

# **„Tumorzellen in der Zellkultur“**

**Kurs SoSe 2007**  
**'Curriculum zur strukturierten Promotion'**  
für Studierende der Humanmedizin

**Dr. rer. nat. A. Vervoorts**  
**Institut für Lasermedizin**  
**Universitätsklinikum Düsseldorf**

Der Kurs findet in Gebäude 22.03. Ebene 04 Raum 73/75 statt.

Bitte mitbringen:

Block, Stift, Taschenrechner, Kittel (falls vorhanden).

Kontakt:

Dr. Anja Vervoorts

Tel. 8112623 (Büro)

8112801 (Labor)

8112762 (Sekretariat)

email: [vervoort@uni-duesseldorf.de](mailto:vervoort@uni-duesseldorf.de)

## 2. Versuch Teil 2

### Aufnahme einer Wachstumskurve

In der ersten Woche wird eine Wachstumskurve einer Krebszellkultur unter normalen Laborbedingungen aufgenommen. Es wird die Zelllinie OAT SCLC (**S**mall **C**ell **L**ung **C**arcinoma), die 1973 aus einem Lungentumor eines japanischen Patienten entnommen wurde verwendet [OHARA & OKAMOTO, 1975]. (Alternativ: HEK 293, Urothelial-Karzinome SW1710, 5637 oder VmCub1)

Es werden pro Person drei Zellkulturen mit je 1 Mio. Zellen angesetzt. Nach je ca. 24 Stunden werden die Kulturen in situ auf dem Invers-Mikroskop ausgezählt (Uhrzeiten notieren!). Dafür werden je 9 mal ein großes Zählquadrat pro Kultur gezählt. Es kann durchaus sein, dass die Kulturen nach ein paar Tagen so dicht bewachsen sind, dass sie nicht mehr in situ gezählt werden können. Tritt dieser Fall ein, so müssen die Zellen wie unten beschrieben geerntet, verdünnt und in Suspension gezählt werden.

### Material und Methoden

#### Zellernte

Das Medium (DMEM, Dulbeccos Modified Eagles Medium, Sigma, + 5% foetales Kälberserum + 5 mM Glutamin [5,8g in 200ml Wasser] + Antibiotika) einer konfluenten Krebszellkultur wird verworfen.

Die Zellen werden 10 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS (Phosphate Buffered Saline) auf dem Schüttler gewaschen. (Warum?)

Anschließend wird das PBS verworfen.

Trypsin-Lösung: 5 ml 2,5% Trypsin-Lösung (portionsweise eingefroren) und 2 ml 0,1 M EDTA-Stammlösung (Lagerung bei +4°C) in 200 ml PBS mit Indikator geben.

3 ml vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung (Trypsin Konz.: 2,5% 1:40 verdünnt; EDTA 0,1 M, 1: 100 verdünnt) wird zugegeben. (Funktion und Wirkungsweise von Trypsin und EDTA?)

3 ml frisches Kulturmedium in einem Zentrifugenröhrchen vorlegen.

Nach ca. 2-3 Minuten werden alle Zellen durch Klopfen der Kulturschale vollständig vom Untergrund abgelöst. Zellsuspension mit einer Spritze aufziehen und sofort in die 3 ml Kulturmedium geben. (Warum?) Kulturschale noch mal mit 3 ml frischem Medium ausspülen und in das Zentrifugenröhrchen geben.

Die Zellen, die sich nun in Suspension befinden, werden für 3 min bei 1000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und das Zellpellett wird vorsichtig in einem definiertem Volumen Zellkulturmedium resuspendiert (ca. 6 ml für eine kleine Flasche).

#### Zellzählung

Die 6 ml Zellsuspension werden in eine kleine Zellkulturflasche pipettiert. Damit alle Zellen auf den Gefäßboden sinken, lässt man die Flaschen ca. 10 Min. ruhen. Am Umkehrmikroskop werden die Zellen mit dem 32er Objektiv gezählt.

Man zählt neunmal neun Zählquadrate pro Kultur [ $Z_i$ ], ermittelt den jeweiligen Mittelwert und die Standardabweichung. An den folgenden Tagen werden die 6 ml Zellsuspension 1:2 bis 1:6 mit Medium verdünnt und dann gezählt.

