Wirkung von osmotischem Schock und Triton-Behandlung auf den Sorbose-Transport von *Neurospora*-Zellen

Effects of osmotic shock and triton treatment on sorbose transport in *Neurospora*

ALFONS HACK und WALTER KLINGMÜLLER

Institut für Genetik, Universität München

(Z. Naturforsch. **26 b**, 250—255 [1971]; eingegangen am 11. November 1970, revidiert am 20. Dezember 1970)

1. Conidia of *Neurospora crassa* were either subjected to osmotic shock or treated with the detergent triton X-100. A decrease in the amount of ^{14}C -sorbose taken up, as measured by means of the millipore filter technique, served as criterium for the efficiency of both procedures. Treated cells were either a) pregerminated with fructose, b) ungerminated but preincubated with sorbose or c) ungerminated and not preincubated, to check for a possible loss of fructose-inducible, sorbose-inducible or constitutive transport components respectively.

2. In contrast to reports for bacteria, osmotic shock by transferring conidia from 30–60% sucrose solutions to $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ MgCl_2 -solution after 5 minutes did not decrease transport activity. Rather there was an increase in the amount of sorbose taken up after such treatment (Table 1). However, if sucrose was replaced by concentrated mineral salts solution (Vogel's minimal 4.75 M stock solution) a drastic decrease of sorbose uptake was observed in conidia pregerminated with fructose (Fig. 1).

Ungerminated conidia preincubated with sorbose did not respond to a shock with mineral salts solution; they did however respond, if 2% triton was added to the salts solution (Table 2). Triton alone was ineffective under comparable conditions (Table 2), but it became effective if the triton concentration was increased and the duration of treatment was extended to 30 minutes (Fig. 2). Ungerminated, not preincubated conidia showed the same reduction of sorbose uptake if treated with triton in this way (Fig. 2).

3. Whenever a decrease of sorbose uptake was observed, it was correlated with a decrease in cell survival. However, the amount of killing does not suffice to explain in full the decrease in sorbose uptake per sample. Thus even surviving cells demonstrate a decrease of sorbose uptake, the reasons for which are considered as follows:

a) Cells preloaded with ^{14}C -sorbose show the same rate of sorbose efflux, whether shocked with mineral salts solution or not (Fig. 3). The shock therefore does not cause an unspecific leakiness of the cell wall or membrane.

b) Oxygen consumption in cell suspensions, as measured by an oxygen macro electrode, is strongly retarded for fructose pregerminated cells which have been shocked with mineral salts solution (Fig. 4). This retardation together with killing is fully sufficient to explain the decrease in sorbose uptake observed. Ungerminated cells preincubated with sorbose do not show this effect, not even after prolonged treatment with triton, when their ability to take up sorbose is reduced. Hence, in such material a loss of specific transport components is indicated.

Konidien des Schimmelpilzes *Neurospora crassa* können den Ketozyucker Sorbose mit Hilfe dreier verschiedener Transportsysteme aufnehmen. Sie wurden als 1. das konstitutive, 2. das durch Fructose-Vorbehandlung stimulierbare und 3. das durch Sorbose-Vorbehandlung stimulierbare Transportsystem bezeichnet¹. Um die chemische Isolierung von Bestandteilen dieser Transportsysteme vorzubereiten, haben wir das von NEU und HEPPEL² für die Isolierung bakterieller „Bindungsproteine“ einge-

führte osmotische Schockverfahren und verschiedene zweckmäßig erscheinende Modifikationen dieses Verfahrens bei *Neurospora* erprobt. Es zeigte sich dabei, daß der zu erzielende Effekt, gemessen als Verringerung der Sorbose-Aufnahme der geschockten Zellen, mit Abtötung oder doch Verringerung der Atmungsintensität der Zellen einhergehen kann. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen werden im folgenden mitgeteilt.

Sonderdruckanforderungen an Priv.-Doz. Dr. W. KLINGMÜLLER, Institut für Genetik, D-8000 München 19, Maria-Ward-Str. 1 a.

