

Gedruckt mit Genehmigung der  
naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Universität Frankfurt am Main

Dekan: Prof. Dr. J. Stauff

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Kuhl

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Lindauer

mündliche Prüfung: 13. Dez. 1966

# Dissoziation und Reaggregation von Epidermiszellen der Larven von *Xenopus laevis* (Daudin) in vitro

Zeitrafferlaufbild- und Teilbildanalyse \*

JÜRGEN BEREITER-HAHN \*\*

Institut für Kinematische Zellforschung an der Johann Wolfgang Goethe-Universität,  
Frankfurt a. M. (Direktor: Prof. Dr. W. KUHLE)

Eingegangen am 20. Dezember 1966

---

\* Dissertation der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Frankfurt a. M. 1966.

\*\* Herrn Prof. Dr. W. KUHLE zum 75. Geburtstag gewidmet.

*Summary.* In Rose-Chambers epidermal cells of *Xenopus laevis* tadpole tails grow out on a coverslip. Outgrowth, dissociation and reaggregation were studied by time-lapse cinematography. The culture medium consisted of Steinberg's salt solution and serum of haemolysed calf blood. For dissociation and reaggregation experiments serum-free salt solutions were used.

The outgrowth of the sheets is brought about by a movement of the hyaline border of the cells being attached to the coverslip. On the medium side of the first cell sheet there may be sometimes a second sheet. During this kind of movement, named "mass-movement" by OPPEL, the cells do not lose the connexion to each other.

Dissociation of the cell sheets with Versene (0,05%) causes differentiation of a hyaline border and a granular cytoplasm. After prolonged action of EDTA the hyaline border is retracted, the cells round themselves and begin to "bubble". Brought into  $\text{Ca}^{++}$  containing salt solutions the cells get back their spread form on the coverslip and about 10 min later the first aggregates with stabilized contacts can be observed. Reaggregation occurs in Ringer's salt solution containing 0,02%  $\text{CaCl}_2$ , in isotonic  $\text{CaCl}_2$  solution, in isotonic  $\text{NaCl}$ - and  $\text{KCl}$ -solution, containing at least 0,02%  $\text{CaCl}_2$ . Univalent cations are suggested to act only as charged groups in cell movement and aggregation.

Potassium cyanide ( $2,5 \times 10^{-3}$  M) and PCMB ( $2,5 \times 10^{-3}$  M) also allow reaggregation, but in PCMB a secondary dissociation of reaggregated cells occurs: the cells lose their contact inhibition and begin to wander each upon another.

No stabilized cellular contacts can be obtained, when in Ringer's solution calcium is replaced by magnesium. Reaggregation does not occur in Ringer solution below pH 4,0 and in isotonic sucrose-diluted  $\text{KCl}$ - and  $\text{NaCl}$ -solutions with a salt concentration below 0,33 M. In these cases cells lose their ability of locomotion. Addition of 2% Trypsin for only 3 min prevents the reaggregation in serum-free media.

Alterations in energy supply of the cells result in viscosity changes of the cytoplasm. Therefore a correlation of viscosity and contractile state of proteins and its dependence of a membrane potential between the interior of the cells and the medium is suggested. This hypothesis is compared with results from muscle physiology.

*Zusammenfassung.* 1. Das Dissoziations- und Reaggregationsverhalten von Epidermiszellen der Larven von *Xenopus laevis* wird unter verschiedenen Bedingungen in vitro mit Hilfe des Zeitrafferfilmes untersucht. Die Kultur der Schwänze erfolgt in Salzlösung nach STEINBERG und Serum hämolysierten Kälberblutes. Für die Reaggregation werden serumfreie Salzlösungen verwendet.

2. Am Auswandern der Zellrasen beteiligen sich alle dem Deckglas anliegenden Zellen. Sie bilden einen Plasmasaum in die Richtung aus, in der sie sich fortbewegen. Der Zusammenhalt zwischen den Zellen wird hierbei nicht gelöst.

3. Die Zellrasen lassen sich mit 0,05%igem EDTA in Einzelzellen auflösen; dabei tritt eine Trennung des Zellplasmas in ein zentral gelegenes granuliertes Plasma und einen hyalinen Plasmasaum auf. Bei längerer Einwirkung des EDTA werden die hyalinen Säume eingezogen. Die Zellen sind dann abgekugelt; es brechen blasenförmige „Lobopodien“ aus den Zellen hervor und verschwinden wieder: „Blubbern“.

4. In Gegenwart von  $\text{Ca}^{++}$  breiten sich die Zellen wieder auf dem Deckglas aus. Die Bildung „stabilisierter Aggregate“ erfolgt in Ringerlösung (mit 0,02%  $\text{CaCl}_2$ ), in isotonischer Calciumchlorid-Lösung, in isotonischer Kochsalz- und Kaliumchlorid-Lösung, wenn Calciumchlorid mindestens 0,02%ig enthalten ist. Es wird angenommen, daß die einwertigen Kationen für die Zellbewegung und Reaggregation nur als Ladungsträger wirksam sind.

In KCN-haltiger ( $2,5 \times 10^{-3}$  M) und in PCMB-haltiger ( $2,5 \times 10^{-3}$  M) Ringerlösung ist ebenfalls Reaggregation möglich. Unter dem Einfluß von PCMB ist die Stabilisierung der Zellgrenzen jedoch nicht von Dauer. Die Aggregate werden wieder aufgelöst; die Zellen zeigen keine Kontakthemmung mehr, sie wandern übereinander.

5. Wird das Calciumchlorid der Ringerlösung durch die äquimolare Menge Magnesiumchlorid ersetzt, so werden die Kontakte nicht stabilisiert, sondern „sliding sheets“ gebildet. Keine Reaggregation ist in Calcium-haltiger Natrium- oder Kaliumchlorid-Lösung einer Konzentration unter 0,33 M und in Ringerlösung unter pH 4,0 möglich. Die Zellen sind dann auch zu keiner Ortsbewegung mehr fähig. Selbst kurze (3 min) Trypsinbehandlung (2%) verhindert die Reaggregation der Zellen im serumfreien Medium.

6. Besonders die Versuche zur Störung des Energiehaushaltes der Zellen legen nahe, daß die dabei zu beobachtenden Viskositätsänderungen im Hyaloplasmasaum auf einer Änderung des Kontraktionszustandes in ihm enthaltener kontraktiler Proteine beruhen. Die Auswirkungen von PCMB, niederem pH und geringer Ionenstärke deuten auf die Beteiligung eines Membranpotentials an der Steuerung der Viskositätsänderung hin. Diese Hypothese wird zu Ergebnissen der Muskelphysiologie in Beziehung gesetzt.

## A. Einleitung

Während der Entwicklung des Lebewesens entsteht die Anordnung der Zellen zu verschiedenen Geweben durch zahlreiche Zellverlagerungen und Wanderungen (HAMANO, 1964; HOLTFRETER, 1947; KÜHL, 1937, 1965; NAKAI, 1960; TOWNES und HOLTFRETER, 1955). Solche Wanderungen sind fast stets an ein festes Substrat gebunden, ohne das z. B. nur gewisse Blutzellen von Insekten zu aktiver Fortbewegung fähig sind (MARSCHALL, 1966). Sollen die Beziehungen von Zellen untereinander *in vitro* untersucht werden, so ist, will man ein dem Normalverhalten im Organismus entsprechendes Bild der dabei ablaufenden Vorgänge erhalten, dieser Voraussetzung Rechnung zu tragen, den Zellen also ein geeigneter Untergrund für ihre Wanderungen zu bieten.

Die Feststellung von CURTIS und GRAEVES (1965), daß das Ausmaß der Aggregation von Zellen in einer *Suspension* nur von der Adhäsivität der Oberflächen abhängt, trifft sicher für die gegebenen Versuchsbedingungen zu, zeigt jedoch nur *einen* der wirksamen Faktoren für die Zusammenlagerung von Zellen *in situ*. Untersuchungen an anorganischen Modellen, etwa an Öltröpfchen in Wasser (HARVEY und DANIELLI, 1938), die unter bestimmten Bedingungen ein lebenden Zellen entsprechendes Verhalten zeigen, lassen sinnvolle Rückschlüsse auf die Grundlagen der Kohäsion von Zellen zu (L. WEISS, 1960), doch liegt in dieser Betrachtungsweise die Gefahr, eine Zelle in bezug auf ihre Adhäsivität wirklich wie eine leblose Partikel zu behandeln. Mikrozeitrafferfilm-Aufnahmen heben dagegen den Zusammenhang zwischen morphologischen Veränderungen und der Adhäsivität hervor. Sie lassen uns den Organismus nicht als „starre Organisation, sondern als organisiertes Verhalten“ (P. WEISS, 1959) auffassen. Äußere Einflüsse auf die Zelle, wie sie z. B. bei der Aggregation auftreten, bewirken nämlich

nicht nur eine rein physikalische Reaktion, sondern führen zu einer Veränderung des physiologischen Zustandes der Zelle (LEVINE u. Mitarb., 1965).

Das Verhalten von Fibroblasten und fibroblastartigen Zellen *in vitro* wurde von mehreren Autoren eingehend beschrieben (ABERCOMBIE, 1961; — und AMBROSE, 1958; — und HEAYSMAN, 1954a, b; — und HEAYSMAN und KARTHAUSER, 1957; AMBROSE, 1961; P. WEISS und GARBER, 1952). Über epitheliale Zellen fehlen entsprechende Untersuchungen. Zwar wurde mehrfach das Auswandern von Epithelzellen in Form geschlossener Zellrasen beobachtet und auch beschrieben (ADACHI und POLLAK, 1966; HITCHCOCK, 1939; OPFEL, 1913), TREVAN und ROBERTS (1960) weisen auch auf unterschiedliche Kohäsion von Epithelzellen unter verschiedenen Bedingungen hin, doch gibt es keine Untersuchung an epithelialen Zellen, die sich mit dem Zusammenhang morphodynamischer Veränderung und dem Adhäsionsverhalten auseinandersetzt. Ziel dieser Arbeit ist, unter Zeittransformation (Zeitraffung), die *Beziehungen* von *Bewegungsweise* und *Aggregationsfähigkeit* von Kaulquappenepidermiszellen *in vitro* an einigen Beispielen aufzuzeigen.

## B. Material und Methode

### I. Zucht und Präparation der Tiere

Untersucht wurden die Epidermiszellen der Larven von *Xenopus laevis* DAUD. Nach Behandlung mit Prolan (Bayer) laichten Frösche. Die Larven wurden bei Zimmertemperatur aufgezogen und mit einem Pulver aus getrocknetem Ei, Leber und Brennesseln ernährt.

Kaulquappen der Stadien 49 und 50 (n. NIEUWKOOP und FABER, 1956) wurden vor der Präparation einen Tag hungern gelassen und in sauberes, abgestandenes Leitungswasser umgesetzt. Die Schwänze der Tiere wurden nach 10 min langer Vorbehandlung mit hellroter Kaliumpermanganatlösung mit einer sterilen Schere hinter dem After abgeschnitten und in Steinberglösung gegeben, der Cibazol (0,1%) zugesetzt war. Für ausreichende Sterilität bei der Anzucht der Gewebe ist die Kaliumpermanganatvorbehandlung von großer Bedeutung. Der Schwanz darf nicht zu nahe am After abgeschnitten werden, da sonst Verunreinigungen in das Präparat gelangen.

Die Kultur der Schwänze erfolgte in Vielzweckkammern nach ROSE u. Mitarb. (1958). Eine solche Kammer besteht aus einer Silikongummiplatte mit einem Loch von 18 mm Durchmesser in der Mitte, das durch zwei Deckgläser verschlossen wird. Die Gummischeibe liegt zwischen zwei Platten aus rostfreiem Stahl, die miteinander verschraubt sind und so die beiden Deckgläser auf den Gummi pressen. Die Stahlplatten haben in ihrer Mitte eine Bohrung, die dem Loch in der Gummischeibe entspricht. Auf dem einen der beiden Deckgläser liegt das Explantat. Es wird mit einem etwa 10 mm breiten Streifen Visking Dialysierschlauch an die Unterlage gedrückt.

Die Kammern wurden mit einer Nährlösung aus gleichen Teilen Salzlösung nach STEINBERG (aus ANSEVIN, 1964) und Kälberserum gefüllt. Das Serum wurde erst nach 90 min langer Hämolyse des Blutes bei 37° abzentrifugiert. Es ist im Gegensatz zu dem nicht hämolysierten Blutes orangefarben. Abb. 1 zeigt einen Vergleich der Lichtdurchlässigkeit bei verschiedenen Wellenlängen von hämolysiertem (gestrichelte Linie) und von nicht hämolysiertem (durchgezogene Linie) Kälberserum. Der Unterschied ist bei 470 m $\mu$  am deutlichsten. Hier läßt gewöhnliches Serum 53% des Lichtes durch, vorbehandeltes nur 18,5%, — jeweils bezogen auf eine entsprechende, mit destilliertem Wasser gefüllte Küvette. Bei Werten über 600 m $\mu$  fallen die beiden Transparenzkurven zusammen. Der Gehalt an Lipiden ist bei hämolysiertem Serum von 14000 ppm auf 4500 ppm, an Kohlenhydraten von 550 ppm auf 422 ppm erniedrigt. Die Menge der Aminosäuren bleibt konstant.

Nur bei Zugabe hämolysierten Serums wandern die Epidermiszellen von den Schwänzen auf das Deckglas aus. Die Kulturlösung enthielt weiterhin 0,05% Cibazol und war mit Tris-hydroxy-methyl-amino-methan (Tris) und 1 N HCL auf pH 7,8 gepuffert. Diese Pufferung ist für die hier beschriebenen Versuche besonders geeignet, da Tris nicht mit Calcium interferiert.

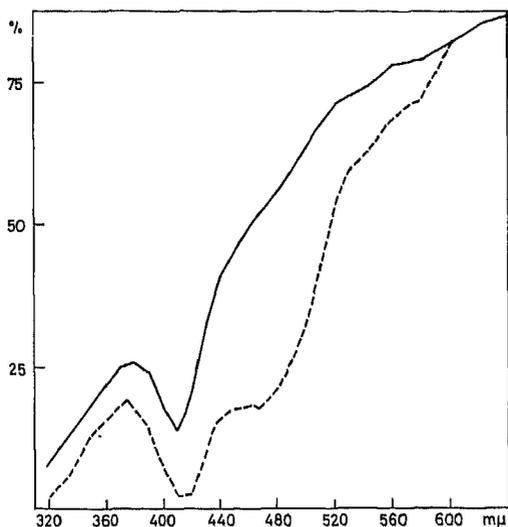


Abb. 1. Transparenz von Serum hämolytierten (---) und nicht hämolytierten (—) Kälberblutes

## II. Versuchsdurchführung

Bei 25°C—26°C ist das Auswandern der Zellen nach 36—48 Std beendet. Dann wurden die Versuche in serumfreiem Medium unternommen. Als isotonisch bezeichnete Lösungen sind auf 0,64 NaCl bezogen. Die osmotische Wirkung des p-Chlor-Quecksilber-Benzoes (PCMB) und des Trypsin wurden vernachlässigt, die D-Saccharoselösung war 7,49%ig. Beim Auflösen des PCMB ist darauf zu achten, daß das pH der Salzlösung bereits eingestellt ist, da bei Zugabe von Salzsäure das PCMB, selbst im alkalischen Bereich ausgefällt wird.

Für die Durchführung der Dissoziations- und Reaggregationsversuche erwiesen sich die Rose-Kammerchen als ungeeignet, da kein schneller und vollständiger Wechsel des Kulturmediums möglich ist. Daher wurden für die Versuche die Deckgläser auf einen gewöhnlichen Objektträger gebracht. Das Deckglas lag hierbei auf zwei 2 mm hohen, auf dem Objektträger im Abstand von 30 mm aufgeklebten Glasstreifen, die, um die Haftung des Deckglases daran zu erhöhen, mit Silikonfett bestrichen waren. Mit einer Rekordspritze kann die Flüssigkeit aus dem Zwischenraum von Deckglas und Objektträger leicht ausgesaugt bzw. in diesen eingespritzt werden, ohne die Lage des Präparates unter dem Mikroskop zu verändern. Die Verdunstung des Wassers kann bei kurzen Versuchszeiten vernachlässigt werden.

Die Streifen Dialysierschlauches wurden während vieler Versuche über den Zellen gelassen, um Strömungseinflüsse zu verringern. Es stellte sich jedoch heraus, daß diesen keine wesentliche Bedeutung zukommt, und so wurde, besonders bei den Versuchen mit Trypsin und PCMB, der Dialysierstreifen, der hier als Diffusionsschranke wirkt, weggelassen.

## III. Untersuchungsmethoden

Die meisten Versuche wurden wenigstens 5—7mal durchgeführt, um einen Überblick über die Streubreite der Ergebnisse zu erhalten. Das Bewegungsverhalten der Zellen wurde mit Hilfe des Mikrozeitrafferfilmes untersucht. Die phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer elektronisch gesteuerten Mikrozeitrafferapparatur (BERGERTER-HAHN, 1965) auf Agfa IFF bzw. Eastman Double X Film hergestellt. Es fanden Zeiss Neofluare und ein langbrennweitiger Phasenkontrastkondensator von Zeiss Verwendung.

Der Darstellung der beobachteten Vorgänge liegt eine Untersuchung des Laufbildes und eine Analyse der einzelnen Filmbilder („Teilbild-Analyse“) nach KÜHL (1942, 1949) zugrunde.

Zur genaueren Beurteilung der Lageverhältnisse der einzelnen Zellen zueinander wurden die Zellgrenzen durch ein einfaches Versilberungsverfahren, das sowohl an ganzen Schwänzen als auch an den Zellrasen auf dem Deckglas gute Resultate liefert, angefärbt. Das Objekt wird

1 min unfixiert mit 0,6%iger Silbernitratlösung behandelt und nach gründlichem Spülen mit destilliertem Wasser, mindestens 30 min mit einer hellen Lampe bestrahlt. Während dieser Zeit kann bereits im 4%igem Formol fixiert werden. Nach dieser Behandlung treten die Zellgrenzen deutlich hervor.

## C. Beobachtungen und Befunde

### I. Normalverhalten der Epidermiszellen *in vitro*

Für gutes Auswachsen der Epidermiszellen sind enger Kontakt des Gewebes mit dem Deckglas sowie Serum von hämolysiertem Blut erforderlich. Der Kontakt mit dem Substrat kann unter anderem durch Andrücken einer Agar-Agar-Schicht oder auch, wie hier angegeben, mit einem Streifen Dialysierschlauch geschehen. Die Bedeutung des direkten Kontaktes geht aus der Tatsache hervor, daß die Zellen meist vom dicken Mittelstück des Schwanzes herauswandern, also von der Stelle, die in engster Berührung mit der Unterlage steht. Ist der nötige Kontakt mit dem Deckglas vorhanden, so wandern die Zellen von allen Stellen des Schwanzes gleich gut aus. In dem erprobten Medium wird innerhalb von etwa zwei Tagen ein ein- bis zweischichtiger Zellrasen gebildet, der in der Anordnung der Zellen zum Deckglas hin der Lage zur „Basalmembran“ *in vivo* entspricht (nach PFLUGFELDER und SCHUBERT, 1965 handelt es sich hier nur um ein Basalmembranäquivalent). Die Epidermis der Kaulquappen der verwendeten Stadien ist ebenfalls zweischichtig (Abb. 2). Die äußere Zellschicht (Deckzellen) besteht aus sehr flachen, vorwiegend fünf- oder sechseckigen Zellen von etwa 40  $\mu$  Durchmesser. Das Plasma dieser Zellen ist sehr hyalin und zeigt im Phasenkontrast sowie nach Pappenheims panoptischer Färbung (aus ROMEIS, 1948) von Abstrichpräparaten nur schwache Granulierung. Die Kerne dieser Zellen sind groß, flach und an den Rändern oft gelappt und enthalten zwei Nucleoli. Die Zellengrenzen mit scharfen, im Leben stets glatten Rändern aneinander, die lichtmikroskopisch keinerlei Strukturierung wie z. B. Bizzozero-Knoten erkennen lassen. Elektronenmikroskopisch jedoch lassen sich Desmosomen nachweisen (PFLUGFELDER und SCHUBERT, 1965). Die Zellen der unteren Epidermisschicht (Basalzellen) haben etwa gleiche Größe und Form. Ihr Plasma enthält zahlreiche Organelle, z. B. Mitochondrien. Der Kern ist oval und meist glattrandig mit zwei Nucleolen. Die Zellgrenzen sind hier im ungestörten Zustand ebenfalls glatt und im Hellfeld im lebenden Tier nicht zu sehen, zeigen jedoch bei geringster Schädigung der Epidermis, etwa durch MS 222 (Sandoz), das zum Bestäuben der Tiere verwendet wird, reversible, bläschenförmige Auflösung, d. h. die Zellen hängen an einzelnen Haftstellen zusammen, während dazwischen der Zusammenhalt gelöst wird (vgl. Abb. 2d). Diese Zellen liegen der „Basalmembran“ auf. Eine Übersicht über die Lageverhältnisse der beiden Zellschichten geben Abb. 2a u. d.

