

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Wissenschaftlicher Film C 874/1964

**Menschliche Krebszellen in der Kultur
Portio-Carcinom, Stamm HeLa**

Begleitveröffentlichung von

Prof. Dr. HENRIETTE GÄRTNER und Priv.-Doz. Dr. K. PETERS,
Tübingen

GÖTTINGEN 1974

Menschliche Krebszellen in der Kultur Portio-Carcinom, Stamm HeLa

HENRIETTE GÄRTNER und K. PETERS, Tübingen

Allgemeine Vorbemerkungen¹

Wachstum und Vermehrung von Krebszellen vollziehen sich *in vitro* unter vereinfachten biologischen Bedingungen, unabhängig von den Steuerungsfunktionen des Organismus und dem Einfluß nervöser, hormonaler und vaskulärer Regulationsmechanismen. Die Zellen sind sämtlich potentiell teilungsfähig. Die Zellvermehrung erfolgt gewöhnlich über die mitotische Zellteilung, der sich eine je nach Zellart verschieden lange Interphase anschließt. Die Dauer von Mitose und Interphase innerhalb der gesamten Zellgenerationszeit ist von der verwendeten Zellart und den Züchtungsbedingungen abhängig. Die Mitosehäufigkeit in einer Kultur variiert dementsprechend und kann durchschnittlich mit etwa 5% angegeben werden (SPEAR [20]).

Man kann heute praktisch jede Zellart von Tieren und Menschen unbegrenzt züchten, ganz gleich, ob es sich um normale embryonale oder adulte oder ob es sich um maligne Ausgangsgewebe handelt.

Ein wesentlicher Vorteil für die experimentellen Fragestellungen besteht darin, daß dem Untersucher kontinuierlich ein hinreichend identisches Material für detaillierte Informationen zur Verfügung steht, so daß fortlaufende, miteinander vergleichbare und jederzeit reproduzierbare Versuche vorgenommen werden können. Bei der Vielzahl der Kriterien kann jedes einzelne Experiment cytomorphologisch oder biochemisch einer mehrfachen kombinierten Auswertung unterzogen werden, so daß in ein und demselben Versuch die Möglichkeit von Test und Gegenteil gegeben ist (GÄRTNER [12], GÄRTNER u. PETERS [26] bis [28]). Außerdem besteht die Möglichkeit, ähnlich wie in der Bakteriologie, von isolierten Zellen jedweder Herkunft „Zellkulturen“ anzulegen und Zellstämme, die sich von einer Elternzelle ableiten, heranzuzüchten. Sie

¹ Angaben zum Film und kurzgefaßter Filminhalt (deutsch, englisch, französisch) s. S. 9 u. 10.

nehmen ihren Ausgang von primären Gewebeexplantaten oder „primären Zellkulturen“. Die Zellen des Ursprungsgewebes werden durch Trypsin oder ähnliche enzymatisch wirksame Substanzen aus dem Gewebeverband herausgelöst, einzeln oder in bekannter Ausgangszellzahl in Kulturgefäße eingesät und in Subkulturen in adaequaten teil- oder vollsynthetischen Nährmedien weiter kultiviert. Bei völliger Adaptation an die Verhältnisse in vitro läßt sich die Züchtung unbegrenzt fortführen, und man erhält „kontinuierliche Zellkulturen“ bzw. Langzeitkulturen bekannter Wachstumsraten (BRAND [9], EDLINGER [10]).

Neben der Fähigkeit zur fortgesetzten mitotischen Teilung besitzen die Zellen in der Gewebekultur noch die der aktiven Bewegung durch Aussendung amöboider Fortsätze, der Pseudopodien.

Jede Zelle in der Kultur kann als ein Individuum bzw. als ein weitgehend unabhängiges Lebewesen angesehen werden, das außerhalb des Organismus die Fähigkeit der amöboiden Fortbewegung, der mitotischen Teilung und zur Bildung von Tochterzellen bewahrt hat. Ebenso kann die Gesamtkultur als eine Zellkolonie betrachtet werden, in der die Einzelzellen der Gruppe als Ganzes untergeordnet sind und in gegenseitiger Abhängigkeit voneinander existieren.