¹ W. KLINGMÜLLER, Z. Naturforsch. **22b**, 181, 188 u. 327 [1967]; Ber. dtsch. bot. Ges. **81**, 303 [1968]; W. KLING-

MÜLLER, H. HUH u. F. KAUEWITZ, Molecular gen. Genetics **109**, 27 [1970]; H. THIELE u. W. KLINGMÜLLER, in Vorbereitung.

² H. C. NEU and L. A. HEPPEL, J. biol. Chemistry **240**, 3685 [1965].

Material und Methoden

1. Stamm: *Neurospora crassa*, Wildtyp 74-OR 23-1A De Serres.

2. Anzuchtverfahren zur Gewinnung von Konidien, Herstellen von Konidiensuspensionen und Plattieren von Konidien wie in früheren Publikationen angegeben¹.

3. Vogels Minimalmedium³ (50-fach): 150 g Na₃-Citrat·5,5 H₂O, 250 g KH₂PO₄, 100 g NH₄NO₃, 10 g MgSO₄·7 H₂O, 5 g CaCl₂·2 H₂O, 5 ml Spurenelemente und 2,5 ml Biotinlösung plus 750 ml H₂O, Endvolumen ca. 1 l, Molarität ca. 4,75.

4. Phosphat-Citratpuffer: 48,7 ml 0,2 M Na₂HPO₄-Lösung + 51,3 ml 0,1 M Citronensäure-Lösung + 100 ml H₂O; pH 4,75.

5. Ankeimen von Konidien: In einer Vogels Minimallösung (1 : 50) mit einem Fructosegehalt von 0,1% wurden die Konidien in einer Konzentration von 4·10⁶/ml 5 h lang bei 25 °C inkubiert. Dabei wurde ein kräftiger Luftstrom durch die Konidiensuspension geführt. Nach diesem Zeitraum waren 70–80% der Konidien gekeimt. Wird statt Fructose 0,1% Sorbose gegeben, so erfolgt keine Keimung.

6. Osmotischer Schock: 40 ml einer gekeimten Konidiensuspension wurden über Membranfilter filtriert. Die niedergeschlagenen Konidien wurden 2-mal mit H₂O gewaschen und anschließend in 20 ml unverdünnter Vogels Minimallösung für 5 min resuspendiert (Schritt A). Nach dieser Zeit wurden die Konidien erneut auf Membranfilter abfiltriert, mit H₂O gewaschen und für 5 min in 400 ml 5·10⁻⁴ M MgCl₂-Lösung aufgeschwemmt.

7. ¹⁴C-Sorbose-Aufnahme: Um die Verringerung der Sorbose-Aufnahme durch den osmotischen Schock zu bestimmen, wurde die Aufnahme sowohl geschockter wie ungeschockter Zellen gemessen. Letztere waren ebenso wie die geschockten vorbehandelt, nur daß statt Vogels Minimal H₂O verwendet wurde. Geschockte und ungeschockte Konidien wurden in 100 ml Belüftungsflaschen mit 20 ml Puffer + 19,6 ml H₂O + 0,4 ml ¹⁴C-Sorbose überführt (L-Sorbose-¹⁴C, spez. Aktivität 2,7 mCi/mMol, The Radiochemical Centre Amersham, England; im Ansatz 0,01 µCi/ml). Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben von 5 ml entnommen, auf Membranfilter niedergeschlagen, 2-mal mit H₂O gewaschen, getrocknet und die Filter in 5 ml Toluol + BBOT (4 g pro l) überführt. Ihre Radioaktivität wurde im Packard Tri Carb Scintillation Spectrometer 3003 gemessen.

