

Gap Junctions in Multicell Spheroids

Franz Brümmer und Dieter F. Hülser
Abteilung Biophysik, Biologisches Institut, Universität Stuttgart,
Ulmer Str. 227, D-7000 Stuttgart-60, BRD
Received 14 April 1982

Cells in organs and tissues are connected by different intercellular junctions which separate functional compartments (tight junctions) or support and orientate them (desmosomes) but which also, like the gap junctions, provide intercellular information exchange. Gap junctions form tiny pores between apposed membranes, thus enabling the diffusion of ions and hydrophilic molecules from cell to cell. The units of the gap junctions are reported to be polypeptides with a molecular weight of about 26 000 daltons [1]. Whether they are arranged in a hexagonal [2–4] or tetragonal [5] structure is still an open question. A pore between two adjacent cells is formed only when each cell contributes such a polygonal protein. The outer diameter of the pore is unequivocally reported to be about 8 nm and the inner diameter about 1.4 nm. In mammalian cells these intercellular channels enable the passage of molecules of up to $M_r = 900$ [6]. Several hundred such pores are arranged in characteristic quasi-crystalline structures which are also found in cultured mammalian cells. Since gap junctions act as regulators for the transport of metabolites the part they play in carcinogenesis has often been investigated; evidence for such a correlation, however, has not yet been provided.

Cultivation of mammalian cells on glass or plastic Petri dishes has some advantage over *in vivo* methods when special cell properties are investigated: by controlled variation of the culture conditions they may be stimulated or suppressed. This strategy is reasonable as long as the investigated property is just as active in two-dimensional growth in culture as under *in vivo* conditions. We have found gap junctions also between tumor cells (BICR/M1R-K) in culture (fig. 1). These membrane structures are present as early as 5 minutes after first contact of the cells and are also found when the cells proliferate and form a dense monolayer, their pores always being completely open. The coupling between the cells can be measured by using glass microelectrodes (tip diameter about 100–500 nm) and injecting ionic current or fluorescent dyes like Lucifer yellow ($M_r = 457$). In a dense monolayer, cells like the normal 3T3 (mouse embryo) may be contact inhibited and stop their proliferation or they may continuously divide until the culture medium is exhausted, like the malignant BICR/M1R-K cells do. In each case they are always coupled by ionic current and by fluorescent dyes. Uncoupling by closing the gap junction pores occurs only after rather unphysiological

Gap Junctions in Multizell- Sphäroiden

Franz Brümmer und Dieter F. Hülser
Abteilung Biophysik, Biologisches Institut, Universität Stuttgart,
Ulmer Str. 227, D-7000 Stuttgart-60, BRD
Eingegangen am 14. April 1982

Zwischen Zellen tierischer Gewebe bestehen verschiedenartige interzelluläre Verknüpfungen. Einerseits trennen sie funktionelle Kompartimente (tight junctions) oder stützen und orientieren Zellverbände (Desmosomen), andererseits dienen sie auch, wie die gap junctions, der interzellulären Informationsübertragung. Die gap junctions bilden feinste Poren zwischen benachbarten Membranen, durch die Ionen und hydrophile Moleküle direkt von Zelle zu Zelle diffundieren können. Die Bausteine der gap junctions sind als Polypeptide mit einer relativen Molekülmasse von 26 000 beschrieben worden [1]. Die Frage, ob sie sich – wie vielfach angenommen – zu einer hexagonalen [2–4] oder zu einer tetragonalen [5] Struktur zusammenlegen, bedarf noch weiterer Untersuchungen. Zur Ausbildung einer Pore zwischen zwei benachbarten Zellen muß natürlich jede Zelle ein solches polygonales Protein beisteuern. Übereinstimmend wird der äußere Durchmesser einer Pore mit ca. 8 nm und der innere Durchmesser mit ca. 1.4 nm angegeben. Diese interzellulären Poren lassen zwischen Säugerzellen Moleküle bis zu einer relativen Molekülmasse von 900 passieren [6]. Mehrere hundert solcher Poren ordnen sich in der Membran zu charakteristischen quasikristallinen Strukturen und sind auch bei Säugerzellen in Kultur nachgewiesen worden. Gap junctions kommt beim Transport von Nährsubstanzen und regulatorischen Molekülen eine steuernde Funktion zu und daher ist die Frage, welche Rolle sie bei der malignen Entartung der Zellen spielen zwar vielfach untersucht, aber nicht eindeutig beantwortet worden.