Bei den im Film verwendeten HeLa-Zellen handelt es sich um Explantate eines menschlichen sehr unreifen, nicht verhornenden Plattenepithel-Carcinoms der Portio uteri, das GEY u. Mitarb. [13] aus dem Excisionsmaterial einer Patientin heranzüchten konnten. Der maligne Charakter kommt in einer erheblichen Teilungsaktivität und zahlreichen Mitosestörungen in Form von mehrpolaren Mitosen und Riesenzellen zum Ausdruck. Die pathologischen Zellteilungen treten in einer Frequenz bis zu 25% auf (PETERS [18]), eine Tatsache, die bei der Beurteilung von experimentellen Ergebnissen von vornherein berücksichtigt werden muß. HeLa-Zellen haben trotz langer Kultivierung die Charakteristiken des malignen Wachstums voll bewahrt. Die Fähigkeit des invasiven und infiltrierenden Wachstums wiesen LEIGHTON u. KLINE [15] nach. Ihre Reimplantierbarkeit unter Erhaltung der Malignität stellten SCOTT, WRYK, DORSEY u. Mitarb. 1960 unter Beweis [19].

Zur Entstehung des Films

Die Darstellung der cytomorphologischen Dynamik von HeLa-Zellen mit Hilfe des Phasenkontrastverfahrens und der Kinematographie erforderte eine Modifizierung der Züchtungsmethode. Die Ausgangszellen wurden in Vierkantflaschen in einem Medium, bestehend aus TCM¹ unter Zusatz von 10% menschlichem Serum, gezüchtet. Diese Kulturen

¹ TCM: Medium 199 nach J. F. MORGAN, H. J. MORTON and R. C. PARKER; Proc. Soc. exp. Biol. Med. **73** (1950), 1.

wurden mit einer Trypsinlösung versetzt und die dadurch isolierten Zellen erneut im Medium suspendiert und in besonders konstruierte planparallele Beobachtungskammern explantiert. Die Tiefe der Kammern betrug 1,5 mm. Um Filmbeobachtungen über längere Zeit (bis zu 12 Tagen) durchführen zu können, erfolgte der Mediumwechsel alle drei Tage über eine besondere Austauschvorrichtung. Damit unterlagen die Zellen hinsichtlich ihrer Ernährungsbedingungen den gleichen Verhältnissen wie die zuvor für die variationsstatistischen Untersuchungen verwendeten Kulturen, so daß die kinematographischen und morphologisch statistischen Ergebnisse miteinander verglichen werden konnten.

Die Aufnahmefrequenzen wechselten zwischen 8 und 4 Bildern pro Minute, um eine Anpassung an die unterschiedliche Zeitdauer der zellulären Vorgänge zu erreichen.

Neben der Darstellung der Morphologie und der Dynamik der HeLa-Zellen *in vitro*¹ bilden die Versuche zugleich die Basis für die in weiteren Filmen erfaßten strahlenbiologischen Phänomene (GÄRTNER u. PETERS [26] bis [28] u. [30]).

Der Zeitrafferfilm hat sich in Verbindung mit dem Phasenkontrastverfahren zur Lösung der gestellten Aufgaben als geeignet erwiesen. Seine besonderen Vorzüge bestehen darin, bestimmte Fragen, die cytologisch-statistisch an fixierten und gefärbten Präparaten nicht hinreichend zu klären sind, zum Beispiel die Aufeinanderfolge und Entwicklung verschiedener morphologischer Prozesse, einer Analyse näherzubringen. Insbesondere die Entstehung von pathologischen Zellformen, wie mehrkernigen Zellen, das Verhalten von Nebenkernen während der Mitose, Mitoseverzögerung und die Entstehung und das Verhalten von Riesenzellen können auf Grund der Filmanalyse eindeutig interpretiert werden.

Erläuterungen zum Film²

Übersicht

Aufnahmefrequenz 2 bis 1 B/min

HeLa-Zellen entstammen einem menschlichen Portio-Carcinom, das seit 1951 fortlaufend in Kulturen gezüchtet wird. Wie diese Übersicht zeigt, ist die Malignität der Zellen durch rege Teilungsaktivität, Mitose-Anomalien und Riesenzellbildung charakterisiert.

Die Zelle hier in Bildmitte enthält links von ihrem Kern einen Nebenkern. Sie beginnt jetzt mit der Mitose. Das Cytoplasma zieht sich zusammen, die Membranen von Haupt- und Nebenkern lösen sich auf, die Chromosomen

¹ S. a. den etwas ausführlicheren Film E 561 (GÄRTNER u. PETERS [25]).

