

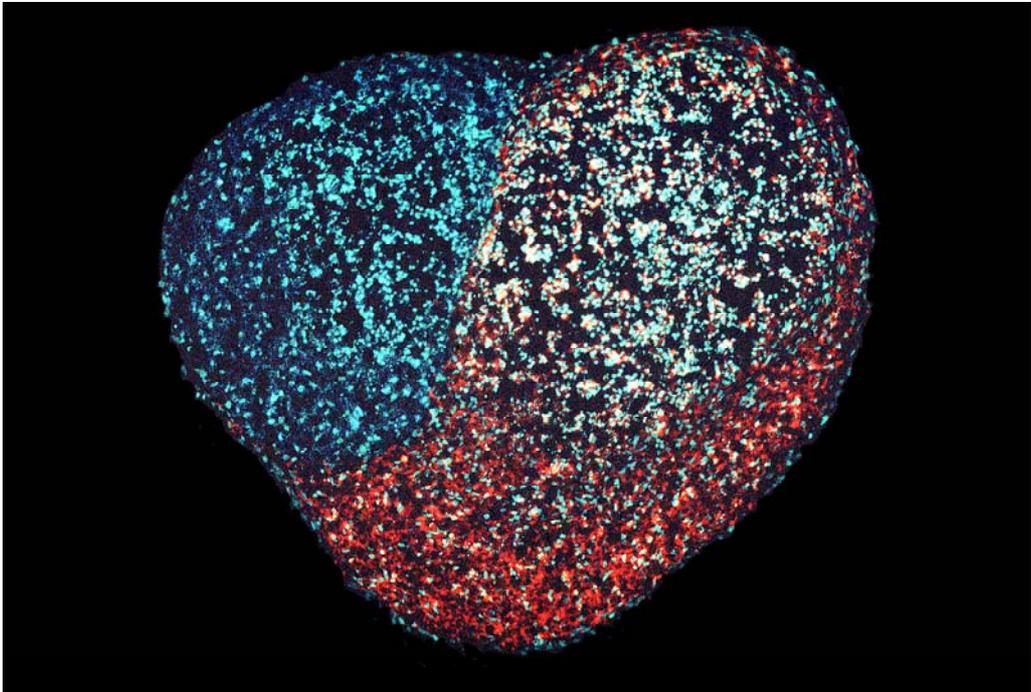
Abteilung Virologie
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Klinikum der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

Tumorforschung am dreidimensionalen Zellkultursystem

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

vorgelegt 2001
von Clemens Winterhalder
geboren in Rheinfelden/Baden

| | |
|--------------------|-----------------------------------|
| Dekan | Prof. Dr. rer. nat. M. Schumacher |
| 1. Gutachter | Prof. Dr. rer. nat. G. Bauer |
| 2. Gutachter | Prof. Dr. med. C. Holubarsch |
| Jahr der Promotion | 2001 |



| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | TUMORENTSTEHUNG – DAS KONZEPT DER MEHRSTUFENKARZINOGENESE | 1 |
| 1.2 | APOPTOSE – ENDSTRECKE VERSCHIEDENER NATÜRLICHER ANTITUMOR-MECHANISMEN | 3 |
| 1.3 | DAS KONZEPT DER INTERZELLULÄREN INDUKTION DER APOPTOSE | 8 |
| 1.4 | MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DER MONOLAYERKULTUR | 12 |
| 1.5 | DAS SPHÄROID ALS DREIDIMENSIONALES ZELLKULTURSYSTEM | 12 |
| 1.6 | ZIELE DER ARBEIT | 15 |
| 2 | MATERIALIEN UND METHODEN | 16 |
| 2.1 | MATERIALIEN | 16 |
| 2.1.1 | ZELLINIEN | 16 |
| 2.1.2 | ZELLKULTURMEDIEN | 17 |
| 2.1.3 | STAMMLÖSUNGEN, PUFFER, REAGENZIEEN | 17 |
| 2.1.4 | GERÄTE | 23 |
| 2.1.5 | PLASTIKMATERIAL | 25 |
| 2.1.6 | VERSCHIEDENES | 25 |
| 2.2 | METHODEN | 27 |
| 2.2.1 | MONOLAYER-ZELLKULTURTECHNIK | 27 |
| 2.2.2 | MARKIERUNG VON ZELLEN MIT FLUOSPHERES | 28 |
| 2.2.3 | SPHÄROIDTECHNIK | 29 |
| 2.2.3.1 | Herstellung von Sphäroiden nach „Bauplan“ | 30 |
| 2.2.3.2 | Sphäroidkultur-Techniken | 34 |
| 2.2.3.3 | Probengewinnung und Weiterverarbeitung | 35 |
| 2.2.3.4 | Färbemethoden | 36 |
| 2.2.3.5 | Auswertung und fotografische Dokumentation | 37 |
| 2.2.4 | KUNSTSTOFFTECHNIK | 39 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3 | ERGEBNISSE | 41 |
| 3.1 | OPTIMIERUNG DER SPHÄROIDTECHNIK | 41 |
| 3.1.1 | ERHÖHUNG DER AUSBEUTE AN BRAUCHBAREN SPHÄROIDEN DURCH ZENTRIFUGATION | 41 |
| 3.1.2 | VARIATION DER INITIALEN SPHÄROIDGRÖÖE DURCH VERÄNDERUNG DER ZELLZAHL | 44 |
| 3.1.2.1 | Kritische Betrachtung: eingesetzte Zellzahl und Zellzahl im Sphäroid | 44 |
| 3.1.3 | MARKIERUNG VON EINZELZELLEN DURCH FLUOSPHERES | 45 |
| 3.1.3.1 | Das Problem der freien Fluospheres | 47 |
| 3.2 | MORPHOLOGIE DES SPHÄROIDS IM SCHNITTPRÄPARAT - DREISCHICHTIGER AUFBAU | 49 |
| 3.3 | PROLIFERATIONSKONTROLLE IM SPHÄROID | 51 |
| 3.3.1 | TRANSFORMIERTE UND NICHT-TRANSFORMIERTE FIBROBLASTEN IN DER MANTELZONE | 52 |
| 3.3.2 | TRANSFORMIERTE UND NICHT-TRANSFORMIERTE FIBROBLASTEN IN DER INNENZONE | 53 |
| 3.3.3 | BEMERKUNG ZUR APOPTOSEZONE | 55 |
| 3.4 | INTERZELLULÄRE INDUKTION DER APOPTOSE IM SPHÄROIDSYSTEM | 56 |
| 3.4.1 | VERHALTEN EINZELNER TRANSFORMIERTER FIBROBLASTEN IN DER INNENZONE | 56 |
| 3.4.1.1 | Umstellung der Sphäroidtechnik | 58 |
| 3.4.2 | VERGRÖÖBERUNG DER KONTAKTFLÄCHE - ZWISCHENSCHICHT-VERSUCH | 61 |
| 3.4.2.1 | Vorbehandlung der nicht-transformierten Fibroblasten mit TGF- β | 63 |
| 3.4.3 | EIN GLÜCKLICHER ZUFALL - VERHALTEN GRÖÖBERER GRUPPEN TRANSFORMIERTER FIBROBLASTEN IN DER INNENZONE | 64 |
| 3.5 | DIE APOPTOSEZONE | 67 |
| 3.5.1 | ENTWICKLUNG EINER APOPTOSEZONE | 67 |
| 3.5.2 | KEINE ABHÄNGIGKEIT DER APOPTOSEZONE VON DER INTERAKTION TRANSFORMIERTER UND NICHT-TRANSFORMIERTER ZELLEN – TEIL 1 | 69 |
| 3.5.3 | KEINE ABHÄNGIGKEIT DER APOPTOSEZONE VON DER INTERAKTION TRANSFORMIERTER UND NICHT-TRANSFORMIERTER ZELLEN – TEIL 2 | 73 |
| 3.5.4 | VERSCHIEDENE MÖGLICHE EINFLUSSFAKTOREN | 77 |
| 3.5.4.1 | Zelldichte der Zellkulturflaschen | 78 |
| 3.5.4.2 | Serumkonzentration und Taurin | 81 |
| 3.5.5 | CHARAKTERISIERUNG DES ZELLUNTERGANGS MIT HILFE DER TUNEL-REAKTION | 84 |
| 3.5.5.1 | Korrelation zwischen TUNEL- und Bis-Benzimidin-Färbung | 88 |
| 3.5.6 | VERSUCH ZUR HERSTELLUNG EINER DOPPEL-APOPTOSEZONE | 89 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.6 | HERSTELLUNG VON MINI-SPHÄROIDEN - DIE KUNSTSTOFFTECHNIK | 92 |
| 3.6.1 | ETABLIERUNG DER METHODE..... | 93 |
| 3.6.1.1 | Konstanthaltung der Umgebungstemperatur-Wasserbad | 93 |
| 3.6.1.2 | Kollagen-Konzentration | 94 |
| 3.6.1.3 | Schichtdicke | 95 |
| 3.6.1.4 | Entfärbung des Mediums - relevant für die Vitalität der Zellen ? | 96 |
| 3.6.1.5 | Nutzung der neuentwickelten Methode..... | 100 |
| 4 | DISKUSSION..... | 101 |
| 4.1 | MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DER VERWENDETEN SPHÄROIDTECHNIK | 101 |
| 4.1.1 | EFFEKTIVITÄT DER SPHÄROID-ENTSTEHUNG | 101 |
| 4.1.2 | GESTEUERTE ZELLAGGREGATION | 103 |
| 4.1.3 | HERSTELLUNG VON SPHÄROIDEN NACH „BAUPLAN“ | 104 |
| 4.1.4 | EINBLICK IN DAS INNERE DER SPHÄROIDE | 105 |
| 4.1.5 | MARKIERUNG MIT FLUOSPHERES | 106 |
| 4.1.6 | BEDEUTUNG DER SPHÄROID-KULTURBEDINGUNGEN..... | 108 |
| 4.1.7 | ZUSATZ EXOGENER STOFFE | 109 |
| 4.1.8 | KUNSTSTOFFTECHNIK | 109 |
| 4.2 | ZONALE HETEROGENITÄT IM SPHÄROID..... | 110 |
| 4.2.1 | MANTELZONE..... | 110 |
| 4.2.2 | APOPTOSEZONE..... | 112 |
| 4.2.3 | INNENZONE | 115 |
| 4.2.4 | VERGLEICH MIT ANDEREN ZELLSYSTEMEN..... | 118 |
| 4.3 | PROLIFERATIONSKONTROLLE IM SPHÄROID | 119 |
| 4.4 | INTERZELLULÄRE INDUKTION DER APOPTOSE IM SPHÄROID..... | 120 |
| 4.4.1 | EINZELZELLEN UND ZELLGRUPPEN | 120 |
| 4.4.2 | KERN-MANTEL-VERSUCHE..... | 124 |
| 4.4.3 | VERGLEICH MIT ANDEREN ZELLSYSTEMEN..... | 124 |
| 4.4.4 | KONSEQUENZEN DIESER BEFUNDE – DAS KONZEPT DER „DORMANT TUMOR CELL“ | 125 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 129 |

- AIF: Apoptose-Induzierende Faktoren
- BPV: Bovines Papilloma-Virus
- BSA: Bovines Serum-Albumin
- CTL: Cytotoxic T-Lymphocyte
- DMSO: Dimethylsulfoxid
- EMEM: Eagle's Minimal Essential Medium
- FKS: Fötale Kälberserum
- GFP: Green Fluorescent Protein
- HMW: High Molecular Weight
- LCST: Lower Critical Solution Temperature
- LMW: Low Molecular Weight
- MCA: Methylcholanthren
- PBS: Phosphate Buffered Saline
- PNIPAAm: Poly-N-Isopropylacrylsäureamid
- PT-Pore: Permeability Transition-Pore
- ROS: Reactive Oxygen Species
- rpm: revolutions per minute
- SNP: Sodium Nitro Prusside
- TESPA siehe Materialien und Methoden
- TGF- β : Transforming Growth Factor β
- TUNEL: Terminal dUTP Nick End Label

- Alle Markennamen werden unter Berücksichtigung der Markenschutzrechte verwendet.

