

# Einfluß von Serum auf die Eliminierung von Phospholipiden aus embryonalen Rattenfibroblasten in Kultur

Influence of Serum on the Release of Phospholipids from Embryonic Rat Cells in Culture

Hans-Jürgen Ristow \*, Heinz Pachowsky und Werner Frank

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

(Z. Naturforsch. 29 c, 760–766 [1974]; eingegangen am 22. Juli 1974)

Rat Fibroblasts, Serum, Phospholipids

The phospholipids of embryonic rat fibroblasts in tissue culture have been labelled with [<sup>3</sup>H] (myo) inositol, [<sup>3</sup>H] choline, [<sup>3</sup>H] glycerol and inorganic <sup>32</sup>P, respectively. After 24 hours in serum-free medium the cells have been triggered by fetal calf serum or by a mixture of the growth-stimulating serum proteins S1 and S2, and the phospholipids were examined.

1. Up to 15–20 percent of total radioactivity are eliminated from the phospholipid fraction during 30 min after stimulation, when the cells have been prelabelled with [<sup>3</sup>H] inositol; within 2 hours, however, the original value is restored. When the cells are prelabelled with <sup>32</sup>P, the radioactivity also decreases, but in contrast to the experiments with [<sup>3</sup>H] inositol it remains low. From this result one must conclude that part of the PI in the membranes is broken down after stimulation, and that the inositol moiety is reutilized for newly synthesized PI. After stimulation, a small amount of labelled PI is also found in the culture medium.

2. The elimination of radioactivity does not exclusively take place in G<sub>1</sub> phase. It can also be demonstrated with cells in S after removal of serum for one hour and readdition.

3. The loss of radioactivity cannot be demonstrated when the cells are triggered by dialysed fetal calf serum or by the serum factors S1 and S2. Examination of the dialysate revealed phosphatidylinositol as compound which necessarily must be present for the elimination process after stimulation. This elimination process is also demonstrable if the biosynthesis of PI is blocked by gamma- or delta-hexachlorocyclohexane, whereas the beta derivative is completely ineffective.

Phospholipide sind essentielle Bestandteile aller biologischen Membranen. Sie sind wichtig für die Aufnahme lipophiler Verbindungen und den selektiven Ausschluß von hydrophilen Substanzen, sie sind verantwortlich für die Fluidität von Zellmembranen und stellen funktionelle Bestandteile von Enzymsystemen dar (z.B.<sup>1</sup>). Werden endokrine Drüsen oder ruhende Zellsysteme stimuliert, so wird der Phospholipid-Turnover verstärkt<sup>2</sup>, aber auch Austausch von intakten Phospholipid-Molekülen mit der Umgebung findet statt<sup>3,4</sup>. Die Abgabe von [<sup>32</sup>P]- und [<sup>14</sup>C]Cholin-markierten Phospholipiden durch kultivierte Zellen wurde zuerst von Peterson und Rubin untersucht<sup>5</sup>. Diese Autoren stellen bei embryonalen Hühnerfibroblasten die rasche Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Zell- und Serumphospholipiden fest, wobei die Anwesenheit von Serum im Kulturmedium die Abgabe stark beschleunigte.

In einer früheren Arbeit war berichtet worden, daß während der ersten Minuten nach Stimulierung von embryonalen Rattenfibroblasten, die durch Serumzug in der G<sub>1</sub>-Phase angesammelt worden waren, bis zu 18% der Radioaktivität aus vormarkiertem PI abgegeben wurden<sup>6</sup>, während auf PC kein Einfluß festgestellt werden konnte. Dieser Serumeffekt wurde im folgenden weiter untersucht, wobei die Phospholipide außer durch Inositol und Cholin noch durch [<sup>32</sup>P] und [<sup>3</sup>H]Glycerin vor-markiert worden waren.

## Material und Methoden

### Zellkulturen

Primärkulturen embryonaler Rattenfibroblasten wurden von den Rückenmuskeln von Föten (18.–20. Tag, Marshall-Ratten) angelegt, wie in einer anderen Arbeit beschrieben wurde<sup>7</sup>. Die Zellen wur-

\* Gegenwärtige Adresse: The Armand Hammer Center for Cancer Biology, The Salk Institut for Biological Studies, San Diego, California.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. W. Frank, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Abteilung Physikalische Biologie, D-7400 Tübingen, Spemannstr. 35.

Abkürzungen: PI, Phosphatidylinositol; PC, Phosphatidylserin; PE, Phosphatidyläthanolamin; C, Cardiolipin; S, Sphingomyelin; FS, foetales Kälberserum; SS, Gemisch der Serumfaktoren S1 und S2.



