

## Elektrophysiologische Untersuchungen an Säugerzellkulturen: Der Einfluß von Bicarbonat und pH auf das Membranpotential\*

DIETER F. HÜLSER

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

Eingegangen am 8. Februar 1971

### Electrophysiological Studies on Mammalian Cells in Cultures: Influence of Bicarbonate and pH on Membrane Potentials

*Summary.* The influence of the  $\text{NaHCO}_3$ -concentration in the culture medium on the membrane potentials of cells from different permanent strains has been investigated. In Eagle-Dulbecco Medium all cells had a membrane potential of about  $-52$  mV. Reduction of  $[\text{HCO}_3^-]$  from 44 mM to 6 mM (conditions for HEPES- and Tricin-buffer) decreased the membrane potential by about 20 mV in the case of BICR/M1R-K- and 3T3-cells. In KB- and HeLa-cells the membrane potential decreased only by about 5 mV. Replacement of Eagle-Dulbecco Medium by  $\text{NaHCO}_3$  free medium of the same pH-value resulted in a new constant membrane potential of about  $-33$  mV within two minutes in BICR/M1R-K cells. The same decrease and the same new constant membrane potential was found, when the pH-value of the Eagle-Dulbecco Medium was adjusted to pH 6.3—6.5 by  $\text{CO}_2$  or  $\text{HCOOH}$ . The membrane properties of the investigated cells as well as the influence of different culture conditions on the membrane potential are discussed.

*Key-Words:* Mammalian Cell Cultures — Membrane Potentials — Bicarbonate — pH-Variation — Membrane Permeability.

*Zusammenfassung.* Es wurde der Einfluß der  $\text{NaHCO}_3$ -Konzentration des Kulturmediums auf die Höhe der Membranpotentiale von Zellen verschiedener permanenter Stämme untersucht. Alle untersuchten Zellen hatten in Eagle-Dulbecco-Medium ein Membranpotential von etwa  $-52$  mV. Erniedrigte man in diesem Medium  $[\text{HCO}_3^-]$  von 44 mM auf 6 mM (Bedingungen für HEPES- und Tricin-Puffer), so verringerte sich die Potentialdifferenz bei BICR/M1R-K- und 3T3-Zellen um etwa 20 mV. Bei KB und HeLa-Zellen betrug die Verringerung dagegen nur etwa 5 mV. Wurde das Eagle-Dulbecco-Medium gegen bicarbonatfreies Medium desselben pH-Wertes ausgetauscht, so stellte sich bei BICR/M1R-K-Zellen innerhalb von 2 min ein neues konstantes Membranpotential von etwa  $-33$  mV ein. Den gleichen Abfall und das gleiche neue konstante Membranpotential beobachtete man, wenn der pH-Wert des Eagle-Dulbecco-Mediums durch Überleiten von  $\text{CO}_2$  oder  $\text{HCOOH}$  auf pH 6.3—6.5 eingestellt wurde. Die Membraneigenschaften der untersuchten Zellen sowie der Einfluß verschiedener Kulturbedingungen auf die Höhe der Membranpotentiale werden diskutiert.

*Schlüsselwörter:* Säugerzellkulturen — Membranpotentiale — Bicarbonat — pH-Variation — Membranpermeabilität.

\* Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Einige der von Good et al. [11] 1966 beschriebenen zwitterionischen Wasserstoff-Ionen-Puffer haben inzwischen Verwendung bei der in vitro-Züchtung von Säugerzellen gefunden. Mehrere Autoren [5, 9, 24, 29] berichteten bereits über Vorzüge, die die Puffersubstanzen Hepes und Tricin gegenüber dem herkömmlichen biphasischen  $\text{NaHCO}_3\text{—CO}_2$ -Puffer besitzen. Zu diesen Vorzügen zählt ihr optimaler Pufferbereich, der genau dem für die Zellen physiologisch günstigsten pH-Bereich entspricht. Hepes hat bei  $37^\circ\text{C}$  einen  $pK_a$ -Wert von 7,31 und ein  $pK_a/^\circ\text{C}$  von  $-0,014$ ; die entsprechenden Werte für Tricin sind 7,79 und  $-0,021$ . Hinzu kommt, daß bei Verwendung dieser Puffer die Zellen nicht in einem abgeschlossenen  $\text{CO}_2$ -Luftgemisch kultiviert werden müssen, sondern in normaler Luftatmosphäre gehalten werden können. Daher wird das Nährmedium meist mit geringer  $\text{NaHCO}_3$ -Konzentration angesetzt.

Die von Good beschriebenen Puffer scheinen für elektrophysiologische Untersuchungen an Zellkulturen besonders geeignet, da man mit ihnen während der Messungen unter dem Mikroskop ohne zusätzlichen Aufwand für Begasung den pH-Wert konstant halten kann. Bei den hier beschriebenen Membranpotentialmessungen in Hepes-gepuffertem Medium ergaben sich jedoch bei 2 von 4 untersuchten Zellstämmen wesentlich geringere Potentialdifferenzen als bei Verwendung von  $\text{NaHCO}_3\text{—CO}_2$  gepuffertem Medium. Versuche zur Klärung dieses Effektes ergaben, daß hauptsächlich die geringere  $\text{NaHCO}_3$ -Konzentration für die Erniedrigung der Potentialdifferenz verantwortlich gemacht werden muß.