Nach der Zählung werden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für den Vitalitätstest abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

#### Vitalitätstest

Das Zellpellett wird mit 100µl Ethidiumbromid/Acridinorange-Lösung versetzt und vorsichtig gemischt. Ca. 15µl der Suspension werden auf einen Objektträger pipettiert und eingedeckt. Am Fluoreszenzmikroskop können mit der Wasserimmersion bei Blau-Anregung lebende und tote Zellen voneinander unterschieden werden. Es sollten ca. 200 Zellen pro Objektträger gezählt werden.

#### Schema:

	gr. Flasche	kl. Flasche (Kurs)	Dauer (min)
Medium absaugen	50 – 75 ml	10 ml	
Waschen in PBS auf dem Schüttler	20ml	6 ml	10
PBS absaugen, Zugabe von Trypsin/EDTA, Ablösen der Zellen	5 ml	3 ml	2-10
Zellsuspension quantitativ in Zentrifugengläser mit Medium überführen	5 ml	3 ml	
Kulturgefäß mit Medium ausspülen	5 ml	3 ml	
Zentrifugation bei 1000 U/min			3
Überstand verwerfen, Zellen in frischem Medium resuspendieren	10 ml	3+3 ml	
Probe für Zellzählung	0,5 ml + 5,5 ml Medium	zurück in kleine Kulturflasche	
Zentrifugation bei 1000U/min			3
Medium verwerfen, Acridinorange-Ethidiumbromid zugeben	100 µl	100µl	
Mikroskopieren bei Blauanregung	10 –15 µl	10-15 µl	

#### Aufgaben:

Ermittlung der Grundfläche der Kulturflasche.

Zellzählung am Umkehrmikroskop. Neun Zählungen, Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung.

Berechnung: Wie viele Zellen befinden sich in dem Gefäß? (Umrechnungsfaktor)

Die einzelnen Präparationsschritte verstehen und erklären können.

Dem wie vielfachen der Erdbeschleunigung  $g$  entspricht die Zentrifugation bei 1000 rpm?

Graphische Auswertung:

Tragen Sie die Zeit gegen Zellzahl in Mio. pro Schale auf.

Tragen Sie die Werte halb logarithmisch auf.

Welche Art von Kurve erwartet man, entspricht die Wachstumskurve den Erwartungen? Welche Stadien des Wachstums unterscheidet man?

Berechnen Sie die Generationsdauer der Zellen.

Berechnen Sie die Teilungsrate der Zellen.

## 2. Versuch Teil 2 Wirkung von Tumormedikamenten in vitro I

### “Taxolversuch”

Die im ersten Versuchsteil aufgestellte Wachstumskurve zeigt das Verhalten einer Krebszellkultur unter normalen Laborbedingungen. In diesem Versuch wird der Einfluss von Tumormedikamenten auf das Wachstum der Zellkulturen getestet. Unter Einfluss von Taxotere (Taxol) wird eine zweite Wachstumskurve aufgenommen.

Das natürliche Chemotherapeutikum Taxol (Paclitaxel, Taxotere) wird in den Blättern der Eibe (*Taxus brevifolia*) gebildet. Es hyperstabilisiert Mikrotubuli des Spindelapparates während der Mitose und führt damit zur Arretierung von sich teilenden Zellen in der Metaphase. Dies lässt sich durch Mikroskopie der Zellen oder Immunfluoreszenz der Teilungsspindel mit Antikörpern gegen das Tubulin des Spindelapparates zeigen. Taxol beeinflusst die Stoffwechselaktivität der Zellen nicht.

### Material und Methoden

Tumorzellen werden aus der Monolayerkultur geerntet, gezählt und auf eine Konzentration von 1 Mio. Zellen/ml eingestellt.  
Es werden pro Gruppe 16 kleine Kulturen mit je 1 Mio. Zellen pro Flasche angesetzt. Dafür werden 5ml Medium vorgelegt und 1ml Zellsuspension zupipettiert.  
Nach ca. 24 Stunden werden die Zellen am Invers-Mikroskop gezählt.