8. Atmungsmessung: 40 ml einer Konidiensuspension (4·10⁶ Konidien/ml) wurden 5 min zur Sauerstoffsättigung mit einem kräftigen Luftstrom durchquirlt. Danach wurde mit einer Sauerstoffelektrode (Beckman Instruments Physiological Gas Analyzer, Modell 160, Oxygen macro electrode) der Abfall des Sauerstoffpartialdruckes in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf in der Suspension bei 25 °C gemessen.

9. Statistische Sicherung: Bei den angegebenen Mutungsgrenzen handelt es sich um den einfachen mittleren Fehler des Mittelwertes.

Ergebnisse

1. Osmotischer Schock mit Sucrose

Bei dem von NEU und HEPPEL² beschriebenen Verfahren werden Bakterien aus ihrem Wachstumsmedium in 20-proz. Sucroslösung + 10⁻⁴ M EDTA überführt und hieraus in 5·10⁻⁴ M MgCl₂-Lösung gebracht (osmotischer Schock). Die Anwendung dieses Verfahrens auf angekeimte Konidien von *Neurospora* erbrachte die in Tab. 1 wiedergegebenen Re-

Sucrose- konzentration [%]	A [min]				B
	5	15	30	60	
0	983	2442	4523	8098	379
30	1911	3452	6451	13023	296
40	1208	3003	5719	11733	311
50	856	1899	3855	8851	318
60	629	1356	2714	6659	300

Tab. 1. Einfluß eines osmotischen Schocks mit Sucroslösungen unterschiedlicher Konzentration auf Sorboseaufnahme und Überlebensrate von angekeimten Konidien. 5-minütige Einwirkung der Sucroslösung. A: gemessene Radioaktivität in cpm je Probe nach verschiedenen Inkubationszeiten der Zellen mit ¹⁴C-Sorbose (Membranfiltertechnik). B: Gefundene Kolonien nach Plattierung von je 400 Zellen.

sultate. Es zeigte sich, daß ein Schock mit 60-proz. Sucroslösung eine bestenfalls geringfügige Verminderung der Sorboseaufnahme bewirkt, der Schock aus niedrigeren Sucrosekonzentrationen aber sogar eine Steigerung. Die Überlebensraten waren demgegenüber für alle geschockten Populationen im Vergleich zu der nicht geschockten Kontrolle vermindert.

2. Osmotischer Schock mit Vogels-Minimal

2.1. Osmotischer Schock an gekeimten Konidien

Ersetzt man beim osmotischen Schock die Sucrose durch konzentriertes Vogels Minimal, eine für die Kultur von *Neurospora* bewährte Salzlösung, so läßt sich für die geschockten Zellen eine Verringerung der Aufnahme von ¹⁴C-Sorbose gegenüber derjenigen ungeschockter Zellen nachweisen (Abb. 1). Ob diese Verringerung auf dem Verlust ihres Sorbose-transport-Systems oder doch von Teilen dieses Systems beruht, ist zunächst offen.

Abb. 1. Gemessene Radioaktivität angekeimter Konidien nach bis zu 60-minütiger Inkubation mit ^{14}C -Sorbose; $2 \cdot 10^7$ Konidien je Probe; Membranfiltertechnik, 25°C . Kreuze: Ansatz von vorher mit konz. Vogels-Minimal geschockten Konidien. Kreise: Ansatz mit ungeschockten, aber sonst gleich behandelten Konidien. Dargestellt sind die Mittelwerte und die mittleren Fehler aus den Ergebnissen von 5 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

2.2. Osmotischer Schock angekeimten, jedoch mit Sorbose vorbehandelten Konidien

Bei den bisherigen Schockversuchen kamen Konidien zur Anwendung, welche mit Fructose vorbehandelt und so angekeimt worden waren. Bei Vorbehandlung der Zellen mit Sorbose wird hingegen eine Keimung verhindert⁴. Trotzdem ist die Sorboseaufnahme solcher Konidien im Vergleich zu nicht vorbehandelten gesteigert. Versuche, bei Sorbose-vorbehandelten Konidien durch osmotischen Schock mit Vogels Minimal die Rate der anschließend gemessenen ^{14}C -Sorboseaufnahme zu verringern, hatten ein negatives Ergebnis. Vermutlich ist die im Vergleich zur Hyphenwand wesentlich stabilere Konidienwand dafür verantwortlich, daß der osmotische Schock hier nicht wirksam werden kann.