Die Bildung der Zellrasen erfolgt allein durch Auswandern der Zellen und nicht durch Teilung. Mitosen sind bei Kulturen innerhalb der ersten 48 Std ebenso selten zu beobachten wie an gefärbten Schwänzen der verwendeten Entwicklungsstadien.

In der Gewebekultur haften Basalzellen am Deckglas, während die Deckzellen auch hier wieder den Abschluß gegen das umgebende Kulturmedium darstellen. Die ursprüngliche Anordnung der Zellen zueinander bleibt also erhalten. Deshalb ist es nötig, daß an der Stelle, an der das Auswandern beginnt, zunächst die basale Zellschicht nach außen kommt. Wie dies geschieht, konnte nicht beobachtet

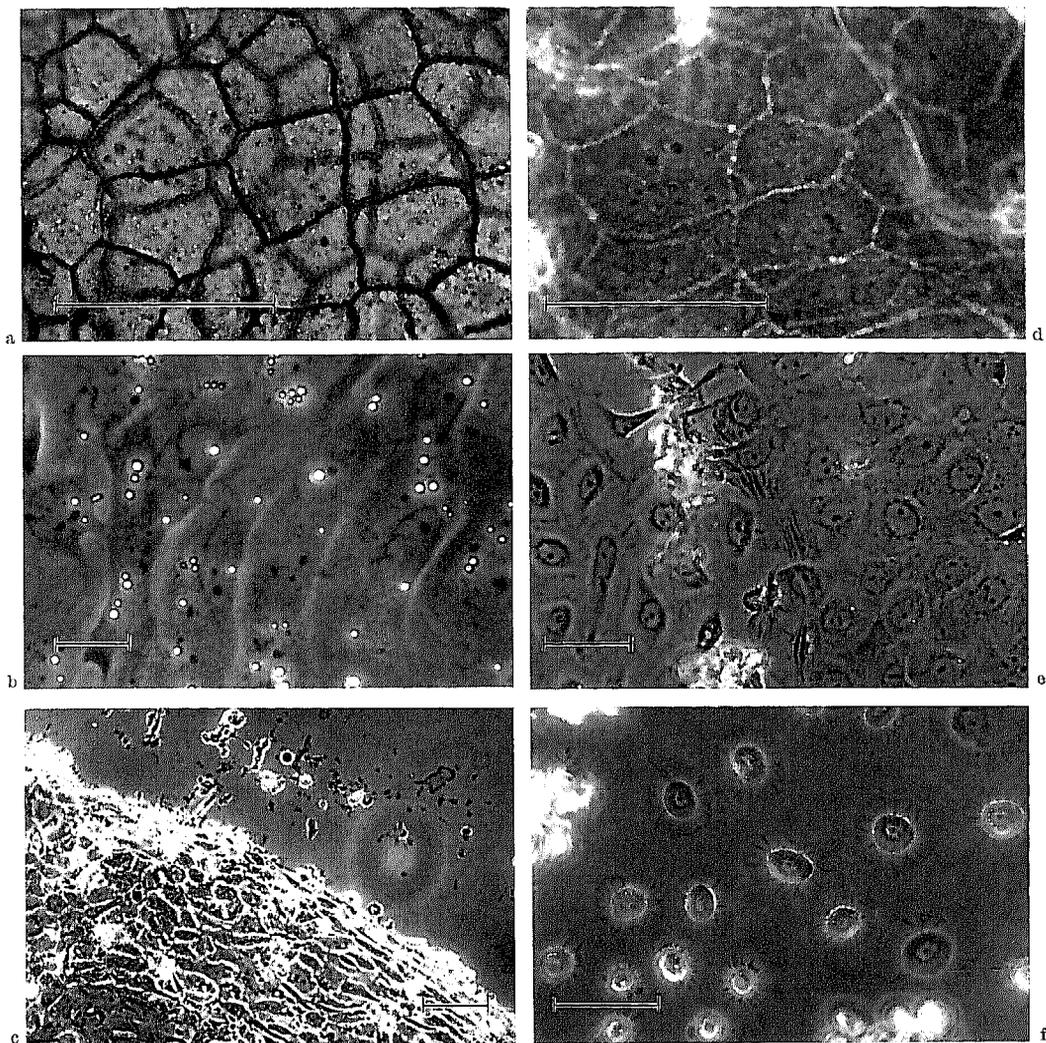


Abb. 2. a Versilberung der Epidermiszellgrenzen auf einem Kaulquappenschwanz. b Auswandernder Zellrasen. Wanderrichtung von rechts nach links. c Beginnende „Einrollung“ des Zellrasens in 2% igem Trypsin. Plasmanetze bleiben am Deckglas hängen. d Epidermiszellen auf dem Kaulquappenschwanz. Schädigung durch 10 min lange Einwirkung von 0,05% EDTA: Erweiterung der Interzellularräume. e Beginnende Dissoziation eines Zellrasens in EDTA. In der linken Hälfte bereits dissoziierte Zellen. Randzellen des Zellrasens stehen unter Spannung, sie führt zur „Einrollung“. f Mit EDTA dissoziierte Zellen mit radial gewellten Säumen unterschiedlicher Größe. Maßstab 50  $\mu$

werden. Eine derartige Polarität in der Anordnung von Zellen wurde von HITCHCOCK (1939) und BROWN (1939) für Amphibienepidermis, von WESSELS (1964) für Hühnenepidermis und von ADACHI und POLLAK (1966) für Kaninchen-Cornea-Epithel *in vitro* beschrieben.

Wenngleich das morphologische Erscheinungsbild der Epidermiszellen am Schwanz *in situ* und am Deckglas *in vitro* sich weitgehend entsprechen, so müssen doch wesentliche Veränderungen, wenigstens an der Membran der Zellen,

vor sich gehen. Am normalen, unfixierten Schwanz zeigt die Oberfläche der Deckzellen starke Esteraseaktivität. Die Reaktion wurde, nach PEARSE (1960) abgewandelt, mit Echtblausalz BB als Kupplungspartner und  $\alpha$ -Naphthylacetat als Substrat in Tris-gepufferter Ringerlösung vorgenommen. Bei einer Inkubationszeit von nur 1 min bei Zimmertemperatur zeichnet der schwarze Niederschlag scharf die Konturen der Deckzellen nach und die übrige Oberfläche ist schwach von granulärem Reaktionsprodukt bedeckt. Bei längerer Inkubationszeit wird der Niederschlag so dicht, daß keine Zellgrenzen mehr sichtbar sind. Die Durchführung des Nachweises sowie die Art der Reaktion entsprechen den von GROPP und HELLWEG (1959) für die Zelloberfläche verschiedener Zellkulturstämme beschriebenen.

Nach etwa einstündiger Einwirkung von serumhaltiger Kulturlösung auf die abgeschnittenen Schwänze ist keinerlei Enzymaktivität mehr festzustellen. An ausgewachsenen Zellrasen färben sich nur die Cytosomen (WEISSENFELS, 1962) deutlich schwarz.

Das Auswandern geschieht mit annähernd konstanter Geschwindigkeit (8—12  $\mu$ /min). Die Zellen am Rande eines Zellrasens zeigen nach der gewebe-freien Seite große, hyaline Säume, zu den benachbarten Zellen aber scharfe Grenzen. Bisweilen lösen sich einige der Randzellen aus dem Verband, sie werden dann spindelförmig (Abb. 8d, h; 10e). Ein einseitiger Saum von halbelliptischer Form ermöglicht die Fortbewegung der Zelle. Diese Bewegung verläuft meist bogenförmig und kommt durch quer über den Saum verlaufende Wellen zustande. Wandert eine Zelle geradlinig, so ist der breite Außenrand des Saumes die Vorderfront, und die Bewegungswellen verlaufen von dort nach der Zellmitte zu. Die Geschwindigkeit dieser Zellen kann bis zu 20  $\mu$ /min betragen. Die Bildung des Zellrasens erfolgt bei den Epidermiszellen nicht wie bei Fibroblastenkulturen, die als Folge anwachsender Populationsdichte eine geschlossene Zellfläche bilden, sondern hier wandern die Zellen bereits im Verband aus, in Form einer „Massenbewegung“ wie sie von OPPEL (1913) für Amphibienzellen und in neuerer Zeit z. B. von ADACHI und POLLAK (1966) für Cornea-Epithelzellen angegeben wurde. Diese Massenbewegung wird möglich, weil die Zellen auf der dem Explantat abgewandten Seite einen Saum ausbilden und dadurch das Aussehen der Wanderform annehmen. Das physiologische Hinterende ist deutlich gegen die nächstfolgende Zelle abgesetzt (Abb. 2b); trotzdem wandern sie als Zellverband.

Die Ausbildung der Säume innerhalb eines Zellrasens wird durch die Beobachtung verständlich, daß die ersten auswandernden Zellen infolge ihrer Bewegungsaktivität sich von ihrer Umgebung zu lösen vermögen; so könnte bereits eine Lockerung des Kontaktes zwischen zwei Zellen zur Ausbildung eines Saumes durch die nachfolgende führen, die dadurch zur Fortbewegung in Richtung des Saumes fähig ist. Dieses Prinzip läßt sich beliebig weit nach hinten fortsetzen. Im Mikrozeit-rafferfilm wird an einigen Stellen die Bewegung der Säume sichtbar. Die „Massenbewegung“ ist also ein fortwährendes „Nachlaufen“ der Zellen. Dieser Wandervorgang endet spätestens, wenn keine Epidermiszellen mehr dem Schwanz auf-liegen. Dies ist nach etwa 36—48 Std der Fall. Die Zellen nehmen dann wieder ihre ursprüngliche Form an und sind an allen Seiten deutlich gegeneinander ab-grenzt (Abb. 2d). Die Ursache für die Einstellung der Bewegung konnte nicht ermittelt werden. Die Deckzellen scheinen sich an der Bewegung nicht zu betei-

gen, die Zellgrenzen bleiben unverändert. Die Deckzellen werden also von den Basalzellen gleichsam mitgetragen. Häufig fehlen in den distalen Gebieten der Zellrasen die Deckzellen. Die Kulturen sind an diesen Stellen einschichtig.

Für Aussehen und Verhalten der Zellen in der Gewebekultur ist es gleichgültig, ob der explantierte Schwanz von einem Tier des Stadiums 48 oder 51 (NIEUWKOOP und FABER, 1956) stammt. Bei den jüngeren Stadien sind noch einige Dotterschollen in den Epidermiszellen zu finden (Abb. 2b); in den älteren treten oft in größerer Zahl Granula auf, die nach Aussehen und färberischen Eigenschaften Cytosomen (WEISSENFELS, 1962) sind. Die Größe der gebildeten Zellrasen ist sehr unterschiedlich, jedoch nicht vom Alter der Explantate abhängig.

Innerhalb von 30—60 min ändert sich das Verhalten der Zellen nicht, wenn das serumhaltige Kulturmedium durch Ringerlösung ersetzt wird. Bei längerer Einwirkung reiner Salzlösung zeigt das Plasma der Zellen starke Vakuolisierung. Diese Schädigung ist in Serumlösung reversibel. Oft erscheinen die Zellen nach 1 Std noch völlig normal, und Schädigungen sind erst nach 2 Std sichtbar. Die Cytosomen werden bei Serummangel abgebaut.

## II. Dissoziation der Zellrasen

Bei der Auflösung der Zellrasen in Einzelzellen (Dissoziation) ist eine möglichst schonende Behandlung der Zellen notwendig, wenn aus ihrem Verhalten noch sinnvolle Schlüsse gezogen werden sollen. Dies scheint durch Verwendung des Chelatbildners Versen (EDTA) gewährleistet. Dieser Stoff bindet zweiwertige Kationen, offenbar ohne die Zellen ernsthaft zu schädigen. Wird rechtzeitig wieder Calcium in ausreichender Menge zugegeben, so erholen sich die Zellen schnell. Da die Dissoziation auf dem Deckglas unter dem Mikroskop durchgeführt wird, ist dieser Vorgang kinematographisch zu verfolgen und die Wirkung der zur Reaggregation zugegebenen Lösung ist sofort zu erfassen. Die meisten Zellen bleiben selbst im Stadium des „Blubbern“ an der Unterseite des Deckglases hängen, so daß kein umgekehrtes Mikroskop benutzt werden muß. Allerdings werden beim Wechseln der Versuchslösung etliche Zellen abgespült.

Für die Durchführung der Reaggregationsversuche erwies sich als günstig, die Zellen zwar zu vereinzeln, aber die Dissoziation abubrechen, bevor ein Großteil der Zellen das „Blubberstadium“ erreicht hat (aus abgekugelten Zellen brechen optisch dichte „Lopobodien“ hervor und verschwinden wieder, während gleichzeitig an anderen Stellen neue Protrusionen entstehen). „Blubbern“ sie bereits, so sind sie unter einigen Bedingungen nicht zur Ausbreitung fähig, behalten aber ihre Säume, wenn sie sie noch nicht eingezogen hatten.

### 1. EDTA in Ringerlösung

Die Geschwindigkeit der Vereinzelnung der Zellen eines Zellrasens ist sehr von der Vorbehandlung abhängig. Wird die serumhaltige Kulturlösung bei der Übertragung des Deckglases auf den Versuchsobjektträger durch Ringerlösung ersetzt, so muß die Einwirkungszeit des EDTA bis zur ausreichenden Dissoziation wesentlich erhöht werden. Werden die Kulturen vor der Dissoziation etwa 10 min mit Ringerlösung vorbehandelt, so ist selbst mit 0,1 % igem EDTA keine Auflösung des Zellrasens mehr möglich. Wird dagegen die Serumlösung sofort durch 0,05 % ige Ca-freie EDTA-Ringerlösung ersetzt, so beginnt die Vereinzelnung der Zellen oft

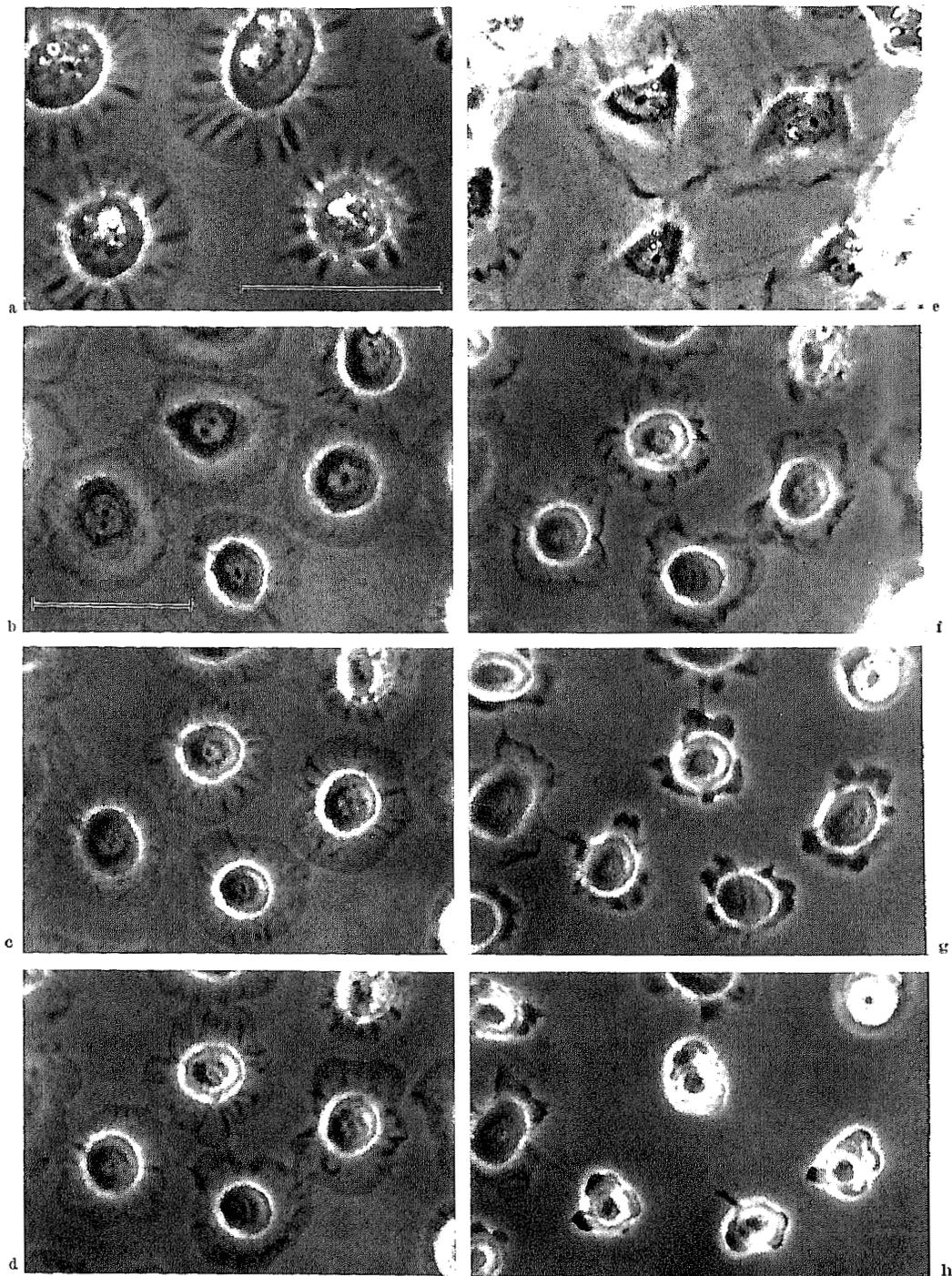


Abb. 3a—h. Morphologische Veränderungen der Zellen bei der Vereinzlung mit 0,05% EDTA. a und e: Gegenüberstellung der beiden Zelltypen. a Säume der Zellen radiär gefaltet. Bei der Zelle rechts unten sind einige Falten miteinander verschmolzen. e Hyaloplasmasäume der Zellen sind glatt und lappig. b—d und f—h Bildfolge aus

bereits nach 30 sec am Rande des Zellrasens. Je nach dem Voranschreiten dieses Vorganges wird die Behandlung nach 3—5 min beendet, oder wenn die Dissoziation durch vorhergegangene Einwirkung von Salzlösung verlangsamt ist, nach 8—12 min. Eine solche kurze Vorbehandlung ist für die weitere Versuchsdurchführung ohne feststellbare Folgen.

Zwei Typen der *Dissoziation*, die nebeneinander und gleichzeitig zu beobachten sind, lassen sich unterscheiden: bei der *ersten* wandern die Zellen vom Rande weg, die Trennung erfolgt also nur vom freien Rand des Zellrasens aus. Die Fähigkeit zur Ortsbewegung geht mit fortschreitender EDTA-Wirkung verloren. Beim *zweiten* Typ trennen sich die Zellen an allen Stellen der Kultur mehr oder weniger gleichzeitig voneinander, ohne daß dabei eine Ortsveränderung eintritt. Meist sind beide Möglichkeiten am gleichen Präparat zu beobachten. Die zweite Form tritt meist nur etwas später auf. Bei dieser Art der Vereinzelung ziehen sich die Zellen zusammen und die Verbindungen der Zellen untereinander reißen unter oft deutlichen Spannungen ab (Abb. 2e). Die Zellen bleiben daher bisweilen durch Plasmafäden miteinander in Verbindung (Abb. 3c, f, g). Als morphologische Veränderung tritt bei der Trennung der Zellen eine Sonderung in hyalines und granuläres Plasma auf, d. h. die granulären Bestandteile der Zelle werden um den Kern herum angesammelt. Diesen Plasmabezirk umgibt ein mehr oder weniger runder Hyaloplasmasaum, der meist von radiär angeordneten „Wellen“ durchzogen ist, in denen das Plasma ständig zentripetal zu strömen scheint, wie im Zeitraffer-Laufbild zu sehen ist (Abb. 2f, 3a, c). Die tangential Verlagerung der Wellen ist sehr geringfügig. Bei längerer Einwirkung des EDTA ziehen sich die Zellen immer weiter zusammen. Während zu Beginn des Vorganges der Zellkern noch sichtbar war (Abb. 3b), wird er jetzt durch immer stärker zusammengeballtes Granuloplasma verdeckt (Abb. 3b, c, d, e). Einige der Wellen verschmelzen miteinander (Abb. 3a, 2f); dann zieht sich die Zelle plötzlich schneller zusammen, und das Plasma bricht in Form breiter, optisch dichter Pseudopodien hervor (Abb. 3h, 4c, 16h). Diese „Lobopodien“ wandern häufig kreisförmig oder halbkreisförmig um die Zelle herum (HOLTFRETER, 1946: Cyclosis). Dieses „Kreiselblubbern“ kann direkt, ohne Zeitraffung, beobachtet werden. Zellen in diesem Stadium haften am Glas, verklumpen aber miteinander, wenn sie durch die Strömung des Mediums aneinandergetrieben werden.

