

3. Methodik

3.1 Rasterelektronenmikroskopie

3.1.1 Tierart und Tumorzelllinie

Für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wird als Tierart eine BD- IX Ratte (Charles River, Deutschland) und als Tumorzelllinie ein Adenokarzinom des Kolons DHD/K12/TRb (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, England) verwendet. Alle Tieren sind männlich und wiegen zum Zeitpunkt des Experimentes 250-300g. Die Tiere werden unter Standardlaborbedingungen gehalten. Vor und nach der Untersuchung haben sie freien Zugang zu Wasser und Nahrung.

Der Antrag an die Tierschutz-Kommission ist von der Senatsverwaltung für Gesundheit der Stadt Berlin genehmigt worden und wird unter der Registriernummer G=124/99 geführt.

Die Karzinomzellen werden als Zellsuspension in tiefgefrorenem Zustand geliefert. Die Zellen werden in einem Wasserbad bei 37° C aufgetaut. Nach Überführung in das Nährmedium (1:1 Dulbeccos MEM und Hams F 10 Medium, Biochrom, Deutschland) erfolgt die Vitalitätsprüfung mittels Acridine-Orange-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie. Danach wird die Zellsuspension fünf Minuten mit 200 g zentrifugiert und in das Medium resuspendiert. Die Inkubation der Zellen erfolgt im Brutschrank in einer Kulturflasche (75 cm² / 250 ml) bei 37° C und einer CO₂-Konzentration von 5%. Dem Nährmedium wird vorher 10% fetales Rinderserum, 1000 IU/l Penicillin-Streptomycin (beides Gibco BRL, Deutschland) und 2 ml Glutamin (Biochrom, Deutschland) zugesetzt. Bei erreichter Konfluenz werden die Zellen subkultiviert. Hierzu werden die Zellen zunächst mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, anschließend 300 µl einer vorgewärmten Trypsin / EDTA-Lösung (0,05% Trypsin / ,02% EDTA) hinzugegeben und die Lösung einige Minuten inkubiert. Die abgelösten Zellen werden aufgenommen, mit der doppelten Menge Medium versetzt, bei 200 g fünf Minuten zentrifugiert, in Medium / Zusatz resuspendiert und in eine neue Kulturflasche pipettiert.

Gleichzeitig werden von dieser Zellsuspension jeweils Proben à 10⁵ Zellen eingefroren. Die Zellen werden in Kryoröhrchen suspendiert, zentrifugiert und nach Abpipettieren des Überstandes in einem Stickstoffbehälter gelagert. Für die Injektion im Tumormodell werden die Zellen wie oben beschrieben aufgetaut, ihre Vitalität geprüft und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.1.2 Einteilung der Gruppen

Für die rasterelektronenmikroskopische Studie werden insgesamt 55 Ratten in Abhängigkeit vom verwendeten Gas folgendermaßen in zwei Gruppen à 25 Tiere und eine Kontrollgruppe à 5 Tiere unterteilt. Innerhalb der Gruppen CO₂ und Helium werden die Tiere nochmals in 5 Untergruppen à 5 Ratten eingeteilt. Diese Unterteilung richtet sich nach dem Zeitpunkt der Probenentnahme.

Gruppe	Untergruppe	Zeitpunkt der Biopsie-entnahme nach Pneumo- peritoneum	Druck in mmHg
CO₂ Insufflation	CO ₂ / 2	2h	15 mmHg
	CO ₂ / 12	12h	
	CO ₂ / 24	24h	
	CO ₂ / 48	48h	
	CO ₂ / 96	96h	
Helium Insufflation	Helium / 2	2h	15 mmHg
	Helium / 12	12h	
	Helium / 24	24h	
	Helium / 48	48h	
	Helium / 96	96h	
Kontrolle		Entnahme der Proben 2h nach Injektion	

Tabelle 1. Einteilung der Gruppen

Die Anlage des Pneumoperitoneums erfolgt bei je fünf Ratten, die somit eine Gruppe bilden. Für die Biopsieentnahme werden zum entsprechenden Zeitpunkt eine der Ratten nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und somit einer der Untergruppen zugewiesen. Helium und CO₂ werden im Wechsel verwendet.

Den ersten fünf Gruppen werden zum Zeitpunkt des Experiments je ein Kontrolltier zugeordnet. Es werden somit zu Beginn des Experiment nicht fünf sondern sechs Tiere ausgewählt, narkotisiert, deren Bauch rasiert, desinfiziert und die Tumorzellen appliziert. Das Pneumoperitoneum wird jedoch nur bei fünf Tieren aufgebaut. Das zufällig ausgewählte sechste Tier dient als Kontrolltier. Die Biopsieentnahme erfolgt bei dieser Ratte zwei Stunden nach Injektion der malignen Zellen. Die Untersuchung der Kontrolltiere dient der Gewinnung intakter Proben und dem Ausschluß von Artefakten.

