



Zellkommunikation und Tumorinvasion in der Petrischale

Thomas Bräuner und Dieter F. Hülser

Abteilung Biophysik, Biologisches Institut der Universität Stuttgart
Pfaffenwaldring 57, D-7000 Stuttgart 80

Zusammenfassung

Wir untersuchten, ob Tumorzellen, die sowohl untereinander als auch mit direkt benachbarten normalen Zellen über feinste Membrankanäle (sogenannte gap junctions) kommunizieren können, gegenüber nicht-kommunizierenden Zellen Vorteile bei der Invasion in normales Gewebe besitzen. Dazu haben wir zunächst fünf Tumorzelllinien histologisch auf das Vorkommen von gap junctions und elektrophysiologisch auf die Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation untersucht. Bei den Experimenten zur Tumorinvasion konnten wir durch die Verwendung eines in-vitro-Invasionsmodells auf den Einsatz von Versuchstieren verzichten: kugelförmige Zellaggregate aus normalen und malignen Zellen wurden in der Petrischale miteinander in Kontakt gebracht und über unterschiedlich lange Zeiträume weitergezüchtet.

Histologische Dünnschnitte dieser Mischkulturen zeigten, daß nur die Tumorzellen zu einer aktiven Invasion in normale Zellaggregate fähig waren, die über gap junctions kommunizieren können. Tumorzellen, die keine gap junctions ausbilden können, waren entweder nicht in der Lage, in den normalen Zellverband einzudringen, oder sie zerstörten das normale Gewebe durch einen Mechanismus, der auf die Kulturbedingungen zurückgeführt werden kann.

Summary: Intercellular Communication and Tumor Invasion in the Petri Dish

Malignant tumor cells are characterized by their ability to invade and destroy normal tissues, whereas benign tumor cells grow locally and, therefore, can be treated with more success. Tumor cell invasion precedes the formation of metastases, which account for the high mortality of cancer patients.

We investigated whether tumor cells which communicate via trans-membrane channels (gap junctions) with each other as well as with normal cells can more easily invade normal tissues than non-communicating tumor cells. Five tumor cell lines were cultured as monolayers and investigated with histological methods for gap junction formation and with electrophysiological methods for intercellular communication. Tumor cells were tested with an in-vitro invasion model:

spheroidal cell aggregates of normal and of malignant cells were confronted in

petri dishes and co-cultured for varying time spans. Thin sections revealed that only tumor cells with gap junctions can actively invade aggregates of normal cells. Tumor cells without gap junctions are unable to invade the normal tissue; they may, however, destroy the normal cells by a completely different mechanism which may be a result of particular culture conditions.

Einleitung

Lange bevor in der Embryonalentwicklung das Nerven- oder Hormonsystem ausgebildet wird, können direkt benachbarte Zellen schon über spezialisierte Membrankontakte, sogenannte gap junctions (Abb. 1), miteinander kommunizieren. Im Bereich dieser gap junctions nähern sich die Membranen benachbarter Zellen bis auf einen Abstand ("gap") von ca. 2 nm an. Dieser Abstand wird durch zahlreiche, dicht aneinanderliegende Membranproteine überbrückt, die in hexa-

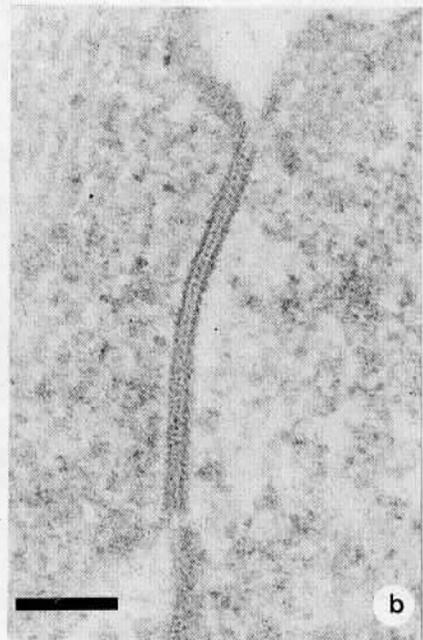
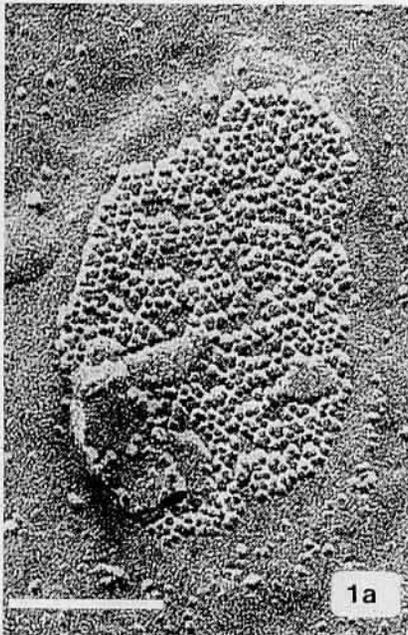