1 Einleitung

1.1 Tumorentstehung – das Konzept der Mehrstufenkarzinogenese

Die Diagnose „Krebs“ hat in den letzten Jahren deutlich an Schrecken verloren, da sie einerseits in vielen Fällen - dank neuer Therapiemöglichkeiten - nicht mehr das „Todesurteil“ für den Patienten bedeuten muß und sie andererseits nicht mehr ganz so rätselhaft und schicksalsgegeben erscheint.

Eine der wichtigsten Erkenntnisse der letzten Jahre ist, daß es sich bei „Krebs“ im wesentlichen um eine *genetische* Erkrankung handelt. Bei praktisch allen bekannten Tumoren besteht jedoch niemals *eine einzige* Mutation als isolierte Ursache (wie dies z.B. bei vererbten Stoffwechselstörungen meist der Fall ist). In diesem Sinne wird die Entstehung eines malignen Tumors heute nicht mehr als „einmaliger genetischer Unfall“ verstanden, sondern als *Prozeß*, der mitunter Jahre dauern kann und stets *mehrere* Veränderungen auf zellulärer Ebene voraussetzt (Vogelstein et al., 1993). Für die Richtigkeit dieser „Mehrtreffer“-Hypothese existieren viele direkte und indirekte Hinweise. So ist beispielsweise gut bekannt, daß Patienten als Folge einer Radio- oder Chemotherapie einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind, mit zeitlicher Latenz (15 Jahre und später) an einem (Zweit-) Malignom zu erkranken (Boice, 1981). Warum die lange Zeitverzögerung? Eine Erklärungsmöglichkeit besteht darin, daß durch die Radio- bzw. Chemotherapie eine genetische Mutation entstand, die jedoch *alleine* zur Tumorentstehung nicht ausreichte. Durch die niedrige Inzidenz zusätzlicher Mutationen nach Therapieende könnte es derart lange dauern, bis sich schließlich ein Tumor entwickelt.

Diese Theorie erklärt, warum die Inzidenz maligner Tumoren mit dem Alter nahezu exponentiell zunimmt (Miller, 1980). Wie lassen sich dann jedoch Tumoren des Kindesalters erklären? Es zeigt sich, daß die meisten Tumoren des Kindesalters – im Gegensatz zu sporadischen Tumoren des Erwachsenenalters - auf dem Boden einer vererbten *Keimbahn-Mutation* entstehen, die für sich alleine noch nicht zur Tumorentstehung führt. Durch den bereits vorhandenen „ersten Treffer“ ist jedoch das Risiko, daß weitere *somatische* Mutationen *frühzeitig* zur Tumorentstehung führen, deutlich erhöht (Knudson, 1996). Neben diesen indirekten epidemiologischen Hinweisen gibt es direkte morphologische und molekulargenetische Hinweise für den Ablauf der geschilderten „Mehrtreffer“-Sequenz *in vivo*. Erstmals gezeigt wurde dies von Vogelstein et al. (Vogelstein et al., 1988; Fearon et al., 1990) für die Pathogenese des Colon-Karzinoms (Adenom-Karzinom-Sequenz): bei der schrittweisen Entwicklung eines Adenoms zum Karzinom (lange bekannt durch pathomorphologische Untersuchungen) konnte in jeder weiter fortgeschrittenen Stufe eine *zusätzliche* genetische Mutation nachgewiesen werden (**Tabelle 1**).

| Stufe | Patho-Morphologie | zusätzliche genetische Veränderung |
|-------|-----------------------------|--|
| 1 | Normales Epithel | Keine |
| 2 | Hyperproliferatives Epithel | Verlust des APC-Genes (Chromosom 5q) |
| 3 | Frühes Adenom | DNA-Hypomethylierung |
| 4 | Intermediäres Adenom | Aktivierung von k-ras (Chromosom 12p) |
| 5 | Spätes Adenom | Verlust von DCC (Chromosom 18q) |
| 6 | Karzinom | Verlust von p53 (Chromosom 17p) |
| 7 | Metastase | Unbekannt |

Tabelle 1: Adenom-Karzinom-Sequenz

Jede pathomorphologisch weiter fortgeschrittene Stufe enthält eine zusätzliche genetische Veränderung (modifiziert nach Vogelstein et al., 1993).

Bei diesem Krankheitsbild existiert eine Variante, die sich nicht sporadisch bei älteren Menschen, sondern regelhaft familiär bei jungen Menschen entwickelt. Auch hier konnte eine *vererbte* Mutation nachgewiesen werden (APC-Gen), welche die *frühzeitige* Entstehung multipler Adenome und Karzinome erklärt (Grodin et al., 1991).

Welche Gene sind dies, die durch ihre fehlgesteuerte Funktion oder Dysfunktion zur Entstehung eines malignen Tumors führen können? Zwei Ansätze wurden verfolgt, die zunächst scheinbar in unterschiedliche Richtungen deuteten. Zum einen wurden in tierexperimentellen Studien Tumoren durch chemische, physikalische oder virale Mutagene *provoziert*, zum anderen Mutationen in *sporadisch* auftretenden humanen Tumoren untersucht. Erstaunlicherweise zeigte sich, daß in beiden Ansätzen *dieselben Gene* betroffen waren, die je nach ihrer Funktion Tumor-Suppressor-Gene oder Onkogene genannt werden. Bei beiden Gruppen handelt es sich um Gene, die das Teilungsverhalten und die Zykluskontrolle von Zellen beeinflussen. Die Tatsache, daß *mehrere* Mutationen dieser kritischen Gene zur Tumorentstehung notwendig sind, deutet darauf hin, daß ein derart sensibler Bereich wie das Proliferationsverhalten der Zelle durch mehrere unterschiedliche Systeme kontrolliert wird. Die Zahl der nötigen „Treffer“ ist stark vom verwendeten Zellsystem abhängig: menschliche Zellen benötigen in etwa 3-7 „Treffer“ bis zur Entwicklung zum malignen Tumor, murine Zellen sind deutlich empfindlicher und benötigen teilweise nur 1-2 solcher „Treffer“ (Vogelstein et al., 1993).

