

## ATP-Spaltung an der Zelloberfläche der Leukozyten aus normalen und leukämischen Ratten

### ATP-Cleavage on the Cell of Leucocytes of Normal and Leukaemic Rats

H. FRIEDRICH-FREKŠA, A. SIMON\* und H. PACHOWSKY

Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, Abteilung für physikalische Biologie

(Z. Naturforsch. 28 c, 195–197 [1973]; eingegangen am 19. Dezember 1972)

ATP-cleavage, cell surface, leukaemia, rats, growth regulation

ATP-cleavage on the surface of L-5222 leukaemic cells of the BD IX-rat occurs at a rate of only 20% of the corresponding value for normal leucocytes.

Säugetierzellen sind, soweit bekannt, für ATP undurchlässig. Gibt man zu einer Suspension solcher Zellen ATP und bebrütet für etwa 20 min, so läßt sich durch Bestimmung im optischen Test nach Bücher feststellen, daß ATP gespalten wurde. Diese Spaltung muß also an der äußeren Oberfläche erfolgen. Sie erfordert Mg-Ionen und keine Na- und K-Ionen und ist auch unempfindlich gegen  $10^{-4}$ M Strophantin. Sie hat also nichts zu tun mit der ATPase, die mit dem Kalium- und Natrium-Transport durch die Zellmembran in Zusammenhang gebracht wird und die wahrscheinlich an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist.

Wir fanden bei Leber-, Nieren- und Embryonalzellen von Ratten, Mäusen und syrischen Hamstern bei ATP-Überschuß eine Spaltung in der Größenordnung von  $0,5 \mu\text{Mol ATP}/10^6$  Zellen  $\times$  Stunde. Bei spontan transformierten, permanent wachsenden Zellstämmen dieser Nagetiere ist die Spaltung stark erniedrigt und beträgt nur etwa  $1/5$  des normalen Wertes.

Eine ähnliche Beobachtung machten AGREN, PONTEN *et al.*<sup>1</sup> beim Vergleich der Spaltung von  $\gamma$ -markierter ATP durch Gliazellen und Gliomzellen des Menschen.

Beide Untersuchungen, von denen die unsere noch nicht publiziert ist, weisen darauf hin, daß ein Zusammenhang zwischen ungehemmtem Wachstum und verminderter ATP-Spaltung der Zelloberfläche besteht. Deshalb benutzten wir sehr gern die Gelegenheit, eine Rattenleukämie zu untersuchen, über die Herr Dr. SIMON als Gast in unserem Institut arbeitete.

Beim Ratteninzuchtstamm BD IX (DRUCKREY *et*

*al.*<sup>2</sup>) trat unter Äthyl-nitroso-Harnstoff-Behandlung eine durch Zellen übertragbare Leukämie (L 5222) auf (DRUCKREY *et al.*<sup>3</sup>), die nach Untersuchungen von IVANKOVIC *et al.*<sup>4</sup> nach morphologischen und cytochemischen Gesichtspunkten als myelomonocytäre Leukämie klassifiziert wurde. Die von uns ermittelte *in vivo*-Verdoppelungszeit der Leukämie beträgt etwa 14 Std.<sup>6</sup>. Weitere Zellzyklusdaten s. HARRISS *et al.*<sup>5</sup>.

### Material und Methoden

#### Präparation der Leukozyten von BD IX-Ratten

Zur Gewinnung der Leukozyten wurde Blut mit einer mit Heparin besetzten Spritze aus der Leistenbeugenvene entnommen. Um bei den normalen Kontrolltieren hinreichend Leukozyten zu erhalten, wurde jeweils das Blut von mehreren Tieren zusammengekommen. Dieses Blut wurde mit EDTA-Plasma-Gemisch versetzt, geschüttelt und in Zentrifugenröhrchen  $1/2$  bis 1 Stde. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Absetzen der Erythrozyten wurde der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen. Dieser die weißen Blutkörperchen enthaltende Überstand wurde mit BSS gewaschen. Die Zählung erfolgte in einer BSS-Lösung, und zwar mittels Türk'scher Lösung (3-proz. Essigsäure mit Gentianaviolett), die bewirkt, daß die Leukozyten blau gefärbt werden, während die noch zahlreich vorhandenen Erythrozyten lysieren und deshalb nicht zählbar sind.

Als BSS-Lösung wurde eine Earle'sche Lösung ohne Mg und Ca verwendet (6,8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,14 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 2,2 g  $\text{NaHCO}_3$  auf 100 ml, pH 7,4 bis 7,5).

#### Herstellung des EDTA-Plasmagels

Plasmagel von Laboratoire Roger Bellon, Neuilly (Hauts-de-Seine).