Abb. 1: Gap junctions in Zellkulturen. a.) Der Gefrierbruch-Abdruck zeigt die dichte Anordnung von gap-junction-Kanälen. Maßstab: 200 nm b.) Ultradünnschnitt durch eine gap junction. Maßstab: 100 nm.

gonaler Anordnung die zylindrische Wand um einen zentralen Membrankanal bilden.

Über diese Membrankanäle können elektrische Signale und niedermolekulare Substanzen (relative Molekülmasse ≤ 900) aus dem Zytoplasma einer Zelle direkt in das Zytoplasma einer angekoppelten Nachbarzelle diffundieren. Auf diese Weise können gap junctions eine wichtige Rolle bei der Synchronisierung kontrahierender Muskelzellen, bei der metabolischen Koordination von Zellen innerhalb eines Gewebes, bei Differenzierungs- und Entwicklungsvorgängen, bei der Wachstumskontrolle sowie bei der Regulation der Enzym-Produktion spielen (Übersichtsartikel: Pitts und Finbow, 1986). Gap junctions werden nicht nur zwischen normalen Zellen ausgebildet, sondern finden sich auch in einer großen Anzahl von Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs (Sheridan, 1970; Hülser und Webb, 1973).

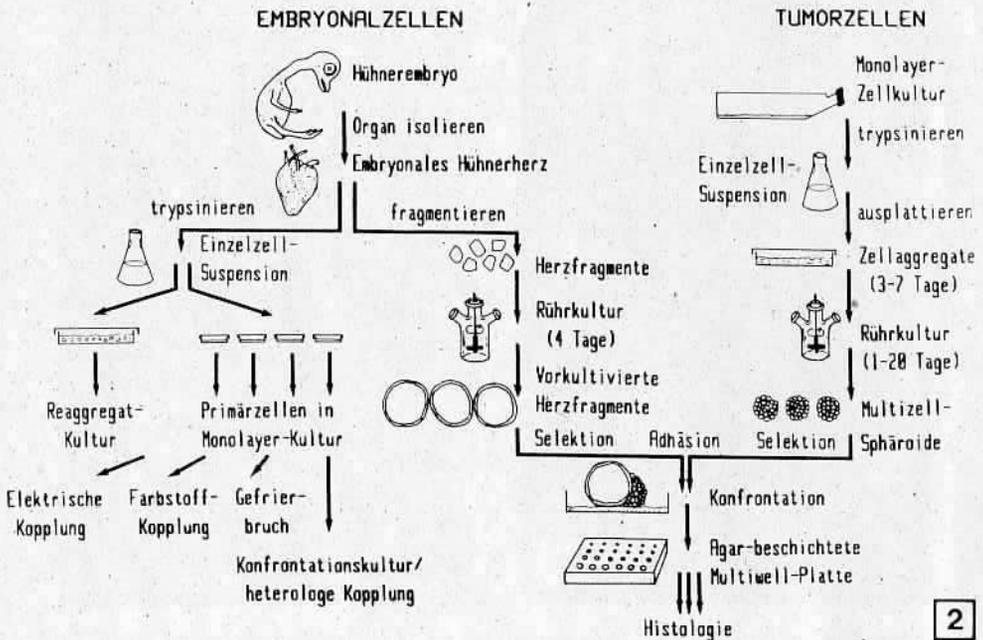


Abb. 2: Darstellung der Experimente zur interzellulären Kommunikation und Tumorinvasion. Dabei werden vorkultivierte Herzfragmente aus Hühnerembryonen mit Multizell-Sphäroiden aus Tumorzellen konfrontiert und weiterkultiviert.