Diese Sichtweise der Tumorentstehung bedarf jedoch der Erweiterung, da Tumorzellen nicht im „leeren Raum“, sondern in einem lebenden Organismus entstehen. Heute sind vielfältige (teilweise epigenetische) Mechanismen bekannt, die es Zellen auf dem Weg der malignen Transformation erschweren, diesen zu vollenden, und welche – zusätzlich zur Aktivierung von Onkogenen und

Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen – zunächst überwunden werden müssen, bevor sich ein metastasierender Tumor bilden kann (**Tabelle 2**).

| | |
|-----|---|
| 1. | Aufhebung der Seneszenzkontrolle |
| 2. | Aufhebung der intrazellulären Proliferationskontrolle |
| 3. | Aktivierung von Onkogenen |
| 4. | Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen |
| 5. | Aufhebung der Proliferationskontrolle durch Nachbarzellen |
| 6. | Resistenz gegenüber der interzellulären Induktion der Apoptose |
| 7. | Schutz vor CTLs, Nk-Zellen, Makrophagen |
| 8. | Schutz vor Hypoxie-induzierter Apoptose |
| 9. | Unabhängigkeit von exogenen Überlebensfaktoren |
| 10. | Fähigkeit zur Metastasierung |

Tabelle 2: Grundlagen der Tumorentstehung

Die Tabelle faßt einige der zentralen Schritte der Tumorentstehung zusammen. Neu in diesem Zusammenhang ist die von unserer Arbeitsgruppe entdeckte "interzelluläre Induktion der Apoptose". Tabelle entnommen aus Winterhalder et al., 1999.

1.2 Apoptose – Endstrecke verschiedener natürlicher Antitumor-Mechanismen

Apoptose (programmierter Zelltod) ist nicht nur die Endstrecke vieler natürlicher und therapeutischer Antitumor-Mechanismen (Strasser, 1999), sondern stellt einen essentiellen Prozeß in der Entwicklung und Homöostase vielzelliger Organismen dar (Majno et al., 1995), dessen Dysregulation in zunehmendem Maße auch für die Pathogenese zahlreicher weiterer Erkrankungen verantwortlich gemacht wird (z.B. Autoimmunerkrankungen (O'Reilly et al., 1999; Walsh et al., 1998; Penninger et al., 1998), neurodegenerative Erkrankungen (Thompson, 1995; Holtzman et al., 1997), AIDS (Jaworowski et al., 1999; Jaruga, 1999) u.s.w.). Was ist der Zweck des kontrollierten Absterbens von Zellen? Zur Beantwortung dieser Frage macht es Sinn, kurz die evolutionäre Entwicklung des Phänomens zu betrachten. Apoptose ist schon bei einzelligen Organismen nachweisbar (Kennedy et al., 1995) und stellt demnach einen evolutionär sehr alten und hochkonservierten Vorgang dar. Initial diente diese „altruistische Form“ des Zelltodes wahrscheinlich dem Erhalt der Art, indem die Zellzahl bei Mangelbedingungen reduziert oder virusinfizierte Zellen eliminiert wurden (Shub, 1994; Yarmolinsky, 1995) und auf diese Weise die Population in ihrem Bestand geschützt werden konnte. Im Laufe der Evolution entwickelte sich dieser Mechanismus – entsprechend der Entwicklung vom Einzeller zum Vielzeller – von einer reinen „Verteidigungsstrategie“ hin zu einem Mechanismus mit essentieller Bedeutung für

Entwicklung, Gewebekomöostase und Abwehr: die Differenzierung zu einem komplexen vielzelligen Organismus ist ohne das gezielte Absterben bestimmter Zellen kaum vorstellbar (Vaux et al., 1999) und auch die ständige Erneuerung von Geweben setzt das Absterben überalterter Zellen voraus (Potten et al., 1997).

Was hat man sich unter Apoptose vorzustellen? Apoptose war zunächst ein *morphologisches* Phänomen, welches von Wyllie (Wyllie, 1980) erstmals bei Thymozyten systematisch untersucht wurde (jedoch schon wesentlich früher Erwähnung fand: Vogt, 1842; Kerr et al., 1972): Glucocorticoid-behandelte Thymozyten zeigten charakteristische morphologische Veränderungen wie Zellschrumpfung, „membrane blebbing“, Chromatin-Kondensation und Kernfragmentierung sowie auf biochemischer Ebene eine typische DNA-Fragmentierung in Banden zu ca. 180 bp. Genauere Erkenntnisse über die molekularen Ursachen dieser Veränderungen erarbeiteten Ellis et al. (Ellis et al., 1991) durch Studien an *Caenorhabditis elegans*. Aus diesen Untersuchungen entstand das Modell der sequentiellen Aktivierung von *Caspasen* (Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen) während des Apoptose-Vorganges (**Abbildung 1**). Unklar blieb jedoch, was schließlich *entscheidend* für den Tod der Zelle ist (survival-factor-Hypothese).

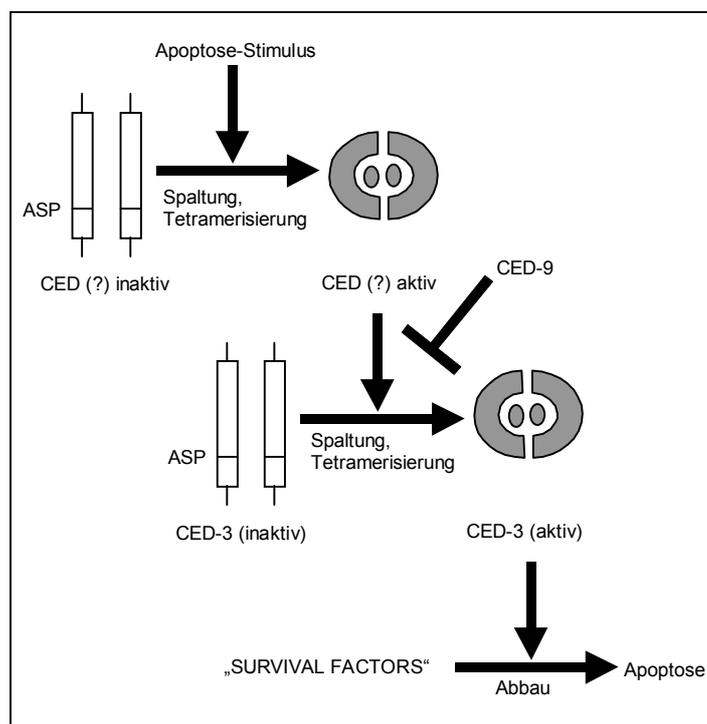


Abbildung 1: Sequentielle Aktivierung von Caspasen bei *Caenorhabditis elegans*

Unterschiedliche Apoptose-Stimuli spalten (inaktive) Pro-Caspasen Aspartat-spezifisch; durch Tetramerisierung entstehen aktive Enzyme, die wiederum weitere Caspasen durch spezifische Spaltung aktivieren können. Schließlich werden (operational definierte) Survival-Factors inaktiviert, die zum Überleben der Zelle notwendig sind. Es sind auch Gene bekannt, deren Produkte in den beschriebenen Vorgang hemmend eingreifen (z.B. CED-9).

