



KfK 5308
Februar 1994

Die Wirkung der Vitamin A-Säure auf multizelluläre Sphäroide

J.-C. Stein
Institut für Toxikologie

Kernforschungszentrum Karlsruhe

KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE
Institut für Toxikologie

KfK 5308

Die Wirkung der Vitamin A-Säure auf multizelluläre Sphäroide

Johannes-Christoph Stein

**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, 76021 Karlsruhe

ISSN 0303-4003

Die Wirkung der Vitamin A-Säure auf multizelluläre Sphäroide

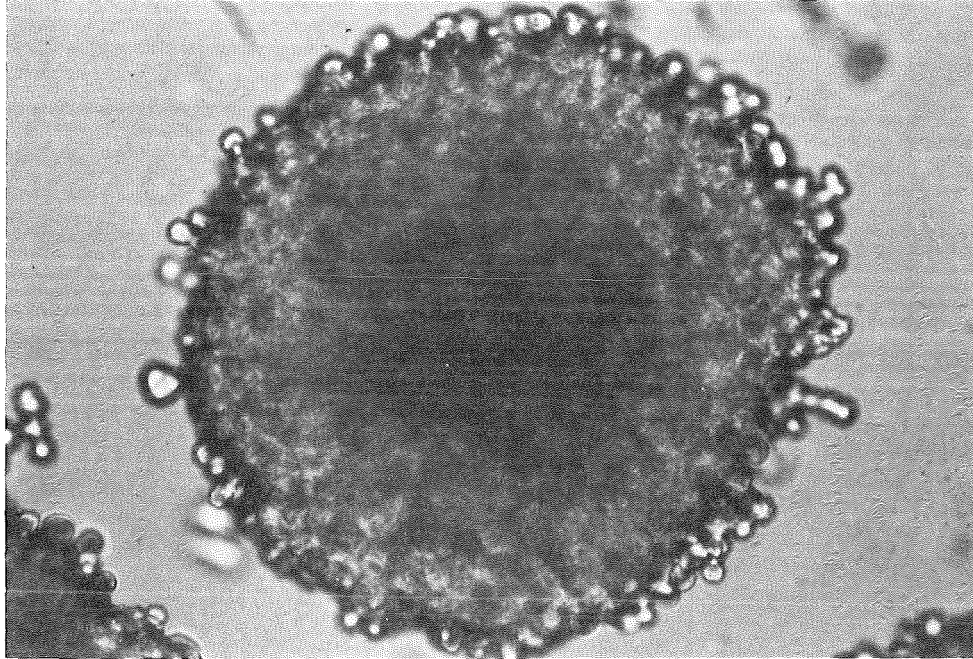
Zusammenfassung:

Der Einfluß der Vitamin A-Säure (Retinsäure) auf biologische Systeme ist vielfältig. In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung auf die Gap Junction-vermittelte interzelluläre Kommunikation von Kulturzellen untersucht. Um Zelllinien-spezifische und Spezies-spezifische Effekte zu vermeiden, kommen eine menschliche Amnionzelllinie (FL-Zellen) und eine Fibroblastenzelllinie der Maus (SV40-3T3-Zellen) zur Verwendung. Beide lassen sich durch niedrigere Retinsäurekonzentrationen (0,1 nM und 0,1 µM) in ihrer Zell-Zellkommunikation stimulieren. Durch Zugabe von 0,1 mM Retinsäure kann die interzelluläre Kommunikation gehemmt werden. Diese Veränderungen spiegeln sich in anderen zellulären Parametern wieder. Die Untersuchungen hierzu erfolgen an einschichtig wachsenden Monolayern und an dreidimensionalen multizellulären Aggregaten, den Sphäroiden. Nur im Sphäroid wird der Einfluß der interzellulären Kommunikation sichtbar: Modulation der Zellkopplung führt hier zu veränderten Verteilungen des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP), des Zellzyklus und der DNA-Synthese. Hierbei zeigt sich generell für das cAMP und die Zellzyklusverteilung eine Erniedrigung von vorhandenen Gradienten durch erhöhte interzelluläre Kommunikation. Durch Hemmung der Zellkopplung werden Gradienten aufgebaut oder verstärkt. Im Monolayer sind solche Zusammenhänge nicht erkennbar. Untersuchungen der DNA-Synthese nach Inkubation mit höheren Retinsäurekonzentrationen zeigen eine mögliche klinische Relevanz für Kombinationstherapien in der Krebsheilung. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der interzellulären Kommunikation ebenso wie die Wichtigkeit eines geeigneten Zellkultursystems.

The effect of vitamin A-acid on multicellular spheroids

Abstract:

Vitamin A-acid (retinoic acid) has multiple influences on biological systems. In this study the effect on gap junction-mediated intercellular communication of cultured cells is investigated. To avoid cell line-specific and species-specific effects a human amniotic cell line (FL-cells) and a mouse fibroblast cell line (SV40-3T3-cells) are used. Both can be enhanced in their rate of cell-cell communication by low concentrations of retinoic acid (0,1 nM and 0,1 µM). Adding 0,1 mM retinoic acid decreases intercellular communication. These alterations influence other cellular parameters. The investigations are carried out with cells grown as monolayers and with threedimensional multicellular aggregates, so called spheroids. The influence of intercellular communication is only visible in spheroids: here modulations of cell coupling lead to altered cyclic Adenosinmonophosphat (cAMP) distribution, altered cell cycle distribution and changes in DNA-synthesis patterns. Possible gradients of cAMP and cell cycle distribution are flattened in general by enhanced intercellular communication. Decreased cell coupling produces gradients or steepens existing ones. Monolayers do not show these dependencies. Investigations of the DNA-synthesis indicate a possible clinical relevance for combined therapies in cancer cure. These results underline the importance of intercellular communication as well as the necessity of an appropriate cell culture system.



Multizellulärer Sphäroid einer menschlichen Amnionzelllinie (FL) mit einem ungefähren Durchmesser von 200 μm .

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungen.....	6
I. Einleitung.....	7
Interzelluläre Kommunikation in Geweben	7
Direkte Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions	8
Multizelluläre Sphäroide	10
Retinsäure und Zelldifferenzierung.....	12
Aufgabenstellung	13
II. Material und Methoden.....	15
II.1. Zellen.....	15
II.1.1. FL-Zellen	15
II.1.2. SV40-3T3-Zellen	15
II.2. Zellkultur	15
II.2.1. Monolayer.....	15
II.2.2. Sphäroide	16
II.2.2.1. FL-Zellen.....	16
II.2.2.2. SV40-3T3-Zellen.....	17
II.2.3. Sequentielle Trypsinierung der Sphäroide.....	18
II.2.4. Zellvitalitätsmessung	18
II.2.5. Mycoplasmentest.....	19
II.2.6. Einfrieren von Kulturzellen	20
II.2.6.1. Kryokonservierung der Zelllinien.....	20
II.2.6.2. Einfrieren von Sphäroiden zur Anfertigung von Gefrierschnitten	20
II.2.7. Anfertigung von Gefrierschnitten.....	21
II.2.8. Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gefrierschnitten.....	21
II.3. Medien und Substanzen	22
II.3.1. Medien.....	22

II.3.2. Chemikalien.....	22
II.3.3. Puffer und Lösungen	23
II.3.4. Lösungen für die histologische Präparation	24
II.3.5. Lösungen für die Elektrophysiologie	25
II.4. Retinsäure.....	25
II.5. Immunocytochemie	25
II.5.1. Monolayer.....	26
II.5.2. Sphäroide	27
II.6. Proliferationsmessung	28
II.6.1. Präparation und Färbung der Zellkerne	28
II.6.2. Meßprinzip.....	29
II.6.3. Auswertung.....	30
II.7. cAMP-Messung.....	32
II.7.1. cAMP-Isolierung	32
II.7.2. Quantitative Bestimmung des cAMP-Gehalts.....	32
II.8. Messung der interzellulären Kommunikation via Gap Junctions	33
II.8.1. Versuchsaufbau.....	33
II.8.2. Mikroelektroden.....	35
II.8.3. Mikro-Iontophorese von Lucifer Yellow	35
II.8.4. Dokumentation	36
III. Ergebnisse.....	37
III.1. Interzelluläre Kommunikation.....	37
III.1.1. Interzelluläre Kommunikation bei Monolayerzellen.....	38
III.1.1.1. FL-Monolayerzellen	38
III.1.1.2. SV40-3T3-Monolayerzellen	43
III.2. cAMP-Gehalt.....	48
III.2.1. cAMP-Gehalt in Monolayerzellen	49
III.2.1.1. FL-Monolayerzellen	49
III.2.1.2. SV40-3T3-Monolayerzellen	51

III. 2.2. cAMP-Gehalt in Sphäroidzellen	53
III.2.2.1. FL-Sphäroidzellen.....	53
III.2.2.2. SV40-3T3-Sphäroidzellen.....	56
III.3. Zellzyklusverteilung	59
III.3.1. Zellzyklusverteilung in Monolayerzellen.....	59
III.3.1.1. FL-Monolayerzellen	60
III.3.1.2. SV40-3T3-Monolayerzellen	62
III.3.2. Zellzyklusverteilung in Sphäroidzellen	64
III.3.2.1. FL-Sphäroidzellen.....	65
III.3.2.2. SV40-3T3-Sphäroidzellen.....	68
III.4. DNA-Synthese	71
III.4.2. DNA-Synthese in Sphäroidzellen	72
III.4.2.1. FL-Sphäroidzellen.....	72
III.4.2.2. SV40-3T3-Sphäroidzellen.....	73
IV. Diskussion.....	74
IV.1. Interzelluläre Kommunikation, cAMP und Retinsäurewirkung	74
IV.1.1. Kurzaßriß relevanter Literaturdaten	74
IV.1.1.1. Biochemisches Verhalten der Retinsäure	74
IV.1.1.2. Interzelluläre Kommunikation und cAMP	75
IV.1.2. Beobachtete Wirkungen der Retinsäure auf das cAMP und die interzelluläre Kommunikation in Monolayern.....	75
IV.1.2.1. Einfluß der Retinsäure auf den intrazellulären cAMP-Gehalt.....	75
IV.1.2.2. Kopplungsstimulation durch geringe Retinsäurekonzentrationen.....	76
IV.1.2.3. Inhibierung der Kopplung durch 0,1 mM Retinsäure	78
IV.1.3. cAMP und interzelluläre Kommunikation in Sphäroiden	79
IV.1.3.1. Interzelluläre Kommunikation	79
IV.1.3.2. Verhalten des intrazellulären cAMPs	79

IV.2. Zellzyklusverteilung in Monolayern und Sphäroiden	81
IV.2.1. Monolayer	81
IV.2.2. Sphäroide.....	81
IV.2.2.1. FL-Sphäroide.....	82
IV.2.2.2. SV40-3T3-Sphäroide.....	83
IV.2.3. BrdU-Einbau in Sphäroide	83
IV.3. Retinsäure-induzierte Veränderungen der Zellkommunikation und der Proliferation in Sphäroiden: Mögliche klinische Bedeutung	85
Schlußfolgerungen.....	88
V. Zusammenfassung	90
VI. Anhang	92
Tabellen zu den Ergebnisgrafiken	92
VI.1. Interzelluläre Kommunikation	92
VI.1.1. Interzelluläre Kommunikation bei Monolayerzellen.....	92
VI.1.1.1. FL-Monolayerzellen.....	92
VI.1.1.2. SV40-3T3-Monolayerzellen.....	93
VI.2. cAMP-Gehalt	94
VI.2.1. cAMP-Gehalt in Monolayerzellen.....	94
VI.2.1.1. FL-Monolayerzellen.....	94
VI.2.1.2. SV40-3T3-Monolayerzellen.....	95
VI. 2.2. cAMP-Gehalt in Sphäroidzellen	96
VI.2.2.1. FL-Sphäroidzellen	96
VI.2.2.2. SV40-3T3-Sphäroidzellen	99
VI.3. Zellzyklusverteilung.....	102
VI.3.1. Zellzyklusverteilung in Monolayerzellen	102
VI.3.1.1. FL-Monolayerzellen.....	102
VI.3.1.2. SV40-3T3-Monolayerzellen.....	103
VI.3.2. Zellzyklusverteilung in Sphäroidzellen.....	104
VI.3.2.1. FL-Sphäroidzellen	104

VI.3.2.2. SV40-3T3-Sphäroidzellen	107
VII. Literatur.....	110

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	Brom-desoxy-Uridin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FCS	Fötale Kälberserum
fmol	femtomol
g	Gramm; Erdbeschleunigung
h	Stunden
krist.	kristallin
M	1 molar; Mega
ml	Milliliter
mM	millimolar
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
n	Anzahl der unabhängigen Versuche
nA	Nanoampere
nm	Nanometer
nM	nanomolar
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RA	Retinsäure
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleinsäure
s.	siehe
SV40	Simian Virus 40
Z	Zellen

I. Einleitung

Gegenstand dieser Arbeit war es, an einem komplexen Zellkulturmodell, den multizellulären Sphäroiden, bestimmte Wirkungen des Vitamin A-Derivates Retinsäure zu studieren. Es ging dabei in erster Linie um Einflüsse auf die durch Gap Junction vermittelte interzelluläre Kommunikation und dem daraus resultierenden Signal- und Proliferationsverhalten von Zellen unter den Bedingungen eines dreidimensionalen Gewebeverbandes. Um diese Zielrichtung der Arbeit zu begründen und zu verdeutlichen, seien zunächst kurz die wichtigsten Aspekte der interzellulären Kommunikation, des Sphäroid-Modells und der Retinsäurewirkung dargestellt.

Interzelluläre Kommunikation in Geweben

Eine Grundvoraussetzung für das Entstehen und die Existenz von mehrzelligen Organismen ist der Austausch von Information zwischen den beteiligten Zellen, vor allem in Form von Signal- und Steuermolekülen. Koordination, Zellspezialisierung, mithin die gezielte Differenzierung von Zellen in Geweben sind ohne eine solche Kommunikation nicht möglich. Im Laufe der Entwicklungsgeschichte haben sich in der Natur hierfür verschiedene Strategien entwickelt. Informationen über ihre Umgebung erhält die Zelle beispielsweise über Rezeptoren, die sich außen an der Zellmembran befinden. Diese nehmen ihre Botschaften entweder über spezifische Oberflächenproteine durch den direkten Kontakt zur benachbarten Zelle oder über Botenstoffe von weiter entfernten Zellen auf. Diese Botenstoffe sind uns zum Beispiel als Hormone bekannt, die von endokrinen Drüsenzellen in die Körperflüssigkeit abgegeben werden und an weit entfernten Zielzellen hochspezifische Reaktionen auslösen. Weitere Botenstoffe sind die Neurotransmitter, aber auch körperfremde Stoffe (Antigene) können durch die Bindung an Oberflächenproteine spezifische Antworten der Zelle auslösen. Eine weitere Möglichkeit des Informationsaustausches wurde mit der Entwicklung von Nervenzellen erschlossen. In

diesem Fall werden spezifische Reizungen der Zellen in elektrische Signale kodiert und mit hoher Geschwindigkeit weitergeleitet.

Direkte Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions

Vielzelligen tierischen Organismen bietet sich auf zellulärer Ebene eine besondere Art des Informationsaustausches: Sie haben die Möglichkeit, untereinander direkt zu kommunizieren. Dies wird durch Zell-Zell-Kontakte, sogenannte Gap Junctions vermittelt. Dabei handelt es sich um echte Plasmabrücken zwischen den Intra-zellularräumen, vergleichbar den pflanzlichen Plasmodesmen. Entdeckt wurden diese zellulären Verbindungen an den Nervenzellen des Flußkrebse bei der Weiterleitung elektrischer Signale (Furshpan und Potter, 1957). Aufgrund dieser Eigenschaft wurden die Gap Junctions zunächst als "low resistance junctions" oder "elektrische Synapsen" bezeichnet.

Gap Junctions sind die am häufigsten auftretenden Zellverbindungen in allen Säugetiergeweben und in fast allen Geweben der verschiedensten Tierstämme zu finden. So wurden sie beispielsweise bei Hohltieren (Hand und Gobel, 1972), bei Ringelwürmern (Berger, 1970), bei Gliedertieren (Payton et al., 1969; Rose, 1971), bei Stachelhäutern (Tupper und Saunders, 1972), bei Knochenfischen (Bennett und Trinkhaus, 1970), bei Vögeln (Sheridan, 1968) und bei Amphibien (Decker und Friend, 1974) elektrophysiologisch und elektronenmikroskopisch nachgewiesen. Gap Junctions werden von Proteinen in der Zellmembran gebildet. Eine Einheit aus sechs Aminosäureketten (Connexine, Abb. 1) bildet einen transmembranen Halbkanal (Connexon) in einer Zelle. Bei entsprechendem Kontakt zur benachbarten Zelle entsteht ein durchgängiger Kanal. Hierfür nähern sich die Membranen der beiden Zellen in diesem Bereich auf einen Abstand von etwa 2 nm an (Revel und Karnovsky, 1967). Die gebildeten Kanalporen haben einen Durchmesser von ungefähr 1,5 nm.

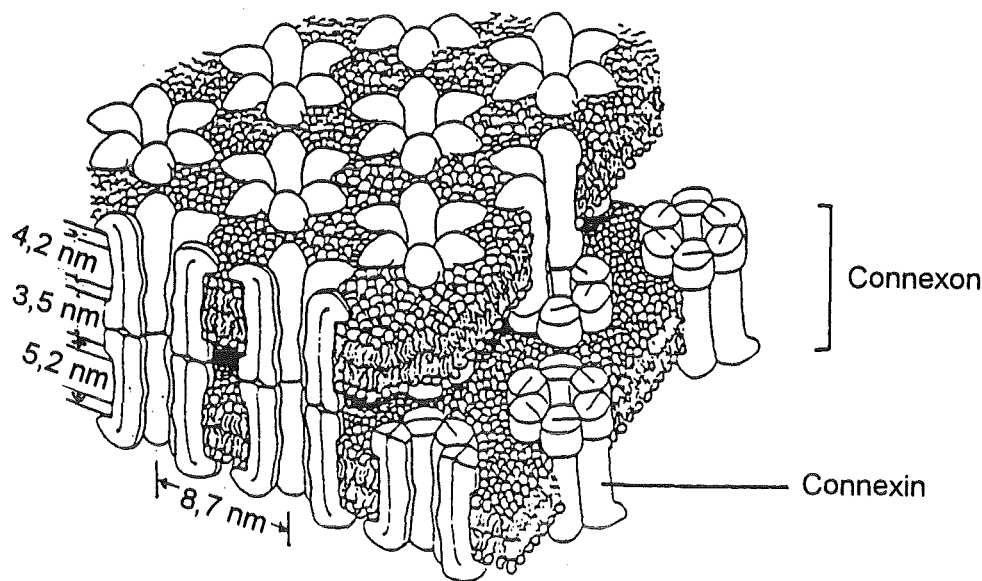


Abb. 1: Schematische Darstellung der Struktur von Gap Junctions (nach Makowski et al., 1977).

Durch die Gap Junctions können Moleküle einer relativen Molekülmasse von bis zu zirka 900 Dalton frei von einer Zelle in die andere diffundieren (Flagg-Newton et al., 1979). So können Ionen, Zuckermoleküle, Aminosäuren, Nukleotide, Steroidhormone und zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) über Gap Junctions ausgetauscht werden (Staehein und Hull, 1978). Die hierdurch zustandekommende metabolische Kopplung der Zellen ermöglicht unter anderem das Überleben von Zellen mit einem Enzymdefekt durch den Kontakt mit normalen Zellen (Subak-Sharpe et al., 1969).

Eine weitere Funktion der Gap Junctions besteht im direkten Vermitteln von elektrischen Signalen. Beispielsweise sind die Synchronisation des Herzschlags und die Koordination der Darmperistaltik an die Existenz von Gap Junctions gebunden. Auch die eingangs erwähnte Koordination innerhalb eines mehrzelligen Organismus und Störungen hierbei werden, ebenso wie die Steuerung der Differenzierung, mit Gap Junctions in Verbindung gebracht. Es wurde früh vermutet, daß ein Botenstoff über Zellkanäle diffundiert und entlang der

Diffusionsstrecke konzentrationspezifische Zellantworten in bezug auf die Differenzierung auslöst (Spemann, 1938).

Dies legt nahe, daß eine solche physiologische Funktion der Gap Junctions und ihre Auswirkung auf das Zellverhalten nur in einem System zum Tragen kommt, in dem sich lokal unterschiedliche Konzentrationen aufbauen können. Diese Voraussetzungen sind natürlicherweise in einem dreidimensional organisierten Zellsystem gegeben, insbesondere in den Sphäroiden, dem hauptsächlichen Untersuchungsobjekt dieser Arbeit. Im Monolayer sind alle Zellen identischen, durch die einheitlichen Konzentrationsverhältnisse des übersichteten Mediums gegebenen Bedingungen ausgesetzt. Die Wirkung der Gap Junctions als Steuerungselement für Konzentrationsgradienten ist im Monolayer gewissermaßen trivial, es sei denn, er enthält kommunizierende Zellen unterschiedlichen Typs (wie etwa bei der metabolischen Kopplung; s. oben). Dies läßt auch plausibel erscheinen, daß gewisse, auf direkter Zellkommunikation beruhende Effekte (hierzu zählt zum Beispiel auch eine besondere Form der Strahlenresistenz) nur unter den Bedingungen eines dreidimensionalen Zellverbandes zu beobachten sind (Dertinger und Hülser, 1984).

Multizelluläre Sphäroide

Sphäroide sind kugelförmig und substratfrei kultivierbare Zellaggregate. Sie können im Prinzip von allen Zellen tierischen und menschlichen Ursprungs gezüchtet werden, die über die Fähigkeit zur Anheftung verfügen. Die Aggregation solcher Zellen führt zu Sphäroiden, die aufgrund weiterer Zellteilungen schließlich viele tausend Zellen enthalten und in der vorliegenden Arbeit einen Durchmesser von etwa 400 µm erreichen können. In solchen Sphäroiden kommt es zur Ausbildung von radialen Gradienten des pH-Werts, der Nährstoffe und der Sauerstoffversorgung zwischen den äußeren und den inneren Zellschichten (Carlson und Acker, 1988; Groebe und Mueller-Klieser, 1991). Diese

unterschiedlichen Mikromilieus führen innerhalb des Sphäroids zu einer physiologischen und funktionellen Heterogenität der Zellen, wie sie auch im normalen Gewebe, besonders aber auch in Tumoren und Metastasen anzutreffen ist.

Während im Sphäroid das örtliche Mikromilieu vom Abstand zur Peripherie abhängt, ist es *in vivo* durch die Entfernung zum nächsten versorgenden Blutgefäß bestimmt. Mangelerscheinungen, die durch zu großen Abstand zur Blutversorgung entstehen oder mangelnder Abtransport von toxischen Abbauprodukten, führen sowohl in Tumoren als auch in Sphäroiden ab einer bestimmten, von der Zellart abhängigen Größe, zur Entstehung von Nekrosen. Dies sind Bereiche im Innern eines Tumors oder in den zentralen Bereichen der Sphäroide, in denen zerstörte Zellen vorzufinden sind.

Durch die unterschiedliche Versorgung der Zellen und andere Faktoren bilden sich außerdem Proliferationsgradienten aus. Dies bedeutet, daß die Zellen in den äußeren Bereichen schneller proliferieren als im Innern des Aggregats. Diese Ähnlichkeiten mit der *in vivo*-Situation haben dazu geführt, daß multizelluläre Sphäroide in der Forschung als ein *in vitro*-Modell für Tumoren Verwendung finden (Sutherland et al., 1971; Mueller-Klieser, 1985 und 1987). Die aufgeführten Vorteile des Sphäroidmodells werden für die Erforschung der Tumor-Wirt-Wechselwirkung, Invasion und Metastasierung genutzt. Auch in der allgemeinen Zellbiologie werden Sphäroide für das bessere Verständnis der zellulären Wechselwirkungen genutzt (zur Übersicht: Durand, 1990).

Zu diesen physiologischen Besonderheiten des Sphäroidsystems kommt noch ein dreidimensionales Zell-Kommunikations- und Interaktionsmuster. Insgesamt induzieren diese Faktoren im Sphäroid Zelldifferenzierung (Dertinger und Hülser, 1984), was sich beispielsweise in der Ausbildung von Extrazellular-Matrices manifestiert (Nedermann et al., 1984).

Retinsäure und Zelldifferenzierung

Einflüsse des Vitamin A und seinen Derivaten auf das zelluläre Verhalten sind seit dem Beginn dieses Jahrhunderts bekannt (Wolbach und Howe, 1925) und werden seitdem *in vivo* und *in vitro* intensiv untersucht. In der Erforschung der Morphogenese wird dabei seit etwa 15 Jahren besonderes Augenmerk auf den differenzierenden Effekt der Retinsäure (Abb. 2) gelegt.

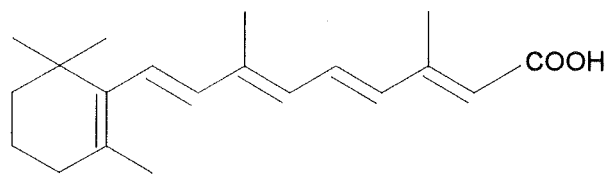


Abb. 2: All-trans Retinsäure (englisch: retinoic acid).

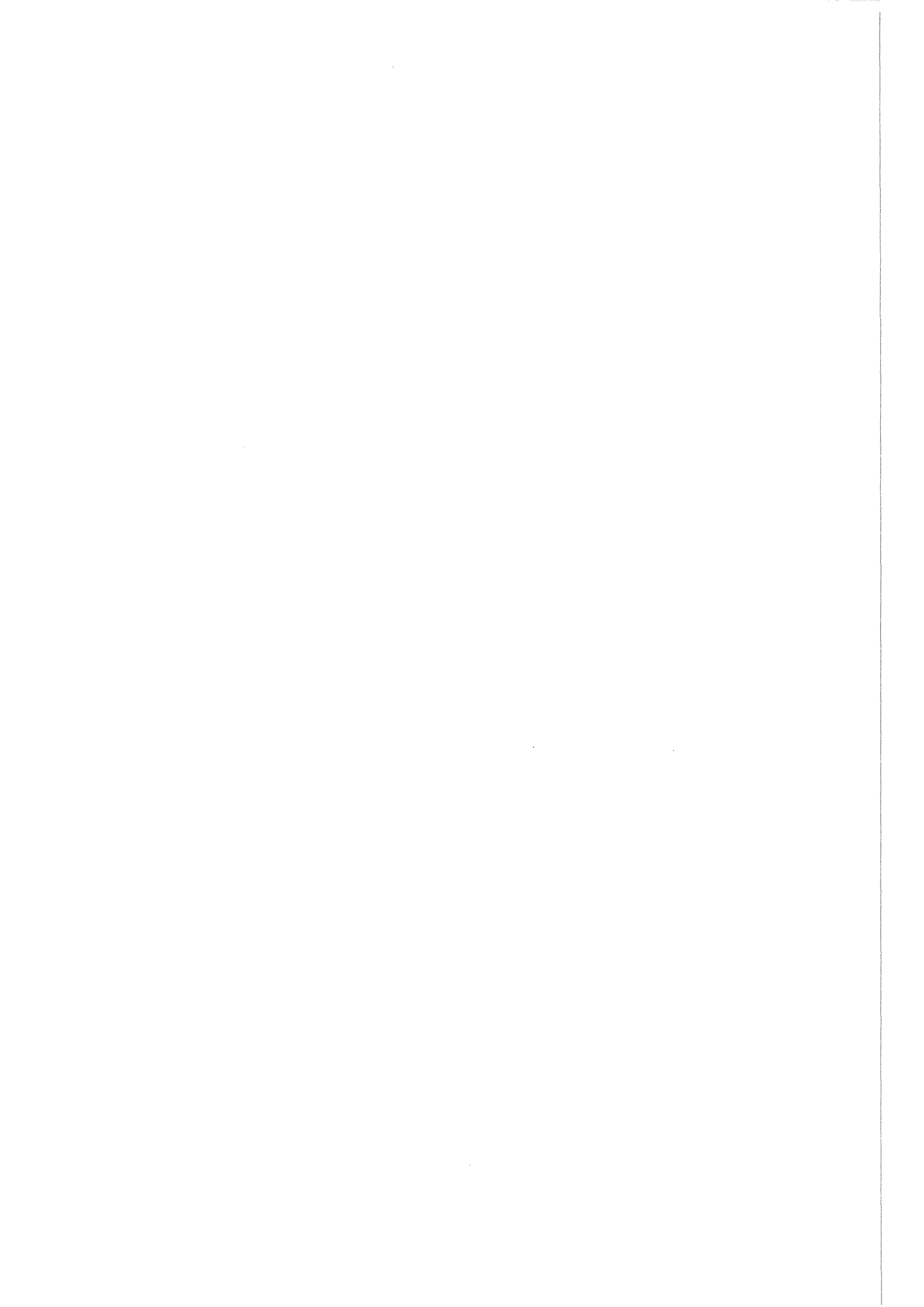
Implantationen von retinsäuregetränktem Material in Gliedmaßenknospen führen beispielsweise bei Hühnerembryonen zu konzentrationsabhängigen Abweichungen gegenüber der normalen Ausbildung der Gliedmaßen (Tickle et al., 1982). Auch der Positionswert von Zellen in regenerierenden Bereichen kann durch Zugabe der Vitamin A-Säure geändert werden (Maden, 1982). Weitere Analysen der polarisierenden Zonen der Gliedmaßen von Hühnerembryonen zeigten, daß die Retinsäure selbst dieses erste bekannte Morphogen darstellt (Thaller und Eichele, 1987; Slack, 1987).

Interessanterweise ist Retinsäure auch in der Lage, die Permeabilität der Gap Junctions zu beeinflussen (Pitts et al., 1981 und 1986; Wälder und Lützel Schwab, 1984; Brümmer, 1988; Bühle et al. 1989; Stein, 1989; Brümmer et al., 1991). Die Retinsäure scheint demnach die Differenzierung von Zellen nicht allein nach Maßgabe eines vorgegebenen Konzentrationsgefälles zu steuern. Sie könnte über eine Permeabilitätsregulation der Gap Junctions selbst die Ausbildung des Morphogen-Verteilungsmusters beeinflussen.

Aufgabenstellung

Besonders der zuletzt genannte Aspekt stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Es ging vor allem um die Retinsäure als Modulator der interzellulären Kommunikation. Es sollte geprüft werden, ob und wie sich das radiale Konzentrationsprofil eines Gap Junction-permeanten Stoffes, nämlich des cAMPs (s. oben), unter dem Einfluß der Retinsäure im Sphäroid ändert. Die Wahl des cAMPs war unter anderem dadurch begründet, daß dieser sekundäre Botenstoff auch mit der Proliferation von Zellen im Zusammenhang steht (Boynton und Whitfield, 1983). Deshalb bestand eine zusätzliche Aufgabe darin, die Zellproliferation (Zellzyklusverteilung und DNA-Syntheserate) in verschiedenen Tiefen des Sphäroids zu messen und nach einem möglichen Zusammenhang mit dem radialen cAMP-Profil zu suchen.

Obwohl sich die Wahl der Sphäroide als Untersuchungsmodell für diese Arbeit aus den Ausführungen dieser Einleitung ergibt, wurden die Experimente zusätzlich auf Monolayer ausgedehnt. Dies ermöglichte den Vergleich der Ergebnisse mit einem biologisch einfacheren System. Schließlich wurde durch Verwendung zweier unterschiedlicher Zelllinien ein gewisses Maß an Allgemeingültigkeit der Ergebnisse angestrebt.



II. Material und Methoden

II.1. Zellen

Untersucht wurden eine humane Zelllinie (II.1.1.) und eine Zelllinie der Maus (II.1.2.).

II.1.1. FL-Zellen

Hierbei handelt es sich um eine Amnionzelllinie des Menschen (Fogh und Lund, 1957), die wir von Prof. Dr. D.F. Hülser, Universität Stuttgart, erhielten.

II.1.2. SV40-3T3-Zellen

Eine aus Swiss-Mauszellen isolierte Fibroblastenzelllinie (Todaro und Green, 1963), die mit SV40-Virus transformiert wurde (Todaro et al., 1964). Diese Zellen erhielten wir von Prof. Dr. G. Adams, Universität Konstanz.

II.2. Zellkultur

II.2.1. Monolayer

Die Zelllinien (s. Material und Methoden, II.1.) wurden in Einweg-Kulturflaschen mit 75 cm² Bewuchsfläche (3024, FALCON) bei 37°C in einem befeuchteten Brutschrank (B5060 EC/CO₂, HERAEUS) in Medium (s. Material und Methoden, II.3.1.) kultiviert. Ein Bicarbonat-Puffersystem aus 44 mM NaHCO₃ im Medium und 5 % CO₂ in der Luft sorgten für die Einhaltung eines pH-Wertes von 7,2 bis 7,4. Der Zusatz eines pH-Indikators (Phenolrot) im Kulturmedium ermöglichte die Kontrolle dieses Wertes. Die permanent wachsenden Zelllinien wurden nach zwei oder drei Tagen passagiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellkulturdichte wurde hierfür das Kulturmedium abgezogen, anschließend wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin (0,25 % für FL-Zellen, 0,05 % für SV40-3T3-Zellen, GIBCO)

abgelöst und vereinzelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels eines Coulter Counters (Industrial D, COULTER ELECTRONICS). Dann wurden die Zellen in neue Kulturflaschen überführt (FL-Zellen: 5×10^5 , SV40-3T3-Zellen: 2×10^4) und in Petrischälchen (22 cm^2 , FALCON) für die Untersuchungen ausgesät. Alle Arbeiten mit Zellen wurden auf einer zuvor mit 70 % Ethanol desinfizierten Arbeitsfläche einer Laminarflow-Bank (Modell TC72, GELAIRE) durchgeführt.

II.2.2. Sphäroide

II.2.2.1. FL-Zellen

FL-Monolayer in Kulturflaschen (s. Material und Methoden, II.2.1.) wurden kurz vor Erreichen der Konfluenz (zirka 3×10^5 Zellen/ cm^2) trypsiniert. Je 3×10^6 Zellen in 10 ml Medium wurden auf eine zuvor mit 2 % Agarose in DMEM beschichtete Bakterienschale (10 cm \varnothing , GREINER) übertragen. Die Beschichtung war bei dieser Zelllinie nötig, da sich die Zellen sonst anhefteten. Nach 6 bis 8 Stunden bildeten sich kleine abgerundete Aggregate, die dann in 250 ml Spinnerflaschen (F 76 90, TECNOMARA) überführt wurden. Die Rührerflaschen waren zuvor silanisiert worden, um ein Anheften der Aggregate an die Flaschenwand zu verhindern. Nach Einstellen des CO_2 -Gehaltes in der Flasche wurde diese fest verschlossen und in ein Wasserbad (MWB-10 L, TECHNE) bei 37°C gestellt. Ein kombiniertes Rührsystem (MCS-104L, TECHNE) sorgte mit 45 Umdrehungen pro Minute für eine dauernde Bewegung der Aggregate. Alle 50 Stunden wurden 150 ml Medium erneuert. Nach 9 bis 10 Tagen hatten die Sphäroide einen Durchmesser von etwa 400 μm erreicht. Mit definierten Metallsieben (BELLCO) erhielt man Sphäroide mit einem Durchmesser von 160 bis 400 μm , die am nächsten Tag inkubiert wurden und in den weiteren Versuchsablauf eingingen.

II.2.2.2. SV40-3T3-Zellen

SV40-3T3-Monolayerzellen in Kulturflaschen (s. Material und Methoden, II.2.1.) wurden bei einer Zelldichte von zirka 2×10^5 Zellen/cm² trypsinisiert. In eine unbehandelte Bakterienchale (s. oben) wurden 3×10^6 Zellen in 10 ml Medium gegeben. Nach zirka 24 Stunden hatten sich kleine Sphäroide ausgebildet, die in 250 ml Spinnerflaschen (s. oben) übertragen wurden. Ab dem vierten Tag in Rührkultur wurden täglich jeweils 150 ml Medium erneuert, vorher nur an jedem zweiten Tag. Die SV40-3T3-Sphäroide erlangten bereits nach 6 bis 8 Tagen den erforderlichen Durchmesser von zirka 400 µm und wurden dann wie oben beschrieben (s. Material und Methoden, II.2.2.1.) behandelt.