Das Ziel unserer Untersuchungen war die Klärung der Frage, ob Tumorzellen, die über gap junctions sowohl miteinander als auch mit angrenzenden normalen Zellen kommunizieren können, leichter in normales Gewebe einwachsen können, als Tumorzellen, die keine gap junctions ausbilden. Dazu haben wir ein in-vitro-Invasionsmodell aus kugeligen Zellaggregaten (Multizell-Sphäroiden) normaler und maligner Zellen eingesetzt, das von Mareel und Mitarbeitern (1979) etabliert worden war (Abb. 2).

Methoden

Interzelluläre Kommunikation

Zellmembranen aller verwendeten Zellen wurden durch elektronenmikroskopische Ultradünnschnitte sowie Gefrierbruch-Abdrücke auf das Vorkommen von gap junctions untersucht. Neben diesem morphologischen Nachweis konnten durch den Einsatz elektrophysiologischer Methoden auch Aussagen über den funktionellen Zustand vorhandener gap junctions gemacht werden.

Bei Messungen der Ionenstrom-Kopplung wird ein rechteckförmiges Stromsignal mit einer Glasmikroelektrode in eine Zelle einer Monolayer-Kultur (Zellrasen) injiziert. Dieses aufgezwungene Stromsignal führt in der injizierten Zelle zu rechteckförmigen Änderungen des Membranpotentials. Mit einer weiteren Glasmikroelektrode wird das Membranpotential einer zweiten direkt benachbarten Zelle gemessen. Sind die beiden Zellen über gap junctions gekoppelt, wird auch in der zweiten Zelle eine rechteckförmige Potentialänderung registriert (Abb. 3a). Damit läßt sich also zeigen, daß die stromführenden Ionen (Na^+ , K^+ und Cl^-) über gap-junction-Kanäle von einer Zelle in eine Nachbarzelle gelangen können.

Durch Messungen der Farbstoff-Kopplung wird überprüft, ob auch größere Moleküle über gap-junction-Kanäle interzellulär ausgetauscht werden können. Dazu wird der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow CH ebenfalls mit einer Glasmikroelektrode in eine Zelle injiziert. Bildet die injizierte Zelle mit direkt

benachbarten Zellen gap-junction-Kanäle aus, können die Farbstoff-Moleküle über diese Kanäle in die angekoppelten Zellen strömen, die dann ebenfalls fluoreszieren (Abb. 3 b). In Zellkulturen, die keine gap junctions ausbilden, bleiben die Farbstoff-Moleküle in der injizierten Zelle, so daß nur diese Zelle fluoresziert.

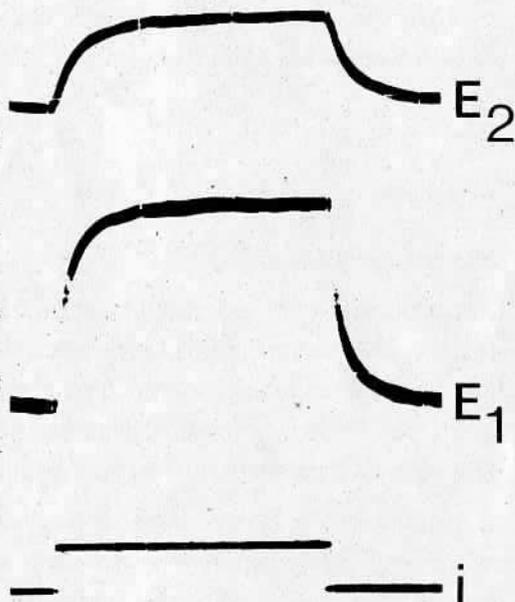
Abb. 3: Elektrophysiologische Experimente zur interzellulären Kommunikation.

a.) Messung der Ionenstrom-Kopplung zwischen zwei Tumorzellen.

E2: Membranpotential-Ableitung aus Zelle 2

E1: Membranpotential-Ableitung aus Zelle 1

i : In Zelle 1 injizierter rechteckförmiger Strompuls



3a

Zur interzellulären Kommunikation über gap junctions wurde in unserem Labor in Zusammenarbeit mit dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, ein Film für den Hochschulunterricht hergestellt, der sich eingehend mit Struktur, Funktion und Nachweis von gap junctions befaßt (Hülser und Inst. Wiss. Film, 1987).