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.

den in einem modifizierten Eagle-Medium<sup>8</sup> unter Zusatz von 10% Kälberserum gezüchtet. Für die Versuche mit [<sup>3</sup>H]Inositol bzw. [<sup>3</sup>H]Cholin erhielten sie zunächst zur Vormarkierung für etwa 2–3 Generationen [<sup>14</sup>C]Thymidin (0,3–0,6 mCi/ml; spez. Akt. 50 mCi/mmol, NEN) und wurden danach in Falcon-Plastik-Kulturschälchen (60 × 15 mm, 1 × 10<sup>6</sup> Zellen in 5 ml Medium) ausgesät. Für die Versuche mit [<sup>32</sup>P] und [<sup>3</sup>H]Glycerin erfolgte eine Vormarkierung mit [<sup>14</sup>C]Thymidin, und die Zellen wurden in diesem Falle in größeren Falcon-Schalen (100 × 20 mm, 4 × 10<sup>6</sup> Zellen in 10 ml Medium) angezüchtet.

#### Markierung der Phospholipide

Nach dem Anzüchten in den Falcon-Kulturschalen wurden die Zellen für 24 Stunden in Medium + 10% Kälberserum inkubiert, das außerdem die entsprechenden radioaktiven Vorstufen enthielt [<sup>32</sup>P]Orthophosphat: 20 μCi/ml, spez. Akt. 1000 Ci/mmol; [<sup>3</sup>H]myo-Inositol: 0,5 μCi/ml, spez. Akt. 472 Ci/mmol, NEN; [<sup>3</sup>H]Cholin: 0,01 μCi/ml, spez. Akt. 16,5 Ci/mmol, Amersham). Beim Einbau von [<sup>3</sup>H]Inositol enthielt das Medium nur 10% der üblichen Inositol-Konzentration. Wie Kontrollversuche zeigten, hat die Reduzierung der Inositolkonzentration während 24 Stunden keinen Einfluß auf das Wachstum der Zellen. Nach der 24-stündigen Markierungsperiode wurde das Medium gewechselt und wurden die Zellen weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium gehalten, das zusätzlich 1% Lactalbuminhydrolysat (Fa. Serva, Heidelberg) enthielt. Die nachfolgende Stimulierung der Zellen erfolgte entweder durch Zugabe von fötalem Kälberserum (Endkonzentration 10%) bzw. wachstumsstimulierenden Serumfaktoren (SS) oder durch Absaugen und Zugabe von frischem Medium mit 10% Serum bzw. SS. SS ist ein Gemisch der früher beschriebenen Faktoren S1 und S2 und wurde wie bei<sup>7</sup> beschrieben gewonnen.

Bei den Doppelmarkierungsversuchen mit [<sup>14</sup>C]Thymidin und [<sup>3</sup>H]Cholin bzw. [<sup>3</sup>H]Inositol wurden die Zellen nach Versuchsende und Abgießen des Mediums mit 5 ml kalter, 7-prozentiger TCA fixiert, mit einem Gummiwischer von den Kulturschälchen abgekratzt und auf Sartorius-Membranfilter (0,45 nm) gesaugt. Nach dem Trocknen wurden die Filterplättchen in Zählerfläschchen überführt und nach Zugabe von 5 ml Toluol-haltiger Szintillatorflüssigkeit die radioaktiven Zerfälle in einem Packard-Tricarb-Szintillationsmeßgerät bestimmt; unter den Zählbedingungen wurden keine Tritium-Impulse im <sup>14</sup>C-Kanal, jedoch 25% der <sup>14</sup>C-Impulse im Tritiumkanal erfaßt.

In einer früheren Arbeit war gezeigt worden, daß unter den angegebenen experimentellen Bedingungen die <sup>3</sup>H-Aktivität des [<sup>3</sup>H]myo-Inositol ausschließlich in die Phospholipide eingebaut wird<sup>9</sup>.

#### Isolierung von [<sup>32</sup>P]- bzw. [<sup>3</sup>H]Glycerin-markierten Phospholipiden aus den Zellen

Die Phospholipide wurden mit Chloroform/Methanol 2:1 aus den Zellen extrahiert, wie kürzlich beschrieben<sup>9</sup>. Die Auftrennung erfolgte durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie, die Isolierung der einzelnen Phospholipide durch Anfärbung mit Jod bzw. Autoradiographie<sup>9</sup>.

#### Isolierung von Phospholipiden aus dem Medium

Das Kulturmedium wurde von dem Zellrasen abgegossen, zentrifugiert und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde mit 2 ml eines Gemisches Chloroform/Methanol 2:1 extrahiert. Nach Zentrifugation wurden aus der Lösung die Phospholipide in gleicher Weise wie bei den Zellextrakten isoliert.

#### Ergebnisse

Wie in einer früheren Arbeit dargelegt wurde<sup>6</sup>, werden bei Sekundärkulturen embryonaler Rattenfibroblasten 20–30 min nach Stimulierung etwa 18% des Inosit aus der Phospholipidfraktion eliminiert, während beim Cholin kein Effekt nachzuweisen ist. Wir haben nun die Kinetik bei Zellen, die mit [<sup>14</sup>C]Thymidin und [<sup>3</sup>H]Inositol bzw. [<sup>3</sup>H]Cholin

