

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn a. Rh.  
(Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)

## CYTOLOGISCHE UND ENZYMOCYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ZELLOBERFLÄCHE AN IN VITRO GEZÜCHTETEN ZELLEN\*

Von

A. GROPP und H. R. HELLWEG

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 4. April 1959)

Die phasenkontrastmikroskopische Lebendbeobachtung ergibt bei der Untersuchung der Oberfläche von normalen und malignen, *in vitro* gezüchteten Zellen wichtige Aufschlüsse über die Funktions- und Formwandelvorgänge, die sich hier abspielen. So wurde insbesondere durch GEY u. Mitarb. (1954a, b; 1954/55) das Vorkommen und das Verhalten von Faltungen der Zelloberfläche näher beschrieben, nämlich vor allem von undulierenden Säumen an Zellrändern oder auch von feinsten Ausziehungen der Zelloberfläche. Die elektronenmikroskopische Untersuchung zahlreicher Gewebe zeigte andererseits, daß eine differenziertere Gestaltung der Zelloberfläche und der Grenzen benachbarter Zellen ein weitverbreitetes Prinzip darstellt (s. BERNHARD 1958), welches allerdings an den einzelnen Zellen in verschiedener Form verwirklicht ist (BERNHARD u. Mitarb. 1956; VOGEL 1957; HORSTMANN u. KNOOP 1958).

In früheren eigenen Untersuchungen (GROPP u. Mitarb. 1958a, b) hatte sich ergeben, daß an gewissen *in vitro* gezüchteten Zellstämmen einige histochemisch nachweisbare Enzyme besondere Beziehung zur Zelloberfläche aufweisen, darunter vor allem die unspezifische Esterase und an zweien von drei in unserem Laboratorium gezüchteten HeLa-Stämmen auch die alkalische Phosphatase. In Anbetracht der großen Bedeutung, die wir der Untersuchung der Zelloberfläche und der Aufklärung ihrer Eigenschaften zumessen, haben wir in dieser Arbeit versucht, an diesen und einigen anderen *in vitro* gezüchteten Zellstämmen die gestaltlichen Phänomene und das Verhalten der Zelloberfläche näher zu beobachten und bessere Voraussetzungen zur Sicherung einer möglichst exakten Lokalisierung der genannten Enzyme an der Zelloberfläche zu schaffen.

### Material und Methode

Die vorliegenden Untersuchungen wurden vor allem an zwei menschlichen Carcinomen, nämlich den Epidermoidcarcinomen HeLa (GEY 1952) und Af (H. Ep. No. 2) (FJELDE 1955), ersteres von der Cervix uteri, letzteres vom Larynx herrührend, durchgeführt. Von HeLa wurden drei Unterstämme (I, II, S) verwendet, die auf verschiedenen Wegen in unser Laboratorium kamen, und die bei uns weiter getrennt gezüchtet werden. Außerdem wurden durch Einbeziehung folgender weiterer Zellstämme die Beobachtungen an HeLa und Af (H. Ep. No. 2) ergänzt: ein menschliches Fibrosarkom, Stamm AFi (GEY); normale menschliche Fibroblasten aus einem Embryo von 12 cm Länge; menschliches Amnionepithel, Stamm A<sub>4</sub> (ZIRCER 1957);

\* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Gesellschaft zur Bekämpfung der Krebskrankheiten, Nordrhein-Westfalen, e. V., danken wir für ihre Unterstützung dieser Arbeit.

Zellkulturen von einem spontanen Mammacarcinom des DBA-Mäusestammes und schließlich Makrophagen und epitheloide Zellen aus Kulturen von der Milz jugendlicher DBA-Mäuse.

Die Gewebe wurden durchweg auf Glasoberflächen, ohne Verwendung von Plasma gezüchtet. Als Kulturgefäße dienten entweder Standgläschen von 24 mm Bodendurchmesser und 45 mm Höhe, in die ein Deckgläschen  $18 \times 18$  mm eingelegt wurde, oder 180 ml-Kulturflaschen nach BREED-DEMETER, deren Boden sich mit 10 Deckgläsern  $18 \times 18$  mm gerade vollständig bedecken ließ. Die Standgläschen erwiesen sich als zweckmäßig, wenn für Lebendbeobachtungen oder Durchströmungsversuche jeweils nur ein mit Zellen bewachsenes Deckglas notwendig war, während die größeren Kulturflaschen für Serien von Enzymreaktionen ein einheitliches Material gewährleisteten. Auf die Deckgläschen wurden entweder Kulturen als Stückchen (Fibroblasten, Milz) aufgebracht oder wie in allen anderen Fällen Zellaufschwemmungen einpipettiert, die mit Trypsin oder Versenat oder durch mechanisches Abspülen gewonnen worden waren. Die Nährflüssigkeit war je nach den Geweben verschieden: Für HeLa und Af (H.Ep. No. 2) bestand sie aus einer 0,5%igen Lösung von Lactalbuminhydrolysat (NBC, Cleveland, Ohio) in Salzlösung nach HANKS + 5% Placentarserum; für menschliche Fibroblasten, Milz und DBA-Mammacarcinom aus einem Gemisch von 40% Placentarserum + 50% Salzlösung nach PANNET-COMPTON (modif.) + 10% Hühnchenembryonalextrakt, und für Stamm AFi und Stamm  $A_4$  schließlich bestand sie aus 80% TCM nach MORGAN, MORTON und PARKER + 20% Placentarserum.

Für phasenkontrastmikroskopische Lebendbeobachtungen wurde ein mit Zellen bewachsenes Deckglas auf ein Metallrähmchen von 0,8 mm Höhe, dessen mit Nährlösung gefüllte Kammer  $16 \times 16$  mm Seitenlänge besitzt, aufgelegt und mit Vaseline abgeschlossen. Für Durchströmungsversuche unter dem Phasenkontrastmikroskop zur Beobachtung des Ablaufs der Enzymreaktionen für die alkalische Phosphatase und die unspezifische Esterase wurde eine ganz einfache Kammer unter Verzicht auf sterile Bedingungen hergestellt, da eine Beobachtung jeweils innerhalb von längstens 10–12 min abgeschlossen wurde. Diese Kammer bestand aus einem 0,1 mm dünnen Glasboden und zwei 0,8 mm hohen, in einem gegenseitigen Abstand von 16 mm aufgeklebten Glasstreifen. Das mit Zellen bewachsene  $18 \times 18$  mm Deckglas wurde auf diese Glasstreifen aufgelegt, mit Vaseline angeklebt, und der 0,8 mm hohe Zwischenraum mit Nährflüssigkeit gefüllt. Die Durchströmung mit der Inkubationslösung zum Enzymnachweis (s. unten) ließ sich dann von zwei Hilfspersonen durch Zupipettieren von der einen und gleichzeitiges Absaugen mittels Filterpapierstreifen auf der anderen Seite bewerkstelligen.

### *Enzymreaktionen*

**1. Unspezifische Esterase.** Substrat  $\alpha$ -Naphthylacetat, Kupplungspartner diazot. o-Dianisidin. Wir wichen von der Arbeitsvorschrift nach PEARSE (1953) ab, indem wir als Milieu physiologische Salzlösung nach HANKS verwendeten, nach Zugabe von Substrat mittels Natriumbikarbonat auf  $pH$  7,4 einstellten und durch laufende Kontrolle auf diesem  $pH$  hielten (GROPP u. Mitarb. 1958b). Bei der Beobachtung des Reaktionsablaufes an lebenden Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop (Zimmertemperatur) wurde innerhalb der beschriebenen Kammer die normale Nährlösung durch dieses Inkubationsgemisch ersetzt. Die Zwischenschaltung einer Waschung mit einfacher Hanks-Lösung erwies sich als überflüssig. Nach Erreichen einer genügend starken Reaktion — gewöhnlich nach 3–6 min — wurde eine vorgekühlte, neutrale Salzformalinlösung durchströmt, die unmittelbar fixierte. Dagegen wurden in den übrigen Versuchen und Kontrollversuchen lebende, unfixierte Zellen vor und nach der Inkubation in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und dann in gekühltem Salzformalin fixiert. Das hier als neutrales Salzformalin bezeichnete Formalin hatte sich in Vorversuchen als besonders günstig für eine schonende Fixierung der Zelle und ihrer Strukturen erwiesen. Es besteht aus

Formalin 40%ig	20 ml
Cadmiumchlorid 10%ig	20 ml
Calciumchlorid 10%ig	20 ml
Aqua destillata	140 ml
physiologischer Salzlösung	
nach PANNET-COMPTON	800 ml.