## Material und Methoden

### 1. Zellkulturen

Die Messungen wurden an Monolayerkulturen von 4 verschiedenen permanenten Zellstämmen durchgeführt:

a) den fibroblastoiden Zellen des Stammes 3T3 (Abb. 1a) (Maus-Embryo-Zellen [28]).

b) den fibroblastoiden Zellen des Stammes BICR/M1R-K (Abb. 1b) (ein transplantabler Mammatumor der weiblichen Marshall-Ratte [19, 25], der von Rajewsky [20] 1969 in Kultur gebracht wurde). Erst nach der 21. Passage wurde dieser Stamm für die beschriebenen Versuche benutzt.

c) den epitheloiden Zellen des Stammes KB (Abb. 1c) (epidermoides menschliches Carcinom [4]).

d) den epitheloiden Zellen des Stammes HeLa (Abb. 1d) (menschliches Cervixcarcinom [10]).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in leicht modifiziertem Eagle-Dulbecco-Medium mit 10% Kälberserum in befeuchteten Brutschränken und einer Atmosphäre von 5%  $\text{CO}_2$  in Luft (pH 7,4). Für die beschriebenen Versuche wurde die Zusammensetzung des normalen bicarbonathaltigen Mediums variiert (s. Tab. 1). Zum Einstellen der Puffer Hepes und Tricin wurde NaOH verwendet. Die entsprechende  $\text{Na}^+$ -Ionen-Konzentration ist in Tab. 1 berücksichtigt.

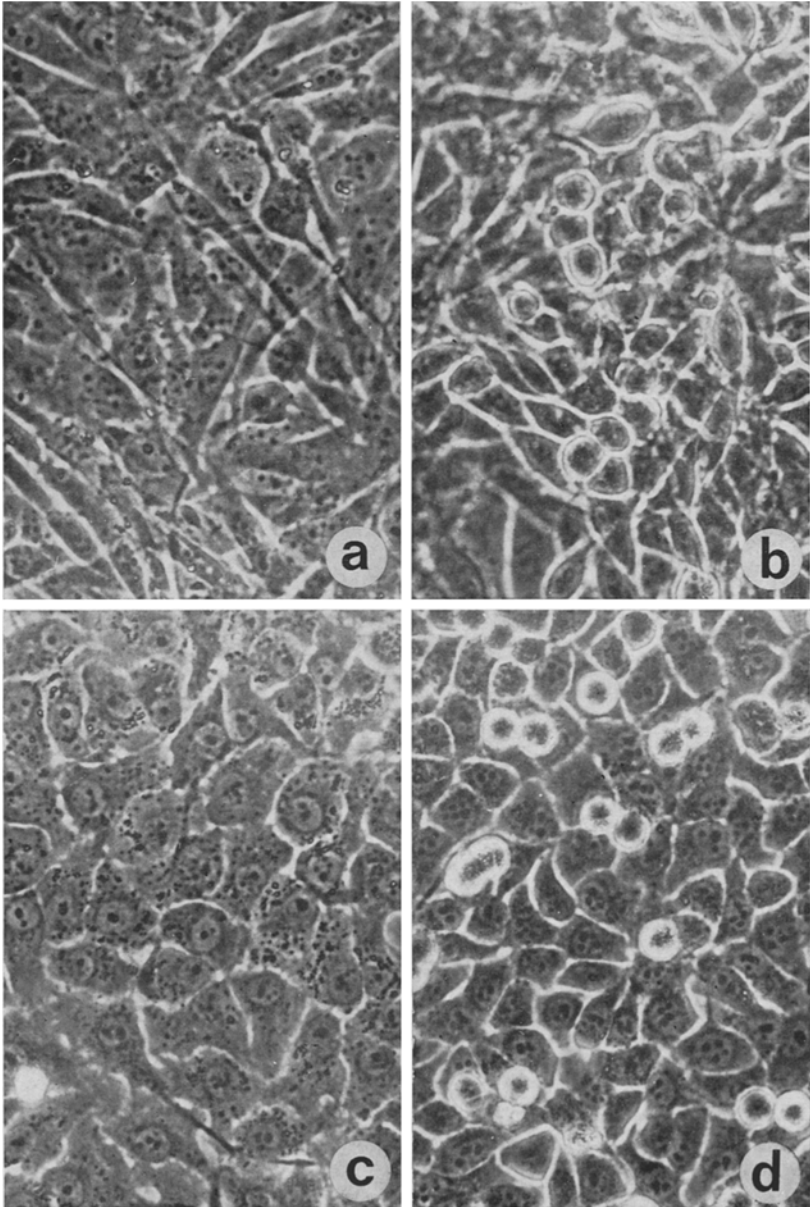


Abb.1. Untersuchte Zellstämme. a 3T3-Zellen; b BICR/M1R-K-Zellen; c KB-Zellen; d HeLa-Zellen. Vergrößerung: 300 ×

Tabelle 1. Ionen-Konzentrationen (mM) einiger Komponenten des Eagle-Dulbecco-Mediums („Bicarbonat-Medium“) und der untersuchten Variationen

Puffersystem	Na <sup>+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hepes	Tricin	Lactat <sup>-</sup>
Bicarbonat	154	44	0	0	0
Hepes (Serva)	126	6	30	0	0
Tricin (Merck)	126	6	0	50	0
Hepes-Na-Lactat	154	6	30	0	28

Bei allen Nährmedien waren die Ionen-Konzentrationen (mM) folgender Komponenten konstant: K<sup>+</sup>: 5,4; Ca<sup>++</sup>: 2,4; Mg<sup>++</sup>: 1; Cl<sup>-</sup>: 118; HPO<sub>4</sub><sup>---</sup>: 1; SO<sub>4</sub><sup>---</sup>: 1.

In einigen Fällen wurde das Medium vor oder während der Messungen gegen Lösungen („Salz-Glucose-Lösungen“) ausgetauscht, die neben den oben aufgeführten Komponenten noch Glucose (4,5 g/l) und Haemaccel (Behring) (3,5 g/l) enthielten.

