

Durchflusszytometrische Bestimmung der Farbstoffausbreitung über Gap-Junction-Kanäle

Studienarbeit
vorgelegt von
Gunnar Schulz

Biologisches Institut der Universität Stuttgart
Abteilung Biophysik
Prof. Dr. D.F. Hülser

Stuttgart
1999

Diese Arbeit wurde von mir selbständig und
nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt.

1	Einleitung	5
2	Material und Methoden	6
2.1	Zellkultur	6
2.1.1	Zell-Linien	6
2.1.2	Zellkultur	6
2.1.3	Zellzahlbestimmung	7
2.1.4	Ansetzen der Monolayerkulturen	7
2.2	Kopplungsansatz	8
2.2.1	Fluoreszenzfarbstoffe	8
2.2.2	Färben der Donorzellen	9
2.2.3	Kopplungsansatz	9
2.2.4	Probenvorbereitung	10
2.2.5	Fotografische Dokumentation	10
3	Theorie zur Durchflusszytometrie	11
3.1	Einleitung	11
3.2	Aufbau des FACStar-Plus™	11
3.3	Kalibrierung	13
3.4	Fokussierung	13
3.5	Reinigung des FACStar Plus™	14
4	Ergebnisse	15
4.1	Mikroskopische Betrachtung der Calceinausbreitung	15
4.2	Durchflusszytometrische Messung der Calceinausbreitung	16
4.2.1	Vergleich der Messungen mit 1 und 2 Lasern	16
4.2.2	Auswertung	18
4.2.3	Zusammenfassung der Kopplungsraten	21
4.2.4	Homo- und heterospezifische Kopplung	21
4.2.5	Homospezifisch-heterotypische Kopplung	21
5	Diskussion	22
6	Literatur	26
7	Anhang	26
7.1	Mikroskope	27
7.1.1	IM 35	27
7.1.2	Axiophot	27
7.2	Zusammensetzung verwendeter Medien und Lösungen	27
7.2.1	Eagels Minimum Essential Medium, Dulbecco`s Modification (DMEM)	27
7.2.2	Eagels Minimum Essential Medium, Dulbecco`s Modification mit wenig Glucose	28
7.2.3	RPMI-Medium	28
7.2.4	Phoshatgepufferte Lösung (PBS)	29
7.2.5	Trypsin Lösung	29

Danksagung

Abkürzungen:

BP	Bandpass
CASY1	Cell Analyser System
c_r	Kopplungsrate
Cx	Connexin
dest.	destilliert
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMEM	Eagels Minimum Essential Medium, Dulbecco's Modifikation
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECACC	European collection of animal cell culture
FACS	Fluorescence activated cell sorter, Durchflusszytometer
FSC	Forward Scatter, Detektor für gebeugtes Licht
FKS	Fötales Kälberserum
FL1	Fluoreszenzkanal 1 des Durchflusszytometers
FL2	Fluoreszenzkanal 2 des Durchflusszytometers
FL3.2	Fluoreszenzkanal 3.2 des Durchflusszytometers
g	Erdbeschleunigung, ca. $9,81\text{m/s}^2$
kd	Kilodalton
mM	millimolar
NKS	Neugeborenen Kälberserum
nm	Nanometer
PBS ⁻	phosphatgepufferte Lösung
PBS	phosphatgepufferte Lösung mit Magnesium und Calcium
SSC	Side Scatter, Detektor für seitlich gestreutes Licht

1 Einleitung

Gap-Junction-Kanäle verbinden benachbarte Vertebraten-Zellen und ermöglichen den interzellulären Transfer von geladenen und ungeladenen Molekülen bis zu einem Molekulargewicht von 1 kd. Ein Gap-Junction-Kanal ist aus zwei Halbkanälen (Connexonen) aufgebaut, die ihrerseits aus 6 ringförmig angeordneten Proteinuntereinheiten, den Connexinen bestehen. Je nach Gewebe und Spezies kommen verschiedene Connexine vor. Sie werden mit Cx und ihrem jeweiligen Molekulargewicht in kd bezeichnet. Zur Zeit sind etwa 20 unterschiedliche Connexine bekannt [1-4]. Die Existenz funktioneller Gap-Junction-Kanäle kann mit Fluoreszenzfarbstoffen untersucht werden (z.B. Lucifer Yellow). Dabei wird der Farbstoff durch eine Glasmikroelektrode in eine Zelle injiziert und die Kopplung durch Auszählen der gefärbten Zellen im Mikroskop bestimmt [5, 6]. Die Ergebnisse dieser Methode variieren, z.B. mit dem Grad der Zell-Schädigung durch die Injektion. Eine genauere Methode zur Quantifizierung der Zell-Zell Kopplung ist die Farbstoff-Beladungs-Technik mit Calcein AM [7]. Calcein AM ist ein membranpermeables Molekül, das im Inneren einer intakten Zelle durch unspezifische Esterasen hydrolysiert wird. Calcein kann nicht mehr frei durch die Membran diffundieren, aber durch Gap-Junction-Kanäle von Zelle zu Zelle gelangen. Gibt man die farbstoffbeladenen Donorzellen auf einen Monolayer ungefärbter Rezipientenzellen, kann man bei gut gekoppelten Zellen im Mikroskop schon nach 30-60 Minuten die Farbstoffausbreitung beobachten. Um die Farbstoffpermeabilität zu quantifizieren, müssen Donorzellen und gefärbte Rezipientenzellen gezählt werden. Wie bei der Injektionsmethode variiert das Ergebnis mit der Qualität der mikroskopischen Ausrüstung, der Auswahl des gefärbten Areals auf dem Monolayer und der Unterscheidung zwischen gefärbten und nicht gefärbten Zellen. Ein weiterer Nachteil des Auszählens am Mikroskop ist der große Arbeitsaufwand. In dieser Arbeit wurde die Farbstoff-Beladungstechnik mit der Fluoreszenz aktivierten Durchflusszytometrie gekoppelt [8]. Durch die große Anzahl der untersuchten Zellen eines Ansatzes ermöglicht diese Methode eine verbesserte Auflösung gegenüber der Injektionsmethode. Es wurden die Kopplungsraten c_r verschiedener Ansätze mit 6 Zell-Linien untersucht. Die Kopplungsrate ist die Anzahl gefärbter Rezipientenzellen pro eingesetzter Donorzelle. Es hat sich gezeigt, daß die Kopplung nicht nur vom Connexintyp (homo- und heterotypischer Kontakt), sondern auch von zellspezifischen Faktoren, wie z.B. der Connexinmenge und der Beweglichkeit der Zellen, abhängt (homo- und heterospezifischer Kontakt).

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zell-Linien

Für meine Untersuchungen verwendete ich folgende permanent wachsende Zell-Linien.

BICR/M1R_k-Zellen (ECACC #96112021) wurde 1969 als permanent wachsende in vitro Kultur aus Zellen eines Brusttumors der Marshall Ratte etabliert [9].

HeLa-Zellen (ECACC #96112022) sind epitheloid wachsend, stammen aus einem menschlichen Gebärmutterhalskrebs (Cervixcarzinom) und wurden 1951 erstmals in Kultur gebracht [10].

HeLa Cx40-Zellen sind Connexin 40 transfizierte HeLa-Zellen [11].

HeLa Cx43-17-Zellen sind Zellen der HeLa Zell-Linie, die stabil mit Connexin 43 transfiziert wurden [12].

SV40-3T3-Zellen (SV40-3T3, Art.-Nr.: 05-526-83, ICN Biomedicals, Meckenheim, Deutschland) sind virustransformierte, embryonale Mausfibroblasten [13].

RIN Cx43-Zellen sind Zellen eines transplantierten Tumors in den Langerhansschen Inseln des Pankreas einer Ratte, die 1980 in Kultur gebracht [14] und 1995 stabil mit Connexin 43 transfiziert wurden [15].