Zur Untersuchung spezieller Zelleigenschaften hat sich das Züchten von Säugerzellen in Plastik- oder Glas-Petrischalen sehr bewährt. Es erlaubt, die zu untersuchenden Merkmale durch kontrollierte Variation der Kulturbedingungen gezielt zu beeinflussen. Diese Strategie ist vernünftig, wenn sichergestellt ist, daß das untersuchte Merkmal auch in diesem zweidimensionalen Zellwachstum wie unter *in vivo* Verhältnissen auftritt. Wir haben gap junctions auch zwischen Tumorzellen (BICR/M1R-K) in Kultur nachgewiesen (Fig. 1). Diese Membranstrukturen werden schon 5 Minuten nach dem ersten Kontakt der Zellen gefunden und bleiben auch während der Proliferation der Zellen zu einem dichten Monolayer vorhanden, wobei die Poren stets ganz geöffnet sind. Mit Hilfe von Glasmikroelektroden (Spitzendurchmesser ca. 100–500 nm) haben wir den Kopplungsgrad durch die erzwungene Ausbreitung eines Ionenstroms oder eines fluoreszierenden Farbstoffs wie Lucifer yellow ($M_r = 457$) bestimmt. Im dichten Monolayer können Zellen, wie die normalen 3T3 (Maus-Embryo), Kontaktinhi-

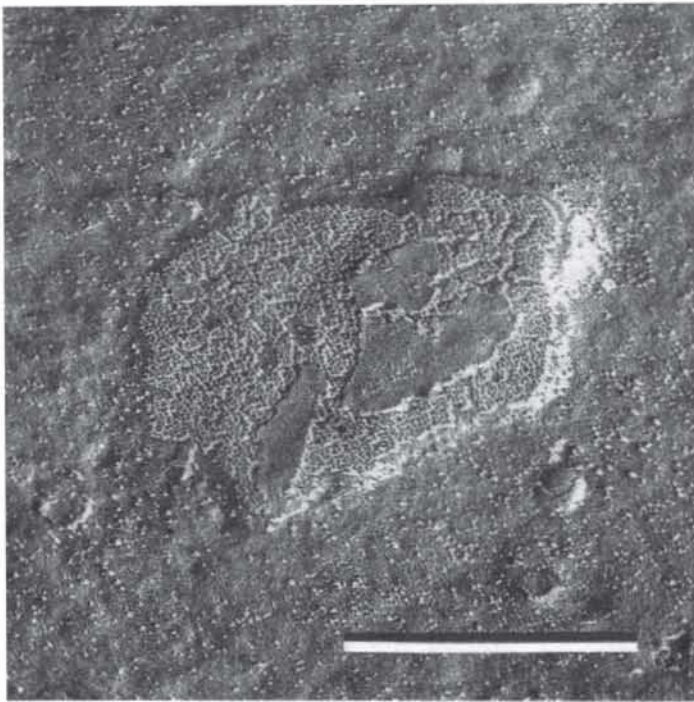


Fig. 1: Gap junction between BICR/M1R-K monolayer-cells (mammary tumor of the marshall rat); bar: 0.5 μ m. Zeiss EM 10.

Abb. 1: Gap junction zwischen BICR/M1R-K Monolayer-Zellen (Mammatumor der Marshall-Ratte). Maßstab 0.5 μ m. Zeiss EM 10.

