *D. Keglević*, *Biochemic. J.* **62**, 199 (1956).

³⁸ Siehe z. B. *P. N. Campbell*, *Biochemic. J.* **61**, 496 (1955).

³⁹ *H. Eagle*, *Science* **122**, 501 (1955); *Arch. Biochem. Biophysics* **67**, 432 (1957).

⁴⁰ *E. F. Gale* und *J. Folkes*, *Biochemic. J.* **55**, 721, 730 (1953).

⁴¹ *M. Rabinovitz*, *M. E. Olson* und *D. M. Greenberg*, *J. Biol. Chem.* **210**, 837 (1954).

Der Kohlenstoff der Substrate wird sowohl durch Mesenchym als auch durch HeLa vorwiegend in die Albuminfraktion und (mit Ausnahme des Tyrosins) in die γ -Globulinfraktion eingebaut. Die untersuchten Gewebe sind also zur autonomen Bildung von Eiweißkörpern befähigt, die sich elektrophoretisch wie Serumalbumin bzw. γ -Globulin verhalten. Damit ist freilich über die chemische Natur der betreffenden Eiweißkörper wenig ausgesagt. Zu beachten ist auch, daß die Sera verschiedener Tierarten in ihren Zusammensetzungen stark voneinander abweichen^{42, 43}.

Ob der Kohlenstoff nach Einbau noch in Form der eingesetzten Aminosäuren vorliegt, wurde nicht untersucht. Auf Grund der allgemeinen Erfahrungen mit intakten Tieren und Gewebeschnitten kann man vermuten, daß dies weitgehend der Fall ist. Auch durch Kulturen von Herz und Lunge embryonaler Hühnchen wird der Kohlenstoff (von Alanin und Phenylalanin) fast ausschließlich in unveränderter Form eingebaut; nach Bebrütung mit markiertem Glykokoll allerdings wurde Aktivität auch, wie zu erwarten, im Serinrest gefunden¹³. Dies gilt auch für Leberhomogenate⁴⁴. Der bemerkenswert starke Einbau des Kohlenstoffs des Tyrosins, wie er hier gefunden wurde, dürfte damit in Zusammenhang stehen, daß diese Aminosäure nur langsam oxydiert wird^{10, 12}.

Wenn alle Proteine durch die Gewebekulturen mit Geschwindigkeiten aufgebaut worden wären, die den anfangs im Nährmedium vorhandenen Mengen dieser Proteine proportional waren, so hätten die in die einzelnen Proteinfraktionen eingebauten Mengen an Radiokohlenstoff im Verhältnis der Anteile der Fraktionen an der Gesamtmenge der für den betreffenden Versuch verwendeten Aminosäure stehen müssen. Die Berechnung zeigt, daß dies bei weitem nicht zutrifft³³. So werden Glykokoll und Alanin stärker in die γ -Globulinfraktion eingebaut, als dem Anteil dieser Fraktion am gesamten Glykokoll bzw. Alanin entspricht. Es war auch nicht zu erwarten, daß die beiden untersuchten Gewebearten Proteine derselben Art und im selben Verhältnis erzeugen, wie sie im Nährmedium vorliegen.

Die Aufnahme von Radiokohlenstoff aus Glykokoll in die γ -Globulinfraktion durch HeLa ist wesentlich größer als durch Mesenchym. Keine solche erhöhte Aufnahme wurde bezüglich Alanin oder Tyrosin festgestellt. Offenbar ist die erhöhte Aufnahme von Glykokoll nicht einfach auf eine gesteigerte Bildungsgeschwindigkeit der betreffenden Proteine in HeLa zurückzuführen, sondern die (elektrophoretisch definierte) γ -Globulinfraktion ist in HeLa anders zusammengesetzt als im Mesenchym. Auffallend ist auch die starke Aktivität der Albuminfraktion bei beiden

⁴² H. F. Deutsch und M. B. Goodloe, J. Biol. Chem. **161**, 1 (1945).

⁴³ D. H. Moore, J. Biol. Chem. **161**, 21 (1945).

⁴⁴ T. Winnick, E. A. Peterson und D. M. Greenberg, Arch. Biochem. Biophysics **21**, 235 (1949).

Gewebe; eine extrahepatische Bildung von Serumalbumin ist bisher nicht mit Sicherheit festgestellt worden^{45, 46}.

Über Unterschiede zwischen gesunden und krebserkrankten Tieren bezüglich des Gehalts an γ -Globulin (sowie auch an anderen Serumproteinen) wurde mehrfach berichtet, wobei freilich in den Tumortieren entweder vergrößerte oder aber verkleinerte Gehalte an γ -Globulin gefunden wurden^{1, 2}. Solche Widersprüche können nicht überraschen, da ja in den Tieren die direkte Bildung von Eiweiß durch den Tumor durch die indirekte Bildung über die Beeinflussung gesunden Gewebes überlagert wird. Ähnliche Probleme werden in bezug auf die Geschwindigkeit der Erneuerung der Serumproteine bei gesunden und tumorkranken Tieren angetroffen; darüber liegen bisher nur wenige Arbeiten vor⁴⁷. So schreibt *Winzler*, daß die meisten Abnormalitäten im Serum eher als systemische Wirkung des Tumors auf den Wirt als als direkte Tumorstoffwirkung zu betrachten seien; das dringendste Problem sei die Aufklärung des Ursprungs der Serumproteine¹.

Die radiochemische Untersuchung der verschiedenen Gewebe in Kultur bietet die Möglichkeit der Bearbeitung dieses Problemkreises. Sowohl die Proteinbildung durch verschiedene Arten gesunder Gewebe als auch die Bildung durch Tumorgewebe können in methodisch einwandfreier Weise untersucht werden. Freilich muß die Kennzeichnung der Proteine durch ihr Verhalten bei der Elektrophorese durch weitere Verfahren ergänzt werden.

Nachtrag bei der Korrektur: In einer neueren Untersuchung wurde der Einbau von markiertem Glutamin durch HeLa-Gewebe in Kultur gemessen, jedoch keine Aufteilung des Proteins in Fraktionen vorgenommen⁴⁸. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, daß Organkulturen Glykokoll, Serin, Alanin und einige weitere Aminosäuren, nicht aber Tyrosin aus (radioaktiver) Glukose bilden⁴⁹.

Wir danken Frau Dr. *B. Figdor* und Frau *A. Brom* für vielfache experimentelle Hilfe und dem Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research für eine großzügige Subvention. Den Österreichischen Stickstoffwerken, Linz, danken wir für leihweise Überlassung des Elektrophoresegeräts.

⁴⁵ *H. Tarver* und *W. O. Reinhardt*, *J. Biol. Chem.* **167**, 395 (1947).

⁴⁶ *L. L. Miller*, *C. G. Bly* und *W. F. Bale*, *J. Exper. Med.* **99**, 133 (1954).

⁴⁷ *E. Norberg* und *D. M. Greenberg*, *Cancer* **4**, 383 (1951).

⁴⁸ *L. Levintow*, *H. Eagle* und *K. A. Piez*, *J. Biol. Chem.* **227**, 929 (1957).

⁴⁹ *J. D. Biggers*, *M. Webb*, *R. C. Parker* und *G. M. Healy*, *Nature* **180**, 825 (1957).