

Stimulierung von Kulturen embryonaler Rattenzellen durch eine Proteinfraction  
aus fötalem Kälberserum

**I: Elektrophysiologische Messungen an den Oberflächenmembranen**

Stimulation of Embryonic Rat Cells in Culture by a Protein Fraction Isolated  
from Fetal Calf Serum

I: Electrophysiological Measurements at the Cell Surface Membranes

DIETER F. HÜLSER und WERNER FRANK

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

(Z. Naturforsch. 26 b, 1045—1048 [1971]; eingegangen am 9. Juni 1971)

Normal embryonic rat cells incubated in serum-free medium accumulate in  $G_1$ -phase of the cell cycle. On addition of a growth-stimulating protein isolated from fetal calf serum they are triggered to proceed through the cycle, and they resume DNA-synthesis 15 to 20 hours later. In this paper it is demonstrated that the surface membrane potential difference ( $PD$ ) decreases immediately after changing serum-free medium against culture medium containing either calf serum or the isolated serum protein; the original  $PD$  is restored 2 to 3 hours later. Serumprotein without growth-stimulating activity does not affect the  $PD$ .

A permanent rat cell line which grows independently of serum also has been tested. The  $PD$  of these cells is not significantly influenced by calf serum.

Fötales Kälberserum enthält eine Proteinfraction, die für maximale Proliferation embryonaler Rattenzellen in Kultur notwendig ist<sup>1</sup>. Werden die Zellen in Medium ohne diesen aktivierenden Faktor inkubiert, so sammeln sie sich in einem bestimmten Kompartiment in der  $G_1$ -Phase des Zellzyklus an. Nach Zugabe von Serum oder des hieraus isolierten Proteins können sie den Zyklus weiter durchlaufen; 15–20 Stdn. später beginnen die Zellen mit der DNA-Synthese, und weitere 10 Stdn. danach setzt eine Mitosewelle ein<sup>2</sup>.

Um die regulatorische Funktion des Serumfaktors verstehen zu können, ist es notwendig, die Ereignisse in den Zellen zwischen Stimulierung in der  $G_1$ -Phase und den Beginn der DNA-Synthese aufzuklären; vor allem muß der Wirkungsort des Faktors in der Zelle gefunden werden. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß zunächst bestimmte Eigenschaften der Oberflächenmembranen verändert werden. Der erste gemessene Effekt nach Aktivierung der Zellen in der  $G_1$ -Phase ist eine starke Abnahme der Oberflächenmembran-Potentialdifferenz.

**Material und Methoden**

*Zellkulturen*

Das Anlegen der Kulturen normaler embryonaler Rattenzellen und das modifizierte Eagle-Medium wurden bereits früher beschrieben<sup>1</sup>. Die permanente

Zelllinie entstand durch „Spontantransformation“ aus einer stationären Kultur embryonaler Rattenzellen<sup>2</sup>. Für die Potentialmessungen wurden die Zellen in Plastikschälchen (60/15 mm, oberflächenbehandelt, Fa. Greiner, Nürtingen) in einer Dichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro Schälchen ausgesät und in Medium + 10% Kälberserum angezüchtet. Nach 24 Stdn. wurde das Medium gegen solches mit 10% Kälberserum bzw. ohne Serum ausgetauscht, die Zellen weitere 24 Stdn. inkubiert und dann für die Messungen verwendet. Zur Kontrolle der DNA-Synthese wurden die Zellen 18 Stdn. in dem entsprechenden Medium inkubiert, und danach durch 30 Min. <sup>3</sup>H-Methyl-Thymidinpulse ( $0,1 \mu\text{Ci/ml}$  Medium, spez. Akt. 5 Ci/mM, New England Nuclear Corp.) markiert. Die eingebaute Radioaktivität wurde gemessen, wie in einer anderen Arbeit beschrieben<sup>1</sup>. Zur Isolierung der aktiven und inaktiven Serumfraktionen s. l. c.<sup>2</sup>.

*Messung der Oberflächenmembran-Potentialdifferenzen*

Die Oberflächenmembran-Potentialdifferenzen ( $PD$ ) wurden mit Ling-Gerard-Elektroden (Widerstand  $> 30 \text{ M}\Omega$ , Spitzenpotential  $< 5 \text{ mV}$ ) gemessen, wie bereits ausführlich beschrieben worden ist<sup>3</sup>. Zur Widerstandskontrolle der Elektroden dienten konstante periodische Stromimpulse. Der daraus resultierende Spannungsabfall wurde sowohl mit der Nulllinie, d. h.

Sonderdruckanforderungen an Dr. D. F. HÜLSER, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung Physikalische Biologie, D-7400 Tübingen, Spemannstr. 35.