2.1.2 Zellkultur

Alle Kultivierungsarbeiten sowie die Aussaat der Zellen in Petrischalen erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitsarbeitsbank (LF-MRF 06.18, Prettl Laminarflow Prozesstechnik, Bempflingen, Deutschland). Alle Glasgeräte wurden für 1,5 Stunden bei 180°C im Wärmeschrank sterilisiert. Die Zellen wurden als Monolayerkulturen in Schräghalsflaschen (Cellstar Gewebekulturflaschen, 250 ml, 75 cm², Art.-Nr.: 658170, Greiner, Nürtingen, Deutschland) in einem befeuchteten und begasteten Brutschrank (B 5060 EK/CO₂, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 8% CO₂-Gehalt kultiviert. BICR/M1R_k, HeLa, HeLa Cx40 und HeLa Cx43-17 wurden in Eagles Minimum Essential Medium, Dulbecco's Modification (DMEM, Art.-Nr.: T043-10, Biochrom, Berlin, Deutschland, Zusammensetzung siehe Anhang), SV40-3T3 in DMEM mit wenig Glucose (DMEM Low Glucose, Art.-Nr.: 31600-083, Life Technologie, Karlsruhe, Deutschland, Zusammensetzung siehe Anhang) und RIN Cx43 in RPMI-Medium (RPMI 1640, Art.-Nr.: T121-10, Biochrom, Zusammensetzung siehe Anhang) kultiviert. Alle Medien wurden vor ihrer Verwendung steril filtriert. Den Medien für die BICR/M1R_k und HeLa Zellen wurden je

10% Neugeborenen Kälberserum (NKS, Art.-Nr.: S0125, Biochrom), denen der anderen Zell-Linien jeweils 10% Fötale Kälberserum (FKS, Art.-Nr.: S0115, Biochrom) zugesetzt. Als Selektionsfaktor wurde den Medien der transfizierten Zell-Linien HeLa Cx43-17 und RIN Cx43 Geneticin (Art.-Nr.: G-9516, Sigma, Steinheim, Deutschland; RIN Cx43 200 µg/ml, HeLa Cx43-17 240 µg/ml) und HeLa Cx40 1 µg/ml Puromycin (Art.-Nr.: P-8833, Sigma, Steinheim, Deutschland) zugesetzt. Alle Medien wurden mit Streptomycin (Art.-Nr.: 35500, Serva) und Penicillin G (Art.-Nr.: P-7794, Sigma) versetzt, um Bakteriumwachstum zu vermeiden. Alle Zell-Linien wurden 2 mal pro Woche umgesetzt. Dazu wurden sie mit PBS⁻ gewaschen und mit 0,25%igem Trypsin (Art.-Nr.: 37290, Serva) vom Flaschenboden gelöst, in frischem Medium aufgenommen und in neue Flaschen überführt.

2.1.3 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde ein Cell Analyser System (CASY1, Schärfe-System, Reutlingen, Deutschland) verwendet, das nach dem Coulter Prinzip funktioniert [16]. Der Porendurchmesser der Kapillare betrug 80 µm. Es wurden je 100 µl der trypsinierten, in PBS, bzw. Medium aufgenommenen Zellen zu 19,9 ml isotonischer Lösung gegeben (Isoton II, Art.-Nr.: 8448011, Coulter, Krefeld, Deutschland). Davon wurden je dreimal 400 µl am CASY1 gemessen.

Der Coulter Counter bietet die Möglichkeit eine Mindestgröße für gemessene Partikel festzulegen. Alle Teilchen, die unterhalb dieser Grenze liegen, werden als Schmutz gewertet und nicht in die Zählung einbezogen. Das CASY1 stellt das Ergebnis der Messung als Größenverteilung am Computer dar. Anhand des Diagramms wird sowohl eine Größenunter-, als auch eine Größenobergrenze festgelegt. Die Abtrennung von Schmutz und Zelldebris wird somit genauer. Des Weiteren bietet das Diagramm eine schnelle Vitalitätskontrolle [17].

2.1.4 Ansetzen der Monolayerkulturen

Für alle Untersuchungen wurden die Zellen am Vortag in Petrischälchen (Art.-Nr.: 150288, Nunclon Surface, 60x15mm, Nalge Nunc International, Wiesbaden, Deutschland) eingesät. Dazu wurden die Zellen einer oder mehrere Kulturflaschen mit PBS⁻ gewaschen, trypsiniert und im jeweiligen Medium aufgenommen. Die angestrebte Zellzahl am Versuchstag entsprach etwa einem konfluenten Monolayer (Tab.1).

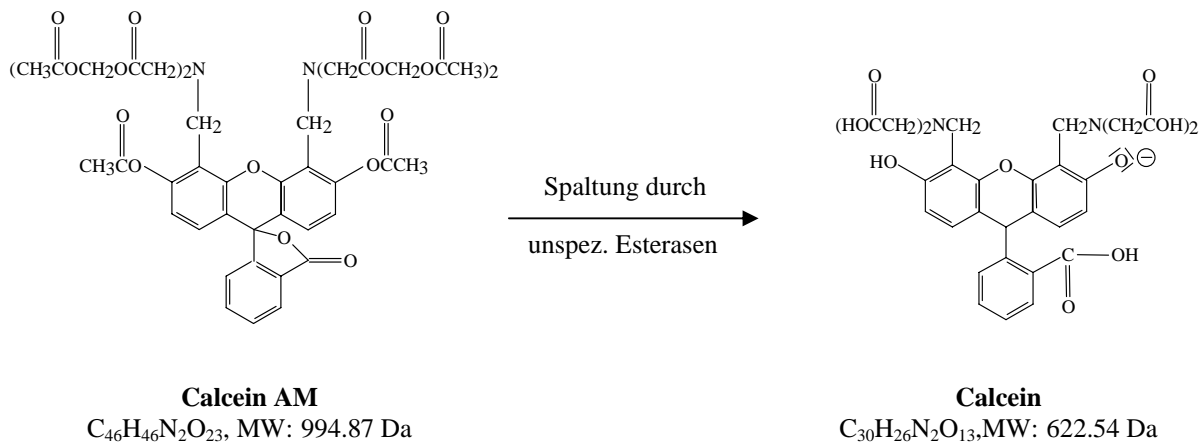
Tabelle 1: Anzahl der Zellen pro Petrischälchen am Versuchstag (N_V) und der am Vortag eingesäten Zellen (N_S) verschiedener Zell-Linien

Zell-Linie	N_S	N_V
MICR/M1R _k	$8(10^5)$	$2(10^6)$
HeLa Cx43-17	$1,8(10^6)$	$2,4(10^6)$
3T3	$1(10^6)$	$3,2(10^6)$
RIN Cx43	$5,5(10^6)$	$10(10^6)$
HeLa	$1,8(10^6)$	$2,4(10^6)$

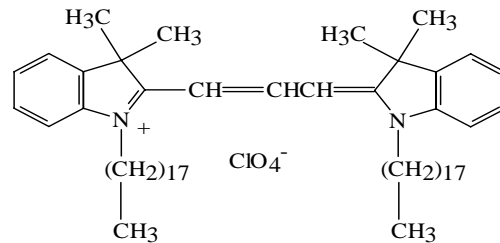
2.2 Kopplungsansatz

2.2.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Calcein AM (Art.-Nr.: C-3099, Molecular Probes, Eugene, USA) wird durch unspezifische Esterasen zum Fluoreszenzfarbstoff Calcein gespalten. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 494 nm, sein Emissionsmaximum bei 517 nm.

**Abb. 1:** Chemische Formel von Calcein AM und dessen Spaltung zu Calcein.

DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Art.-Nr.: D-282, Molecular Probes) lagert sich mit seinen langen Kohlenwasserstoffketten in der Plasmamembran ein. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 549 nm, sein Emissionsmaximum bei 565 nm.



DiI

$C_{59}H_{97}ClN_2O_4$, MW: 933.88 Da

Abb. 2: Chemische Formel von DiI.

2.2.2 Färben der Donorzellen

Für die Färbung wurden die Zellen mit Trypsin vereinzelt und in Medium aufgenommen. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 500g wurde der Überstand abgezogen und das Zellpellet in 2 ml Färbelösung (268 mM Glucose, 5 μ M Calcein AM und 9 μ M DiI in dest. H_2O) je Schälchen resuspendiert. Während der 30 minütigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen alle 5 Minuten mit einer Pasteurpipette suspendiert. Anschließend wurde die Lösung 10 Minuten bei 500g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zell-Pellet in ca. 5 ml PBS gewaschen. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt, das Zellpellet anschließend in Medium aufgenommen und die Zellzahl am CASY1 bestimmt.

2.2.3 Kopplungsansatz

Vor jedem Kopplungsansatz wurde ein Schälchen mit Rezipientenzellen ausgezählt. Die Donorzellen wurden im Verhältnis 1:50 (Donor:Rezipient) auf den Rezipientenmonolayer gegeben. Dabei wurden die Donorzellen auf dem Monolayer durch Schwenken der Schälchen gleichmäßig verteilt. Es wurden jeweils drei identische Kopplungsansätze mit 3 Stunden Kontaktzeit durchgeführt.

2.2.4 *Probenvorbereitung*

Nach der 3 stündigen Inkubation wurden die Schälchen zur Kontrolle unter einem inversen Mikroskop mit Fluoreszenzausstattung betrachtet (IM 35, Zeiss, Oberkochen, Deutschland; Filter und Objektive siehe Anhang). Anschließend wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen, trypsinisiert und in 2,5 ml Medium aufgenommen. Zusätzlich zu den Kopplungsansätzen wurde immer ein Schälchen mit unbehandelten Rezipientenzellen trypsinisiert. Aus jedem Ansatz wurde 1ml in ein FACS-Röhrchen (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) überführt, mit 1 ml PBS verdünnt und im Durchflusszytometer gemessen (FACStar PlusTM, Art.-Nr.: 90111B, 1987, Becton Dickinson).

2.2.5 *Fotografische Dokumentation*

Zur fotografischen Dokumentation wurden die Zellen im Schälchen auf einem Deckglas kultiviert und der Kopplungsansatz wie beschrieben durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Deckgläser vorsichtig mit PBS gespült und auf einen Objektträger gelegt. Für die Aufnahmen wurde ein Mikroskop mit Fluoreszenzausstattung verwendet (Axiophot, Zeiss, Objektive und Filter siehe Anhang).

