

Stimulierung von Kulturen embryonaler Rattenzellen durch Kälberserum

V*. Verhalten der Inosit- und Cholinphospholipide

Stimulation of Embryonic Rat Cells by Calf Serum

V*. Metabolism of Inositol- and Choline Phospholipids

HANS-JÜRGEN RISTOW, WERNER FRANK und MARGITTA FRÖHLICH

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

(Z. Naturforsch. 28 c, 188–194 [1973]; eingegangen am 18. Dezember 1972)

Rat cells, calf serum, inositol-, cholin phospholipids

Embryonic rat fibroblasts were accumulated in G₁-phase by incubation in serum-free medium and subsequently stimulated by the addition of calf serum. Using ³H-inositol and ¹⁴C-choline as label for phospholipids, the following results have been obtained:

1. Within a few minutes after stimulation up to 20 per cent of total phosphatidyl ³H-inositol is released from the membranes of prelabelled cells. This could not be detected with ¹⁴C-choline-prelabelled phospholipids.
2. Incorporation of ³H-inositol into phosphatidyl inositol, but not the uptake into the acid-soluble cell pool, is increased 30 and 45 min after stimulation by a factor of 2.8 and 3.3 respectively. Incorporation of ¹⁴C-choline at that time is significantly lower (2.0 and 1.6 respectively).
3. Incorporation of ³²P inorganic phosphate into the lipid fraction of stimulated cells is 8.9 times higher after 10 min as compared with the controls.

Einleitung

Inkubiert man Sekundärkulturen embryonaler Rattenzellen in Medium ohne Serum, so häufen sich die Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus an¹. Durch Zugabe von 10-proz. Kälberserum oder von zwei hieraus isolierten Proteinfractionen^{2,3} lassen sich die Zellen wieder stimulieren. Sie beginnen nach 8–10 Stdn. mit der DNA-Synthese und erreichen hier nach 15–18 Stdn. die gleiche Syntheserate wie Kontrollkulturen, die fortlaufend in Medium mit 10-proz. Kälberserum inkubiert wurden. Die ersten meßbaren Veränderungen nach der Stimulierung, die bisher beobachtet werden konnten, sind ein Abfall der Membranpotentialdifferenz innerhalb der ersten Minute von –50 mV auf –17 mV⁴, ein Abfall der intrazellulären cAMP-Konzentration innerhalb der ersten 10 min auf 20% des Ausgangswertes und ein Anstieg der cAMP-spal-

tenden Phosphodiesteraseaktivität innerhalb der ersten 30 min um den Faktor 2⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Rattenfibroblasten das Verhalten der Membranphospholipide in der ersten Stunde nach Serumzugabe untersucht. Als radioaktive Marker dienten hierbei ³H-Inositol, ¹⁴C-Cholin und ³²P-Orthophosphat.

Hinweise dafür, daß sich bei den Phospholipiden Veränderungen abspielen müßten, waren außer der Abnahme der Membranpotentialdifferenz Ergebnisse bei Untersuchungen an ähnlichen Systemen: So fanden FISHER und MUELLER^{6,7} in Lymphozyten innerhalb der ersten Minuten nach Stimulierung durch Phytohämagglutinin eine Beschleunigung des ³²P-Phosphat-Einbaues in Phosphatidylinositol sowie eine erhebliche Beschleunigung des Einbaues von ³H-Inositol. CUNNINGHAM und PARDEE⁸ beobachteten eine verstärkte Markierung der Phospholipidfraktion mit ³²P-Phosphat, wenn zu kontaktgehemmten 3T3-Zellen Serum gegeben wurde. Weiterhin beschrieb PASTERNAK⁹ kürzlich Untersuchungen an kontaktgehemmten Hühnerfibroblasten, bei denen nach Serumgabe ebenfalls ein verstärkter Phospholipid-Turnover, besonders von Phosphatidylinositol, zu bemerken war. Zu erwähnen wären in diesem Zusammenhang auch die Arbeiten von SABRA und KARNOVSKY¹⁰ sowie von SASTRY und

Sonderdruckanforderungen an Dr. H.-J. RISTOW, MPI für Virusforschung, Abt. physik. Biologie, D-7400 Tübingen, Spemannstraße 35/I.

Nicht gebräuchliche Abkürzungen: dT, Desoxythymidin; FS, Foetales Kälberserum; KS, Kälberserum; TCA, Trichloroessigsäure.

* IV. Mitteilung: J. VESER und W. FRANK, Z. Naturforsch. 27 b, 1573 [1972].



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 digitalized 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.

HOKIN¹¹, die bei phagozytierenden Leukozyten einen verstärkten ³²P-Phosphat-Einbau in die Phospholipidfraktion fanden, besonders in Phosphatidsäure und Phosphatidylinosit.

Material und Methoden

Fibroblasten von Rattenembryonen wurden nach der früher beschriebenen Methode gewonnen⁸ und in einem modifizierten Eagle-Medium gezüchtet¹².