Bei den Zellkulturen wurde das Medium in Abständen von 3 Tagen gewechselt. Sie wurden passagiert, sobald ein dichter Zellrasen gewachsen war. Dazu wurden die Zellen nach Ablösen durch eine 1–2 min Behandlung mit 0,25%iger Trypsinlösung (in Ca-Mg-freier, isotoner Salzlösung) bei 37°C in Bicarbonat-Medium gewaschen und zur Stammhaltung in Glasflaschen bzw. für die Versuche in Plastikschalen (50 mm Ø, Greiner oder Falcon) ausgesät. Erst nach der Aussaat in Plastikschalen (1 × 10<sup>5</sup> Zellen/Schale; 5 ml Medium) kamen die Zellen mit den jeweiligen Versuchsmedien in Kontakt. Die Membranpotentialmessungen wurden zwischen dem 2. und 4. Tag nach Aussaat der Zellen bei Zimmertemperatur durchgeführt, ohne daß zuvor ein Mediumwechsel erfolgte. In einigen Fällen wurde das Bicarbonat-Medium vor oder während der Messungen ausgetauscht. Dazu wurde das alte Medium mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das neue Medium (bzw. eine Salz-Glucose-Lösung) aus einer Spritze oder einem höherstehenden Vorratsgefäß nachgefüllt.

## 2. Elektrische Messungen

Zur Messung der Membranpotentiale benutzten wir Ling-Gerard-Elektroden [15], die mit einem vertikalen Ziehgerät (David Kopf, Modell 700 C) aus Pyrex-Capillaren (Corning 234440, Außendurchmesser 2 mm) gezogen worden waren. Durch Unterdruck wurden die Elektroden mit Methanol und anschließend durch Diffusion mit einer Mischung aus 3 M KCl und 2 mM K-Citrat gefüllt. Nach Politoff et al. [18] haben Elektroden mit dieser Füllung geringere Spitzenpotentiale und niedrigere Widerstände. Zur Messung der Membranpotentiale kamen nur Elektroden mit Spitzenpotentialen ≤ 5 mV und einem Widerstand von 30–40 MΩ in Frage. Nach Frank u. Becker [6] und Castro u. Machado [3] entspricht das einem Spitzendurchmesser < 0,5 µm. Die Elektroden waren in Plexiglashalter eingespannt und über eine 3 M KCl-Lösung mit einer Kalomelektrode verbunden.

Als Gleichspannungs-Verstärker diente ein Elektrometer mit Kathodenfolger-Eingang (Keithley, Mod. 605). Die Membranpotentiale wurden auf einem Oscillographen (Tektronix 564) beobachtet und auf einem Schreiber (Graphirac, Sefram) registriert. Zur fortlaufenden Widerstandskontrolle der Elektrode während der Membranpotentialmessungen war ein modifizierter Tektronix 601/161/162 Puls-generator über einen Widerstand (10 GΩ) an den Verstärker gekoppelt [13]. Die konstanten Stromimpulse einer Frequenz von 0,1 Hz verursachten einen Spannungs-

abfall am Meßkreis. Dieser Spannungsabfall war dem Elektrodenwiderstand direkt proportional und konnte mit den Membranpotentialen registriert werden.

Über eine Agar-Ringer-Brücke, die das Kulturmedium mit einer 3 M KCl-Lösung und einer Kalomelektrode (K 100 Radiometer) verband, war für eine symmetrische Ableitung aus dem Medium gesorgt. Die Spitzenpotentiale der Elektroden konnten vor Beginn der Membranpotentialmessungen mit dem Gleichspannungs-Verstärker kompensiert werden.

Während der Messungen wurden die Kulturen unter einem Mikroskop (Zeiss Standard RA) mit 40fachen Wasserimmersionsobjektiven im Phasen- oder Interferenzkontrast beobachtet. Dazu mußten die Metallfassungen der Objektive mit einer Mischung aus Bienenwachs und Kolophonium gegen das Medium isoliert werden [27]. Dies führte zwar zu einer Verringerung des Arbeitsabstandes und damit zu einem sehr flachen Einstichwinkel, hatte aber den Vorteil, daß auf das Aufbringen einer weichen Schicht auf dem Schälchenboden zum Schutze der Elektrodenspitze verzichtet werden konnte. Um eine freie Führung der Elektroden unter dem Objektiv zu gewährleisten, wurde der Rand der Kulturschalen mit einem LötKolben teilweise entfernt.

### Ergebnisse

Alle 4 untersuchten Zellstämme wuchsen in HEPES- und Tricin-Medium ebensogut wie in Bicarbonat-Medium. Im Lichtmikroskop konnten morphologische Unterschiede nicht festgestellt werden. Die gemessene Verdopplungszeit  $t_D$  war für die BICR/M1R-K-Kulturen in allen 3 Medien gleich groß ( $t_D = 18.6$  Std). Bei den anderen Zellstämmen wurden die Verdopplungszeiten nicht ermittelt, sie liegen aber ebenfalls in der Größenordnung von 20 Std.

Bei allen Zellen konnte zunächst eine kleine positive Potentialdifferenz von etwa 3–5 mV gemessen werden, wenn man die Elektrode langsam an die Zelle heranführte. Erst nach dem Durchstechen der Membran wurden negative Potentialdifferenzen registriert. Die kontinuierliche Widerstandskontrolle der Elektrode ergab bei den fibroblastoiden Zellen der Stämme BICR/M1R–K und 3T3 im Kulturmedium und innerhalb der Zelle identische Werte. Bei den epitheloiden Zellen der Stämme KB und HeLa waren die mit dem Membranpotential registrierten Spannungsabfälle der Widerstandsmessungen meist etwa 20% höher als die im Kulturmedium gemessenen. Dies läßt den Schluß zu, daß die Membranen der KB- und HeLa-Zellen einen höheren Widerstand besitzen als die Membranen der BICR/M1R-K- und 3T3-Zellen.

#### *Membranpotentialmessungen in verschiedenen Medien*

Der Mittelwert der gemessenen Membranpotentiale wurde unter der Annahme einer symmetrischen Verteilung der Werte ermittelt. Als Streumaß ist der Standard-Fehler des Mittels angegeben.