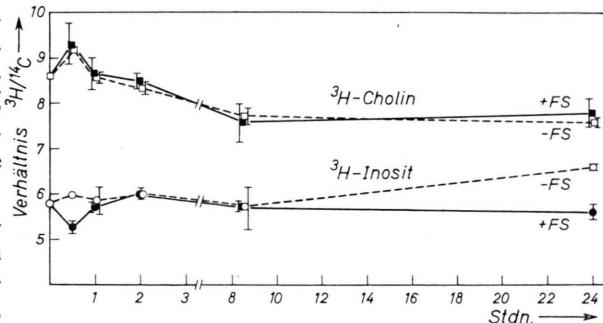


Abb. 1. Verhalten der Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion von embryonalen Rattenfibroblasten, die 24 Stunden mit [<sup>3</sup>H]myo-Inositol (0,5 μCi/ml Medium) bzw. [<sup>3</sup>H]Cholin (0,01 μCi/ml Medium) vormarkiert, danach weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium + 1% Lactalbuminhydrolysat inkubiert und durch Zugabe von Fötalserum zum Zeitpunkt 0 stimuliert worden waren. Um die Zellverlustraten korrigieren zu können, waren die Zellen vor Versuchsbeginn über 2–3 Generationen in Gegenwart von [<sup>14</sup>C]Thymidin gezüchtet worden. Dargestellt sind die Durchschnittswerte von 3 Einzelbestimmungen und die Standardfehler.

lin vormarkiert worden waren, bis 24 Stunden nach Zugabe von fötalem Kälberserum verfolgt, die Ergebnisse sind in Abb. 1 wiedergegeben. Danach folgt beim Inosit auf die Phase des Ausbaus der Radioaktivität (Maximum nach 30 min) eine 2. Phase, während die die  $^3\text{H}$ -Aktivität in der säureunlöslichen Zellfraktion wieder ansteigt und die nach etwa 2 Stunden abgeschlossen ist. Zwischen der 9. und 24. Stunde nimmt dann die  $^3\text{H}$ -Aktivität in den nichtstimulierten Zellen leicht zu, während sie in den Zellen in Medium mit 10% Serum konstant bleibt. Beim Cholin dagegen kann bis zu 24 Stunden kein signifikanter Unterschied zwischen stimulierten Zellen und Kontrollen nachgewiesen werden. Um festzustellen, ob diese Abnahme des Inositgehaltes nach Zugabe von Serum nur auf die G<sub>1</sub>-Phase beschränkt ist, oder ob sie auch in anderen Phasen des Zellzyklus nach Wegnahme und Wiederzugabe von Serum erfolgt, wurde das folgende Experiment durchgeführt. Eine Hälfte von Kulturen embryонаler Rattenfibroblasten wurde mit [ $^3\text{H}$ ]Inosit vormarkiert, wie in Material und Methoden beschrieben. Nachdem die Zellen anschließend 24 Stunden im Medium ohne Serum inkubiert worden waren, wurden sie mit FS stimuliert. Nach 20 min wurden die Zellen zweier Schälchen mit TCA fixiert; ebenso wurden 2 Kontrollen behandelt, die nicht mit Serum getriggert worden waren. Den übrigen, mit [ $^3\text{H}$ ]-Inosit vormarkierten Zellen wurde nach 18 bzw. 21 oder 24 Stunden das Serum entzogen und nach 1 Stunde wieder zugegeben. Jeweils 20 min danach wurde die Inkubation durch Zugabe von TCA beendet. Die genannten Zeiten wählten wir deshalb, weil aus früheren Untersuchungen bekannt war, daß zwischen der 15. und 24. Stunde das Maximum der DNA-Synthese liegt<sup>10</sup>. Um auch in diesem Fall sicherzugehen, daß sich die Zellen wirklich in der S-Phase befanden, wurde der anderen Hälfte der Kulturen, die nicht mit [ $^3\text{H}$ ]Inosit vormarkiert worden waren, in den genannten Zeiten für 1 Stunde [ $^3\text{H}$ ]Thymidin angeboten und die Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion bestimmt. Dem erheblich gesteigerten Thymidineinbau zur 19., 22. und 25. Stunde kann entnommen werden, daß sich die Zellen in der S-Phase befanden. Der Anteil der Radioaktivität, der von den mit [ $^3\text{H}$ ]Inosit vormarkierten Zellen nach Zugabe von Serum abgegeben wird, ist aber zu diesen Zeiten praktisch gleich wie zum Zeitpunkt „Null“, d. h. wie in der G<sub>1</sub>-Phase (Abb. 2).