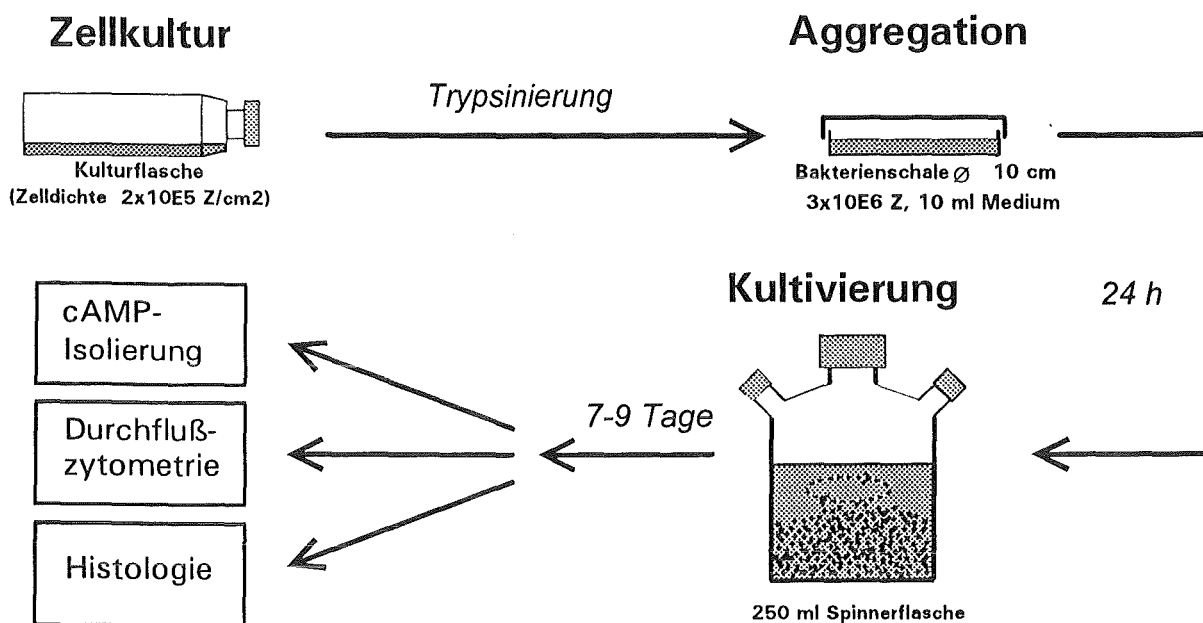


Abb. 3: Schematischer Ablauf der Sphäroidkultivierung.

II.2.3. Sequentielle Trypsinierung der Sphäroide

(Modifizierte Methodik von Freyer und Sutherland, 1980)

Um die Zellen eines Sphäroids differenziert zu untersuchen, ist es wichtig, Zellfraktionen zu erhalten, die innerhalb des Sphäroids unter den gleichen Bedingungen wuchsen. Hierfür ist insbesondere die Entfernung der einzelnen Zelle zum umgebenden Nährmedium von Bedeutung. Es muß also das Ziel sein, Zellen gleicher räumlicher Position im Sphäroid durch definiertes, sukzessives Abtragen zu erhalten.

Nachdem die Sphäroide vorsichtig abzentrifugiert waren (140 x g, 10 Sekunden), wurde das Medium abgezogen. Nach Zugabe von 8 ml 0,25 % Trypsin (Raumtemperatur) wurden die Zellaggregate in einem 50 ml Erlenmeyerkolben leicht bewegt (rotary shaker, RO 10, GERHARDT, 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur). Die Zugabe von 10 ml kaltem Medium stoppte die Trypsinreaktion. Durch Pipettieren wurden die noch locker mit den Sphäroiden verbundenen Einzelzellen abgelöst. Auf Eis wurden nun die Sphäroide durch Absinken von den Einzelzellen aus der Suspension getrennt. Die Einzelzellsuspension wurde vorsichtig abgezogen und auf Eis gestellt. Die Sphäroide wurden erneut der Trypsinierung zugeführt, bis zur innersten Fraktion. Der zentrale Bereich der Sphäroide mußte aufgrund der höheren Haftung der Zellen untereinander durch Trypsinierung für 5 bis 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad aufgelöst werden. Sphäroide der untersuchten Größe (160 bis 400 µm, s. Material und Methoden, II.2.2.) konnten so in 6 bis 8 radiale Schichtungen aufgetrennt werden.

II.2.4. Zellvitalitätsmessung

Die Untersuchung der Zellvitalität wurde in dieser Arbeit durch den Ausschlußtest von Lindl und Bauer (1989) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen im

Kulturmedium für 5 Minuten mit einer 0,5 %igen Trypanblaulösung in 0,9 % NaCl inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, die Endkonzentration der zugegebenen Lösung lag bei zirka 0,15 %. Eine Anfärbung erfolgt nur bei toten oder stark geschädigten Zellen, die den Farbstoff über die perforierte Zellmembran aufnehmen.

In der Sphäroidkultur kam dieser Schnelltest regelmäßig zur Anwendung, um eine ausreichende Vitalität der Zellen vor Versuchsbeginn zu gewährleisten. War diese nicht gegeben, wurden die Sphäroide nicht im Versuch weitergeführt.

II.2.5. Mycoplasmentest

Die Überprüfung auf eine mögliche Kontamination der Zellkultur mit Mycoplasmen erfolgte nach den Methoden von Russel et al. (1975), Freshney (1983) und Lindl und Bauer (1989). Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst auf Deckgläschen, die in Petrischalen gelegt wurden, ausgesät. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte (noch nicht konfluenter Zellrasen) wurde mit 37°C warmem PBS gewaschen. Nun erfolgte die 20- bis 30-minütige Inkubation mit 2 µg/ml in PBS gelöstem DAPI (37°C). Nach Entfernen der Färbelösung und Waschen in PBS wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (Aristoplan, Filtersatz A 513678 und 50' Immersionsobjektiv, LEITZ) auf Mycoplasmen untersucht. Diese zeigen sich als gleichmäßig geformte, hell leuchtende Punkte im Zytoplasma, hauptsächlich an den Zellgrenzen.

Eine weitere Untersuchungsmöglichkeit besteht in der Fixierung der gleichermaßen kultivierten Zellen in DAPI-Methanol. Dies erfolgte, wenn der oben beschriebene Test keine eindeutige Aussage ermöglichte. Hierfür wurde zunächst mit PBS und dann mit DAPI-Methanol gewaschen. Nach 15 bis 30 Minuten bei 37°C wurde einmal mit Methanol gewaschen, dann wurde wie oben beschrieben auf Mycoplasmen untersucht. Alle Zellkulturen, die in die Untersuchungen gingen, waren nach diesen Tests mycoplasmenfrei.

II.2.6. Einfrieren von Kulturzellen

II.2.6.1. Kryokonservierung der Zelllinien

Hierzu wurden Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, trypsinisiert. Nach dem Abstoppen der Trypsinreaktion mit kaltem Medium wurden die Zellen abzentrifugiert (4°C, 800 x g, 5 Minuten). In die Einfrierampullen wurde jeweils 1 ml frisch hergestelltes Einfriermedium (95 % FCS und 5 % DMSO) mit 2×10^6 Zellen abgefüllt. Nun wurden die Zellen 30 Minuten auf Eis gekühlt, anschließend für 2 Stunden auf -20°C gebracht und schließlich für 12 Stunden bei -80°C eingefroren. Die Lagerung dieser konservierten Zellen erfolgte in Flüssigstickstoff bei -196°C.

II.2.6.2. Einfrieren von Sphäroiden zur Anfertigung von Gefrierschnitten

Ein Becherglas mit Methylbutan wurde in einem flüssigstickstoff-gefüllten Dewargefäß gekühlt. Wenn im Boden des Becherglases Methylbutan fest wurde, war die gewünschte Arbeitstemperatur von -150° bis -160°C erreicht. Auf mit Aluminiumfolie am stumpfen Ende verschlossenen Einmalpipetten wurde nun ein Tropfen Einbettmedium (JUNG) aufgetragen, so daß diese zur Aufnahme und Halterung der Proben dienten. Die Sphäroide wurden vorsichtig abzentrifugiert (140 x g, 10 Sekunden) und nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen. Nachdem sie sich abgesetzt hatten, wurden sie vorsichtig mit einer Kunststoff-Pasteur-Pipette (BENDER & HOBEIN) aufgenommen. Nun ließ man die Sphäroide sich abermals zum offenen Ende der Pipette hin absetzen und trug dann vorsichtig einen Tropfen aus der Pipette auf das Einfriermedium auf. Mit einem saugfähigen Papiertuch wurde nun das überständige PBS abgenommen, so daß die Sphäroide in das Einfriermedium einsanken. Unter dauernder Bewegung wurden die Sphäroide nun in das vorgekühlte Methylbutanbad eingetaucht und einige Minuten durchgekühlt. Die gewonnenen Präparate wurden nun in ebenfalls flüssigstickstoff-

vorgekühlte Einfrierröhrchen (NALGENE) gebracht und bei -80°C aufbewahrt (nach Walser, 1993).

II.2.7. Anfertigung von Gefrierschnitten

In einem Kryomikrotom (2800 FRIGOCUT E, REICHERT-JUNG) wurden die Kryopräparate bei einer Box-Temperatur von -28°C und einer Präparat-Temperatur von -22°C geschnitten. Gefrierschnitte von 10 µm Dicke wurden auf einen gekühlten Objektträger gebracht, der zuvor mit Albumin beschichtet worden war. Anschließend wurde der aufgebraute Schnitt bei Raumtemperatur für 10 Minuten getrocknet, um dann den weiteren histologischen Schritten (s. Material und Methoden, II.2.8. und II.5.) zugeführt zu werden.

II.2.8. Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gefrierschnitten

Arbeitsschritt	Agens	Zeit
1. Fixieren	5 % Eisessig und 95 % Ethanol	20 Minuten
2. 3 x Waschen	PBS	je 3 Minuten
3. Färben	modifiziertes Hämalaun	10 Minuten
4. Bläuen	Leitungswasser	5 Minuten
5. Spülen	dest. Wasser	15 Sekunden
6. Färben	1 % Eosinlösung (in dest. Wasser)	15 Minuten
7. Spülen	dest. Wasser	2 x 10 Sekunden
8. Differenzieren	96 % Ethanol	10 Sekunden
9. Entwässern	100 % Ethanol	10 Sekunden
10. Aufhellen	Xylol	2 x 20 Sekunden

Abschließend wurde ein Tropfen Entellan auf den Schnitt gebracht, ein Deckglas aufgelegt und getrocknet.

II.3. Medien und Substanzen

II.3.1. Medien

Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; SERVA, GIBCO) kultiviert. Zugesezt wurden 10 % fötales Kälberserum (FCS, GIBCO, einheitliche Charge), 1 % Antibiotika (Penicillin: 10000 Einheiten/ml; 1000 µg/ml, GIBCO) und 1 % Glutamin (200 mM, GIBCO).

II.3.2. Chemikalien

Die meisten der eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen MERCK, SERVA und SIGMA bezogen. Weitere Chemikalien wurden von den im folgenden aufgelisteten Firmen erworben.

Chemikalie	Firma
cAMP [¹²⁵ I] assay system (dual range)	AMERSHAM
Cell Proliferation Kit	AMERSHAM
DMSO	FLUKA
Einbettmedium	JUNG

II.3.3. Puffer und Lösungen

Agaroselösung zur Verhinderung der Zellanheftung in Bakterienchalen bei der Sphäroidkultur:

2 % Agarose (Typ II) in DMEM erhitzen und lösen (Mikrowelle). Zur Beschichtung von Bakterienchalen mit 10 cm Durchmesser werden zirka 10 ml warme Agaroselösung in eine Schale gegeben und bei geschlossenem Deckel über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt.

Albuminlösung zur Beschichtung der Objektträger:

1 % Albumin in H₂O

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

Citratpuffer zur Verdünnung der Trypsin-Stammlösung:

17 mM Na-Citrat; 0,13 M KCl in H₂O; pH 7,6

DAPI (= 4',6-Diamidino-2-phenylindol • 2 HCl)-Stammlösung:

0,54 mM DAPI in H₂O

DAPI-Lösung zur Präparation und Färbung von Zellkernen für die Flußzytometrie:

5,4 µM DAPI; 2 mM MgCl₂; 0,15 M NaCl; 0,1 % TritonX-100 in 0,1 M Tris-Puffer pH 7,3

DAPI-Methanol:

DAPI-Stammlösung mit Methanol auf 0,1 µg/ml verdünnen.

Fixierungsmittel für Monolayer und Sphäroid-Schnitte:

5 % Eisessig, 95 % Ethanol (frisch herstellen)

PBS:

0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 0,7 mM CaCl₂; 0,6 mM MgCl₂

Silanisierungslösung zur Verhinderung der Zellanheftung in der Spinnerflaschen-Kultur:

5 % Dimethyldichlorsilan in CCl₄

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

Trypanblau-Stammlösung für Vitalitätstest:

0,5 % Trypanblau in 0,9 % NaCl

II.3.4. Lösungen für die histologische Präparation

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 % KIO₃ und 2 ml 1 M HCl zugeben.

Eosin-Lösung:

1 % Eosin in H₂O bidest.

II.3.5. Lösungen für die Elektrophysiologie

KCl-Lösung:

3 M KCl in H₂O_{dest.}

LiCl-Lösung:

1 M LiCl in H₂O_{dest.}

Lucifer Yellow-Lösung:

4 % Lucifer Yellow (krist.) in wässriger LiCl-Lösung (s. oben)

Ringer-Lösung:

4 Tabletten (Ringer-Kompretten) in 500 ml H₂O_{dest.}

II.4. Retinsäure

Die Vitamin A-Säure (all-trans retinoic acid, SIGMA) wurde in Stammlösungen in Dimethylsulfoxid (DMSO, SIGMA) gelöst; die Stammlösungen wurden bei -20°C dunkel gelagert. Beim Einbringen in das Kulturmedium erfolgte eine 200-fache Verdünnung der Stammlösung, so daß eine Endkonzentration von 0,5 % DMSO vorlag. Untersucht wurde der Einfluß der Retinsäure in den Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 0,1 mM in 10er-Verdünnungsschritten; vorgestellt werden in dieser Arbeit vor allem die Ergebnisse nach Inkubation mit 0,1 nM, 0,1 µM und 0,1 mM Retinsäure.

II.5. Immunozytochemie

Dieses Verfahren diente zur Untersuchung der DNA-Syntheserate der Zellen nach den unterschiedlichen Retinsäureinkubationen. Hierfür wurde ein "Cell Proliferation

Kit" (AMERSHAM) eingesetzt, bei dem den Zellen das Thymidin-Analogon Brom-desoxy-Uridin (BrdU) zum Einbau in die DNA angeboten wird. Gleichzeitig wird die Thyminsynthetase durch den Zusatz von 5'-Fluoro-2'-desoxy-Uridin gehemmt. Eingebautes BrdU wird durch einen monoklonalen Antikörper nachgewiesen, an den eine Farbreaktion gekoppelt ist. Zellkerne, in denen eine *de novo*-Synthese von DNA erfolgte, erscheinen nach der Farbreaktion unter dem Mikroskop als blau-schwarz gefärbt.

II.5.1. Monolayer

Um Monolayerzellen auf ihren Einbau von BrdU hin zu untersuchen, wurden diese auf Objektträgern angezüchtet, die in Zellkulturschälchen (10 cm Ø, FALCON) mit Medium bedeckt lagen. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte erfolgte die Inkubation mit der zu untersuchenden Retinsäurekonzentration. Nachdem für 4 Stunden mit 1:1000 verdünnter Stammlösung BrdU markiert wurde, wurden die Zellen in PBS gewaschen und anschließend in 95 % Ethanol mit 5 % Eisessig fixiert. Vor den weiteren Schritten wurden alle Zellen außerhalb einer deckgläschengroßen Fläche vom Objektträger entfernt. Nun wurden die Präparate rehydratisiert (3 x 3 Minuten in PBS). Es folgte eine dreistündige Inkubation mit Anti-Brom-desoxy-Uridin bei Raumtemperatur. Ein Austrocknen der Präparate wurde durch Benutzung einer Feuchtigkeitsbox verhindert. Nach erneutem Waschen in PBS (3 x 3 Minuten) wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit dem zweiten Antikörper (Peroxidase-anti-mouse-Ig) inkubiert, welcher an den ersten Antikörper bindet. Wieder wurde in PBS gewaschen (3 x 3 Minuten), dann erfolgte eine 20-minütige Färbung mit Diaminobenzidin. Die Polymerisierung von Diaminobenzidin, katalysiert durch die Peroxidase, ergibt in Gegenwart von Kobalt und Nickel die erwähnte blau-schwarze Färbung der BrdU-markierten Zellkerne. Anschließend wurden die Präparate in destilliertem Wasser gespült. Eine bessere Kontrastierung der nicht angefärbten Bereiche der Präparate wurde durch eine 15-

minütige Eosin-Gegenfärbung erzielt. Abschließend erfolgte die Konservierung der Präparate:

Arbeitsschritt	Agens	Zeit
1. Waschen	H ₂ O _{dest}	2 x 10 Sekunden
2. Differenzieren	96 % Ethanol	10 Sekunden
3. Dehydratisieren	100 % Ethanol	10 Sekunden
4. Aufhellen	Xylol	2 x 10 Sekunden

Im Anschluß wurde ein Tropfen Entellan auf das Präparat gebracht und ein Deckgläschen aufgelegt.

II.5.2. Sphäroide

Zur Untersuchung kamen Sphäroide mit einem Durchmesser zwischen 160 und 400 µm (s. Material und Methoden, II.2.2.). Nach der zu untersuchenden Retinsäureinkubation wurde in Rührkultur für 4 Stunden mit BrdU markiert. Dann wurden die Sphäroide mit PBS gewaschen, anschließend eingefroren und geschnitten (s. Material und Methoden, II.2.6.2. und II.2.7.). Die gewonnenen Gefrierschnitte wurden zunächst mikroskopisch untersucht, dann für 20 Minuten in 95 % Ethanol mit 5 % Eisessig fixiert. Die Präparate konnten nun bei -20°C (oder kälter) aufbewahrt werden. Die anschließenden immunozytochemischen Präparationen und die Konservierung der Schnitte erfolgte wie bei den Monolayerzellen (s. Material und Methoden, II.5.1.).

II.6. Proliferationsmessung

Die Untersuchung des zellulären Proliferationsverhaltens erfolgte mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Mit diesem Verfahren kann eine Zellpopulation in Hinblick auf ihre Zellzyklusverteilung untersucht werden, indem die DNA der einzelnen Zelle proportional mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt wird. Dies ermöglicht die Zuordnung zu einer der Zyklusphasen: G1-, S- und G2-Mitose-Phase (Van Dilla, 1979; Goerttler und Stöhr, 1982; Göhde et al., 1985). Die DNA wurde in dieser Arbeit mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Abb. 4) angefärbt.

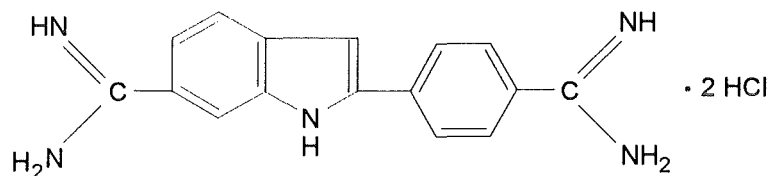


Abb. 4: Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol zur DNA-Proportionalfärbung.

Dieser Farbstoff hat sein Absorptionsmaximum bei 340 nm, sein Fluoreszenzmaximum liegt bei 488 nm. Er zeigt ein spezifisches Bindungsvermögen an A-T-reiche DNA und eine hohe UV-Stabilität (SERVA-Produktinformation, 1976; Stöhr et al., 1978).

II.6.1. Präparation und Färbung der Zellkerne

Bei den Zellzyklusuntersuchungen wurden Zellkerne präpariert und der Untersuchung zugeführt, um zytoplasmatische Fluoreszenz, welche durch die Anfärbung von Doppelstrang-RNA auftreten kann (Van Dilla, 1979), auszuschließen. Es wurde im wesentlichen nach der "pH 10 procedure"-

Originalvorschrift von Vindelov (1977) verfahren, wobei diese zu einem Einschritt-Protokoll zusammengefaßt wurde.

II.6.2. Meßprinzip

Die Zellkerne wurden in einem PAS-II Durchflußzytometer (PARTEC) untersucht. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI wird hier durch eine UV-Lichtquelle (Quecksilber-Höchstdrucklampe, HBO 100 W) angeregt. Die von der angefärbten DNA ausgesandten Lichtimpulse werden mit einem Photomultiplier gemessen. Ein nachgeschalteter Vielkanal-Analysator sortiert die aufgenommenen Impulse nach ihrer Intensität (Abb. 5). Dabei erfolgt eine Zuordnung von Fluoreszenzintensität zu einem bestimmten Kanal, der somit einer bestimmten DNA-Menge entspricht. In einem Histogramm wird nun die Kanalzahl einer gemessenen Zellzahl zugeordnet (Van Dilla, 1979; Freshney, 1983). Ein Histogramm stellt 20000 bis 80000 gemessenen Zellkern-Fluoreszenzen dar.

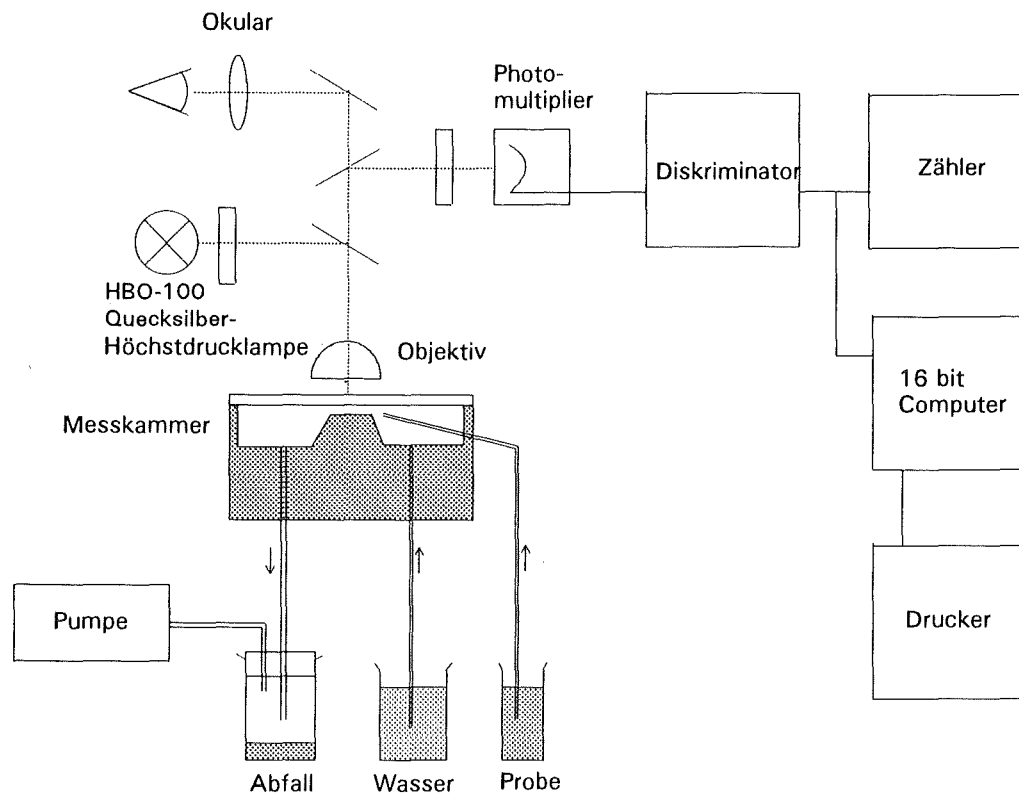


Abb. 5: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines Durchflußzytometers der Firma PARTEC (nach Göhde et al., 1985).

II.6.3. Auswertung

Die gemessenen Histogramme wurden zunächst mit einem an das Durchflußzytometer gekoppelten Rechner auf Disketten gespeichert. Durch ein Umwandlungsprogramm (MS-File, PARTEC) wurden die Werte für ein DOS Betriebssystem lesbar gemacht und nun mit einer Diskette auf einen IBM-kompatiblen PC übertragen. Die mathematische Auswertung erfolgte hier mit dem Computerprogramm "MultiCycle" (= multiple option cell cycle fitting von Peter S. Rabinovitch, 1987, PHOENIX FLOW SYSTEMS; San Diego, CA). Die mathematischen Modelle zur Berechnung der Zellzyklusverteilung von Dean und Jett (1974) und von Fox (1980) bilden die Grundlagen dieses Programms. Alle Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus haben die gleiche Menge an DNA. Sie binden somit gleich viel DAPI und emittieren mit der gleichen Fluoreszenzintensität, welche in einem Kanal zusammengefaßt wird. Alle Zellen in

der (G2+M)-Phase haben ihre DNA verdoppelt und werden somit einer doppelt hohen Kanalzahl zugeordnet. Zellen, welche DNA synthetisieren (S-Phase-Zellen), werden Kanälen zwischen G1 und (G2+M) zugeordnet, je nach bereits synthetisierter DNA-Menge. Der idealisierte Fall, daß G1- und (G2+M)-Zellen alle in je einem Kanal zu finden sind, wird durch biologische und histologische Effekte verhindert, sowie durch Meßungenauigkeiten im optischen und elektrischen System. Dadurch kommt es zu einer Verbreiterung der beiden G-Peaks. Auch die Messung der S-Phase-Zellen unterliegt diesem Einfluß (Abb. 6).

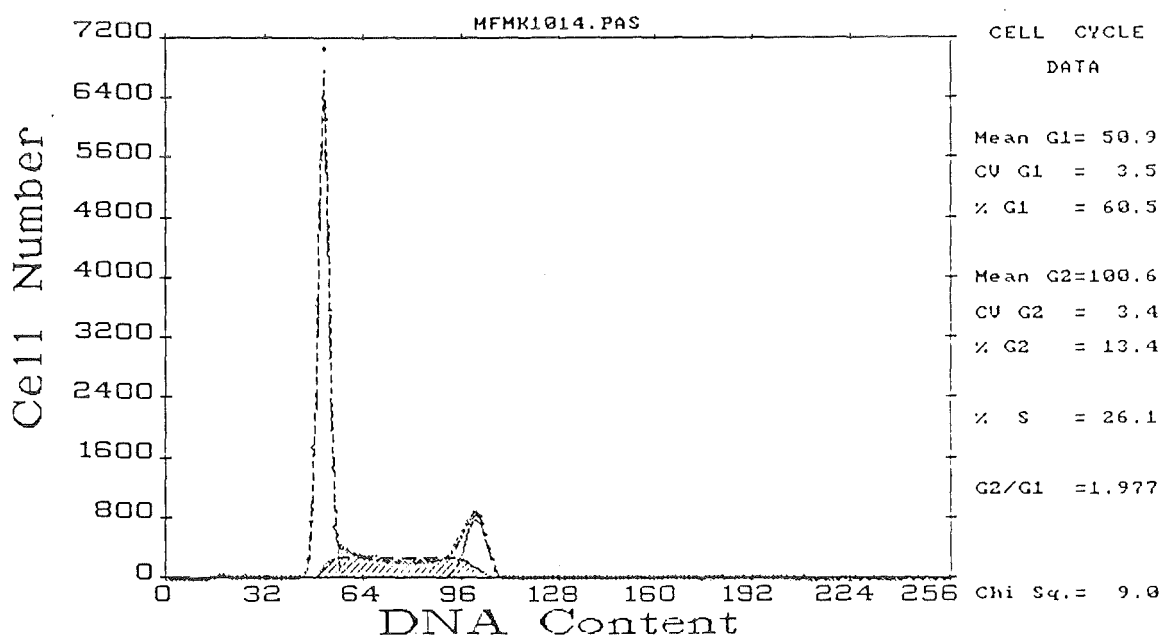


Abb. 6: Originalhistogramm einer Monolayer-Kultur von FL-Zellen.

Untersuchungen an synchron wachsenden Zellkulturen (Dean und Jett, 1974) haben gezeigt, daß eine Normalverteilung die optimale mathematische Anpassung zur Berechnung der G-Peaks darstellt. Die Berechnung der S-Phase im Histogramm erfolgt am genauesten über ein Polynom zweiten Grades, welches vom Auswertungsprogramm "MultiCycle" durch Minimierung von Chi-Quadrat iterativ an die gemessene Kurve angepaßt wird.

II.7. cAMP-Messung

II.7.1. cAMP-Isolierung

Nach der Trypsinierung von Monolayer- und Sphäroidzellen wurden diese in kaltem Medium aufgenommen. Für die folgenden Arbeitsschritte wurde eine Temperatur von 4°C eingehalten. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde mit PBS (4°C) gewaschen und in einer Kühlzentrifuge (Variofuge, HERAEUS) zentrifugiert (4°C, 1200 x g, 6 Minuten). Der Überstand wurde verworfen, anschließend wurde das cAMP zweimal mit 65 % Ethanol (4°C) extrahiert. Der entstandene Extrakt wurde nochmals zentrifugiert (4°C, 2000 x g, 15 Minuten), der Überstand in einem Speed Vac Concentrator (BACHOFER) getrocknet. Die so isolierten Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

II.7.2. Quantitative Bestimmung des cAMP-Gehalts

Die Quantifizierung des cAMP-Gehalts der Zellen wurde mit einem Radioimmunoassay (cAMP [¹²⁵I] assay system, AMERSHAM) durchgeführt. Dieser nutzt die Konkurrenz nicht-markierter cAMPs und einer definierten Menge ¹²⁵I-markierter cAMPs um eine vorgegebene Anzahl von cAMP-Bindungsstellen an einem spezifischen Antikörper. Die Menge des an den Antikörper gebundenen radioaktiven cAMPs ist bei einer bestimmten Antikörperkonzentration umgekehrt proportional zur Menge des nicht-radioaktiven cAMPs. Die Empfindlichkeit dieses Tests wurde durch eine vorangehende Acetylierung erhöht. So wird ein Nachweisbereich von 2 bis 128 fmol / Probenröhrchen erzielt. Bei FL- und SV40-3T3-Zellen entspricht dies etwa dem cAMP-Gehalt von 25000 bis 50000 Zellen. Nach dem Protokoll der Firma AMERSHAM wurden die getrockneten cAMP-Proben zunächst in Proben-Puffer gelöst, dann erfolgte die Acetylierung. Jetzt wurde eine definierte Menge ¹²⁵I-cAMP und Antikörper zugegeben, gemischt und bei 4°C für 15 bis 18 Stunden inkubiert. Die Abtrennung von gebundenem cAMP erfolgte über die Inkubation mit einem zweiten Antikörper für 10 Minuten bei Raumtemperatur,

anschließend wurde zentrifugiert. Die so gewonnenen Pellets wurden in einem Gamma-counter (1470 Wizard, WALLAC) mit Computersteuerung und -auswertung gezählt. Die Berechnung des cAMP-Gehalts erfolgte über ein integriertes Rechenprogramm (Riacalc, PHARMACIA).

II.8. Messung der interzellulären Kommunikation via Gap Junctions

Zellen, die im Verbund wachsen, können untereinander über sogenannte Gap Junctions in direktem interzellulären Kontakt stehen (s. Einleitung, I.). Diese Verbindungen können unter anderem durch den Übertritt eines elektrischen Rechtecksignals oder durch die Ausbreitung eines Fluoreszenzfarbstoffs nachgewiesen werden. Hier wurde die zweite Methode angewendet.

II.8.1. Versuchsaufbau

Als Unterlage für das Mikroskop und den Mikromanipulator diente ein schwingungsgedämpfter Tisch mit einer Marmor-Arbeitsplatte (T-260, PHYSIK INSTRUMENTE). Die Arbeitsplatte war zusätzlich mit Bleigewichten beschwert, um die Stabilität des Arbeitsplatzes zu erhöhen. Die Untersuchungen wurden mit einem Mikroskop (Standard, ZEISS) mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung und Phasenkondensator durchgeführt. Als Immersionsobjektive wurden ein 16er und ein 40er Neofluar (ZEISS) eingesetzt, dazu kam ein UV-Filtersatz (05, ZEISS) und eine Quecksilber-Hochdrucklampe (HBO 50, ZEISS). Der Meßkreis wurde aus Elektrode, Vorverstärker, Verstärker und Oszilloskop gebildet (Abb. 7).

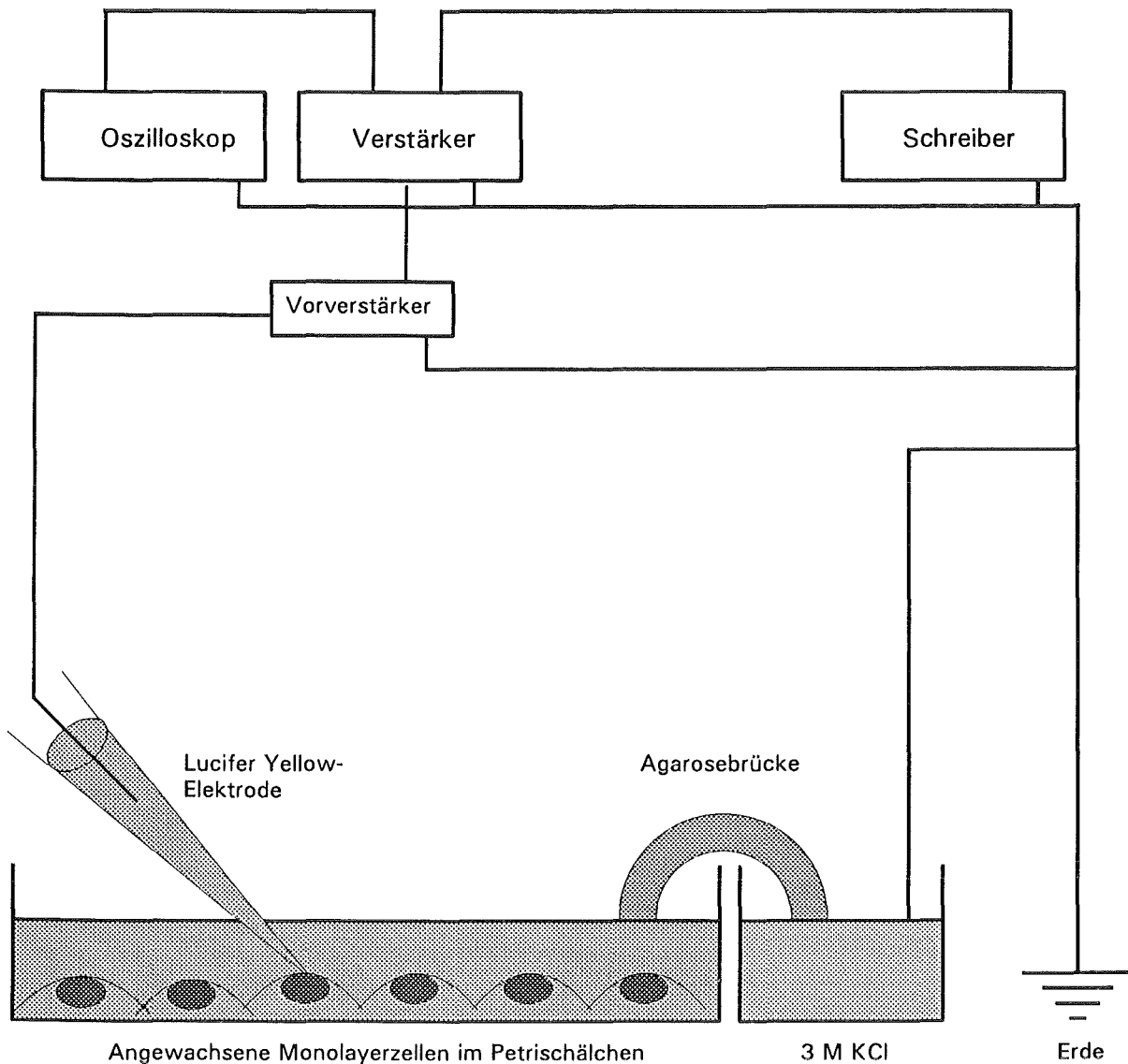


Abb. 7: Schematische Darstellung zur Messung der interzellulären Kommunikation mit Mikroelektroden.

Der Vorverstärker war direkt auf dem Mikromanipulator angebracht und fixierte den Elektrodenhalter aus Plexiglas (EH 1S, WPI) und die daran befestigte Mikroelektrode. Der Mikromanipulator (DC 3, MÄRZHÄUSER) war auf der Arbeitsplatte verschraubt. Ein ferngesteuerter Antrieb von drei Elektromotoren erlaubte die freie Bewegung der Mikroelektrode in allen drei Raumrichtungen.

