INTERZELLULÄRE KOMMUNIKATION IN DREIDIMENSIONAL WACHSENDEN MULTIZELL-SPHÄROIDEN

EIN ZELLKULTURMODELL ZUR VERRINGERUNG VON TIERVERSUCHEN.

Dieter F. Hülser, Thomas Bräuner und Franz Brümmer

Abt. Biophysik, Biologisches Inst., Universität Stuttgart
Ulmer Str. 227, 7000 Stuttgart 60

Tiere erreichen stets ihre artspezifische Größe und Gestalt. Sie mag zwar von Individuum zu Individuum etwas variieren, ihr Bauplan ist jedoch genetisch festgelegt. Woher wissen aber einzelne Zellen, daß die programmierte räumliche Ordnung und die Funktionsfähigkeit des von ihnen gebildeten Organs oder Gewebes erreicht ist und daß sie sich nur bei Bedarf wieder zu teilen haben? Eine der Möglichkeiten für eine Informationsübermittlung ist die direkte Kommunikation von Zelle zu Zelle über enge Kanäle. Diese interzelluläre Kopplung läßt mannigfachen Informationsaustausch zu, wobei die Geschwindigkeit der Nachrichtenübermittlung von der Diffusionsfähigkeit der signaltragenden Moleküle abhängt.

Schon für die früheste Embryonalentwicklung ist dieses Informationssystem nachgewiesen worden. Bei den meisten Arten findet man es nach der dritten Teilung des befruchteten Eies, wenn erst acht Zellen vorhanden sind (5). In späteren Entwicklungsstadien ermöglicht die Kopplung zwischen Dottersack und den sich heranbildenden spezialisierten Organen eine

interzelluläre Nährstoffversorgung (11), eine Aufgabe, die schließlich vom Blutkreislauf übernommen wird. Während der Differenzierung von Zellen zu einem Gewebe oder Organ entkoppeln sich diese von den umgebenden undifferenzierten Zellen. Im vollständig ausdifferenzierten Zustand sind die Zellen eines Organs nur dann ständig über diese Kanäle gekoppelt, wenn dazu eine funktionelle physiologische Notwendigkeit besteht. Diese ist für den koordinierten Herzschlag genauso gegeben wie für die Peristaltik des Darmes oder die gezielte Hormonausschüttung von Drüsenzellen. Nach mechanischen Verletzungen oder Einwirkungen von zellschädigenden Substanzen antworten die gesunden Zellen mit gezielten Teilungen, die den Zellverlust wieder ausgleichen. Auch diese Information über das Ausmaß der notwendigen Gewebe- oder Organergänzung gelangt über gezieltes Öffnen der Zell-zu-Zell-Kanäle äußerst fein abgestimmt zu den teilungsfähigen Zellen.

Diese Kanäle sind in den Membranen der koppelnden Zellen verankert und überbrücken den dazwischenliegenden engen Spalt (14). Jede der beteiligten Zellen steuert so zur Kanalbildung in den Kontaktstellen einen Halbkanal (Connexon) bei, der an sein Gegenstück in der anderen Zelle binden muß (6). Unsere hochauflösenden elektrophysiologischen Untersuchungen an Zellkulturen haben ergeben, daß die Connexone jedoch erst öffnen, wenn mehrere zu einer sogenannten gap junction in der Membran aggregiert sind (8).

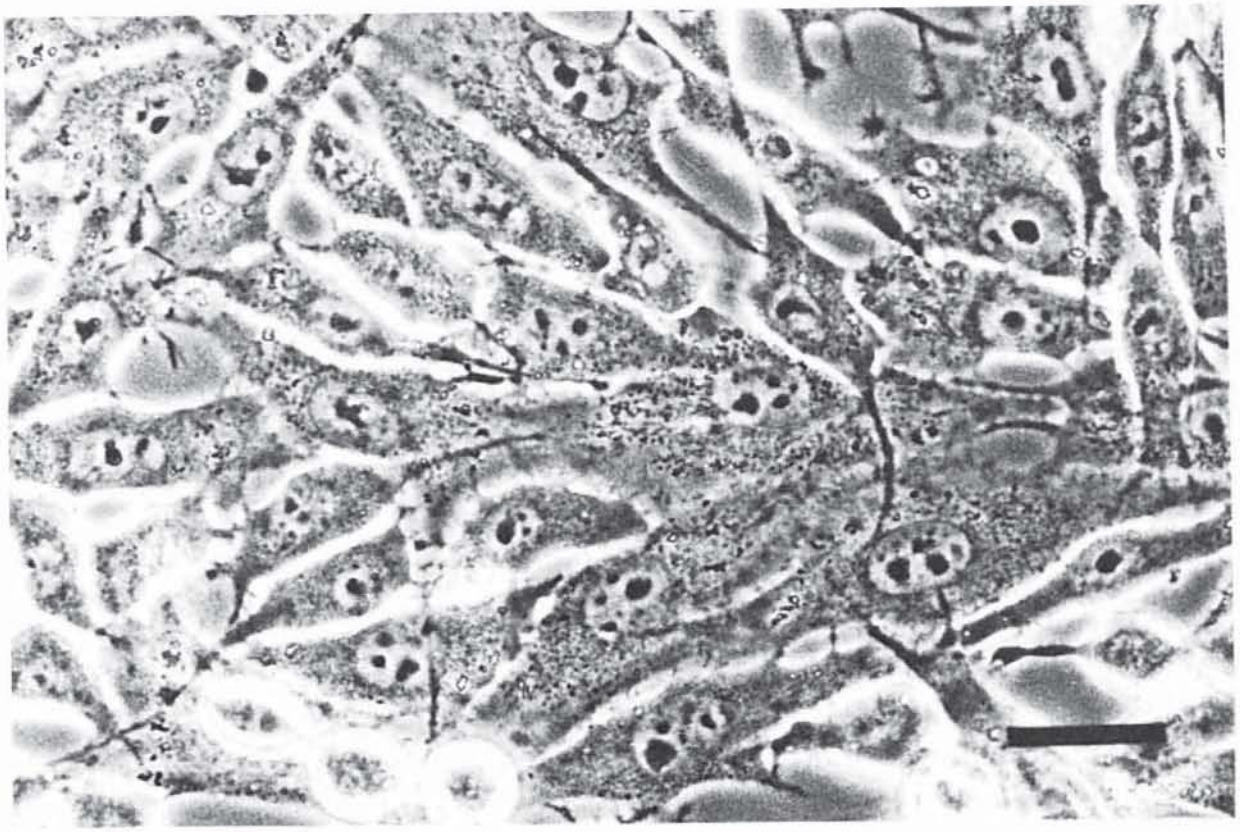
Am Beispiel dieser direkten interzellulären Kommunikation konnten wir zeigen, daß in zweidimensional wachsenden Zellkulturen auch die in Tieren gefundenen Strukturen der gap junctions ausgebildet werden, ohne daß die üblichen Funktionen geleistet werden. Sobald die Zellen jedoch mit einem Züchtungstrick dazu gebracht werden, dreidimensional wachsende Zellaggregate zu formen, lassen sich an ihnen auch wieder Regulationsleistungen und Organisationsmerkmale nachweisen, wie man sie vom intakten Organismus her kennt.

Diese Multizell-Sphäroide zeigen das gleiche histologische Bild wie kleine Tumorknötchen und sind wie diese durch das Auftreten von zentralen Nekrosen charakterisiert. An solchen Modelltumoren konnten wir einen Zusammenhang zwischen der Strahlenresistenz von Tumorzellen und ihrem Kopplungsverhalten nachweisen (1). Diese Ergebnisse führten zu klinischen Versuchen, bei denen vor der Bestrahlung von Tumorpatienten die wirksame minimale Strahlendosis durch Kommunikationsmessungen an Tumorbiopsien ermittelt wurden (2). Messungen der Strahlenresistenz der entsprechenden Tumore nach Transplantation in Nacktmäuse können so entfallen.