In ein und demselben Präparat gibt es neben Zellen mit runden, radial gewellten Säumen auch solche, die nach kurzer EDTA-Einwirkung flach ausgebreitet sind (Abb. 3b, 16a), deren Säume nach längerem Einfluß von EDTA sich stark bewegen und umschlagen oder auch über ihre gesamte Breite unregelmäßige Faltungen zeigen (Abb. 3e). Bei diesen Zellen tritt bisweilen auch Pinocytose auf. Es könnte sich bei diesen beiden Zellformen um Unterschiede zwischen Deck- und Basalzellen handeln; Übergänge sind möglich (Abb. 3b, c, d). Im „Blubberstadium“ sind keine Unterschiede mehr feststellbar.

Lösen sich Zellen vom Rande der Kultur los, so handelt es sich in den meisten Fällen um solche der Basalschicht. Den Deckzellen wird dadurch ihr Substrat entzogen, was sie zur Kontraktion veranlaßt. Diese Zellschicht löst sich hierbei

einem Mikrozeitrafferfilm. b 10 min 40 sec, c 12 min 20 sec, d 14 min, f 14 min 40 sec, g 16 min 20 sec, h 18 min 40 sec nach Zugabe von EDTA in Ca-freier Ringerlösung. Abb. c und d zeigen leicht radiär gefaltete Hyaloplasmasäume, die dann lappig werden (f und g). Maßstab 83  $\mu$  in b für b—d und f—h, in a für a und e

immer mehr von der darunterliegenden, ohne daß dabei der Zusammenhalt der Deckzellen untereinander gelöst wird. Nur an Stellen besonders starker Spannung reißen die Zellen an ihren Grenzen auseinander. Die losgelösten Zellen bleiben in Klumpen aneinander hängen (Abb. 2e, 9h). Diese „Einrollung“ des Zellrasens erfaßt nicht nur die Deckzellen, sondern auch etliche Basalzellen.

Wird das EDTA isotonischer Saccharose-Lösung zugesetzt, hat diese keinen Einfluß auf das Dissoziationsverhalten der Zellen. Lediglich die Säume der Zellen erscheinen klarer, mit schärfer ausgeprägten Radiärwellen; die „blubbernden“ Zellen bleiben, wenn sie durch Strömung auseinandergespült werden, stärker aneinander haften und bilden dann größere Klumpen.

## 2. Dissoziation mit Trypsin

Durch Ca-freie Ringerlösung, die 2% Trypsin (Merck) enthält, lassen sich die Zellrasen nicht in Einzelzellen auflösen. Auch bei Zusatz der üblichen Menge EDTA

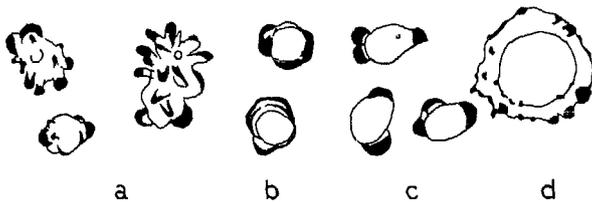


Abb. 4a—d. Verschiedene Formen des „Blubbers“ bei Kaulquappenepidermiszellen. a In Trypsin, b In EDTA-Ringerlösung, c In PCMB, d In Ringerlösung, in der das Calcium durch Magnesium ersetzt wurde

(0,05%) löst sich nur der Zellrasen als Ganzes vom Deckglas (Abb. 2c). Die Ablösung der Zellschicht vom Deckglas entspricht genau dem auch bei Dissoziation in EDTA beobachteten „Einrollen“, nur werden bei Gegenwart von Trypsin alle Zellen von diesem Vorgang erfaßt. Es bleiben dabei oft Plasmafetzen am Deckglas hängen, die noch einige Minuten unter Zeitraffung sichtbare Bewegungen ausführen. Vor der Behandlung bereits aus dem Verband gelöste Zellen „blubbern“ unter Trypsineinwirkung mit zahlreichen kleinen, oft fingerförmigen Protrusionen (Abb. 4a, 13g). Die Zellen nehmen hierbei nicht immer Kugelgestalt an, sondern bleiben oft länglich und der ganze Zell-Leib windet und krümmt sich. In diesem Stadium neigen die Zellen stark zu Verklumpung.

## III. Reaggregation der Zellen

Wie in der Einleitung bereits dargelegt wurde, spielen Zellbewegungen für die Bildung von Zellverbänden eine wichtige Rolle. Bei den hier beschriebenen Reaggregationsversuchen werden verschiedene Faktoren (wie z. B. das pH der Lösung, ihre Ionenstärke oder der Energiehaushalt der Zellen) verändert, deren Einfluß auf die Reaggregationsfähigkeit oder die Bewegungsweise von Zellen bekannt ist. Mit Hilfe des Mikrozeitrafferfilmes lassen sich aus dem Bewegungsverhalten der Zellen Schlüsse über die mögliche Wirkungsweise der einzelnen Faktoren ziehen. Elektrophysiologische Methoden, die bei der Klärung der Frage nach der Steuerung von Zellbewegungen sinnvoll mitwirken könnten, sind wegen der geringen Größe des Objektes nicht anwendbar.

## 1. Reaggregation in Ringerlösung

a) *Ausbreiten der Zellen.* In EDTA sind die runden Säume der Zellen, wie bereits beschrieben, meist deutlich radiär gefaltet (Abb. 2f, 3a); andere Zellen haben ihre Säume eingezogen und „blubbern“ (Abb. 3h, 4b). Durch Zugabe von Ringerlösung (0,02%  $\text{CaCl}_2$ ) ändert sich in kurzer Zeit das Bild vollständig. In etwa 20—90 sec werden die Säume glatt oder bleiben nur noch leicht gewellt (Abb. 10a—d), was jedoch nicht mit der scharfen radiären Faltung in EDTA verglichen werden kann. Sie nehmen an Flächenausdehnung bedeutend zu, und viele der zunächst die ganze Zelle umgebenden Säume werden auf einer Seite

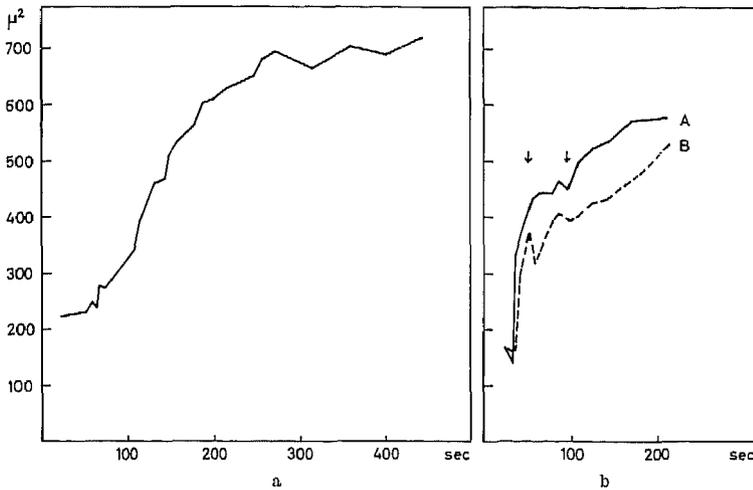


Abb. 5a u. b. Ausbreiten der Kaulquappen-Epidermiszellen in Ringerlösung nach EDTA-Dissoziation. b In dem durch die Pfeile gekennzeichneten Zeitabschnitt treten Überlappung der Hyaloplasmasäume der Zellen A und B auf

eingezogen, was zur Bildung der „Wanderzellen“ führt. (z. B. Abb. 10d). Das „Blubbern“ geht kontinuierlich in das Ausbreiten des Saumes über. Die Flächenausbreitung erfolgt gleichmäßig (Abb. 5a), nicht stufenweise, wie P. WEISS (1958) für Fibroblasten angibt. Die Kurven der Flächenzunahme steigen zunächst fast linear und werden dann immer flacher. Es wird nicht nur ein zunächst fast runder Saum gebildet, sondern auch das Granuloplasma ist nicht mehr so dicht geballt. Der Zellkern wird wieder sichtbar (vgl. Abb. 10a mit d). Gleichzeitig flachen sich die Zellen ab, wie dies sehr eindrucksvoll für menschliche Konjunktiva-Zellen von A. C. TAYLOR (1961) gezeigt wurde.

Gewöhnlich liegen die dissoziierten Zellen so nahe beieinander, daß sie sich beim Ausbreiten berühren. Dies führt zu einer Kontraktion des Saumes, wodurch der kontinuierliche Verlauf der Flächenzunahme gestört wird (Abb. 5b). Diese Kontaktretrektion kommt nicht sofort zur Auswirkung, sondern es treten oft vorher Überlappungen der Säume auf.

Während des durch die beiden Pfeile (Abb. 5b) bezeichneten Zeitabschnittes überlappen sich die Zellen. Der linke Pfeil bezeichnet das Auftreten einer starken Überschneidung der beiden Säume; sie wird durch Einziehen des Saumes der Zelle B an dieser Stelle aufgehoben. Zelle A reagiert schwächer; sie verlangsamt

zunächst nur das Ausbreiten ihres Saumes, das dann zum Stillstand kommt. Inzwischen haben sich die beiden Zellen voneinander getrennt, sie breiten sich wieder aus, berühren sich daher erneut, was zu nochmaligem Einziehen der Säume an der Berührungsstelle führt (rechter Pfeil). Die Zelle B wandert jetzt fort; die Zellen können sich weiterhin ungestört ausbreiten.

Dieser deutliche Einfluß der Berührung zweier Zellen auf die gesamte Flächen-

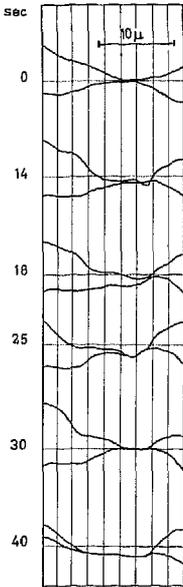


Abb. 6. Reaktion zweier Zellen bei gegenseitiger Berührung. Darstellung der Kontaktzonen. Die waagerechte Hilfslinie bei 0 sec liegt genau zwischen den beiden Zellen bei der ersten Berührung. Bei 40 sec sind die Zellen über einen größeren Abschnitt in engem Kontakt. Die waagerechten und die senkrechten Hilfslinien stellen das Bezugssystem für die Verlagerungen der Zellgrenzen dar

der Saum einer Zelle an der Berührungsstelle weit eingezogen werden, so daß eine tiefe konkave Einbuchtung entsteht, in die sich das „Pseudopodium“ der gegenüberliegenden Zelle hineinschiebt. Auch können die beiden Säume wechselweise in sehr kleinen Flächenbereichen an der Berührungsfrent vorgestreckt und wieder zurückgezogen werden (Abb. 6). Abb. 6 zeigt die Grenzen zweier Zellen im Berührungsbereich. An den Figuren 14 sec—18 sec ist deutlich zu sehen, wie das Aufeinandertreffen der beiden Säume an den Kontaktstellen zunächst zu einer lokalen Kontraktion führt. Die drei unteren Diagramme veranschaulichen die schnelle Erweiterung der Kohäsionszone, in der die wellenförmige Randbewegung der Säume zum Stillstand kommt. Diese Kontaktzone ist im Phasenkontrast als scharfe Zellgrenze sichtbar (Abb. 7 a, b, e, f). In diesem

Reaktionen entsprechend geringer (Abb. 6). Bei schnell wandernden Zellen ist die Kontaktretraktion besonders stark, jedoch nur bei einer der berührenden Zellen, so daß im Zeitrafferfilm der Eindruck entsteht, als „rollten“ die Zellen aneinander ab.

Die frisch ausgebreiteten Zellen zeigen entweder runde oder halb elliptische, einseitige Säume (Wanderform) oder je einen Saum an den beiden Enden, die sich nur von der Stelle bewegen können, wenn einer der beiden Säume deutlich größer ist als der andere.

*Verklumpte* Zellen erholen sich in Ringerlösung nicht mehr. Bisweilen sind auch *einzelne* „Blubberzellen“ noch nach 20 min zu finden, obwohl die meisten anderen Zellen bereits Aggregate gebildet haben. Manche Zellen, die bereits Säume ausgebreitet haben, ziehen diese ohne zunächst erkennbare Ursache wieder ein und beginnen zu „blubbern“. A. C. TAYLOR (1961) führt ein derartiges Verhalten auf Degeneration infolge Serummangels zurück.

*b) Reaggregation der Zellen.* Bei Zellen mit rundem Plasmasaum, die zu keiner Fortbewegung fähig und optimal ausgebreitet sind, verhindert die Kontaktretraktion die Bildung einer dauernden Berührungszone. Liegen zwei Zellen näher zusammen oder bewegen sie sich aufeinander zu — die Bewegungsrichtung ist stets zufällig (KUHLE, 1937), wie die Laufbilduntersuchung von Mikrozeitrafferfilmen zeigt, liegt hier keine Chemotaxis oder dgl. vor — kann beispielsweise

Bereich ist die Kontakthemmung voll wirksam. Im Zeitrafferfilm sind bei einer Raffung auf  $1/_{24}$  keine Bewegungen der Zellgrenzen und keine Überlappung mehr zu sehen. Die vorher deutliche Trennung in hyalinen Plasmasaum und Granuloplasma wird aufgehoben. Da die Säume entlang der Berührungsfront oft eingezogen werden, kann die Grenzlinie im Phasenkontrastbild durch „Halo“ verdeckt sein (Abb. 9d).

Dieser Zustand soll als „*Stabilisierter Kontakt*“ bezeichnet werden. Entsprechend wird der Begriff „stabilisiertes Aggregat“ gebraucht. Solche stabilisierte Aggregate sind in Ca-haltiger Ringerlösung frühestens 10 min nach deren Zugabe zu beobachten.

Die einzelnen Bezirke einer Zelle verhalten sich hinsichtlich der Stabilisierung der Kontakte völlig unabhängig voneinander. Eine Zelle kann also an einer Stelle bereits eine deutliche Grenzlinie zur Nachbarzelle ausgebildet haben und an einer anderen Stelle den Saum überlappen (Abb. 7a, e).

c) *Einfluß des pH-Wertes auf die Reaggregation.* Die Versuche wurden gewöhnlich bei pH 7,8, dem pH der Kulturlösung durchgeführt. Da nach einigen Autoren (BANGHAM und PETHICA, 1960; CURTIS, 1957, 1962 u. a.; KUCHLER u. Mitarb., 1960; STEINBERG, 1958) die Ladung der Zellmembran für deren Adhäsivität von ausschlaggebender Bedeutung ist, erschien es sinnvoll, das Verhalten der Zellen auch bei niedrigem pH zu untersuchen. Da die für diesen pH-Bereich in Frage kommenden Pufferlösungen alle einen Einfluß auf das Verhalten der Zellen ausüben, mußten ungepufferte Lösungen verwendet werden. Den hier zitierten Werten liegen Messungen zugrunde, die *nach* der Durchführung des Versuches vorgenommen wurden, da Rückstände auf pH 7,8 gepufferter EDTA-Lösung stets das pH der Versuchslösung um etwa 0,7 heraufsetzen. Der Einheitlichkeit der Versuchsbedingungen wegen wurde auch dieser Ringerlösung Tris zugesetzt, das in niederen pH-Bereichen keinerlei Pufferwirkungen mehr aufweist. Zur Einstellung des pH diente 1 N HCl.

Noch bei pH 4,3—4,7 tritt normale Reaggregation ein. Auch hier sind bereits nach 15 min stabilisierte Kontakte zu beobachten. Zellen im „Blubberstadium“ bilden Säume aus, radiär gefaltete Säume werden glatt oder schwach gewellt.

Bei pH 3,4 hört nach kurzer Zeit das vorher lebhaftes „Blubbern“ auf. Diese Zellen sind dann abgekugelt und lagern sich häufig zu Klumpen zusammen. Die Säume der Zellen werden sehr kontrastarm, glatt und erscheinen im Zeitrafferfilm als ob sie völlig flach an das Deckglas gedrückt wären (Abb. 7g). Bei einer Raffung auf  $1/_{32}$  zeigen sie nur am Rande eine sehr schwache Plasmabewegung; es tritt jedoch keine Ortsveränderung ein. Unter diesen Bedingungen findet *keine Reaggregation* mehr statt, die Adhäsivität an Glas ist dagegen nicht aufgehoben, vielmehr entsteht bei der Betrachtung des Zeitraffer-Filmes der Eindruck, als sei sie verstärkt. In einem Versuch wurde nach 15 min langer Einwirkung von Ringerlösung pH 3,5, das pH auf 7,8 erhöht. 7 min später hatten ca. 90% der Zellen leicht gewellte, kontrastreiche Säume. Es wurden jedoch nur wenige Aggregate gebildet.

## 2. Einfluß zweiwertiger Kationen auf die Reaggregation der Zellen

a) *Calcium.* Das Vorhandensein zweiwertiger Ionen, besonders des Calciums, gilt als wesentliche Voraussetzung für die Bildung eines Zellverbandes (COMAN,

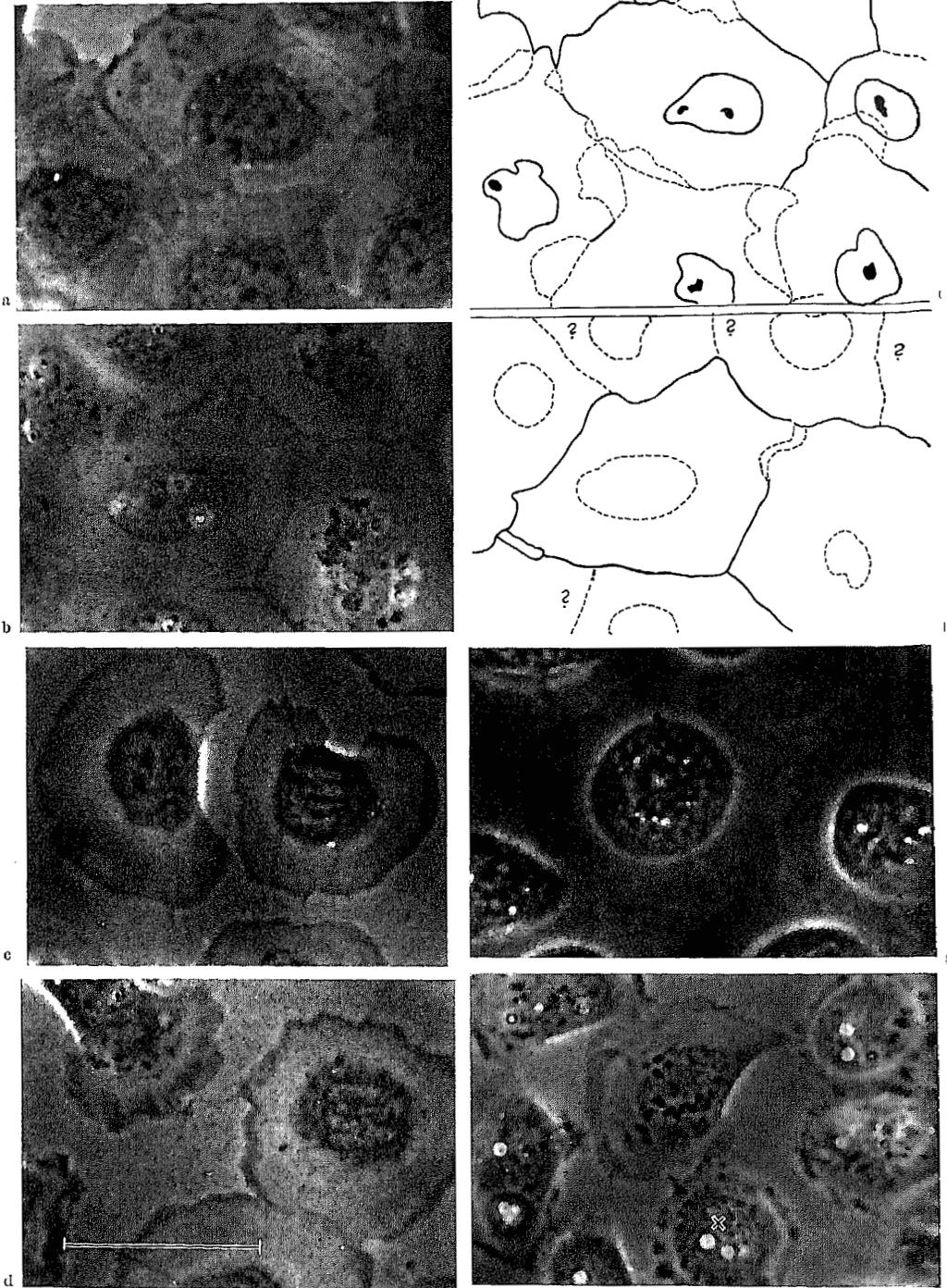


Abb. 7a—b. Teilbilder aus Mikrozeitrafferfilmen. a Reaggregat 15 min in Ca-haltiger Ringerlösung. Die Zellgrenzen sind nur an wenigen Stellen stabilisiert; Schema c. Die gestrichelten Linien bezeichnen Überlappungen und noch nicht stabilisierte Grenzbezirke. b Anderes Reaggregat 37 min lange Einwirkung von Ca-Ringerlösung. Zell-

1954; CURTIS, 1957, 1960; PETHICA, 1961; STEINBERG, 1958). Bei den meisten der hier beschriebenen Versuche enthielt die Salzlösung keine Magnesium-Ionen. Für die Reaggregation der Epidermiszellen genügt also im Außenmedium die Anwesenheit von Calcium. Es stand den Zellen als Chlorid in der Konzentration von 0,02% (0,0018 M) zur Verfügung. Diese Konzentration entspricht etwa einem Zehntel der Ca-Konzentration im Froschblut. Das Aggregationsverhalten unter dieser Bedingung wurde im vorhergehenden Kapitel ausführlich besprochen.