3.1.3 Tumorzellinjektion und Pneumoperitoneum

Die Narkotisierung der Tiere erfolgt durch die intramuskuläre Injektion von Xylazinhydrochlorid (Rompun[®] 2%, Bayer Vital GmbH, Deutschland; 10mg/kg Körpergewicht) und Ketaminhydrochlorid (Ursotamin[®], Serum- Werk Bernburg AG, Deutschland; 80 mg/kg Körpergewicht) in eines der Hinterbeine. Die Spontanatmung bleibt während des gesamten Experiments erhalten. Nach Einleitung der Narkose wird den Tieren der Bauch rasiert und desinfiziert. Dann erfolgt die intraperitoneale Injektion von 10⁶ malignen Zellen mit einer Subkutannadel intraperitoneal. Die Ratten werden anschließend durch eine Stanzmarke am Ohr gekennzeichnet.

Zur Anlage des Pneumoperitoneum wird die Bauchhöhle der Ratten mit einer Venenverweilkanüle (1,4 mm Durchmesser) punktiert. Es folgt der Aufbau des Pneumoperitoneums durch Anschluss an einen Insufflator (Electronic Laparoflator, Karl Stolz GmbH, Deutschland). Nach begonnener Insufflation schwankt der Druck maximal in einem Bereich von +/- 1 mmHg um den Zieldruck. Der anfängliche Gasflow beträgt 0,1 l/min, der endgültige gesamt Gasverbrauch ca. 1,5-2 l. Nach 30 Minuten wird die Verbindung zum Insufflator dekonnektiert und die Bauchhöhle desuffliert. Zuletzt werden die Venenverweilkanülen entfernt und die Ratten in den Tierstall entlassen.

3.1.4 Biopsieentnahme

Zu den oben angegebenen Zeitpunkten (3.1.2) wird ein Tier aus einer Gruppe (siehe 2.2.8) zufällig ausgewählt und durch die intramuskuläre Injektion einer Überdosis Rompun[®] /Ursotamin[®] narkotisiert. Der Ratte wird dann intraperitoneal 10 ml einer Glutaraldehydlösung (GA; 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,3) injiziert, um eine Lebendfixierung des Peritoneums zu erreichen.

Zur Biopsieentnahme wird zuerst ein medianer Bauchhautschnitt durchgeführt und dann die Haut von der darunter liegenden Muskelschicht abpräpariert. Anschließend wird die Bauchhöhle eröffnet und aus jedem Quadranten der Peritoneums ca. 1x1 cm große Biopsate, bestehend aus dem Peritoneum und der darunter liegenden Muskelschicht, von der parietalen Bauchwand entnommen. Die Gewebeproben werden unter Zuhilfenahme von Nadeln auf einem Korkstück aufgespannt und so für sechs Stunden in einer mit Glutaraldehydlösung (GA) gefüllten Schale bei 8° C aufbewahrt. Bei Entnahme der Proben aus den Schalen wird die dem Peritoneum abgewandte Seite mit einem Faden markiert. Darauffolgend werden die Biopsien in

mit GA gefüllte Probenköpfe überführt, in denen sie mindestens 24 Stunden gekühlt (4-8 Grad) lagern.

3.1.5 Rasterelektronenmikroskopie

Das Prinzip der Elektronenmikroskopie entspricht größtenteils dem der Lichtmikroskopie. Anstatt einer Lichtquelle wird eine Elektronenquelle verwendet, zur Fokussierung und Lenkung der Strahlen werden elektromagnetische Felder eingesetzt. Während der Lichtstrahl durch das Auge wahrgenommen wird, werden die Elektronen durch einen Detektor registriert und ein Bild errechnet. Die Vorteile der Elektronenmikroskopie liegen im stärkeren Auflösungsvermögen (ca. 1 nm gegenüber 0,1 μm bei der Lichtmikroskopie), der höheren größtmöglichen Vergrößerung (bis 150 000 fach versus ca. 1000 fach) und der größeren Tiefenschärfe. Bei der Transmissionselektronenmikroskopie werden die Proben wie in der Lichtmikroskopie durchstrahlt. Die Bildentstehung der Rasterelektronen-mikroskopie beruht auf reflektierten und in der Probe erzeugten Elektronen. Dadurch kann die Oberfläche einer Probe genau beurteilt werden. Die Beobachtung erfordert jedoch eine besondere Vorbehandlung der Biopsate.

Im Rasterelektronenmikroskop (REM) werden Elektronen aus einer Elektronenquelle freigesetzt und durch ein starkes elektrisches Feld in einem Vakuum beschleunigt. Magnetische Felder bündeln und lenken den Elektronenstrahl so, dass die Proben zeilenförmig abgetastet werden. Das Auftreffen der Elektronen resultiert in Reflektion (Rückstreuerelektronen), Absorption mit der Entstehung von Probenstrom oder Freisetzung weiterer Elektronen (Sekundärelektronen). Rückstreu- und Sekundärelektronen werden durch einen Detektor registriert und hieraus ein Bild errechnet. Das Ergebnis wird auf einem Monitor betrachtet und kann fotografiert oder digital gespeichert werden.

Das verwendete Gerät ist ein DSM 982 Gemini (Zeiss, Deutschland). Der Kathodenstrom beträgt 150 mA und die Beschleunigungsspannung 5 kV. Es wird ein Arbeitsabstand von 10 mm eingehalten. Die Biopsate werden mit 20 bis 5000 facher Vergrößerung betrachtet. Die Dokumentation erfolgt anhand von Photographien und digitaler Speicherung.