3 Theorie zur Durchflusszytometrie

3.1 Einleitung

Im Durchflusszytometer können flüssige Proben auf verschiedene Parameter gleichzeitig untersucht werden. Auf den Probenstrom sind 1 oder mehrere Laser fokussiert. Trifft das Laserlicht auf ein Partikel im Probenstrom, z.B. eine Zelle, wird es gestreut, von Fluoreszenzfarbstoffen absorbiert und als Licht niedrigerer Wellenlänge emittiert. Die Veränderungen des Anregungslichtes werden von verschiedenen Photomultipliern erfasst und aufgezeichnet [18]. Das verwendete FACStar-Plus™ ermöglicht die Erfassung von 6 Parametern eines Partikels gleichzeitig, z.B. der Größe, Granularität und mehrerer Fluoreszenzen. Durch die hohe Messgeschwindigkeit (bis 400 Partikel pro Sekunde) können sehr viele Teilchen einer Probe in kurzer Zeit gemessen werden. Die Auswertung der Daten wird durch Computer mit spezieller Software erleichtert.

3.2 Aufbau des FACStar-Plus™

Das Anregungslicht des FACStar-Plus™ wird von zwei wassergekühlten Lasern geliefert (Laser 1: 488 nm, Model.-Nr.: ENTCII-621BD, 1999; Laser 2: 513 nm, Model.-Nr.: Innova 90, 1986, Coherent, Santa Clara, USA). Die Photodiode des Forward Scatters (FSC) detektiert die Größe und Oberflächenbeschaffenheit des gemessenen Partikels. Der Photomultiplier des Side Scatters (SSC) registriert gestreutes Licht im 90° Winkel zum Anregungslicht. Das Signal lässt Schlüsse über die innere Beschaffenheit (Granularität, Komplexität) des gemessenen Partikels zu. Die 4 Photomultiplier zur Erfassung von Fluoreszenzen sind wie der SSC im 90° Winkel zum Anregungslicht angeordnet. Die Multiplier FL1 und FL2 erfassen Signale des Anregungslichtes von Laser 1 (488 nm), FL3.2 und FL4 von Laser 2 (513 nm). Je nach Emissionswellenlänge der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe können geeignete Filter vor die Photomultiplier gesetzt werden. Alle Daten werden auf einem Power Macintosh Computer 7300 (Apple Computer, Cupertino, Kalifornien, USA) aufgezeichnet und mit spezieller Software ausgewertet (Cell Quest™ Version 3.1 für Apple System, 1997, Becton Dickinson und Attractors Version 3.0 für Apple System, 1996, Becton Dickinson).

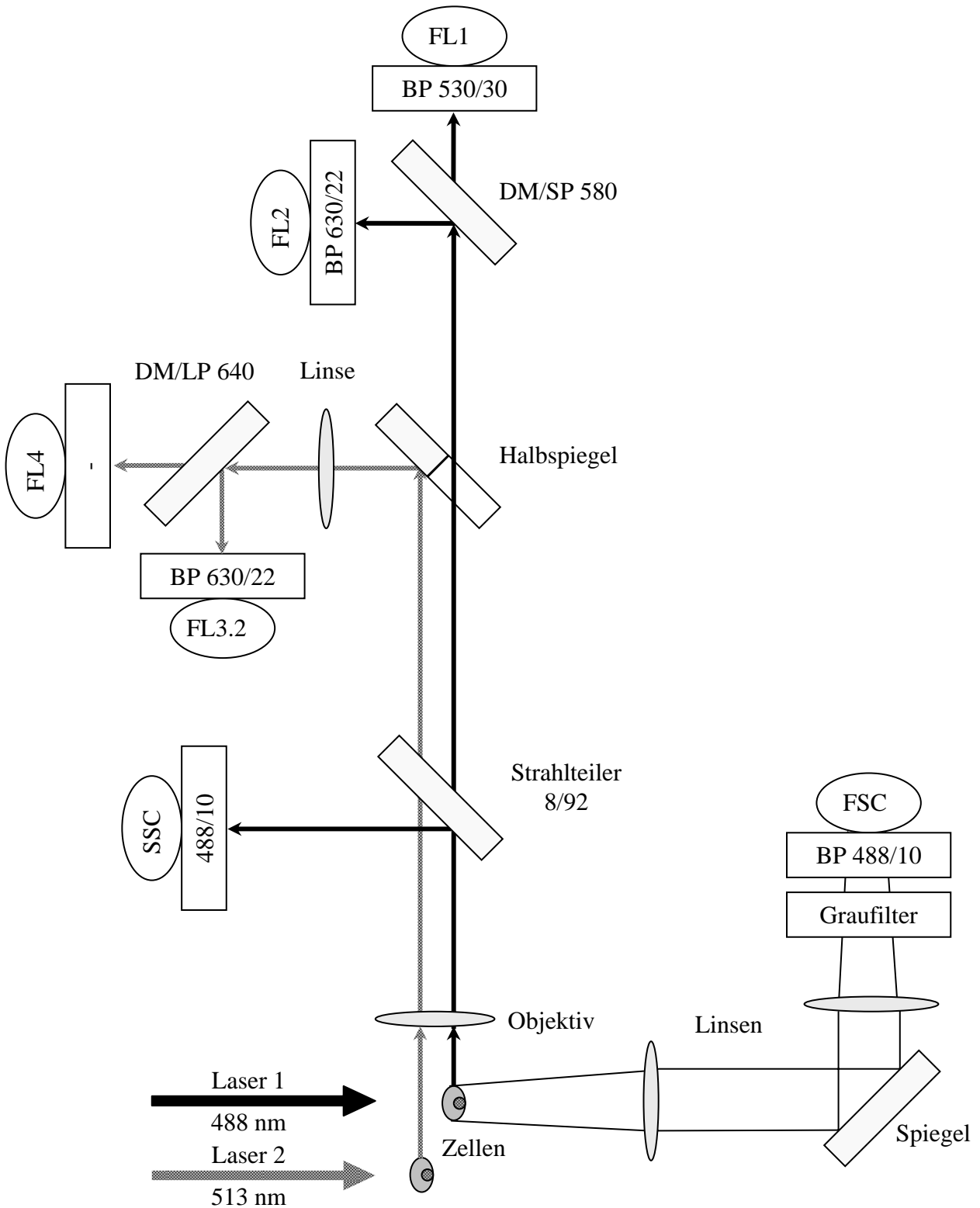


Abb. 3: Strahlengang des FACStar Plus™, incl. aller verwendeten Filter

3.3 Kalibrierung

Am Anfang jeden Messtages ist eine Feinkalibrierung nötig, um die Laser exakt auf den Probenstrom zu fokussieren. Es wurden fluoreszierende Plexigaskügelchen genormter Größe (CaliBRITE™ Beads, Art.-Nr.: 349502, Becton Dickinson) im Durchflusszytometer gemessen und die Signale anhand verschiedener Histogramme ideal eingestellt.

3.4 Fokussierung

Während einer Messung wird die Proben mit einem Überdruck aus dem FACS-Röhrchen durch eine Düse (Öffnungsdurchmesser 70 μm) gedrückt. Der entstehende Probenstrom wird von einem Hüllstrom aus isotonischer Lösung (FACS Flow, Art.-Nr.: 342003, Becton Dickinson) umflossen und dadurch stabilisiert. Der Probendruck entscheidet über den Durchmesser des Probenstroms. Er sollte so gewählt werden, dass der Probenstrom gerade so breit ist wie der Durchmesser der zu messenden Zellen. Nur so kann erreicht werden, dass sich die Zellen hintereinander aufreihen und ideal vom Anregungslicht getroffen werden (Abb.4). Für Probenkonzentrationen von 500.000 - 1.000.000 Zellen pro ml liegt die ideale Durchflussrate bei etwa 400 Partikeln pro Sekunde.

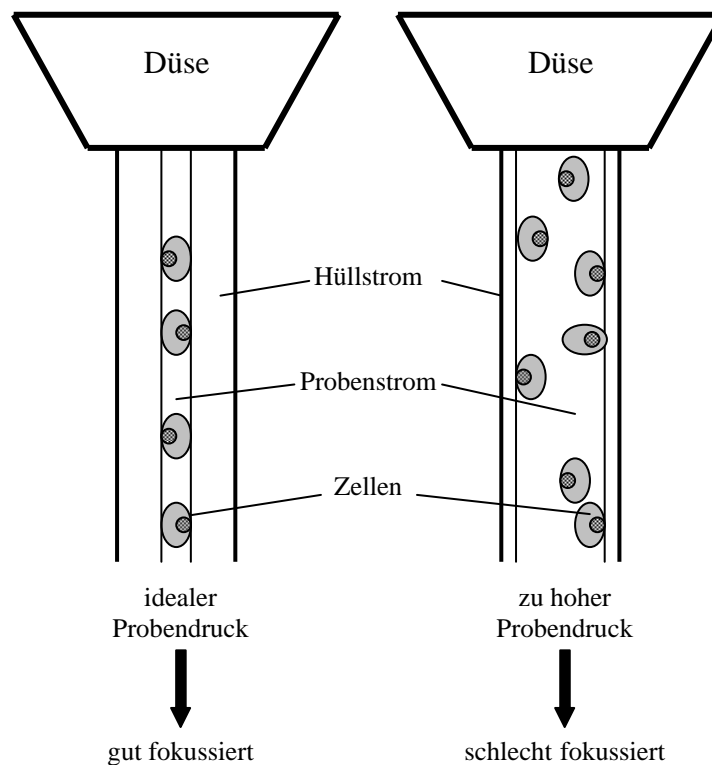


Abb. 4: Darstellung des Probenstroms bei idealem und zu hohem Probendruck.