Zahlreiche weitere Untersuchungen zeigten, daß Apoptose einen *universellen* Vorgang darstellt, der – relativ unabhängig vom auslösenden Stimulus – stets sehr *gleichförmig* abläuft, sowie, daß viele Vorgänge, die früher der Nekrose (charakterisiert durch Kern- und Zellschwellung) zugeschrieben wurden, eigentlich Apoptosen darstellen, die sekundär in Nekrosen übergehen. Die heutige Apoptose-Forschung zeichnet ein ständig komplexer werdendes Bild der ablaufenden Vorgänge (Wilson, 1998; Vaux et al., 1996). Zusammenfassend und vereinfachend kann man folgendes sagen: Apoptose läßt sich in mehrere Phasen unterteilen (Stimulus, Transduktions, Effektor- und Post-mortem-Phase). Verschiedenste Stimuli (z.B. Rezeptor-Ligand-Interaktionen, Nährstoffmangel, Chemikalien und ROS) vermögen eine konstitutiv exprimierte Apoptose-Maschinerie auszulösen, die, einmal in Gang gesetzt, den kontrollierten Selbstmord der Zelle bewirkt. Die Apoptose-Maschinerie selbst besteht wahrscheinlich aus mehreren Teilen, wobei das Caspasen-System und das Mitochondrien-System (unter Beteiligung von ROS) von entscheidender Bedeutung zu sein scheinen und vielfältig interagieren (**Abbildung 2**). Die typischen morphologischen Veränderungen treten wahrscheinlich erst in der Post-mortem-Phase ein („cleaning up after death“) und erfordern Energieträger. Falls diese nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen (oder falls das Apoptose-Programm sehr rasant abläuft), findet sekundäre Nekrose statt (Slater et al., 1995; Leist et al., 1999; Lemasters, 1999). Zahlreiche Stoffe (besonders Antioxidantien) und Proteine (z.B. bcl-2, BPV-Proteine, crmA) sind bekannt, die an unterschiedlicher Stelle mit dem Apoptose-Programm interferieren und dieses hemmen können.

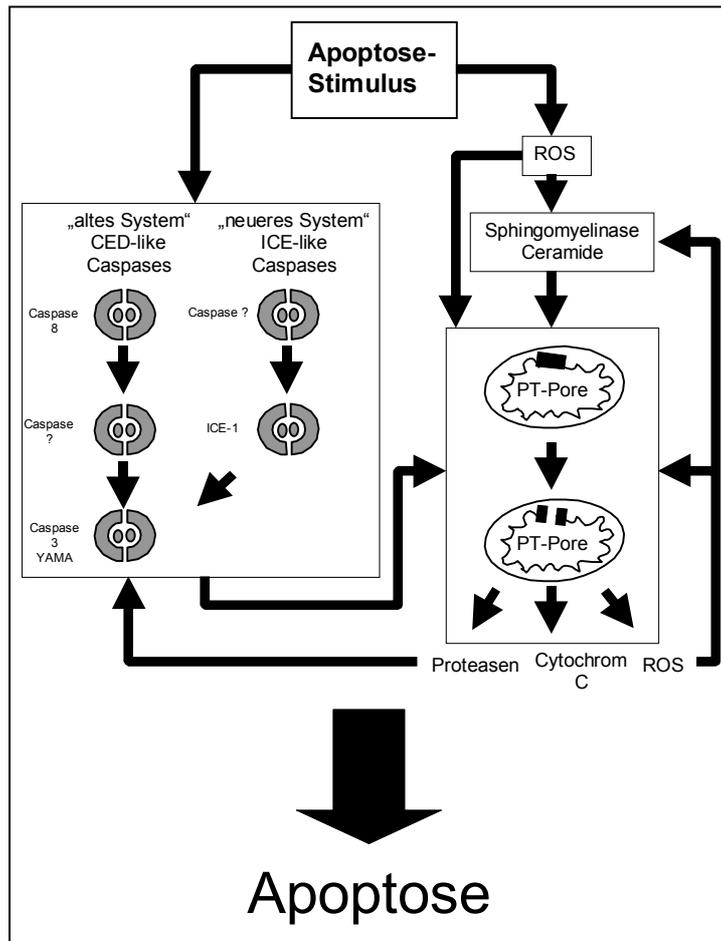


Abbildung 2: Neueres Konzept des programmierten Zelltodes

Je nach Stimulus wird zunächst das links dargestellte System (Caspasen) oder das rechts dargestellte System (Mitochondrien, ROS) aktiviert.

Aktive Caspasen spalten sequentiell weitere Pro-Caspasen, bis schließlich Caspase 3 als entscheidendes Effektor-Enzym entsteht. Innerhalb des Caspasen-Systems existieren mindestens zwei unterschiedliche Wege (das evolutionär ältere "CED-like"-System und das jüngere "ICE-like"-System), die jedoch eine gemeinsame Endstrecke besitzen.

ROS können an mehreren Stellen eingreifen. Über Aktivierung der Sphingomyelinase entstehen Ceramide, die ihrerseits die PT-Pore des Mitochondriums öffnen können. Diese Pore kann auch durch ROS direkt und durch aktive Caspasen geöffnet werden. Die Öffnung der PT-Pore bewirkt einen Zusammenbruch des Protonengradienten des Mitochondriums mit konsekutivem "oxidative burst" (Entkopplung der Atmungskette): weitere ROS, Cytochrom C und Proteasen werden freigesetzt. Entstehende ROS können andere Mitochondrien aktivieren sowie Ceramide freisetzen; Proteasen können Caspasen aktivieren.