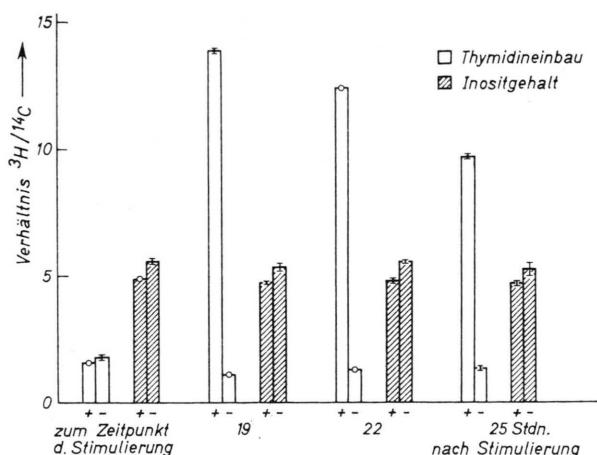


Abb. 2. Versuche zur Zellzyklus-Spezifität der Abgabe von [ $^3\text{H}$ ]Inosit aus der säureunlöslichen Zellfraktion. Die Zellen waren mit [ $^3\text{H}$ ]myo-Inosit bzw. [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidin vormarkiert worden, wie bei Abb. 1 beschrieben. 18, 21 und 24 Stunden nach Stimulierung mit Fötalserum wurde jeweils für 1 Stunde das Serum wieder entzogen, nach 1 Stunde erneut zugegeben (die Kontrollen wurden stets in serumfreiem Medium inkubiert) und der Ausbau von [ $^3\text{H}$ ]Inosit 20 min später gemessen. Zur Kontrolle des Thymidin-Einbaus wurden Zellen, die nur mit [ $^{14}\text{C}$ ]Thymidin vormarkiert waren, für 1 Stunde mit [ $^3\text{H}$ ]Thymidin (1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ; spez. Akt. 5 Ci/mmol) markiert. Dargestellt sind die Durchschnittswerte von 3 Einzelbestimmungen und die Standardfehler.

Wenn die Phospholipide der Fibroblasten durch Vorinkubation mit  $^{32}\text{P}$  markiert wurden, so nimmt ebenfalls wenige min nach Stimulierung die Radioaktivität im PI ab (Abb. 3). Im Gegensatz zu den Versuchen mit [ $^3\text{H}$ ]Inosit wurde die abgegebene

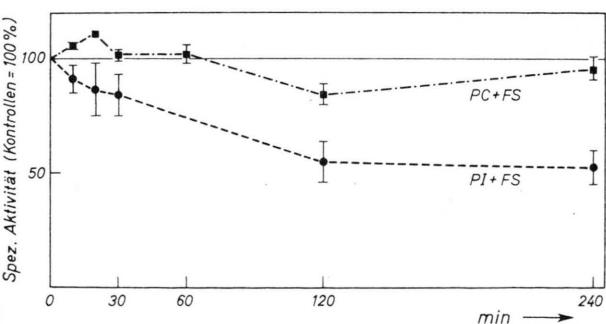


Abb. 3. Relative spezifische Aktivitäten von  $^{32}\text{P}$  in PI und PC nach Stimulierung. Die embryonalen Rattenfibroblasten waren 24 Stunden mit [ $^{32}\text{P}$ ]Orthophosphat (15  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  Medium) vorinkubiert, weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium ohne  $^{32}\text{P}$  nachinkubiert und zum Zeitpunkt 0 mit 10% Fötalserum stimuliert worden. Die Phospholipide wurden extrahiert, dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und die spez. Aktivität nach Hydrolyse ermittelt; die nicht stimulierten Kontrollen wurden = 100% gesetzt. Dargestellt sind die Durchschnittswerte von 3 Einzelbestimmungen und die Standardfehler. Die Kurvenverläufe bei PE und PS entsprechen denen bei PC und sind deshalb nicht aufgeführt.

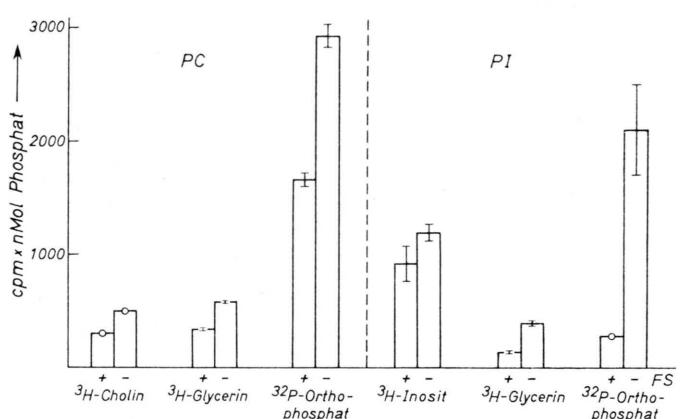
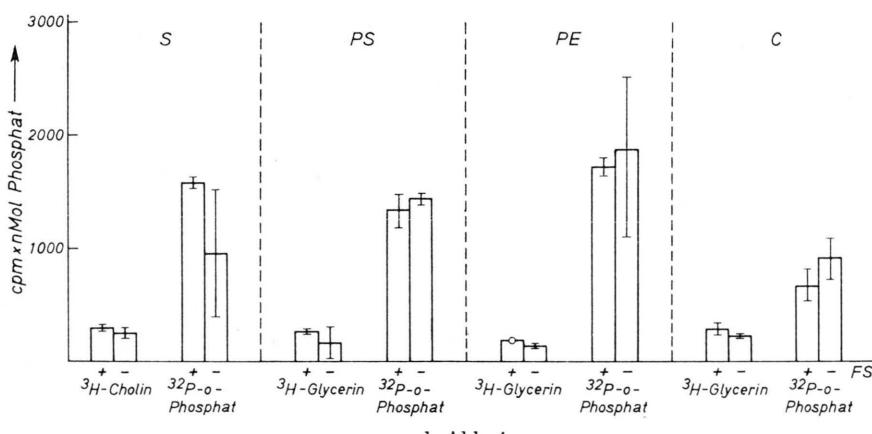