Zur Untersuchung des Stoffwechsels von Inosit und Cholin, die beide essentiell für kultivierte Rattenembryonalzellen sind, wurden im wesentlichen drei Versuchsanordnungen gewählt, die in Abb. 1 (s. Er-

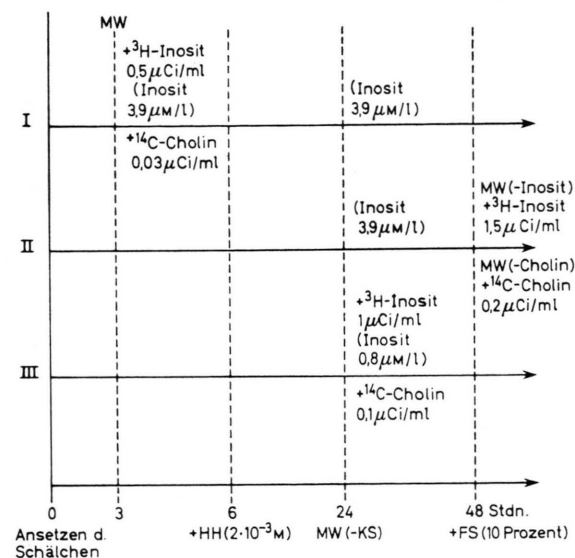


Abb. 1. Schematische Darstellung zur Untersuchung des Stoffwechsels von Inosit und Cholin nach kurzzeitiger Stimulierung mit Serum. Zum Zeitpunkt 0 wurden die Zellen in einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ in Plastikschälchen ausgesät. Bei den „Inositversuchen“ I und III war die Zell-DNA mit ¹⁴C-dT, bei den „Cholinversuchen“ II und III mit ³H-dT vormarkiert. Sind keine näheren Angaben gemacht, so handelt es sich immer um das modifizierte Eagle-Medium mit 10 Prozent KS, dessen genaue Zusammensetzung in l.c.¹³ beschrieben wurde. Inosit und Cholin finden sich hier in einer Konzentration von $39 \mu\text{M/l}$ bzw. $29 \mu\text{M/l}$. (MW, Mediumwechsel; HH, Hydroxyharnstoff).

gebnisse) skizziert sind. Zum Zeitpunkt 0 wurden die Zellen in oberflächenbehandelten Plastikschälchen (Fa. Greiner, Nürtingen; Durchmesser 60 mm) in einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Schälchen in 5 ml des schon erwähnten¹² modifizierten Eagle-Medium mit 10-proz. KS ausgesät. Nach entsprechender weiterer

Behandlung erfolgte nach 48 Std. die Stimulierung durch Zugabe von Foetalserum. Die Kontrollen erhielten die gleiche Menge „inaktives“ Medium (Eagle-Medium ohne Serum), das kein Inosit bzw. Cholin enthielt.

Das Zupipettieren erfolgte auf einer Wärmeplatte, während der restlichen Zeit des Versuches wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C in CO₂-angereicherter Atmosphäre inkubiert. Bei Versuchsende wurde das Medium abgesaugt und eiskalte 5-proz. TCA (2,5 ml) auf die Zellen pipettiert. Zur Bestimmung der Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion wurden dann die Zellen aus den Schälchen gekratzt, auf Membranfilter (Sartorius-Werke, Göttingen), gesaugt, getrocknet und in toluolhaltiger Zählerflüssigkeit im Tricarb-Szintillationszähler (Fa. Packard, Modell 3375) gezählt. Für die in Abb. I/II und III dargestellten Versuche wurde in Roux-Flaschen die DNA der Zellen mit ¹⁴C-dT bzw. ³H-dT vormarkiert.

Bei der gewählten Einstellung des Tricarb-Szintillationszählers werden 25 Prozent der ¹⁴C-Aktivität im ³H-Kanal und weniger als ein Prozent der ³H-Aktivität im ¹⁴C-Kanal mitgezählt.

Zur Bestimmung von ³H- bzw. ¹⁴C-Aktivität in der säurelöslichen Fraktion wurden die Zellen nach Herauskratzen aus den Schälchen hochtourig in einer Tischzentrifuge sedimentiert und die Radioaktivität von 0,5 ml des Überstandes in 5 ml dioxanhaltiger Zählerflüssigkeit im Tricarb-Szintillationszähler gemessen. Das Sediment — die säureunlösliche Fraktion — wurde wie oben beschrieben weiter verarbeitet.