Ist das System einmal angestoßen, verstärkt es sich durch positive Rückkopplung selbst. Die verschiedenen Wege sind stark vernetzt.

Verschiedene natürliche Antitumor-Mechanismen bedienen sich der Induktion des programmierten Zelltodes um (potentiell) maligne Zellen zu eliminieren. Man kann dabei Systeme unterscheiden, die *direkten* Zell-Zell-Kontakt erfordern (Rezeptor-Ligand-Interaktion) oder *ohne* direkten Zellkontakt ablaufen (z.B. interzelluläre Induktion der Apoptose, siehe unten). Als Beispiel eines rezeptorvermittelten Antitumor-Mechanismus soll die CD95-vermittelte Apoptose durch zytotoxische T-Lymphozyten genannt werden, da in diesem Fall die Signaltransduktion von der Zellmembran zur Apoptose-Maschinerie sehr gut untersucht ist (Muzio et al., 1996; Enari et al.,

1996; Rasper et al., 1998). Die Weiterleitung eines Rezeptorsignals an die Apoptose-Maschinerie über ein entsprechendes Adapterprotein mit „death domain“ und „death effector domain“ stellt einen weitverbreiteten Mechanismus dar und zeichnet die Familie der „death receptors“ aus (**Abbildung 3**).

Die interzelluläre Induktion der Apoptose läuft ohne direkten Zell-Zell-Kontakt ab und soll im nächsten Abschnitt ausführlich dargestellt werden.

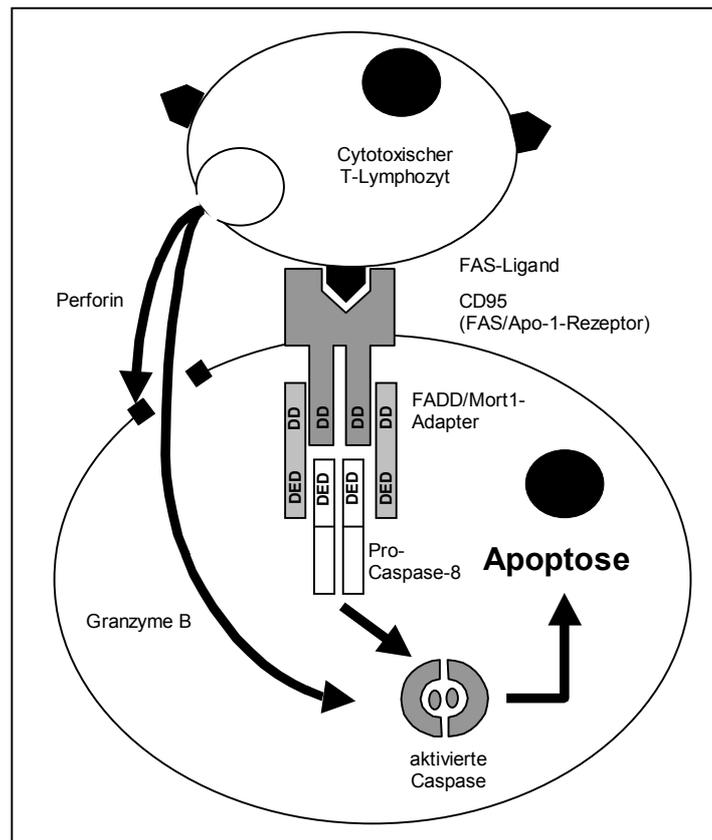


Abbildung 3: CD95 vermittelte Apoptose durch zytotoxische T-Lymphozyten

Durch Interaktion des CD95-Rezeptors (FAS/Apo-1-Rezeptor) mit seinem Liganden (FAS-Ligand) wird die intrazelluläre Domäne des Rezeptors aktiviert. Mit Hilfe des FADD/Mort1-Adapters und dessen „Death Domains“ bzw. „Death Effector Domains“ kann Pro-Caspase 8 an den Rezeptorkomplex binden und gespalten werden. Dadurch entsteht aktive Caspase 8, die weitere Enzyme aktivieren kann. Neben diesem System existiert eine weitere Möglichkeit zur Induktion der Apoptose durch zytotoxische T-Lymphozyten: Perforin ermöglicht das Eindringen von Granzyme B in die Zielzelle. Granzyme B besitzt selber Protease-Aktivität und kann direkt Caspasen aktivieren.

1.3 Das Konzept der interzellulären Induktion der Apoptose

Tumorentstehung erfolgt nach heutigem Verständnis - wie gesagt - in einem mehrstufigen Prozeß, an dessen Anfang die normale, nicht-transformierte Zelle steht. Durch einmalige Applikation eines Tumor-Initiators und anschließende mehrfache Wirkung von Tumorpromotoren können Zellen verschiedener Herkunft stabil in den sogenannten „transformierten Zustand“ überführt werden (Friedwald and Rous, 1944; Boutwell 1984; Slaga et al., 1980; Fürstenberger et al., 1981). Transformierte Zellen besitzen charakteristische Eigenschaften (Reznikoff et al., 1973a; Shin et al., 1975; Mondal and Heidelberger, 1976; Kahn et al., 1979; Cifone et al., 1980). Sie sind – im Gegensatz zu nicht-transformierten Zellen – zur Koloniebildung in Weichagar und zur Fokusbildung befähigt, unterliegen keiner Kontakt-Inhibition, zeigen criss-cross-Wachstum und häufig eine typische spindelförmige Morphologie. Damit sind schon einige Kriterien des malignen Wachstums erfüllt. Was unterscheidet transformierte Zellen dann von Tumorzellen? Der wesentlichste Unterschied besteht wohl darin, daß transformierte Zellen auf dem Weg der malignen Entartung erst soweit fortgeschritten sind, daß sie (zumindest *in vitro*) noch der Kontrolle durch verschiedene Anti-Tumor-Mechanismen unterliegen; die komplette Entfaltung des malignen Potentials ist erst dann möglich, wenn sie *Resistenz* gegenüber den im folgenden besprochenen Anti-Tumor-Mechanismen erwerben (Bauer, 1995).