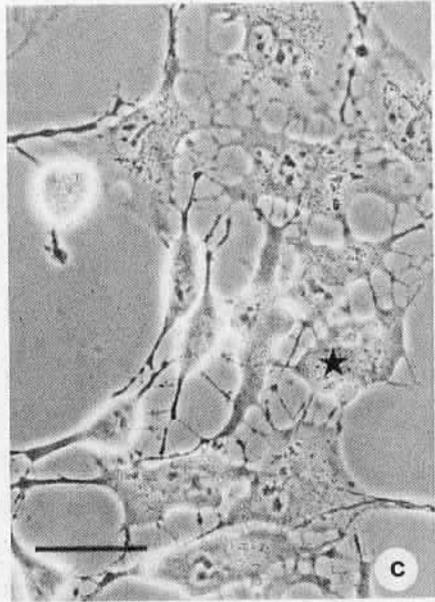
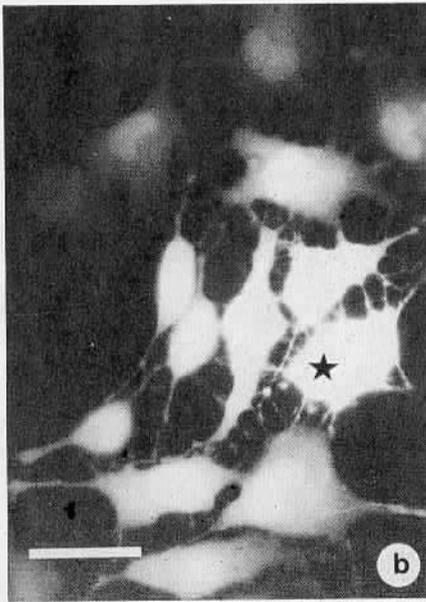


Abb 3b, c: Messung der Farbstoff-Ausbreitung in Tumorzellen (b). Der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer yellow CH wurde mit einer Glasmikroelektrode in eine Zelle (*) injiziert und breitet sich von dort über gap-junction-Kanäle in angekoppelte Zellen aus. Zur Veranschaulichung sind die selben Zellen im Phasenkontrast-Verfahren abgebildet (c.). Maßstab: 50 μm .

Züchtung von Multizell-Sphäroiden

Stammkulturen der in Tab. 1 aufgeführten Tumorzellen wurden als Zellrasen in Plastikflaschen gezüchtet. Durch Trypsin-Behandlung wurden diese Monolayer-Kulturen zu einer Zellsuspension vereinzelt. Nach Aussaat von ein bis zwei Millionen Zellen in eine Plastik-Petrischale, deren unbehandelte Oberfläche ein Anhaften der Zellen und damit ein flächiges Wachstum als Zellrasen weitgehend verhindert, bilden die Zellen verstärkt gegenseitige Kontakte aus und wachsen zu Aggregaten heran.

Nach drei bis sieben Tagen werden diese Aggregate in Rührflaschen überführt, in denen sie bei ca. 120 Umdrehungen pro Minute kultiviert werden. Dabei nehmen

sie bald Kugelform an und werden dann als Multizell-Sphäroide bezeichnet (Abb. 4).

