

## Stimulierung von Kulturen embryonaler Rattenzellen durch Kälberserum

### VI. Calcium- und Kaliumionen als Cofaktoren

Stimulation of Embryonic Rat Cells in Culture by Calf Serum

#### VI. Calcium and Potassium Ions as Cofactors

Werner Frank

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

(Z. Naturforsch. **28 c**, 322–328 [1973]; eingegangen am 18. Dezember 1972)

Rat fibroblasts, proliferation, calcium, potassium

Embryonic rat cells are stopped in G<sub>1</sub>-phase when they are incubated in serum-free medium. They can be triggered to proceed through their cell cycle by the addition of two proteins which have been isolated from fetal calf serum. The influence of calcium and potassium ions on the stimulation process has been examined:

1. Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> ions simultaneously must be present in the culture medium in concentrations of at least  $5 \times 10^{-4}$  M and  $1 \times 10^{-3}$  M, resp.
2. The intracellular concentrations of both ions are increased by the serum factors.
3. The intracellular concentrations of K<sup>+</sup> strongly are dependent on the extracellular Ca<sup>2+</sup>-concentrations; they increase threefold between  $5 \times 10^{-5}$  and  $1 \times 10^{-3}$  M of Ca<sup>2+</sup>. On the other hand, the intracellular calcium concentrations are not significantly influenced by the potassium content of the culture medium.

Werden Kulturen embryonaler Rattenzellen in serumfreiem Medium inkubiert, so sammeln sich die Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase an<sup>1</sup>. Aus fötalem Kälber-serum konnten 2 Faktoren isoliert werden, welche diese Zellen wieder zu stimulieren vermögen<sup>2</sup>; sie beginnen dann nach 12–15 Std. mit der DNA-Synthese.

Bereits wenige Minuten nach Zugabe der aktiven Serumkomponenten kann man Veränderungen bei den Phospholipiden der Membranen nachweisen: der Einbau von <sup>3</sup>H-Inositol in Phosphatidylinositol wird um das Doppelte<sup>3</sup>, der von <sup>32</sup>P-Orthophosphat in dieses Lipid um den Faktor 15 gesteigert<sup>4</sup>. Weiterhin ist 10 min nach Stimulierung der cAMP-Spiegel in den Zellen auf etwa 20% des Ausgangswertes abgefallen<sup>5</sup>. Diese Befunde legen den Gedanken nahe, daß die Wachstumsregulation mit einer Permeabilitätsänderung der Zellmembranen für bestimmte Komponenten des Kulturmediums gekoppelt ist. Whitfield und Mitarbeiter konnten kürzlich die Bedeutung der extrazellulären Calciumkonzentration für die Proliferation von Lymphozyten und Hühner-fibroblasten zeigen<sup>6–8</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluß der Calcium- und Kalium-konzentrationen des Mediums auf die Stimulierbarkeit von Sekundärkulturen embryonaler Rattenfibro-

blasten durch die Serumfaktoren untersucht. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob die intrazellulären Konzentrationen dieser beiden Ionen durch die Faktoren verändert werden können.

#### Material und Methoden

Das Anlegen von Kulturen embryonaler Rattenfibroblasten wurde in einer früheren Arbeit beschrieben<sup>2</sup>. Die Zellen wurden normalerweise in einem modifizierten Eagle-Medium<sup>9</sup> unter Zusatz von 10% Kälberserum gezüchtet und für die Versuche in Plastik-Kulturschälchen (Falcon Plastics; 2·10<sup>6</sup> Zellen, 5 ml Medium pro Schälchen, 60/15 mm) ausgesät.

Zur Bestimmung des <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbaus in die säureunlösliche Fraktion wurden die Zellen nach entsprechender Vorinkubation für 1 Stde. mit Methyl-<sup>3</sup>H-Thymidin (Radiochemical Center Amersham, U. K., 0,25 µCi/ml Medium; spez. Akt. 5 Ci/mMol) markiert. Hierauf wurde das Medium abgegossen, der Zellrasen zweimal mit dest. Wasser gespült und durch Zugabe von 3 ml 7-proz. Trichloressigsäure fixiert. Nach 15 min wurden die Zellen mit einem Gummiwischer abgekratzt, auf Millipore Membran-filter gesaugt und dreimal mit je 5 ml 7-proz. TCA gewaschen. Die Filter wurden in Plastik-Szintillator-fläschchen überführt und mit 5 ml Toluol-PPO-Szintillator versetzt; die Radioaktivität wurde in einem Zählgerät der Firma Packard mit der Seriennummer 3375 gemessen.

Sonderdruckanforderungen an Dr. Werner Frank, MPI für Virusforschung, D-7400 Tübingen, Spemannstr. 35/I.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Zur Ermittlung der Zellzahlen in den Kulturschälchen wurde in Parallelansätzen die DNA der Zellen 30 min in 5-proz. TCA hydrolysiert (siedendes Wasserbad) und danach der DNA-Gehalt mit der Indolmethode<sup>10</sup> bestimmt. Für die Erstellung der Eichkurven wurden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und weiter behandelt, wie oben beschrieben.

