



KfK 5083
Oktober 1992

**Untersuchungen zur
Zellproliferation in Sphäroiden:
Analyse von cAMP und
Zyklusverteilung im
Zusammenhang mit der
Zellkommunikation**

U. Anderer
Hauptabteilung Sicherheit

Kernforschungszentrum Karlsruhe

**KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE
Hauptabteilung Sicherheit**

KfK 5083

**Untersuchungen zur Zellproliferation in Sphäroiden:
Analyse von cAMP und Zyklusverteilung im Zusammenhang mit der
Zellkommunikation**

Ursula Anderer

**Dissertation, genehmigt von der Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 7500 Karlsruhe 1

ISSN 0303-4003

Untersuchungen zur Zellproliferation in Sphäroiden: Analyse von cAMP und Zyklusverteilung im Zusammenhang mit der Zellkommunikation

Zusammenfassung

Viele Säugerzelllinien können als multizelluläre Sphäroide (SPH) kultiviert werden. Hier haben die Zellen die Möglichkeit, ihre natürliche dreidimensionale Anordnung wieder einzunehmen. In dieser Studie wurde die Regulation der Proliferation im Bezug auf die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten untersucht. Die Ermittlung des intrazellulären cAMP-Gehaltes sowie der Zellproliferation (Zellzyklusphasenverteilung und BrdU-Einbauraten) erfolgte deshalb an zwei Fibroblastenzelllinien der Maus mit unterschiedlicher Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation: SV40-transformierte 3T3-Zellen sind über Gap Junctions (GJ) miteinander verbunden, L-Zellen haben nicht die Fähigkeit über GJ zu kommunizieren. Für beide Zelllinien ist im Monolayer mit zunehmender Zelldichte eine Abnahme des cAMP-Gehaltes und des BrdU-Einbaus sowie eine Zunahme der G1-Zellen zu beobachten. In Sphäroiden ist eine Korrelation dieser drei Parameter nur bei L-Zellen festzustellen; Abnahme des cAMP-Gehaltes und des BrdU-Einbaus sowie eine Zunahme der G1-Zellen mit zunehmender Tiefe. In SV40-3T3-SPH dagegen ist zwar eine Korrelation des cAMP-Gehaltes und der Phasenverteilung zu beobachten, jedoch keine radiale Abhängigkeit dieser Parameter: alle Zellen haben unabhängig von ihrer Lage im Sphäroid einen nahezu identischen cAMP-Gehalt und eine einheitliche Zellzyklusphasenverteilung. Eine Hemmung der Zellkommunikation durch Mezerein in SV40-3T3-SPH erzeugt radiale cAMP- und Zellzyklusphasen-Gradienten, wie sie in unbehandelten L-SPH zu beobachten sind. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die für cAMP permeablen GJ-Kanäle einen Ausgleich der cAMP-Konzentration innerhalb der SV40-3T3-SPH und als Folge davon einen Ausgleich des radialen Zellzyklusphasen-Gradienten bewirken. Aber auch in kommunizierenden SV40-3T3-SPH war eine Abnahme des BrdU-Einbaus mit zunehmender Tiefe in den Zellaggregaten zu beobachten. Die Radialunabhängigkeit der Phasenverteilung in den SV40-3T3-SPH muß deshalb als Folge einer gleichmäßigen Verlängerung aller Zyklusphasen mit zunehmender Tiefe im Sphäroid interpretiert werden. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß eine Abhängigkeit wichtiger zellulärer Eigenschaften von der Zellkommunikation nur in Sphäroiden zum Ausdruck kommt. Die physiologische und regulatorische Wirkung von GJ scheint an die Existenz eines dreidimensionalen Zellverbandes gebunden zu sein, wodurch sie bei bisherigen Untersuchungen an Monolayer-Kulturen verborgen blieb.

Investigations of cell proliferation in spheroids: Analysis of cAMP and cell cycle distribution in relation to cell communication

Abstract

Many mammalian cell lines can be cultured as multicellular spheroids (SPH), in which cells can re-establish their natural three-dimensional arrangement. Regulation of proliferation was analysed with respect to the establishment of cell-to-cell-contacts. For this purpose the intracellular cAMP content and cell proliferation (cell cycle distribution and BrdU incorporation) were analysed using two fibroblast cell lines with different capability of intercellular communication: SV40-transformed 3T3-cells are connected via gap junctions (GJ), whereas L-cells are not able to communicate via GJ. In monolayer cultures of both cell lines cAMP content and BrdU incorporation decreased, and the proportion of G1-cells increased with increasing cell density. In spheroids, a correlation of these three parameters was observed with L-cells only: Decrease in cAMP content and BrdU incorporation accompanied by increase in G1-cell proportion with increasing depth of cell location. In communicating SV40-3T3-SPH a correlation of cAMP content and phase distribution was observed, too, but no significant radial change was found: an almost identical cAMP content and equal proportions of G1-cells in all parts of the aggregates. Inhibition of cell communication by Mezerein in SV40-3T3-SPH caused formation of radial gradients of cAMP and of cell cycle distribution similar to those seen in L-SPH. These results suggest an equilibration of the GJ-permeable cAMP molecule throughout the spheroids of SV40-3T3-cells and, as a consequence, an equilibration of the radial cell cycle gradient. BrdU incorporation, however, also decreased with increasing depth in communicating SV40-3T3-SPH. The radial independence of the cell cycle distribution in these aggregates must therefore be interpreted as a consequence of a uniform elongation of all cell cycle phases with increasing depth of the SV40-3T3-SPH. These results indicate, that important cellular properties dependent on cell-to-cell communication are only expressed in spheroids. The physiological and regulating effects of GJ appear to be coupled to three-dimensional cell aggregates seeing that they remained undiscovered in investigations with monolayer cultures.

Inhaltsverzeichnis	Seite
I. Einleitung	1
1. Besonderheiten der Sphäroid-Kultur gegenüber anderen Kulturformen für Säugetierzellen	1
2. Ziel dieser Arbeit	2
II. Material und Methoden	3
1. Material	3
1.1. Zellen	3
1.1.1. SV40-3T3-Zellen	3
1.1.2. L-Zellen	3
1.2. Medien	3
1.3. Chemikalien	3
1.4. Puffer und Lösungen	4
2. Zellkultur	6
2.1. Monolayer	6
2.1.1. SV40-3T3-Zellen	6
2.1.2. L-Zellen	6
2.2. Sphäroide	7
2.2.1. SV40-3T3-Zellen	7
2.2.2. L-Zellen	7
2.3. Sequentielle Trypsinierung der Sphäroide	8
2.4. Überprüfung der Zellvitalität	8
2.5. Mycoplasmentest	8
2.6. Einfrieren eukaryontischer Zellen	9
2.6.1. Einzelzellen aus Monolayerkulturen zur Cryokonservierung	9
2.6.2. Sphäroide zur Anfertigung von Gefrierschnitten	9
2.7. Anfertigung von Gefrierschnitten	10
2.8. Hämatoxylin-Eosin-Färbung für Gefrierschnitte	10
3. Behandlung der Zellkulturen mit modifizierenden Agenzien	11
3.1. N ⁶ -2'-O-Dibutyryladenosen ^{3',5'} -Cyclisches Monophosphat (db-cAMP)	11
3.2. Stimulation der Adenylatcyclase mit Forskolin	11
3.3. Inhibierung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions durch Mezerein	11

4. Methoden zur Untersuchung der Zellproliferation	12
4.1. Flußcytometrie	12
4.1.1. Präparation und Färbung der Zellkerne	12
4.1.2. Meßprinzip	12
4.1.3. Auswertung der Histogramme	13
4.2. Immuncytochemisches Verfahren zur Markierung proliferierender Zellen	15
4.2.1. Cell Proliferation Test bei Monolayer-Kulturen	15
4.2.2. Cell Proliferation Test bei Sphäroiden	16
5. Ermittlung des intrazellulären cAMP-Gehaltes	17
5.1. cAMP-Isolierung	17
5.2. Quantitative Bestimmung des cAMP	17
6. Methoden zur Untersuchung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions	18
6.1. Versuchsaufbau	18
6.2. Messung der elektrischen Kopplung	20
6.3. Beobachtung der Zell-Zell-Kopplung durch Farbstoffausbreitung	22
III. Ergebnisse	23
1. Auswahl der Zellen und Charakterisierung der Kulturformen	23
1.1. Nachweis der interzellulären Kommunikation	23
1.2. Wachstumsverhalten der Monolayer-Kulturen	26
1.3. Eigenschaften der Sphäroide	26
1.4. Innere Struktur der Sphäroide	29
2. cAMP-Gehalt und Zellzyklusphasenverteilung im Monolayer	31
2.1. cAMP-Gehalt	31
2.2. Zellzyklusphasenverteilung	31
3. cAMP-Gehalt und Zellzyklusphasenverteilung im Sphäroid	34
3.1. cAMP-Gehalt	34
3.2. Zellzyklusphasenverteilung	36
4. Markierung DNA-synthetisierender Zellen	38
4.1. Brom-desoxy-Uridin-Einbau in ML	38
4.2. Brom-desoxy-Uridin-Einbau in SPH	38
5. Inhibierung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions durch Mezerein	41
5.1. Eigenschaften von Mezerein	41
5.2. Behandlung der Zellen mit Mezerein	42
5.3. Wirkung von Mezerein auf die interzelluläre Kommunikation	42

5.4. Zeitlicher Verlauf von cAMP-Gehalt und Zellzyklusphasenverteilung der Zellen im ML nach Mezerein-Behandlung	45
5.5. Zeitlicher Verlauf von cAMP-Gehalt und Zellzyklusphasenverteilung der Zellen im SPH nach Mezerein-Behandlung	47
5.5.1. L-Sphäroide	47
5.5.2. SV40-3T3-Sphäroide	49
5.5.3. SV40-3T3-Sphäroide (6h Mezerein)	51
6. Wirkung des cAMP-Analogons db-cAMP auf die interzelluläre Kommunikation, den cAMP-Gehalt und den Zellzyklus	55
6.1. Eigenschaften von db-cAMP	55
6.2. Behandlung der Zellen mit db-cAMP	55
6.3. Wirkung von db-cAMP auf die interzelluläre Kommunikation	56
6.4. Wirkung von db-cAMP auf den cAMP-Gehalt und den Zellzyklus im ML	57
6.4.1. Kurzzeitbehandlung (10 min) mit db-cAMP	57
6.4.2. Langzeitbehandlung (18 Stunden) mit db-cAMP	59
6.5. Wirkung von db-cAMP auf den cAMP-Gehalt und den Zellzyklus in SPH	60
6.5.1. L-Sphäroide	60
6.5.2. SV40-3T3-Sphäroide	62
7. Veränderung des cAMP-Gehaltes durch Behandlung mit Forskolin: Wirkung auf die interzelluläre Kommunikation und den Zellzyklus	65
7.1. Eigenschaften von Forskolin	65
7.2. Behandlung der Zellen mit Forskolin	65
7.3. Wirkung von Forskolin auf die interzelluläre Kommunikation	65
7.4. cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung nach Forskolin-Einwirkung im Monolayer	67
7.5. cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung nach Forskolin-Einwirkung in Sphäroiden	67
7.5.1. L-Sphäroide	67
7.5.2. SV40-3T3-Sphäroide	68
IV. Diskussion	
1. Grundsätzliches zum Systemvergleich Monolayer-Sphäroid	70
2. Morphologische Unterschiede zwischen L- und SV40-3T3-Sphäroiden	70
3. Volumenwachstum der Sphäroide	71
4. cAMP-Gehalt und Zyklusphasenverteilung in Monolayern und äußeren Sphäroid-Zellen	72
5. Radialprofil von cAMP-Gehalt und Zyklusphasenverteilung in Sphäroiden	72
6. Bestimmung DNA-synthetisierender Zellen in Sphäroiden	73

7. Deutung des Proliferationsverhaltens von SV40-3T3-Sphäroiden als Kommunikations abhängigen Effekt: die Wirkung von Mezerein als Kommunikationsinhibitor	74
8. Wirkung von db-cAMP und Forskolin	75
9. Schlußfolgerungen	76
9.1. cAMP und Zelldichte	76
9.2. cAMP und Zyklusphasenverteilung	76
9.3. Gap Junctions, cAMP und Zyklusphasenverteilung in Sphäroiden	76
9.4. Besonderheiten der Zellproliferation in Sphäroiden	77
V. Zusammenfassung	78
VI. Anhang	81
1. Sphäroide	82
1.1. Aufbau und Gewinnung von multizellulären Sphäroiden	82
1.2. Sphäroide als in vitro Tumormodell	83
1.3. Sphäroide zum Studium von Invasion und Metastasierung	84
1.4. Sphäroide zum Studium der Tumor-Wirt-Wechselwirkung	85
1.5. Zell-Zell Kontakte in Sphäroiden	85
1.6. Zelldifferenzierung in Tumorzell-Sphäroiden	86
1.7. Differenzierung in Sphäroiden aus normalen Zellen	87
2. Gap Junctions	88
2.1. Einleitung	88
2.2. Struktur der Gap Junctions	88
2.3. Physiologische Funktionen der Gap Junctions	90
2.4. Messung der Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions	90
2.5. Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung der Gap Junction-Proteine	91
2.6. Antikörper gegen Gap Junction-Proteine	94
2.7. Regulation der Permeabilität der Gap Junction Kanäle	94
2.8. Biochemische Entkopplung der Gap Junctions	95
2.9. Rolle der Gap Junctions in der Embryonalentwicklung	97
2.10. Rolle der Gap Junctions bei Proliferation und Differenzierung	97
2.11. Gap Junctions und Carcinogenese	97
3. Tabellen	99
4. Abbildungen	115
VII. Literaturverzeichnis	119

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	Brom-desoxy-Uridin
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
db-cAMP	N ⁶ -2'-O-Dibutyryladenoin 3',5'-Cyclisches Monophosphat
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
GJ	Gap Junction
MG	Molekulargewicht
MEM	Eagle's Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen
ML	Monolayer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
SPH	Sphäroid(e)
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TRIS	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
vgl.	vergleiche

I. Einleitung

I.1. Besonderheiten der Sphäroid-Kultur gegenüber anderen Kulturformen für Säugetierzellen

Die am häufigsten eingesetzten Kultivierungsformen für Säugetier- und humane Zellen sind die Einzelzell-Suspensionskultur und die Einschicht-Kultur (Monolayer, ML). Betrachtet man diese unter dem Aspekt der Vergleichbarkeit zur in vivo-Situation, so stellen beide relativ einfache Modelle dar, mit denen sich eher die Reaktionen der einzelnen Zelle erfassen lassen als die eines komplex organisierten Gewebes. Wenngleich dies für sehr viele Anwendungen, beispielsweise für viele Fragestellungen auf dem Gebiet der Genetik, ausreicht, stellt die mangelnde biologische Komplexität dieser Kulturen ein Hindernis dar, wenn es um die Gewinnung realistischer Daten geht wie z. B. in der Toxikologie oder in der Strahlenbiologie. Auch für die experimentelle Tumorforschung und -therapie wünscht man sich eine Kulturform, welche die komplexe physiologische Situation in einem soliden Tumor, wie z. B. Hypoxie oder Nekrose, besser modelliert.

Diese Arbeit befaßt sich mit einem dreidimensionalen Kulturmodell für Säugetierzellen, den multizellulären Sphäroiden, das seit den frühen Siebziger Jahren vor allem Eingang in die experimentelle Krebsforschung gefunden hat. Eine ausführlichere Darstellung der Eigenschaften der Sphäroide (SPH) findet sich im Anhang VI.1. dieser Arbeit, sodaß an dieser Stelle nur in aller Kürze auf ihre Besonderheiten eingegangen wird.

Durch seine Kugelgestalt kommt es in einem Sphäroid "automatisch" zur Ausbildung radialer metabolischer Gradienten. So nimmt z.B. der Sauerstoff-Partialdruck nach innen ab, wodurch es zur Ausbildung hypoxischer Regionen im Innern größerer SPH kommen kann. Dies hat zur Folge, daß die Zellen, je nach ihrer Lage im Sphäroid, unterschiedlichen physiologischen Bedingungen ausgesetzt sind, was ihre Eigenschaften und Reaktionen beeinflusst. Diese "Zonierungen" sind ähnlich denjenigen, die beispielsweise in einem Gewebe in Abhängigkeit vom Abstand von den Gefäßkapillaren auftreten. Im Gegensatz hierzu sind in der Suspensions- oder ML-Kultur alle Zellen den gleichen Umgebungsbedingungen ausgesetzt.

Ebenso herrschen in Sphäroiden vom Monolayer abweichende Bedingungen, was die Ausbildung des interzellulären Kommunikationsmusters und die Zell-Matrix-Interaktionen betrifft. In der ML-Kultur können Zellkontakte nur entlang der Berührungssäume der flach auf dem Substrat aufgewachsenen Zellen erfolgen. In der Suspensionskultur ist überhaupt keine Etablierung von Zellkontakten möglich. In ihrer Gesamtheit führen diese Besonderheiten im SPH-Verband zur Ausbildung von Zelldifferenzierungen, die im ML keine Entsprechung haben (vgl. Anhang VI.1.).

I.2. Ziel dieser Arbeit

Für viele Anwendungen des SPH-Modells spielt die Zellproliferation in diesem System eine wichtige Rolle. Trotz zahlreicher Untersuchungen sind noch viele Fragen offen. Sie betreffen vor allem die Rolle des dreidimensionalen Zellkontaktes und der Gap Junction-vermittelten interzellulären Kommunikation bei der Kontrolle dieser Zellfunktion. Die Gap Junctions spielen bei vielen Prozessen im Gewebeverband wie Embryonalentwicklung, Wachstum und Differenzierung eine wichtige Rolle. Im Anhang "Gap Junctions" (VI.2.) wird auf Struktur und Funktion dieser Spezialisierung der Zellmembran eingegangen. Ein Beispiel für einen kommunikationsabhängigen Differenzierungsprozeß in Sphäroiden ist die sog. "Kontaktresistenz". Hierbei handelt es sich um die gegenüber dem ML erhöhte Strahlenresistenz von SPH-Zellen mit der Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation (Dertinger und Hülser, 1981; Anderer, 1986; Knedlitschek et al., 1990).

Der dreidimensionale Zellkontakt stellt im Hinblick auf die Zelldichte-Abhängigkeit der Proliferation eine Besonderheit dar, auf die sich die bisher bekannten Gesetzmäßigkeiten bei der ML-Kultur nicht ohne weiteres übertragen lassen. Es handelt sich hierbei um die Kontaktinhibition der Proliferation mit zunehmender Zelldichte im ML, die mit einer Änderung der intrazellulären Konzentration des sekundären Botenstoffes cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) einhergeht (Friedman et al., 1976; Boynton und Whitfield, 1983).

Um zu einer Klärung der in einem dreidimensionalen Zellverband herrschenden Bedingungen beizutragen, soll im Rahmen dieser Arbeit die Rolle der interzellulären Kommunikation, des dreidimensionalen Zellkontaktes und des cAMP bei der Regulation der Zellproliferation in SPH untersucht und mit dem ML verglichen werden. Um zugleich den oben erwähnten Aspekt der radialen "Zonierung" in SPH zu berücksichtigen, werden diese Untersuchungen ortsaufgelöst durchgeführt, was durch Einsatz der sequentiellen Trypsinierungstechnik bzw. mittels histochemischer Analyse von Cryostat-Schnitten ermöglicht wird. Die Proliferation wird dabei sowohl mit Hilfe der flußcytometrischen Analyse des Zellzyklus als auch anhand des Einbaues von Bromdesoxyuridin in den Zellkern untersucht.

Um die Rolle der Gap Junction-vermittelten Zellkommunikation zu berücksichtigen, werden diese Untersuchungen an 2 Fibroblastenlinien der Maus durchgeführt, den kommunikationslosen L-Zellen und den kommunizierenden SV40-3T3-Zellen. Zur Absicherung der Befunde soll außerdem das Proliferationsverhalten bei gezielter Beeinflussung der interzellulären Kommunikation studiert werden, so z.B. durch Inhibition mit Hilfe des "second stage" Tumor-Promotors Mezerein.

II. Material und Methoden

II.1. Material

II.1.1. Zellen

II.1.1.1. SV40-3T3-Zellen:

Fibroblastenzelllinie aus embryonalen Swiss-Mauszellen (Todaro und Green, 1963), die mit dem SV40-Virus transformiert wurde (Todaro et al., 1964). Erhalten von Prof. G. Adams, Universität Konstanz.

II.1.1.2. L-Zellen:

Zelllinie aus subkutanen Fibroblasten einer adulten C3H-Maus, die mit 20-Methylcholanthren transformiert wurde (Earle et al., 1943). Erhalten von Prof. D. F. Hülser, Universität Stuttgart.

II.1.2. Medien

Eagle's Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen (= MEM; SERVA, GIBCO)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (= DMEM; SERVA, GIBCO)

Fötale Kälberserum (= FCS; GIBCO)

Antibiotika (Penicillin: 10000 Einheiten/ml; Streptomycin: 10000 μ g/ml, GIBCO)

Glutamin (200mM, GIBCO)

Trypsin (0,25%, GIBCO)

Einfriermedium (95% FCS, 5% DMSO)

II.1.3. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden größtenteils von den Firmen SERVA, SIGMA und MERCK bezogen.

DMSO, Dimethyl-dichlorsilan, Lucifer Yellow	FLUKA
Forskolin	CALBIOCHEM
Einbettmedium	JUNG
Cell proliferation kit	AMERSHAM
cAMP[¹²⁵ J]assay system (dual range)	AMERSHAM

II.1.4. Puffer und Lösungen

Citratpuffer zur Verdünnung der Trypsin-Stammlösung

17 mM Na-Citrat; 0,13 M KCl; pH 7,6

Silikonisierungslösung zur Verhinderung der Zellanheftung in der Spinner-Kultur

5% Dimethyl-dichlorsilan in CCl_4

Zur Silikonisierung der Spinnerflaschen werden diese mit der 5%igen Lösung benetzt, an der Luft getrocknet, mit dest. Wasser gewaschen und mit absolutem Ethanol nachgespült.

Agaroselösung zur Verhinderung der Zellanheftung in Petrischalen bei der SPH-Aggregation

2% Agarose (Typ II) in MEM erhitzen und lösen (Mikrowelle)

Zur Beschichtung von 10 cm-Petrischalen werden ca. 8 ml warme Agaroselösung in eine Schale gegeben und bei geschlossenem Deckel über Nacht erkalten lassen.

Trypanblau-Stammlösung für Vitalitätstests

0,5% Trypanblau in 0,9% NaCl

PBS

0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na_2HPO_4 ; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 0,7 mM CaCl_2 ;
0,6 mM MgCl_2

DAPI-Stammlösung (= 4',6-Diamidino-2-phenylindol x 2 HCl x H_2O)

0,54 mM DAPI in H_2O (10 mg DAPI in 50 ml H_2O)

DAPI-Lösung zur Präparation und Färbung von Zellkernen für die Flußcytometrie

5,4 μM DAPI (2 mg/l); 2 mM MgCl_2 ; 0,15 M NaCl; 0,1% Triton X-100
in 0,1 M TRIS-Puffer pH 7,3

DAPI-Methanol

DAPI-Stammlösung mit Methanol auf 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnen

db-cAMP-Stammlösung (N^6 -2'-O-Dibutyryladenosen 3',5'-Cyclisches Monophosphat)

100 mM db-cAMP in H_2O

Forskolin-Stammlösung

1 mM Forskolin in 95% Ethanol

Mezerein-Stammlösung

1 mM Mezerein in Ethanol

Albuminlösung zur Beschichtung der Objektträger

1% Albumin in H₂O

Zur Beschichtung werden die Objektträger zunächst mit Aceton gereinigt, danach in die 1%ige Lösung getaucht und an der Luft getrocknet.

Fixierungsmittel für Monolayer und SPH-Schnitte

5% Eisessig, 95% Ethanol (frisch herstellen)

Lösungen für histochemische Färbungen:

Modifiziertes Hämalaun

0,1 g Hämatoxylin; 5 g Kalialaun [KAl(SO₄)₂]; 0,1 g Benzoesäure
in 100 ml H₂O bidest. lösen und
1 ml 2% KJO₃ und 2 ml 1 N HCl zugeben.

Eosin-Lösung

1% Eosin in H₂O bidest.

Lösungen zur Messung der Farbstoffkopplung:

KCl-Lösung

3 M KCl in H₂O

Lucifer Yellow-Lösung

4% in 1 M LiCl in H₂O

Ringer-Lösung

4 Tabletten in 500 ml H₂O

II.2. Zellkultur

II.2.1. Monolayer

Die Zellen wurden in Einweg-Plastikgefäßen der Firma FALCON kultiviert. Die Inkubation erfolgte in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre von 95% Luft und 5% CO₂ bei 37 °C.

II.2.1.1. SV40-3T3-Zellen

Die Zellen wurden in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum, 1% Glutamin (Endkonzentration 2 mM) und 1% Antibiotika (Penicillin: 100 Einheiten/ml und Streptomycin: 100 µg/ml Medium) gezüchtet. Die Stammkultur wurde alle zwei Tage subkultiviert. Hierzu wurden die Zellen nach Entfernung des Kulturmediums mit 0,5 ml Trypsin (verdünnt mit Citratpuffer auf 0,05%) vom Gefäßboden abgelöst (2 Minuten Inkubation bei 37 °C), in Medium resuspendiert und durch Pipettierung vereinzelt. Mit Hilfe eines Coulter Counters (COULTER ELECTRONICS) wurden die Zellen gezählt und mit einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen/cm² in neue Kulturflaschen überimpft.

Für Versuche wurden die Zellen auf Petrischalen (6 cm Durchmesser, 5 ml Medium) mit einer Dichte von $1,4 \times 10^4$ Zellen/cm² plattiert und nach 2 Tagen für die Experimente eingesetzt.

II.2.1.2. L-Zellen

Die Zellen wurden in MEM mit 5% fötalem Kälberserum, 1% Glutamin (Endkonzentration 2 mM) und 1% Antibiotika (Penicillin: 100 Einheiten/ml und Streptomycin: 100 µg/ml Medium) gezüchtet. Die Stammkultur wurde einmal pro Woche subkultiviert. Hierzu wurden die Zellen nach Entfernung des Kulturmediums mit 0,5 ml Trypsin (0,25%) vom Gefäßboden abgelöst, in Medium resuspendiert, gezählt (siehe SV40-3T3) und mit einer Zelldichte von 4×10^3 Zellen/cm² in neue Kulturflaschen überimpft. Am dritten und fünften Tag wurde das Medium durch frisches ersetzt.

Für Versuche wurden die Zellen auf Petrischalen (6 cm Durchmesser, 5 ml Medium) mit einer Dichte von $1,8 \times 10^3$ Zellen/cm² ausgesät und nach 5 Tagen für Experimente eingesetzt (Mediumwechsel am vierten Tag) oder mit $3,6 \times 10^3$ Zellen/cm² ausgesät und nach 4 Tagen für den Versuch eingesetzt (ohne Mediumwechsel).

II.2.2. Sphäroide

II.2.2.1. SV40-3T3-Zellen

SV40-3T3-Monolayer wurden bei einer Zelldichte von etwa 2×10^5 Zellen/cm² trypsiniert und jeweils 3×10^6 Zellen auf eine unbeschichtete Petrischale (10 cm Durchmesser, zur Bakterienkultur, GREINER, 10 ml Medium) übertragen. Das Fehlen einer Beschichtung verhindert weitgehend das Anheften der Zellen, die dann bereits nach einem Tag kleine, gut abgerundete Aggregate (Sphäroide) bilden. Die Zellaggregate wurden in 250 ml-Spinnerflaschen (TECNOMARA) überführt. Diese wurden zuvor silikonisiert, um ein Anwachsen der Zellen an der Glaswand zu verhindern. Die Sphäroidkultur erfolgte in dicht verschlossenen Spinnerflaschen in einem Wasserbad (37°C), wobei die Zellaggregate durch einen Magnetrührer (45 UpM, TECNOMARA) ständig bewegt wurden. Dies gewährleistete ein gleichmäßiges Nährstoffangebot innerhalb der Kultur. Jeden Tag wurden 150-200 ml Medium in der Spinnerflasche durch frisches Medium ersetzt. Nach etwa 6-7 Tagen hatten die Sphäroide einen Durchmesser von 300-450 µm erreicht. Mit Metallsieben (definierte Porengröße, BELLCO) wurden die Sphäroide mit einem Durchmesser von 160-400 µm aussortiert und am darauffolgenden Tag für den Versuch eingesetzt.

II.2.2.2. L-Zellen

Monolayerkulturen der L-Zellen wurden bei einer Dichte von etwa 2×10^5 Zellen/cm² trypsiniert und jeweils 3×10^6 Zellen auf eine Petrischale (10 cm Durchmesser, 10 ml Medium) übertragen, die am Tage zuvor mit 2% Agarose in MEM beschichtet wurde. Dies war nötig, da sich L-Zellen sogar an unbeschichtetem Plastikmaterial anheften. Die Überführung der Zellaggregate in silikonisierte Spinnerflaschen erfolgte erst am dritten oder vierten Tag, wenn relativ kompakte Sphäroide vorlagen. Um einem Nährstoffmangel während der Aggregationsphase vorzubeugen, wurde am zweiten oder dritten Kulturtag die Hälfte des Mediums auf den Petrischalen durch frisches ersetzt. Die Kultivierung der Sphäroide in Spinnerflaschen erfolgte wie bei SV40-3T3-Sphäroiden, wobei nur jeden zweiten Tag Medium gewechselt wurde. Nach 12-16 Tagen hatten die Sphäroide einen Durchmesser von etwa 150-350 µm erreicht und wurden über die entsprechenden Siebe filtriert, um auch hier Sphäroide definierter Größe zu erhalten (Durchmesser 160-400 µm).

II.2.3. Sequentielle Trypsinierung der Sphäroide

(Modifizierung der Methode von Freyer und Sutherland, 1980)

Um Zellen in unterschiedlicher Tiefe der Sphäroide gezielt untersuchen zu können, müssen die kugelförmigen Zellaggregate in wohldefinierten Schichten von außen nach innen "geschält" werden. Dies erfolgte durch sukzessives Trypsinieren unter streng eingehaltenen Bedingungen:

Die Sphäroide wurden leicht abzentrifugiert (140 x g, 30 Sekunden), das Medium abgenommen und mit 8 ml 0,25% Trypsin (Raumtemperatur) in einem 50 ml Erlenmeyerkolben langsam bewegt (rotary shaker, 3 Minuten bei Raumtemperatur). Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 10 ml kaltem Medium gestoppt. Die noch locker mit den Sphäroiden verbundenen Zellen wurden durch Pipettierung von den Sphäroiden abgetrennt und die Sphäroid-Einzelzell-Suspension sofort auf Eis gestellt. Nachdem die Sphäroide auf den Boden des Glasgefäßes abgesunken waren, wurde die überstehende Zellsuspension vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und auf Eis gestellt. Dieser Vorgang wurde sofort wiederholt, bis nur noch die zentralen Bereiche der Sphäroide übrig waren. Da die Zellen im inneren Bereich der Sphäroide sehr stark aneinander haften, mußten die Kerne 5-10 Minuten bei 37 °C (Wasserbad) trypsinieren werden. Bei einem Durchmesser der Sphäroide von 160-400 µm kann man durch diese Methode ca. 5-7 Zellschichten voneinander trennen.

II.2.4. Überprüfung der Zellvitalität

Hierzu wurde der Ausschlußtest mit Trypanblau angewendet (Lindl und Bauer, 1989): Zellen in Kulturmedium wurden mit einer 0,5%igen Trypanblaulösung in 0,9% NaCl (Endkonzentration ca. 0,15%) für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Vitale Zellen nehmen keinen Farbstoff auf, stark geschädigte oder tote Zellen färben sich blau an, da der Farbstoff über die permeabel gewordene Zellmembran in die Zelle eindringt.

Dieser Schnelltest wurde in regelmäßigen Abständen bei der Sphäroidkultur angewendet, um sicherzustellen, daß die Zellen in den z. T. sehr kompakten Aggregaten noch ihre volle Vitalität besaßen, bevor sie in den verschiedenen Versuchen eingesetzt wurden; andernfalls wurden sie verworfen.

II.2.5. Mycoplasmentest (Russell et al., 1975; Freshney, 1983; Lindl und Bauer, 1989)

Hierzu wurden die Zellen auf Deckgläsern (in Petrischalen) ausgesät, bei der gewünschten Zelldichte mit PBS (37 °C) gewaschen und mit 2 µg/ml DAPI in PBS 15 bis 30 Minuten bei

37 °C inkubiert. Danach wurde die Färbelösung entfernt, die Zellen in PBS (37 °C) gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop (LEITZ Aristoplan: Filtersatz A 513678, 50 x Wasserimmersionsobjektiv) auf Mycoplasmen (als gleichmäßig geformte, hell leuchtende Punkte vorwiegend entlang der Zellkontur erkennbar) untersucht. Ermöglichte dieser Test keine eindeutige Aussage (z. B. hohe Hintergrundfluoreszenz im Cytoplasma), wurden die auf Deckgläsern kultivierten Zellen mit DAPI-Methanol fixiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS und danach mit DAPI-Methanol gewaschen. Nach einer Inkubationszeit von 15 bis 30 Minuten bei 37 °C mit DAPI-Methanol wurden die Zellen einmal mit Methanol gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop auf Mycoplasmen untersucht (s.o.). Alle verwendeten Kulturen erwiesen sich als Mycoplasmenfrei.

II.2.6. Einfrieren eukaryontischer Zellen

II.2.6.1. Einzelzellen aus Monolayerkulturen zur Cryokonservierung

Die Zellkulturen wurden in ihrer exponentiellen Wachstumsphase trypsinisiert, mit kaltem Medium gestoppt und die Zellen abzentrifugiert (4 °C, 800 x g, 5 Minuten). Pro Einfrierampulle wurden 2×10^6 Zellen (in je 1 ml frisch hergestelltem Einfriermedium) abgefüllt. Das Einfrieren erfolgte in mehreren Stufen: die Zellen wurden zunächst 30 Minuten auf Eis gekühlt, dann in einem Styroporbehälter 2 Stunden bei -20 °C und über Nacht bei -80 °C eingefroren und schließlich im flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

II.2.6.2. Sphäroide zur Anfertigung von Gefrierschnitten

(Technik in der Arbeitsgruppe von B. Walser entwickelt)

Vorbereitung:

Ein kleines Dewargefäß wurde mit Flüssigstickstoff gefüllt, ein Becherglas mit Methylbutan gefüllt und im Flüssigstickstoff abgekühlt (zur Isolation in einem Styroporbehälter). Das Methylbutan hatte die gewünschte Temperatur von -150 bis -160 °C erreicht, wenn sich im Becherglas ein weißer Bodensatz gebildet hatte .

Als Probenhalter wurden gelbe Einmal-Pipettenspitzen am stumpfen Ende mit Alufolie überzogen und ein Tropfen Einbettmedium für Gefrierschnitte (JUNG) daraufgegeben.

Die Sphäroide wurden leicht abzentrifugiert (140 x g, 30 Sekunden), das Medium abgenommen, einmal in PBS gewaschen und in 2 ml PBS resuspendiert. Die Sphäroide wurden auf einem Nylonnetz (50 µm Maschenweite) gesammelt und auf das Einbettmedium aufgebracht.

Einfrieren:

Die Sphäroide im Einbettmedium wurden unter leichter Agitation in das Methylbutanbad eingetaucht. Zur völligen Durchkühlung blieben die Präparate einige Minuten im Einfrierbad.

Aufbewahrung der Cryopräparate:

Die Präparate wurden mit einer Plastikpipette in Einfrierröhrchen (NALGENE, vorgekühlt im flüssigen Stickstoff) gebracht, im flüssigen Stickstoff durchgekühlt und dann bei -80 °C aufbewahrt.

II.2.7. Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Cryopräparate wurden mit einem Cryomikrotom (2800 FRIGOCUT E, REICHERT-JUNG) bei einer Objekttemperatur von -15 °C geschnitten. Die Gefrierschnitte mit einer Dicke von 5-10 µm wurden sofort auf mit Albumin beschichtete Objekträger aufgebracht und an der Luft getrocknet (10 Minuten).

II.2.8. Hämatoxylin-Eosin-Färbung für Gefrierschnitte

Mit dieser Färbung wird der Zellkern blau (Hämalaun) und das Cytoplasma rot (Eosin) angefärbt.

1. Fixieren der luftgetrockneten Schnitte :
20 Minuten in 5% Eisessig + 95% Ethanol (aus 95% EtOH)
dreimal waschen in PBS, jeweils drei Minuten
2. Modifiziertes Hämalaun 10 Minuten
3. Bläuen in Leitungswasser 5 Minuten
4. in dest. Wasser spülen 15 Sekunden
5. Eosinlösung (1% in dest. Wasser) 15 Minuten
6. in dest. Wasser spülen 2 x 10 Sekunden
7. Differenzieren in 96% Ethanol 10 Sekunden
8. Entwässern in 100% Ethanol 10 Sekunden
9. Aufhellen in Xylol 2 x 20 Sekunden
10. Einen Tropfen Entellan auf den Schnitt aufbringen, Deckglas auflegen und trocknen lassen.

II.3. Behandlung der Zellkulturen mit modifizierenden Agenzien

II.3.1. N⁶-2'-O-Dibutyryladenosen 3',5'-Cyclisches Monophosphat (db-cAMP)

Monolayerzellen wurden auf Petrischalen (6 cm Durchmesser) bis zu einer Zelldichte von ca. $1,3 \times 10^5$ Zellen/cm² (SV40-3T3-Zellen) bzw. ca. $3,5 \times 10^4$ Zellen/cm² (L-Zellen) kultiviert. Dies entspricht jeweils einer Zelldichte, bei der die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase sind. Nun erfolgte eine Inkubation von 10 Minuten (Kurzzeit) oder 18 Stunden (Langzeit) mit 0,5 mM db-cAMP bei 37 °C (Murdoch und Rosenfeld, 1982; Saez et al., 1986). Daraufhin wurden sofort oder nach unterschiedlichen Zeiten in frischem Medium die verschiedenen Untersuchungen an den Zellen durchgeführt. Mit den Sphäroiden wurden sowohl Langzeit- (18 Stunden) als auch Kurzzeituntersuchungen (20 Minuten) durchgeführt.

II.3.2. Stimulation der Adenylatcyclase mit Forskolin

Die Anzucht der Monolayerzellen erfolgte wie bei db-cAMP. Die Zellen wurden zwischen 30 Minuten und 2 Stunden mit 1 µM Forskolin bei 37 °C inkubiert. Sphäroide wurden 1 Stunde inkubiert (Murdoch und Rosenfeld, 1982; Mehmet et al., 1990).

II.3.3. Inhibierung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions durch Mezerein

Die Anzucht der Monolayerzellen erfolgte wie bei db-cAMP. Die Zellen wurden dann 2 Minuten mit 1 µM Mezerein bei 37 °C inkubiert und nach verschiedenen Zeiten in Mezerein-freiem Medium weiterbearbeitet (Fitzgerald et al., 1983; Brümmer, 1988; Budunova et al., 1989). Die Sphäroidkulturen wurden 5 Minuten mit 1 µM Mezerein behandelt und nach entsprechenden Zeiten aufgearbeitet, bzw. bis zu maximal 6 Stunden in Mezerein-haltigem Medium weiterinkubiert.

II.4. Methoden zur Untersuchung der Zellproliferation

II.4.1. Flußcytometrie

Mit Hilfe der Flußcytometrie kann der Anteil der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus (G1-, S- und (G2+M)-Phase) über die Verteilung des DNA-Gehaltes einer Zellpopulation ermittelt werden. Die Methode basiert auf einer Proportionalfärbung der DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen, die dann in einem schnellen Durchflußsystem über die Fluoreszenz-emission einzelner Zellkerne quantifiziert wird (Abb. 1; Van Dilla und Mendelsohn, 1979; Goertler und Stöhr, 1982; Göhde et al., 1985). Die DNA wurde im Rahmen dieser Arbeit mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt, einem Fluoreszenzfarbstoff, der ein spezifisches Bindungsvermögen an A-T-reiche DNA aufweist (Absorptionsmaximum bei 340 nm, Fluoreszenzmaximum bei 488 nm) und eine hohe Beständigkeit im UV-Licht zeigt (SERVA-Produktinformation, 1976; Stöhr et al., 1978).

II.4.1.1. Präparation und Färbung der Zellkerne

Um cytoplasmatische Fluoreszenz auszuschließen, die z. B. durch Anfärbung von doppelsträngiger RNA auftreten kann (Van Dilla und Mendelsohn, 1979), wurden zur flußcytometrischen Messung Zellkernpräparationen eingesetzt. Dabei gelangte eine geringfügige Modifikation der "pH 10 procedure" von Vindelov (1977) zur Anwendung, bei der im wesentlichen die Originalvorschrift zu einem Einschnitt-Protokoll zusammengefaßt wurde.

Die Trypsinierung der Kulturen zur Gewinnung von Einzelzellen wurde durch die Zugabe kalten Mediums beendet. 2×10^6 Zellen wurden abzentrifugiert (500 x g, 5 Minuten), das Medium entfernt und das Pellet in 4 ml DAPI-Lösung zur Präparation und Färbung von Zellkernen vorsichtig resuspendiert. Die Zellkernsuspension wurde zum Färben 15 Minuten auf Eis gestellt.

II.4.1.2. Meßprinzip

Im benutzten Durchflußcytometer PAS-II (PARTEC) erfolgt eine Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI durch UV-Licht aus einer Quecksilberhöchstdrucklampe (HBO 100 W). Die emittierten Fluoreszenzlichtpulse werden mit einem Photomultiplier gemessen und in einem nachgeschaltetem Vielkanal-Analysator nach ihrer Intensität sortiert (Abb. 1). Hierbei ist die Fluoreszenzintensität (= Kanalzahl) dem DNA-Gehalt der untersuchten Zellen proportional und läßt sich als Histogramm (Zellzahl gegen Kanalzahl) darstellen (Van Dilla und Mendelsohn, 1979; Freshney, 1983). Für jedes Histogramm wurde der DNA-Gehalt von ca. 40000 Zellkernen aufgezeichnet.

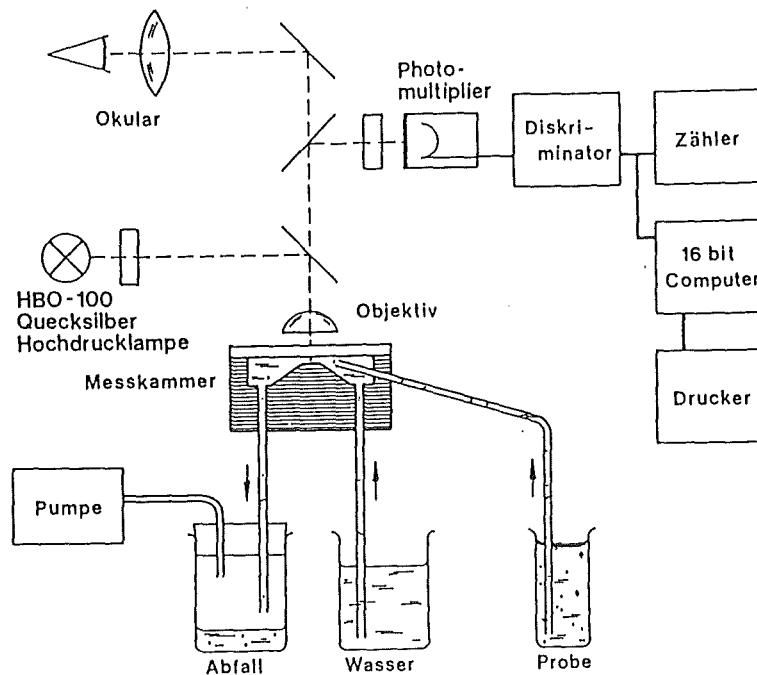


Abb. 1: Schematisches Funktionsdiagramm des Durchflußcytometers der Firma PARTEC (aus Göhde et al., 1985).

II.4.1.3. Auswertung der Histogramme

Die Auswertung der Histogramme erfolgte mit dem Computerprogramm "MultiCycle" (Multiple Option Cell Cycle Fitting) von Peter S. Rabinovitch, 1987 (PHOENIX FLOW SYSTEMS, San Diego, CA). Die Grundlage dieses Programms bilden die mathematischen Modelle zur Berechnung der Zellzyklusverteilung aus flußcytometrischen Daten von Dean und Jett (1974) und Fox (1980). Für die Auswertung stand ein IBM PC/AT zur Verfügung, in den die mit dem Flußcytometer gemessenen Histogramme per Diskette übertragen wurden.

Die Auswertung der DNA-Verteilungen in Bezug auf die Bestimmung der Anteile der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus wird anhand eines in Abb. 2 dargestellten Histogrammes gezeigt. Alle Zellen, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden, haben den gleichen DNA-Gehalt ($2n$). Jede dieser Zellen bindet somit die gleiche Menge an DAPI und das emittierte Fluoreszenzlicht hat die gleiche Intensität (Kanalzahl). In der (G2+M)-Phase haben alle Zellen ihren DNA-Gehalt verdoppelt ($4n$) und erscheinen daher im Histogramm bei der doppelten Kanalzahl im Vergleich mit den G1-Zellen. Die S-Phase-Zellen, deren DNA-Gehalt je nach dem Fortschreiten in dieser Phase Werte zwischen $2n$ und $4n$ annimmt, sind im Histogramm zwischen den G-Peaks zu finden.

Durch Streuungen im optischen und elektrischen Teil des Meßsystems, sowie durch biologische oder färbetechnische Variabilitäten kommt es zur Verbreiterung des G1- bzw. (G2+M)-Peaks. Sie wirken jedoch auch auf die Kanäle der S-Phase. Dean und Jett (1974) haben durch Untersuchung synchron wachsender Zellkulturen gezeigt, daß diese Streuungen zu einer Normalverteilung als optimale Anpassung der G1- und (G2+M)-Zellen führen. Die beste Beschreibung des Verlaufs der S-Phase im Histogramm ist ein Polynom zweiten Grades, das vom Auswerteprogramm "MultiCycle" iterativ durch Minimalisierung von Chi-Quadrat an die gemessene Kurve angepaßt wird.

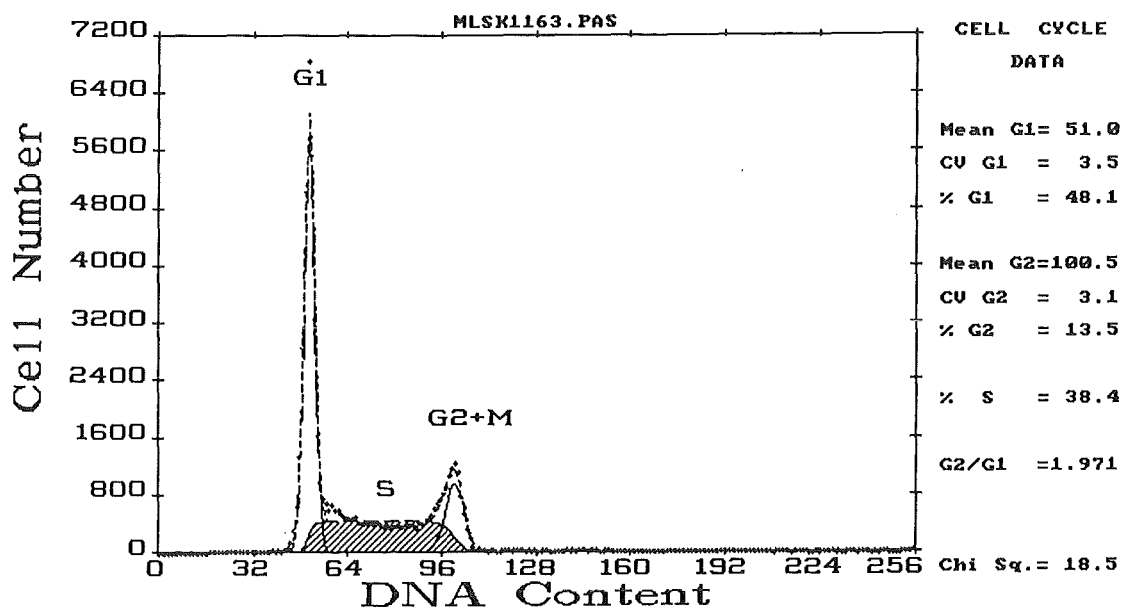


Abb. 2: Original-Histogramm einer ML-Kultur von L-Zellen. Die experimentell ermittelten Meßwerte sind als kreuzförmige Symbole zu erkennen. Die durchbrochene Linie repräsentiert die Gesamtanpassung der Daten durch das Computerprogramm. Die Anteile der Zellen in den einzelnen Zyklusphasen (%G1, %G2 bzw. %S) werden als Flächen unter den durchgezogenen Kurven dargestellt. Zur besseren Übersicht wurde die Fläche, welche die Anteile der S-Phase-Zellen wiedergibt, schraffiert. "Mean G1" bzw. "Mean G2" gibt den Mittelwert (Kanalzahl) der entsprechenden Normalverteilung an. Um einen Eindruck von den o. g. Streuungen, d. h. von der "Güte" des Histogrammes zu vermitteln, berechnet das Auswerteprogramm für den G1- und (G2+M)-Peak außerdem die CV-Werte (coefficient of variation) "CV G1" bzw. "CV G2". Das Verhältnis des DNA-Gehaltes von 4n- zu 2n-Kernen wird vom Programm als "G2/G1" ausgegeben. Gegenüber seinem theoretischen Wert von 2 wird, konstruktionsbedingt, meist ein etwas kleinerer Wert (ca. 1,9) gefunden (Fox, 1980).

Bei asynchron wachsenden Zellen findet das Programm die Lage der G1- und (G2+M)-Peaks selbständig und macht anhand dieser Festlegung erste Abschätzungen der Parameter des S-Polynoms. Ihre Variation wird solange fortgeführt, bis die Abweichung im Chi-Quadrat zwischen zwei konsekutiven Iterationen kleiner als 1% ist. Anschließend werden die Prozentsätze der Zellen in den einzelnen Zyklusphasen berechnet (Fox, 1980).