Bei noch geringerer  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration (0,0009 M) lagern sich zwar noch viele Zellen zusammen, doch werden die Säume nicht mehr völlig eingezogen und die Kontakte nicht mehr stabilisiert. Da die meisten Zellen unter dieser Bedingung nur an einer Seite einen hyalinen Saum aufweisen, ähneln die neu gebildeten Zellverbände in Aussehen und Verhalten einem auswachsenden Zellrasen.

b) *Magnesium*. Nach CURTIS (1962), DAN (1947) und STEINBERG (1958) ist Calcium bis zu einem gewissen Grad durch andere zweiwertige Ionen ersetzbar. Wegen der hohen Toxizität der meisten in Frage kommenden Ionen wurde hier nur Magnesium auf seine Wirkung hin untersucht. Es wurde in Ca-freier Ringerlösung als Chlorid 0,0018 M zugesetzt. Zunächst entspricht die Wirkung der des Calciums. Die im EDTA strahlig gewellten Säume werden meist wieder glatt, die „blubbernden“ Zellen breiten wieder Säume aus und nach etwa 12 min haben sich größere Zellverbände gebildet. Diese Zellverbände zeigen jedoch keine stabilisierten Grenzen; die starke Plasmabewegung am Zellrand bleibt erhalten (vgl. Abb. 8d, h u. Abb. 7b). Diese Bewegung äußert sich nicht so sehr in einer Veränderung der Umrißlinie, sondern in einer Plasmabewegung in der Randzone, die nur beim Betrachten des Mikrozeitraffer-Laufbildes und nicht durch Vergleichen von Teilbildern zu erfassen ist. Überhaupt scheint die Plasmabewegung — nicht die Ortsbewegung — lebhafter als in Ca-haltiger Salzlösung. Die Granulen des zentralen Plasmabezirkes sind miteinander verklumpt. Wird nur das EDTA nach der Dissoziation der Zellen entfernt und durch Ca-freie Ringerlösung ersetzt, so werden die Säume sofort glatt und völlig homogen, meist sind sie auf eine Zelleseite beschränkt (Abb. 7c).

Das Glätten der Säume nach EDTA in Mg-Ringer ist nur von kurzer Dauer, bald werden sie breit gewellt, und in der äußersten Randzone „wedelt“ der Plasmasaum in die Salzlösung hinein. Bei vielen Zellen treten, wenn bereits ein deutlicher Saum ausgebreitet wurde, wieder Protrusionen hervor, so daß Zellen entstehen, die „blubbern“, obwohl sie einen typischen Saum besitzen (Abb. 7h, 4d). Die Protrusionen gehen oft auch durch Verdichtungen von Wellen aus dem Saum hervor. Die Plasmaviskosität ist offenbar gegenüber der in Ca-haltiger Lösung stark erniedrigt. Die Kontaktretraktion ist sehr deutlich, die Zellen überlappen sich höchstens in der Breite der äußersten dunkleren, stark bewegten Plasmazone. Bei der Aggregation wird die Saumbreite verringert, doch werden die Säume nicht ganz eingezogen. Die *Randbewegung* wird nicht gehemmt. Die Aggregate ähneln auswandernden Zellrasen (vgl. Abb. 8d, h u. Abb. 7b).

grenzen größtenteils stabilisiert; Schema f. Undeutliche Zellgrenzen mit ? gekennzeichnet. e Mit EDTA dissoziierte Zellen in Ca-freier Ringerlösung ohne EDTA. d Dieselben Zellen seit 5 min in Ca-haltiger Ringerlösung. g EDTA-dissoziierte Zellen seit 5 min in Ca-haltiger Ringerlösung pH 3,5. h EDTA-dissoziierte Zellen seit 30 min in Ringerlösung, die statt Calcium Magnesium enthält. Eine Zelle (x) zeigt kleine Protuberanzen am Hyaloplasmasaum. Maßstab 33  $\mu$ .

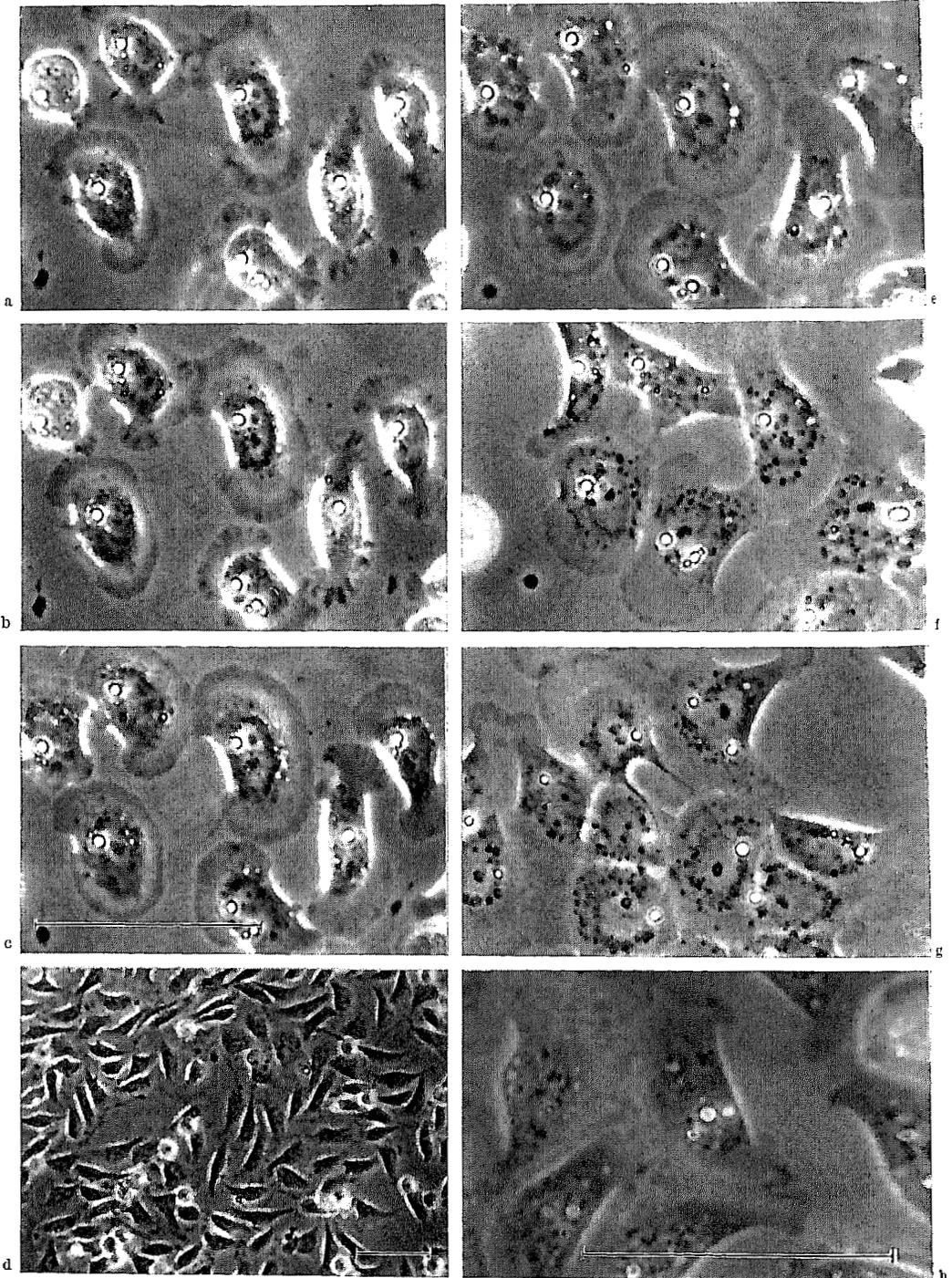


Abb. 8a—h. Einzelbilder aus Mikrozeitrafferfilmen. a—c, e—g Glattwerden der Hyaloplasmasäume in EDTA-KCl-Lösung dissoziierter Zellen und deren Reaggregation bei Gegenwart von 0,02%  $\text{CaCl}_2$ . a 15 sec, b 45 sec,

### 3. Einfluß einwertiger Kationen auf die Reaggregation der Zellen

Im Gegensatz zur Bedeutung zweiwertiger Kationen für die Bildung von Zellaggregaten, ist über die der einwertigen noch wenig gearbeitet worden (CURTIS, 1962).

Die Natrium- und Kalium-freien Lösungen enthielten 0,02%  $\text{CaCl}_2$ . Die Isotonie wurde, soweit notwendig, mit D-Saccharose eingestellt. Zur Pufferung wurde wie üblich Tris/HCl-Puffer benutzt. Bereits die Dissoziation wurde mit Na-K-freien Lösungen durchgeführt.

In 0,02% iger  $\text{CaCl}_2$ -Saccharoselösung tritt keine Reaggregation ein, es werden auch keine Säume ausgebreitet, sondern die Bewegung der Zellen hört nach kurzer Zeit (etwa 5 min) auf. Die Salzlösungen für die folgenden Reaggregationsversuche enthalten Calcium alle in dieser Konzentration.

In isotonischer wie in verdünnter KCl-Lösung weisen die Zellen ein sehr charakteristisches Aussehen auf. Die Zellsäume und das Grundplasma sind hyalin, klar, und die Granula des zentralen Plasmabezirkes sind miteinander verklumpt (Abb. 8e—f). Dies entspricht den Feststellungen von BLASIUS (1962) an Blutzellen von *Anodonta cygnea*. In isotonischer KCl-Lösung mit 0,05% EDTA sind die Säume radiär, schmal gewellt oder am Rande lappig (Abb. 8a). Diese Wellen glätten sich nach Zugabe von Ca-haltiger isotonischer Kaliumlösung innerhalb einer Minute (Abb. 8a—c). Die Säume breiten sich aus, und es werden Aggregate gebildet (Abb. 8e—f). Geringe Ortsbewegung ist möglich.

0,33 molare KCl-Lösung mit  $\text{Ca}^{++}$  ermöglicht den Zellen immer noch das Ausbreiten der Säume und die Zusammenlagerung zu einzelnen kleinen Aggregaten, doch müssen die Zellen dicht beieinander liegen, da sie zu keiner Fortbewegung fähig sind. Die Bewegungsunfähigkeit beruht hier nicht auf mangelnder Adhäsion an der Unterlage, sondern auf zu geringer Plasmabewegung; der Saum kann nicht in Falten gelegt werden. Die Zellränder sind häufig ausgebuchtet. Dies scheint die Grenzkonzentration zu sein, bei der noch Reaggregation in geringem Maße möglich ist. In einer weiteren Versuchsreihe konnte bei dieser Salzkonzentration keine Zusammenlagerung von Zellen mehr festgestellt werden.

Entsprechende Versuche mit Kalium-freier, isotonischer und verdünnter NaCl-Lösung ergaben grundsätzlich die gleichen Ergebnisse: In Ca-haltiger isotonischer NaCl-Lösung tritt im normalen Zeitraum Reaggregation ein (Abb. 9a—d). Die Säume sind jedoch nicht so klar wie bei Kalium-Einfluß. Sie sind glatt oder leicht gewellt mit kleinen dunklen „Flecken“, die ihnen ein „schmutziges“ Aussehen verleihen. Sie zeigen am Rand unter Zeitraffung wellende Bewegung, die jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt ist wie bei Trypsinbehandlung. Die Inhomogenität der Säume nimmt bei längerer Einwirkung der Kochsalzlösung zu (vgl. Abb. 9a mit 9f).

Noch in 0,33 molarer NaCl-Lösung können „blubbernde“ Zellen innerhalb von 10 min, also etwas verlangsamt, Säume ausbreiten, die sich nur wenig im Aussehen von denen in isotonischer Kochsalzlösung unterscheiden. Sie sind am Rande stärker eingebuchtet (Abb. 9e—h). Es lagern sich etwa 50% aller einzelnen Zellen zu kleinen Aggregaten zusammen (Abb. 9h). Ortsveränderung

c 3 min 45 sec, e 9 min, f 16 min, g 20 min (andere Stelle als a—c und e—f) nach Zugabe von  $\text{CaCl}_2$ -KCl-Lösung. d Übersicht über ein Reaggregat in Ca-freier, Magnesium-haltiger Ringerlösung: Die Zellen bleiben meist spindelförmig. g 22 min nach Zugabe von Mg-Lösung. Es werden keine stabilisierten Kontakte ausgebildet. Maßstab 50  $\mu$

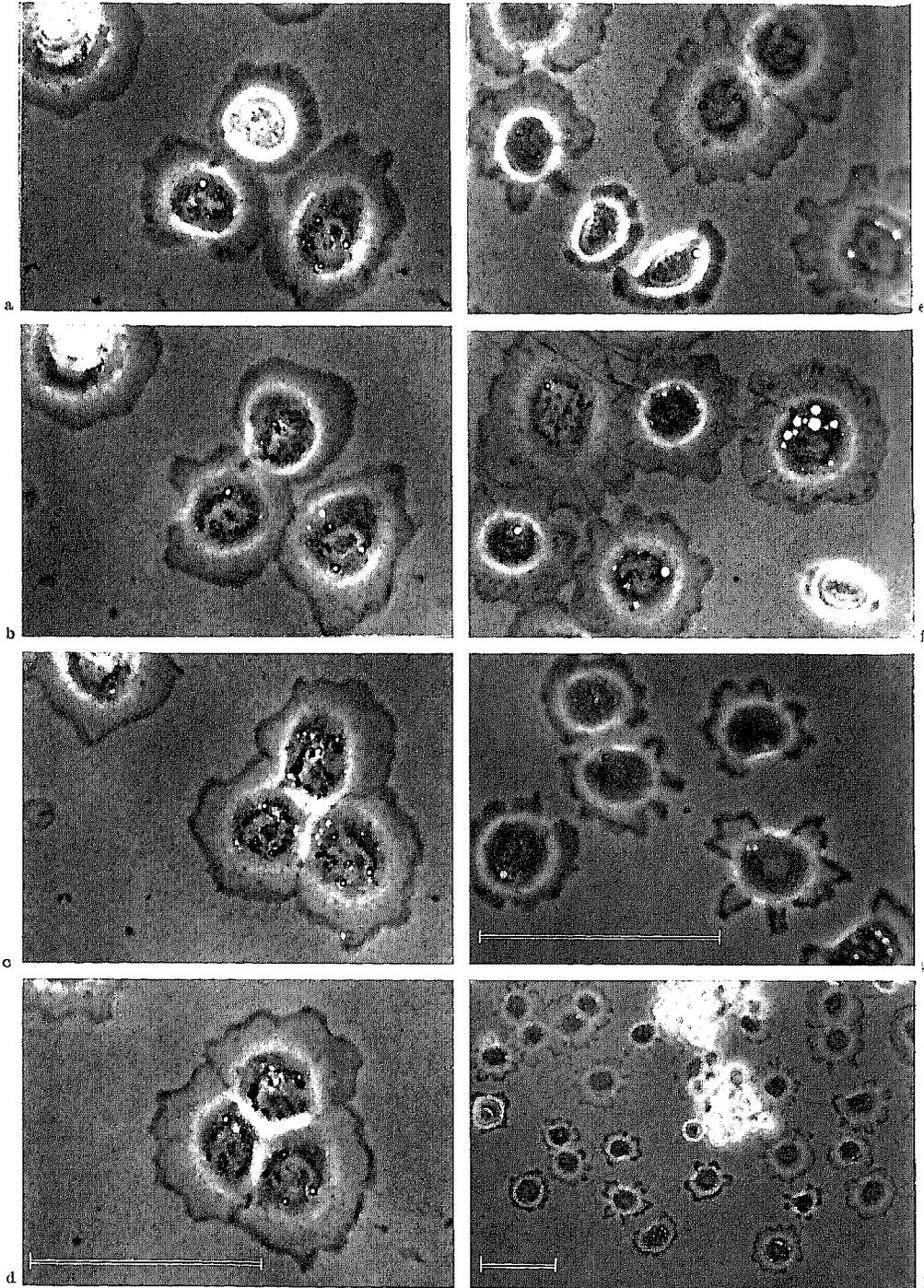


Abb. 9a—d. Ausbreiten der Säume und Reaggregation in isotonomer NaCl-Lösung (0,02% CaCl<sub>2</sub>). Vier Teilbilder aus einem Mikrozeitrafferfilm. a 2 min 17 sec, b 3 min 34 sec, c 13 min, d 15 min 18 sec nach Zugabe der NaCl-Lösung: Reaggregation beendet. e—h Dissoziierte Zellen in verdünnter (3:7 mit isotonomer Saccharose-

ist nicht möglich. Zugabe von Ringerlösung führt zu einer Verbreiterung der Säume. Die Zellen können sich dann auch fortbewegen. Überlappungen werden nicht beobachtet. Bei noch geringerer NaCl-Konzentration (0,11 M) werden noch Säume ausgebildet, doch tritt keine Reaggregation mehr ein.

Auch bei Fehlen von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  in isotonischer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung tritt ordentliche Reaggregation ein. Die Säume der Zellen werden auch hier in der Berührungszone eingezogen. Häufig kontrahiert sich eine Zelle ohne ersichtlichen Grund, was meist zur Folge hat, daß die angrenzende Zelle sich ebenfalls zusammenzieht. Solches Verhalten ist aber auch unter sehr verschiedenen anderen Bedingungen zu beobachten.

#### 4. Störung der Energieversorgung reaggregierender Epidermiszellen

Sowohl für die Bewegung als auch für die Aufrechterhaltung einer bestimmten Zellform ist Energie notwendig (LETTRE und SCHLEICH, 1954). Es liegt daher nahe, Folgen einer Unterbrechung dieser Energiezufuhr für das Verhalten dissoziierter Epidermiszellen zu untersuchen.

a) *Hemmung der ATP-ase.* Die Spaltung von ATP läßt sich z.B. durch  $2,5 \times 10^{-3}$  M p-Chlor-Mercurium-Benzoat (PCMB) reversibel hemmen; Fluorid wirkt spezifischer auf die ATP-ase, interferiert jedoch auch mit Calcium. Wird der Hemmstoff den Kulturen in dieser oder einer niedrigeren Konzentration zugegeben, so wird er zunächst die ATP-ase-Aktivität an der Zellmembran und in dem direkt darunterliegenden Plasmabezirk hemmen, den Gebieten, die in erster Linie für das Verhalten einer Zelle anderen Zellen gegenüber verantwortlich sein dürften.

Während der ersten 5—10 min ist keinerlei Wirkung des PCMB festzustellen. Die Zellen breiten sehr schnell wieder ihre Säume aus (Abb. 10 a—d). Die vorher welligen Säume glätten sich und die Zellgrenzen in den Zusammenlagerungen werden an einigen Stellen bereits deutlich. Spätestens jedoch nach 10 min nimmt die Bewegung der Zellränder zu. Die vorher scharfen Grenzen werden undeutlich und die frisch gebildeten Aggregate häufig wieder aufgelöst. Die Dissoziation geschieht entweder durch *Abwandern* der Zellen, oder durch teilweises *Einziehen* der Säume. Die vorher glatten oder leicht welligen Säume zeigen oft Umschlagbewegungen am distalen Rand und starke Pinocytose (Abb. 11 e). Die Zellen haben häufig nicht einseitige Hyaloplasma-Säume, sondern je einen an den beiden Polen (Abb. 10 e, f). Die Fortbewegung dieser Zellen ist zunächst sehr lebhaft. Nach längerer PCMB-Einwirkung nehmen die Auffaltungen der Säume so stark zu, daß keine Ortsveränderungen mehr möglich ist.