Autoradiographien wurden von Zellen angefertigt, die ebenfalls in Plastik-Kulturschälchen (Falcon, 60/15 mm) angezüchtet, in den entsprechenden Medien vorinkubiert und für 30 min mit Methyl-<sup>3</sup>H-Thymidin (10  $\mu$ Ci/ml Medium; spez. Akt. 5 Ci/mMol) markiert worden waren. Nach Abgießen des Mediums wurden die Zellen mit 5-proz. wässriger Glutaraldehyd-Lösung fixiert, 12 Stdn. in fließendem Wasser ausgewaschen und mit Ilford K 5 Emulsion beschichtet. Nach einer Expositionszeit von etwa 8 Tagen wurden die Fotoschichten entwickelt und die Markierungsindices nach Anfärben der Zellen mit Acridinorange<sup>11</sup> ermittelt. Pro Schälchen wurden 500 Zellen ausgezählt, von jedem Zeitwert wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Zur Messung der <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme wurden die Zellrasen in den Plastik-Kulturschälchen nach entsprechender Vorbehandlung 5-mal mit 0,15 N NaCl – 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,2 gespült und mit 3,0 ml 7-proz. TCA versetzt; der gesamte Waschvorgang bis zur Fixierung dauerte weniger als 10 sec. Nach 10–15 min bei Raumtemperatur wurden aus jedem Schälchen 1,0 ml des TCA-Extraktes in 10 ml Dioxan-haltige Szintillatorflüssigkeit pipettiert und die Radioaktivität im Packard-Szintillationszähler 3375 bei <sup>14</sup>C-Standardeinstellung gemessen. Die spezifischen Aktivitäten des Calciums im Kulturmedium wurden bestimmt, indem je 10  $\mu$ l des Mediums mit bekanntem Ca<sup>2+</sup>-Gehalt in 1,0 ml 7-proz. TCA pipettiert und nach Zugabe von 10 ml Dioxan-Szintillator der Radioaktivitätsgehalt gemessen wurde.

Unter den angewandten Versuchsbedingungen wird das gesamte, in die Zellen aufgenommene <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> extrahiert. Zur Kontrolle wurde der TCA-unlösliche Rückstand auf Millipore-Membranfilter gesaugt, getrocknet und in Tolual-haltigem Szintillator die Aktivität bestimmt; sie betrug weniger als 0,1% von der des Extraktes.

Die Absolutbestimmungen von K<sup>+</sup> wurden bei Zellen vorgenommen, die in Falcon-Plastik-Kulturschalen (100/15 mm, 8 · 10<sup>6</sup> Zellen, 10 ml Medium) angezüchtet, entsprechend vorinkubiert und danach mit 10,0 ml 7-proz. TCA extrahiert worden waren. Die Extrakte wurden 5-mal mit je 10 ml Äther ausgeschüttelt und zur Entfernung des restlichen Äthers kurzzeitig in einem Vakuumexsikkator evakuiert.

Die K<sup>+</sup>-Konzentrationen wurden flammenphotometrisch bestimmt.

Die beiden aktiven Serumproteine S<sub>1</sub> (MG > 200 000 Dalton) und S<sub>2</sub> (niedermolekular) wurden nach der kürzlich beschriebenen Methode isoliert<sup>2</sup>. Die Stickstoffbestimmungen wurden in einer Mikro-Kjeldahl-Apparatur durchgeführt.

## Ergebnisse

Um Sekundärkulturen embryonaler Rattenfibroblasten, die in serumfreiem Medium in der G<sub>1</sub>-Phase gestoppt worden waren, durch zwei aus Kälberserum isolierte Faktoren wieder stimulieren zu können, müssen Calcium- und Kaliumionen im Medium vorhanden sein. Wie in Abb. 1 dargestellt, steigt inner-

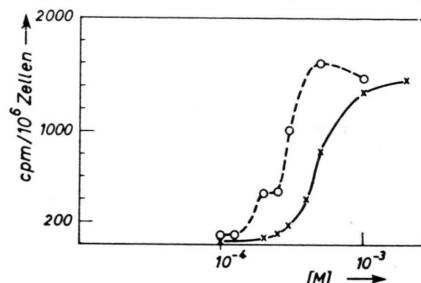


Abb. 1. <sup>3</sup>H-Thymidineinbau in die säureunlösliche Fraktion von Zellen, die nach 24-stdg. Vorinkubation in serumfreiem Medium für 18 Stdn. in Medium mit den entsprechenden K<sup>+</sup>- bzw. Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen in Gegenwart der beiden aktiven Serumproteine gehalten worden waren. Markierungsdauer 1 Stde. (Methyl-<sup>3</sup>H-Thymidin, spez. Akt. 5 Ci/mMol; 0,25  $\mu$ Ci/ml Medium).