Der Einfluß von Formalinfixierung vor der Reaktion zum Esterasenachweis sowie die Einwirkung von Hemmsubstanzen wurden in Reihen geprüft, in denen Kulturen von 30 min bis

4 Std in neutralem Salzformalin oder in einer Verdünnung 1:50 von Formaldehyd-Lösung (35 Gew.-%, p. a., Merck) fixiert und mit oder ohne Zwischenschaltung eines Aufenthaltes in destilliertem Wasser bzw. Lösungen sog. „Esteraschemmer“ inkubiert wurden.

**2. Alkalische Phosphatase.** Substrat  $\alpha$ -Naphthylphosphat; Diazoniumsalz: diazot. o-Dianisidin und diazot. 4-Benzoylamino-2,5-dimethoxyanilin. Die Reaktion ( $p_H$  9,2; 18–20° C) wurde entsprechend dem oben für die unspezifische Esterase beschriebenen Vorgehen, ausgehend von den Arbeitsvorschriften nach PEARSE (1953), abgewandelt. Die Einstellung der Salzlösung nach HANKS auf  $p_H$  9,2 geschah nach Zugabe von Substrat und Kupplungspartner mittels  $n/10$  NaOH. Die Inkubationszeit betrug bei lebenden, unfixierten Zellen 3–4 min, bei Zellen, die in Salzformalinlösung fixiert waren, 10–15 min. Die Beobachtung des Ablaufs der Enzymreaktion unter dem Phasenkontrastmikroskop sowie entsprechende Kontrollversuche zum Einfluß von Fixierung und Hemmsubstanzen wurden wie bei der unspezifischen Esterase vorgenommen.

### Ergebnisse

#### *1. Phasenkontrastmikroskopische Beobachtungen an der Zelloberfläche*

Die Phasenkontrastmikroskopische Untersuchung lebender Zellen zeigt bei der Mehrzahl von in vitro gezüchteten Zellen, daß ihre Oberfläche und ihr Randsaum eine Vielfalt von feinen und gröberen Fortsätzen, zarten Fältelungen oder breiteren undulierenden Falten und Säumen besitzt. Durch sie wird umgekehrt die Zelloberfläche erst zu einem sichtbaren und beobachtbaren Bestandteil der Zelle. Im einzelnen ist das Erscheinungsbild der Zelloberfläche je nach der Zellart, aber auch bei einer bestimmten Zellart je nach der Züchtungsmethode verschieden. In der Regel läßt schon die einfache Beobachtung erkennen, daß die Zelloberfläche mit ihren Fortsätzen und Fältelungen nicht in Ruhe verharret, sondern sich in ständiger Veränderung befindet, wobei sich die Bewegungsvorgänge selbst zumeist gerade unter der Grenze der physiologischen Wahrnehmbarkeit befinden. Bei Anwendung der Zeitraffer-Mikrokinematographie dagegen, etwa mit einer Beschleunigung von 60:1, sind die Bewegungen an der Zelloberfläche, bei aller Verschiedenheit im Einzelfall, meist von großer Lebhaftigkeit und einer Analyse ihres Verlaufs zugänglich. An den Zellen des HeLa- und des Af (H. Ep. No. 2)-Epidermoidcarcinoms lassen sich gewöhnlich zwei verschiedene Formen von Oberflächenfältelung beobachten, die in den Abb. 1 und 2 dargestellt sind. An den freien Randsäumen finden sich breitere Falten (Abb. 1a). Sie entstehen zumeist in der Peripherie von ganz flach ausgebreiteten Cytoplasmazungen, bewegen sich in zentripetaler Richtung über diese hinweg — rollen sie gleichsam auf —, fließen ineinander oder glätten sich wieder aus. Wenn dann peripher erneut flache Cytoplasmazungen ausfließen, spielt sich in ständigem Wechsel der gleiche Vorgang des Entstehens und Vergehens solcher Falten ab. Im Zusammenhang mit den Faltungs- und Bewegungserscheinungen an den freien Randsäumen der Zellen findet die Aufnahme von Flüssigkeitströpfchen in das Zellinnere (Pinocytose, W. H. LEWIS 1931) statt.

Dagegen ist über der glasabgewandten Oberfläche der Zellen eine zweite, von der vorher beschriebenen etwas verschiedene Form von Fältelungen zu beobachten. Um sie sichtbar zu machen, ist es notwendig, mit dem Feintrieb des Mikroskops die Zelloberfläche „abzutasten“, da diese auf der der Glashaftfläche entgegengesetzten Seite der Zelle nicht in einer Ebene liegt und vor allem über dem Zellkern vorgebuckelt ist (vgl. Abb. 4c). Es handelt sich dabei oftmals um feinste Protrusionen, die der Zelloberfläche ein Aussehen ähnlich einer „Gänsehaut“ verleihen (Abb. 1b); häufiger noch sind es feinere, filigranartige Fältchen, wie

sie in der Abb. 2 dargestellt sind: Diese Abbildung verdeutlicht, wie beim Verlassen der Scharfeinstellung der Zellkerne und Mitochondrien (Abb. 2a) an der Oberfläche ein Muster von solchen zarten Fältchen erscheint (Abb. 2b). Derartige Fältelungen gehören insbesondere bei den in einschichtigen Komplexen eng benachbarten Zellen zu dem gewöhnlichen Erscheinungsbild. Andererseits treten bei den sehr häufigen Riesenzellen des HeLa- und Af (H. Ep. No. 2)-Stammes auf der Oberfläche der meist besonders

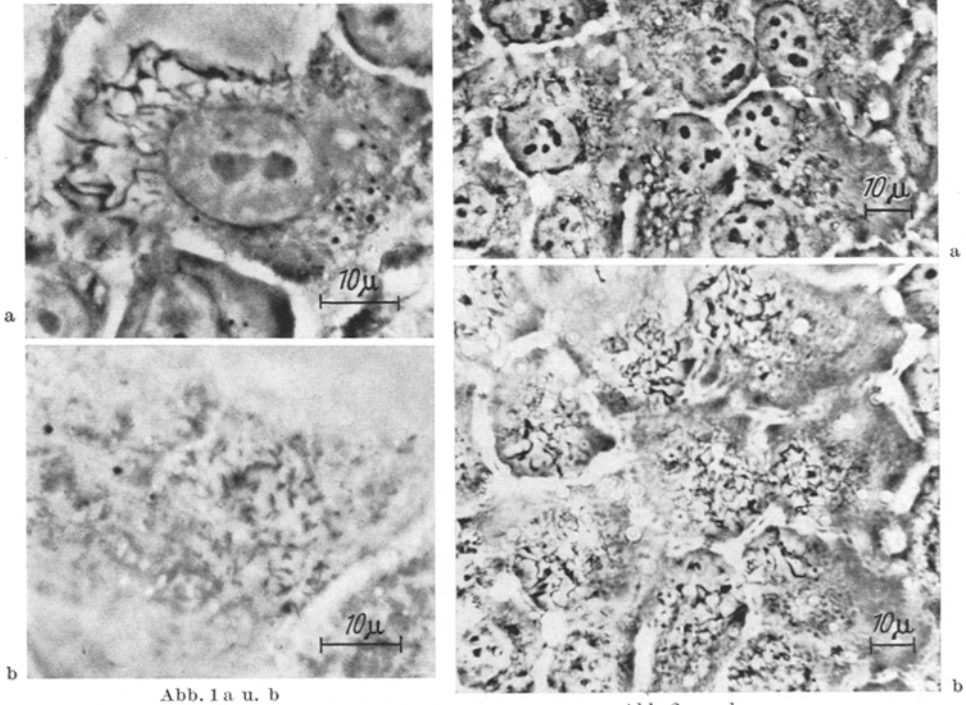


Abb. 1 a u. b

Abb. 2 a u. b

Abb. 1. a) Af (H. Ep. Nr. 2)-Carcinomzelle, lebend, Phasenkontrast; breite, undulierende Falten der Oberfläche in der Zellperipherie. — b) HeLa-Carcinomzelle, lebend, Phasenkontrast, optische Ebene in Einstellung auf die von der Glasunterlage abgewandte Oberfläche mit feinsten Fältelungen

Abb. 2 a u. b. Zellverband von HeLa-Carcinomzellen, lebend, Phasenkontrast. a) Kernmembran und cytoplasmatische Strukturen in Scharfeinstellung. b) Gleiche Stelle bei Einstellung der glasabgewandten Oberfläche der Zellen mit filigranartigen Fältelungen

flach ausgebreiteten Zellen etwas abgewandelte, gröbere Fältelungen (vgl. Abb. 5a) auf. Sie ähneln etwas mehr den Falten an freien Zellrändern, zumal sie wie diese offenbar mit den in einem mehr oder weniger regelmäßigen Rhythmus undulierenden Oberflächenbewegungen entstehen und vergehen.