² Wortlaut des im Film gesprochenen Kommentars. Die *Kursiv*-Überschriften entsprechen den Zwischentiteln im Film.

werden sichtbar und ordnen sich zur Metaphaseplatte. Es folgt die Anaphase mit der Trennung der Chromosomen und der Durchschnürung des Cytoplasmas. In der Rekonstruktionsphase werden zwei einkernige Tochterzellen sichtbar. Daraus geht hervor, daß der Nebenkern in die Kernteilung einbezogen wurde.

Inzwischen hat links unten eine weitere Zelle die Mitose begonnen. Sie befindet sich jetzt in der Metaphase. Die Einordnung der Chromosomen in die Äquatorialebene ist deutlich verzögert.

Eine tripolare Anaphase, aus der drei Tochterzellen entstehen, ist die Folge der Mitosestörung. Demgegenüber verläuft die Teilung oberhalb zeitlich und morphologisch regulär.

Die hohe Mitoserate der HeLa-Kulturen kommt auch in diesem kleineren Ausschnitt deutlich zum Ausdruck.

Gut sichtbar sind die cytoplasmatischen Bewegungen, die wellenartig an der Oberfläche der Zellen verlaufen.

Normale und pathologische Teilungen

Aufnahmefrequenz 8 bis 4 B/min

Die untere Zelle befindet sich im Stadium der frühen Prophase. Deutlich ist die Pinocytose erkennbar an den Vakuolen, die sich in Kernnähe auflösen. Die beiden anderen Zellen, charakterisiert durch ihre runden, gegen das umgebende Cytoplasma scharf abgegrenzten Zellkerne mit den Kernkörperchen, sind Interphasezellen.

Die untere Zelle zeigt nun den Ablauf einer regulären Mitose. Während das Cytoplasma sich kontrahiert, werden die Chromosomen allmählich sichtbar, die Kernmembran löst sich auf, die Nukleoli verschwinden, und die Chromosomen ordnen sich zur Metaphase; dabei oszillieren sie in der Äquatorialebene.

Jetzt das Auseinanderweichen der Tochterchromosomen in der Anaphase und die Durchschnürung des Cytoplasmas in der Telophase.

In der Rekonstruktionsphase erfolgt die Bildung der Tochterkerne. Nukleoli und Kernmembranen werden sichtbar, und das Cytoplasma der Tochterzellen breitet sich aus.

Die Zellteilung hat insgesamt etwa 4 Stunden gedauert. In der Interphase setzt als Zeichen der beginnenden Stoffaufnahme die Pinocytose in den Tochterzellen ein.

Die Teilung dieser Zelle verläuft pathologisch. Jetzt in der Metaphase weist sie noch keine Besonderheiten auf. Im weiteren Ablauf zeigen sich aber Anomalien: die Spindel mit den Tochterchromosomen wird hin- und hergeschoben, und die Durchschnürungsvorgänge sind gestört.

Diese Störung führt dazu, daß der größte Teil des Kernmaterials in eine der Tochterzellen gelangt. In der Rekonstruktionsphase entsteht eine zweikernige Tochterzelle, während die andere Zelle offenbar nicht genügend Material erhielt, um einen Kern zu bilden.

Allgemein sind bei HeLa-Kulturen etwa 20% der Teilungen abnorm.

Hier tritt die Mitoseanomalie schon während der Metaphase in der tripolaren Anordnung der Chromosomen zutage. Aus dieser Anlage entstehen drei

Tochterzellen, die durch eine dünne Cytoplasmabrücke über längere Zeit verbunden bleiben.

Während unterhalb davon eine reguläre Teilung abläuft, findet in der Rekonstruktionsphase der tripolaren Mitose eine Fusion der beiden linken Tochterzellen statt. Zweikernige Zellen können somit auch durch Zellfusion entstehen.

In der zweikernigen Zelle liegen die beiden Kerne jetzt so eng beieinander, daß sie an den Berührungsstellen abgeplattet sind; ihre Individualität bleibt aber eindeutig erhalten.

Diese Aufnahme ist ein weiteres Beispiel für Mitoseanomalien. Sie zeigt eine pentapolare Gruppierung der Chromosomen während der Metaphase. Im Cytoplasma enthält diese Zelle einen Einschlußkörper.

Die Bewegungen in der Anaphase erscheinen völlig irregulär. Bei der Durchschnürung in der Telophase bietet sich ein verwirrendes Bild. Die Tochterzellen sind um so schwerer zu identifizieren, als sie zum Teil außerhalb der optischen Ebene liegen. Eine abgesprengte Plasmamasse am Bildrand oben rechts, die sich lebhaft bewegt, ist noch durch einen Plasmafortsatz mit den zentralen Zellen verbunden.