Zur dünnstichtchromatographischen Untersuchung der säurelöslichen Fraktion wurde zur Entfernung der TCA der Überstand nach dem Abzentrifugieren insgesamt fünfmal mit demselben Volumen Äther ausgeschüttelt, im Vakuum eingengt, mit 0,3 ml destill. Wasser erneut in Lösung gebracht und 100 µl auf eine DC-Fertigplatte Kieselgel (Fa. Merck, Darmstadt, Art. 5721) aufgetragen. Als Referenzsubstanzen dienten ³H-Inosit und Phosphatidylinosit, Fließmittel war Eisessig-Aceton-Methanol-Benzol (5/5/20/70)¹³. Phosphatidylinosit wurde mit Joddampf angefärbt. Zur Bestimmung der ³H-Aktivität von Inosit und der säurelöslichen Fraktion wurden Streifen in 1,5 cm Abstand herausgekratzt, mit 1 ml H₂O 30 min gekocht, abzentrifugiert und 0,5 ml des Überstandes in dioxanhaltiger Zählflüssigkeit im Tricarb-Szintillationszähler gemessen. Ungefähr 2 Prozent der Gesamtaktivität gingen während des Ausschüttelns in die Ätherphase. Wegen der geringen Menge wurde dieser Anteil nicht weiter untersucht.

Für die Untersuchung des Einbaues von ³²P-phosphat wurden die Zellen in Glasschälchen, Durchmesser 90 mm, angezüchtet, mit ³H-Inosit vormarkiert und in Gegenwart von radioaktivem Phosphat durch Serumzugabe stimuliert. Die Kontrollen erhielten „inaktives“ Medium an Stelle des Serums. Nach 10 min wurde die Reaktion gestoppt durch Abgießen des Mediums und sofortige Zugabe von flüssigem Stickstoff. Das Herauskratzen der Zellen erfolgte mit Chloroform-Methanol (1:1) und die Extraktion der

Lipide mit neutralen und durch Zugabe von HCl angesäuerten Chloroform-Methanol-Gemischen nach einem von WELLS und DITTMER¹⁴ angegebenen Verfahren. Die neutralen und sauren Extrakte wurden anschließend über die Sephadex-C25-Säule (0,7 x 12 cm, Elutionsmittel Chloroform-Methanol 2:1) von nichtlipidischen Substanzen¹⁵ getrennt, im Vakuum eingengt und die Radioaktivität eines Aliquots mit dioxanhaltiger Zählerflüssigkeit im Szintillationszähler gezählt. Bei der gewählten Einstellung wurde 1 Prozent der ³²P-Aktivität im ³H-Kanal mitgezählt und keine ³H-Aktivität im ³²P-Kanal. In einem Vorversuch konnte sichergestellt werden, daß ungebundenes ³H-Inosit und Na₂H³²PO₄ unter gleichen Bedingungen vollständig auf der Säule zurückgehalten werden.

Myo-Inositol-2-³H (3,09 Ci/mm), Cholin-1,2-¹⁴C-Chlorid (3,8 mCi/mm), Na₂H³²PO₄ (1000 mCi/mm) und Thymidin-2-¹⁴C (50 mCi/mm) von New England Nuclear, Boston/Mass., USA; Thymidin-(Methyl-³H) (5 Ci/mm) von The Radiochemical Centre, Amersham; Hydroxyharnstoff von Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland/Ohio, USA; Sephadex G-25 fine von Pharmacia, Uppsala/Schweden.

Ergebnisse

Für den Einbau von ³H-Inosit erwies es sich hier, wie auch in den übrigen Versuchen, als vorteilhaft, die Menge an nicht radioaktivem Inosit zeitweilig auf 10 bzw. 2 Prozent der Normalkonzentration herabzusetzen. In Vorversuchen konnte durch ³H-dT-Einbau und Autoradiographie sichergestellt werden, daß die geringeren Inositzkonzentrationen über eine entsprechende Zeit sich nicht nachteilig auf das Wachstum der Zellen auswirkten.

Um eine exaktere Synchronisation der Zellen in der G₁-Phase zu erzielen, wurden die Zellen etwa 6 Stdn. nach Ansetzen der Schälchen mit 2 · 10⁻³M Hydroxyharnstoff in der S-Phase vorsynchronisiert¹⁶.

Während für das Medium zum Anzüchten der Zellen KS genommen wurde, wie wir es gewöhnlich zur fortlaufenden Zucht der Zellen verwenden, setzen wir bei der Stimulierung FS ein, da die wachstumsstimulierenden Faktoren ebenfalls aus FS gewonnen wurden³.

Zur Untersuchung der in die Membranen eingebauten Phospholipide nach Stimulierung mit Serum wurden die Zellen zunächst in Gegenwart von ³H-Inosit bzw. ¹⁴C-Cholin angezüchtet. Nach Synchronisation der Zellen durch aufeinanderfolgende Inkubation in Hydroxyharnstoff und serumfreiem Medium wurden die Zellen stimuliert.