Ergänzend zu diesen Experimenten untersuchen wir jetzt den Zusammenhang zwischen Invasivität von Tumorzellen und ihrer Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation mit dem konfrontierten Gewebe. Dies kann nicht mehr ausschließlich mit Multizell-Sphäroiden aus permanent wachsenden Zellinien durchgeführt werden, da ein Zielgewebe benötigt wird, dessen Zellen sich nicht mehr teilen (proliferieren). Solche nicht-proliferierenden Multizell-Sphäroide kann man aus neun Tage lang bebrüteten Hühnereiern gewinnen.

Messung der interzellulären Kommunikation in Zellkulturen

Mit Hilfe feinster Mikropipetten - aus Glaskapillaren vor dem Versuch frisch gezogen und mit einem fluoreszierenden Farbstoff gefüllt - gelingt es, in eine Zelle der Kultur eine zellfremde Substanz zu injizieren. Die so aufgezwungenen "Botenmoleküle" machen die interzelluläre Kommunikation direkt sichtbar, wie in Abb.1 mit einer Monoläyer-Kultur von BICR/M1R-k Zellen (Brusttumor der weiblichen Marshall Ratte, (12)) gezeigt ist. Die Ausläufer der Zellen und ihre Kontaktstellen mit Nachbarzellen sind im Phasenkontrast deutlich auszumachen. Dieselben Zellen sind im Fluoreszenzbild zu sehen, zwei Minuten nachdem in die hell strahlende Zelle der



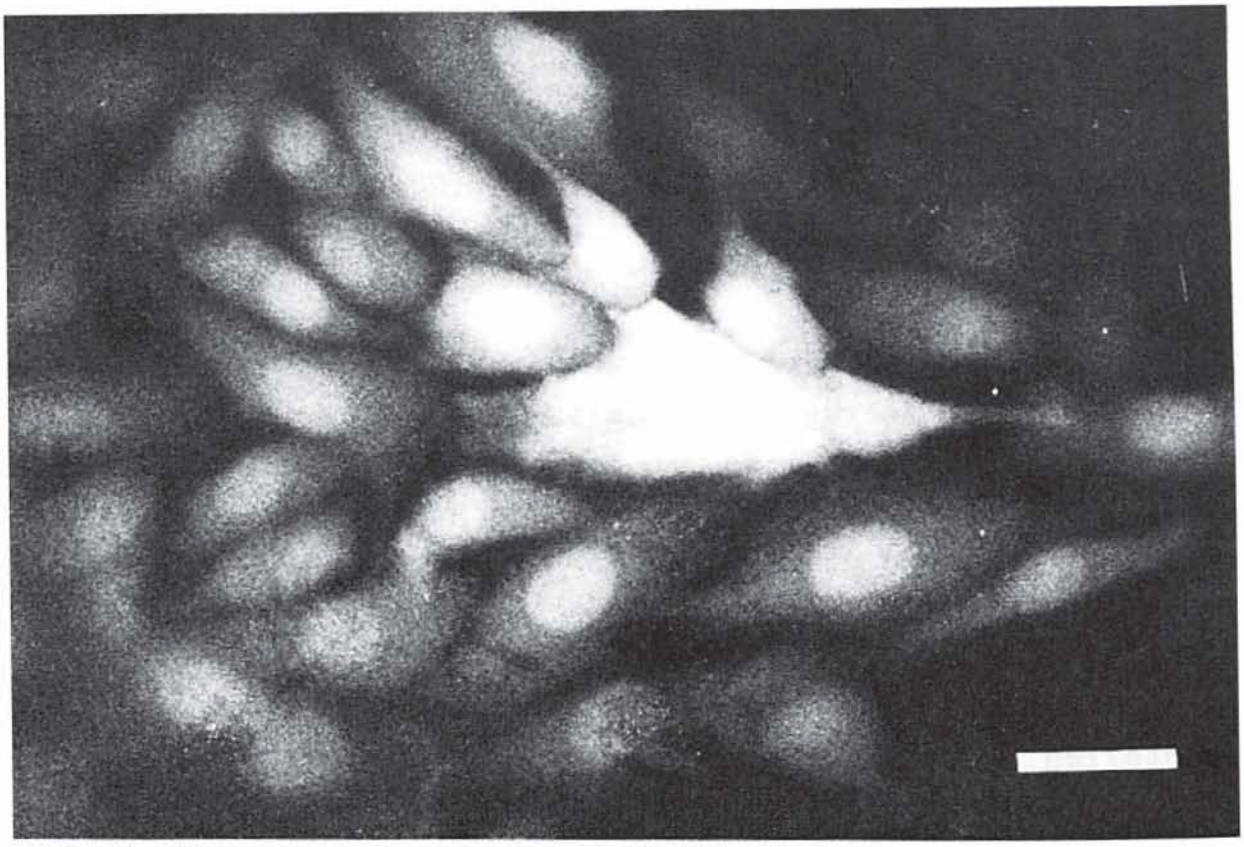


Abb. 1: Monolayer-Kultur von BICR/M1R-k Zellen.
Oben: Phasenkontrast-Aufnahme. Unten: Fluoreszenz-Aufnahme der selben Stelle. Der in die hell strahlende Zelle injizierte Fluoreszenzfarbstoff hat sich über gap-junction-Kanäle in die angekoppelten Zellen ausgebreitet. Maßstab: 30 µm

Farbstoff Lucifer yellow (Molekulargewicht 457) injiziert worden ist. Die Farbstoffmoleküle sind in alle Zellen diffundiert, die direkt oder über andere Zellen mit der injizierten Zelle in Kontakt stehen.

Eine andere Möglichkeit, interzelluläre Kommunikation nachzuweisen, ist mit elektrolytgefüllten Mikropipetten gegeben, die dem Membranpotential einer Zelle ein kleines Stromsignal aufprägen. Es kann nach Durchgang durch die gap junctions mit dem Membranpotential benachbarter Zellen wieder abgeleitet werden (Abb.2). Aus dem Vergleich der Signalamplituden läßt sich der Kopplungsgrad der Zellen zahlenmäßig erfassen. Diese elektrophysiologischen Messungen erlauben eine weitere Charakterisierung der Zellen: man kann ihre Membranpotentiale und ihre Membranwiderstände messen.

Während man ziemlich sicher weiß, daß die Art des Signals zwischen Herzzellen ein elektrischer Impuls ist (Abb.3), kann man über die Natur des Signals zwischen Zellen in anderen Organen im Moment nur spekulieren. Einige Ionen und Moleküle, wie Calciumionen und cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), für die bereits eine Botenfunktion innerhalb der Zelle nachgewiesen wurde, scheinen die Öffnung und Schließung der Poren zu beeinflussen, so daß sie eher als signalsteuernde Moleküle in Frage kommen.