×—× Variation der K<sup>+</sup>-Konzentration, 1 · 10<sup>-3</sup> M Ca<sup>2+</sup>.  
○—○ Variation der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, 1 · 10<sup>-3</sup> M K<sup>+</sup>.

halb eines relativ schmalen Konzentrationsbereiches beider Ionen der <sup>3</sup>H-Thymidineinbau in Zellen 18 Stdn. nach Zugabe der Proteine steil an. Das Maximum liegt für Ca<sup>2+</sup> bei 5 · 10<sup>-4</sup> M, für K<sup>+</sup> bei 2 · 10<sup>-3</sup> M; unterhalb einer Konzentration von 1,25 · 10<sup>-4</sup> M (Ca<sup>2+</sup>) bzw. 2 · 10<sup>-4</sup> M (K<sup>+</sup>) werden die Zellen nicht stimuliert. Dies konnte durch Bestimmung der Markierungsindices (Aautoradiographien) und durch das Ausbleiben einer Mitosewelle bestätigt werden.

Für die Stimulierbarkeit der Zellen ist unerlässlich, daß die entsprechenden Ca<sup>2+</sup>- und K<sup>+</sup>-Konzentrationen gleichzeitig mit den Serumfaktoren ins Kulturmedium gegeben werden. Bei dem in Abb. 2 beschriebenen Experiment wurde ein Teil einer Rattenfibroblastenkultur, die 24 Stdn. serumfrei vorinkubiert worden war, zum Zeitpunkt 0 durch Zugabe beider Serumfaktoren, 5 · 10<sup>-4</sup> M Ca<sup>2+</sup> und

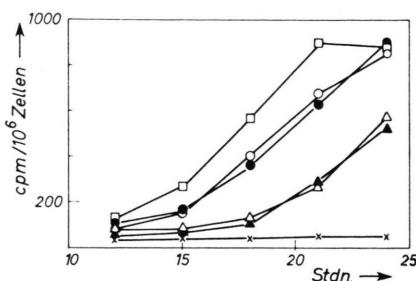


Abb. 2.  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau in die säureunlösliche Fraktion von Zellen, die 24 Stdn. in serumfreiem Medium vorinkubiert und ab Zeitpunkt 0

1.  $\times - \times$  weiterhin in serumfreiem Medium gehalten wurden;
2.  $\square - \square$  in Normal-Medium unter Zusatz von aktiven Serumfaktoren inkubiert wurden;
3.  $\circ - \circ$  in serumfreiem Medium mit  $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$   $\text{Ca}^{2+}$  inkubiert wurden, dem nach 3 Stdn. die aktiven Serumfraktionen zugesetzt wurden;
4.  $\bullet - \bullet$  in Gegenwart der aktiven Serumfraktionen mit  $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$   $\text{Ca}^{2+}$  inkubiert wurden, wobei nach 3 Stdn. die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf  $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  erhöht wurde;
5.  $\triangle - \triangle$  wie unter 3. angegeben inkubiert wurden, jedoch erfolgte die Zugabe der Serumfaktoren erst nach 6 Stdn.;
6.  $\blacktriangle - \blacktriangle$  wie unter 4. angegeben inkubiert wurden, wobei die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach 6 Stdn. erfolgte.

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen für 30 min mit Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidin (spez. Akt. 5 Ci/mMol; 0,25  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) markiert.

$5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$   $\text{K}^+$  aktiviert. Die restlichen Zellen erhielten zur selben Zeit die Faktoren, jedoch betrug die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Medium nur  $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , oder sie erhielten serumfreies Medium mit  $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ; nach 3 bzw. 6 Stdn. wurden dann die Calcium-

konzentrationen auf  $5 \cdot 10^{-5}$  erhöht bzw. die Serumkomponenten ins Medium zupipettiert. Der um 3 bzw. 6 Stdn. verzögerte Thymidineinbau in Kulturen, denen die aktivierenden Proteine oder Calcium entsprechend später zugesetzt wurden, zeigt die Notwendigkeit der gleichzeitigen Anwesenheit beider Komponenten. Dasselbe konnte auf gleiche Weise für Kalium gezeigt werden.