Bei der Interpretation der gewonnenen Phasenverteilungen ist zu berücksichtigen, daß es sich hierbei um eine statische Größe handelt, die keine Aussage über die aktive Proliferation der Zellen ermöglicht. Dies ist insbesondere bei ungestörter Zellproliferation mit zeitlich nur sehr langsam veränderlicher Phasenverteilung von Bedeutung. Grundsätzlich ist die Wahrscheinlichkeit, eine Zelle in einer bestimmten Phase zu finden, proportional zu ihrer relativen Dauer. Hieraus folgt, daß sich im Falle der Verlängerung aller Phasen um einen konstanten Faktor das Phasenverhältnis nicht ändert. Eine vollständige Charakterisierung des Proliferationszustandes einer Zellpopulation erfordert deshalb eine zusätzliche Methode, wie den BrdU-Einbau in die DNA der Zellen (s. unten). Darüberhinaus erlaubt die Flußcytometrie ohne zusätzliche Messungen keine Unterscheidung zwischen G1- und G0-Zellen, also Zellen in der Ruhephase.

II.4.2. Immuncytochemisches Verfahren zur Markierung proliferierender Zellen

Bei dieser Methode wird den Zellen das Thymidin-Analog Brom-desoxy-Uridin (BrdU) zum Einbau in die DNA angeboten. Um die Empfindlichkeit dieser Technik zu erhöhen, wird dem Inkubationsansatz gleichzeitig ein Hemmstoff der Thymidinsynthetase (5-Fluoro-2'-desoxy-Uridin) zugesetzt. Der Nachweis des eingebauten BrdU erfolgt mit einem monoclonalen Antikörper (Anti-Brom-desoxy-Uridin), an den eine Farbreaktion gekoppelt ist. Bereiche mit neu-synthetisierter DNA erscheinen dann blauschwarz gefärbt (Cell Proliferation Kit, AMER-SHAM). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protokoll wie folgt an die besondere Problemstellung angepaßt.

II.4.2.1. Cell Proliferation Test bei Monolayer-Kulturen

Markierung mit Brom-desoxy-Uridin

Monolayerzellen wurden auf Objektträgern bis zur gewünschten Zelldichte kultiviert und 2-4 Stunden bei 37 °C mit BrdU (Stammlösung des Kits 1:1000 mit entsprechendem Zellkulturmedium verdünnt) inkubiert. Die Zellen wurden in PBS gewaschen, 30 Minuten in 5% Eisessig und 95% Ethanol fixiert und zweimal in 100% Ethanol gewaschen. Die fixierten Zellen wurden dann an der Luft getrocknet.

Immuncytochemie

Nach dem Rehydrieren der fixierten Zellen mit PBS (3 x 3 Minuten) wurden sie für drei Stunden bei Raumtemperatur mit Anti-Brom-desoxy-Uridin inkubiert. Nach dem Waschen in PBS (3 x 3 Minuten) erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Peroxidase-anti-mouse-Ig, einem Antikörper, der gegen Anti-Brom-desoxy-Uridin gerichtet ist. Die Peroxidase bindet über Anti-Brom-desoxy-Uridin nur in DNA-Bereichen, wo BrdU eingebaut wurde. Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS (3 x 3 Minuten) wurden die Zellen 20 Minuten mit DAB (Diaminobenzidin) gefärbt: die Peroxidase katalysiert die Polymerisierung von DAB, was in Gegenwart von Kobalt und Nickel eine blauschwarze Färbung ergibt. Nach dem Färben wurden die Zellen in destilliertem Wasser gewaschen. Zur besseren Kontrastierung wurde eine Gegenfärbung mit Eosin angeschlossen (1 % Eosinlösung, 15 Minuten).

Konservierung der Präparate

1. Spülen in destilliertem Wasser: 2 x 10 Sekunden
2. Differenzieren in 96% Ethanol: 10 Sekunden
3. Entwässern in 100% Ethanol: 10 Sekunden
4. Aufhellen in Xylol: 2 x 20 Sekunden
5. Einen Tropfen Entellan auf den Schnitt aufbringen, Deckglas auflegen und trocknen lassen.

II.4.2.2. Cell Proliferation Test bei Sphäroiden

Markierung mit Brom-desoxy-Uridin

Sphäroide mit einem Durchmesser von 160-400 μm wurden vor Versuchsbeginn auf Vitalität getestet. Danach erfolgte die Inkubation mit BrdU bei 37 °C für 4 Stunden. Die Sphäroide wurden mit PBS gewaschen, eingefroren und geschnitten (siehe II.2.6.2. und II.2.7.). Die luftgetrockneten Gefrierschnitte wurden für 20 Minuten in 5% Eisessig und 95% Ethanol fixiert. Die fixierten Schnitte (trocken) können bei -20 °C (oder niedriger) aufbewahrt werden.

Die Durchführung der *Immuncytochemie* und die *Konservierung der Präparate* erfolgte wie bei den Monolayer-Kulturen.

Da bereits nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden mit BrdU im Zentrum der SPH markierte Zellen lokalisiert werden konnten (siehe Abb. 32 in III.6.5.2.), können eventuell auftretende Markierungsgradienten nicht auf Diffusionsbarrieren von BrdU zurückgeführt werden. Auch

die Penetrationsstudien von Nederman et al. (1981) zeigten eine gleichmäßige Durchdringung von Gliom-SPH mit BrdU-verwandten Substanzen bereits nach kurzen Inkubationszeiten (15 Minuten).

II.5. Ermittlung des intrazellulären cAMP-Gehaltes

II.5.1. cAMP-Isolierung

Zur cAMP-Isolierung wurde die Trypsinreaktion zur Vereinzelung der SPH-Zellen bzw. Ablösung der ML-Zellen vom Gefäßboden mit kaltem Medium beendet und die Zellsuspension auf Eis gestellt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Nach Ermittlung der Zellzahl wurde mit PBS (4 °C) gewaschen, kalt zentrifugiert (4 °C, 1200 x g, 5 Minuten) und der Überstand entfernt. Das cAMP wurde zweimal mit 65% Ethanol (4 °C) extrahiert. Der cAMP-Extrakt wurde nochmals zentrifugiert (4 °C, 2000 x g, 15 Minuten) und der Überstand dieser Zentrifugation in einem SpeedVac Concentrator (BACHOFER) getrocknet. Die getrockneten cAMP-Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

II.5.2. Quantitative Bestimmung des cAMP

Zur Quantifizierung des cAMP wurde ein Radioimmunoassay der Firma AMERSHAM eingesetzt. Dieser basiert auf der Konkurrenz zwischen nicht-markiertem cAMP und einer festen Menge ¹²⁵J-markiertem cAMP um eine begrenzte Anzahl von cAMP-Bindungsstellen an einem spezifischen Antikörper. Bei einer bestimmten Menge Antikörper und radioaktivem cAMP ist die Menge des an den Antikörper gebundenen ¹²⁵J-cAMP umgekehrt proportional zu der Konzentration des zugefügten nicht-radioaktiven cAMP. Die Konzentration des nicht-markierten cAMP wird aus einer Eichkurve abgelesen. Um die Empfindlichkeit des Tests zu erhöhen, wurde eine Acetylierung vorangestellt. Der Nachweisbereich liegt dann bei 2-128 fmol/tube. Dies entspricht bei den SV40-3T3-Zellen etwa dem cAMP-Gehalt von 25000-50000 Zellen, bei den L-Zellen etwa 15000-30000 Zellen.

Für den Einsatz im Assay wurden entsprechend dem Protokoll der Fa. AMERSHAM die getrockneten cAMP-Proben in Assay-Puffer gelöst, acetyliert, mit einer festen Menge ¹²⁵J-cAMP und Antikörper gemischt und 15 bis 18 Stunden bei 4 °C inkubiert. Zur Abtrennung des freien vom gebundenen cAMP wurde mit einem zweiten Antikörper inkubiert (10 Minuten bei Raumtemperatur) und das gebundene cAMP durch Zentrifugation abgetrennt. Die Pellets wurden in einem Philips PW 4580 automatic gamma analyser ausgezählt. Mit Hilfe der parallel zu den Proben erstellten Eichkurve wurden die unbekanntenen cAMP-

Konzentrationen bestimmt.

Das Ablösen der ML-Zellen von der Kulturschale mit Trypsin erniedrigt den cAMP-Gehalt gegenüber Zellen, die mechanisch abgelöst wurden (Segal, 1986). In Vorversuchen wurde ermittelt, daß das Verhältnis der beiden Werte unter verschiedenen experimentellen Bedingungen konstant war (für L-Zellen 65%, für SV40-3T3-Zellen 80%). Mit Blick auf die ortsaufgelöste cAMP-Bestimmung in SPH, die nur über die sequentielle Trypsinierungstechnik erreicht werden kann, wurden alle cAMP-Bestimmungen mit trypsinierten Zellen durchgeführt.

Auch der Serumgehalt des Zellkulturmediums hat einen Einfluß auf den cAMP-Gehalt der Zellen (Kram et al., 1973; Moens et al., 1975; Friedmann et al., 1976). Bei beiden in dieser Arbeit benutzten Zelllinien steigt der intrazelluläre cAMP-Gehalt, wenn der Serumgehalt erhöht wird. Alle in dieser Arbeit durchgeführten cAMP-Bestimmungen erfolgten nach cAMP-Isolierung aus Zellen, die mit einem konstanten Serumanteil im Medium kultiviert wurden: SV40-3T3-Zellen in 10% FCS, L-Zellen in 5% FCS (siehe II.2.1. und II.2.2.).

II.6. Methoden zur Untersuchung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions

Aneinander angrenzende Zellen können an der Berührungsfläche ihrer Zellmembranen sogenannte "Gap Junctions" ausbilden. Dies sind spezifische Kanäle, die sich in Form siebartiger Plaques in der Zellmembran zusammenlagern können. Sie erlauben den interzellulären Austausch von Ionen und kleinen Molekülen (MG kleiner 1500 Dalton; siehe Anhang VI.2. "Gap Junctions"). Zum Nachweis dieser Zell-Zell-Verbindungen wird deshalb die elektrische Kopplung über den Austausch von Ionen gemessen oder die Farbstoffkopplung durch Ausbreitung eines geeigneten Farbstoffes visuell bestimmt (Dertinger und Hülser, 1984; Brümmer, 1988).

II.6.1. Versuchsaufbau

Die elektrophysiologischen Messungen und die Farbstoffinjektionen wurden auf einem schwingungs isolierten Labortisch (T-250, mit einer 6 cm dicken Marmorplatte mit pneumatischem Rollbalgisolator, PHYSIK INSTRUMENTE) ausgeführt.

Der elektrische Meßkreis wurde von Elektroden, Vorverstärkern, Verstärkern (LIST L/M-1), einem Funktionsgenerator (TOELLNER) und einem Oszilloskop (HAMEG, HM 203-6) gebil-

det. Zur Datenübernahme bei der elektrischen Kopplung war ein Computer (IBM/AT) über einen 12-Bit Analog/Digital Wandler (MIKROLINK) an den Meßkreis angeschlossen.

Die Strom- bzw. Farbstoffinjektionen erfolgten mit Glasmikroelektroden, die über Elektrodenhalter (Modell EH-IS, WORLD PRECISION INSTRUMENTS) und Vorverstärker mittels Mikromanipulatoren (LEITZ 520601) gesteuert wurden.

Die Elektroden wurden aus Glaskapillaren (7 cm Länge, 1 mm Außendurchmesser, 0,8 mm Innendurchmesser, mit Innenfilament, HILGENBERG) mit einem vertikalen Puller (Modell C, DAVID KOPF INSTRUMENTS) gezogen und hatten einen Spitzendurchmesser von 100-400 nm). Zur Farbstoffinjektion wurde die Spitze mit Lucifer Yellow, der Schaft mit 1 M LiCl-Lösung gefüllt. Zur Messung der elektrischen Kopplung war die ganze Glaselektrode mit 3 M KCl gefüllt. Die Befüllung der Elektroden erfolgte vom Ende her mit einer Edelstahlkanüle auf Einmal-Kunststoffspritzen.

Die Elektrodenhalter waren mit 3 M KCl gefüllt. Eine Ag/AgCl-Halbzelle an der Basis vermittelte den Stromübertritt von der Salzlösung zum Metall. Die hier auftretende Galvanispannung wurde durch eine gleich große, im Meßkreis jedoch entgegengesetzte Galvanispannung an der Referenzelektrode ausgeglichen. Das Medium in der Kulturschale und die 3 M KCl-Lösung der Referenzelektrode war durch eine Elektrolytbrücke (durch 2% Agarose verfestigte Ringer-Lösung in einem kleinen Glas-U-Rohr) verbunden.

Zur optischen Kontrolle diente ein ZEISS Universalmikroskop mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung, Phasenkontrastmöglichkeit und ein 40xW/0,75 Immersionsobjektiv für großen Arbeitsabstand. Lichtquelle bei der Fluoreszenzmikroskopie war eine Quecksilberhöchstdrucklampe (HBO 50 Watt) mit einem Erregerfilter (450-490 nm), einem Farbteiler (510 nm Interferenzfilter) und einem Sperrfilter (520 nm Kantenfilter).

Die photographische Dokumentation erfolgte an diesem Mikroskop mit einer aufgesetzten Kamera (ZEISS M35W) und KODAK Ektachrome 200-Diafilmen.

Die Zellen wurden für diese Meßtechnik auf 6 cm Petrischalen bis zur gewünschten Dichte kultiviert. Damit die Elektroden ohne Berührung des Schalenrandes mit einem Winkel von ca. 15 Grad in die Zellen eingestochen werden konnten, mußte dieser seitlich auf etwa ein Drittel der Höhe mit einem LötKolben entfernt werden. Zur Aufrechterhaltung physiologischer Bedingungen während der Meßdauer von zwanzig bis dreißig Minuten wurde der Mikroskopisch temperiert, wodurch die Temperatur der Petrischale konstant bei 36°C gehalten wurde.

II.6.2. Messung der elektrischen Kopplung

Das Prinzip der in dieser Arbeit verwendeten Methode beruht auf dem Nachweis eines Spannungsabfalls in einer Zelle, wenn in eine Nachbarzelle ein Konstantstrom-Signal injiziert wird. Das vereinfachte Schema hierzu ist in Abb. 2 dargestellt. Durch die Strominjektion (33Hz, sinusförmig, maximal 10 nA) wird zunächst in der injizierten Zelle selbst ein Spannungsabfall des 33 Hz-Signals erzeugt, der dem negativen Membranpotential überlagert ist. Ist die Nachbarzelle zur Injektionszelle über die Leitfähigkeit der Gap Junction-Poren elektrisch gekoppelt, entsteht hier ebenfalls ein Spannungsabfall, der mit einer zweiten Elektrode (Meßelektrode) neben dem Membranpotential gemessen werden kann (Dertinger und Hülser, 1984).

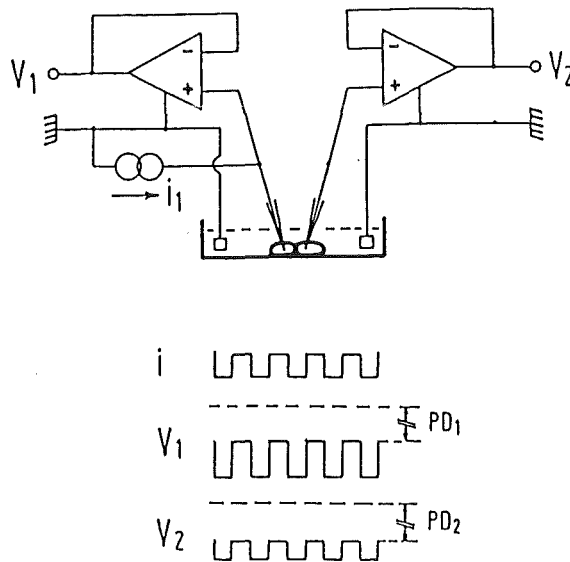


Abb. 3: Schematische Darstellung der 'Zwei-Elektroden-Technik' zur Messung der elektrischen Zell-Zell-Kopplung. Ein Rechteckstrom (in der vorliegenden Arbeit ein Sinusstrom) wird in die linke Zelle injiziert, wo er über deren innere Leitfähigkeit einen Spannungsabfall (V_1) induziert, der dem negativen Membranpotential (PD_1) überlagert ist. Wenn die benachbarten Zellen elektrisch gekoppelt sind, wird auch in der rechten Zelle neben dem Membranpotential (PD_2) ein Signal (V_2) beobachtet, welches um so größer ist, je stärker die Kopplung ist (aus Dertinger und Hülser, 1984).

Die Meßwerterfassung durch den Computer erfolgte über eine IEC-Schnittstelle und wurde durch ein in dieser Arbeitsgruppe entwickeltes Programm gesteuert. Dieses ermittelte aus den an den jeweiligen Ein- bzw. Ausgängen anliegenden Signalspannungen, nachdem über den Analog/ Digital Wandler jeweils 500 Einzelmeßwerte in 300 ms digitalisiert und gespeichert wurden, die mittlere Signalamplitude und den Mittelwert des Gesamtsignals (Gleichspannungsanteil; Maß für das Membranpotential). Spannungssignale der injizierten und der Nachbarzellen wurden auf diese Weise erfaßt. Die Werte wurden auf dem Bildschirm grafisch und numerisch dargestellt.

Die Auswertung der Meßreihen erfolgte durch ein weiteres Programm. Hierbei wurden zunächst die Kopplungsmessungen an Nachbarzellen bzw. an injizierten Zellen am Bildschirm markiert. Beispiele solcher Meßdatenfiles sind in Abb. 4 gezeigt. Danach berechnete das Programm den mittleren Kopplungsgrad der Zellen in Form des Verhältnisses der Mittelwerte der Spannungsabfälle der 33 Hz-Signalamplituden von Nachbarzellen zu Kontrollzellen. Von diesen Amplitudenwerten wurde zuvor die mittlere Rauschamplitude des Verstärkersystems abgezogen. Ein Kopplungsgrad von beispielsweise 10% bedeutet demnach, daß 10% des in der injizierten Zelle entstehenden Spannungssignals in der Nachbarzelle gemessen wird.

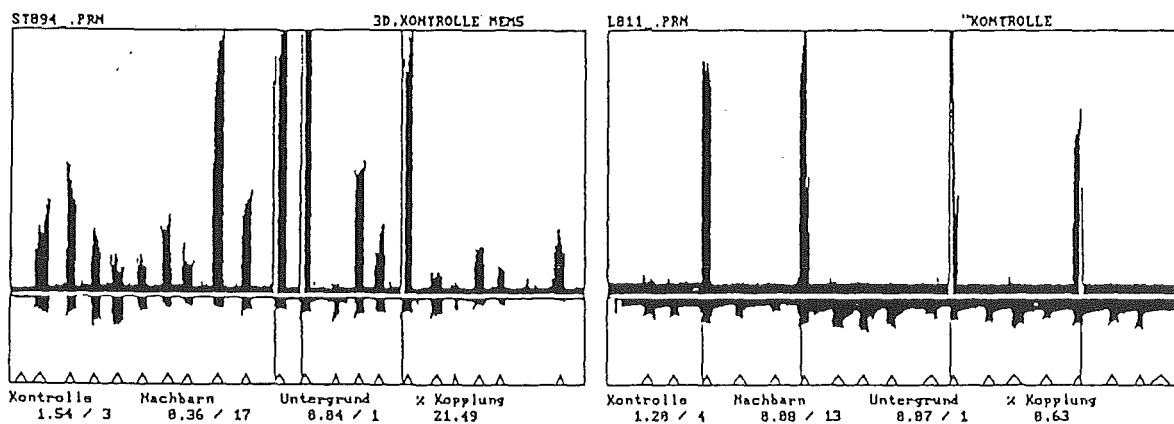


Abb. 4: Beispiele für Meßdatenfiles bei der Messung der elektrischen Zell-Zell-Kopplung. Signalkopplung in SV40-3T3-Zellen (links) und ungekoppelte L-Zellen (rechts). Der korrekte Einstich in eine Zelle ist am Auftreten des Membranpotentials unterhalb der Nulllinie zu erkennen. Weitere Erläuterungen im Text.

II.6.3. Beobachtung der Zell-Zell-Kopplung durch Farbstoffausbreitung

Zur Beobachtung der Farbstoffausbreitung wurde der gelb fluoreszierende Farbstoff Lucifer Yellow ausgewählt (Absorptionsmaximum 430 nm, Emissionsmaximum 540 nm). Er hat eine hohe Quantenausbeute und ist im physiologischen pH-Bereich negativ geladen, wodurch er nicht membranpermeabel ist. Diese Eigenschaft verhindert ein "Durchsickern" des Farbstoffes nach Injektion in eine Zelle und erlaubt eine genaue Beobachtung der Farbstoffausbreitung über Gap Junctions, da Lucifer Yellow mit einem MG von 457 Dalton GJ-permeabel ist (Stewart, 1978; Stewart und Feder, 1985). Mit einer Mikropipette wurde der Farbstoff iontophoretisch in eine Zelle injiziert. Dazu diente ein negativer Stromimpuls von 10 nA für die Dauer von 10 Sekunden. Die Ausbreitung des Farbstoffes in die umliegenden Zellen konnte im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Bei stark gekoppelten Zellen war der Farbstoff nach 2 Minuten nicht nur in direkt benachbarten Zellen zu sehen, sondern auch in weiter von der injizierten Zelle entfernten Zellen, z. B. Nachbarn "2. Ordnung" .

III. Ergebnisse

III.1. Auswahl der Zellen und Charakterisierung der Kulturformen

Um tier- und zelltypspezifische Unterschiede im Verhalten der Zellen auszuschließen, wurden zwei permanente Fibroblastenzelllinien der Maus ausgewählt: L-Zellen sind transformierte Zellen einer adulten Maus (Earle et al., 1943), 3T3-Zellen wurden aus embryonalen Fibroblasten gewonnen (Todaro und Green, 1963). Beide Zelllinien unterscheiden sich bezüglich der interzellulären Kommunikation. 3T3-Zellen können über spezifische Kanäle, die Gap Junctions, Ionen-permeable Kontakte zu Nachbarzellen herstellen, wodurch sie elektrisch gekoppelt werden (Dertinger und Hülser, 1981; Flagg-Newton et al., 1981; Enomoto und Yamasaki, 1985; Pitts et al., 1986). L-Zellen haben nicht die Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation (Dertinger und Hülser, 1981+1984; Bräuner et al., 1990).

Verschiedene 3T3-Stämme wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, SPH zu bilden, untersucht. Dabei erwiesen sich Swiss-3T3-Zellen, die mit dem SV40-Virus transformiert waren (Todaro et al., 1964), als geeignetste Zelllinie: die Zellen sind elektrisch gekoppelt und besitzen in ausreichendem Maße die Fähigkeit, kugelförmige Aggregate zu bilden. Alle weiteren hier beschriebenen Ergebnisse wurden mit dieser Zelllinie gewonnen.

III.1.1. Nachweis der interzellulären Kommunikation

Die Zell-Zell-Kopplung über Gap Junctions ermöglicht den Transport von Ionen und Molekülen, deren Molekulargewicht 1500 Dalton nicht überschreitet (siehe Anhang VI.2. "Gap Junctions"). Diese Eigenschaft wird zur Messung bzw. Beobachtung der interzellulären Kommunikation herangezogen.

In SV40-3T3-Zellen war die Ausbreitung des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow gut zu beobachten. Nach Injektion des Farbstoffes in eine Zelle (siehe II.6.3.) breitete er sich von der injizierten Zelle zu benachbarten Zellen aus (Abb. 5). Nach Injektion von Lucifer Yellow in eine außen im Sphäroid liegende Zelle konnte die Farbstoffkopplung auch in diesem System nachgewiesen werden.

In L-Zellen konnte dagegen keine Ausbreitung von Lucifer Yellow in benachbarte Zellen beobachtet werden (Abb. 6).

Diese Ergebnisse der Farbstoffkopplung werden durch elektrophysiologische Messungen (siehe II.6.2.), die an diesem Institut gemacht wurden, gestützt. Hierbei zeigen SV40-3T3-Zellen einen Kopplungsgrad von 22%. In L-Zellen konnte keine signifikante elektrische Kopplung gemessen werden (Kopplungsgrad 1-2%).

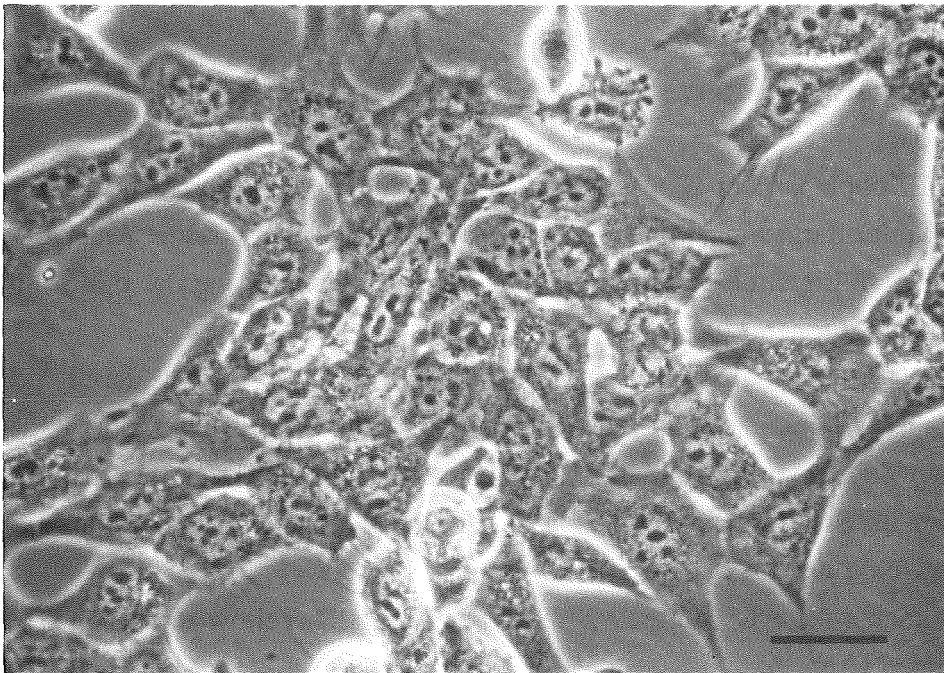
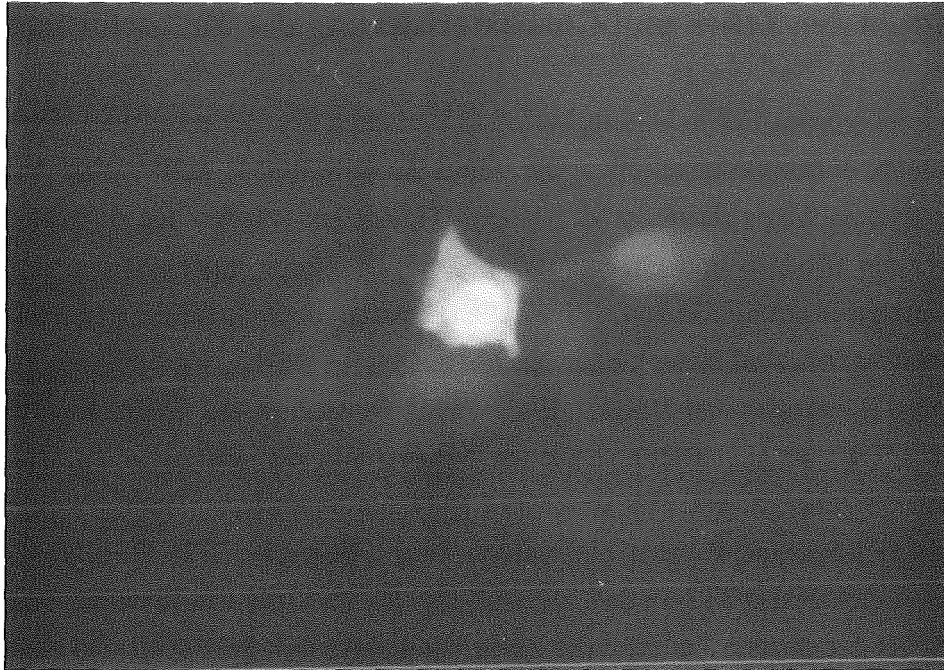


Abb. 5: Farbstoffausbreitung in SV40-3T3-Zellen: Im Fluoreszenzauflicht ist die Ausbreitung in Nachbarzellen zu sehen (oben); darunter dieselben Zellen im Phasenkontrast (Balkenlänge: 30 μm).

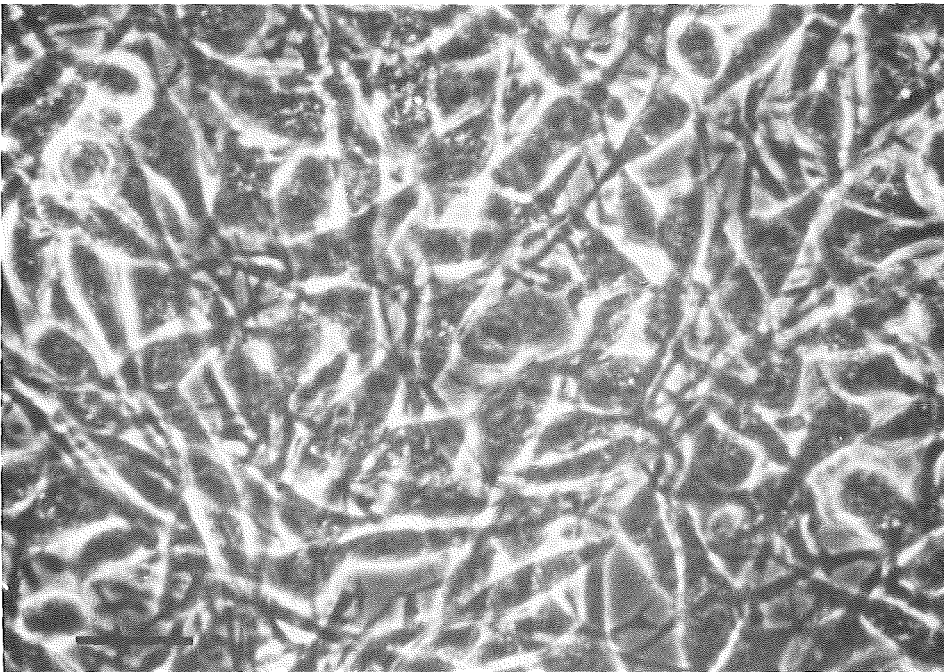
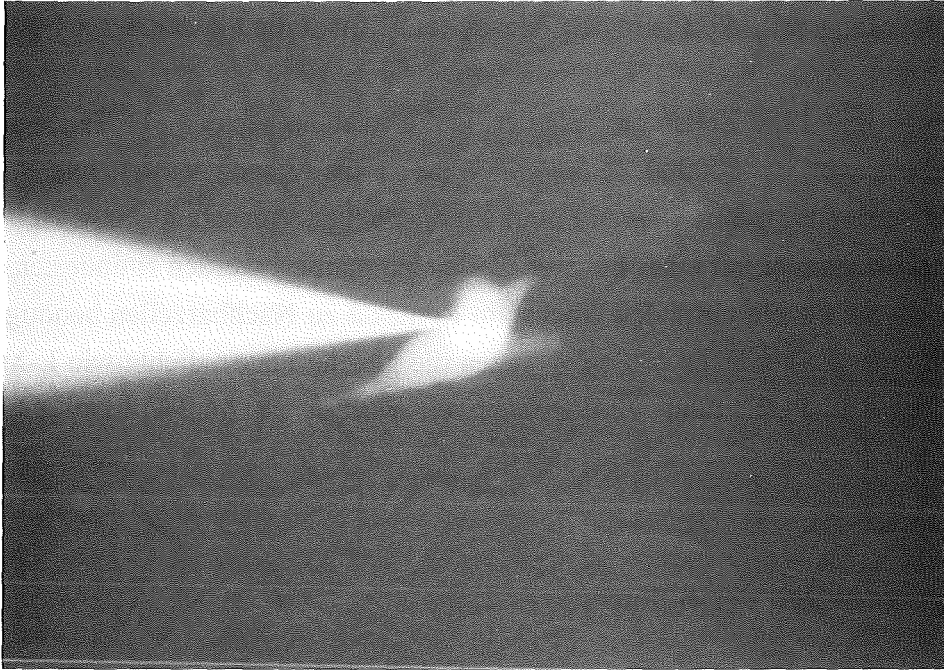


Abb. 6: Farbstoffausbreitung in L-Zellen: Hier ist keine Ausbreitung des Fluoreszenzfarbstoffes zu beobachten (oben). Links im Bild ist die mit Lucifer Yellow gefüllte Mikropipette zu erkennen. Darunter dieselben Zellen im Phasenkontrast (Balkenlänge: 30 μm).

III.1.2. Wachstumsverhalten der Monolayer-Kulturen

Das Verhalten der Zellen wurde an Hand von Wachstumskurven charakterisiert, aus denen sich die Verdopplungszeit, die Plating Efficiency (P. E.) und die Plateaudichte bestimmen lassen.

L-Zellen wurden mit 1250 Zellen/cm² plattiert und erreichten nach ca. 11 Tagen Kulturdauer ihre Plateaudichte von ca. 500000 Zellen/cm² (Abb. 1 im Anhang VI.4.). Die P. E. beträgt 69% und die Verdopplungszeit während ihrer exponentiellen Wachstumsphase 20,9 Stunden. SV40-3T3-Zellen müssen mit einer höheren Zelldichte plattiert werden (mindestens $1-2 \times 10^4$ Zellen/cm²), da sie für ein normales Wachstum Kontakte zu Nachbarzellen benötigen. Sie erreichten nach einer Kulturdauer von ca. 4 Tagen die gleiche Plateaudichte wie L-ML (Abb. 1 im Anhang VI.4.). P. E. und Verdopplungszeit wurden zu 84,9% bzw. 14,6 Stunden bestimmt.

III.1.3. Eigenschaften der Sphäroide

SV40-3T3-Zellen zeigen eine ausgeprägte Tendenz zur Aggregation und bilden bereits nach einem Tag kleine Sphäroide von bis zu 130 μm Durchmesser. Nach weiteren 5 Tagen Kulturdauer in der Spinnerflasche haben sie bereits eine Größe von durchschnittlich 320 μm erreicht (siehe II.2.2.1.). SV40-3T3-SPH sind sehr kompakt und zeigen eine glatte Oberfläche. Auch unter dem Mikroskop lassen sich im Randbereich kaum einzelne Zellen voneinander unterscheiden (Abb. 7).

Werden L-Zellen als Sphäroide kultiviert, so erhält man erst nach 3-4 Tagen Kulturdauer auf mit Agarose beschichteten Petrischalen kleine Zellaggregate von bis zu 110 μm Durchmesser. Sie zeigen eine deutlich geringere Tendenz zur Aggregation. Nach weiteren 10 Tagen in einer Spinnerflasche haben sie einen Durchmesser von 180-230 μm erreicht (siehe II.2.2.2.). Sie sind weniger kompakt als SV40-3T3-Sphäroide und man erkennt mit Hilfe des Lichtmikroskops einzelne Zellen in der äußeren Zellschicht (Abb. 7).

Die halb-logarithmische Darstellung der SPH-Wachstumskurven ergibt eine Sättigungskurve, d. h. die Wachstumsgeschwindigkeit der SPH-Volumina nimmt mit zunehmender Kulturdauer ab (Abb. 8).

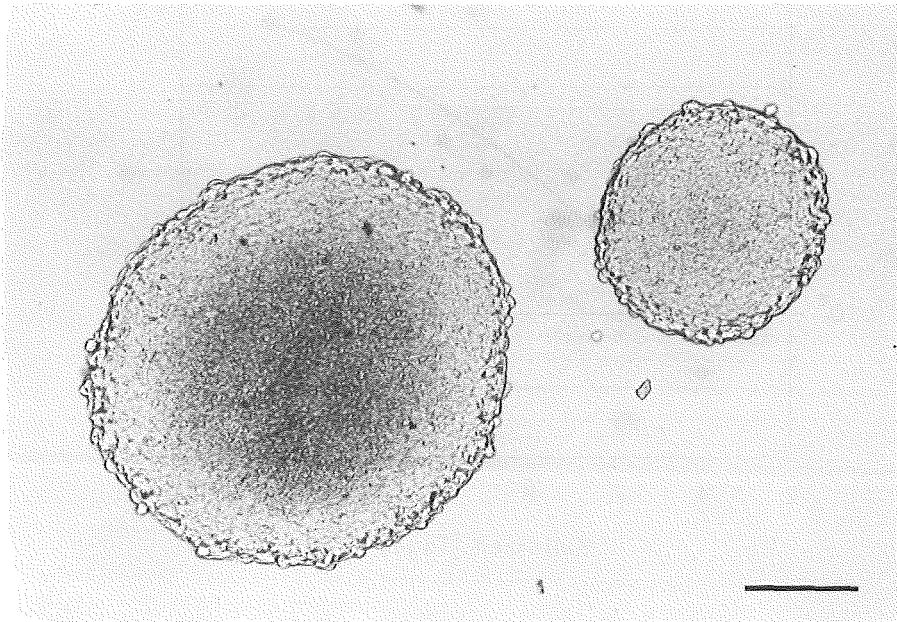
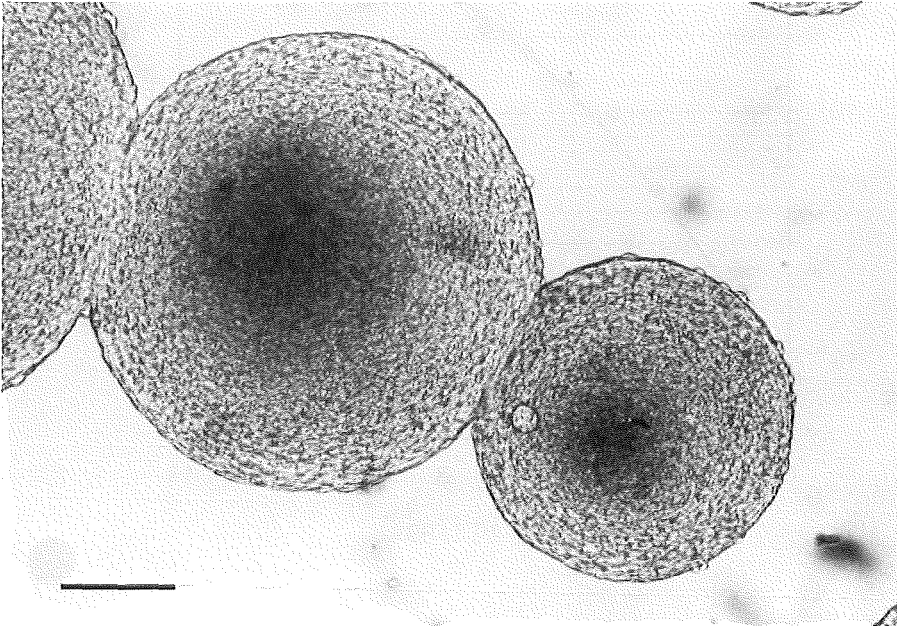


Abb. 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen von SV40-3T3-Sphäroiden (10 Tage alt, oben) und L-Sphäroiden (12 Tage alt, unten); Balkenlänge: 150 μm .

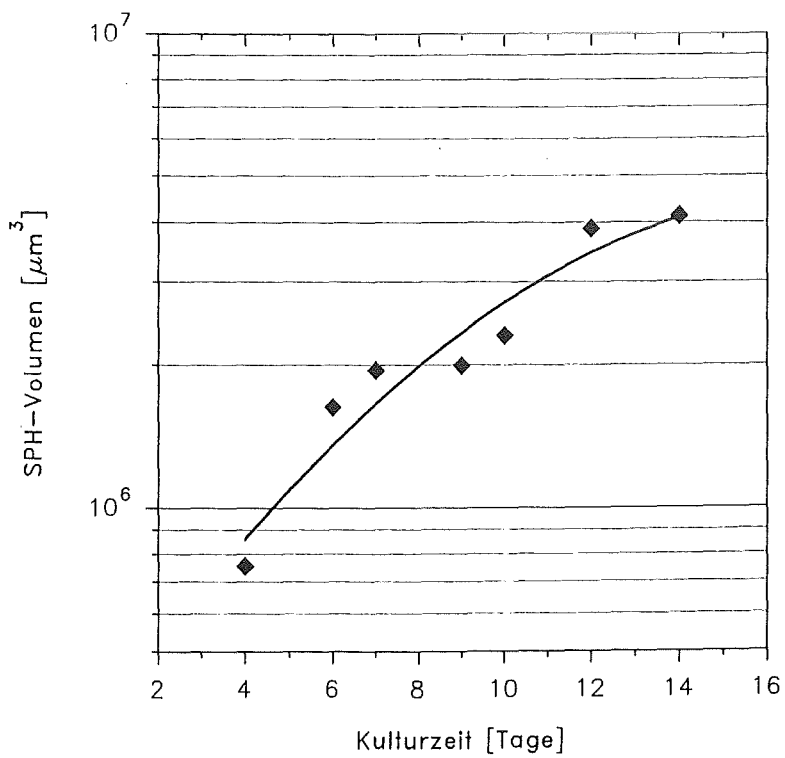
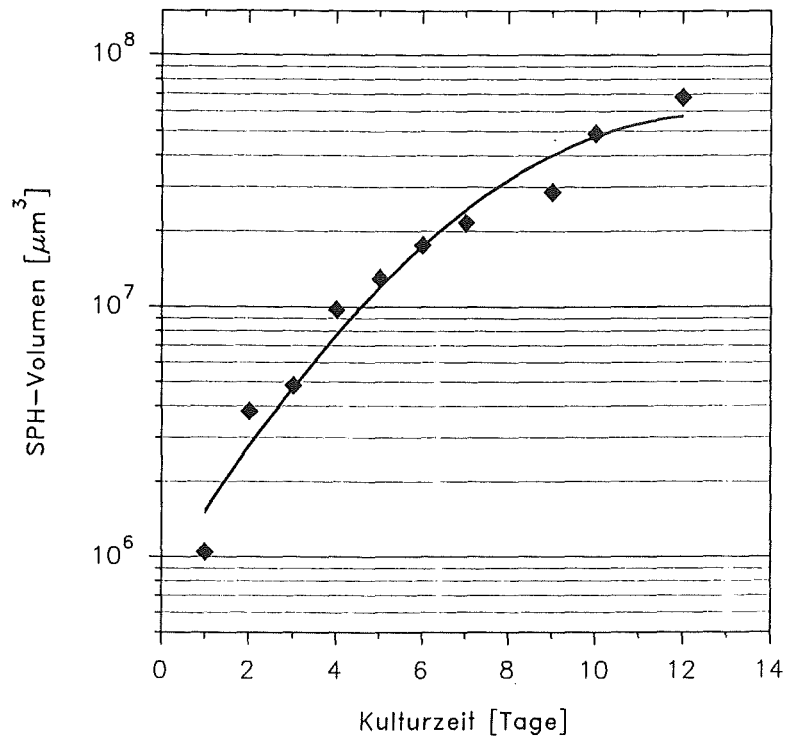


Abb. 8: Wachstumskurven von SV40-3T3-SPH (oben) und L-SPH (unten). Aufgetragen sind die SPH-Volumina (Symbole) gegen die Zeit. Die eingezeichnete Kurve ist eine durch den Computer ermittelte Regressionsgerade 2. Ordnung. Die mikroskopisch ermittelten SPH-Durchmesser (Mittelwerte von mindestens 2 Versuchen) und die daraus errechneten SPH-Volumina sind in Tab. 1 im Anhang VI.3. zusammengestellt.

III.1.4. Innere Struktur der Sphäroide

Die beobachteten morphologischen Unterschiede zwischen den beiden SPH-Typen deuten auf eine unterschiedliche innere Struktur hin. Eine grobe Vorstellung hierüber läßt sich in einfacher Weise über Zellzahl- und Größenbestimmungen in Verbindung mit elementaren geometrischen Überlegungen erzielen, bei denen die Zellen im SPH als annähernd kugelförmig angenommen werden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind zugleich hilfreich bei der Interpretation der Ergebnisse zur Proliferationskontrolle unter dem Aspekt der im SPH-Verband herrschenden geometrischen Verhältnisse.

Definition der hierbei verwendeten Größen (Formeln siehe Anhang VI.3.):

SPH-Volumen:	berechnet sich formal aus dem mikroskopisch ermittelten SPH-Durchmesser
Zellen pro SPH:	mit Hilfe des Coulter Counters ermittelte Zellzahl nach Trypsinierung des gesamten SPH
Effektives Zellvolumen:	$\text{SPH-Volumen} / \text{Zellen pro SPH}$
Effektiver Zelldurchmesser:	berechnet sich formal aus dem effektiven Zellvolumen
Zellzahl in der äußeren SPH-Zellschicht (N):	$\text{Schichtvolumen} / \text{effektives Zellvolumen}$
Zelldichte in der äußeren SPH-Zellschicht (D):	$\text{Oberfläche der äußeren Zellschicht} / N$
Wahrer Zelldurchmesser:	mit Hilfe eines geeichten Okularmikrometers ermittelter Zelldurchmesser nach Trypsinierung von SPH bzw. ML

Sowohl das effektive Zellvolumen als auch der hieraus berechnete effektive Zelldurchmesser stimmen für beide Zelllinien überein. Auch in der Zelldichte der äußeren Sphäroidschicht ist kein Unterschied festzustellen. Interessanterweise entspricht die Zelldichte der äußeren SPH-Schicht derjenigen dichter ML (Tab. 1).

	effektives	effektiver	Zelldichte [10^5 Z/cm ²]	
	Zellvolumen [μm^3]	Zelldurchmesser [μm]	D	konfl. ML
SV40-3T3	7559 \pm 2203	24,2 \pm 2,3	3,4 \pm 0,6	3,2
L-Zellen	7534 \pm 2149	24,1 \pm 2,2	3,3 \pm 0,6	3,0

Tab. 1: Gegenüberstellung morphologischer Parameter von SPH und ML. Die Werte der entsprechenden Einzelversuche für SPH sind der Tab. 2 im Anhang VI.3. zu entnehmen. Angaben zur Zelldichte für ML s. Tab. 5 im Anhang VI.3.

Ausgeprägte Unterschiede ergeben sich bei den wahren Zellvolumina bzw. wahren Durchmessern und der Packungsdichte. In SV40-3T3-SPH ist nur 22% des Volumens wahres Zellvolumen; bei den verbleibenden 78% des Volumens handelt es sich wahrscheinlich hauptsächlich um im SPH-Verband synthetisiertes extrazelluläres Matrixmaterial. Dies wird gestützt durch die Beobachtung von faserartigen Rückständen bei der Trypsinierung der SPH. Die mittlere Dicke der Matrixschicht, mit der jede Zelle umgeben ist, ist gleich der halben Differenz zwischen effektivem und wahren Zelldurchmesser, also etwa 4,8 μm .

Dagegen bestehen 77% der L-SPH aus wahren Zellvolumen, ein Wert, der nahe bei dem theoretischen Wert von 74% für die sog. dichteste Kugelpackung bei 12 nächsten Nachbarn liegt (Kittel, 1969). Diese maximal dichte Packung der Zellen läßt in den L-SPH die Ausbildung einer Extrazellulärmatrix nur in dem ausgesparten Volumenanteil (22%) zu.

	wahrer	wahres	effektives	Packungsdichte
	Zelldurchmesser	Zellvolumen (A)	Zellvolumen (B)	[A/B]
	[μm]	[μm^3]	[μm^3]	
SV40-3T3	14,62 \pm 0,86	1647 \pm 295	7559 \pm 2203	0,22
L-SPH	21,96 \pm 3,14	5823 \pm 2564	7534 \pm 2149	0,77

Tab. 2: Unterschiedliche Zellpackungsdichte in SV40-3T3- und L-SPH. Der wahre SPH-Zelldurchmesser ist der Mittelwert aus getrennten Auswertungen von 5 SPH-Schichten. Die Werte der entsprechenden Einzelversuche (wahre Durchmesser und die daraus berechneten wahren Volumina der SPH-Zellen) sind der Tab. 3 im Anhang VI.3. zu entnehmen.

Die aus dieser Analyse resultierenden Daten geben eine befriedigende Deutung für die beobachteten äußeren morphologischen Unterschiede zwischen den beiden SPH-Typen. So läßt sich die Kompaktheit, mechanische Stabilität und glatte Oberflächenstruktur der SV40-3T3-SPH durch die Einbettung der Zellen in die Extrazellulärmatrix ("Kittsubstanz") erklären. Dieses Merkmal fehlt bei L-SPH, wodurch sie als weniger kompakte Aggregate erscheinen, mit aufgelösten Zellkonturen an der Oberfläche.

III.2. cAMP-Gehalt und Zellzyklusphasenverteilung im Monolayer

Der Gehalt an zellulärem sekundärem Botenstoff cAMP wurde mit Hilfe eines kompetitiven Bindungsassays (RIA) bestimmt (siehe II.5.). Zur Ermittlung der Verteilung der Zellzyklusphasen einer Zellpopulation diente die Flußcytometrie (II.4.1.).

III.2.1. cAMP-Gehalt

In Übereinstimmung mit Daten anderer Autoren (Burstin et al., 1974; Moens et al., 1975; Flagg-Newton und Loewenstein, 1981; Channon et al., 1987) ergibt sich bei der Kultivierung der beiden Zelllinien als ML im wesentlichen eine Abnahme des cAMP-Gehaltes mit zunehmender Zelldichte. Der cAMP-Gehalt bei L-Zellen liegt dabei deutlich höher als derjenige der SV40-3T3-Zellen (Tab. 3 in III.3.1.). Bei L-Zellen erfolgt im Bereich sehr geringer Zelldichte zunächst jedoch ein Anstieg des cAMP-Gehaltes (Abb. 9). Ein solcher konnte bei SV40-3T3-Zellen nicht beobachtet werden (Abb. 10), wahrscheinlich aufgrund der erforderlichen höheren Ausgangszelldichte. Die aus der Literatur bekannten Werte für die intrazelluläre cAMP-Konzentration der 3T3-Zellen im Bereich von 1140-3500 fmol/10⁶ Zellen konnte ich bestätigen (Kram et al., 1973; Burstin et al., 1974; Smets und Van Rooy, 1987). Hierbei ist zu beachten, daß sich die Absolutwerte verschiedener SV40-3T3-Klone bei den genannten Autoren um den Faktor 2-3 unterscheiden.