3.1.6 Präparation von Proben und Tumorzellen

Nach der Fixierung in Glutaraldehyd erfolgt eine Postfixierung mit Osmiumtetroxid (1% in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,3), die eine geringere Extraktion durch Stabilisierung der Lipide bewirkt. Darüber hinaus wird durch die Anlagerung von Schwermetall die Leitfähigkeit des Präparats erhöht. Vor und nach der Postfixierung werden die Proben mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen (Tabelle 2).

Die Beobachtung im REM erfordert ein Hochvakuum, daher müssen die Proben entwässert und getrocknet werden. Nach der vollständigen Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe werden die Proben mit Hexamethyldisilazan (HMDS; Sigma, Deutschland) infiltriert und luftgetrocknet. Durch seinen geringen Dampfdruck verdampft HMDS so langsam, dass keine das Gewebe schädigenden Oberflächenspannungen entsteht. Im Anschluß an die Trocknung werden die Präparate mit Hilfe von Leitsilber auf Probenteller montiert.

Die getrockneten biologischen Proben haben durch den Wasserverlust ihre Leitfähigkeit eingebüßt. Darüber hinaus bestehen sie aus leichten Elementen mit einer schlechten Sekundärelektronenemission. Um Aufladungen und thermische Belastungen durch das Elektronenbombardement sowie eine schlechte Sekundärelektronenausbeute zu vermeiden, werden die Präparate in einer Hochvakuum – Kleinbeschichtungsanlage (MED 020, BAL – TEC AG, Fürstentum Liechtenstein) mit einer dünnen Goldschicht überzogen.

Maligne Zellen werden mikroskopiert, um sie in den Gewebeproben erkennen zu können. 10^6 maligne Zellen werden aus dem Medium in Glutaraldehyd überführt und sechs Stunden fixiert. Es erfolgt keine Postfixierung. Die Vorgänge Entwässerung, Trocknung und Beschichtung entsprechen der Behandlung der Gewebeproben. Zwischen den einzelnen Vorgängen werden die Tumorzelllösungen mit 200 g zentrifugiert. Nach der Infiltration mit HMDS werden die Zellen ein letztes Mal zentrifugiert und mit einer kleinen Menge HMDS resuspendiert. Ein Tropfen dieser Suspension wird auf einen Objektträger aufgebracht und getrocknet.

Vorgang	Zeitdauer
Fixierung und Postfixierung	
Fixierung in Glutaraldehyd	Mindestens 6 Stunden
Waschen mit Phosphatpuffer	2 x 15 Minuten
Postfixierung mit Osmiumtetroxid	2 Stunden
Waschen mit Phosphatpuffer	2 x 15 Minuten
Entwässerung mit Ethanol:	
70%	2 x 15 Minuten
90%	2 x 15 Minuten
100%	2 x 15 Minuten
Trocknung	
Infiltration mit HMDS	2 x 15 Minuten
Lufttrocknung	Ca. 12 Stunden
Montage auf Probesteller	
Beschichtung der Proben	

Tabelle 2: Präparation von Proben

3.1.7 Befundung und Diagnosestellung

Jedem Präparat wird nach der Untersuchung und Befundung anhand eines standardisierten Auswertungsprotokolls die Diagnose „intaktes Peritoneum“, oder „nicht intaktes Peritoneum“ zugewiesen.

Alle Proben wurden in vier Quadranten eingeteilt, mikroskopiert und bewertet. Dabei werden die Regionen erst in der Übersicht mit niedriger (z.B. 200 facher) Vergrößerung betrachtet. Dann folgt die genaue Betrachtung mit höherer Vergrößerung, um Details analysieren zu können.

Die Befunde werden für jeden Quadranten einzeln in einem Protokoll festgehalten. Die Einzelaspekte des Befundbogens orientierten sich an Literaturangaben über entzündliche Veränderungen des Peritoneums und berücksichtigten die Struktur der peritonealen Oberfläche, den Zustand des Mesothel und das Auftreten von Tumor- oder Entzündungszellen. Zur Differenzierung von Tumor- und Entzündungszellen werden Einzelaufnahmen der Tumorzellen angefertigt. Insgesamt wird so eine einheitliche Dokumentation der Untersuchungsergebnisse ermöglicht. Zusätzlich wird

ein Ausschnitt jeder Probe in 200-, 1000-, 2000- und 5000 facher Vergrößerung fotografiert oder digital gespeichert. Die Bilder dokumentieren eine Übersicht des Präparates, den Zustand des Zellverbundes und Details einzelner Zellen und Zellgrenzen. Der Kamerafokus bleibt während der Dokumentation auf derselben Position. Pathologische Befunde werden in denselben Vergrößerungen festgehalten, um sie mit den regelrechten Strukturen vergleichen zu können.

Die Kriterien bei der Diagnosestellung werden in Anlehnung an die Literatur festgelegt (93,94,95,96).