3.5 Reinigung des FACStar Plus™

Vor jedem Probenwechsel muß das Durchflusszytometer mit FACS Flow gespült werden bis die Durchflussrate nahe null ist. Auf diese Weise wird das Vermischen der Proben verhindert. Nach Beenden der Messungen ist eine gründliche Reinigung wichtig, da sich im System Nischen befinden, in denen sich Material ansammeln kann. Werden die Nischen nicht gereinigt, können von dort ausgespülten Partikel folgende Messungen beeinflussen oder es können sich größere Klumpen lösen, die die Düse verstopfen. Für die Reinigung hat sich das abwechselnde Spülen mit FACS Flow und FACS Rinse (Art.-Nr.: 340346, Becton Dickinson) am besten bewährt.

4 Ergebnisse

4.1 Mikroskopische Betrachtung der Calceinausbreitung

Der lipophile Fluoreszenzfarbstoff DiI färbt die Zellmembran der Donorzellen rot. Das membranpermeable, nicht fluoreszierende Calcein AM wird im Inneren intakter Zellen durch unspezifische Esterase zum grün fluoreszierenden Calcein gespalten. Calcein ist membranimpermeabel, kann aber durch Gap-Junction-Kanäle von Zelle zu Zelle gelangen. Donorzellen sind sowohl rot, als auch grün gefärbt, gekoppelte Zellen fluoreszieren nur grün. Dies ist für die gut koppelnden BCIR/M1R_k nach 2 Stunden Kontaktzeit gezeigt (Abb.5 A-C). Die Farbstoffausbreitung beschränkt sich nicht auf die Zellen mit direktem Kontakt zur Donorzelle, auch weiter entfernte Zellen des Monolayers weisen eine grüne Färbung auf. Dabei sind zunächst die Rezipientenzellen mit direktem Kontakt zur Donorzelle sehr intensiv gefärbt, die weiter entfernten nur schwach. Nach vielen Stunden Kontaktzeit ist dieser Intensitätsgradient nicht mehr erkennbar. Die kopplungsdefizienten HeLa zeigten keine Farbstoffausbreitung (Abb.5 D-F), auch nach 5 Stunden Kontaktzeit sind nur die intensiv fluoreszierenden Donorzellen erkennbar.

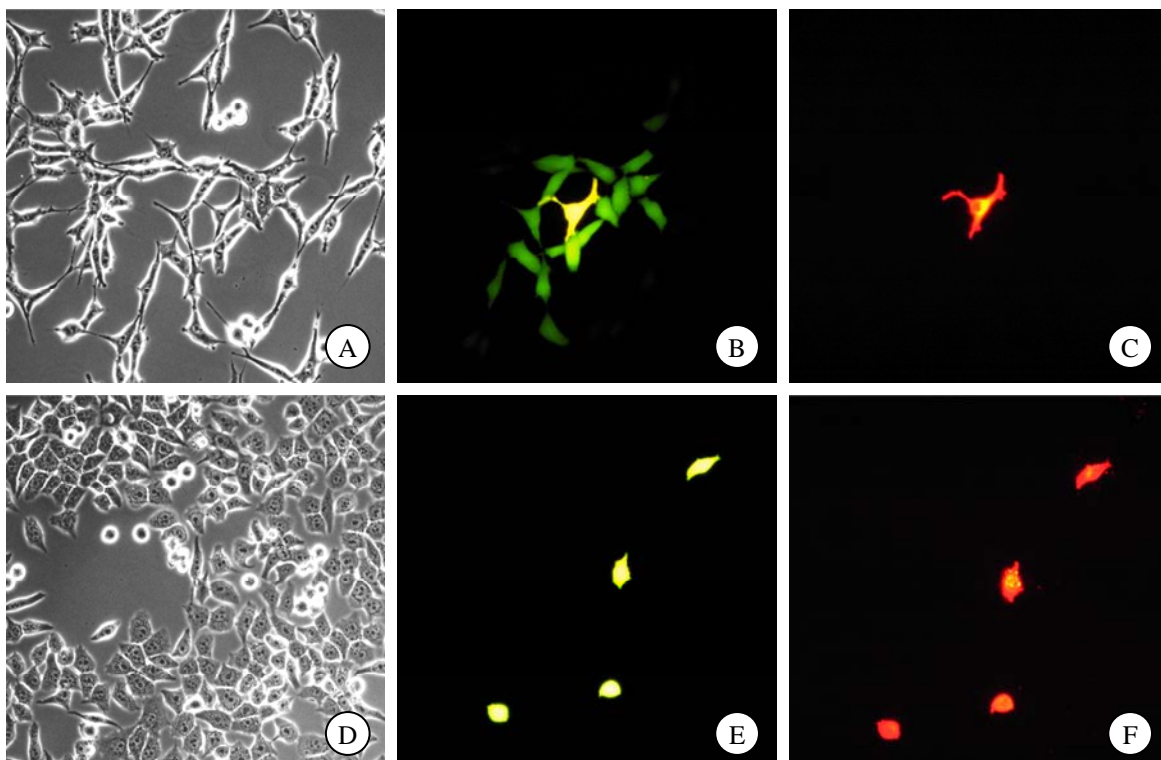


Abb. 5: Farbstoffausbreitung in BICR/M1R_k und HeLa Zellen. (A-C) BICR/M1R_k Zellen. (A) Phasenkontrast. (B) Fluoreszenzbild derselben Region. Calceinausbreitung nach 2 Stunden Kontaktzeit. (C) Fluoreszenzbild der DiI gefärbten Donorzelle. (D-F) HeLa Zellen. (D) Phasenkontrast. (E) Fluoreszenzbild derselben Region. Keine Farbstoffausbreitung nach 3 Stunden Kontaktzeit erkennbar. (F) Fluoreszenzbild der DiI gefärbten Donorzellen.

4.2 Durchflusszytometrische Messung der Calceinausbreitung

4.2.1 Vergleich der Messungen mit 1 und 2 Lasern

Die Abb.6A zeigt das Ergebnis einer Messung von ungefärbten Zellen, die direkt vor der Messung mit doppelt gefärbten Donorzellen gemischt wurden. Im Diagramm sind FL1 (grüne Fluoreszenz = Calcein Signal) und FL2 (rote Fluoreszenz = DiI Signal) abgetragen. Die Ansammlung von Punkten (Punktwolke) in der linken unteren Ecke des Diagramms zeigt die Eigenfluoreszenz der ungefärbten Zellen, die obere rechte Punktwolke die grüne und rote Fluoreszenz der Donorzellen. In Abb.6B+C erkennt man zwischen diesen beiden Punktwolken eine dritte Population, die der grün fluoreszierenden gekoppelten Zellen. Zwischen Messungen mit 1 Laser (Abb.6B) und 2 Laser Anregung (Abb.6C) kann man deutliche Unterschiede in der Form der Punktwolken erkennen. Dabei stimmen die Punktwolken der ungefärbten Zellen weitgehend überein. Bei den Donorzellen in Abb.6B ist die Population rundlich und aufgrund unterschiedlichen Calceinverlustes bei der Kopplung horizontal gestreut. Die Unterpoptulation der gekoppelten Zellen mit 1 Laser Anregung verläuft flach und diagonal, die mit 2 Laser Anregung breit und horizontal, erst bei höheren Calceinkonzentrationen leicht diagonal. Die Trennung zwischen ungefärbten und gekoppelten Zellen mit wenig Calcein, sowie die Identifizierung der Donorzellen fällt bei Messungen mit zwei Lasern leichter. Dies ist für die Auswertung relevant (siehe 4.2.2).

