

ENCYCLOPAEDIA CINEMATOGRAPHICA

Editor: G. WOLF

E 561/1963

Portio-Carcinom in vitro

Stamm HeLa — Homo sapiens

Cytomorphologie

GÖTTINGEN 1966

INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM

Der Film ist ein Forschungsdokument und wurde zur Auswertung in Forschung und Hochschulunterricht veröffentlicht. Länge der Kopie (16-mm-Stummfilm, schwarzweiß): 120 m
Vorföhrdauer: 11 Min. — Vorföhrgeschwindigkeit: 24 B/s

Inhalt des Films

Der Film zeigt 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, Endomitosen und Riesenzellbildungen.

Die Aufnahme des Films erfolgte im Jahre 1961 durch das
Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen
(Direktor: Dr.-Ing. G. WOLF)
Sachbearbeitung: Dr. G. BEKOW, Aufnahme: E. HEYSE
Wissenschaftliche Leitung und Begleitveröffentlichung:
Prof. Dr. HENRIETTE GÄRTNER, Priv.-Doz. Dr. K. PETERS
Medizinisches Strahleninstitut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. R. BAUER)

Portio-Carcinom in vitro

Stamm HeLa — *Homo sapiens*

Cytomorphologie

HENRIETTE GÄRTNER und K. PETERS, Tübingen

Allgemeine Vorbemerkungen

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 Gegentest gegeben ist (GÄRTNER [12], [25] bis [26]).

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 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 teilerweiterten 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 SCOTTI, WRYK, DORSEY u. Mitarb. 1960 unter Beweis [19].

Zu den Filmaufnahmen

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 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

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

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 Bildern pro Minute und 30 Bildern pro Stunde, 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* bilden die Versuche zugleich die Basis für die in weiteren Filmen erfaßten strahlenbiologischen Phänomene (GÄRTNER [25] bis [26]).

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.

Filminhalt

*Übersicht*¹⁾

2 bis 1 B/Min.

Die erste Aufnahme soll einen Überblick über das typische Wachstum der HeLa-Zellen *in vitro* vermitteln. In dieser Übersicht einer einschichtig gewachsenen HeLa-Kultur ist die Herkunft der Zellen von einem Plattenepithel deutlich zu erkennen. Im Gegensatz zu Fibroblasten, die *in vitro* ein gerichtetes Wachstum aufweisen [21], sehen wir hier nur ein Verschieben der Zellen gegeneinander. Die Malignität der Zellen kommt schon hier in einer regen Teilungsaktivität, in Mitoseanomalien und Riesenzellen zum Ausdruck (Aufnahmefrequenz: 1 B/Min.)

In der zweiten Aufnahme (Aufnahmefrequenz: 2 B/Min.) ist besonders auf die Zelle in der Bildmitte hinzuweisen. Als Anomalie enthält sie links neben ihrem Kern einen Nebenkern. Sie tritt nun in die Mitose ein, das Cytoplasma zieht sich zusammen, die Membranen von Haupt- und Nebenkern lösen sich auf, die Chromosomen werden sichtbar und ordnen

¹⁾ Die *Kursiv*-Überschriften entsprechen den Zwischentiteln im Film.

sich zur Metaphaseplatte. Es folgt die Anaphase mit der Trennung der Tochterchromosomen und der Durchschnürung des Cytoplasmas. In der Rekonstruktionsphase werden zwei einkernige Tochterzellen sichtbar. Während in früheren Experimenten an Hühnerherzfibroblasten die Entstehung eines Nebenkernes aus einem während der Anaphase liegegebliebenen Chromosom im Film gezeigt werden konnte (GÄRTNER [23]), läßt sich hier demonstrieren, daß in der darauffolgenden Teilung der Nebenkern funktionell und strukturell synchron in die Kernteilung einbezogen wird.

