

Die Anwendung der Gradient-Zentrifugation zur Herstellung synchroner Krebszellkulturen

Von

R. SCHINDLER

Pathologisches Institut der Universität Bern

In den letzten Jahren haben die biochemischen Prozesse, die dem geordneten Ablauf des Teilungszyklus von Säugerzellen zugrunde liegen, zunehmendes Interesse gefunden (MUELLER, 1969). Wegen der beschränkten Empfindlichkeit der verfügbaren Analysemethoden können biochemische Fragestellungen meist nicht an Einzelzellen bearbeitet werden. Deshalb werden Zellpopulationen benötigt, die den Teilungszyklus synchron durchlaufen. Eine Synchronisierung von Zellkulturen gelingt beispielsweise durch reversible Hemmung der DNS-Synthese mit Hilfe von bestimmten Antimetaboliten (EIDINOFF und RICH, 1959; RUECKERT und MUELLER, 1960; SCHINDLER, 1960). Dabei wird jedoch der Stoffwechsel der Zellen gestört, so dass er nicht mehr demjenigen normaler, nicht der Synchronisierung unterworfenen Zellkulturen vergleichbar ist. Es erscheint deshalb wünschbar, synchrone Zellkulturen mit Hilfe von Methoden zu gewinnen, die auf der Abtrennung der in einer bestimmten Zyklusphase befindlichen Zellen von der restlichen Zellpopulation beruhen. Eine solche Möglichkeit zur Herstellung synchroner Kulturen, die hier beschrieben wird, besteht in der Auftrennung der Zellen auf Grund von Unterschieden der Zellgrösse und der dadurch bedingten unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit.

Bei der Entwicklung dieser Methode mussten die folgenden Anforderungen erfüllt werden:

1. Abtrennung der Zellen einer Grössenklasse mit hoher Auflösung. Es ist zu erwarten, dass das Volumen einer Zelle, die unmittelbar vor der Zellteilung steht, im Mittel doppelt so gross ist wie dasjenige einer Zelle, die soeben aus einer Zellteilung hervorgegangen ist. Um eine gute Synchronie zu erhalten, müssen somit Zellen voneinander getrennt werden, deren Volumina sich wesentlich weniger als im Verhältnis von 2 : 1 unterscheiden.
2. Keine irreversible Schädigung von Zellen durch Komponenten der Lösung, in der die Zellen auf Grund ihrer unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit aufgetrennt werden. Zur Stabilisierung der Flüssigkeit, in der die Zellen sedimentieren, ist ein Dichtegradient erforderlich, für dessen Herstellung somit nur Substanzen in Frage kommen, die für die Zellen nicht toxisch sind.

3. Keine oder möglichst geringe Veränderung des Proliferationsverhaltens der Zellen durch die mit der Auftrennung verbundenen Manipulationen. Selbst wenn die Fähigkeit der Zellen zur weiteren Vermehrung erhalten bleibt, ist eine vorübergehende Verzögerung im Durchlaufen des Teilungszyklus in Betracht zu ziehen. Falls eine solche Verzögerung nicht für alle Zellen gleich gross ist, wird sie sich in einer unbefriedigenden Synchronie äussern.
4. Keine Schwellung oder Schrumpfung der Zellen während der Auftrennung im Dichtegradienten. Um eine Veränderung der Zellgrösse auszuschliessen, sollten im ganzen Bereich des Gradienten isotonische Verhältnisse vorliegen.
5. Möglichst kurze Dauer der für die Auftrennung der Zellen benötigten Manipulationen. Es muss vermieden werden, dass die Zellen während der Auftrennung einen erheblichen Teil des Zellzyklus durchlaufen und dadurch ihre Grösse verändern, da sich dies auf die Trennschärfe ungünstig auswirken würde.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an Suspensionskulturen eines transplantierbaren Mäuse-Mastocytoms (Zellstamm P-815-X 2) (DUNN und POTTER, 1957; GREEN und DAY, 1959; SCHINDLER, DAY und FISCHER, 1959) durchgeführt. Die für die Kultur verwendete Methodik ist an anderer Stelle beschrieben worden (SCHINDLER, DAY und FISCHER, 1959). Die Nährlösung enthielt 10% Pferdeserum, im übrigen entsprach ihre Zusammensetzung derjenigen des früher beschriebenen Mediums I (SCHAER und SCHINDLER, 1967).