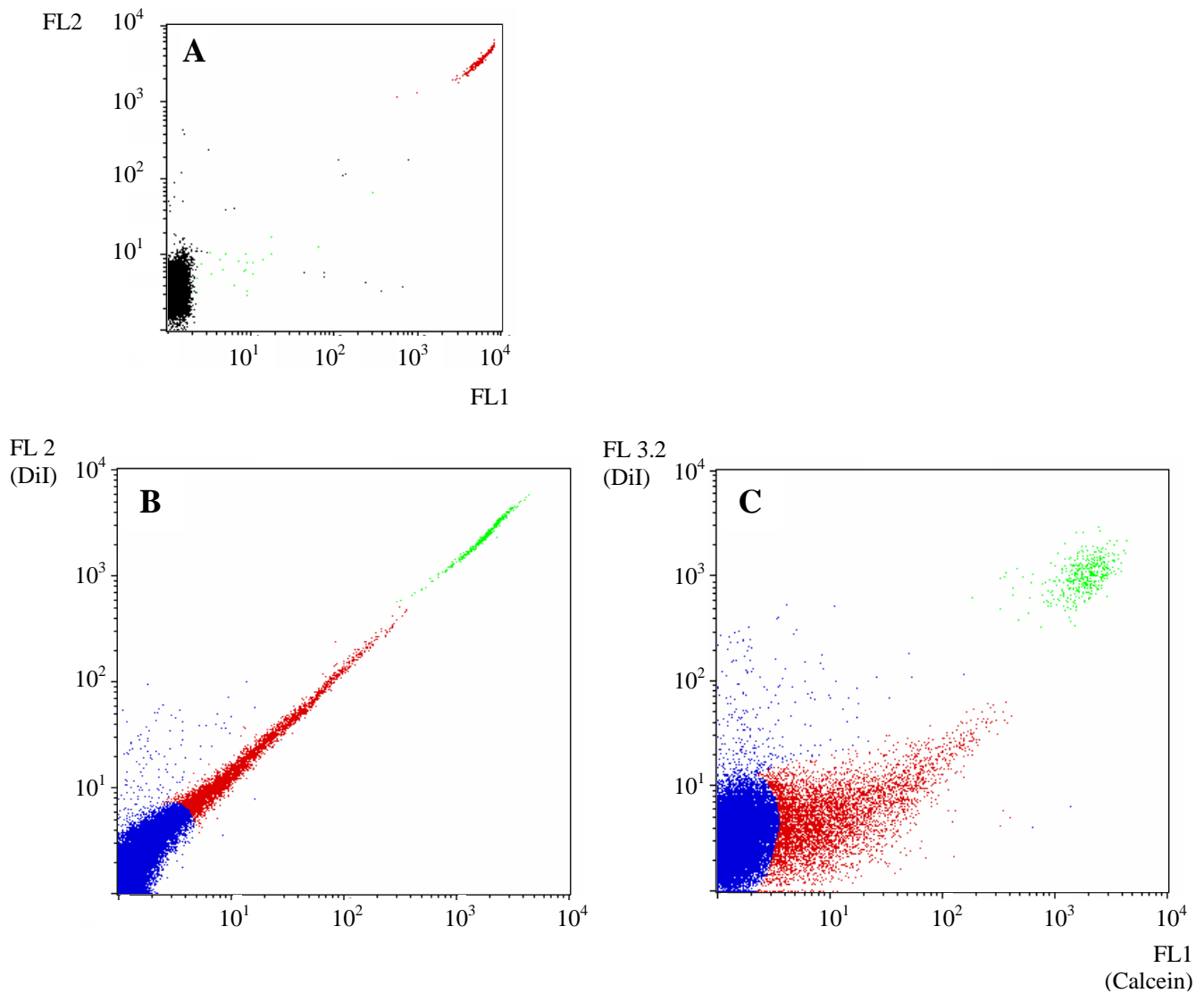


Abb. 6: (A) Messung ungefärbter und doppelt gefärbter BICR/M1R_k-Zellen, die direkt vor der Messung gemischt wurden. (B-C) Vergleich zwischen 1 Laser Anregung und 2 Laser Anregung. (B) Diagramm FL1 gegen FL2 in Cell Quest einer Kopplungsmessung mit HeLa Cx43-17 Donorzellen und 3T3 als Rezipientenzellen, gemessen mit 1 Laser Anregung, 3h Kontaktzeit, $c_r=15$. (C) Diagramm FL1 gegen FL3.2 derselben Messung, gemessen mit 2 Laser Anregung, $c_r=13$.

4.2.2 Auswertung

Die Auswertungssoftware Cell Quest™ bietet die Möglichkeit alle gemessenen Partikel als Punkte in verschiedenen Diagrammen darzustellen. Für die Auswertung meiner Messungen ließ ich alle gemessenen Partikel in einem Punktdiagramm (FSC gegen SSC) darstellen (Abb.7A+8A).

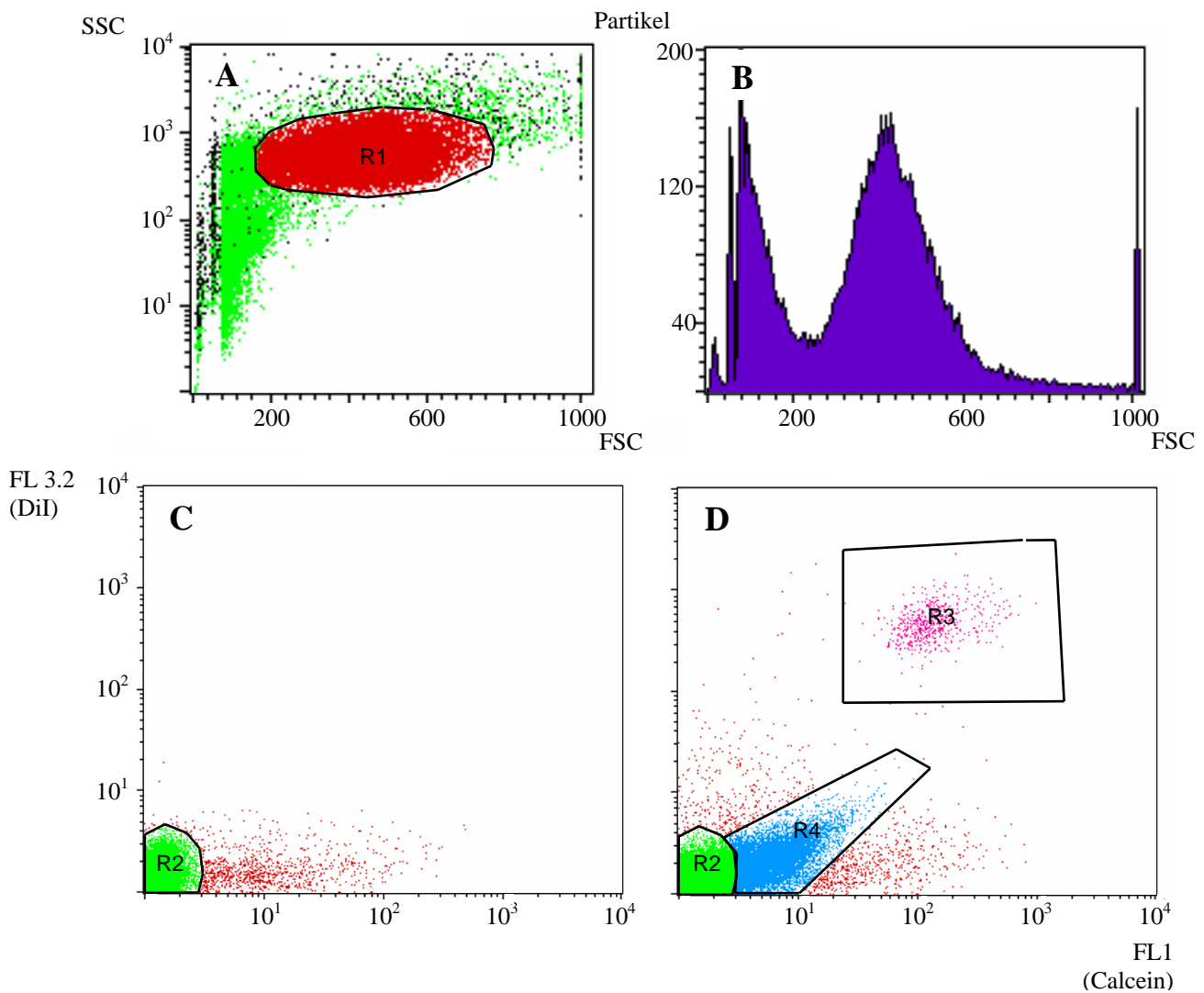


Abb. 7: Darstellungen der Cell Quest™ Auswertung anhand einer Kopplungsmessung mit BICR/M1R_k-Zellen (2 Laser Anregung). (A) Darstellung aller Messereignisse im Diagramm FSC gegen SSC. (B) Histogramm zur Größenverteilung aller gemessenen Partikel. (C) Ergebnis der Messung ungefärbter Zellen. (D) Ergebnis einer Kopplungsmessung, 3h Kontaktzeit, $c_r=26$.

Um Schmutzpartikel und Zelldebris von der Auswertung auszuschließen, wurden alle Punkte, deren Größe und Granularität der von Zellen entsprachen, mit einer elektronischen Umrandung (Gate) versehen. Dabei half die im Histogramm (Abb.7B) dargestellte Größenverteilung der gemessenen Partikel bei der Festlegung der Grenzen. Im weiteren Punktdiagramm (FL1 gegen FL2/FL3.2) wurden nur die umrandeten Punkte dargestellt (Abb.7C+D). Die drei Unterpopulationen (siehe 4.2.1) wurden mit Gates markiert. Um die Abtrennung der ungefärbten Zellen von den schwach gekoppelten Zellen besser zu trennen, wurden zu jeder Messreihe ungefärbte Rezipientenzellen gemessen, die resultierende Punktwolke im Diagramm FL1 gegen FL2/FL3.2 umrandet (Abb.7C) und bei der Auswertung der Kopplungsansätze als Gate für ungefärbte Zellen verwendet. Die Anzahl der Punkte innerhalb der Gates wurde automatisch gezählt und daraus die Kopplungsrate berechnet.