<sup>1</sup> W. FRANK u. S. ZABEL, Exp. Cell Res. 59, 186 [1970].

<sup>2</sup> W. FRANK, H.-J. RISTOW u. S. ZABEL, Europ. J. Biochem. 14, 392 [1970].

<sup>3</sup> D. F. HÜLSER, Pflügers Arch. 325, 174 [1971].

mit der Elektrode im Medium, als auch mit den gemessenen Potentialdifferenzen, d. h. mit der Elektrode in den Zellen, registriert. Vergrößerungen des Spannungsabfalls während einer *PD*-Messung sind ein Zeichen für einen zusätzlichen Ohmschen Widerstand von einigen  $M\Omega$ , der auf den im Meßkreis liegenden Widerstand der Zellmembran zurückzuführen ist<sup>3</sup>.

Das Kulturmedium wurde gegebenenfalls kurz vor den Messungen gegen die entsprechenden Medien mit gleichem pH-Wert ausgetauscht; die Messungen selbst erfolgten bei Raumtemperatur.

### Ergebnisse

Normale embryonale Rattenzellen, die 24 Stdn. in modifiziertem Eagle-Medium ohne Serumzusatz inkubiert wurden, unterscheiden sich in ihrer Oberflächenmembran-Potentialdifferenz (*PD*) von 49,6 mV (Zellinneres negativ) nur geringfügig von den Kontrollen in Medium + 10% Kälberserum (*PD* = 56,5 mV), wie aus Tab. 1 zu entnehmen ist. Beim Austausch gegen identische, frische Medien ändern sich die entsprechenden Potentiale nicht. Wird dagegen das Medium ohne Serum gegen solches mit 10% Kälberserum ausgetauscht, so fällt innerhalb der ersten Min. der Mittelwert der *PD* von 49,6 mV auf 16,4 mV ab; Abb. 1 zeigt ein solches Experiment. Der Pfeil gibt den Austausch des serumfreien Mediums, in dem die Zellen 24 Stdn. vorinkubiert worden waren, gegen Medium mit 10% Kälberserum an; die Elektrode blieb während der gesamten Messung in der Zelle. Die der Potentialspur aufgesetzten

Impulse stammen von den kontinuierlichen Widerstandsmessungen. Bei normalen Embryonalzellen wird der registrierbare Gesamtwiderstand im Meßkreis ausschließlich durch den der Ling-Gerard-Elektrode bestimmt; der Widerstand der Oberflächenmembranen ist so gering, daß er mit der angegebenen Versuchsanordnung nicht bestimmt wer-

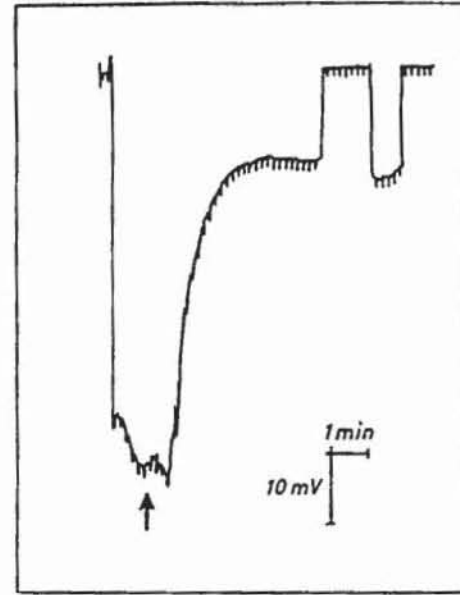


Abb. 1. Messung des Oberflächenmembran-Potentials einer normalen embryonalen Rattenzelle während des Austausches von serumfreiem Medium gegen solches mit 10% Kälberserum. Der Pfeil zeigt den Beginn des Mediumwechsels an; die zweite *PD* wurde nach dem Austausch in einer anderen Zelle gemessen. Die kontinuierlichen Impulse dienen zur Kontrolle des Elektrodenwiderstandes.

1	2	3	4	5	6	7
Zellart	24-stdg. Inkubation in modifiziertem Eagle-Medium	Austausch gegen modifiziertes Eagle-Medium	<sup>3</sup> H-Thymidineinbau 18 Stdn. nach Mediumaustausch [relative Einheiten]	<i>PD</i> sofort n. Mediumaustausch Zellinneres negativ [mV]	Standardfehler [mV]	Anzahl der Messungen
Normale embryonale Rattenzellen	ohne Serum	kein Austausch + 10% Kälberserum	1	49,6	0,56	327
	ohne Serum	+ 10% Kälberserum	20	16,4	0,44	196
	ohne Serum	+ aktives Protein (50 µg N/ml Medium)	20	17,8	0,53	201
	ohne Serum + 10% Kälberserum	inaktives Protein kein Austausch	1 10	46,7 56,5	1,65 1,26	42 43
Permanente Rattenzellen	ohne Serum	kein Austausch	1	63,3	1,50	34
	ohne Serum	+ 10% Kälberserum	1	59,5	2,27	29