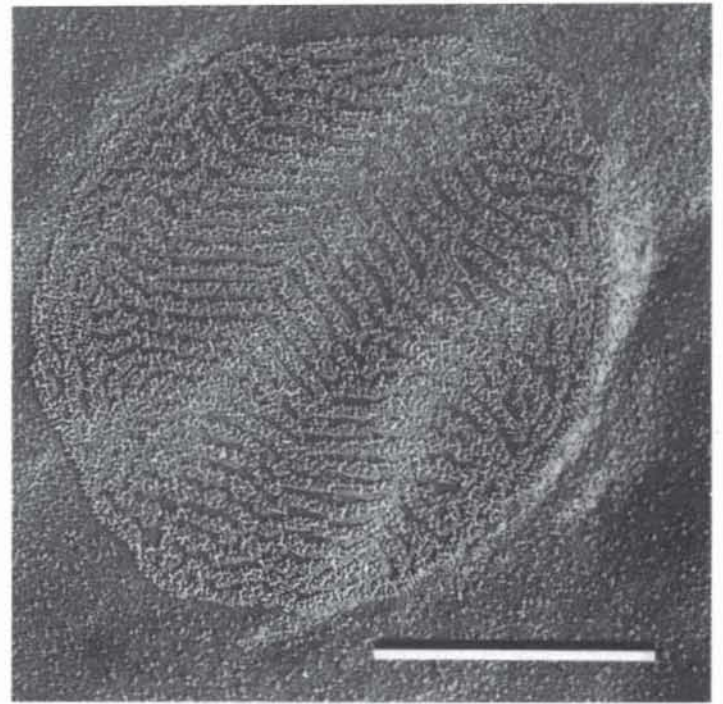


Fig. 2: Gap junction between BICR/M1R-K cells after 2 days in spinner culture (multicell-spheroid) bar: 0.5 μ m. Zeiss EM 10.

Abb. 2: Gap junction zwischen BICR/M1R-K Zellen nach 2 Tagen im Rührkolben (Multizell-Sphäroid). Maßstab 0.5 μ m. Zeiss EM 10.



Fig. 3: Gap junction between BICR/M1R-K cells after 2 days in spinner culture (multicell-spheroid) bar: 0.5 μ m. Zeiss EM 10.

Abb. 3: Gap junction zwischen BICR/M1R-K Zellen nach 2 Tagen im Rührkolben (Multizell-Sphäroid). Maßstab 0.5 μ m. Zeiss EM 10.

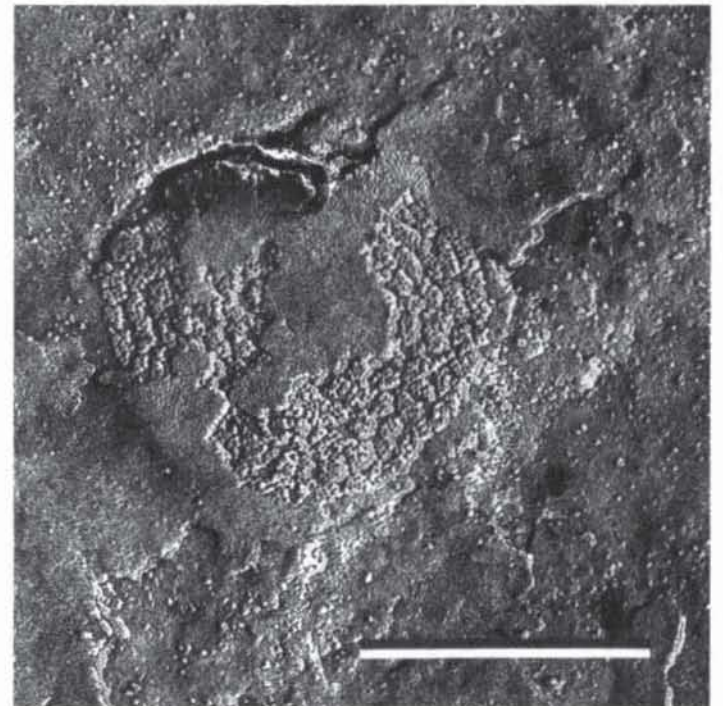


Fig. 4: Gap junction between BICR/M1R-K cells after 4 days in spinner culture (multicell-spheroid) bar: 0.5 μ m. Zeiss EM 10.

Abb. 4: Gap junction zwischen BICR/M1R-K Zellen nach 4 Tagen im Rührkolben (Multizell-Sphäroid). Maßstab 0.5 μ m. Zeiss EM 10.