Abb. 4. Spezifische Aktivitäten von  $[{}^3\text{H}]$ Glycerin,  $[{}^3\text{H}]$ myo-Inositol,  $[{}^3\text{H}]$ Cholin und  ${}^{32}\text{P}$  in Phospholipiden von embryonalen Rattenfibroblasten, die 24 Stunden mit den entsprechenden Verbindungen markiert ( $[{}^3\text{H}]$ Glycerin: 1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ;  $[{}^3\text{H}]$ Inositol: 1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  Medium, das 1% des normalen Inositgehaltes hat;  $[{}^3\text{H}]$ Cholin: 0,1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ;  ${}^{32}\text{P}$ : 20  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ), weitere 24 Stunden in serumfreiem Medium nachinkubiert und 24 Stunden mit 10% Fötalserum stimuliert worden waren. Die Phospholipide wurden extrahiert, dünnenschichtchromatographisch getrennt und hydrolysiert; in Aliquots wurden die Radioaktivitäten bzw. Phosphatgehalte ermittelt. Dargestellt sind die Meßwerte von Doppelbestimmungen.



noch Abb. 4

Radioaktivität nicht mehr in die Phospholipidfraktion eingebaut. In einem weiteren Experiment wurden die Zellen zusätzlich noch durch Vorinkubation mit  $[{}^3\text{H}]$ Glycerin markiert und die Abgabe von  $[{}^3\text{H}]$ Inositol,  $[{}^{32}\text{P}]$ - und  $[{}^3\text{H}]$ Glycerin 24 Stunden nach Stimulierung gemessen. Nach den in Abb. 4 wiedergegebenen Daten wird sowohl bei der Markierung mit  $[{}^{32}\text{P}]$ - wie mit  $[{}^3\text{H}]$ Glycerin ein beträchtlicher Teil der Radioaktivität im Vergleich zu den nicht aktivierten Kontrollen aus dem PI und zum Teil auch aus dem PC eliminiert, während nach Markierung von PI mit  $[{}^3\text{H}]$ Inositol kaum ein signifikanter Unterschied zu finden ist. Beträgt nach  $[{}^3\text{H}]$ Inositol- und  $[{}^{32}\text{P}]$ -Vormarkierung das Verhältnis der  ${}^3\text{H}$ -Aktivität zur  $[{}^{32}\text{P}]$ -Aktivität zum Zeitpunkt der Stimulierung durchschnittlich 0,4 (nicht dargestellt), so steigt es nach 24 Stunden in den stimulierten Zellen auf 3,3, während es in den nichtstimulierten Zellen zu diesem Zeitpunkt 0,6 beträgt. Für

PC lauten die entsprechenden Werte nach  $[{}^3\text{H}]$ Cholin- und  $[{}^{32}\text{P}]$ -Vormarkierung: 0,13 zum Zeitpunkt der Stimulierung, 0,18 bei stimulierten Zellen nach 24 Stunden und 0,17 bei nichtstimulierten nach 24 Stunden. Bei allen übrigen Phospholipiden fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen stimulierten und nichtstimulierten Zellen.

Für den Abfall der Radioaktivität im PC und besonders im PI gibt es 2 Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen könnte der Abbau dieser Phospholipide nach Stimulierung verstärkt erfolgen, zum anderen kann aber auch eine Abgabe oder ein Austausch kompletter Moleküle erfolgen. Um letztere Möglichkeit zu prüfen, wurde nach Stimulierung der Gehalt an  $[{}^{32}\text{P}]$ -markierten Phospholipiden im Kulturmedium untersucht. Nach Abb. 5 werden sowohl von stimulierten als auch von nicht stimulierten Zellen PI, PC, PS, PE, PC und C in das Medium abgegeben, wobei die Mengen in Gegenwart von Serum größer

sind als ohne Serum. Insgesamt jedoch beträgt die mit den intakten Phospholipiden abgegebene Radioaktivität nur etwa 5–10% der nach Stimulierung aus den Zellen verschwundenen Gesamtkaktivität. Hieraus muß der Schluß gezogen werden, daß die Hauptmenge der Phospholipide nicht als ganze Moleküle ausgetauscht, sondern abgebaut wird.