Wie Abb. 2A zeigt, findet man schon nach 5 min einen meßbaren Abfall der ³H-Aktivität in der säure-

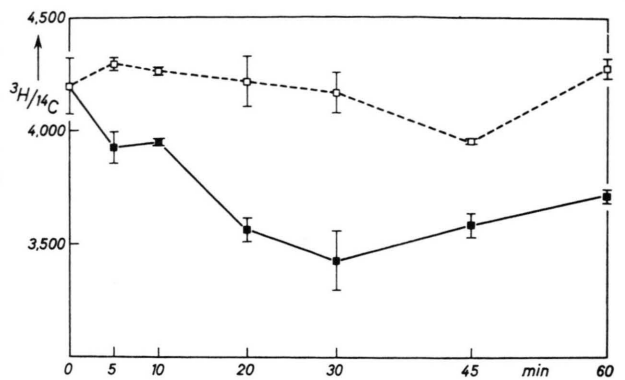


Abb. 2A. Verhalten des ³H-Inosit in der säureunlöslichen Fraktion (Phosphatidyl-³H-Inosit) nach Stimulierung der Zellen mit Serum (Versuchsschema Abb. 1, I) zum Zeitpunkt 0. Die DNA der Zellen war mit ¹⁴C-dT vormarkiert worden. Alle Punkte stellen Durchschnittswerte und Standardfehler von drei Einzelbestimmungen dar. ■—■ + FS; □---□ Kontrolle (+ „inaktives“ Medium). Absolutimpulse um 3 · 10³/10⁶ Zellen.

unlöslichen Fraktion dieser Zellen gegenüber Kontrollzellen, die statt des Serums nur „inaktives“ Medium (s. Methoden) in entsprechender Menge erhalten hatten. Wie aus Abb. 2A weiter zu ersehen ist, schreitet dieser Abfall bis zur 30. Minute fort, in der die ³H-Aktivität 82 Prozent der Aktivität der Kontrollen ausmacht.

Die Schwankungen bei den Kontrollen in diesen und den übrigen Experimenten haben wohl ihre Ursache in den Versuchsbedingungen; sie dürften auf die unvermeidlichen Temperatur- bzw. pH-Änderungen sowie auf die Erschütterung der Kulturen zurückzuführen sein. Dies konnte folgendermaßen gezeigt werden: Bei einem Versuch, wie in Abb. 1, I dargestellt,

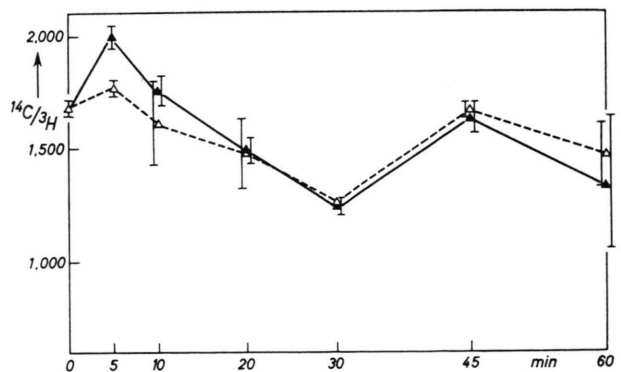


Abb. 2B. Gleiche Versuchsanordnung wie A unter Verwendung von ¹⁴C-Cholin anstelle von ³H-Inosit und Vormarkierung der Zellen mit ³H-dT. ▲—▲ + FS; △---△ Kontrolle (+ „inaktives“ Medium). Absolutimpulse bei 2,5 · 10³/10⁶ Zellen.

wurden zusätzlich Schälchen wie üblich behandelt, jedoch wurde beim letzten Schritt auf der Wärmeplatte weder Serum noch „inaktives“ Medium hinzupipettiert. Dennoch traten Schwankungen gleichen Ausmaßes wie bei den Kontrollen auf, die „inaktives“ Medium erhalten hatten.

Abb. 2B zeigt das Verhalten von ^{14}C -Cholin unter den gleichen Versuchsbedingungen. Man findet hier keinen Abfall der ^{14}C -Aktivität in der säureunlöslichen Fraktion bei Zellen, die mit Serum stimuliert wurden, gegenüber den Kontrollen. Eher deutet sich ein leichter Anstieg innerhalb der ersten 5 min an.

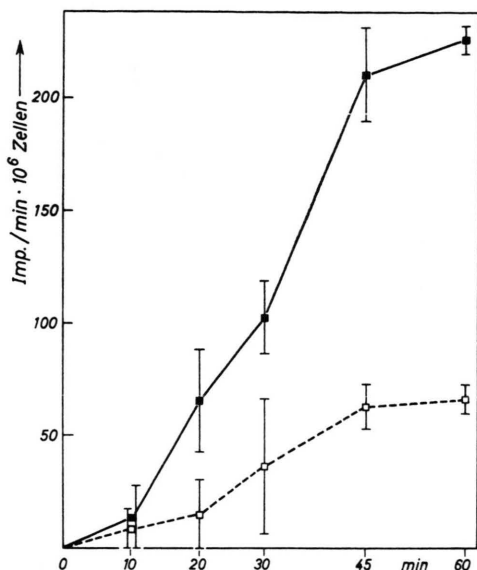


Abb. 3A. Einbau von ^3H -Inosit in die säureunlösliche Fraktion (Phosphatidylinosit) nach Stimulierung und gleichzeitiger Gabe des Isotops (Versuchsschema Abb. 1, II). Alle Punkte stellen Durchschnittswerte und Standardfehler von drei Einzelbestimmungen dar. ■—■ + FS; □—□ Kontrolle (+ „inaktives“ Medium).