2.3. Osmotischer Schock unter Zusatz von Triton

Um bei Sorbose-vorbehandelten Konidien dennoch einen Effekt zu erzielen, wurde der Vogels Minimal-Lösung 2% Triton zugesetzt. Die Einwirkungs-dauer wurde auf 10 min ausgedehnt. Diese Behandlung brachte den Sorbose-transport solcher Konidien völlig zum Erliegen (Tab. 2). Sie sind nach Plattierungsversuchen nicht mehr zur Keimung und Koloniebildung befähigt.

[min]	Konidien in Schritt A behandelt mit:					
	H_2O unge- schockt	Vogels konz. + 2% Triton	H_2O	Vogels 1 : 2	Vogels 1 : 5	Vogels 1 : 10
I	5	518	201	516		
	15	1150	127	1148		
	30	1982	162	1793		
	45	2538	186	2410		
	60	2948	—	2695		
II	5	798	65	835	—	88
	15	1804	55	1731	—	83
	30	3136	57	3068	—	120
	60	5082	87	4891	—	112
	K	346	0	306	—	4
III	5	1535	—	—	71	327
	15	2993	—	—	175	288
	30	5003	—	—	127	383
	60	8074	—	—	191	403
	K	—	—	—	1	39

Tab. 2. Einfluß eines osmotischen Schocks mit Vogels Minimal + Triton, bzw. einer alleinigen Vorbehandlung mit Triton auf Sorboseaufnahme und Überlebensrate ungekeimter, jedoch mit Sorbose vorbehandelter Konidien. I—III: Drei verschiedene, unabhängig voneinander angesetzte Versuche. 5 min—60 min: Inkubationszeit der Zellen mit ^{14}C -Sorbose (Membranfiltertechnik) und dazugehörig die jeweils gemessene Radioaktivität in cpm je Probe. K: Gefundene Kolonien nach Plattierung von je 400 Zellen.

Verdünnung der für den Schock benutzten Vogels Minimal-Lösung bei Beibehaltung von 2% Triton im Ansatz ergab selbst für die Verdünnung 1 : 10 noch eine Transportminderung (Tab. 2, letzte Spalte). Diese war aber wie zuvor mit einer wenn auch geringfügigen Verminderung der Überlebensrate verknüpft.

³ H. J. VOGEL, Microbial Genet. Bull. 13, 42 [1956].

⁴ F. J. DE SERRES, H. G. KØLMARK, and H. E. BROCKMAN. Nature [London] 193, 556 [1962]; H. E. BROCKMAN and F. J. DE SERRES, Amer. J. Bot. 50, 709 [1963].

3. Tritonbehandlung ungekeimter Konidien ohne osmotischen Schock

Um eine Verringerung des Transportes ohne gleichzeitige Beeinträchtigung der Überlebensrate zu erreichen, wurden ungekeimte, jedoch Sorbose-vorbehandelte Zellen unter Verzicht auf die Minimal-lösung auch mit höheren Tritonkonzentrationen behandelt. Die Inkubationsdauer wurde auf 30 min verlängert. Die Sorboseaufnahme war danach für alle geprüften Tritonkonzentrationen verglichen mit den Kontrollen stark verringert. Nach 1-stdg. Inkubation betrug sie für Konidien, welche mit 2,5, 5 oder 10% Triton behandelt worden waren, zwischen 43 und $48 \pm 2,5\%$ der Kontrollen. Die Überlebensrate wurde nur auf ca. $68 \pm 5\%$ gesenkt.