Während die Serumfaktoren nach früheren Befunden nur in einem begrenzten Zeitraum der  $G_1$ -Phase zur Stimulierung benötigt werden<sup>1</sup>, müssen für einen optimalen  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau Calcium und Kalium ständig in Mindestkonzentrationen von  $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  im Medium vorhanden sein. Um dies zu zeigen, wurden Rattenfibroblasten wie üblich aktiviert, nach 16 Stdn. wurden ihnen aber gemäß den Angaben in Tab. I entweder die Serumfaktoren entzogen, oder es wurden die Calcium- bzw. Kaliumkonzentrationen im Medium gesenkt. Nach weiteren 4 Stdn. wurden die  $^3\text{H}$ -Thymidineinbauraten gemessen; dabei zeigte sich, daß die Kulturen, denen zuvor die Serumfaktoren entzogen worden waren, eher noch mehr Thymidin in die DNA einbauten als die Kontrollen. Wurden jedoch die  $\text{Ca}^{2+}$ -bzw.  $\text{K}^+$ -Konzentrationen herabgesetzt, so wurde in der säureunlöslichen Fraktion erheblich weniger Radioaktivität gefunden. Dabei war kein Unterschied festzustellen, ob die aktiven Proteine zusätzlich im Medium vorhanden waren oder fehlten.

Als nächstes wurde der Einfluß der Serumfaktoren und der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zellen gemessen.

Tab. I.  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau in die säureunlösliche Fraktion von Rattenfibroblasten, die nach 24-stdg. Vorinkubation in serumfreiem Medium in den oben aufgeführten Medien nachinkubiert worden waren. Nach 16 Stdn. wurden die Medien, wie angegeben, gewechselt; weitere 4 Stdn. später wurde der Thymidineinbau nach 1-stdg. Puls gemessen (Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidin; spez. Akt. 5 Ci/mMol; 0,25  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  Medium).

16 Stdn. [Mol/l]	Serum- faktoren		4 Stdn. [Mol/l]	Serum- faktoren	$^3\text{H}$ -Thymidin- einbau nach 20 Stdn. [cpm/ $10^6$ Zellen]
	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{K}^+$			
$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	+	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$5650 \pm 30$
$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	-	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$650 \pm 40$
$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	+	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$3550 \pm 70$
$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	+	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$3090 \pm 290$
$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	+	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$3070 \pm 150$
$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	+	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$2670 \pm 100$
$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	+	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$4590 \pm 300$
$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	+	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$4700 \pm 20$
$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	+	$1 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$3890 \pm 300$
$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	+	$1 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$4080 \pm 200$
$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	+	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$6520 \pm 440$

Als Maß für die aufgenommene Menge diente das Radioisotop  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ; bietet man dieses in einer Gesamtkonzentration von  $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  den Zellen an, so findet man nach 4 Std. keinen weiteren Anstieg der aus den Zellen mit TCA extrahierbaren Radioaktivität.

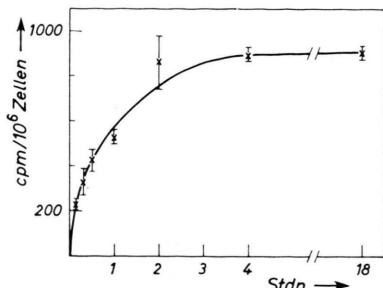


Abb. 3. Aufnahme von  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  in embryonale Rattenfibroblasten, die in Eagle-Medium + 10% Kälberserum gewachsen waren. Ab Zeitpunkt 0 wurden die Zellen in Medium inkubiert, das  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  in einer Gesamtkonzentration von  $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  und außerdem die aktiven Serumkomponenten enthielt; zu den angegebenen Zeiten wurden Zellen mit TCA extrahiert und die Radioaktivität im Extrakt gemessen. Die angegebenen Kurvenpunkte stellen die Mittelpunkte von drei Bestimmungen dar, zusätzlich sind die maximalen Abweichungen von den Mittelwerten eingetragen.

tät (Abb. 3). Nach dieser Zeit dürfte eine Äquilibrierung des austauschbaren Calciums in den Zellen mit dem des Mediums stattgefunden haben. Die austauschbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge ist dann dem Radioaktivitätsgehalt der Zellen proportional; aus der bekannten spez. Akt. des  $\text{Ca}^{2+}$  im Medium wurde sie bei den Rattenfibroblasten zu  $4,12 \cdot 10^{-9} \text{ Mol} \pm 0,38 \cdot 10^{-9}$  pro  $10^6$  Zellen errechnet, und sie umfaßt den freien und gebundenen Anteil.

Die Aufnahme von  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  ist von der Außenkonzentration des Ions abhängig und wird durch die Serumfaktoren stark gefördert, wie Abb. 4 zeigt. Im Bereich von  $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  bis etwa  $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  steigt die aufgenommene Menge mit dem Logarithmus der Mediumkonzentration linear an, bei höheren Konzentrationen erfolgt ein sprunghafter Anstieg.