Als Veränderungen werden betrachtet:

- **Retraktion des apikalen Zellpols der Mesothelzellen**
- **Separation der Deckzellen / Freilegung der Basalmembran**
- **Ablösung des Mesothels von der Basalmembran**
- **Feinfädige oder schwammartige Fibrinbeläge**
- **Leukozyteninfiltration des Peritoneums**

Tabelle 3: Veränderung von Mesothelpräparaten

Aus der Überlegung heraus, dass ein Pneumoperitoneum eher das gesamte Peritoneum schädigt und vereinzelte Veränderungen eher durch andere Ursachen wie z.B. mechanische Manipulation entstehen, wurde bei Auftreten von Veränderungen in keinem oder nur einem Quadranten die Diagnose „intaktes Peritoneum“ gestellt. Traten die Veränderungen in zwei oder mehr Quadranten auf, so wurde die Probe als „nicht intakt“ gewertet. Anzahl und Morphologie der Mikrovilli wurden nicht als Beurteilungskriterium in die Wertung mit einbezogen, da Veränderungen der Mikrovilli nicht auf pathologische Veränderungen auch im entzündlichen Rahmen des Peritoneums deuten lassen (93,94). Ferner schwankt die Anzahl der Mikrovilli auch bei intaktem Mesothel (95,96).

3.1.8 Statistik

Als Grundlage für die Bestimmung der Fallzahlen dienten die Ergebnisse elektronenmikroskopischer Studie nach Pneumoperitoneum anderer Arbeitsgruppen (94). Dort bildeten drei oder vier Tiere jeweils eine Untergruppe. In einem Vorversuch unserer Arbeitsgruppe wurde bei einer Gruppe (sechs Tiere) ein Pneumoperitoneum mit CO₂ und 15 mmHg über dreißig Minuten aufgebaut. Die Biopsientnahmen erfolgten nach 2, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden. Dabei zeigten sich bei allen Tieren in allen Quadranten des untersuchten Präprätes ein intaktes Mesothel. Daraufhin wurde die Quote „nicht intaktes Peritoneum“/„intaktes Peritoneum“ für die Angaben aus der Literatur mit 9:1 und die des Vorversuchs mit 1:9 abgeschätzt. So ergab sich nach Festlegung der Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$ und der Stärke des Tests $\beta = 0,2$ eine Fallzahl von fünf Ratten pro Untergruppe.

Da nominal skalierte Daten vorliegen, wurden diese mit dem χ^2 Test (exakter Test nach Fischer) getestet. Die Ergebnisse jeder Untergruppe wurden dabei einzeln analysiert. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 11.

3.2 Adhäsionsmolekülexpression auf HT-29-Zellen

In einer ersten Versuchsreihe wird die Expression der verschiedenen Adhäsionsmoleküle (E-Cadherin, CD44v6, CD54 und CD29) auf unbehandelten bzw. nicht inkubierten HT-29 Zellen analysiert bzw. mittels Durchflußzytometrie bestimmt.

Anschließend werden in einer zweiten Versuchsreihe die HT-29 Zellen unterschiedlichen Drücken (10 und 20 mmHg) und unterschiedlichen Gasen (Kohlendioxid und Helium) ausgesetzt. Dabei werden die Zellen in einer Druckkammer (Mini-Inkubator „TC2020“) für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgt zu definierten Zeitpunkten die Analyse der Expression der verschiedenen Adhäsionsmoleküle mittels der Durchflußzytometrie nach standardisierter Methodik (siehe 3.2.7).

In einer dritten Versuchsreihe wird die Expression der obengenannten Adhäsionsmolekülen von HT-29 Zellen nach 30 minütiger Inkubation der Zellen in einem sauren Medium (pH 6,4) bzw. einem basischen Medium (pH 8,2) durchflußzytometrisch bestimmt.

3.2.1 Kolonkarzinomzellen (HT-29)

Bei den Kolonkarzinomzellen handelt es sich um eine Adenokarzinomzellreihe des Menschen. Sie ist morphologisch heterogen und schnellwachsend, die Verdoppelungszeit liegt bei ca. 24 Stunden. Diese Zelllinie ist eine der am häufigsten untersuchten Kolonkarzinomzelllinien. Sie wurde 1975 aus einem Adenokarzinom des Kolons etabliert (97). In unseren Versuchsreihen wurden Zellen mit 45 bis 58 Passagen verwendet.

3.2.2 Züchtung von Kolonkarzinomzellen HT-29

Die Karzinomzellen werden in tiefgefrorenem Zustand geliefert. Es folgt das Auftauen der Kultur in einem Wasserbad bei 37 ° C. Unter sterilen Bedingungen werden die Zellen abpipettiert und unter vorsichtiger Zugabe (6-10 ml) von vorgewärmtem Medium (Minimalmedium nach Dulbecco) in ein 10 ml Röhrchen überführt. Die Vitalitätsprüfung erfolgt mit dem Trypanblau-Färbetest. Die Zellsuspension wird bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Zellkultur im

Medium resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation (200 x g für 5 Minuten) werden die Zellen mit dem Kulturmedium unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum in die Kulturflasche überführt.

Die Inkubation der Zellen erfolgt im Brutschrank bei 37 °C und einer CO₂ Konzentration von 5%. Bei erreichter Konfluenz erfolgt die Subkultivierung der Zellen. Hierzu werden die Zellen zunächst mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, anschließend wird die vorgewärmte Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA, 37°C) hinzugegeben und für 3 bis 5 Minuten inkubiert. Hiernach werden die Zellen mit einer sterilen Pipette aufgenommen und in ein Zentrifugenglas mit der doppelten Menge an frischem Medium mit Serumzusatz gegeben. Die Zellsuspension wird bei 200 x g für 10 Minuten abzentrifugiert, in neuem Medium aufgenommen und in eine neue Kulturflasche pipettiert. Gleichzeitig werden von der Zellsuspension jeweils fünf Proben (2×10^6 Zellen) eingefroren. Nach Pipettieren der Suspension in ein Kryoröhrchen und Abzentrifugation (500 x g für 1 Minute) wird der Überstand bis auf 1 ml abpipettiert und das Röhrchen in einem Stickstoffbehälter gelagert.