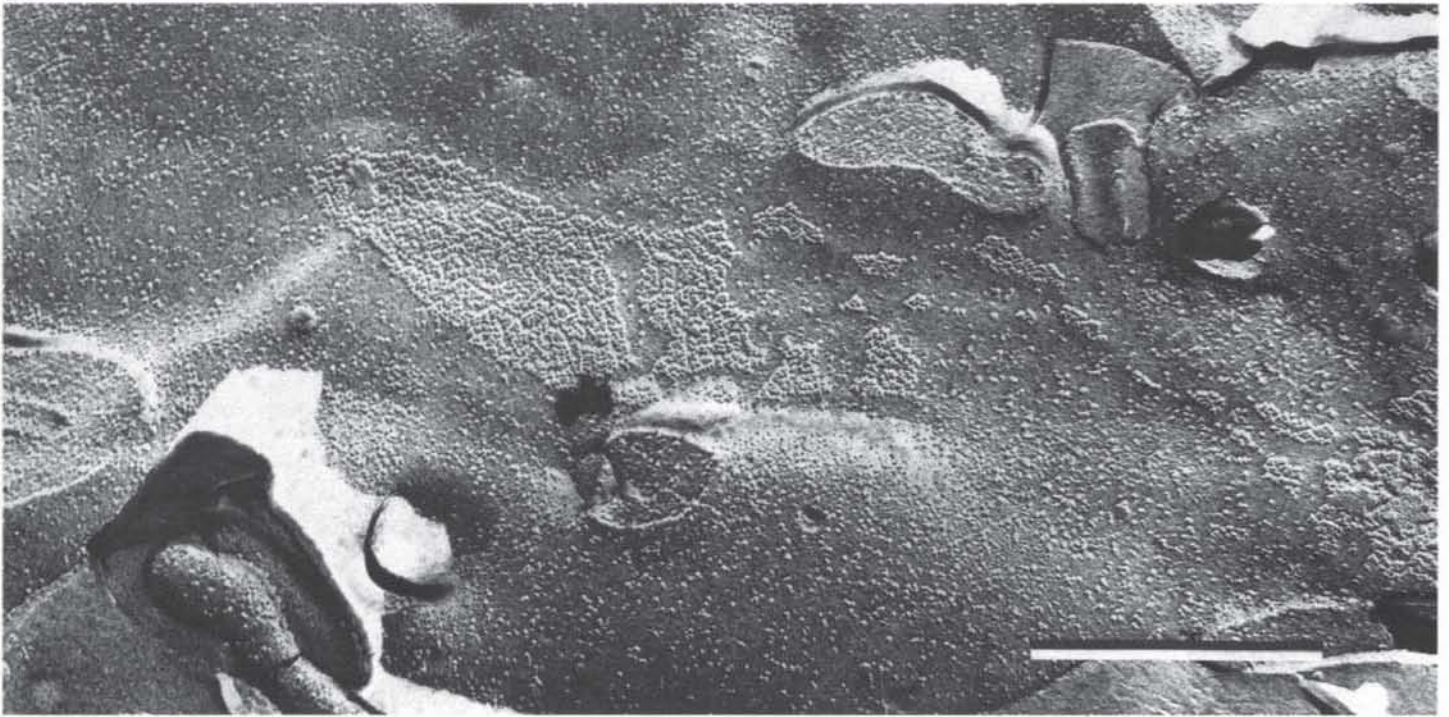


Fig. 5: Gap junction between BICR/M1R-K cells after 9 days in spinner culture (multicell-spheroid) bar: 0.5 μm . Zeiss EM 10.

Abb. 5: Gap junction zwischen BICR/M1R-K Zellen nach 9 Tagen im Rührkolben (Multizell-Sphäroid). Maßstab 0.5 μm . Zeiss EM 10.

variations of Ca^{++} - and H^{+} -ion activities or after treatment with glutaraldehyde.

Gap junctions may well be found in monolayers of cell cultures but they are unable to perform those regulatory functions which are probably active in vivo. A part of these regulatory functions may be regained after growing the cells to three-dimensional multicell-spheroids. For this purpose, 2–3 days old monolayer cultures are transferred without trypsinization into a spinner flask and incubated at 37° C. Within 8 days and with daily medium exchange the multicell-spheroids reach a diameter of about 0.5 mm (about 20 000 cells). Some of the cell lines have different survival rates for $\text{Co-}\gamma$ -irradiation as monolayers than as spheroids: non coupled cells are less radioresistant than coupled cells [7]. Since the survival rate of monolayer cells after irradiation shows a different correlation, we have also investigated the amount of coupling in a spheroid. Surprisingly, the electrical coupling between cells in a spheroid decreases continuously until complete uncoupling occurs after 8 days. These cells (BICR/M1R-K) are "differentiated": they are less sensitive to irradiation than their coupled counterparts in a monolayer and – in spite of electrical uncoupling – they reveal regularly numerous gap junctions (fig. 2–5), even after 9 days of spheroid growth. This may be the result of either a simultaneous reduction of the internal diameter of all gap junction channels or a complete closure of all pores in distinct gap junction plaques. This question cannot be decided simply by measurements of the electrical coupling. By injection of Lucifer yellow, however, we demonstrated that the first possibility is true: Lucifer yellow spreads between cells of a two-day-old spheroid (fig. 6 a, b, c) whereas two days later the dye is retained in the injected cell (fig. 7 a, b, c).

