

Stimulierung embryonaler Rattenzellen durch
Kälberserum, VII

**Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels nicht
durch Abgabe des Nukleotids ins Kulturmedium
bedingt**

Stimulation of Embryonic Rat Cells in Culture by
Calf Serum, VII

Decrease of Intracellular cAMP Level Not Caused by
Leakage of the Nucleotide into the Culture Medium

J. Grimm und W. Frank

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

(Z. Naturforsch. 28 c, 629–630 [1973]; eingegangen
am 3. Juli 1973)

Rat fibroblasts, serum stimulation, cAMP release

Werden embryonale Rattenfibroblasten in serumfreiem Medium inkubiert, so steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel beträchtlich¹, und die Zellen häufen sich in der G₁-Phase des Zellzyklus an². Nach Zusage von fötalem Kälberserum fällt innerhalb von 10 min die cAMP-Konzentration um den Faktor 5 ab¹; die Zellen beginnen dann etwa 15 Stdn. später mit der DNA-Synthese.

Für den Mechanismus der Stimulierung ist von großer Bedeutung, ob die rasche Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration auf einem beschleunigten Abbau innerhalb der Zellen beruht, oder ob das cyclische Nukleotid infolge von Membranveränderungen ins Kulturmedium abgegeben wird. In der vorliegenden Mitteilung wird gezeigt, daß eine bevorzugte Abgabe ins Medium nicht den raschen Abfall des cAMP-Gehaltes erklären kann.

Die Kulturen embryonaler Rattenfibroblasten wurden angelegt, wie bereits früher beschrieben wurde³. Für die Versuche wurden die Zellen in Plastik-Kulturschälchen (Falcon Plastics, 60/10 mm) in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Schälchen ausgesät und 24 Stdn. in einem modifizierten Eagle-Medium⁴ unter Zusatz von 10% Kälberserum angezüchtet (5 ml Medium pro Schälchen, mit Wasser-gesättigter O₂/CO₂-Atmosphäre begast). Nach Mediumwechsel wurden die Kulturen weitere 24 Stdn. in serumfreiem Medium gehalten, dann in jedes Schälchen 5 μ l ³H-Adenosin (1 mCi/ml, spez. Akt. 16,2 Ci/mMol; NEN) pipettiert und die Zellen weitere 2 Stdn. inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt, und die eine Hälfte der Kulturen erhielt je Schälchen 3,0 ml Eagle-Medium, die insgesamt 0,2 mg kaltes cAMP sowie 0,2 μ l 2-¹⁴C-cAMP (0,1 mCi/ml; spez. Akt.

52,5 mCi/mMol; NEN) enthielten; die andere Hälfte wurde zusätzlich durch 10% Kälberserum stimuliert. In der angewandten Konzentration hat das cAMP im Kulturmedium keinen Einfluß auf die Stimulierbarkeit der Zellen durch Serum⁵. Das Medium wurde nach 30 min abgegossen und aufgearbeitet, wie weiter unten beschrieben. Zu den Zellen wurden je Schälchen 3,0 ml eiskalte 7-proz. Perchlorsäure-Lösung gegeben, die insgesamt ebenfalls 0,2 mg kaltes cAMP sowie 0,2 μ l 2-¹⁴C-cAMP (0,1 mCi/ml; spez. Akt. 52,5 mCi) enthielten. Die Extrakte von jeweils 3 Schälchen, die mit bzw. ohne Serum für 30 min inkubiert worden waren, wurden vereinigt und mit KOH neutralisiert. Das ausgefallene Kalium-perchlorat wurde abzentrifugiert, der Überstand im Vakuum-Exsikkator über P₂O₅ eingeengt und nach Zentrifugieren auf PEI-Zelluloseplatten (Fa. Merck, Darmstadt) aufgetragen; die PEI-Zelluloseplatten waren zuvor mit bidestilliertem Wasser gewaschen worden. Die Chromatogramme wurden in einer feuchtigkeitsgesättigten Kammer mit 0,3 M wäßriger LiCl-Lösung entwickelt, bis die Lösungsmittelfront den oberen Plattenrand erreicht hatte¹. Die cAMP-enthaltende Bande wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht, ausgekratzt und mit 1,0 ml heißer 7-proz. Trichloressigsäure extrahiert. Die Radioaktivität in 0,5 ml des Extraktes wurde in 5,0 ml dioxanhaltiger Zählerflüssigkeit im Packard-Szintillationszähler, Model 3375, ermittelt. Die Kanaleinstellung wurde so gewählt, daß weniger als 0,1% der ³H-Aktivität im ¹⁴C-Kanal und 20% der ¹⁴C-Aktivität im ³H-Kanal gemessen wurden; die Ergebnisse wurden entsprechend korrigiert.