Überraschenderweise konnte kein Ausbau von [<sup>3</sup>H]Inositol aus PI gefunden werden, wenn die Fibroblasten durch dialysiertes Fötalserum oder durch ein Gemisch der beiden Serumfaktoren S1 und S2 (SS) stimuliert wurden (Abb. 6). Der verschiedene Gehalt an freiem Inositol in dialysiertem Medium ist hierfür nicht verantwortlich, wie aus

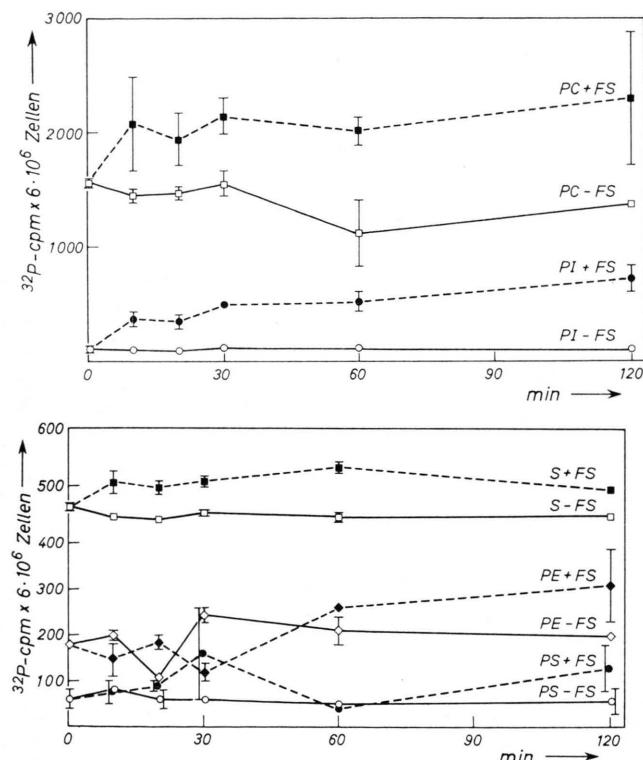


Abb. 5. Abgabe von <sup>32</sup>P-markierten Phospholipiden ins Kulturmedium durch gestimulierte bzw. nichtgestimulierte Rattenfibroblasten (ca.  $8 \cdot 10^6$  Zellen). Die Zellen waren nach der Markierung mit <sup>32</sup>P 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert und zum Zeitpunkt 0 (ohne Mediumwechsel) durch Zugabe von Fötalserum stimuliert worden. Die Phospholipide wurden nach Lyophilisieren des Mediums extrahiert und durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie getrennt. Dargestellt sind die Durchschnittswerte von 3 Einzelbestimmungen und die Standardfehler. Die Phosphatgehalte der einzelnen Radioaktivitätszonen lagen knapp über der Nachweisgrenze der benutzten Analysenmethode, so daß die spezifischen Aktivitäten nicht ermittelt werden konnten.

Abb. 7 entnommen werden kann. Bringt man mit [<sup>3</sup>H]Inositol vormarkierte Zellen 24 Stunden vor Zugabe des Serums in Medium mit 0 bzw. 4 oder 40 μM Inositol, so ist der Abfall der <sup>3</sup>H-Aktivität 30 min nach Zugabe von Serum bei den verschiedenen Inositkonzentrationen gleich. Um zu klären, weshalb mit dialysiertem Fötalserum und SS dieser Effekt nicht eintritt, wurde das Dialysat des Fötalserums durch Lyophilisieren eingeengt und bei der

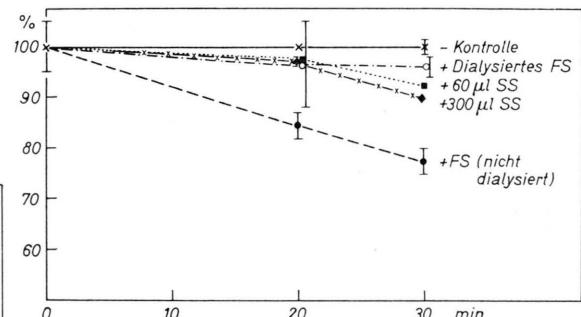


Abb. 6. Verhalten der Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion von Rattenfibroblasten. Die Zellen waren wie unter Abb. 1 beschrieben, mit [<sup>3</sup>H]Inositol vormarkiert und anschließend 24 Stunden in 3 ml serumfreiem Medium nachinkubiert worden. Sie wurden dann mit 0,3 ml FS bzw. mit 0,3 ml dialysiertem Fötalserum oder einem Gemisch der beiden wachstumsstimulierenden Serumfaktoren (SS) stimuliert. Die nicht stimulierten Kontrollen wurden = 100% gesetzt. Eine Menge von 60 μl SS auf 3 ml Medium war ausreichend, um die gleiche Wachstumsstimulierung zu erreichen wie 0,3 ml FS.

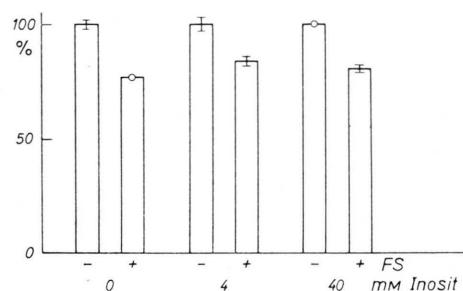


Abb. 7. Abhängigkeit der [<sup>3</sup>H]Inositolabgabe aus der säureunlöslichen Zellfraktion stimulierter Fibroblasten von der Inositkonzentration des Mediums. Die Zellen (mit [<sup>14</sup>C]Thymidin vormarkiert) wurden 30 min nach Zugabe von Fötalserum untersucht. Das <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C-Verhältnis der nicht stimulierten Kontrollen wurde = 100% gesetzt.