Die Zellen aller 4 untersuchten Stämme hatten im Bicarbonat-Medium keine signifikant unterschiedlichen Membranpotentiale. Die Mittelwerte aus zahlreichen Messungen lagen für alle Stämme bei etwa

Tabelle 2. Membranpotentiale verschiedener Zellen in unterschiedlichen Nährmedien

Zellstamm	Medium	Membranpotential <sup>a</sup> (mV)	Standardfehler (mV)	Anzahl der Messungen
BICR/M1R-K	Bicarbonat	52,47	0,33	1013
	Hepes	35,05	0,44	294
	Tricin	35,76	0,46	443
	Hepes-Na-Lactat	38,09	0,39	289
3T3	Bicarbonat	51,71	0,58	214
	Hepes	33,43	0,31	259
KB	Bicarbonat	53,65	0,59	262
	Hepes	49,36	0,65	207
HeLa	Bicarbonat	52,29	0,79	104
	Hepes	46,42	0,73	147

<sup>a</sup> Zellinneres negativ.

—52 mV. Die Ergebnisse sämtlicher Potentialmessungen sind in Tab. 2 aufgeführt. Wuchsen die Zellen der 3T3- und BICR/M1R-K-Stämme statt in Bicarbonat-Medium in Hepes-Medium, so hatten die Zellen wesentlich niedrigere Membranpotentiale (—33,43 mV bzw. —35,05 mV). BICR/M1R-K-Zellen wurden auch nach Kultivierung im Tricin-Medium gemessen; sie hatten ebenso niedrige Membranpotentiale (—35,76 mV) wie nach Kultivierung in Hepes-Medium. Die Verteilung der gemessenen Membranpotentiale im Bicarbonat- und Hepes-Medium ist für BICR/M1R—K-Zellen in Abb. 2 dargestellt. Die Membranpotentiale der Zellen der Stämme KB und HeLa waren im Hepes-Medium weniger drastisch erniedrigt (—48,36 mV bzw. —46,42 mV).

Die Experimente zur Erklärung der unterschiedlichen Membranpotentiale in Bicarbonat- und Hepes-Medium wurden ausschließlich mit BICR/M1R-K-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst in solchen Medien gezüchtet und gemessen, die gegenüber dem Bicarbonat-Medium nach Möglichkeit nur in einer Komponente variiert worden waren. Um zu klären, ob Hepes alleine eine Erniedrigung der Potentialdifferenz bewirkt, wurden dem normalen Bicarbonat-Medium 30 mM Hepes zugesetzt und die Zellen mit und ohne CO<sub>2</sub>-Begasung gezüchtet. Unter diesen Bedingungen konnte kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Membranpotentiale gegenüber den im Bicarbonat-Medium gezüchteten Zellen festgestellt werden. Dasselbe gilt, wenn dem Medium Tricin anstelle von Hepes zugesetzt wird.

Das Hepes-Medium hat neben seiner geringeren HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ionen-Konzentration auch eine geringere Na<sup>+</sup>-Ionen-Konzentration als das normale Medium. Darum wurde im Hepes-Medium die Na<sup>+</sup>-Ionen-Konzentration durch Zusatz von Na-Lactat auf die ursprüngliche Höhe

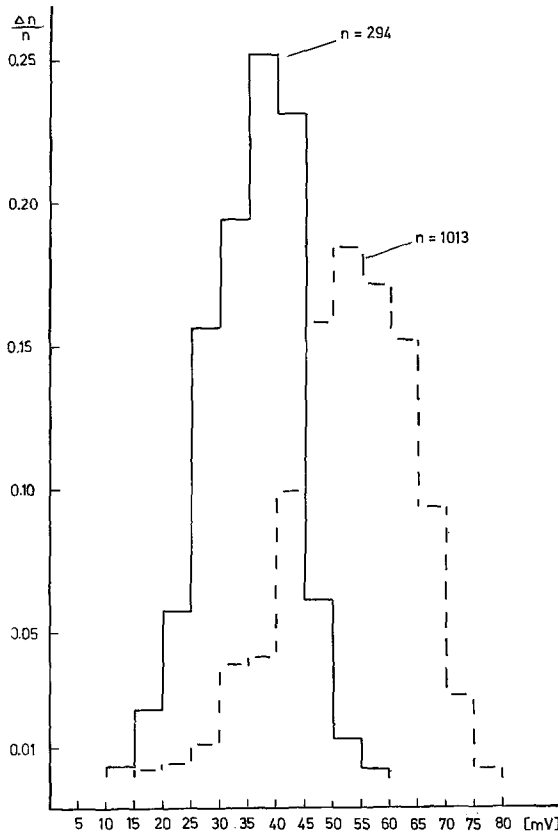


Abb.2. Verteilung der Membranpotentiale von BICR/M1R-K-Zellen in Eagle-Dulbecco-Medium ( $\bar{x} = -52,47$  mV, Anzahl der Messungen  $n = 1013$ ) und in Hepes-Medium ( $\bar{x} = -35,05$  mV,  $n = 294$ ). Abszisse: Potentialdifferenz in mV (Zellinneres negativ). Ordinate: relative Häufigkeit der gemessenen Potentialdifferenz

gebracht. Die Werte für die Membranpotentiale ( $-38,09$  mV) der in diesem Medium gezüchteten BICR/M1R-K-Zellen lagen dann geringfügig über den für Hepes-Medium bestimmten Werten, aber immer noch ganz deutlich unter denen des Bicarbonat- und des Bicarbonat-Hepes-Mediums.