Abbn. 3A und B zeigen den Einbau von ^3H -Inosit und ^{14}C -Cholin, wenn die Isotope erst bei der Stimulierung zugegeben werden; Die Versuchsanordnung ist in Abb. 1/II schematisch dargestellt. Eine Vormarkierung mit ^{14}C - bzw. ^3H -dT erwies sich als unbrauchbar. Auf Grund der geringen Einbauraten von ^3H -Inosit bzw. ^{14}C -Cholin nach Stimulierung überwog die in die DNA eingebaute Radioaktivität wesentlich, so daß die Verhältnisse der ^3H - und ^{14}C -Aktivitäten zu ungünstig lagen.

Dem Kurvenverlauf ist zu entnehmen, daß in den ersten 60 min nach Stimulierung unter dem Einfluß

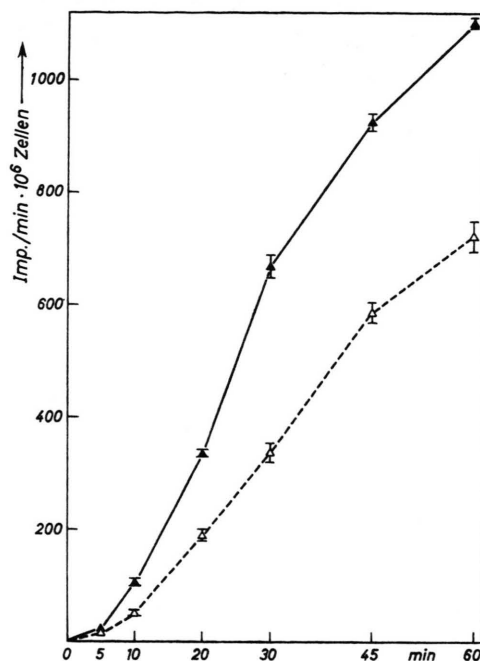


Abb. 3B. Gleiche Versuchsanordnung wie bei A, nur ^{14}C -Cholin anstelle von ^3H -Inosit. ▲—▲ + FS; △—△ Kontrolle (+ „inaktives“ Medium).

von Serum sowohl beim Inosit als auch beim Cholin ein verstärkter Einbau in die säureunlösliche Fraktion stattfindet. Beim Inosit-Einbau ist der Unterschied zwischen serumstimulierten Zellen gegenüber den Kontrollen aber ausgeprägter als beim Cholineinbau; er konnte in 3 von einander unabhängigen Experimenten beobachtet werden. Ein ähnliches Ergebnis fanden wir in einem Doppelmärkierungsexperiment über 30 min (Abb. 4); ^3H -Inosit und ^{14}C -Cholin wurden hier gemeinsam bei der Stimulierung gegeben.

Eine Kombination der beiden beschriebenen Experimente ist in Abb. 1/III skizziert. Die Zellen wurden mit ^3H -Inosit bzw. ^{14}C -Cholin vormarkiert und in Gegenwart dieser Isotope auch stimuliert. Das Ergebnis ist in den Abbn. 5A und B dargestellt. Der Verlauf der Kurven gleicht weitgehend dem von Abbn. 2A und B. Während beim Cholin in der säureunlöslichen Fraktion sich kein Unterschied zwischen serumstimulierten Zellen und Kontrollen findet, ist beim Inosit der Abfall der ^3H -Aktivität serumstimulierter Zellen eher noch verstärkt.

Um sicher zu sein, daß sich bei der Markierung mit ^3H -Inosit die Radioaktivität in der Lipidfraktion der Membran befindet, wurden die Zellen mit Chloroform-Methanol extrahiert¹⁴. 98 Prozent der gesamten

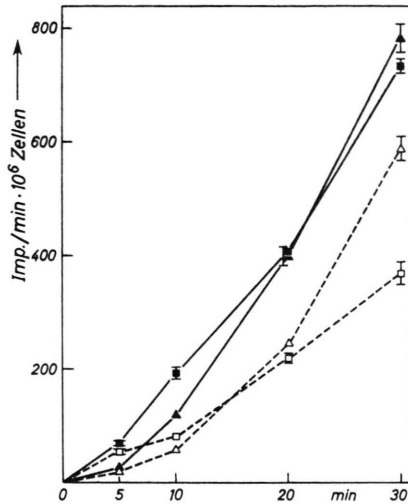


Abb. 4. ^3H - und ^{14}C -Aktivität (Imp./min · 10^6 Zellen) in der säureunlöslichen Fraktion nach gleichzeitiger ^3H -Inosit- ($4 \mu\text{Ci/ml}$) und ^{14}C -Cholin ($0,2 \mu\text{Ci/ml}$)-Gabe zum Zeitpunkt der Stimulierung durch FS entsprechend Abb. 1, II. ■—■ ^3H -Inosit + FS; □---□ ^3H -Inosit, Kontrolle; ▲—▲ ^{14}C -Cholin + FS; Δ---Δ ^{14}C -Cholin, Kontrolle. Alle Punkte stellen Durchschnittswerte und Standardfehler von drei Einzelbestimmungen dar.