Tab. 1. Zusammenhang zwischen Potentialdifferenz (*PD*) und DNA-Synthese bei normalen und permanenten Rattenzellen. Die Zellen waren 24 Stdn. in dem in Spalte 2 angegebenen Medium vorinkubiert worden; unmittelbar vor den *PD*-Messungen wurden gegen die in Spalte 3 aufgeführten Medien ausgetauscht. Der Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin wurde 18 Stdn. nach Stimulierung gemessen; Pulsdauer 30 Min., 0,1 µCi/ml Medium.



den kann. Der Abfall der *PD* nach Stimulierung der Zellen ist reversibel, wie in Abb. 2 dargestellt. Bereits nach wenigen Min. beginnt die *PD* wieder anzusteigen und hat nach 2–3 Stdn. wieder den Ausgangswert erreicht, wenn die Zellen bei 37 °C inkubiert werden. Beläßt man sie nach Austausch des Mediums bei Raumtemperatur, so ist selbst nach 30 Min. keinerlei Anstieg der *PD* festzustellen.

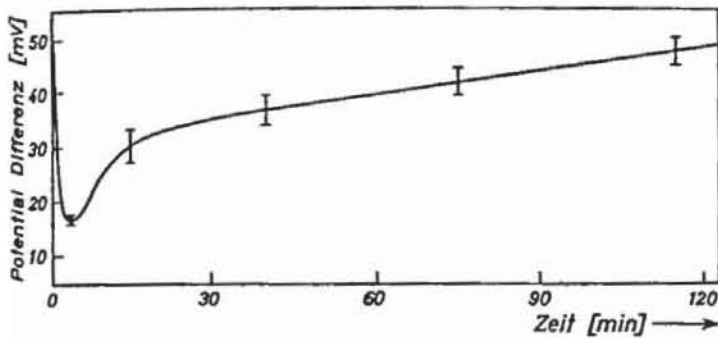


Abb. 2. Kinetik der Potentialdifferenzen. Zum Zeitpunkt 0 wurde das Medium ohne Serum gegen solches mit Serum ausgetauscht und die Zellen bei 37 °C im Brutschrank weiterinkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die *PDs* bei Raumtemperatur gemessen.

Wird anstelle von Kälberserum die Wachstumsstimulierende Proteinfraction aus fötalem Kälberserum dem Medium zugegeben, so nimmt die *PD* ebenso wie nach Serumzugabe ab (Tab. 1). In Abb. 3 ist die Abhängigkeit von der Proteinkonzentration im Medium wiedergegeben. Mit steigender Konzentration ist der Abfall der *PD* zunächst ziemlich steil, sie nähert sich danach aber asymptotisch einem Grenzwert von ungefähr 17 mV. Bei niederen Proteinkonzentrationen fanden sich häufig Zellen, die keine oder nur eine geringe Änderung ihrer *PD* aufwiesen, während bei den höheren Konzentrationen solche Zellen nur in etwa 2% der Fälle gefunden wurden. Bei den Berechnungen der Mittelwerte wurden die Messungen an diesen Zellen ebenfalls berücksichtigt.

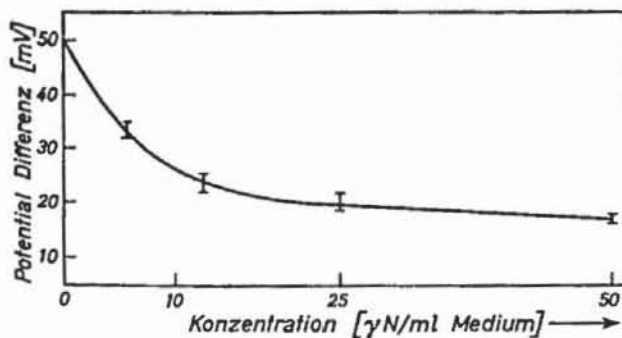


Abb. 3. Abhängigkeit der Potentialdifferenz von der Konzentration des stimulierenden Serumproteins im Medium.