Elektronenmikroskopische Darstellung der Zell-zu-Zell-Kanäle

Gap junctions können in den Zellmembranen benachbarter Zellen im Elektronenmikroskop eindeutig sichtbar gemacht werden. Nach strukturerhaltender Fixierung in Glutardialdehyd werden die Zellen über eine aufsteigende Alkoholreihe in Polyester (Epon) überführt, polymerisiert und mit einem Ultramikrotom etwa 60 nm (1 nm = 1 millionstel Millimeter) dünn geschnitten. Die mit Uran-, Blei- oder Lanthansalzen kontrastierten Membranen der Zellen lassen sich auf solchen

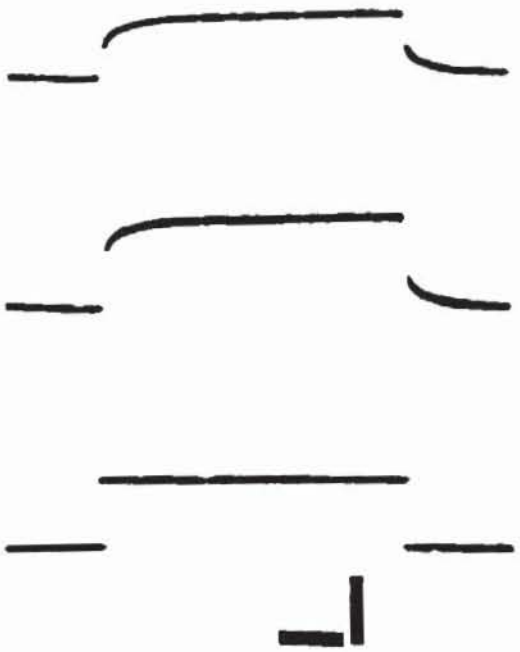


Abb. 2: Ein intrazellulär injizierter rechteckiger Strompuls (unten) führt zu Membranpotentialänderungen in gekoppelten BICR/M1R-k Zellen (Mitte und oben). Das Verhältnis der Potentialamplituden ist ein Maß für den Grad der Kopplung. Horizontaler Maßstab: 10 ms Vertikaler Maßstab: 50 mV bzw. 20 nA

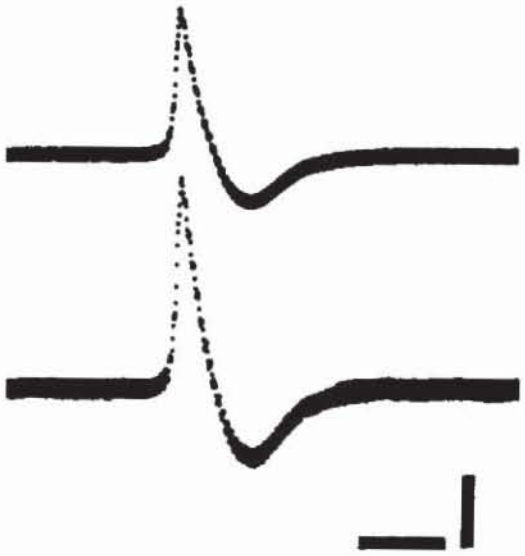


Abb. 3: Aktionspotentiale abgeleitet aus benachbarten embryonalen Hühnerherz Zellen in Kultur: natürliche elektrische Signale, die durch gap-junction-Kanäle weitergeleitet werden.
Horizontaler Maßstab: 1 sec
Vertikaler Maßstab: 5 mV

Schnitten im Elektronenmikroskop deutlich erkennen und heben die Kontaktstellen zwischen den Zellen deutlich hervor, wie in Abb.4 dargestellt ist.

Mit einer anderen Präparationstechnik - der Gefrierbruch-Methode - lassen sich größere Abdrücke von Zellmembranen herstellen. Nach raschem Einfrieren in flüssigem Propan bei annähernd -190 °C bricht man die Zellen im Hochvakuum noch im tiefgefrorenen Zustand auseinander. Als vorteilhaft für Membranuntersuchungen erweist sich dabei die Tatsache, daß bei tiefgefrorenen Zellen die Lipiddoppelschicht ihrer Membranen als Sollbruchstelle wirkt. Daher verlaufen die Bruchflächen in den meisten Fällen innerhalb der Zellmembranen, von denen dann durch Aufdampfen von Platin und Kohle ein Abdruck hergestellt wird. Ein solcher Abdruck zweier benachbarter Membranen mit einer charakteristischen gap junction ist in Abb.4 zu sehen. Der innere Kanal, der eine Zelle mit der Nachbarzelle verbindet, hat nur etwa 1,5 nm lichte Weite und ist mit diesem Abbildungsverfahren nicht aufzulösen.

Aufgrund von elektronenmikroskopischen, biochemischen und elektrophysiologischen Untersuchungen an Zellkulturen kennt man heute viele Details der Poren. So wird ihre Länge mit 15 nm angegeben (14) und ihre chemische Zusammensetzung als hexagonale Anordnung von Polypeptiden eines Molekulargewichts von etwa 26 000 beschrieben (7, 18). Für ihre maximale Leitfähigkeit ergeben sich etwa 330 pS (16), was einen interzellulären Transport von Partikeln bis zu einem Molekulargewicht von etwa 1000 zuläßt (3). Allerdings scheinen die Zellen in Monolayer-Kultur nicht über die gap-junction-Kanäle regulieren zu können: unabhängig von der Dichte des Zellrasens oder dem Alter der Zellen in Kultur bleiben diese Zellen im Monolayer stets gekoppelt. Ganz anders stellt sich die Situation jedoch bei dreidimensionaler Zellaggregation dar.