Schon lange ist bekannt, daß transformierte Fibroblasten *in vitro* einer starken Proliferationshemmung durch benachbarte nicht-transformierte Fibroblasten unterliegen (Berwald and Sachs, 1963; Stoker et al., 1966; Bignami et al., 1988). Dieser Effekt ist abhängig vom direkten Zell-Zell-Kontakt über gap-junctions (Mehta et al., 1986), kann aber auch durch freigesetzte Stoffe verursacht werden (Martin et al., 1991). Zusätzlich zu diesem Effekt der reinen Proliferationshemmung wurde in unserer Arbeitsgruppe ein System entdeckt, welches transformierte Fibroblasten in Gegenwart nicht-transformierter Fibroblasten mittels Induktion des programmierten Zelltodes selektiv *eliminiert* (Bauer, 1996, review). Beobachtet wurde dieses Phänomen erstmals bei dem Versuch, transformierte Fibroblasten, die bereits zum Fokus ausgewachsen waren, zusammen mit nicht-transformierten Zellen in der Überzahl zu kultivieren. Zusätzlich zu der erwarteten Proliferationshemmung trat ein *selektives Absterben* der transformierten Foci ein (Bauer et al., 1991; Höfler et al., 1993). Der Effekt ließ sich durch Zugabe von exogenem TGF- β dramatisch verstärken, war jedoch auch ohne diesen Zusatz zu beobachten (basale Elimination). Dieses als „interzelluläre Induktion der Apoptose“ bezeichnete System ist Zellkontakt-unabhängig (Jürgensmeier et al., 1994a).

Die Empfindlichkeit gegenüber der interzellulären Induktion der Apoptose stellt eine Eigenschaft

dar, die kausal mit dem transformierten Phänotyp verbunden ist (Beck et al., 1997), unabhängig vom ursprünglich transformierenden Agens (Jürgensmeier et al., 1994b; Panse et al., 1997). Von dieser Regel existiert eine Ausnahme mit weitreichender Konsequenz für die Tumorentstehung (Bauer, 1997): BPV-transformierte Fibroblasten sind resistent gegenüber der interzellulären Induktion der Apoptose (Melchinger et al., 1996). Interessanterweise sind Ex-vivo-Tumorzellen ebenfalls resistent gegenüber der interzellulären Induktion der Apoptose (I. Engelmann, unpublished). Dieser Befund verdeutlicht, daß zur Tumorentstehung weitere Veränderungen notwendig sind, die es transformierten Zellen erlauben, der Kontrolle durch die interzelluläre Induktion der Apoptose zu entgehen.

In den letzten Jahren wurden detaillierte Kenntnisse über die Funktion des Systems erarbeitet. Zur besseren Übersicht soll zunächst ein stark vereinfachtes Schema dargestellt werden (**Abbildung 4**). Die Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen erfolgt über lösliche Faktoren. Die transformierte Zelle produziert TGF- β_1 , ein hochaktives Polypeptid, das einer großen Familie von Zytokinen mit pluripotentem Wirkungsspektrum bei Wachstum und Entwicklung angehört (Massagué, 1987). Es wird in einer inaktiven, latenten Form (hohes Molekulargewicht) sezerniert und durch verschiedene Mechanismen aktiviert (z.B. pH-Schock, ROS). Latentes (HMW) TGF- β_1 besitzt die Eigenschaft, die Epstein-Barr-Virus Antigen-Synthese zu aktivieren und kann auf diese Weise quantifiziert werden (Bauer et al., 1982a/b/c). Aktives (LMW) TGF- β_1 wurde als 25 kD-Homodimer (zwei β_1 -Ketten, durch Disulfidbrücken stabilisiert) charakterisiert (Massagué, 1987). TGF- β hat in diesem System eine doppelte Wirkung. Einerseits erhält es durch einen „autokrinen Loop“ den transformierten Zustand der Zielzelle aufrecht (Wehrle et al., 1994; Hackenjos et al., 1996), andererseits dient es zur Signalübermittlung zur nicht-transformierten Effektorzelle (Häufel et al., 1999, review). Die Signaltransduktion erfolgt dabei über TGF- β -Rezeptoren (Serin-Threonin-Kinasen) mit angekoppelten SMAD-Proteinen (Massagué, 1992/1996; Massagué et al., 1997; Heldin et al., 1997; Whitman, 1997). Die nicht-transformierte Effektorzelle erhält durch TGF- β das Signal, operational definierte AIF (Apoptose Induzierende Faktoren) zu produzieren. Dieser Schritt ist ROS-abhängig und kann durch unspezifische Antioxidantien gehemmt werden (Schaefer et al., 1995; Langer et al., 1996). Freigesetzte AIF sind kurzlebig und vermögen in transformierten Zielzellen selektiv Apoptose zu induzieren. Auch dieser Vorgang läßt sich durch (spezifische) Antioxidantien hemmen und soll später näher erläutert werden. Die Übermittlung des Signals zur Apoptose-Induktion erfolgt über Lipidperoxidation der Zellmembran der Zielzelle (C. Maurus, unpublished) und mündet damit vermutlich in den oben beschriebenen Vorgang der Apoptose-Induktion durch ROS ein (**Abbildung 2**). Die Effektivität der Apoptose-Induktion ist – wie zu erwarten – vom Redoxzustand der Zielzelle abhängig (Zucker et al., 1997a/b).

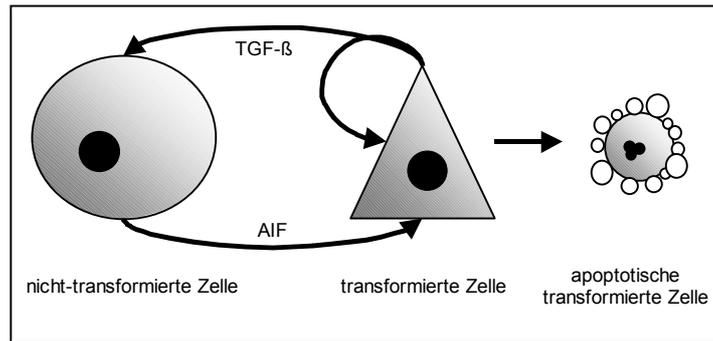


Abbildung 4: Stark vereinfachtes Schema der interzellulären Induktion der Apoptose

Die transformierte Zielzelle setzt das Zytokin TGF- β frei, welches einerseits über einen autokrinen Kreislauf den transformierten Phänotyp aufrechterhält und andererseits als Signalmolekül für die interzelluläre Induktion der Apoptose wirkt. TGF- β gibt der nicht-transformierten Effektorzelle das Signal, AIF (Apoptose Induzierende Faktoren) freizusetzen. AIF führen zur selektiven Apoptose der transformierten Zielzelle.