Für die Implantation der Tumorzellen in die Druckkammer werden die Zellen nach dem beschriebenen Verfahren aufgetaut, die Vitalität der Zellen überprüft und die Zellzahl bestimmt.

3.2.3 Versuchsgeräte und Instrumente

Mini-Inkubator „TC-2020“ (siehe 3.2.3.1)	[spec. LAB]
FACSort-Durchflußzytometer	[Becton Dickinson]
Laminar-Flow-Box	[Clean Air]
Lichtmikroskop	[Olympus]
MiniMACS Separationsständer	[Miltenyi Biotec GmbH]
Neubauer Zählkammer	[Brand]
Pipettboy	[Tecnomara]
Zentrifuge "Megafuge 1.0"	[Heraeus Sepatech]
PH Sonde (pH-Meter)	[WTW, MicoProcessor pH537]

3.2.3.1 Mini-Inkubator „TC-2020“ - Druckkammer

Der Mini-Inkubator „TC-2020“ ist eigens für das Forschungsprojekt von der Firma spec.LAB (Spezielle Forschungs- und Labortechnik, Breiter Weg 33, 12487 Berlin) entwickelt und produziert worden und dient der Kultivierung von Zellen. Sehr vorteilhaft ist hierbei die transparente Auslegung des Inkubator-Gehäuses, was eine stete und unmittelbare visuelle Kontrolle der Inkubator internen Zellzuchtprozesse ermöglicht. Die vorliegende Inkubator-Konstruktion erlaubt ein breites Einsatzspektrum an Kultivierungen und Begasungen, sowohl hinsichtlich der gewünschten Gasarten (Kohlendioxid und Helium) als auch der spezifischen Gas-Parameter (Druck), welche über externe, gasspezifische Druckkontroller zugeführt werden. Der Inkubator verfügt über eine vollelektronische Digital-Meßeinrichtung für Fein-Drücke im Bereich von 0 bis 100 mmHg. Darüber hinaus verfügt der Inkubator über eine interne Temperatur-Meßeinheit, die je nach Versuchserfordernissen frei wählbar ist. Im Sinne eines höchstmöglich stabilen Temperatur-Regimes ist der Mini-Inkubator mit einer aktiven Heiz-Ausrüstung (Thermo.Plus) ausgerüstet worden.

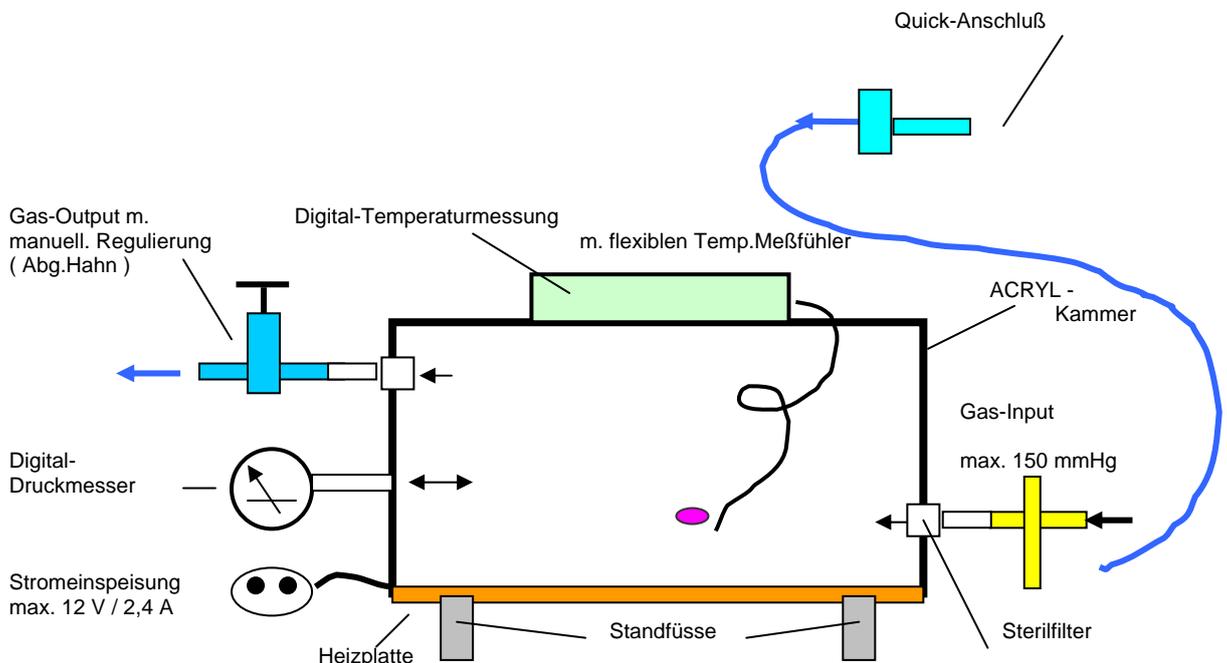


Abb.1: Mini-Inkubator TC2020 (spec.LAB, Spezielle Forschungs- und Labortechnik, Breiter Weg 33 / 12487 Berlin, Tel.: 030/639087262, www.speclab.de)

