

2.3 Migrations-Versuche

2.3.1 Versuche

Die Migrations-Versuche wurden nach einem einheitlichen zeitlichen Ablaufschema durchgeführt, das in Abbildung 11 dargestellt ist. Um definierte Bedingungen für die Migration zu haben, wurden die Zellen $72 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ vor Beginn der Videomikroskopie aus der laufenden Kultivierung genommen und $1,5 \times 10^5$ Zellen in eine 25 cm^2 -Flasche eingesät. Zum Zeitpunkt der Einsaat für den Versuch war die Zellkulturflasche noch nicht dicht bewachsen, so dass die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet wurden. Die Versuche wurden in Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm durchgeführt. Pro Gewebekulturschale wurden 1×10^4 Zellen eingesät. Für jeden Versuch wurden 14 Gewebekulturschalen verwendet. Von zwei dieser Gewebekulturschalen wurde zu Beginn der Videomikroskopie die Zellzahl bestimmt. Bei den Bestrahlungsversuchen wurden 18 Stunden nach der Einsaat Zellen mit 0 Gy, 2 Gy bzw. 10 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt. Bei jeder Bestrahlungsdosis wurden vier Proben bestrahlt und anschließend je zwei Proben in den Brutschrank, die anderen zwei in die Klimakammer gestellt. Die Bestrahlung erfolgte bei einer Beschleunigungsspannung von 250 kV, einem Kathodenstrom von 16 mA und einer Dosis von 3 Gy/min. Mit dem Start der Videomikroskopie wurde 1-2 Stunden nach der Bestrahlung begonnen. Diese Zeitverzögerung ergab sich zum einen aus der räumlichen Distanz zwischen Bestrahlungsplatz und Mikroskop, zum anderen daraus, dass die Probendeckel beim Einsetzen in die Klimakammer zunächst beschlugen, da die Bestrahlung bei Raumtemperatur stattfand. Bei Versuchen mit Foliendeckeln erfolgte die Anzucht der Zellen und die Bestrahlung mit herkömmlichen Deckeln. Zu Beginn der Videomikroskopie wurden diese in einer sterilen Werkbank durch die Foliendeckel ausgetauscht. Versuche ohne Bestrahlung wurden ebenfalls 18 Stunden nach der Einsaat gestartet. Die Beobachtung erfolgte in der Klimakammer, damit die Zellen möglichst optimale Lebensbedingungen hatten. In der Klimakammer wurde eine Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und ein CO_2 -Gehalt von 5 % eingestellt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden hinweg beobachtet. Während dieser Zeit wurden alle 30 Minuten Aufnahmen gemacht. Pro Gewebekulturschale wurden sechs bis sieben Positionen photographiert. Die Anzahl der Positionen hing von der Dichte der Zellen ab. In jedem Bildfeld befanden sich 20 bis 30 Zellen. Mit dieser Anzahl von Zellen im Bildfeld ist eine Auswertung mit Einzelzellverfolgung möglich.

Nach Beendigung der Beobachtung wurden von den Proben aus der Klimakammer und denen aus dem Brutschrank Zellzahlen bestimmt. Durch diese Messungen konnte der Einfluss von Substrat bzw. Strahlung auf die Proliferation der Zellen, sowie mögliche Einflüsse der Klimakammer auf die Proliferation ermittelt werden.