Kurze Zeit nach Aktivierung durch die beiden Proteine strömt verstärkt  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  in die Zellen ein. Bereits 10 min später ist die mit TCA extrahierbare Radioaktivität gegenüber den Kontrollen auf das 1,5-fache, 30 min später auf das Doppelte angestiegen (Abb. 5). Dagegen hat die extrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration in einem Bereich von  $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  bis  $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  keinen wesentlichen Einfluß auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, wie sich aus Tab. II ergibt. Aus diesem Experiment geht weiter hervor, daß die Calciumauf-

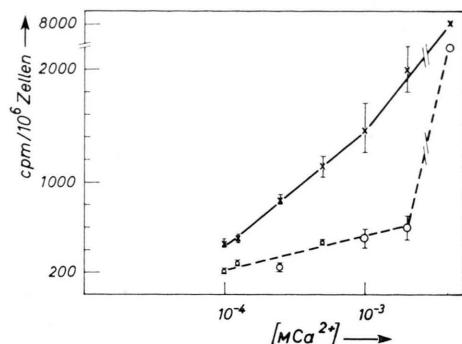


Abb. 4. Aufnahme von  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  in Rattenfibroblasten in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration des Mediums. Die Zellen waren 24 Std. in serumfreiem Medium vorinkubiert, anschließend weitere 18 Std. in serumfreiem Medium ( $\circ - \circ$ ) bzw. in Gegenwart der Serumfaktoren ( $\times - \times$ ) nachinkubiert und dann mit TCA extrahiert worden. Die spez.  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration betrug in allen Fällen  $1,2 \text{ mCi/mMol}$ . Jeder Kurvenpunkt stellt den Mittelpunkt einer Dreifachbestimmung dar, außerdem sind die maximalen Abweichungen angegeben.

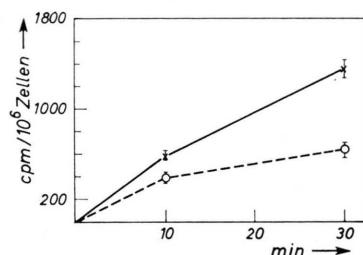


Abb. 5. Zeitliche Abhängigkeit der  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in Rattenfibroblasten nach Stimulierung durch die Serumfaktoren. Die Zellen waren 24 Std. in serumfreiem Medium vorinkubiert und ab Zeitpunkt 0 in serumfreiem Medium ( $\circ - \circ$ ) bzw. Medium mit aktiven Serumfaktoren ( $\times - \times$ ) nachinkubiert worden; das Medium enthielt während der Nachinkubationsperiode  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (spez. Akt.  $1,2 \text{ mCi/mMol}$ ), die Gesamt-Calciumkonzentration betrug  $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ . Angegeben sind die beiden Werte einer Doppelbestimmung mit Mittelwert.

Tab. II. Aufnahme von  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  und  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau in Rattenfibroblasten als Funktion der  $\text{K}^+$ -Konzentration im Medium. Die Zellen waren 24 Std. in serumfreiem Medium vorinkubiert und in den Medien mit den oben angegebenen  $\text{K}^+$ -Konzentrationen in Gegenwart der Serumfaktoren nachinkubiert worden; die Calciumkonzentration betrug stets  $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , spez. Aktivität des  $^{45}\text{Ca}^{2+}$   $0,5 \text{ mCi/mMol}$ . Der Einbau von Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidin wurde nach 1-stdg. Puls gemessen ( $0,25 \mu\text{Ci/ml}$  Medium; spez. Akt.  $5 \text{ Ci/mMol}$ ). Angegeben ist der Mittelwert von Doppelbestimmungen mit den Abweichungen der Einzelwerte.

$\text{K}^+$ -Konzentration im Medium [Mol/l]	Aufgenommenes $^{45}\text{Ca}^{2+}$ [cpm/10 <sup>6</sup> Zellen]	$^3\text{H}$ -Thymidin- einbau [cpm/10 <sup>6</sup> Zellen]
$1 \cdot 10^{-4}$	$710 \pm 20$	$110 \pm 10$
$2 \cdot 10^{-4}$	$730 \pm 30$	$410 \pm 100$
$5 \cdot 10^{-4}$	$630 \pm 30$	$2980 \pm 120$
$1 \cdot 10^{-3}$	$670 \pm 20$	$2920 \pm 280$
$5 \cdot 10^{-3}$	$590 \pm 30$	$2780 \pm 220$

nahme in Gegenwart der Serumfaktoren unabhängig vom Funktionszustand der Zellen zu sein scheint, d. h. davon, ob die Zellen zur DNA-Synthese stimuliert sind ( $1 \cdot 10^{-3}$  M K<sup>+</sup>) oder nicht ( $1 \cdot 10^{-4}$  M K<sup>+</sup>).

Das für die Stimulierung verantwortliche intrazelluläre Calcium kann mit dem des Mediums ausgetauscht werden, wie folgender Versuch, der in Tab. III dargestellt ist, zeigt. Rattenfibroblasten

Tab. III. Aufnahme von  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  in Rattenfibroblasten, die 24 Stdn. in serumfreien Medien mit bzw. ohne  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  vorinkubiert und weitere 18 Stdn. nachinkubiert worden waren. Die  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration betrug  $1 \cdot 10^{-3}$  M, spez. Aktivität des  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  stets 0,5 mCi/mMol. Steigerung des  $^3\text{H}$ -Thymidineinbaus nach 18 Stdn. in Gegenwart der Serumfaktoren 10-fach.