Die Ergebnisse mit Triton an Sorbose-vorbehandelten Konidien sprechen dafür, daß das Detergens das Sorbose-stimulierbare Transportsystem erreicht. Ob auch das konstitutive beeinträchtigt wird, wurde in Parallelansätzen geprüft. Dazu kamen Konidien entweder in Puffer oder in Puffer + 0,1% Sorbose. Anschließend wurde eine 30 min dauernde Tritonbehandlung durchgeführt, dann die Messung der Aufnahme von ^{14}C -Sorbose und Plattierung von Konidien zur Ermittlung der Überlebensrate.

Wie Abb. 2 zeigt, war bei Puffer-behandelten und bei Sorbose-behandelten Konidien die Tritonwirkung auf den Transport etwa gleichstark. Dementsprechend war auch die Überlebensrate in beiden Fällen im gleichen Maße verringert (auf 69 bzw. 67%). Triton wirkt demnach nicht etwa spezifisch

Abb. 2. Gemessene Radioaktivität mit Sorbose vorbehandelter (offene Symbole) bzw. nicht vorbehandelter (geschlossene Symbole), ungekeimter Konidien. Dreiecke: Konidien vor Angebot der radioaktiven Sorbose für 30 min in 2,5-proz. Triton inkubiert. Sonst wie Abb. 1. Einzelversuche mit Zellen derselben Population.

auf den Sorbose-stimulierbaren Sorbosetransport, sondern beeinträchtigt sowohl diesen als auch den konstitutiven.

4. Ursachen der Transportminderung

Die Bestimmung der Überlebensrate nach dem osmotischen Schock an gekeimten Konidien ergab eine Reduktion um $21 \pm 6\%$ (Mittel aus 5 Versuchen), verglichen mit den ungeschockten Kontrollen. Da die Reduktion der Sorboseaufnahme wesentlich stärker war (Verringerung um $62 \pm 3\%$) kann sie nicht ausschließlich mit der Abtötung eines Teiles der Population durch den osmotischen Schock erklärt werden. Das gleiche gilt für die Reduktion der Sorboseaufnahme, die nach Behandlung ungekeimter Zellen mit Triton beobachtet wurde. Eine zusätzliche Erklärungsmöglichkeit würde sich bieten, wenn bei den geschockten Konidien die Sorbose-Abgabe (Efflux) gesteigert wäre, z. B. durch eine unspezifische Beschädigung der Zellwand oder Zellmembran. Dies ist jedoch, wie entsprechende Versuche zeigten, nicht der Fall (Abb. 3).

Abb. 3. Sorboseabgabe geschockter (x) bzw. ungeschockter (o) Konidien. Mit Fructose angekeimte Konidien wurden 1 h lang mit ^{14}C -Sorbose inkubiert. Anschließend ein Teil mit Vogels-Minimal geschockt, der andere Teil ungeschockt belassen und der Radioaktivitätsverlust der Zellen mit der Zeit mittels Membranfiltrationstechnik verfolgt. 10γ Actidion/ml im Ansatz.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre dann gegeben, wenn sich nach dem osmotischen Schock Änderungen in der Atmungsintensität der Zellen erkennen lassen. Die experimentelle Prüfung ergab,

daß mit Fructose angekeimte Konidien nach osmotischem Schock mit Vogels Minimal, insoweit sie diesen überleben, gegenüber ungeschockten Konidien tatsächlich eine geringere Atmungsintensität besitzen (Abb. 4). Die geringere Atmungsintensität in Verbindung mit der verringerten Überlebensrate reicht

Abb. 4. Atmungsintensität geschockter (x) und ungeschockter (o) angekeimter Konidien, ausgedrückt als Abnahme des Sauerstoffgehaltes der Konidien suspension mit der Zeit. $1,6 \cdot 10^8$ Konidien in 40 ml Puffer/Ansatz; 25 °C.

aus, um die nach dem Schock gemessene Verringerung der Aufnahmerate von Sorbose zu erklären.