#### *Einfluß der pH-Änderung auf die Membranpotentiale*

Die Untersuchungen an BICR/M1R-K-Zellen ergaben ferner, daß der pH-Wert des Bicarbonat-Mediums in einem weiten Bereich (pH 6,5 bis pH 8,4) geändert werden konnte, ohne daß die gemessenen Potentialdifferenzen dabei einen deutlichen Trend zu höheren oder niederen

Werten erkennen ließen. Über denselben pH-Bereich hinweg blieb auch das Membranpotential einzelner Zellen konstant. Es änderte sich in einzelnen Zellen 1 Std lang nicht, während in dieser Zeit durch den niedrigeren  $\text{CO}_2$ -Druck der Normalatmosphäre der pH-Wert von 7,4 auf 8,4 anstieg. Erhöhte man dagegen den  $\text{CO}_2$ -Druck über dem Bicarbonat-Medium durch Überleiten eines kräftigen  $\text{CO}_2$ -Stromes, dann trat bei einem pH-Wert von 6,3–6,5 eine plötzliche Verringerung der Potentialdifferenz auf und es stellte sich ein neues, konstantes Membranpotential von etwa  $-30$  bis  $-35$  mV ein. Der Verlauf ist ähnlich der in Abb. 5 gezeigten plötzlichen Änderung der Potentialdifferenz nach Austausch des Bicarbonat-Mediums gegen eine bicarbonatfreie Salz-Glucose-Lösung. Dieser Effekt trat auch auf, wenn die pH-Erniedrigung durch vorsichtiges Überleiten von  $\text{HCOOH}$  herbeigeführt wurde. Ließ man diese Kulturen mit niedrigem pH-Wert 1 Std lang stehen, so stieg der pH-Wert wieder auf etwa 7,4 an und es konnten wieder normale Potentialdifferenzen ( $-52$  mV) gemessen werden. Wurde saures Medium (pH 6,3) gegen normales Bicarbonat-Medium (pH 7,4) ausgetauscht, so zeigten die Zellen sofort wieder normale Potentialdifferenzen. Zellen, die in Hepes-Medium gezüchtet worden waren, zeigten nach Erniedrigung des pH-Wertes auf 6,3–6,5 keine wesentliche Verringerung der Potentialdifferenz.

#### *Änderung der Membranpotentiale nach Mediumwechsel*

Obwohl Schwankungen des pH-Werts im physiologischen Bereich keinen Einfluß auf die Potentialdifferenzen hatten, wurde bei den hier beschriebenen Experimenten dennoch darauf geachtet, daß stets nur Medien mit gleichem pH-Wert ausgetauscht wurden.

Ersetzte man in einer BICR/M1R-K-Kultur, die 3 Tage in Bicarbonat-Medium gezüchtet worden war, das Medium durch Hepes-Medium, so stellte sich innerhalb von 1–2 min eine niedrigere Potentialdifferenz (Abb. 3) ein. Der neue Wert entsprach dem Membranpotential der in Hepes-Medium kultivierten Zellen. Im umgekehrten Fall, d. h. wenn Hepes-Medium durch Bicarbonat-Medium ersetzt wurde, ergab sich ein langsamer Anstieg der Potentialdifferenz (Abb. 4). Erst nach mindestens 20 min hatten die Zellen wieder die für Bicarbonat-Medium charakteristischen Membranpotentiale erreicht.

Der zeitliche Verlauf der Potentialdifferenzänderungen wird deutlicher, wenn der Mediumwechsel während der Membranpotentialmessung einer Zelle geschieht. Abb. 5 zeigt einen solchen Versuch, bei dem ein Ersatz des Mediums durch Salz-Glucose-Lösungen erfolgte. Der Austausch der Lösungen dauerte etwa 1 min. Man erkennt auch hier deutlich, daß sich die geringere Potentialdifferenz nach Zugabe einer  $\text{NaHCO}_3$ -freien Salz-Glucose-Lösung wesentlich schneller einstellt, als die alte



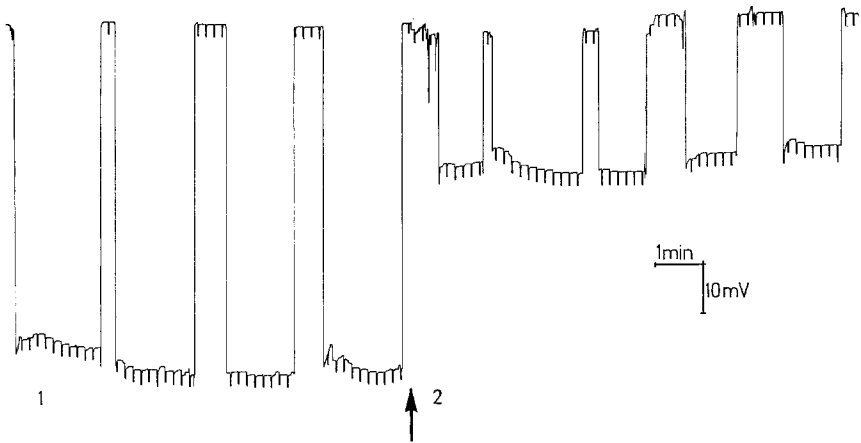


Abb.3. Membranpotentiale der BICR/M1R-K-Zellen. 1 Eagle-Dulbecco-Medium (44 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7,5); Pfeil: Mediumwechsel, Dauer ca. 2 min. 2 Hepes-Medium (6 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7,5). Die kontinuierlichen Impulse dienten zur Kontrolle des Elektrodenwiderstandes

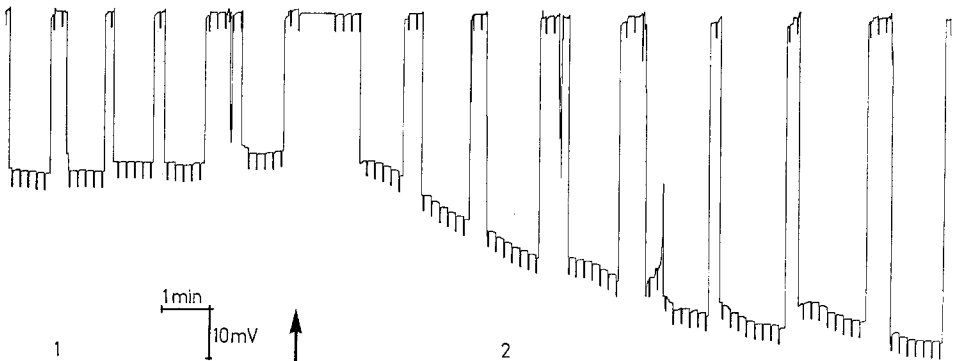


Abb.4. Membranpotentiale der BICR/M1R-K-Zellen. 1 Hepes-Medium (6 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7,5). Pfeil: Mediumwechsel, Dauer ca. 2 min. 2 Eagle-Dulbecco-Medium (44 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7,5). Die kontinuierlichen Impulse dienten zur Kontrolle des Elektrodenwiderstandes

Potentialdifferenz nach Zugabe einer Salz-Glucose-Lösung mit 44 mM  $\text{NaHCO}_3$ . Wurde während einer Membranpotentialmessung in einer Zelle das Medium gegen eine Salz-Glucose-Lösung mit gleicher Ionenkonzentration und gleichem pH-Wert ausgetauscht, war keine Änderung der Potentialdifferenz festzustellen.