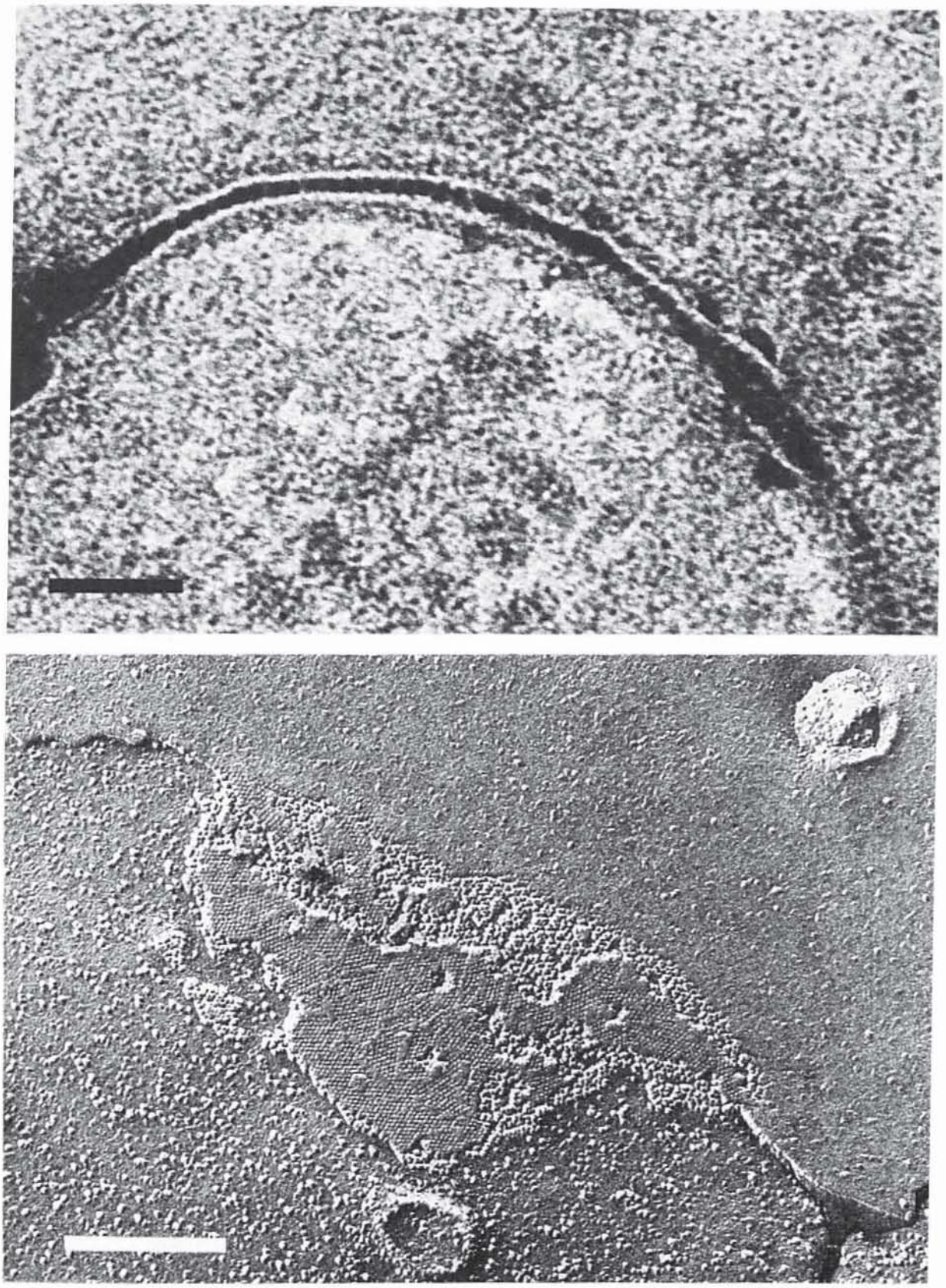


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der gap-junction-Struktur benachbarter BICR/M1R-k Zellen.
Oben: Dünnschnitt, Lanthan-Kontrastierung. Maßstab: 0,05 µm
Unten: Gefrierbruch-Abdruck. Maßstab: 0,25 µm

Züchtung von Multizell-Sphäroiden

Dreidimensional wachsende Multizell-Sphäroide wurden von der Heidelbergerin A. Schleich im Jahre 1967 als knötchenförmige Modelltumore in die Krebsforschung eingeführt (15). Mit dieser Art der Zellzüchtung steht ein Kultursystem von recht hoher Komplexität zur Verfügung, mit dem die Verhältnisse im Tier wesentlich besser angenähert werden können als mit den zweidimensional wachsenden Monolayer-Kulturen.

Die Züchtung von Multizell-Sphäroiden beginnt mit der Aussaat von etwa einer Million Einzelzellen in Plastik-Petrischalen (Bakterienschalen mit 9 cm Durchmesser), die das Anwachsen der Zellen am Schalenboden verhindern. Je nach Wachstumsverhalten der Zellen haben sich innerhalb drei bis fünf Tagen durch Aggregation und Zellteilung zahlreiche Zellklümpchen gebildet, die in Rührflaschen überführt werden. Das ständige Rühren mit 180 Umdrehungen pro Minute gewährleistet auch im serumarmen Medium eine optimale Versorgung der Zellen unter normalen Zuchtbedingungen wie Temperaturkonstanz bei 37 °C, Begasung mit CO_2 zur pH-Regulierung und hoher Luftfeuchtigkeit zur Verhinderung der Mediumverdunstung. So bilden sich bald kugelförmige Zellaggregate unterschiedlicher Größe aus, die über Siebkaskaden nach Volumen getrennt werden. Damit stehen uns Rührkulturen mit einheitlich großen Multizell-Sphäroiden zur Verfügung, die wir bis zu 20 Tage in Kultur wachsen lassen. Ein drei Tage alter Multizell-Sphäroid aus BICR/M1R-k Zellen ist in Abb.5 mit einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme dargestellt; zum Vergleich sind die gleichen Zellen als Monolayer mit der selben Aufnahmetechnik abgebildet.

Um Aussagen über das Verhalten der Multizell-Sphäroide bei Konfrontation mit normalen Zellen machen zu können, ist eine genaue Kenntnis der Wachstumseigenschaften unerläßlich. So zeigt Abb.6 beispielsweise die Volumenzunahme und den pH-Verlauf in einer Multizell-Sphäroid Kultur von BICR/M1R-k

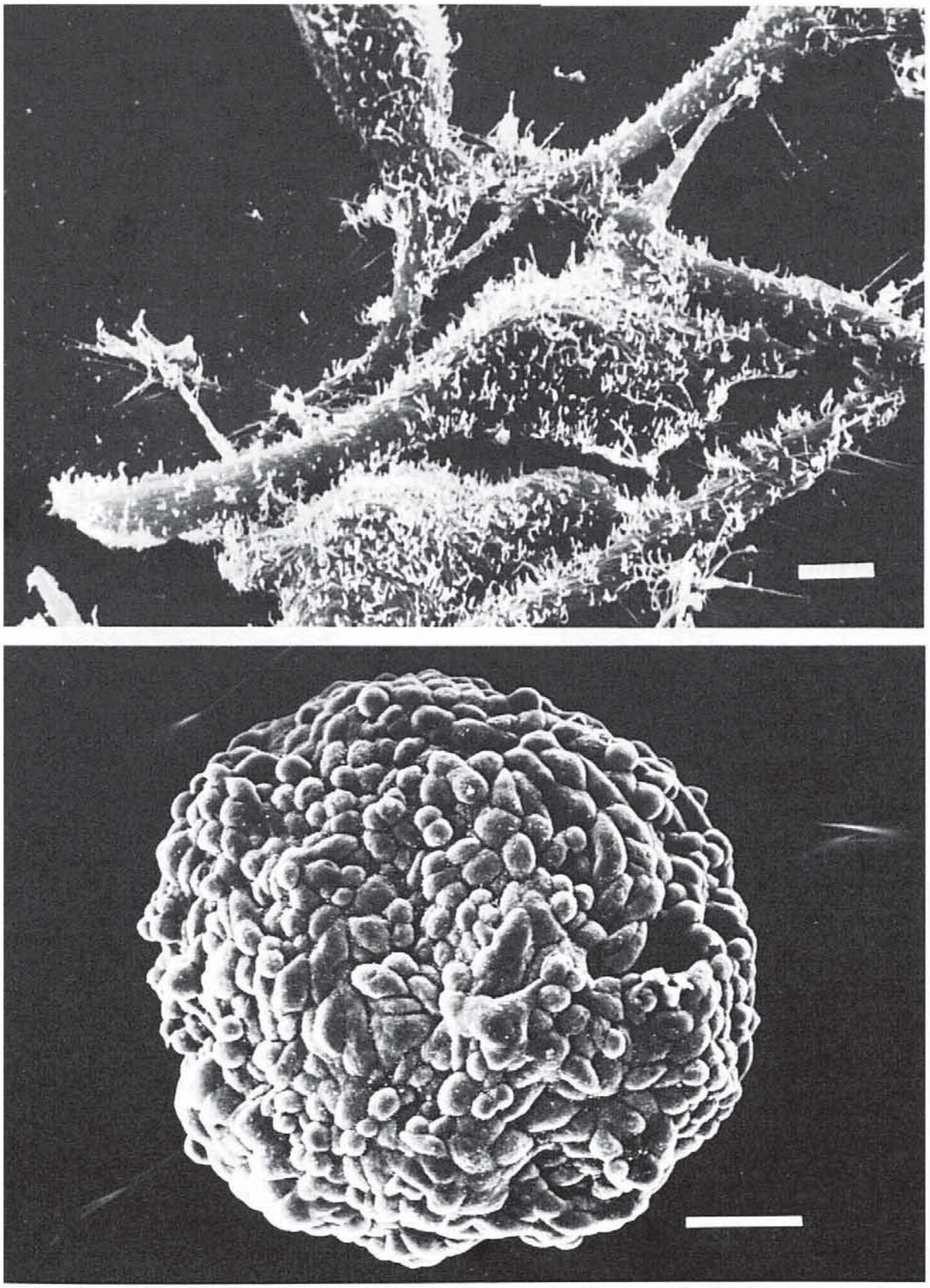


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der BICR/M1R-k Zellen als zweidimensionale Monolayer-Kultur (oben, Maßstab: 10 µm) und als dreidimensionaler Multizell-Sphäroid (unten, Maßstab: 50 µm).