Die Atmung von ungekeimten, mit Sorbose vorbehandelten Konidien wurde hingegen durch einen osmotischen Schock nicht beeinträchtigt, was mit der Unempfindlichkeit des Sorbosetransportes solcher Konidien gegen osmotischen Schock in Einklang steht. Ungekeimte, mit Sorbose vorbehandelte Zellen wiesen auch nach Tritonbehandlung keine Beeinträchtigung ihrer Atmungsintensität auf, obwohl Triton hier die gemessene Aufnahmerate von Sorbose verringert. Zu dieser Verringerung müssen bei ihnen außer der Abtötung eines Teiles der Zellpopulation also noch weitere, bisher nicht erfaßte Faktoren beitragen.

Diskussion

Im Gegensatz zu den Angaben für Bakterien bewirkt der Sucrose-Schock bei gekeimten Konidien von *Neurospora* eine Steigerung der Sorboseauf-

nahme. Diese Steigerung läßt sich interpretieren, wenn man berücksichtigt, daß der Sorbosetransport Fructose-vorgekeimter Konidien ein energieabhängiger, aktiver Vorgang ist¹. Das Eindringen von Sucrose in die Konidien während des osmotischen Schocks bedeutet für diese die Bereitstellung eines Substrates zur Gewinnung von Stoffwechselenergie, was zur Steigerung der Sorboseaufnahme führen sollte.

Eine Verringerung der Sorboseaufnahme gekeimter Konidien wurde gemessen, wenn statt einer Sucroslösung konz. Vogels Minimallösung zum Schock verwendet wurde. Diese Verringerung läßt sich durch Abtötung eines Teiles der Zellpopulation in Verbindung mit einer Depression der Atmungsintensität der überlebenden Zellen erklären. Die Abtötung eines Teils der Zellpopulation konnte durch Abwandlung der Versuchsbedingungen nicht umgangen werden.

Ob bei Bakterien eine Verringerung der Atmungsintensität zu der dort gemessenen Transportminderung nach osmotischem Schock beiträgt, scheint von anderen Autoren nicht immer in ausreichendem Maße geprüft worden zu sein. Sofern infolge des Schocks tatsächlich Proteine isoliert werden können, die als Transportproteine charakterisierbar sind, ist dies kein Mangel (ANRAKU 1967, Rekonstruktion des Transportes geschockter Zellen durch Wiedereinbau der gewonnenen Proteine⁵). Die schlechte Reproduzierbarkeit solcher Versuche, die PARDEE⁶ beklagt, deutet aber darauf hin, daß hier bisher noch manches außer Acht gelassen wurde, wozu gerade eine Veränderung der Atmungsintensität der Bakterienzellen infolge des osmotischen Schocks gehören könnte. Ihre Registrierung erscheint demnach in Zukunft unerläßlich.

Eine Verringerung der Sorboseaufnahme ungekeimter, jedoch mit Sorbose vorbehandelter Konidien gelang durch alleinige Anwendung von Vogels Minimal nicht. Nach Zusatz von 2% Triton wurde eine starke Depression erzielt. Triton allein wirkte während einer gleichen Behandlungsdauer bestenfalls geringfügig. Der starke Effekt bei Kombination beider Behandlungen deutet auf eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber osmotischem Schock mit Vogels Minimal durch das Tritonangebot hin. Die Einzelheiten dieses Effektes sind noch unverstanden.

⁵ Y. ANRAKU, J. biol. Chemistry **242**, 793 [1967].

⁶ A. B. PARDEE, Science [Washington] **162**, 632 [1968].

In höherer Konzentration und bei Verlängerung der Einwirkungszeit verringerte auch Triton allein die Sorboseaufnahme ungekeimter Konidien. Mit dieser Verringerung war, im Gegensatz zu derjenigen geschokter, mit Fructose angekeimter Zellen, keine Verringerung der Atmungsintensität verbunden. Die Überlebensrate war beeinträchtigt, aber nicht stark genug um die gemessene Verringerung der Sorboseaufnahme voll zu erklären. Der über die Abtötung hinausgehende Anteil der Transport-

minderung kann deshalb als Hinweis auf die mögliche Abtrennung von Transportproteinen der Zelloberfläche durch die Tritonbehandlung gewertet werden. Weitere Versuche dazu sind im Gange.