bition zeigen und ihre Teilung einstellen oder, wie die malignen BICR/M1R-K (Ratten-Mammatumoren), so lange proliferieren, bis das Medium erschöpft ist. In jedem Falle sind sie stets vollständig gekoppelt, d. h. Ionenstrom- und Farbstoff-Kopplung sind nachweisbar. Eine Schließung der gap junction Poren wird nur nach eher unphysiologischen Variationen der Ca^{++} - und H^{+} -Ionenaktivität oder nach noch stärkeren Eingriffen, wie Anfixierung mit Glutaraldehyd, beobachtet.

Gap junctions treten also im Monolayer von Zellkulturen zwar noch auf, sie erbringen dort aber nicht mehr die Regulationsleistung, die sie in-vivo vermutlich zu leisten vermögen. Einen Teil dieser Regulationsleistungen haben wir wieder beobachtet, nachdem wir den Zellen ein dreidimensionales Wachstum in Kultur ermöglichten (sog. Multizell-Sphäroide). Dazu werden 2–3 Tage alte Monolayer-Kulturen in Rührkolben überführt und weiter bei 37° C inkubiert. Innerhalb 8 Tagen und bei täglichem Mediumwechsel wachsen Multizell-Sphäroide mit einem Durchmesser bis zu 0.5 mm (ca. 20 000 Zellen) heran. Einige der Zellstämme zeigen dabei unterschiedliche Überlebensraten, wenn sie als Monolayer-Kultur oder als Sphäroid bestrahlt werden. Es ergibt sich eine eindeutige Korrelation zwischen dem elektrischen Kopplungsgrad der Zellen im Monolayer und den Überlebensraten der entsprechenden Sphäroide nach Einwirkung ionisierender Strahlung: nicht gekoppelte Zellen sind wesentlich strahlenempfindlicher als elektrisch gekoppelte [7]. Da die Überlebensraten der Monolayerzellen nach Bestrahlung nicht dieselbe Korrelation aufweisen, haben wir auch den Kopplungsgrad der Zellen in den Sphäroiden bestimmt. Die elektrische Kopplung zwischen den Zellen des Sphäroids nimmt überraschenderweise kontinuierlich bis zur vollständigen Entkopplung am 8. Tag ab. Diese Zellen (BICR/M1R-K) haben sich „differenziert“: sie sind gegenüber ionisierender Strahlung unempfindli-