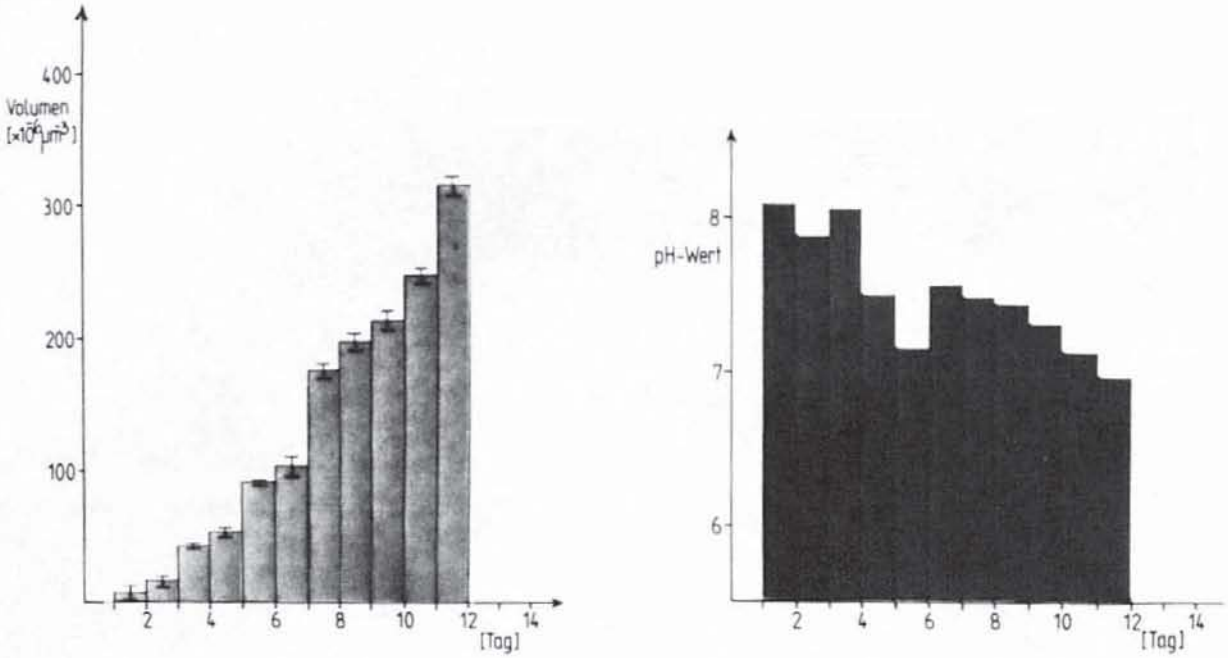


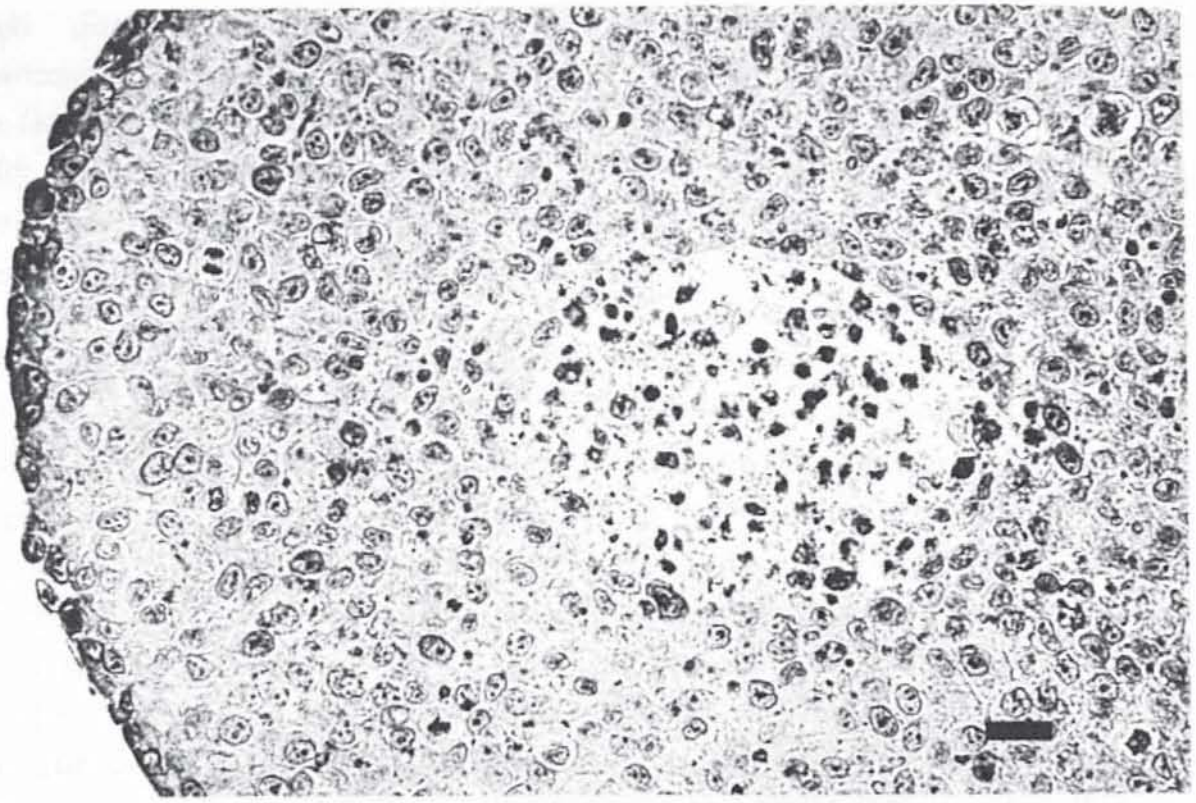
Abb. 6: Volumenzunahme der BICR/M1R-k Multizell-Sphäroide und pH-Änderung über den selben Zeitraum.

Zellen. Außerdem haben wir auch für Zellen von Hirntumoren der Ratte (BT5C, BT3C1, C6), von einem Zervixkarzinom des Menschen (HeLa), von einem Lungentumor der Maus (EMT6/Ro), von normalen Fibroblasten der Maus und des Hamsters (L, 3T3, BHK-F, B14 F28) und von primärem Nerven- und Herzgewebe die Kulturbedingungen für ein optimales Wachstum zu dreidimensionalen Multizell-Sphäroiden ermittelt.

Auch wenn Zellen jahrelang nur in Monolayer-Kultur gehalten worden sind, bilden sie im MultizellSphäroid wieder deutlich die histologische Ordnung aus, die ihrem Ursprungsgewebe oder -organ entspricht. So ordnen sich die HeLa Zellen, die schon 1952 in Kultur überführt worden sind (4), an der Sphäroidoberfläche wieder epithelartig an (Abb.7). Dadurch sind die im Inneren des HeLa Multizell-Sphäroids liegenden Zellen von einer optimalen Versorgung durch das Medium ausgeschlossen, was durch die fehlende interzelluläre Kopplung über die gap junctions noch verstärkt wird. Daher findet man in Multizell-Sphäroiden ungekoppelter Zellen schon zentrale Nekrosen, wenn der Sphäroiddurchmesser noch relativ gering ist (0,4 mm für HeLa Zellen). Die gut gekoppelten BICR/M1R-k Zellen sind dagegen als Multizell-Sphäroid so locker gepackt, wie es für die selben Zellen als transplantabler Tumor beschrieben worden ist (13). Hier tritt die Nekrosenbildung erst bei einem Sphäroiddurchmesser von etwa 1 mm auf (Abb.8).