Für die Auftrennung der Zellen auf Grund von Unterschieden der Zellgrösse wurde vorerst die konventionelle Dichtegradient-Zentrifugation mit Hilfe eines Ausschwing-Rotors verwendet. Lineare Gradienten wurden durch Mischen der beiden folgenden Lösungen hergestellt: a) eine Nährlösung, die an Stelle von 8 mg/ml NaCl Saccharose in einer Konzentration von 95 mg/ml enthielt, und b) eine Nährlösung, die 6,4 mg/ml NaCl und 19 mg/ml Saccharose enthielt. Die Gradienten waren dadurch in ihrem ganzen Bereich isotonisch und enthielten mit Ausnahme von NaCl alle Komponenten der normalen Nährlösung in optimaler Konzentration.

Die Gradienten wurden in Zentrifugengläser von 21 cm Länge und 1,5 bis 2,5 cm Durchmesser eingefüllt, mit ca. 2×10^8 Zellen in 2 bis 5 ml Nährlösung überschichtet und während 4 bis 5 Minuten bei 1200 rpm (entsprechend 80 bis 400 g) zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation war ein Teil der Zellen bereits auf den Boden des Zentrifugenglases sedimentiert, während sich die restlichen Zellen auf die untere Hälfte des Gradienten verteilten. Die am langsamsten sedimentierenden Zellen – insgesamt 2 bis 5% der ursprünglichen Zellzahl – wurden abpipettiert, zentrifugiert, in Saccharose-freier Nährlösung suspendiert und unter Bedingungen eines "Steady state" (SCHINDLER, RAMSEIER, SCHAER und GRIEDER, 1970) als Suspensionskultur weiter-inkubiert.

Alle 60 Minuten wurde aus der Kultur eine Probe entnommen und mit dem gleichen Volumen einer Fixationslösung (Äthylalkohol-Eisessig- H_2O 5:2:3, Vol/Vol) vermischt. Die Bestimmung der Mitose-Indices an diesen Proben erfolgte gemäss

der an anderer Stelle beschriebenen Methodik (SCHINDLER, RAMSEIER, SCHAER und GRIEDER, 1970).

Für die Auftrennung der Zellen mittels Zonalzentrifugation wurde ein Zonalrotor A (MSE, England) verwendet. Isotonische Saccharose-Gradienten wurden in gleicher Weise wie für die Zentrifugation im Ausschwing-Rotor hergestellt, in den Zonalrotor eingepumpt, anschliessend die Zellsuspension vom Zentrum des Rotors her eingebracht und mit normaler Nährlösung überschichtet. Darauf wurde die Zentrifugationsgeschwindigkeit erhöht und gleichzeitig der Gradient durch Unterschichten mit einer 15%igen Saccharose-Lösung in Richtung auf das Zentrum des Rotors verschoben, so dass die am langsamsten sedimentierenden Zellen durch diesen Gegenstrom in annähernd konstantem Abstand von der Rotor-Achse gehalten wurden. Auf diese Weise liessen sich die am langsamsten sedimentierenden Zellen nach der Abtrennung von der restlichen Zellpopulation in relativ kurzer Zeit wieder aus dem Rotor auspumpen. Zudem konnte eine allzu grosse Verdünnung der Zellsuspension im Zonalrotor vermieden werden. Die am langsamsten sedimentierenden Zellen wurden ebenso wie nach Zentrifugation im Ausschwing-Rotor in normale Nährlösung gebracht und unter "steady state"-Bedingungen weiterinkubiert.