Stimulierung der Zellen dem dialysierten Fötalserum bzw. den Serumfaktoren SS zugegeben. Unter diesen Bedingungen wurde der Ausbau der Radioaktivität wiedergefunden. Als wirksame Komponente des Dialysates konnten wir durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie PI identifizieren. Wie Abb. 8 zeigt, kann man den Abfall der

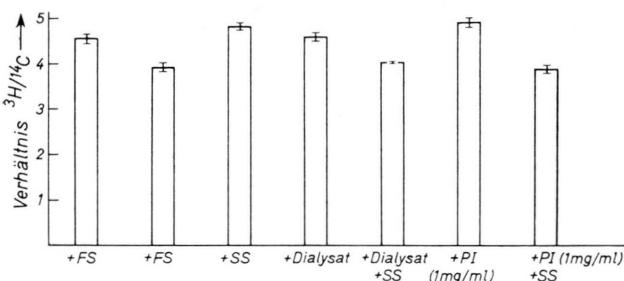


Abb. 8. Einfluß des Dialysates von fötalem Serum bzw. von PI auf den bis 20 min nach Stimulierung erfolgenden Ausbau von Radioaktivität aus der säureunlöslichen Zellfraktion von Fibroblasten, die mit [<sup>3</sup>H]Inositol vormarkiert worden waren. Dargestellt sind die Durchschnittswerte von 3 Einzelbestimmungen und die Standardfehler; die Zellen waren zur Korrektur der Zellverlustrate mit [<sup>14</sup>C]Thymidin vormarkiert worden.

Radioaktivität auch dann beobachten, wenn käuflich erworbene PI in einer Konzentration von 1 mg/ml dialysiertem Fötalserum oder SS zugesetzt wird.

Weiterhin wird nach Stimulierung durch die isolierten Serumfaktoren die Abgabe von [<sup>3</sup>H]Inositol aus dem PI auch dann bewirkt, wenn dem Inkubationsmedium Gamma- oder Delta-Hexachlorocyclohexan zugesetzt werden (Abb. 9). Beide Stoffe sind

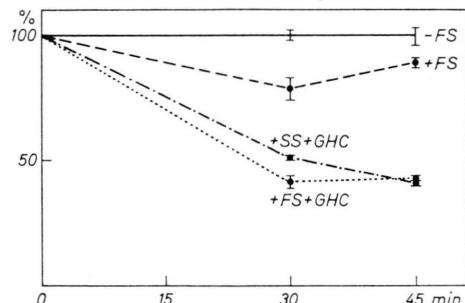


Abb. 9. Einfluß von Gamma-Hexachlorocyclohexan (GHC;  $3 \cdot 10^{-4}$  M) auf den Ausbau von Radioaktivität aus Fibroblasten, die mit [<sup>3</sup>H]Inositol vormarkiert worden waren. Dargestellt sind die Durchschnittswerte von 3 Einzelbestimmungen und die Standardfehler; die Werte der nicht stimulierten Kontrollen wurden = 100% gesetzt.

unter anderem als Inhibitoren der PI-Biosynthese bekannt<sup>11–13</sup>, wobei die Delta-Verbindung das sterische Analogon des Inosits darstellt. Wird dagegen Beta-Hexachlorocyclohexan verwendet, so kann man keinen ausbauenden Effekt feststellen.

## Diskussion

Wie in einer vorausgehenden<sup>9</sup> und in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, wird bei der Stimulierung ruhender embryonalen Rattenfibroblasten

durch Kälberserum der Phospholipid-Stoffwechsel und besonders der des PI aktiviert. Dies äußert sich innerhalb von 10 bis 20 min in einem Verlust von Radioaktivität aus der Phospholipidfraktion von Zellen, die entweder mit [<sup>3</sup>H]Inositol oder <sup>32</sup>P vormarkiert worden waren. Während jedoch im Falle der Markierung mit [<sup>3</sup>H]Inositol die Radioaktivität in der Phospholipidfraktion aktiverter Fibroblasten nach 30–45 min wieder ansteigt und bis 8 Stunden etwa gleich ist wie bei den Kontrollzellen, bleibt sie bei der Vormarkierung mit <sup>32</sup>P nach dem anfänglichen Abfall 45% geringer als in den nicht stimulierten Zellen. Dieser Befund spricht eindeutig dagegen, daß intakte PI-Moleküle zunächst aus den Membranen abgegeben und als solche später wieder aufgenommen werden; außerdem beträgt die aus den Kulturmedien isolierbare Menge radioaktiver Phospholipide nur etwa 5–10% dessen, was aus der Phospholipidfraktion der Zellen verschwindet. Es müssen demnach unmittelbar nach Stimulierung etwa 15–20% des PI metabolisiert werden. Hierbei wird die Phosphorsäure abgegeben und nicht mehr eingebaut; [<sup>3</sup>H]Inositol dagegen, das vielleicht als cyclisches Inositol-Monophosphat abgespalten wird<sup>2</sup>, wird bei der verstärkten Neusynthese von PI wiederverwendet. Dieses markierte [<sup>3</sup>H]Inositol kann nicht mit dem „kalten“ Inositol des Mediums ausgetauscht werden, da die Höhe des Wiedereinbaus von der Mediumkonzentration des Inosits unabhängig ist. Es muß somit in ein spezielles Zellkompartiment abgegeben werden; aus diesem Kompartiment wird es wieder bevorzugt für die PI-Synthese nach Stimulierung herangezogen.