Bei den weiter untersuchten Zellarten (s. S. 315) sind zum Teil etwas andere Formen von Fältelungen der Oberfläche und von undulierenden Säumen anzutreffen. Ohne sie im einzelnen zu beschreiben, ist hier vor allem darauf hinzuweisen, daß die erwähnten filigranartigen Fältelungen über der glasabgewandten Ober-

fläche der Zellen bei dem A<sub>4</sub>-Amnionepithelstamm sehr deutlich, bei dem AFi-Sarkomstamm und den Mammacarcinomzellen der Maus weniger stark ausgeprägt und schließlich bei den epitheloiden Zellen der Milzkulturen kaum vorhanden sind. Die in der Regel annähernd spindeligen Fibroblasten weisen nur gelegentlich eine der Längsrichtung dieser Zellen entsprechende, feinstreifige Fältelung der Oberfläche auf. Undulierende Faltungen an den peripheren Cytoplasmasäumen stehen bei einigen der hier betrachteten Zellen, wie bei denen des AFi-Stammes und bei Makrophagen, in einem besonders innigen Zusammenhang mit sehr lebhaften Pinocytosevorgängen; dabei ist bemerkenswert, daß sie dann vorwiegend auf mehr oder minder breite bis pseudopodiale Cytoplasmaausläufer begrenzt sind.

## II. Ergebnis von Enzymreaktionen

Die Frage der Nachweisbarkeit und der Lokalisation der unspezifischen Esterase und der alkalischen Phosphatase wurde an allen in dieser Untersuchung verwendeten Zellarten sowohl an lebendem, unfixiertem wie an fixiertem Material geprüft. Dabei zeigte sich, daß die unspezifische Esterase im Vergleich zur alkalischen Phosphatase unter diesen Zellen eine allgemeinere Verbreitung besitzt. Die besonderen Ergebnisse der Beobachtung des Ablaufs der Nachweisreaktion und der Versuche über den Einfluß von Fixierung und spezifischen Hemmstoffen auf den Enzymnachweis werden daher in erster Linie am Beispiel der unspezifischen Esterase geschildert.

**1. Unspezifische Esterase.** An HeLa- und Af (H. Ep. No. 2)-Carcinomzellen ist regelmäßig eine starke Aktivität des Enzyms nachweisbar. Die Intensität der Reaktion ist allerdings in hohem Ausmaße von der Art und der Dauer der Fixierung abhängig (s. unten). Bei Vornahme des Enzymnachweises an *lebenden, unfixierten* Zellen bei Zimmertemperatur ist eine optimale Reaktion nach 4—6 min erreicht (Abb. 3). Die drei von uns verwendeten HeLa-Stämme (S, I, II) verhalten sich der Stärke der Reaktion nach gleich; die Zellen des Af (H. Ep. No. 2)-Stammes wiesen eine etwas höhere Aktivität auf. Die Art und die Lokalisation des Reaktionsproduktes ist jedoch bei diesen Zellen durchaus gleichartig: es ist vorwiegend in feinfädig-netziger oder auch mehr kommaartiger Form abgelagert. Seine Dichte nimmt — bei scheinbarer Freilassung des Zellkerns — von zentral nach peripher ab (Abb. 3), wobei im allgemeinen Riesenzellen eine etwas stärkere Aktivität aufweisen.

Die Eigenart der Enzymreaktion an in vitro gezüchteten Zellen verlangt — anders als bei Gewebsschnitten — für eine feinere und weitergehende Lokalisierung des Enzyms die Klärung der Frage, ob das Reaktionsprodukt innerhalb der Zelle oder auf der Zelloberfläche entsteht. Bereits in Abb. 3 fällt an einigen der kleineren Zellen der rechten Bildhälfte auf, daß sich im Gegensatz zu den übrigen Zellen das Reaktionsprodukt gerade dort findet, wo der Zellkern zu suchen ist und umgekehrt peripher davon nicht erkennbar wird. Daß dies eine Folge der Höheneinstellung der optischen Ebene im Mikroskop ist, demonstriert die Abb. 4: Bei einem ähnlichen „Abtasten“ der Zelle, wie es oben für die Lebendbeobachtung im Phasenkontrastmikroskop beschrieben wurde, stellt eine „deckglasnahe“ optische Ebene (Abb. 4a) das Reaktionsprodukt — wiederum mit peripher abnehmender Intensität — über der gesamten Zelle mit Ausnahme des Zellkernbereichs scharf dar. Andererseits erscheint bei einer etwas „deckglasfernen“

Einstellung (Abb. 4b) eine filigranartige Ablagerung von Reaktionsprodukt gerade im Zellkernbereich scharf gezeichnet. Die phasenkontrastmikroskopische Lebenduntersuchung hatte bereits gezeigt, daß bei der Beobachtung der Fältelungen auf der glasabgewandten Oberfläche der Zellen ähnlich verfahren werden muß, da der wesentlich geringer abgeflachte Zellkern in seinem Bereich die Oberfläche der sonst überaus flach auf der Glasunterlage ausgebreiteten Zelle deutlich vorwölbt (Abb. 4c). Man darf daher das bei dem Nachweis der unspezifischen Esterase entstandene Reaktionsprodukt entweder ebenfalls an der

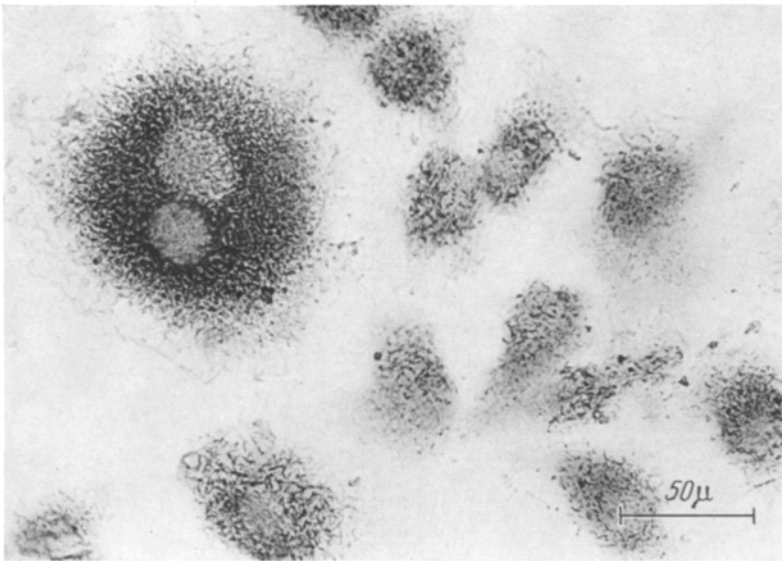


Abb. 3. HeLa-Zellkultur; unspezifische ( $\alpha$ -Naphthyl-) Esterase, Inkubation lebender Zellen 5 min. Zartnetzige, filigranähnliche Ablagerung des Reaktionsproduktes vermutlich an der Zelloberfläche (s. Text)

Zelloberfläche oder in einer dicht darunter liegenden Schicht des Cytoplasmas vermuten. Die besondere Eigenart seiner Lokalisation und Anordnung entspricht dabei durchaus den an den lebenden, unbeeinflussten Zellen im Phasenkontrastmikroskop beschriebenen feinen, filigranartigen Fältelungen der Zelloberfläche. Gegenüber diesen zeichnen sich die durch den Enzymnachweis dargestellten Strukturen allerdings durch eine größere Dichte und eine gewisse Vergrößerung aus. Zu einer Anfärbung von Strukturen, welche den undulierenden Falten zu vergleichen wären, die an den Randsäumen der lebenden Zellen beobachtet wurden, kommt es bei dem Nachweis der unspezifischen Esterase nicht. Die Abb. 4c zeigt in schematischer Weise die Verhältnisse, wie sie sich sowohl auf Grund der Untersuchung der lebenden Zellen wie auch bei der Esterasenachweisreaktion ergeben. Die Einzeichnung von Fortsätzen der der Glasunterlage zugewandten Zelloberfläche in dieses Schema ergibt sich auf Grund eines Befundes von BORYSKO und SAPRANAUSKAS (1954), die an Dünnschnitten von Zellen, die auf einer Glasunterlage gewachsen waren, kurze haftfüßchenähnliche Fortsätze beschrieben.