III.2.2. Zellzyklusphasenverteilung

ML-Kulturen von L- und SV40-3T3-Zellen zeigen, in Übereinstimmung mit Literaturdaten (Smets und Van Rooy, 1987), mit zunehmender Zelldichte eine kontinuierliche Abnahme der Zellen in der S-Phase und eine Zunahme der Zellen in der G1-Phase. Der Anteil der Zellen in der (G2+M)-Phase bleibt konstant (Abb. 9 und 10).

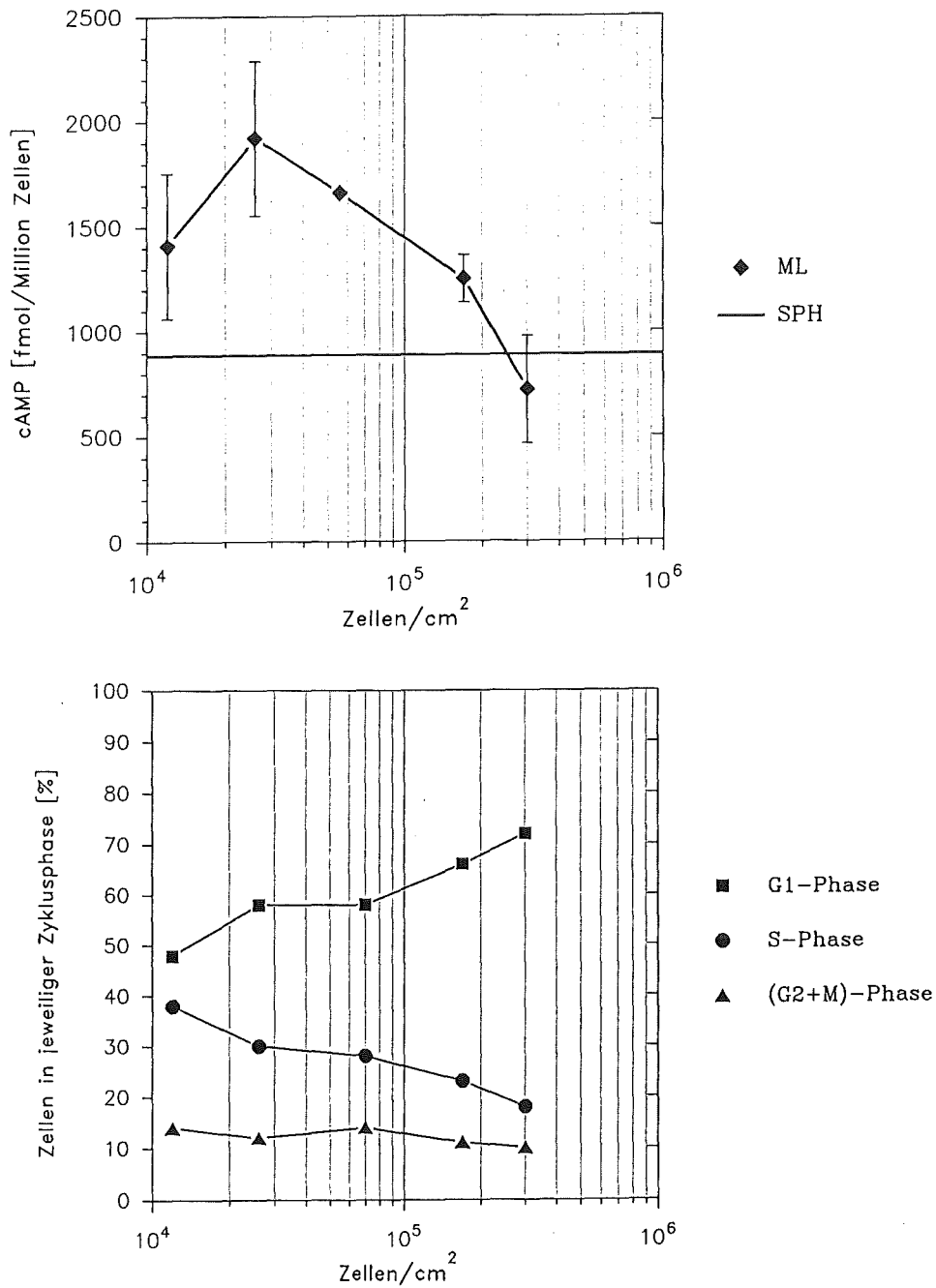


Abb. 9: cAMP-Gehalt (oben) und Zellzyklusverteilung (unten) von L-Zellen bei zunehmender Zelldichte. Die cAMP-Kurve verbindet die Mittelwerte zweier Experimente \pm Standardabweichung. Ist keine Standardabweichung zu sehen, liegt sie innerhalb der Symbolgröße. Für die Zellzyklusverteilung ist die Auswertung eines Experiments dargestellt. Die Zahlenwerte hierzu sind in der Tab. 5a im Anhang VI.3. zusammengestellt.

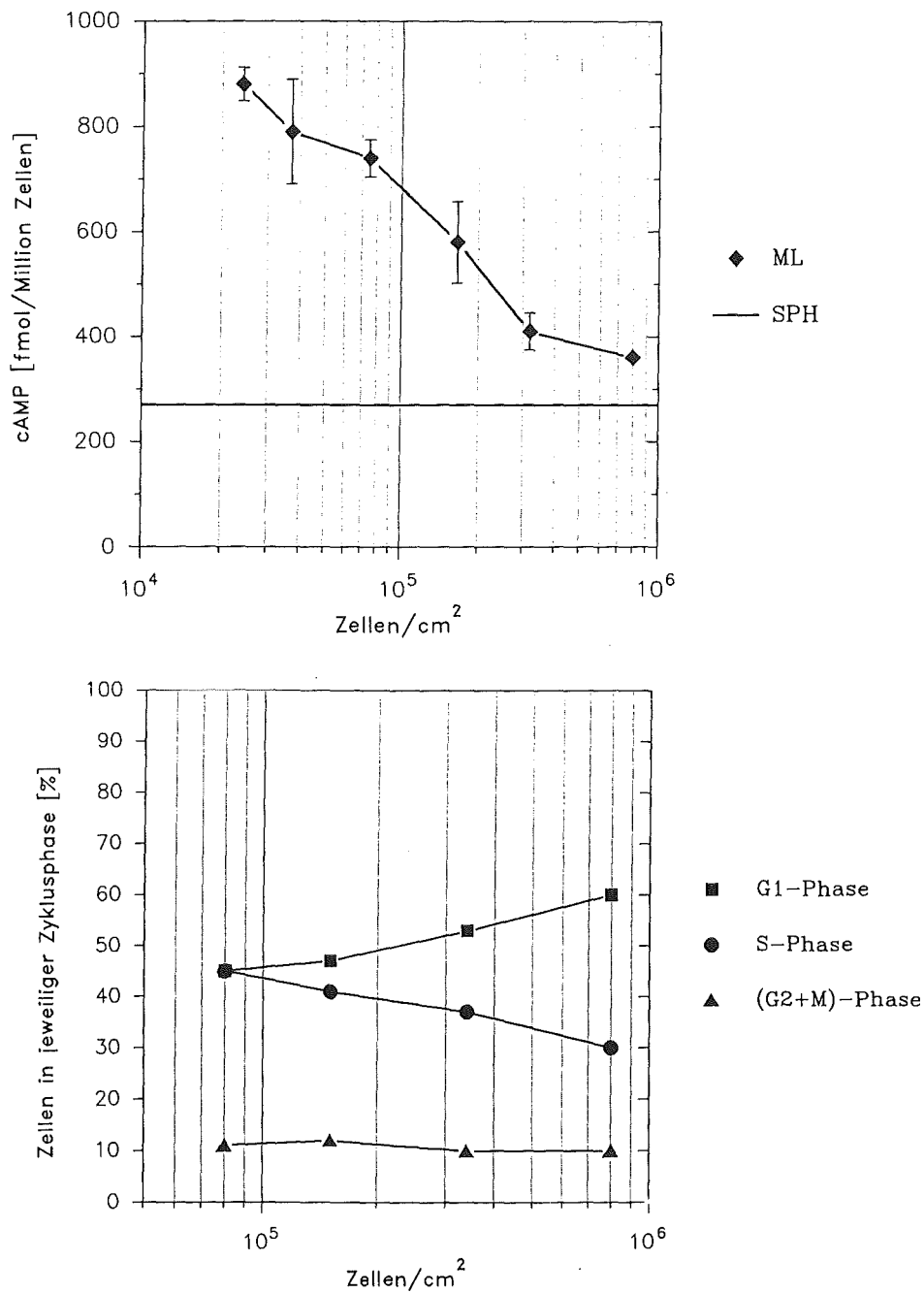


Abb. 10: cAMP-Gehalt (oben) und Zellzyklusverteilung (unten) von SV40-3T3-Zellen bei zunehmender Zelldichte. Die cAMP-Kurve verbindet die Mittelwerte zweier Experimente \pm Standardabweichung. Ist keine Standardabweichung zu sehen, liegt sie innerhalb der Symbolgröße. Für die Zellzyklusverteilung ist die Auswertung eines Experiments dargestellt. Die Zahlenwerte hierzu sind in der Tab. 5b im Anhang VI.3. zusammengestellt.

III.3. cAMP-Gehalt und Zellzyklusphasenverteilung im Sphäroid

III.3.1. cAMP-Gehalt

Zur Bestimmung des cAMP-Gehaltes von Zellen im Sphäroidverband wurden die Sphäroide zunächst vollständig trypsiniert und der cAMP-Gehalt als Mittelwert aller Sphäroidzellen unabhängig von ihrer Lage bestimmt. Hierbei ergaben sich bei SV40-3T3- und L-Sphäroiden Werte, die im Bereich des cAMP-Gehaltes von dichten Monolayerzellen liegen (Abb. 9 und 10, horizontale Linien).

Um zu untersuchen, ob sich die in verschiedenen Tiefen der SPH befindlichen und unterschiedlichen physiologischen Bedingungen ausgesetzten Zellpopulationen in ihrem cAMP-Gehalt unterscheiden, wurden von den SPH durch sequentielle Trypsinierung einzelne Zellschichten von außen nach innen "abgeschält" (siehe II.2.3.). An den aus unterschiedlichen Tiefen im SPH stammenden Zellen wurde die cAMP-Bestimmung durchgeführt.

In Tab. 3 sind die cAMP-Werte für Zellen aus der äußersten Schicht und dem Zentralbereich der SPH zusammengefaßt und den Werten für exponentiell wachsende und konfluente ML gegenübergestellt. Zunächst erkennt man, daß für beide Zelllinien der cAMP-Gehalt der äußeren Zellschichten im Sphäroid dem Wert des zugehörigen konfluenten Monolayers entspricht.

	cAMP-Gehalt [fmol/Million Zellen]			
	ML		SPH	
	exp.	Plateau	außen	innen
SV40-3T3	880	360	360	275
L-Zellen	1920	720	780	160

Tab. 3: cAMP-Gehalt der Zellen im ML (exponentielle Wachstumsphase bzw. im Plateau) und im SPH (äußere Zellschicht bzw. innerste Zellen).

Beide Zelllinien unterscheiden sich jedoch bezüglich der Radialabhängigkeit der cAMP-Konzentration. Bei L-Sphäroiden sinkt der cAMP-Gehalt der Zellen mit zunehmender Sphäroidtiefe. Im "Kern" des Sphäroids enthalten die Zellen nur noch 20% des cAMP-Wertes der äußeren Zellschichten (Tab. 3/Abb. 11).

Im Gegensatz dazu zeigt sich bei SV40-3T3-Sphäroiden kein nennenswerter cAMP-Gradient von den Zellen der äußeren Schale bis hin zum innersten Bereich. Die Zellen im Sphäroid haben alle denselben cAMP-Gehalt, der dem eines dichten Monolayers entspricht (Tab. 3/Abb. 11).

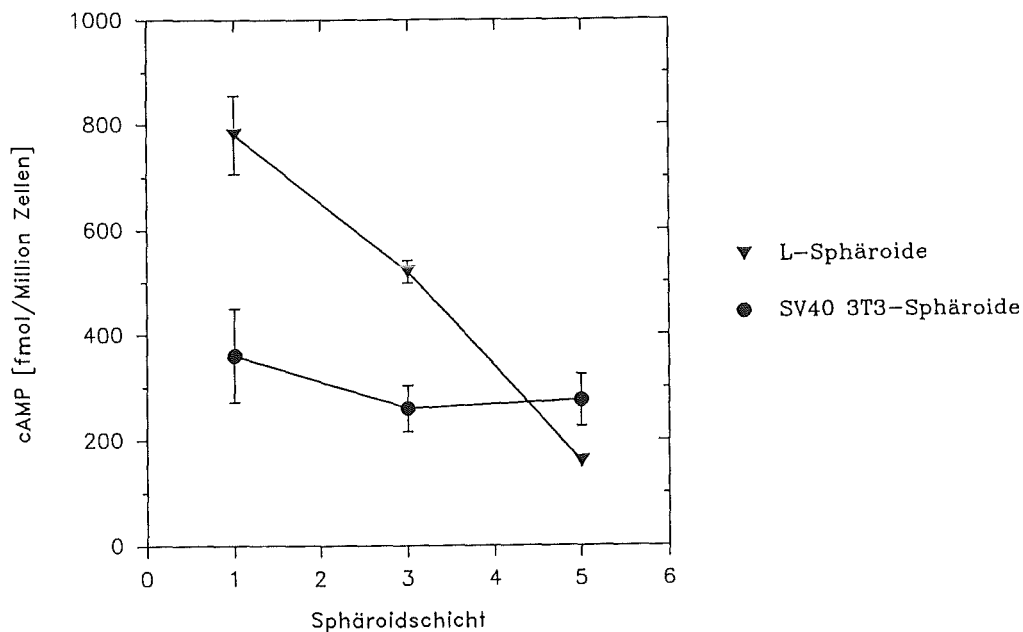


Abb. 11: cAMP-Gehalt der Zellen in SV40-3T3- und L-Sphäroiden mit zunehmender Tiefe im SPH: Sphäroidschicht 1 = äußere Zellschicht; Sphäroidschicht 5 = Zellen im SPH-Inneren. Die eingezeichneten Kurven verbinden jeweils die Mittelwerte von drei Experimenten \pm Standardabweichung. Ist keine Standardabweichung eingezeichnet, so liegt sie innerhalb der Symbolgröße. Die Zahlenwerte hierzu sind in der Tab. 6 im Anhang VI.3. aufgeführt.

III.3.2. Zellzyklusphasenverteilung

Die flußcytometrischen Untersuchungen der SPH wurden, ebenso wie die Analysen des intrazellulären cAMP-Gehaltes, schichtenweise durchgeführt. In Tab. 4 sind für beide Zelllinien die Zyklusphasenverteilungen für exponentiell wachsende und konfluente ML, sowie für äußere und innere SPH-Zellen zusammengestellt. Ein Vergleich der Werte von ML und SPH zeigt, daß für beide Zelllinien keine Unterschiede zwischen der äußeren Sphäroidschicht und einem konfluenten ML bestehen. Es ergibt sich damit ein ähnliches Verhalten wie beim cAMP-Gehalt (vgl. Tab. 3).

		Zellzyklusphasenverteilung [%]			
		ML		SPH	
		exp.	Plateau	außen	innen
SV40-3T3	G1	45	60	59	58
	S	45	30	34	35
	G2+M	11	10	6	7
L-Zellen	G1	48	72	73	92
	S	38	18	16	4
	G2+M	14	10	11	4

Tab. 4: Prozentuale Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen im ML (exponentielle Wachstumsphase bzw. im Plateau) und im SPH (äußere Zellschicht bzw. innerste Zellen).

Ein grundlegender Unterschied zwischen L- und SV40-3T3-SPH besteht bezüglich der Radialabhängigkeit der Zyklusverteilung (Tab. 4/Abb. 12). Während sie sich bei letzteren in Abhängigkeit von der Tiefe der Zellen im SPH nicht ändert, kommt es in den L-SPH zu einer kontinuierlichen Abnahme von S- und (G2+M)-Zellen und einer Zunahme des G1-Anteils mit der Tiefe. Im Innern der L-SPH sind nahezu alle Zellen (92%) in der G1-Phase.

Beim Vergleich der Radialprofile von Zyklusverteilung und cAMP ergeben sich interessante Parallelen (Abb. 11 und 12). Während in SV40-3T3-SPH für beide Größen keine Radialabhängigkeit besteht, korreliert in den L-SPH die radiale cAMP-Abnahme mit der Zunahme des G1-Anteils bzw. der Abnahme der übrigen Phasenanteile.

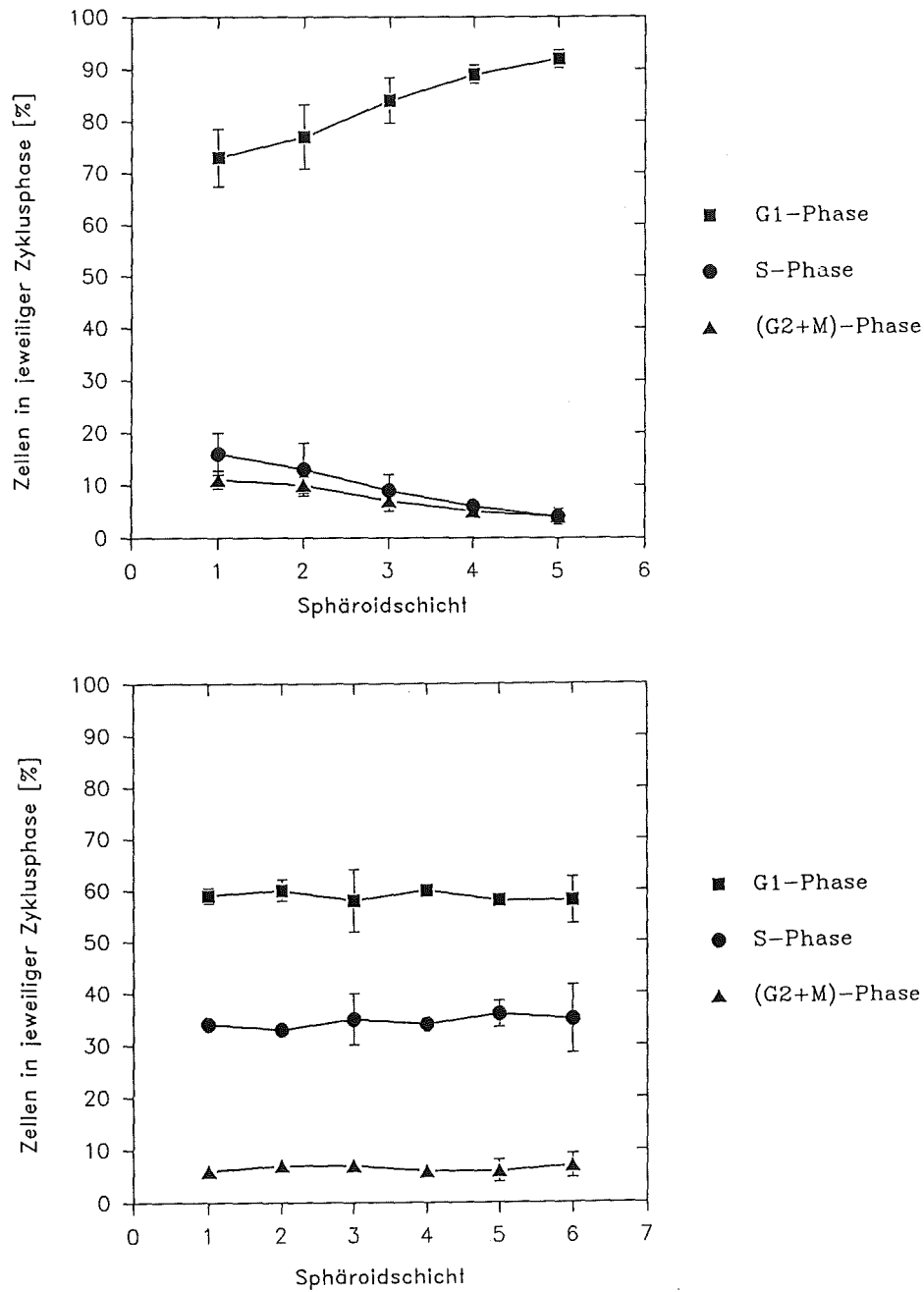


Abb. 12: Zellzyklusverhalten der Zellen in L-Sphäroiden (oben) und SV40-3T3-SPH (unten) mit zunehmender Tiefe im SPH: Sphäroidschiicht 1 = äußere Zellschiicht; Sphäroidschiicht 5 bzw. 6 = Zellen in der SPH-Mitte. Die eingezeichneten Kurven verbinden jeweils die Mittelwerte von drei Experimenten \pm Standardabweichung. Ist keine Standardabweichung zu sehen, liegt sie innerhalb der Symbolgröße. Die Zahlenwerte hierzu sind in der Tab. 6 im Anhang VI.3. aufgeführt; Original-Histogramme der äußeren, mittleren und inneren Zellen sind in Abb. 2 (für L-SPH) und in Abb. 3 (für SV40-3T3-SPH) im Anhang VI.4. zusammengestellt.

III.4. Markierung DNA-synthetisierender Zellen

III.4.1. Brom-desoxy-Uridin-Einbau in ML

Beim Einbau von BrdU in ML-Kulturen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase erhält man bei beiden Zelllinien eine gleichmäßige Verteilung der schwarz markierten Zellkerne über den ganzen Zellrasen. Ein Vergleich der Abbn. 13 bis 15 zeigt, daß Zellen im ML und SPH, sofern sie DNA synthetisieren, in gleichem Maße "markiert" sind.

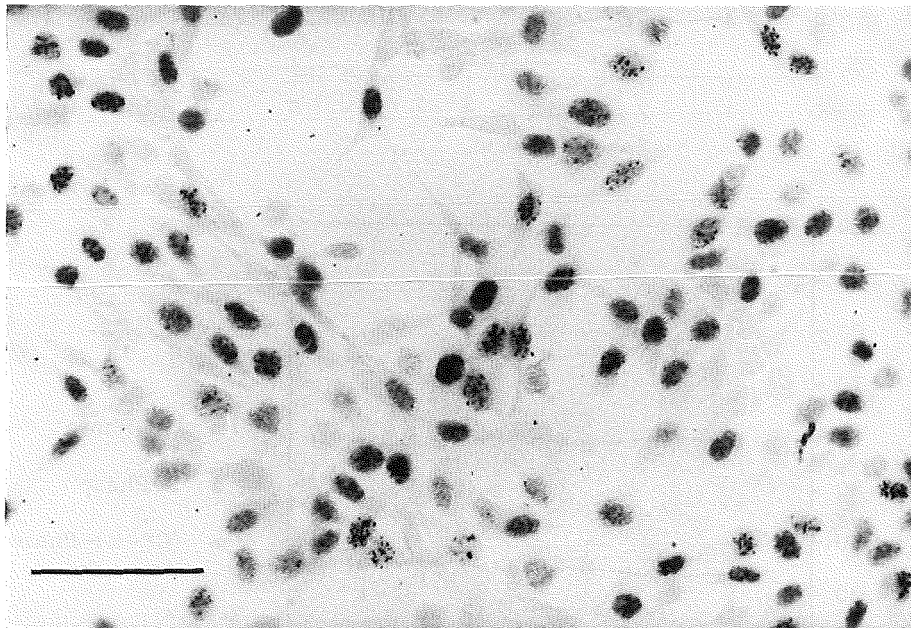


Abb. 13: Lichtmikroskopische Aufnahme von SV40-3T3-ML nach 2-stündiger Inkubation mit BrdU (Balkenlänge: 100 μm).

III.4.2. Brom-desoxy-Uridin-Einbau in SPH

Die Zellzyklusanalyse mit Hilfe der Flußcytometrie liefert nur eine Momentaufnahme der untersuchten Zellpopulation. Aus diesem Grund erlaubt beispielsweise die fehlende Radialabhängigkeit der Phasenverteilung bei den SV40-3T3-SPH (Abb. 12) nicht die Schlußfolgerung eines innerhalb dieser SPH einheitlichen Proliferationsverhaltens. So ergäbe sich eine positionsunabhängige Phasenverteilung z. B. auch unter der Annahme, daß die Dauer aller Zyklusphasen (d. h. nicht nur der G1-Phase) proportional mit der Tiefe zunimmt. Um die

se Vieldeutigkeit der flußcytometrischen Daten zu überwinden, wurde die DNA-Syntheserate in SPH anhand des BrdU-Einbaus nachgewiesen (siehe II.4.2.).

Auf Gefrierschnitten von L-Sphäroiden ist zu erkennen, daß nur die Zellen der äußersten 2-3 Zellschichten schwarz gefärbte Kerne aufweisen, während die inneren SPH-Zellen keine Markierung zeigen (Abb. 13).

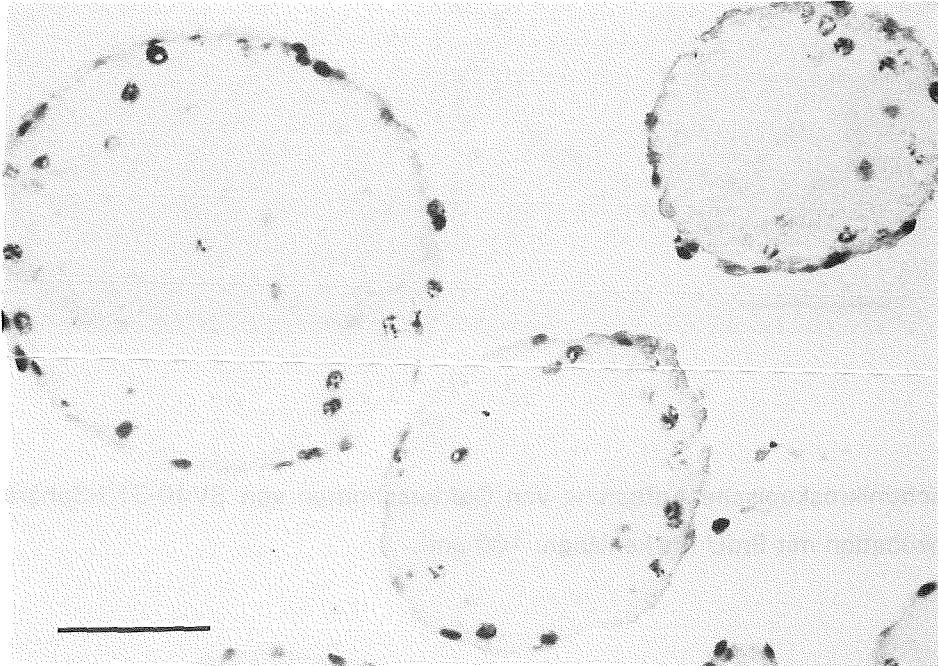


Abb. 14: Lichtmikroskopische Aufnahme von Gefrierschnitten von L-Sphäroiden nach 4-stündiger Inkubation mit BrdU (Balkenlänge: 100 μm).

Ein ähnliches Verhalten zeigen die SV40-3T3-Sphäroide. Gegenüber den L-SPH ist jedoch der äußere Ring BrdU-inkorporierender Zellen dicker, was auf die kürzere Verdopplungszeit der SV40-3T3-Zellen zurückzuführen ist. Außerdem ist die Grenze zwischen markierten und nicht-markierten Zellen bei den SV40-3T3-SPH nicht so deutlich ausgeprägt; vereinzelt sind noch punktuelle Markierungen der Zellkerne bei "halber SPH-Tiefe" zu erkennen (Abb. 14). Diese BrdU-Markierung der Zellkerne auf Gefrierschnitten von SV40-3T3-SPH zeigt, daß auch hier die DNA-Syntheserate mit der Tiefe abnimmt. Die sich hieraus und in Verbindung mit den flußcytometrischen Daten (Abb. 12) ergebenden Konsequenzen werden in Kapitel IV.6. diskutiert.

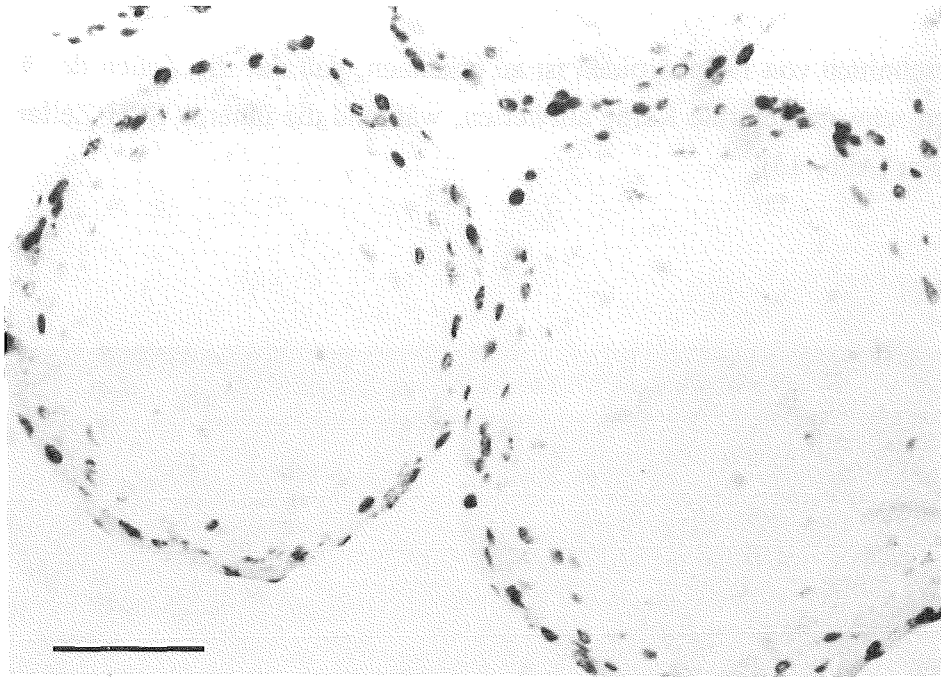


Abb. 15: Lichtmikroskopische Aufnahme von Gefrierschnitten von SV40-3T3-Sphäroiden nach 4-stündiger Inkubation mit BrdU (Balkenlänge: 100 μm).

III.5. Inhibierung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions durch Mezerein

Es liegt nahe, das in Kapitel III.3. beschriebene Fehlen einer Radialabhängigkeit der cAMP-Konzentration und der Phasenverteilung bei den SV40-3T3-SPH als Folge der interzellulären Kommunikation zwischen diesen Zellen zu deuten. Da die Gap Junctions für cAMP permeabel sind (MG: 329 Dalton; SIGMA-Produktinformation, 1991), könnte es innerhalb der SPH-Zellschichten zum Konzentrationsausgleich dieses sekundären Botenstoffes kommen, der eine Konstanz der Phasenverteilung bewirkt. Um diese einfache Hypothese zu überprüfen, wurden die SPH mit Mezerein, einem Inhibitor der interzellulären Kommunikation, behandelt und die unter III.3. durchgeführten Untersuchungen wiederholt. Zum Vergleich wurde in ML beider Zelllinien der zeitliche Verlauf der cAMP-Konzentration und der Phasenverteilung nach Mezerein-Behandlung untersucht.

III.5.1. Eigenschaften von Mezerein

Mezerein ist ein aus Pflanzen isolierter Ester von 12-Hydroxydaphnetoxin (Mufson et al., 1979). Dieses Diterpen ähnelt in seiner chemischen Struktur dem TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate), einem Phorbol-ester, der aus Krotonöl (Extrakt der Samen von *Croton tiglium*) gewonnen wird (Mufson et al., 1979; Berridge, 1985; Jeffrey und Liskamp, 1986; Castagna, 1987). Mezerein und TPA zeigen in vielen Experimenten mit Zellkulturen die gleichen morphologischen und biochemischen Effekte (Mufson et al., 1979; Iizuka et al., 1989; Miyake et al., 1989; Runyan et al., 1990), unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer Eigenschaft als Tumorpromotoren. Mezerein ist ein schwacher "second-stage" Promotor und zeigt als alleiniger Tumorpromotor kaum Wirkung (Mufson et al., 1979; Slaga et al., 1980; Slaga, 1984). TPA hingegen ist ein starker "first-stage" Promotor und kann nach Initiation mit einem chemischen Carcinogen oder Strahlung auch als alleiniger Promotor Tumoren auslösen (Slaga et al., 1980).

Eine gemeinsame Eigenschaft beider Promotoren ist die reversible Inhibierung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions. Diese wurde durch die Hemmung des passiven Transports von Farbstoffen wie Fluorescein (Fitzgerald et al., 1983) und Lucifer Yellow (Enomoto und Yamasaki, 1985; Mesnil et al., 1986; Brümmer, 1988; Budunova et al., 1989) nachgewiesen.

III.5.2. Behandlung der Zellen mit Mezerein

Die Wahl der Mezerein-Konzentration und der Inkubationszeit erfolgte in Anlehnung an die Angaben von Franz Brümmer (1988). Die ML wurden für 2 Minuten in 1 μM Mezerein bei 37 °C inkubiert. Unter diesen Bedingungen konnten weder toxische Wirkungen noch morphologische Zellveränderungen beobachtet werden. Für die Sphäroide wurde eine 5-minütige Inkubation gewählt, um eine Diffusion des Promotors ins Innere der SPH zu erlauben. Grundlage hierfür bieten Diffusionsstudien von Molekülen unterschiedlichster Größe in SPH (Nederman et al., 1981). Auch eine Exposition von bis zu 6 Stunden, die in einer Versuchsreihe angewendet wurde (siehe III.6.3.), beeinträchtigte die Vitalität der SPH-Zellen nicht. Um aber Effekte von Tumorpromotoren wie Eingriffe in die DNA- und/oder Proteinsynthese (Slaga et al., 1980) weitgehend auszuschließen, wurde außer in dem eben erwähnten Fall auf längere Inkubationszeiten verzichtet.

III.5.3. Wirkung von Mezerein auf die interzelluläre Kommunikation

Die entkoppelnde Wirkung des Mezereins wurde an kommunizierenden SV40-3T3-Zellen über den elektrischen Signaltransfer und über die Lucifer Yellow-Ausbreitung nachgewiesen. Nach 2-minütiger Inkubation war die elektrische Kopplung auf 2-3% der Kontrolle abgefallen, um nach kurzem Verweilen auf diesem Niveau nach etwa 6 Stunden wieder in den Bereich unbehandelter Zellen anzusteigen (Abb. 16).

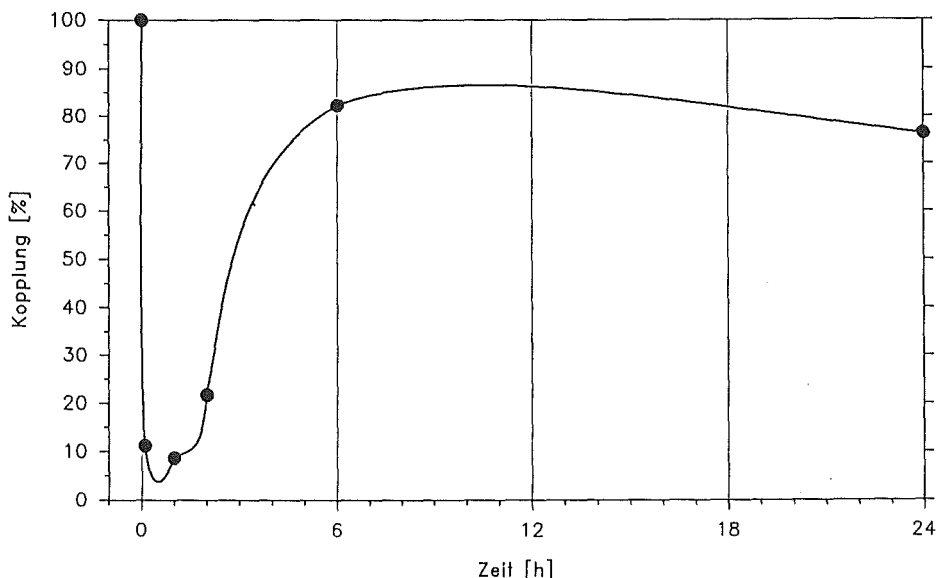


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der Inhibition der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions nach Behandlung von SV40-3T3-Zellen mit Mezerein (1 μM , 2 min). Nach 2 Minuten wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die elektrische Kopplung der Kontrolle ist auf 100% normiert.

Auch die Ausbreitung des Farbstoffes Lucifer Yellow von der injizierten Zelle zu benachbarten Zellen wurde blockiert. Fluoreszenz konnte nur in der injizierten Zelle beobachtet werden, obwohl diese von mehreren Zellen umgeben war (Abb. 17).

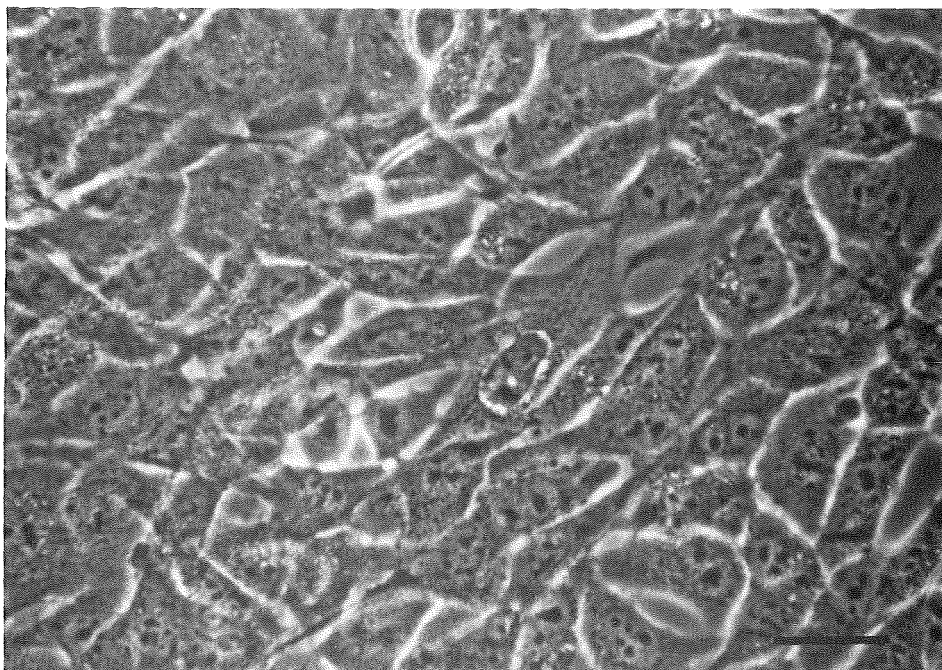
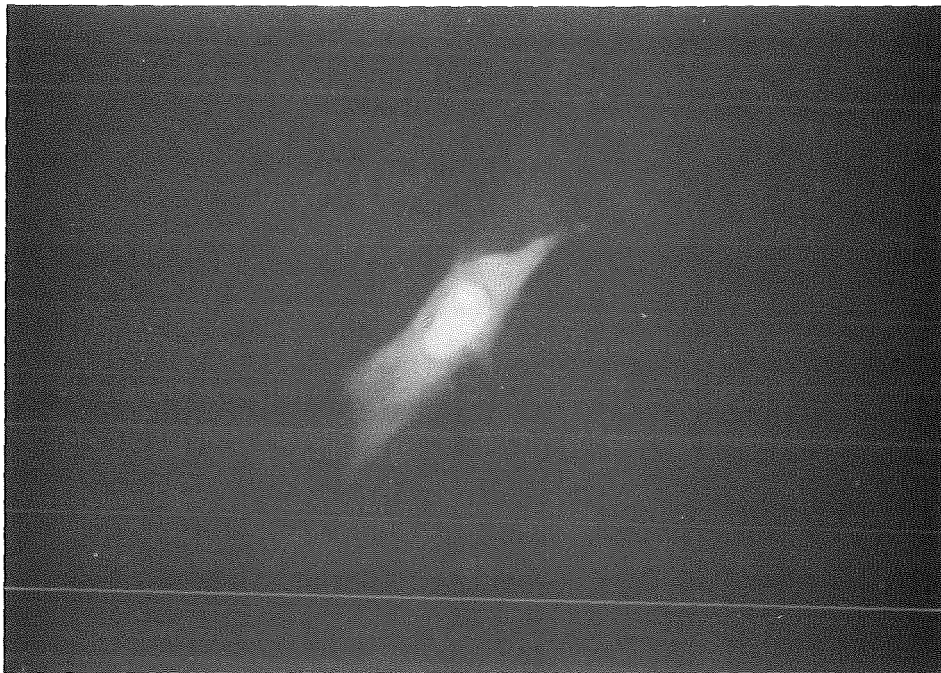


Abb. 17: Farbstoffausbreitung in SV40-3T3-Zellen nach Behandlung mit Mezerein ($1 \mu\text{M}$, 20 min): Die Zellen sind vollständig entkoppelt, wodurch der Farbstoff in keiner der angrenzenden Zellen zu beobachten ist (oben); darunter dieselben Zellen im Phasenkontrast (Balkenlänge: $30 \mu\text{m}$).

Analoge Messungen wurden auch mit den nicht-kommunizierenden L-Zellen durchgeführt. Die äußerst geringe elektrische Kopplung in unbehandelten ML-Kulturen sank nur wenig ab und die Fluoreszenzbilder nach Injektion von Lucifer Yellow entsprachen, wie erwartet, ebenfalls der Kontrolle (Abb. 18).

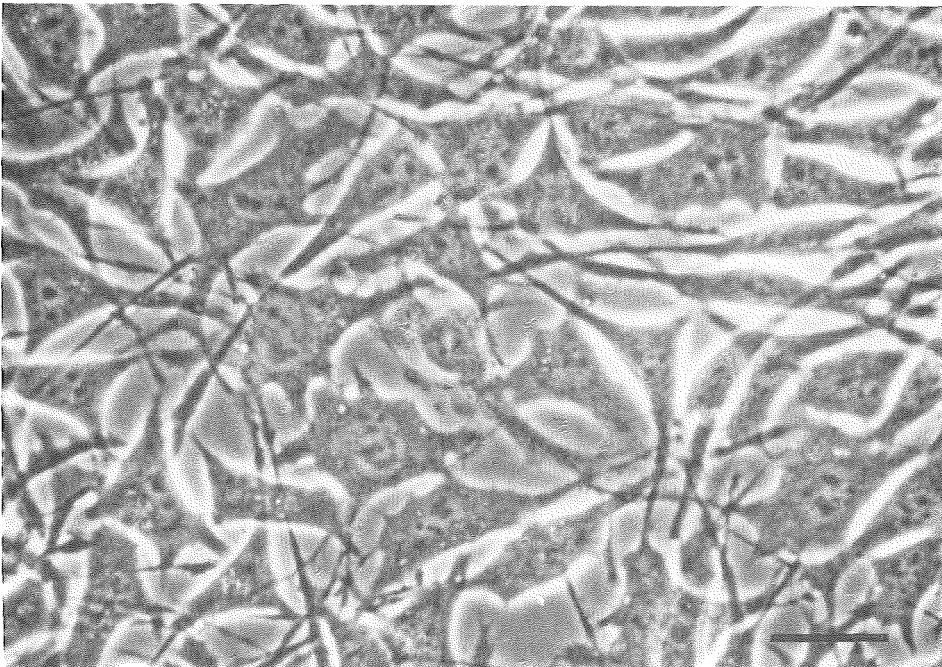


Abb. 18: Farbstoffausbreitung in L-Zellen nach Behandlung mit Mezerein ($1 \mu\text{M}$, 20 min): Hier ist, wie bei der Kontrolle, keine Ausbreitung des Fluoreszenzfarbstoffes zu beobachten (oben); darunter dieselben Zellen im Phasenkontrast (Balkenlänge: $30 \mu\text{m}$).

III.5.4. Zeitlicher Verlauf von cAMP-Gehalt und Zellzyklusphasenverteilung der Zellen im ML nach Mezerein-Behandlung

Eine der gemeinsamen biochemischen Eigenschaften der Tumorpromotoren Mezerein und der Gruppe der Phorbolster ist die Beeinflussung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (Mufson et al., 1979; Iizuka et al., 1989). Durch die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes von cAMP und Phasenverteilung an ML beider Zelllinien nach Mezerein-Behandlung sollte zunächst die Frage nach einem möglichen Einfluß der interzellulären Kommunikation bei dieser Kulturform beantwortet werden.

Das Ergebnis ist in Abb. 19 dargestellt. In SV40-3T3-ML führte eine 2-minütige Mezerein-Behandlung zu einer transienten Erhöhung des cAMP-Gehaltes. Dieser lag jedoch bereits nach 30 Minuten Inkubation in frischem Medium wieder im Bereich der Kontrolle. Ebenfalls geringe Langzeiteffekte auf das cAMP wurden bei den L-ML verzeichnet. Hier führte die Mezerein-Behandlung jedoch anfänglich zu einer Absenkung des cAMP-Gehaltes, der sich nach 4 Stunden wieder auf dem Niveau der Kontrolle stabilisierte.

Der zeitliche Verlauf der Phasenverteilung nach Mezerein-Behandlung war für beide Zelllinien ähnlich und weitgehend unabhängig vom cAMP-Verlauf (Abb. 19). Nach einer leichten kurzzeitigen Erhöhung der S-Zellen kommt es nach 2 Stunden in frischem Medium zu einer Reduktion des S-Anteils; der Prozentsatz von (G₂+M)-Zellen steigt bereits ab 30 Minuten nach Behandlung kontinuierlich an. Nach 24 Stunden Inkubation in frischem Medium (nicht dargestellt, Daten siehe Tab. 7 im Anhang VI.3.) ist die Reaktion des Zellzyklus auf das Mezerein weitgehend abgeklungen; die Phasenverteilungen nähern sich wieder den Werten der mitgeführten Kontrolle.

Aus früheren Untersuchungen in dieser Arbeitsgruppe war bekannt, daß ein reiner Mediumwechsel kaum einen Effekt auf die Phasenverteilung des Zellzyklus hat (Hiller, 1988), wodurch sichergestellt ist, daß es sich bei den beobachteten Reaktionen im Zyklusverhalten um eine Reaktion der Zellen auf die Mezereineinwirkung handelt, nicht nur um eine Reaktion auf die Zugabe frischen Mediums.

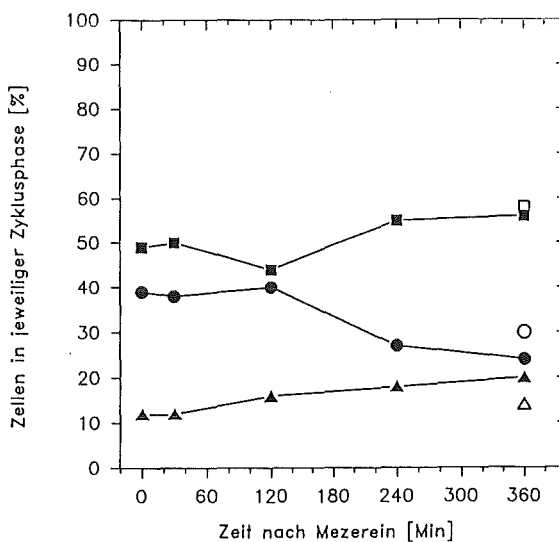
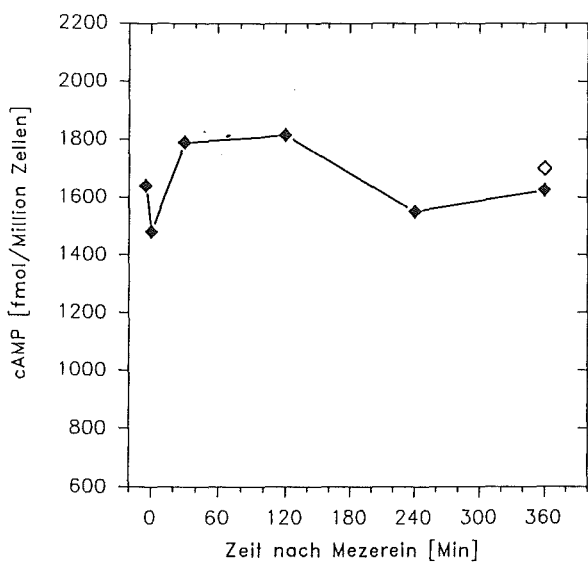
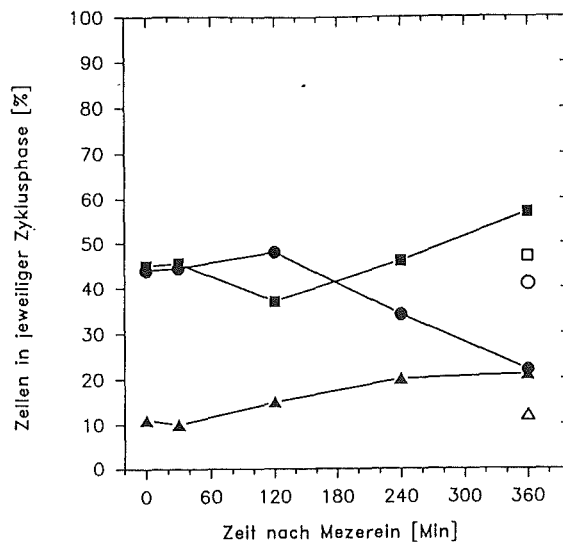
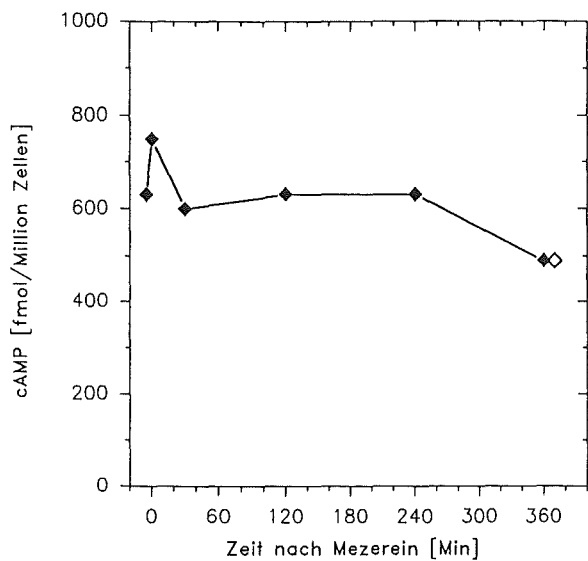


Abb. 19: Behandlung von Monolayer-Zellen mit Mezerein ($1 \mu\text{M}$, 2 min) und anschließende Kultivierung in frischem Medium: Zeitlicher Verlauf von cAMP-Gehalt (links) und Zellzyklusverteilung (rechts) in SV40-3T3-Zellen (oben; 1×10^5 Zellen/ cm^2) und L-Zellen (unten; 6×10^4 Zellen/ cm^2). Behandelte Zellen werden durch ausgefüllte Symbole dargestellt, offene Symbole repräsentieren die Werte der mitgeführten Kontrolle nach 6 Stunden: \blacklozenge cAMP-Gehalt, \blacksquare G1-Phase, \bullet S-Phase, \blacktriangle (G2 + M)-Phase. Die Zahlenwerte hierzu sind in der Tab. 7 im Anhang VI.3. aufgeführt.