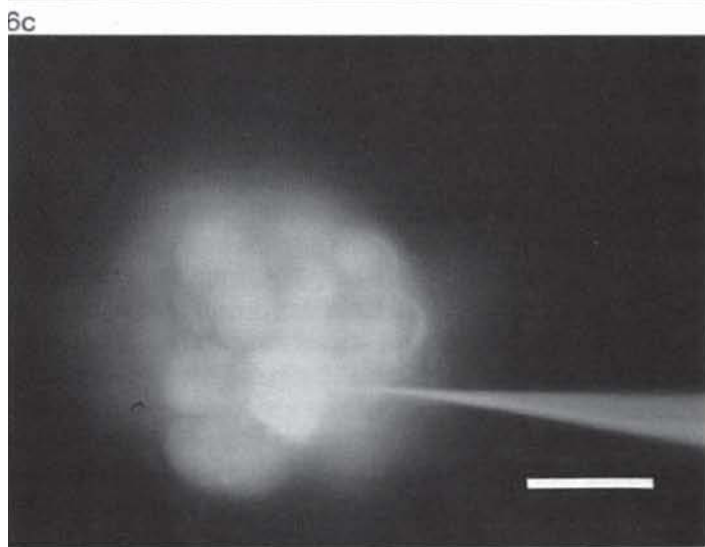
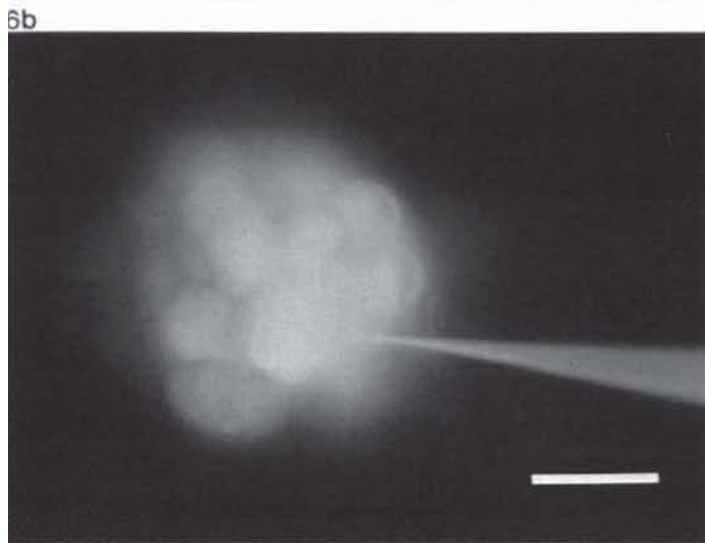
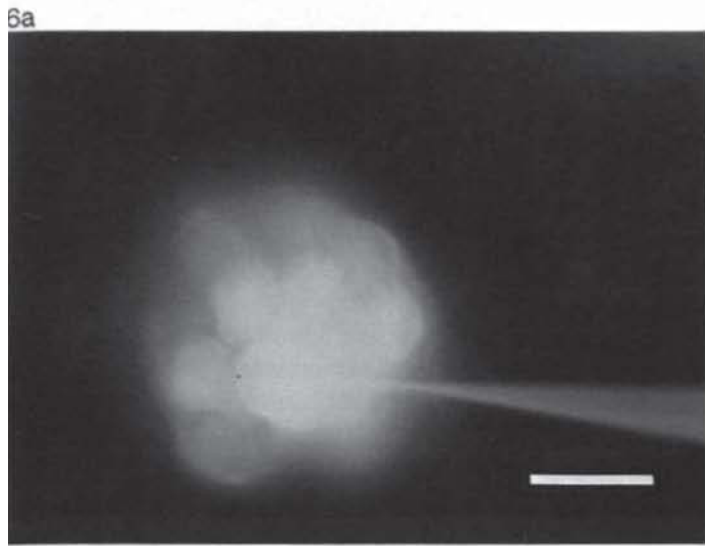


Fig. 6: Micro-iontophoresis of the fluorescent dye Lucifer yellow into a BICR/M1R-K cell of a 2 days old multicell-spheroid. 40/0.75 water immersion objective, Zeiss Standard 14 Microscope, bar: 40 μ m. a) 2 min, b) 4 min, c) 6 min after injection.

Abb. 6: Mikro-Iontophorese des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer yellow in eine BICR/M1R-K Zelle im 2 Tage alten Multizell-Sphäroid. 40/0.75 Wasserimmersions-Objektiv, Zeiss Standard 14 Mikroskop, Maßstab 40 μ m. a) 2 min, b) 4 min, c) 6 min nach Injektion.