Die Esterasenachweisreaktion an lebenden Zellen des A<sub>4</sub>-Amnionepithelstammes, die eine den HeLa- und Af (H. Ep. No. 2)-Zellen ganz ähnliche Oberflächenfältelung aufweisen, führt bei Inkubationszeiten von 5—7 min zu einem

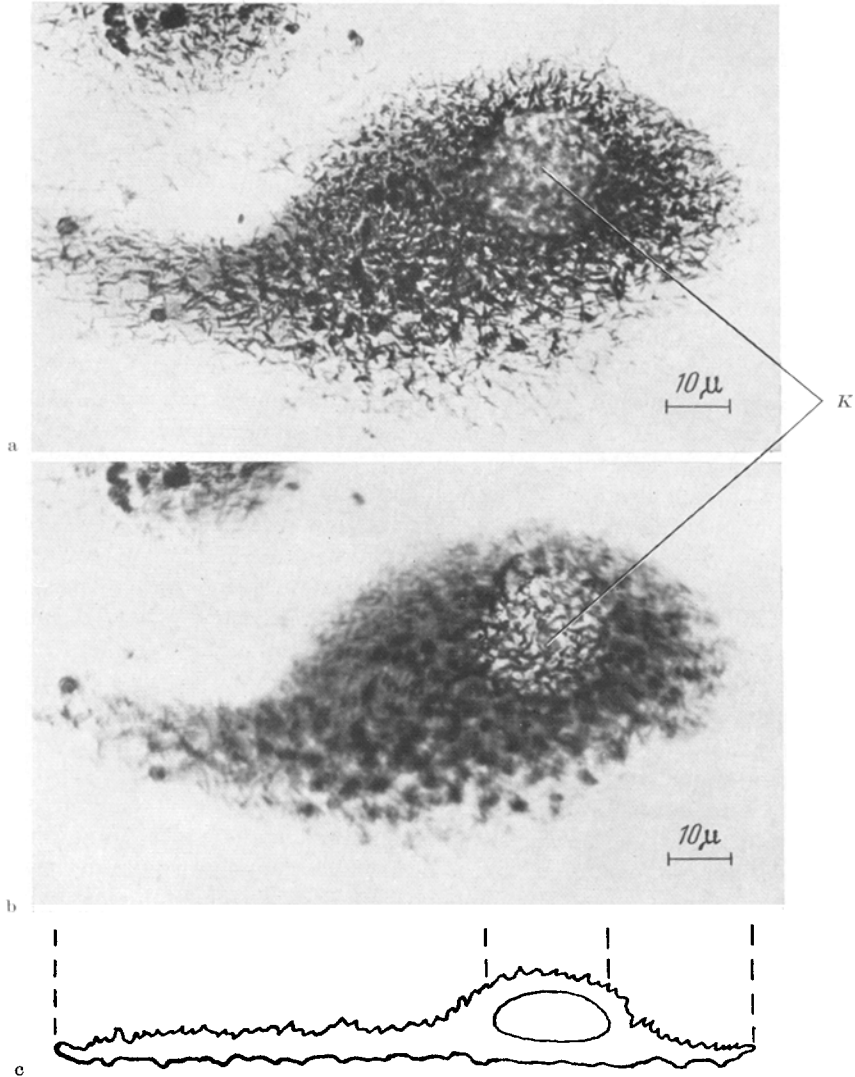


Abb. 4 a—c. Af (H. Ep. Nr. 2)-Carcinomzelle; unspezifische ( $\alpha$ -Naphthyl-) Esterase, Inkubation der lebenden Zelle, 6 min. a) Einstellung einer mittleren optischen Ebene mit scharfer Zeichnung des Reaktionsproduktes über fast der gesamten Zelle mit Ausnahme des Bereichs über dem Zellkern. b) Gleiche Zelle bei etwas glasfärnerer Einstellung, wobei nur die Ablagerung des Reaktionsproduktes über dem Zellkern scharf dargestellt wird (K Zellkern). c) Schematische Darstellung der gleichen Zelle auf Grund von a und b

Ergebnis, das dem an diesen Zellen völlig gleicht. Dagegen ist unter denselben Bedingungen die Aktivität der AFi-Sarkomzellen, der Mammacarcinomzellen von der Maus und der epitheloiden Zellen aus Mäusemilz deutlich geringer; die Form und die Lokalisation des Reaktionsproduktes ist jedoch von der gleichen Art wie

bei den vorher genannten Zellen. Im Unterschied zu den epitheloiden Zellen weisen amöboide Makrophagen aus denselben Kulturen eine wesentlich stärkere, allerdings häufig mehr diffuse Enzymreaktion auf. Menschliche Fibroblasten schließlich besitzen nur eine sehr geringe und nicht sicher lokalisierbare unspezifische Esteraseaktivität.

*Beobachtung der unspezifischen Esterase-Nachweisreaktion im Phasenkontrastmikroskop.* Die noch offene Frage, ob die Ähnlichkeit der Form und der Lokalisation des Reaktionsproduktes des Esterasenachweises mit den an lebenden Zellen vorhandenen Fältelungen der Zelloberfläche zu bedeuten hat, daß die Enzymreaktion tatsächlich an diesen Fältelungen stattfindet, sollte durch die Beobachtung und photographische Registrierung des Reaktionsablaufes im Phasenkontrastmikroskop sichergestellt werden. Zu diesem Zweck wurden zahlreiche photographische Serien von Zellen des HeLa- und des Af (H. Ep. No. 2)-Stammes hergestellt. Die jeweils an einer Zelle vorgenommene Beobachtung beginnt einige Minuten vor der Substratzugabe an der noch unbeeinflussten, im üblichen Züchtungsmilieu befindlichen Zelle und endet nach erfolgter Fixierung in neutralem Salzformalin. Auf eventuelle morphologisch faßbare Schädigungen der Zelle während der Substratperfusion oder Veränderungen durch die Fixierung wurde besonders geachtet.

Es ergab sich in allen Versuchen, daß das Reaktionsprodukt des Enzymnachweises ausschließlich an den bereits vorhandenen Zelloberflächenfältelungen auftrat. Etwa 1—2 min nach Beginn der Substratdurchströmung setzte verhältnismäßig rasch eine Verstärkung des Kontrastes sowie eine mäßige Vergrößerung an den Fältchen ein. Während sich diese bis dahin noch — wie an der unbeeinflussten Zelle — bewegten bzw. langsam ihre Form veränderten, erstarrten sie von der zweiten bis dritten Minute ab zunehmend, ohne jedoch sonst eine Veränderung zu zeigen. Auch die Kontur des Zellrandes ließ bei der photographischen Analyse von der 2.—3. min der Substratperfusion an eine Erstarrung des gerade vorhandenen Zustandsbildes erkennen. Nur gelegentlich trat während der Inkubation an den fädigen Mitochondrien eine beginnende Fragmentierung auf, wie sie z. B. auch beim Aufenthalt in Hanks-Lösung allein oder durch Phosphatpuffer hervorgerufen werden kann. Wenn nach der Einwirkung der Substratlösung von durchschnittlich 5—6 min Fixierungsflüssigkeit durchströmt wird, beobachtet man als einzig erkennbares Zeichen der erfolgten Fixierung eine stärkere Zeichnung der Kernmembran.

Die vier aus einer größeren Serie entnommenen Photogramme der Abb. 5 zeigen am Beispiel einer HeLa-Carcinomzelle (Stamm HeLa S) den Verlauf der Esterasereaktion. Abb. 5a stellt die noch unbeeinflusste, lebende Zelle im Phasenkontrast unmittelbar vor der Substratdurchströmung (Zeit 0 min) dar. Man erkennt die eigentümlich gewundenen Formen der Fältelungen auf der hier scharf eingestellten, glasabgewandten Zelloberfläche; die in der unteren Bildhälfte befindliche Kernregion und insbesondere die Kernmembran sind dementsprechend etwas unscharf. In der phasenkontrastmikroskopischen Abb. 5b ist 1 min seit Beginn der Substratperfusion verfloßen: Das Bild ist fast unverändert, die einzelnen Fältelungen sind höchstens etwas stärker kontrastiert und gering vergrößert. In der gleichfalls phasenkontrastoptischen Abb. 5c, 3 min nach Substratdurchströmung, ist die Kontrastvermehrung und Vergrößerung der Fältchen