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt: cpm/ $10^6$ Zellen				
24 Stdn.	24 Stdn. Vorinkubation in serumfreiem Medium + $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ; serumfrei 18 Stdn. Nachinkubation in Medium + $^{45}\text{Ca}^{2+}$ + Serumfaktoren	24 Stdn. Vorinkubation in serumfreiem Medium — $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ; 18 Stdn. Nachinkubation in Medium + $^{45}\text{Ca}^{2+}$ + Serumfaktoren —	900 ± 50	960 ± 70
			590 ± 50	560 ± 90
			960 ± 20	560 ± 90

wurden in serumfreiem Medium mit  $1 \cdot 10^{-3}$  M Ca<sup>2+</sup> inkubiert, wobei die eine Hälfte der Kultur außerdem  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  erhielt. Nach 24 Stdn. wurden die beiden Hälften der Kultur nochmals in 2 Untergruppen geteilt, von denen jeweils eine weiterhin in serumfreiem Medium, die andere in Gegenwart der Serumfaktoren inkubiert wurden; alle Zellen erhielten  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  ins Medium, wobei die spez. Aktivität dieselbe war wie bei der 24-stdg. Vorinkubation. Nach weiteren 18 Stdn. war der Gehalt an radioaktivem Ca<sup>2+</sup> in beiden Gruppen mit stimulierten Zellen gleich groß und damit unabhängig davon, wie lange die Zellen in radioaktivem Medium inkubiert worden waren. Dasselbe wurde auch für die Zellen gefunden, die 18 Stdn. in serumfreiem Medium nachinkubiert worden waren. Hier ist der  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt jedoch wesentlich geringer als bei den beiden andern Gruppen und den Kontrollen, die sofort nach der 24-stdg. Vorinkubation extrahiert wurden. Da diese Kontrollen genau soviel  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  enthielten wie die stimulierten Zellen 18 Stdn. danach, muß während der Nachinkubation das für die Stimulierung notwendige Calcium von den Zellen in serumfreiem Medium abgegeben worden sein.

Die bisher beschriebenen Versuche könnten vermuten lassen, die Serumfaktoren würden nur zur

Aufrechterhaltung einer für die Stimulierung notwendigen intrazellulären Calciumkonzentration benötigt. In Tab. IV sind jedoch die Ergebnisse von Experimenten wiedergegeben, bei denen durch Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration in

Tab. IV.  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme und  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau in Rattenfibroblasten, die 24 Stdn. in serumfreiem Medium vorinkubiert und weitere 18 Stdn. in den oben angegebenen Medien nachinkubiert worden waren. Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidinpuls 1 Stde. (0,25  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  Medium; spez. Akt. 5 Ci/mMol). Angegeben sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen mit den maximalen Abweichungen.

Medium $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration [Mol/l]	$^{45}\text{Ca}^{2+}$ - Aufnahme [cpm/ $10^6$ Zellen]	$^3\text{H}$ -Thymidin- einbau [cpm/ $10^6$ Zellen]
$5 \cdot 10^{-4}$ + Serumfaktoren	1530 ± 100	1690 ± 20
$2 \cdot 10^{-3}$ — Serumfaktoren	1190 ± 90	220 ± 70
$5 \cdot 10^{-4}$ + Insulin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	1750 ± 50	550 ± 10
$5 \cdot 10^{-4}$ + Insulin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	1350 ± 120	680 ± 0
Dibutyryl-cAMP (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + Serumfaktoren	3130 ± 270	780 ± 60
$5 \cdot 10^{-4}$ + S <sub>1</sub> (1,6 $\mu\text{g N}/\text{ml}$ )	1460 ± 60	1180 ± 0
$5 \cdot 10^{-4}$ + S <sub>2</sub> (4,2 $\mu\text{g N}/\text{ml}$ )	1580 ± 30	1160 ± 0

serumfreiem Medium auf  $2 \cdot 10^{-3}$  M die  $^{45}\text{Ca}$ -Aufnahme zwar gesteigert werden konnte, aber kaum Zellen zur DNA-Synthese stimuliert wurden. Solche Zellen, die gleichzeitig in Medium mit einer Calciumkonzentration von  $5 \cdot 10^{-4}$  M in Gegenwart der Serumfaktoren inkubiert wurden, nahmen weniger  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  auf, bauten aber erheblich mehr  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau ein.