Bei anderen Zellen treten am Rand der Säume dunkle Flecken auf, „Plasmotropfen“, die unter Zeitraffung keine eigene Bewegungsaktivität erkennen lassen (Abb. 11 b). An den Säumen erkennt man einen inneren Bezirk, der im Phasenkontrast dunkler erscheint, dessen Plasma relativ geringer viskös ist und einen äußeren, helleren mit visköserem Plasma (Abb. 11 b, c, g). Bei längerer Einwirkung wird der äußere Teil eingezogen und der innere Saumbereich zeigt starkes „Blubbern“ (Abb. 11 c, g). Dieses unterscheidet sich deutlich von dem entsprechenden

lösung) NaCl-Lösung, c nach 8 min in verdünnter NaCl-Lösung (0,02%  $\text{CaCl}_2$ ), b 6 min später, andere Stelle. e Zellen mit stärker eingebuchteten, vom Deckglas teilweise gelösten Säumen. d Übersicht; nur wenige Zellen haben kleine Aggregate gebildet. Bei der Dissoziation verdumpten zahlreiche Zellen. Maßstab 50  $\mu$ .

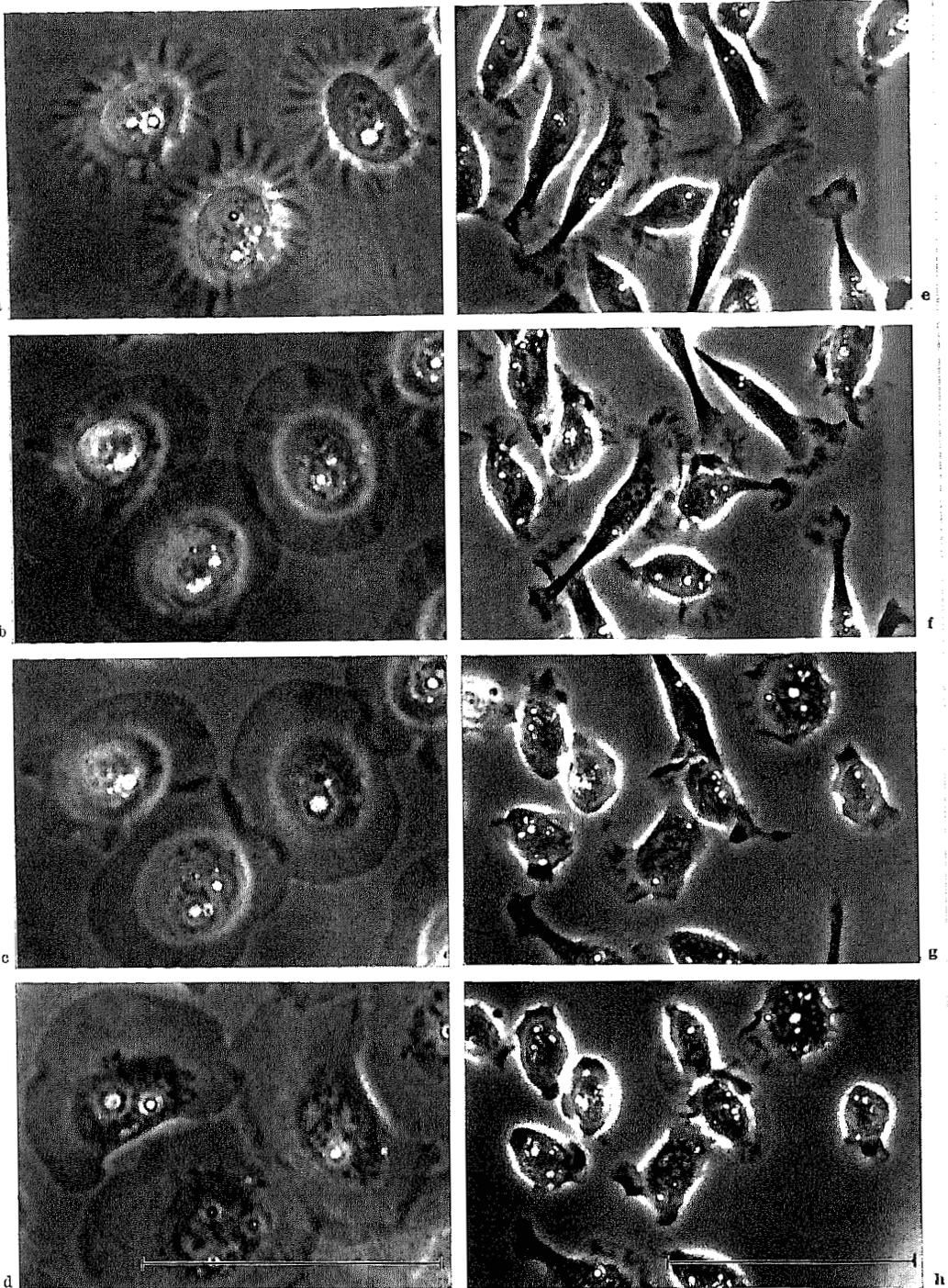


Abb. 10a—h. Einfluß von PCMB  $2,5 \times 10^{-3}$  M in Ringerlösung (0,02%  $\text{CaCl}_2$ ) a—d Glättung der Säume und Ausbreiten in EDTA dissoziierter Zellen. e 10 min, f 12 min 30 sec, g 17 min nach Zugabe von PCMB. Die Kon-

Verhalten in EDTA (vgl. Abb. 4b, c). Das granuliertes Plasma wird in diesen Fällen nicht abgekugelt, sondern die Zellen bleiben länglich. Diese Phase kann bereits nach 10 min langer Einwirkung von PCMB ( $2,5 \times 10^{-3}$  M) erreicht sein.

Tiefgreifende Veränderungen zeigen die Zellen im Verhalten gegeneinander. Die *Kontakthemmung* ist weitgehend *aufgehoben*, die Zellen wandern unter- und übereinander (Abb. 10e, f; 11e). Die Aufhebung der Kontakthemmung ist nicht nur bei vorher dissoziierten Zellen sondern auch an den im EDTA nicht aufgelösten Zellrasen zu beobachten (Abb. 12a, b). Nach einer Einwirkungszeit von etwa 10 min haben die dem Deckglas anhaftenden Zellen leicht gewellte, einseitige Säume ausgebildet und wandern vom Explantat weg, über das Deckglas bzw. die darunterliegenden Deckzellen (Abb. 12a, b). Diese behalten ihre deutlichen, glatten Zellgrenzen auch unter dem Einfluß von PCMB bei. Erst nach Auflösung des Zusammenhanges der Basalzellen reißen die Verbindungen zwischen den Deckzellen auf und bilden einen netzartigen Verband. Nicht in allen Versuchen ist die Dissoziation durch das PCMB so deutlich wie in Abb. 12a u. b, oft sind nur die Zellgrenzen durch Bewegung des Randplasma gelockert. Die derart dissoziierten Zellen verlieren ebenfalls weitgehend ihre Adhäsionsfähigkeit zum Glas und „blubbern“ dann, wie die anderen, durch EDTA aus dem Verband gelösten Zellen unter dem Einfluß des PCMB. Das „Blubbern“ hört nach längerer PCMB-Einwirkung auf.

b) *Cysteineinwirkung*. PCMB blockiert spezifisch SH-Gruppen. Diese Hemmung kann durch Cystein aufgehoben werden. Die Versuche an Kaulquappenepidermiszellen bestätigen dies. Die in PCMB stark gefalteten Säume mit Pinocytoseaktivität werden nach Zugabe von  $2,5 \times 10^{-3}$  M Cystein innerhalb von 1—2 min glatt, es tritt keine Pinocytose mehr ein; die Überlappungen werden rückgängig gemacht (Abb. 11f). War die Konzentration des PCMB nur etwa  $10^{-6}$  M, so ziehen sich die Säume der Zellen in  $2,5 \times 10^{-3}$  M Cystein nach ca. 5 min zusammen und weisen an ihren Rändern zahlreiche kleine „Pseudopodien“ auf (Abb. 11d, 12e). In diesem Zustand verharren die Zellen für etwa 2 min, dann breiten sich die Säume wieder aus (Abb. 12d).

Cystein ( $1,25 \times 10^{-3}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M) hebt die Wirkung des PCMB nur noch teilweise und kurzfristig auf. Es werden beispielsweise die Säume noch glatt, jedoch nach kurzer Zeit beginnen diese Zellen zu „blubbern“ (Abb. 10h).

In  $2,5 \times 10^{-3}$  molarer Cysteinlösung ohne vorausgegangener PCMB-Behandlung bilden die Zellen Aggregate wie in gewöhnlicher Ringerlösung, nur „blubbernde“ Zellen sind nicht fähig, Säume auszubreiten. Nach etwa 20 min „erstarren“ auch hier die Zellen für kurze Zeit.

c) *KCN-Wirkung*. KCN hemmt die Atmungskette und stört so die Versorgung der Zelle mit ATP. Ein Vergleich der Wirkung des KCN mit der des PCMB scheint wegen ihrer Gemeinsamkeit in der Störung des Energiehaushaltes der Zelle angebracht. KCN wurde ebenfalls  $2,5 \times 10^{-3}$  M verwendet. In KCN-haltiger Ringerlösung breiten die Zellen ihre Säume aus und bilden stabilisierte Aggregate. Bereits 8 min nach Hinzufügen des KCN ziehen jedoch einige Zellen ihre Säume ein, wobei strahlenförmige Plasmastränge am Deckglas hängen bleiben. Diese

takthemmung ist weitgehend aufgehoben; die Säume werden verkleinert. h 30 sec nach Zugabe PCMB-freier  $2,5 \times 10^{-6}$  M Cysteinlösung. Es werden nur einige Säume glatter; die niedere Konzentration hat nur kurzen und geringen Einfluß auf die Zellen. Links oben „blubbern“ zwei Zellen. Maßstab 50  $\mu$

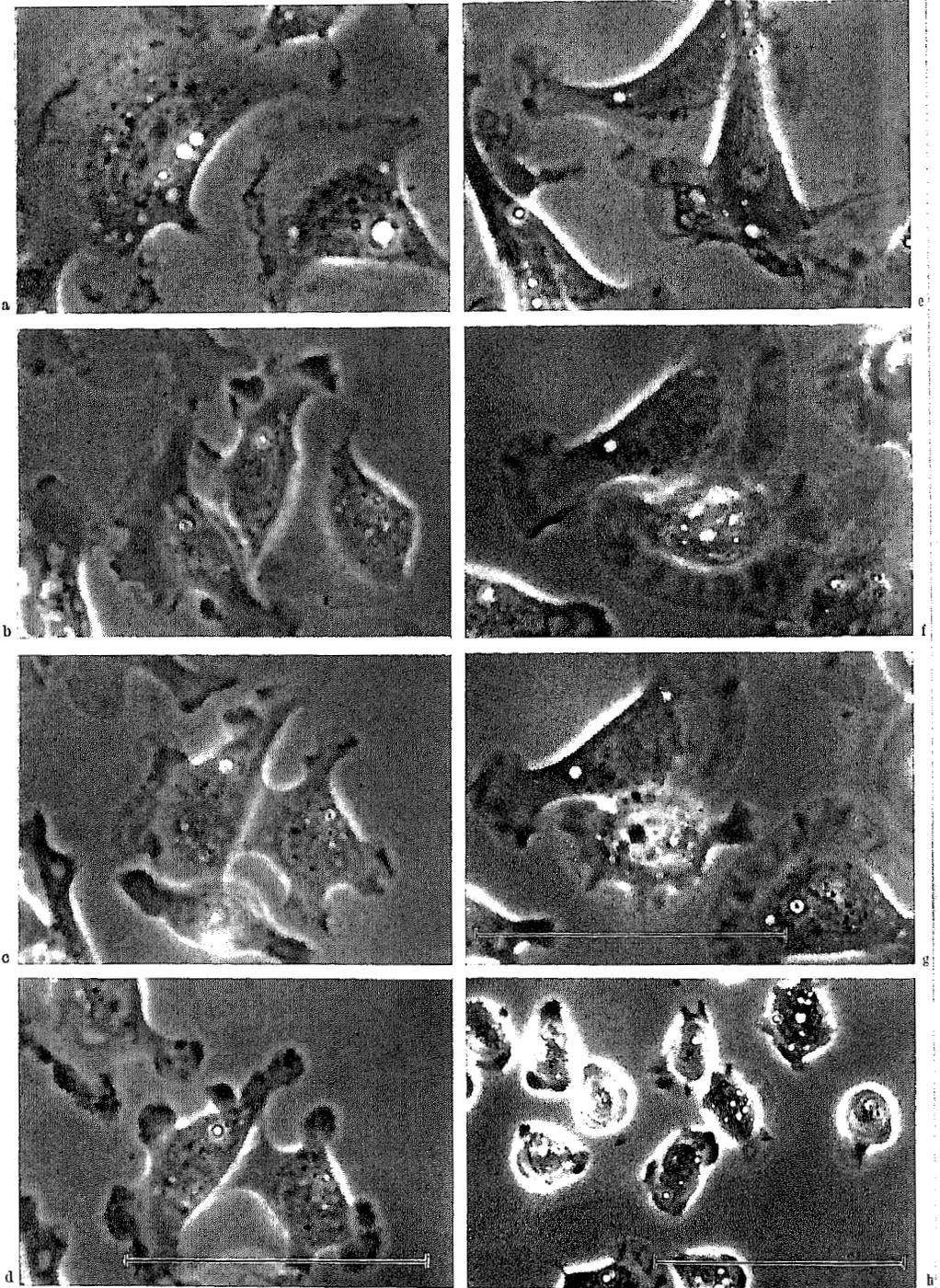


Abb. 11a—h. Einfluß von PCMB (a—d:  $10^{-6}$  M, e—f:  $2,5 \times 10^{-3}$  M) auf dissoziierte Zellen. a Erste sichtbare Schädigung: der Saumrand ist in kleinen Falten aufgeworfen. b, c Manche Säume lassen eine hellere distale und eine dunklere proximale Zone erkennen. Untere Zelle Fig. c ohne Saum. d Dieselben Zellen wie b und c nach

Kontraktion geschieht sehr langsam und ist als Vorgang nur unter Zeitraffung (auf  $1/48$ ) zu beobachten. Nach dem Einziehen der Säume zeigen diese Zellen auch unter Zeitraffung keine Bewegung. Es könnte sich um eine bereits postmortale Veränderung handeln. Die Säume der übrigen Zellen sind groß und glatt (Abb. 12h).

d) *ATP-Wirkung.* Um sicher zu sein, daß der Einfluß des PCMB nicht mit der Ansammlung überschüssigen ATP zu erklären sei, wurden Kontrollversuche mit  $10^{-2}$  M und  $2,5 \times 10^{-3}$  M ATP in Ringerlösung durchgeführt. Unter diesen Bedingungen können die Zellen Säume ausbreiten und Aggregate bilden, doch sind sie nicht zur Stabilisierung der Zellgrenzen fähig. Die Stabilisierung wird hier nicht durch besonders heftige Bewegungsaktivität verhindert, sondern die Zellgrenzen überlappen sich, ohne bei einer Raffung auf  $1/32$  wesentliche Bewegungsaktivität erkennen zu lassen. Die Zellen erscheinen auch sehr klar, mit verklumpten Granulen, ähnlich wie in isotonischer Kaliumchloridlösung (vgl. Abb. 12e, f mit Abb. 8f, g).

$10^{-2}$  M ATP führt zu kurzfristigem Auftreten von Faltungen auf den Säumen (Abb. 12g). Diese Falten sind auch unter Zeitraffung (auf  $1/24$ ) für wenige Sekunden völlig bewegungslos. Bei Nachlassen der Starre ist lebhafte Plasmaströmung in ihnen zu sehen (unter Zeitraffung!).

### 5. Einfluß von Trypsin auf die Reaggregation der Zellen

Bei diesen Versuchen wurden die Dialysierschlauchstreifen von den Präparaten entfernt, um die großen Trypsinmoleküle nicht von den Zellen fernzuhalten. Da die Vereinzelung der Zellen durch Trypsin, auch in Gegenwart von EDTA nicht zu erreichen ist, wurden die Zellen zunächst mit Versen aus dem Verband gelöst und dann der Einfluß des Trypsin (2%) in Ca-freier Ringerlösung auf die Bewegung der Zellen untersucht.

Im Trypsin zeigen die Säume der Zellen ein lappiges Aussehen, sie weisen über ihre ganze Breite hin Falten auf (Abb. 13c—e). Die Säume sind dabei oft von der Unterlage losgelöst und „wedeln“ frei in der umgebenden Flüssigkeit; nur der zentrale Plasmaanteil haftet noch am Deckglas (Abb. 13d). Das „Wedeln“ der Plasmasäume ist eine relativ langsame Bewegung; sie ist im Film bei einer Raffung auf  $1/48$  deutlich zu sehen. Im allgemeinen ist jedoch die Bewegungsintensität des Plasmas durch Trypsin verstärkt (Pinocytose). Eine Filmeinstellung zeigt, wie in EDTA ein glatter Zellsaum mit kleinen Wellenbewegungen am Rande unter dem Einfluß von Trypsin über zunächst großflächigere Wellenbewegungen in „Wedeln“ übergeht.

Neben diesen Zellen sind noch viele zu beobachten, die ähnlich wie in EDTA radiäre Wellen zeigen, in denen das Plasma schnell zentripetal zu fließen scheint (Abb. 13f). Im Gegensatz zum Verhalten in Versen „oszillieren“ diese Wellen in tangentialer Richtung. Meist lassen sie in der Mitte ihres Saumes einen dunkleren konzentrischen Ring erkennen. Bisweilen werden Übergänge zwischen diesen beiden Typen beobachtet. Die Zellen mit radiärstrukturierten Hyaloplasmasäumen zeigen deutliche Kontaktretraktion. Sie liegen zunächst oft so dicht beieinander, daß sich die Säume berühren: an dieser Stelle werden diese etwas verkleinert und

14 min langer Einwirkung von  $2,5 \times 10^{-3}$  M Cystein. Keine Überlappungen, keine Pinocytose. c 5 min 8 sec nach Cystein-Zugabe. Infolge der geringen Cysteinkonzentration setzt sich die Wirkung des PCMB wieder durch. Mittlere Zelle mit hellerem und dunklerem Saumbereich. d „Blubbern“ in  $2,5 \times 10^{-3}$  M PCMB. Teilbilder aus Mikrozeitrafferfilmen. Maßstab 50  $\mu$ .