Ergebnisse und Diskussion

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Fähigkeit der am langsamsten sedimentierenden Zellen zur Bildung von Kolonien in einem halbfesten Nährmedium durch die Gradient-Zentrifugation nicht beeinträchtigt wird. Die verwendete Methode hat somit keinen schädigenden Effekt auf das Proliferationsvermögen der Zellen. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die am langsamsten sedimentierenden Zellen im Mittel kleiner sind und zudem eine geringere Streuung der Zellgrösse aufweisen als die gesamte Zellpopulation (SCHINDLER, RAMSEIER, SCHAER und GRIEDER, 1970).

Die durch Gradient-Zentrifugation im Ausschwing-Rotor erreichbare Synchronie ist in Abb. 1 dargestellt. Zu Beginn der Inkubation der am langsamsten sedimentierenden Zellen ist die Mitose-Tätigkeit sehr gering. Der Mitose-Index steigt dann an und erreicht nach ungefähr 7 Stunden ein Maximum und nach weiteren 4 Stunden ein Minimum. Der zeitliche Verlauf der Mitosetätigkeit lässt eine Periodizität von ca. 8 Stunden erkennen, die der Generationszeit der Zellen unter den verwendeten Kulturbedingungen entspricht. Zu Beginn der Inkubation befand sich somit der Hauptanteil der Zellen in früher Interphase.

Nach der Auftrennung von Zellen durch Zonalzentrifugation wurden bisher ähnliche Ergebnisse erzielt wie bei Verwendung des Ausschwing-Rotors. Trotz der theoretisch grösseren Leistungsfähigkeit der Zonalzentrifugation liess sich somit das Ausmass der Synchronie als Ausdruck der Trennschärfe nicht verbessern. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der Instabilität des Gradienten bei Beschleunigung oder Verzögerung des Zonalrotors. So liess sich bei Änderung der Rotationsgeschwindigkeit eine rasche Verbreiterung der die Zellen enthaltenden Zone im Rotor beobachten. Zur Vermeidung dieses Effekts soll versucht werden, die Steuerung der