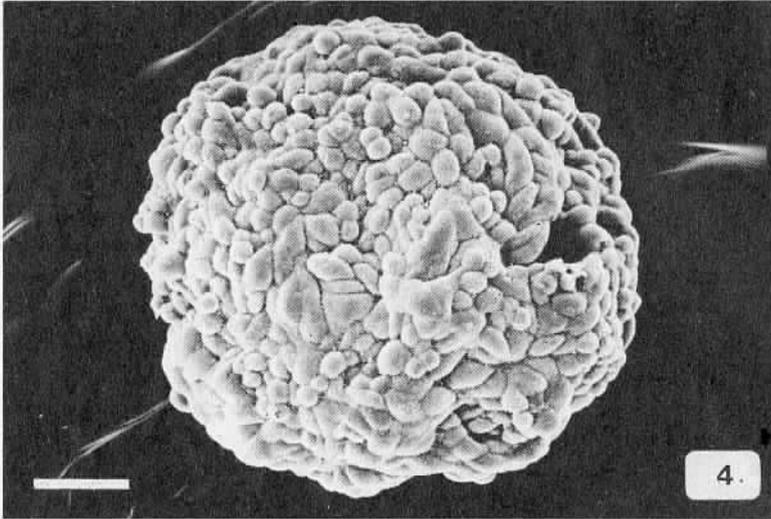
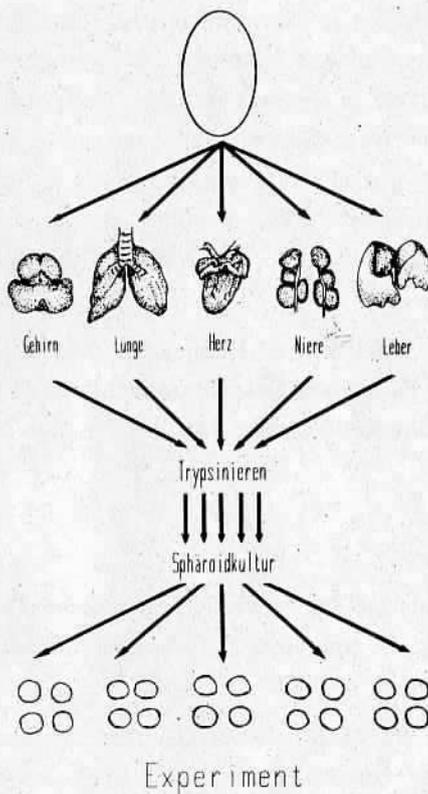


Abb. 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Multizell-Sphäroids aus Tumorzellen der Ratte. Maßstab: 50 μm .

Diese Multizell-Sphäroide können bei täglichem Mediumwechsel über mehrere Wochen in Rührkultur gehalten werden, wobei Durchmesser von bis zu 4 mm erreicht werden können (weiterführende Literatur s. Bräuner 1987).

Multizell-Sphäroide lassen sich jedoch nicht nur aus permanent wachsenden Tumorzellen züchten, sondern auch aus den verschiedensten Organen und Geweben embryonaler Tiere (Moscona, 1961). So können beispielsweise aus einem bebrüteten Hühnerei weit über 1000 Multizell-Sphäroide gewonnen werden (Abb. 5).

MULTIZELL-SPHÄROIDE AUS PRIMÄRZELLEN



5

Abb. 5: Züchtung von Multizell-Sphäroiden aus Primärgeweben von Hühnerembryonen.

Präparation embryonaler Hühnerherz-Fragmente

Befruchtete Hühnereier wurden im Brutschrank bei 38°C gelagert und nach neun Tagen unter sterilen Bedingungen geöffnet. Das embryonale Herz wurde unter der Stereolupe mit einer Mikroschere in kleine Fragmente geschnitten (Freshney, 1983), die anschließend in Rührflaschen bei 120 Upm über vier Tage kultiviert wurden. Dabei rundeten sich die Fragmente ab und bildeten eine mehrlagige Kapsel aus fibroblastoiden Zellen aus. In diesem Zustand wurden Herzfragmente

mit einem Durchmesser von ca. 400 μm für die Invasionsexperimente ausgewählt.

Konfrontationskulturen

Unter der Stereolupe wurden je ein vorkultiviertes Herzfragment (Durchmesser 400 μm) mit je ein Multizell-Sphäroid (Durchmesser 200 μm) der zu untersuchenden Tumorzelle in Kontakt gebracht. Nach ein- bis zweistündiger Inkubation bei 37°C bildeten sich stabile Zellkontakte aus, so daß die einzelnen Konfrontationskulturen in je eine mit Agar beschichtete und mit Medium gefüllte Kammer einer Mehrfachkulturschale überführt werden konnten. Nach unterschiedlichen Zeiträumen wurden die Kulturen für histologische Untersuchungen fixiert.

Ein Antiserum gegen embryonales Hühnerherz (Mareel et al., 1981a) in Verbindung mit einer Peroxidase-Antiperoxidase-Markierung ermöglichte eine eindeutige Unterscheidung der Herzzellen von den jeweiligen Tumorzellen.

Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchungsergebnisse zur interzellulären Kommunikation für die fünf Tumorzelllinien sowie die embryonalen Hühnerherz-Zellen sind in Tabelle 1 dargestellt.

BICR/M1Rk, C6 und EMT6/Ro-Zellen, die über gap junctions miteinander kommunizieren können, bildeten in Mischkulturen mit embryonalen Hühnerherz-Zellen auch mit diesen funktionsfähige gap junctions aus (heterologe Kopplung). Über diese heterologen gap junctions breiteten sich beispielsweise Aktionspotentiale aus den Herzmuskel-Zellen in die angrenzenden Tumorzellen aus, wo sie – mit verringerter Amplitude – registriert werden konnten.



	Auftreten von gap junctions	Ionenstrom- Kopplung	Farbstoff- Kopplung	Heterologe Kopplung	Invasion nach 4 Tagen
BICR/MIR _k Mammatumor, Ratte	+	+	+	+	+
C6 Gliom, Ratte	+	+	+	+	+
EMT6/Ro Mammatumor, Maus	+	+	+	+	+
L Sarkom, Maus	-	-	-	-	-
HeLa Zervixkarzinom, Mensch	-	-	-	-	-
Embryonale Herzmuskel- Zellen	+	+	+	+	

Tab. 1: Interzelluläre Kommunikation und invasives Wachstum in Zellkulturen

Experimente zur Tumorzell-Invasion

Die lichtmikroskopische Kontrolle lebender Konfrontationskulturen ergab für alle Tumorzelllinien während der ersten Tage ein ähnliches Bild: Die zunächst noch deutlich erkennbare Gliederung in ein vorkultiviertes Herzfragment und das angelagerte Multizell-Tumorsphäroid verwischte sich rasch durch die starke

Zunahme der Tumorzellmasse infolge der hohen Zellteilungsrate. Erst die histologischen Schnitte zeigten deutliche Unterschiede im Verhalten der Tumorzelllinien auf.

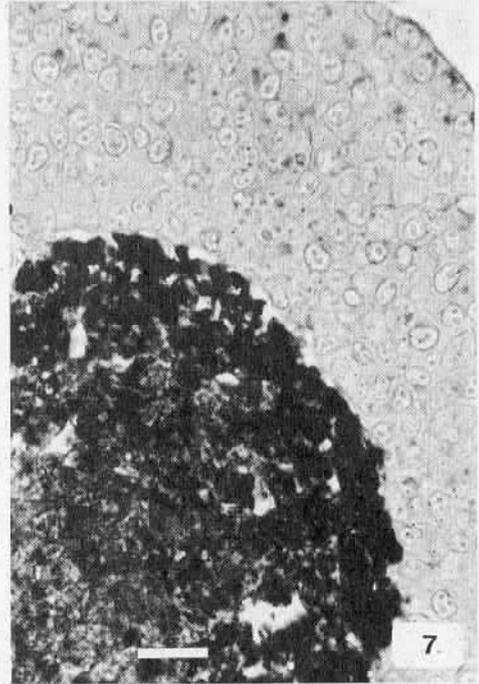
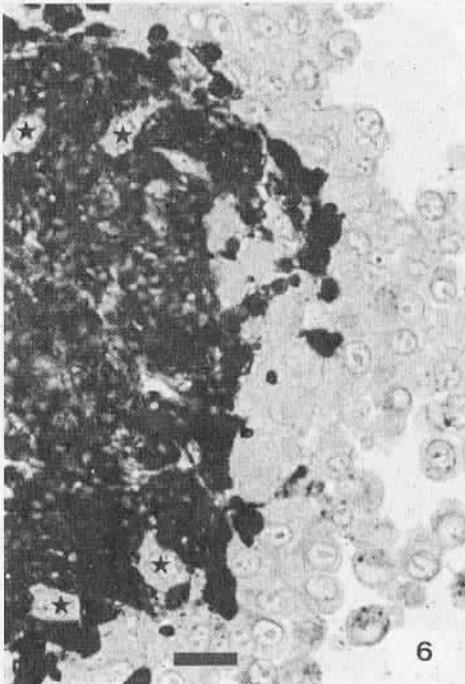


Abb. 6: Invasives Wachstum von Brusttumor-Zellen der Ratte in ein vorkultiviertes Herzfragment (schwarz gefärbt) nach 65 Stunden. Einzelne Tumorzellen (*) sind bereits tief eingedrungen. Maßstab: 25 μ m

Abb. 7: Zervixkarzinom-Zellen bilden auch nach 84 Stunden nur eine mehrlagige Kapsel um das vorkultivierte Herzfragment (schwarz gefärbt) aus, ohne invasives Wachstum zu zeigen. Maßstab: 25 μ m.