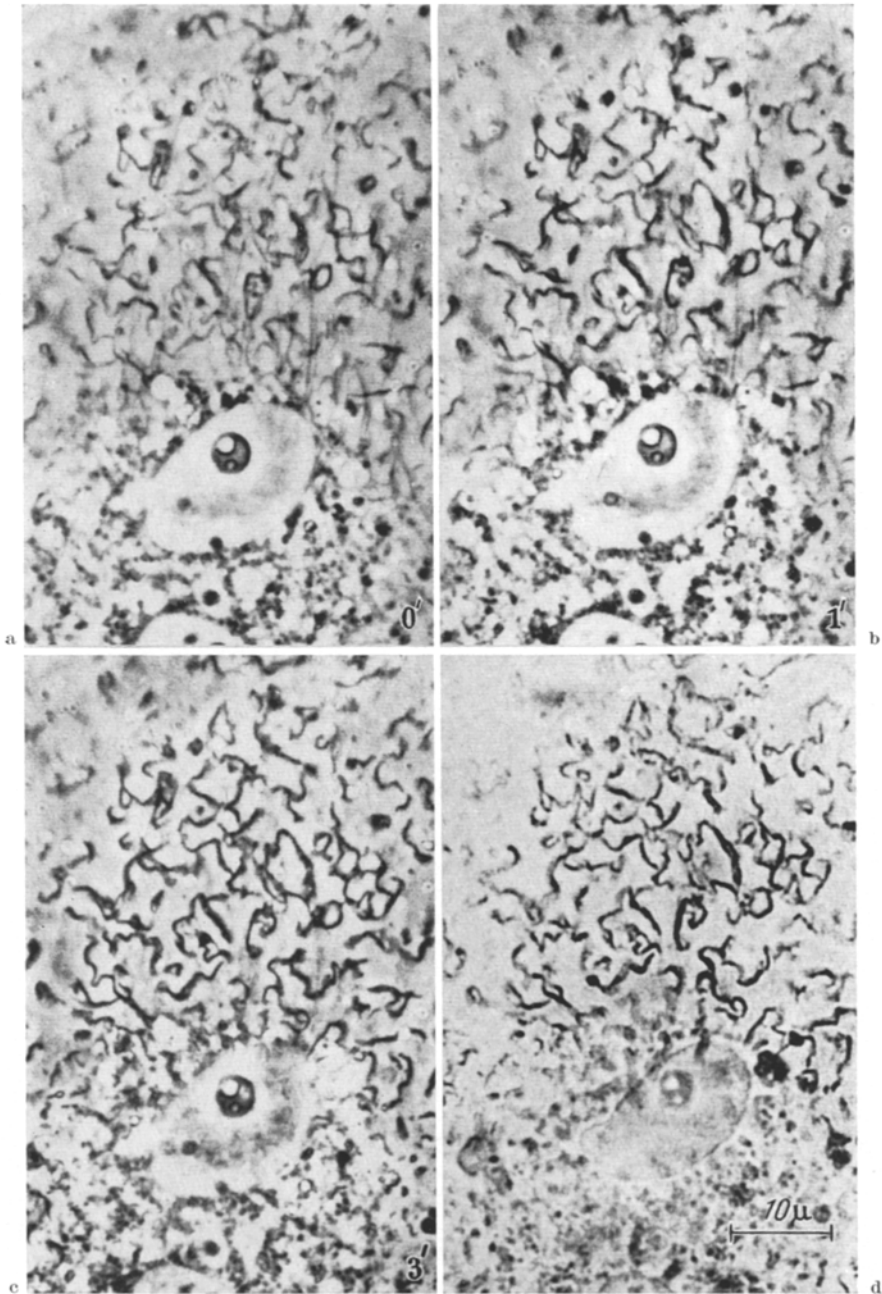


Abb. 5 a—d. HeLa-Carcinomzelle,  $\alpha$ -Naphthyl-Esterasenachweisreaktion im Phasenkontrastmikroskop (Durchströmungskammer). a) Zelloberfläche mit Fältelungen vor Beginn der Reaktion (Zeit 0 min); Phasenkontrast. b) 1 min nach Beginn der Durchströmung mit der Substratlösung; Phasenkontrast. c) 3 min nach Beginn der Reaktion, stärkerer Kontrast und Vergrößerung der Oberflächenfältelungen; Phasenkontrast. d) Gleiche Zelle kurz nach Durchströmung mit Salzformalin (6 min nach Reaktionsbeginn); Hellfeld. — Vgl. Text

durch Ablagerung des Reaktionproduktes weiter fortgeschritten. 6 min nach Substratzugabe, also 3 min nach Abb. 5c, wurde die Zelle fixiert. Die jetzt durch die Enzymreaktion gefärbte Zelle wurde dann kurz darauf, immer noch innerhalb der Durchströmungskammer, nun aber — nach Auswechseln des Kondensors — im Hellfeld aufgenommen und als Abb. 5d den phasenkontrastoptischen Aufnahmen a—c gegenübergestellt. Die Ablagerung des gefärbten Reaktionsproduktes hat also genau an den Fältelungen der Zelloberfläche stattgefunden, die an den lebenden Zellen vorhanden waren. Jedes einzelne der nun gefärbten Fältchen läßt sich von der Abb. 5d bis zur Abb. 5a, also vor Beginn der Enzymreaktion, zurückverfolgen.

*Kontrollversuche zur Spezifität der Esterasenachweisreaktion.* Nach Hitzeeinwirkung (5 min in Wasser bei 90° C) trat eine völlige Inaktivierung des Enzyms ein. Bei der Inkubation eines Deckgläschens mit hitzeinaktivierten Zellen, das teilweise mit einem Leberschnitt bedeckt war (vgl. DANIELLI 1953), blieb eine Diffusion von dem enzymaktiven Leberschnitt auf die enzymnegativen, inaktivierten Zellen aus.

Da gerade bei dem Enzymnachweis an lebenden Zellen die Frage auftaucht, ob beide für eine erfolgreiche Enzymreaktion notwendigen Faktoren, nämlich das Substrat bzw. das als Kupplungspartner fungierende Diazoniumsalz durch die Zelloberfläche in die Zelle eindringen, wurde folgender Versuch gemacht: Lebende Zellen wurden 10 min in einer Lösung des Diazoniumsalzes allein in der sonst üblichen Konzentration von 1 mg/ml inkubiert. Danach wurden sie innerhalb einiger Minuten gut gewaschen, kurz in Salzformalin anfixiert und in eine 0,1%ige Lösung von  $\alpha$ -Naphthol gebracht. Die Anfixierung sollte ein Eindringen des  $\alpha$ -Naphthols in die Zelle sichern. Bei dieser Versuchsanordnung blieb die Entstehung des Azofarbstoffes aus. Es liegt daher nahe, anzunehmen, daß das Diazoniumsalz nicht die Oberfläche der lebenden Zelle hat passieren können und beim Waschen bzw. Anfixieren der Zelle abgespült wurde.

*Weitere Versuche zur Bestimmung des Einflusses der Fixierung und spezifischer Hemmsubstanzen auf die nachweisbare Esteraseaktivität.* Bereits frühere Untersuchungen (GROPP u. HUPE 1958b) hatten gezeigt, daß nach Formalinfixierung an in vitro gezüchteten Carcinomzellen nur eine wesentlich geringere Aktivität der unspezifischen Esterase nachgewiesen werden kann als bei Durchführung der Reaktion an lebenden Zellen. Ausgedehntere Versuche über die Bedeutung der Formalinfixierung für die nachweisbare Enzymaktivität und für die Enzymlokalisierung führten zu folgenden Ergebnissen:

Im Vergleich zu der Intensität des Reaktionsausfalls an lebenden Zellen kommt es nach Fixierung in kaltem, neutralem Salzformalin zu einer deutlichen Verminderung der nachweisbaren Aktivität. Dieser Abfall ist in den ersten 30 min. der Fixierung am stärksten; bei Verlängerung der Fixierungsdauer bis 2 Std nimmt die Reaktionsintensität nur noch wenig ab. Die genaue Lokalisierbarkeit des Reaktionsproduktes bleibt jedoch durchweg in gleicher Form wie an lebend inkubierten Zellen erhalten. Dies ist auch der Fall, wenn zwischen Fixierung und Inkubation ein bis 1stündiger Aufenthalt in derselben physiologischen Salzlösung (nach PANNET-COMPTON modif.), die als Grundlage des Salzformalins dient, eingeschaltet wird. Dagegen verursacht die gleichlange Zwischenschaltung eines Aufenthaltes in destilliertem Wasser eine weitere Verringerung an nachweisbarer Aktivität und vor allem einen diffusen Ausfall der Reaktion mit dem Verlust der Lokalisierbarkeit des Enzyms. Fixierung in Formalin 1:50 (Merck, p. a.) anstelle von Salzformalin führt zu dem gleichen Ergebnis wie die Zwischenschaltung eines Aufenthaltes in destilliertem Wasser: Bereits nach 30 min Fixierung tritt nur noch eine sehr geringe, diffuse Enzymreaktion ein.