Der Teilungsvorgang ist im Vergleich zum regulären Ablauf stark verlangsammt, und die Rekonstruktion der einzelnen Tochterzellen erfolgt nicht gleichzeitig. Besonders die Zellen in Bildmitte haben eine deutlich verlängerte Rekonstruktionsphase, während die linke und auch die rechte Tochterzelle bereits mehrere Zellkerne erkennen lassen.

Beim Übergang in die Interphase zeigen die neu entstandenen Zellen eine sehr unterschiedliche Kern- und Cytoplasmaverteilung: rechts und links oben je eine Tochterzelle mit mehreren Kernen, links unten eine vergrößerte Zelle mit nur einem Kern, dazwischen zwei kleine Zellen, von denen die eine anscheinend einen, die andere mehrere Kerne besitzt, und in der Mitte ein Restkörper, der möglicherweise mit dem schon zu Beginn der Teilung sichtbaren Einschlußkörper identisch ist.

Hier grenzen in Bildmitte zwei Riesenzellen aneinander, von denen nur Ausschnitte sichtbar sind. Riesenzellen sind in HeLa-Kulturen mit einer Häufigkeit von etwa 1% enthalten. Links sehen wir eine vielkernige Riesenzelle, deren Telophase etwa 2 Stunden zurückliegt. Einen Vergleich der Größenunterschiede erlaubt die oberhalb der Bildmitte liegende normale Zelle, die sich jetzt teilt.

Literatur und Filmveröffentlichungen

Allgemeine Literatur zur Gewebezüchtung und Strahlenbiologie:

- [1] CAMERON, G.: Tissue Culture Technique. New York 1950.
- [2] FISCHER, A.: Gewebezüchtung. Müller u. Steinicke, München 1930.
- [3] FISCHER, I.: Grundriß der Gewebezüchtung. S. Fischer, Jena 1942.
- [4] GÄRTNER, H.: Untersuchungen an der Gewebekultur. In: Strahlenpathologie der Zelle. Ed. E. SCHERER u. H. St. STENDER. Thieme, Stuttgart 1963.
- [5] HAGEN, U.: Biochemie der biologischen Strahlenwirkungen. In: Ergebnisse der med. Strahlenforschung, Bd. I. Thieme, Stuttgart 1964.

- [6] DE HEVESEY, G. K., A. G. FORSSBERG and J. D. ABATT: *Advances in Radiobiology*. Oliver & Boyd, London 1957.
- [7] HOLLAENDER, A.: *Radiation Biology I. u. II*. McGraw-Hill Book Inc. 1954.

Spezielle Literatur:

- [8] BRACHET, J., and A. E. MIRSKY: *The Cell*. Vol. I. Academic Press, New York — London 1959.
- [9] BRAND, G.: Virusimpfstoffe — Zellkulturen — Krebs: Eine bemerkenswerte Querverbindung. *Fortschr. Med.* **81** (1963), 65.
- [10] EDLINGER, E. A.: Die somatische Zelle als Mikroorganismus. *Probleme der Zellkultur*. *Wien. klin. Wschr.* **72** (1960), 633.
- [11] GÄRTNER, H.: Strahlenbiologische Grundlagen für die Anwendung energiereicher Strahlen. *Strahlentherapie* **107** (1958), 619.
- [12] GÄRTNER, H.: Experimentalforschung an Gewebekulturen als Grundlage für die Behandlung mit energiereichen Strahlen. *Strahlentherapie* **114** (1961), 1.
- [13] GEY, G. O., W. D. COFFMAN and M. T. KUBICEK: Tissue Culture Studies of the Proliferative Capacity of Cervical Carcinoma and Normal Epithelium. *Cancer Res.* **12** (1952), 264.
- [14] HSU, T. C.: Cytological Studies on HeLa, a Strain of Human Cervical Cancer. I. Observations on Mitosis and Chromosomes. *Tex. Rep. Biol. Med.* **12** (1954), 833.
- [15] LEIGHTON, J., and J. KLINE: Studies on Human Cancer Using Sponge Matrix Tissue Culture. II. Invasion of Connective Tissue by Carcinoma (Strain HeLa). *Tex. Rep. Biol. Med.* **12** (1954), 865.
- [16] MOORHEAD, P. S., and T. C. HSU: Cytologic Studies of HeLa, a Strain of Human Cervical Carcinoma. III. Durations and Characteristics of the Mitotic Phases. *J. nat. Cancer Inst.* **16** (1956), 1047.
- [17] PAUL, J.: *Cell and Tissue Culture*. E. and S. Livingstone, Ltd., Edinburgh — London 1961.
- [18] PETERS, K.: Untersuchungen über die Einwirkung von Elektronenstrahlen auf Karzinomzellen (Stamm: HeLa) in Gewebekulturen. *Fortschr. Röntgenstr.* **88** (1958), 50.
- [19] SCOTTI, T. M., M. A. WRZYK, M. DORSEY jr. and M. SIGEL: Transplantation of Human Malignant Epithel Cells from Tissue Culture to Rat Brains. *Cancer Res.* **20** (1960), 58.
- [20] SPEAR, F. G.: *Radiations and Living Cells*. Chapman and Hall Ltd., London 1953.