Die Kulturmedien von je 3 Schälchen (mit und ohne Serum nachinkubiert) wurden ebenfalls vereinigt. Das cAMP wurde durch aufeinanderfolgende Absorptionen an Dowex 2 und Dowex 50⁶ vorge-reinigt; das Dowex-50-Eluat wurde im Vakuum-Exsikkator über P₂O₅ eingeengt und der Rückstand auf PEI-Zelluloseplatten weiter aufgetrennt, wie für die Perchlorsäureextrakte beschrieben wurde.

Tab. I. Verhältnis ³H-cAMP/¹⁴C-cAMP im Kulturmedium und Perchlorsäure-Extrakt von embryonalen Rattenfibroblasten, die 24 Stdn. in serumfreiem Medium vorinkubiert, dann für 2 Stdn. mit ³H-Adenosin markiert und für 30 min mit bzw. ohne Serum nachinkubiert worden waren. Dem Kulturmedium (während der 30 min Stimulierung) und der Perchlorsäure für die Extraktion waren jeweils gleiche Mengen kaltes cAMP und ¹⁴C-cAMP zugesetzt worden.

Inkubation [30 min]	Verhältnis ³ H/ ¹⁴ C-Aktivität cAMP des Kulturmediums	Verhältnis ³ H/ ¹⁴ C-Aktivität cAMP des Zellextraktes
+	0,72	7,1
-	0,72	25,4



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.

Das Ergebnis eines typischen Experiments ist in Tab. I aufgeführt. Da stets gleiche Mengen ^{14}C -cAMP dem Kulturmedium bzw. der Perchlorsäure zugesetzt wurden, sind die $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotienten den ^3H -cAMP-Konzentrationen direkt proportional. Hieraus ergibt sich, daß 30 min nach Stimulierung durch Kälberserum die ^3H -cAMP-Konzentration in den Zellen nur noch 28% des Kontrollwertes, bei dem die Zellen in Medium ohne Serum inkubiert wurden, beträgt.

Von den nicht stimulierten Zellen wurden während der 30 min weniger als 3% des intrazellulären ^3H -cAMP ins Kulturmedium abgegeben. Dieser Wert erhöhte sich bei den stimulierten Zellen nicht.

¹ J. Grimm u. W. Frank, Z. Naturforsch. **27 b**, 562 [1972].

² W. Frank, H.-J. Ristow u. S. Zabel, Eur. J. Biochem. **14**, 392 [1970].

³ J. Veser u. W. Frank, Z. Naturforsch. **27 b**, 1573 [1972].

Aus 3 verschiedenen Experimenten ergaben sich folgende Mittelwerte mit Standardabweichungen: Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels 30 min nach Stimulierung $69 \pm 6\%$; Abgabe von cAMP ins Kulturmedium während dieser Zeit $3,0 \pm 1,2\%$. So mit muß praktisch die gesamte Menge des verschwindenden cAMP in den Zellen enzymatisch abgebaut worden sein. Dies wiederum ist nur möglich durch eine sehr rasche Veränderung der Aktivitäten des cAMP-metabolisierenden Enzymsystems (Phosphodiesterasen und Adenylatcyclase).

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

⁴ W. Frank, H.-J. Ristow u. S. Schwab, Exp. Cell Res. **70**, 380 [1972].

⁵ W. Frank, Exp. Cell Res. **71**, 238 [1972].

⁶ E. W. Sutherland u. T. W. Rall, J. biol. Chemistry **232**, 1077 [1958].