Tumorzellen, die sowohl untereinander als auch mit den embryonalen Hühnerherz-Zellen über gap junctions kommunizieren konnten, drangen sehr schnell (innerhalb von zwei Tagen) in das Herzfragment ein (Abb. 6). Die nicht gekoppelten HeLa- und L-Zellen waren dagegen innerhalb von vier Tagen nicht



in der Lage, invasiv in das Herzfragment einzuwachsen (Abb. 7). Sie umgaben statt dessen das Herzfragment mit einer vielschichtigen Zellkapsel, die – im Falle der fibroblastoiden L-Zellen – auch nach mehr als sieben Tagen zu keiner erkennbaren Schädigung der Herzzellen führte. Dagegen bewirkte die epithelartige, dichtgepackte Anordnung der HeLa-Zellen schließlich eine Unterversorgung mit Nährstoffen und somit eine Destabilisierung des im Inneren liegenden Herzfragmentes, so daß einzelne HeLa-Zellen nach ca. fünf Tagen in das vorgeschädigte Herzfragment eindringen konnten.

Dieser passive Mechanismus kann sich aus den Kulturbedingungen (Nährstoffversorgung) ergeben. Er unterscheidet sich grundlegend vom Verhalten gekoppelter Tumorzellen, das durch eine aktive, sehr früh einsetzende Invasion einzelner Tumorzellen charakterisiert war.

Ein Einfluß der interzellulären Kommunikation auf die Invasivität läßt sich dabei unter zwei Gesichtspunkten diskutieren: Für eine Tumorzelle an der Invasionsfront können sich sowohl aufgrund der homologen Kopplung mit anderen Tumorzellen als auch aufgrund der heterologen Kopplung an das Wirtsgewebe Vorteile ergeben. Durch die homologe Kopplung können beispielsweise Metabolite und Regulationssignale zwischen den Tumorzellen weitergeleitet werden, was besonders im fremden Mikromilieu des Wirtsgewebes einen Überlebensvorteil gegenüber nicht-gekoppelten Tumorzellen bedeuten kann. Durch die Ausbildung von gap junctions zwischen Tumorzelle und Wirtszelle kann die invasive Zelle parasitär am Metabolismus der Wirtszelle teilhaben. Da jedoch über die Natur der interzellulär ausgetauschten Signale noch weitgehend Unklarheit herrscht, lassen sich keine konkreten Angaben über die möglichen Auswirkungen der heterologen Kopplung machen. Zukünftige Experimente mit Substanzen, welche die interzelluläre Kommunikation über gap junctions blockieren, ohne dabei die übrigen spezifischen Eigenschaften der Zellen zu beeinträchtigen, könnten zur Lösung dieses Problems beitragen.

Für derartige Reihenuntersuchungen bietet sich das hier verwendete in-vitro-Invasionsmodell ebenso an wie für das Austesten therapeutisch interessanter



Substanzen, mit denen in das Invasionsgeschehen eingegriffen werden soll. Ausschlaggebend für die Bewertung dieses Invasionsmodells ist die Beantwortung der Frage nach der Übertragbarkeit damit gewonnener Ergebnisse auf die Invasion maligner Zellen im lebenden Organismus. Für die Anwendbarkeit des in dieser Arbeit eingesetzten, von Mareel und Mitarbeitern etablierten Invasionsmodells sprechen 3 wichtige Argumente (Mareel, 1982):

- 1.) Die Kriterien für die Invasion von Tumorzellen (zeitlich und räumlich zunehmende Besiedlung und Schädigung des Wirtsgewebes) in einem Organismus ließen sich auch zur Charakterisierung der Invasion *in-vitro* anwenden.
- 2.) Für eine Reihe von Zelllinien stimmten die histologischen Befunde der *in-vitro*-Invasion hinsichtlich Invasionstyp und Invasionsrate mit denen einer Tumor-Implantation in das entsprechende Tier gleichen genetischen Ursprungs überein.
- 3.) Parallel-Untersuchungen von fibroblastoiden Lungenzellen der Maus (Mareel et al., 1981b) sowie fetalen Gehirnzellen der Ratte (de Ridder und Laerum, 1981) auf ihre Invasivität *in-vivo* und *in-vitro* ergaben eine strikte Korrelation zwischen der Entstehung invasiver Tumore im Tier und der Invasivität derselben Zellen im *in-vitro*-Modell.