Diese Versuche zeigen, daß sich die Membranpotentiale von BICR/M1R-K-Zellen sehr rasch auf neue Mediumbedingungen einstellen können. Die folgenden Experimente wurden daher nach Austausch des

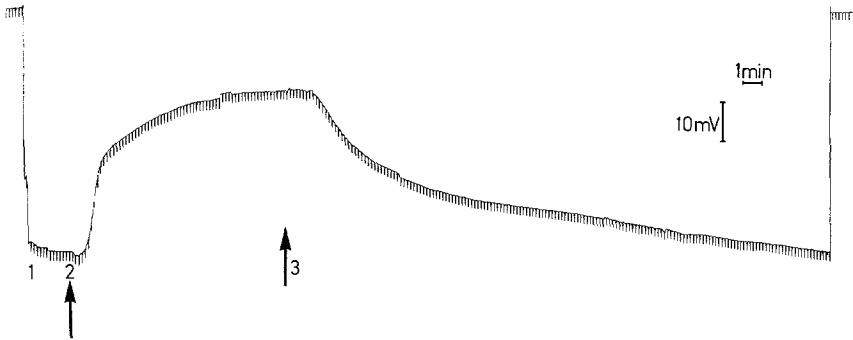


Abb. 5. Membranpotentialmessung in einer BICR/M1R-K-Zelle während zweimaligen Mediumwechsels. 1 Eagle-Dulbecco-Medium (44 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 7,6). 2 Beginn des Austausches gegen bicarbonatfreie Salz-Glucose-Lösung (pH 7,6). 3 Beginn des Austausches gegen Salz-Glucose-Lösung mit 44 mM  $\text{NaHCO}_3$  (pH 7,6). Dauer des Austausches jeweils etwa 1 min. Die kontinuierlichen Impulse dienen zur Kontrolle des Elektrodenwiderstandes

Bicarbonat-Mediums gegen das zu prüfende Medium durchgeführt. Es war zunächst noch festzustellen, welchen Einfluß unterschiedliche  $\text{Na}^+$ -Ionen-Konzentrationen auf die Membranpotentiale haben. Wie oben bereits beschrieben, haben in Hepes-Na-Lactat-Medium gezüchtete BICR/M1R-K-Zellen noch immer ein deutlich verringertes Membranpotential. Um einen Einfluß von Lactat-Ionen auszuschließen, wurde daher die  $\text{Na}^+$ -Ionen-Konzentration des Hepes-Mediums durch Zusatz von NaCl korrigiert. Mit diesem Medium ergaben sich wiederum Potentialdifferenzen (ca.  $-38$  mV), die den in Hepes-Na-Lactat-Medium gemessenen entsprachen. Ein eventueller Einfluß der erhöhten Cl-Ionen-Konzentration wurde danach nicht mehr geprüft.

Nachdem somit gezeigt war, daß die bei BICR/M1R-K-Zellen gefundenen geringeren Membranpotentiale in Hepes-Medium auf die geringere  $\text{NaHCO}_3$ -Konzentration zurückgeführt werden können, wurde der Einfluß unterschiedlicher  $\text{NaHCO}_3$ -Konzentrationen auf die Potentialdifferenz der Zellen untersucht. Dazu wurde vor Beginn des Versuchs das Bicarbonat-Medium gegen Salz-Glucose-Lösungen ausgetauscht, die mit 30 mM Hepes gepuffert waren. Tab. 3 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Die Werte für 6 und 44 mM  $\text{NaHCO}_3$  sind dabei aus Tab. 2 entnommen.

Nach Austausch des Bicarbonat-Mediums gegen ungepufferte oder Acetat-gepufferte, bicarbonatfreie Salz-Glucose-Lösungen wurden ebenfalls Membranpotentiale um  $-33$  mV gemessen. Entsprechende Salz-Glucose-Lösungen mit 44 mM  $\text{NaHCO}_3$  veränderten dagegen die normale Höhe der Membranpotentiale nicht. Bei Austauschversuchen mit Phos-

Tabelle 3. *BICR/MIR-K-Zellen: Abhängigkeit des Membranpotentials von der NaHCO<sub>3</sub>-Konzentration im Kulturmedium*

NaHCO <sub>3</sub> (mM)	Membranpotential <sup>a</sup> (mV)	Standardfehler (mV)	Anzahl der Messungen
0	32,59	0,37	205
6	35,05	0,44	294
20	41,28	0,38	164
30	42,95	0,35	148
44	52,47	0,33	1013

<sup>a</sup> Zellinneres negativ.

phatpuffer konnten unter bestimmten Bedingungen transiente periodische Schwankungen des Membranpotentials hervorgerufen werden [14].

### Diskussion

Zellen vom Typ der in Abb. 1a und 1b gezeigten spindelförmigen Form werden oft als fibroblastoid, die in Abb. 1c und 1d gezeigten runden Zellen als epitheloid bezeichnet. Es muß jedoch bemerkt werden, daß es durch Veränderung des Medium-pH oft möglich ist, spindelförmige Zellen in runde zu verwandeln und umgekehrt [7]. In den vorliegenden Untersuchungen hatten die Zellen vom epitheloiden Typ einen wesentlich höheren Membranwiderstand als die fibroblastoiden, und ihre Membranpotentiale konnten durch Veränderungen der NaHCO<sub>3</sub>-Konzentration kaum beeinflußt werden. Dagegen ergab sich für die fibroblastoiden Zellen eine deutliche Abhängigkeit der Membranpotentiale von der NaHCO<sub>3</sub>-Konzentration des Kulturmediums.