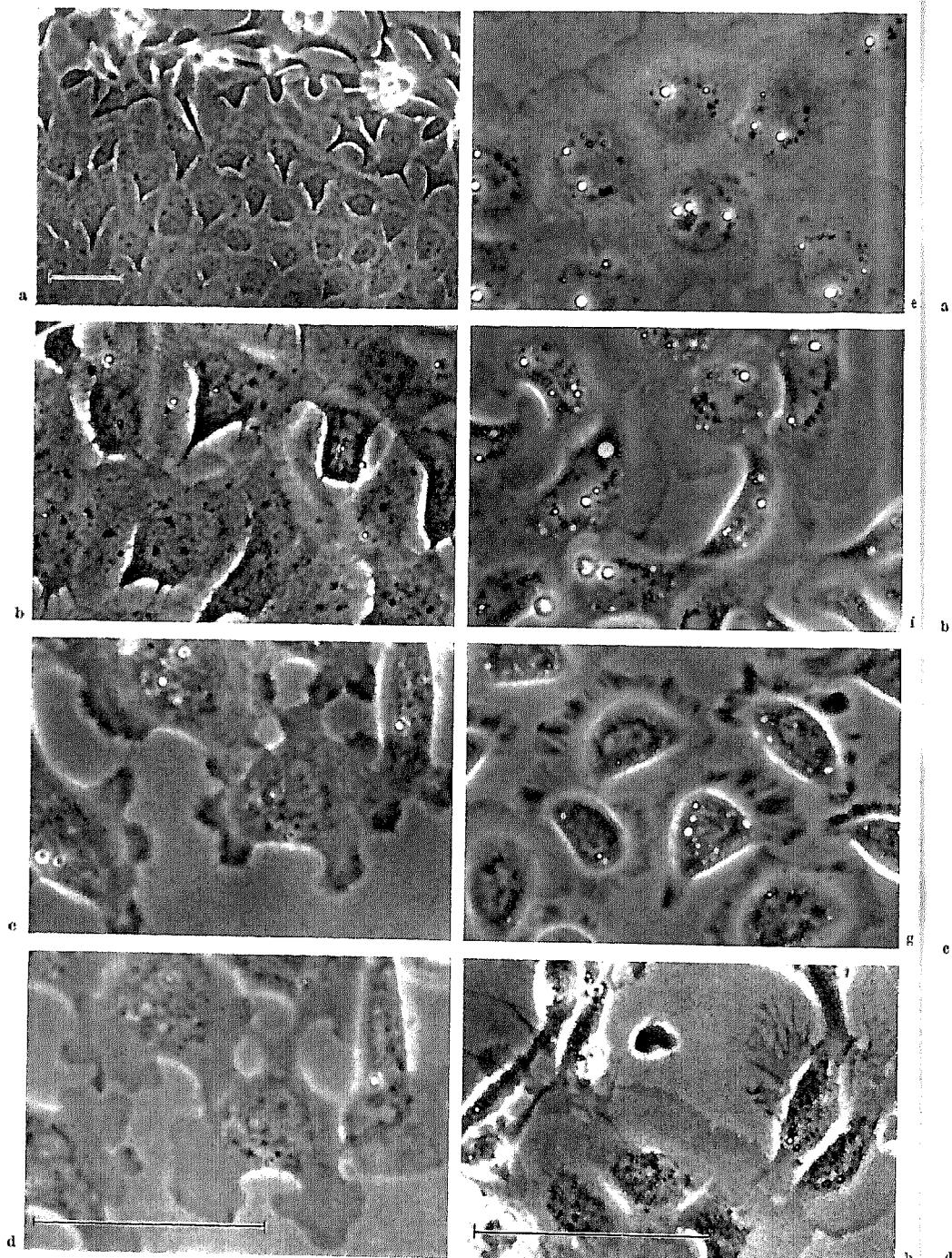


Abb. 12a, b. Auflösung eines Zellrasens in  $2,5 \times 10^{-3}$  M PCMB. c, d Cystein  $2,5 \times 10^{-2}$  M. c 14 min nach dessen Zugabe. Saumränder mit winzigen Pseudopodien. d 6 min später, die Säume breiten sich wieder aus. e—g Einfluß von ATP auf dissoziierte Zellen. e, f  $2,5 \times 10^{-3}$  M ATP, keine stabilisierten Kontakte innerhalb von 40 min nach Zugabe Ca-haltiger Salzlösung. g ATP  $10^{-3}$  M. d, KCN  $2,5 \times 10^{-3}$  M. Teilbilder aus Mikrozeitrafferfilmen. Maßstab  $50 \mu$

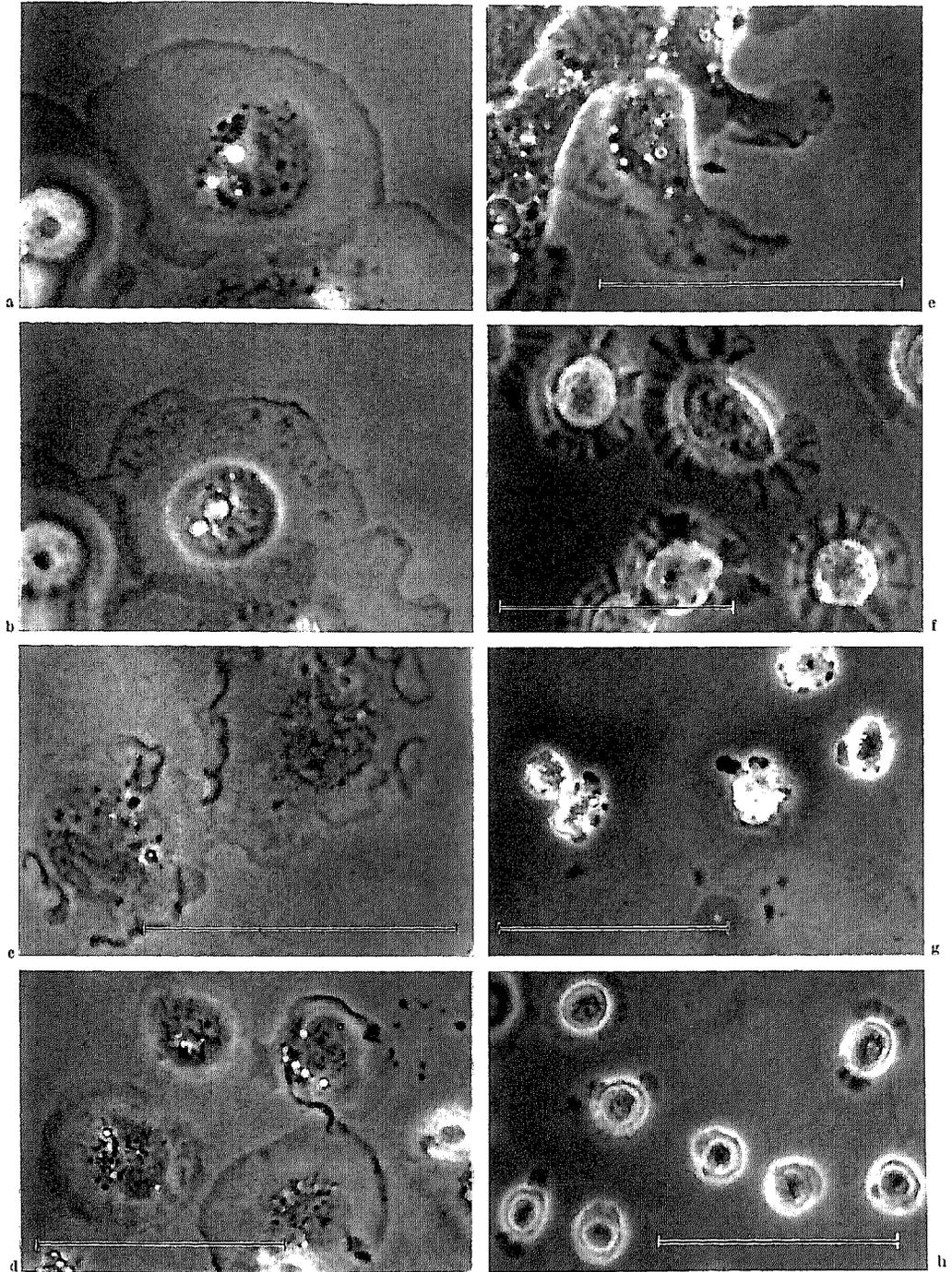


Abb. 13a—h. Einfluß von Trypsin auf dissoziierte Zellen. a Hyaloplasmasaum der Zelle in Ca-freier EDTA-Ringerlösung glatt. b nach 3 min in 2%igem Trypsin treten dunklere Flecke auf. c—d Die Hyaloplasmasäume „wedeln“. e Pinocytosebläschen an einem Saum. f Radiale Faltung der Säume. Konzentrische Ringe auf dem Saum sind erkennbar. g „Blubbern“ der Zellen in Trypsin. h „Blubbern“ in EDTA zum Vergleich mit Abb. g. Maßstab 50  $\mu$

nach wenigen Minuten bleibt der Abstand der Zellen voneinander konstant. Auch Zellen mit einseitigem Saum zeigen keine Ortsveränderungen, sie scheinen bei schneller Plasmabewegung „auf der Stelle zu treten“. Die Cytosomen werden unter Trypsineinwirkung aufgelöst.

In Ca-haltiger Ringerlösung breiten nach Trypsinbehandlung einige der Zellen wieder Säume aus, die schmale radiäre Wellen aufweisen (s. oben). Auf den großen lappigen Säumen sind häufig dunkle, kleine Flecke zu sehen, die schnell verlagert werden (Abb. 13b, e). Diese kleinen dunklen Bezirke treten nur selten bereits in Trypsinlösung auf. Pinocytose und die Saumüberwerfung bleiben durch das Calcium unbeeinflusst. Reaggregation der Zellen fand in Ringerlösung nie statt, auch nicht nach nur 3 min langer Einwirkung des Trypsin. In serumhaltiger Kulturlösung wurden nach etwa 4 min die Säume der Zellen wieder glatt. Die Frage, ob dann noch Reaggregation möglich ist, wurde nicht untersucht.

Zur Kontrolle, ob die beobachteten Vorgänge nur auf längere Einwirkung des Ca-Mangels zurückzuführen sind, wurde noch EDTA-Ca-freie Ringerlösung zu dem Präparat gegeben. Die Säume werden jetzt geglättet, völlig unstrukturiert und mehr oder weniger auf eine Zelleite begrenzt (Abb. 7c). Kontaktretraktion ist deutlich ausgeprägt; geringe Ortsbewegung ist zu beobachten, jedoch keine Reaggregation und keine Pinocytose.

## D. Auswertung der Beobachtungen

### I. Erläuterungen zum Zellmaterial

Sollen Untersuchungen an Zellen *in vitro* Vorgänge *in situ* aufklären helfen, so müssen die Zellen möglichst weitgehend ihre Differenzierungshöhe beibehalten. Sie dürfen also nicht zu lange den Kultivierungseinflüssen ausgesetzt sein. Die Erfüllung dieser Forderung bringt einige Nachteile mit sich.

Das für die hier angestellten Versuche verwendete Zellmaterial ist nicht einheitlich. Einmal wegen der Zweischichtigkeit der Zellrasen und damit des Vorhandenseins zweier Zelltypen, zum anderen, weil es sich um Frischpräparate und nicht um bereits über längere Zeit kultivierte Zellstämme handelt. Bei dissoziierten Zellen lassen sich nur selten die beiden vorher unterscheidbaren Zelltypen (Basalzellen und Deckzellen) erkennen. Nur in einigen Fällen sind Zellen mit besonders großen hyalinen Säumen und wenig dichtem Granuloplasma zu beobachten. Diese halte ich für Deckzellen. Die beiden Zelltypen zeigen außerhalb des Zellverbandes weitgehend gleiche Form und gleiches Verhalten. Bei der Dissoziation hingegen unterscheiden sie sich. Die Deckzellen lösen sich nicht so leicht voneinander, und es tritt eine Kontraktion vorwiegend dieser Zellage ein.

Die Verwendung eines Zellkulturstammes für Aggregationsversuche hat den Vorteil einheitlicher Reaktionen auf die verschiedenen Versuchsbedingungen. Bei erst wenige Stunden oder Tage kultivierten Zellen spielen eine große Zahl nicht klar erfaßbarer Faktoren wie z. B. der jeweilige Ernährungszustand der einzelnen Tiere und Unterschiede im Calcium-Gehalt der Tiere aus verschiedenen Ovulationen (CURTIS, 1957) eine Rolle. Sehr verschieden ist die Größe der Schwanzfläche, die durch den Dialysierschlauchstreifen an das Deckglas gedrückt wird und somit auch die Ausdehnung der ausgewachsenen Zellrasen. Entsprechend ist die Reaktion der Zellen oft verschieden. So tritt z. B. in manchen Versuchsserien keinerlei „Einrollen“ der Zellrasen unter EDTA-Einfluß auf, bei anderen sehr

deutlich. Das Trypsin führt bei einigen Zellen zu stark gefalteten Säumen mit Pinocytose (Abb. 13c—e). Andere Zellen weisen unter denselben Bedingungen runde, bis auf oszillierende Radiärwellen glatte Säume auf (Abb. 13f). Bei herabgesetzter Ionenstärke sind neben Zellen mit dünnen Säumen, mit nur am Rand schwach welligen Rändern (Abb. 9e, f) solche mit sehr kontrastreichen, meist nicht die ganze Zelle umschließenden Säumen mit tief eingebuchteten Rändern zu sehen (Abb. 9g). Diese beiden Typen unterscheiden sich in ihrem Aggregationsverhalten.

Da bei gleicher Bewegungsweise nie Unterschiede in der Aggregationsfähigkeit zu beobachten waren und die Voraussetzungen für die Adhäsion von Zellen von ihrer Herkunft weitgehend unabhängig sind, können die erwähnten Unterschiede unberücksichtigt bleiben. Zudem bestehen vielfältige Übergänge zwischen den einzelnen Zellformen. Selbst bei Untersuchungen an Zellstämmen können große Differenzen in der Reaktionsweise der Zellen auftreten (LEVINSON und GREEN, 1965), weshalb beim Studium der Zellaggregation auch statistische Methoden mit Erfolg angewendet werden (CURTIS und GRAEVES, 1965; L. R. TAYLOR, 1961).

Der Vorteil der hier verwandten Zellen liegt in der Kürze der *Kultivierungszeit*, während der ihr ursprüngliches Aussehen und ihre Differenzierung weitgehend erhalten bleiben. Die Annahme, daß diese Zellen *in vitro* ein dem im lebenden Tier ähnliches Verhalten zeigen, scheint daher berechtigt. Einschränkend muß aber auf das Verschwinden der Esterase-Aktivität auf der freien Oberfläche der Deckzellen, bereits nach einstündiger Behandlung mit Kulturlösung, hingewiesen werden. Die Außenseite der Deckzellen ist am frischen Schwanz mit einer dünnen Schicht SH-positiven Materials (Nachweis nach CHEVREMONT und FREDERIC aus PEARSE, 1960) überzogen. Nach einstündiger Behandlung mit Kulturlösung fällt die Reaktion negativ aus. Zwischen diesen beiden Veränderungen und dem Auswandern der Zellen könnten Zusammenhänge bestehen, da z. B. bei gleich langer Inkubation in Ringerlösung, in der kein Auswandern stattfindet, keine Veränderungen in der Esterase- und SH-Reaktion feststellbar sind. Die Bearbeitung dieser interessanten Frage lag nicht im Rahmen der vorliegenden Untersuchung.

## II. Kritik der Methodik

Zahlreiche Faktoren sind für die Adhäsion der Zellen von Bedeutung, so z. B. der Proteingehalt der Lösungen (CURTIS und GRAEVES, 1965; LIEBERMAN und OVE, 1958; MOSCONA, 1963; MOSKOWITZ, 1963; A. C. TAYLOR, 1961; L. WEISS, 1959a, b), der Gehalt an zweiwertigen Kationen (COMAN, 1954; CURTIS, 1957, 1960; PETHICA, 1961; STEINBERG, 1958), der pH-Wert (BANGHAM und PETHICA, 1960; CURTIS, 1963; GANGULY, 1962; HOLTFRETER 1946; KUCHLER u. Mitarb., 1960; STEINBERG, 1958), die Temperatur (HUMPHREYS, 1963; STEINBERG, 1958; 1961; L. WEISS, 1964), die Ionenstärke (BANGHAM und PETHICA, 1959) und die Viskosität der äußeren Zellplasmasschichten (CURTIS, 1960, 1962; MULLINS, 1959). Bei solcher Vielfalt der Möglichkeiten, einen Vorgang zu beeinflussen, ist es notwendig, die Versuchsbedingungen möglichst genau zu bestimmen und entbehrliche Faktoren auszuschalten, um die Wirkung der einzelnen um so deutlicher zu erfassen.

Nach A. C. TAYLOR (1961) ist die Adhäsivität von Zellen in serumfreiem Medium höher als in serumhaltigem. Da außerdem über die Wirkung der einzelnen

Serumbestandteile auf das Verhalten von Zellen noch wenig bekannt ist, ist es sinnvoll, die Versuche in reiner Salzlösung durchzuführen, wodurch die Versuchsbedingungen genau reproduzierbar sind.

Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt, da die hierbei auftretenden Schwankungen außerhalb des für die Zellaggregation bedeutsamen Bereiches bleiben. Der pH-Wert von 7,8 des Kulturmedium wurde möglichst auch während der Versuche beibehalten, da er sich für das Wachstum der Zellen als vorteilhaft erwiesen hatte (JONES und ELSDALE, 1963), und auch für die Dissoziation der Zellen günstig ist. Zur Reaggregation muß die Salzlösung nur Calcium in einer Mindestkonzentration von 0,0018 M enthalten, Magnesium erwies sich als entbehrlich.

### III. Adhäsion und Kohäsion

CURTIS (1964) hält für die *Kohäsion* von Zellen aneinander die Wirkung der gleichen Faktoren und Kräfte wie für die *Adhäsion* einer Zelle an Glas wahrscheinlich. Dem widersprechen die verschiedenen Wirkungen des EDTA und des Trypsin auf die Dissoziation der Kaulquappenepidermiszellen. Durch das EDTA wird zunächst der Kontakt der Zellen untereinander gelöst, durch das Trypsin die Adhäsivität zum Glas aufgehoben, ohne Vereinzelung der Zellen, auch bei gleichzeitiger Wirkung von EDTA. Die Betrachtung des Zeitraffer-Laufbildes zeigt, daß die Zellen beim „Einrollen“ des Rasens unter starken Spannungen (Abb. 2c) stehen, die Zellgrenzen aber nur an besonders durch Zug beanspruchten Stellen aufreißen. A. C. TAYLOR (1961) gibt an, daß sich tote und lebende Zellen gleich gut an Glas anzuheften vermögen. Tote Zellen sind jedoch nicht imstande ein Aggregat zu bilden, sondern werden z. B. bei Wunden in der Kaulquappenepidermis nach außen abgestoßen. Auch ist zur Adhäsion an Glas nicht unbedingt Calcium im Außenmedium nötig (Abb. 7c), wohl aber zur Aggregatbildung.

### IV. Adhäsivität ohne Calcium

Sobald die Zellen die Haftung am Deckglas verlieren, beginnen sie zu „blubbern“. Sie hängen dann nur noch lose an der Unterlage und werden leicht durch Strömungen des umgebenden Mediums weggespült. Die „Restadhäsivität“ dürfte mit der Haftfähigkeit der Zellen in Gegenwart von Calcium nicht viel Gemeinsames aufweisen, da sie verstärkt unter Bedingungen auftritt, die selbst nach Zufuhr von Calcium eine Reaggregation verhindern, z. B. bei Trypsinbehandlung oder in Saccharose-Lösung. BORLE (1965) stellt Verklumpung von HeLa-Zellen nach Einwirkung von Parathyroidhormonen fest und hält das Verkleben der Zellen unter diesen Bedingungen hinsichtlich der Rolle des Calcium für die Kohäsion von Zellen für widersprüchlich. Dieses Verhalten der Zellen könnte auf Freisetzung eines „klebrigen Stoffes“ beruhen. MOSCONA (1963) gibt dies für chemisch dissoziierte Zellen mariner Schwämme an. Er hält allerdings diesen Stoff für die wesentliche Voraussetzung physiologischer Adhäsivität; auch L. WEISS (1960) vermutet Mitwirkung mucoiden Materials bei der Verbindung von Zellen. Ähnliche Zusammenlagerungen sind an Granulocyten in Citratblut zu beobachten (FLECK, 1952).

„Verklumpten Zellen“ fehlt der Kontakt mit dem Deckglas, sie können sich daher auch in Ca-haltiger Salzlösung nicht ausbreiten, sondern „blubbern“ weiter. Dieses Verhalten ist für suspendierte Amphibienzellen allgemein (HOLTFRETER, 1946) und nicht von der Gegenwart zweiwertiger Ionen in der Kulturflüssigkeit

abhängig, sondern vom Kontakt mit einem festen Substrat. Das Einziehen der Säume kann also allein durch Loslösen der Zellen vom Deckglas erreicht werden. Bei starker Kohäsion der Zellen führt die Ablösung vom Substrat zur „Einrollung“ des Zellrasens, da wegen des starken Zusammenhaltes keine Vereinzelung möglich ist.

### V. Reaggregation

Die Schwierigkeit bei der Untersuchung des Adhäsions- bzw. Kohäsionsmechanismus liegt nicht in der Vielzahl der beteiligten Faktoren sondern vor allem in der Unkenntnis ihres Einflßbereiches. So wird z.B. das Calcium an die Zellmembran angelagert (CURTIS, 1957), ändert so deren zeta-Potential und ihre Permeabilitätseigenschaften und beeinflßt die Viskosität des Cytoplasmas (P. WEISS und SCOTT, 1963).