3.2.4 Durchflußzytometrie

Das Prinzip eines Durchflußzytometers besteht darin, dass eine Suspension von Zellen so in einen Flüssigkeitsstrom eingebracht wird, dass die Zellen sich hintereinander aufreihen und einzeln einen Laserstrahl passieren. Dabei werden durch Messung der Lichtintensität in Richtung des Laserstrahls bzw. senkrecht zum Laserstrahl für jede Zelle entsprechende Werte bestimmt, die der Größe der Zelle und der Granularität entsprechen (sogenanntes Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht). Darüber hinaus werden die durch Antikörper an der Zelle gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe durch den Laser angeregt und emittieren entsprechend langwelligeres Licht, das über Photomultiplier verstärkt ebenfalls detektiert wird und damit ein Maß für die Menge an gebundenem Antikörper und somit ein Maß für die relative Moleküldichte der durch die Antikörper detektierten Moleküle darstellt. Vorteil der Methode ist, dass in kürzester Zeit an einer großen Anzahl an Zellen Informationen über Größe, Granularität und Expression von Antigenen ermittelt werden können.

3.2.5 Verbrauchsmaterialien, Puffer und monoklonale Maus-anti-human Antikörper

1,5 und 2 ml Eppendorfgefäße	[Eppendorf]
10 ml Röhrchen, Polypropylen	[Greiner]
50 ml „Blue-cap“-Röhrchen	[Falcon, Becton Dickinson]
Kulturplatten, Flach/Rundbodenwell	[Falcon, Becton Dickinson]
Pipetten mit Spitzen	[Eppendorf]
sterile Pasteur-Pipetten	[Elkay]
FACS-Puffer (PBS, 10% FKS, 0,1% NaN ₃)	
NaN ₃	[Serva]
PBS	[Gibco BRL]

anti-E-Cadherin	[BD Biosciences]
anti-CD44v6-FITC	[Acris]
anti-CD54-PE	[BD Biosciences]
anti-CD29-PE	[BD Biosciences]
Isotyp-IgG1-PE	[BD Biosciences]
Isotyp-IgG1-FITC	[BD Biosciences]
Isotyp-IgM	[BD Biosciences]
anti-Maus-IgM-PE	[BD Biosciences]

3.2.6 Analyse der Adhäsionsmolekülexpression auf HT-29-Zellen

Jeweils 50 µl der HT-29 Zellsuspension in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml FACS-Puffer werden mit jeweils 5 µl an sättigenden Mengen des entsprechende monoklonalen Antikörpers (jeweils Doppelansätze /Antikörperfärbung) bei 4°C für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Ansätze mit direkt fluoreszenzmarkierten Antikörper werden anschließend mittels FACSort gemessen (siehe 2.3.4). Ansätze mit unmarkierten Antikörpern werden noch einmal gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper, der fluoreszenzmarkiert ist, für weitere 20 Minuten unter den gleichen Bedingungen inkubiert, erneut gewaschen und ebenfalls mittels FACSort gemessen. Es werden jeweils 10.000 lebende HT29-Zellen gemessen und ausgewertet, die Lebend-Gatung erfolgt über die Scatter-Eigenschaften der Zellen.

Als Negativkontrolle wird jeweils ein Ansatz mit Kontroll-IgG entsprechenden Isotyps und entsprechender Fluoreszenz, aber irrelevanter Spezifität mitgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem LYSYS II Software-Paket.

Nach Gatung der lebenden Zellen wird, im Falle einer annähernden Normalverteilung der gefärbten Zellpopulation, der geometrischen Mittelwert der Fluoreszenzintensität, als „geo-mean“ bezeichnet. Nach Bildung von Mittelwerten aus den jeweiligen Doppelansätzen wird der „geo-mean“ der entsprechenden Isotypkontrolle vom „geo-mean“ des spezifischen Antikörpers abgezogen. Dieser Wert gilt als Maß für die Expression der Oberflächenmoleküle und wird als Mittlere Relative Fluoreszenzstärke (MFI) bezeichnet.

3.2.7 Verwendete Computersoftware

CellQuest	[Beckton Dickinson]
LYSYS II	[Beckton Dickinson]
SPSS 11.0 für Windows	[SPSS]

3.2.8 Messzeitpunkte und Verlauf

Die Inkubation der Tumorzellen erfolgt in 6-well-Platten. Dabei befinden sich jeweils pro well 10^6 Tumorzellen in 3 ml Zellmedium. Diese werden in den Mini-Inkubator positioniert und je nach Versuchsanordnung für 30 Minuten kultiviert. Somit ist es möglich, den Einflusses von CO_2 und Helium sowie von 10 bzw. 20 mmHg Atmosphärendruck auf die Tumorzellen zu untersuchen.

Der Inkubator wird gut eine Stunde vor Messung mit Hilfe der Heizplatte auf 37°C erwärmt. Unmittelbar nach der Inkubation werden die Tumorzellen abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert.