Ein weiterer Unterschied zwischen diesen beiden Zelltypen scheint in ihrer Kommunikationsfähigkeit mit Nachbarzellen zu liegen. Wie in einigen Messungen der Ionenströme zwischen benachbarten Zellen mit der von Loewenstein u. Kanno [16] angegebenen Methode festgestellt wurde, weisen die epitheloiden Zellen nur eine geringe, die fibroblastoiden Zellen jedoch eine gute intercelluläre Kommunikation auf. Dies bestätigt Befunde von Furshpan u. Potter [8] sowie von Borek, Higashino u. Loewenstein [1], die gezeigt haben, daß bestimmte transformierte epitheliale Zellen durch eine geringe oder fehlende intercelluläre Kommunikation charakterisiert sind, während für transformierte wie auch für normale Fibroblasten ein guter Ionenstromdurchgang gefunden wurde.

Der Wert von etwa  $-52$  mV für die Membranpotentiale sämtlicher untersuchter Zellstämme (auch für primäre Rattenembryonalzellen ergaben sich Werte in dieser Größenordnung) scheint für das verwendete Bicarbonat-Medium charakteristisch zu sein. Dieser Wert liegt höher als

die meisten in der Literatur angegebenen Werte für Kulturen gleicher oder ähnlicher Zellen [2, 21, 22, 23, 26]. Mit Elektroden eines zu niedrigen Widerstandes (ca. 10–20 M $\Omega$ ) infolge eines größeren Spitzendurchmessers haben auch wir niedrigere Werte gemessen. Dieser Effekt ist möglicherweise durch Verletzungen der punktierten Zellen zu erklären. Die hohe Vergrößerung mit einem 40fachen Objektiv, die immer eine gute Kontrolle der jeweils gemessenen Zelle ermöglichte, sowie die Beschränkung auf Zellen, deren Membranpotential mindestens 1 min lang konstant war, erlaubten es, bei den vorliegenden Messungen alle diejenigen Zellen auszusondern, welche sich während der Meßzeit morphologisch veränderten oder nicht optimal punktiert worden waren.

Abb. 2 zeigt, daß keine genaue symmetrische Verteilung der Membranpotentiale vorliegt, sondern daß die Verteilung zu den niedrigen Werten hin breiter ist. Dies kann seine Ursache darin haben, daß die Zellmembranen durch die zur Passage der Kulturen erforderliche Trypsin-Behandlung unterschiedlich stark verändert wurden. Solche Änderungen der Permeabilität nach Trypsinbehandlung sind beschrieben worden [12]. Zellen, die bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert worden waren, hatten in den ersten Passagen nach dem Auftauen ebenfalls stets niedrigere Membranpotentiale als Zellen aus Langzeitpassagen. Solche Kulturen wurden daher nicht zu den Untersuchungen verwendet.

Da Messungen aus vielen Kulturen zusammengefaßt wurden, ist die insgesamt breite Verteilung der Werte für die Membranpotentiale verständlich. Würden nur Vielfachmengen an einer bestimmten Kultur berücksichtigt, ergäbe sich eine wesentlich engere Verteilung. In dünner bewachsenen (jüngeren) Kulturen und auch an dünner bewachsenen Stellen älterer Kulturen wurden stets geringere Membranpotentiale gemessen als an dicht liegenden Zellen. Für die Höhe der Membranpotentiale scheint daher die Dichte der Zellen pro Flächeneinheit und nicht eine eventuelle Zellschädigung verantwortlich zu sein (vgl. [23]). Beim Einstich der Elektrode ins Cytoplasma, bzw. in den Zellkern wurden Unterschiede in der Höhe der Membranpotentiale nicht beobachtet.

Nach den Ergebnissen der hier beschriebenen Versuche (vgl. Abb. 3, 4, 5) ist nicht daran zu zweifeln, daß die Höhe der Membranpotentiale von BICR/M1R-K- und 3T3-Zellen von der NaHCO<sub>3</sub>-Konzentration des Mediums abhängig ist. Da es nicht möglich war, die tatsächliche Bicarbonatkonzentration in den jeweils gemessenen Zellkulturen zu bestimmen, kann eine genaue Relation zwischen Membranpotential und Bicarbonat- (bzw. CO<sub>2</sub>-) Konzentration nicht angegeben werden. Die genaue Bestimmung der Bicarbonatkonzentration im Medium würde eine Messung des aktuellen pH-Werts sowie des CO<sub>2</sub>-Partialdrucks des Gasraumes über dem Medium während der Potentialmessung erfordern.

Nur bei Kenntnis dieser beiden Größen kann die tatsächliche  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration bestimmt werden. Das zugegebene  $\text{NaHCO}_3$  wird stets vollständig dissoziiert sein und die Dissoziation von  $\text{H}_2\text{CO}_3$  zurückdrängen. In Tab. 3 sind daher nur die Konzentrationen des zugegebenen  $\text{NaHCO}_3$  angegeben, während die tatsächliche  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration durch das  $\text{CO}_2$  im Gasraum über den Kulturen jeweils größer sein muß. Die beiden Good-Puffer [11] Hepes und Tricin haben als solche keinen Einfluß auf die Höhe der gemessenen Membranpotentiale.

Im Zusammenhang mit der für BICR/M1R-K- und 3T3-Zellen gefundenen Abhängigkeit der Membranpotentiale und damit auch der Membranpermeabilität von der Bicarbonatkonzentration interessiert ein Befund von Maude [17], nach dem Zellen des proximalen Tubulus in  $\text{HCO}_3^-$ -freiem Medium einen signifikant niedrigeren K-Transport zeigen.