III.5.5. Zeitlicher Verlauf von cAMP-Gehalt und Zellzyklusphasenverteilung der Zellen im SPH nach Mezerein-Behandlung

III.5.5.1. L-Sphäroide (5 min Mezerein)

In Mezerein-behandelten L-SPH wurde, wie im Monolayer (siehe Abb. 19), eine sofortige Absenkung des intrazellulären cAMP-Gehaltes in den Zellen aller SPH-Schichten beobachtet; der radiale cAMP-Gradient unbehandelter SPH bleibt somit erhalten (Abb. 20). Nach 6 Stunden Inkubation in frischem Medium hatte sich der cAMP-Gehalt aller Sphäroidzellen bereits wieder erhöht, die Kontrollwerte waren jedoch noch nicht erreicht (Abb. 20).

Auch die Radialabhängigkeit der Phasenverteilung änderte sich nach Mezerein-Behandlung nicht grundlegend. Es ist im wesentlichen eine Verringerung des S-Phaseanteils bei gleichzeitiger Erhöhung des (G2+M)-Anteils zu verzeichnen (Abb. 21).

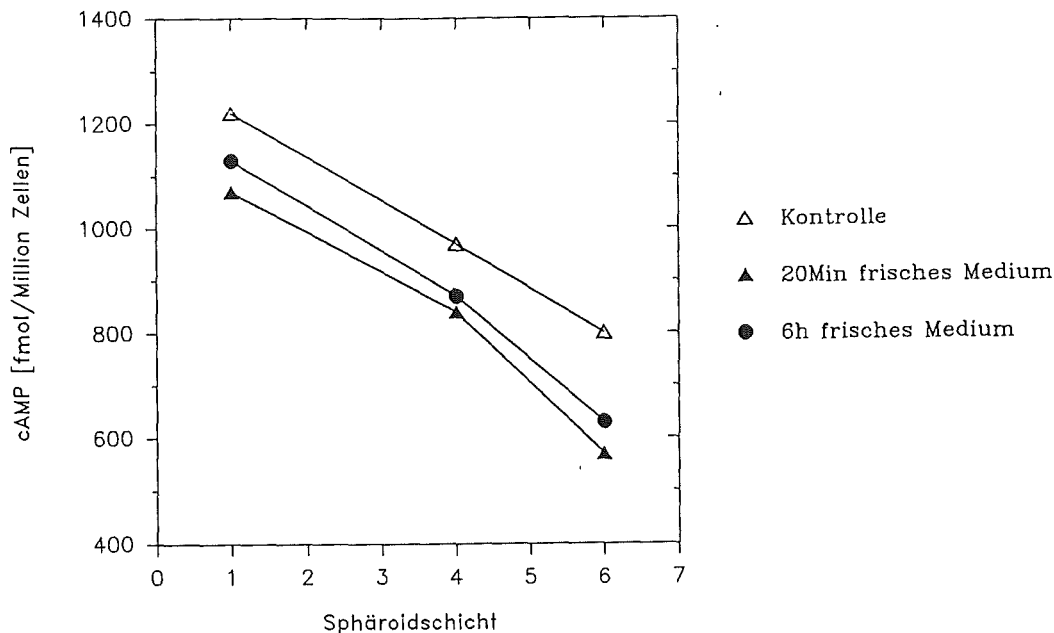
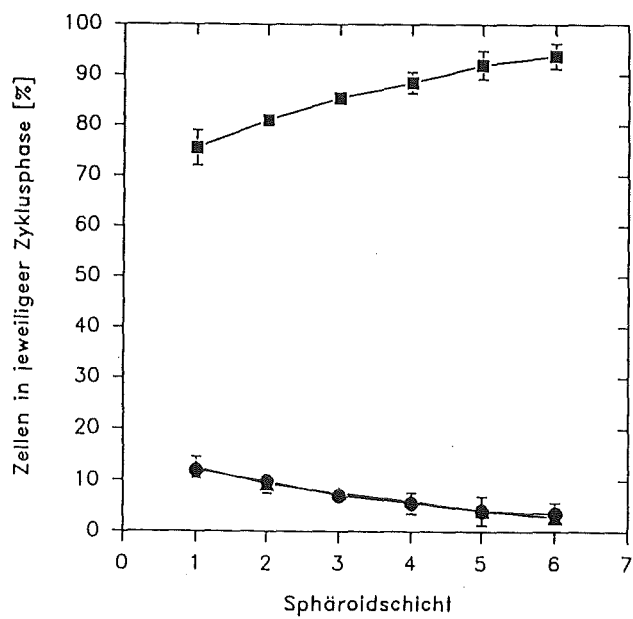
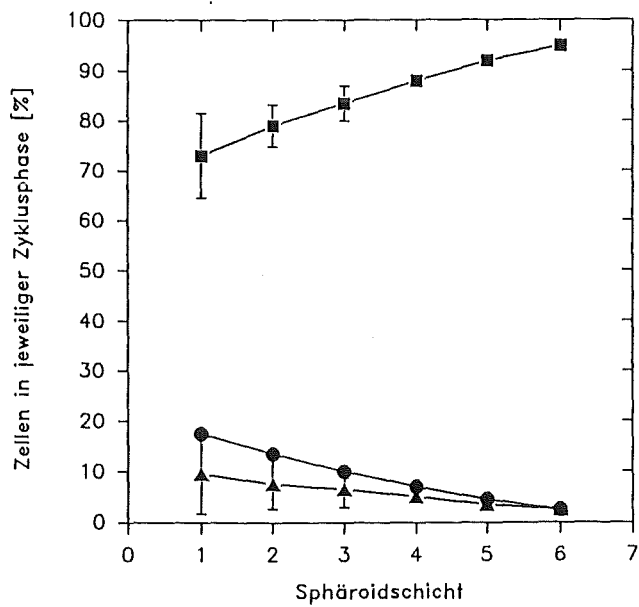
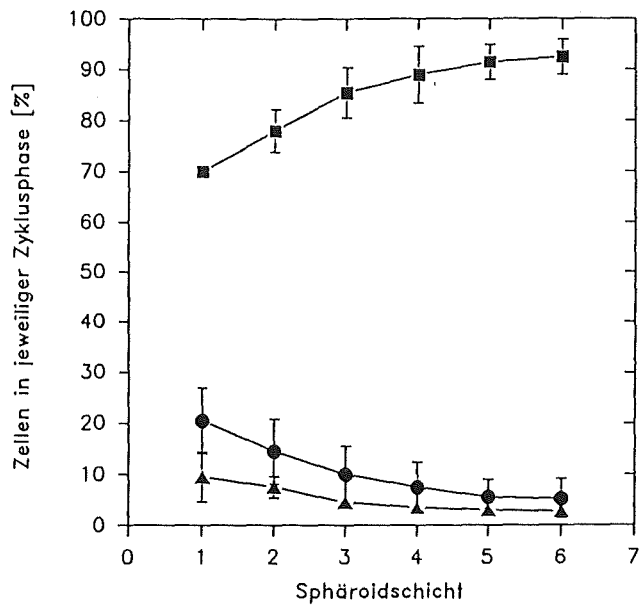


Abb. 20: Behandlung von L-Sphäroiden mit Mezerein ($1 \mu\text{M}$, 5 min): cAMP-Gehalt der Zellen mit zunehmender Tiefe im SPH nach unterschiedlichen Zeiten in frischem Medium. SPH-Schicht 1 = äußere Zellen, SPH-Schicht 6 = innere Zellen. Daten siehe Tab. 8a im Anhang VI.3.

Abb. 21 (nächste Seite): Behandlung von L-Sphäroiden mit Mezerein ($1 \mu\text{M}$, 5 min): Zellzyklusverteilung mit zunehmender Tiefe im SPH nach unterschiedlichen Zeiten in frischem Medium (Mitte: 2 Stunden; unten: 6 Stunden). Zum Vergleich das Zellzyklusverhalten unbehandelter Sphäroide (oben). Aufgetragen sind die Mittelwerte zweier Experimente \pm Standardabweichung. Ist diese nicht angegeben, so liegt sie innerhalb der Symbolgröße. SPH-Schicht 1 = äußere Zellen, SPH-Schicht 6 = innere Zellen. Daten siehe Tab. 8b im Anhang VI.3.



III.5.5.2. SV40-3T3-Sphäroide (5 min Mezerein)

Die Mezereinbehandlung der kommunizierenden SV40-3T3-Zellen im Sphäroidverband zeigte, im Gegensatz zum ML (siehe Abb. 19), keine Sofortwirkung auf den cAMP-Gehalt. Eine Veränderung wurde erst ca. zwei Stunden nach Entfernung des Entkopplers deutlich (Abb. 22). Der cAMP-Gehalt der Zellen war deutlich erhöht, wobei sich ein von außen nach innen fallender Gradient ausbildet. Nach 18 Stunden in frischem Medium war dieser bereits wieder abgeschwächt und der cAMP-Gehalt näherte sich insgesamt wieder dem Wert un behandelter Zellen. Bei den innersten SPH-Zellen wurde nach Mezerein-Behandlung durchweg ein höherer cAMP-Wert gemessen als in der davorliegenden Zellschicht (Abb. 22). SV40-3T3-Sphäroide bildeten 2 Stunden nach Mezereinbehandlung auch bezüglich der Zellzyklusverteilung einen den L-SPH (Abb. 21) ähnlichen radialen Gradienten aus (Abb. 23). Dieser baute sich bei längerer Inkubation in frischem Medium wieder ab. Nach 18 Stunden entsprach das Proliferationsmuster wieder der Kontrolle (Abb. 23).

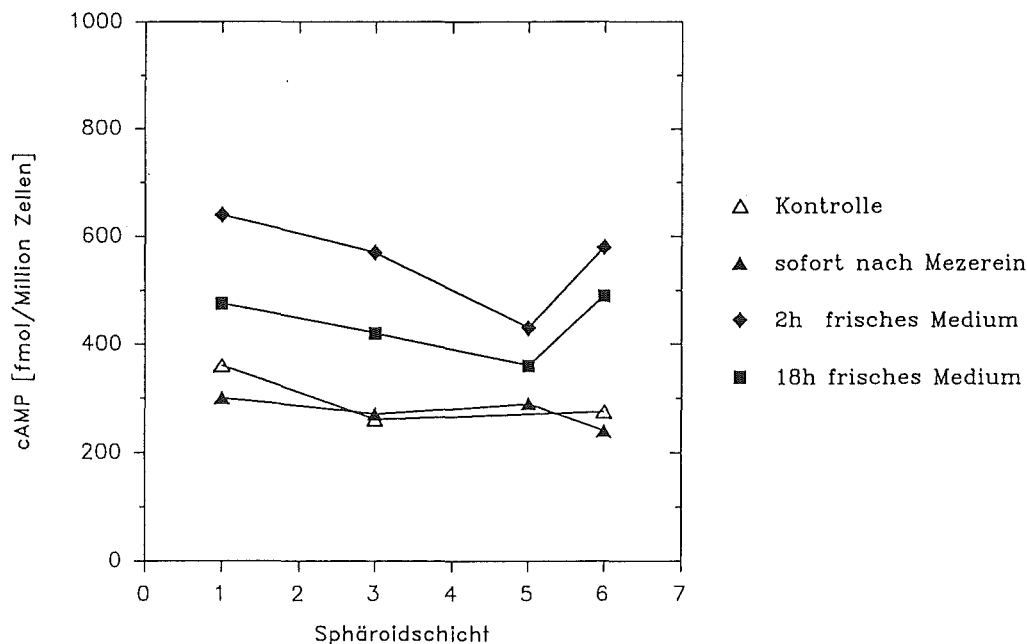
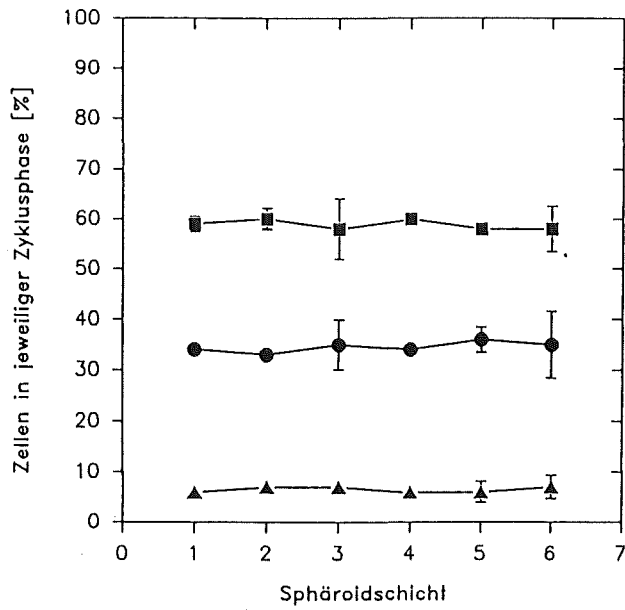


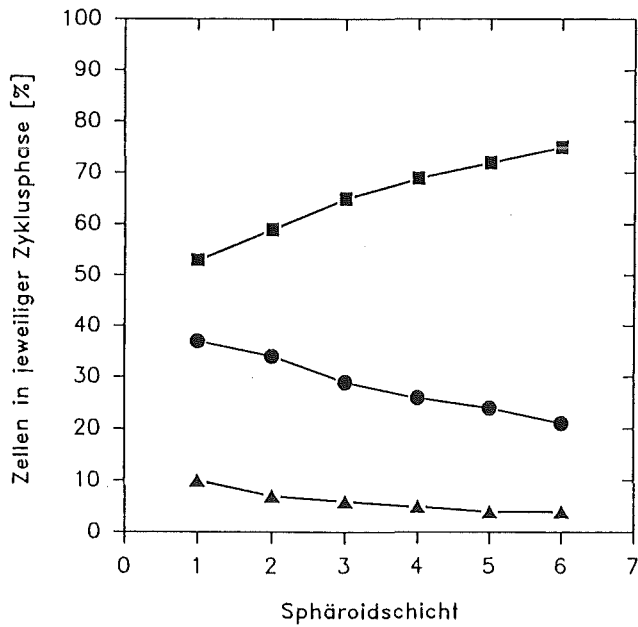
Abb. 22: Behandlung von SV40-3T3-Sphäroiden mit Mezerein ($1 \mu\text{M}$, 5 min): cAMP-Gehalt der Zellen mit zunehmender Tiefe im SPH nach unterschiedlichen Zeiten in frischem Medium. SPH-Schicht 1 = äußere Zellen, SPH-Schicht 6 = innere Zellen. Daten siehe Tab. 9a im Anhang VI.3.

Abb. 23 (nächste Seite): Behandlung von SV40-3T3-Sphäroiden mit Mezerein ($1 \mu\text{M}$, 5 min): Zellzyklusverteilung mit zunehmender Tiefe im SPH nach unterschiedlichen Zeiten in frischem Medium (Mitte: 2 Stunden; unten: 18 Stunden). Zum Vergleich das Zellzyklusverhalten un behandelter Sphäroide (oben). SPH-Schicht 1 = äußere Zellen, SPH-Schicht 6 = innere Zellen. Daten siehe Tab. 9b im Anhang VI.3.



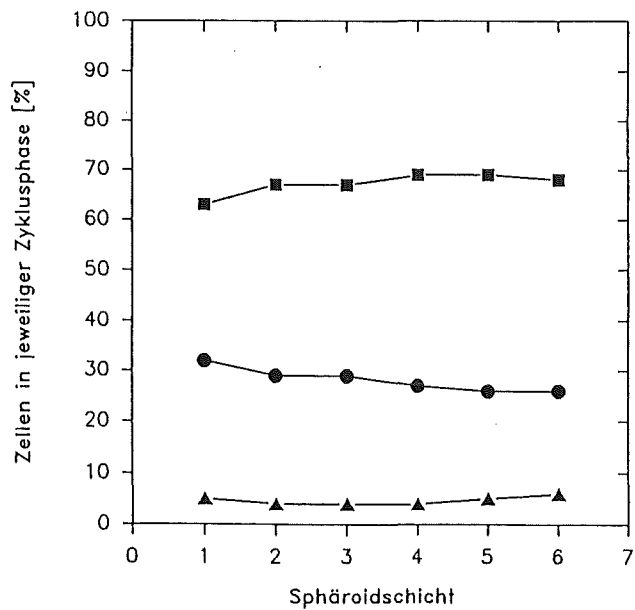
Kontrolle

- G1-Phase
- S-Phase
- ▲ (G2+M)-Phase



2h frisches Medium

- G1-Phase
- S-Phase
- ▲ (G2+M)-Phase



18h frisches Medium

- G1-Phase
- S-Phase
- ▲ (G2+M)-Phase

III.5.5.3. SV40-3T3-Sphäroide (6 h Mezerein)

Um die Ausbildung eines radialen Gradienten des cAMP-Gehaltes und der Phasenverteilung unter Bedingungen einer länger andauernden Kommunikationshemmung zu untersuchen, wurde die Mezerein-Behandlung auf maximal 6 Stunden ausgedehnt. Hierbei zeigten sich bezüglich des cAMP-Gradienten, außer einer längeren "Standzeit" und einer deutlicheren Ausprägung (Abb. 24), keine prinzipiellen Änderungen gegenüber einer Kurzzeit-Exposition mit anschließender Inkubation in frischem Medium (vgl. Abb. 22).

Ähnliches galt für den sich ausbildenden Gradienten der Phasenverteilung (Abb. 25). Eine Abweichung gegenüber der Kurzzeit-Exposition (vgl. Abb. 23) war im Verhalten der inneren SPH-Zellen zu erkennen, die eine Phasenverteilung vergleichbar derjenigen weiter außen liegender Zellschichten aufweisen. Die Bedeutung dieses Effektes, der auch für den cAMP-Gehalt zu beobachten ist (vgl. auch Abb. 22 und 24), ist unklar. Er wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

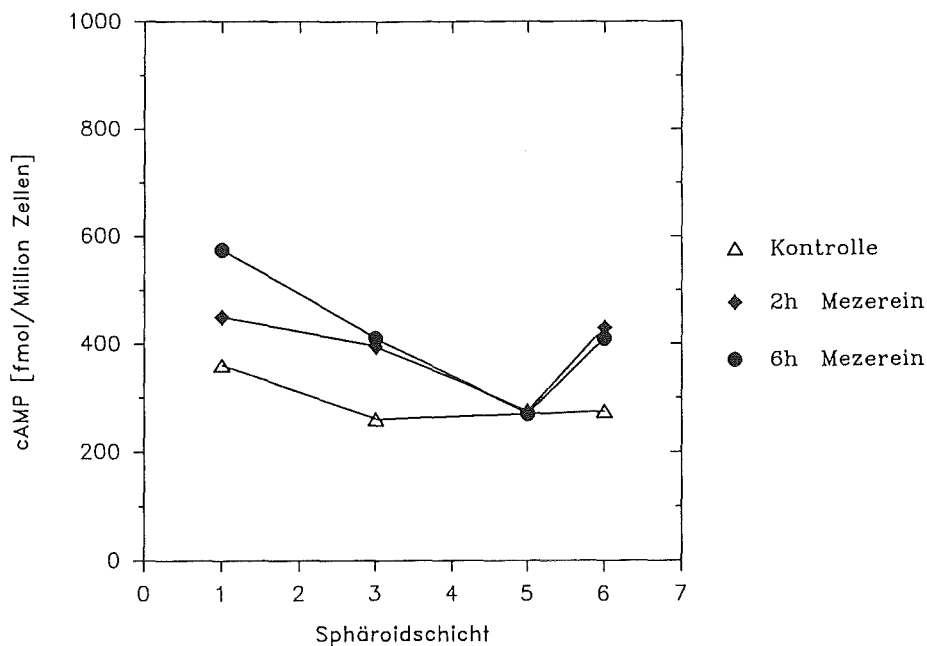
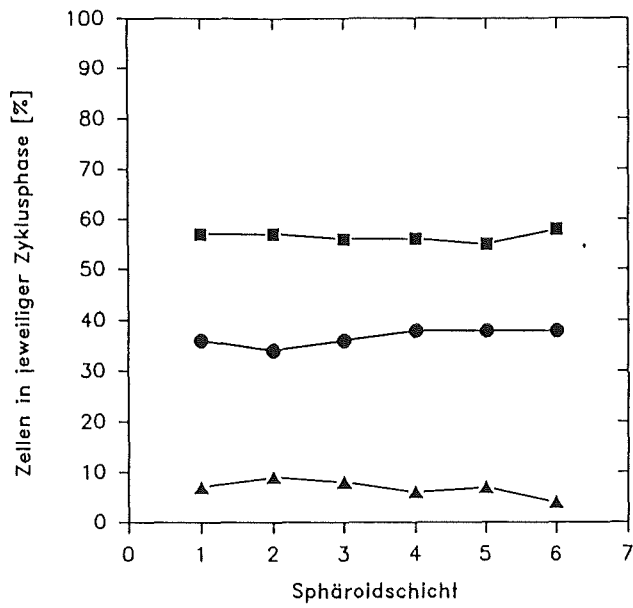


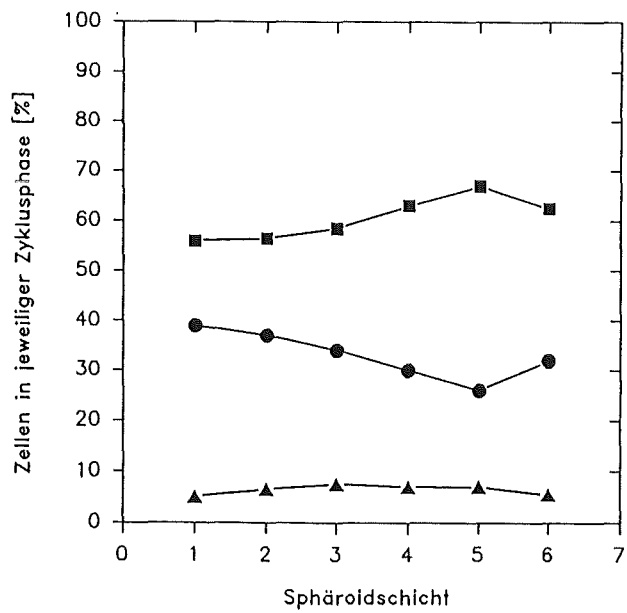
Abb. 24: Behandlung von SV40-3T3-Sphäroiden mit Mezerein ($1 \mu\text{M}$): cAMP-Gehalt der Zellen mit zunehmender Tiefe im SPH nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. SPH-Schicht 1 = äußere Zellen, SPH-Schicht 6 = innere Zellen. Daten siehe Tab. 10a im Anhang VI.3.

Abb. 25 (nächste Seite): Behandlung von SV40-3T3-Sphäroiden mit Mezerein ($1 \mu\text{M}$): Zellzyklusverteilung mit zunehmender Tiefe im SPH nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (Mitte: 2 Stunden; unten: 6 Stunden). Zum Vergleich das Zellzyklusverhalten un behandelter Sphäroide (oben). SPH-Schicht 1 = äußere Zellen, SPH-Schicht 6 = innere Zellen. Daten siehe Tab.10b im Anhang VI.3.



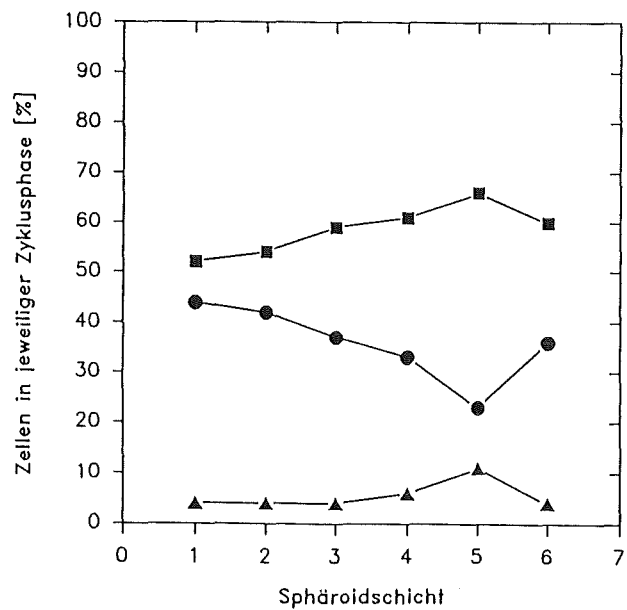
Kontrolle

- G1-Phase
- S-Phase
- ▲ (G2+M)-Phase



2h Mezerein

- G1-Phase
- S-Phase
- ▲ (G2+M)-Phase



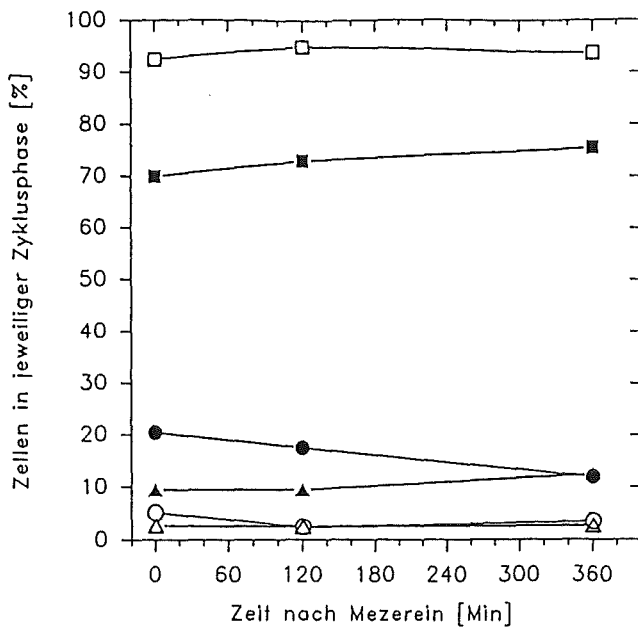
6h Mezerein

- G1-Phase
- S-Phase
- ▲ (G2+M)-Phase

Beim Vergleich des Zyklusverhaltens der äußeren mit den inneren Zellen in SV40-3T3- und L-SPH nach Mezerein zeigt sich die unterschiedliche Reaktion gekoppelter und ungekoppelter SPH-Zellen deutlich (Abb. 26): bei L-SPH "paralleler Verlauf", bei SV40-3T3-SPH "divergierendes Bild", besonders ausgeprägt beim 6 h-Versuch. Dieses abweichende Verhalten der SV40-3T3-SPH-Zellen läßt einen unterschiedlichen "Differenzierungszustand" der Zellpopulation als Erklärung möglich erscheinen.

Zusammenfassend lassen sich aus den Ergebnissen der Behandlung von SPH mit dem Kommunikationsinhibitor Mezerein folgende Schlüsse ziehen: In den kommunizierenden SV40-3T3-SPH kommt es bei Kopplungshemmung zur Ausbildung eines radial fallenden Gradienten des zellulären cAMP-Gehaltes von außen nach innen (Abb. 22 und 24). Ebenso stellt sich ein Gradient bezüglich der Phasenverteilung ein (Abb. 23 und 25). Die Form dieser Gradienten entspricht qualitativ denjenigen unbehandelter L-SPH (Abb. 11 und 12). Diese Veränderungen sind vereinbar mit der Hypothese, daß das Fehlen einer Radialabhängigkeit dieser Größen in unbehandelten SV40-3T3-SPH durch einen Ausgleich der cAMP-Konzentration zwischen Zellen in verschiedener Tiefe im SPH über Gap Junctions zustande kommt. Werden die Gap Junction Kanäle durch Mezerein geschlossen, zeigen die SV40-3T3-SPH das radiale cAMP- und Phasenprofil der kommunikationslosen L-SPH. Letztere werden in ihren Radialprofilen nach Mezerein-Behandlung nur unwesentlich beeinflußt. Auf die Folgerungen bezüglich des Zusammenhanges zwischen cAMP und Proliferation in SPH wird in der Diskussion (Kapitel IV.) eingegangen.

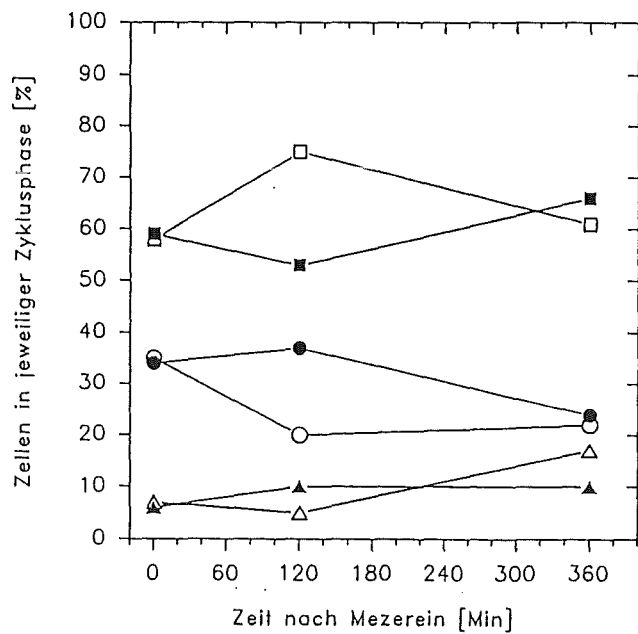
Abb. 26 (nächste Seite): Behandlung gekoppelter und nicht-gekoppelter Zellen im SPH-Verband mit Mezerein (1 μ M): Zeitlicher Verlauf der Zellzyklusverteilung der äußeren und inneren Zellen in den SPH. L-Sphäroide (oben) und SV40-3T3-Sphäroide (Mitte) nach 5 min Mezerein und anschließender Inkubation in frischem Medium. Das Verhalten der Zellen in SV40-3T3-SPH bei einer Dauerbehandlung mit Mezerein ist in der unteren Grafik dargestellt.



L-SPH / 5min Mezerein

- G1-Phase
- S-Phase
- ▲ (G2+M)-Phase

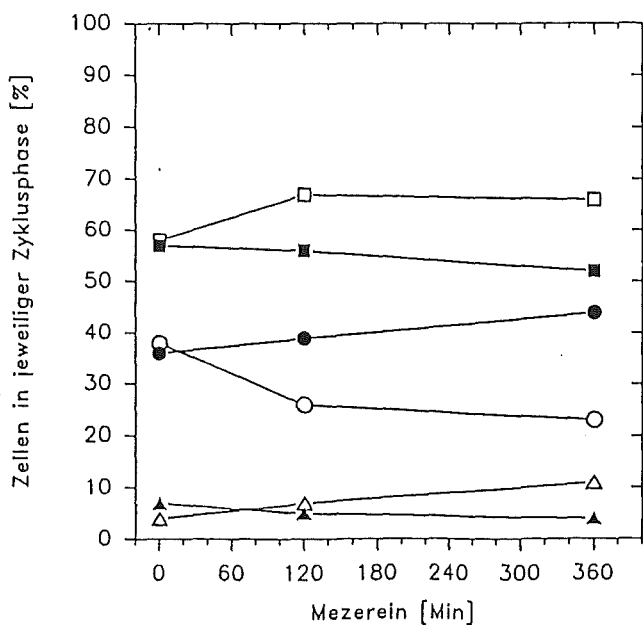
- äußere Zellen
- innere Zellen



SV40-3T3-SPH / 5min Mezerein

- G1-Phase
- S-Phase
- ▲ (G2+M)-Phase

- äußere Zellen
- innere Zellen



SV40-3T3-SPH / bis 6h Mezerein

- G1-Phase
- S-Phase
- ▲ (G2+M)-Phase

- äußere Zellen
- innere Zellen

III.6. Wirkung des cAMP-Analogons db-cAMP auf die interzelluläre Kommunikation, den cAMP-Gehalt und den Zellzyklus

Zur weiteren Prüfung der Vorstellung, ob ein cAMP-Ausgleich in SV40-3T3-SPH ausreichend für die Proliferationskontrolle in diesen Zellaggregaten ist, wurde ein cAMP-Analogon im Überschuß für längere Zeit angeboten, sodaß prinzipiell überall die gleiche cAMP-Konzentration möglich wurde. Nach Behandlung der Zellen mit db-cAMP wurden die unter III.3. durchgeführten Untersuchungen wiederholt und mit den entsprechenden ML-Daten verglichen.

III.6.1. Eigenschaften von db-cAMP

Das cAMP-Derivat Dibutyryl-cAMP (db-cAMP; Posternak et al., 1962; Posternak und Cehovic, 1971) wird von den Zellen passiv aufgenommen (Saez et al., 1986; Vairo et al., 1990). Es zeigt eine verbesserte Membranpermeabilität gegenüber dem unmodifizierten cyclischen AMP (Johnson und Pastan, 1972; Korth und Engels, 1987) und wird in der Zelle zunächst zu Monobutyryl-cAMP (mb-cAMP) und schließlich zu cAMP deacyliert. Das in die Zelle eingebrachte lipophile cAMP-Derivat muß durch vorhandene Esterasen erst gespalten werden, um als second messenger in der Zelle wirken zu können (Ryan und Heidrick, 1968). Sowohl db-cAMP als auch mb-cAMP wirken als Phosphodiesterase-Inhibitoren (Johnson und Pastan, 1972; Sletholt et al., 1987) und können durch dieses Enzym nicht hydrolysiert werden (Corbin et al., 1986; Korth und Engels, 1987; Beebe et al., 1988). Es gibt Hinweise dafür, daß L-Zellen keine Esterasen besitzen, die db-cAMP deacylieren können (Ryan und Heidrick, 1968), wodurch die Phosphodiesterase in diesen Zellen stark gehemmt würde.

III.6.2. Behandlung der Zellen mit db-cAMP

Für die Untersuchungen wurde sowohl eine Kurzzeit (10 Minuten)- als auch eine Langzeitbehandlung (18 Stunden) der Zellen durchgeführt. Die eingesetzte db-cAMP-Konzentration von 0,5 mM wurde in Anlehnung an Literaturangaben gewählt (Kram et al., 1973; Friedmann et al., 1976; Rozengurt, 1982; Jungmann et al., 1983; Gainer und Murray, 1986; Saez et al., 1986; Oktar et al., 1987; Sletholt et al., 1987).

III.6.3. Wirkung von db-cAMP auf die interzelluläre Kommunikation

Nach einer Inkubation von 30-60 Minuten in db-cAMP war ein erhöhter Farbstofftransfer in SV40-3T3-Zellen zu beobachten. Nahezu alle direkten Nachbarn der mit Lucifer Yellow injizierten Zelle zeigten eine deutliche Fluoreszenz und sogar in Nachbarn 2. Ordnung (übernächste Nachbarn) war der Farbstoff zu erkennen (Abb. 27). In L-Zellen war nach einer einstündigen Behandlung mit db-cAMP keine Farbstoffkopplung zu beobachten.

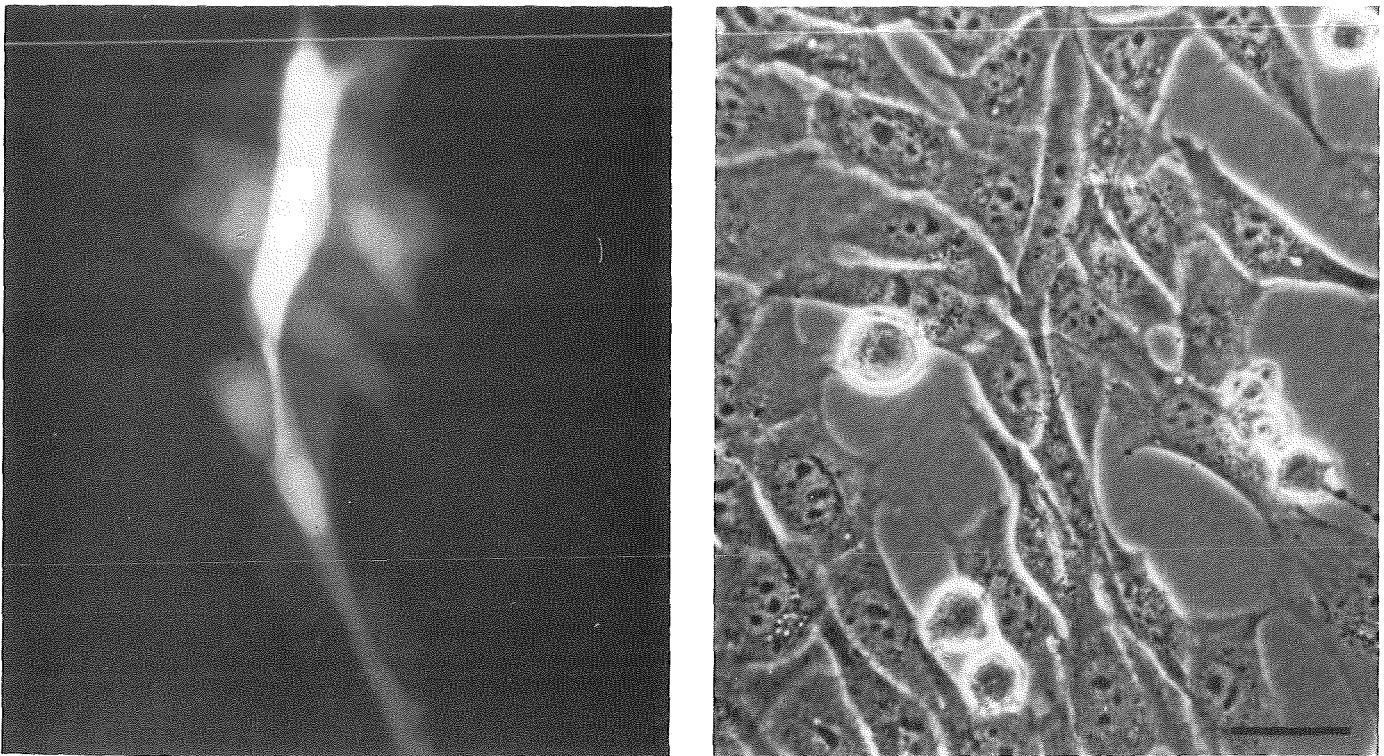


Abb. 27: Farbstoffausbreitung in SV40-3T3-Zellen nach Behandlung mit db-cAMP (0,5 mM; 50 min): In nahezu allen direkten Nachbarzellen und vielen Nachbarzellen 2. Ordnung ist der Farbstoff zu sehen (links); daneben die Zellen im Phasenkontrast (Balkenlänge: 30 μ m). Zum Vergleich (Farbstoffausbreitung in unbehandelten SV40-3T3-Zellen) siehe Abb. 5 in III.1.

III.6.4. Wirkung von db-cAMP auf den cAMP-Gehalt und den Zellzyklus im ML

III.6.4.1. Kurzzeitbehandlung (10 min) mit db-cAMP

Monolayer beider Zelllinien reagierten bezüglich des cAMP-Gehaltes unterschiedlich auf die Behandlung. Während sich bei L-Zellen der intrazelluläre cAMP-Gehalt kurzfristig stark erhöhte (200% der Kontrolle; Abb. 28, Tab. 11a im Anhang 3), war bei SV40-3T3-Zellen eine Abnahme zu beobachten (45% der Kontrolle; Abb. 28, Tab. 11b im Anhang 3). Bei beiden Zelllinien bewegte sich der cAMP-Gehalt nach spätestens 6 Stunden in frischem Medium wieder auf dem Ausgangsniveau.

Demgegenüber änderte sich die Zellzyklusverteilung beider Zelllinien innerhalb von 6 Stunden nicht (Abb. 28, nächste Seite; Tab. 11 im Anhang VI.3.).

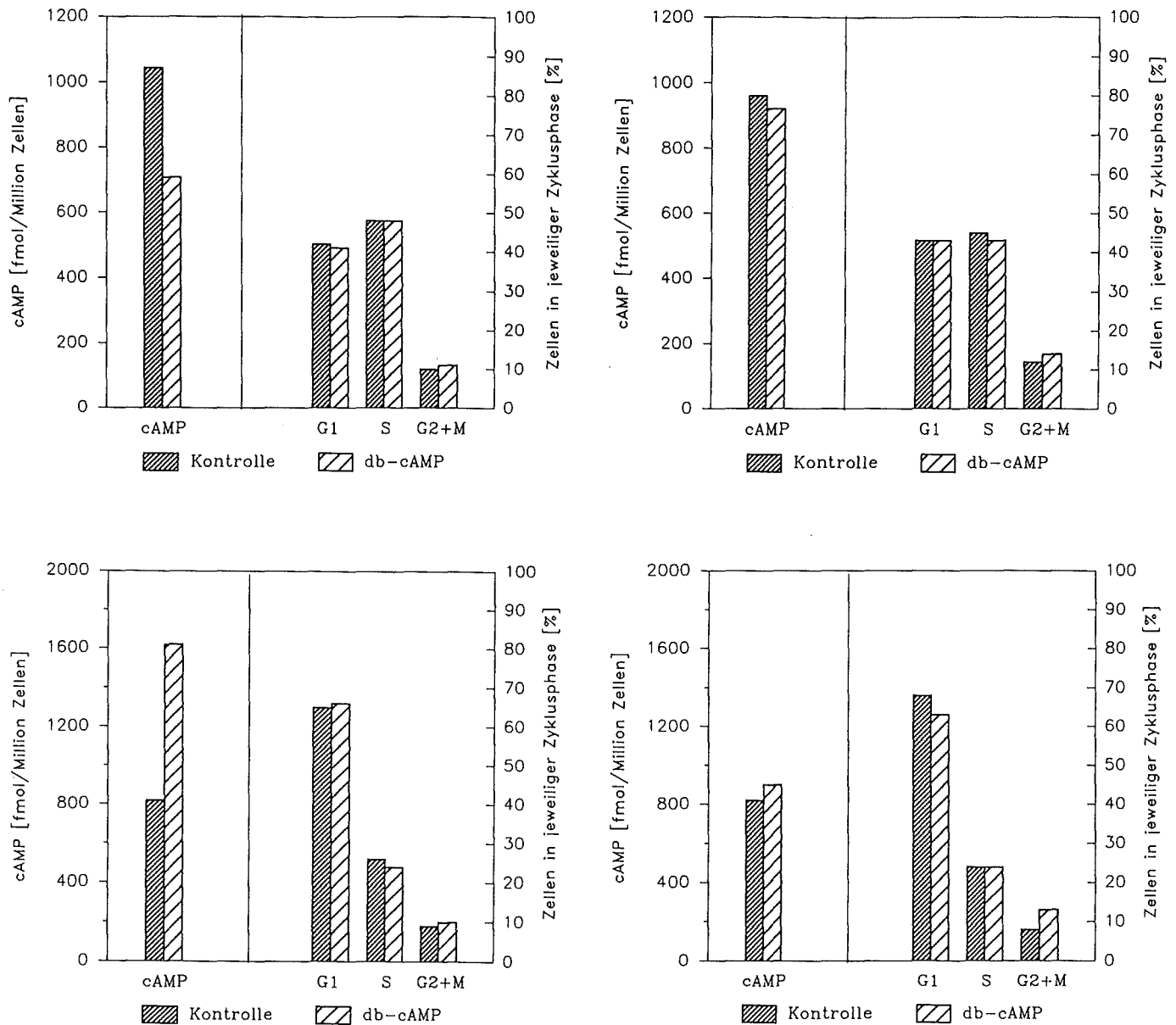


Abb. 28: Behandlung von ML-Zellen mit db-cAMP (0,5 mM, 10 min) und anschließende Kultivierung in frischem Medium. cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung in SV40-3T3-Zellen (oben) und L-Zellen (unten) sofort nach der db-cAMP-Behandlung (links) und nach 6-stündiger Kultivierung in frischem Medium (rechts). Die Zahlenwerte hierzu sind in der Tab. 11 im Anhang VI.3. aufgeführt.

III.6.4.2. Langzeitbehandlung (18 Stunden) mit db-cAMP

Bei längerer Inkubation mit db-cAMP nahm der cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Zellen geringfügig ab, während er sich in L-Zellen nahezu verdoppelte (Abb. 29; Tab. 12 im Anhang VI.3.).

Bezüglich der Phasenverteilung im Zellzyklus war bei SV40-3T3-Zellen keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrolle zu erkennen (Abb. 29; Tab. 12 im Anhang VI.3.), während bei L-Zellen eine Abnahme von S-Zellen zugunsten einer Verdopplung des (G2+M)-Anteils zu erkennen war (G2-Block; Abb. 29).

Eine signifikante Wirkung einer Langzeitbehandlung war somit auf ML-Ebene nur bei den kommunikationslosen L-Zellen zu erkennen.

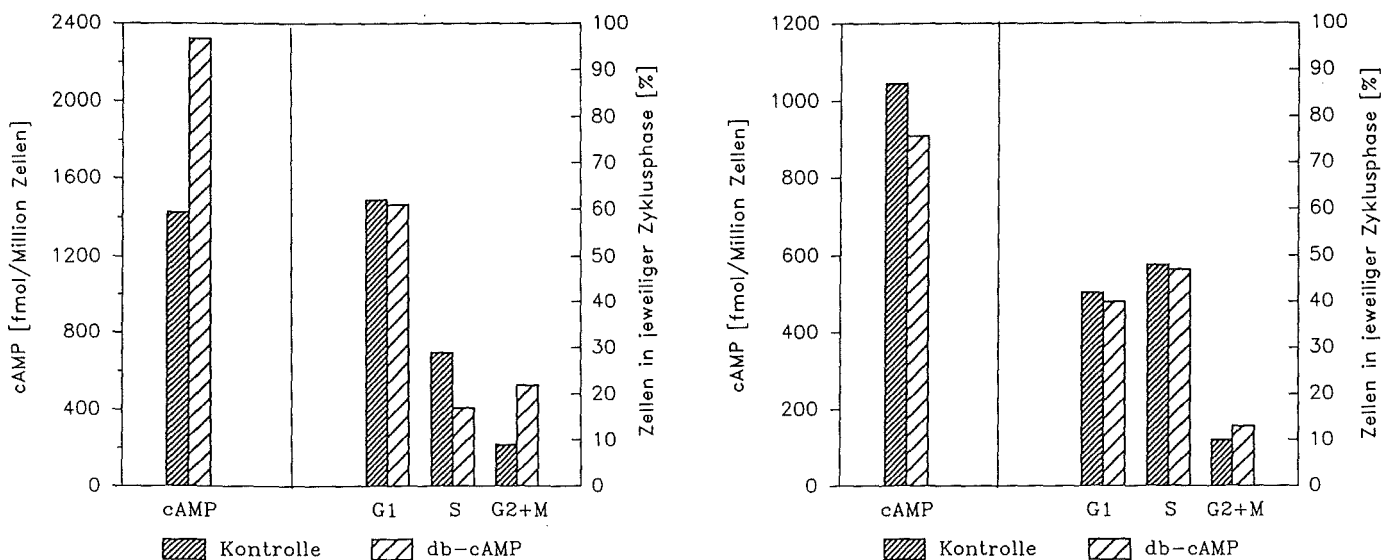


Abb. 29: ML-Zellen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase nach Behandlung mit db-cAMP (0,5 mM, 18 Stunden). cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung von L-Zellen (links) und SV40-3T3-Zellen (rechts). Hierzu sind Original-Histogramme der L-Zellen in Abb. 4 im Anhang VI.4. zusammengestellt. Die Zahlenwerte zu den Grafiken sind in der Tab. 12 im Anhang VI.3. aufgeführt.