Elektronenmikroskopische Dünnschnitte durch HeLa Multizell-Sphäroide lassen den epithelartigen Charakter der äußeren Zellschicht erkennen, der durch die charakteristischen Schlußleisten (tight junctions) noch unterstrichen wird (Abb.7). Beim Multizell-Sphäroid der BICR/M1R-k Zellen ist hingegen eine lockere Anordnung der Zellen auch an der äußeren Zellschicht zu beobachten (Abb.8), die sich in das Innere fortsetzt. Zwischen diesen Zellen sind stets gap junctions nachweisbar, nicht aber die zwischen den HeLa Zellen gefundenen tight junctions.

Interessanterweise ist im Multizell-Sphäroid von Zellen, die in der Lage sind, interzelluläre Kommunikation über gap



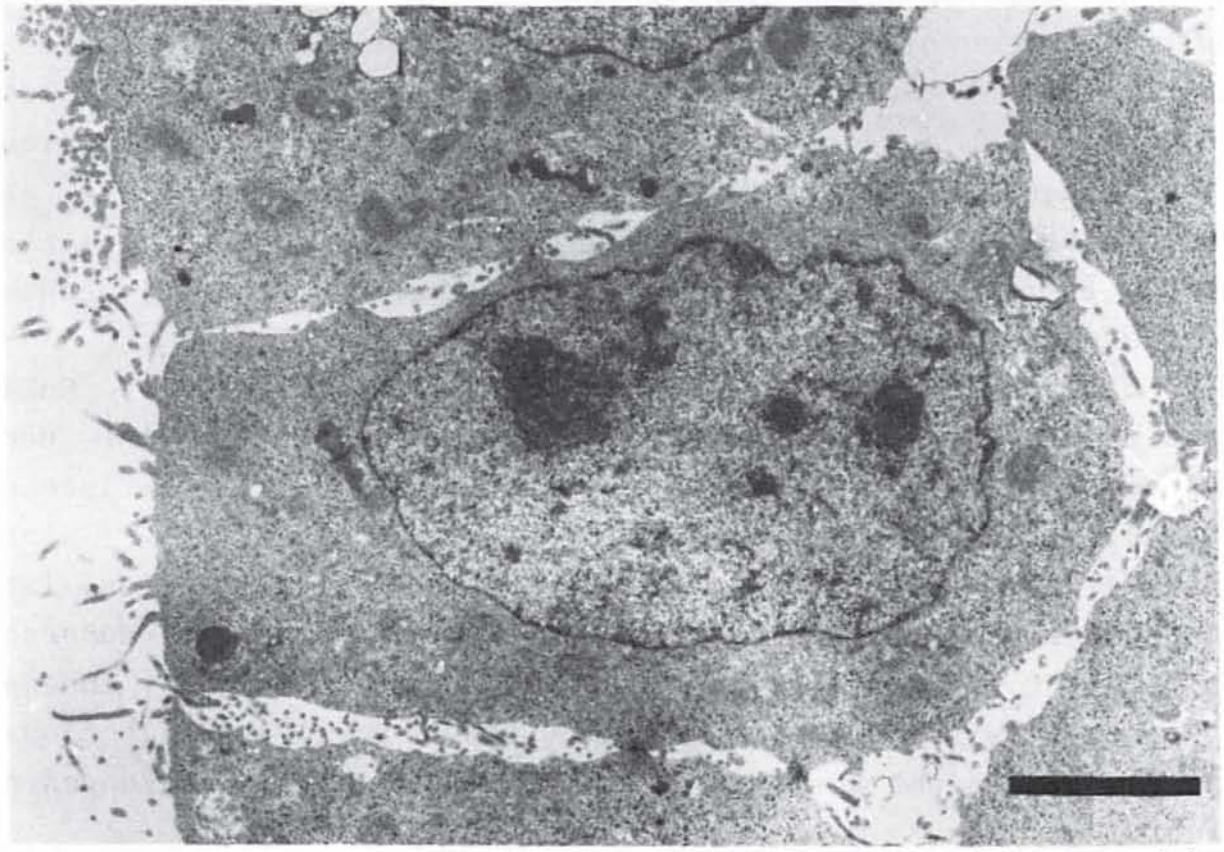


Abb. 7: Schnitt durch einen HeLa Multizell-Sphäroid. Die lichtmikroskopische Aufnahme (oben) zeigt die dichte äußere Packung der Zellen und die zentrale Nekrose bei einem sechs Tage alten Multizell-Sphäroid. Maßstab: 20 µm
Die elektronenmikroskopische Aufnahme (unten) verdeutlicht den epithelartigen Charakter der Zellen. Maßstab: 2,5 µm