Der Einfluß von Esterase-Hemmstoffen (GOMORI 1955, BURSTONE 1956) wurde in der Regel an HeLa-Zellkulturen und zwar meist auf folgende Weise geprüft: In einem Versuchsansatz wurden in einer ersten Reihe lebende Zellkulturen 30 min mit absteigenden Konzentrationen der betreffenden Substanz in physiologischer Salzlösung behandelt, nach kurzem Waschen dann im Esterase-Substratansatz inkubiert und anschließend fixiert; in einer zweiten Reihe wurde die Substrateinwirkung von gleicher Dauer mit entsprechendem Auswaschen zuvor und hernach zwischen eine Fixierung von 30 min und die Inkubation eingeschaltet. Das Ergebnis wird in der Tabelle dargestellt. Die stärkste Hemmung der Esteraseaktivität

ließ sich demnach mit den beiden quaternären Ammoniumbasen Benzethoniumchlorid (Phemerol) und Benzalkoniumchlorid (Zephiran) erreichen. Bemerkenswert ist dabei, daß — entsprechend der auch sonst höheren Aktivität — das Enzym an der lebenden, unfixierten Zelle mit zunehmender Verdünnung der Hemmsubstanz wieder eher nachweisbar wird als an der fixierten Zelle. Diisopropylfluorophosphat bewirkt ebenfalls eine starke Hemmung der Esterase; bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M tritt allerdings schon eine eben erkennbare Enzymreaktion auf, die dann, ebenso wie nach den weniger wirksamen, stärkeren Verdünnungen der vorher genannten Substanzen, die auch sonst an den HeLa-Zellen gewohnte Lokalisation zeigte.

Tabelle. *Wirkung von Hemmsubstanzen auf die ( $\alpha$ -Naphthyl-) Esteraseaktivität von HeLa-Zellen*

Substanz	Konzentration	Hemmeffekt bei Inkubation von	
		lebenden Zellkulturen	vorfixierten Zellkulturen
NaF . . . . .	0,003—0,01 M	(+)	(+)
Na-arsanilat (Atoxyl) . . . . .	0,01 M	(+ ?)	(+ ?)
Physostigminsulfat . . . . .	0,0001 M	—	—
KCN . . . . .	0,01 M	—	—
Diisopropylfluorophosphat . . . . .	0,0001 M	++	++
Benzethoniumchlorid (Phemerol, PARKE, DAVIS u. Co.). . . . .	$1:10^4$	+++	+++
	$1:10^5$	++	++
	$1:10^6$	—	+
Benzalkoniumchlorid (Zephiran, Winthrop, Lab.). . . . .	$1:10^4$	++	+++
	$1:10^5$	(+)	++

+++ totale Hemmung; ++ starke Hemmung mit Andeutung einer positiven, lokalisierbaren Reaktion; + deutliche Hemmung; (+) geringe Hemmung; (+ ?) sehr fragliche Hemmung; — keine Hemmung.

**2. Alkalische Phosphatase.** In einer früheren Mitteilung (GROPP u. HUPE 1958b) war festgestellt worden, daß sich bei Durchführung der Azofarbstoff-nachweismethode an lebenden Kulturen von HeLa-Carcinomzellen alkalische Phosphatase an die breiten, undulierenden Falten der Randsäume der Zellen lokalisieren läßt. Diese Ergebnisse hatten sich auf den damals allein zur Verfügung stehenden HeLa-Stamm (Herkunft Behring-Werke, hier unter der Bezeichnung „I“ geführt) bezogen. Die weitere Fortführung dieser Untersuchungen, insbesondere auch die Beobachtung des Ablaufs der Enzymreaktion im Phasenkontrastmikroskop und seine photographische Registrierung, ähnlich wie bei der unspezifischen Esterase beschrieben, bestätigte die Lokalisation des Enzyms an Faltungen der Zellperipherie (Abb. 6), welche eingangs an den lebenden Zellen als undulierende Säume erwähnt wurden (vgl. Abb. 1a). Über den übrigen Bezirken der Zelloberfläche ist eine zwar kräftige, doch vorwiegend körnige bis unscharf-netzige Reaktion vorhanden. Vor allem werden die bei der Esterase-reaktion anfärbbaren, feineren, filigranartigen Fältelungen der glasabgewandten Zelloberfläche in der Regel nicht dargestellt; dies ist nur ganz selten an den etwas größeren Fältelungen der Oberfläche der Fall, welche, — wie S. 318 erwähnt — häufig die besonders großen bzw. Riesenzellen auszeichnen.

Inzwischen wurden Versuche zum Nachweis der alkalischen Phosphatase auf einen HeLa-Stamm anderer Herkunft (LETTRÉ, als „II“ bezeichnet) ausgedehnt, der bis kurz vorher in Stückchenkulturen innerhalb eines Plasmasubstrats gezüchtet worden war, sowie auf einen dritten He-La-Stamm S (Herkunft ebenfalls Behring-Werke<sup>1</sup>). Obwohl diese beiden He-La-Stämme Zelloberflächenfältelungen und undulierende Faltungen an den Zellsäumen ebenso gut besitzen wie die Zellen des ersterwähnten Stammes He-La (I), tritt an Stamm HeLa (II) nur eine sehr geringe alkalische Phosphatasereaktion an den Randsäumen ein;

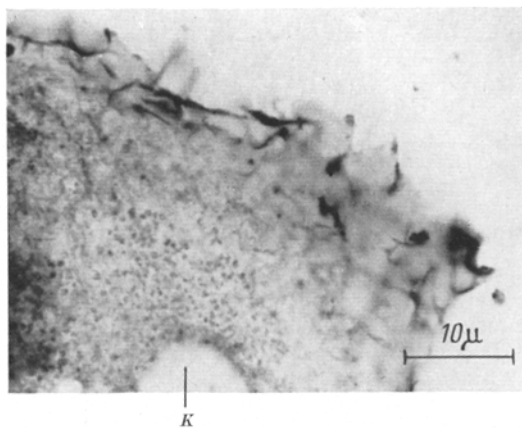


Abb. 6. HeLa-Carcinomzelle (Stamm HeLa „I“). Alkalische Phosphatase, Azofarbstoffmethode an der unfixierten Zelle, Inkubation 5 min. Darstellung von Falten am Randsaum der Zelle; K Zellkern

die Zellen des Stammes HeLa (S) dagegen sind völlig negativ. Das Ergebnis an Zellen des Af (H. Ep. No. 2)-Stammes gleicht etwa dem an HeLa (II). Alle übrigen untersuchten Zellarten besitzen keine nachweisbare Aktivität an alkalischer Phosphatase.

Fixierung in Salzformalin vor der Durchführung der Enzymreaktion führt auch bei der alkalischen Phosphatase zu einer allerdings auch bei tagelanger Fixierung nur geringen Verminderung der nachweisbaren Aktivität. Dagegen wird durch vorangehende Fixierung die Lokalisierung des Reaktionsproduktes an die Faltungen der Zellsäume stark beeinträchtigt. l-Cystein 0,001 M und KCN 0,01 M hemmen die an HeLa (I) nachweisbare alkalische Phosphatase.

### Besprechung

Die Aufgabe dieser Untersuchung war, Voraussetzungen für eine möglichst exakte Lokalisierung der unspezifischen Esterase und der alkalischen Phosphatase an einigen in vitro gezüchteten Zellarten zu schaffen. Bereits früher war von uns vermutet worden (GROPP u. Mitarb. 1958a, b), daß diese Enzyme besondere lokalisatorische Beziehungen zu der Zelloberfläche besitzen. Im Hinblick auf die große Bedeutung, die der Oberfläche der Zelle und den sich an ihr abspielenden Vorgängen zukommt, scheint uns ihre weitere Untersuchung mit den Methoden, die uns von der Enzymhistochemie bzw. Enzymcytochemie in die Hand gegeben werden, von großer Wichtigkeit. Die Verwendung von Zellkulturen bringt

<sup>1</sup> Herrn Prof. Dr. SANDRITTER, Frankfurt a. M., danken wir für die Überlassung dieses Stammes.

für derartige Versuche eine Reihe von Vorteilen mit, von denen die wesentlichen darin bestehen, daß auf Präparationsmethoden, die die Zelle bereits vor dem Enzymnachweis schädigen oder die größere Enzymverluste bedingen, weitgehend verzichtet werden kann, sowie daß unter geeigneten Bedingungen (sog. Simultanmethoden) die während der Enzymnachweisreaktion ablaufenden Vorgänge direkt beobachtet werden können.