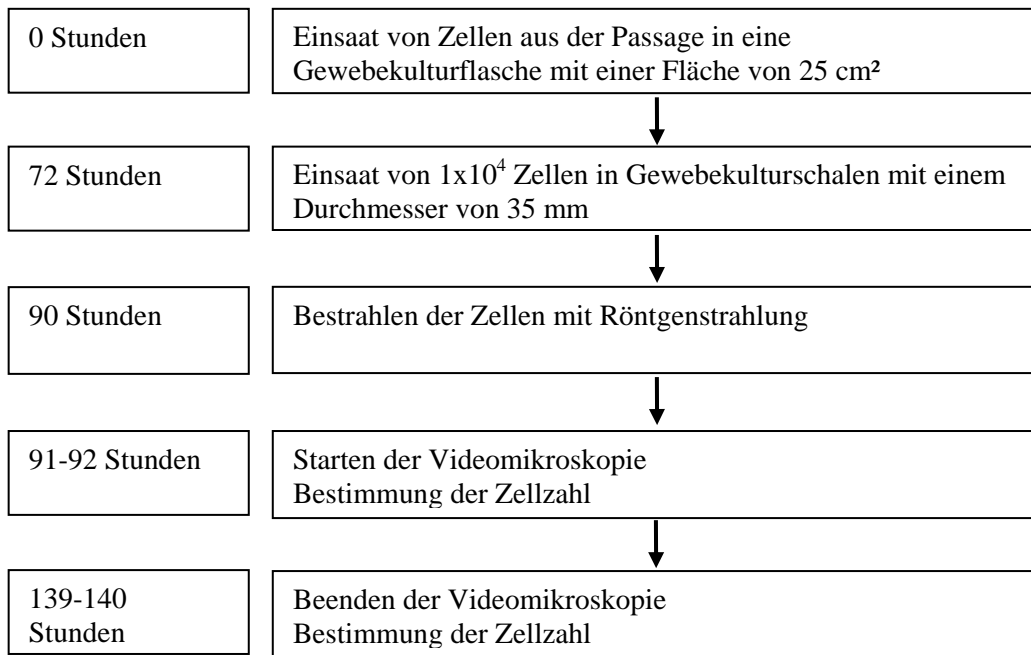


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Migrationsversuche mit Videomikroskopie.

2.3.2 Auswertung

Die Bilder aus der Videomikroskopie haben eine Größe von 640 x 512 Pixel. Bei der Verwendung des 10x Objektivs entspricht ein Pixel 2 µm, woraus sich eine Größe eines Bildes von 1,280 x 1,024 mm ergibt. Für die Auswertung mit dem Programm **Simi BioCell** wurden die Bilderserien im JPEG-Format mit ImageJ in einen Film im AVI-Format umgewandelt.

Simi BioCell wurde ursprünglich für die Beobachtung der Entwicklung von *C. elegans* entwickelt. Es dokumentiert, ausgehend von einer Startzelle, die Position dieser Zelle und ihrer Tochterzellen zu dem jeweiligen Zeitpunkt, die Teilungen der Zellen und die Zeit zwischen den Teilungen. Zudem können zu einzelnen Zellen Attribute wie Zelltod, Fusion oder äußerliche Merkmale vermerkt werden. Die Auswertung erfolgt anhand eines Templates in Form eines Stammbaumes, der von einer einzigen Zelle ausgeht. Dieses Template wird während der Auswertung überschrieben.

Um nicht für jede einzelne Zelle eine eigene Datei erstellen zu müssen, wurde für den Start der Auswertung ein Zeitpunkt in dem Template gewählt, der in der 5. Generation der ersten Zelle liegt. Somit konnten maximal 32 (2⁵) Zellen in einer Datei ausgewertet werden. Diese maximal 32 „Startzellen“ wurden einzeln verfolgt und von jeder Zelle Position und Zellteilungen dokumentiert. Für die Festlegung der Position der Zelle wurde der Zellkern markiert. Aus den gespeicherten Positionen kann die Strecke, die die Zelle zurückgelegt hat, und die daraus resultierende Geschwindigkeit ermittelt werden.

Es wurden zwei unterschiedliche Strecken ermittelt (siehe Abbildung 12): die totale und die effektive Strecke. Die totale Strecke ist die Strecke, die eine Zelle in der Beobachtungszeit zurücklegt, inklusive aller „Umwege“. Die direkte Verbindung vom Startpunkt der Zelle zum Endpunkt ist die effektive Strecke, die stark vom Ende der Beobachtung abhängt. Aus diesen beiden Strecken wurden unter Einbeziehung der jeweiligen Beobachtungszeit die

dazugehörigen Geschwindigkeiten ermittelt. Der Beginn der Beobachtungszeit ist durch eine Mitose bzw. den Experimentbeginn definiert; das Ende der Beobachtungszeit für die jeweilige Zelle durch die folgende Mitose bzw. das Ende des Experimentes oder das Herauslaufen der Zelle aus dem Bildfeld. Die effektive Geschwindigkeit hat allein wenig Aussagekraft. Zusammen mit der totalen Geschwindigkeit gibt sie Aufschluss über die Art der Bewegung, die die Zellen verrichten. Würde eine Zelle sich beispielsweise immer in eine Richtung bewegen, so wären totale und effektive Geschwindigkeit gleich. Der Quotient effektive durch totale Geschwindigkeit wäre dann 1. Je häufiger die Zelle die Richtung ändert, desto kleiner wird der Quotient.