III.6.5. Wirkung von db-cAMP auf den cAMP-Gehalt und den Zellzyklus in SPH

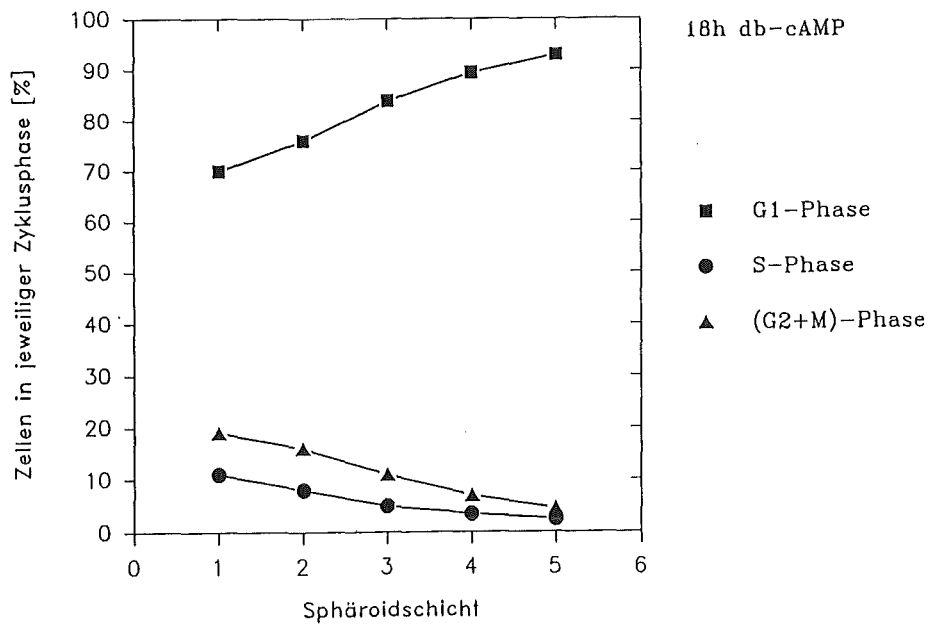
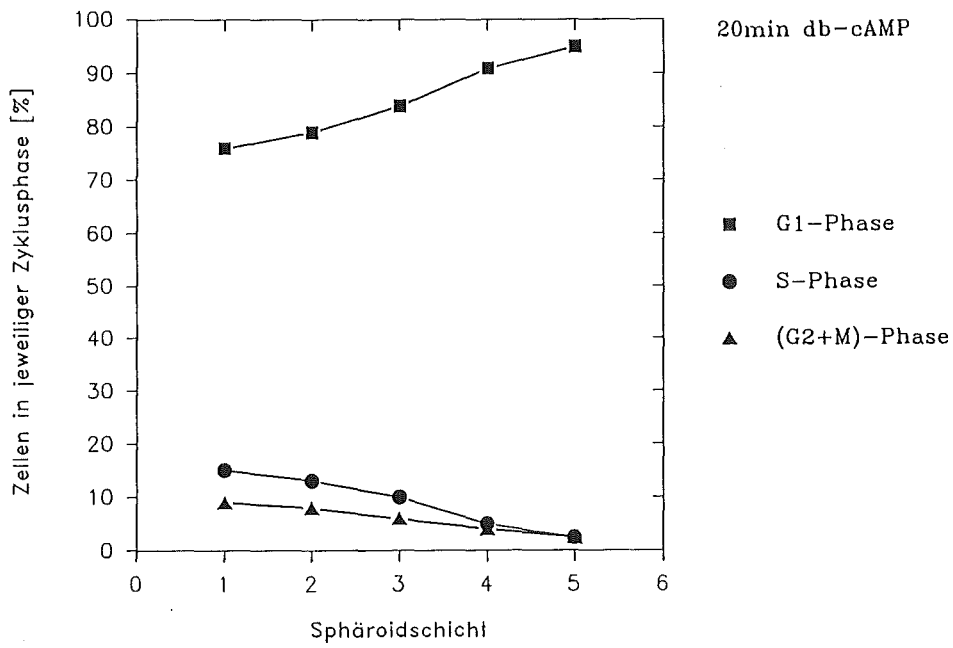
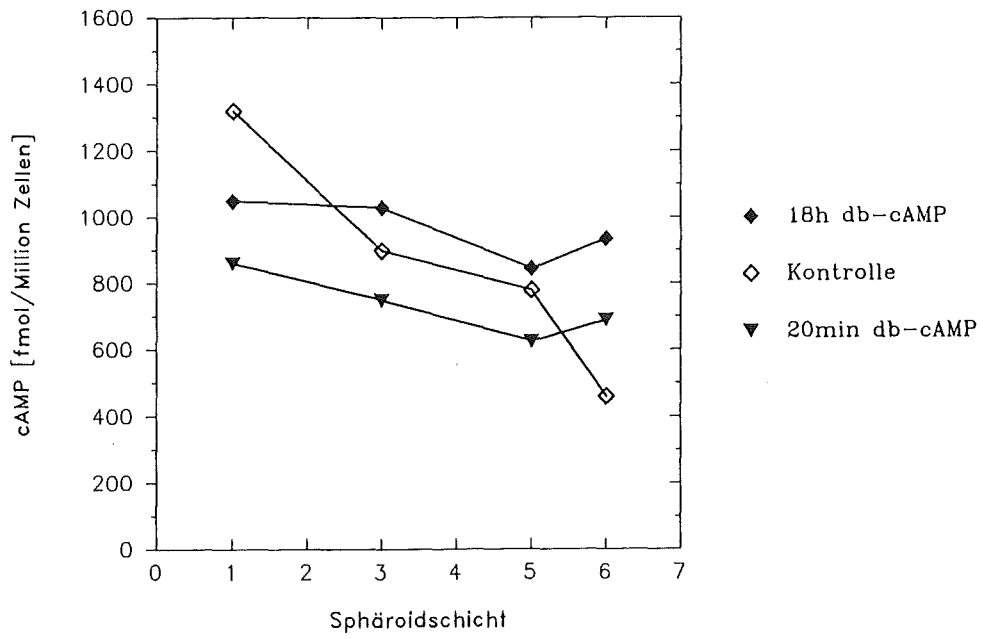
III.6.5.1. L-Sphäroide (20 min und 18 h db-cAMP)

Der in unbehandelten L-Sphäroiden auftretende radial fallende cAMP-Gradient ist bereits nach einer 20-minütigen Inkubation mit 0,5 mM db-cAMP deutlich abgeflacht (Abb. 30). Hierbei ist der cAMP-Gehalt im SPH-Zentrum gegenüber den darüber liegenden Schichten leicht erhöht. Auch nach einer Langzeitbehandlung der L-SPH von 18 Stunden mit db-cAMP bleibt dieses Bild weitgehend erhalten, wobei allerdings das absolute cAMP-Niveau gegenüber der Kurzzeitbehandlung erhöht ist (Abb. 30).

Wie aufgrund der ML-Ergebnisse zu erwarten war, ist im Proliferationsverhalten der SPH-Zellen nach einer 20-minütigen Behandlung mit db-cAMP (Abb. 30) noch kaum eine Veränderung gegenüber unbehandelten SPH zu erkennen (vgl. Abb. 12). Nach 18-stündiger Inkubation mit db-cAMP zeigt sich jedoch eine deutliche Verschiebung der Phasenanteile: der Anteil der Zellen in der S-Phase ist in jeder Sphäroidschicht auf die Hälfte der Kontrolle reduziert, der prozentuale Anteil der Zellen in der (G2+M)-Phase ist stark erhöht und liegt über dem S-Anteil. Der Gradient im Sphäroid bleibt dennoch erhalten, da die Veränderungen im Zellzyklus alle Zellschichten innerhalb des Sphäroids gleichmäßig betreffen (Abb. 30).

Nicht-kommunizierende L-Zellen zeigen somit als ML und im Sphäroidverband das gleiche Verhalten: cAMP steigt; der Anteil der Zellen in der S-Phase ist reduziert, während der Anteil der (G2+M)-Zellen zunimmt; der Anteil an G1-Zellen bleibt weitgehend unbeeinflusst.

Abb. 30 (nächste Seite): cAMP-Gehalt (oben) und Zellzyklusverteilung (Mitte und unten) der Zellen in unterschiedlichen Schichten von L-Sphäroiden nach Behandlung mit db-cAMP (0,5 mM). Der cAMP-Gehalt wurde für beide Inkubationszeiten in einer Grafik dargestellt, die Zellzyklusverteilung für eine Behandlungszeit von 20 min in der Mitte und 18 Stunden unten. Die Zahlenwerte hierzu sind in Tab. 13 im Anhang VI.3. aufgeführt.



III.6.5.2. SV40-3T3-Sphäroide (18 h db-cAMP)

Während sich in unbehandelten SV40-3T3-SPH der zelluläre cAMP-Gehalt mit der Tiefe nicht ändert, führte die 18-stündige Inkubation dieser SPH mit 0,5 mM db-cAMP zur Ausbildung eines steilen, radial ansteigenden Konzentrationsgradienten. In der äußeren Sphäroidschicht entspricht der intrazelluläre cAMP-Gehalt den Kontrollwerten und erreicht im SPH-Zentrum nahezu den 3-fachen cAMP-Gehalt der Kontrollzellen (Abb. 31, nächste Seite; Tab. 14 im Anhang VI.3.).

Auch die Zellzyklusverteilung von unbehandelten SV40-3T3-SPH (keine Veränderung der Phasenanteile innerhalb des dreidimensionalen Zellverbandes) wird durch db-cAMP-Behandlung verändert (Abb. 31). Es bildet sich innerhalb des Sphäroids eine Radialabhängigkeit der Zellzyklusverteilung aus, bei der sich zwei Phasen unterscheiden lassen. In der 1. Phase (Schicht 1 bis 3) erhöht sich zunächst der G1-Anteil geringfügig bei gleichzeitigem Absinken des S- und einem Anstieg des (G2+M)-Phasenanteils, wobei die Verteilung der äußeren Zellschicht derjenigen der Kontrolle entspricht. In der 2. Phase, ab der vierten Zellschicht, dreht sich dieser Trend um: es kommt zu einem S-Anstieg und zu einem Abfall der G1- und der (G2+M)-Anteile (Abb. 31, nächste Seite; Tab. 14 im Anhang VI.3.).

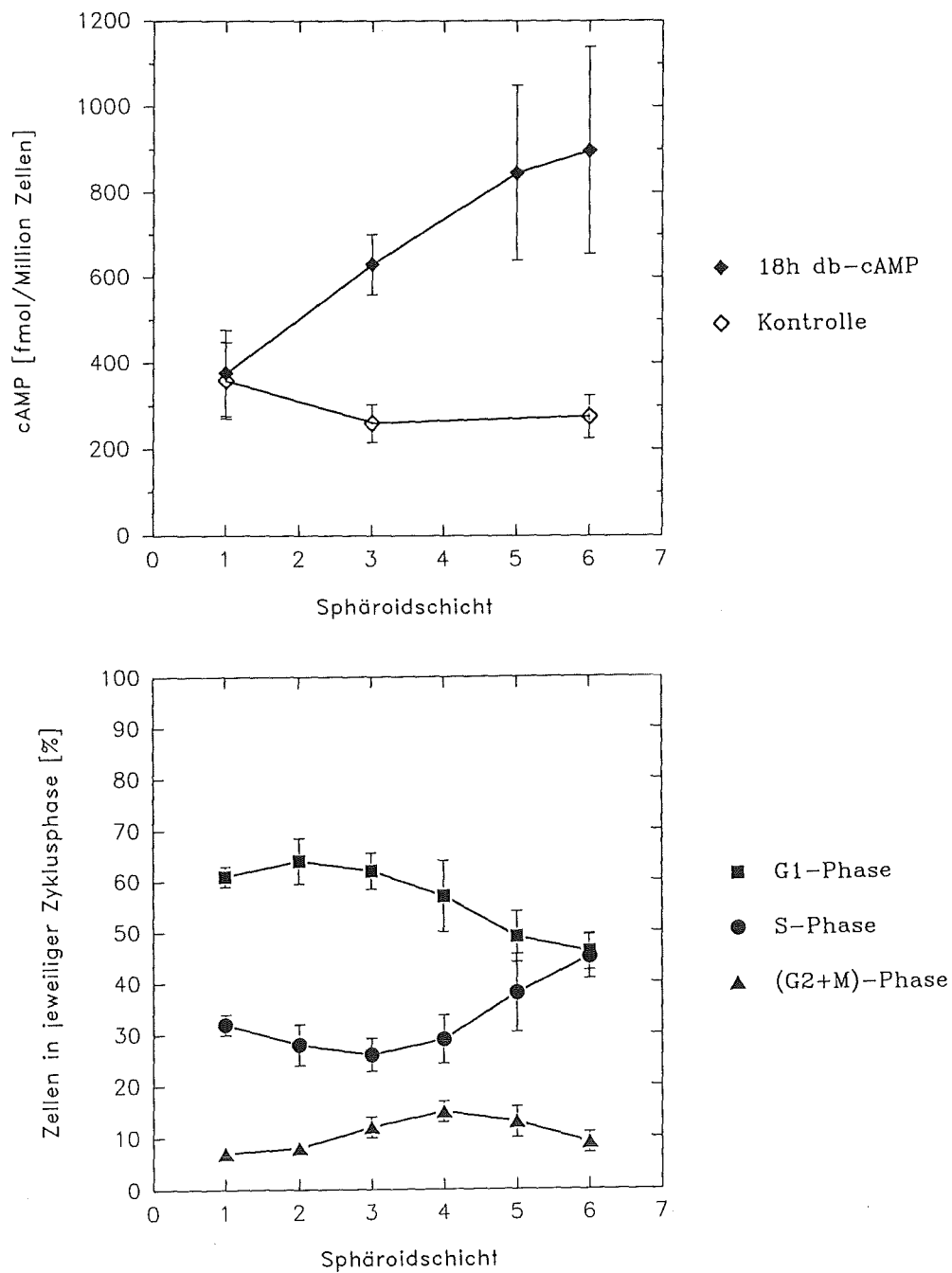


Abb. 31: cAMP-Gehalt (oben) und Zellzyklusverteilung (unten) der Zellen in unterschiedlichen Schichten von SV40-3T3-Sphäroiden nach Behandlung mit db-cAMP (0,5 mM, 18 Stunden). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus drei Experimenten \pm Standardabweichung. Ist keine Standardabweichung zu sehen, liegt sie innerhalb der Symbolgröße. Die Zahlenwerte hierzu sind in Tab. 14 im Anhang VI.3. aufgeführt.

Diese "biphasische Reaktion" der Zellen in den SV40-3T3-SPH, mit einem Anstieg der S-Zellen und einem Abfall der G-Zellen im Innern, könnte bedeuten, daß die innere Zellpopulation durch db-cAMP-Einwirkung einen Proliferationsstimulus erfährt. Um dieses zu klären, wurde der BrdU-Einbau in db-cAMP-behandelten SPH untersucht. Abb. 32 zeigt, daß im Innern deutlich markierte Zellkerne auftreten, im Gegensatz zu unbehandelten SPH (vgl. Abb. 15 in III.4.). Dies weist auf eine Stimulation der DNA-Synthese bei den inneren Zellen hin.

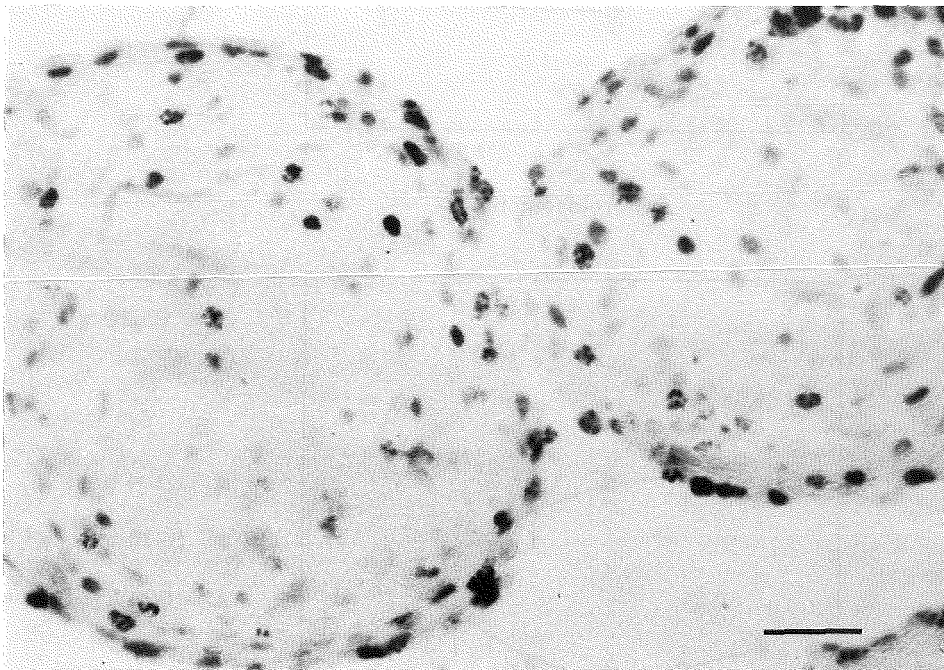


Abb. 32: Lichtmikroskopische Aufnahme von Gefrierschnitten von SV40-3T3-SPH nach Inkubation mit db-cAMP (0,5 mM, 18 Stunden) und Markierung der Zellkerne mit BrdU während der letzten beiden Behandlungsstunden (Balkenlänge: 50 μ m).

III.7. Veränderung des cAMP-Gehaltes durch Behandlung mit Forskolin: Wirkung auf die interzelluläre Kommunikation und den Zellzyklus

Das ständige Angebot des cAMP-Analogons db-cAMP stellt für die Zellen eine weitgehend "unphysiologische" Situation dar. Daher wurde in einer weiteren Versuchsreihe das zelleigene Enzymsystem zur cAMP-Synthese durch die Zugabe von Forskolin stimuliert.

Wie auch bei den Untersuchungen mit db-cAMP wurde zunächst überprüft, ob eine Behandlung mit Forskolin die interzelluläre Kommunikation der Zellen verändert. Anschließend wurde die Beeinflussung des cAMP-Gehaltes im Zusammenhang mit dem Proliferationsmuster der Zellen untersucht.

III.7.1. Eigenschaften von Forskolin

Forskolin ist ein Diterpen, das aus den Wurzeln des indischen Nesselgewächses *Coleus forskohlii* isoliert wird (Berridge, 1985). Es ist membranpermeabel, aktiviert direkt die Adenylatcyclase und hat keine Wirkung auf die cAMP-spaltende Phosphodiesterase (Seamon et al., 1981; Fradkin et al., 1982; Santos und Rojas, 1987).

III.7.2. Behandlung der Zellen mit Forskolin

Die Konzentration von Forskolin ($1\mu\text{M}$) und die Inkubationszeit der Zellen (1-2 Stunden) wurden entsprechend einer Reihe von Veröffentlichungen gewählt (Seamon et al., 1981; Murdoch und Rosenfeld, 1982; Santos und Rojas, 1987; Mehmet et al., 1990; Thoresen et al., 1990).

III.7.3. Wirkung von Forskolin auf die interzelluläre Kommunikation

Bereits eine 1-2 stündige Inkubation von SV40-3T3-Zellen mit Forskolin führte zu einer Erhöhung der Farbstoffkopplung. In L-Zellen konnte auch nach 4-stündiger Inkubation keine Farbstoffkopplung beobachtet werden.

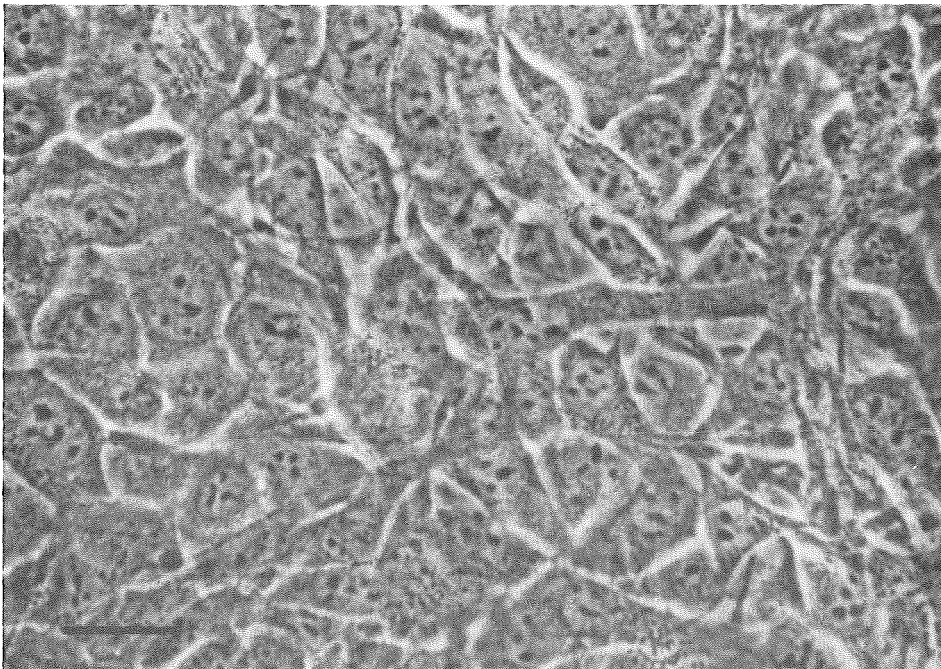


Abb. 33: Farbstoffausbreitung in SV40-3T3-Zellen nach Behandlung mit Forskolin ($1 \mu\text{M}$; 60 min): Im Fluoreszenzauflicht ist die Ausbreitung in nahezu allen direkten Nachbarzellen zu sehen (oben); darunter dieselben Zellen im Phasenkontrast (Balkenlänge: $30 \mu\text{m}$). Zum Vergleich (Farbstoffausbreitung in unbehandelten SV40-3T3-Zellen) siehe Abb. 5 in III.1.

III.7.4. cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung nach Forskolin-Einwirkung im Monolayer

Wurden SV40-3T3- und L-Monolayerzellen mit $1\mu\text{M}$ Forskolin inkubiert, so erhöhte sich, wie erwartet, der intrazelluläre Gehalt an cAMP. Nach 1-2 Stunden war der maximale Effekt erreicht: der cAMP-Gehalt der Zellen war um ca. 1/3 gegenüber der Kontrolle erhöht (siehe Tab. 15 im Anhang VI.3.).

Nach 2-stündiger Inkubation mit Forskolin ist bei beiden Zelllinien eine deutliche Veränderung in der Zellzyklusverteilung zu erkennen: geringfügige Erhöhung der Zellen in der S-Phase, deutliche Erniedrigung der Zellen in der G1-Phase und stark erhöhter Anteil der Zellen in der (G2+M)-Phase. In SV40-3T3-Zellen ist der Forskolin-Effekt etwas deutlicher ausgeprägt als in L-Zellen (siehe Tab. 15 im Anhang VI.3.).

III.7.5. cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung nach Forskolin-Einwirkung in Sphäroiden

III.7.5.1. L-Sphäroide

Die Stimulierung der Adenylatcyclase in L-Sphäroiden führte innerhalb einer Stunde zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Gehaltes in allen Schichten der Sphäroide. In den äußeren Zellen war der cAMP-Anstieg etwas stärker (160% der Kontrolle) als im Kern (130% der Kontrolle). Der cAMP-Gradient im Sphäroid war dadurch noch steiler im Vergleich zu unbehandelten Zellaggregaten (Abb. 34, nächste Seite).

Im Zellzyklus dagegen ist kaum eine Veränderung im Vergleich zu unbehandelten SPH (siehe Abb. 12) zu erkennen (Abb. 34, nächste Seite).

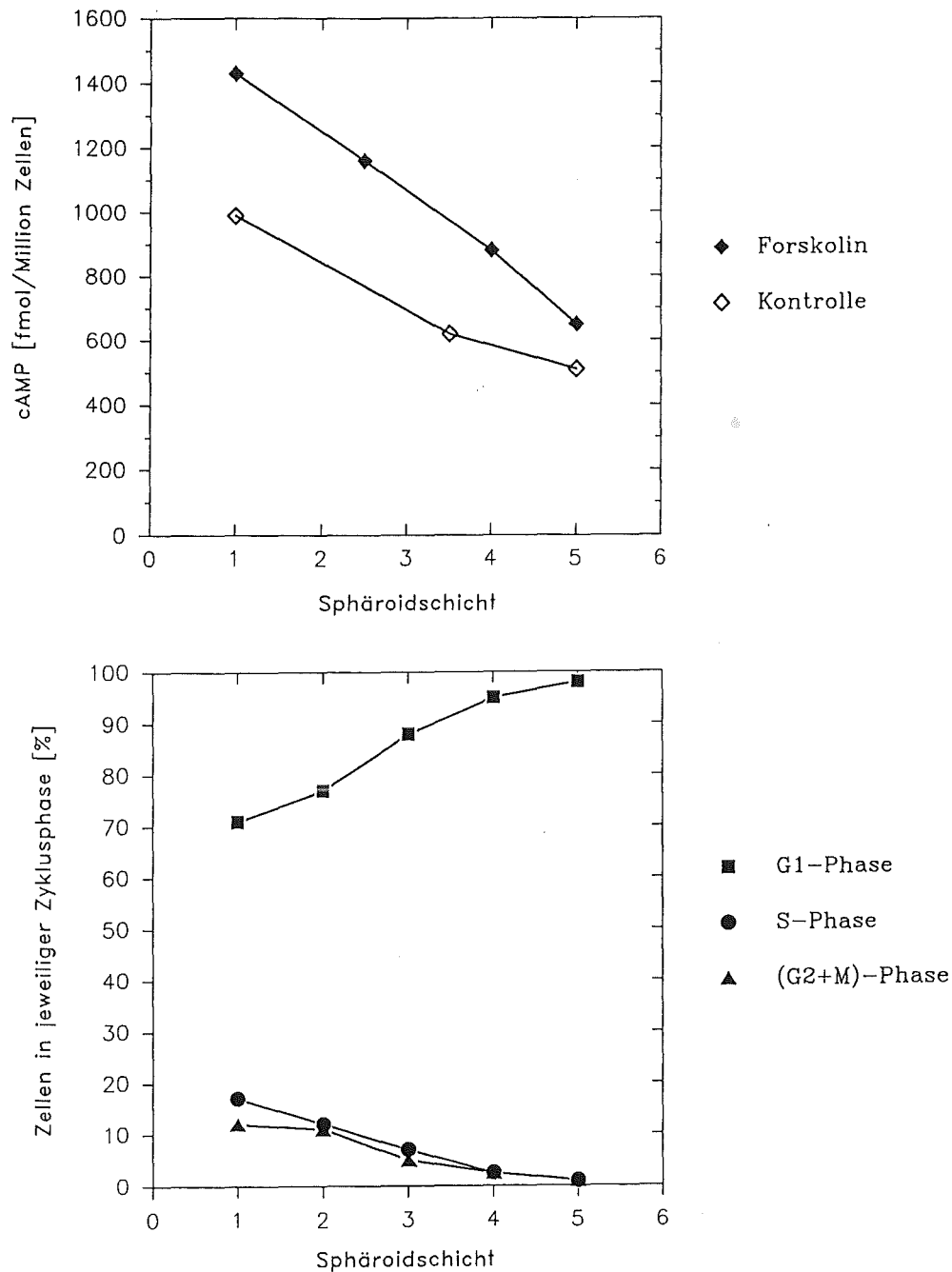


Abb. 34: Behandlung von L-Sphäroiden mit Forskolin ($1 \mu\text{M}$, 1 Stunde). cAMP-Gehalt (oben) und Zellzyklusverteilung (unten) der Zellen mit zunehmender Tiefe in den SPH: SPH-Schicht 1 = äußere Zellen; SPH-Schicht 5 = innere Zellen. Die Zahlenwerte hierzu sind in Tab. 16 im Anhang VI.3. aufgeführt.

III.7.5.2. SV40-3T3-Sphäroide

Forskolin stimuliert innerhalb einer Stunde auch die Adenylatcyclase in SV40-3T3-Sphäroiden. Die daraus resultierende Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (ca. 150% der Kontrolle) erfolgt gleichmäßig in allen Schichten der Sphäroide (Abb. 35, nächste Seite).

Bezüglich der Zellzyklusverteilung zeigen die äußeren SPH-Zellen keine Änderung gegenüber der Kontrolle. Mit zunehmender Tiefe kommt es jedoch zu einem Anstieg des S-Phase-Anteils und einer entsprechenden Abnahme der G1-Zellen (Abb. 35).

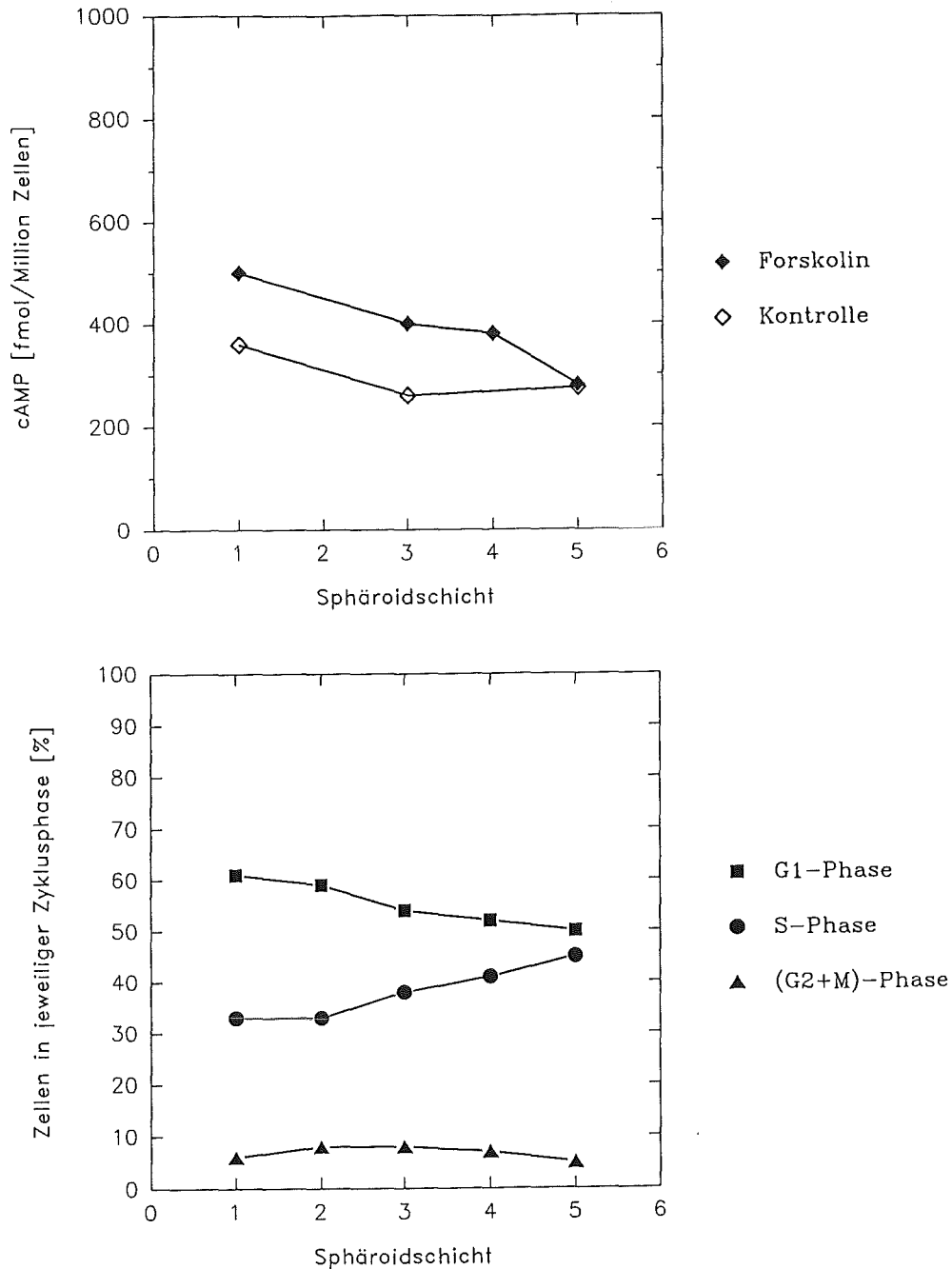


Abb. 35: Behandlung von SV40-3T3-Sphäroiden mit Forskolin ($1 \mu\text{M}$, 1 Stunde). cAMP-Gehalt (oben) und Zellzyklusverteilung (unten) der Zellen mit zunehmender Tiefe in den SPH: SPH-Schicht 1 = äußere Zellen; SPH-Schicht 5 = innere Zellen. Die Zahlenwerte hierzu sind in Tab. 16 im Anhang VI.3. aufgeführt.

IV. Diskussion

IV.1. Grundsätzliches zum Systemvergleich Monolayer-Sphäroid

Vor einer detaillierten Diskussion der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse über die Rolle des cAMP und der interzellulären Kommunikation bei der Regulation der Proliferation in SPH sollen zunächst einige grundsätzliche Probleme angesprochen werden, die beim Vergleich mit der im ML angetroffenen Situation von Bedeutung sind. Diese resultieren vor allem aus der unterschiedlichen "Dimensionalität" der beiden Kultursysteme und den sich hieraus ergebenden Konsequenzen. Diese bewirkt, daß die Zellen in verschiedenen Proliferationszuständen in beiden Kultursystemen unterschiedlichen physiologischen Bedingungen ausgesetzt sind. Im ML ist der Proliferationszustand der Zellen bei optimierter Mediumversorgung allein von der augenblicklichen Zelldichte abhängig. Dies ist im SPH-System grundsätzlich nicht der Fall. Hier liegen die Zellen mit eingeschränkter Proliferation im Innern des dreidimensionalen Zellverbandes, in Bereichen also, wo von der ML-Kultur abweichende metabolische Besonderheiten (z.B. Hypoxie) angetroffen werden, auf die im Anhang VI.1. eingegangen wird.

Beim Vergleich beider Systeme, etwa in bezug auf die Zelldichte, ist ferner zu berücksichtigen, daß diese Größe im SPH streng genommen dreidimensional ist. Ein Systemvergleich ML-SPH ist deshalb nicht ohne weiteres möglich, und, falls überhaupt, nur bezüglich der äußeren SPH-Zellschicht sinnvoll. Hierfür stellen die unter III.1.4. durchgeführten Messungen und Berechnungen trotz gewisser mathematischer Vereinfachungen eine wichtige Basis dar. Ein wesentliches Ergebnis ist hierbei, daß die Zelldichte der äußeren SPH-Schicht für beide Typen identisch ist mit der im ML maximal erreichten Zelldichte. Das Verhalten des zellulären cAMP-Gehaltes und des Zellzyklus beim Übergang vom konfluenten ML zur äußeren SPH-Zellschicht läßt sich auf dieser Basis erklären (s. IV.4.).

IV.2. Morphologische Unterschiede zwischen L- und SV40-3T3-Sphäroiden

Die im Abschnitt III.1.4. beschriebenen Messungen und Berechnungen weisen auf erhebliche Unterschiede in der inneren Struktur hin. Während in den L-SPH die Zellen sehr dicht liegen und bezüglich ihres Anteils am gesamten SPH-Volumen (Packungsdichte) nahe am mathematisch möglichen Maximalwert von 74% (dichteste Kugelpackung) liegen, beträgt dieser Wert in SV40-3T3-SPH nur 22%. Aus dem großen zellfreien Raumanteil in diesen SPH lassen sich gewisse proliferative Besonderheiten erklären, auf die weiter unten eingegangen wird. Da es sich bei der Packungsdichte um eine statistisch gemittelte Größe handelt, bedeutet eine geringe Größe nicht, daß die Zellen keine direkten Kontakte ausbilden können. Insbesondere ist die Ausbildung Gap-Junction-vermittelter Zellkommunikation nicht

im Widerspruch hierzu, zumal die mathematische Interpretation der Zellpackungsdichte für Werte weit unterhalb der dichtesten Kugelpackung nicht streng an die Voraussetzung kugelförmiger Zellen gebunden ist, sondern auch Zellkontakte aufgrund unregelmäßiger Zellkonturen (Ausläufer) zuläßt.

IV.3. Volumenwachstum der Sphäroide

Die halb-logarithmische Darstellung der SPH-Wachstumskuren (Abb. 8) ergibt keine Geraden, sodaß kein exponentielles Wachstum unter Beteiligung aller Zellen vorliegt. Vielmehr kommt es mit der Zeit zu einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit. Dies kann zweierlei bedeuten: entweder verringert sich die Verdopplungsrate aller Zellen gleichmäßig (1) oder das Volumenwachstum ist im wesentlichen getragen von der zeitlich konstanten Proliferation einer Zellpopulation, deren Anteil am Gesamtvolumen mit der Zeit abnimmt (2). Bei dieser Zellpopulation kann es sich u. a. aus geometrischen Gründen nur um die Zellen aus den äußeren SPH-Schichten handeln. Ihre Zahl nimmt näherungsweise proportional zur SPH-Oberfläche, d.h. proportional zum Quadrat des SPH-Durchmessers, zu, während die Gesamtzellzahl pro SPH proportional zur 3. Potenz des Durchmessers zunimmt. Dies bedeutet, daß der Anteil der proliferierenden Zellen umgekehrt proportional zum SPH-Durchmesser ist und folglich mit der Zeit abnimmt. Die an SPH durchgeführten BrdU-Markierungsexperimente (Abb. 13 und 14) zeigen, daß das Thymidin-Analogon vorzugsweise in die Kerne der äußeren SPH-Zellen eingebaut wird und somit für beide SPH-Typen die Proliferationshypothese (2) zutrifft (s. dazu auch IV.4. über ML und äußere SPH-Zellen).

Inwiefern für die Einschränkung der Proliferation bei den inneren Zellen sterische Behinderungen verantwortlich sind, läßt sich kaum abschätzen, zumal sich beide SPH-Typen in ihrer inneren Struktur (Packungsdichte) stark unterscheiden und diesbezügliche Fluktuationen im Innern nur schwer zu erfassen sind. Es müssen deshalb auch physiologische Faktoren wie Änderungen im Sauerstoff-Partialdruck oder im pH-Wert, aber auch mangelhafte Nährstoffversorgung im Innern in Betracht gezogen werden (vgl. Anhang VI.1. "Sphäroide").

Erwähnenswert scheint in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung, daß das Zellvolumen der L-Zellen mit zunehmender Tiefe im SPH zunimmt (siehe Tab. 3 im Anhang VI.3.), nicht aber bei den SV40-3T3-SPH. Da weder die Größe der SPH noch eine Behinderung des Nährstofftransportes durch Matrixmaterial in L-SPH als Erklärung für dieses Phänomen in Frage kommt, bleibt hierzu zu bemerken, daß auch die Zellen eines Organs wie Herz oder Leber bei Ischämie ihr Volumen deutlich vergrößern (Gersing et al., 1991). Die fehlenden Zell-Zell-Verbindungen könnten für die ungenügende metabolische Versorgung der L-Zellen im SPH-Innern verantwortlich sein.

IV.4. cAMP-Gehalt und Zyklusphasenverteilung in Monolayern und äußeren Sphäroid-Zellen

Der Hauptaspekt bei der Diskussion der Ergebnisse zur Änderung des cAMP-Gehaltes und zur Proliferationskinetik betrifft die Zusammenhänge zwischen cAMP, interzellulärer Kommunikation, Zyklusphasen-Profil und DNA-Syntheserate in beiden Kultursystemen.

Die ML-Daten zur Dichteabhängigkeit des cAMP-Verlaufes und der Proliferationskinetik (Abb. 9 und 10) lassen keinen Einfluß der interzellulären Kommunikation erkennen. Für beide Zelllinien kommt es mit zunehmender Zelldichte im wesentlichen zu einer cAMP-Abnahme bei gleichzeitiger Zunahme des G1-Anteils und einer Abnahme der S-Phasezellen. Dieses Profil der dichteabhängigen Proliferations-Inhibierung entspricht den in der Literatur erhobenen Befunden (z. B. Smets und Van Rooy, 1987).

Beim Vergleich mit dem cAMP-Gehalt und der Phasenverteilung der äußeren SPH-Zellen fällt auf, daß die hierfür erhaltenen Werte identisch sind mit denjenigen konfluenter ML (vgl. Abbn. 9-12). Da die zugehörigen Zelldichten in beiden Fällen gleich sind (Tab. 1 in III.1.4.), läßt sich hieraus folgern, daß cAMP-Gehalt und Zyklusverteilung unter vergleichbaren physiologischen Bedingungen (ML-Zellen bzw. Zellen an der SPH-Oberfläche) und unabhängig vom Kommunikationsvermögen der Zellen in eindeutiger Weise von der Zelldichte abhängen.

IV.5. Radialprofil von cAMP-Gehalt und Zyklusphasenverteilung in Sphäroiden

Hier besteht zunächst ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden SPH-Typen, indem bei den kommunikationslosen L-SPH der cAMP-Gehalt zum SPH-Zentrum hin abnimmt, bei gleichzeitigem Anwachsen des G1-Anteils und einem Absinken der S-Population (Abb. 11 und 12). Bei den kommunizierenden SV40-3T3-SPH fehlt hingegen eine solche Radialabhängigkeit. Weder cAMP noch Zyklusverteilung ändern sich in nennenswerter Weise in Abhängigkeit von der Lage der Zellen im SPH (Abb. 11 und 12).

Trotz dieses Unterschiedes ergibt sich für beide SPH-Typen ein übereinstimmendes Bild, was die Korrelation zwischen cAMP und der Zyklusverteilung anbetrifft. Bei den L-SPH setzt sich der im ML bestehende Zusammenhang zwischen cAMP-Abnahme und G1-Zunahme (S-Abnahme) in die Tiefe fort. In SV40-3T3-SPH ist die Radialabhängigkeit zwar nicht zu beobachten, der Zusammenhang zwischen cAMP-Gehalt und Zyklusphasenanteilen bleibt aber dennoch gewahrt.

IV.6. Bestimmung DNA-synthetisierender Zellen in Sphäroiden

Das Fehlen einer Radialabhängigkeit von cAMP und Zyklusverteilung in SV40-3T3-SPH erschwert die widerspruchsfreie Deutung der hier herrschenden Proliferationsverhältnisse. Ohne zusätzliche Daten würde eine "naive" Interpretation der flüßcytometrischen Ergebnisse die Folgerung einer über den SPH-Querschnitt konstanten Proliferationsrate erlauben. Zwar stünde dies im Widerspruch zur Form der SPH-Wachstumskurven (Abb. 8), die dann einen exponentiellen Verlauf zeigen müßte, jedoch könnte ihr gekrümmter Verlauf auch im Sinne einer uniform verringerten Proliferationsrate mit gleichmäßiger Verlängerung aller Phasen des Zellzyklus bei zunehmender SPH-Größe interpretiert werden.

Um zu einer widerspruchsfreien Deutung zu kommen und um zugleich die mögliche Rolle der interzellulären Kommunikation zu klären, wurde der BrdU-Einbau in beide SPH-Typen untersucht. Hierbei ergab sich in beiden Fällen ein Einbau des Thymidin-Analogons nur in die Zellkerne der äußeren Schichten. Die sich bei den SV40-3T3-SPH geringfügig weiter ins Innere erstreckende Markierung ist hierbei auf die gegenüber den L-Zellen kürzere Verdopplungszeit zurückzuführen (siehe III.1.2.). Dieses Ergebnis stützt die Interpretation der Krümmung der SPH-Wachstumskurven als Folge einer im wesentlichen auf die äußeren Zellen beschränkten Proliferation (s. oben).

Was die radiale Konstanz der Phasenverteilung in SV40-3T3-SPH anbetrifft, so läßt sie in eindeutiger Weise auf eine gleichmäßige Verlängerung aller Zyklusphasen mit zunehmender Tiefe schließen. Nur eine solche Annahme läßt das Phasenverhältnis, wie gemessen, unverändert. Bei den L-SPH ergibt sich dagegen das "klassische" Bild einer Proliferations-Inhibierung der inneren Zellen durch eine Verlängerung der G1-Phase, d.h. durch eine zunehmende Arretierung der Zellen in dieser Phase (Müller-Klieser, 1987; Sutherland, 1988).

Eine solche Verlängerung der einzelnen Zellzyklusphasen wurde von Wibe et al. (1981) mit zunehmender Tiefe in SPH einer menschlichen Cervixcarcinom-Zelllinie festgestellt, nachdem auch in diesen SPH kaum ein radialer Gradient im Verlauf der Zellzyklusphasen zu beobachten war. Allison et al. (1983) beobachteten in V79-SPH selbst nach langen Markierungszeiten mit H3-Thymidin (24 Stunden) nicht-markierte Zellen mit einem DNA-Gehalt, der Zellen in der S- und G2-Phase entspricht. Sie diskutierten ebenfalls eine starke Verlängerung oder sogar eine Arretierung des Zellzyklus in allen Zellzyklusphasen. Da zumindest für die V79-Zelllinie interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions nachgewiesen ist (Dertinger und Hülser, 1982; Yancey et al., 1982; Pitts et al., 1986), unterstützen die oben erwähnten Befunde die Interpretation einer gleichmäßigen Verlängerung aller Zyklusphasen mit zunehmender SPH-Tiefe.

IV.7. Deutung des Proliferationsverhaltens von SV40-3T3-Sphäroiden als Kommunikations-abhängigen Effekt: die Wirkung von Mezerein als Kommunikations-inhibitor

Durch Anwendung eines Hemmstoffes der interzellulären Kommunikation sollte die Frage geklärt werden, ob das ungewöhnliche radiale cAMP- und Proliferationsverhalten in diesen SPH die Folge eines Gap-Junction-vermittelten Prozesses ist. Hierbei wurde zunächst von der einfachen Vorstellung ausgegangen, daß über die Gap-Junction-Kanäle die Bildung eines radialen cAMP-Gradienten verhindert wird, bzw. ein solcher weitgehend abgeflacht wird. Von einer Behandlung der SV40-3T3-SPH mit dem Tumor-Promotor Mezerein wurde deshalb erwartet, daß die Schließung der Gap-Junction-Kanäle die Ausbildung eines radialen cAMP- und Phasengradienten bewirkt, wie er in den nicht-kommunizierenden L-SPH auftritt. Sowohl Kurzzeit- wie Langzeit-Expositionen (im ersten Fall 2h nach Auswaschen des Mezereins) bestätigten diese Erwartung (Abbn. 22-25). Demgegenüber blieb die Mezerein-Behandlung von L-SPH ohne wesentlichen Einfluß auf das Radialmuster der Phasenverteilung. Der geringe Abfall der S-Population dürfte hier auf den transienten cAMP-Abfall zurückführbar sein (Abb. 20 und 21), der auch im ML auftritt (Abb. 19).

Nach Mezereinbehandlung reagieren alle Zellen in L-SPH wie die entsprechend behandelten ML-Kulturen (Abbn. 19, 20, 21, 26). In SV40-3T3-SPH dagegen verhalten sich nur die äußeren Zellen wie die entsprechenden ML (Abbn. 19, 22 bis 26). Das unterschiedliche Verhalten der Zellen in SPH der kommunikationskompetenten Zellen legt die Vermutung nahe, daß mit zunehmender Tiefe im SPH Zellen in einem abweichenden "Differenzierungszustand" (hier im weitesten Sinne zu verstehen) vorliegen (s. dazu auch Anhang VI.1.6.: Zelldifferenzierung in Tumorzell-SPH). Eine "meßbare" Differenzierungsleistung von SPH kommunizierender Zellen stellt der Kontakteffekt dar, der für SV40-3T3-SPH ebenfalls nachgewiesen ist (Anderer et al., 1990). Hinweise auf einen unterschiedlichen "Differenzierungszustand" der Zellen im SPH-Inneren finden sich auch bei der Betrachtung des cAMP-Gehaltes und des Zyklusverhaltens in SV40-3T3-SPH nach db-cAMP- bzw. Forskolinbehandlung (Abbn. 29 und 35; siehe auch IV.8.).

IV.8. Wirkung von db-cAMP und Forskolin.

Die db-cAMP- und Forskolin-Untersuchungen waren als komplementär zu den Mezerlein-Experimenten in diese Arbeit einbezogen worden. Es sollte hiermit das Proliferationsverhalten von SPH bei verstärkter Zellkommunikation studiert werden, die durch beide Stoffe induziert wird (Abb. 27 und 33).

Nach den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen wird eine Intensivierung der Zellkommunikation durch Maßnahmen und Behandlungen erzielt, die zu einer Erhöhung des zellulären cAMP-Gehaltes führen (Saez et al., 1986; Santos und Rojas, 1987; Brümmer, 1988). Die nach db-cAMP-Behandlung bei den SV40-3T3-Zellen beobachtete Verstärkung der Zellkommunikation (Abb. 27) ist jedoch offenbar nicht direkt auf eine cAMP-Erhöhung zurückzuführen, da die Konzentration dieses Botenstoffes, außer bei den inneren SPH-Zellen, nicht zunimmt (vgl. Abb. 31). Insgesamt sind die hier beobachteten Wirkungen des db-cAMP sehr komplex. Sie beruhen jedoch wahrscheinlich nicht auf direkten "Nebenwirkungen" der intrazellulär abgespaltenen Butyryl-Reste, da auch nach Forskolin-Behandlung ein erhöhter Anteil an S-Phase-Zellen im SPH-Innern zu beobachten ist (s. unten). Die Ergebnisse lassen sich deshalb nicht ohne weiteres auf der Basis reiner cAMP- und Kommunikationseffekte erklären.

Ein grundsätzlich interessantes Ergebnis zeigt sich bei der Radialabhängigkeit von cAMP und Phasenverteilung in SV40-3T3-SPH (Abb. 31). Hier kommt es nach db-cAMP-Behandlung zu einem starken cAMP-Anstieg in den inneren Zellen, die einhergeht mit einer Zunahme der S-Zellen und einer Abnahme der G1-Zellen. Daß es sich hierbei tatsächlich um eine Stimulierung der Proliferation der inneren Zellen handelt, zeigt der Einbau von BrdU auch in diese Zellen im SPH-Kern (Abb. 32). Da die Packungsdichte der Zellen in SV40-3T3-SPH sehr gering ist (s. oben), existieren keine wesentlichen sterischen Behinderungen, die einem Proliferationsschub im Innern dieser SPH im Wege stehen könnten.

Eine solche Proliferationsaktivierung der inneren SV40-3T3-Zellen mit S-Zunahme und G1-Abnahme wird auch nach Forskolin-Behandlung beobachtet (Abb. 35); sie findet in den L-SPH nicht statt (Abb. 34). Durch das im Vergleich zu db-cAMP "physiologisch" stimulierende Forskolin (vgl. III.7.) kommt es in ML und SPH beider Zelllinien zu einem cAMP-Anstieg, der bei den SV40-3T3-Zellen zu einer Erhöhung der Farbstoff-Kopplung führt.

IV.9. Schlußfolgerungen

Die aus den Ergebnissen und ihrer Diskussion resultierenden Schlußfolgerungen bezüglich der Regulation der Zellproliferation im dreidimensionalen Zellverband der SPH seien an dieser Stelle noch einmal zusammengefaßt und den Verhältnissen im ML gegenübergestellt.

IV.9.1. cAMP und Zelldichte

Der cAMP-Gehalt ist in unbehandelten Kulturen eine eindeutige Funktion der Zelldichte. Diese Aussage ist bezüglich der SPH nur für die äußere Zellschicht zulässig, da nur die dort befindlichen Zellen physiologisch und metabolisch mit ML-Zellen vergleichbar sind. Die Messungen zeigen, daß die Zelldichte der äußeren SPH-Schicht derjenigen eines konfluenten ML entspricht und der cAMP-Gehalt in beiden Fällen gleich ist. Dieses Ergebnis gilt für beide Zelllinien, d.h. unabhängig von deren Kommunikationsvermögen über Gap Junctions und von der inneren Struktur der SPH (Zellpackungsdichte).