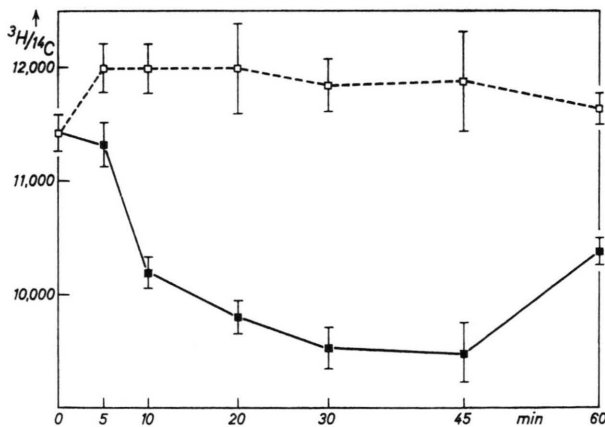


Abb. 5A. $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis in der säureunlöslichen Fraktion bei dem in Abb. 1, III skizzierten Experiment: Vorinkubation der Zellen und Stimulierung durch Serum in Gegenwart von ^3H -Inosit. DNA der Zellen mit ^{14}C -dT vormarkiert. Alle Punkte stellen Durchschnittswerte und Standardfehler von drei Einzelbestimmungen dar. ■—■ + FS; □---□ Kontrolle (+ „inaktives“ Medium).

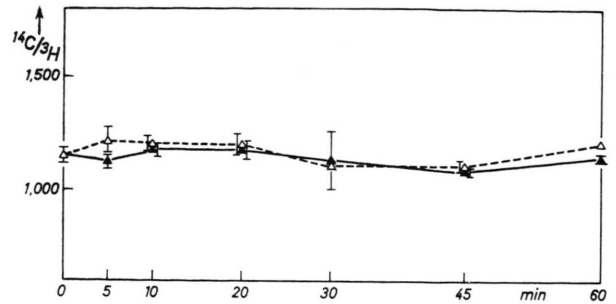


Abb. 5B. Durchführung des Experimentes wie bei A, nur ^{14}C -Cholin anstelle von ^3H -Inosit und Vormarkierung der DNA mit ^3H -dT. ▲—▲ + FS; Δ---Δ Kontrolle (+ „inaktives“ Medium).

Radioaktivität konnten in der organischen Phase nachgewiesen werden. Eine chromatographische Auftrennung ergab, daß wiederum über 90 Prozent davon im Phosphatidylinosit wiedergefunden wurden¹⁷.

Der beim ^3H -Inosit beobachtete Einbau in die säureunlösliche Fraktion unter Einwirkung von Serum ist nicht durch einen verstärkten Transport in die Zelle bedingt.

Wie Abb. 6 zeigt, nehmen stimulierte Zellen und die Kontrollen gleiche Mengen Radioaktivität in die

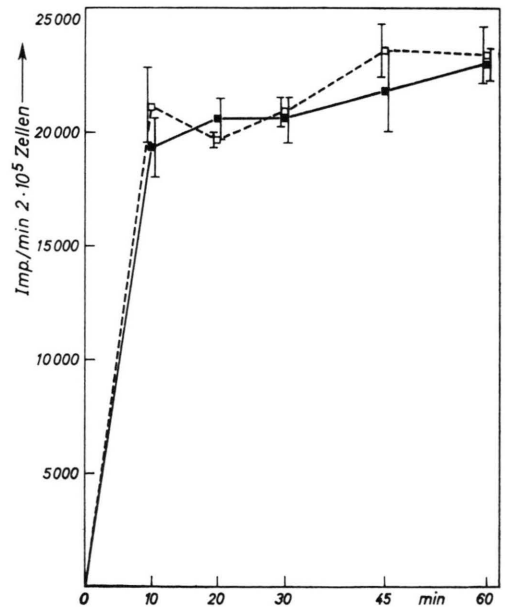


Abb. 6. Aufnahme von ^3H -Inosit in die säurelösliche Fraktion: Das ^3H -Inosit ($4 \mu\text{Ci/ml}$) wurde gleichzeitig mit der Stimulierung gegeben (Versuchsschema Abb. 1, II). Zu den gegebenen Zeiten wurden die Zellen mit 2,5 ml 5-proz. TCA extrahiert. Alle Punkte stellen Durchschnittswerte und Standardfehler von drei Einzelbestimmungen dar. ■—■ + FS; □---□ Kontrolle (+ „inaktives“ Medium).

säurelösliche Fraktion auf. Dabei scheint bereits nach 10 min ein weitgehender Ausgleich erfolgt zu sein.