EDTA (Titriplex) 1,107 g in 100 ml 0,7% NaCl.

\* A. SIMON, Med. Univ.-Klinik Freiburg i. Br.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. FRIEDRICH-FREKŠA, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung für physikalische Biologie, D-7400 Tübingen, Spemannstraße 35.



**Mischung:**

- Plasmagel und EDTA-Lösung im Verhältnis 1:1 mischen (Lösung A).
- Lösung A wird mit Blut im Verhältnis 1:1 gemischt. 15-30 min stehengelassen. Die Erythrozyten sinken dann ab, während die Leukozyten in der oberen Schicht bleiben und abpipettiert werden können.

Die Zählung wurde mit der Zählkammer nach Neubauer durchgeführt.

Bei den leukämischen Ratten wurde 10-14 Stdn. vor der Entblutung zur Bestimmung der Zellzahl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Aufziehen des Blutes mit einer üblichen Erythrozytenzählpipette und Verdünnung 1:200 mit Türk'scher Lösung, Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer. Die in Tab. II angegebenen Leukozytenzahlen/ $\mu$ l entsprechen also bei der angegebenen Verdoppelungszeit der Hälfte der Zellzahl, die bei der Entblutung erreicht worden sein dürfte.

**Messung der ATP-Spaltung**

$5 \cdot 10^6$  bis  $5 \cdot 10^8$  Leukozyten wurden in 5 ml BSS aufgenommen, 0,1 ml 1 M  $MgCl_2$  und 15 mg ATP in 1 ml BSS hinzugefügt. Der Ansatz wurde bei 27 °C bebrütet und Proben nach 0, 10, 20, 30 und 40 min entnommen. Sofort nach Entnahme der Probe wurde die Reaktion mit 0,6 M Perchlorsäure unterbrochen (4 ml Perchlorsäure + 1 ml Probe). Nach Zentrifugieren der Proben wurde im Überstand ATP nach der Methode von Bücher mit 3-Phosphoglyceratkinase bestimmt (Anweisung und Reagenzien von Boehringer, Mannheim).

Die Werte der Bestimmung in gleichen Zeitabständen liegen befriedigend auf einer Geraden. Daraus ergibt sich, daß innerhalb der Beobachtungszeit die Reaktion gleichmäßig verläuft. Die Bebrütung wurde bei 27 °C durchgeführt. Bei dieser Temperatur ist die Spontanspaltung des ATP zu vernachlässigen, die bei 37 °C den Nullwert heraufsetzt. Unter Berücksichtigung dieser Spontanspaltung ist kein großer Unterschied zwischen 27 und 37 °C. Wir fanden als Mittelwert bei

5 Ratten bei 37 °C für normale Leukozyten 69 E gegenüber einem Mittelwert bei 27 °C von 65,5 E (Tab. I). 100 E entsprechen einem Umsatz von 0,41  $\mu$ Mol ATP.

Der niedrige Temperaturkoeffizient beruht vermutlich darauf, daß Diffusion geschwindigkeitsbestimmend ist; denn es handelt sich hier nicht um eine Fermentlösung, sondern um eine schnelle Reaktion an der Oberfläche von Zellen, die bis zu 100  $\mu$  voneinander entfernt sind.

**Ergebnisse****ATP-Spaltung bei Leukozyten von normalen Ratten**

Tab. I gibt 12 Messungen bei normalen Ratten wieder. Die Leukozyten wurden gewonnen und gezählt wie vorgehend beschrieben. Für die Messung der ATP-Spaltung wurden Zellzahlen von  $6 \cdot 10^6$  bis  $4 \cdot 10^7$  normaler Leukozyten verwendet. Die Meßwerte

Tab. I. ATPase-Bestimmung. Normalblut von BD IX-Ratten – Weiße Blutzellen.

Bestimmt am	Zellzahl	Einh./ $10^6$ Zellen und Stunde	Zahl der Tiere
4.7.72	$7,9 \cdot 10^6$	80 E	2
5.7.72	$1,1 \cdot 10^7$	40 E	2
7.7.72	$3,3 \cdot 10^7$	56 E	2
27.7.72	$7,5 \cdot 10^6$	79 E	1
27.7.72	$1,98 \cdot 10^7$	60 E	1
27.7.72	$6,0 \cdot 10^6$	62 E	2
27.7.72	$2,3 \cdot 10^7$	86 E	2
1.8.72	$9,4 \cdot 10^6$	87 E	2 weibl.
1.8.72	$5,5 \cdot 10^6$	63 E	2 männl.
8.8.72	$2,8 \cdot 10^7$	45 E	2 männl.
2.10.72	$2,8 \cdot 10^7$	55 E	3
2.10.72	$2,8 \cdot 10^7$	69 E	3

$\bar{x} = 65,5$ ; S.D. = 13,8; S.E. = 4,0.