#### 1. Serum und Reaggregation

Zellen, die unter Trypsineinfluß „blubbern“, sind nicht ganz abgerundet, ihre „Pseudopodien“ sind schmal, oft fingerförmig. Die Zellen krümmen sich. Diese gänzlich andere Bewegungsweise als im EDTA läßt sich nicht allein durch einen Mangel an Kontakt mit dem Substrat sondern nur durch eine spezifische Schädigung der Zelle, besonders deren Membran erklären; wie sie von LEVINSON und GREEN (1965) nachgewiesen wurde. Hier ist die Adhäsion zum Glas stark verringert. Bei Zellen, die nicht „blubbern“, können große Teile ihrer Säume frei im umgebenden Medium „wedeln“ (Abb. 13d); die Plasmabewegung ist gegenüber Zellen in Ca-freier Ringerlösung sehr verstärkt. Trotzdem ist keine Ortsbewegung möglich. Bei Berührung zweier Zellen tritt keine Kontaktretraktion auf. Die Säume werden in Calcium-haltiger Ringerlösung nicht glatt sondern bleiben stark gewellt. Reaggregation der Zellen ist in Ringerlösung nicht möglich, sie scheinen die Fähigkeit zur Reaktion auf Änderungen ihrer Umgebung weitgehend verloren zu haben. Wird dem Kulturmedium jedoch Serum zugefügt, so können sich die Zellen wieder erholen. Dies entspricht ganz den Ergebnissen von MOSCONA (1961, 1963), L. WEISS (1960) und LIEBERMAN und OVE (1959), die adhäsionsfördernde Wirkung von Serum beobachteten. CURTIS (1962, 1963), CURTIS und GREAVES (1965), MOSKOWITZ (1963) und A. C. TAYLOR (1961) dagegen wiesen auf die adhäsionshemmende Wirkung von Serum hin. Diese widersprüchlichen Ergebnisse dürften ihren Grund in den verschiedenen Dissoziationsmethoden haben. MOSCONA und L. WEISS benutzten Trypsin zur Trennung der Zellen, die anderen Autoren hingegen nicht. Auch Kaulquappeneplidermiszellen reaggregieren in reiner Salzlösung nach Versenierung, nicht dagegen nach Trypsinierung. Auf die Bedeutung der Dissozierungsmethode für die Reaggregation wurde bereits von L. WEISS (1959a) und HUMPHREYS (1963) hingewiesen. Der hier angegebene Einfluß einer Vorbehandlung der Zellrasen mit Salzlösung auf die Dissoziationszeit stimmt mit den Ergebnissen von A. C. TAYLOR (1961) überein. Er konnte in Salzlösung gezüchtete menschliche Conjunktiva-Zellen mit 0,05% EDTA nicht vom Glas ablösen, wohl aber in serumhaltigem Medium kultivierte.

#### 2. Bewegungsweise und Reaggregation

Bei sämtlichen, hier dargestellten Versuchen zeigt sich ein enger Zusammenhang zwischen *Bewegungsaktivität* und *Reaggregationsfähigkeit*. Ortsveränderung ist

notwendig, damit die Zellen miteinander in Kontakt kommen können, aber nicht Voraussetzung zur Bildung von Aggregaten, wenn die Zellen dicht genug beieinanderliegen (z. B. in Salzlösungen geringer Ionenkonzentration). Die Ortsveränderung ist abhängig von der Plasmabewegung und der Adhäsivität der Zellen zum Deckglas (RICHTER, 1964c).

Unter dem Einfluß von Trypsin ist rege Plasmabewegung zu beobachten, die Säume „wedeln“ und zeigen Pinocytose, doch ist die Haftung der Zellen an das Deckglas gering. Entsprechend ist auch keine Fortbewegung möglich. Zellen mit starker Pinocytoseaktivität zeigen auch in PCMB nur sehr geringe Ortsveränderungen, ebenfalls wegen Mangel an Glasadhärenz. Verringerung der Adhäsivität ist auch bei zu geringer Ionenstärke im Außenmedium festzustellen. Hier sind bei den Zellen mit stark eingebuchteten Hyaloplasmasäumen (Abb. 9g) die Saumränder vom Deckglas gelöst: es ist keine Fortbewegung möglich. Erniedrigung der Adhäsivität bei gleichzeitiger Erhöhung des zeta-Potentials in Na-freier Lösung stellten DAN (1947) für *Arabica* Eier und HEAD und SEAMAN (1960) an menschlichen Erythrocyten fest.

Ist der pH-Wert sehr niedrig, hört die Plasmabewegung auf. Trotz starker Adhäsion können die Zellen sich nicht von der Stelle bewegen und keine Aggregate bilden.

Wird den Zellen statt Calcium Magnesium geboten, so ist das Plasma in lebhafter Bewegung, die Zellen haften auch am Deckglas und sind fähig zu „wandern“. Sie zeigen jedoch eine sehr starke Kontaktretraktion (also kaum Überlappungen), die die Ausbildung stabilisierter Zellgrenzen verhindert. Die Zellen lagern sich zu einem „sliding sheet“ (TREVAN und ROBERTS, 1960) zusammen. Das Plasma ist in diesen Zellen von relativ niedriger Viskosität, was die kleinen runden Protuberanzen auf den Säumen mancher Zellen anzeigen (Abb. 7h).

### 3. Viskosität des Cytoplasmas

Nach CURTIS (1961, 1962) ist die Adhäsivität von Zellen stark von der Viskosität der Zellmembran und der darunterliegenden Plasmaschichten abhängig. Bei kleinen Objekten ist nur die Bestimmung *relativer* Viskositätsunterschiede durch Messung der Granulabewegung möglich (SCHWÖBEL, 1952). Die hier verwendeten Epidermiszellen haben jedoch keine Granula in den für die Aggregation wesentlichen Saumbezirken — nur von deren Verhalten soll in den folgenden Abschnitten die Rede sein —. Hier ist nur aus der Intensität der im Mikro-Zeitraffer-Laufbild sichtbaren Plasmabewegung auf den Flüssigkeitsgrad einzelner Zellbezirke zu schließen. Der überwiegende Teil der Saumflächen erscheint hell und homogen und zeigt nur geringe Plasmaströmung. Die äußersten, dunkleren Randgebiete (Abb. 7d, 8c, 9b—h, 12f, 13a) und die radiären Faltungen bei EDTA-Einfluß (Abb. 2f; 3a, c, d; 10a) oder nach Trypsinbehandlung (Abb. 13f) sind dagegen Orte heftiger Bewegung. Der stärkere Phasenkontrast dieser Stellen dürfte auf größerer Dicke, als einer Folge der geringen Viskosität, dieser Zellbezirke beruhen. Keine oder nur geringe Plasmabewegung lassen die dunklen Flecke an manchen Säumen PCMB-geschädigter Zellen (Abb. 11b) unter Zeitrafferung erkennen, sie hängen wie „Flüssigkeitsblasen“ am Cytoplasmasaum. Sehr deutlich zeigen Zellen in  $10^{-2}$  M ATP die kontrastreichen Faltungen als Orte geringer Viskosität (Abb. 12g). Der Saum erscheint zunächst in seinen Faltungen wenige Sekunden

völlig erstarrt bis unter starker Plasmaströmung die Falten langsam verschwinden. Damit hört auch die heftige Strömungsaktivität auf. Ein weiteres Beispiel für den Zusammenhang von Plasmadichte und Viskosität ist das „Blubbern“ der Zellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Bei diesem Vorgang ist das Plasma sehr dünnflüssig und „versucht auszufließen“, die Spannung der Zelloberfläche (es ist nicht sicher, ob es sich um die Zellmembran im Sinne von ROBERTSON (1959) oder LESSEPS (1963) handelt oder ob am Zustandekommen der Spannung noch einige darunterliegende Schichten beteiligt sind) — hält jedoch die Zelle zusammen. Das „Blubbern“ läßt sich durch „Spannungsänderungen“ in der Zellmembran erklären: Nimmt an einer Stelle die Oberflächenspannung ab, so kann das Plasma als „Lobopodium“ die Membran hier vorwölben. Die dadurch wirkenden Scherkräfte veranlassen die Membran zur Kontraktion. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, daß nach längerer PCMB-Einwirkung das „Blubbern“ der Zellen aufhört, ohne daß die Lobopodien verschwänden. Die Zelloberfläche ist also zu keiner Kontraktion mehr fähig.

#### 4. Viskosität und Zellbewegung

Im engstem Zusammenhang mit Viskositätsänderungen des Zellplasma stehen die Plasmabewegungen von Zellen (GOLDACRE, 1954; ALLEN, 1961). Diese Bewegungen kommen durch abwechselnde Kontraktion und Erschlaffung einzelner Plasmabezirke zustande und sind ATP-abhängig (LETTRE und SCHLEICH, 1954). Nach den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von WOHLFAHRT-BOTTERMANN (1962a, b) und den Glycerinextraktionen von HOFFMANN-BERLING (1961, 1963) ist die strukturelle und physiologische Vergleichbarkeit dieser Kontraktionen mit Muskelkontraktionen gesichert. Es ist also zulässig, *Viskositätsänderungen im Zellplasma* in Hinblick auf *muskelphysiologische Ergebnisse* zu betrachten.

Nach LETTRE und SCHLEICH (1954) wird zur Erhaltung der Zellform im ausgebreiteten Zustand ATP verbraucht, da ATP-Mangel bei Fibroblasten zu Protrusionen führt, die den bei der Mitose auftretenden entsprechen. Glycerinextrahierte Zellen dagegen behalten ihre Form bei, kontrahieren sich jedoch irreversibel nach ATP-Zugabe. Es wird daher die Vergleichbarkeit des glycerinextrahierten Modelles mit einer lebenden Zelle verneint. Die hier beschriebenen Versuche mit dem ATP-ase-Hemmer PCMB an lebenden Epidermiszellen stimmen im Wesentlichen mit den Befunden an Fibroblasten überein. Hier führt die Hemmung der ATP-Spaltung zu einer besonderen Form des „Blubberns“ (Abb. 5c, 10h).

Es ist jedoch zu prüfen, ob die Formkonstanz ausgebreiteter Zellen notwendig an eine Kontraktion der äußeren Plasmaschichten gebunden ist und ob die Protrusionen bei ATP-Mangel örtlich begrenzte Plasma-Erschlaffungen sein müssen. Eng damit verknüpft ist die Frage, welcher Plasmazustand der energieverbrauchenden Kontraktion entspricht. Unter der Voraussetzung, daß während des relativ kurzen Beobachtungszeitraumes keine weiteren viskositätsbeeinflussenden Vorgänge in der Zelle ablaufen, scheint nach den gewonnenen Ergebnissen *Plasma niedriger Viskosität kontrahiert* zu sein und *Plasma höherer Viskosität im erschlafften Zustand*. Dies stimmt mit den Untersuchungen von GOLDACRE und LORCH (1950) und GOLDACRE (1952) an Amöben überein, wonach bei Kontraktion durch ATP die Viskosität des Cytoplasmas wegen des freiwerdenden Synerese-Wassers abnimmt. SZENT-GYÖRGYI (1957) korreliert Viskositätserniedrigung und Kontrak-

tion eines Myosingels unter ATP-Einfluß. Der Starre-Zustand mit niedrigviskösen Saumfalten in  $10^{-2}$  M ATP, der nach wenigen Sekunden nachläßt, entspricht den Beobachtungen an extracellulärem Myosin.

Der Spindelapparat bei Zellteilung in der Metaphase hat hohe Viskosität und muß zu diesem Zeitpunkt in erschlafftem Zustand vorliegen, da die Spindelfasern sich in der Anphase kontrahieren, wie z.B. die Untersuchungen von JACQUEZ und BRESLE (1954) zeigen.

Erhöhung des ATP-Gehaltes auf  $2,5 \times 10^{-3}$  M im Außenmedium führt zu einer Bewegungsminderung der Zellen; es scheint dies eine Folge der „Weichmacherwirkung“ des ATP zu sein.

KCN ( $10^{-3}$  M), das als Atmungsgift die *Synthese* des ATP hemmt, führt im Gegensatz zu PCMB nicht zum Einziehen der Säume, sondern die Zellen bleiben weit ausgebreitet; nur einige ziehen sich langsam zusammen, wobei strahlenförmig Plasmastränge am Deckglas hängen bleiben (Abb. 12h). Die Zellen „blubbern“ dann nicht, sondern bleiben in Ruhe. Diese Form der Kontraktion könnte bereits eine postmortale Veränderung sein, da die Zellen selbst bei einer Raffung auf  $1/48$  keinerlei Bewegung mehr erkennen lassen.

Der Unterschied der Schädigung durch PCMB und durch KCN muß im Angriffspunkt der beiden Inhibitoren liegen.

Geht man von der Annahme aus, das optisch wenig dichte, hyaline Plasma der Zellsäume sei in erschlafften Zustand, zu dessen Aufrechterhaltung nur wenig Energie benötigt wird, so ist die Form der Zellen in KCN verständlich. Durch Blockierung der ATP-Zufuhr wird zunächst die Kontraktionsfähigkeit des Plasmas aufgehoben, dann wird die Ionenpumpe der Zellmembran gehemmt.

##### 5. Viskositätsänderungen und Umwelteinflüsse

Nach DRAPER (1960) und DAINTY (1960) ist für lebende Zellen das Vorhandensein eines *Membranpotentials* zwischen Zellinnerem und dem Außenmedium lebensnotwendig. Es wird durch aktiven Transport der Ionen gegen ein elektrochemisches Gefälle, durch eine „Ionenpumpe“ hergestellt. Hierzu wird Energie benötigt. Analog der Muskelzellmembran scheint auch bei anderen Zellen ein Einfluß des Membranpotentials auf den Kontraktionszustand des Plasmas wahrscheinlich. Wird die Ionenpumpe blockiert, z.B. durch die Hemmung der ATP-Spaltung, wie dies durch PCMB geschieht, muß dies zu einem Abfall des Potentials führen und damit zu einer Änderung des Kontraktionszustandes des Cytoplasmas. Je nachdem ob diese Hemmung nur an einzelnen Stellen der Membran oder gleichmäßig geschieht, tritt eine Erhöhung der Bewegungsaktivität (lokale Kontraktion) oder eine allgemeine Viskositätserniedrigung des Cytoplasmas ein. Beide Reaktionsweisen sind bei Kaulquappenepidermiszellen zu beobachten. Im ersten Falle bewegen sich die Plasmasäume lebhaft und zeigen heftige Pinocytose (Abb. 11e), im anderen Fall bleiben die Säume der Zellen weitgehend glatt; es sind aber deutlich zwei Plasmabezirke, ein distaler, heller und ein proximaler, optisch dichter Bereich zu unterscheiden (Abb. 11 b, c, g). Bei längerer PCMB-Wirkung verliert der helle, distale Bezirk immer mehr an Fläche, bis an dem zentralen Granulaplasma nur noch Plasmotropfen hängen (Abb. 11 c, h). Nimmt man analog der Muskelkontraktion an, daß auch für das Erschlaffen ATP gespalten werden muß (HASSELBACH, 1963), so ist dies eine Erklärung dafür, weshalb die Zellen in, wie

oben behauptet, kontrahiertem Zustand verharren, da das PCMB inzwischen weiter in die Zellen eingedrungen ist und nicht mehr nur die ATP-ase an der Zellmembran hemmt. Cysteinzugabe ermöglicht, wenn die Schädigung noch nicht allzusehr fortgeschritten ist, wieder das Ausbreiten der Säume. Wird Cystein  $2,5 \times 10^{-3}$  M zu noch nicht stark geschädigten Zellen gegeben, so führt es zunächst auch zu Kontraktion und Starre der Säume mit winzigen Pseudopodien (Abb. 11 d, 12 c). Nach kurzer Zeit jedoch breiten sich die Säume der Zellen wieder aus und werden glatt (Abb. 12 d).

Bei zu geringen Cysteinkonzentrationen ( $1,25 \times 10^{-3}$  M und  $10^{-6}$  M) werden zwar die Säume der Zellen zunächst glatt, sie pinocytieren auch nicht mehr. Doch nach kurzer Zeit beginnen die Zellen trotzdem zu „blubbern“. Dieses „Blubbern“ in Cystein entspricht genau dem in Abwesenheit von Cystein. Selbst Zellen, die unter dem ersten Einfluß des Cysteins sich wieder völlig erholt zu haben scheinen, lassen nach einiger Zeit einen inneren und einen äußeren Plasma-bezirk verschiedener Dichte unterscheiden (vgl. Abb. 11 f mit Abb. 11 g). Dies läßt sich durch eine Absättigung des Cysteins durch noch in den Zellen gespeichertes PCMB erklären. Das Cystein ermöglicht als erste Wirkung die ATP-Spaltung an der Zellmembran. Aus dem Inneren der Zelle herausdiffundierendes PCMB blockiert nach einiger Zeit das Cystein und hebt so seine Wirkung auf, wenn es in zu geringer Konzentration vorhanden ist. Nach ABE (1963) kann die Schädigung der Zellen durch PCMB nur durch höhere Cysteinkonzentration als PCMB-Konzentration aufgehoben werden. Auffällig ist, daß der erneut auftretende PCMB-Einfluß nicht zu starker Bewegungsaktivität des Saumes mit Pinocytose, sondern zu allgemeiner Verflüssigung des hyalinen Plasmas führt.

Mit der Annahme, daß das PCMB zunächst an der Zellmembran wirkt, läßt sich auch die Aufhebung der Kontakthemmung durch diesen Inhibitor erklären. Die Zellmembran verliert durch die Störung des Membranpotentials die Möglichkeit auf Außenreize zu reagieren. Nach SZENT-GYÖRGYI (1965) spielen SH-Gruppen bei der Oncogenese, die ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Kontakthemmung führt, eine wichtige Rolle. Aus diesen Erwägungen und den hier gewonnenen Ergebnissen läßt sich eine enge *Beziehung des Energiehaushalles einer Zelle und ihrem Adhäsionsverhalten* vermuten.

Die hier vorgetragene Beziehung von Plasmaviskosität und Kontraktionszustand bestätigen die Beobachtungen über die Reaggregation in Magnesium-haltiger, aber Calcium-freier Ringerlösung.  $Mg^{++}$  fördern die Spaltung von ATP, was zu erhöhter Bewegungsaktivität und Verringerung der Plasmaviskosität führt. Die Kontaktretraktion ist sehr ausgeprägt. Kontakthemmung ist nicht möglich, da den Zellen der starken ATP-ase-Aktivierung wegen die Fähigkeit zur Erschlaffung ihres Plasmas fehlt. Diese scheint hier wie bei der Muskelzelle von der Gegenwart von Ca-Ionen abzuhängen. Calcium fördert zwar auch die ATP-Spaltung, verhindert jedoch die Kontraktion. Nach theoretischen Erwägungen von SZENT-GYÖRGYI (1957) vermag es wohl die Lockerung der Phosphatbindung durch Komplexbildung mit dem ATP zu erreichen, ist jedoch unfähig, die freiwerdende Energie zu übertragen.

Trypsin greift die Zellmembran an, sie verliert hierbei ihre unterschiedliche Permeabilität gegenüber  $Na^+$  und  $K^+$ . (LEVINSON und GREEN, 1965). Nach obigen Ausführungen muß dies eine Steigerung der Bewegungsaktivität der Zelle und

im Extremfall den völligen Zusammenbruch der Formkonstanz der Zelle („Blubbern“) bewirken. Die hohe Bewegungsaktivität zeigt sich in der heftigen Pino-cytose und in der unter Zeitraffung schnellen Plasmaströmung in den Zellen mit radial gewellten Säumen. In serumfreier Salzlösung ist keine Erholung mehr möglich, die Zellen behalten in Ca-haltiger Ringerlösung ihre Bewegungsweise bei.

Verringerung der Natrium- und Kaliumkonzentrationen im Außenmedium müßten analog der Muskeleerregung zu einer Änderung des Bewegungsverhaltens einer Zelle führen. Bei der Bewertung der hierzu durchgeführten Versuche ist zu beachten, daß auch in den als Natrium- und Kaliumfrei bezeichneten Lösungen immer noch Spuren dieser beiden Ionen aus dem Gewebe vorhanden sein werden.

Fehlt Kalium in isotonischer, Ca-haltiger NaCl-Lösung, so sind die Kaulquappenepidermiszellen voll beweglich und aggregationsfähig. Fehlt das Natrium in isotonischer Ca-haltiger KCl-Lösung, so ist nur sehr geringe Ortsbewegung möglich; das Plasma erscheint besonders hyalin und deutlich von verklumpten Granulen abgesetzt. Die Plasmabewegung ist gegenüber der in NaCl-Lösung deutlich verringert. Das Zellplasma scheint in erschlafftem Zustand zu sein. Dies entspricht dem Verhalten von Muskelzellen, die bei Fehlen von  $\text{Na}^+$  im Außenmedium nicht erregbar sind. Erstaunlich ist jedoch, daß bei Fehlen von Natrium und Kalium im Außenmedium in isotonischer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung Zellbewegung und Reaggregation möglich sind. Zwar kann zur Aufrechterhaltung der Erregbarkeit glatter Muskelzellen nach KOBAYASHI (1965) Natrium durch Ca-Überschuß ersetzt werden, doch nur bei Gegenwart von  $\text{K}^+$ . Demnach scheint bei den hier untersuchten Epidermiszellen das Membranpotential nicht notwendig nur ein  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Potential zu sein. Nach HODGKIN und HOROWICZ (1959) (zit. n. DRAPER, 1960) können auch Chloridionen zur Ausbildung eines Membranpotentials führen.