Das Auswertungsprogramm Attractors funktioniert ähnlich wie Cell Quest™ (Abb.8). Die Gates werden Attractor genannt und besitzen eine einheitliche Grundform. Die Position eines Attractor wird automatisch auf den Ereignisschwerpunkt einer Punktwolken festgelegt. Eine Vorlage mit Attractoren für jede Unterpopulation wurde erstellt und für alle Auswertungen verwendet.

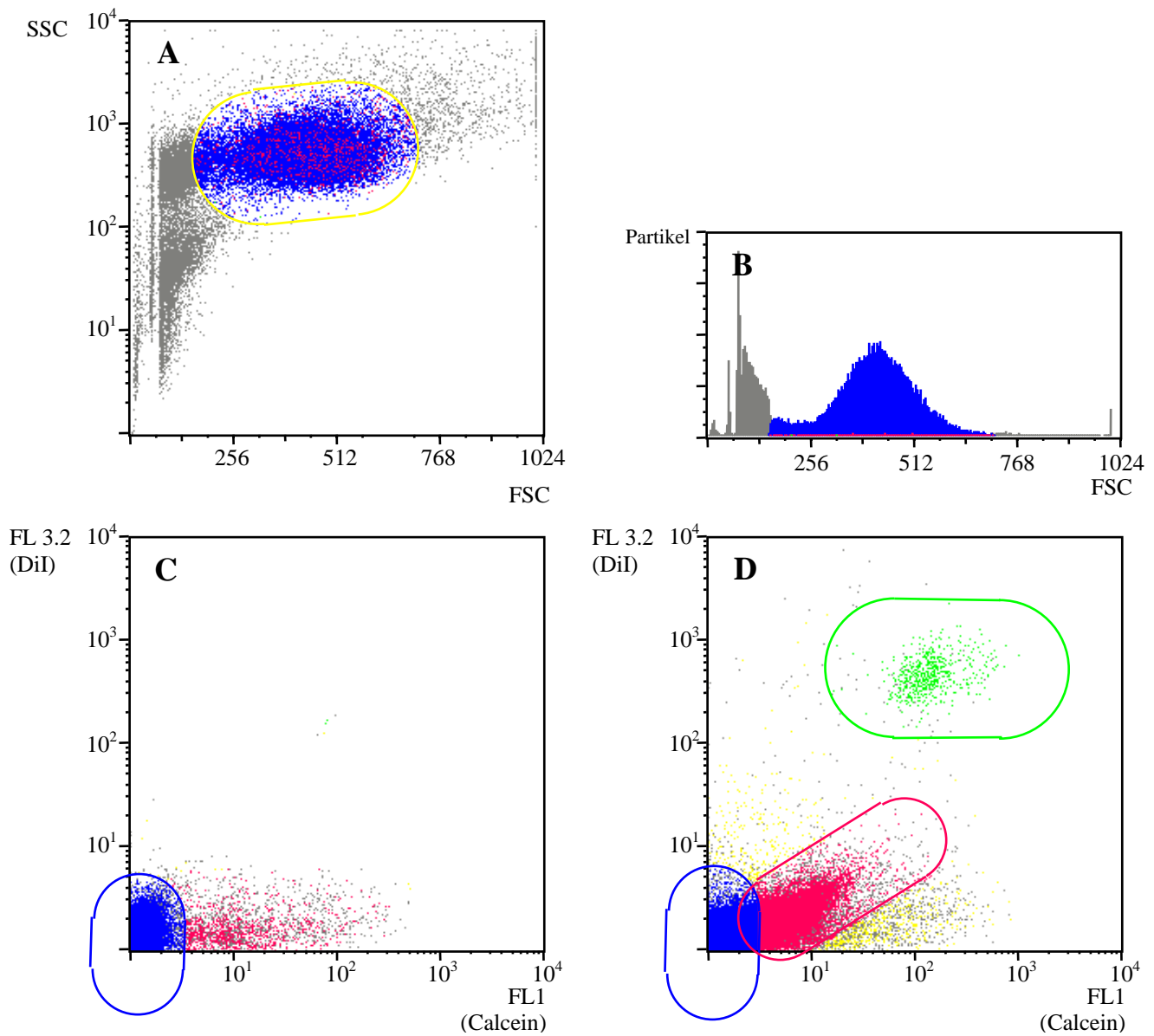


Abb. 8: Darstellungen der Attractors Auswertung anhand einer Kopplungsmessung mit BICR/M1R_k Zellen (2 Laser Anregung). (A) Darstellung aller Messereignisse im Diagramm FSC gegen SSC. (B) Histogramm zur Größenverteilung aller gemessenen Partikel. (C) Ergebnis der Messung ungefärbter Zellen. (D) Ergebnis einer Kopplungsmessung, 3h Kontaktzeit, $c_r=26$.

4.2.3 Zusammenfassung der Kopplungsraten

Die Kopplungsrate c_r kann mit dem Durchflusszytometer sehr effizient bestimmt werden, weil die Messung vieler Zellen in kurzer Zeit möglich ist. Die Kopplungsrate kann von vielen Faktoren beeinflusst werden, z.B. den Eigenschaften der Zell-Linien (homo-, bzw. heterospezifische Kopplung), dem Connexintyp (homo-, bzw. heterotypische Kopplung), der Zelldichte des Monolayers und der Kontaktzeit der Donorzellen auf dem Monolayer (dynamische und statische Kopplung). Die Kopplungsraten sind in den Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Kopplungsraten der Messungen mit zwei Lasern.

Donor Rezipient	BICR/M1R _k	HeLa Cx43-17	SV40-3T3	RIN Cx43
BICR/M1R _k	26	18	11	1
HeLa Cx43-17	14	20	15	1
SV40-3T3	13	13	16	-
RIN Cx43	18	3	-	8

4.2.4 Homo- und heterospezifische Kopplung

Bei den homospezifischen Ansätzen erreichten BICR/M1R_k die höchste Kopplungsrate, gefolgt von HeLa Cx43-17, SV40-3T3 und RIN Cx43. Die Kopplungsraten der heterospezifischen Ansätze lagen bis auf eine Ausnahme niedriger als die der homospezifischen (siehe Tabelle 2).

4.2.5 Homospezifisch-heterotypische Kopplung

Die Messung der Farbstoffausbreitung zwischen HeLa Cx40 und HeLa Cx43-17 ergab eine geringe Kopplungsrate von $c_r=6$. Das Ergebnis zeigt das verbesserte Auflösungsvermögen der vorgestellten Methode gegenüber älteren Methoden mit denen für diese Zell-Linien keine Kopplung nachgewiesen werden konnte.

5 Diskussion

Die Untersuchung der Farbstoffausbreitung über Gap-Junction-Kanäle ist bereits lange etabliert [5, 6]. Bei der Injektion des Farbstoffes mit einer Glasmikroelektrode können die Zellen verletzt werden und die Membran undicht werden. Die Messungen sind aufwendig, weil jede Donorzelle einzeln angestochen werden muß und gekoppelten Zellen nur am Mikroskop gezählt werden können. Die Glasmikroelektroden können in ihrer Qualität variieren und leicht instabil werden. Zur Quantifizierung der Zell-Zell-Kopplung ist die Farbstoffinjektion aufgrund des hohen Zeitaufwandes und der unkonstanten Bedingungen nicht geeignet.

Die Farbstoffbeladungstechnik in Kombination mit der Durchflusszytometrie [7, 8, 19] bietet entscheidende Verbesserungen der Kopplungsmessung. Die Donorzellen werden ohne Schaden zu nehmen mit einem Überschuss an Calcein beladen und auf den Rezipientenmonolayer gebracht. Nach der Kontaktzeit werden mit dem Durchflusszytometer pro Ansatz 90.000 Zellen, darunter etwa 1000 Donorzellen, bewertet. Die große Zahl der gemessenen Zellen, die konstanten Versuchsbedingungen und die Sensibilität der durchflusszytometrischen Messung ermöglichen eine verbesserte Auflösung gegenüber den älteren Methoden. Der eindeutige Nachweis einer Kopplung zwischen HeLa Cx40 und HeLa Cx43-17 zeigt das Auflösungsvermögen der Methode am deutlichsten. Weder mit Farbstoffinjektionen, noch mit Elektrophysiologie konnte für diese Zellen eine deutliche Kopplung nachgewiesen werden [20].

Bei der Auswertung der Messdaten bereitet die Identifikation der Donorzellen keine Schwierigkeiten. Die Trennung zwischen ungefärbten und schwach Calcein gefärbten Zellen hingegen ist schwieriger, weil die Grenze zwischen ihnen fließend verläuft. Kleine Verschiebungen der Gates haben aufgrund der hohen Ereignisdichte an dieser Stelle eine große Auswirkung auf das Ergebnis. Mit der Cell Quest™ Software können die Gates nur manuell nach dem Ermessen des Experimentators plziert werden. Die Auswertung gleicher Rohdaten kann so leicht zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Mit der Attractors Software kann die Auswertung standardisiert und vom Experimentator unabhängiger gemacht werden. Voraussetzung dafür ist eine einheitliche Auswertungsvorlage, die durch geringe Veränderungen an jede Messung angepasst werden kann.