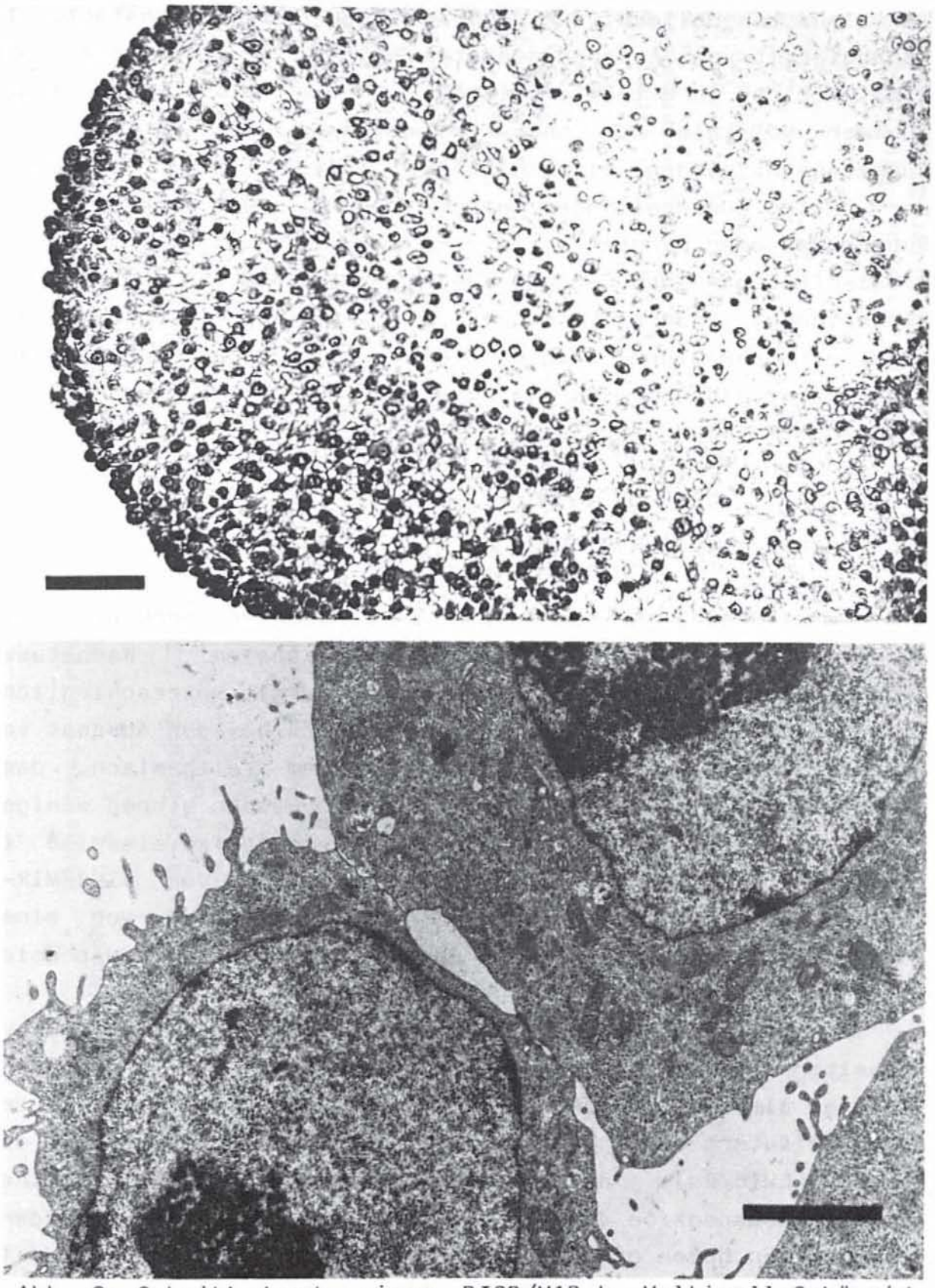


Abb. 8: Schnitt durch einen BICR/M1R-k Multizell-Sphäroid. Die lichtmikroskopische Aufnahme (oben) zeigt die lockere Packung der Zellen und die zentrale Nekrose bei einem zwanzig Tage alten Multizell-Sphäroid. Maßstab: 100 µm
Die elektronenmikroskopische Aufnahme (unten) zeigt gap junctions in der äußeren Zellschicht. Maßstab: 2,5 µm

junctions auszubilden, der Kopplungsgrad nicht konstant. In Abhängigkeit vom Versorgungsstatus der Zellen reduzieren die gap junctions ihre totale Leitfähigkeit so stark, daß immer weniger Moleküle mit hohem Molekulargewicht interzellulär ausgetauscht werden, bis schließlich eine völlige Abkopplung der Zellen untereinander erreicht wird (9). Entkoppelnde Substanzen oder Eingriffe in den vermuteten Regelkreis der Kanal-Öffnungs- und -Schließungsmechanismen wurden bereits beschrieben. Unsere Versuche an Monolayer-Kulturen oder Multizell-Sphäroiden zeigen, daß diese Substanzen zwar entkoppeln, jedoch sterben die meisten Zellen nach einer solchen Behandlung ab (Tab.1).

Konfrontation unterschiedlicher Multizell-Sphäroide

Um das Verhalten von Zellen verschiedener Herkunft beim Aufeinandertreffen unter dreidimensionalen Wachstumsbedingungen zu untersuchen, haben wir drei unterschiedliche Kulturansätze getestet. Beginnt man bereits bei der Aussaat von Einzelzellen in Bakterienschalen mit einem Zellgemisch, dann entmischen sich die Zellen in den meisten Fällen binnen weniger Stunden, und es bilden sich Sphäroide, die beispielsweise im Inneren HeLa Zellen enthalten und deren Mantel von BICR/M1R-k Zellen gebildet wird. Läßt man zunächst Sphäroide von einer Zellinie heranwachsen und gibt dann eine Einzelzell-Suspension hinzu, erhält man eine ähnliche Anordung.

Das im histologischen Schnitt vermeintlich invasive Verhalten einiger Zellen erweist sich jedoch bei genauerem Hinsehen als nicht-invasive Zellteilung, wie am Beispiel der Abb.9 erläutert wird. Hier waren Zellen eines Lungentumors der Maus (EMT6/Ro) als Multizell-Sphäroid mit einer Einzelzellsuspension der BICR/M1R-k Zellen konfrontiert worden. Beide Zellen haben eine ähnliche Verdopplungszeit und sind in Monolayer-Kokultur miteinander gekoppelt. Wenn kein Eindringen

Substanz	Konz. mMol/l	Beobachtete Wirkung auf Morphologie	Kommunikation	Wirkung
2,4 Dinitro-phenol	0,1 0,5	1 Std: ohne Befund 5 min: Abrundung	Entkopplung Entkopplung	Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung; Ca^{2+}-Freisetzung
Heptanol	0,35 2,5 3,5	45 Std: ohne Befund 5 min: angeschwollen 3 Std: abgestorben	ohne Befund reversible Entkoppl. irrevers. Entkoppl.	Ca^{2+}-Freisetzung; Wechselwirkung mit extrazellulärer Seite der Membranproteine
o-Nitrobenzyl-alkohol	2,0	5 min: angeschwollen	reversible Entkoppl.	Wahrscheinlich wie Heptanol
Chlorpromazin	0,01 0,0625 0,25	1 Std: ohne Befund 30 Std: Abrundung 1 Std: größere Kerne Abrundung 1 Std: abgestorben	schwache Kopplung irrevers. Entkoppl. irrevers. Entkoppl.	Inhibition der calmodulinabhängigen Phosphodiesterase
Dibucain	0,5	5 min: Abrundung 1 Std: abgestorben	irrevers. Entkoppl.	Inhibition einer Phosphodiesterase
Tetracain	2,0	5 min: Kerne vergrößert; 1 Std: abgestorben	irrevers. Entkoppl.	Inhibition einer Phosphodiesterase

Tab.1: Einfluß verschiedener Substanzen auf die interzelluläre Kommunikation bei BICR/M1R-k Monolayer Zellen. Kontroll- und Versuchsmessungen in phosphatgepufferter Salzlösung

Abb. 9: Konfrontation eines EMT6/Ro Multizell-Sphäroids mit BICR/M1R-k Zellen. Der nach drei Tagen ausgebildete Zellpfropf ist auf ähnliche Zellteilungsraten zurückzuführen und nicht mit einer Invasion zu verwechseln. Maßstab: 30 µm

(Invasion) der BICR/M1R-k Zellen möglich ist, dann legen sie ihre neugebildeten Zellen an den Rand des EMT6/Ro Multizell-Sphäroides an. Gleichzeitig teilen sich aber auch die EMT6/Ro Zellen, so daß nach einigen Tagen zwangsläufig der abgebildete keilförmige Grenzlauf zwischen den beiden Zellinien entsteht. Es hat sich also ein Pfropf aus fremden Zellen in einem Multizell-Sphäroid gebildet, was nicht mit einer Invasion verwechselt werden sollte.

Vom nicht-invasiven Verhalten der Zellen in Kultur muß aber nicht notwendigerweise auf ein Fehlen der Invasionsfähigkeit im lebenden Organismus geschlossen werden. Dies könnte nämlich auch auf die fehlende extrazelluläre Matrix des Zielgewebes zurückzuführen sein (17). Diese Matrix - die sogenannte Glycokalix - ist ein Gerüst von membrangebundenen Glycoproteinen und Glycolipiden, das für die Zellerkennung und -anhaftung eine Rolle spielt und bei Zellen in Kultur verändert sein kann.