Weiterhin wurde untersucht, in welchen Substanzen sich die ^3H -Aktivität in der säurelöslichen Fraktion befindet. Die Zellen wurden entsprechend den Angaben von Abb. 1/I mit ^3H -Inosit markiert, 18 Std. in serumfreiem Medium nachinkubiert und dann mit TCA extrahiert. Die Auftrennung des Extraktes erfolgte dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgelplatten mit zwei verschiedenen Fließmittelsystemen; ^3H -Inosit und Phosphatidylinosit dienten als Referenzsubstanzen. 98 Prozent der Radioaktivität fanden sich in Höhe des Inosits und 2 Prozent in Höhe des Phosphatidylinosits.

Um den Einbau von ^{32}P in die Phospholipidfraktion, unter dem Einfluß von Serum zu untersuchen, wurde ebenfalls eine Versuchsanordnung entsprechend Abb. 1/I gewählt. Das Medium enthielt die übliche Phosphatkonzentration (0,9 mM). 15 min vor der Stimulierung durch Serum wurde ^{32}P zupipettiert. Dieses sollte eine Anreicherung von ^{32}P im Phosphat-Pool ermöglichen. Nach einer Stimulierungsdauer von 10 min wurden die Lipide zunächst neutral und anschließend sauer extrahiert. Durch die saure Extraktion sollte eine mögliche verstärkte Phosphorylierung von Polyphosphoinositiden erfaßt werden¹⁸. Tab. I zeigt das $^{32}\text{P}/^3\text{H}$ -Verhältnis in den neutral und sauer extrahierten Lipidfraktionen. Bei den mit Serum stimulierten Zellen findet man gegenüber den Kontrollen eine Steigerung dieses Verhältnisses in den entsprechenden Fraktionen von 0,095 auf 0,844 bzw. 2,945 auf 10,283. Bei diesen Werten wurde berücksichtigt, daß die nicht stimulierten Zellen während der 15 min dauernden Vorinkubationsperiode mit ^{32}P bereits radioaktives Phosphat in die Phospholipide eingebaut haben. Die Steigerung des Phosphateinbaues

beträgt also bei den neutral extrahierten Lipiden das 8,9-fache, bei den sauer extrahierten das 3,5-fache.

Diskussion

Werden Sekundärkulturen embryonaler Rattenzellen 24 Std. in Medium ohne Serum inkubiert und anschließend mit Serum stimuliert, lassen sich zwei verschiedene von einander getrennte Effekte im Stoffwechsel des Phosphatidylinosit beobachten. Innerhalb weniger Minuten nach Serumzugabe wird aus den Membranen Phosphatidylinosit, das mit ^3H -Inosit vormarkiert worden ist, ausgebaut. Das Maximum dieses Effektes wurde nach 30 min gefunden. Die Radioaktivität ist zu diesem Zeitpunkt um etwa 20 Prozent geringer als in den entsprechenden Kontrollen.

Parallel hierzu wird die Neusynthese von Phosphatidylinosit durch den Serumzusatz gesteigert. Die Steigerungsrate gegenüber den Kontrollen beträgt nach 30 min das 2,8-fache, nach 45 min das 3,3-fache. In Absolutimpulsen gemessen, überwiegt jedoch zumindest in der ersten Stunde nach Stimulierung der oben beschriebene ausbauende Effekt.

Nicht geklärt ist zur Zeit noch der Mechanismus dieses Ausbaues, für den es zwei verschiedene Möglichkeiten gibt. Einmal kann aus dem radioaktiv markierten Phosphatidylinosit das ^3H -Inosit in Form des Monophosphates abgespalten werden; dieses würde dem üblichen katabolen Stoffwechselweg des Lipids entsprechen. Zum anderen könnte aber das Phosphatidylinosit als Gesamtmolekül gegen Phosphatidylinosit des Serums ausgetauscht werden. Welche dieser Möglichkeiten zutrifft, müssen weitere Untersuchungen klären. Sicher ist, daß der verstärkte Einbau von ^3H -

Tab. I. $^{32}\text{P}/^3\text{H}$ -Aktivität in den Lipiden von Zellen, die nach Vormarkierung mit ^3H -Inosit (Abb. 1, I) in Gegenwart von ^{32}P stimuliert wurden. 15 min vor Serumzugabe wurde ^{32}P in das Medium pipettiert. 10 min nach Stimulierung wurden die Zellen neutral und sauer extrahiert. Die linke Hälfte der Tabelle zeigt die $^{32}\text{P}/^3\text{H}$ -Verhältnisse bei stimulierten Zellen und Kontrollen sowie die prozentuale Steigerung des Phosphateinbaues. In der rechten Hälfte sind die entsprechenden korrigierten Werte angegeben. Dabei wurde berücksichtigt, daß die Zellen 15 min vor der Stimulierung bereits ^{32}P eingebaut haben, was in einer anderen Versuchsserie gezeigt werden konnte¹⁷.