Währenddessen hat links unten im Bild eine weitere Zelle mit der Mitose begonnen. Die Metaphase mit der Einordnung der Chromosomen in die Äquatorialebene verläuft hier jedoch deutlich verzögert, ein Zeichen dafür, daß Abweichungen vom normalen Teilungsmechanismus zu erwarten sind. Als morphologische Manifestation der Anomalie wird eine tripolare Konstellation in der Anaphase kurz sichtbar, aus der im Verlauf der Telophase drei Tochterzellen entstehen. Demgegenüber verläuft der andere Teilungsvorgang 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 Teilungen

8 bis 1 B/Min.

Die nächste Teilung wurde bei stärkerer Vergrößerung aufgenommen (Aufnahmefrequenz: 8 B/Min.). Die untere Zelle befindet sich im Stadium der frühen Prophase und zeigt eine lebhaft Pinocytose, erkennbar an den Vakuolen, die sich in Kernnähe auflösen. Die beiden anderen Zellen sind mit ihren runden, gegen das umgebende Cytoplasma scharf begrenzten Zellkernen und den Kernkörperchen deutlich als Interphasezellen zu erkennen. An der unteren Zelle läßt sich nun der Ablauf einer regulären Mitose demonstrieren: Während das Cytoplasma sich kontrahiert, werden die Chromosomen allmählich sichtbar, die Kernmembran löst sich auf, die Nukleoli verschwinden, und die Chromosomen ordnen sich zur Metaphaseplatte an; dabei oszillieren sie in der Äquatorialebene. Es folgt das Auseinanderweichen der Tochterchromosomen in der Anaphase und die Durchschnürung des Cytoplasmas in der Telophase. In der Rekonstruktionsphase erfolgt die Bildung der Tochterkerne, wobei zuerst die Nukleoli und dann die Kernmembranen wieder sichtbar werden. Anschließend breitet sich das Cytoplasma der Tochterzellen aus, so daß diese beiden neu entstandenen Zellen sämtliche Charakteristiken der Interphasezellen annehmen. Die Zellteilung hat insgesamt vier Stunden

gedauert. Mit Beginn der Interphase setzt als Zeichen der regen Stoffwechselftigkeit die Pinocytose in den Tochterzellen ein.

Die nächste Aufnahme (Aufnahmefrequenz: 1 B/Min.) läßt am oberen Bildrand eine abnorme Zelle mit einem Haupt- und zwei Nebenkernen erkennen, die in die Mitose eintritt. Oben rechts und in der Mitte darunter sehen wir zwei andere Mitosen, deren Teilungsstadien zeitlich regulär durchschritten werden. Bei der oberen Zelle verläuft die Metaphase stark verzögert, und die Richtung der Äquatorialplatte ändert sich mehrfach.

Vor dem Eintritt in die Anaphase ist das Bild der sogenannten Ballmetaphase gut sichtbar. Während der Anaphase ordnen sich die Chromosomen vorübergehend tripolar an; in der dann folgenden Telophase tritt diese Gruppierung jedoch nicht mehr in Erscheinung, sondern die endgültige Teilung erfolgt ungleich bipolar.

Pathologische Teilungen

8 B/Min. bis 30 B/Std.

In der nun folgenden Teilung (Aufnahmefrequenz: 8 B/Min.) weist die Metaphase noch keine Besonderheiten auf. Im weiteren Ablauf zeigen sich aber Anomalien: Die Spindel mit den Tochterchromosomen wird hin- und hergeschoben, und die Durchschnürungsvorgänge in der Telophase erscheinen gestört. Diese Störung führt dazu, daß der größte Teil des Kernmaterials in eine der Tochterzellen gelangt. In der Rekonstruktionsphase entstehen in der einen Tochterzelle zwei Kerne, während die Geschwisterzelle, die offenbar nicht genügend Material erhielt, um einen Kern zu bilden, nur ein Kerngerüst schwach erkennen läßt.

Bei der folgenden Aufnahme (Aufnahmefrequenz: 8 B/Min.) tritt die Mitoseanomalie 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. Im Gegensatz zu der vorigen Aufnahme entsteht hier die zweikernige Zelle durch Zellfusion und ermöglicht somit die Demonstration eines weiteren Entstehungsmodus für die Bildung mehrkerniger Zellen. In der zweikernigen Zelle liegen die beiden Kerne so eng aneinander, daß sie an den Berührungsstellen abgeplattet erscheinen; ihre Individualität bleibt aber eindeutig erhalten.