Die Untersuchungen ergaben, daß die Enzyme  $\alpha$ -Naphthylesterase und  $\alpha$ -Naphthylphosphatase mit histochemischen Nachweismethoden bei einer Reihe von in vitro gezüchteten Zellen eindeutig an „Strukturen“ der Zelloberfläche zu lokalisieren sind, die von der Lebendbeobachtung dieser Zellen her als formveränderliche bzw. einer ständigen Bewegung unterworfenen Faltungen der Oberfläche bekannt waren. Es ließ sich zeigen, daß sich im wesentlichen zwei Typen von solchen Oberflächenfaltungen unterscheiden lassen. Einmal nämlich handelt es sich um breitere Falten, die an den Zellsäumen im Verlaufe von undulierenden Bewegungen auftreten (vgl. GEY 1954/55, GEY u. Mitarb. 1954a, b) und die in zum Teil recht verschiedener Form an allen von uns verwendeten Zellarten, einschließlich den Fibroblasten, zu beobachten sind. An derartigen Falten war unter den untersuchten Zellstämmen nur bei den Zellen des Stammes HeLa „I“ eine starke Aktivität der alkalischen Phosphatase nachweisbar, an denen der Stämme HeLa „II“ und Af (H. Ep. No. 2) eine recht geringe. Die übrigen Zellarten, darunter auch ein dritter HeLa-Stamm („S“), blieben negativ. Unspezifische Esterase fand sich an den Falten der Zellsäume in keinem Fall. — Die Unterscheidung einer zweiten Art von Oberflächenfalten, die bei den flach auf einer Glasunterlage gezüchteten Zellen auf deren glasabgewandter Oberfläche zu beobachten sind, erschien zunächst durch deren besondere Erscheinungsform als feinste, filigranartige Fältelungen gerechtfertigt. Vor allem aber wies das Ergebnis der Esteraseuntersuchung darauf hin: Eine Aktivität dieses Enzyms konnte bei allen untersuchten Zellarten mit solchen Fältelungen an eben diese lokalisiert werden, also insbesondere bei den Zellen aller drei verwendeten HeLa-Stämme, des Af (H. Ep. No. 2)- und des A<sub>4</sub>-Amnionepithelstammes. Die Zellen des AFi-Sarkomstammes, die Mammacarcinomzellen der Maus und epitheloide Zellen aus Mäusemilz besaßen entsprechend dem geringeren Vorhandensein dieser Oberflächenfältelungen eine geringere Esteraseaktivität; die untersuchten menschlichen Fibroblasten schließlich, die kaum solche filigranartige Oberflächenfältelungen zeigen, waren negativ. Andererseits ließ sich bei den Zellen des HeLa-Stammes „I“, die an den Falten der Randsäume stark phosphatasepositiv sind, an den feineren Oberflächenfältelungen keine alkalische Phosphatase nachweisen.

Es erhob sich die Frage, ob die besonderen Bedingungen z. B. des Esterasenachweises an Zellen in vitro, insbesondere bei der Reaktion an lebenden Zellen, dafür verantwortlich sind, daß sich dieses Enzym nur an der Zelloberfläche bzw. ihren Fältelungen findet und eine eventuelle Aktivität im Cytoplasma nur deshalb unentdeckt bleibt, weil die Komponenten der Substratlösung nicht eindringen können. Der qualitativ identische Ausfall der Reaktion an vorfixierten Zellen, deren Oberfläche für den Eintritt der zum Enzymnachweis notwendigen Substanzen kein Hindernis mehr sein sollte, spricht — ohne es allerdings ganz auszuschließen — gegen das Vorhandensein von nachweisbarer Esteraseaktivität im Cytoplasma.

Für die Lokalisierung der hier untersuchten Enzyme, in erster Linie der unspezifischen Esterase, war der Umstand wichtig, daß es möglich ist, die Nachweisreaktion an der lebenden Zelle durchzuführen und im Phasenkontrastmikroskop direkt zu beobachten. Eine derartige supravitale Enzymreaktion erwies sich — wenigstens vom morphologischen Standpunkt aus — als ein sehr schonendes Verfahren; denn es ließ sich zeigen, daß bei sehr kurzen Inkubationszeiten, bei Wahrung eines physiologischen bzw. isotonischen Milieus und bei Verwendung von Salzformalin als Fixierungsmittel jegliche Schrumpfungerscheinungen oder anderweitige, morphologisch erfaßbare Schädigungen an der Zelle vermieden werden. Die Bedeutung des Aufbaus der Substratlösungen auf einer physiologischen Salzlösung (nach HANKS oder PANNET-COMPTON, modif.) ergab sich aus Vorversuchen, die zeigten, daß mit gewöhnlichem isotonischem Phosphatpuffer als Grundlage der Substratlösung oder sogar schon durch den Puffer allein regelmäßig eine starke Fragmentation der Mitochondrien eintritt. Diese wurde durch Benutzung der genannten physiologischen Salzlösungen weitgehend, wenn auch nicht vollständig, verhindert.

Untersuchungen über den *Einfluß der Fixierung* mit Formalin und die Bedeutung der Verwendung von Salzlösungen für die Stärke und Lokalisierbarkeit der Enzymaktivität, insbesondere bei der Esterase, führten zunächst zu dem Ergebnis, daß durch die Formalinfixierung ein Teil der nachweisbaren Aktivität verlorengeht. Dieser Verlust ist innerhalb der ersten 30 min der Fixierung am größten. Entscheidend ist dabei jedoch die Anwesenheit von Salzen, wie sie in den von uns verwendeten physiologischen Salzlösungen vorliegen. Durch sie läßt sich der Enzymverlust verringern, vor allem aber eine Diffusion des Enzyms vermeiden, welche die exakte Lokalisierbarkeit beeinträchtigt bzw. verhindert. NACHLAS, PRINN und SELIGMAN (1956), die die durch Einwirkung von wäßrigem Milieu entstehenden Enzymverluste u. a. bei der Esterase auf etwa zwei Drittel beziffern, wiesen schon auf die Bedeutung des Anteils von Lyo-Enzymen, also einer leichter löslichen gegenüber einer unlöslichen Fraktion, an dem Gesamtenzym hin. Mit den Ergebnissen dieser Autoren stimmen die hier mitgeteilten Befunde durchaus überein. Es ist wahrscheinlich, daß ein Teil der von uns an der Zelloberfläche nachgewiesenen Esterase leicht löslich bzw. diffusibel ist, daß jedoch durch Anwesenheit von Salzen in der Zusammensetzung und Konzentration der von uns verwendeten Lösungen die Diffusion weitgehend reduziert werden kann. Dem widerspricht keineswegs der Befund der genannten Autoren, daß an unfixierten Gewebsschnitten eine Behandlung mit einer stark hypertonischen, nämlich 2M NaCl-Lösung einen besonders hohen Enzymverlust verursacht. Die Esterase, die an den von uns untersuchten HeLa-Zellen vorkommt, weist ein für dieses Enzym charakteristisches Hemmspektrum (GOMORI 1955, BURSTONE 1956) auf, an dem die starke Hemmbarkeit durch Diisopropylfluorophosphat und die quaternären Ammoniumbasen Benzethonium- und Benzalkoniumchlorid hervorgehoben zu werden verdient.

Es ist ein für die Physiologie der Zelloberfläche wichtiger Umstand, daß an ihr bzw. in einer elektiven Weise an den für die Zelloberfläche charakteristischen Faltungen Enzyme nachgewiesen und eindeutig lokalisiert werden können. Allerdings läßt sich an Hand der hier geschilderten Befunde nicht entscheiden, ob diese Enzyme einer bestimmten Schicht der Zelloberfläche oder möglicherweise

einer die Zelloberfläche überziehenden Hülle im Sinne eines „extracellular coat“ (vgl. dazu GROPP u. Mitarb. 1958a; RINALDINI 1958; WEISS 1958) angehören. Die vorliegenden Ergebnisse bekräftigen jedoch unsere Auffassung, daß es sich bei den mannigfachen Faltungen und Protrusionen um Formdifferenzierungen der Zelloberfläche eigener Art und möglicherweise mit eigenen besonderen Aufgaben handelt. Ihre Verbreitung an *in vitro* gezüchteten Zellen ist allgemein (vgl. GEY 1954/55). Zu den wesentlichsten, morphologisch erfaßbaren Funktionsvorgängen, an denen sie unter diesen Bedingungen beteiligt sind, gehören die Phagozytose und die Pinocytose (GEY 1954/55; GEY u. Mitarb. 1954b; BRANDT 1958). Es liegt nahe anzunehmen, daß Oberflächenfaltungen auch an Zellen *in vivo* innerhalb von Gewebsverbänden, an freien Oberflächen und frei beweglichen Zellen in der einen oder anderen Form vorhanden sind. Der elektronenmikroskopischen Untersuchungsmethode ist es gelungen, an der Oberfläche von Zellen zahlreicher normaler und maligner Gewebe Fortsätze und Faltungen zu erkennen, die, soweit sie freie Zelloberflächen betreffen, zumeist als „Microvilli“ beschrieben werden (vgl. BERNHARD u. Mitarb. 1956, 1958). Es ist durchaus wahrscheinlich, daß ein Teil dieser Gebilde denen entspricht, die als Faltungen an lebenden, *in vitro* gezüchteten Zellen beobachtet werden. Die Klärung dieser Frage muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Wenn die Faltungen und Protrusionen der Zelloberfläche als eine besondere Formdifferenzierung betrachtet werden, so ist es für ihre Beurteilung wichtig, daß sie offenbar nur besondere Bildungen innerhalb der Bewegungserscheinungen der Zelloberfläche überhaupt darstellen. Der Formwandel, dem diese und damit die an ihr auftretenden Faltungen unterworfen sind, wird nach Vorstellungen, die u. a. LETTRÉ (vgl. LETTRÉ u. SCHLEICH 1954) entwickelt hat, durch lokale Kontraktionsunterschiede der Zelloberfläche in Abhängigkeit von dem aus dem Zellstoffwechsel zur Verfügung gestellten ATP hervorgerufen. Damit wird die Form der Zelloberfläche auf die Stoffwechselsituation der Zelle und ihre lokalen Veränderungen innerhalb der Zelle zurückgeführt. Es bestehen andererseits Hinweise, daß Substanzen, die direkt an der Zelloberfläche ihren Angriffspunkt haben wie Trypsin (GROPP u. Mitarb. 1958a) oder Versene (BRANDT 1958), sei es durch die Einwirkung auf die oberflächlichen Proteinschichten oder durch Bindung der für die Rigidität der Zelloberfläche wichtigen  $Ca^{++}$ -Ionen, einen Einfluß auf die Formwandelvorgänge haben.