	Kontrolle $^{32}\text{P}/^3\text{H}$	+ Serum $^{32}\text{P}/^3\text{H}$	Steigerung gegenüber Kontrolle in [%]	Kontrolle (korrig.) $^{32}\text{P}/^3\text{H}$	+ Serum (korrig.) $^{32}\text{P}/^3\text{H}$	Steigerung gegenüber Kontrolle in [%]
Neutral extrahierte Lipidfraktion	0,236	1,037	439	0,095	0,884	888
Sauer extrahierte Lipidfraktion	7,369	11,946	162	2,945	10,283	349

Inosit nach Stimulierung auf eine Neusynthese des Phosphatidylinosit zurückzuführen ist. Wie die Untersuchung von ^3H -Inosit in dem säurelöslichen Pool zeigt, nehmen stimulierte Zellen und Kontrollen gleich viel Inosit auf. Dieses steht im Gegensatz zu den Befunden bei Uridin; hier findet innerhalb weniger Minuten nach Stimulierung ein verstärkter Einstrom dieses Nukleosids in die Zellen statt¹⁹.

Im Gegensatz zu den Befunden beim Inosit erfolgt bei Zellen, die mit ^{14}C -Cholin vormarkiert worden waren, gegenüber den Kontrollen kein Ausbau von Radioaktivität nach Stimulierung mit Serum. Bietet man den Zellen zusammen mit Serum ^{14}C -Cholin an, so steigt zwar der Einbau gegenüber den nicht stimulierten Kontrollen an, erreicht aber nicht dasselbe Ausmaß wie beim Inosit (2,0-fach nach 30 min, 1,6-fach nach 45 min). Wesentlich stärker noch als die Aufnahme von Inosit wird der Einbau von anorganischem Phosphat in die Phospholipide durch Serum stimuliert. Bereits nach 10 min findet man in der neutral extrahierten Lipidfraktion einen Anstieg der ^{32}P -Aktivität um das 8,9-fache gegenüber den Kontrollen. In der sauer extrahierten Lipidfraktion, die vorwiegend Polyphosphoinositide enthalten soll, ist dieser Anstieg im Einbau nicht so ausgeprägt und beträgt nur das 3,5-fache der Kontrolle.

Alle diese Ergebnisse deuten auf bestimmte Änderungen der Membranstruktur hin, die kurze Zeit nach Stimulierung der Zellen durch Serum erfolgen müssen. Dies drückt sich auch im Abfall der Membranpotentialdifferenz⁴ und in der erhöhten Permeabilität für Uridin¹⁹ und Ca^{2+} aus²⁰. Es scheint, daß die Strukturänderungen und die daraus resultierende Permeabilitätsänderung für bestimmte Substanzen die Voraussetzung für die Stimulierbarkeit der DNA-Synthese in den Zellen sind.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Herrn Dr. H. DIRINGER danken wir für die Überlassung des Phosphatidylinosits, Fräulein U. WEISSER für die technische Assistenz.

- ¹ W. FRANK, H.-J. RISTOW u. S. ZABEL, *Europ. J. Biochem.* **14**, 392 [1970].
- ² W. FRANK u. S. ZABEL, *Exp. Cell Res.* **59**, 186 [1970].
- ³ J. VESER u. W. FRANK, *Z. Naturforsch.* **27b**, 1573 [1972].
- ⁴ D. HÜLSER u. W. FRANK, *Z. Naturforsch.* **26b**, 1045 [1971].
- ⁵ J. GRIMM u. W. FRANK, *Z. Naturforsch.* **27b**, 562 [1971].
- ⁶ D. B. FISHER u. G. C. MUELLER, *Biochemistry* **60**, 1396 [1968].
- ⁷ D. B. FISHER u. G. C. MUELLER, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **248**, 434 [1971].
- ⁸ D. D. CUNNINGHAM u. A. B. PARDEE, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **64**, 1049 [1969].
- ⁹ C. A. PASTERNAK, *J. Cell Biol.* **53**, 231 [1972].
- ¹⁰ A. J. SABRA u. M. L. KARNOVSKY, *J. biol. Chemistry* **235**, 2224 [1960].
- ¹¹ P. S. SASTRY u. L. E. HOKIN, *J. biol. Chemistry* **241**, 3354 [1966].
- ¹² W. FRANK, H.-J. RISTOW u. S. SCHWALB, *Exp. Cell Res.* **70**, 390 [1972].
- ¹³ E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967.
- ¹⁴ M. A. WELLS u. J. C. DITTMER, *Biochemistry* **4**, 2459 [1965].
- ¹⁵ M. A. WELLS u. J. C. DITTMER, *Biochemistry* **2**, 1259 [1963].
- ¹⁶ R. MANSO u. W. FRANK, *Z. Naturforsch.* **27b**, 1500 [1972].
- ¹⁷ R. HOFFMANN, H.-J. RISTOW u. W. FRANK, in Vorbereitung.
- ¹⁸ J. C. DITTMER u. M. G. DOUGLAS, *Ann. New York Acad. Sci.* **165**, Art. 2, 515 [1969].
- ¹⁹ M. HÜMPEL u. W. FRANK, *Z. Naturforsch.* **27b**, 1399 [1972].
- ²⁰ W. FRANK, in Vorbereitung.