Weiterhin ist Tab. IV zu entnehmen, daß jeder der beiden isolierten Serumfaktoren (S<sub>1</sub> und S<sub>2</sub>) die Calciumaufnahme zu steigern vermag. Insulin erhöht in Konzentrationen bis 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Medium ebenfalls die Calciumaufnahme, ohne den Thymidineinbau auf mehr als 40% des mit den Serumfaktoren erreichbaren Wertes steigern zu können. Bemerkenswert ist die Wirkung des Proliferationshemmers Dibutyryl-cAMP<sup>12</sup>; bei einer Mediumkonzentration von 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  steigt der  $^{45}\text{Ca}$ -Gehalt der Zellen in Gegenwart der Serumfaktoren um mehr als das Doppelte gegenüber den Kontrollen, der  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau beträgt aber nur 50% des Kontrollwertes. Alle diese Ergebnisse zeigen, daß der intra-

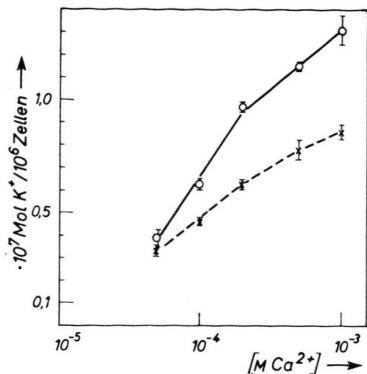


Abb. 6. Kaliumgehalt embryonaler Rattenfibroblasten in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration des Mediums und von den Serumfaktoren. Die Zellen waren 24 Stdn. in serumfreiem Medium vorinkubiert und anschließend 18 Stdn. in serumfreien Medien ( $1 \cdot 10^{-3}$  M K<sup>+</sup>) nachinkubiert worden, welche die angegebenen Calciumkonzentration ( $\times - \times$ ) und zusätzlich die aktiven Serumfaktoren ( $\circ - \circ$ ) enthielten. Nach Behandlung der Zellen mit TCA wurde die Kalium-Konzentration des Extraktes flammenphotometrisch gemessen; es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, im Diagramm angegeben sind die beiden Werte mit Mittelwert.

zelluläre Calciumgehalt und die Stimulierbarkeit des Thymidineinbaus nicht direkt miteinander korreliert sind.

Der Kaliumgehalt der Rattenfibroblasten wird von den Serumfaktoren und der extrazellulären Calciumkonzentration kontrolliert, wie flammenphotometrische Bestimmungen ergeben haben, die in Abb. 6 dargestellt sind. In einem Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsbereich zwischen  $5 \cdot 10^{-5}$  M und  $1 \cdot 10^{-3}$  M steigt die intrazelluläre Kalium-Konzentration auf mehr als das 3-fache an; außerdem wird der Einfluß der Serumfaktoren immer stärker, je höher der Calciumgehalt des Mediums ist. Ähnliche Zusammenhänge zwischen der Kaliumkonzentration in den Zellen und der Calciumkonzentration der extrazellulären Flüs-

Tab. V.  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau in Rattenfibroblasten in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration des Mediums. Die Zellen waren 24 Stdn. in serumfreien Medien vorinkubiert und dann in Gegenwart von  $1 \cdot 10^{-3}$  M Ca<sup>2+</sup> bzw. K<sup>+</sup> durch die Serumfaktoren stimuliert worden; nach 18 Stdn. wurde der Methyl- $^3\text{H}$ -Thymidineinbau nach einem 1-stdg. Puls gemessen (0,25  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ; spez. Akt. 5 Ci/mMol). Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Mg <sup>2+</sup> -Konzentration [Mol/l]	$^3\text{H}$ -Thymidineinbau [cpm/10 <sup>6</sup> Zellen]
$8,0 \cdot 10^{-4}$	$3110 \pm 180$
$4,0 \cdot 10^{-4}$	$3020 \pm 200$
$8,0 \cdot 10^{-5}$	$3000 \pm 50$
$8,0 \cdot 10^{-6}$	$3040 \pm 140$
0	$3050 \pm 100$

sigkeit wurden von mehreren Autoren bei anderen Systemen bereits beschrieben<sup>13-15</sup>.

Neben Calcium und Kalium spielt Magnesium im Zellstoffwechsel eine wesentliche Rolle. Im Gegensatz zu den beiden erstgenannten Ionen muß jedoch Magnesium bei der Stimulierung der Rattenfibroblasten nicht im Kulturmedium vorhanden sein. Wie in Tab. V aufgeführt ist, bleibt die Steigerung des  $^3\text{H}$ -Thymidineinbaus in dem Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationsbereich von  $0 - 0,8 \cdot 10^{-3}$  M unbeeinflußt, wenn die übrigen Kulturbedingungen optimal sind.