Es werden folgende taxolhaltige Kulturmedien hergestellt:

Stammlösung:  $2 \times 10^{-3}$  M Taxol in Dimethylsulfoxid (DMSO)

Lösungen in Kulturmedium:

1	200 µl Stammlösung in 20 ml Kulturmedium	Konz.:
2	60 µl Stammlösung in 20 ml Kulturmedium	Konz.:

Beide Lösungen **sterilfiltrieren!** Weitere Lösungen **steril** ansetzen:

3	2 ml Lösung 1 + 18 ml Kulturmedium	Konz.:
4	2 ml Lösung 2 + 18 ml Kulturmedium	Konz.:
5	2 ml Lösung 3 + 18 ml Kulturmedium	Konz.:
6	2 ml Lösung 4 + 18 ml Kulturmedium	Konz.:
7	2 ml Lösung 5 + 18 ml Kulturmedium	Konz.:
K	reines Kulturmedium (Kontrolle)	

Das Medium der 16 Kulturen wird verworfen und durch je 6ml der Lösungen 1 – 7 und K ersetzt (Kulturschalen eindeutig beschriften!).

Nach weiteren 24 Stunden wird am Umkehrmikroskop auf Zellvermehrung (Kontrollkultur K) und Todesrate (Anteil der abgerundeten bzw. abgelösten Zellen) geprüft.

Anschließend werden lose am Untergrund haftende Zellen mechanisch gelöst, das taxolhaltige Medium und Kontrollmedium K werden verworfen und die Kulturen mit je 6ml PBS für 20 Minuten gewaschen. Zellen werden nochmals gelöst und das PBS wird verworfen und durch reines Kulturmedium ersetzt. Die Zellen werden gezählt (=überlebende Zellen).

Kontrollieren Sie die Kulturen alle 24 Stunden auf Rezidive.

## **Aufgaben:**

Berechnen Sie die Endkonzentrationen von Taxol in den Medien 1-7.

Tragen Sie die Taxolkonzentration (x-Achse) gegen die Anzahl lebender (=gestreckter bzw. haftender) Zellen auf.

Besteht eine Dosisabhängigkeit?

Bei welchen Konzentrationen lassen sich bis zum Ende des Versuches noch lebende Zellen beobachten?

Vermehren sich diese Zellen nach Entfernung des Taxols wieder (Rezidive!)?

Welche Gründe kann es für Resistenzen gegenüber Taxol geben?

## **empfohlene Literatur:**

Ohara, H., Okamoto, T.

A New in Vitro Cell Line Established from Human Oat Cell Carcinoma of the Lung  
Cancer Res. 37, 3088-3092 (Sep. 1977)

Lindl, T., Bauer, J.

Zell- und Gewebekultur

3. Aufl., Gustav Fischer Verlag

(Auszüge befinden sich im Anhang)

Parks, D., Bryan, V., Oi, V., Herzenberg, L.

Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter

Proc. Natl. Acad. Sci **76**, 1962-1966 (April 1979)

Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle.

Jordan-A; Hadfield-JA; Lawrence-NJ; McGown-AT

Med-Res-Rev. 1998 Jul; **18**(4): 259-96

## 1. Versuch

### Wirkung von Tumormedikamenten in vitro II

#### “Doxorubicinversuch” (Adriblastin)

Die Wirkung von Doxorubicin wird nicht in einer Monolayerkultur, sondern in einer Suspensionskultur getestet. Es werden folgende doxorubicinhaltige Kulturmedien hergestellt:

Stammlösung:  $3,44 \times 10^{-3}$  M

Lösungen in Kulturmedium (Achtung! Medium darf keinen HEPES-Puffer enthalten!):

1                    X  $\mu$ l Stammlösung in 30 ml Kulturmedium                    Konz.: 50 $\mu$ M

Lösung **sterilfiltrieren!** Weitere Lösungen **steril** ansetzen:

2	7,6 ml Lösung 1 mit Kulturmedium auf 25 ml auffüllen	Konz.:
3	2,5 ml Lösung 1 mit Kulturmedium auf 25 ml auffüllen	Konz.:
4	2,5 ml Lösung 2 mit Kulturmedium auf 25 ml auffüllen	Konz.:
5	2,5 ml Lösung 3 mit Kulturmedium auf 25 ml auffüllen	Konz.:
6	2,5 ml Lösung 4 mit Kulturmedium auf 25 ml auffüllen	Konz.:
7	2,5 ml Lösung 5 mit Kulturmedium auf 25 ml auffüllen	Konz.:
8	2,5 ml Lösung 6 mit Kulturmedium auf 25 ml auffüllen	Konz.:
K	reines Kulturmedium (Kontrolle) und Zellen	
M	reines Kulturmedium ohne Zellen	
M+	reines Kulturmedium + 500 $\mu$ l HCl 0,1N (in 25 ml)	

Tumorzellen werden aus der Monolayerkultur geerntet, gezählt und auf eine Konzentration von 1,2 Mio. Zellen/ml eingestellt.

Für jede Konzentration werden pro Gruppe je 3 Suspensionskulturen angesetzt (33 Röhren, vorher beschriftet!).

Dafür werden 5ml der einzelnen Verdünnungen vorgelegt und 1ml Zellsuspension mit 1,2 Mio. Zellen zupipettiert. (Endkonzentrationen ändern sich!)

Die (beschrifteten) Röhren werden über Nacht bei ca. 35°C auf einem Schrägkarussell inkubiert.

Am folgenden Tag werden die Suspensionskulturen für 3 min bei 3000 rpm (1000g) abzentrifugiert und der Überstand bei 546 nm photometriert.

#### Aufgaben

Wie wirkt Doxorubicin?

Wie funktioniert der photometrische Test? Warum ist er bei Taxol nicht möglich?

Berechnen Sie die Endkonzentrationen von Doxorubicin.

- Berechnung der Pufferkapazität
1. Auftragung der Extinktionen aller Einzelwerte der Reihen M und M+ gegen die dort vorliegende Säurekonzentration (hier 0 mmol/l und 1,96078 mmol/l)
  2. Ablesen der Steigung des Graphen
  3. Berechnung der Berechnungskonstante K

$$K = V \cdot \text{Umrechnungsfaktor} / \text{Zellzahl} \cdot t \cdot \text{Steigung}$$

**V** = Probenvolumen in l (hier 6E-3 l)

**Umrechnungsfaktor** = da der Zahlenwert aus der Pufferkapazitätskurve genommen wird. Weil die Säurekonzentration aber nicht in mol, sondern in mmol angegeben ist. 1 mmol (hier: 1,0E-3 mol)

**Zellzahl** = hier 1,2 E6 bzw. 2E6 Zellen pro Röhrchen

**t** = Inkubationszeit in Stunden

**Steigung** des Graphen aus Punkt 2.

K gibt an, wie viel Säureäquivalent eine Zelle pro Stunde produzieren müsste, damit zwischen der Kontrolle K und M eine Differenz von 1 entsteht.

- Berechnung der Toxizitätskurve, Ermittlung der LD<sub>50</sub> und LD<sub>90</sub>
1. Berechnung des Mittelwertes aus den Extinktionen der Reihe K (Annahme 100% überlebende Zellen, da kein Doxorubicin enthalten ist)
  2. Bildung der Differenz  $\Delta E$  zwischen den einzelnen Extinktionswerten und dem Mittelwert der Extinktionen der Reihe K.
  3. Bildung des Mittelwertes der  $\Delta E$  aus Reihe M („alle Zellen tot“)
- Der Anstieg einer Extinktion um den berechneten Mittelwert bedeutet eine Zunahme der abgetöteten Zellen auf 100%.
4. Division aller  $\Delta E$ -Werte durch den MW der Reihe M (MW aus Schritt 3.; =Errechnung des Prozentsatzes an toten Zellen)
  5. Bildung der Differenz zum Wert 1 (= Errechnung des Anteils an lebenden Zellen =  $F/F_0$ )
  6. Bildung des Logarithmus des Anteils der lebenden Zellen (=log  $F/F_0$ )
  7. Auftragung von log  $F/F_0$  gegen die Konzentration, die für die jeweilige Reihe eingesetzt wurde.