Wie in Tab. 1 weiter aufgeführt, hat eine Proteinfraction aus fötalem Kälberserum, welche die DNA-Synthese nicht stimulieren kann (inaktive Serumfraction), keinerlei Einfluß auf die *PD*. In einer früheren Arbeit wurde eine permanente Rattenzelllinie beschrieben, die sich auch ohne Serum während mindestens 3 Zellzyklen ebenso rasch vermehrt wie die Kontrollen in Medium mit Kälberserum<sup>2</sup>. Werden diese Zellen 24 Stdn. in Medium ohne Serum vorinkubiert und anschließend in Medium mit Kälberserum gebracht, so hat dieses keinen signifikanten Einfluß auf die *PD*. Die permanenten Zellen unterscheiden sich von den normalen Embryonalzellen weiterhin durch ihren stark erhöhten Oberflächenmembran-Widerstand. Wie bereits oben erwähnt, ist der Membranwiderstand von Normalzellen verglichen mit dem Elektrodenwiderstand so gering, daß er mit dem beschriebenen Meßsystem nicht bestimmt werden kann. Bei den permanenten Zellen ist er bis auf die Größenordnung des Elektrodenwiderstandes angestiegen, er konnte daher mit der bei diesen Experimenten verwendeten Schaltung erfaßt werden.

### Diskussion

Die dargelegten Experimente zeigen, daß die Stimulierung der DNA-Synthese bei normalen embryonalen Rattenzellen wahrscheinlich durch die Veränderung bestimmter Eigenschaften der Oberflächenmembranen eingeleitet wird. Sowohl Kälberserum als auch die isolierte aktive Proteinfraction erniedrigen innerhalb einer Min. die *PD* von Zellen, die längere Zeit in serumfreiem Medium inkubiert worden waren. Dieses ist kein allgemeiner Proteineffekt auf die Zellmembran: eine Proteinfraction aus fötalem Kälberserum, welche keine Wachstumsstimulierende Wirkung auf die Zellen ausübt, beeinflußt auch das Membranpotential nicht. Ebenso konnte bei permanenten Rattenzellen, die durch „Spontantransformation“ von der aktivierenden Wirkung des Serums unabhängig geworden sind, keine signifikante Veränderung der *PD* nach Austausch von serumfreiem Medium gegen solches mit Kälberserum beobachtet werden.

Die Potentialdifferenz zwischen Außen- und Innenseite der Oberflächenmembran einer Säugerzelle wird im wesentlichen durch die Kaliumionen-Konzentration innerhalb und außerhalb der Zelle sowie durch die Kaliumionen-Membranpermeabilität bestimmt. Da die Kaliumionen-Konzentration in der

Zelle wesentlich größer ist als im umgebenden Kulturmedium, muß dieses Konzentrationsgefälle entgegen der Ionendiffusion durch einen aktiven, ATP-abhängigen Prozeß aufrecht erhalten werden (Na-K-Pumpe). Für den raschen Abfall der *PD* nach Stimulierung der normalen embryonalen Rattenzellen gibt es somit folgende Erklärungsmöglichkeiten:

1. Die Membranpermeabilität für Kalium- und Natriumionen wird durch die Wechselwirkung zwischen dem Serumprotein und der Zellmembran schlagartig verändert. Dabei hat eine Verringerung der Kaliumionen-Permeabilität denselben Effekt auf die *PD* wie eine Erhöhung der Natriumionen-Permeabilität. Unter normalen Bedingungen beträgt der Permeabilitäts-Koeffizient für Natriumionen nur einen Bruchteil des Kaliumionen-Koeffizienten; deshalb ist der Beitrag der verschiedenen Natriumionen-Konzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle zum Membranpotential vernachlässigbar. Durch eine wesentliche Vergrößerung der Natriumionen-Permeabilität könnte aber ein dem Kaliumionenpotential entgegengesetztes Natriumionenpotential entstehen, was ebenfalls eine Verminderung der *PD* zur Folge hätte.

2. Die Na-K-Pumpe wird in ihrer Wirksamkeit negativ beeinflusst, indem das Serumprotein gewisse Enzymsysteme (z. B. ATPasen) oder die Trägermoleküle inaktiviert.

3. Durch die Besetzung bestimmter Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit dem Serumprotein werden in der Zelle energieverbrauchende Reaktionen gestartet; die Energie, die in der *PD* als elektrisches Äquivalent enthalten ist („Energiepuffer“, vgl. l. c.<sup>4</sup>), könnte unmittelbar nach der Stimulierung zur Erzeugung von chemischer Energie in Form von ATP verwendet werden.

Weitere Untersuchungen müssen die Art des Primärvorganges an den Zellen nach Aktivierung durch das Serumprotein klären. Die Befunde sprechen dafür, daß durch gewisse Vorgänge an den Oberflächenmembranen während der Stimulierung von embryonalen Rattenzellen eine Reihe von vorprogrammierten Ereignissen ausgelöst werden, die 15 – 20 Stdn. später zur DNA-Synthese führen.

Fr. H. BRAUNS und Fr. S. SCHWALB danken wir für zuverlässige Hilfe bei den Versuchen. Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

<sup>4</sup> E. A. LIBERMAN u. V. P. SKULACHEV, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **216**, 30 [1970].