In Anbetracht der ständigen Formänderungen und Bewegungen der Zelloberflächenfalten muß es als ein eigenartiges Phänomen erscheinen, daß sich — wie wir zeigen konnten — bestimmte Enzyme an Stellen lokalisieren lassen, die keine Strukturen im eigentlichen Sinne, sondern veränderliche Gebilde sind. Eine formale Erklärung ist vielleicht darin zu suchen, daß wir es wenigstens zum Teil mit Enzymen bzw. mit Enzymfraktionen zu tun haben, die als Lyo-Enzyme im Sinne von NACHLAS u. Mitarb. (1956) auf Grund ihrer Löslichkeit leicht Ortsverschiebungen mitmachen können. Ein tiefergehendes Verständnis ist wahrscheinlich nur dann möglich, wenn es gelingt, von der Vorstellung der Zelloberfläche als einem starren System wegzukommen und sie als ein in morphologischer und funktioneller Hinsicht *dynamisches* System aufzufassen. Dessen weitere Aufklärung ist für die Kenntnis zahlreicher Lebensvorgänge der Zelle deswegen so wichtig, weil es auf vielfältige Weise entscheidende Mittler- und vielleicht

auch Kontrollfunktionen bei den Wechselwirkungen des äußeren und des inneren Milieus der Zelle ausübt.

Fräulein I. DITZ und Fräulein I. HÖWELMEIER danken wir für ihre Mithilfe bei den dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen.

### Zusammenfassung

1. An in vitro gezüchteten Zellen, insbesondere HeLa- und Af (H. Ep. No. 2)-Carcinomzellen, werden Beobachtungen der Zelloberfläche und ihres Formwandels unter besonderer Berücksichtigung der dabei auftretenden Faltungsvorgänge beschrieben. Vor allem wird bei den auf einer Glasunterlage flach ausgebreiteten Zellen auf filigranartige Fältelungen der glasabgewandten Zelloberfläche hingewiesen.

2. An diesen letztgenannten Fältelungen läßt sich an lebenden Zellen bei den meisten untersuchten Zellstämmen ( $\alpha$ -Naphthyl)-Esterase nachweisen. Die genaue Lokalisierung dieses Enzyms wird durch unmittelbare Beobachtung des Reaktionsablaufs im Phasenkontrastmikroskop gesichert. Dagegen besteht, allerdings nur bei einem Teil der untersuchten Zellen, darunter zwei von drei vorhandenen Linien des HeLa-Stammes, eine alkalische ( $\alpha$ -Naphthyl-) Phosphataseaktivität an den breiteren Falten der undulierenden Randsäume.

3. Bei der eingehend untersuchten Esterasenachweisreaktion erwies sich zur Vermeidung von Enzymverlusten und Diffusionserscheinungen die Verwendung von Salzlösungen bei der Substratinkubation und gegebenenfalls bei der vorangehenden Fixierung als wichtige Vorbedingung. Ein Teil der nachgewiesenen Enzymaktivität läßt sich als leichter lösliche „Lyofraktion“ auffassen, deren Abdiffusion durch die Anwesenheit von Salzen weitgehend vermindert wird.

4. Die Formwandelvorgänge der Zelloberfläche und insbesondere die an ihr entstehenden Faltungen werden als Formdifferenzierungen eigener Art und möglicherweise eigener funktioneller Bedeutung diskutiert und in den Rahmen einer in morphologischer und funktioneller Hinsicht dynamischen Auffassung der Zelloberfläche gestellt.

### Literatur

- BERNHARD, W.: Electron microscopy of tumor cells and tumor viruses. A review. *Cancer Res.* **18**, 491—509 (1958). — BERNHARD, W., M. GUÉRIN et Ch. OBERLING: Mise en évidence de corpuscules d'aspect viral dans différentes souches de cancers mammaires de la souris. Etude au microscope électronique. *Acta Un. int. Cancr.* **12**, 544—557 (1956). — BORYSKO, E., and P. SAPRANAUSKAS: A new technique for comparative phase contrast and electron microscope studies of cells grown in tissue culture, with an evaluation of the technique by means of time-lapse cinematographs. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **95**, 68—79 (1954). — BRANDT, P. W.: A study of the mechanism of pinocytosis. *Exp. Cell Res.* **15**, 300—313 (1958). — BURSTONE, M. S.: Esterase of the salivary glands. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 130—139 (1956). — DANIELLI, J. F.: *Cytochemistry. A critical approach.* New York: John Wiley & Sons 1953. — FJELDE, A.: Observations on a human tumour in tissue culture. *Nature (Lond.)* **175**, 434 (1955). — GEY, G. O.: Some aspects of the constitution and behavior of normal and malignant cells maintained in continuous culture. *Harvey Lect., Ser. L*, p. 154—229 (1954/55). — GEY, G. O., F. B. BANG and M. K. GEY: An evaluation of some comparative studies on cultured strains of normal and malignant cells of animals and man. *Texas Rep. Biol. Med.* **12**, 805—827 (1954a). — GEY, G. O., W. D. COFFMAN and M. T. KUBICEK: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**, 264—265 (1952). — GEY, G. O., P. SHAPRAS and E. BORYSKO: Activities and responses of living cells and their components as recorded by cinephase microscopy and electron microscopy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **58**, 1089—1109 (1954b). — GOMORI, G.: *Histochemistry of*



human esterases. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 479—484 (1955). — GROPP, A., E. BONTKE and K. HUPE: Untersuchungen zum Nachweis der alkalischen Phosphatase an in vitro gezüchteten menschlichen Carcinomzellen mit besonderer Berücksichtigung ihrer Beziehung zu der Zelloberfläche. *Exp. Cell Res.* **15**, 200—213 (1958a). — GROPP, A., u. K. HUPE: Fermenthistochemische Reaktionen an lebenden Zellen in Gewebekulturen. *Klin. Wschr.* **36**, 361—362 (1958b). — HORSTMANN, F., u. A. KNOOP: Elektronenmikroskopische Studien an der Epidermis. *Z. Zellforsch.* **47**, 348—362 (1958). — LETTRÉ, H., u. A. SCHLEICH: Zur Bedeutung der Adenosintriphosphorsäure für Formkonstanz und Formänderungen von Zellen. *Protoplasma* **44**, 314—321 (1954). — LEWIS, W. H.: Pinocytosis. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **49**, 17—27 (1931). — NACHLAS, M. M., W. PRINN and A. M. SELIGMAN: Quantitative estimation of lyo- and desmoenzymes in tissue sections with and without fixation. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 487—502 (1956). — PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*. London: J. & A. Churchill 1953. — RINALDINI, L. M.: The isolation of living cells from animal tissues. *Intern. Rev. Cytol.* **7**, 587—647 (1958). — VOGEL, A.: Zelloberfläche und Zellverbindungen im elektronenmikroskopischen Bild. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 41. Tagg, Bad Nauheim, S. 284—295, 1957. — WEISS, L.: The effects of trypsin on the size, viability, and dry mass of sarcoma 37 cells. *Exp. Cell Res.* **14**, 80—83 (1958). — ZITCER, E. M., and T. H. DUNNEBACKE: Transformation of cells from the normal human amnion into established strains. *Cancer Res.* **17**, 1047—1053 (1957).

Dr. A. GROPP, Bonn a. Rh., Pathologisches Institut der Universität