II.8.2. Mikroelektroden

Die Glasmikroelektroden wurden aus 7 cm langen Glaskapillaren mit Innenfilament (1 mm Außendurchmesser, 0,8 mm Innendurchmesser, HILGENBERG) gezogen. Die Kapillare wurden hierfür in einen horizontalen Puller (P 87, SUTTER INSTRUMENTS) eingespannt. Dabei umgibt das Glasröhrchen in der Mitte ein heizbares Metallfilament. Nach Erhitzen dieses Filamentes erfolgt an beiden Enden der Kapillare ein gleichmäßiger, definierter Zug, so daß nach der Trennung zwei identische Elektroden entstehen. Die Mikroelektroden zur Messung der elektrischen Kopplung und die Elektrodenhalter waren mit 3 M KCl-Lösung gefüllt, die Mikroelektroden zur Injektion eines Fluoreszenzfarbstoffs (Lucifer Yellow, SIGMA, Abb. 8) wurden in der Spitze mit dem Farbstoff, im Schaft mit 1 M LiCl-Lösung gefüllt. Dies erfolgte am stumpfen Ende der Elektroden mit Edelstahlkanülen (0,3 mm Durchmesser, HAMILTON) auf Einwegspritzen. Elektroden mit KCl-Lösung hatten einen Widerstand von 10 bis 30 MOhm, das Spitzenpotential im Medium betrug etwa -5 Millivolt Lucifer Yellow-Mikroelektroden hatten einen Widerstand von 100 bis 150 MOhm.

II.8.3. Mikro-Iontophorese von Lucifer Yellow

Interzelluläre Kanäle zwischen den Zellen lassen sich über die Ausbreitung eines Fluoreszenzfarbstoffs von einer injizierten Zelle in ihre Nachbarzellen nachweisen (Stewart, 1978). Mit den oben beschriebenen Mikroelektroden wurde hierfür der negativ geladenene Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow iontophoretisch in eine Zelle injiziert (Microiontophoresis Programmer, WPI; L/M - 1, LIST).

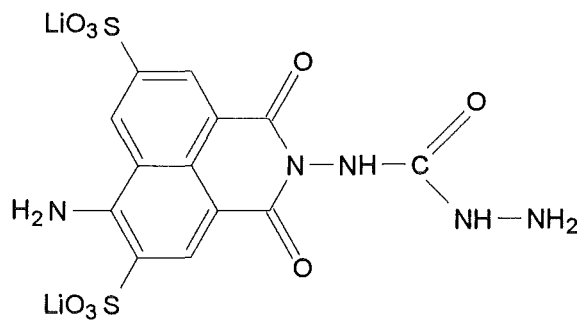


Abb. 8: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow (Absorptionsmaximum 430 nm, Emissionsmaximum 540 nm).

Die negative Stromstärke betrug hierbei bis zu 20 nA, injiziert wurde für 10 Sekunden. Um eine konstante Diffusionszeit zu erzielen, wurde zwei Minuten nach der Injektion die Gesamtzahl der direkten Nachbarn (Nachbarn erster Ordnung, = $N1_{ges}$) bestimmt und die Anzahl der Zellen, welche den Farbstoff aufgenommen hatten ($N1_{fl}$). Hieraus ließ sich nun der prozentuale Kopplungsgrad (KG_{fl} , Flagg-Newton und Loewenstein, 1981) errechnen:

$$(N1_{fl} : N1_{ges}) \times 100 = KG_{fl} [\%]$$

II.8.4. Dokumentation

Die fotografische Dokumentation erfolgte über eine auf das Mikroskop aufgesetzte Spiegelreflexkamera (M 35 W, ZEISS) oder eine entsprechend montierte Polaroidkamera (M 4 x 5, ZEISS). Die Belichtungseinstellung erfolgte über eine externe Steuerung (MC 63, ZEISS). Es wurden 160 ASA oder 200 ASA Filme (Ektachrome, KODAK) eingesetzt, Polaroidbilder wurden mit 800 ASA Filmmaterial (533, POLAROID) aufgenommen.

III. Ergebnisse

III.1. Interzelluläre Kommunikation

Die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions wurde durch Mikroinjektion des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow in eine Zelle und die anschließende Ausbreitung in benachbarte Zellen untersucht (s. Material und Methoden, II.8.). Der Einfluß der Retinsäure (0,1 nM, 0,1 µM und 0,1 mM) wurde nach zwei unterschiedlichen Inkubationszeiten (0,5 und 24 Stunden) untersucht. Diese Zeiten wurden gewählt, um kurzzeitige Effekte der Retinsäure auf Ebene der second messenger von Mechanismen zu unterscheiden, die eine längere Inkubation voraussetzen. Letztere lassen möglicherweise auf eine Beeinflussung der Proteinbiosynthese schließen. Die Untersuchung erfolgte mit beiden Zelllinien (FL und SV40-3T3) in Monolayerkulturen. Eine Ausbreitung des Fluoreszenzfarbstoffs in benachbarte Zellen konnte in den Kontrollexperimenten immer beobachtet werden, das heißt die Zellen sind normalerweise gut gekoppelt (Abb. 9 und Abb. 14). Die inhibierende Wirkung der 0,1 mM Retinsäure wird in den Abbildungen 11 und 16 deutlich. Die Abbildungen 13 und 18 zeigen die Stimulierung der interzellulären Kommunikation durch die Vitamin A-Säure im Konzentrationsbereich von 0,1 µM. Die Auswertung erfolgte nach der unter Material und Methoden, II.8.3. beschriebenen Formel zur Berechnung des prozentualen Kopplungsgrades (KG_{fl}). Die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit in den Abbildungen als Prozent der Kontrolle dargestellt. Die absolute Farbstoffausbreitung in den Kontrollen betrug bei FL-Zellen 41 % (Anzahl der Experimente n=24) und bei SV40-3T3-Zellen 32 % (n=52).

III.1.1. Interzelluläre Kommunikation bei Monolayerzellen

III.1.1.1. FL-Monolayerzellen

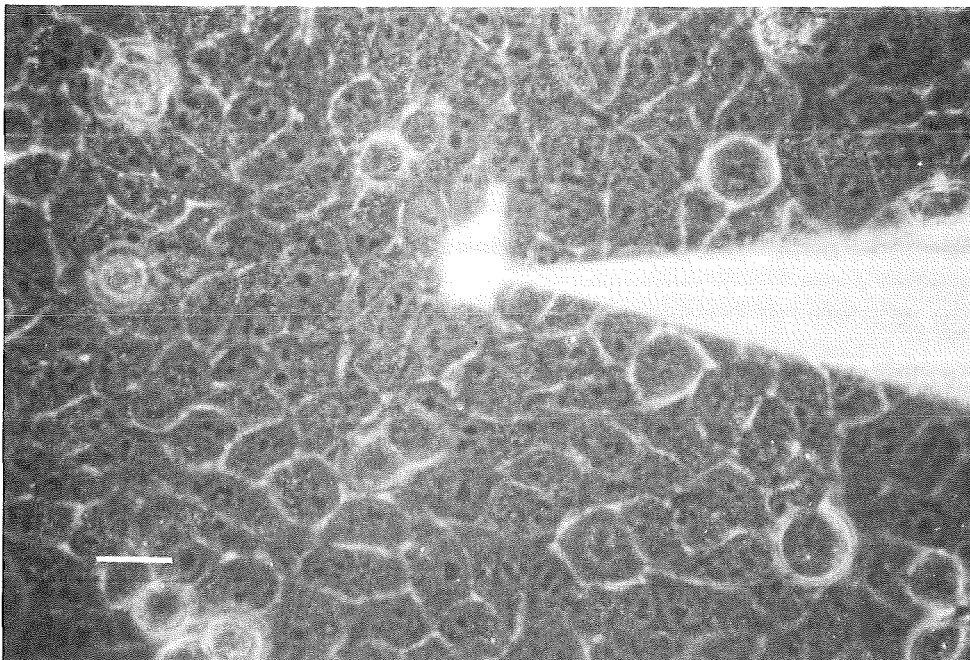
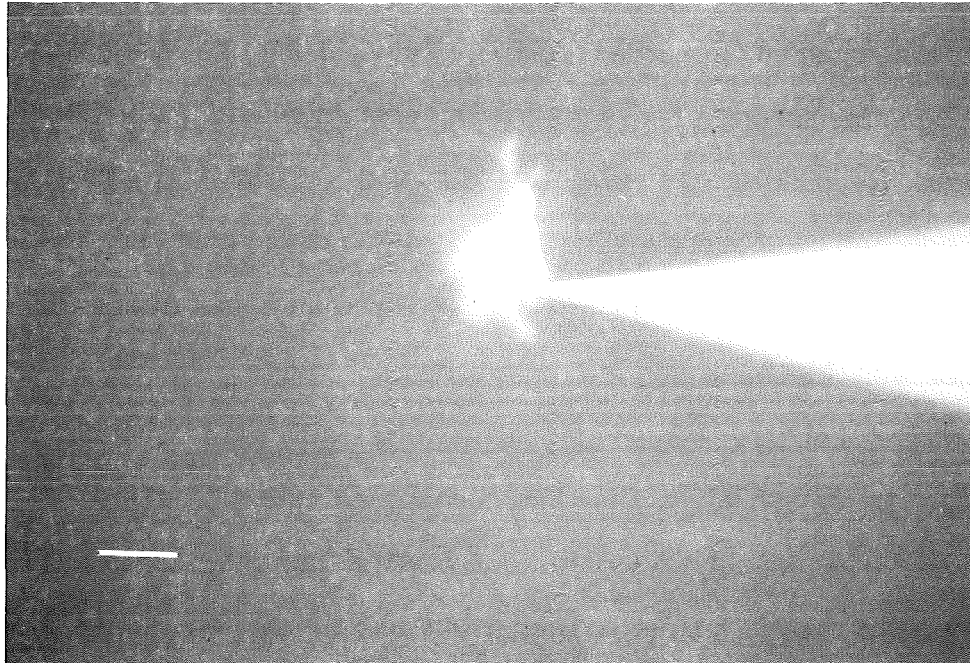


Abb. 9: Farbstoffkopplung in einem FL-Monolayer (Kontrolle). Das obere Bild zeigt die Auflichtfluoreszenzabbildung, das untere Bild zeigt dieselben Zellen im Phasenkontrast. Der Balken entspricht 20 μm .

0,1 μM Retinsäure erhöhte nach 0,5 Stunden Inkubation die interzelluläre Kommunikation um zirka 50 %; 0,1 mM Retinsäure reduzierte die interzelluläre Kommunikation um zirka 90 %.

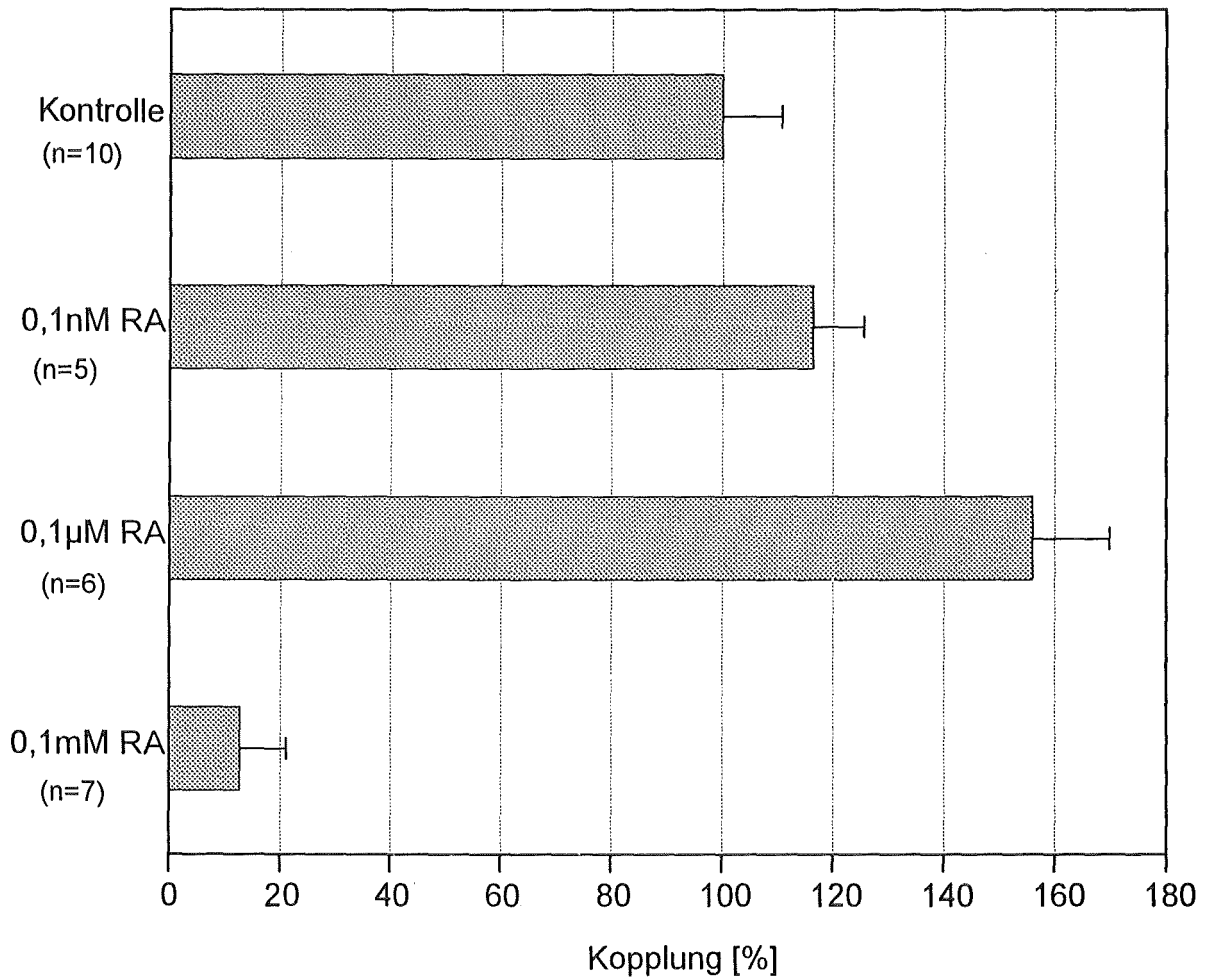


Abb. 10: Ausbreitung des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow nach Mikroinjektion (s. Material und Methoden, II.8.) in FL-Monolayerzellen nach 0,5 Stunden Retinsäureinkubation. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung gegenüber dem Kontrollwert sowie der Standardfehler. (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.1.1.1.)

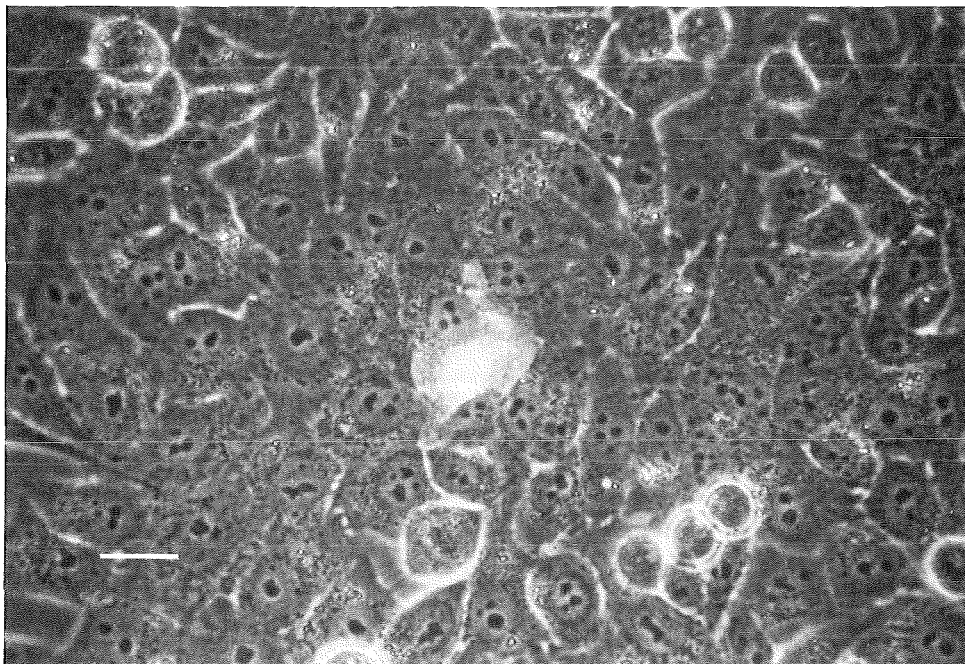
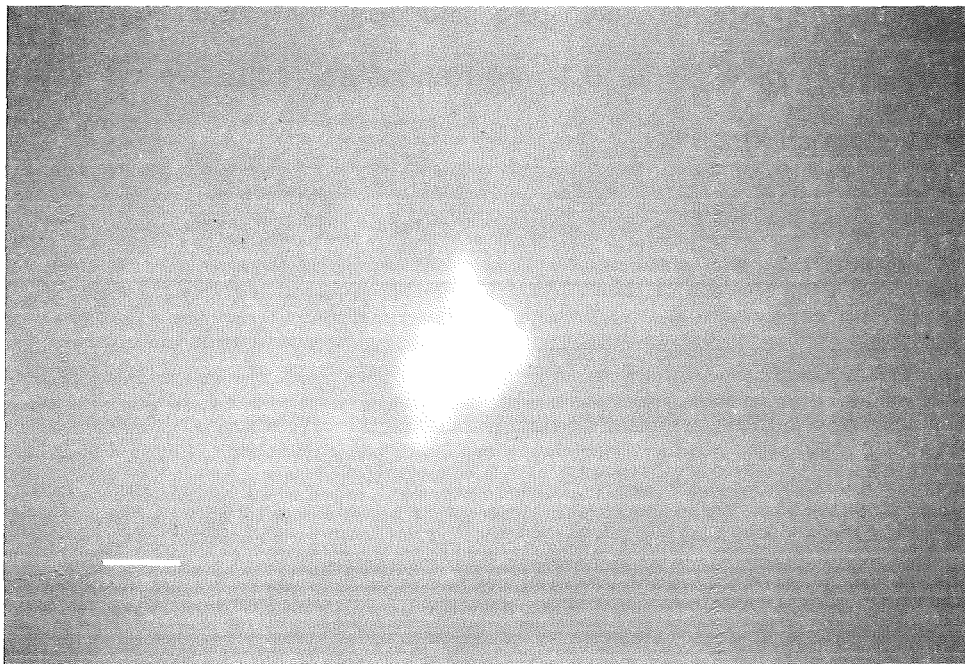


Abb. 11: Reduzierte Farbstoffkopplung in einem FL-Monolayer nach Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure (24 h). Das obere Bild zeigt die Auflichtfluoreszenzabbildung, das untere Bild zeigt dieselben Zellen im Phasenkontrast. Der Balken entspricht 20 μm .

Nach 24 Stunden Inkubation hatte sich der Effekt der 0,1 μM Retinsäure auf die Erhöhung der interzellulären Kommunikation auf über 100 % verstärkt; 0,1 mM Retinsäure hemmte die Kopplung fast vollständig.

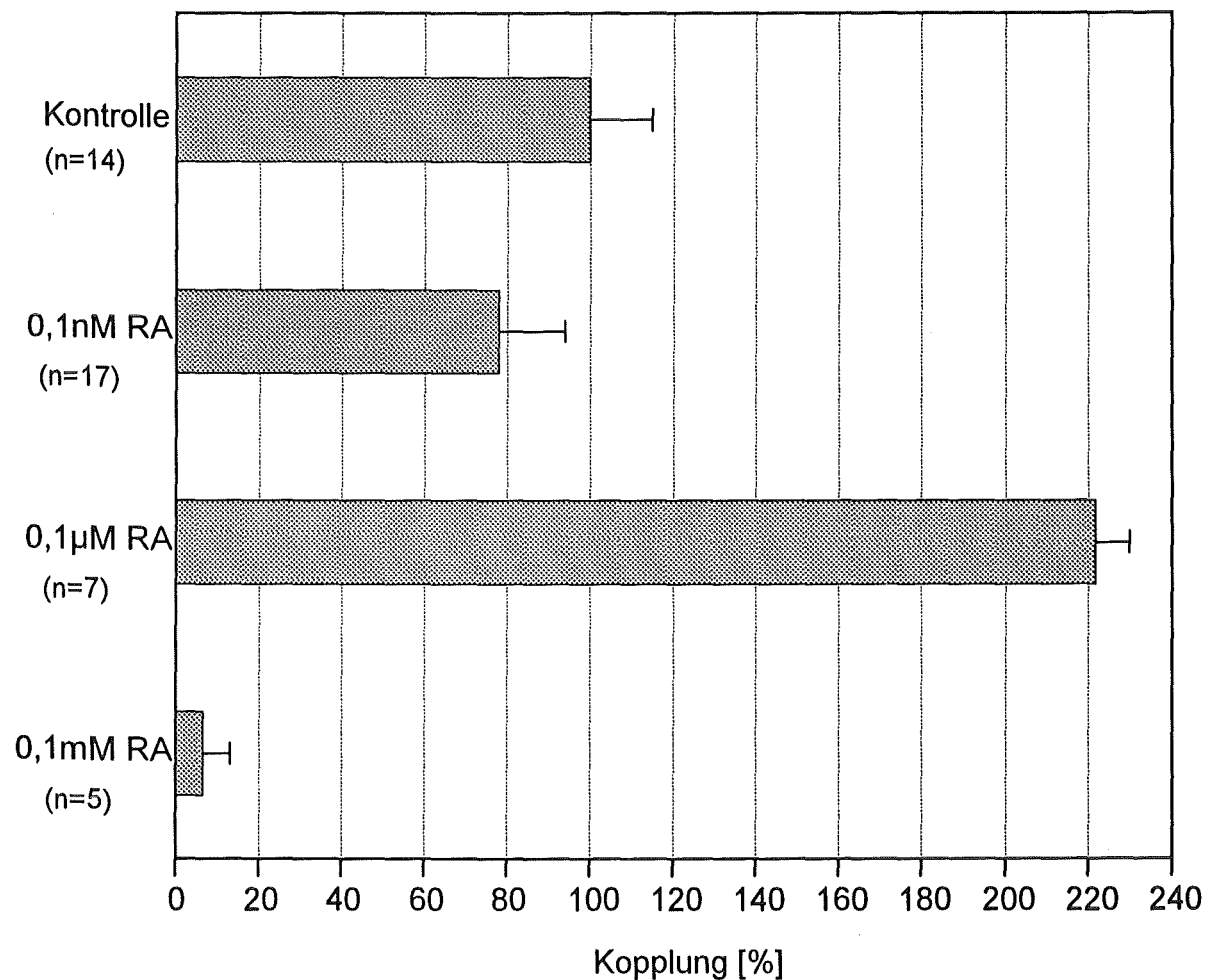


Abb. 12: Ausbreitung des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow nach Mikroinjektion (s. Material und Methoden, II.8.) in FL-Monolayerzellen nach 24 Stunden Retinsäureinkubation. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung gegenüber dem Kontrollwert sowie der Standardfehler. (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.1.1.1.)

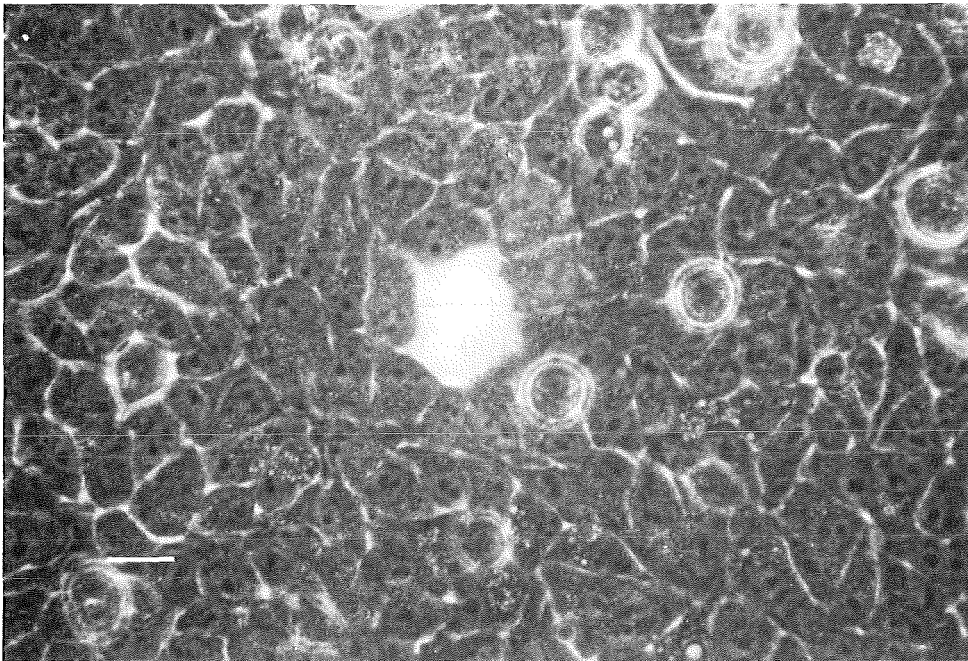
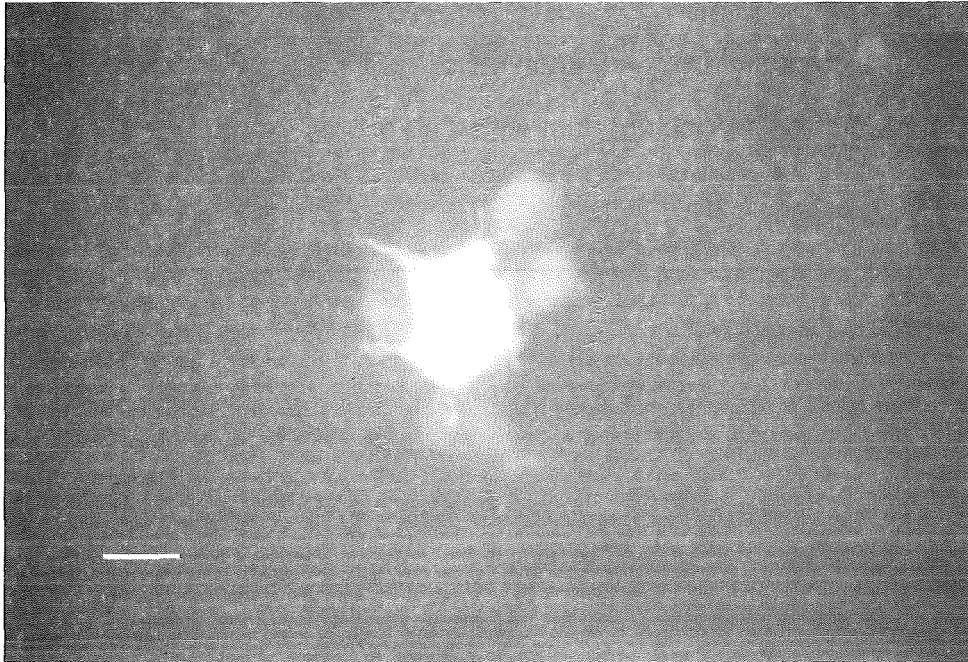


Abb. 13: Erhöhte Farbstoffkopplung in einem FL-Monolayer nach Inkubation mit $0,1 \mu\text{M}$ Retinsäure (24 h). Das obere Bild zeigt die Auflichtfluoreszenzabbildung, das untere Bild zeigt dieselben Zellen im Phasenkontrast. Der Balken entspricht $20 \mu\text{m}$.

III.1.1.2. SV40-3T3-Monolayerzellen

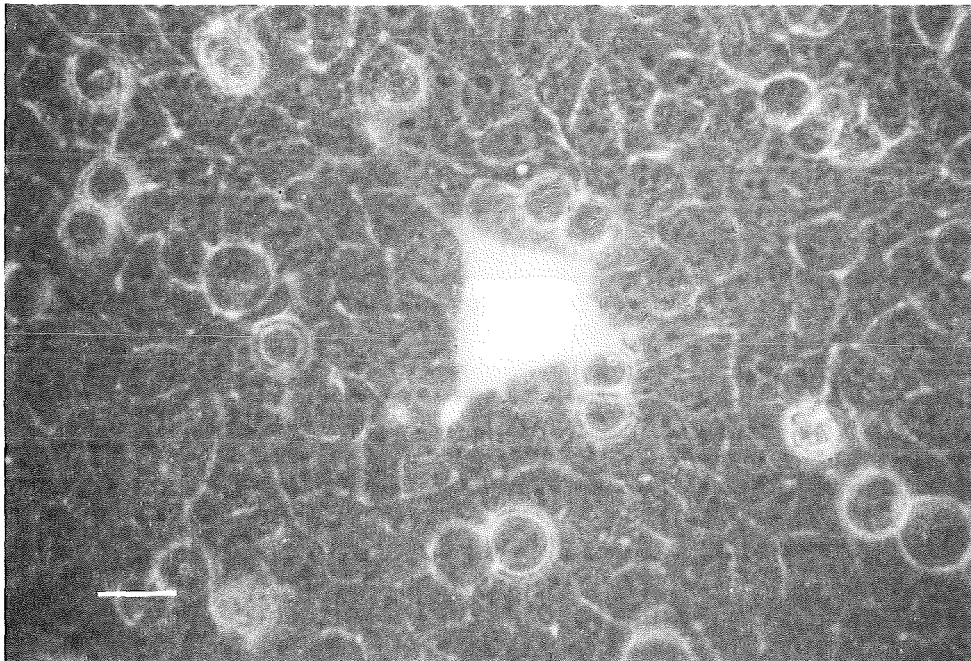
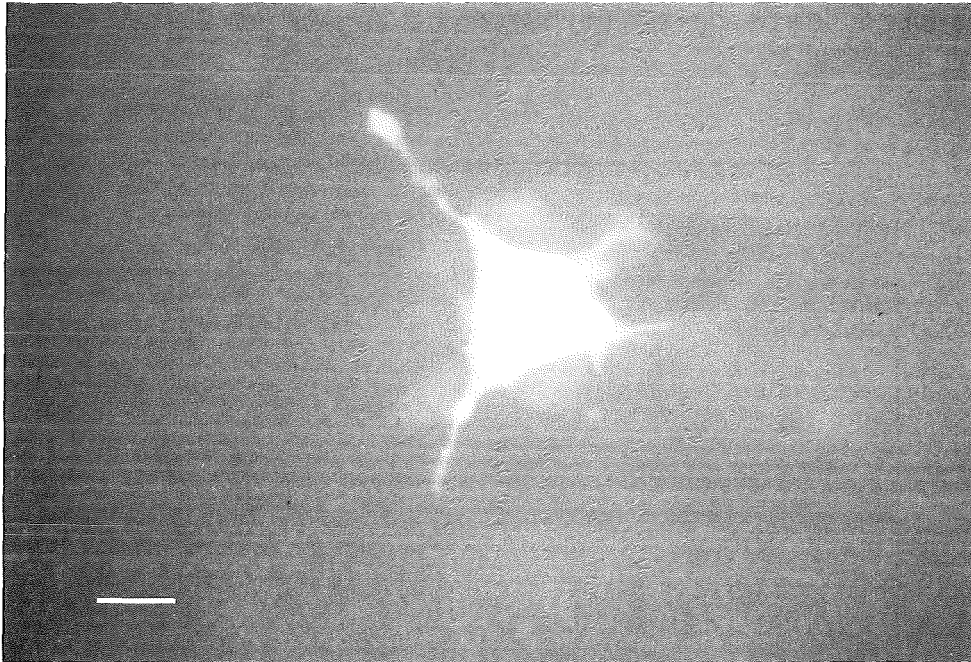


Abb. 14: Farbstoffkopplung in einem SV40-3T3-Monolayer (Kontrolle). Das obere Bild zeigt die Auflichtfluoreszenzabbildung, das untere Bild zeigt dieselben Zellen im Phasenkontrast. Der Balken entspricht 20 μm .

0,5 Stunden Retinsäureinkubation zeigte bei den SV40-3T3-Monolayerzellen im Gegensatz zu den FL-Zellen deutlich stimulierende Effekte bei 0,1 μM Retinsäure und eine deutlichere Inhibierung bei Zugabe von 0,1 mM Retinsäure.

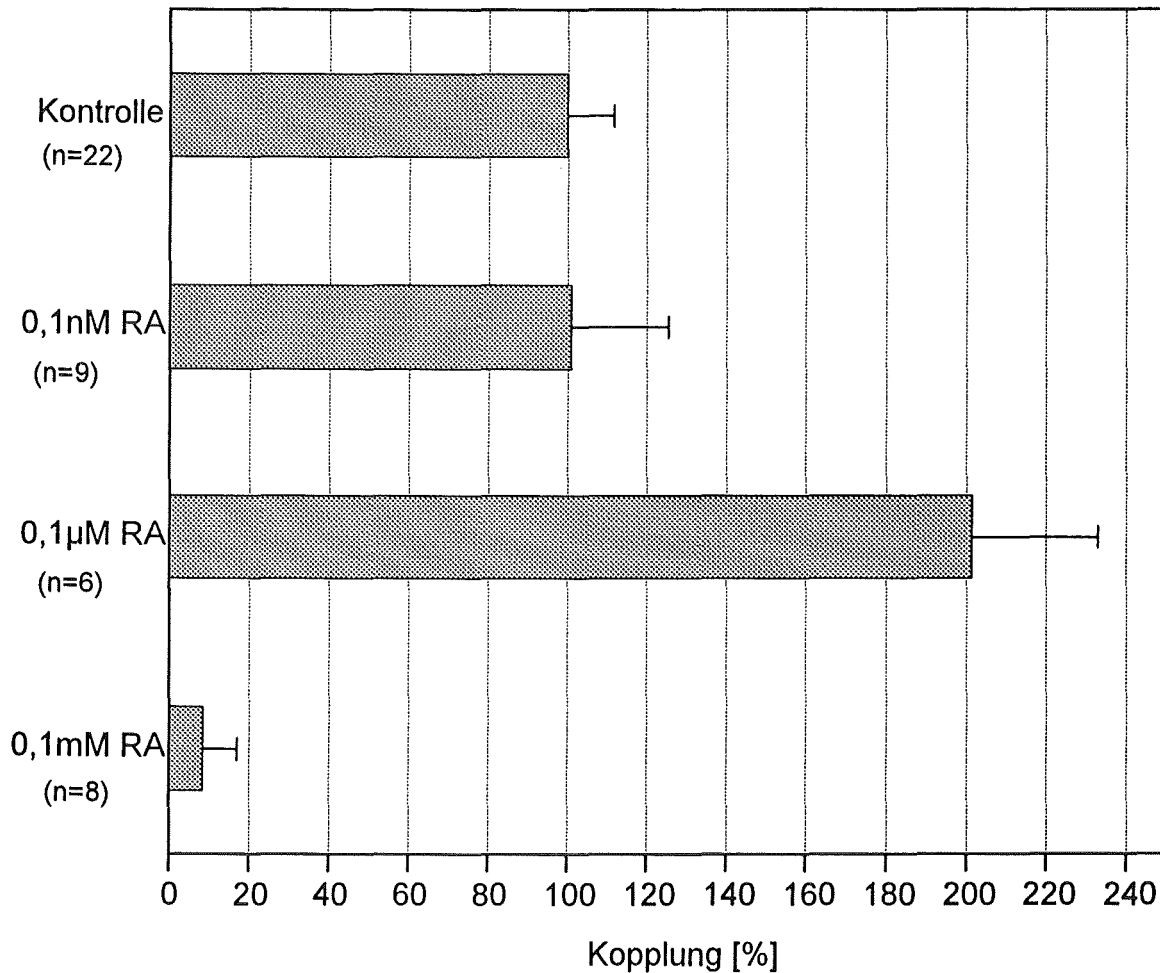


Abb. 15: Ausbreitung des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow nach Mikroinjektion (s. Material und Methoden, II.8.) in SV40-3T3-Monolayerzellen nach 0,5 Stunden Retinsäureinkubation. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung gegenüber dem Kontrollwert sowie der Standardfehler. (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.1.1.2.)