Filmveröffentlichungen:

- [21] GÄRTNER, H.: Zellteilung in Gewebekulturen (Hühnerherzfibroblasten). Film C 615 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1952.
- [22] GÄRTNER, H.: Wirkung von Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen auf Gewebekulturen (Hühnerherzfibroblasten). Film C 616 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1952.
- [23] GÄRTNER, H.: Zellschädigung durch 184-kV-Röntgenstrahlen und 15-MeV-Elektronen. Film B 633 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1953.

- [24] GÄRTNER, H.: Wirkung der ultraharten Röntgenstrahlen eines 15 MeV-Betatrons auf Gewebekulturen. Film C 634 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1953.
- [25] GÄRTNER, H., u. K. PETERS: Portio-Carcinom in vitro, Stamm HeLa — Homo sapiens — Cytomorphologie. Film E 561 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1963.
- [26] GÄRTNER, H., u. K. PETERS: Portio-Carcinom in vitro, Stamm HeLa — Homo sapiens — Zellschädigung durch Röntgenstrahlen (180 kV). Film E 562 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1963.
- [27] GÄRTNER, H., u. K. PETERS: Portio-Carcinom in vitro, Stamm HeLa — Homo sapiens — Zellschädigung durch Gammastrahlen (Cobalt 60). Film E 563 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1963.
- [28] GÄRTNER, H., u. K. PETERS: Portio-Carcinom in vitro, Stamm HeLa — Homo sapiens — Zellschädigung durch Elektronen (17 MeV). Film E 564 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1963.
- [29] GÄRTNER, H., u. K. PETERS: Menschliche Krebszellen in der Kultur — Portio-Carcinom, Stamm HeLa. Film C 874 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1964.
- [30] GÄRTNER, H., u. K. PETERS: Strahlenschädigung menschlicher Krebszellen in der Kultur — Portio-Carcinom, Stamm HeLa. Film C 875 des Inst. Wiss. Film, Göttingen 1964.

Angaben zum Film

Der Film wurde 1964 veröffentlicht und ist für die Verwendung im Hochschulunterricht bestimmt. Tonfilm, 16 mm, schwarzweiß, 100 m, 9 ½ min (Vorführgeschw. 24 B/s).

Die Aufnahmen entstanden im Jahre 1961 und wurden 1963 bearbeitet. Veröffentlichung aus dem Medizinischen Strahleninstitut der Universität Tübingen, Prof. Dr. HENRIETTE GÄRTNER, Priv.-Doz. Dr. K. PETERS, und dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, Dr. G. BEKOW; Aufnahme: E. HEYSE.

Inhalt des Films

Der Film zeigt in Zeitrafferaufnahmen die besonderen Merkmale der HeLa-Zellen in vitro. Neben normalen Interphasezellen und normalen Mitosen sind Zellanomalien zu sehen: multipolare Teilungen, mehrkernige Tochterzellen, ungleiche Verteilung von Kern- und Cytoplasmamaterial im Verlauf der Telophase und Riesenzellbildungen.

Summary of the Film

The film shows in time-lapse exposures the peculiar characteristics of HeLa cells in vitro. In addition to normal interphase cells and normal mitoses, cell

anomalies can be seen: multipolar divisions, multinucleated daughter cells, unequal distribution of nuclear and cytoplasmatic material in the course of the telophase, and formation of giant cells.

Résumé du Film

Le film montre au ralenti les caractères particuliers des cellules HeLa in vitro. On voit, à côté de cellules normales en interphase, et des mitoses normales, des anomalies cellulaires telles que divisions multipolaires, cellules filles à plusieurs noyaux, répartition irrégulière du matériel nucléaire et cytoplasmique au cours de la télophase, ainsi que la formation de cellules géantes.