IV.9.2. cAMP und Zyklusphasenverteilung

Es besteht eine für beide Zelllinien und beide Kulturformen durchgängige Korrelation zwischen zellulärem cAMP-Gehalt und Phasenverteilung. Mit sinkendem cAMP-Gehalt nimmt, unabhängig von der Art und Weise des Zustandekommens in unbehandelten Kulturen, der Anteil der G1-Zellen zu, derjenige der S-Zellen ab. Für beide Zelllinien haben konfluente ML und äußere SPH-Zellen gleiche Phasenverteilungen.

IV.9.3. Gap Junctions, cAMP und Zyklusphasenverteilung in Sphäroiden

Das einzige Ergebnis, bei dem sich ein Einfluß der interzellulären Kommunikation zeigt, ist das Fehlen einer Radialabhängigkeit von cAMP und Phasenverteilung in den kommunizierenden SV40-3T3-SPH. Durch Behandlung mit dem Tumor-Promotor Mezerein läßt sich die Zellkommunikation hemmen und es kommt zur Ausbildung eines gegen das Sphäroid-Innere fallenden cAMP-Gradienten sowie zur Zunahme der G1- bzw. Abnahme der S-Phase-Zellen in dieser Richtung. Es etabliert sich damit ein radiales Muster von cAMP und Phasenverteilung, wie es in den unbehandelten, nicht kommunizierenden L-SPH beobachtet wird. Dies unterstützt die einfache Hypothese, wonach die für cAMP permeablen Gap Junction-Kanäle im geöffneten Zustand einen Ausgleich der cAMP-Konzentration innerhalb der SV40-3T3-SPH bewirken. Die interzelluläre Kommunikation wirkt damit indirekt, über die Steuerung des radialen cAMP-Profiles, auf die Kontrolle der Phasenverteilung im SPH.

IV.9.4. Besonderheiten der Zellproliferation in Sphäroiden

Aus der Form der SPH-Wachstumskurven und aus den Experimenten zum BrdU-Einbau für beide SPH-Typen resultiert ein eindeutiges Proliferationsbild, bei dem nur die Zellen in den äußeren SPH-Schichten aktiv proliferieren. Damit ist bei den kommunizierenden SV40-3T3-SPH das "klassische" Prinzip durchbrochen, wonach die inneren nicht-proliferierenden Zellen weitgehend in der G1-Phase arretiert sind, wie das bei den L-SPH und den konfluenten ML beider Zelllinien der Fall ist. Die Radialunabhängigkeit der Phasenverteilung in den SV40-3T3-SPH muß deshalb als Folge einer gleichmäßigen Verlängerung aller Zyklusphasen mit zunehmender Tiefe im SPH interpretiert werden. Möglicherweise erklärt sich hierdurch die "Proliferationsbereitschaft" der inneren Zellen in diesen SPH, die auf eine Behandlung mit cAMP- bzw. Kommunikationsstimulatoren (Forskolin, db-cAMP), wie beschrieben, mit einer Aktivierung der Proliferation reagieren.

Zusammen mit den Gesetzmäßigkeiten anderer Gap Junction-vermittelter Prozesse, wie der Kontakt-Resistenz gegenüber ionisierender Bestrahlung (Dertinger und Hülser, 1981; Anderer et al., 1990; Knedlitschek et al., 1990), machen die hier gewonnenen Ergebnisse nicht zuletzt deutlich, daß die physiologische und regulatorische Wirkung dieser Zell-Zell-Verbindungen an die Existenz eines dreidimensionalen Zellverbandes gebunden ist und deshalb ihre weitere funktionelle Erforschung bevorzugt am SPH-Modell erfolgen sollte.

V. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Proliferationsverhalten von Zellen zu untersuchen, die als multizelluläre Sphäroide (sphärische Aggregate von max. 400 μm Durchmesser) kultiviert wurden. Das Hauptinteresse richtete sich dabei auf die Rolle der Gap Junction-vermittelten Zellkommunikation, des sekundären Botenstoffes cAMP und der Sphäroid-typischen dreidimensionalen Zellarchitektur bei der Regulation der Proliferation, worüber bisher wenig bekannt ist. Zusätzlich sollte diesbezüglich ein Vergleich mit der Monolayerkultur erfolgen.

Die Untersuchungen wurden an 2 Fibroblastenlinien der Maus durchgeführt, einer Methylcholanthren-induzierten Tumorlinie (L-Zellen) und an SV40-transformierten 3T3 Zellen (SV40-3T3), wobei nur letztere die Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation über Gap Junctions besitzen. Die Zellproliferation wurde mit Hilfe der Flußcytometrie und anhand der Einbaurrate von Brom-desoxy-Uridin (BrdU) untersucht. Durch Anwendung einer sequentiellen Trypsinieierungstechnik war es möglich, das Radialprofil der cAMP-Konzentration und der Zyklusphasenverteilung in den Sphäroiden zu analysieren. Dem gleichen Ziel diente die Bestimmung des BrdU-Einbaues mit Hilfe von Cryostatschnitten der Sphäroide. Zusätzlich wurde experimentell und rechnerisch die Zellpackungsdichte in den Sphäroiden, sowie die Flächenbelegung (Zelldichte) der äußeren SPH-Zellschicht ermittelt. Um die Rolle der Gap Junctions bei der Proliferationskontrolle abzusichern, wurden der Tumor-Promotor Mezerein als Inhibitor der interzellulären Kommunikation eingesetzt, sowie dibutyryl-cAMP (db-cAMP) und Forskolin als cAMP- und Kommunikations-Aktivatoren. Die Zellkommunikation wurde über den Gap Junction-spezifischen interzellulären Austausch des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow und über die elektrische Zell-Zell-Kopplung mit Hilfe einer Mikroelektrodenteknik bestimmt.

Es zeigte sich, daß der cAMP-Gehalt in unbehandelten Kulturen (Monolayern und Sphäroiden) eine eindeutige Funktion der Zelldichte ist. Diese Aussage ist bezüglich der Sphäroide auf die äußere Zellschicht zu begrenzen, da nur die dort befindlichen Zellen physiologisch und metabolisch mit Monolayer-Zellen vergleichbar sind. Die Messungen ergaben, daß die Zelldichte der äußeren Sphäroidschicht derjenigen eines konfluenten Monolayers entspricht und der cAMP-Gehalt in beiden Fällen gleich ist. Dieses Ergebnis gilt für beide Zelllinien, d.h. unabhängig von deren Kommunikationsvermögen über Gap Junctions und von der inneren Struktur der Sphäroide, für die die Zellpackungsdichte ein repräsentatives Maß ist. Bezüglich dieser Größe unterschieden sich die Sphäroide beider Zelllinien erheblich. Während in den L-Sphäroiden etwa 77% des Volumens von den Zellen eingenommen wurde, waren es im Falle von SV40-3T3 nur 22%.

Des weiteren bestand für beide Zelllinien und beide Kulturformen eine durchgängige Korrelation zwischen zellulärem cAMP-Gehalt und Phasenverteilung. Mit sinkendem cAMP-Gehalt

nahm, unabhängig von der Art und Weise des Zustandekommens in unbehandelten Kulturen, der Anteil der G1-Zellen zu, derjenige der S-Zellen ab. Für beide Zelllinien hatten konfluente Monolayer und äußere Sphäroid-Zellen gleiche Phasenverteilungen. Im einzelnen nahm in den Monolayern beider Zelllinien der cAMP-Gehalt mit steigender Zelldichte ab, zugleich der G1-Anteil zu und der S-Phaseanteil der Zellen ab. Im Innern der nicht kommunizierenden L-Sphäroide setzte sich dieser Trend fort: es kam zu einem weiteren Absinken des cAMP mit zunehmender Tiefe, begleitet von einem weiteren G1-Anstieg (S-Abnahme). In den kommunizierenden SV40-3T3-Sphäroiden zeigte sich keine Radialabhängigkeit von cAMP und Phasenverteilung. Die Werte entsprachen denjenigen konfluenter Monolayer. Durch Behandlung dieser Sphäroide mit Mezerein formierte sich jedoch ein radiales cAMP- und Phasenverteilungsmuster ähnlich wie in den L-Sphäroiden.

Hieraus wurde gefolgert, daß die für cAMP permeablen Gap Junction-Kanäle im geöffneten Zustand einen Ausgleich der cAMP-Konzentration innerhalb der SV40-3T3-SPH bewirken. Die interzelluläre Kommunikation scheint damit indirekt, über die Steuerung des radialen cAMP-Profiles, auf die Kontrolle der Phasenverteilung in Sphäroiden zu wirken.

Die Interpretation einer fehlenden Radialabhängigkeit im Zyklusphasenprofil der SV40-3T3-Sphäroide ergab sich aus der nicht-exponentiellen Form der Sphäroid-Wachstumskurven und aus den Experimenten zum BrdU-Einbau für beide Sphäroid-Typen, die nur eine Aufnahme des Thymidin-Analogons in die Kerne der äußeren Zellschichten erkennen ließen. Sie vermittelten damit ein eindeutiges Proliferationsprofil, bei dem nur die Zellen in den äußeren SPH-Schichten aktiv proliferierten.

Damit scheint bei den kommunizierenden SV40-3T3-Sphäroiden das "klassische" Prinzip durchbrochen, wonach die inneren nicht-proliferierenden Zellen weitgehend in der G1-Phase arretiert sind, wie dies bei den L-Sphäroiden und den Monolayern beider Zelllinien der Fall ist. Die Radialunabhängigkeit der Phasenverteilung in den SV40-3T3-Sphäroiden muß deshalb als Folge einer gleichmäßigen Verlängerung aller Zyklusphasen mit zunehmender Tiefe im Sphäroid interpretiert werden, wodurch sich das Phasenverhältnis nicht ändert.

In der Existenz von S-Phasezellen im Innern der SV40-3T3-Sphäroide könnte eine "Proliferationsbereitschaft" zum Ausdruck kommen, die erklären könnte, daß die inneren Zellen auf eine Behandlung mit den cAMP- bzw. Kommunikationsstimulatoren Forskolin und db-cAMP, wie in weiteren Experimenten beobachtet, mit einer Aktivierung der Proliferation reagieren, die bei den L-Sphäroiden nicht beobachtet wurde.

Ein besonders zu betonendes Ergebnis dieser Arbeit ist die Beobachtung, daß eine Abhängigkeit wichtiger zellulärer Eigenschaften von der Zellkommunikation nur in Sphäroiden zum

Ausdruck kommt. Die physiologische und regulatorische Wirkung der Gap Junctions scheint an die Existenz eines dreidimensionalen Zellverbandes gebunden zu sein, wodurch sie bei bisherigen Untersuchungen an Monolayer-Kulturen weitgehend verborgen blieb.

VI. Anhang

VI.1. Sphäroide

VI.1.1. Aufbau und Gewinnung von multizellulären Sphäroiden

Multizelluläre Sphäroide sind Zellaggregate, in denen die Zellen im Gegensatz zur Einschichtkultur einen dreidimensionalen Zellverband aufbauen. Die zumeist kugelförmigen Gebilde enthalten nur "Biomasse" und sind frei von künstlichem Stützmaterial wie z. B. "Microbeads". Diese Kulturform entspricht auf Grund der räumlichen Anordnung der Zellen eher einem natürlichen Gewebeverband als der konventionelle Monolayer. Sphäroide lassen sich aus normalen Zellen und Tumorzellen wie auch aus etablierten Zelllinien gewinnen (Yuhas et al., 1977; Haji-Karim und Carlsson, 1978; Bräuner und Hülser, 1990).

Erste Versuche mit sphärischen Aggregaten embryonaler Zellen wurden von Holtfreter (1944) durchgeführt. Er erreichte eine Aggregation der Zellen dadurch, daß er ein Anwachsen der Zellen an der Kulturschale durch eine Agar-Beschichtung verhinderte. Zur weiteren Kultur wurden diese Schalen dann leicht bewegt, um Wechselwirkungen von Zellen und Substrat zu verhindern (Holtfreter, 1947). Weiterentwickelt wurde diese Methode von Moscona (1952 +1961), der sowohl die Aggregationsphase der Zellen als auch die weitere Kultivierung in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler durchführte. Bei Anwendung dieser Methode haben maligne Zellen ein wesentlich höheres Potential Aggregate zu bilden als normale Zellen (Halpern et al., 1966). Möglicherweise beruht diese Beobachtung auf einer besonderen Eigenschaft von Tumorzellen, der sog. anchorage independence (Weichagarwachstum), die auch zur Klassifizierung der Krebszellen genutzt wird (Mc Alister et al., 1967). Sutherland und seine Mitarbeiter kultivierten die Zellaggregate in Spinnerflaschen und prägten auf Grund ihrer nahezu perfekten sphärischen Form den Ausdruck "multizelluläre Sphäroide" (Sutherland et al., 1971).

Die Gewinnung und Kultivierung von SPH ist abhängig von der Zellart und den beabsichtigten Experimenten. Am meisten angewendet werden die "liquid overlay" Kultur (agarbeschichtete Petrischalen überschichtet mit Zellkulturmedium) und die Kultivierung in Spinnerflaschen. Oft werden diese beiden Techniken auch kombiniert: Aggregationsphase der SPH auf agarbeschichteten Petrischalen und weitere Kultivierung in Spinnerflaschen (siehe Material und Methoden). Ist es erforderlich, einzelne SPH über einen längeren Zeitraum hinaus zu beobachten, so werden diese in kleinen Petrischalen in "liquid overlay" Technik kultiviert (Yuhas et al., 1977; Haji-Karim und Carlsson, 1978; Conger und Ziskin, 1983; Carlsson und Yuhas, 1984). Werden SPH in größerer Menge und möglichst einheitlicher Größe benötigt, ist die Kultivierung in Spinnerflaschen besser geeignet (Sutherland und Durand 1976+1984; Erlichman und Vidgen, 1984; Acker et al., 1984). In Spinnerflaschen ist auch eine bessere Kontrolle der Wachstumsbedingungen, insbesondere der Sauerstoffversorgung, gewährleistet

(Franko et al., 1984).

VI.1.2. Sphäroide als in vitro Tumormodell

Sphäroide werden über ihre Oberfläche mit Sauerstoff und Nährstoffen aus dem Kulturmedium versorgt, die durch Diffusion in den Zellverband eindringen. Die Zellen in den äußeren Schichten der SPH, die optimal versorgt sind, zeigen im Gegensatz zu den inneren Zellen eine hohe Proliferationsaktivität. Die detaillierte Erforschung dieses radialen Wachstumsprofils ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Erreichen die Aggregate einen bestimmten Durchmesser, kann ein Mangel an Sauerstoff, Glucose und anderen Substraten auftreten; es kommt zur Ausbildung von radialen Gradienten im Sauerstoffpartialdruck, der Glucosekonzentration und des pH-Wertes (Carlsson und Acker, 1988). Diese Mangelerscheinungen, wie auch die Anhäufung toxischer Stoffwechselprodukte, können zu Zelltod und Nekrose im Zentrum der Sphäroide führen (zur Übersicht siehe Müller-Klieser, 1987 und Sutherland, 1988). Der Abstand von der SPH-Oberfläche bis zur Tiefe, wo Nekrosen beobachtet werden, ist abhängig von Zelltyp und Kulturart und liegt zwischen 25 und 400 μm (Haji-Karim und Carlsson, 1978; Carlsson und Acker, 1988). Bei genügend langer Kulturdauer können Sphäroide Durchmesser von 1 bis 4 mm erreichen (Sweigert und Alpen, 1986; Mueller-Klieser, 1987).

Der Proliferationsgradient eines Sphäroids entspricht etwa dem von Mikrometastasen und intervaskulären Mikroregionen größerer Tumore (Sutherland, 1988): wenige Zellagen neben den Blutgefäßen teilen sich die Zellen exponentiell; mit zunehmendem Abstand von der Quelle für Sauerstoff, Nährstoffe und Wachstumsfaktoren nimmt die Wachstumsrate ab, bis sich die Zellen nicht mehr teilen und auch nekrotische Bereiche zu beobachten sind. Dadurch entsteht über diese Distanz sowohl im Tumor als auch in den Sphäroiden ein typisches Mikromilieu, das zu einer Heterogenität der Zellen und ihrer Umgebung führt. Aufgrund dieser Eigenschaften werden die Sphäroide zunehmend als in vitro Tumormodell in der Forschung eingesetzt (Sutherland et al., 1971; Sutherland und Durand, 1976).

Auch in der experimentellen Tumorthherapie hat sich das Sphäroidmodell durchgesetzt. Durch seine proliferationskinetischen Besonderheiten eignet es sich zum Test cytostatisch wirkender Agenzien, wobei auch Aussagen über deren Penetrationsvermögen gemacht werden können (Sutherland, 1986+1988; Nederman et al., 1981; Ehrlichman und Vidgen, 1984; Carlsson und Nederman, 1989; Schwachöfer, 1990 zur Übersicht siehe Müller-Klieser, 1987). Auch als strahlentherapeutisches Testmodell werden Sphäroide häufig eingesetzt. Hierbei richtet sich der Augenmerk besonders auf das Verhalten der hypoxischen und deshalb strahlenresistenten Tumorzellen, die in größeren Sphäroiden zu finden sind (Durand und Suther-

land, 1972; Dertinger und Hülser, 1981; Dertinger et al., 1983; Hinz und Dertinger, 1983; Anderer et al., 1990; Knedlitschek et al., 1990; zur Übersicht siehe Müller-Klieser, 1987 und Schwachöfer, 1990). Schließlich wird auch die Wirkung anderer Therapiemodalitäten an Sphäroiden simuliert wie Hyperthermie oder Kombinationsbehandlungen (Lücke-Huhle und Dertinger, 1977; Sutherland et al., 1987; Sutherland, 1988; Carlsson und Nederman, 1989; zur Übersicht siehe Müller-Klieser, 1987).

VI.1.3. Sphäroide zum Studium von Invasion und Metastasierung

Zum Studium der Invasion von Tumorzellen in normales Wirtsgewebe wurden verschiedene *in vitro* Modelle entwickelt, wobei oft Primärkulturen embryonaler Zellen als Wirt für Tumorzellen dienten (zur Übersicht siehe Mareel, 1980). Um nun die Vorteile von *in vitro* Experimenten mit dem Aufbau und der Gestalt eines *in vivo* Tumors zu verbinden, wurden schon bald Gewebeexplantate und Sphäroide auf diesem Forschungsgebiet eingesetzt. Dabrowska-Piaskowska (1959) beobachtete die Invasion von Tumorzellen in Muskelfragmente der Maus. Schleich (1973) verdeutlicht mit seinen Untersuchungen zur Konfrontation von normalem Gewebe mit Tumorzellen die Vorteile von SPH gegenüber Einzelzellsuspensionen bei der Invasion.

Mareel und seine Mitarbeiter (1979) entwickelten einen 'in vitro Invasionsassay' bei dem sie vorkultivierte Fragmente embryonaler Hühnerherzen mit Tumorsphäroiden konfrontierten. Sie zeigten dabei, daß 3-dimensionale Kulturen notwendig sind, um die invasive Kapazität von Tumoren aufrechtzuerhalten, da keine Invasion zu beobachten war, wenn Tumorzellen in Suspension auf einen Monolayer der Herzzellen aufgebracht wurden. Vergleichende Untersuchungen hierzu zeigen eine direkte Korrelation zwischen der Invasion *in vitro* und der Bildung invasiver Tumoren *in vivo* nach Implantation von Tumorzellen in syngeneische Mäuse (de Rieder und Laerum, 1981).

Bräuner und Hülser (1990) untersuchten den Zusammenhang von Tumorzellinvasion und Kommunikation über Gap Junctions, indem sie vorkultivierte Herzfragmente (s. Mareel et al., 1979) mit SPH aus Tumorzelllinien mit unterschiedlichem Kopplungsvermögen konfrontierten. Sie beobachteten dabei, daß weder Migration noch Proliferation der Zellen einen Einfluß auf den invasiven Vorgang haben. Nur Tumorzellen, die die Fähigkeit haben, mit ihren Wirtszellen über Gap Junctions zu kommunizieren, konnten aktiv in die "Herz-Zell-SPH" eindringen.

Auch in Untersuchungen zur Bildung von Metastasen werden SPH eingesetzt. Umbreit und Erbe (1979) untersuchten das Ablösen von Zellen von Tumorsphäroiden und das Anheften dieser Zellen an Aggregate aus Hamsterfibroblasten, wobei die Trennung homologer Zellen und die Verbindung heterologer Zellen eine für Krebszellen spezifische Eigenschaft zu sein scheint. MacDonald und Sordat (1980) implantierten Tumorsphäroide an verschiedenen Stellen in Mäusen und konnten daraufhin die Entwicklung verschiedener Metastasentypen beobachten. Landry et al. (1981) zeigten an EMT6/Ro-SPH *in vitro*, daß "cell-shedding", das Ablösen der Zellen von der SPH-Oberfläche, wahrscheinlich der erste Schritt in der metastasierenden Ausbreitung von Tumorzellen ist. Nach Implantation dieser SPH in die Peritonealhöhle von Mäusen erzeugten die von der SPH-Oberfläche abgespaltenen Zellen sekundäre Tumoren in der Bauchhöhle der Tiere.

VI.1.4. Sphäroide zum Studium der Tumor-Wirt-Wechselwirkung

Multizelluläre SPH sind ein gutes Modell zum Studium der Wirtsimmunität gegenüber soliden Tumoren. Hierzu werden die SPH in die Peritonealhöhle von normalen oder immundefizienten Mäusen implantiert, nach unterschiedlichen Zeitintervallen wieder entnommen und auf die Infiltration von Wirtszellen und die Zerstörung des Tumorgewebes hin untersucht, wobei sogar eine quantitative Bestimmung dieser beiden Parameter möglich ist: die Zellen der SPH können durch mildes Trypsinieren in eine Einzelzellsuspension überführt werden und alle darin enthaltenen Zellen können ohne Verlust der Vitalität gewonnen werden. Das SPH-Modell hat somit große Vorteile gegenüber anderen Modellen. Beim Benutzen der "Schwamm-Matrix" (ein mit Fibroblasten infiltrierter Celluloseschwamm wird implantiert) können nur die infiltrierenden Wirtszellen gewonnen werden und es kann keine Wirkung auf das Implantat selbst beobachtet werden. Aus Gewebetransplantaten können nur qualitative Schätzungen über die Zerstörung des Tumorgewebes gewonnen werden (Mac Donald und Sordat, 1980; Lord et al., 1980; Lord und Nardella, 1980; Wilson und Lord, 1987).

VI.1.5. Zell-Zell Kontakte in Sphäroiden

Die Zellen im Sphäroidverband sind durch extrazelluläre Matrix (Nederman et al., 1984; Landry et al., 1985; Mulcahy et al., 1985; Kawata et al., 1991), Zellfortsätze und eine Vielzahl von Zell-Zell-Verbindungen (Desmosomen, Tight Junctions und Gap Junctions) miteinander verbunden (Sutherland et al., 1971; Sutherland und Durand, 1976; Bräuner und Hülser, 1990; Knuechel et al., 1990; Bridges et al., 1991).

Extrazelluläre Matrix (ECM) wird in vivo von den Zellen in die Umgebung abgegeben und dient als amorphe Grundsubstanz der Gewebe. Sie ist wichtig bei der Morphogenese (Toole, 1976; Ekblom et al., 1980; Kawata et al., 1991), Differenzierung und Proliferation von Zellen (Gospodarowicz et al., 1978; Loring et al., 1982; Grover et al., 1983). Bestandteile der ECM wie Fibronectin, Laminin, Collagen und Glycosaminoglycane wurden in SPH verschiedener Tumorzelllinien nachgewiesen; zwischen Zellen im ML werden diese Materialien nicht abgelagert (Nederman et al., 1984).

Gap Junctions sind auf Grund ihrer Eigenschaften von besonderem Interesse (Sutherland, 1988): sie spielen wahrscheinlich eine regulatorische Rolle in der Embryonalentwicklung, in Wachstum und Differenzierung (siehe Anhang VI.2. "Gap Junctions"). Hülser und Brümmer (1982) konnten in SPH sogar Unterschiede in der Zell-Zell-Kommunikation in Abhängigkeit vom Alter der SPH messen und führten dies auf eine stufenweise erfolgte Schließung der Gap Junction Poren zurück. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit ihrer Rolle bei der Regulation der Zellproliferation.

VI.1.6. Zelldifferenzierung in Tumorzell-Sphäroiden

Ein besonderes Merkmal der Sphäroide ist die Induktion morphologischer und funktioneller Zelldifferenzierung. Schon Mc Allister und seine Mitarbeiter (1967) fanden eine ausgesprochene Ähnlichkeit zwischen den cytologischen Merkmalen von primären Tumoren, den entsprechenden Kolonien in Soft-Agar und den Tumoren, die durch Implantation kultivierter Zellen induziert wurden. Dies wurde an weiteren Tumorsystemen bestätigt (Yuhas et al., 1977; Erlichman und Vidgen, 1984; Rofstad und Sutherland, 1989; Knuechel et al., 1990). Die folgenden Beispiele sollen eine Vorstellung von den in Sphäroiden beobachteten Differenzierungsprozessen geben.

Sphäroide menschlicher Darm-Adenocarcinomzellen entwickeln pseudoglanduläre Strukturen im Bereich der ruhenden Zellen der vitalen Randschicht wie sie Tumoren in vivo zeigen. Sie produzieren acht mal mehr carcinoembryogenes Antigen als ML und zeigen beträchtliche Unterschiede in der Sauerstoffversorgung innerhalb eines Sphäroids (Sutherland, 1988). Acker und seine Mitarbeiter (1990) konnten eine weitere funktionelle Differenzierung von SPH einer Darm-Carcinom-Zelllinie beobachten: sie untersuchten die Produktion angiogener Faktoren durch Tumorzellen und beobachteten, daß SPH die Zellteilung von Endothelzellen von Blutgefäßen in weit größerem Maßstab stimulieren als ML. Donaldson und seine Mitarbeiter (1990) beobachteten in SPH einer Prostata-Carcinom-Zelllinie ebenfalls das typische Adenocarcinombild und untersuchten die für diese Zellen typische p40-Antigen Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation der Zellen im SPH. In den äußeren Zellen entsprach die

p40-Aktivität den ML-Zellen, in Richtung SPH-Mitte war ein 2-facher Anstieg zu beobachten. Eine Gradientenbildung wurde auch in der metabolischen Aktivität der Zellen festgestellt: außen im SPH sind metabolisch aktive Zellen, innen im SPH sind die Zellen metabolisch inaktiv.

Grover und seine Mitarbeiter (1983) konnten die Ausbildung eines Epithels in den äußeren Schichten von embryonalen Carcinomzell-SPH beobachten und dabei sechs Stadien unterscheiden: Aggregation, Proliferation, Differenzierung, Organisation (Ausbildung einer Basalmembran), Reifung und Sekretion von Alphafötoprotein. Dabei können die Zellen der äußeren Schicht des 3-dimensionalen Zellverbandes nicht als unabhängige Zelllinie, die Alpha-fötoprotein synthetisiert, isoliert werden. Diesen Differenzierungsgrad behalten die Zellen nur im Kontakt mit den inneren, wenig differenzierten Zellen.

Karbach et al. (1991) beobachteten in SPH eines chemisch induzierten Rattenmyosarkoms die Ausbildung von Myotuben in tiefer liegenden Schichten der SPH. Verbunden mit dieser morphologischen Differenzierung ist eine Reduktion der Proliferation der Tumorzellen.

VI.1.7. Differenzierung in Sphäroiden aus normalen Zellen

Auch aus Zellen, die frisch aus einem Tier isoliert wurden, lassen sich SPH gewinnen und verschiedene Merkmale des in vivo-Gewebes feststellen. Zellaggregate aus verschiedenen embryonalen Gewebeanlagen von Hühnchen und Maus differenzieren entsprechend dem in vivo-Gewebe und zeigen die dafür typischen morphologischen Strukturen. Die zelluläre Differenzierung fötaler Hirnzellen in SPH-Kultur zeigt einen ähnlichen Zeitverlauf in ihrer Entwicklung wie das zentrale Nervensystem der Ratte in vivo (Trapp et al., 1979; Matthieu et al., 1981). Die einfache Handhabung und die Möglichkeit zur Gewinnung ausreichender SPH-Mengen für biochemische und morphologische Analysen erschlossen neue Möglichkeiten in der Entwicklungsbiologie.

Normale Zellen aus adultem, differenziertem Gewebe können in ihrem differenzierten und aktiv funktionierenden Zustand über Wochen als SPH kultiviert werden (Schilddrüsenzellen-SPH - Lissitzky et al., 1971; SPH aus Inselzellen des Pankreas - Ono et al., 1979; Hepatocyten-SPH - Landry et al., 1985 + Walser et al., 1991; SPH aus Epithelzellen der Atemwege der Nase - Bridges et al., 1991).

VI.2. Gap Junctions

VI.2.1. Einleitung

Gap Junctions (GJ) sind Träger der direkten Zell-Zell-Kommunikation und sind in den meisten Geweben der verschiedensten Tierstämme zu finden. Nur in einigen enddifferenzierten Zellen (Skelettmuskel, zirkulierende Blutzellen, einige Nervenzellen) sind sie nicht mehr vorhanden (Grieppe und Revel, 1977; Pitts, 1990). Tierische Zellen verschiedenster Arten bilden auch in Kultur funktionierende Gap Junctions aus (Lawrence et al., 1978; Flagg-Newton et al., 1981; Dertinger und Hülser, 1984; Traub et al., 1987; Lasater et al., 1987; Santos und Rojas, 1987; Brümmer, 1988).

Ihren Namen erhielten diese Junctions nach der Sichtbarmachung auf elektronenmikroskopischen Bildern von Dünnschnitten von Herz- und Leberpräparaten, wo ein deutlicher Spalt (engl.: gap) zwischen benachbarten Zellmembranen zu erkennen war (Revel und Karnovsky, 1967). An Tangentialschnitten im Bereich von Gap Junctions konnten die Autoren hexagonal gepackte Strukturen erkennen. Weiteren Einblick in den Aufbau und die Struktur der Gap Junctions lieferten unterschiedliche Fixierungs- und Färbetechniken bei Dünnschnitten (Zampighi und Simon, 1985; Page und Manjunath, 1985; Hanna et al., 1985; Miller und Goodenough, 1986) sowie Gefrierbruchpräparationen (Hanna et al., 1985; Miller und Goodenough, 1985+1986). Eine exakte Analyse der Struktur wurde durch die Isolation von Gap Junctions erreicht, die auf der Detergenz- und Alkaliresistenz dieser Membranstrukturen beruht (Hertzberg, 1984). Sie ermöglichte Röntgenstrukturanalysen (Makowski et al., 1977; Makowski, 1985) und die Auswertung von Elektronenbeugungsbildern (Unwin und Zampighi, 1980; Zampighi und Simon, 1985).

VI.2.2. Struktur der Gap Junctions

Gap Junctions sind Membranbereiche, in denen sich eine Anhäufung von Proteinkanälen befindet, die das Cytoplasma benachbarter Zellen direkt verbinden. Dabei wird von jeder Zelle ein Halbkanal (Connexon; lat.: conexio = Verknüpfung) aus sechs Proteinen (Connexine) gebildet. Diese sechs Untereinheiten sind symmetrisch im Phospholipid-Bilayer der Zellmembran angeordnet (Abb. 1). Jedes dieser Connexine hat einen cytoplasmatischen, einen transmembranen und einen extrazellulären Anteil. Die extrazellulären Bereiche der Connexone zweier Zellen lagern sich zusammen und ermöglichen somit die Ausbildung eines transmembranen Kanals, wobei der charakteristische Abstand ("gap") von 2-3 nm zwischen den Zellmembranen erhalten bleibt.

Die genauen Abmessungen der Kanäle sind abhängig von Gewebe, Isolierung und Fixierung. Ein Connexon hat 6,5-8,5 nm Durchmesser, eine Länge von 7,5 nm und die Entfernung von Mittelpunkt zu Mittelpunkt der Connexone beträgt 8-10 nm. Der Porendurchmesser von 1,5 - 2 nm begrenzt die Auswahl der über Gap Junctions austauschbaren Moleküle: nur Ionen und Moleküle mit einer Größe bis zu 1500 Dalton (anorganische Ionen, Zucker, Aminosäuren, kleine Peptide, Nukleotide, Vitamine) können die interzellulären Kanäle passieren, Makromoleküle wie Proteine, Nukleinsäuren und Polysaccharide können nicht ausgetauscht werden (Bennett et al., 1981; Pitts et al., 1985; Green, 1988; Übersicht bei Dermietzel et al., 1990).

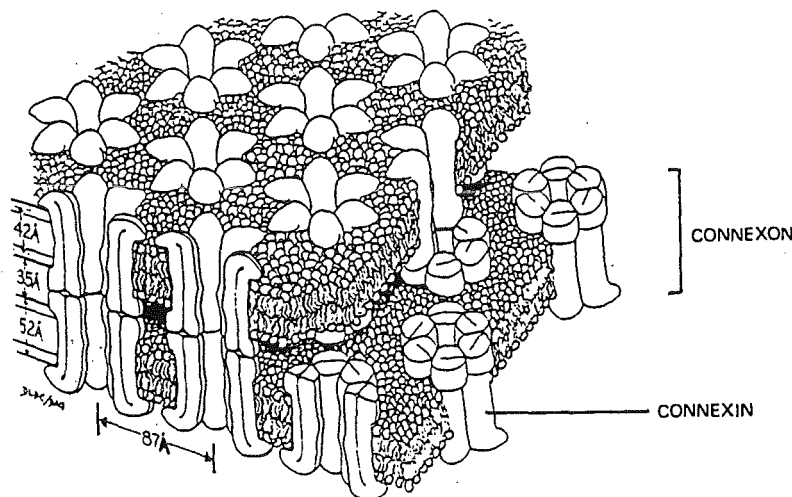


Abb. 1: Schematische Darstellung der Struktur von Gap Junctions (aus Makowski et al., 1977).

Die Porenweite der Connexone ist variabel und der Mechanismus zur Regulation ist eine viel-diskutierte Fragestellung. Möglich wäre ein koordiniertes Gleiten und Kippen der Connexine (Unwin und Zampighi, 1980; Unwin und Ennis, 1984; Zampighi und Simon, 1985). Eine weitere Kontrollmöglichkeit wäre eine "Gating Domain" auf der cytoplasmatischen Seite der Gap Junctions. Durch lokale Bewegung (Rotation) eines Proteins (6 Untereinheiten mit 1 - 1,5 KD) könnte die Permeabilität des Kanals kontrolliert werden (Makowski, 1985). Auch andere Mechanismen, wie z. B. die Anordnung der einzelnen Connexone im GJ-Areal, werden diskutiert (Miller und Goodenough, 1985; Schmitz und Wolburg, 1991; zur Übersicht siehe Hanna et al., 1985).

VI.2.3. Physiologische Funktionen der Gap Junctions

Der Kanaldurchmesser der GJ ermöglicht sowohl eine elektrische als auch eine metabolische Kopplung der Zellen. In erregbarem Gewebe besteht die Aufgabe der GJ in der Weiterleitung von Ionen; sie sind somit wichtig für die schnelle Ausbreitung von Impulsen (Nervenzellen) und die Synchronisation gekoppelter Elemente (Herzmuskel). In nicht-erregbarem Gewebe besteht durch das Netz der GJ ein Transportsystem, das den Austausch verschiedenster Metabolite und Signalstoffe ermöglicht und somit eine Gewebemöostase, d. h. eine Gleichschaltung der Zellen ermöglicht (Hertzberg, 1985; Spray und Bennett, 1985; Green, 1988). Als Beispiel für eine metabolische Kopplung sei hier die Augenlinse von Vertebraten erwähnt. Sie ist relativ groß und nicht vaskularisiert. Hier könnten über GJ Nährstoffe ins Linseninnere und Abfallprodukte des Stoffwechsels nach außen in die Epithelschicht transportiert werden (Revel und Yancey, 1985).

Ein Beispiel für ionische und metabolische Kopplung über GJ sind die Studien von Lawrence et al. (1978). In Kokulturen von Granulosazellen (Ratte) und Herzzellen (Maus) kann parallel zur Ausbildung von GJ eine "Kreuz-Stimulation" der Zellen beobachtet werden. Granulosazellen antworten auf FSH (Folikel-stimulierendes Hormon) mit der Produktion des Plasminogenaktivators. Herzzellen, die keinen Rezeptor für dieses Hormon haben, erhöhen ihre Schlagfrequenz nach Zugabe von FSH, wenn GJ zwischen den verschiedenen Zelltypen ausgebildet werden. Umgekehrt erhöht die Zugabe von Adrenalin (stimuliert nur Herzzellen) die Menge an Plasminogenaktivator in Granulosazellen. Als mögliches "Kommunikationsmolekül" wird der GJ-permeable second messenger cAMP diskutiert. Sind zwei Herzzellen über eine Granulosazelle gekoppelt, so wird ihr Schlag synchronisiert, was auf den Transfer von Ionen zwischen den getrennten Herzmuskelzellen hinweist.

VI.2.4. Messung der Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions

Die elektrische und metabolische Kopplung der Zellen über GJ ermöglicht die Ergänzung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen durch physiologische Messungen (Spray und Bennett, 1985; Green, 1988; siehe auch II.7.). Die Messung der elektrischen Kopplung erfolgt mit Hilfe der Mikroelektrode-technik (Dertinger und Hülser, 1984). Der interzelluläre Transfer von Farbstoffen mit entsprechend geringem Molekulargewicht, wie z. B. Lucifer Yellow, kann direkt beobachtet werden (Farbstoffkopplung; Brümmer, 1988) oder es wird die Weiterleitung radioaktiv markierter Metabolite verfolgt (Autoradiographie; Pitts et al., 1985).

VI.2.5. Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung der Gap Junction-Proteine

Die Isolierung von Gap Junctions aus verschiedenen Geweben und anschließende Gelelektrophorese der Proteine (SDS-PAGE) ermöglichte die Bestimmung des relativen Molekulargewichtes der Gap Junction Proteine. Zur Zeit umfaßt die Connexin-Familie Proteine mit relativen MGs von 16 KD bis 70 KD. Hierbei ergaben sich nicht nur deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Geweben sondern auch innerhalb eines Gewebes wurden verschiedene GJ-Proteine gefunden (zur Übersicht siehe Revel et al., 1985; Beyer et al., 1990 und Dermietzel et al., 1990). Am besten untersucht sind die Gap Junctions in Leber, Herz und Augenlinse.

Die biochemische Analyse der Leber-GJ gibt Hinweise auf zwei Haupt-GJ-Proteine unterschiedlicher Größe: 26-28 KD und 21 KD (Page und Manjunath, 1985; Hertzberg, 1985; Traub et al., 1982+1987; Nicholson und Zhang, 1988). Der Anteil des 21 KD-Proteins an der GJ-Fraktion ist artspezifisch. In der Ratte sind es etwa 10%, in der Maus 35-50% der isolierten Gap Junctions (Revel et al., 1986; Nicholson und Zhang, 1988; Traub et al., 1989). Die Proteine sind gemeinsam in einem GJ-Plaques zu finden, wobei noch nicht eindeutig geklärt ist, ob die Connexone aus Homopolymeren (Nicholson et al., 1987) oder Heteropolymeren (Traub et al., 1989) bestehen. Das 27 KD-Protein ist auch in vielen anderen Geweben der Ratte (Bauchspeicheldrüse, Niere Magen, Hirn) identifiziert worden (Hertzberg, 1985).

Aus Herz-GJ wurden lange Zeit nur Proteine mit 43-47 KD (Page und Manjunath, 1985; Revel et al., 1986; Yancey et al., 1989) isoliert. Verbesserte Isolationstechniken bei niedriger Temperatur ermöglichten auch hier das Auffinden eines zweiten GJ-Proteins mit 70 KD (Harfst et al., 1990). Beide Proteine sind Bestandteile der GJ von Herzmuskelzellen, ob sie jedoch gemeinsam innerhalb eines GJ-Plaques vorkommen, ist noch nicht geklärt.

Aus den Faserzellen der Augenlinse wurden ebenfalls mehrere GJ-Proteine isoliert, von denen das MIP26 (main intrinsic protein - rel. MG: 26 KD) und das MP70 (membrane protein - rel. MG: 70KD) mit seinem in vivo Proteolyseprodukt MP38 am häufigsten diskutiert werden (Gorin et al., 1984; Kistler et al., 1985+1988; Revel et al., 1986).

Durch partielle Sequenzierung dieser GJ-Proteine aus Leber, Herz und Augenlinse wurde eine Homologie zwischen allen Connexinen mit Ausnahme von MIP26 festgestellt (Dermietzel et al., 1990). MIP26 ist linsenspezifisch. Bei einem von Finbow et al. (1983, 1985, 1990) beschriebenen 16 KD GJ-Protein, das in verschiedenen Geweben unterschiedlicher Tierspecies und auch in Zellkulturen gefunden wird und keinerlei Homologie zu anderen Connexinen aufweist, handelt es sich möglicherweise nicht um ein "echtes" GJ-Protein.

Die biochemischen Unterschiede zwischen den einzelnen Gap Junction-Typen spiegeln sich auf struktureller und/oder physiologischer Ebene wieder. Elektronenmikroskopische Aufnahmen isolierter Gap Junction-Bereiche von Leber und Herz zeigen bereits deutliche Unterschiede: auf der cytoplasmatischen Seite von Herz-GJ sind "faserige Proteinteile" zu erkennen, während Leber-GJ eine glatte Plasmamembran im Bereich von Gap Junctions zeigen. Auf Bildern von Gefrierbruchpräparationen ist dieses strukturelle Unterscheidungsmerkmal durch eine partikuläre (Herz) bzw. eine glatte (Leber) cytoplasmatische Oberfläche zu erkennen (Page und Manjunath, 1985; Revel et al., 1986). In der Augenlinse sind zwei morphologisch unterschiedliche Gap Junction-Typen auch physiologisch zu unterscheiden: GJ zwischen Epithelzellen (homotypische GJ) zeigen eng gepackte Connexone und reversible Entkopplung bei Erniedrigung des pH-Wertes; GJ zwischen Epithelzellen und Faserzellen (heterotypische GJ) bzw. zwischen Faserzellen enthalten eine zufällmößigere Verteilung der Connexone und koppeln auch nach Erniedrigung des pH-Wertes (Miller und Goodenough, 1986).

Die Klonierung und Sequenzierung der cDNAs vieler GJ-Proteine (Paul, 1986; Kumar und Gilula, 1986; Heynkes et al., 1986) ermöglichte die Aufklärung der vollständigen Aminosäuresequenzen (AS) und anhand dieser Daten die Berechnung der tatsächlichen Molekulargewichte. Eine Liste der sich zur Zeit ständig erweiternden Familie der Connexine ist in der folgenden Tabelle aufgeführt (Gorin et al., 1984; Kistler et al., 1988; Nicholson und Zhang, 1988; Dermietzel et al., 1990; Beyer et al., 1990).

GJ-Quelle	Molekulargewicht [KD]		
	nach SDS-PAGE	nach vollst. Sequenzierung	% der homologen Aminosäuren
Leber (Ratte)	26-28	Connexin32	
	21	Connexin26	63% zu Con32
Herz (Ratte)	43-47	Connexin43	43% zu Con32
Augenlinse	MIP26	Connexin28	keine!
	MP70/MP38 ?	Connexin46	zu Con32+43
Leber (Xenopus)		Connexin30	71% zu Con32
Oocyten und Embryos (Xenopus)		Connexin38	40% zu Con32

Tab. 1: Molekulargewichte der verschiedenen Connexine und Homologie der Aminosäuren.

In Ergänzung zur Primärstruktur der Connexine ermöglichten Hydropathie-Plots (Paul, 1986; Nicholson und Zhang, 1988) und Proteolysestudien in Zusammenhang mit Immuncytochemie (Zimmer et al., 1987, Hertzberg et al., 1988; Yancey et al., 1989) die Konstruktion eines to-

pologischen Modells zur Anordnung der Polypeptide in der Zellmembran (Abb. 2). Alle bisher sequenzierten Connexine (mit Ausnahme von MIP26) haben vier hydrophobe, transmembrane Domänen, die durch hydrophile Bereiche getrennt sind; N- und C-terminales Ende sowie eine weitere Untereinheit sind auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert. Die Untereinheiten der verschiedenen Connexine unterscheiden sich, mit Ausnahme vom Aminoende, deutlich sowohl in der Länge als auch in der Sequenz. Diese Unterschiede dienen möglicherweise zur Regulation der GJ in unterschiedlichen Geweben (Dahl et al., 1987; Werner et al., 1991) oder ermöglichen eine physiologische Kontrolle der Porenöffnungsweite verschiedener Connexine innerhalb eines Gewebeverbandes (Traub et al., 1989). Die beiden extrazellulären "loops" haben sich im Verlauf der Phylogenese kaum verändert. Sie zeigen eine starke Homologie in der Aminosäuresequenz (ca. 90%) zwischen den verschiedenen Connexinen und ermöglichen so eine heterologe Interaktion von Connexonen verschiedener Proteine (zur Übersicht siehe Hertzberg, 1985; Dermietzel et al., 1990 und Beyer et al., 1990). MIP26 hat im Gegensatz zu den meisten GJ-Proteinen wahrscheinlich sechs transmembrane Bereiche (Gorin et al., 1984; Revel und Yancey, 1985; Revel et al., 1986), wobei jeweils vier Proteine ein Connexon aufbauen (Ehring et al., 1990).

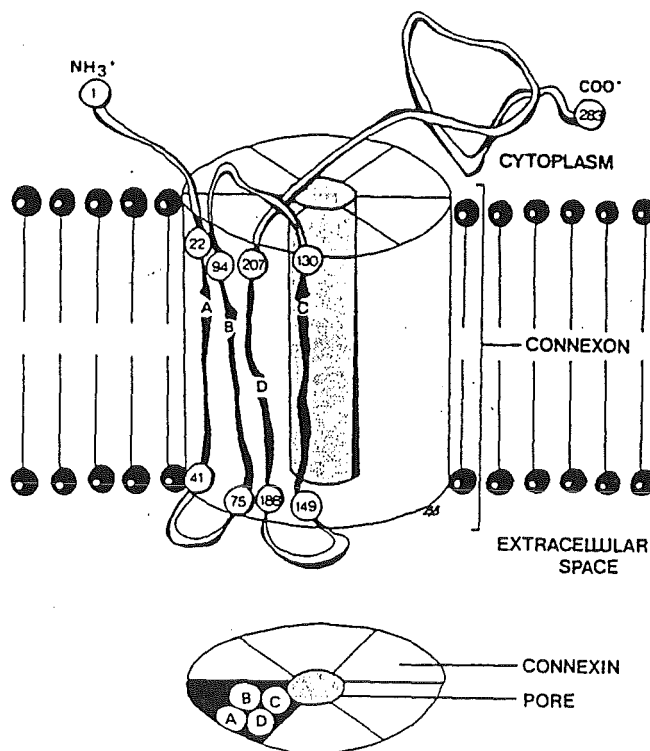


Abb. 2: Topologisches Modell der molekularen Anordnung eines einzelnen Connexons. Die vier transmembranen Connexin-Domänen sind mit A-D bezeichnet. Die AS-Übergänge von der hydrophilen extramembranen Domäne zur hydrophoben Domäne sind numeriert. Der untere Teil des Bildes zeigt die hypothetische Struktur eines Connexon-Halbkanals im Querschnitt (aus Dermietzel, 1990).

VI.2.6. Antikörper gegen Gap Junction-Proteine

Verbesserte Isolationstechniken der GJ-Proteine ermöglichten den Zugriff auf größere Proteinmengen und somit die Gewinnung von Antikörpern gegen das 21 KD- und 27 KD-Leber-GJ-Protein (Traub et al, 1982; Hertzberg, 1985), gegen das MP70 der Augenlinse (Kistler et al., 1985) sowie gegen das 43 KD-Herz-GJ-Protein (Yancey et al., 1989). Die Verfügbarkeit dieser Antikörper ermöglichte die genauere Untersuchung der Rolle der GJ besonders in Bezug auf Zellwachstum und Entwicklung (z. B. Warner et al., 1984; Fraser et al., 1987).

In verschiedenen Primärzellkulturen und in etablierten Zelllinien hemmt die Injektion von affinitätsgereinigten Antikörpern gegen das 27 KD Leber-GJ-Protein sowohl die Farbstoffausbreitung als auch die elektrische Kopplung (Hertzberg und Spray, 1985; Hertzberg et al., 1985; Brümmer, 1988). Durch die gezielte Unterbrechung der interzellulären Kommunikation über GJ (Farbstoff- und ionische Kopplung) durch Injektion von Antikörpern gegen das 27 KD Leber-GJ-Protein in eine bestimmte Zelle im 8-Zell-Stadium des Krallenfrosches *Xenopus* konnten Warner et al. (1984) charakteristische Abnormalitäten auf Grund fehlender Differenzierungsprozesse der entsprechenden Zellen in den sich entwickelten Kaulquappen feststellen (s. auch VI.2.9.).

VI.2.7. Regulation der Permeabilität der Gap Junction Kanäle

Der Kommunikationsgrad der Zellen wird durch die Anzahl der Kanäle, ihre Größe, den Öffnungsgrad und den Zeitraum, in dem sie geöffnet sind, bestimmt. Die Kanalgröße ist abhängig vom Connexin-Typ (s. o.); die drei anderen Faktoren lassen sich auf zwei Arten regulieren:

(1) Über die Kurzzeit-Regulation (Sekunden bis Minuten); sie bestimmt den Öffnungsgrad und die Öffnungszeit der Kanäle ("gating") und beinhaltet alle Mechanismen, die die Membranpermeabilität direkt am Kanal regulieren. Eine Verringerung der Kanalpermeabilität kann bewirkt werden durch eine Erhöhung der elektrischen Spannung (Furshpan und Potter, 1959; Spray et al., 1984; Giaume und Korn, 1985; Spray und Bennett, 1985; Campos de Carvalho, 1988), eine (unphysiologische) Erhöhung der Calciumionenkonzentration (Spray et al., 1984+1985; Spray und Bennett, 1985; Peracchia, 1987; Zimmer et al., 1987; Campos de Carvalho, 1988; Spray, 1990) oder eine (ebenfalls unphysiologische) Erniedrigung des pH-Wertes (Spray et al., 1984+1985; Campos de Carvalho, 1988; Spray, 1990). Veränderungen der Konzentrationen cyclischer Nucleotide können ebenfalls die Kanalpermeabilität ändern (Lasater und Dowling, 1985; Saez et al., 1986; Lasater, 1987; Traub et al., 1987; De Mello, 1984+1988; Burt und Spray, 1988; Campos de Carvalho, 1988; Spray, 1990).