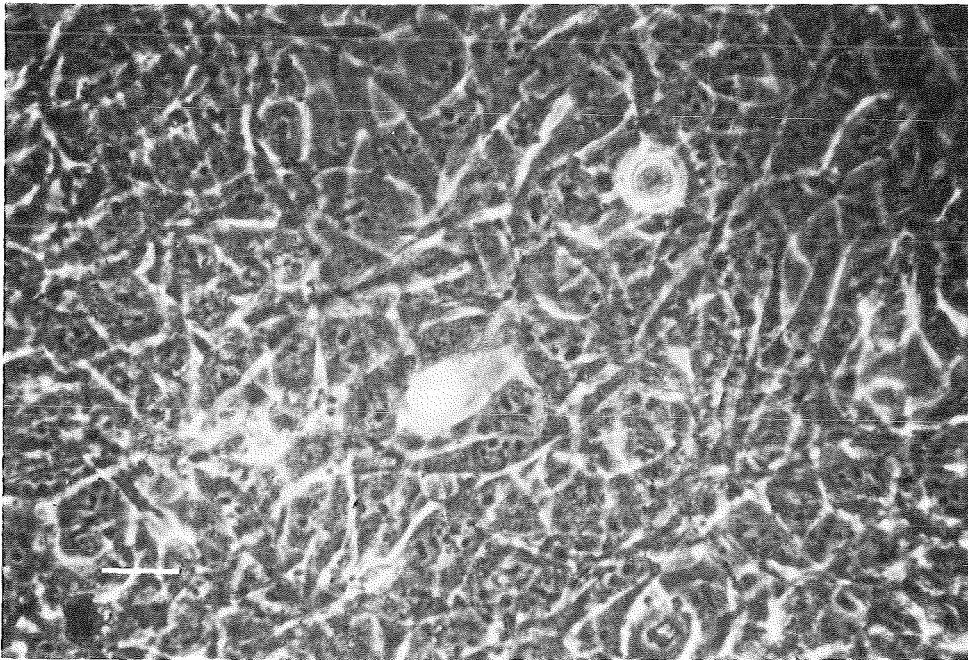
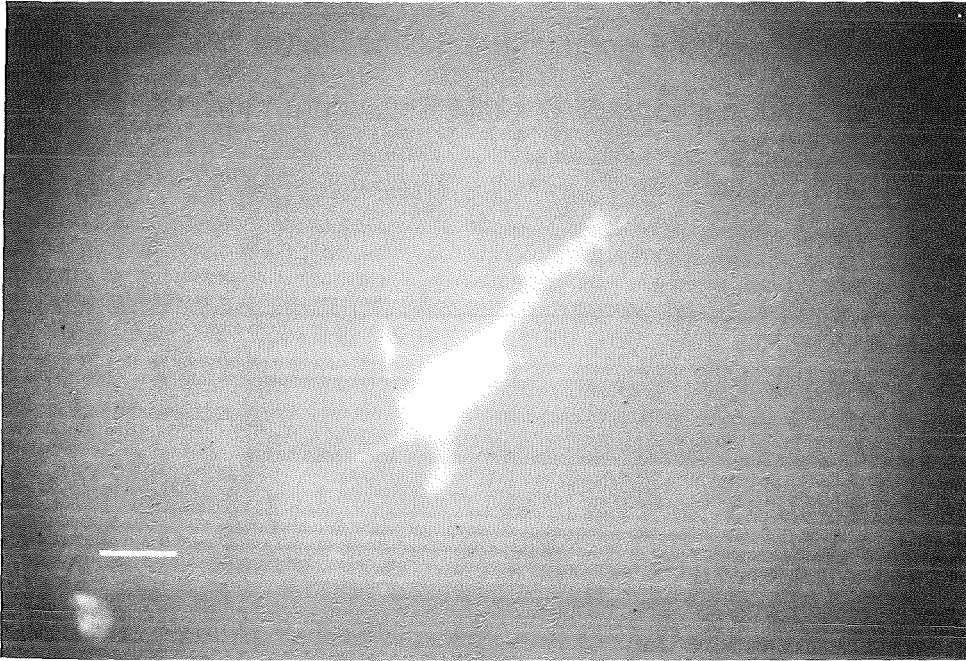


Abb. 16: Reduzierte Farbstoffkopplung in einem SV40-3T3-Monolayer nach Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure (24 h). Das obere Bild zeigt die Auflichtfluoreszenzabbildung, das untere Bild zeigt dieselben Zellen im Phasenkontrast. Der Balken entspricht 20 μm .

Nach 24 Stunden Inkubation zeigte die Retinsäure bei den SV40-3T3-Monolayerzellen eine deutliche Kopplungszunahme bei 0,1 nM; bei 0,1 μ M war die Zunahme nicht so stark ausgeprägt. 0,1 mM Retinsäure hemmte die interzelluläre Kommunikation fast vollständig.

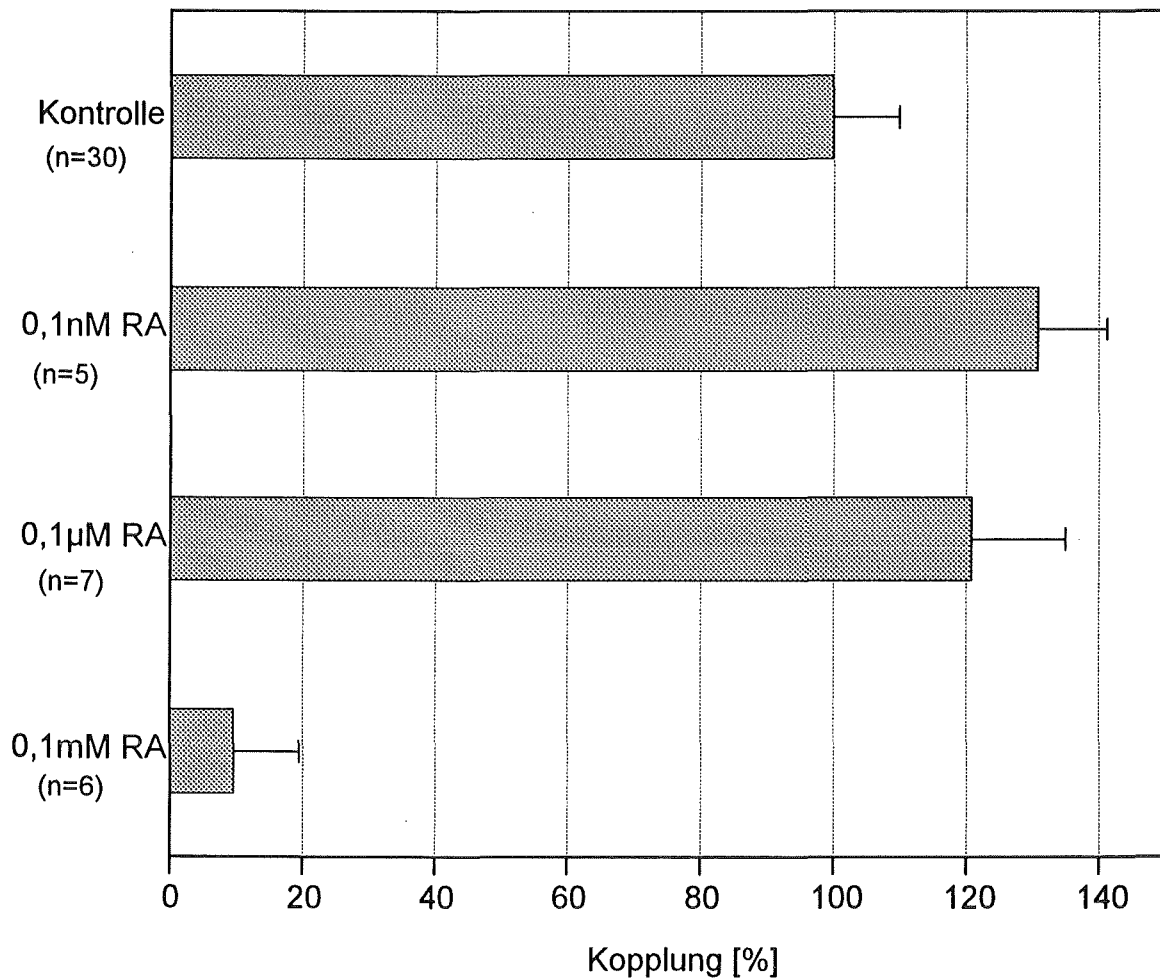


Abb. 17: Ausbreitung des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer Yellow nach Mikroinjektion (s. Material und Methoden, II.8.) in SV40-3T3-Monolayerzellen nach 24 Stunden Retinsäureinkubation. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung gegenüber dem Kontrollwert sowie der Standardfehler. (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.1.1.2.)

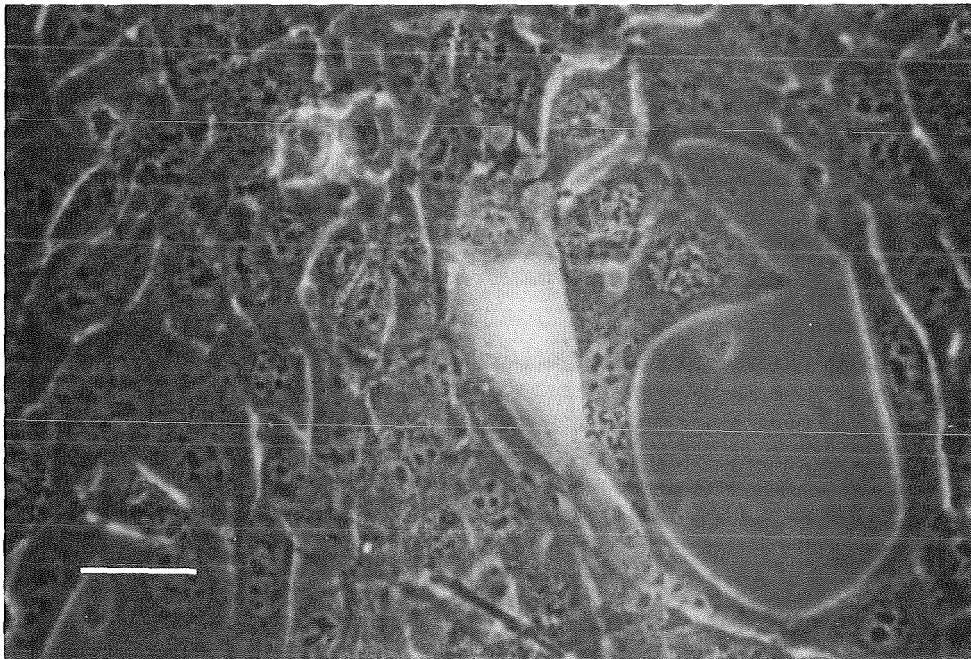
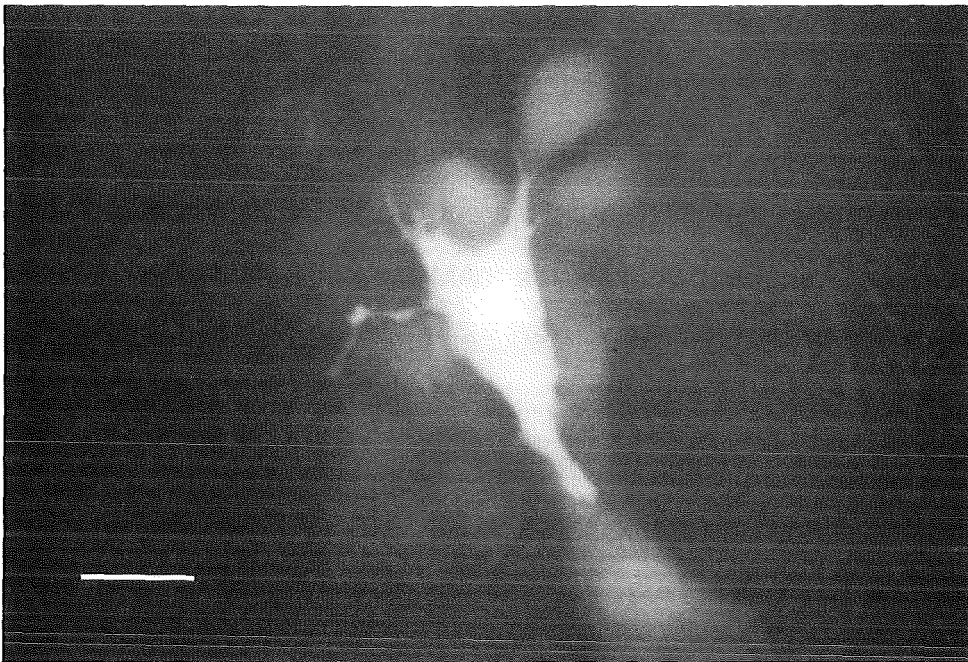


Abb. 18: Erhöhte Farbstoffkopplung in einem SV40-3T3-Monolayer nach Inkubation mit $0,1 \mu\text{M}$ Retinsäure (24 h). Das obere Bild zeigt die Auflichtfluoreszenzabbildung, das untere Bild zeigt dieselben Zellen im Phasenkontrast. Der Balken entspricht $20 \mu\text{m}$.

III.2. cAMP-Gehalt

Nach der Alkoholextraktion (s. Material und Methoden, II.7.1.) wurde der Gehalt des zellulären cAMPs mit einem Radioimmunoassay (RIA) bestimmt. Dieser nutzt zur Bestimmung des Gehalts an zellulärem cAMP die kompetitive Bindung eines Antikörpers an radioaktiv markiertes cAMP definierter Menge und an nicht-radioaktives cAMP aus der zu untersuchenden Probe (s. Material und Methoden, II.7.2.). In Monolayerzellen beider Zelllinien wurde das intrazelluläre cAMP nach 0,5 Stunden und nach 24 Stunden Retinsäureinkubation bestimmt. Sphäroidzellen wurden nach 24 Stunden Retinsäureeinwirkung auf mögliche Veränderungen des cAMP-Gehalts untersucht, nachdem sie durch die sequentielle Trypsinierung in ihre Schichtungen aufgetrennt waren (s. Material und Methoden, II.2.3.). Da die Messung mit einem RIA-Test sehr aufwendig und kostspielig ist, wurde nur jede zweite durch die sequentielle Trypsinierung gewonnene Schicht der Untersuchung zugeführt. Bei beiden Zelllinien kamen so von 7 Fraktionen je 4 zur Auswertung, das heißt die äußerste Schicht (Fraktion 1), Fraktion 3 und 5 und die innersten Zellen des trypsinierten Sphäroids (Fraktion 7).

III.2.1. cAMP-Gehalt in Monolayerzellen

III.2.1.1. FL-Monolayerzellen

Nach 0,5 Stunden Inkubation zeigte sich nur bei 0,1 μM Retinsäure eine leichte Abnahme des intrazellulären cAMP-Gehalts, andere Konzentrationen hatten keinen deutlichen Effekt.

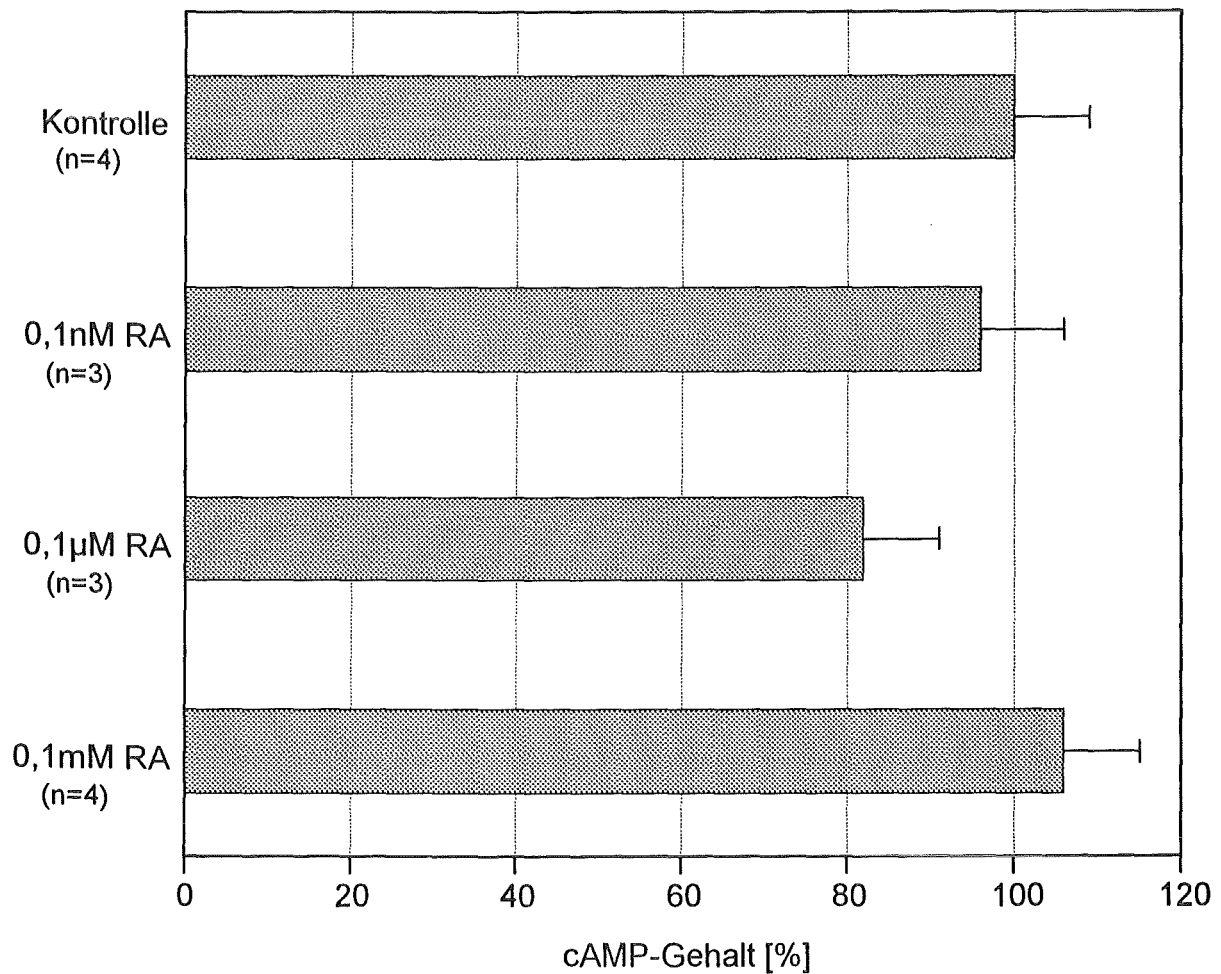


Abb. 19: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in FL-Monolayerzellen nach 0,5 Stunden Retinsäureinkubation. Dargestellt ist der prozentuale Gehalt bezogen auf die Kontrolle sowie der Standardfehler. (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.2.1.1.)

Nach 24 Stunden Inkubation der FL-Monolayerzellen zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit des intrazellulären cAMP-Gehalts von der Konzentration der zugegebenen Retinsäure. Die stärkste Abnahme (um 50 %) wurde durch die höchste eingesetzte Retinsäuredosis (0,1 mM) erreicht.

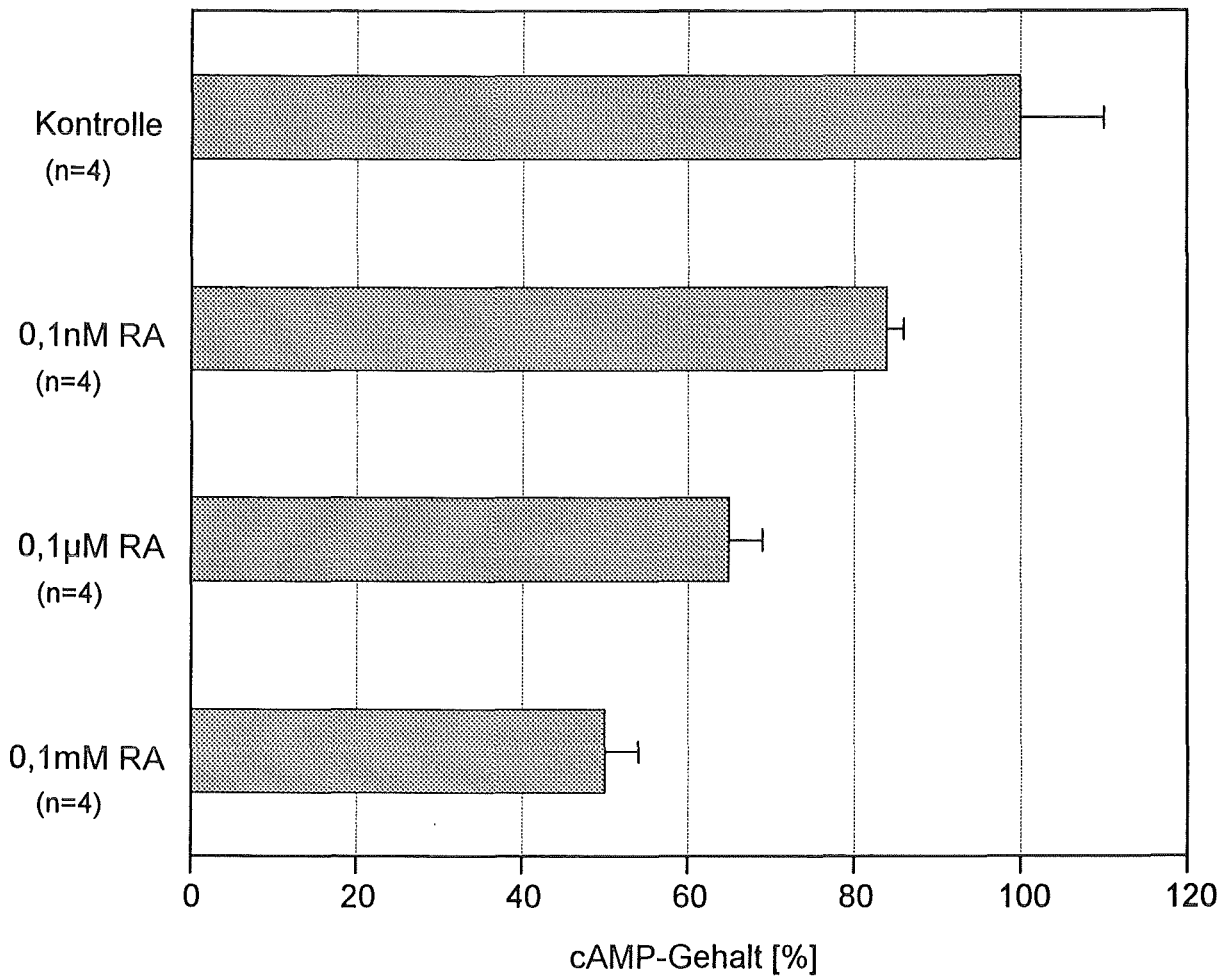


Abb. 20: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in FL-Monolayerzellen nach 24 Stunden Retinsäureinkubation. Dargestellt ist der prozentuale Gehalt bezogen auf die Kontrolle sowie der Standardfehler. (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.2.1.1.)

III.2.1.2. SV40-3T3-Monolayerzellen

0,5 Stunden Inkubation von SV40-3T3-Monolayerzellen führte bei Verwendung von 0,1 mM Retinsäure zu einer deutlichen Anhebung des intrazellulären cAMP-Gehalts. Dieser Effekt deutete sich auch bei FL-Zellen nach 0,5 Stunden Inkubation an, war jedoch nicht signifikant. Die anderen Konzentrationen blieben ohne Einfluß.

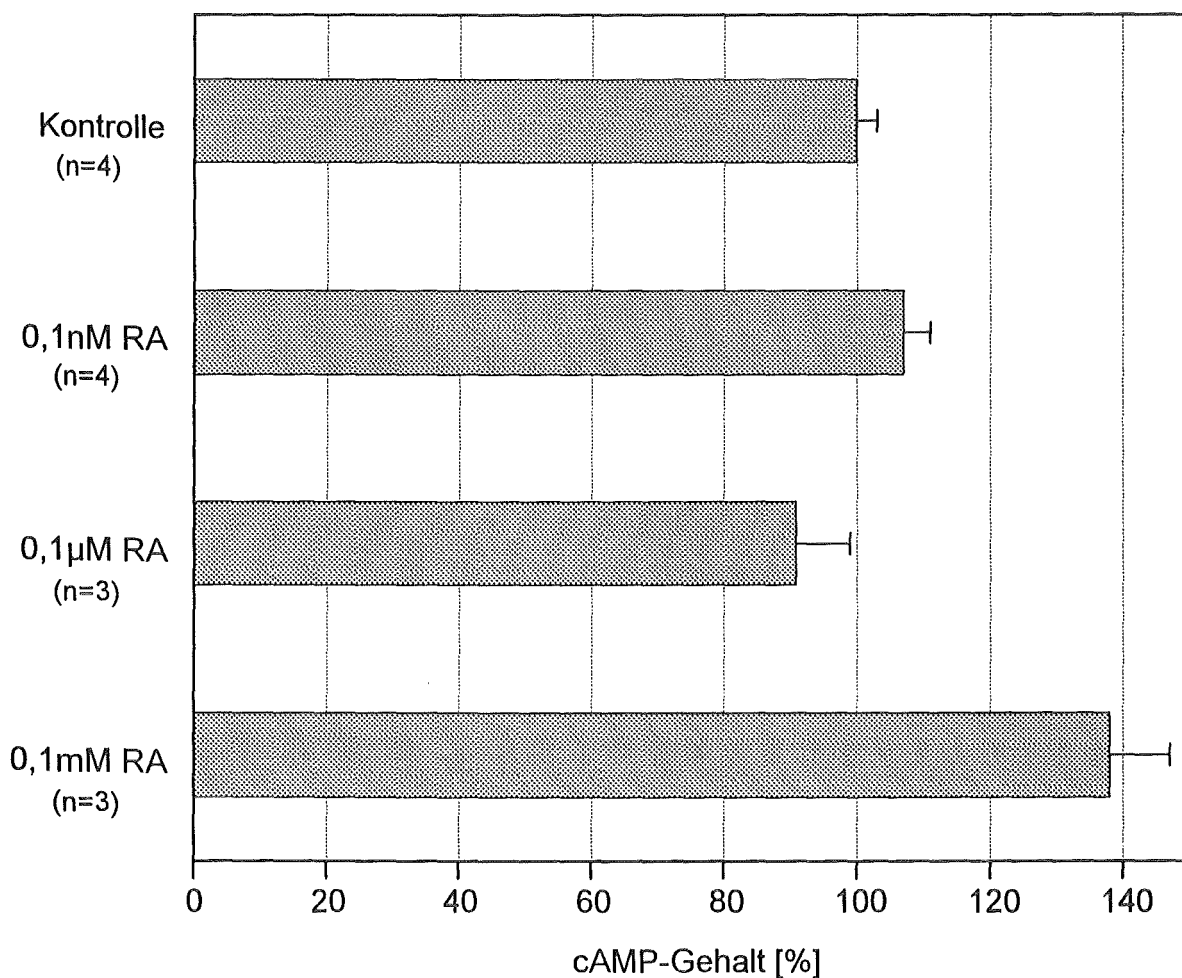


Abb. 21: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Monolayerzellen nach 0,5 Stunden Retinsäureinkubation. Dargestellt ist der prozentuale Gehalt bezogen auf die Kontrolle sowie der Standardfehler. (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.2.1.2.)

24 Stunden Retinsäureinkubation führten bei den SV40-3T3-Monolayerzellen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des intrazellulären cAMPs, wie es bei den FL-Zellen der Fall war. Auch hier zeigte sich die stärkste Reduktion durch Zugabe von 0,1 mM Retinsäure.

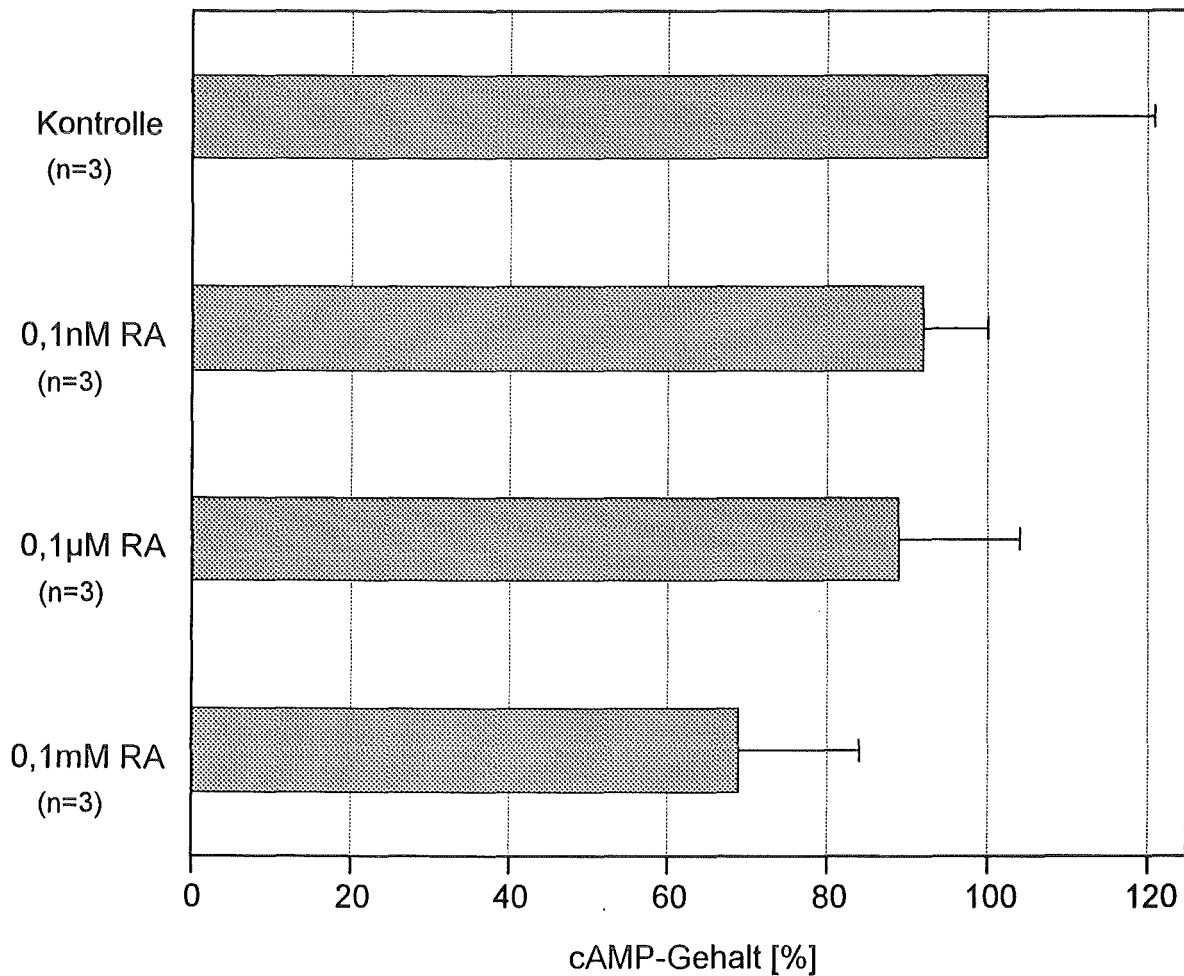


Abb. 22: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Monolayerzellen nach 24 Stunden Retinsäureinkubation. Dargestellt ist der prozentuale Gehalt bezogen auf die Kontrolle sowie der Standardfehler. (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.2.1.2.)

III. 2.2. cAMP-Gehalt in Sphäroidzellen

III.2.2.1. FL-Sphäroidzellen

Bei den Sphäroiden erfolgten die Messungen ausschließlich nach 24 Stunden. Der in den Kontrollzellen vorhandene Gradient des intrazellulären cAMPs wurde durch die Inkubation mit 0,1 nM Retinsäure für 24 Stunden nicht beeinflusst.

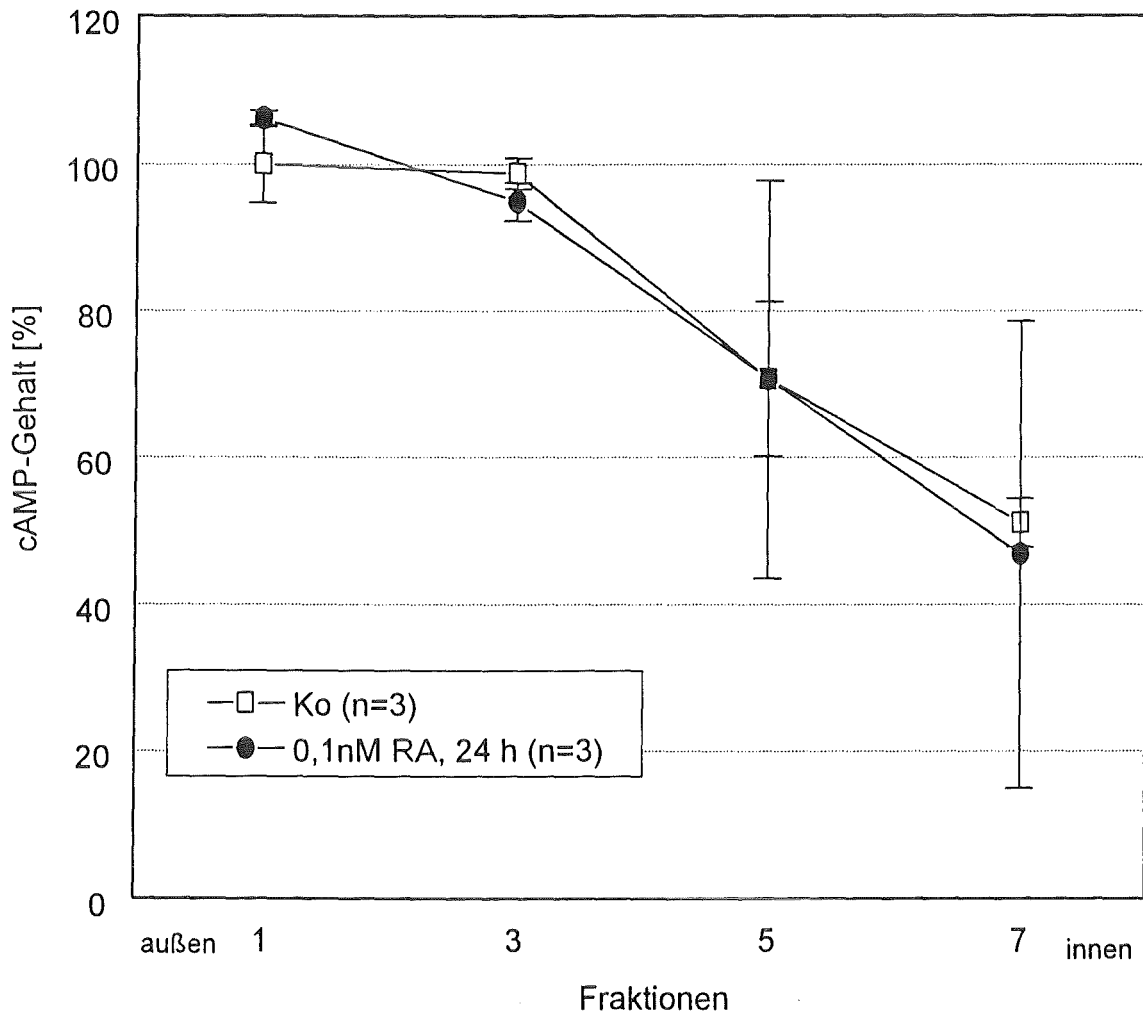


Abb. 23: cAMP-Gehalt in FL-Sphäroidzellen nach 24 Stunden 0,1 nM Retinsäureinkubation. Dargestellt ist der prozentuale cAMP-Gehalt gegenüber der Kontrolle in Abhängigkeit von der räumlichen Position der Zellen im Sphäroid (s. Material und Methoden, II.2.3.). (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.2.2.1.)

Eine Inkubation mit 0,1 μM Retinsäure führte zu einer Abflachung des in den Kontrollen auftretenden cAMP-Gradienten.