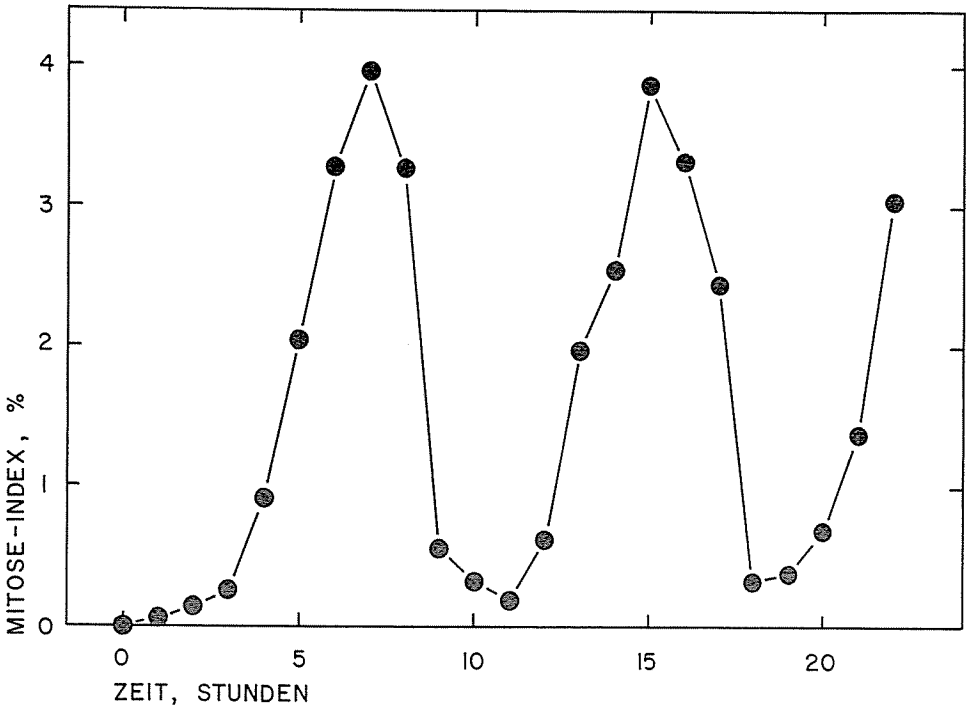


Abb. 1. Die Mitoseaktivität in der Suspensionskultur eines Mäuse-Mastocytoms als Funktion der Zeit nach Inkubation von Zellen, die auf Grund ihrer langsamen Sedimentationsgeschwindigkeit in einem Saccharose-Gradient von der Gesamtzellpopulation abgetrennt wurden.

Zentrifuge so zu modifizieren, dass beliebig langsame und in ihrem zeitlichen Ablauf gut reproduzierbare Veränderungen der Rotationsgeschwindigkeit vorgenommen werden können.

Zusammenfassung

Die Zentrifugation *in vitro* gezüchteter Zellen (Mäuse-Mastocytom P-815-X 2) in Saccharose-Gradienten erlaubt eine Abtrennung der Zellen in früher Interphase von der übrigen Zellpopulation. Isotonische Gradienten wurden durch Mischen einer normalen mit einer modifizierten Nährlösung hergestellt, in der NaCl durch Saccharose in isoosmolarer Konzentration substituiert war. Bei Weiterzüchtung der Zellen liess sich eine Synchronie der Mitosetätigkeit beobachten. Die Zonal-Zentrifugation ergab ähnliche Resultate wie die Gradient-Zentrifugation im Ausschwing-Rotor.

Die Untersuchungen wurden unterstützt durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.

Literatur

1. T. B. DUNN and M. POTTER: A transplantable mast-cell neoplasm in the mouse. *J. nat. Cancer Inst.* *18*, 587–601 (1957).
2. M. L. EIDINOFF and M. A. RICH: Growth inhibition of a human tumor cell strain by 5-fluoro-2'-deoxyuridine: time parameters for subsequent reversal by thymidine. *Cancer Res.* *19*, 521–524 (1959).
3. J. P. GREEN, and M. DAY: Heparin, 5-hydroxytryptamine, and histamine in neoplastic mast cells. *Biochem. Pharmacol.* *3*, 190–205 (1960).
4. G. C. MUELLER: Biochemical events in the animal cell cycle. *Fed. Proc.* *28*, 1780–1789 (1969).
5. R. R. RUECKERT and G. C. MUELLER: Studies on unbalanced growth in tissue culture. I. Induction and consequences of thymidine deficiency. *Cancer Res.* *20*, 1584–1591 (1960).
6. J. C. SCHAEER and R. SCHINDLER: The requirement of mammalian cell cultures for serum proteins. Growth-promoting activity of pepsin-digested serum albumin in different media. *Biochim. biophys. Acta* *147*, 154–161 (1967).
7. R. SCHINDLER: Der zeitliche Ablauf der Desoxyribonukleinsäure-Synthese im Teilungszyklus von Krebszellen in Kultur. *Helv. physiol. Acta* *18*, C 93–C 95 (1960).
8. R. SCHINDLER, M. DAY, and G. A. FISCHER: Culture of neoplastic mast cells and their synthesis of 5-hydroxytryptamine and histamine in vitro. *Cancer Res.* *19*, 47–51 (1959).
9. R. SCHINDLER, L. RAMSEIER, J. C. SCHAEER and A. GRIEDER: Studies on the division cycle of mammalian cells. III. Preparation of synchronously dividing cell populations by isotonic sucrose gradient centrifugation. *Exp. Cell Res.* *59*, 90–96 (1970).