Unser Dank gilt Herrn Professor Dr. FRITZ KAUDOWITZ für die Förderung dieser Untersuchungen. Es konnten Mittel und Geräte des Institutes benutzt werden, außerdem Mittel und Geräte aus Sachbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des ehemaligen Bundesministeriums für wissenschaftliche Forschung an W. K.

Mangel an C₂-Fragmenten im Intermediärstoffwechsel embryonaler Rattenzellen in Kultur

Deficiency of C₂-Fragments in the Metabolism of Embryonic Rat Cells in Culture

WERNER FRANK

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

Herrn Prof. Dr. H. FRIEDRICH-FREKSA zum 65. Geburtstag

(Z. Naturforsch. 26 b, 255—259 [1971]; eingegangen am 10. Dezember 1970)

For optimal growth of embryonic rat cells in tissue culture the amino acid serine is essential. It can be substituted by equimolar amounts of glyoxylic acid; radioactivity from 1-¹⁴C-glyoxylic acid is incorporated into various amino acids among which serine is also found. The presented experiments show that there must be a deficiency of C₂-fragments in the metabolism of embryonic rat cells.

Seit längerer Zeit ist es möglich, verschiedene Typen von Säugetierzellen in Zellkultur zu vermehren¹. Hierfür werden in den meisten Fällen Kulturmedien verwendet, die bis auf einen Serumzusatz aus definierten, synthetisch herstellbaren Komponenten bestehen; es handelt sich dabei neben den notwendigen anorganischen Salzen um Glucose, Vitamine und essentielle Aminosäuren. Bei manchen Zellstämmen hat sich nun gezeigt, daß unter gewissen Bedingungen auch nichtessentielle Aminosäuren, d. h. solche Aminosäuren, die von den Zellen normalerweise aus vorhandenen Vorstufen selbst aufgebaut werden können, zum Kulturmedium hinzugefügt werden müssen².

Embryonale Rattenzellen wachsen in Zellkultur in Eagles minimum essential medium (MEM)³ sehr langsam, wenn anstelle von 10% Kälberserum dialysiertes Serum zugesetzt wird; wie in dieser

Arbeit gezeigt wird, benötigen diese Zellen im Medium zusätzlich die nichtessentielle Aminosäure Serin. Normalerweise genügt der Serinegehalt des Kälberserums für ein gutes Wachstum, jedoch sind nach Entfernung dieser Aminosäure durch Dialyse die Zellen infolge eines Mangels an C₂-Fragmenten nicht mehr in der Lage, einen optimalen Intermediärstoffwechsel ablaufen zu lassen.

Material und Methoden

Zellkulturen

Kulturen embryonaler Rattenzellen (Stamm Marshall, eigene Zucht) wurden angelegt, wie in einer früheren Arbeit beschrieben⁴; das Kulturmedium war Eagles minimum essential medium (MEM; Microbiological Associates, Bethesda) mit 10% Kälberserum. Für Einbauversuche mit radioaktiven Isotopen wurden die Zellen in Plastikschälchen (60/15 mm, oberflächen-

Sonderdruckanforderungen an Dr. W. FRANK, MPI f. Virusforschung, Abt. f. physikal. Biologie, D-7400 Tübingen, Spemannstraße.

¹ J. PAUL, Cell and Tissue Culture, Livingstone Ltd., Edinburgh 1970.

² L. LEVINTOW u. H. EAGLE, Ann. Rev. Biochem. 30, 605 [1961].

³ H. EAGLE, Science [Washington] 130, 432 [1959].

⁴ W. FRANK, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 237 [1968].