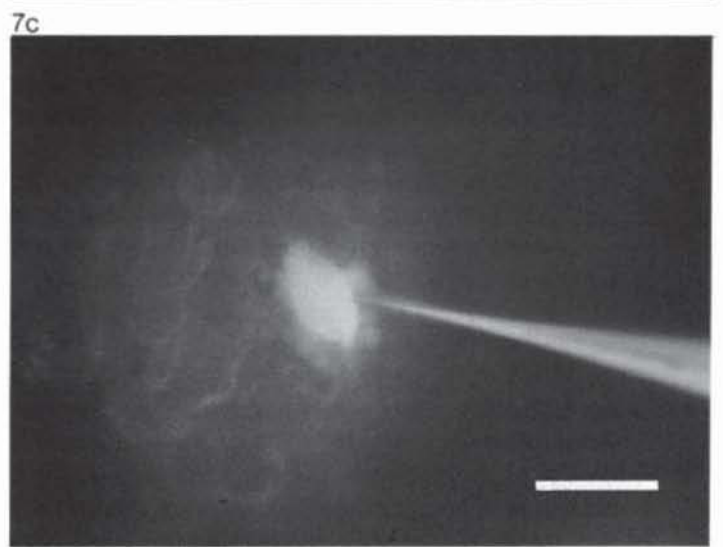
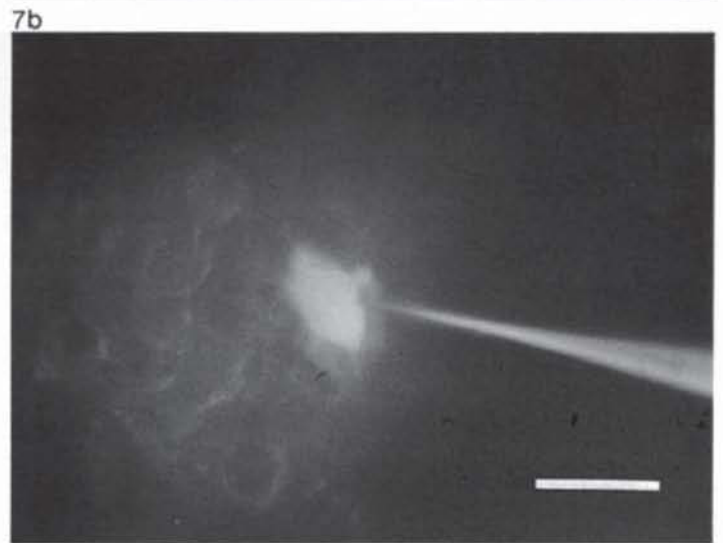
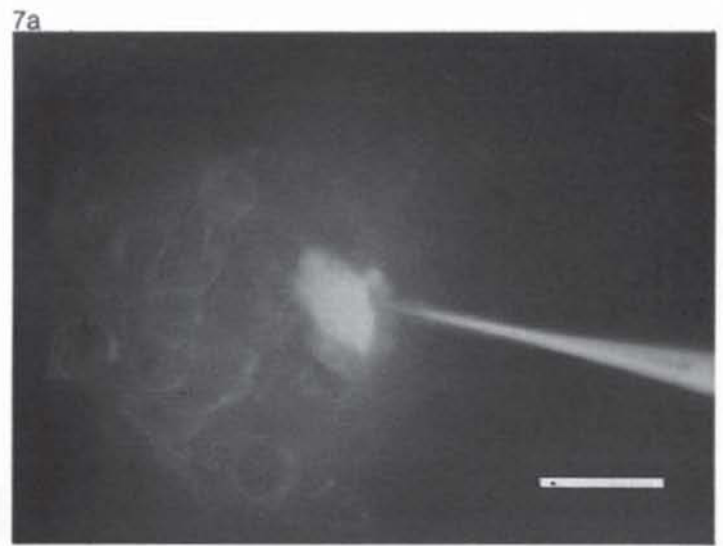


Fig. 7: Micro-iontophoresis of the fluorescent dye Lucifer yellow into a BICR/M1R-K cell of a 4 days old multicell-spheroid. 40/0.75 water immersion objective, Zeiss Standard 14 microscope, bar: 40 μ m. a) 2 min, b) 4 min, c) 6 min after injection.

Abb. 7: Mikro-Iontophorese des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer yellow in eine BICR/M1R-K Zelle im 4 Tage alten Multizell-Sphäroid. 40/0.75 Wasserimmersions-Objektiv, Zeiss Standard 14 Mikroskop, Maßstab 40 μ m. a) 2 min, b) 4 min, c) 6 min nach Injektion.

In a two-dimensionally growing monolayer the same morphological structure as *in vivo* may be detected, however, as we have shown for gap junctions, their regulatory activity may be retarded. Cells growing in three-dimensional multicell-spheroids may re-establish their regulatory activities and, therefore, match the *in vivo* conditions more closely. Multicell-spheroids enable *in vitro* investigations on differentiating systems and on interactions between normal and malignant cells, thus substituting costly *in vivo* experiments. (Translated by the authors)