Die Kopplungsraten mit 1 und 2 Lasern Anregung unterscheiden sich kaum. Erst die Verteilung der Messpunkte im Diagramm FL1 gegen FL2/FL3.2 (Abb.6) zeigt die Unterschiede der Messungen deutlich. Bei Anregung mit einem Laser (488 nm) wird DiI nicht ideal angeregt, die Emission, besonders im langwelligen Bereich, ist sehr schwach. Um ein ausreichend starkes DiI Signal zu erhalten, muß die Photomultiplerverstärkung erhöht werden. Da

Calcein bei 488 nm ideal angeregt wird, emittiert es über ein breites Wellenlängenspektrum und überlagert teilweise das DiI Signal. Durch die hohe Photomultiplier-Spannung wird das Signal so verstärkt, daß die Punktwolke der gefärbten Rezipientenzellen im Diagramm FL1 gegen FL2 (Abb.6B) nicht axial verläuft, wie man es bei zunehmender Grünfluoreszenz erwarten würde, sondern diagonal. Verlieren die Donorzellen bei der Kopplung Calcein, wandert die entsprechende Punktwolke diagonal in Richtung Nullpunkt, obwohl keine rote Fluoreszenz verloren geht. Bei Verwendung längerwelliger Filter an Photomultiplier FL2 wurde das DiI Signal sehr viel schwächer, bei kürzerwelligeren Filtern wurde die Überlagerung des Calcein Signal dominant. Die Anregung mit dem zweiten Laser (517 nm) führte zu klareren Ergebnissen. Die DiI Emission im längerwelligeren Bereich wurde durch die für den Farbstoff idealere Anregung stärker, der Einfluss des überlagerten Calcein Signals entsprechend geringer (Abb.6C). Betrachtet man Abb.6C, fällt die rundliche Form der Donorzellpopulation mit ihrer Calceinverlust bedingten axialen Streuung auf. Die Population der gekoppelten Zellen verläuft zunächst weitgehend axial, erst bei großer Calceinkonzentration überlagert das Signal den DiI Kanal. Es könnte sich dabei um Quench Effekte handeln [18]. Obwohl sich die Kopplungsraten zwischen der Anregung mit einem und zwei Lasern kaum unterscheiden, können die Unterpopulationen mit zwei Laser Anregung deutlicher voneinander getrennt werden.

Die Höhe der Kopplungsrate hängt von Connexintyp und -menge, sowie von verschiedenen zellspezifischen Faktoren ab. Homospezifische Ansätze führen zu den höchsten Kopplungsraten. BICR/M1R_k-Zellen koppeln von allen untersuchten Zellen, wohl aufgrund der großen Anzahl ihrer Kanäle, am besten [21]. Des Weiteren können Donorzellen mit ihren langen Ausläufern auch weit entfernt liegende Zellen des Rezipientenmonolayers erreichen. Die Zellen eines HeLa Cx43-17 Monolayers wachsen dicht aneinander, wie Steine einer Mauer. Die Kopplung wird durch die große Kontaktfläche begünstigt. Da die Zellen keine Ausläufer bilden, wird die Kopplungsrate der BICR/M1R_k nicht ganz erreicht [21, 22]. SV40-3T3 Zellen bilden kleinere Ausläufer als BICR/M1R_k und besitzen nicht die große Kontaktfläche der HeLa Cx43-17. Ihre Kopplungsrate liegt niedriger als die der beiden anderen Zell-Linien. Die Zellen der RIN Cx43 Zell-Linie sind im Vergleich zu den anderen untersuchten Zellen sehr klein. Sie wachsen oft in isolierten Zellhaufen, selten als konfluenter Monolayer. So können viele Donorzellen keine Kontakte aufbauen, weil sie in zellfreien Lücken liegen. BICR/M1R_k Zellen eignen sich aufgrund ihrer Größe und Beweglichkeit besonders gut als Donorzellen, so koppeln sie mit HeLa Cx43-17 und SV40-3T3 nur geringfügig weniger als beim homospezifischen Ansatz. Die großen BICR/M1R_k Zellen enthalten genug Calcein, um

viele der kleinen RIN Cx43 zu füllen. Mit ihren langen Ausläufern können sie als Donorzellen auch Lücken im Monolayer RIN Cx43 überwinden und Kontakte herstellen. Aus diesen Gründen ist die Kopplungsrate sogar viel höher als bei dem homospezifischen Ansatz der RIN Cx43 Zellen. HeLa Cx43-17 Donorzellen sind kleiner als BICR/M1R_k Zellen und erreichen mit ihnen eine deutlich kleinere Kopplungsrate als der homospezifische Ansatz. Mit SV40-3T3 Zellen als Rezipient ergibt sich eine geringfügig kleinere Kopplungsrate als bei dem homospezifischen Ansatz. Trotz der Größe der HeLa Cx43-17 Zellen ist die Kopplungsrate mit RIN Cx43 sehr klein. Da HeLa Cx43-17 Zellen nach 3 Stunden keine Ausläufer bilden, können nur Zellen koppeln, die direkten Kontakt zu einem RIN Cx43 Zellhaufen haben. SV40-3T3 Zellen können aufgrund ihrer geringeren Größe BICR/M1R_k und HeLa Cx43-17 Rezipienten weniger stark anfärben, als dies für die jeweiligen homospezifischen Ansätze der Fall ist. RIN Cx43 Zellen eignen sich für die verwendeten Rezipientenzellen nicht als Donorzellen, da sie zu wenig Calcein aufnehmen können, um eine Farbstoffausbreitung nachzuweisen.

Eine Kopplung zwischen unterschiedlichen Zell-Linien mit Cx40 oder Cx43 (heterospezifisch-heterotypische Kopplung) konnte bisher nicht nachgewiesen werden [23]. Mit Farbstoffinjektionen konnte auch für HeLa Cx40 und HeLa Cx43 keine Kopplung gezeigt werden [22]. Erst die Untersuchung mit der vorgestellten Methode hat eine deutliche Farbstoffausbreitung zwischen den beiden unterschiedlich transfizierten HeLa-Zellen gezeigt. Für die Kopplung dieses homospezifisch-heterotypischen Ansatzes müssen folglich andere Faktoren eine Rolle spielen. Denkbar wäre, daß die Zellen durch zellspezifische Adhensionsmoleküle enge Kontakte knüpfen und die Ausbildung von heterotypischen Kanälen möglich wird. Eine andere Möglichkeit wäre, daß durch die Transfektionen endogenes Cx45 zur Expression gebracht wurde und dieses für eine geringe Kopplung ausreicht.

Die Kopplungsmessungen haben gezeigt, daß neben Connexintyp und -menge auch zellspezifische Faktoren bei der Ausbildung von Kontakten zwischen Zellen eine Rolle spielen müssen. Die Beweglichkeit der Donorzellen, die Eigenschaften des Rezipientenmonolayers und die Oberflächenbeschaffenheit der Zellen sind dabei die wichtigsten Merkmale.

Wie frühere Kopplungsmessungen mit unterschiedlichen Kontaktzeiten gezeigt haben, ist es möglich mit dem Durchflusszytometer zwischen dynamischer und statischer Kopplung zu unterscheiden [23]. Bei jedem erfolgreichen Kopplungsansatz ist nach etwas einer Stunde eine Farbstoffausbreitung messbar. In den folgenden Stunden steigt die Kopplungsrate linear an, je nach Zell-Linie schneller oder langsamer (dynamische Kopplung), um schließlich eine Sättigung zu erreichen (statische Kopplung).

Bei Messungen ungefärbter Zellen am Durchflusszytometer fiel auf, daß zu Beginn der Messung die Eigenfluoreszenz zunahm. Die entsprechende Punktwolke wanderte diagonal nach oben, um sich dort nach etwa 2 Minuten zu stabilisieren. Die verschiedenen Zell-Linien zeigten diesen Effekt in unterschiedlicher Intensität, wobei BICR/M1R_k-Zellen am stärksten reagierten. Bei Kopplungsansätzen wurde der gleiche Effekt beobachtet. Die Punktwolke der ungefärbten Zellen dehnte sich während der Messung in der Diagonalen aus, ähnlich den gekoppelten Zellen bei 1 Laser Anregung. Bei Messungen mit 2 Lasern kann ausgeschlossen werden, daß derart streuende Zellen als gekoppelt bewertet werden, bei 1 Laser Anregung kann es dagegen zu Ergebnisveränderungen kommen. Da der Anteil der gestreuten Zellen an der Gesamtpopulation etwa 3 Prozent betrug, können die erhöhten Kopplungsraten der 1 Laser Anregung wohl auf die irrtümliche Einbeziehung der gestreuten Zellen in die Population der gekoppelten Zellen zurückgeführt werden. Trotz diverser Versuche konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden, welche Ursache dieses Phänomen hat. Die Annahme, daß sich das Zellvolumen im Verlauf der Messung verändert konnte nicht bestätigt werden.