In 0,33 molarer NaCl- und KCl-Lösung ist die Reaggregation der Zellen trotz ihres verschiedenen Aussehens etwa gleich gut; in  $\text{CaCl}_2$ -Lösung der gleichen Ionenstärke ( $\mu = 0,33$ ) reaggregieren die Zellen ebenfalls. Dies legt nahe, daß die einwertigen Kationen für die Zellaggregation keine qualitativ unterschiedliche Wirkung haben, sondern daß sie nur als Ladungsträger von Bedeutung sind. Die endgültige Klärung dieser Frage erfordert weitere eingehende Untersuchungen.

Bei niederm pH-Wert (unter 4,0) liegen die Zellen sehr flach ausgebreitet am Deckglas und sind zu keiner Ortsbewegung fähig. Nach DAN (1947) steigt bei Seeigeleiern das zeta-Potential mit steigendem pH. Damit sinkt gleichzeitig die Adhäsivität der Zellen und es ändert sich die Permeabilität der Zellmembran gegenüber Ionen, was eine Änderung des Potentials zwischen Zellinnerem und Außenmedium und damit des Bewegungsverhaltens der Zelle zur Folge haben muß. Die Adhäsivität der Kaulquappenepidermiszellen bleibt übereinstimmend mit den Ergebnissen von DAN (1947) an Seeigeleiern erhalten bei niederm pH. Reaggregation ist also nur wegen mangelnder Beweglichkeit nicht möglich. In Zellsuspensionen kann dies durch Rühren ausgeglichen werden (CURTIS, 1963).

Durch die Annahme einer Beeinflussung des Potentials zwischen Zellinnerem und Außenmedium durch das zeta-Potential läßt sich auch die viskositätssteigernde Wirkung von Calcium erklären. Das Calcium wird nach CURTIS (1957) an die Zellmembran gebunden, womit notwendig eine Senkung des zeta-Potentials verbunden ist, was zum Anstieg des Potentials zwischen den beiden Seiten der Zellmembran und damit der Plasmaviskosität führt.

## 6. Kontaktverhalten der Zellen

Die Zeitraffer-Filmanalyse des Kontaktverhaltens zweier Zellen zeigt, daß an der Berührungsstelle wenigstens eine der beiden Zellen ihr „Pseudopodium“ einzieht, nach kurzer Zeit diesen Saumabschnitt meist aber wieder ausstreckt. Diese Reaktion ist bei Fibroblasten sehr heftig (ABERCOMBIE und HEAYSMAN, 1954; AMBROSE, 1961), bei epithelialen Zellen dagegen nur von geringem Ausmaß (Abb. 6), doch allgemein verbreitet [auch bei HeLa-Zellen und Schweinenierenzellen an Filmen von RICHTER (1964 a, b, c) beobachtet]. Da diese Kontaktretraktion bei Epithelzellen nur in sehr kleinen Flächenbereichen auftritt, — einzelne Berührungsstellen an einer Zellmembran reagieren unabhängig voneinander (P. WEISS, 1963) — und keine langanhaltende Wirkung ausübt, wurde sie bisher übersehen (P. WEISS, 1958). Die Reaktion auf Berührung scheint also bei Epithelzellen und Fibroblasten im Prinzip gleich, nur im Ausmaß verschieden zu sein, wie auch Kontakthemmung keine dem „Alles-oder-nichts-Prinzip“ unterworfenen Verhaltensweise ist (TREVAN und ROBERTS, 1960).

Wegen hoher Bewegungsaktivität des Plasmas im äußersten Randbereich des Saumes ist aus der Veränderung der Zellkonturen an der Berührungszone zweier Zellen kein Rückschluß auf den Kontraktionszustand des Plasmas zur Zeit des Kontaktes, der nicht mehr von einer Kontaktretraktion gefolgt ist, möglich. Nach HOCKINGS (1960, zit. nach CURTIS, 1962) sollen Zelloberflächen sich nicht mehr abstoßen, wenn ihre Bewegungen „phasengleich“ sind. Diese Phasengleichheit könnte durch die Kontaktretraktion erreicht werden.

Auch hier wird die Unabhängigkeit verschiedener Stellen der Zelloberfläche voneinander deutlich, denn eine Zelle kann bereits über größere Bereiche „stabilisierte Kontakte“ gebildet haben, obwohl daneben noch mächtige Überlappungen auftreten. Morphologisch sind die stabilisierten Kontakte, durch volle Wirksamkeit der Kontakthemmung, durch deutlich sichtbare Zellgrenzen ausgezeichnet. Nach den vorhergegangenen Betrachtungen über den Zusammenhang von Bewegungsaktivität und Viskosität hat es den Anschein als wäre an Stellen stabilerer Kontakte die dicht unter der Zellmembran liegende Plasmaschicht in erschlafftem, höher viskösem Zustand.

Meinem Lehrer, Herrn Prof. W. KUHL, danke ich herzlich für die Einführung in die Methode der kinematischen Zellforschung, die Anregung zu dieser Arbeit und für sein Verständnis für die, bei der Durchführung dieser Untersuchung aufgetretenen Probleme. Frau G. KUHL bin ich für ihr freundliches Interesse, das sie dieser Arbeit entgegengebracht hat, sehr verbunden. Herrn Dr. I. E. RICHTER verdanke ich wertvolle Hinweise und vielfältige Unterstützung. Frä. L.-M. HORSTMANN danke ich für die Bestimmung des Eiweiß-, Zucker- und Fettgehaltes von Kälberserum.

## Literatur

- ABE, S.: The effect of p-chloromercuribenzoate on ameboid movement, flagellar movement and gliding movement. *Biol. Bull.* **124**, 107—114 (1963).
- ABERCOMBIE, M.: The bases of locomotory behaviour of fibroblasts. *Exp. Cell Res., Suppl.* **8**, 188—198 (1961).
- , and E. J. AMBROSE: Interference microscope studies of cell contacts in tissue culture. *Exp. Cell Res.* **15**, 332—345 (1958).
- , and J. E. HEAYSMAN: Observation of the social behaviour of cells in tissue culture. II. „Monolayering“ of fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **6**, 293—306 (1954 a).
- — Invasiveness of sarcoma cells. *Nature (Lond.)* **174**, 697—698 (1954 b).
- — and H. M. KARTHÄUSER: Social behaviour of cells in tissue culture. III. Mutual influence of sarcoma cells and fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **13**, 276—291 (1957).

- ADACHI, M., and O. J. POLLAK: Rabbit's corneal cells studies in tissue cultures. I. Morphologic and quantitative aspects. *Z. Zellforsch.* **70**, 279—283 (1966).
- AMBROSE, E. J.: The movements of fibrocytes. *Exp. Cell Res., Suppl.* **8**, 54—73 (1961).
- ANSEVIN, K. D.: Aggregative and histoformative performance of adult frog liver cells in vitro. *J. exp. Zool.* **155**, 371—380 (1964).
- BERREITER-HAHN, J.: Eine Mikrozeitraffereinrichtung aus Fertigteilen mit elektronischer Steuerung. *Res. Film* **5**, 341—346 (1965).
- BORLE, A. B., and W. F. NEUMANN: Effects of parathyroid hormone on HeLa-cell cultures. *J. Cell Biol.* **24**, 316—323 (1965).
- BROWN, M. W.: The migratory behaviour of frog epidermis with special reference to surface-polarity and to factors determining direction of movement. *J. exp. Zool.* **81**, 91—126 (1939).
- COMAN, D. R.: Cellular adhesiveness in relation to invasiveness of cancer: Electron microscopy of liver perfused with a chelating agent. *Cancer Res.* **14**, 519—521 (1954).
- CURTIS, A. S. G.: The role of calcium in cell aggregation of *Xenopus* embryos. *Proc. roy. Phys. Soc. Edinb.* **26**, 25—32 (1957).
- Cell contact and adhesion. *Biol. Rev.* **37**, 82—129 (1962).
- Effect of pH and temperature on cell re-aggregation. *Nature (Lond.)* **200**, 1235—1236 (1963).
- The mechanism of adhesion of cells to glass. A study by interference reflection microscopy. *J. Cell Biol.* **20**, 199—215 (1964).
- , and M. F. GREAVES: The inhibition of cell aggregation by pure serum protein. *J. Embryol. exp. Morph.* **13**, 309—326 (1965).
- DAN, K.: Elektrokinetic studies of marine ova. VII. Relation between the zeta potential and adhesiveness of the cell membrane of sea-urchin eggs. *Biol. Bull.* **93**, 274—286 (1947).
- DRAPER, M. H.: The movements of ions about the muscle membrane. *Proc. roy. Phys. Soc. Edinb.* **28**, 15—18 (1960).
- FLECK, L.: Über Leukergie. *Acta haemat. (Basel)* **8**, 282—292 (1952).
- GOLDACRE, R. J.: The action of general anaesthetics on amoebae and the mechanism of the response to touch. *Symp. Soc. exp. Biol.* **6**, 128—145 (1952).
- The role of the cell membrane in the locomotion of amoebae and the source of the motive force and its control by feedback. *Exp. Cell Res., Suppl.* **8**, 1—16 (1961).
- , and I. J. LORCH: Folding and unfolding of protein molecules in relation to cytoplasmic streaming, amoeboid movement and osmotic work. *Nature (Lond.)* **166**, 497—500 (1950).
- GROPP, A., u. H. R. HELLEWEG: Cytologische und enzymcytochemische Untersuchungen über die Zelloberfläche an in vitro gezüchteten Zellen. *Z. Zellforsch.* **50**, 315—331 (1959).
- , u. K. HUPF: Fermenthistochemische Reaktionen an lebenden Zellen in Gewebekulturen. *Klin. Wschr.* **36**, 361—362 (1958).
- HARVEY, E. N., and J. F. DANIELLI: Properties of the cell surface. *Biol. Rev.* **13**, 319—341 (1938).
- HASSELBACH, W.: Muskelphysiologie. Die Koppelung chemischer und mechanischer Reaktionen während der Kontraktion und Erschlaffung des Muskels. *Fortschr. Zool.* **15**, 1—91 (1963).
- HEARD, D. H., G. V. F. SEAMAN, and I. SIMON-REUSS: Electrophoretic mobility of cultured mesodermal tissue cells. *Nature (Lond.)* **190**, 1009 (1961).
- HITCHCOCK, H. B.: The behaviour of adult amphibian skin cultured in vivo and in vitro. *J. exp. Zool.* **81**, 299—332 (1939).
- HOLTRETER, J.: Changes of structure and the kinetics of differentiating embryonic cells. *J. Morph.* **80**, 57—91 (1947).
- Structure, motility and locomotion in isolated embryonic amphibian cells. *J. Morph.* **79**, 27—62 (1946).
- HUMPHREYS, T.: Chemical dissolution and in vitro reconstruction of sponge cell adhesion. I. Isolation and functional demonstration of the components involved. *Develop. Biol.* **8**, 27—47 (1963).
- JACQUEZ, J. A., and J. J. BIESELE: A study of Michel's film of meiosis in *Psophus stridulus*. *Exp. Cell Res.* **6**, 17—29 (1954).
- JONES, K. W., and T. R. ELSDALE: The culture of small aggregates of amphibian cells in vitro. *J. Embryol. exper. Morph.* **11**, 135—154 (1963).

- KOBAYASHI, M.: Effects of Na and Ca on the generation and conduction of excitation in the ureter. *Amer. J. Physiol.* **208**, 175—719 (1965).
- KUCHLER, R. J., M. L. MARLOWE, and D. J. MERCHANT: The mechanism of cell binding and cell sheet formation in L strain fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **20**, 428—437 (1960).
- KUHL, W.: Untersuchungen über das Verhalten künstlich getrennter Furchungszellen und Zellaggregate einiger Amphibienarten mit Hilfe des Zeitrafferfilmes (Laufbild- und Teilbildanalyse) *Arch. Entwickl.-Mech. Org.* **136**, 593—671 (1937).
- Kinematische Zellforschung. *Biol. generalis (Wien)* **16**, 263—309 (1942).
- Die technischen Grundlagen der kinematischen Zellforschung. Vorschläge für eine exakte wissenschaftliche Kinematographie, S. 185. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1949.
- Kinematische Zellforschung durch Änderung des Zeitmomentes mit Hilfe des Mikrozeitrafferfilmes. *Anat. Anz., Suppl.* **15**, 10—43 (1950).
- , u. G. KUHL: Die Dynamik der Frühentwicklung von *Sagitta setosa*. Lauf- und Teilbild-Analysen von Zeitrafferfilmen. *Helgol. wiss. Meeresunters.* **12**, 260—301 (1965).
- LESSEPS, R.: Cell surface projections: Their role in the aggregation of embryonic chick cells as revealed by electron microscopy. *J. exp. Zool.* **153**, 171—182 (1963).
- LEVINE, E. M., Y. BECKER, CH. W. BOONE, and EAGLE: Contact inhibition, macromolecular synthesis, and polyribosomes in cultured human diploid fibroblasts. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **53**, 350—356 (1965).
- LEVINSON, C., and J. W. GREEN: Cellular injury resulting from tissue disaggregation. *Exp. Cell Res.* **39**, 309—317 (1965).
- LIEBERMAN, I., and P. OVE: A protein factor for mammalian cells in culture. *J. biol. chem.* **233**, 637—642 (1958).
- MARSCHALL, K. J.: Bau und Funktion der Blutzellen des Mehlkäfers *Tenebrio molitor* L. *Z. Morph. u. Ökol. Tiere* **58**, 182—246 (1966).
- MOSCONA, A. A.: Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions in vitro. *Exp. Cell Res.* **22**, 455—475 (1961a).
- Effect of temperature on adhesion to glass and histogenetic cohesion of dissociated cells. *Nature (Lond.)* **190**, 408—409 (1961b).
- Studies on cell aggregation: Demonstration of materials with selective cell-binding activity. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **49**, 743 (1963).
- MOSKOWITZ, M.: Aggregation of cultured mammalian cells. *Nature (Lond.)* **200**, 854—856 (1963).
- MULLINS, W. W.: Flattening of a nearly plane solid surface due to capillarity. *J. appl. Phys.* **30**, 77—83 (1959).
- NAKAI, J.: Studies on the mechanism determining the course of nerve fibers in tissue culture. II. The mechanism of fasciculation. *Z. Zellforsch.* **52**, 427—449 (1960).
- NIEUWKOOP, P. D., and J. FABER: Normal table of *Xenopus laevis* (DAUDIN). Amsterdam: North Holland Publ. Co. 1956.
- OPPEL, A.: Demonstration der Epithelbewegung im Explantat von Froschlarven. *Anat. Anz.* **45**, 173—185 (1913).
- PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry theoretical and applied*, 2nd ed., 998 p. Boston 1960.
- PETHICA, B. A.: The physical chemistry of cell adhesion. *Exp. Cell Res., Suppl.* **8**, 123—140 (1961).
- PFLUGFELDER, O., u. G. SCHUBERT: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Haut von Larven- und Metamorphosestadien von *Xenopus laevis* nach Kaliumperchloratbehandlung. *Z. Zellforsch.* **67**, 96—112 (1965).
- RICHTER, I.-E.: Untersuchungen zur Cytodynamik kontinuierlich züchtbarer Zellen. I. Das Verhalten von Schweinenieren-Zellen (Stamm ENS 53). *Protoplasma (Wien)* **58**, 426—438 (1964a).
- II. Zellbewegungen während der Wachstumsphase. *Protoplasma (Wien)* **58**, 589—602 (1964b).
- III. Plasmabewegungen und Lokomotion. *Verh. Dtsch. Zool. Ges. in Kiel*, S. 458—464. 1964 (c).
- ROBERTSON, J. D.: The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem. Soc. Symp.* **16**, 3—43 (1959).
- ROMEIS, B.: *Mikroskopische Technik*. München 1948.

- ROSE, G. G., C. M. POMERAT, T. O. SHINDLER, and J. B. TRUNNELL: A cellophane-strip technique for culturing tissue in multipurpose culture chambers. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 761—764 (1958).
- SCHWÖBEL, W.: Untersuchung zur Granulabewegung im Ei von *Parascaris equorum* (GOETZE) mit Hilfe des Zeitrafferfilmes. *Protoplasma (Wien)* **41**, 21—56 (1952).
- STEINBERG, M. S.: On the chemical bonds between animal cells: A mechanism for typespecific association. *Amer. Naturalist* **92**, 65 (1958).
- SZENT-GYÖRGYI, A.: *Bioenergetics*, 143 p. New York 1957.
- Cell division and cancer. *Science* **149**, 34—37 (1965).
- TAYLOR, A. C.: Attachment and spreading of cells in culture. *Exp. Cell Res., Suppl.* **8**, 350—356 (1961).
- Responses of cells to pH changes in the medium. *J. Cell Biol.* **15**, 201—209 (1962).
- TAYLOR, L. R.: Aggregation, variance and the mean. *Nature (Lond.)* **189**, 732—735 (1961).
- THOMASON, D., and R. SCHOFIELD: Calcium and cell surface properties. *Exp. Cell Res.* **22**, 487—492 (1961).
- TOWNES, P. L., and J. HOLTFRETER: Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J. exp. Zool.* **128**, 53—120 (1955).
- TREVAN, D. J., and D. C. ROBERTS: Sheet formation by cells of an ascites tumour in vitro. *Brit. J. Cancer* **14**, 724—729 (1960).
- WEISS, L.: Studies on cellular adhesion in tissue culture. I. The effects of serum. *Exp. Cell Res.* **17**, 499—507 (1959a).
- Studies on cellular adhesion in tissue culture. II. The adhesion of cells to gel surfaces. *Exp. Cell Res.* **17**, 508—515 (1959b).
- The adhesion of cells. *Int. Rev. Cytol.* **9**, 187—229 (1960).
- WEISS, P.: In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J. exp. Zool.* **68**, 393—448 (1934).
- Cellular dynamics. *Rev. mod. Phys.* **31**, 11—20 (1959).
- , and B. GARBER: Shape and movement of mesenchyme cells as functions of the physical structure of the medium. Contributions to a quantitative morphology. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **38**, 264—280 (1952).
- , and B. I. H. SCOTT: Polarization of cell locomotion in vitro. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **50**, 330—336 (1963).
- WEISSENFELS, N.: Der Einfluß der Gewebezüchtung auf die Morphologie der Hühnerherzmyoblasten. III. Der Einfluß der Ernährung auf die Entstehung der Cytosomen. *Protoplasma (Wien)* **54**, 540—554 (1962).
- Der Einfluß der Gewebezüchtung auf die Morphologie der Hühnerherzmyoblasten. II. Die Herkunft und die Entwicklung der Cytosomen. *Protoplasma (Wien)* **54**, 328—344 (1962).
- WESSELS, N. K.: Substrate and nutrient effects upon epidermal basal cell orientation and proliferation. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **52**, 252—259 (1964).
- WITTEKIND, D.: Pinocytose. *Verh. dtsh. Naturf. u. Ärzte* **102**, 111—118 (1963).
- und G. RENTSCH: Über Etalement, Pinocytose und amöboide Bewegung von Exsudat-Phagocyten und über Möglichkeiten ihrer Beeinflussung durch verschiedene Methoden der Exsudaterzeugung. *Z. Zellforsch.* **63**, 374—404 (1964).
- WOHLFAHRT-BOTTERMANN, K. E.: Weitreichende fibrilläre Protoplasma differenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplasmaströmung. I. Elektronenmikroskopischer Nachweis und Feinstruktur. *Protoplasma (Wien)* **54**, 514—539 (1962).
- Cytologische Studien VIII. Zum Mechanismus der Cytoplasmaströmung in dünnen Fäden. *Protoplasma (Wien)* **54**, 1—26 (1962).

Dr. JÜRGEN BEREITER-HAHN  
 Institut für Kinematische Zellforschung  
 6 Frankfurt a. M., Senckenberganlage 27

## Lebenslauf

Am 21. April 1941 wurde ich als Sohn des damaligen Landgerichtsrates Dr. iur. Werner Bereiter-Hahn und seiner Gemahlin Dorothea, geb. Dittrich, in Innsbruck geboren. Die Volksschule besuchte ich in Dingolfing, Landshut und Innsbruck. 1951 — 1956 besuchte ich die Oberrealschule in Landshut und von 1956 — 1961 die Wöhlerschule in Frankfurt, wo ich auch die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 1961 begann ich mit dem Studium der Zoologie an der Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt. Als Nebenfächer studierte ich Botanik und zunächst Philosophie, dann Biochemie. Im Sommersemester 1963 begann ich am Institut für Kinematische Zellforschung unter der Leitung von Professor Dr. W. Kuhl meine Dissertationsarbeit über

Dissoziation und Reaggregation von Epidermiszellen der Larven  
von *Xenopus laevis* (Daudin) in vitro.  
(Zeitrafferlaufbild- und Teilbildanalyse),  
die im Juli 1966 abgeschlossen wurde.