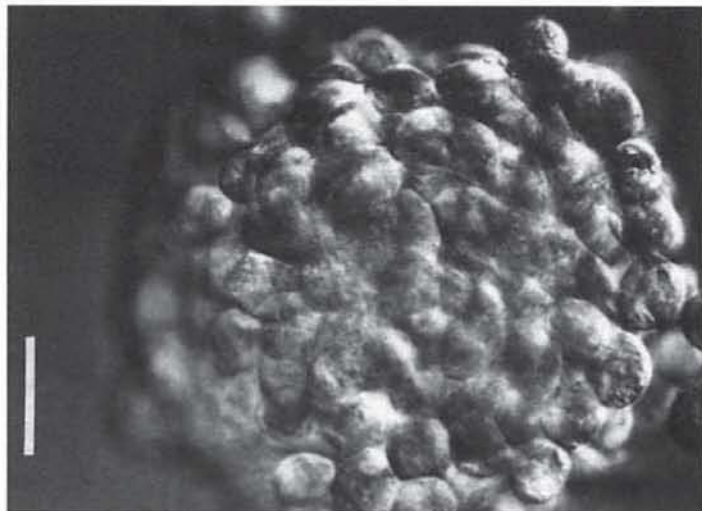


Fig. 8: A four days old multicell-spheroid. Interference contrast, 40/0.75 water immersion objective, Zeiss Standard 14 microscope, bar: 40 μ m.

Abb. 8: Ein 4 Tage alter Multizell-Sphäroid. Interferenzkontrast, 40/0.75 Wasserimmersions-Objektiv, Zeiss Standard 14 Mikroskop, Maßstab 40 μ m.

References

- [1] O. Traub and K. Willecke, *Eur. J. Cell Biol.* **27**, 31 (1982).
- [2] L. Makowski, D. L. D. Caspar, W. C. Phillips and D. A. Goodenough, *J. Cell Biol.* **74**, 629 (1974).
- [3] G. Peracchia, *Nature* **271**, 669 (1978).
- [4] P. N. T. Unwin and G. Zampighi, *Nature* **283**, 545 (1980).
- [5] G. Zampighi and S. A. Simon, *J. Supramol. Struct. Cell Biochem.* **16**, 313 (1981).
- [6] J. L. Flagg-Newton, I. Simpson and W. R. Loewenstein, *Science* **205**, 404 (1979).
- [7] H. Dertinger and D. Hülser, *Radiat. Environ. Biophys.* **19**, 101 (1981).

cher als ihre gekoppelten Geschwister im Monolayer und sie zeigen – trotz Entkopplung – im Elektronenmikroskop auch noch nach 9 Tagen Sphäroidwachstum regelmäßig und häufig gap junctions (Fig. 2–5). Es sind zwei Fälle möglich, die zu einem solchen Ergebnis führen können: entweder nimmt die lichte Weite aller gap junction Poren gleichmäßig ab, oder einzelne gap junction Plaques schließen ihre sämtlichen Poren vollständig. Allein auf Grund elektrischer Kopplungsmessungen sind diese beiden Fälle nicht zu unterscheiden. Durch Injektion von Lucifer yellow konnten wir jedoch sicherstellen, daß der erste Fall gilt: nach 2 Tagen Sphäroidwachstum lassen die gap junction Poren den Farbstoff noch passieren (Fig. 6 a, b, c), während sie zwei Tage später so eng geworden sind, daß nur noch Ionenstrom-Kopplung möglich ist, der Farbstoff aber zurückgehalten wird (Fig. 7 a, b, c).

Am Beispiel der gap junctions haben wir gezeigt, daß im zweidimensionalen Monolayer-Wachstum durchaus die gleichen morphologischen Strukturen wie *in-vivo* gefunden werden, ihre funktionellen Aktivitäten jedoch verkümmert sein können. Im dreidimensionalen *in-vitro* Wachstum werden Regulationsleistungen jedoch reaktiviert und dadurch *in-vivo* Verhältnisse besser angenähert. Daher können mit solchen Multizell-Sphäroiden Untersuchungen zur Differenzierung und Interaktion bei normalen und malignen Zellen durchgeführt werden, die bislang nur im Tierexperiment möglich waren.

Literatur

- [1] O. Traub und K. Willecke, *Eur. J. Cell Biol.* **27**, 31 (1982).
- [2] L. Makowski, D. L. D. Caspar, W. C. Phillips und D. A. Goodenough, *J. Cell Biol.* **74**, 629 (1974).
- [3] G. Peracchia, *Nature* **271**, 669 (1978).
- [4] P. N. T. Unwin und G. Zampighi, *Nature* **283**, 545 (1980).
- [5] G. Zampighi und S. A. Simon, *J. Supramol. Struct. Cell Biochem.* **16**, 313 (1981).
- [6] J. L. Flagg-Newton, I. Simpson und W. R. Loewenstein, *Science* **205**, 404 (1979).
- [7] H. Dertinger und D. Hülser, *Radiat. Environ. Biophys.* **19**, 101 (1981).