6 Literatur

1. Kumar, N. M., and Gilula, N. B. (1992) Molecular biology and genetics of gap junction channels. *Sem. Cell Biol.* **3**, 3-16.
2. Kumar, N. M., and Gilula, N. B. (1996) The gap junction communication channel. *Cell* **84**, 381-388.
3. Goodenough, D. A., Goliger, J. A., and Paul, D. L. (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 475-502.
4. Simon, A. M., and Goodenough, D. A. (1998) Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol.* **8**, 477-483.
5. Stewart, W. W. (1978) Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell* **14**, 741-759.
6. Stewart, W. W. (1981) Lucifer dyes-highly fluorescent dyes for biological tracing. *Nature* **292**, 17-21.
7. Goldberg, G. S., Bechberger, J. F., and Naus, C. C. (1995) A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer. *BioTechniques* **18**, 490-497.
8. Kiang, D. T., Kollander, R., Lin, H. H., LaVilla, S., and Atkinson, M. M. (1994) Measurement of gap junctional communication by fluorescence activated cell sorting. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **30A**, 796-802.
9. Rajewsky, M. F., and Grüneisen, A. (1972) Cell proliferation in transplanted rat tumors: influence of the host immune system. *Eur. J. Immunol.* **2**, 445-447.
10. Gey, G. O. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**, 264-265.
11. Hennemann, H., Suchyna, T., Lichtenberg-Fraté, H., Jungbluth, S., Dahl, E., Schwarz, J., Nicholson, B. J., and Willecke, K. (1992) Molecular cloning and functional expression of mouse connexin40, a second gap junction gene preferentially expressed in lung. *J. Cell Biol.* **117**, 1299-1310.
12. Traub, O., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Elfgang, C., Bastide, B., Scheidtmann, K. H., Hülser, D. F., and Willecke, K. (1994) Immunochemical and electrophysiological characterization of murine connexin40 and -43 in mouse tissues and transfected human cells. *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 101-112.
13. Todaro, G. J., and Green, H. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established cell lines. *J. Cell Biol.* **17**, 299-313.
14. Gazdar, A. F., Chick, W. L., Oie, H. K., Sims, H. L., King, D. L., Weir, G. C., and Lauris, V. (1980) Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 3519-3523.
15. Vozzi, C., Ullrich, S., Charollais, A., Philippe, J., Orci, L., and Meda, P. (1995) Adequate connexin-mediated coupling is required for proper insulin production. *J. Cell Biol.* **131**, 1561-1572.
16. Coulter, W. H. (1956) High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proc. Natl. Electr. Conf.* **12**, 1034-1043.
17. Glauner, B. (1991) Vitalitätskontrolle in der Zellkulturtechnik. *BioTec* **5**, 58-61.
18. Shapiro, H. M. (1988) Practical Flow Cytometry 2nd Edition. *Alan R. Liss-Inc. New York* .
19. Tomasetto, C., Neveu, M. J., Daley, J., Horan, P. K., and Sager, R. (1993) Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfectants in culture. *J. Cell Biol.* **122**, 157-167.
20. Haubrich, S., Schwarz, H. J., Bukauskas, F., Lichtenberg-Fraté, H., Traub, O., Weingart, R., and Willecke, K. (1996) Incompatibility of connexin 40 and 43 hemichannels in gap junctions between mammalian cells is determined by intracellular domains. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1995-2006.
21. Brümmer, F., Zempel, G., Böhle, P., Stein, J. C., and Hülser, D. F. (1991) Retinoic acid modulates gap junctional permeability: a comparative study of dye spreading and ionic coupling in cultured cells. *Exp. Cell Res.* **196**, 158-163.
22. Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Fraté, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R. A., Hülser, D. F., and Willecke, K. (1995) Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J. Cell Biol.* **129**, 805-817.
23. Czyz, J., Irmer, U., Schulz, G., Mindermann, A., and Hülser, D. F. (1999) Gap Junctional Coupling Measured by Flow Cytometry. *Exp. Cell Res.* .

7 Anhang

7.1 Mikroskope

7.1.1 IM 35

Anregungslicht: HBO 100

Calcein: Anregungsfilter: BP 450-490 nm, Farbteiler: 510 nm, Sperrfilter: LP 520 nm

DiI: Anregungsfilter: BP 510-560 nm, Farbteiler: 580 nm, Sperrfilter: LP 590 nm

Objektiv: 20x Neofluar Ph 2, Zeiss, Oberkochen, Deutschland

7.1.2 Axiophot

Anregungslicht: HBO 50

Calcein: Anregungsfilter: BP 450-490 nm, Farbteiler: 510 nm, Sperrfilter: LP 520 nm

DiI: Anregungsfilter: BP 546 nm, Farbteiler: 580 nm, Sperrfilter: LP 590 nm

Objektive: 20x Plan-Apochromat, Hellfeld; 20x Plan-Neofluar, Ph 2; 40x Plan-Neofluar Ph 3, Imm. Korr., Zeiss, Oberkochen

Film: Ektachrom 400, Art.-Nr. 3775681, Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA

7.2 Zusammensetzung verwendeter Medien und Lösungen

7.2.1 *Eagles Minimum Essential Medium, Dulbecco`s Modification (DMEM)*

Komponenten	mg/ml	Komponenten	mg/ml
NaCl	6400	L-Lysin HCl	146
KCl	400	L-Methionin	30
CaCl ₂	200	L-Phenylalanin	66
MgSO ₄ (7 H ₂ O)	200	L-Serin	42
NaH ₂ PO ₄ (7 H ₂ O)	124	L-Threonin	95
D(+)-Glucose	4500	L-Tryptophan	16
Fe(NO ₃) ₃ (9 H ₂ O)	0,1	L-Tyrosin	72
Phenolrot	15	L-Valin	94
NaHCO ₃	3700	Choline chloride	4
L-Arginin(HCl)	84	Folsäure	4
L-Cystein	48	i-Inositol	7,2
L-Glutamin	580	Nicotinamid	4
Glycin	30	D-Ca pantothenat	4
L-Histidin HCl(H ₂ O)	42	Pyridoxal HCl	4
L-Isoleucin	105	Riboflavin	0,4
L-Leucin	105	Thiamin HCl	4

7.2.2 *Eagles Minimum Essential Medium, Dulbecco`s Modification mit wenig Glucose*

Komponenten	mg/ml	Komponenten	mg/ml
NaCl	6400	L-Methionin	30
KCl	400	L-Phenylalanin	66
CaCl ₂ (anhydr.)	200	L-Serin	42
MgSO ₄ (anhydr.)	97,67	L-Threonin	95
NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O ³)	125	L-Tyrosin	16
D(+)-Glucose	1000	L-Tryptophan (Di-Natrium-Salz)	104,18
Fe(NO ₃)(9 H ₂ O	0,1	L-Valin	94
Phenolrot	15	Choline chloride	4
L-Arginin(HCl	84	Folsäure	4
L-Cystein(HCl	62,77	i-Inositol	7,2
L-Glutamin	584	Nikotinamid	4
Glycin	30	D-Ca pantothenat	4
L-Histidin HCl(H ₂ O	42	Pyridoxine HCl	4
L-Isoleucin	105	Riboflavin	0,4
L-Leucin	105	Thiamin HCl	4
L-Lysin HCl	146		

7.2.3 *RPMI-Medium*

Komponenten	mg/ml	Komponenten	mg/ml
NaCl	6000	L-Methionin	15
KCl	400	L-Phenylalanin	15
Ca(NO ₃) ₂ (4 H ₂ O	100	L-Prolin	20
MgSO ₄ (7 H ₂ O	100	L-Serin	30
NaH ₂ PO ₄ (7 H ₂ O	1512	L-Threonin	20
D(+)-Glucose	2000	L-Tryptophan	5
Phenolrot	5	L-Tyrosin	20
NaHCO ₃	2000	L-Valin	20
L-Arginin	200	Glutathion	1
L-Asparagin	50	Biotin	0,2
L-Asparaginsäure	20	Vitamin B ₁₂	0,005
L-Cystein	50	D-Ca-Pantothenat	0,25
L-Glutamin	300	Cholinchlorid	3
L-Glutaminsäure	20	Folsäure	1
Glycin	10	i-Inositol	35
L-Histidin	15	Nicotinamid	1
L-HydroxiProlin	20	p-Aminobenzoessäure	1
L-Isoleucin	50	Pyridoxin(HCl	1
L-Leucin	50	Riboflavin	0,2
L-Lysin(HCl	40	Thiamin(HCl	1

7.2.4 Phosphatgepufferte Lösung (PBS)

Komponente	mg/ml
NaCl	8
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄ (2 H ₂ O)	1,15
KH ₂ PO ₄	0,2
MgCl ₂ (6 H ₂ O)	0,1
CaCl ₂ (2 H ₂ O)	0,1325

7.2.5 Trypsin Lösung

Komponente	mg/ml
Na ₂ -EDTA (Triplex III)	0,2
NaCl	0,8
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄ (2 H ₂ O)	1,15
KH ₂ PO ₄	0,2
Streptomycin Sulfat (723 U/mg)	0,1
Penicillin G (1536 U/mg)	0,06
Trypsin (1:250, 4U/mg)	2,5

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. D.F. Hülser für die persönliche Betreuung und Förderung dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. Irmer danke ich besonders für seine Unterstützung am FACS, sowie den vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen.

Den Mitarbeitern der Abteilung Biophysik danke ich für die allzeit nette Arbeitsatmosphäre.

Bei meinen Eltern Elke und Jürgen Schulz möchte ich mich neben der Bereitstellung ihrer Erbanlagen auch für die großzügige finanzielle Unterstützung bedanken.