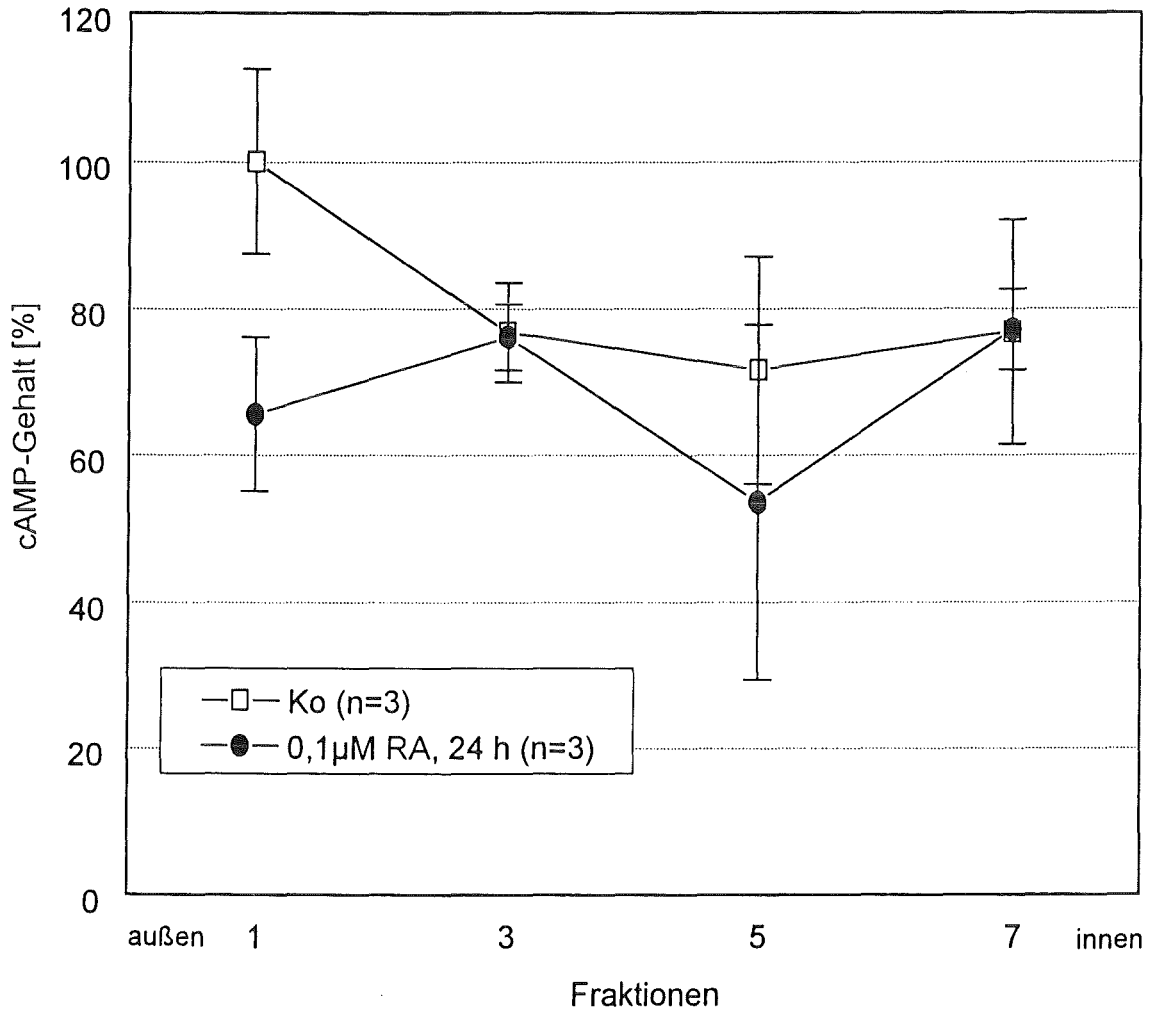


Abb. 24: cAMP-Gehalt in FL-Sphäroidzellen nach 24 Stunden 0,1 μM Retinsäureinkubation. Dargestellt ist der prozentuale cAMP-Gehalt gegenüber der Kontrolle in Abhängigkeit von der räumlichen Position der Zellen im Sphäroid (s. Material und Methoden, II.2.3.). (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.2.2.1.)

0,1 mM Retinsäure führte zum erneuten Auftreten des cAMP-Gradienten. Die Konzentration des intrazellulären cAMPs war jedoch insgesamt erniedrigt.

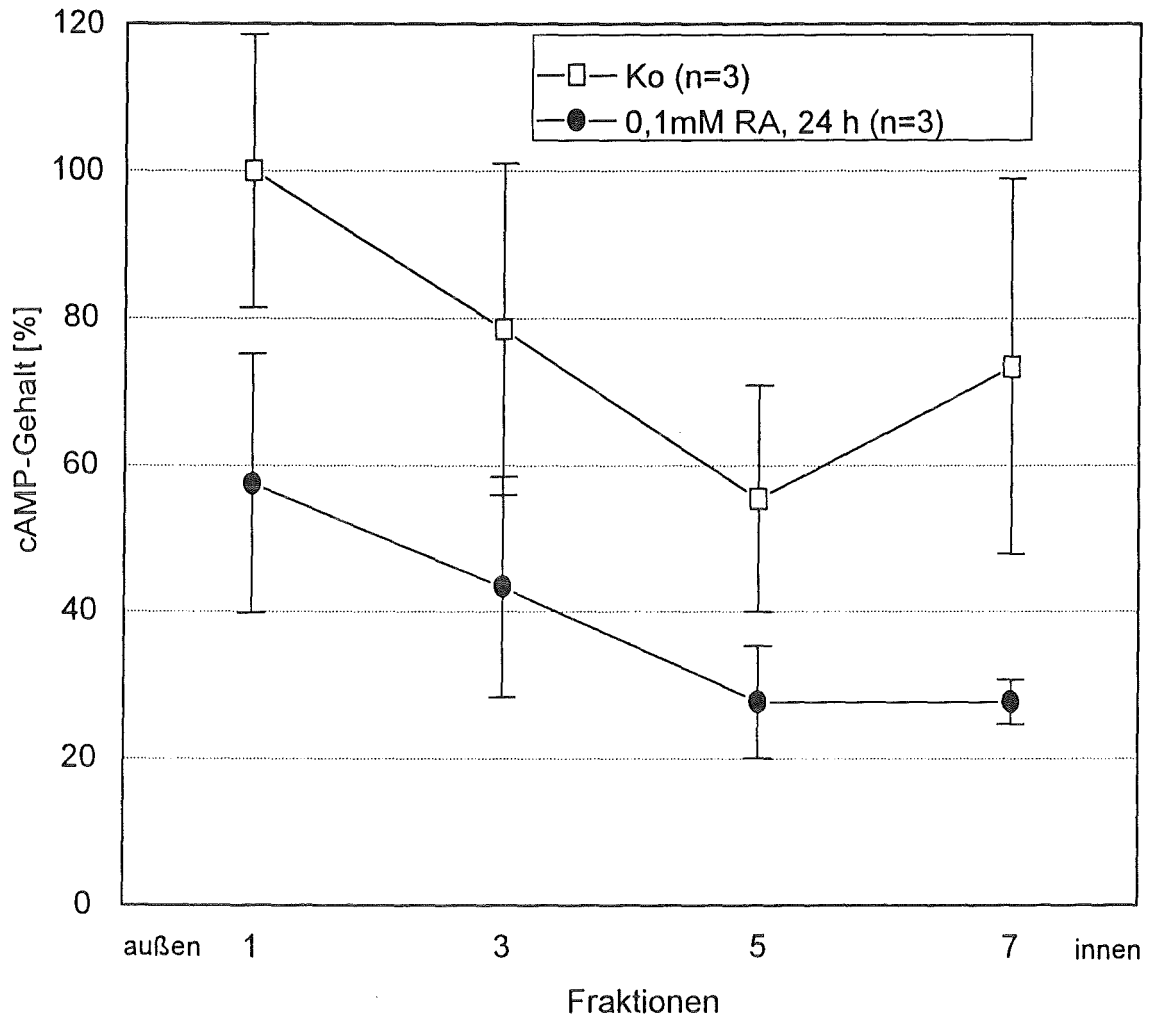


Abb. 25: cAMP-Gehalt in FL-Sphäroidzellen nach 24 Stunden 0,1 mM Retinsäureinkubation. Dargestellt ist der prozentuale cAMP-Gehalt gegenüber der Kontrolle in Abhängigkeit von der räumlichen Position der Zellen im Sphäroid (s. Material und Methoden, II.2.3.). (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.2.2.1.)

III.2.2.2. SV40-3T3-Sphäroidzellen

Bei den SV40-3T3-Sphäroiden führte bereits eine Inkubation mit 0,1 nM Retinsäure zu einer Abflachung des cAMP-Gradienten.

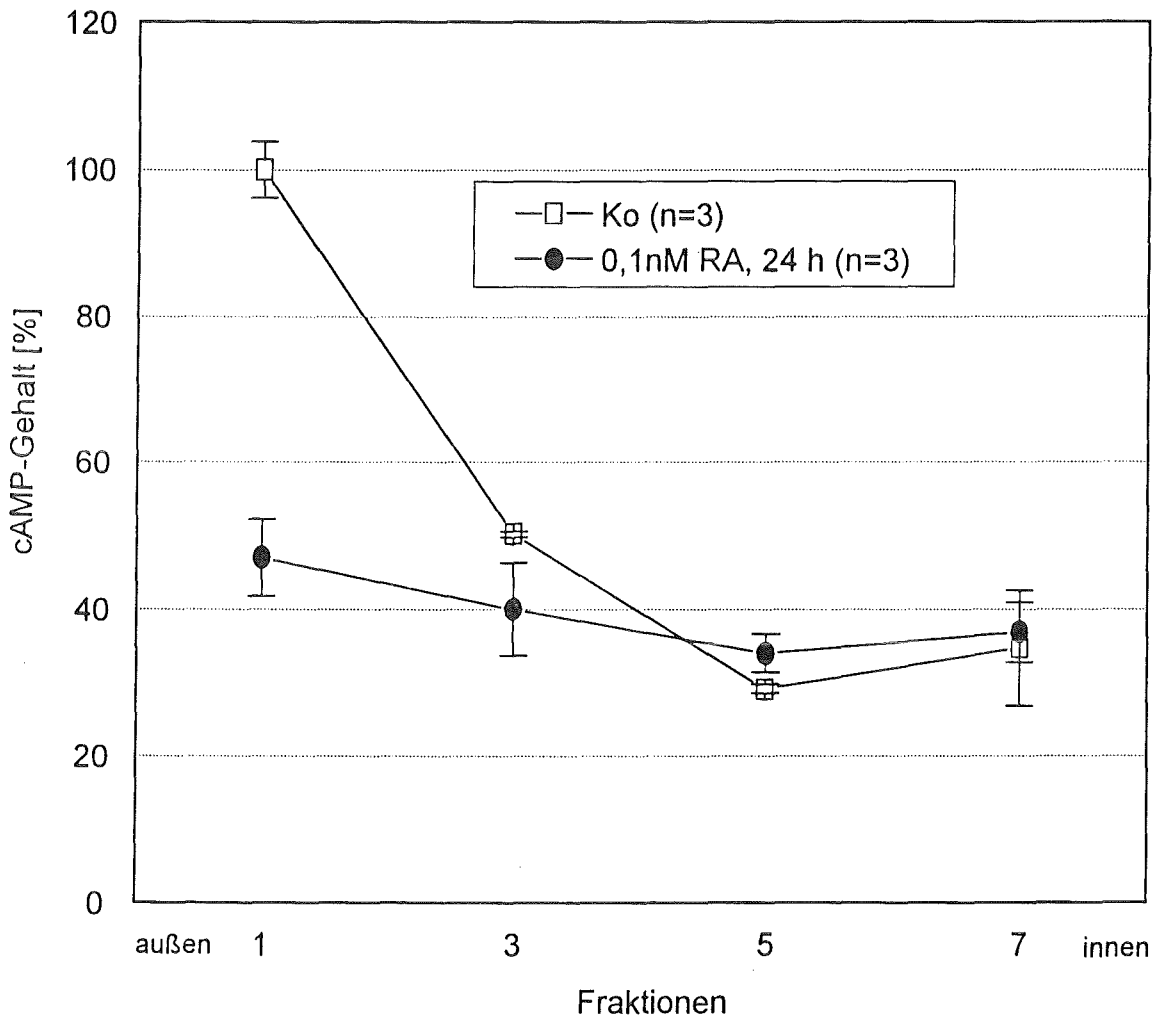


Abb. 26: cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Sphäroidzellen nach 24 Stunden 0,1 nM Retinsäureinkubation. Dargestellt ist der prozentuale cAMP-Gehalt gegenüber der Kontrolle in Abhängigkeit von der räumlichen Position der Zellen im Sphäroid (s. Material und Methoden, II.2.3.). (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.2.2.2.)

Im Vergleich zu der Kontrolle wurde der cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Sphäroiden nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 μM Retinsäure erniedrigt, der Gradient wurde leicht abgeflacht.

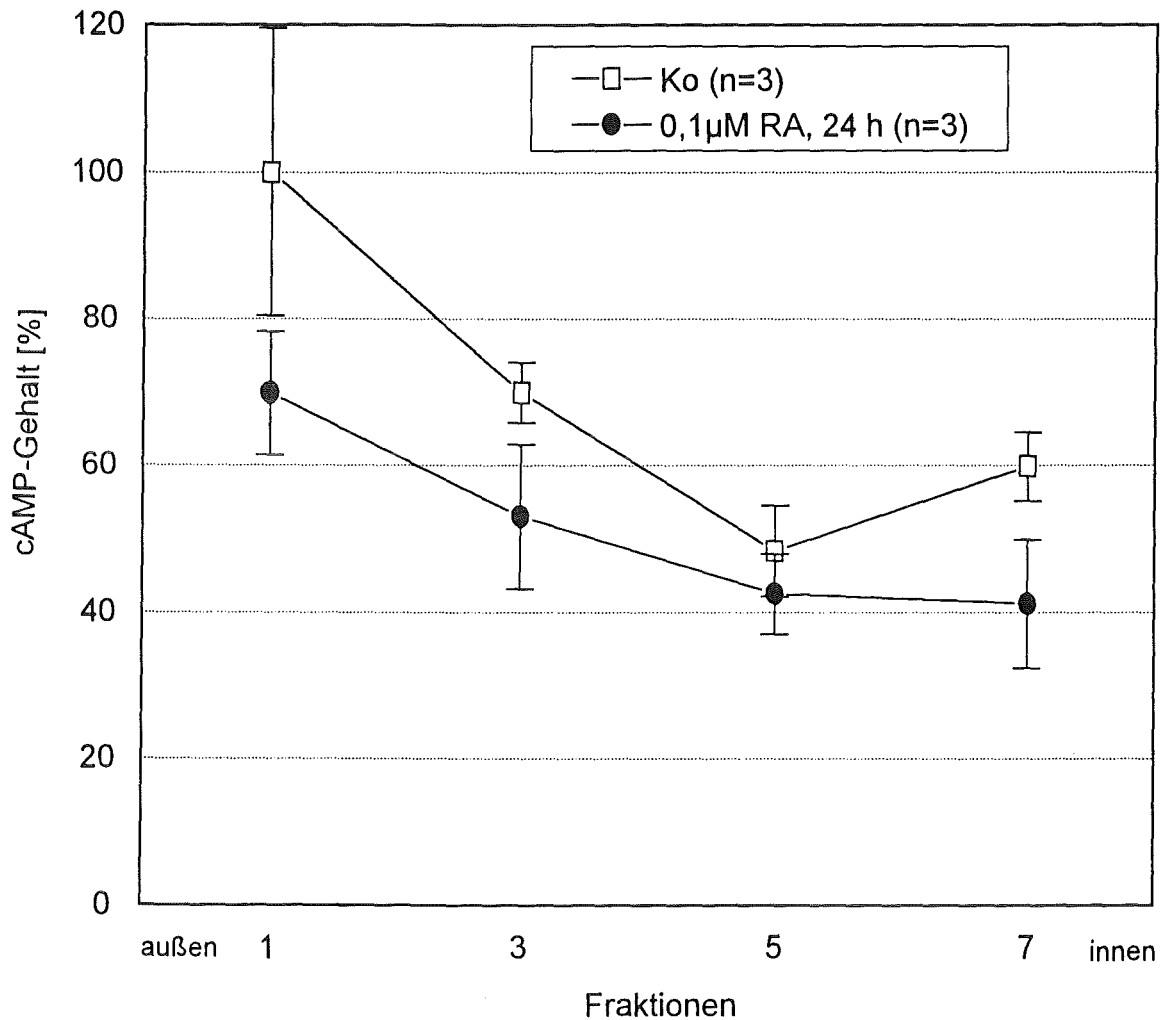


Abb. 27: cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Sphäroidzellen nach 24 Stunden 0,1 μM Retinsäureinkubation. Dargestellt ist der prozentuale cAMP-Gehalt gegenüber der Kontrolle in Abhängigkeit von der räumlichen Position der Zellen im Sphäroid (s. Material und Methoden, II.2.3.). (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.2.2.2.)

Die Inkubation von SV40-3T3-Sphäroiden mit der höchsten verwendeten Retinsäurekonzentration (0,1 mM) führte zu einer Abflachung des cAMP-Gradienten.

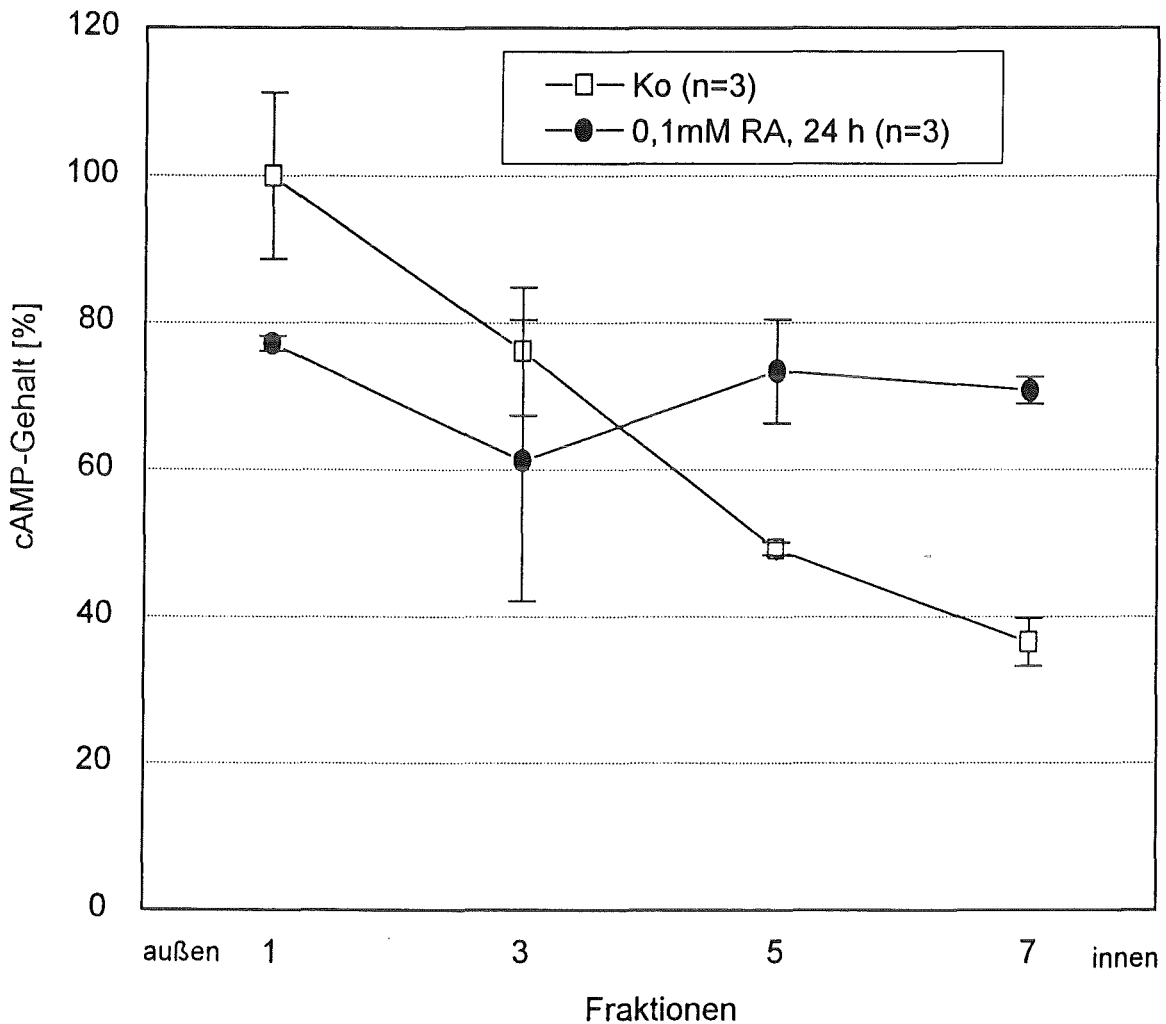


Abb. 28: cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Sphäroidzellen nach 24 Stunden 0,1 mM Retinsäureinkubation. Dargestellt ist der prozentuale cAMP-Gehalt gegenüber der Kontrolle in Abhängigkeit von der räumlichen Position der Zellen im Sphäroid (s. Material und Methoden, II.2.3.). (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.2.2.2.)

III.3. Zellzyklusverteilung

Untersuchungen der Zellzyklusverteilung erfolgten an Monolayer- und Sphäroidzellen beider Zelllinien mit einem Durchflußzytometer der Firma Partec (PAS II). Mit diesen Messungen wurde die Proliferationsaktivität der Zellen unter dem Einfluß von Retinsäure getestet. Da eine Veränderung der Zellzyklusverteilung erst nach einer gewissen Zeit festzustellen ist, erfolgten die Messungen immer 24 Stunden nach Zugabe der Vitamin A-Säure. Dabei wurde die Säure bei den Untersuchungen der Monolayerzellen entweder 0,5 Stunden auf die Zellen gebracht und danach durch frisches Medium ersetzt, oder es wurde die gesamte Zeit (24 h) inkubiert. Sphäroidzellen wurden nur nach Langzeitinkubation untersucht.

III.3.1. Zellzyklusverteilung in Monolayerzellen

Einen besonderen Einfluß auf die Verteilung im Zellzyklus hat die Dichte des zu untersuchenden Monolayers. Bei beiden Zelllinien ist mit zunehmender Zelldichte eine Erhöhung der G1-Phase-Zellen und ein Rückgang der S-Phase-Zellen zu beobachten. Aus diesem Grund muß die Zelldichte in den einzelnen Versuchsansätzen möglichst exakt gleich gehalten werden, um Effekte, die nicht auf den Einfluß der Retinsäure zurückzuführen sind, auszuschließen. Generell wurden die SV40-3T3-Monolayerzellen in geringerer Dichte im Versuch eingesetzt als die FL-Zellen (s. Material und Methoden, II.2.1.), da SV40-3T3-Zellen bei höheren Zelldichten differenzieren können. Aus diesem Grund lag die S-Phase der SV40-3T3-Monolayerzellen bei den gezeigten Resultaten höher als bei den FL-Zellen.

III.3.1.1. FL-Monolayerzellen

0,5 Stunden Inkubation von FL-Monolayerzellen mit Retinsäure zeigte nach anschließender 24-stündiger Zugabe von frischem Medium nur bei 0,1 mM Retinsäure eine leichte Erniedrigung der G1-Phase, die S-Phase war leicht erhöht. Die anderen verwendeten Konzentrationen zeigten keinen Einfluß.

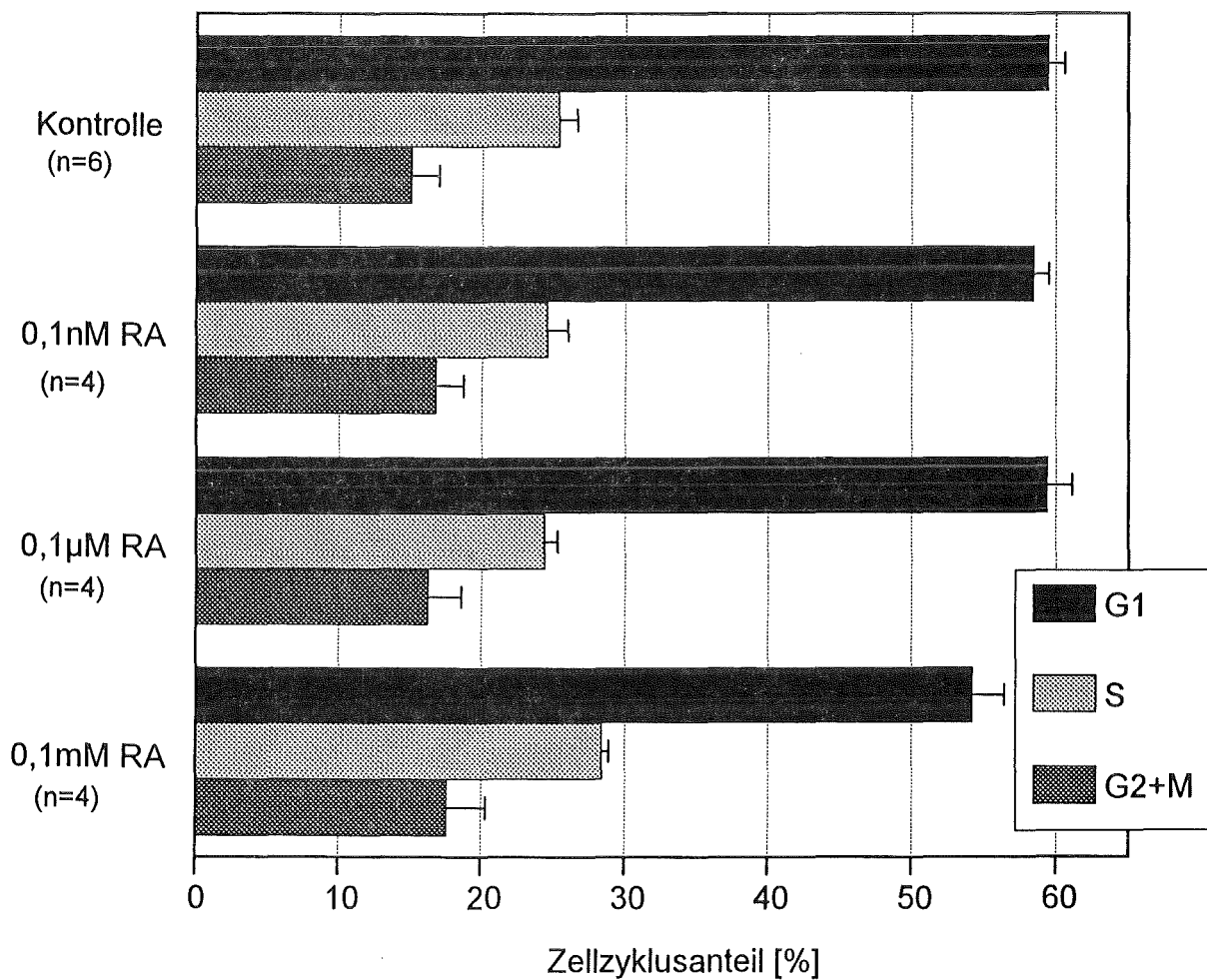


Abb. 29: Zellzyklusverteilung in FL-Monolayerzellen nach 0,5 Stunden Retinsäureinkubation und anschließendem Mediumwechsel. Durchflußzytometermessung erfolgte nach 24 Stunden. (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.3.1.1.)

Nach 24 Stunden Dauerinkubation hatte sich der Einfluß der 0,1 mM Retinsäure auf die FL-Monolayerzellen verstärkt: Gegenüber der Kontrolle zeigte sich der Anteil von Zellen in der G1-Phase um fast 10 % (absolut) verringert, die S-Phase war durch diese Behandlung um etwa den gleichen Betrag erhöht. Auch hier zeigten die anderen Retinsäurekonzentrationen keinen deutlichen Einfluß auf die Zellzyklusverteilung.

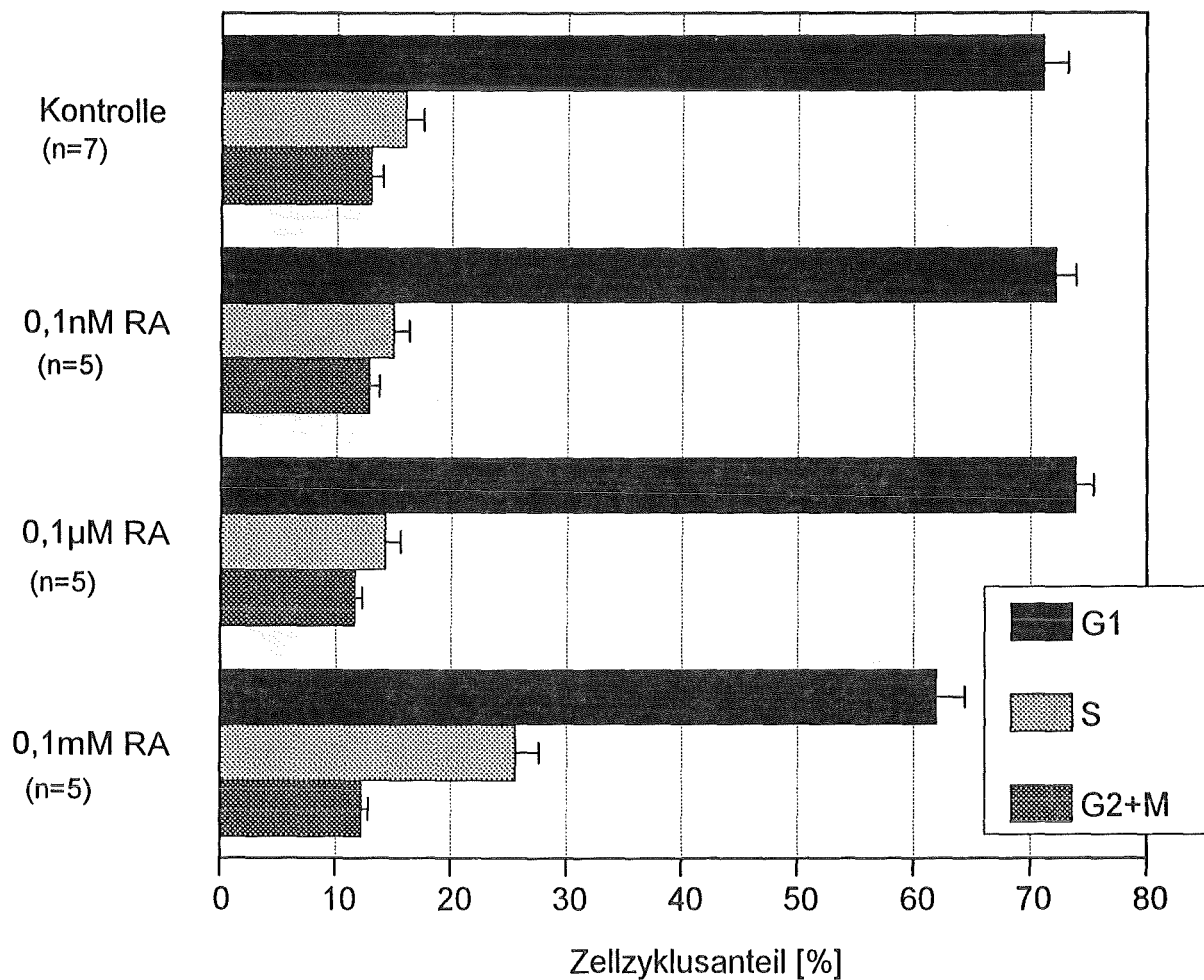


Abb. 30: Zellzyklusverteilung in FL-Monolayerzellen nach 24 Stunden Retinsäureinkubation. (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.3.1.1.)

III.3.1.2. SV40-3T3-Monolayerzellen

Im Gegensatz zu den FL-Zellen zeigten die SV40-3T3-Monolayerzellen 24 Stunden nach einer halbstündigen 0,1 mM Retinsäurezugabe eher eine leichte Zunahme der G1-Phase-Zellen und eine Abnahme der Synthesephaseanteile. Die anderen Konzentrationen blieben ohne meßbaren Einfluß auf den Zellzyklus.

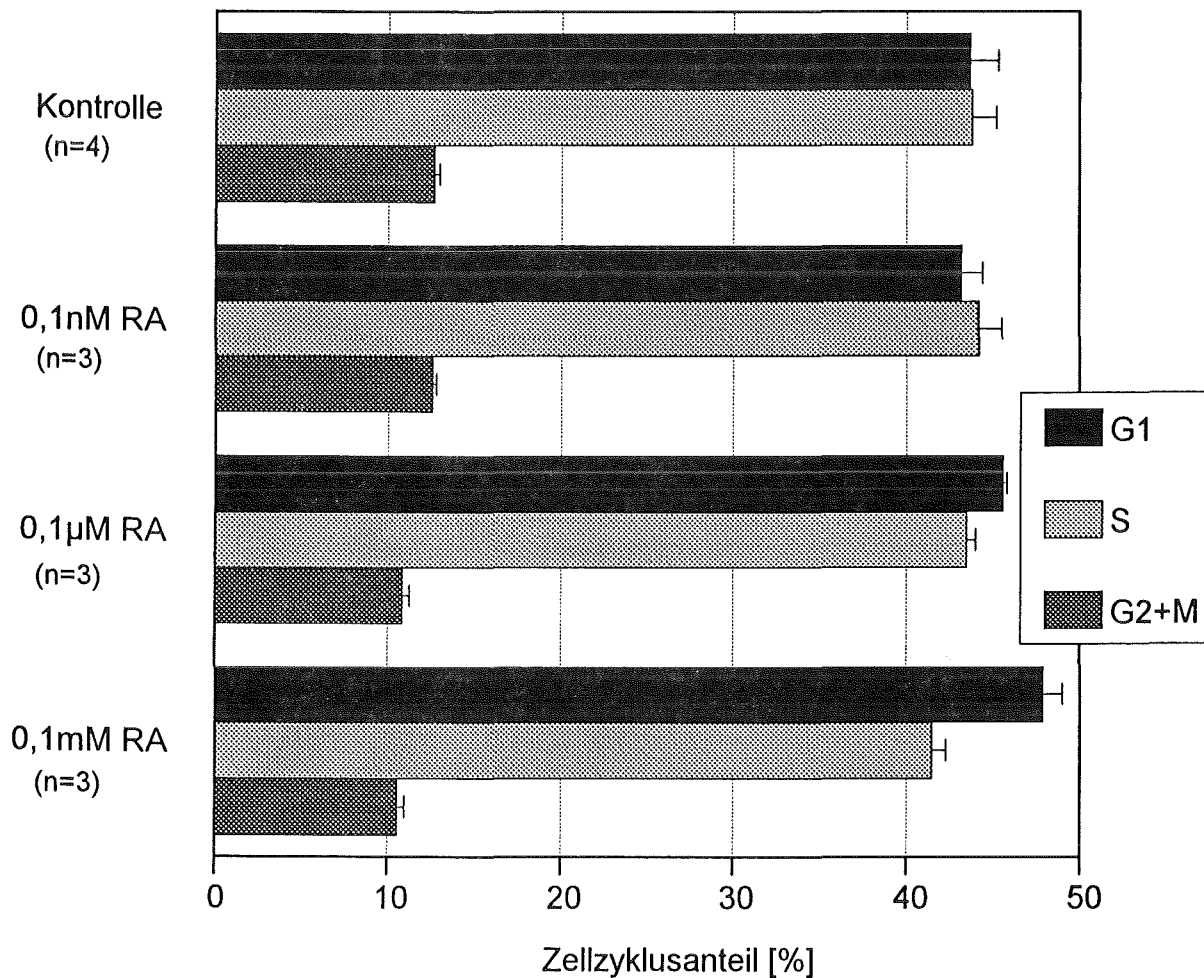


Abb. 31: Zellzyklusverteilung in SV40-3T3-Monolayerzellen nach 0,5 Stunden Retinsäureinkubation und anschließendem Mediumwechsel. Durchflußzytometermessung nach 24 Stunden. (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.3.1.2.)

Nach 24 Stunden Inkubation zeigte die 0,1 mM Retinsäure den gleichen Einfluß wie bei den FL-Monolayerzellen (s. Ergebnisse, III.3.1.1.), das heißt der Anteil an G1-Phase-Zellen nahm gegenüber den Kontrollen deutlich ab, während sich der Anteil an S-Phase-Zellen erhöhte. Auch hier waren die niedrigeren Konzentrationen ohne signifikanten Einfluß auf die Zellzyklusverteilung.