Man stößt hier also an eine Grenze der Untersuchungsmöglichkeiten mit permanent in Kultur wachsenden Zellen. Die Technik der Sphäroid-Kultur ermöglicht aber, die Versuche mit einer erheblich verringerten Tierzahl auszuführen als dies bei reinen in-vivo-Versuchen der Fall wäre. Allerdings muß auch hierbei darauf geachtet werden, daß die Unterschiede in der Wachstumsrate der beteiligten Zellen und Gewebe möglichst hoch sind. So erwiesen sich z.B. primäre Nervenzellkulturen (vergl. den Beitrag von Reuss, Wienrich und Harting in diesem Heft) in unserem System als ungeeignet, obwohl die Nervenzellen kaum proliferieren. Das umgebende Gliagewebe wächst unter unseren Kulturbedingungen dafür um so stärker, so daß nicht mit erfolgreichen Experimenten gerechnet werden konnte.

Ein wesentlich besserer Ansatz zur Aufklärung der zellulären Wechselwirkungen bei der Invasion von Krebszellen in normales Gewebe ist dagegen die Verwendung von Zellaggregaten aus embryonalem Hühnerherz (10). Nach 9 Tagen im Brutkasten wurden die bebrüteten Hühnereier geöffnet, unter sterilen

Bedingungen die Herzen entnommen und unter mikroskopischer Kontrolle in quaderförmige Stückchen (Seitenlänge ca. 0,4 mm) zerteilt. Sie werden wie Multizell-Sphäroide in der Rührflasche gehalten, wo sie sich binnen eines Tages zu Sphäroiden abkugeln. Auf diese Weise lassen sich mehr als 20 Multizell-Sphäroide aus einem Hühnerei gewinnen. Als Wundheilung wachsen unter unseren Kulturbedingungen nur wenige Fibroblasten auf der Sphäroidoberfläche aus. Unter mikroskopischer Kontrolle wird ein Herz-Sphäroid mit einem Multizell-Sphäroid der zu testenden Zellen in engen Kontakt gebracht und für unterschiedlich lange Zeiten gemeinsam kultiviert. Das Ergebnis einer fünftägigen gemeinsamen Inkubation von HeLa Multizell-Sphäroiden mit Herzfragmenten ist in Abb.10 zu sehen, wo die HeLa Zellen tief in das Herzgewebe eingedrungen sind und dort auch noch weiter proliferieren.

Hiermit haben wir die Funktionsfähigkeit unseres dreidimensionalen Zellkultursystems so erweitert, daß wir nicht nur Toxizitäts- und Resistenzprüfungen, sondern auch noch komplexere Zusammenhänge wie zelluläre Wechselwirkungen bei der Tumorinvasion oder während der Entwicklung und Differenzierung *gezielt untersuchen können. Die Anzahl* der Tierexperimente, die durch Verwendung der Multizell-Sphäroide eingespart werden kann, läßt sich daher auch schätzungsweise nicht angeben.

Wir danken Frau Inge Metzger und Frau Beate Rehkopf für ihre einsatzfreudige technische Assistenz.

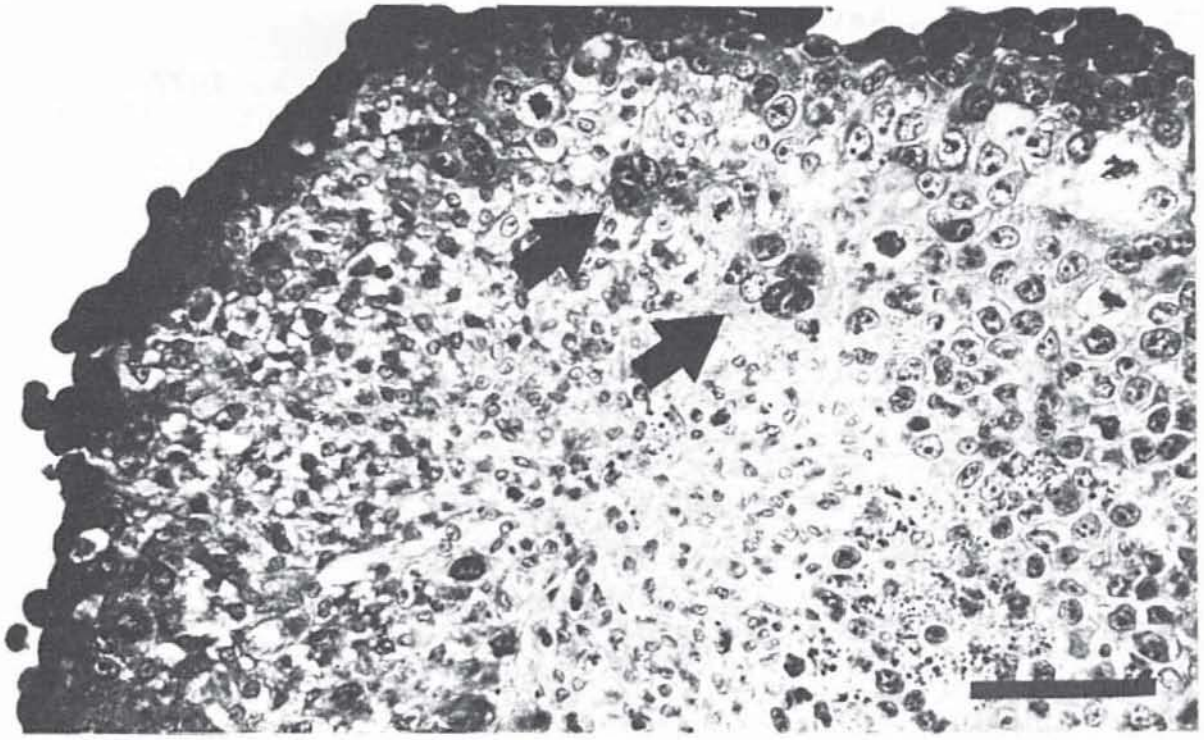


Abb. 10: Konfrontation eines Hühnerherz-Sphäroids mit HeLa Zellen. Nach fünf Tagen sind die malignen HeLa Zellen schon weit in das Herzgewebe eingedrungen (Pfeile) und teilen sich dort weiter. Maßstab: 60 µm

Literatur

1. Dertinger H., Hülser D.F.
Radiat. Environ. Biophys. 19 (1981) 101
2. Dertinger H., Guichard M., Malaise E.P.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 20 (1984) 561
3. Flagg-Newton J., Simpson I., Loewenstein W.R.
Science 205 (1979) 404
4. Gey G.O., Coffmann W.D., Kubicek M.T.
Cancer Res. 12 (1952) 264
5. Griepp E.B., Revel J.-P.
In: Intercellular Communication, 1-32,
Ed.: De Mello, W.C.; Plenum Press New York, 1977
6. Goodenough D.A.
J. Cell Biol. 61 (1974) 557
7. Hertzberg E.L., Skibbens R.V.
Cell 39 (1984) 61
8. Hülser D.F.
studia biophysica 90 (1982) 197
9. Hülser D.F., Brümmer F.
Biophys. Struc. Mech. 9 (1982) 83
10. Mareel, M., Kint,J., Meyvisch, C.
Virchows Arch. B Cell Path. 30 (1979) 95
11. Potter D.D., Furshpan E.J., Lennox E.S.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55 (1966) 328
12. Rajewsky M.F., Grüneisen A.
Eur. J. Immunol. 2 (1972) 445
13. Rajewsky M.F.
Therapiewoche 23 (1973) 2090
14. Revel J.-P., Karnovsky M.J.
J. Cell Biol. 33 (1967) C7
15. Schleich A.
Europ. J. Cancer 3 (1967) 243
16. Sheridan J.D.
Amer. Zool. 13 (1973) 1119
17. Smets L.A., Enninga I.C., Van Rooy H.
Exp. Cell Res. 139 (1982) 181
18. Traub O., Janssen-Timmen P.M., Drüge P.M., Dermietzel R., Willecke K.
J. Cell. Biochem. 19 (1980) 27