Die Änderung der Permeabilität läßt sich mit Hilfe einer von Woodbury [30] angegebenen Gleichung abschätzen.

$$E_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{p[\text{Na}^+]_o + [\text{K}^+]_o}{[\text{Na}^+]_o + [\text{K}^+]_o} \quad [V]$$

( $E_M$  = Membranpotential,  $R$  = Gaskonstante,  $T$  = absolute Temperatur,  $F$  = Faraday-Konstante,  $p = \frac{p_{\text{Na}}}{p_{\text{K}}}$  Permeabilitätskoeffizient,  $[\text{K}^+]_o$ ,  $[\text{Na}^+]_o$  =  $\text{K}^+$ - bzw.  $\text{Na}^+$ -Konzentration im Medium.)

Diese Beziehung hat gegenüber der Goldman-Gleichung den Vorteil, daß neben dem gemessenen Membranpotential nur die genau bekannten Ionenkonzentrationen des Außenmediums für die Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten benötigt werden. Für in Bicarbonat-Medium gezüchtete Zellen ergibt sich aus der Woodbury-Gleichung ein Permeabilitätskoeffizient von  $p = 0,1$ ; für Zellen in bicarbonatfreiem Medium ist  $p = 0,25$ . Ähnliche Werte ergeben sich auch, wenn man in die Goldman-Gleichung für  $[\text{Na}^+]_i = 40 \text{ mM}$  und  $[\text{K}^+]_i = 140 \text{ mM}$  einsetzt. Wie die vorliegenden Messungen an 4 verschiedenen Zellstämmen zeigen, gilt diese Abhängigkeit des Permeabilitätskoeffizienten von der Bicarbonatkonzentration jedoch nicht grundsätzlich, sondern sie ist abhängig vom gemessenen Zelltyp. Genaue Messungen der intracellulären  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentration von Zellen in Bicarbonat- und Hepes-Medium sind nötig, um zu klären, ob sich die aus dem Befund von Maude [17] resultierende Vermutung bestätigt, daß auch hier hauptsächlich die K-Permeabilität verringert worden ist.

Mein Dank gilt Herrn Dr. M. F. Rajewsky für die Bereitstellung der Zellkulturen und Herrn Dr. E. Frömter (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.) für wertvolle Ratschläge und Diskussionen. Für die Vorbereitung der Versuche und die Mithilfe bei den Messungen danke ich Fräulein H. Brauns und Frl. Ch. Henrichmann.

### Literatur

1. Borek, C., Higashino, S., Loewenstein, W. R.: *J. Membrane Biol.* **1**, 274—293 (1969).
2. Borle, A. B., Loveday, J.: *Cancer Res.* **28**, 2401—2405 (1968).
3. Castro, G. M. O., Machado, R. D.: *Experientia* (Basel) **25**, 556—558 (1969).
4. Eagle, H.: *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **89**, 362—364 (1955).
5. Fisk, A., Pathak, S.: *Nature* (Lond.) **224**, 1030—1031 (1969).
6. Frank, K., Becker, M. C.: Microelectrodes for recording and stimulation. In: *Physical techniques in biological research. Vol. 5; Electrophysiological methods, Part A.* Hrsg. von William L. Nastuk. New York-London: Academic Press 1964.
7. Frank, W.: Persönliche Mitteilung.
8. Furshpan, E. J., Potter, D. D.: Low-Resistance junctions between cells in embryos and tissue culture. In: *Current topics in developmental biology, Vol. 3.* Hrsg. von A. A. Moscona u. A. Manroy. New York-London: Academic Press 1968.
9. Gardner, R. S.: *J. Cell Biol.* **42**, 320—321 (1969).
10. Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubicek, M. T.: *Cancer Res.* **12**, 264 (1952).
11. Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., Singh, M. M.: *Biochemistry* **5**, 467—477 (1966).
12. Günther, T., Goecke, C.: *Z. Naturforsch.* **21 b**, 1171—1174 (1966).
13. Hegel, U., Frömter, E.: *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **291**, 121—128 (1966).
14. Hülser, D. F.: In Vorbereitung.
15. Ling, G., Gerard, R. W.: *J. cell. comp. Physiol.* **34**, 383—396 (1949).
16. Loewenstein, W. R., Kanno, Y.: *J. Cell Biol.* **22**, 565—586 (1964).
17. Maude, D. L.: *Fed. Proc. (Abstracts 54th Annual Meeting)*, **29**, 271 Abs. (1970).
18. Politoff, A. L., Socolar, S. J., Loewenstein, W. R.: *J. gen. Physiol.* **53**, 498—515 (1969).
19. Rajewsky, M. F.: *Exp. Cell Res.* **60**, 269—276 (1970).
20. — In Vorbereitung.
21. Redmann, K.: *Biophysik* **4**, 92—96 (1967).
22. — Stolte, C., Lüders, D.: *Naturwissenschaften* **54**, 255 (1967).
23. Schaefer, H., Schanne, O.: *Naturwissenschaften* **43**, 445 (1956).
24. Shipmann, C.: *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **130**, 305—310 (1969).
25. Steel, G. G., Adams, K., Barrett, J. C.: *Brit. J. Cancer* **20**, 784—800 (1966).
26. Swift, M. R., Todaro, G. J.: *J. cell. comp. Physiol.* **71**, 61—64 (1968).
27. Thurm, U.: Persönliche Mitteilung.
28. Todaro, G. J., Green, H.: *J. Cell Biol.* **17**, 299—313 (1963).
29. Williamson, J. D., Cox, P.: *J. gen. Virol.* **2**, 309—312 (1968).
30. Woodbury, J. W.: The cell membrane: Ionic and potential gradients and active transport. In: *Med. Physiol. and Biophysics, 18th Ed.* Hrsg. von T. C. Ruch u. J. F. Fulton. Philadelphia: W. B. Saunders Co. 1960.

Dr. D. F. Hülser  
 Max-Planck-Institut für Virusforschung  
 Abteilung Physikalische Biologie  
 BRD-7400 Tübingen, Spemannstraße 35  
 Deutschland