Die mit dem hier verwendeten *in-vitro*-Invasionsmodell gewonnenen Ergebnisse lassen sich also auf *in-vivo*-Verhältnisse übertragen und haben eine Vielzahl von Daten geliefert. Für diese Arbeit wurden ca. 300 Konfrontationskulturen aus je einem Herzfragment und einem Tumor-Sphäroid angesetzt. Für die Gewinnung der Herzfragmente waren lediglich 15 Hühnerembryonen erforderlich. Bei Verwendung des gebräuchlichen Tumorzell-Implantationstests hätten wenigstens 300 Mäuse bzw. Ratten eingesetzt werden müssen. Diese Tierversuche hätten jedoch keine Erkenntnisse über eine Kopplung zwischen Wirts- und Tumorzelle erbracht. Das hier verwendete *in-vitro*-Invasionsmodell trug also nicht nur zur Einsparung von Tieren bei, sondern ermöglichte auch die separate Untersuchung von zellulären Parametern, für die eine Beteiligung am Mechanismus der Tumor-Invasion diskutiert wird (Bräuner, 1987).



Danksagung

Diese Untersuchungen wurden in dankenswerter Weise durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert (03-8549-0). Wir danken Frau Ulrike Reber und Frau. Beate Rehkopf für die wertvolle technische Mitarbeit und Frau Dipl.-Biol. Irene Klünder für die Anfertigung der Zeichnungen.

Literatur

Bräuner, Th.: Interzelluläre Kommunikation und invasives Wachstum maligner Zellen. Verlag Stöffler & Schütz, Stuttgart, 192 pp, (1987).

de Ridder, L. J. und Laerum, O. D.: Invasion of rat neurogenic cell lines in embryonic chick heart fragments in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.* 66, 723-728, (1981).

Freshney, R. J.: Culture of animal cells. A manual of basic technique. Alan R. Liss, Inc., New York (1983).

Hülser, D. F. und Inst. Wiss. Film: Interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions. Film C 1624 des IWF, Göttingen 1987. Publikation von D. F. Hülser, Publ. Wiss. Film., Sekt. Med., Ser. 7, Nr. 2/C 1624 (1987), 12 S.

Hülser, D. F. und Webb, D. J.: Relation between ionic coupling and morphology of established cells in culture. *Exp. Cell Res.* 80, 210-222 (1973).

Mareel, M., Kint, J. und Meyvisch, C.: Methods of study of the invasion of malignant C3H-mouse fibroblasts into embryonic chick heart in vitro. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* 30, 95-111 (1979).

Mareel, M. M., De Bruyne, G. K., Vandesande, C. und Dragonetti, C.: Immunohistochemical study of embryonic chick heart invaded by malignant cells in three-dimensional culture. *Invasion and Metastasis* 1, 195-204 (1981 a).

Mareel, M. M., Kieler, J. V. F., Bruyneel, E., Van Cauwenberge, R. and Dragonetti, C.: Invasiveness of malignant ST/A mouse lung cells in vitro. *Virchows Arch. B. Cell Pathol.* 38, 101-116 (1981 b).

Mareel, M. M. K.: The use of embryo organ cultures to study invasion in vitro. In: *Tumor invasion and metastasis* (eds. L. A. Liotta und J. R. Hart), 207-230. Martinus Nijhoff Publishers, Den Haag-Boston-London (1982).

Moscona, A.: Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions in vitro. *Exp. Cell Res.* 22, 455-475 (1961).

Pitts, J. D. und Finbow, M. E.: The gap junction. *J. Cell Sci. Suppl.* 4, 239-266 (1986).

Sheridan, J. D.: Low resistance junctions between cancer cells in various solid tumors. *J. Cell Biol.* 45, 91-99 (1970).