(2) Über die Langzeit-Regulation (Stunden bis Tage), die die Anzahl der zur Verfügung stehenden Kanäle beeinflusst. Hierzu zählen Mechanismen, die mit Synthese, Einbau und korrekter Anordnung, sowie Entfernung und Abbau der GJ-Proteine im Zusammenhang stehen. Der second messenger cAMP wird dabei als ein Hauptregulator von vielen Autoren diskutiert (Azarnia et al., 1981; Flagg-Newton et al., 1981; Wiener und Loewenstein, 1983; Loewenstein, 1985; Cole und Garfield, 1986; Traub et al., 1987; Campos de Carvalho, 1988; Miller et al., 1988; Spray, 1990). Auch Einflüsse von Adhäsionsmolekülen (CAMs) oder Komponenten der Extrazellulärmatrix auf die Expression der Connexine bzw. der entsprechenden mRNA sind hier von Bedeutung (Spray et al., 1987; Watanabe et al., 1987; Mege et al., 1988).

VI.2.8. Biochemische Entkopplung der Gap Junctions

Eine große Anzahl von Stoffen beeinflusst die Kopplung von Zellen, wobei große Unterschiede im Wirkmechanismus bestehen. Die folgende Tabelle enthält eine Auswahl von Stoffen, die entkoppelnde Wirkung haben (man bezeichnet sie daher häufig als "Entkoppler") und ihre in der Literatur diskutierte Wirkungsweise (Mufson et al., 1979; Fitzgerald et al., 1983; Miyake et al., 1984; Slaga et al., 1980; Jeffrey und Liskamp, 1986; Castagna, 1987; Iizuka et al., 1989; O'Brian und Ward, 1989; Runyan et al., 1990; zur Übersicht siehe Spray und Bennett, 1985; Brümmer, 1988).

Alle diese Stoffe (siehe nachfolgende Tabelle) beeinflussen auch andere Eigenschaften der Zelle, wodurch es schwierig ist, einen direkten Zusammenhang der Regulation der GJ zum untersuchten Prozeß (z. B. Wachstumskontrolle) herzustellen.

Entkoppler	Wirkungsweise/Wirkort
Mezerein	"second-stage" Tumorpromotor Aktivierung der Proteinkinase C - Aktivierung der PKA über die PKC - Phosphorylierung des H^+/Na^+ -Carriers durch die PKC (-> Erniedrigung des pH-Wertes) Aktivierung der Adenylatcyclase (direkt oder über die PKC)
Phorbolster	Tumorpromotoren Aktivierung der Proteinkinase C (s. Mezerein) Reduktion der PKC-Aktivität nach Aktivierung (Autoregulation) unspezif. Anlagerung an das GJ-Protein Reduzierung der funktionsfähigen Kanäle - Internalisierung ganzer GJ-Plaques - Reduzierte GJ-Bildung Beeinflussung der Fluidität der Lipidmoleküle in der Zellmembran Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase (-> Erhöhung der Na^+ -Konzentration -> Erhöhung der Ca^{2+} -Freisetzung aus Mitochondrien)
Retinsäure	Antagonist zu einer Reihe von Tumorpromotoren direkte Wirkung auf das Kanalprotein ist unwahrscheinlich indirekte Wirkung über Ca^{2+} , H^+ oder cAMP ist unwahrscheinlich evtl. Einlagerung in die Membran
Chlorpromazin Trifluoperazin Calmidazolium	Calmodulin-Antagonisten
Heptanol/Oktanol	- indirekte Wirkung über Ca^{2+} oder H^+ (intrazellulärer Wirkort) - direkte Wirkung auf das Kanalprotein (extrazellulärer Wirkort)
Glutaraldehyd Formaldehyd	Quervernetzung von Membranproteinen

Tab. 2: Wirkung verschiedener, die interzelluläre Kommunikation unterbindender Agenzien.

VI.2.9. Rolle der Gap Junctions in der Embryonalentwicklung

Die GJ wurden auf Grund ihrer Eigenschaften (passiver Transport von Molekülen bis 1500 D) schon bald als möglicher Weg von Signalstoffen vorgeschlagen, wie sie für Zellwachstum, Ausbildung von Gewebemustern und Differenzierung von Zellen erforderlich sind (zur Übersicht siehe Bennett et al., 1981; Lo, 1985). Die Zell-Zell-Kommunikation ermöglicht jedoch nicht nur die direkte Weiterleitung solcher Stoffe, sondern auch den Aufbau chemischer Gradienten durch den gezielten Einsatz der GJ, wodurch zu bestimmten Zeiten in der Embryonalentwicklung nur zwischen bestimmten Zellen Ionen und Moleküle entsprechender Größe ausgetauscht werden können. Dies führt zu einem räumlichen Muster verschiedener Zelltypen durch positionsspezifische Information innerhalb des Embryos (Warner und Lawrence, 1982; zur Übersicht siehe Caveney, 1985). Für die Kompartimentierung und Segmentierung als Folge einer gezielten Kontrolle der GJ-vermittelten Zellkommunikation gibt es zahlreiche Beispiele (Lo und Gilula, 1979; Warner und Lawrence, 1982; Warner et al., 1984; Fraser et al., 1987; Winterhager et al., 1988+1991).

VI.2.10. Rolle der Gap Junctions bei Proliferation und Differenzierung

Aus der Regulation der Zell-Zell-Kommunikation über sekundäre Botenstoffe ergibt sich für ein normales Gewebe die Möglichkeit, Zellwachstum, Differenzierung und weitere Funktionen zu modulieren. Als Beispiel sei hier die Wachstumskontrolle der Haut angeführt. Die Basalzellen der Epidermis zeigen ein kontrolliertes Wachsen und Teilen, das den Verlust der enddifferenzierten Zellen an der Hautoberfläche ausgleicht. Pitts und Mitarbeiter haben auf Grund ihrer Untersuchungen (Kam und Pitts, 1988; Pitts, 1990) ein Modell zur Proliferationskontrolle in der Epidermis vorgeschlagen: in jeder Kommunikationseinheit der Epidermis diffundieren second messengers, die in der Basalzelle gebildet werden, über GJ in die darüberliegenden differenzierenden Zellen. Erhöht sich die über GJ-verbundene Zellzahl, so fällt die Konzentration des second messengers unter einen Schwellenwert und die Zellteilung wird gestoppt. Löst sich eine differenzierte Zelle von der Hautoberfläche ab, so kann wieder eine Zellteilung erfolgen. Diese interzelluläre cytoplasmatische Homöostase einer Proliferations-einheit auf Grund von GJ führt somit zu einer Beeinflussung der durch Wachstumsfaktoren stimulierten Zellteilung in den Basalzellen durch die Hautdicke.

VI.2.11. Gap Junctions und Carcinogenese

Störungen der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions werden als eine mögliche Ursache im mehrstufigen Prozeß der malignen Entartung in Betracht gezogen, da bei Krebs-

zellen veränderte Eigenschaften der Zell-Zell-Kommunikation im Vergleich zu den entsprechenden normalen Zellen festgestellt wurden. Erste Untersuchungen durch Loewenstein und seine Mitarbeiter (Loewenstein und Kanno, 1966+1967; Loewenstein, 1979) zeigten eine starke Reduktion oder sogar eine vollständige Unterbrechung der GJ-vermittelten Zellkommunikation in soliden Tumoren und bei Krebszellen in Kultur. Andere Autoren konnten jedoch auch an Tumorzellen eine Kopplung über GJ nachweisen (Hülser und Webb, 1973) oder fanden Tumore mit unveränderter interzellulärer Kommunikation (Weinstein und Pauli, 1986). Für einen Zusammenhang dieser beiden Faktoren (GJ und Krebs) spricht auch die entkoppelnde Wirkung von Tumorpromotoren, wie sie von vielen Autoren beschrieben wird (Murray und Fitzgerald, 1979; Yotti et al., 1979; Fitzgerald et al., 1983; McKay et al., 1983; Enomoto und Yamasaki, 1985; Budunova et al., 1989; Aylsworth et al., 1989). Tatsächlich führt die Behandlung mit Phorbolestern (Tumorpromotoren der Haut) in Zellen des Chinesischen Hamsters (V79) *in vitro* (Yancey et al., 1982) wie auch in der Epidermis der Maus *in vivo* (Kalimi und Sirsat, 1984) zu einer Verringerung der Anzahl von Gap Junctions. Im Einklang mit dieser Vorstellung steht auch die Beobachtung, daß eine Behandlung von Ratten mit dem leberspezifischen Tumorpromotor Phenobarbital die Menge der mRNA des GJ-Proteins Connexin32 verringert (Yamasaki, 1990). Dieser hemmende Effekt von Phorbolestern auf die interzelluläre Kommunikation kann durch Substanzen, die den intrazellulären cAMP-Gehalt erhöhen, aufgehoben werden (Gainer und Murray, 1986; Enomoto et al., 1984).

Die Beeinflussung der Zell-Zell-Kommunikation über GJ durch Tumorpromotoren und sekundäre Botenstoffe legt eine Verknüpfung mit transmembranen Signalwegen nahe. Diese "Kommunikationsketten" sind wichtig zur Kontrolle von zellulärem Wachstum und Differenzierung. Viele Bausteine dieser Signalwege können Produkte von Onkogenen sein bzw. durch solche ersetzt werden. Einige dieser Onkogenprodukte hemmen die Zellkommunikation gleichzeitig mit einer Wachstumsstimulierung der Zellen (zur Übersicht siehe Trosko et al., 1990; Yamasaki, 1990).

Ein Zusammenhang zwischen Krebsentstehung und Kopplung der Zellen untereinander scheint hierdurch wiederum bestätigt zu werden. Von besonderer Bedeutung dabei ist u. U. nicht primär die Kommunikation der Tumorzellen untereinander, sondern die Kopplung von Krebszellen mit den umgebenden normalen Zellen. Diese Hypothese der "selektiven interzellulären Kommunikation" (Yamasaki, 1990) wird gestützt durch Untersuchungen von Mehta et al. (1986), die verschiedene transformierte Zellen in Kokultur mit den entsprechenden normalen Zellen beobachteten. Treten die unterschiedlichen Zellen nicht miteinander über GJ in Kontakt, so ist kein verändertes Wachstumsverhalten festzustellen. Werden heterologe GJ (induziert durch PKA-Aktivatoren) ausgebildet, so ist eine Wachstumshemmung der transformierten Zellen zu beobachten. Es wäre deshalb denkbar, daß GJ-permeable Faktoren an der Tumor-Suppression beteiligt sind (zur Übersicht siehe Yamasaki, 1990).

VI.3. Tabellen

Tab. 1: Wachstumsverhalten der Sphäroide: Mikroskopisch ermittelte SPH-Durchmesser nach unterschiedlicher Kulturdauer und die sich daraus berechnende Sphäroidoberfläche ($O = \pi d^2$) bzw. das Sphäroidvolumen ($V = \pi/6 d^3$). Die Durchmesserangaben sind die Mittelwerte von 2-4 Versuchen mit jeweils 40 Einzelmessungen \pm Standardabweichung (s).

a) L-Sphäroide:

Kulturzeit [Tage]	Durchmesser/s [μm]	Oberfläche [μm^2]	Volumen [μm^3]
4	113 \pm 1,0	40115	755499
5	----	-----	-----
6	146 \pm 8,6	66966	1629510
7	155 \pm 16,3	75477	1949816
8	----	-----	-----
9	156 \pm 3,5	76453	1987799
10	164 \pm 17,7	84496	2309564
11	----	-----	-----
12	195 \pm 13,8	119459	3882419
13	----	-----	-----
14	199 \pm 21,9	124410	4126272

b) SV40-3T3-Sphäroide:

Kulturzeit [Tage]	Durchmesser/s [μm]	Oberfläche [μm^2]	Volumen [μm^3]
1	126 \pm 1,0	49876	1047394
2	194 \pm 13,3	118237	3822996
3	210 \pm 4,5	138544	4849048
4	265 \pm 4,9	220618	9743976
5	292 \pm 16,5	267865	13036084
6	323 \pm 16,8	327759	17644371
7	346 \pm 65,7	376099	21688370
8	----	-----	-----
9	380 \pm 44,6	453646	28730912
10	454 \pm 14,4	647532	48996623
11	----	-----	-----
12	507	807543	68237405

Tab. 2: Morphologische Parameter von Sphäroiden. Die Werte in Spalte 2 wurden mikroskopisch ermittelt, die Werte in Spalte 3 wurden nach Trypsinierung der SPH mit Hilfe eines Coulter Counters gezählt. In Spalte 7 ist die Anzahl (n) der SPH pro Experiment aufgeführt. Für n>1 enthält Spalte 2 volumengemittelte Durchmesser (Φ). Zur Berechnung der Werte in den Spalten 4 bis 6 siehe Kapitel III.1.4. und die Ergänzung nach Tab. 3 in diesem Anhang.

a) L-Sphäroide:

Exp. Nr.	(mittlerer) SPH- ϕ [μm]	Zellen pro SPH	effekt. Zellvol. [μm^3]	effekt. Zell- ϕ [μm]	Zell-dichte [10^5z/cm^2]	n
1	400	6000	5585	22,1	3,9	1
2	410	4980	7246	24,0	3,3	1
3	379	2774	10276	26,9	2,6	5
4	460	5023	10146	26,8	2,7	1
5	393	5352	5916	22,4	3,8	10
6	373	4505	6032	22,6	3,7	5
Mittelwerte			7534	24,1	3,3	
Standardabweichungen			± 2149	$\pm 2,2$	$\pm 0,6$	

b) SV40-3T3-Sphäroide:

Exp. Nr.	(mittlerer) SPH- ϕ [μm]	Zellen pro SPH	effekt. Zellvol. [μm^3]	effekt. Zell- ϕ [μm]	Zell-dichte [10^5z/cm^2]	n
1	380	4377	6564	23,2	3,5	1
2	340	4242	4815	21,0	4,3	1
3	333	2731	7080	23,8	3,4	5
4	374	3285	8338	25,2	3,0	5
5	390	4277	7262	24,0	3,3	1
6	410	6872	5251	21,6	4,1	1
7	379	2505	11379	27,9	2,5	10
8	428	4211	9749	26,5	2,7	5
Mittelwerte				7559	24,2	3,4
Standardabweichungen				± 2203	$\pm 2,3$	$\pm 0,6$

Tab. 3: "Wahre" Zelldurchmesser der Zellen mit zunehmender Tiefe in Sphäroiden. Die Werte wurden nach sequentieller Trypsinierung der SPH mikroskopisch ermittelt. Der Durchmesser (Φ) der SPH lag im Bereich von 160-400 μm . (SV40-3T3-SPH: Zahl der ausgemessenen Zellen pro SPH-Schicht (n) = 25-50; L-SPH: n = 10; Gelistet sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung).

SPH-Schicht	wahrer Zelldurchmesser [μm] in	
	SV40-3T3-SPH	L-SPH
1 (außen)	15,75 \pm 1,58	18,53 \pm 2,82
2	14,73 \pm 1,74	19,87 \pm 2,20
3	-----	23,33 \pm 3,03
4	14,24 \pm 1,95	26,58 \pm 4,29
5 (innen)	13,74 \pm 1,82	21,49 \pm 5,07
Mittelwerte	14,62 \pm 0,86	21,96 \pm 3,14

Aus den wahren Zelldurchmessern berechnen sich die

SPH-Schicht	wahren Zellvolumina [μm^3] in	
	SV40-3T3-SPH	L-SPH
1 (außen)	2045,69	3331,38
2	1673,42	4107,64
3	-----	6648,79
4	1511,92	9832,49
5 (innen)	1358,18	5196,46
Mittelwerte	1647,30 \pm 295,14	5823,35 \pm 2564,23

Tab. 4: "Wahre" Zelldurchmesser konfluenter ML-Zellen. Die Werte wurden nach Trypsinierung der Zellen mikroskopisch ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus 2 Experimenten \pm Standardabweichung; Zahl der jeweils ausgemessenen Zellen (n) = 45.

konfl. ML	wahrer Zelldurchmesser [μm] von	
	SV40-3T3-Zellen	L-Zellen
	15,60 \pm 1,71	17,5 \pm 1,54

Aus den wahren Zelldurchmessern berechnen sich die

konfl. ML	wahren Zellvolumina [μm^3] in	
	SV40-3T3-Zellen	L-Zellen
	2082 \pm 671	2854 \pm 756

In diesem Zusammenhang benutzte Formeln (Ergänzung zu den vorausgehenden Tab. 2 bis 4 und Kapitel III.1.4. der Ergebnisse):

Wahres Zellvolumen (A): $V = 4/3 \pi r^3$ mit $r =$ Zellradius

Effektives Zellvolumen (B): SPH-Volumen/Zellen pro SPH

Effektiver Zelldurchmesser: $d = 2 r$

$r = \sqrt[3]{V \cdot 3/4 \cdot 1/\pi}$ mit $V =$ effekt. Zellvolumen

Packungsdichte
der Zellen in SPH: A/B

Dicke der äußeren
SPH-Zellschicht: entspricht dem effekt. Zelldurchmesser

Zellzahl in der äußeren
SPH-Zellschicht (N): Schichtvolumen/effekt. Zellvolumen

Zelldichte in der äußeren
SPH-Zellschicht (D): Oberfläche der äußeren Zellschicht/N

Die äußere SPH-Zellschicht ("Kugelschicht") hat die Dicke des effektiven Zelldurchmessers der äußeren SPH-Zellen; ihr mittlerer Abstand vom SPH-Zentrum beträgt SPH-Radius minus Zellradius. Die Zahl der Zellen in dieser Schicht ergibt sich durch Division des Schichtvolumens durch das effektive Zellvolumen. Die Zelldichte erhält man durch Division dieser Zellzahl durch die Oberfläche der äußeren Schicht (siehe Tab. 1).

Tab. 5: cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung von ML-Zellen bei zunehmender Zelldichte. Die Daten sind Mittelwerte von zwei Experimenten, s = ± Standardabweichung; für die Zell-zyklusverteilung der L-ML sind die Daten eines Experiments gelistet.

a) L-Monolayer:

Zelldichte [Zellen/cm ²]	cAMP [fmol/10 ⁶ Zellen]	s
12000	1410	±346,5
26000	1920	±367,7
56000	1660	± 21,2
170000	1250	±113,1
300000	720	±257,1

Zelldichte [Zellen/cm ²]	G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2+M-Phase [%]
12000	48	38	14
26000	58	30	12
70000	58	28	14
170000	66	23	11
300000	72	18	10

b) SV40-3T3-Monolayer:

Zelldichte [Zellen/cm ²]	cAMP [fmol/10 ⁶ Zellen]	s
24000	880	±31,82
37000	790	±98,99
75000	740	±35,36
165000	580	±77,78
320000	410	±35,36
800000	360	± 0,00

Zelldichte [Zellen/cm ²]	G1-Phase/s [%]		S-Phase/s [%]		G2+M-Phase/s [%]	
80000	45	±0,0	45	±0,7	11	±0,7
150000	47	±0,0	41	±0,0	12	±0,0
340000	53	±0,7	37	±0,7	10	±0,0
800000	60	±0,7	30	±1,4	10	±0,7

Tab. 6: cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung der Zellen mit zunehmender Tiefe in Sphäroiden (SPH-Schicht 1 = äußere Zellschicht; SPH-Schicht 5 bzw. 6 = Zellen im SPH-Zentrum; die Zahlen sind Mittelwerte von drei Experimenten, s = ± Standardabweichung).

a) L-Sphäroide:

SPH-Schicht	cAMP [fmol/10 ⁶ Zellen]	s			
1 (außen)	780	±74,3			
3	520	±21,2			
5 (innen)	160	± 0,0			

SPH-Schicht	G1-Phase/s [%]		S-Phase/s [%]		G2+M-Phase/s [%]	
1 (außen)	73	±5,6	16	±4,0	11	±1,7
2	77	±6,2	13	±5,0	10	±1,5
3	84	±4,4	9	±3,0	7	±2,0
4	89	±1,7	6	±1,3	5	±0,8
5 (innen)	92	±1,7	4	±0,6	4	±1,5

b) SV40-3T3-Sphäroide:

SPH-Schicht	cAMP [fmol/10 ⁶ Zellen]	s			
1 (außen)	360	±88,9			
3	260	±43,6			
5 (innen)	275	±49,5			

SPH-Schicht	G1-Phase/s [%]		S-Phase/s [%]		G2+M-Phase/s [%]	
1 (außen)	59	±1,5	34	±0,6	6	±1,2
2	60	±2,1	33	±1,2	7	±1,0
3	58	±6,1	35	±4,9	7	±1,2
4	60	±1,4	34	±1,4	6	±0,0
5	58	±0,6	36	±2,5	6	±2,1
6 (innen)	58	±4,5	35	±6,6	7	±2,3

Tab. 7: cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung von ML-Zellen nach Inkubation mit Mezerein (1 μ M - 2 min) und anschließender Kultivierung in frischem Medium ohne Mezerein-Zusatz. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse eines Experiments.

a) L-Monolayer^c

	cAMP-Gehalt [fmol/10 ⁶ Zellen]	G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2+M-Phase [%]
Kontrolle	1640	50	39	11
sofort	1480	49	39	12
30 min	1790	50	38	12
2 Stunden	1815	44	40	16
4 Stunden	1550	55	27	18
6 Stunden	1625	56	24	20
24 Stunden ^d	1075	62	23	15
Kontrolle nach 6 Stunden	1700	58	30	14

b) SV40-3T3-Monolayer^e

	cAMP-Gehalt [fmol/10 ⁶ Zellen]	G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2+M-Phase [%]
Kontrolle	630	45	45	10
sofort	750	45	44	11
30 min	600	45,5	44,5	10
2 Stunden	630	37	48	15
4 Stunden	630	46	34	20
6 Stunden	490	57	22	21
24 Stunden ^f	520	50	43	11
Kontrolle nach 6 Stunden	490	47	41	12
nach 24 Stunden ^f	490	53	37	10

^c 60000 Zellen/cm²

^d 170000 Zellen/cm²

^e 100000 Zellen/cm²

^f 400000 Zellen/cm²

Tab. 8: cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung der Zellen in unterschiedlichen Schichten von L-Sphäroiden nach Behandlung mit Mezerein (1 μ M, 5 min) und anschließender Kultivierung in frischem Medium ohne Mezerein-Zusatz. Die cAMP-Werte repräsentieren 1 Experiment. Für die Zellzyklusverteilung sind die Mittelwerte von 2 Experimenten mit der jeweiligen Standardabweichung (\pm s) gelistet.

a) cAMP-Gehalt von L-SPH-Zellen nach Mezerein

SPH-Schicht	cAMP [fmol/10 ⁶ Zellen]		
	Kontrolle	20 min frisches Medium	6 Stunden frisches Medium
1 (außen)	1220	1070	1130
4	970	840	870
6 (innen)	800	570	630

b) Zellzyklusverteilung von L-SPH-Zellen nach Mezerein

SPH-Schicht	G1-Phase/s [%]		S-Phase/s [%]		G2+M-Phase/s [%]	
^a 1 (außen)	70,0	$\pm 1,4$	20,5	$\pm 6,4$	9,5	$\pm 4,9$
2	78,0	$\pm 4,2$	14,5	$\pm 6,4$	7,5	$\pm 2,1$
3	85,5	$\pm 4,9$	10,0	$\pm 5,6$	4,5	$\pm 0,7$
4	89,0	$\pm 5,6$	7,5	$\pm 4,9$	3,5	$\pm 0,7$
5	91,5	$\pm 3,5$	5,5	$\pm 3,5$	3,0	$\pm 0,0$
6 (innen)	92,5	$\pm 3,5$	5,0	$\pm 3,9$	2,5	$\pm 0,3$
^b 1 (außen)	73,0	$\pm 8,5$	17,5	$\pm 0,7$	9,5	$\pm 7,8$
2	79,0	$\pm 4,2$	13,5	$\pm 0,7$	7,5	$\pm 4,9$
3	83,5	$\pm 3,5$	10,0	$\pm 0,0$	6,5	$\pm 3,5$
4	88,0	$\pm 0,0$	7,0	$\pm 1,4$	5,0	$\pm 1,4$
5	92,0	$\pm 0,0$	4,5	$\pm 0,7$	3,5	$\pm 0,7$
6 (innen)	95,0	$\pm 0,0$	2,5	$\pm 0,7$	2,5	$\pm 0,7$
^c 1 (außen)	75,5	$\pm 3,5$	12,0	$\pm 1,4$	12,5	$\pm 2,1$
2	81,0	$\pm 1,4$	9,8	$\pm 0,3$	9,2	$\pm 1,8$
3	85,5	$\pm 0,7$	7,0	$\pm 1,4$	7,5	$\pm 0,7$
4	88,5	$\pm 2,1$	5,5	$\pm 2,1$	6,0	$\pm 0,0$
5	92,0	$\pm 2,8$	4,0	$\pm 2,8$	4,0	$\pm 0,0$
6 (innen)	93,8	$\pm 2,5$	3,5	$\pm 2,1$	2,7	$\pm 0,3$

- ^a Kontrolle (unbehandelte Zellen)
^b 2 Stunden frisches Medium
^c 6 Stunden frisches Medium

Tab. 9: cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung der Zellen in unterschiedlichen Schichten von SV40-3T3-Sphäroiden nach Behandlung mit Mezerein (1 μ M, 5 min) und anschließender Kultivierung in frischem Medium ohne Mezerein-Zusatz. Die cAMP-Werte und die Zellzyklusverteilung der behandelten Zellen repräsentieren 1 Experiment. Für die Kontrolle der Zyklusphasen sind die Mittelwerte von 3 Experimenten mit der jeweiligen Standardabweichung (\pm s) gelistet.

a) cAMP-Gehalt von SV40-3T3-SPH-Zellen nach Mezerein

SPH-Schicht	cAMP [fmol/10 ⁶ Zellen]				
	Kontrolle/s		sofort nach Mez.	2 Stunden frisches Medium	18 Stund. frisches Medium
1 (außen)	360	$\pm 88,9$	300	640	475
3	260	$\pm 43,6$	270	570	420
5	---	-----	290	430	360
6 (innen)	275	$\pm 49,5$	240	580	490

b) Zellzyklusverteilung von SV40-3T3-SPH-Zellen nach Mezerein

SPH-Schicht	G1-Phase/s [%]		S-Phase/s [%]		G2+M-Phase/s [%]	
a ₁ (außen)	59	$\pm 1,5$	34	$\pm 0,6$	6	$\pm 1,2$
2	60	$\pm 2,1$	33	$\pm 1,2$	7	$\pm 1,0$
3	58	$\pm 6,1$	35	$\pm 4,9$	7	$\pm 1,2$
4	60	$\pm 1,4$	34	$\pm 1,4$	6	$\pm 0,0$
5	58	$\pm 0,6$	36	$\pm 2,5$	6	$\pm 2,1$
6 (innen)	58	$\pm 4,5$	35	$\pm 6,6$	7	$\pm 2,3$
b ₁ (außen)	53		37		10	
2	59		34		7	
3	65		29		6	
4	69		26		5	
5	72		24		4	
6 (innen)	75		20		5	
c ₁ (außen)	63		32		5	
2	67		29		4	
3	67		29		4	
4	69		27		4	
5	69		26		5	
6 (innen)	68		26		6	

- a Kontrolle (unbehandelte Zellen)
- b 2 Stunden frisches Medium
- c 18 Stunden frisches Medium

Tab. 10: cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung der Zellen in unterschiedlichen Schichten von SV40-3T3-Sphäroiden nach unterschiedlichen Behandlungszeiten mit Mezerein (1 μ M). Die Daten repräsentieren 1 Experiment.

a) cAMP-Gehalt von SV40-3T3-SPH-Zellen nach Mezerein

SPH-Schicht	cAMP [fmol/10 ⁶ Zellen]		
	Kontrolle	Mezerein	
		2 Stunden	6 Stunden
1 (außen)	360	450	575
3	260	395	410
5	---	275	270
6 (innen)	275	430	410

b) Zellzyklusverteilung von SV40-3T3-SPH-Zellen nach Mezerein

SPH-Schicht	G1-Phase [%]			S-Phase [%]			G2+M-Phase [%]		
	K	Mezerein		K	Mezerein		K	Mezerein	
		2 h	6 h		2 h	6 h		2 h	6 h
1 (außen)	57	56	52	36	39	44	7	5	4
2	57	56,5	54	34	37	42	9	6,5	4
3	56	58,5	59	36	34	37	8	7,5	4
4	56	63	61	38	30	33	6	7	6
5	55	67	66	38	26	23	7	7	11
6 (innen)	58	62,5	60	38	32	36	4	5,5	4

Tab. 11: cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung von ML-Zellen nach Inkubation mit db-cAMP (0,5mM -10 min) und anschließender Kultivierung in frischem Medium ohne db-cAMP-Zusatz. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse eines Experiments.

a) L-Monolayer^c

	cAMP-Gehalt [fmol/10 ⁶ Zellen]	G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2+M-Phase [%]
Kontrolle	820	65	26	9
sofort	1620	66	24	10
20 min	600	67	24	9
40 min	670	66	26	8
60 min	700	64	27	9
2 Stunden	740	63	27	10
6 Stunden	900	63	24	13
Kontrolle nach 6 Stunden	820	68	24	8

b) SV40-3T3-Monolayer^d

	cAMP-Gehalt [fmol/10 ⁶ Zellen]	G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2+M-Phase [%]
Kontrolle	1045	42	48	10
sofort	710	41	48	11
20 min	960	42	49	9
40 min	930	40	50	10
60 min	470	40	48	12
2 Stunden	565	41	48	11
6 Stunden	920	43	43	14
Kontrolle nach 6 Stunden	960	43	45	12

^c 44000 Zellen/cm²
^d 175000 Zellen/cm²

Tab. 12: cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung von ML-Zellen nach Inkubation mit db-cAMP (0,5mM - 18 Stunden).

a) L-Monolayer^c:

	cAMP-Gehalt [fmol/10 ⁶ Zellen]	G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2+M-Phase [%]
Kontrolle	1425	62	29	9
db-cAMP	2320	61	17	22

b) SV40-3T3-Monolayer^d:

	cAMP-Gehalt [fmol/10 ⁶ Zellen]	G1-Phase [%]	S-Phase [%]	G2+M-Phase [%]
Kontrolle	1045	42	48	10
db-cAMP	910	40	47	13

^c 36000 Zellen/cm²
^d 150000 Zellen/cm²

Tab. 13: cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung der Zellen in unterschiedlichen Schichten von L-Sphäroiden nach Behandlung mit 0,5 mM db-cAMP (20 Minuten und 18 Stunden).

a) cAMP-Gehalt von L-SPH-Zellen nach db-cAMP

SPH-Schicht	cAMP [fmol/10 ⁶ Zellen]		
	Kontrolle	dbcAMP	
		20 min	18 Stunden
1 (außen)	1320	860	1050
3	900	750	1030
5	780	625	845
6 (innen)	460	690	935

b) Zellzyklusverteilung von L-SPH-Zellen nach db-cAMP

SPH-Schicht	G1-Phase [%]			S-Phase [%]			G2+M-Phase [%]		
	K	dbcAMP		K	dbcAMP		K	dbcAMP	
		20min	18h		20min	18h		20min	18h
1 (außen)	67	76	70	20	15	11	13	9	19
2	70	79	76	18	13	8	12	8	16
3	79	84	84	12	10	5	9	6	11
4	87	91	89,5	7,5	5	3,5	5,5	4	7
5 (innen)	91	95	93	5	2,5	2,5	4	2,5	4,5

Tab. 14: cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung der Zellen in unterschiedlichen Schichten von SV40-3T3-Sphäroiden nach Behandlung mit db-cAMP (0,5 mM, 18 Stunden). Gelistet sind die Mittelwerte von 3 Experimenten mit der jeweiligen Standardabweichung ($\pm s$).

a) cAMP-Gehalt von SV40-3T3-SPH-Zellen nach db-cAMP

SPH-Schicht	cAMP [fmol/10 ⁶ Zellen]		% Kontrolle ^c	
	Kontrolle/s	db-cAMP/s		
1 (außen)	360 ±89	377 ±100	105%	
3	260 ±44	630 ± 71	242%	
5	- -	845 ±205	-	
6 (innen)	275 ±50	897 ±242	326%	

b) Zellzyklusverteilung von SV40-3T3-SPH-Zellen nach db-cAMP

SPH-Schicht	G1-Phase/s [%]		S-Phase/s [%]		G2+M-Phase/s [%]	
^a 1 (außen)	59 ±1,5	34 ±0,6	6 ±1,2			
2	60 ±2,1	33 ±1,2	7 ±1,0			
3	58 ±6,1	35 ±4,9	7 ±1,2			
4	60 ±1,4	34 ±1,4	6 ±0,0			
5	58 ±0,6	36 ±2,5	6 ±2,1			
6 (innen)	58 ±4,5	35 ±6,6	7 ±2,3			
^b 1 (außen)	61 ±2,0	32 ±2,0	7 ±0,0			
2	64 ±4,5	28 ±4,0	8 ±1,0			
3	62 ±3,6	26 ±3,2	12 ±2,0			
4	57 ±7,0	29 ±4,7	15 ±2,0			
5	49 ±5,0	38 ±7,6	13 ±3,0			
6 (innen)	46 ±3,6	45 ±4,3	9 ±2,0			
^c 1 (außen)	103%	94%	117%			
2	107%	85%	114%			
3	107%	74%	171%			
4	95%	85%	250%			
5	84%	106%	217%			
6 (innen)	79%	129%	129%			

^a Kontrolle (unbehandelte Zellen)

^b mit db-cAMP behandelt: absoluter Wert

^c mit db-cAMP behandelt: % der Kontrolle

Tab. 15: cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung von ML-Zellen nach Forskolinbehandlung (1 μ M) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

a) L-Monolayer^c:

	cAMP [fmol/10 ⁶ Zellen]	% Kontrolle (%K)
0 Stunden	950	
1 Stunde	590	62%
2 Stunden	1250	132%

Zeit	G1-Phase		S-Phase		G2+M-Phase	
	[%]	%K	[%]	%K	[%]	%K
0 Stunden	62		28		10	
1 Stunde	63	102%	28	100%	9	90%
2 Stunden	56	90%	31	111%	13	130%

b) SV40-3T3-Monolayer^d:

	cAMP [fmol/10 ⁶ Zellen]	% Kontrolle (%K)
0 min	790	
30 min	855	108%
1 Stunde	1080	137%
2 Stunden	1120	142%

Zeit	G1-Phase		S-Phase		G2+M-Phase	
	[%]	%K	[%]	%K	[%]	%K
0 min	41		49		10	
30 min	41	100%	49	100%	10	100%
1 Stunde	37	90%	51	104%	12	120%
2 Stunden	33	80%	53	108%	14	141%

^c 54000 Zellen/cm²

^d 120000 Zellen/cm²

Tab. 16: cAMP-Gehalt und Zellzyklusverteilung der Sphäroidzellen nach Forskolinbehandlung (1 μ M - 1 Stunde) in Abhängigkeit von ihrer räumlichen Anordnung im Sphäroid.

a) L-Sphäroide

SPH-Schicht	cAMP [fmol/10 ⁶ Zellen]		
	Kontrolle	Forskolin	% Kontrolle (%K)
1 (außen)	990	1430	159%
2	-	-	-
3	620	1160	142%
4	-	880	-
5 (innen)	510	650	127%

SPH-Schicht	G1-Phase [%]			S-Phase [%]			G2+M-Phase [%]		
	K	Forsk.	%K	K	Forsk.	%K	K	Forsk.	%K
	1 (außen)	74	71	96%	17	17	100%	9	12
2	79	77	97%	13,5	12	89%	7,5	11	147%
3	89	88	99%	7	7	100%	4	5	125%
4	95	95	100%	4	2,5	63%	1,5	2,5	167%
5 (innen)	98	98	100%	1	1	100%	1	1	100%

b) SV40 3T3-Sphäroide:

SPH-Schicht	cAMP [fmol/10 ⁶ Zellen]		
	Kontrolle	Forskolin	% Kontrolle
1 (außen)	360	500	139%
3	260	400	154%
4	-	380	-
5 (innen)	275	280	102%

SPH-Schicht	G1-Phase [%]			S-Phase [%]			G2+M-Phase [%]		
	K	Forsk.	%K	K	Forsk.	%K	K	Forsk.	%K
	1 (außen)	59	61	103%	34	33	97%	6	6
2	60	59	98%	33	33	100%	7	8	114%
3	58	54	93%	35	38	109%	7	8	114%
4	60	52	87%	34	41	121%	6	7	117%
5 (innen)	58	50	86%	36	45	129%	6	5	83%

VI.4. Abbildungen

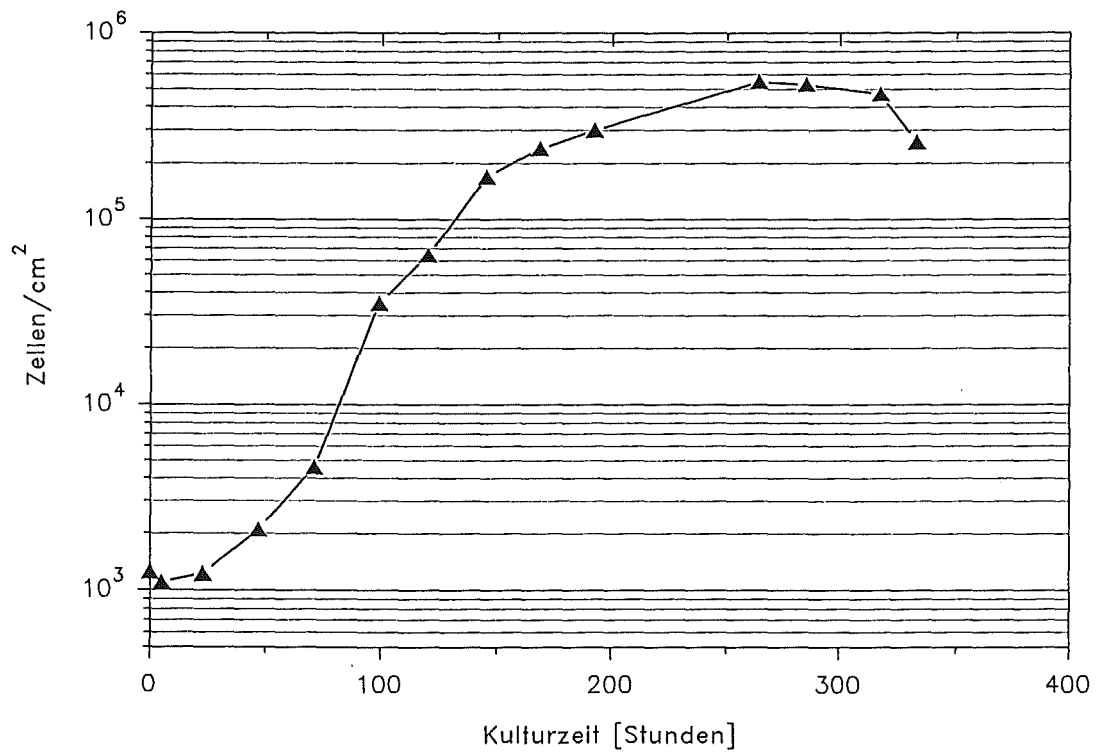
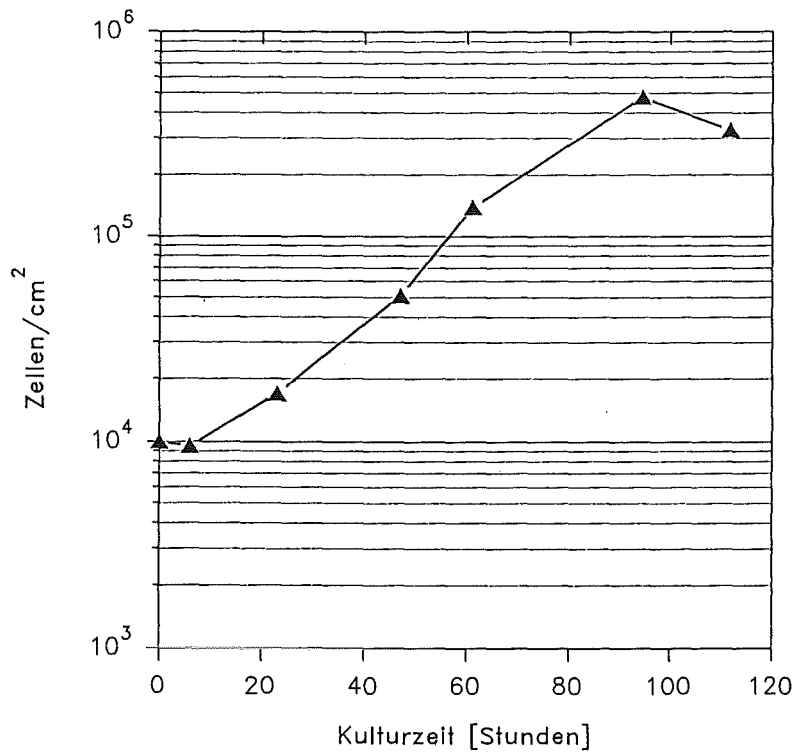


Abb. 1: Wachstumskurven von SV40-3T3-ML (oben) und L-ML (unten).

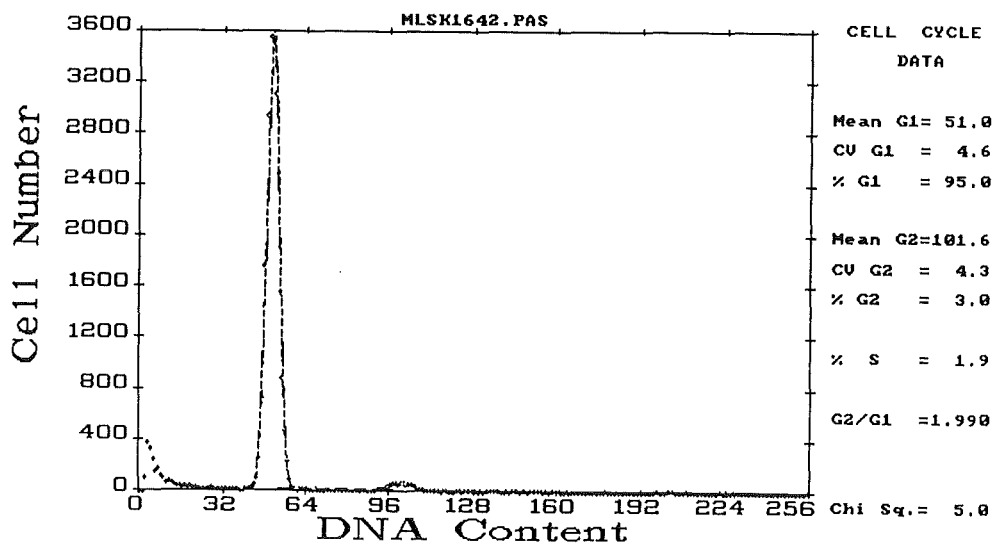
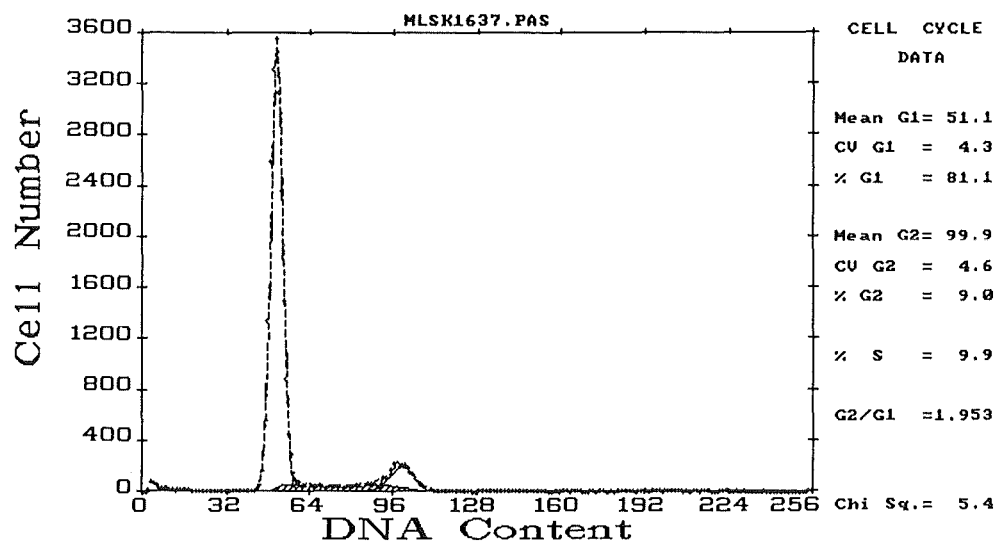
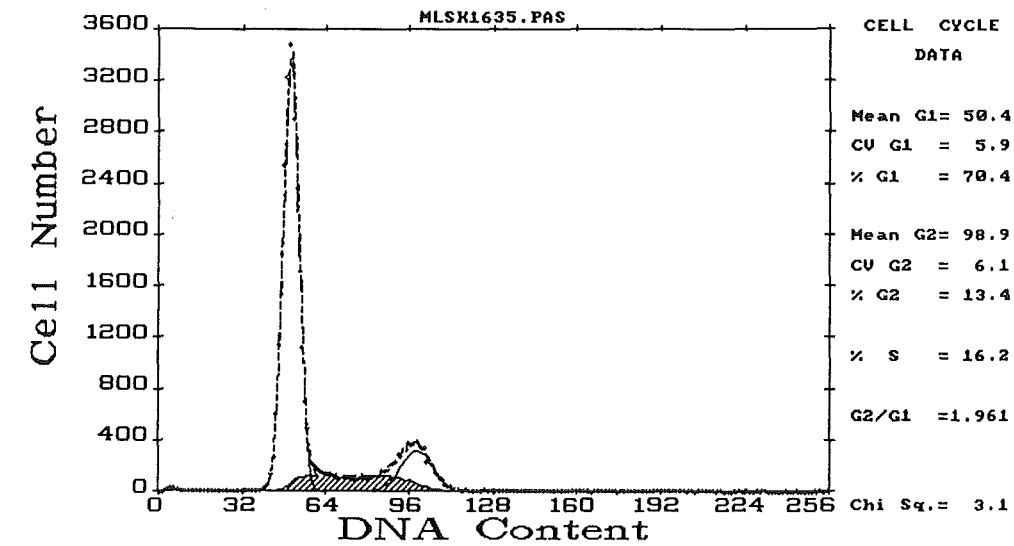


Abb. 2: Originalhistogramme der äußeren (oben), mittleren (Mitte) und inneren Zellen (unten) von L-Sphäroiden (vgl. Abb. 12 in III.3.).