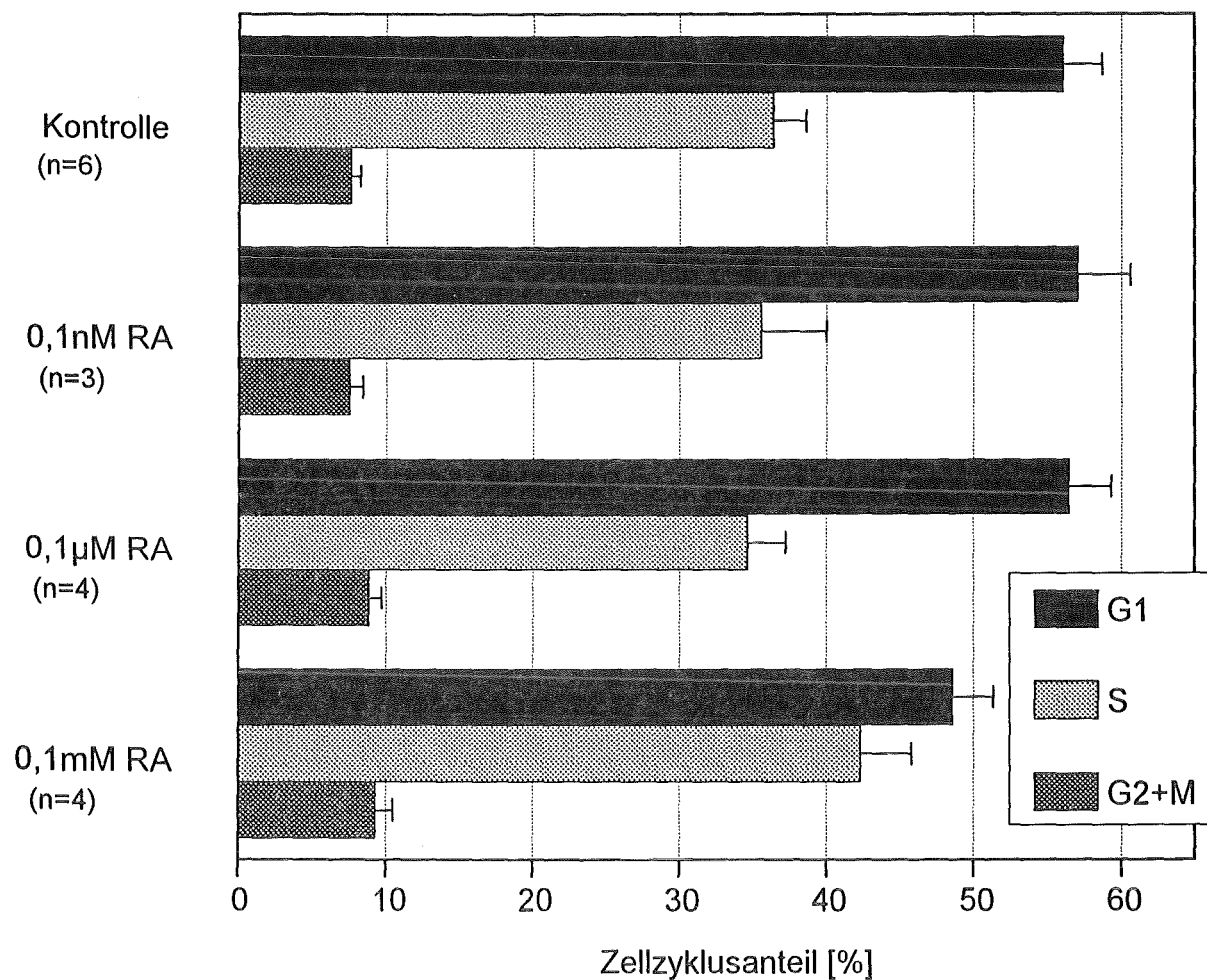


Abb. 32: Zellzyklusverteilung in SV40-3T3-Monolayerzellen nach 24 Stunden Retinsäureinkubation. (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.3.1.2.)

III.3.2. Zellzyklusverteilung in Sphäroidzellen

Bei Sphäroiden erfolgte die Untersuchung der Zellzyklusverteilung nach fraktionierter Trypsinierung (s. Material und Methoden, II.2.3.). Bei FL-Sphäroiden wurden 7 Fraktionen gewonnen, bei Sphäroiden der SV40-3T3-Zelllinie waren es jeweils 6 Fraktionen, da diese Sphäroide etwas kleiner waren und im Innern weniger Zellen enthalten (Anderer, 1992). Jede Fraktion wurde einzeln durchflußzytometrisch untersucht. Dadurch wurden Veränderungen des Zellzyklus nach Zugabe von Retinsäure auch nach der Position der Zellen im Sphäroid aufgelöst.

III.3.2.1. FL-Sphäroidzellen

Die Inkubation mit 0,1 nM Retinsäure für 24 Stunden zeigte bei den FL-Sphäroidzellen weder in den Prozentzahlen noch in den Gradienten einen detektierbaren Effekt in der Zellzyklusverteilung.

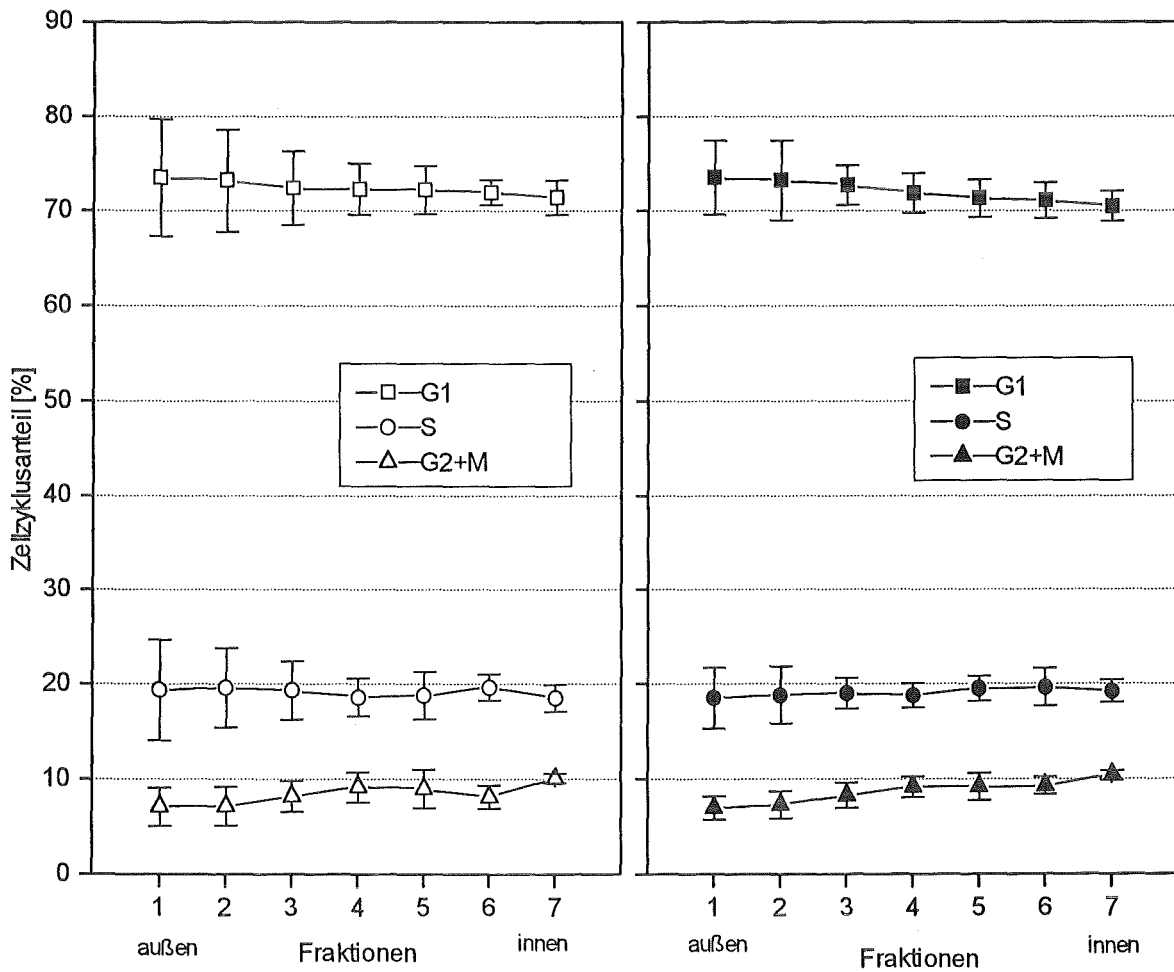


Abb. 33: Zellzyklusverteilung in FL-Sphäroidzellen; links ist die Kontrolle gezeigt, rechts die Verteilung nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 nM Retinsäure (n=3). (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.3.2.1.)

Die Inkubation mit 0,1 μM Retinsäure für 24 Stunden zeigte eine leichte Abflachung des G1-Phase-Gradienten gegenüber der Kontrolle. Die S-Phase-Anteile waren in den entsprechenden Bereichen erhöht. Die jeweiligen Veränderungen waren über alle Fraktionen, also von außen bis innen zu beobachten.

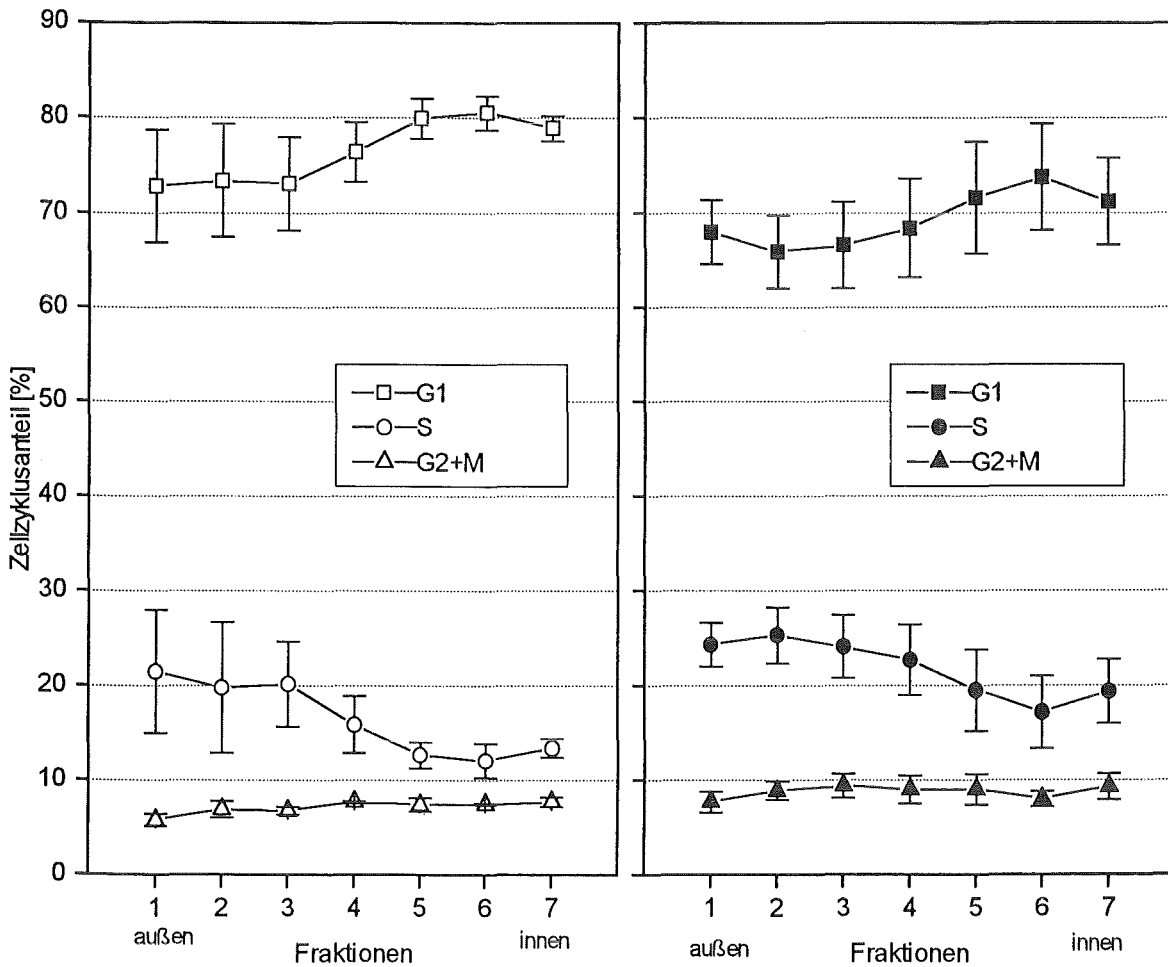


Abb. 34: Zellzyklusverteilung in FL-Sphäroidzellen; links ist die Kontrolle gezeigt, rechts die Verteilung nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 μM Retinsäure (n=3). (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.3.2.1.)

24-stündige Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure führte bei den FL-Sphäroidzellen zu einer deutlichen Anhebung der S- und der G2-Phase, der Anteil an Zellen in der G1-Phase war erniedrigt. Die Erhöhung an S-Phase-Zellen und die Reduktion der G1-Phase-Zellen war in den inneren Sphäroidschichten besonders ausgeprägt, während die Erhöhung der G2-Phase besonders in den äußeren Schichten zu messen war.

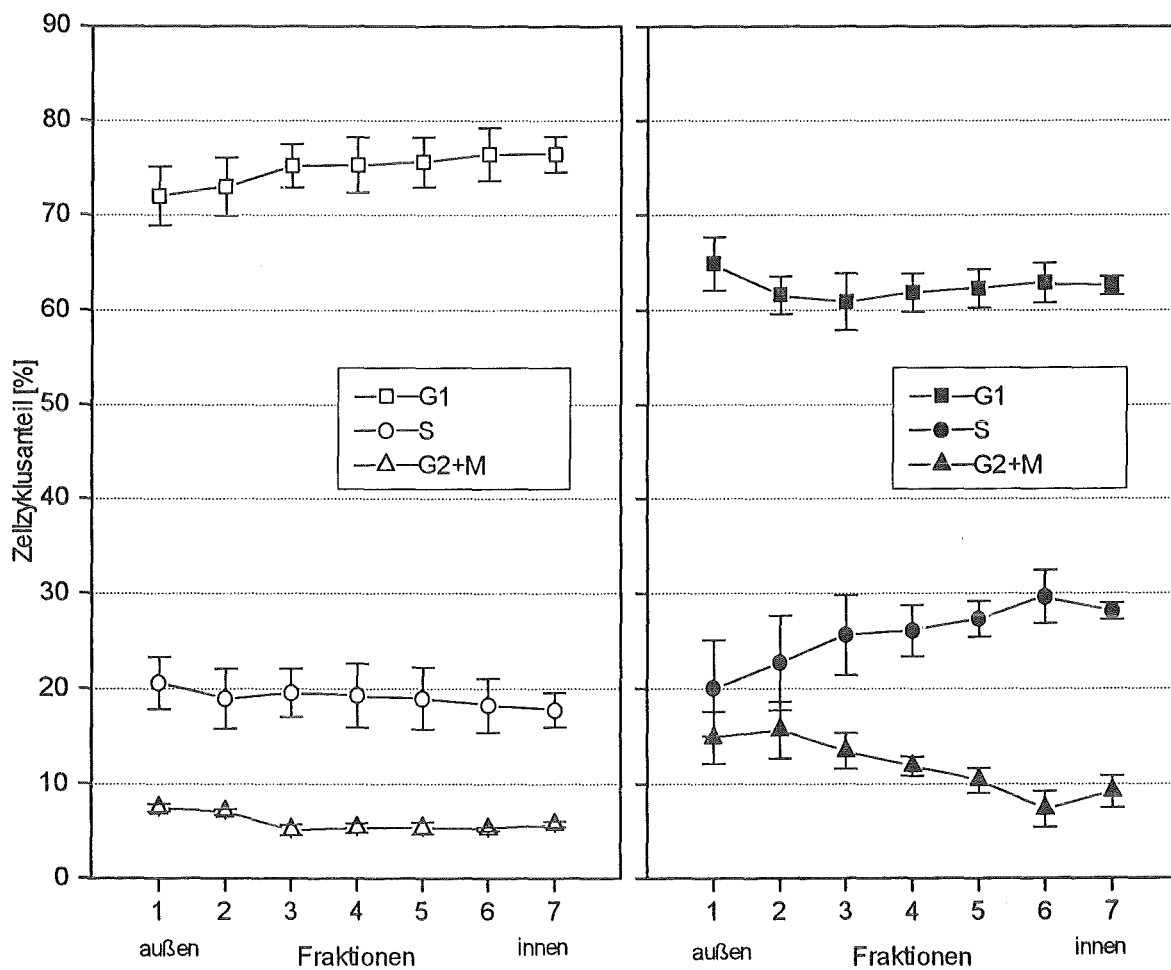


Abb. 35: Zellzyklusverteilung in FL-Sphäroidzellen; links ist die Kontrolle gezeigt, rechts die Verteilung nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure (n=3). (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.3.2.1.)

III.3.2.2. SV40-3T3-Sphäroidzellen

Die Inkubation mit 0,1 nM Retinsäure für 24 Stunden führte zu einer Abflachung des G1-Phase- und des S-Phase Gradienten in SV40-3T3-Sphäroidzellen.

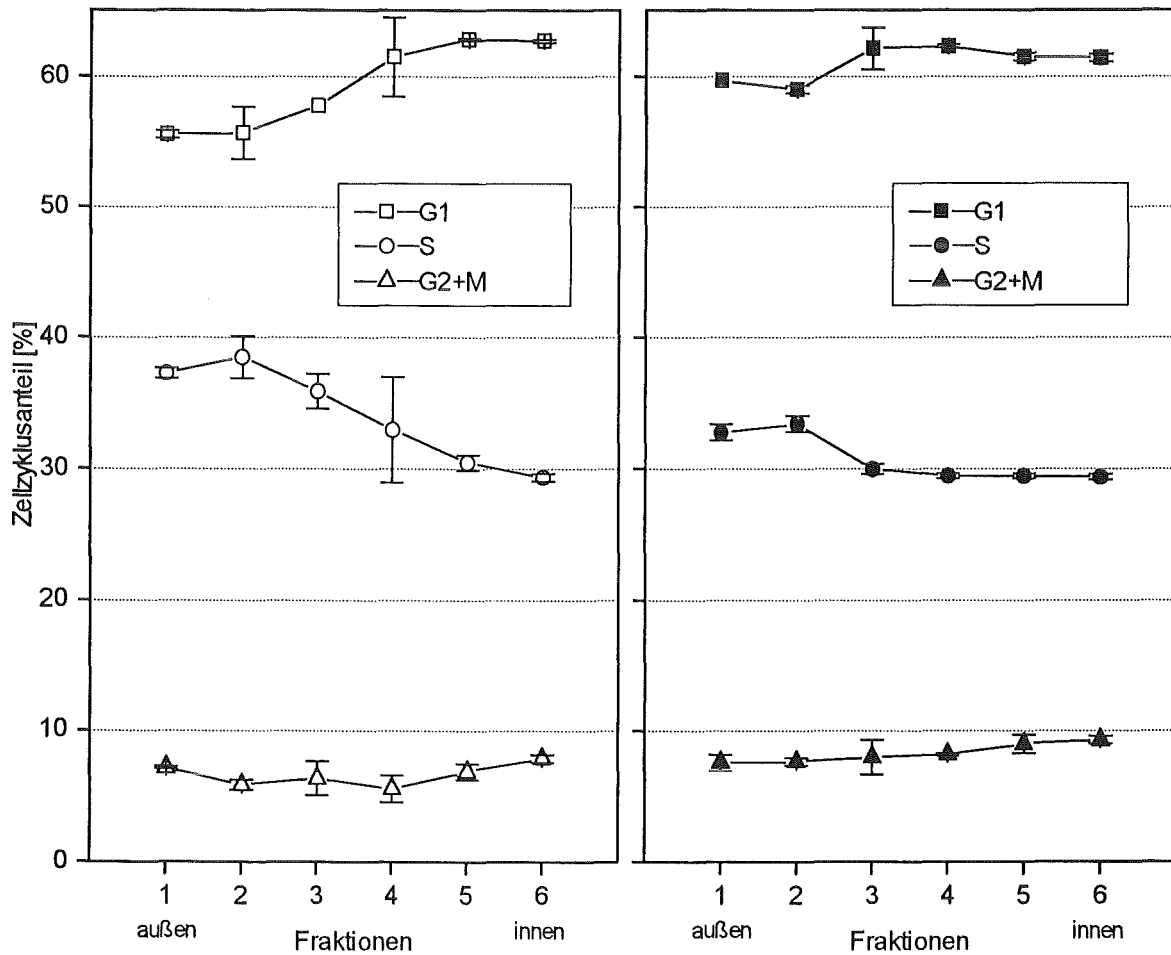


Abb. 36: Zellzyklusverteilung in SV40-3T3-Sphäroidzellen; links ist die Kontrolle gezeigt, rechts die Verteilung nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 nM Retinsäure (n=3). (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.3.2.2.)

Inkubation mit 0,1 μM Retinsäure für 24 Stunden führte zu einer leichten Abflachung des G1-Phase-Gradienten. Die S-Phase-Anteile zeigten sich nicht signifikant verändert.

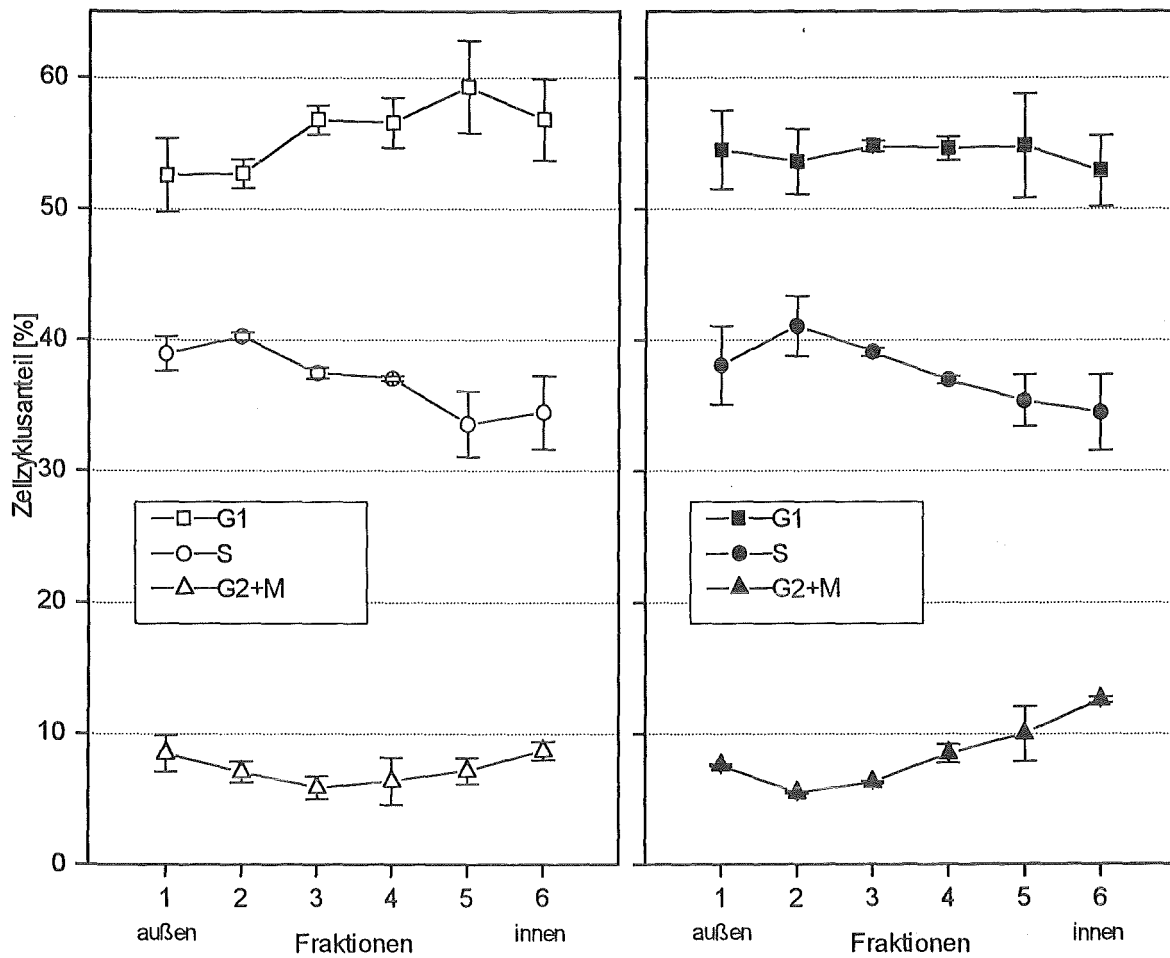


Abb. 37: Zellzyklusverteilung in SV40-3T3-Sphäroidzellen; links ist die Kontrolle gezeigt, rechts die Verteilung nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 μM Retinsäure (n=3). (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.3.2.2.)

Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure für 24 Stunden führte zu einer deutlichen Ausprägung von G1- und S-Phase-Gradienten gegenüber den Kontrollen, die G2-Phase-Anteile waren generell erhöht.

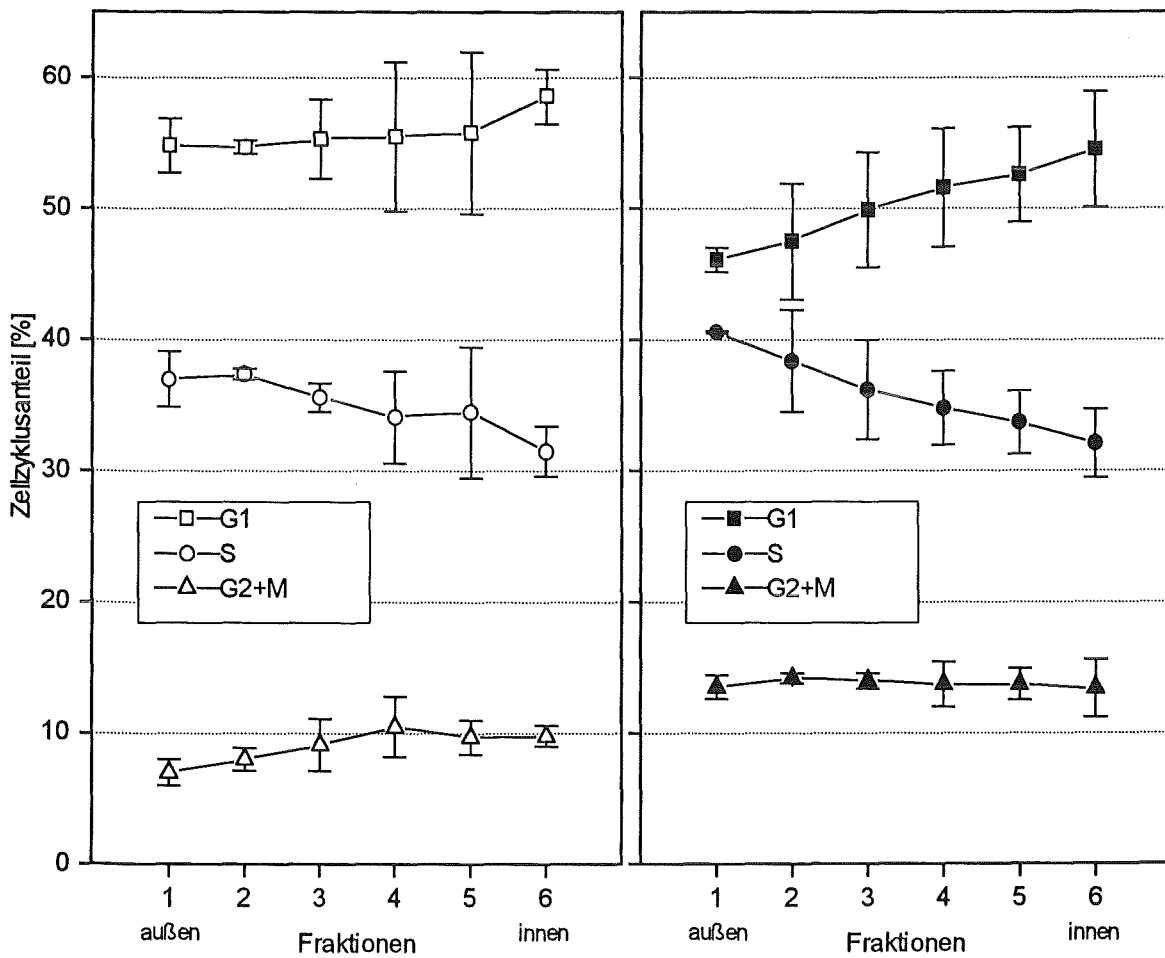


Abb. 38: Zellzyklusverteilung in SV40-3T3-Sphäroidzellen; links ist die Kontrolle gezeigt, rechts die Verteilung nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure (n=3). (Tabelle der Originalwerte s. Anhang, VI.3.2.2.)

III.4. DNA-Synthese

Die Bestimmung der Zellzyklusverteilung mit Hilfe der Durchflußzytometrie zeigt eine "Momentaufnahme" des jeweiligen Zustandes der untersuchten Zellen. Ob Zellen, welche sich nach dieser Meßmethode in der S-Phase befinden, auch tatsächlich DNA synthetisieren oder nur in dieser Phase arretiert sind, ist nur durch Überprüfung des Einbaus von Material in die DNA der Zellen zu messen. Dies kann entweder mit radioaktiv markierten Thymidinen oder mit antikörpermarkierbarem Brom-desoxy-Uridin (BrdU, s. Material und Methoden, II.5.) erfolgen, welche beide nach dem Einbau in die DNA gemessen werden können. In dieser Arbeit wurde mit der BrdU-Methode gearbeitet.

III.4.2. DNA-Synthese in Sphäroidzellen

III.4.2.1. FL-Sphäroidzellen

Nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure fand sich ein erhöhter BrdU-Einbau in den inneren Lagen der FL-Sphäroide. Die durchflußzytometrischen Untersuchungen zeigten hier einen Anstieg der S-Phase (Abb. 35).

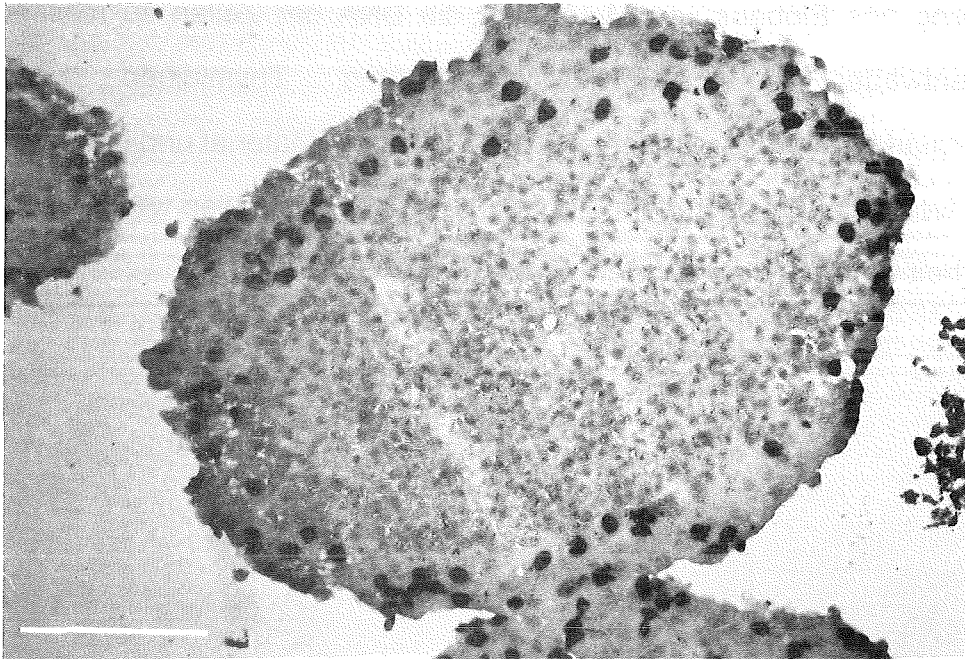


Abb. 39: BrdU-Einbau in FL-Sphäroiden (Kontrolle). Der Balken entspricht 100 μm .

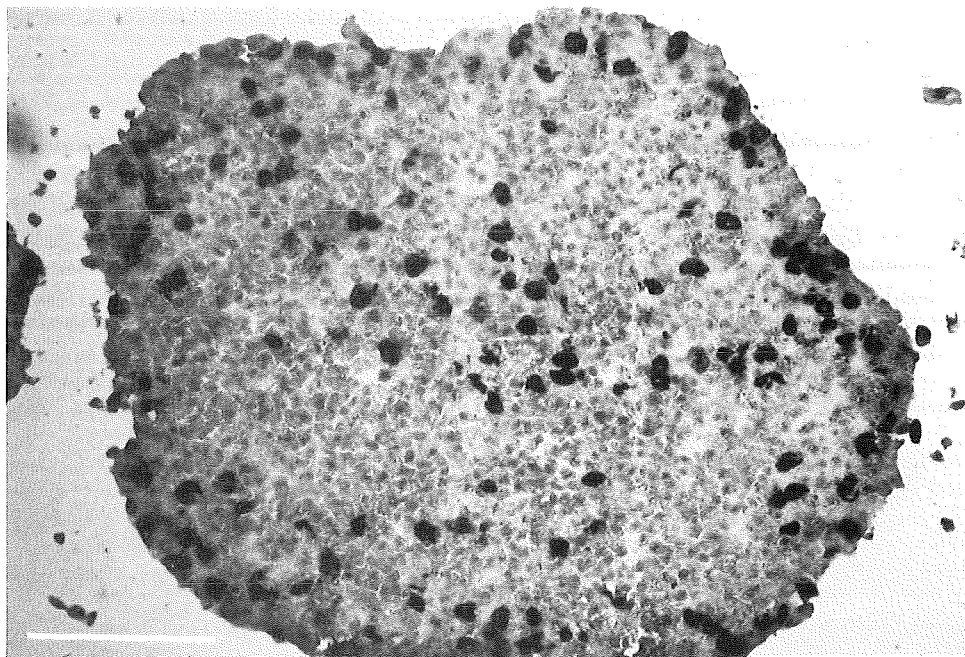


Abb. 40: BrdU-Einbau in FL-Sphäroiden nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure. Der Balken entspricht 100 μm .

III.4.2.2. SV40-3T3-Sphäroidzellen

Nach 24 Stunden führten höhere Retinsäurekonzentrationen zu generell verstärktem BrdU-Einbau. 0,1 mM Retinsäure erhöhte bei den durchflußzytometrischen Messungen die S-Phase in den äußeren Lagen (Abb. 38). Nach Inkubation mit dieser Konzentration war allerdings kein BrdU-Einbau mehr zu beobachten.

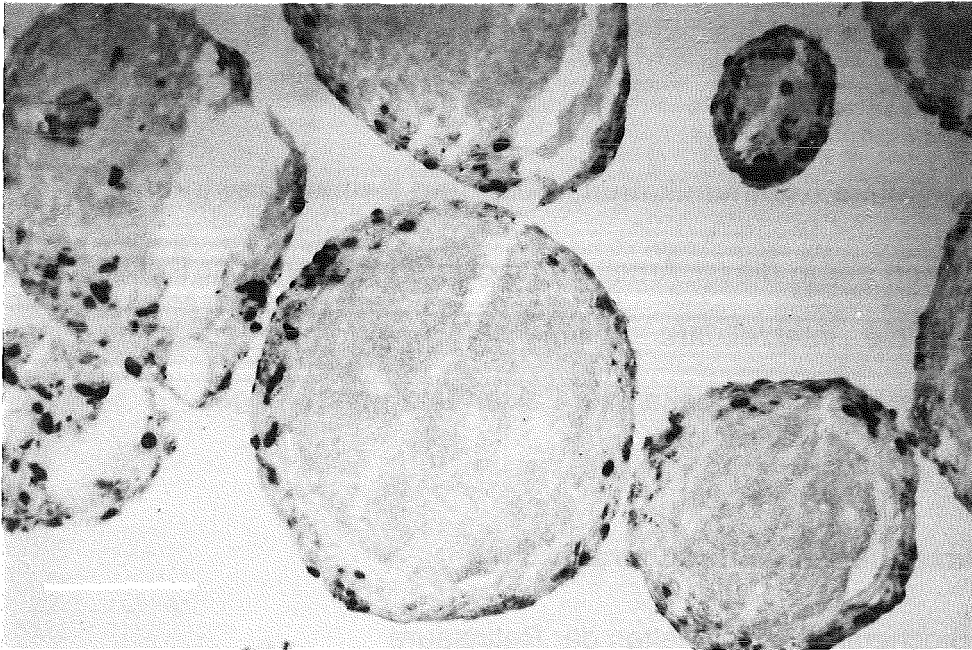


Abb. 41: BrdU-Einbau in SV40-3T3-Sphäroiden (Kontrolle). Der Balken entspricht 100 μm .