Tab. II. ATPase-Bestimmung. Leukämie-Blut von BD IX-Ratten.

Bestimmt am	Zellzahl	Leukozytenzahl/ $\mu$ l	Einh./ $10^6$ Zellen u. Stunde	Zahl der Tiere
4.7.72	$2,5 \cdot 10^7$		20 E	2 unbeh.
7.7.72	$3 \cdot 10^7$		14 E	2 bestr.
8.7.72	$8,6 \cdot 10^7$		12 E	2 bestr.
10.8.72	$3,1 \cdot 10^8$	159000	9 E	1 unbeh. Nr. 13
10.8.72	$4,8 \cdot 10^8$	279000	8 E	1 unbeh. Nr. 12
10.8.72	$5,6 \cdot 10^8$	151000	9 E	1 unbeh. Nr. 21
10.8.72	$2,76 \cdot 10^8$	126000	16 E	1 unbeh. Nr. 22
10.8.72	$1,46 \cdot 10^8$	92000	14 E	1 unbeh. Nr. 23
10.8.72	$2,3 \cdot 10^8$	104000	14 E	1 unbeh. Nr. 32
10.8.72	$1,25 \cdot 10^8$	77000	18 E	1 unbeh. Nr. 33
10.8.72	$2,12 \cdot 10^8$	157000	10 E	1 unbeh. Nr. 51

$\bar{X} = 13,1$ ; S.D. = 3,9; S.E. = 1,18.

liegen zwischen 40 E und 87 E, bezogen auf  $10^6$  Zellen und 1 Stde. Spaltung. Der Mittelwert beträgt 65,5 E, die Standardabweichung 13,8 und der mittlere Fehler 4,0.

#### *ATP-Spaltung bei Leukämie-Zellen*

Tab. II zeigt 11 Bestimmungen bei Leukämiezellen. Die Zellzahl schwankt zwischen  $2,5 \cdot 10^7$  bis  $5,6 \cdot 10^8$ . Die Werte liegen zwischen 8 E und 20 E, ebenfalls bezogen auf  $10^6$  Zellen. Der Mittelwert beträgt 13,1, SD 3,9, SE 1,18. Da die Zellzahlen in der Versuchsreihe mit leukämischen Zellen fast durchweg höher liegen als in der Versuchsreihe mit normalen Zellen, wurde zur Kontrolle noch in Verdünnungsreihen untersucht, ob der pro Zelle gefundene Umsatz von der Zellkonzentration abhängig ist. Es konnte keine Abhängigkeit von der Zellkonzentration zwischen  $2 \cdot 10^8$  und  $5 \cdot 10^7$  gefunden werden. Der Mittelwert der Spaltung beträgt also nur etwa  $\frac{1}{5}$  des Wertes bei normalen Tieren. Es ist hier zu berücksichtigen, daß die Leukämiezellen noch mit normalen Zellen vermischt sind, so daß die Unterschiede bei reinen Leukämiezellen noch größer sein dürften als dem Unterschied der

Mittelwerte entspricht. Hiermit stimmt überein, daß die stärksten Leukämien mit den größten Werten von Leukozyten/ $\mu$ l die niedrigsten Werte aufweisen: 279 000 = 8 E gegenüber 77 000 = 18 E.

#### **Besprechung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse bei der Rattenleukämie stützen die Vermutung, daß ein Zusammenhang besteht zwischen stark erniedrigter ATP-Spaltung an der äußeren Zelloberfläche und der Störung der Wachstumsregulation der Zelle.

Wir danken Frau E. FRIEDRICH-FREKŠA, Herrn D. F. HÜLSER und Herrn O. D. LAERUM für ihre Hilfe.

<sup>1</sup> G. AGREN, J. PONTEN, G. RONQUIST, u. B. WESTERMARK, *J. Cell Physiol.* **78**, 171–176 [1971].

<sup>2</sup> H. DRUCKREY, P. DANNEBERG, W. DISCHLER u. D. STEINHOFF, *Arzneimittel-Forsch.* **12**, 911 [1962].

<sup>3</sup> H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC u. D. SCHMÄHL, *Z. Krebsforsch.* **69**, 103–201 [1967].

<sup>4</sup> S. IVANKOVIC u. ZELLER; in Vorbereitung.

<sup>5</sup> E. B. HARRISS u. D. HOELZER, *Cell Tissue Kinet.* **4**, 433–441 [1971].

<sup>6</sup> A. SIMON u. M. F. RAJEWSKY, in Vorbereitung.