Bei Annahme, dass in Reihe M die Zellen zu 100% abgetötet worden sind, müsste der Anteil toter Zellen bei 100% liegen. Das heißt  $F/F_0$  wäre 0 und der entsprechende Logarithmus ginge gegen Minus Unendlich. Daher werden die Werte für Reihe M nicht in Schritt 6 mit aufgetragen.

Ablesen der LD<sub>90</sub>, entspricht der Konzentration die zu wählen ist, um 90% der Zellen abzutöten (= Erreichen der LD<sub>90</sub>).

Gibt es resistente Zellen? Welche Gründe kann es für Resistenzen gegenüber Doxorubicin geben?

## Das gehört auch dazu:

Für das Praktikum werden größere Mengen PBS benötigt. Diese bitte wie folgt ansetzen:

Es werden je 5 l angesetzt:

<b>PBS ohne Indikator</b>	<b>PBS mit Indikator</b>	<b>DMEM ohne HEPES</b>
40 g NaCl	40 g NaCl	8,6 g NaCl
4,5 g Glucose	4,5 g Glucose	-
6,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-
2 g KCl	2 g KCl	-
-	2,5 ml Phenolrot	2,5 ml Phenolrot
-	-	6 g NaHCO <sub>3</sub>
-	-	50 g DAT (1/2 Paket)

Feste Substanzen einwiegen und in 4,5 l bidestilliertem Wasser lösen. Für PBS mit Indikator und DMEM 2,5 ml Phenolrot einpipettieren (Stammlösung: 1g Phenolrot in 100 ml Ethanol lösen, tropfenweise NaOH zugeben, bis sich das Phenolrot vollständig löst). Volumen auf 5 l auffüllen, pH-Wert mit HCl auf 7,35 einstellen. Lösungen per Druckfiltration sterilfiltrieren und auf 500 ml Flaschen (autoklaviert!) füllen. Im Kühlraum lagern.

In das filtrierte Medium kommen kurz vor Gebrauch pro Flasche 5ml Glutamin-Lösung (5,8g auf 200 ml Wasser, steril), 25 ml inaktiviertes fötales Kälberserum (30 min 56°C), 0,5 ml Fortum, 0,5 ml Refobacin.

weitere nützliche Rezepte:

Trypsin-Lösung: 200 ml PBS mit Indikator  
5 ml 2,5% Trypsin-Lösung (portionsweise eingefroren)  
2 ml 0,1 M EDTA-Stammlösung (Lagerung bei +4°C)

**Arbeitsplatz aufräumen und sauber hinterlassen.  
Benutzte Glasgefäße mit Wasser ausspülen,  
Beschriftungen entfernen und in die Plastikwanne stellen.**

**Kanülen (Braunülen) NICHT in den Abfall, sie werden  
ebenso wie Glasbruch getrennt entsorgt!**

## Protokolle

Bitte die Protokolle kurz und korrekt formulieren! Zahlen bitte im wissenschaftlichen Format angeben ( $1,2 \times 10^6$  statt 1 234 345 Zellen bzw.  $3,9 \times 10^{-3}$ /mMol statt 0,003879352 Mol). Grafiken sollten ohne Farbe verständlich sein!  
Die Gliederung soll wie folgt aussehen:

### 1. Einleitung

Ziele der Versuche formulieren, welche Frage soll anhand des Versuchs beantwortet werden?

### 2. Material und Methoden

Die einzelnen Präparationsschritte sind schon im Skript beschrieben. Hier sollte aber nun das Vorgehen erklärt werden. Welche Schritte sind wichtig, warum werden sie so durchgeführt. Im ersten Teil des Skriptes sind beispielhaft Fragen formuliert, die im Protokoll beantwortet werden sollen.

### 3. Ergebnisse

In diesem Kapitel bitte die Ergebnisse kurz beschreiben und ggf. mit Grafiken darstellen. (z.B. Wachstumskurve abbilden).

### 4. Diskussion

In der Diskussion werden die Ergebnisse gedeutet. Stimmen sie mit den Erwartungen überein? Werden die in der Einleitung formulierten Fragen beantwortet? Ergeben sich neue Fragen?

### 5. Literatur

Zitierte Literatur angeben (auch Quellen aus dem Internet müssen angegeben werden)