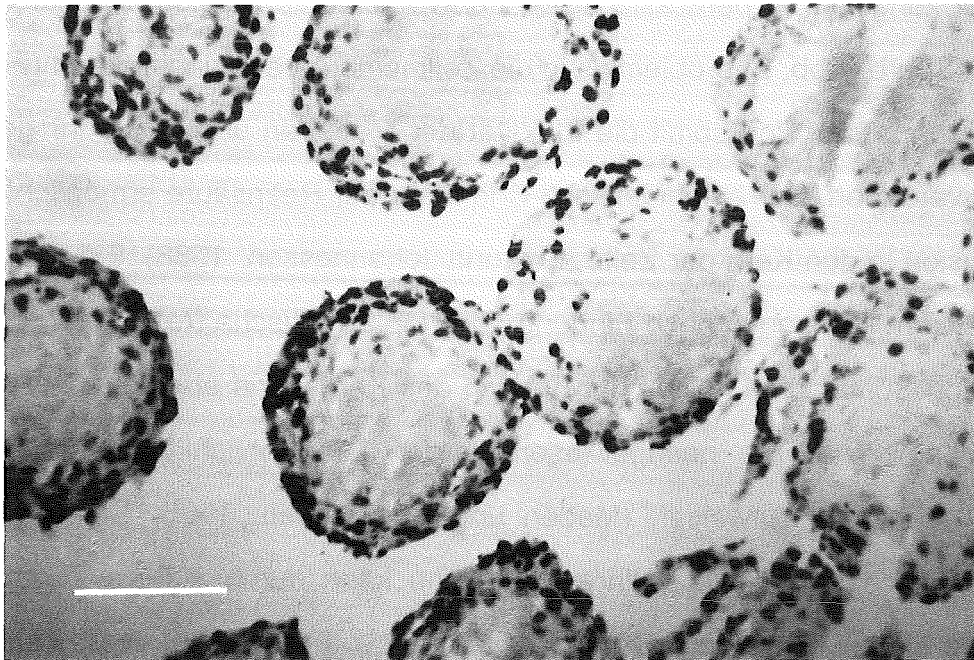


Abb. 42: BrdU-Einbau in SV40-3T3-Sphäroiden nach 24 Stunden Inkubation mit 1 μM Retinsäure. Der Balken entspricht 100 μm .

IV. Diskussion

Um die verschiedenen Aspekte dieser Arbeit in überschaubarer Weise darzustellen, gliedert sich diese Diskussion in drei Teile. Beginnend mit dem Komplex "Interzelluläre Kommunikation, cAMP und Retinsäurewirkung" wird im zweiten Teil auf dessen Auswirkungen auf die Zellproliferation eingegangen. Abschließend wird die klinische Bedeutung dieser Ergebnisse erläutert.

IV.1. Interzelluläre Kommunikation, cAMP und Retinsäurewirkung

Die Diskussion der in dieser Arbeit beobachteten Wirkung der Retinsäure auf das cAMP und die interzelluläre Kommunikation erfordert zunächst eine kurze Zusammenfassung bereits bekannter Fakten und Vorstellungen.

IV.1.1. Kurzaufsatz relevanter Literaturdaten

IV.1.1.1. Biochemisches Verhalten der Retinsäure

Hierbei ist zunächst zu berücksichtigen, daß ein amphipatisches Molekül wie die Vitamin A-Säure (Abb. 2) problemlos in die Zellmembran eindringen kann (Fex und Johannesson, 1988) und somit die Fluidität der Membran und der in ihr gelösten Moleküle verändert. Der amphipatische Charakter der Retinsäure ermöglicht ferner eine Diffusion in den Kern der Zelle (Fex und Johannesson, 1988). Ein Eindringen in den Zellkern kann auch nach Bindung an zytoplasmatische Rezeptoren erfolgen (Maden und Summerbell, 1986). Im Bereich des Kerns sind ebenfalls Rezeptoren für die Vitamin A-Säure nachgewiesen worden, die Ähnlichkeiten mit Steroidhormon-Rezeptoren aufweisen (Maden und Summerbell, 1986; Giguere et al., 1987; Petkovich et al., 1987). Ihre Produktion kann durch äußere Zugabe von Retinsäure stimuliert werden (Durand et al., 1992). Ferner beeinflusst Retinsäure die Proteinbiosynthese; ein erhöhtes Auftreten von Proteinen nach Retinsäureinkubation ist beobachtet worden (Niles und Loewy, 1989).

Im Zusammenhang mit der in dieser Arbeit beobachteten Wirkung der Retinsäure auf den cAMP-Gehalt der Zellen ist das Verhalten der cAMP-abhängigen Proteinkinasen wichtig. Ihre Aktivität wird durch Bindung an die Zellmembran beeinflusst (Plet et al., 1982). Retinsäure führt zu einer Steigerung ihrer Aktivität (Anderson et al., 1985). Plet und Mitarbeiter (1982 und 1986) fanden nach Inkubation mit 10 nM und 0,1 μ M Retinsäure eine Vermehrung der cAMP-abhängigen Proteinkinasen in Zellmembranen verschiedener Zelllinien.

IV.1.1.2. Interzelluläre Kommunikation und cAMP

Die Gap Junction-Permeabilität ist mit dem cAMP-Gehalt der Zelle verknüpft (Azarnia et al., 1981; Flagg-Newton und Loewenstein, 1981; Flagg-Newton et al., 1981; Loewenstein, 1985), wobei die Zunahme des intrazellulären cAMP-Gehalts eine erhöhte Gap Junction-Permeabilität bewirkt. Dies kann auch durch äußere Zugabe von cAMP erreicht werden. Hierbei wird eine erhöhte Phosphorylierung von Gap Junction-Proteinen diskutiert, was zur Öffnung des transmembranen Kanals führt. Außerdem wird der Abbau der Kanäle reduziert und so die Lebensdauer von intakten Kanälen erhöht.

Unterschiedliche Empfindlichkeiten von Zellen in Kultur bei Retinsäureinkubation hinsichtlich ihrer Zell-Zell-Kommunikation sind bekannt (Brümmer et al., 1991), besonders auch beim Vergleich von transformierten und nicht-transformierten Formen (Mehta und Loewenstein, 1991).

IV.1.2. Beobachtete Wirkungen der Retinsäure auf das cAMP und die interzelluläre Kommunikation in Monolayern

IV.1.2.1. Einfluß der Retinsäure auf den intrazellulären cAMP-Gehalt

Bei Monolayern beider Zelllinien wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme des cAMP-Gehaltes nach 24 Stunden Inkubation mit Retinsäure gefunden (Abb. 20

und Abb. 22). Bei 30-minütiger Behandlung war dies nicht der Fall (Abb. 19 und Abb. 21). Hier war insbesondere bei der höchsten Retinsäurekonzentration (0,1 mM) eine Tendenz zur cAMP-Erhöhung erkennbar, die bei den SV40-3T3-Zellen (Abb. 21) sogar zu einer Steigerung auf fast 140 % des Kontrollwertes führte. Zur Erklärung dieses cAMP-Verhaltens muß von zwei überlagerten, gegenläufigen Effekten der Retinsäure ausgegangen werden: Einem cAMP-stimulatorisch wirkenden Kurzzeiteffekt und einem cAMP-reduzierenden Langzeiteffekt.

Kurzzeitige Veränderungen des zellulären cAMP-Spiegels resultieren aus der Aktivierung von zellulären Signalketten und vollziehen sich innerhalb von Sekunden oder Minuten (Breer, 1992). Es ist deshalb wahrscheinlich, daß eine Retinsäure-induzierte Anhebung des cAMPs selbst bei der kurzen Expositionszeit (30 Minuten) schon vor der cAMP-Isolation (s. Material und Methoden, II.7.1.) stattgefunden hat, also bereits wieder rückläufig ist. Dies würde erklären, warum nur bei der höchsten Retinsäurekonzentration eine Chance zur Detektion des cAMP-Anstieges besteht.

Der längerfristig beobachtete cAMP-Abfall unter den Kontrollwert könnte neben dem Phosphodiesterase-Abbau auf die Retinsäure-induzierte Vermehrung von cAMP-abhängigen Proteinkinasen in der Membran und die dadurch bedingten Phosphorylierungsprozesse zurückgehen (s. oben). Vorstellbar ist ein hierdurch ausgelöster lokaler Abfall der ATP-Konzentration, durch den die cAMP-Synthese durch das ebenfalls membranständige und ATP-verbrauchende Enzym Adenylatcyclase in seiner Aktivität eingeschränkt wird. Eine zusätzliche Hemmwirkung auf dieses Enzym könnte dabei, insbesondere bei höheren Konzentrationen, von der durch die Retinsäure veränderten Fluidität der Membran ausgehen.

IV.1.2.2. Kopplungsstimulation durch geringe Retinsäurekonzentrationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen keinen Zusammenhang zwischen der Stimulation der interzellulären Kommunikation durch niedrige Retinsäure-

konzentrationen ($<0,1$ mM) und einer cAMP-Erhöhung in der unter IV.1.1.2. diskutierten Weise erkennen. Dies gilt für beide Zelllinien und betrifft sowohl die 0,5 Stunden und die 24 Stunden Retinsäurebehandlung (Abb. 10, Abb. 12, Abb. 15, Abb. 17, Abb. 19, Abb. 20 und Abb. 22).

Trotz dieses Befundes kann keineswegs ausgeschlossen werden, daß im Bereich sehr kurzer Expositionszeiten, deren systematische Untersuchung nicht Gegenstand dieser Arbeit war, cAMP-abhängige Prozesse zu der Kopplungsverstärkung beitragen. Tatsächlich muß eine Wirkung des cAMPs auf die interzelluläre Kommunikation in Betracht gezogen werden, obwohl die Erhöhung des cAMPs, wie in IV.1.2.1. diskutiert, nur so kurzzeitig besteht, daß sie bei geringen Retinsäurekonzentrationen unter den experimentellen Bedingungen der Arbeit kaum nachweisbar ist.

Selbst eine transiente Erhöhung des cAMP-Gehaltes bewirkt eine Phosphorylierung verschiedener Proteine, unter anderem auch der Gap Junction-Proteine, was nach IV.1.1.2. zu einer erhöhten Permeabilität der Kanäle führt. Connexin 32, das Gap Junction-Protein der Leber, wird durch die cAMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert (Saez et al., 1990), deren Aktivität außerdem durch Retinsäure angehoben werden kann (s. Diskussion, IV.1.1.1.). Dies könnte nach dem in IV.1.1.2. Gesagten außerdem zu einer Verlängerung der biologischen Halbwertszeit der Kanalproteine führen und damit zu mehr intakten und durchlässigen Kanälen. Interessanterweise bewirkt äußerliches Auftragen der Säure in der medizinischen Anwendung ein vermehrtes Auftreten von Gap Junctions im elektronenmikroskopischen Präparat (Elias et al., 1980).

Demnach ist es trotz des diesbezüglich negativen Ergebnisses dieser Arbeit wahrscheinlich, daß initiale cAMP-abhängige Prozesse an der Kopplungserhöhung durch geringe Retinsäurekonzentrationen beteiligt sind.

IV.1.2.3. Inhibierung der Kopplung durch 0,1 mM Retinsäure

Die in dieser Arbeit beobachtete Inhibierung der interzellulären Kommunikation durch Gap Junctions bei einer Behandlung mit 0,1 mM Retinsäure (Abb. 10, Abb. 12, Abb. 15 und Abb. 16) wurde auch bei anderen Zellen beschrieben, wird jedoch in der Literatur unterschiedlich diskutiert. Pitts und Mitarbeiter (1981 und 1986) sprechen nach Messungen des Übertritts von ^3H -markierten Nukleotiden und eines fluoreszierenden Farbstoffs von einem tatsächlichen Verschuß der Proteinkanäle. Weitere Messungen mit anderen Methoden haben zu der Vermutung geführt, daß kein absoluter Verschuß der Poren vorliegt: Durch metabolische Kopplung von radioaktiv markiertem Material (^3H -Hypoxanthin; Wälder und Lützelshwab, 1984), welches noch durch die Kanäle diffundieren konnte, und mit Messungen der elektrischen Kopplung (Brümmer, 1988; Stein, 1989; Brümmer et al., 1991) durch Einspeisung eines elektrischen Stromsignals in eine Zelle sowie Quantifizierung seines Überganges in benachbarten Zellen konnte jeweils noch eine leitfähige Verbindung zu diesen aufgezeigt werden. Es handelte sich in diesen Fällen also lediglich um eine reduzierte Permeabilität der Poren.

Eine Abnahme der Anzahl der Kanäle als Erklärung für die verminderte Zell-Zell-Kommunikation erscheint ebenfalls nicht zulässig, da nach Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure unter dem Elektronenmikroskop kein Unterschied in Anzahl und Größe der Gap Junction-Plaques gegenüber den Kontrollen zu beobachten ist (Pitts et al., 1986). Auch die hohe Geschwindigkeit der Inhibierung bereits nach 30-minütiger Behandlung (Abb. 10 und Abb. 15) spricht gegen eine Abnahme der Porenzahl.

Als wahrscheinlichste Erklärung für die Entkopplung kommt die in IV.1.1.1. diskutierte Erhöhung der Membranfluidität durch die Retinsäure in Frage. Hierdurch könnte ein Auseinanderdriften der Gap Junction-Proteine und damit eine Instabilität der Kanalpermeabilität bewirkt werden. Ein solcher Mechanismus wird auch für die Wirkung von Arachidonsäure auf die elektrische Leitfähigkeit von Gap Junctions diskutiert (Giaume et al., 1989). Arachidonsäure ist eine vierfach

ungesättigte Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen, also ähnlich membrangängig wie die Retinsäure.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Inhibierung der interzellulären Kommunikation könnte im Prinzip auch in der Abnahme des intrazellulären cAMP-Gehalts nach 24 Stunden Inkubation der Zellen mit 0,1 mM Retinsäure liegen. Diese wurde gleichermaßen in Monolayern (Abb. 20 und Abb. 22) und in Sphäroiden (Abb. 25 und Abb. 28) beobachtet. Ein Zusammenhang zwischen cAMP und Kopplung wird jedoch nur in bezug auf eine Stimulation diskutiert (s. oben). Ob auch umgekehrt eine cAMP-Verringerung eine Inhibierung der Kopplung bewirkt, ist bis jetzt nicht ausreichend untersucht, so daß eine diesbezügliche Interpretation der Ergebnisse im Augenblick hypothetisch bleiben muß.

IV.1.3. cAMP und interzelluläre Kommunikation in Sphäroiden

IV.1.3.1. Interzelluläre Kommunikation

Messungen des Farbstoffaustausches in Sphäroiden sind wegen mangelhafter visueller Kontrolle mit hohen Unsicherheiten behaftet. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Kommunikationsgrad der Zellen im Monolayer bestimmt. Da nach Hülser und Brümmer (1982) die interzelluläre Kommunikation in den äußeren Sphäroidschichten mit derjenigen im Monolayer vergleichbar ist, können die Monolayerergebnisse mit guter Näherung auch auf die Sphäroide übertragen werden.

IV.1.3.2. Verhalten des intrazellulären cAMPs

Für Sphäroide wurden Messungen des cAMP-Gehaltes sowie auch der Zellproliferation nur nach 24 Stunden Retinsäurebehandlung durchgeführt. Gegenüber dem Monolayer (s. Diskussion, IV.1.2.1.) ergab sich bei den Sphäroiden ein komplexeres Bild des cAMP-Verhaltens. Hier wirkten sich Veränderungen der Kopplung, das heißt der Permeabilität der Gap Junction-

Kanäle, bei beiden Zelllinien auf die Steilheit des radialen cAMP-Gradienten und auch auf den Proliferationsgradienten aus (s. Diskussion, IV.2.): Eine Erhöhung der interzellulären Kommunikation führte qualitativ zu einem Ausgleich der cAMP-Konzentration, das heißt der radiale Konzentrationsgradient flachte ab. Umgekehrt bewirkte eine Inhibierung der Kommunikation, daß die Gradienten steiler wurden. Im einzelnen ergibt sich für die Sphäroide der beiden Zelllinien folgende Aussage:

FL-Sphäroide

Bei FL-Zellen führte die Inkubation mit 0,1 nM Retinsäure für 24 Stunden zu einer leichten Abnahme der interzellulären Kommunikation (Abb. 12). Die Steilheit des cAMP-Gradienten im Sphäroid vergrößerte sich dabei nur geringfügig (Abb. 23). Eine deutliche Abflachung war hingegen mit 0,1 μ M Retinsäure zu beobachten (Abb. 24), wo sich die Zellkommunikation um mehr als das Doppelte erhöhte (Abb. 12). Der Abfall der interzellulären Kommunikation nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure auf unter 10 % (Abb. 12) führte "erwartungsgemäß" zu einem erneuten Auftreten des Gradienten im Sphäroid (Abb. 25).

SV40-3T3-Sphäroide

Bei SV40-3T3-Zellen bewirkte Retinsäure in 0,1 nM Konzentration eine Kopplungssteigerung auf etwa 130 % der Kontrollen (Abb. 17), was zu einem gegenüber der Kontrolle stark abgeflachten cAMP-Gradienten im Sphäroid führte (Abb. 26). Der leichte Rückgang der Kopplung auf 120 % bei 0,1 μ M machte diese Abflachung wieder etwas rückgängig (Abb. 27).

Eine Reduktion der interzellulären Kommunikation durch 24 Stunden Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure auf zirka 10 % (Abb. 17) sollte nach diesen Überlegungen im Sphäroid zu einem steileren cAMP-Gradienten führen. Die Untersuchungen zeigten allerdings einen abgeflachten Gradienten (Abb. 28). Dies bedeutet nicht, daß

dieses Konzept hier durchbrochen ist. Vielmehr ist davon auszugehen, daß die höchste verwendete Retinsäurekonzentration bei SV40-3T3-Zellen nicht mehr als physiologisch zu betrachten ist, zumindest was längere Inkubationszeiten betrifft. Hierfür spricht auch die Untersuchung der DNA-Synthese durch den Einbau von BrdU (s. Ergebnisse, III.4.2.). Hier zeigten die SV40-3T3-Sphäroide nach Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure für 24 Stunden keine DNA-Synthese mehr.

IV.2. Zellzyklusverteilung in Monolayern und Sphäroiden

IV.2.1. Monolayer

Signifikante Wirkungen auf den Zellzyklus wurden bei beiden Zelllinien nur nach 24-stündiger Behandlung mit der höchsten Retinsäurekonzentration (0,1 mM) beobachtet (Abb. 29 bis Abb. 32). Es ergab sich eine Zunahme der S-Phase-Zellen zulasten der G1-Phase. Bei 30-minütiger Behandlung mit anschließender 24-stündiger Retinsäure-freier Inkubation war dies nur bei den FL-Zellen zu erkennen. SV40-3T3-Monolayer zeigten eher eine leichte Abnahme der S-Zellen und eine Zunahme des G1-Anteils.

Die Kopplungsmodulationen durch die niederen Retinsäurekonzentrationen wirkten sich im Monolayer somit nicht auf den Zellzyklus aus. Ebenso wenig ließ sich eine Korrelation zwischen cAMP und Zyklusverteilung erkennen.

IV.2.2. Sphäroide

Hier wurde eine Abhängigkeit des Radialverlaufes der Zellzyklusverteilungen von der Retinsäurekonzentration beobachtet. Da sich im Sphäroidsystem Retinsäure-induzierte Veränderungen der Zellkommunikation auf die Steilheit des radialen cAMP-Gradienten auswirken (s. Diskussion, IV.1.3.2.), wird die Diskussion der Zellzyklusverteilungen im wesentlichen unter dem Aspekt geführt, daß diese von der lokalen cAMP-Konzentration abhängig sein könnten (Boynton und Whitfield,

1983). Mit anderen Worten, die in Sphäroiden nach Retinsäurebehandlung beobachteten Auswirkungen auf den Radialverlauf der cAMP-Konzentration sollten sich auch auf das Radialmuster der Phasenverteilung auswirken, woraus sich eine indirekte Abhängigkeit von der Stärke der interzellulären Kommunikation ergeben könnte. Im folgenden wird gezeigt, daß dies durch die Ergebnisse mit SV40-3T3-Sphäroiden, vor allem in bezug auf die Zyklusphasen G1 und S, tendenziell gestützt wird. Bei den FL-Sphäroiden wird dies durch andere Effekte überdeckt.

IV.2.2.1. FL-Sphäroide

Hier ist zunächst auffällig, daß es in den Kontrollen keine ausgeprägte Radialabhängigkeit der Zyklusphasenverteilung gab. Unter diesen Umständen erscheint es plausibel, daß Retinsäure-induzierte Kopplungsverstärkungen beziehungsweise Abflachungen des cAMP-Gradienten keine analogen Änderungen in den Zyklusgradienten gegenüber den Kontrollen bewirken können, was bei der 0,1 nM und 0,1 µM Retinsäurekonzentration im wesentlichen der Beobachtung entsprach (Abb. 33 und Abb. 34). Im letzteren Fall deutete sich jedoch (im Gegensatz zum Monolayer) eine generelle Abnahme der G1-Zellen und eine Zunahme der S-Zellen an.

Besonders interessant sind die Verhältnisse bei 0,1 mM Retinsäurekonzentration (Abb. 35). Hier ergab sich der ungewöhnliche Befund, daß die inneren Sphäroidschichten prozentual mehr S-Zellen besaßen, als die äußeren Schichten. Auch die G2-Zellen zeigten einen charakteristischen Verlauf; ihr Anteil war in den äußeren Schichten gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht, nahm jedoch nach innen ab. Die G1-Zellen lagen weitgehend positionsunabhängig bei knapp über 60 %.

Diese "Momentaufnahme" des proliferationskinetischen Radialmusters erlaubt verschiedene Erklärungen. Im folgenden wird gezeigt, daß die relative Zunahme von S-Zellen zur Sphäroidmitte hin durch eine Erhöhung der Zahl aktiv DNA-synthetisierender Zellen gegenüber der Kontrolle zustande kommt.

IV.2.2.2. SV40-3T3-Sphäroide

Ein Vergleich der Abbildungen 26 und 36 zeigt zunächst, daß eine 0,1 nM Konzentration von Retinsäure sowohl den cAMP-Gradient als auch die Gradienten der G1- und S-Phase-Anteile gegenüber den Kontrollen abflachte. Bei 0,1 µM Retinsäure war die Abflachung weniger ausgeprägt (Abb. 27 und Abb. 37), jedoch im Verlauf der G1-Phase noch deutlich erkennbar. Die Anwendung der Retinsäure in 0,1 mM Konzentration führte zu einer Kopplungsinhibierung und in der Folge zur Ausprägung steiler Zyklusgradienten bei der G1- und S-Phase (Abb. 38). Ein derartiger radialer Anstieg der G1-Phase-Anteile bei gleichzeitiger Abnahme der S-Phase-Anteile von außen nach innen ist von nicht-kommunizierenden Zelllinien, wie den L-Zellen bekannt (Anderer, 1992). Daß eine 0,1 mM Retinsäurekonzentration über 24 Stunden möglicherweise leicht zytotoxisch wirkt, wurde bereits bei der Diskussion des cAMP-Gradienten (Abb. 28) erwähnt. Bei dieser Behandlung wurde zugleich ein allgemeiner Anstieg der G2-Zellen gefunden (Abb. 38). Er könnte ein Indiz für eine Arretierung der Zellen in dieser Phase sein und darauf hindeuten, daß die Zykluspassage und insbesondere die DNA-Synthese (wie beobachtet) unter diesen Bedingungen gestört ist.

IV.2.3. BrdU-Einbau in Sphäroide

Kontrollsphäroide beider Zelllinien zeigten DNA-Synthese (BrdU-Einbau) nur in den äußeren Zellen (Abb. 39 und Abb. 41). Beim Vergleich dieses Kriteriums mit den Zyklusphasenverteilungen wird dabei deutlich, daß aus letzteren keine eindeutige Aussage über das Proliferationsverhalten gewonnen werden kann. Insbesondere bei den unbehandelten FL-Sphäroiden (zum Beispiel Abb. 33) war das Phasenverhältnis weitgehend unabhängig von der Position der Zellen im Sphäroid. Ohne weitere Messungen würde man daraus schließen, daß alle Zellen im Sphäroid in gleicher Weise proliferieren, was im Widerspruch zum BrdU-Einbau steht.

Tatsächlich kann aus der Konstanz des Phasenverhältnisses nicht auf eine unveränderte Zellzyklusdauer innerhalb des Sphäroids geschlossen werden. Auch eine Verlangsamung der Zykluspassage mit zunehmender Tiefe im Sphäroid, von der alle Phasen gleichmäßig betroffen sind, läßt die Phasenverteilung der Zellen ungeändert. Hierdurch verringert sich jedoch die DNA-Syntheserate der inneren Zellen, was in Einklang mit einem vorwiegenden BrdU-Einbau in die äußeren Zellen steht. Ein solcher Mechanismus, bei dem der Rückgang der Proliferationsaktivität im Innern der Sphäroide das Phasenverhältnis ungeändert läßt, wurde auch von Anderer (1992) beobachtet. Ein Proliferationsstop bei den inneren Zellen ist demnach nicht notwendigerweise durch eine Verlängerung der G1-Phase und folglich durch die selektive Akkumulation von Zellen in dieser Phase bedingt, wie es sich bei unbehandelten SV40-3T3-Sphäroiden andeutete (zum Beispiel Abb. 36). Es muß vielmehr gefolgert werden, daß proliferationsinhibierte Sphäroidzellen bestimmter Linien in allen Zyklusphasen arretiert werden können.

Nach Behandlung von FL-Sphäroiden mit 0,1 mM Retinsäure erfolgte ein erheblicher BrdU-Einbau in die inneren Zellen (Abb. 40). Das bedeutet, daß ein Teil der in der S-Phase arretierten Zellen ihre DNA-Synthese wieder aufnahmen (Abb. 35). Dies würde jedoch nicht unmittelbar zu einer Erhöhung des S-Zellen-Anteils führen. Aus Abbildung 35 kann indessen insgesamt auf eine Aktivierung des Zellzyklus geschlossen werden: Zunächst nahm die Zahl der G2-Zellen gegenüber den teilungsaktiven äußeren Zellen ab, ein Indiz für einen beschleunigten Durchgang durch diese Phase. Aus der Tatsache, daß es dabei nicht zu einer Erhöhung der G1-Population kam, läßt sich folgern, daß zugleich G1-Zellen in die S-Phase übertraten und so den beobachteten Zellanteil in dieser Phase erhöhten.

In den SV40-3T3-Sphäroiden fand nach Behandlung mit 0,1 mM Retinsäure kein BrdU-Einbau mehr statt (s. oben). Diese Sphäroide waren empfindlicher gegenüber der Retinsäure, als diejenigen der Zelllinie FL. Die statt dessen durchgeführten BrdU-Einbautests bei 1 µM Retinsäurekonzentration führten gegenüber den

Kontrollen zu einer Verbreiterung der äußeren Einbauzone (Abb. 41 und Abb. 42). DNA-Synthese in den inneren Zellen deutete sich nur bei kleinen Sphäroiden an. Tendenziell zeigten damit auch die SV40-3T3-Sphäroide nach Behandlung mit hohen Retinsäurekonzentrationen eine Aktivierung der Proliferation in den inneren Bereichen.

Die Stimulation der DNA-Synthese führt wahrscheinlich nicht zu einem länger andauernden "Proliferationsschub". Zellzählungen ergaben keine Anhaltspunkte für eine Erhöhung der Zellnachkommenschaft gegenüber den Kontrollen. Es war eher ein geringer Abfall der Zellzahl zu verzeichnen, wahrscheinlich bedingt durch eine leichte Zytotoxizität der 0,1 mM Retinsäure (vor allem bei den SV40-3T3-Zellen).

IV.3. Retinsäure-induzierte Veränderungen der Zellkommunikation und der Proliferation in Sphäroiden: Mögliche klinische Bedeutung

Die Inhibierung der interzellulären Kommunikation wird allgemein als Indiz für die tumorpromovierende Wirkung eines Agens angesehen (Enomoto et al., 1981). In Anwendung dieses Prinzips verhält sich Retinsäure in hoher Konzentration (hier 0,1 mM) als Tumorpromoter. Die Konsequenzen lassen sich im Sphäroidsystem erkennen. Durch den Wegfall der homöostatisch wirkenden Gap Junctions (in dieser Arbeit in bezug auf die Kontrolle des radialen cAMP-Konzentrationsprofils und die Regulation des radialen Proliferationsmusters) verhalten sich die Sphäroidzellen bezüglich ihres Proliferationsverhaltens wie isolierte Zellen, das heißt ähnlich wie Monolayer. Dieses "entdifferenzierte" Verhalten kommt besonders deutlich bei den FL-Sphäroiden zum Ausdruck: Die inneren Zellen bauten nach Retinsäurebehandlung BrdU ein und verhielten sich damit ähnlich wie Monolayer. Ferner stimmten die über die inneren und äußeren Zellen gemittelten Phasenverteilungen nach 0,1 mM Retinsäureinkubation (Abb. 35) exakt mit den Werten der ähnlich behandelten Monolayer überein (Abb. 30), was nicht für die Kontrollen oder die mit niedrigeren Retinsäurekonzentrationen behandelten Kulturen zutrif.

In jüngerer Zeit wird jedoch der Vitamin A-Säure eine antagonistische Wirkung gegenüber Tumorpromotoren zugesprochen (Verma und Boutwell, 1977; Verma et al., 1978; Rustin und Eccles, 1985). Offensichtlich spielt hier die verwendete Konzentration eine entscheidende Rolle. Bei der vorliegenden Arbeit sprechen eher die Ergebnisse mit kleinen Retinsäurekonzentrationen (0,1 μM) für eine solche Wirkung. Hierbei kam es in beiden Zelllinien zu einer Steigerung der interzellulären Kommunikation. Die Konsequenzen für die Proliferation waren im Sphäroidsystem an einer Änderung des Radialprofils der Zyklusverteilung erkennbar. In keinem Fall wurde dabei das "natürliche" Proliferationsprofil der Sphäroide gestört, das heißt die Zyklushemmung der inneren Zellen blieb stets gewahrt.

Die medizinische Anwendung von Vitamin A-Derivaten bei der Krebsprävention (Moon und Itri, 1984; Orfanos et al., 1985) dürfte unter anderem auf dieser "antipromovierenden" Wirkung im mittleren und niedrigen Dosisbereich beruhen. Es wird jedoch auch der Einsatz von höher dosierter Retinsäure als Adjuvans bei der Therapie von Krebs erforscht (Jaques et al., 1992), wobei auch der stoffwechselbedingte Abbau eine wichtige Rolle spielt (Westarp et al., 1992 und 1993). Obwohl die therapielevanten Wirkungen noch nicht geklärt sind, dürfte hierbei die in dieser Arbeit beobachtete Retinsäure-induzierte Aktivierung der Zyklusprogression, insbesondere der DNA-Synthese von Bedeutung sein. Ähnlich wie Sphäroide, beherbergen auch solide Tumoren teilungsgehemmte (ruhende) Zellen. Da nur aktiv proliferierende Zellen für Bestrahlungen und die meisten Zytostatika sensibel sind, werden die ruhenden Zellen im allgemeinen nicht zerstört. Gelingt es jedoch, diese wenigstens kurzzeitig zum Beispiel mit hoch dosierter Vitamin A-Säure proliferativ zu stimulieren, so können sie von der Strahlentherapie und dem Zytostatikum abgetötet werden. Erste Studien, in denen solche Kombinationen erforscht werden, sei es die veränderte Strahlenresistenz oder die Sensibilisierung für Zytostatika (Rutz und Little, 1989; Jacobi und Koch, persönliche Mitteilungen, Krefeld 1992; Westarp et al. 1993), zeigen bereits positive Tendenzen, was nach

der vorangegangenen Diskussion nicht überraschend erscheint. Da sich bei vielen Tumoren die überwiegende Zahl der Zellen in einer Ruhephase befindet, ist das therapeutische Potential grundsätzlich als hoch einzustufen.

Schlußfolgerungen

Diese Arbeit hat deutliche Unterschiede zwischen dem Monolayer- und Sphäroidsystem aufgezeigt. Sie ergeben sich hauptsächlich beim Vergleich der Ergebnisse der 24-stündigen Retinsäurebehandlung, für die durchgehende Meßdaten existieren.

Die Unterschiede betreffen im wesentlichen die Auswirkungen der Retinsäure-induzierten Veränderungen der interzellulären Kommunikation, die in den Monolayern beider Zelllinien nicht erkennbar sind, jedoch im Sphäroidsystem sichtbar werden. Hier ergeben sich beispielsweise bei niederen Retinsäurekonzentrationen, die zu einer Erhöhung der interzellulären Kommunikation führen, Abflachungen der radialen cAMP-Gradienten. Diese sind auch im Radialprofil der Zyklusverteilung zu erkennen, jedoch nur dann, wenn das Radialprofil der Kontrollen genügend steil ist, damit sich die Abflachungen auch manifestieren können (SV40-3T3).

Damit erfolgt in Sphäroiden eine konzentrationsabhängige, indirekte Kontrolle der Zellzyklusverteilung über den Gradienten des Gap Junction-permeanten Signalstoffes cAMP.

Die Sphäroiddaten stützen die Hypothese, wonach Retinsäure über eine Permeabilitätsregulation der Gap Junctions die Ausbildung des Verteilungsmusters der Differenzierung (Morphogenese) beeinflußt (s. Einleitung, I.). Die Ergebnisse sprechen aber auch für die bereits in der Einleitung entwickelte Vorstellung, nach der die physiologische Rolle der Gap Junctions im Monolayer trivial ist.

Zum Stichwort "Retinsäure als differenzierendes Agens" erlaubt ihre Wirkung auf die interzelluläre Kommunikation die Folgerung, daß die Säure, je nach Konzentration, sowohl differenzierend als auch entdifferenzierend wirken kann. Eine Interpretation im erstgenannten Sinn ist für die Zunahme der Zellkommunikation bei niedrigen Retinsäurekonzentrationen zutreffend. Eine entdifferenzierende Wirkung muß hingegen für die 0,1 mM Konzentration postuliert werden. Im Sphäroidsystem (FL) führt dies sogar zu einer Aktivierung der DNA-Synthese der

normalerweise teilungsgehemmten inneren Zellen. Natürlich umfaßt die Zelldifferenzierung durch Retinsäure zusätzliche zelluläre und biochemische Prozesse, deren Erforschung nicht Gegenstand dieser Arbeit waren.

V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Retinsäure (Vitamin A-Säure) auf Monolayer und multizelluläre Sphäroide von Mausfibroblasten (SV40-3T3) und menschlichen Amnionzellen (FL) untersucht. Die verwendeten Retinsäurekonzentrationen betragen 0,1 nM, 0,1 μ M und 0,1 mM, die Behandlungszeiten 24 und 0,5 Stunden. Gemessen wurden behandlungsbedingte Änderungen der Gap Junction-vermittelten interzellulären Kommunikation (Farbstoffaustausch), des intrazellulären cAMP-Gehaltes (Radioimmun-Test) und der Zellproliferation (Flußzytometrie, in Sphäroiden auch DNA-Synthese anhand des BrdU-Einbaus). Gefragt waren mögliche Unterschiede in der Reaktion beider Kultursysteme auf die Retinsäureinkubation sowie die Rolle der interzellulären Kommunikation bei der Retinsäurewirkung auf das cAMP- und das Proliferationsverhalten.

0,1 mM Retinsäure inhibierte die Zellkommunikation auf weniger als 20 % der Kontrollen; die niedrigeren Konzentrationen führten, abhängig von der Zelllinie und der Behandlungsdauer, zu einer Erhöhung der interzellulären Kommunikation (Gap Junction-Permeabilität). In Monolayern sank nach 24 Stunden Behandlung der intrazelluläre cAMP-Spiegel mit steigender Retinsäurekonzentration; nach 0,5 Stunden ergaben sich zum Teil gegenläufige Effekte. Die einzige im Monolayer beobachtete signifikante Wirkung auf den Zellzyklus trat bei 0,1 mM Konzentration auf und bestand in einer Zunahme des Anteils von S-Phase-Zellen bei Abnahme des Anteils der G1-Zellen; nach 0,5 Stunden Behandlung war dieser Effekt nur schwach ausgeprägt beziehungsweise gegenläufig (G1-Zunahme bei FL).

Während im Monolayer damit kein Einfluß der Zellkommunikation auf cAMP- und Zyklusverhalten nachweisbar war, wurde ein solcher im komplexeren, dreidimensional organisierten Zellsystem der Sphäroide beobachtet. Er wurde mit Hilfe einer sequentiellen Trypsinierungsmethode untersucht und machte sich in der Steilheit der radialen Gradienten der cAMP-Konzentration und des Zyklusverteilungsmusters bemerkbar. Unter Berücksichtigung der für die Zelllinien

spezifischen Verläufe dieser Radialmuster in den Kontrollsphäroiden wurden die Gradienten bei kommunikationsstimulierenden Retinsäurekonzentrationen flacher und unter den Bedingungen der Kommunikationsinhibierung (0,1 mM) steiler.

Eine Besonderheit wiesen die FL-Sphäroide bei 0,1 mM Retinsäurekonzentration auf. Hier wurde ein Einbau von BrdU auch in die inneren, normalerweise nicht-proliferierenden Sphäroidzellen beobachtet. Bei den niedrigeren Konzentrationen und in den Kontrollsphäroiden beider Zelllinien blieb die DNA-Synthese auf die äußeren Zellen beschränkt.