Die Abgabe von [<sup>3</sup>H]Inositol aus PI nach Serumzugabe ist nicht spezifisch für Zellen, welche durch Vorinkubation in serumfreiem Medium in der G<sub>1</sub>-Phase angesammelt worden waren. Auch durch einständige Inkubation in serumfreiem Medium während der S-Phase und anschließend erneute Zugabe von Serum läßt sich dieser Effekt in demselben Ausmaße erzielen wie bei Zellen in G<sub>1</sub>. Da auch durch kurzzeitige Inkubation in Medium ohne Serum die Biosynthese von PI sehr rasch erniedrigt wird<sup>9</sup>, scheint der Stoffwechsel dieses Phospholipids in allen Zellzyklusphasen stark von der Anwesenheit der wachstumsstimulierenden Serumfaktoren abhängig zu sein.

Bemerkenswerterweise ist nun der Abfall der Radioaktivität in der PI-Fraktion stimulierter Zellen, die mit [<sup>3</sup>H]Inositol (bzw. [<sup>32</sup>P]- oder [<sup>3</sup>H]Gly-

cerin) vormarkiert worden waren, von der Anwesenheit von PI oder Gamma- bzw. Delta-Hexachlorocyclohexan im Kulturmedium abhängig. Da nach den bisher vorliegenden Daten der Turnover von PI, also sowohl Neusynthese wie Abbau, nach der Zugabe von Serum gesteigert werden, könnte zum einen die Synthese des zellulären PI durch das PI im Kulturmedium zunächst gehemmt werden. Die Befunde mit den chlorierten Inositanaloga müßten dann durch die antagonistische Wirkung dieser Substanzen bei der PI-Synthese erklärt werden. Zum anderen kann aber nach den bisherigen Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden, daß der Abbau durch zugeführtes PI, Gamma- und Delta-Hexachlorocyclohexan induziert wird. Der nach 30 min erfolgende

Wiedereinbau von Radioaktivität in die Phospholipidfraktion im Falle der Markierung mit [<sup>3</sup>H]Inosit wird dann durch die nun wieder einsetzende Neusynthese von PI erklärt, wobei bevorzugt [<sup>3</sup>H]-Inosit aus zuvor abgebauten PI-Molekülen verwendet wird; in Gegenwart der chlorierten Inhibitoren der PI-Synthese ist dieser Wiederanstieg dann selbstverständlich nicht mehr möglich. *In vitro*-Versuche an einem zellfreien System, mit dem die Kompartimentierungsprobleme in den intakten Zellen umgangen werden können, sollen zur Klärung des Problems beitragen und werden zur Zeit durchgeführt.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

- <sup>1</sup> B. Roelofsen and L. L. M. van Deenen, Eur. J. Biochem. **40**, 245–257 [1973].
- <sup>2</sup> E. G. Lapetina and R. H. Michell, FEBS Letters **31**, 1–10 [1973].
- <sup>3</sup> T. Sakagami, O. Minari, and T. Orni, Biochim. Biophys. Acta **98**, 111–116 [1965].
- <sup>4</sup> K. W. Wirtz and D. B. Zilversmit, J. Biol. Chem. **243**, 3596–3602 [1968].
- <sup>5</sup> J. A. Peterson and H. Rubin, Exptl. Cell Res. **58**, 365–378 [1969].
- <sup>6</sup> H.-J. Ristow, W. Frank, and M. Fröhlich, Z. Naturforsch. **28 c**, 188–194 [1973].
- <sup>7</sup> J. Veser and W. Frank, Z. Naturforsch. **27 b**, 1573–1574 [1972].
- <sup>8</sup> W. Frank, H.-J. Ristow, and S. Schwab, Exptl. Cell Res. **70**, 390–395 [1972].
- <sup>9</sup> R. Hoffmann, H.-J. Ristow, H. Pachowsky, and W. Frank, Eur. J. Biochem., zur Publikation eingesandt.
- <sup>10</sup> W. Frank, H.-J. Ristow, and S. Zabel, Eur. J. Biochem. **14**, 392–398 [1970].
- <sup>11</sup> Th. Pasternak, Proc. 2nd Meeting FEBS **2**, 31–40 [1965].
- <sup>12</sup> M. R. Hokin and D. F. Brown, J. Neurochem. **16**, 475–483 [1969].
- <sup>13</sup> D. B. Fisher and G. C. Mueller, Biochem. Pharmacol. **20**, 2515–2518 [1971].