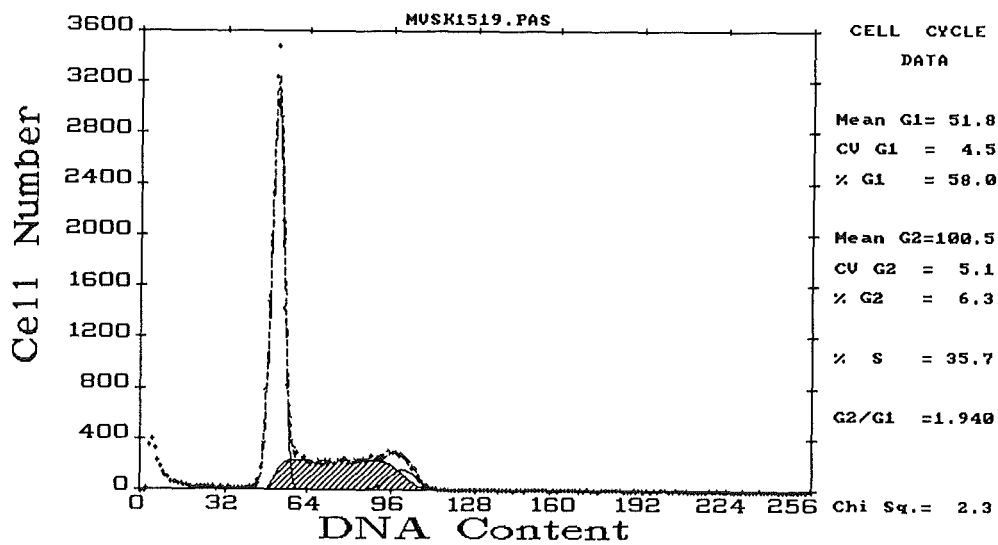
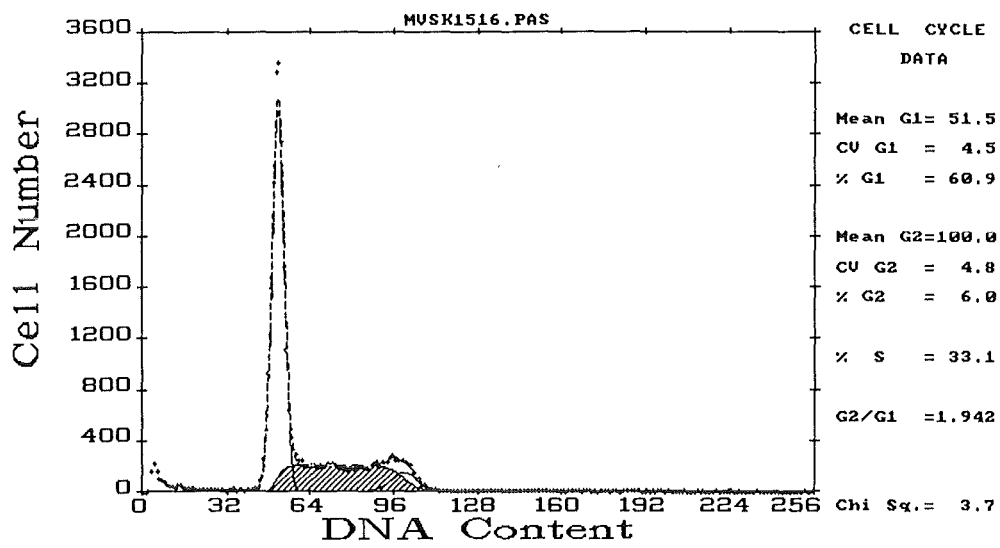
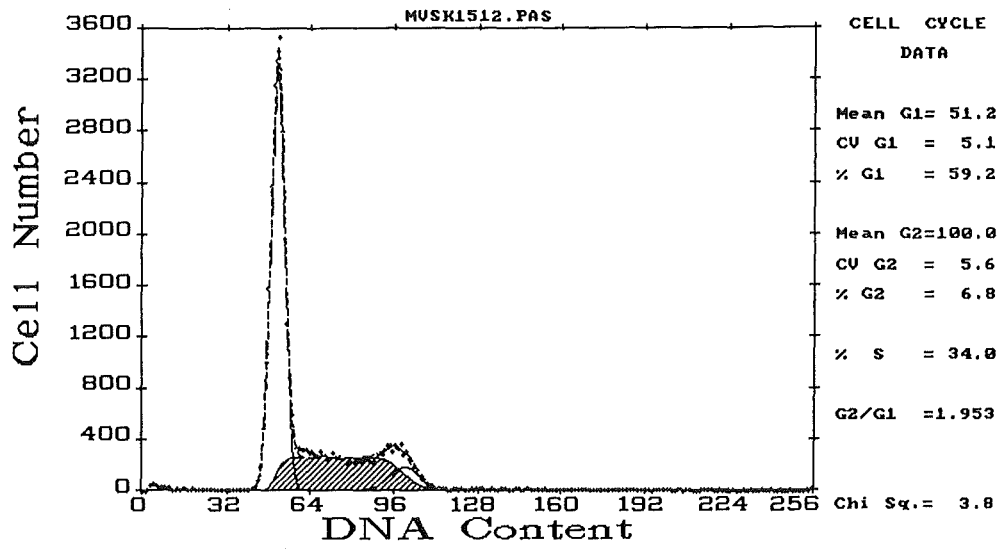


Abb. 3: Originalhistogramme der äußeren (oben), mittleren (Mitte) und inneren Zellen (unten) von SV40-3T3-Sphäroiden (vgl. Abb. 12 in III.3.).

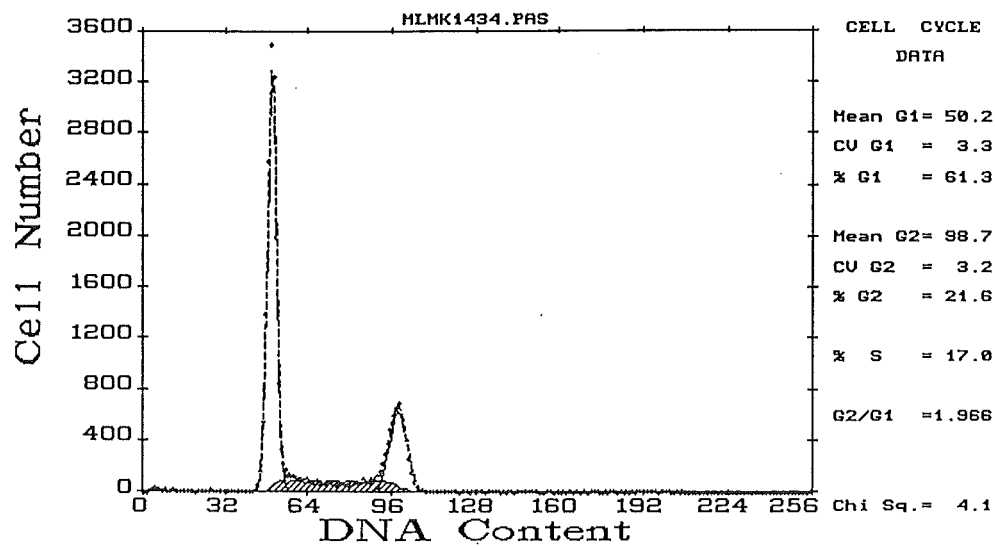
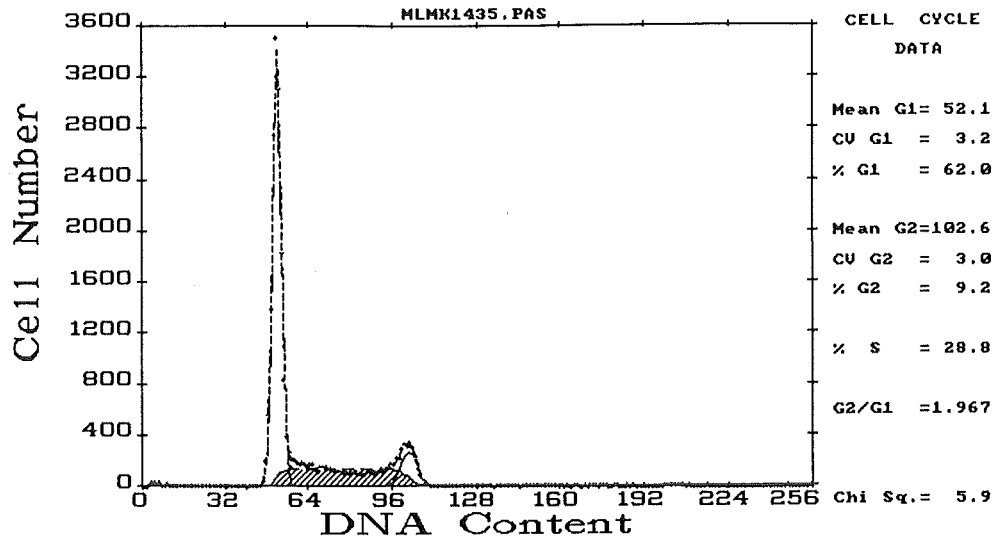


Abb. 4: Originalhistogramme von L-ML in ihrer exponentiellen Wachstumsphase nach Behandlung mit db-cAMP (0,5 mM, 18 Stunden): Kontrolle (oben), behandelte Zellen (unten). Vergleiche hierzu auch Abb. 29 in III.6.4.

VII. Literaturverzeichnis

- Acker H., Pietruschka F., Deutscher J. (1990).** Endothelial cell mitogen released from HT29 tumour cells grown in monolayer or multicellular spheroid culture.
Br. J. Cancer **62**, 376-377.
- Allison D. C., Yuhas J. M., Ridolpho P. F., Anderson S. L., Johnson T. S. (1983).** Cytophotometric measurement of the cellular DNA content of [³H]thymidine-labelled spheroids.
Cell Tissue Kinet. **16**, 237-246.
- Anderer U. (1986).** Strahlenempfindlichkeit und Zellkommunikation verschiedener Gliomzelllinien in Monolayer- und Sphäroidkultur.
Diplomarbeit, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften, Universität Karlsruhe.
- Anderer U., Knedlitschek G., Weibezahn K.F., Dertinger H. (1990).** Cell-cell-communication, proliferation and radiosensitivity of cells cultured as three-dimensional clones (spheroids).
J. Cancer Res. Clin. Oncol., Suppl. to Vol. **116**, 392.
- Aylsworth C.F., Trosko J.E., Chang C.C., Benjamin K., Lockwood E. (1989).** Synergistic inhibition of metabolic cooperation by oleic acid or 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate and dichlorodiphenyltrichlorethane (DDT) in chinese hamster V79 cells: implication of a role for protein kinase C in the regulation of gap junctional intercellular communication.
Cell Biol. Toxicol. **5**, 27-37.
- Azarnia R., Dahl G., Loewenstein W.R. (1981).** Cell junction and cyclic AMP: III. Promotion of junctional membrane permeability and junctional membrane particles in a junction-deficient cell type.
J. Membrane Biol. **63**, 133-146.
- Beebe S. J., Beasley-Leach A., Corbin J. D. (1988).** cAMP Analogs used to study low-K_m hormone-sensitive phosphodiesterase.
Methods In Enzymology **159**, 531-540.
- Bennett M.V.L., Spray D.C., Harris A.L. (1981).** Electrical coupling in development.
Amer. Zool. **21**, 413-427.
- Berridge M. J. (1985).** Die Signalübertragung in die Zelle.
Spektrum der Wissenschaft **12**, 136-146.
- Beyer E.C., Paul D.L., Goodenough D.A. (1990).** Connexin family of gap junction proteins.
J. Membrane Biol. **116**, 187-194.

- Boynton A. L., Whitfield J. F. (1983).** The role of cyclic AMP in cell proliferation: a critical assessment of the evidence.
in: Greengard P., Robison G. A. (eds.)
Advances in Cyclic Nucleotide Research **15**, 193-294.
Raven Press, New York.
- Bräuner T., Hülser D. F. (1990).** Tumor cell invasion and gap junctional communication. II. Normal and malignant cells confronted in multicell spheroids.
Invasion Metastasis **10**, 31-48.
- Bräuner T., Schmid A., Hülser D. F. (1990).** Tumor cell invasion and gap junctional communication. I. Normal and malignant cells confronted in monolayer cultures.
Invasion Metastasis **10**, 18-30.
- Bridges M. A., Walker D. C., Harris R. A., Wilson B. R., Davidson A. G. F. (1991).** Cultured human nasal epithelial multicellular spheroids: polar cyst-like model tissues.
Biochem. Cell Biol. **69**: 102-108.
- Brümmer F. (1988).** Farbstoffausbreitung durch Gap Junctions in tierischen Zellkulturen.
Stöffler und Schütz, Stuttgart.
- Budunova I. V., Mittelman L. A., Belitsky G. A. (1989).** Identification of tumor promoters by their inhibitory effect on intercellular transfer of lucifer yellow.
Cell Biology and Toxicology **5**, 77-89.
- Burstin S. J., Renger H. C., Basilico C. (1974).** Cyclic AMP levels in temperature sensitive SV40 transformed cell lines.
J. Cell. Physiol. **84**, 69-74.
- Burt J. M., Spray D. C. (1988).** Inotropic agents modulate gap junctional conductance between cardiac myocytes.
Am. J. Physiol. **254**, H1206-H1210.
- Campos-De-Carvalho A. C. (1988).** Regulation of gap junction channels.
Brazilian J. Med. Biol. Res. **21**, 177-188.
- Carlsson J., Acker H. (1988).** Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids.
Int. J. Cancer **42**, 715-720.
- Carlsson J., Nederman T. (1989).** Tumour spheroid technology in cancer therapy research.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. **25**, 1127-1133.
- Carlsson J., Yuhas J. M. (1984).** Liquid-overlay culture of cellular spheroids.
in: Acker H., Carlsson J., Durand R., Sutherland R. M. (eds.)
Spheroids in cancer research. Methods and perspectives, 1-23.
Springer Verlag, Berlin.
- Castagna M. (1987).** Phorbol esters as signal transducers and tumor promoters.
Biology of the Cell **59**, 3-14.

- Caveney S. (1985).** The role of gap junctions in development.
Ann. Rev. Physiol. **47**, 319-335.
- Channon M., Trivedi A., Sridhar R., Tustanoff E. R. (1987).** Changes in cyclic nucleotide profiles in proliferating multi-cell spheroids.
Biochemistry International **15**, 981-987.
- Cole W. C., Garfield R. E. (1986).** Evidence for physiological regulation of myometrial gap junction permeability.
Am. J. Physiol. **251**, C411-C420.
- Conger A. D., Ziskin M. C. (1983).** Growth of mammalian multicellular tumor spheroids.
Cancer Res. **43**, 556-560.
- Corbin J. D., Beebe S. J., Blackmore P. F., Redmon J. B., Sheorain V. S., Gettys T. W. (1986).** Discriminative insulin antagonism of effects of different cAMP analogs in intact mammalian cells.
in: Belfrage P., Donnér J., Strålfors P. (eds.)
Mechanisms of insulin action, 167-174.
Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York.
- Dabrowska-Piaskowska K. (1959).** Observations on the histoformative capacities of tumor cells dissociated by digestion with trypsin.
Exp. Cell Res. **16**, 315-323.
- Dahl G., Miller T., Paul D., Voellmy R., Werner R. (1987).** Expression of functional cell-cell channels from cloned rat liver gap junction complementary DNA.
Science **236**, 1290-1293.
- Dean P. N., Jett J. H. (1974).** Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry.
J. Cell Biol. **60**, 523-527.
- De Mello W. C. (1984).** Effect of intracellular injection of cAMP on the electrical coupling of mammalian cardiac cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **119**, 1001-1007.
- De Mello W. C. (1988).** Increase in junctional conductance caused by isoproterenol in heart cell pairs is suppressed by cAMP-dependent protein-kinase inhibitor.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **154**, 509-514.
- De Ridder L. I., Laerum O. D. (1981).** Invasion of rat neurogenic cell lines in embryonic chick heart fragments in vitro.
J. Natl. Cancer Inst. **66**, 723-728.
- Dermietzel R., Hwang T. K., Spray D. S. (1990).** The gap junction family: structure, function and chemistry.
Anat. Embryol. **182**, 517-528.

- Dertinger H., Guichard M., Malaise E. P. (1983).** Is there a relationship between hypoxia, contact resistance, and intercellular communication?
Radiat. Environ. Biophys. **22**, 209-214.
- Dertinger H., Hinz G., Jakobs K. H. (1982).** Intercellular communication, three-dimensional cell contact und radiosensitivity.
Biophys. Struct. Mech. **9**, 89-93.
- Dertinger H., Hülser D.F. (1981).** Increased radioresistance of cells in cultured multicell spheroids.
Radiat. Environ. Biophys. **19**, 101-107.
- Dertinger H., Hülser D. F. (1984).** Intercellular communication in spheroids.
 in: *Recent results in cancer research* **95**
 Acker H., Carlsson I., Durand R., Sutherland R. M. (eds.)
Spheroids in cancer research, 67-83.
 Springer Verlag, Berlin.
- Dertinger H., Lücke-Huhle C. (1975).** A comparative study of post-irradiation growth kinetics of spheroids and monolayers.
Int. J. Radiat. Biol. **28**, 255-265.
- Donaldson J. T., Tucker J. A., Keane T. E., Walther P. J., Webb K. S. (1990).**
 Characterization of a new model of human prostatic cancer: The multicellular tumor spheroid.
Int. J. Cancer **46**, 238-244.
- Durand R. E., Sutherland M. (1972).** Effects of intercellular contact of radiation damage.
Exp. Cell Res. **71**, 75-80.
- Earle W. E., Schilling E. L., Stark T. H., Straus N. P., Brown M. F., Shelton E. (1943).** Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells.
J. Nat. Cancer Inst. **4**, 165-212.
- Ehring G. R., Zampighi G., Horwitz J., Bok D., Hall J. E. (1990).** Properties of channels reconstituted from the major intrinsic protein of lens fiber membranes.
J. Gen. Physiol. **96**, 631-664.
- Ekblom P., Alitalo K., Vaheri A., Timpl R., Saxén L. (1980).** Induction of a basement membrane glycoprotein in embryonic kidney: Possible role of laminin in morphogenesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 485-489.
- Enomoto T., Martel N., Kanno Y., Yamasaki H. (1984).** Inhibition of cell communication between Balb/c 3T3 cells by tumor promoters and protection by cAMP.
J. Cell. Physiol. **121**, 323-333.
- Enomoto T., Yamasaki H. (1985).** Phorbol ester-mediated inhibition of intercellular

communication in BALB/c 3T3 cells: Relationship to enhancement of cell transformation.

Cancer Res. **45**, 2681-2688.

Erlichman C., Vidgen D. (1984). Cytotoxicity of adriamycin in MGH-U1 cells grown as monolayer cultures, spheroids and xenografts in immune-deprived mice.

Cancer Res. **44**, 5369-5375.

Finbow M. E., Eldridge T., Buultjens J., Kam E., Shuttleworth J., Pitts J. D. (1985). Comparison of the protein components present in vertebrate and arthropod gap junction preparations.

in: Bennett M.V.L., Spray D.C. (eds)

Gap Junctions, 77-89.

Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Finbow M. E., Shuttleworth J., Hamilton A. E., Pitts J. D. (1983). Analysis of vertebrate gap junction protein.

The EMBO Journal **2**, 1479-1486.

Finbow M.E., Thompson P., Keen J., Jackson P., Eliopolous E., Meagher L., Findlay J.B.C. (1990). A structural analysis of the gap junctional channel and the 16K protein.

in: Robards A.W., Lucas W.J., Pitts J.D., Jongsma H.J., Spray D.C. (eds)

Parallels in cell to cell junctions in plants and animals, 13-19.

Springer-Verlag, Berlin, New York.

Fitzgerald D. J., Knowles S. E., Ballard F. J., Murray A. W. (1983). Rapid and reversible inhibition of junctional communication by tumor promoters in a mouse cell line.

Cancer Res. **43**, 3614-3618.

Flagg-Newton J. L., Loewenstein W. R. (1981). Cell junction and cyclic AMP:

II. Modulations of junctional membrane permeability, dependent on serum and cell density.

J. Membrane Bio. **63**, 123-131.

Fox M. H. (1980). A model for the computer analysis of synchronous DNA distributions obtained by flow cytometry.

Cytometry **1**, 71-77.

Fradkin J. E., Cook G. H., Kilhoffer M.-C., Wolff J. (1982). Forskolin stimulation of thyroid adenylate cyclase and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate accumulation.

Endocrinology **111**, 849-856.

Franko A. J., Freedman H. I., Koch C. J. (1984). Oxygen supply to spheroids in spinner and liquid-overlay culture.

in: Acker H., Carlsson J., Durand R., Sutherland R. M. (eds.)

Spheroids in cancer research. Methods and Perspectives, 162-167.

Springer Verlag, Berlin.

- Fraser S. E., Green C. R., Bode H. R., Gilula N. B. (1987).** Selective Disruption of gap junctional communication interferes with a patterning process in hydra.
Science **237**, 49-55.
- Freyer J. P., Sutherland R. M. (1980).** Selective dissociation and characterization of cells from different regions of multicell tumor spheroids.
Cancer Res. **40**, 3956-3965.
- Freshney R. I. (1983).** Culture of animal cells.
 Alan R. Liss, New York.
- Friedman D. L., Johnson R. A., Zeilig D. E. (1976).** The role of cyclic nucleotides in the cell cycle.
 in: Greengard P., Robison G. A. (eds.)
Advances in Cyclic Nucleotide Research **7**, 69-113.
 Raven Press, New York.
- Furshpan E. J., Potter D. D. (1959).** Transmission at the giant motor synapses of the crayfish.
J. Physiol. **145**, 289-325.
- Gainer H. St. C., Murray A. W. (1986).** The effect of cAMP on tumor promoter responses mediated by C-Kinase.
Exp. Cell Res. **166**, 171-179.
- Gersing E., Bach F., Brockhoff C., Gebhard M. M., Kehrer G., Meißner A., Bretschneider H. J. (1991).** Messung der elektrischen Impedanz von Organen - Methodische Grundlagen.
Biomedizinische Forschung **36**, 70-77.
- Giaume C., Korn H. (1985).** Junctional Voltage-dependence at the Crayfish Rectifying Synapse.
 in: Bennett M.V.L., Spray D.C. (eds.)
Gap Junctions, 367-379.
 Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Goerttler K., Stöhr M. (1982).** Automated cytology. The state of the art.
Arch. Pathol. Lab. Med. **106**, 657-661.
- Göhde W., Schliermann M., Miltenburger H. G., Schumann J. (1985).** Durchfluß-Zytofluorometrie zur Routineuntersuchung von Zellkulturen in der Biotechnologie.
forum mikrobiologie **8**, 231-237.
- Gorin M. B., Yancey S. B., Cline J., Revel J.-P., Horwitz J. (1984).** The Major Intrinsic Protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: Characterization and structure based on cDNA cloning.
Cell **39**, 49-59.

- Gospodarowicz D., Greenburg G., Birdwell C.R. (1978).** Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res.* **38**, 4155-4171.
- Green C. R. (1988).** Evidence mounts for the role of gap junctions during development. *BioEssays* **8**, 7-10.
- Griep E. B., Revel J.-P. (1977).** Gap junctions in development. in: De Mello W.C. (ed.), *Intercellular Communication*. 1-32. Plenum Press, New York, London.
- Grover A., Oshima R. G., Adamson E. D. (1983).** Epithelial layer formation in differentiating aggregates of F9 embryonal carcinoma cells. *J. Cell Biol.* **96**, 1690-1696.
- Haji-Karim M., Carlsson J. (1987).** Proliferation and viability in cellular spheroids of human origin. *Cancer Res.* **38**, 1457-1464.
- Halpern B., Pejsachowicz B., Gebvre H. L., Barski G. (1966).** Differences in patterns of aggregation of malignant and non-malignant mammalian cells. *Nature* **209**, 157-159.
- Hanna R. B., Ornberg R. L., Reese T. S. (1985).** Structural details of rapidly frozen gap junctions. in: Bennet M.V.L., Spray D.C. (eds.) *Gap Junctions*, 23-32. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Harfst E., Severs N. J., Green C. R. (1990).** Cardiac myocyte gap junctions: evidence for a major connexon protein with an apparent relative molecular mass of 70000. *J. of Cell Science* **96**, 591-604.
- Hertzberg E. L. (1984).** A detergent-independent procedure for the isolation of gap junctions from rat liver. *J. of Biol. Chem.* **259**, 9936- 9943.
- Hertzberg E. L. (1985).** Antibody probes in the study of gap junctional communication. *Ann. Rev. Physiol.* **47**, 305-318.
- Hertzberg E. L., Disher R. M., Tiller A. A., Zhou Y., Cook R. G. (1988).** Topology of the M_r 27,000 liver gap junction protein. *J. Biol. Chem.* **263**, 19105-19111.
- Hertzberg E. L., Spray D. C. (1985).** Studies of gap junctions: Biochemical analysis and use of antybody probes. in: Bennett M.V.L., Spray D.C. (eds.) *Gap Junctions*, 57-65. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- Hertzberg E. L., Spray D. C., Bennett M. V. L. (1985).** Reduction of gap junctional conductance by microinjection of antibodies against the 27-kDa liver gap junction polypeptide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 2412-2416.
- Heynkes R., Kozjek G., Traub O., Willecke K. (1986).** Identification of a rat liver cDNA and mRNA coding for the 28 kDa gap junction protein.
FEBS Letters **205**, 56-60.
- Hiller M. (1988).** Wirkung von Mezerein auf die interzelluläre Kommunikation und den Zellzyklus.
Diplomarbeit, Fakultät für Bio- und Geowissenschaften, Universität Karlsruhe.
- Hinz G., Dertinger H. (1983).** Increased radioresistance of cells in cultured multicell spheroids. II. Kinetic and cytogenetic studies.
Radiat. Environ. Biophys. **21**, 255-264.
- Holtfreter J. (1944).** A study of the mechanics of gastrulation.
J. Exp. Zool. **95**, 171-212.
- Holtfreter J. (1947).** Neural induction in explants which have passed through a sublethal cytolysis.
J. Exp. Zool. **106**, 197-222.
- Hülser D. F., Webb D. J. (1973).** Relation between ionic coupling and morphology of established cells in culture.
Exp. Cell Res. **80**, 210-222.
- Hülser D.F., Brümmer F. (1982).** Closing and opening of gap junction pores between two- and threedimensional cultured tumor cells.
Biophys. Struct. Mech. **9**, 83-88.
- Iizuka H., Sakai H., Tamura T. (1989).** Effects of the tumor promoter, phorbol 12-myristate-13-acetate on the epidermal adenylate cyclase system: Evidence for adenylate cyclase-regulation by protein kinase C.
J. Invest. Dermatol. **93**, 387-391.
- Jeffrey A. M., Liskamp R. M. (1986).** Computer-assisted molecular modeling of tumor promoters: Rationale for the activity of phorbol esters, teleocidin B, and aplysiatoxin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 241-245.
- Johnson G. S., Pastan I. (1972).** Role of 3',5'-adenosine monophosphate in regulation of morphology and growth of transformed and normal fibroblasts.
J. Nat. Cancer Inst. **48**, 1377-1387.
- Jungmann R. A., Kelley D. C., Miles M. F., Milkowski D. M: (1983).** Cyclic AMP regulation of lactate dehydrogenase.
J. Biol. Chem. **258**, 5312-5318.
- Kalimi G.H., Sirsat S.M. (1984).** The relevance of gap junction to stage I tumor promotion in mouse epidermis.

- Carcinogenesis **5**, 1671-1677.
- Kam E., Pitts J. D. (1988).** Effects of the tumour promotor 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on junctional communication in intact mouse skin: Persistence of homologous communication and increase of epidermal-dermal coupling.
Carcinogenesis **9**, 1389-1394.
- Karbach U., Gerharz C.-D., Gabbert H., Mueller-Klieser W. (1991).** Interrelationship among proliferation and differentiation in BA-HAN-1C Rhabdomyosarcoma spheroids.
European J. Cell Biol. **54**, suppl. 32, 66.
- Kistler J., Christie D., Bullivant S. (1988).** Homologies between gap junction proteins in lens, heart and liver.
Nature **331**, 721-723.
- Kistler J., Kirkland B., Bullivant S. (1985).** Identification of a 70,000-D protein in lens membrane junctional domains.
J. Cell Biol. **101**, 28-35.
- Kittel C. (1969).** Einführung in die Festkörperphysik. 47-48.
R. Oldenburg Verlag München, Wien.
- Knedlitschek G., Anderer U., Weibezahn K. F., Dertinger H. (1990).** Radioresistance of rat glioma cell lines cultured as multicellular spheroids. Correlation with electrical cell-to-cell-coupling.
Strahlenther. Onkol. **166**, 164-167.
- Knuechel R., Keng P., Hofstaedter F., Langmuir V., Sutherland R. M., Penney D. P. (1990).** Differentiation patterns in two- and three-dimensional culture systems of human squamous carcinoma cell lines.
Am. J. Pathol. **137**, 725-736.
- Korth M., Engels J. (1987).** Inotropic and electrophysiological effects of 8-substituted cyclic AMP analogues on guinea-pig papillary muscle.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **335**, 77-85.
- Kram R., Mamont P., Tomkins G. M. (1973).** Pleiotypic control by adenosine 3':5'-cyclic monophosphate: A model for growth control in animal cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **70**, 1432-1436.
- Kumar N. M., Gilula N. B. (1986).** Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein.
J. Cell Biol. **103**, 767-776.
- Landry J., Bernier D., Ouellet C., Goyette R., Marceau N. (1985).** Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: Histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities.
J. Cell Biol. **101**, 914-923.
- Landry J., Freyer J. P., Sutherland R. M. (1981).** Shedding of mitotic cells from the surface of multicell spheroids during growth.

- J. Cell. Physiol. **106**, 23-32.
- Lasater E. M. (1987)**. Retinal horizontal cell gap junctional conductance is modulated by dopamine through a cyclic AMP-dependent protein kinase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 7319-7323.
- Lasater E. M., Dowling J. E. (1985)**. Electrical coupling between pairs of isolated fish horizontal cells is modulated by dopamine and cAMP.
in: Bennett M.V.L., Spray D.C. (eds.)
Gap Junctions, 393-404.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Lawrence T. S., Beers W. H., Gilula N. B. (1978)**. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication.
Nature **272**, 501-506.
- Lindl T., Bauer J. (1989)**. Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen.
Fischer Verlag Stuttgart.
- Lissitzky S., Fayet G., Giraud A., Verrier B., Torresani J. (1971)**. Thyrotrophin-induced aggregation and reorganization into follicles of isolated porcine-thyroid cells.
Eur. J. Biochem. **24**, 88-99.
- Lo C. W. (1985)**. Communication compartmentation and pattern formation in development.
in: Bennett M.V.L., Spray D.C. (eds.)
Gap Junctions, 251-263.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Lo C. W., Gilula N. B. (1979)**. Gap junctional communication in the post-implantation mouse embryo.
Cell **18**, 411-422.
- Loewenstein W. R. (1979)**. Junctional intercellular communication and the control of growth.
Biochim. Biophys. Acta **560**, 1-65.
- Loewenstein W. R. (1985)**. Regulation of cell-to-cell communication by phosphorylation.
Biochem. Soc. Symp. **50**, 43-58.
- Loewenstein W. R., Kanno Y. (1966)**. Intercellular communication and the control of tissue growth: Lack of communication between cancer cells.
Nature **209**, 1248-1249.
- Loewenstein W. R., Kanno Y. (1967)**. Intercellular communication and tissue growth.
I. Cancerous growth.
J. Cell Biol. **33**, 225-234.
- Lord E. M., Nardella G. (1980)**. The multicellular tumor spheroid model.
II. Characterization of the primary allograft response in unsensitized mice.
Transplantation **29**, 119-124.

- Lord E. M., Nardella G. B., Sutherland R. M. (1980).** The multicellular tumor spheroid model. I. Characterization of the allograft response in sensitized mice.
Cell. Immunol. **52**, 119-131.
- Loring J., Glimelius B., Weston J.A. (1982).** Extracellular matrix materials influence quail neural crest cell differentiation in vitro.
Developmental Biol. **90**, 165-174.
- Lücke-Huhle C., Dertinger H. (1977).** Kinetic response of an in vitro "tumour-model" (V79 spheroids) to 42 C hyperthermia.
Europ. J. Cancer **13**, 23-28.
- MacDonald H. R., Soprdat B. (1980).** The multicellular tumor spheroid: A quantitative model for studies of in situ immunity.
Contemp. Top. Immunobiol. **10**, 317-342.
- Makowski L., Caspar D. L. D., Philipps W. C., Goodenough D. A. (1977).** Gap Junction structures. II. Analysis of the X-ray diffraction data.
J. Cell Biol. **74**, 629-645.
- Makowski L. (1985).** Structural domains in gap junctions: Implications for the control of intercellular communication.
in: Bennett M.V.L., Spray D.C. (eds.)
Gap Junctions, 5-12.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Mareel M. M. (1980).** Recent aspects of tumor invasiveness.
in: Richter G. W., Epstein M. A. (eds.)
International Review of Experimental Pathology **22**, 65-131.
Academic press, New York, London.
- Mareel M., Kint J., Meyvisch D. (1979).** Methods of study of the invasion of malignant C3H-mouse fibroblasts into embryonic chick heart in vitro.
Virchows Arch. B Cell Path. **30**, 95-111.
- Matthieu J.-M., Honegger P., Favrod P., Poduslo J. F., Krstic R. (1981).** Aggregating brain cell cultures: A model to study brain development.
in: Minkowski A., Monset-Couchard M. (eds.)
Physiological and biochemical basis for perinatal medicine, 359-366, Karger, Basel.
- McAllister R. M., Reed G., Huebner R. J. (1967).** Colonial growth in agar of cells derived from adenovirus-induced hamster tumors.
J. Nat. Cancer Inst. **39**, 43-53.
- McKay I., Collins M., Taylor.Papadimitriou J., Rozengurt E. (1983).** An inhibitory effect of tumour promoters on human epithelial cell growth can be dissociated from an effect on junctional communication.
Experimental Cell Res. **145**, 245-254.

- Mege R. M., Matsuzaki F., Gallin W. J., Goldberg J. I., Cunningham B. A., Edelman G. M. (1988).** Construction of epitheloid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 7274-7278.
- Mehmet H., Morris C., Rozengurt E. (1990).** Multiple synergistic signal transduction pathways regulate c-fos expression in Swiss 3T3 cells: The role of cyclic AMP.
Cell Growth & Differentiation **1**, 293-298.
- Mehta P. P., Bertram J. S., Loewenstein W. R. (1986).** Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells.
Cell **44**, 187-196.
- Mesnil M., Montesano R., Yamasaki H. (1986).** Intercellular communication of transformed and non-transformed rat liver epithelial cells. Modulation by TPA.
Exp. Cell Res. **165**, 391-402.
- Miller T. M., Goodenough D. A. (1985).** Gap junction structures after experimental alteration of junctional channel conductance.
J. Cell Biol. **101**, 1741-1748.
- Miller T. M., Goodenough D. A. (1986).** Evidence for two physiologically distinct gap junctions expressed by the chick lens epithelial cell.
J. Cell Biol. **102**, 194-199.
- Miller T., Dahl G., Werner R. (1988).** Structure of a gap junction gene: rat connexin-32.
Bioscience Reports **8**, 455-464.
- Miyake R., Tanaka Y., Tsuda T., Kaibuchi K., Kikkawa U., Nishizuka Y. (1984).** Activation of protein kinase C by non-phorbol tumor promoter, mezerein.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **121**, 649-656.
- Moens W., Vokaer A., Kram R. (1975).** Cyclic AMP and cyclic GMP concentrations in serum- and density-restricted fibroblast cultures.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72**, 1063-1067.
- Moscona A. (1952).** Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos.
Exp. Cell Res. **3**, 535-539.
- Moscona A. (1961).** Ratation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions in vitro.
Exp. Cell Res. **22**, 455-475.
- Mueller-Klieser W. (1987).** Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. **113**, 101-122.
- Mufson R. A., Fischer S. M., Verma A. K., Gleason G. L., Slaga T. J., Boutwell R. K. (1979).** Effects of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate and mezerein on epidermal ornithine decarboxylase activity, isoproterenol-stimulated levels of cyclic adenosine

- 3':5'-monophosphate and induction of mouse skin tumors in vivo.
Cancer Res. **39**, 4791-4795.
- Mulcahy R. T., Rosenkrans Jr., W. A., Penney D. P., Cooper R. A. (1985).** The growth and morphology of FRTL-5 thyroid epithelial cells grown as multicellular spheroids in vitro.
In Vitro Cell. Develop. Biol. **21**, 513-520.
- Murdoch G. H., Rosenfeld M. G. (1982).** Eukaryotic transcriptional regulation and chromatin-associated protein phosphorylation by cyclic AMP.
Science **218**, 1315-1317.
- Murray A. W., Fitzgerald D. J. (1979).** Tumor promoters inhibit metabolic cooperation in cocultures of epidermal and 3T3 cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **91**, 395-401.
- Nederman T., Carlsson J., Malmqvist M. (1981).** Penetration of substances into tumor tissue - a methodological study on cellular spheroids.
In Vitro **17**, 290-298.
- Nederman T., Norling B., Glimelius B., Carlsson J., Brunk U. (1984).** Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids.
Cancer Res. **44**, 3090-3097.
- Nicholson B., Dermietzel R., Teplow D., Traub O., Willecke K., Revel J.-P. (1987).** Two homologous protein components of hepatic gap junctions.
Nature **329**, 732-733 .
- Nicholson B., Zhang J.-T. (1988).** Multiple protein components in a single gap junction: Cloning of a second hepatic gap junction protein (M 21000).
Mod. Cell Biol. **7**, 207-218.
- O'Brian C. A., Ward N. E. (1989).** Biology of the protein kinase C family.
Cancer and Metastasis Reviews **8**, 199-214.
- Oktar N., Darling J. L., Thomas D. G. T. (1987).** An experimental trial of cyclic nucleotides on multicellular spheroids derived from human brain tumours.
J. Neuro-Oncology **5**, 83-89.
- Ono J., Takaki R., Okano H., Fukuma M. (1979).** Long-term culture of pancreatic islet cells with special reference to the β -cell function.
In Vitro **15**, 95-102.
- Page E., Manjunath C. K. (1985).** Biochemistry and structure of cardiac gap junctions: Recent observations.
in: Bennett M.V.L., Spray D.C. (eds.)
Gap Junctions, 49-56.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Paul D. L. (1986).** Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein.

- J. Cell Biol. **103**, 123-134.
- Peracchia C., Bernardini G., Peracchia L. L. (1983).** Is calmodulin involved in the regulation of gap junction permeability ?
Pflügers Arch. **399**, 152-154.
- Pitts J. D. (1990).** Junctional communication: The role of communication compartments in complex multicellular organisms.
in: Robards A.W., Lucas W.J., Pitts J.D., Jongsma H.J., Spray D.C. (eds.)
Parallels in cell to cell junctions in plants and animals, 53-62.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Pitts J. D., Finbow M. E., Eldridge T., Buultjens J., Kam E., Shuttleworth J. (1985).**
Junctional communication and communication compartments in development.
in: Marthy H.-J. (ed.)
Cellular and molecular control of direct cell interactions, 323-335.
Plenum Press New York, London.
- Pitts J. D., Hamilton A. E., Kam E., Burk R. R., Murphy J. P. (1986).** Retinoic acid inhibits junctional communication between animal cells.
Carcinogenesis **7**, 1003-1010.
- Posternak T., Cehovic G. (1971).** Derivatives and analogues of cyclic nucleotides.
Annals New York Academy of Sciences, 42-49.
- Posternak T., Sutherland E. W., Henion W. F. (1962).** Derivatives of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate.
Biochim. Biophys. Acta **65**, 558-560.
- Revel J.-P., Karnovsky M. J. (1967).** Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver.
J. Cell Biol. **33**, C7-C12.
- Revel J.-P., Nicholson B. J., Yancey S. B. (1985).** Chemistry of gap junctions.
Ann. Rev. Physiol. **47**, 263-279.
- Revel J.-P., Yancey S. B. (1985).** Molecular conformation of the major intrinsic protein of lens fiber membranes: Is it a junction protein ?
in: Bennett M.V.L., Spray D.C. (eds.)
Gap Junctions, 33-48.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Revel J.-P., Yancey S. B., Nicholson B. J. (1986).** The gap junction proteins.
Trends Biochem. Sci. **11**, 375-377.
- Rofstad E. K., Sutherland R. M. (1989).** Growth and radiation sensitivity of the MLS human ovarian carcinoma cell line grown as multicellular spheroids and xenografted tumours.
Br. J. Cancer **59**, 28-35.
- Rozengurt E. (1982).** Synergistic stimulation of DNA synthesis by cyclic AMP derivatives

- and growth factors in mouse 3T3 cells.
J. Cell. Physiol. **112**, 243-250.
- Runyan R. B., Potts J. D., Sharma R. V., Loeber C. P., Chiang J. J., Bhalla R. C.** (1990). Signal transduction of a tissue interaction during heart development.
Cell Regulation **1**, 301-313.
- Russell W. C., Newman C., Williamson D. H.** (1975). A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses.
Nature **253**, 461-462.
- Ryan W. L., Heidrick M. L.** (1968). Inhibition of cell growth in vitro by adenosine 3',5'-monophosphate.
Science **162**, 1484-1485.
- Saez J. C., Spray D. C., Nairn A. C., Hertzberg E., Greengard P., Bennett M. V. L.** (1986). cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 2473-2477.
- Santos R. M., Rojas E.** (1987). Evidence for modulation of cell-to-cell electrical coupling by cAMP in mouse islets of Langerhans.
FEBS Letters **220**, 342-346.
- Schleich A.** (1973). The confrontation of normal and malignant cells in vitro. An experimental system in tumor invasion studies.
 in: Garattini S., Franchi G. (eds.)
Chemotherapy of Cancer Dissemination and Metastasis, 51-58.
 Raven Press, New York.
- Schmitz Y., Wolburg H.** (1991). Gap junction morphology of retinal horizontal cells is sensitive to pH alterations in vitro.
Cell Tissue Res. **263**, 303-310.
- Schwachöfer J. H. M.** (1990). Multicellular tumor spheroids in radiotherapy research.
Anticancer Res. **10**, 963-970.
- Seamon K. B., Padgett W., Daly J. W.** (1981). Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and intact cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 3363-3367.
- Segal J.** (1986). Trypsin-induced increase in cyclic AMP concentration in rat thymocytes.
Biochem. J. **239**, 603-607.
- Slaga T. J.** (1984). Can tumour promotion be effectively inhibited?
 in: Borzsonyi M., Day, Lapis, Yamasaki (eds.)
Models, mechanisms and etiology of tumour promotion, 497-506.
 IARC scientific publications, no. 56.
- Slaga T. J., Fischer S. M., Nelson K., Gleason G. L.** (1980). Studies on the mechanism of

skin tumor promotion: evidence for several stages in promotion.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3659-3663.

Sletholt K., Haug E., Gautvik K. M. (1987). On the involvement of cyclic AMP and extracellular Ca^{2+} in the regulation of hormone release from rat pituitary tumour (GH₂) cells in culture.

Bioscience Reports 7, 93-105.

Smets L. A., Van Rooy H. (1987). Mitogenic and antimitogenic effects of cholera toxin-mediated cyclic AMP levels in 3T3 cells.

J. Cell. Physiol. 133, 395-399.

Spray D. C. (1990). Electrophysiological properties of gap junction channels.

in: Robards A.W., Lucas W.J., Pitts J.D., Jongsma H.J., Spray D.C. (eds.)

Parallels in cell to cell junctions in plants and animals, 63-85.

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

Spray D. C., Bennett M. V. L. (1985). Physiology and pharmacology of gap junctions.

Ann. Rev. Physiol. 47, 281-303.

Spray D. C., Fujita M., Saez J. C., Choi H., Watanabe T., Hertzberg E., Rosenberg L. C., Reid L. M. (1987). Proteoglycans and glycosaminoglycans induce gap junction synthesis and function in primary liver cultures.

J. Cell Biol. 105, 541-551.

Spray D. C., White R. L., Campos de Carvalho A., Harris A. L., Bennett M. V. L. (1984). Gating of gap junction channels.

Biophys. J. 45, 219-230.

Spray D. C., White R. L., Verselis V., Bennett M. V. L. (1985). General and comparative physiology of gap junction channels.

in: Bennett M.V.L., Spray D.C. (eds.)

Gap Junctions, 139-153.

Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Stewart W. W. (1978). Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer.

Cell 14, 741-759.

Stewart W. W., Feder N. (1985). Lucifer dyes as biological tracers: a review.

in: Marthy H.-J. (ed.)

Cellular and molecular control of direct cell interactions, 297-312.

Plenum Press, New York, London.

Stöhr M., Vogt-Schaden M., Knobloch M., Vogel R., Futterman G. (1978). Evaluation of eight fluorochrome combinations for simultaneous DNA-Protein flow analyses.

Stain Technology 53, 205-215.

Sutherland R. M. (1986). Importance of critical metabolites and cellular interactions in the

- biology of microregions of tumors.
Cancer **58**, 1668-1680.
- Sutherland R. M. (1988)**. Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model.
Science **240**, 177-240.
- Sutherland R. M., Buchegger F., Schreyer M., Vacca A., Mach J.-P. (1987)**. Penetration and binding of radiolabeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their antigen binding fragments in human colon multicellular tumor spheroids.
Cancer Res. **47**, 1627-1633.
- Sutherland R. M., Durand R. E. (1976)**. Radiation response of multicell spheroids - an in vitro tumour model.
Curr. Top. Radiat. Res. **11**, 87-139.
- Sutherland R. M., Durand R. E. (1984)**. Growth and cellular characteristics of multicell spheroids.
in: Acker H., Carlsson J., Durand R., Sutherland R. M. (eds.)
Spheroids in Cancer Research. Methods and perspectives, 24-49.
Springer Verlag, Berlin.
- Sutherland R. M., McCredie J. A., Inch W. R. (1971)**. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas.
J. Nat. Cancer Inst. **46**, 113-120.
- Sweigert S. E., Alpen E. L. (1986)**. Dynamics of cell kinetic parameters during 9L spheroid growth.
Cell Tissue Kinet. **19**, 567-576.
- Thoresen G. H., Sand T.-E., Refsnes M., Dajani O. F., Guren T. K., Gladhaug I. P., Killi A., Christoffersen T. (1990)**. Dual effects of glucagon and cyclic AMP on DNA synthesis in cultured rat hepatocytes: stimulatory regulation in early G1 and inhibition shortly before the S phase entry.
J. Cell. Physiol. **144**, 523-530.
- Todaro G. J., Green H. (1963)**. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines.
J. Cell Biol. **17**, 299-313.
- Todaro G. J., Green H., Goldberg B. D. (1964)**. Transformation of properties of an established cell line by SV40 and polyoma virus.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **51**, 66-73.
- Toole B. P. (1976)**. Morphogenetic role of glycosaminoglycans (acid mucopolysaccharides) in brain and other tissues.
in: Barondes S. (ed.); Neuronal recognition, 275-324.
Plenum Publishing Corp., New York.

- Trapp B. D., Honegger P., Richelson E., Webster H. D. (1979).** Morphological differentiation of mechanically dissociated fetal rat brain in aggregating cell cultures. *Brain Res.* **160**, 117-130.
- Traub O., Janssen-Timmen U., Drüge P. M., Dermietzel R., Willecke K. (1982).** Immunological properties of gap junction protein from mouse liver. *J. Cellular Biochem.* **19**, 27-44.
- Traub O., Look J., Paul D., Willecke K. (1987).** Cyclic adenosine monophosphate stimulates biosynthesis and phosphorylation of the 26 kDa gap junction protein in cultured mouse hepatocytes. *Europ. J. Cell Biol.* **43**, 48-54.
- Traub O., Look J., Dermietzel R., Brümmer F., Hülser D.F., Willecke K. (1989).** Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes. *J. Cell Biol.* **108**, 1039-1051.
- Trosko J.E., Chang C C., Madhukar B.V. (1990).** Modulation of intercellular communication during radiation and chemical carcinogenesis. *Radiation Res.* **123**, 241-251.
- Umbreit J.N., Erbe R.W. (1979).** Transfer of tumor cells between cell aggregates as a model for adhesive changes in metastasis. *Cancer Res.* **39**, 2001-2005.
- Unwin P.N.T., Ennis P.D. (1984).** Two configurations of a channel-forming membrane protein. *Nature* **307**, 609-613.
- Unwin P.N.T., Zampighi G. (1980).** Structure of the junction between communicating cells. *Nature* **283**, 545-549.
- Vairo G., Argyriou S., Bordun A.-M. (1990).** Inhibition of the signaling pathways for macrophage proliferation by cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* **265**, 2692-2701.
- Van Dilla M.A. (1979).** Introduction and resumé of flow cytometry and sorting. in: Melamed M. R., Mullaney P. F., Mendelsohn M. L. (eds.) *Flow cytometry and sorting*, 11-37. John Wiley & Sons, New York.
- Vindelov L. (1977).** Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. *Virchows Arch. Biol. Cell Pathol.* **24**, 227-242.
- Walser B., Wildeboer B., Weibezahn K. F., Dertinger H. (1991).** Metabolic properties of adult rat hepatocytes cultured as multicellular spheroids. *Eur. J. Cell Biol.* **54** Suppl. 32, 81

- Warner A. E., Guthrie S. C., Gilula N. B. (1984).** Antibodies to gap-junctional protein selectively disrupt junctional communication in the early amphibian embryo. *Nature* **311**, 127-131.
- Warner A. E., Lawrence P. A. (1982).** Permeability of gap junctions at the segmental border in insect epidermis. *Cell* **28**, 243-252.
- Watanabe T., Saez J., Spray D. C., Reid L. (1987).** Heparins potentiate the regulation by hormones and growth factors of liver-specific mRNA expression in cultured hepatocytes. *J. Cell Biol.* **105**, 65a.
- Weinstein R. S., Pauli B. U. (1986).** Cell junctions and the biological behaviour of cancer. *CIBA foundation symposium* **125**, 240-260.
- Werner R., Levine E., Rabadan-Diehl C., Dahl G. (1991).** Gating properties of connexin32 cell-cell channels and their mutants expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B* **243**, 5-11.
- Wibe E., Lindmo T., Kaalhus O. (1981).** Cell kinetic characteristics in different parts of multicellular spheroids of human origin. *Cell Tissue Kinet.* **14**, 639-651.
- Wiener E. C., Loewenstein W. R. (1983).** Correction of cell-cell communication defect by introduction of a protein kinase into mutant cells. *Nature* **305**, 433-435.
- Wilson K. M., Lord E. M. (1987).** Specific (EMT6) and non-specific (WEHI-164) cytolytic activity by host cells infiltrating tumour spheroids. *Br. J. Cancer* **55**, 141-146.
- Winterhager E., Brümmer F., Dermietzel R., Hülser D. F., Denker H.-W. (1988).** Gap junction formation in rabbit uterine epithelium in response to embryo recognition. *Developmental Biol.* **126**, 203-211.
- Winterhager E., Stutenkemper R., Traub O., Beyer E., Willecke K. (1991).** Expression of different connexin genes in rat uterus during decidualization and at term. *Europ. J. Cell Biol.* **55**, 133-142.
- Yamasaki H. (1990).** Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. in: Robards A.W., Lucas W.J., Pitts J.D., Jongsma H.J., Spray (eds.) *Parallels in cell to cell junctions in plants and animals*, 115-127. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Yancey S. B., Edens J. E., Trosko J. E., Chang C.-C., Revel J.-P. (1982).** Decreased incidence of gap junctions between chinese hamster V-79 cells upon exposure to the tumor promoter 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Exp. Cell Res.* **139**, 329-340.
- Yancey S. B., John S. A., Lal R., Austin B. J., Revel J.-P. (1989).** The 43-kD

polypeptide of heart gap junctions: Immunolocalization, topology and functional domains.

J. Cell Biol. **108**, 2241-2254.

Yotti L. P., Chang C. C., Trosko J. E. (1979). Elimination of metabolic cooperation in chinese hamster cells by a tumor promotor.

Science **206**, 1089-1091.

Yuhas J. M., Li A. P., Martinez A. O., Ladman A. J. (1977). A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids.

Cancer Res. **37**, 3639-3643.

Zampighi G. A., Simon S. A. (1985). The structure of gap junctions as revealed by electron microscopy.

in: Bennett M.V.L., Spray D.C. (eds.)

Gap Junctions, 13-22.

Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Zimmer D. B., Green C. R., Evans W. H., Gilula N. B. (1987). Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and junction-derived single membrane structures.

J. Biol. Chem. **262**, 7751-7763.