Diese Ergebnisse wurden insbesondere unter folgenden Gesichtspunkten diskutiert:

- Mechanismen der Retinsäure-induzierten Verstärkung beziehungsweise Inhibierung der interzellulären Kommunikation.
- Ausgeprägte Funktion der Gap Junctions im Sphäroidsystem (Beispiel Homöostase beziehungsweise Differenzierung).
- Retinsäure und Differenzierung.
- Zellzyklusverteilung von ruhenden und proliferierenden Zellen (die teilungs-inaktiven inneren Sphäroidzellen sind im allgemeinen nicht ausschließlich in der G1/G0-Phase arretiert).
- Klinische Bedeutung der Ergebnisse (Krebstherapie).

VI. Anhang

Tabellen zu den Ergebnisgrafiken

VI.1. Interzelluläre Kommunikation

VI.1.1. Interzelluläre Kommunikation bei Monolayerzellen

VI.1.1.1. FL-Monolayerzellen

<u>Behandlung</u>	<u>n</u>	<u>Kopplung</u> [%]	<u>Standardfehler</u> [%]
Kontrolle	10	100	± 11
0,1 nM Retinsäure, 0,5 h	5	117	± 9
0,1 µM Retinsäure, 0,5 h	6	156	± 14
0,1 mM Retinsäure, 0,5 h	7	13	± 8

Tabelle 1: Kopplung von FL-Monolayerzellen nach 0,5 Stunden Retinsäureinkubation.

<u>Behandlung</u>	<u>n</u>	<u>Kopplung</u> [%]	<u>Standardfehler</u> [%]
Kontrolle	10	100	± 15
0,1 nM Retinsäure, 24 h	5	78	± 16
0,1 µM Retinsäure, 24 h	6	222	± 8
0,1 mM Retinsäure, 24 h	7	7	± 7

Tabelle 2: Kopplung von FL-Monolayerzellen nach 24 Stunden Retinsäureinkubation.

VI.1.1.2. SV40-3T3-Monolayerzellen

<u>Behandlung</u>	<u>n</u>	<u>Kopplung</u> [%]	<u>Standardfehler</u> [%]
Kontrolle	22	100	± 12
0,1 nM Retinsäure, 0,5 h	9	101	± 24
0,1 µM Retinsäure, 0,5 h	6	202	± 31
0,1 mM Retinsäure, 0,5 h	8	9	± 9

Tabelle 3: Kopplung von SV40-3T3-Monolayerzellen nach 0,5 Stunden Retinsäureinkubation.

<u>Behandlung</u>	<u>n</u>	<u>Kopplung</u> [%]	<u>Standardfehler</u> [%]
Kontrolle	30	100	± 10
0,1 nM Retinsäure, 24 h	5	131	± 10
0,1 µM Retinsäure, 24 h	7	121	± 14
0,1 mM Retinsäure, 24 h	6	10	± 10

Tabelle 4: Kopplung von SV40-3T3-Monolayerzellen nach 24 Stunden Retinsäureinkubation.

VI.2. cAMP-Gehalt

VI.2.1. cAMP-Gehalt in Monolayerzellen

VI.2.1.1. FL-Monolayerzellen

<u>Behandlung</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
Kontrolle	4	633	100	± 9
0,1 nM Retinsäure, 0,5 h	3	609	96	± 10
0,1 µM Retinsäure, 0,5 h	3	516	82	± 9
0,1 mM Retinsäure, 0,5 h	4	671	106	± 9

Tabelle 5: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in FL-Monolayerzellen nach 0,5 Stunden Retinsäureinkubation.

<u>Behandlung</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
Kontrolle	4	1304	100	± 10
0,1 nM Retinsäure, 24 h	4	1094	84	± 2
0,1 µM Retinsäure, 24 h	4	843	65	± 4
0,1 mM Retinsäure, 24 h	4	649	50	± 4

Tabelle 6: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in FL-Monolayerzellen nach 24 Stunden Retinsäureinkubation.

VI.2.1.2. SV40-3T3-Monolayerzellen

<u>Behandlung</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
Kontrolle	4	759	100	± 3
0,1 nM Retinsäure, 0,5 h	3	809	107	± 4
0,1 µM Retinsäure, 0,5 h	3	689	91	± 8
0,1 mM Retinsäure, 0,5 h	4	1049	138	± 9

Tabelle 7: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Monolayerzellen nach 0,5 Stunden Retinsäureinkubation.

<u>Behandlung</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
Kontrolle	3	475	100	±21
0,1 nM Retinsäure, 0,5 h	3	437	92	±8
0,1 µM Retinsäure, 0,5 h	3	421	89	±15
0,1 mM Retinsäure, 0,5 h	4	328	69	±15

Tabelle 8: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Monolayerzellen nach 24 Stunden Retinsäureinkubation.

VI. 2.2. cAMP-Gehalt in Sphäroidzellen

VI.2.2.1. FL-Sphäroidzellen

<u>Sphäroidschale</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
1	3	346	100	± 5
3	3	342	99	± 2
5	3	245	71	± 11
7	3	178	51	± 3

Tabelle 9: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in FL-Sphäroiden in verschiedenen Schichtungen (Kontrolle zu den Werten in Tabelle 10).

<u>Sphäroidschale</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
1	3	368	106	± 1
3	3	329	95	± 3
5	3	245	71	± 27
7	3	163	47	± 32

Tabelle 10: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in FL-Sphäroiden in verschiedenen Schichtungen nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 nM Retinsäure.

<u>Sphäroidschale</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
1	3	392	100	± 13
3	3	300	77	± 7
5	3	281	72	± 16
7	3	301	77	± 15

Tabelle 11: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in FL-Sphäroiden in verschiedenen Schichtungen (Kontrolle zu den Werten in Tabelle 12).

<u>Sphäroidschale</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
1	3	257	66	± 11
3	3	298	76	± 5
5	3	210	54	± 24
7	3	302	77	± 6

Tabelle 12: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in FL-Sphäroiden in verschiedenen Schichtungen nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 µM Retinsäure.

<u>Sphäroidschale</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
1	3	633	100	± 19
3	3	497	79	± 23
5	3	351	55	± 16
7	3	477	75	± 26

Tabelle 13: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in FL-Sphäroiden in verschiedenen Schichtungen (Kontrolle zu den Werten in Tabelle 14).

<u>Sphäroidschale</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
1	3	364	58	± 18
3	3	275	43	± 15
5	3	185	29	± 4
7	3	262	41	± 3

Tabelle 14: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in FL-Sphäroiden in verschiedenen Schichtungen nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure.

VI.2.2.2. SV40-3T3-Sphäroidzellen

<u>Sphäroidschale</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
1	3	1347	100	± 4
3	3	678	50	± 0
5	3	394	29	± 1
7	3	460	35	± 8

Tabelle 15: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Sphäroiden in verschiedenen Schichtungen (Kontrolle zu den Werten in Tabelle 16).

<u>Sphäroidschale</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
1	3	634	47	± 5
3	3	540	40	± 6
5	3	459	34	± 3
7	3	497	37	± 4

Tabelle 16: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Sphäroiden in verschiedenen Schichtungen nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 nM Retinsäure.

<u>Sphäroidschale</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
1	3	1229,3	100	± 23
3	3	861	70	± 4
5	3	595	48	± 6
7	3	736	60	± 5

Tabelle 17: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Sphäroiden in verschiedenen Schichtungen (Kontrolle zu den Werten in Tabelle 18).

<u>Sphäroidschale</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
1	3	859	70	± 8
3	3	653	53	± 10
5	3	524	43	± 5
7	3	507	41	± 9

Tabelle 18: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Sphäroiden in verschiedenen Schichtungen nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 µM Retinsäure.

<u>Sphäroidschale</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
1	3	687	100	± 11
3	3	523	76	± 9
5	3	339	49	± 1
7	3	251	37	± 3

Tabelle 19: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Sphäroiden in verschiedenen Schichtungen (Kontrolle zu den Werten in Tabelle 20).

<u>Sphäroidschale</u>	<u>n</u>	<u>cAMP-Gehalt</u> [fmol/10 ⁶ Zellen]	<u>cAMP-Gehalt</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
1	3	530	77	± 1
3	3	421	61	± 19
5	3	504	73	± 7
7	3	487	71	± 2

Tabelle 20: Intrazellulärer cAMP-Gehalt in SV40-3T3-Sphäroiden in verschiedenen Schichtungen nach 24 Stunden Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure.

VI.3. Zellzyklusverteilung

VI.3.1. Zellzyklusverteilung in Monolayerzellen

VI.3.1.1. FL-Monolayerzellen

<u>Behandlung</u> (0,5 h Inkubation)	<u>n</u>	<u>G1</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]	<u>S</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]	<u>G2</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
Kontrolle	6	59,5	± 1,1	25,4	± 1,2	15,1	± 1,9
0,1 nM RA	4	58,5	± 1,0	24,6	± 1,4	16,8	± 1,9
0,1 µM RA	4	59,4	± 1,7	24,4	± 0,9	16,3	± 2,3
0,1 mM RA	4	54,2	± 2,2	28,4	± 0,5	17,6	± 2,7

Tabelle 21: Zellzyklusverteilung (prozentual) in FL-Monolayerzellen nach Retinsäureinkubation (0,5 Stunden Inkubation, Messung nach 24 Stunden).

<u>Behandlung</u> (24 h Inkubation)	<u>n</u>	<u>G1</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]	<u>S</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]	<u>G2</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
Kontrolle	7	71,2	± 2,0	16,0	± 1,5	13,0	± 1,0
0,1 nM RA	5	72,2	± 1,7	15,0	± 1,3	12,9	± 0,8
0,1 µM RA	5	73,9	± 1,5	14,3	± 1,3	11,7	± 0,6
0,1 mM RA	5	62,0	± 2,4	25,6	± 2,0	12,3	± 0,5

Tabelle 22: Zellzyklusverteilung (prozentual) in FL-Monolayerzellen nach 24 Stunden Retinsäureinkubation.

VI.3.1.2. SV40-3T3-Monolayerzellen

<u>Behandlung</u> (0,5 h Inkubation)	<u>n</u>	<u>G1</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]	<u>S</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]	<u>G2</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
Kontrolle	4	43,7	± 1,6	43,8	± 1,4	12,7	± 0,3
0,1 nM RA	3	43,2	± 1,2	44,2	± 1,3	12,6	± 0,2
0,1 µM RA	3	45,6	± 0,2	43,5	± 0,5	10,9	± 0,4
0,1 mM RA	3	47,9	± 1,1	41,5	± 0,8	10,6	± 0,4

Tabelle 23: Zellzyklusverteilung (prozentual) in SV40-3T3-Monolayerzellen nach Retinsäureinkubation (0,5 Stunden Inkubation, Messung nach 24 Stunden).

<u>Behandlung</u> (24 h Inkubation)	<u>n</u>	<u>G1</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]	<u>S</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]	<u>G2</u> [%]	<u>Fehler</u> [%]
Kontrolle	6	56,1	± 2,6	36,4	± 2,2	7,6	± 0,6
0,1 nM RA	3	57,1	± 3,5	35,6	± 4,4	7,5	± 0,9
0,1 µM RA	4	56,5	± 2,8	34,7	± 2,5	8,9	± 0,8
0,1 mM RA	4	48,6	± 2,7	42,4	± 3,4	9,3	± 1,2

Tabelle 24: Zellzyklusverteilung (prozentual) in SV40-3T3-Monolayerzellen nach 24 Stunden Retinsäureinkubation.

VI.3.2. Zellzyklusverteilung in Sphäroidzellen

VI.3.2.1. FL-Sphäroidzellen

<u>Fraktion</u>	<u>G1[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>S[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>G2[%]</u>	<u>Fehler</u>
1	73,5	± 6,2	19,4	± 5,3	7,1	± 2,0
2	73,2	± 5,4	19,6	± 4,2	7,2	± 2,0
3	72,4	± 3,9	19,3	± 3,1	8,2	± 1,6
4	72,3	± 2,7	18,6	± 2,0	9,2	± 1,6
5	72,2	± 2,5	18,8	± 2,5	9,0	± 2,0
6	72,0	± 1,3	19,7	± 1,4	8,2	± 1,2
7	71,4	± 1,8	18,5	± 1,4	10,1	± 0,5

Tabelle 25: Prozentuale Anteile der Zellzyklusphasen von FL-Sphäroidzellen in den verschiedenen Zellschichten (Kontrolle zu den Werten in Tabelle 26).

<u>Fraktion</u>	<u>G1[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>S[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>G2[%]</u>	<u>Fehler</u>
1	74,5	± 3,9	18,5	± 3,2	7,0	± 1,2
2	73,8	± 4,2	18,8	± 3,0	7,3	± 1,4
3	72,7	± 2,1	19,0	± 1,6	8,3	± 1,3
4	71,9	± 2,1	18,8	± 1,3	9,2	± 1,1
5	71,3	± 2,0	19,5	± 1,3	9,2	± 1,4
6	71,1	± 1,9	19,6	± 2,0	9,3	± 0,9
7	70,5	± 1,6	19,2	± 1,2	10,4	± 0,5

Tabelle 26: Prozentuale Anteile der Zellzyklusphasen von FL-Sphäroidzellen in den verschiedenen Zellschichten nach Inkubation mit 0,1 nM Retinsäure für 24 Stunden.

<u>Fraktion</u>	<u>G1[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>S[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>G2[%]</u>	<u>Fehler</u>
1	72,8	± 5,9	21,5	± 6,5	5,8	± 0,6
2	73,4	± 5,9	19,8	± 6,9	6,9	± 0,9
3	73,1	± 4,9	20,2	± 4,5	6,7	± 0,4
4	76,4	± 3,1	15,9	± 3,0	7,7	± 0,1
5	79,9	± 2,1	12,7	± 1,4	7,4	± 0,7
6	80,5	± 1,8	12,1	± 1,8	7,5	± 0,1
7	78,9	± 1,3	13,4	± 1,0	7,7	± 0,5

Tabelle 27: Prozentuale Anteile der Zellzyklusphasen von FL-Sphäroidzellen in den verschiedenen Zellschichten (Kontrolle zu den Werten in Tabelle 28).

<u>Fraktion</u>	<u>G1[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>S[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>G2[%]</u>	<u>Fehler</u>
1	68,0	± 3,4	24,3	± 2,3	7,7	± 1,1
2	65,9	± 3,9	25,3	± 2,9	8,9	± 1,0
3	66,6	± 4,6	24,1	± 3,3	9,4	± 1,3
4	68,4	± 5,2	22,7	± 3,7	9,0	± 1,5
5	71,6	± 5,9	19,5	± 4,3	9,0	± 1,6
6	73,8	± 5,6	17,2	± 3,8	8,0	± 0,8
7	71,2	± 4,6	19,4	± 3,4	9,3	± 1,4

Tabelle 28: Prozentuale Anteile der Zellzyklusphasen von FL-Sphäroidzellen in den verschiedenen Zellschichten nach Inkubation mit 0,1 µM Retinsäure für 24 Stunden.

<u>Fraktion</u>	<u>G1[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>S[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>G2[%]</u>	<u>Fehler</u>
1	72,0	± 3,1	20,6	± 2,7	7,5	± 0,4
2	73,0	± 3,1	19,0	± 3,1	7,1	± 0,3
3	75,2	± 2,3	19,6	± 2,5	5,2	± 0,6
4	75,3	± 2,9	19,3	± 3,3	5,4	± 0,5
5	75,6	± 2,6	19,0	± 3,2	5,4	± 0,6
6	76,4	± 2,8	18,3	± 2,8	5,3	± 0,2
7	76,4	± 1,9	17,8	± 1,8	5,8	± 0,3

Tabelle 29: Prozentuale Anteile der Zellzyklusphasen von FL-Sphäroidzellen in den verschiedenen Zellschichten (Kontrolle zu den Werten in Tabelle 30).

<u>Fraktion</u>	<u>G1[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>S[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>G2[%]</u>	<u>Fehler</u>
1	64,9	± 2,8	20,1	± 5,0	14,9	± 2,7
2	61,6	± 2,0	22,7	± 4,9	15,7	± 3,0
3	60,9	± 3,0	25,6	± 4,2	13,5	± 1,9
4	61,9	± 2,0	26,1	± 2,7	11,9	± 1,0
5	62,3	± 2,0	27,3	± 1,9	10,4	± 1,3
6	62,9	± 2,1	29,6	± 2,8	7,4	± 1,9
7	62,6	± 1,0	28,1	± 0,9	9,2	± 1,7

Tabelle 30: Prozentuale Anteile der Zellzyklusphasen von FL-Sphäroidzellen in den verschiedenen Zellschichten nach Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure für 24 Stunden.

VI.3.2.2. SV40-3T3-Sphäroidzellen

<u>Fraktion</u>	<u>G1[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>S[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>G2[%]</u>	<u>Fehler</u>
1	55,6	± 0,3	37,3	± 0,4	7,2	± 0,1
2	55,7	± 2,0	38,5	± 1,6	5,9	± 0,4
3	57,8	± 0,0	35,9	± 1,3	6,4	± 1,3
4	61,5	± 3,0	33,0	± 4,0	5,6	± 1,0
5	62,8	± 0,1	30,5	± 0,6	6,9	± 0,6
6	62,7	± 0,1	29,4	± 0,3	7,9	± 0,3

Tabelle 31: Prozentuale Anteile der Zellzyklusphasen von SV40-3T3-Sphäroidzellen in den verschiedenen Zellschichten (Kontrolle zu den Werten in Tabelle 32).

<u>Fraktion</u>	<u>G1[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>S[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>G2[%]</u>	<u>Fehler</u>
1	59,5	± 0,0	32,8	± 0,6	7,6	± 0,6
2	59,0	± 0,3	33,4	± 0,6	7,6	± 0,3
3	62,1	± 1,6	30,8	± 0,4	8,0	± 1,3
4	62,3	± 0,1	29,5	± 0,2	8,2	± 0,1
5	61,5	± 0,3	29,5	± 0,2	9,0	± 0,7
6	61,4	± 0,3	29,4	± 0,2	9,3	± 0,3

Tabelle 32: Prozentuale Anteile der Zellzyklusphasen von SV40-3T3-Sphäroidzellen in den verschiedenen Zellschichten nach Inkubation mit 0,1 nM Retinsäure für 24 Stunden.

<u>Fraktion</u>	<u>G1[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>S[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>G2[%]</u>	<u>Fehler</u>
1	52,6	± 2,8	39,0	± 1,3	8,5	± 1,4
2	52,7	± 1,1	40,3	± 0,3	7,1	± 0,8
3	56,8	± 1,1	37,5	± 0,4	5,9	± 0,9
4	56,6	± 1,9	37,1	± 0,2	6,4	± 1,8
5	59,3	± 3,5	33,6	± 2,5	7,2	± 1,0
6	56,8	± 3,1	34,5	± 2,8	8,7	± 0,7

Tabelle 33: Prozentuale Anteile der Zellzyklusphasen von SV40-3T3-Sphäroidzellen in den verschiedenen Zellschichten (Kontrolle zu den Werten in Tabelle 34).

<u>Fraktion</u>	<u>G1[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>S[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>G2[%]</u>	<u>Fehler</u>
1	54,5	3,0	38,1	3,0	7,6	0,1
2	53,6	2,5	41,1	2,3	5,5	0,1
3	54,8	0,4	39,1	0,3	6,3	0,1
4	54,6	0,9	37,0	0,3	8,5	0,7
5	54,8	4,0	35,4	2,0	10,0	2,1
6	52,9	2,7	34,5	2,9	12,6	0,2

Tabelle 34: Prozentuale Anteile der Zellzyklusphasen von SV40-3T3-Sphäroidzellen in den verschiedenen Zellschichten nach Inkubation mit 0,1 µM Retinsäure für 24 Stunden.

<u>Fraktion</u>	<u>G1[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>S[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>G2[%]</u>	<u>Fehler</u>
1	54,8	± 2,1	37,0	± 2,1	7,0	± 1,0
2	54,7	± 0,5	37,4	± 0,4	8,0	± 0,9
3	55,3	± 3,0	35,6	± 1,1	9,1	± 2,0
4	55,5	± 5,7	34,1	± 3,5	10,5	± 2,3
5	55,8	± 6,2	34,5	± 5,0	9,7	± 1,3
6	58,6	± 2,1	31,5	± 1,9	9,8	± 0,8

Tabelle 33: Prozentuale Anteile der Zellzyklusphasen von SV40-3T3-Sphäroidzellen in den verschiedenen Zellschichten (Kontrolle zu den Werten in Tabelle 34).

<u>Fraktion</u>	<u>G1[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>S[%]</u>	<u>Fehler</u>	<u>G2[%]</u>	<u>Fehler</u>
1	46,1	± 0,9	40,6	± 0,1	13,5	± 0,9
2	47,5	± 4,4	38,4	± 3,9	14,2	± 0,4
3	49,9	± 4,4	36,2	± 3,8	14,0	± 0,6
4	51,6	± 4,5	34,8	± 2,8	13,7	± 1,7
5	52,6	± 3,6	33,7	± 2,4	13,7	± 1,2
6	54,5	± 4,4	32,1	± 2,6	13,4	± 2,2

Tabelle 36: Prozentuale Anteile der Zellzyklusphasen von SV40-3T3-Sphäroidzellen in den verschiedenen Zellschichten nach Inkubation mit 0,1 mM Retinsäure für 24 Stunden.

VII. Literatur

Anderer, U.:

Untersuchungen zur Zellproliferation in Sphäroiden: Analyse von cAMP und Zyklusverteilung im Zusammenhang mit der Zellkommunikation
Dissertation, Naturwissenschaftlich-Mathematische-Gesamtfakultät der Universität Heidelberg, 1992

Anderson, W.B.; Thomas, T.B.; Plet, A. und Brion, D.E.:

Effect of retinoic acid on cyclic AMP-dependent and calcium phospholipid-dependent protein kinase activities: counteraction to phorbol ester tumor promoter
in: Saurat (ed.):
Retinoids: New trends in research and therapy, 40-47
Retinoid symp., Geneva 1984
Karger Verlag, Basel 1985

Azarnia, R.; Dahl, G. und Loewenstein, W.R.:

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, 1981

Bennett, M.V.L. und Trinkhaus, J.-P.:

Electrical coupling between embryonic cells by way of extracellular space and specialized junctions
J. Cell Biol. 44, 592, 1970

Berger, W.K.:

Electrical coupling and dye transfer between axon segments in the medium giant axon of the earthworm
Biophys. Struct. Mech. 9, 109-115, 1970

Boynton, A.L. und Whitfield, J.F.:

The role of cyclic AMP in cell proliferation: a critical assesment of the evidence
in: Greengard, P. und Robinson, G.A. (eds.):
Advances in Cyclic Nucleotide Research 15, 199-294, 1983

Breer, H.:

Reaction cascade in olfactory signal transduction
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 373 (9), 869, 1992

Brümmer, F.:

Farbstoffausbreitung durch Gap Junctions in tierischen Zellkulturen
Dissertation, Biologisches Institut der Universität Stuttgart, 1988

Brümmer, F.; Zempel, G.; Bühle, P.; Stein, J.-C. und Hülser, D.F.:

Retinoic acid modulates gap junctional permeability: a comparative study of dye spreading and ionic coupling in cultured cells
Exp. Cell Res. 196, 158-163, 1991

Bühle, P.; Stein, J.-C.; Zempel, G.; Gabbert, H.E. und Hülser, D.F.:

Effect of retinoic acid on cell differentiation and gap junction communication on FL and F1/1 III a cells
European Journal of Cell Biology 48, Suppl. 26, 9, 1989

Carlson, J. und Acker, H.:

Relations between pH, oxygen partial pressure, and growth in cultured cell spheroids
Int. J. Cancer 42, 715-720, 1988

Dean, P.N. und Jett, J.H.:

Mathematical analysis of DNA distribution derived from flow microfluorometry
J. Cell Biol. 60, 523-527, 1974

Decker, R.S. und Friend, D.S.:

Assembly of gap junctions during amphibian neurulation
J. Cell Biol. 62, 32, 1974

Dertinger, H. und Hülser, D.F.:

Intercellular communication in spheroids
Recent Results in Cancer Research 95, 67-83,
Springer Verlag, Heidelberg 1984

- Durand, B.; Saunders, M.; Leroy, P.; Leid, M. und Chambon, P.:
All-trans and 13-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs
Cell 71 (1), 73-85, 1992
- Durand, R.E.:
Multicell spheroids as a model for cell kinetic studies (invited review)
Cell Tissue Kinet. 23, 141-159, 1990
- Elias, P.M.; Grayson, S.; Caldwell, T. und McNutt, S.:
Gap junction proliferation in retinoic acid treated human basal cell carcinoma
Laboratory Investigations 42 (4), 469-474, 1980
- Enomoto, T.; Sasaki, Y.; Shiba, Y.; Kanno, Y. und Yamasaki, H.:
Tumor promoters cause a rapid and reversible inhibition of the formation and maintenance of electrical cell coupling in culture
Proc. Natl. Acad. Sci. 78 (9), 5628-5632, 1981
- Fex, G. und Johannesson, G.:
Retinol transfer across and between phospholipid bilayer membranes
Biochem. et Biophys. Acta 944, 249-255, 1988
- Flagg-Newton, J.L.; Simpson, J. und Loewenstein, W.R.:
Permeability of the cell-to-cell membrane channels in mammalian cell junction
Science 205, 404-407, 1979
- Flagg-Newton, J.L.; Dahl, G. und Loewenstein, W.R.:
Cell junctions and cyclic AMP: I. Upregulation of junctional permeability and junctional membrane particles by administration of cyclic nucleotide or phosphodiesterase inhibitor
J. Membrane Biol. 63, 105-121, 1981
- Flagg-Newton, J.L. und Loewenstein, W.R.:
Cell junctions and cyclic AMP: II. Modulations of junctional membrane permeability, dependent on serum and cell density
J. Membrane Biol. 63, 123-131, 1981

Fogh, J. und Lund, R.O.:

Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amniotic membrane

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94, 532-537, 1957

Fox, M.H.:

A model for the computer analysis of synchronous DNA distributions obtained by flow cytometry

Cytometry 1, 71-77, 1980

Freshney, R.I.:

Culture of animal cells

Alan R. Liss Inc. Verlag, New York 1983

Freyer, J.P. und Sutherland, R.M.:

Selective dissociation and characterization of cells from different regions of multicell tumor spheroids

Cancer Res. 40, 3956-3965, 1980

Furshpan, E.J. und Potter, D.D.:

Mechanism of nerve-impulse transmission at a cray fish synapse

Nature 180, 342-343, 1957

Giaume, C.; Randriamampita, C. und Trautmann, A.:

Arachidonic acid closes gap junction channels in rat lacrimal glands

Eur. J. Physiology 413, 273-279, 1989

Giguere, V.; Ong, E.S.; Segui, P. und Evans, R.M.:

Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid

Nature 330, 624-629, 1987

Göhde, W.; Schliermann, M.; Miltenburger, H.G. und Schumann, J.:

Durchfluß-Zytofluorometrie zur Routineuntersuchung von Zellkulturen in der Biotechnologie

forum mikrobiologie 8, 231-237, 1985

Goerttler, K. und Stöhr, M.:

Automated cytology. The state of the art

Arch. Path. Lab. Med. 106, 657-661, 1982

- Groebe, K. und Mueller-Klieser, W.:
Distribution of oxygen, nutrient and metabolic waste concentrations in multicellular spheroids and their dependence on spheroid parameters
Eur. Biophys. J. 19, 169-181, 1991
- Hand, A.R. und Gobel, S.:
The structural organization of the septate and gap junction of hydra
J. Cell Biol. 52, 97, 1972
- Hülser, D.F. und Brümmer, F.:
Closing and opening of gap junction pores between two- and three-dimensionally cultured tumor cells
Biophys. Struct. Mech. 9, 83-88, 1982
- Jaques, G.; Herlinger, U. und Havemann, K.:
The influence of retinoic acid in small cell lung cancer cell lines
Canc. Res. Clin. Oncol. 118 Suppl., R99, 1992
- Lindl, T. und Bauer, J.:
Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen
Fischer Verlag, Stuttgart 1989
- Loewenstein, W.R.:
Regulation of cell-to-cell communication by phosphorylation
Biochem. Soc. Symp. 50, 43-58, 1985
- Maden, M.:
Vitamin A and pattern formation in the regenerating limb
Nature 295, 672-675, 1982
- Maden, M. und Summerbell, D.:
Retinoic acid-binding protein in the chick limb bud: identification at developmental stages and binding affinities of various retinoids
J. Embryol. Exp. Morph. 97, 239-250, 1986
- Makowski, L.; Caspar, D.L.D.; Philipps, W.C. und Goodenough, D.A.:
Gap junction structures. II. Analysis of the X-ray diffraction data
J. Cell Biol. 74, 629-645, 1977

- Mehta, P.P. und Loewenstein, W.R.:
Differential regulation of communication by retinoic acid in homologous and heterologous junctions between normal and transformed cells
J. Cell Biol. 113 (2), 371-379, 1991
- Moon, R.C. und Itri, L.M.:
Retinoids and cancer
in: Sporn, M.B.; Roberts, A.B. und Goodman, D.S. (eds.):
The retinoids, 327-334
Acad. Press, New York 1984
- Mueller-Klieser, W.:
Limitierende Faktoren für die Versorgung von Tumorgewebe
Funktionsanalyse biologischer Systeme 13, 1985
Akademie der Wissenschaften und der Literatur, Mainz
- Mueller-Klieser, W.:
Multizelluläre Spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 113, 101-122, 1987
- Nedermann, T.; Norling, B.; Glimelius, B.; Carlson, J. und Brunk, U.:
Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids
Cancer Res. 44, 3090-3097, 1984
- Niles, R.M. und Loewy, B.P.:
Induction of protein kinase C in mouse melanoma cells by retinoic acid
Cancer Res. 49, 4483-4487, 1989
- Orfanos, C.E.:
Retinoids in clinical dermatology: an update
in: Saurat (ed.)
Retinoids: New trends in research and therapy, 314-334
Retinoid symp., Geneva, 1984
Karger Verlag, Basel 1985
- Payton, B.W.; Bennett, M.V.L. und Pappas, G.D.:
Permeability and structure of junctional membranes at an electronic synapse
Science 165, 594, 1969

- Petkovich, M.; Brand, N.J.; Krust, A. und Chambon, P.:
A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear
receptors
Nature 330, 444-450, 1987
- Pitts, J.D.; Burk, R.R. und Murphy, J.P.:
Retinoic acid blocks junctional communication between animal cells
Cell Biology International Reports 5, Suppl. A, 45, 1981
- Pitts, J.D.; Hamilton, A.E.; Kam, E.; Burk, R.R. und Murphy, J.P.:
Retinoic acid inhibits junctional communication between animal cells
Carcinogenesis 7 (6), 1003-1010, 1986
- Plet, A.; Evain, D. und Anderson, W.B.:
Effect of retinoic acid treatment of F9 embryonal carcinoma cells on the
activity and distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase
The Journal of Biological Chemistry 257 (2), 889-893, 1982
- Plet, A.; Gerbaud, P.; Sherman, M.I.; Anderson, W.B. und Brion, D.E.:
Retinoic acid effect on cyclic AMP-dependent protein kinase in embryonal
carcinoma cells: studies with differentiation-defective sublines
Journal of Cellular Physiology 127, 341-347, 1986
- Revel, J.P. und Karnovsky, M.J.:
Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and
liver
J. Cell Biol. 33, C7, 1967
- Rose, B.:
Intercellular communication and some structural aspects of membrane
junctions in a simple cell system
J. Membrane Biol. 5, 1, 1971
- Russel, W.C.; Newman, C. und Williamson, D.H.:
A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells
infected with mycoplasmas and viruses
Nature 253, 461-462, 1975

Rustin, G.J.S. und Eccles, S.A.:

The potential clinical use of retinoids in oncology
British Journal of Cancer 51, 443-445, 1985

Rutz, H.P. und Little, J.B.:

Modification of radiosensitivity and recovery from X ray damage in vitro by
retinoic acid
Int. J. Oncol. Biol. Phys. 16, 1285-1288, 1989

Saez, J.C.; Nairn, A.C.; Czernik, A.J.; Spray, D.C.; Hertzberg, E.L.; Greengard, P.
und Bennett, M.V.L.:

Phosphorylation of connexin 32, a hepatocyte gap-junction protein by
cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C and Ca^{2+} /
calmodulin-dependent protein kinase II
Eur. J. Biochem. 192, 263-273, 1990

Sheridan, J.D.:

Electrophysiological evidence for low resistance intercellular junctions in the
early chick embryo
J. Cell. Biol. 37, 650, 1968

Slack, J.M.W.:

We have a morphogen!
Nature 327, 553-554, 1987

Spemann, H.:

Embryonic development and induction
Yale University Press, New Haven 1938
Nachdruck: Garland, New York 1988
Deutsche Ausgabe: Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der
Entwicklung (Deutsche Ausgabe der Siliman Lectures, gehalten an der
Yale University 1933) Nd. der Ausgabe 1936. Springer Verlag, Berlin 1968

Staehein, L.A. und Hull, B.E.:

Junctions between living cells
Sci. Am. 238, 141-152, 1978

Stein, J.-C.:

Einfluß der Retinsäure auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions

Diplomarbeit, Biologisches Institut der Universität Stuttgart, 1989

Stewart, W.W.:

Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer

Cell 14, 741-759, 1978

Stöhr, M.; Vogt-Schaden, M.; Knobloch, M.; Vogel, R. und Futtermann, G.:

Evaluation of eight fluorochrome combinations for simultaneous DNA-protein flow analyses

Stain Technology 53, 205-215, 1978

Subak-Sharp, J.H.; Bürk, R.R. und Pitts, J.D.:

Metabolic cooperation between biochemically marked cells in tissue culture

J. Cell. Sci. 4, 353-367, 1969

Sutherland, R.M.; McCredie, J.A. und Inch, W.R.:

Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model for nodular carcinomas

J. Natl. Cancer Inst. 46, 113-118, 1971

Thaller, C. und Eichele, G.:

Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud

Nature 327, 625-628, 1987

Tickle, C.; Alberts, B.; Wolpert, L. und Lee, J.:

Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region

Nature 296, 564-566, 1982

Todaro, G.J. und Green, H.:

Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines

J. Cell Biol. 17, 299-313, 1963

Todaro, G.J.; Green, H. und Goldberg, B.D.:

Transformation of properties of an established cell line by SV40 and polyoma virus

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 66-73, 1964

Tupper, J.T. und Saunders, J.W.:

Intercellular permeability in the early asterias embryo

Dev. Biol. 27, 546, 1972

Van Dilla, M.A.:

Introduction and resumé of flow cytometry and sorting

in: Melamed, M.R.; Mullaney, P.F. und Mendelsohn, M.L. (eds.):

Flow cytometry and sorting, 11-37

John Wiley & Sons, New York 1979

Verma, A.K. und Boutwell, R.K.:

Vitamin A acid (retinoic acid), a potent inhibitor of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis

Cancer Res. 37, 2196-2201, 1977

Verma, A.K.; Rice, H.M.; Shapas, B.G. und Boutwell, R.K.:

Inhibition of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis by vitamin A analogs (retinoids)

Cancer Res. 38, 793-801, 1978

Vindelov, L.:

Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions

Virchows Arch. Biol. Cell Pathol. 24, 227-242, 1977

Wälder, L. und Lützelshwab, R.:

Effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), retinoic acid and diazepam on intercellular communication in a monolayer of rat liver epithelial cells

Exp. Cell Res. 152, 66-76, 1984

Walser, B.:

Entwicklung und Charakterisierung eines dreidimensionalen
Zellkultursystems für Hepatocyten adulter Ratten (Hepatocyten-Sphäroide)
Dissertation, Naturwissenschaftlich-Mathematische-Gesamtfakultät der
Universität Heidelberg, 1993

Westarp, M.E.; Westarp, M.P.; Bollag, W. und Kornhuber, H.H.:

Hohe Retinoid-Serumdauerspiegel bei primären ZNS-Tumoren durch orale
Kombination von Isotretinoin und Inhibitor R75251
Canc. Res. Clin. Oncol. 118 Suppl., R99, 1992

Westarp, M.E.; Westarp, M.P.; Bruynseels, J.; Bollag, W. und Kornhuber, H.H.:

Oral liarozole as a catabolic inhibitor potently increases retinoic acid in vivo:
first experience from an ongoing therapeutic trial in highly malignant primary
brain tumors
Onkologie 16, 22-25, 1993

Westarp, M.E.; Westarp, M.P.; Grundl, W.; Biesalski, H. und Kornhuber, H.H.:

Improving medical approaches to primary CNS malignancies- retinoid
therapy and more
Medical Hypotheses 41, 267-276, 1993

Wolbach, S.B. und Howe, P.R.:

Tissue changes following deprivation of fat-soluble vitamin A
J. Exp. Med. 42, 753-777, 1925