## Diskussion

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, müssen für die Stimulierung von Rattenfibroblasten neben den bereits früher isolierten Serumfaktoren Ca<sup>2+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionen in Konzentrationen über  $5 \cdot 10^{-4}$  M bzw.  $1 \cdot 10^{-3}$  M im Medium vorhanden sein. Die Aufnahme beider Ionen in die Zellen wird durch die Serumfaktoren gefördert, außerdem ist die intrazelluläre K<sup>+</sup>-Konzentration von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration des Kulturmediums abhängig. Bereits kurze Zeit nach ihrer Zugabe verändern die aktivierenden Proteine Strukturen der Plasmamembranen, was sich unter anderem in der Steigerung des Inositphosphatid-Stoffwechsels<sup>3</sup> und in dem um das 15-fache erhöhten Einbau von  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat in bestimmte Membranlipide ausdrückt<sup>4</sup>. Diese Ereignisse könnten für die Änderungen der Ionenpermeabilitäten verantwortlich sein.

Während die Serumfaktoren nur zu Beginn der Stimulierung im Medium anwesend sein müssen, dürfen die Mindestkonzentrationen der Ca<sup>2+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionen selbst 16 Stdn. nach „Triggerung“ der Zellen nicht unter  $5 \cdot 10^{-4}$  M aufallen, damit nach 20 Stdn. ein optimaler  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau gewährleistet ist. Dies scheint nicht vereinbar zu sein mit der Annahme, daß eine wichtige Funktion der Proteine in der Erhöhung der Membranpermeabilitäten für beide Ionen besteht. Zur Lösung des Widerspruches bieten sich zwei Möglichkeiten an. Einmal könnten die Zellen einen größeren Vorrat an aktiven Serumfaktoren speichern, der sie während einiger Stunden von der Anwesenheit der Proteine im Serum unabhängig macht; autoradiographische Untersuchungen mit  $^{125}\text{I}$ -markierten Faktoren sollen dies beweisen oder ausschließen. Zum andern sind möglicherweise während der ersten Stimulierungsschritte in den Zellen höhere Calcium- und Kaliumkonzentrationen nötig als im weiteren Verlauf des

Zellzyklus bis zur DNA-Synthese. Diese ersten „kritischen“ Konzentrationen würden bei physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentrationen im Außenmedium nur dann erreicht werden, wenn gleichzeitig ihre Aufnahme durch die Serumfaktoren erleichtert wird.

Weitere Untersuchungen müssen klären, ob die aktivierenden Proteine nur für die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentrationen verantwortlich sind, oder ob sie bestimmte Stoffwechselreaktionen steuern, wobei die Ionen als essentielle

Cofaktoren wirken. Selbstverständlich muß auch noch in Betracht gezogen werden, daß Serumfaktoren und Ionen verschiedene Vorgänge in den Zellen beeinflussen, die gleichzeitig ablaufen müssen und für die Stimulierung notwendig sind, aber miteinander nicht gekoppelt sind.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Frau S. Bernhard danke ich für geschickte und zuverlässige Mitarbeit.

- <sup>1</sup> W. Frank, H.-J. Ristow u. S. Zabel, Eur. J. Biochem. **14**, 392 [1970].
- <sup>2</sup> J. Veser u. W. Frank, Z. Naturforsch., im Druck.
- <sup>3</sup> H.-J. Ristow, W. Frank u. M. Fröhlich, Z. Naturforsch. **28c**, 188 [1973].
- <sup>4</sup> R. Hoffmann, H.-J. Ristow u. W. Frank, in Vorbereitung.
- <sup>5</sup> J. Grimm u. W. Frank, Z. Naturforsch. **27b**, 562 [1972].
- <sup>6</sup> R. H. Rixon u. J. F. Whitfield, J. cell. Physiol. **79**, 343 [1972].
- <sup>7</sup> J. F. Whitfield, J. P. MacManus, B. M. Braceland u. D. J. Gillan, J. cell. Physiol. **79**, 353 [1972].
- <sup>8</sup> S. D. Balk, Proc. natl. Acad. Sci. USA **68**, 271 [1971].
- <sup>9</sup> W. Frank, H.-J. Ristow u. S. Schwalb, Exp. Cell Res. **70**, 390 [1972].
- <sup>10</sup> R. Keck, Arch. Biochem. Biophysics **63**, 446 [1956].
- <sup>11</sup> H.-A. Fabricius, Microscop. Acta **71**, 199 [1972].
- <sup>12</sup> W. Frank, Exp. Cell Res. **71**, 238 [1972].
- <sup>13</sup> H. Kalant u. R. A. Hickie, Cancer Res. **28**, 2086 [1968].
- <sup>14</sup> P. J. Goodford, J. Physiology **186**, 11 [1966].
- <sup>15</sup> J. F. Gilbert, Europ. J. Canc. **8**, 99 [1972].
- <sup>16</sup> T. F. McDonald, H. G. Sachs, C. W. Orr u. J. D. Ebert, Development Biol. **28**, 290 [1972].