Die folgende Aufnahme (Aufnahmefrequenz: 8 B/Min.) liefert ein weiteres Beispiel für Mitoseanomalien. Sie zeigt eine pentapolare Gruppierung der Chromosomen während der Metaphase. Im Cytoplasma ent-

hält die 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 verlangsamt, und die Rekonstruktion der einzelnen Tochterzellen erfolgt nicht gleichzeitig. Besonders die Zellen in der 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 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.

In der nächsten Aufnahme (Aufnahmefrequenz: 15 B/Min.) grenzen in der Bildmitte zwei Riesenzellen aneinander, von denen nur Ausschnitte sichtbar werden. Riesenzellen sind in HeLa-Kulturen mit einer Häufigkeit von 1 bis 2% enthalten (PETERS [18]). Bei der linken Riesenzelle liegt die Telophase etwa zwei Stunden zurück. Einen Vergleich der Größenunterschiede erlaubt die oberhalb der Bildmitte liegende normale Zelle, die gerade eine Mitose durchläuft.

In der letzten Aufnahme (Aufnahmefrequenz: 30 B/Std.) ist der Verlauf der Endomitose einer Riesenzelle zu sehen. Das Cytoplasma kontrahiert sich zunächst wie bei Beginn einer normalen Mitose. Die typischen Kernveränderungen der Mitose bleiben jedoch aus; die Individualität des Zellkernes gegenüber dem Cytoplasma, das sich nach einiger Zeit wieder ausbreitet, bleibt erhalten. Die Messung der Kernflächen vor und nach dem Ablauf dieses Prozesses ergab eine Zunahme um den Faktor 2 und stellt damit unter Beweis, daß es sich um eine Endomitose handelt. Die in den abschließenden Bildern um die Riesenzelle liegenden normalen Zellen erlauben einen Größenvergleich.

Literatur

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] HEVESEY, G. K. de, A. G. FORSSBERG a. J. D. ABATT: Advances in Radiobiology. Oliver a. Boyd, London 1957.
- [7] HOLLAENDER, A.: Radiation Biology I. u. II. Mc. Graw-Hill Book Inc. 1954.

Spezielle Literatur

- [8] BRACHET, J., a. 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 a. 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., a. 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., a. 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. a. 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. WRYK, M. DORSEY jr. a. 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.

Begleitveröffentlichungen zu Filmen
des Instituts für den Wissenschaftlichen Film

- [21] GÄRTNER, H.: Zellteilung in Gewebekulturen. Film C 615/1952.
- [22] GÄRTNER, H.: Wirkung von Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen auf Gewebekulturen (Hühnerherzfibroblasten). Film C 616/1952.
- [23] GÄRTNER, H.: Zellschädigung durch 184-kV-Röntgenstrahlen und 15-MeV-Elektronen. Film B 633/1953.
- [24] GÄRTNER, H.: Wirkung von ultraharten Röntgenstrahlen eines 15-MeV-Betatrons auf Gewebekulturen. Film C 634/1953.

Begleitveröffentlichungen zu Filmen
der ENCYCLOPAEDIA CINEMATOGRAPHICA

- [25] GÄRTNER, H., u. K.PETERS: Portio-Carcinom in vitro, Stamm HeLa — Homo sapiens — Zellschädigung durch Röntgenstrahlen (180 kV). Film E 562/1963.
- [26] GÄRTNER, H., u. K.PETERS: Portio-Carcinom in vitro, Stamm HeLa — Homo sapiens — Zellschädigung durch Gammastrahlen (Cobalt 60). Film E 563/1963.
- [27] GÄRTNER, H., u. K.PETERS: Portio-Carcinom in vitro, Stamm HeLa — Homo sapiens — Zellschädigung durch Elektronen (17 MeV). Film E 564/1963.