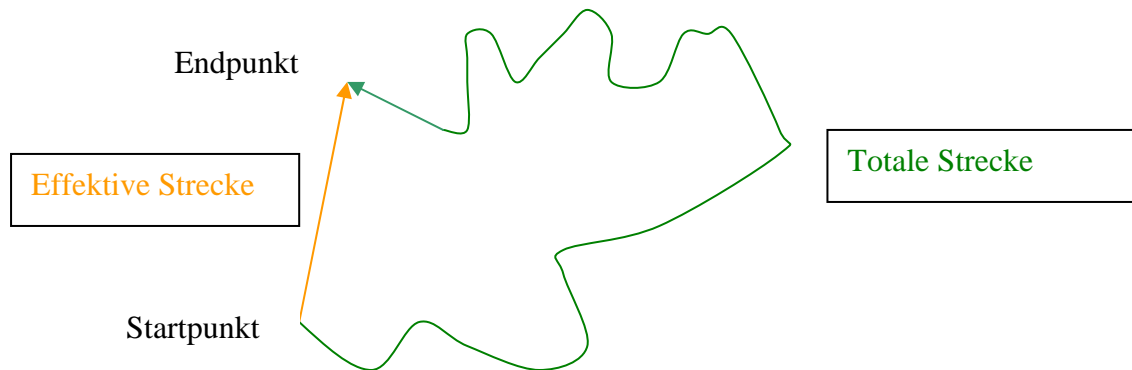


Abb. 12: Schematische Darstellung des Unterschiedes zwischen totaler und effektiver Strecke.

Neben der Geschwindigkeit, die sich aus der Gesamtbeobachtungszeit einer Zelle ergibt, wurde auch die momentane Geschwindigkeit aus dem jeweiligen Halbstunden- Intervall bestimmt.

Ausgehend von jeder Startzelle wurde, wie in Abbildung 13 gezeigt, ein Stammbaum erstellt auf dem die Mutter-Tochterbeziehung und der Zeitpunkt der Mitosen dargestellt sind. Jeder Zelle konnten Attribute zugeschrieben werden, um Auffälligkeiten und/oder das Schicksal der Zelle zu dokumentieren. Zu den Attributen zählten „out of Frame“, wenn die Zelle während der Beobachtung aus dem Bild lief, „Riesenzelle“, „Zelltod“, „Zellfusion“ und „3er Teilung“. Bei einer „3er Teilung“ entstehen bei der Mitose drei Tochterzellen.

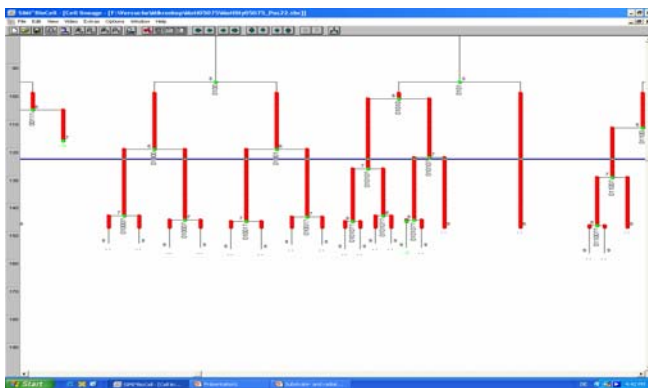


Abb. 13: Ausschnitt aus einem Stammbaum der Simi BioCell-Auswertung. Die aus der Auswertung mit Simi BioCell erhaltenen Daten wurden mit LabView BCAnalysis10.vi (von M. Scholz) weiter bearbeitet. Es wurden zwei Dateien ausgegeben: in der ersten Datei stehen zu jeder Zelle Detailinformationen über einzelne Zeitschritte (Zeit,

Position, Generation), in der zweiten Übersichtsinformationen (Beobachtungsdauer, effektive und totale Strecke, Geschwindigkeiten).

Mit pawNT und den zugehörigen, bei der GSI entwickelten Makro-Programmen, wurden aus diesen Daten folgende Graphen erstellt:

- totale und effektive Geschwindigkeit als Funktion der Zeit,
- Geschwindigkeit der Zellen als Funktion der Zeit nach Mitose,
- Verteilung der Zellen in den verschiedenen Generationen,
- Häufigkeitsverteilung der Zellzyklusdauer (für die erste und die zweite Generation)
- Häufigkeitsverteilung der Einzelmessungen.

Aus den Histogrammen zu den Geschwindigkeiten wurde die durchschnittliche totale bzw. durchschnittliche effektive Geschwindigkeit berechnet.