Anschließend wird eine Probe zur FACS Analyse in FACS Puffer suspendiert. Die anderen Proben werden erneut in frischem Medium suspendiert und im Brutschrank bei 37° Grad gelagert. Die gleiche Procedur erfolgt nach 12h, 24h, 48h und 96 Stunden (Tabelle 4).

Parallel zu jeder Behandlung bzw. Inkubation wird jeweils eine unbehandelte Kontrolle (HT-29 Karzinomzellen) zu den entsprechenden Zeitpunkten zur FACS Analyse in FACS Puffer suspendiert und die entsprechenden Adhäsionsmoleküle bestimmt, um somit Schwankungen innerhalb der Messreihen auszuschließen.

Um den direkten Einfluß von pH-Veränderungen des Mediums unabhängig von den verwendeten Gasen zu untersuchen, wurden in einer dritten Versuchsreihe jeweils 10^6 Tumorzellen in 3 ml 6,4 saurem bzw. 8,2 basischen Medium suspendiert. Zu diesem Zweck wird PBS Medium mittels einer H_2 Lösung bzw. NaOH Lösung auf die entsprechenden pH-Werte titriert. Die Kontrolle erfolgt mit einer pH-Sonde (WTW, MicoProcessor pH537). Nach 30 Minuten werden die Zellen abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Eine Probe wird zur FACS-Analyse in FACS Puffer suspendiert. Die anderen Proben werden im Brutschrank bei 37° Grad gelagert. Die gleiche Procedur erfolgt nach 12, 24, 48 und 96 Stunden (Tabelle 4). Parallel zu jeder

Behandlung wird ebenfalls jeweils eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt, um somit Schwankungen innerhalb der Messreihen auszuschließen.

N=5	CO ₂ Begasung mit 10 mmHg	1h	12h	24h	48h	96h
N=5	CO ₂ Begasung mit 20 mmHg	1h	12h	24h	48h	96h
N=5	Helium Begasung mit 10 mmHg	1h	12h	24h	48h	96h
N=5	Helium Begasung mit 20 mmHg	1h	12h	24h	48h	96h
N=5	Medium pH 6,4	1h	12h	24h	48h	96h
N=5	Medium pH 8,2	1h	12h	24h	48h	96h

Tabelle 4: Messzeitpunkte

3.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe von SPSS-11.0 für Windows. Zur Anwendung kommen nichtparametrische Tests, Korrelationsanalyse nach Friedman (Test für mehrere verbundene Stichproben).

3.3 Intrazelluläre Kalziummessung

3.3.1 Prinzip der Kalziummessung mit FURA2-AM

Für die intrazelluläre Kalziumbestimmung wird der Fluoreszenzfarbstoff FURA2-AM (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) verwendet. Die Fluoreszenzeigenschaften von FURA2-AM sind abhängig von der umgebenden Kalziumkonzentration. Bei steigender Kalziumkonzentration wird die Emission (510 nm Emissionsmaximum bei 22°C) bei einer Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge von 340 nm stärker, bei 380 nm schwächer und bei 360 nm bleibt die Emission in Bezug auf die Kalziumänderung konstant.

Liegt FURA2-AM als ungebundenes Anion vor (also völlig ungesättigt mit Kalziumionen) ist das Absorptionsmaximum 360 nm, in einem FURA-Kalzium-Komplex 340 nm.

Setzt man also voraus, dass die zu untersuchende Zelle homogen mit FURA2-AM beladen ist, so zeigt eine Veränderung der mit 360 nm angeregten Emissionsintensität eine Veränderung der FURA2-AM Konzentration in der sonst nicht veränderten HT-29 Zelle, nicht aber eine Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ an. Somit ist der Verlauf des 360 nm- Signals eine gute Kontrolle, ob bei Veränderungen der 340 und 380 nm-Signale tatsächlich eine Verschiebung der Kalziumverhältnisse stattgefunden hat (98). Für die Darstellung der relativen Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ wird der Quotient der gemessenen Emissionsintensität der Exzitationswellenlängen 340 nm und 380 nm benutzt (340/380 Ratio). Durch diesen mathematischen Schritt ist es möglich, die Kalziumverhältnisse unabhängig der FURA2-AM Konzentration aufzuzeigen und damit eine bessere Vergleichsmöglichkeit der einzelnen Versuche untereinander zu ermöglichen. Die Änderung des Absolutwertes dieses Quotienten ist proportional zur Änderung der $[Ca^{2+}]_i$. In den Beschreibungen der Versuchsergebnisse wird eine Änderung der Ratio mit Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ gleichgesetzt.

3.3.2 HT-29 Zellen und Beladung mit FURA2-AM

Die Züchtung der HT-29 Kolonkarzinomzellen erfolgt wie im Kapitel 3.2.2 beschrieben. Zur intrazellulären Kalziummessung werden die HT-29 Zellen auf runden Glasplättchen (Assistent, Berlin, Deutschland, Durchmesser 24 mm) ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Insgesamt reichen ca. 10^5 Zellen pro Aussaat aus, um eine ausreichende Zellzahl auf den Glasplättchen zu erhalten.

Die Glasplättchen sind deswegen erforderlich, da diese zur eigentlichen Kalziummessung in die entsprechenden Messkammern platziert werden können (siehe 3.3.3). Für die intrazelluläre Kalziumbestimmung wird der Fluoreszenzfarbstoff FURA2-AM (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) verwendet (1 $\mu\text{mol/L}$), (siehe 3.3.1). Alle Messungen werden in frischen Medium durchgeführt.

3.3.3 Meßsystem (Inoquant[®] und Digitale Bildanalyse)

a) Inoquant[®]

Hierbei handelt es sich um ein Inversionsmikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland), das mit einer Fluoreszenzlichtquelle versehen ist (HbO-Lampe, 100W). Die Anregung erfolgt über alternierende Filter (340, 360, 380 nm) mit einer Wechselfrequenz von 30 Hertz (99). Das durch die drei verschiedenen Wellenlängen entstehende Emissionslicht wird von einem Photomultiplier registriert und mittels eines Rechners ausgewertet. Mit Hilfe einer Blende kann der Messbereich genau über einer Einzelzelle eingestellt werden.

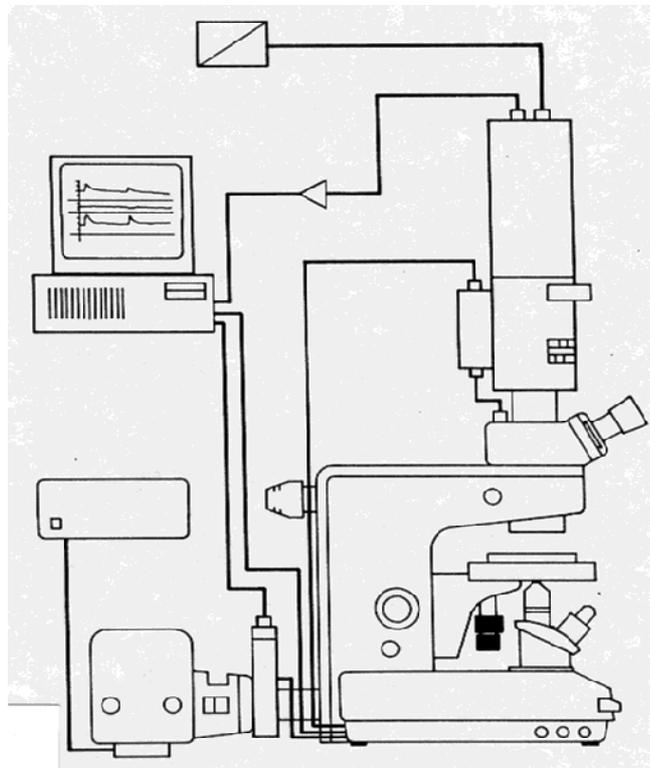


Abb.2: Schematische Darstellung des Inoquant[®] - Meßsystems

b) Digitale Bildanalyse:

Regionale Kalziumänderungen werden mit Hilfe eines digitalen Bildanalyse-Systems (T.I.L.L. Photonics, Planegg, Deutschland) untersucht. Dieses System ist mit einem Inversionsmikroskop (DMIRB, Leica) und einem Zeiss Fluar 40x/1.30 Öl-Inversionsobjektiv ausgestattet. Die Exzitationswellenlängen 340 nm und 380 nm werden von einem Monochromator erzeugt. Mit Hilfe einer „slow scan CCD“-Kamera werden Fluoreszenzintensitäten digital registriert und in einer nachfolgenden Rechneinheit bearbeitet. Im Gegensatz zum Ionoquant kann an diesem System neben zeit- auch ortsabhängige Kalziumbestimmungen durchgeführt werden.

Bei beiden Meßmethoden wird die Autofluoreszenzeigenschaften der HT-29 Zelle bestimmt. Dazu werden mit FURA2-AM beladene HT-29 Zellen den oben beschriebenen Exzitationswellenlängen ausgesetzt und die Ratio der Emissionsintensität gemessen.

3.3.4 Zellinkubation und Messzeitpunkte

Die Zellinkubation bzw. Begasung erfolgt in dem unter 3.2.3.1 beschriebenen Mini-Incubator. Die Inkubation wird jeweils für 30 Minuten bei verdunkelten Versuchsverhältnissen durchgeführt. Als Inkubationsgas wird wie schon in den vorhergehenden Versuchen Kohlendioxid oder Helium bei einem Inkubationsdruck von 10 mmHg bzw. 20 mmHg verwendet. Jeder Versuch wird insgesamt 5 mal durchgeführt (n=5). Unmittelbar vor der Inkubation erfolgt die Zugabe des Farbstoffes FURA2-AM zur Kalziumbestimmung. Anschließend erfolgt entweder unmittelbar nach Inkubation oder 30 Minuten später die Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration wie oben beschrieben.

3.3.5 Statistik

Relative $[Ca^{2+}]_i$ Unterschiede werden über Vergleiche der entsprechenden Fluoreszenzemissionen bei 340/380 nm Exzitationswellenlängen analysiert. Angegeben sind die Änderungen der Emissionsintensitätsverhältnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung. Zellen, die nach unterschiedlichen Vorbehandlungen verändert sind, werden anhand des ungepaarten t-Test nach vorheriger Prüfung auf Normalität mit der Kontrolle verglichen. P-Werte kleiner als 0,05 werden als statistisch signifikant gewertet (Boxplot).