Das dargestellte stark vereinfachte Schema läßt einige Fragen offen. Insbesondere war es interessant, die chemische Natur der AIF zu entschlüsseln und zu klären, wodurch deren Selektivität für transformierte Zellen begründet ist. Beide Fragen konnten in letzter Zeit zufriedenstellend beantwortet werden. Hemmstoff-Experimente zeigten, daß es sich bei den beschriebenen Vorgängen um ein komplexes Zusammenspiel reaktiver Sauerstoffspezies handelt (**Abbildung 5**). Die Effektorzelle setzt (nach TGF- β -Stimulation) ein Enzym mit Peroxidase-Aktivität (I. Engelmann, G. Bauer, unpublished) sowie Stickstoffmonoxid (NO) frei (S. Heigold, unpublished). Die Zielzelle leistet ihrerseits einen Beitrag zu ihrer eigenen Elimination durch Produktion von Superoxid-Anionen (M. Herdener, unpublished). In komplexen Reaktionsschritten entstehen schließlich apoptose-auslösende Hydroxyl-Radikale und Peroxynitrit. Die Spezifität der Elimination liegt in der Entstehung der zytotoxischen Radikale in enger räumlicher Beziehung zur Zielzelle begründet und weist damit große Ähnlichkeit zur Elimination von Bakterien durch Abwehrzellen auf (auch hinsichtlich der beteiligten Stoffe: Saran et al., 1999; Saran et al., 1998). Tatsächlich konnten ähnliche Reaktionsschritte auch bei der Interaktion transformierter Fibroblasten mit Promyelozyten nachgewiesen werden (K. Paul, unpublished); die beschriebenen Reaktionswege könnten damit eine mehr oder weniger universelle Bedeutung haben.

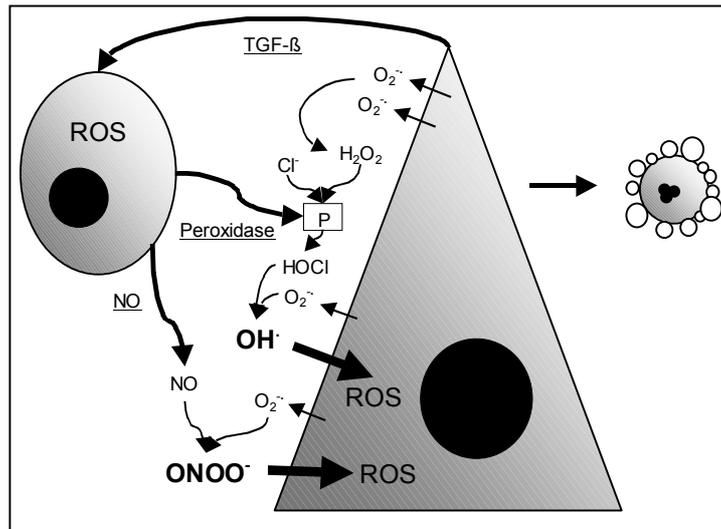


Abbildung 5: Rolle von ROS während der interzellulären Induktion der Apoptose

Die TGF- β -stimulierte Effektorzelle (links, ovales Symbol) setzt NO sowie ein Enzym mit Peroxidase-Aktivität frei (gekoppelt an die intrazelluläre Wirkung von ROS). Die transformierte Zielzelle (dreieckiges Symbol) produziert Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$). Über komplizierte Reaktionswege entstehen schließlich räumlich nahe an der Zielzelle hochreaktive Effektormoleküle: Hydroxyl-Radikale (OH^{\cdot}) und Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot-}$). Diese bewirken über Lipidperoxidation eine Signaltransduktion in das Zellinnere der transformierten Zielzelle, welche daraufhin ihr Apoptose-Programm in Gang setzt (apoptotische Zelle rechts). Die dargestellten Reaktionswege sind vielfältig gekoppelt und durch diverse Stoffe hemmbar (nicht dargestellt).

Den entscheidenden Faktor für die Spezifität der beschriebenen Reaktionen stellt die Produktion von Superoxid-Anionen durch die transformierten Zielzellen dar. Die Superoxid-Anionen-Produktion konnte zwar in diesem System noch nicht *direkt* nachgewiesen werden, verschiedene elegante Hemmexperimente (M. Herdener, unpublished) lassen dies jedoch mehr als wahrscheinlich erscheinen. Neuerdings ließ sich auch zeigen, daß einerseits ras-transformierte Zellen Superoxid-Anionen produzieren (Irani et al., 1998) und andererseits, daß die alleinige Expressierung eines klonierten Superoxid-produzierenden Enzyms Zellen *transformieren* kann (Suh et al., 1999). Es erscheint damit denkbar, daß die Produktion von Superoxid-Anionen *kausal* mit dem transformierten Phänotyp verbunden sein könnte. Der Schlüssel zur Resistenz von Ex-vivo-Tumorzellen gegenüber der (interzellulären) Induktion der Apoptose liegt demnach vielleicht darin begründet, daß diese Zellen Mechanismen entwickelt haben, die mit den beschriebenen oxidativen Vorgängen interferieren (Kong et al., 1998 (review); Wolff, 1996; Chang et al., 1997; Yanase et al., 1999).

1.4 Möglichkeiten und Grenzen der Monolayerkultur

Das Konzept der interzellulären Induktion der Apoptose wurden anhand von Monolayer-Versuchen (teilweise unter Einsatz von Trennkammern zur räumlichen Separierung der Zellen) entwickelt. Das Monolayer-System bietet zahlreiche Vorteile. So ist die getrennte Manipulation und Vorbehandlung verschiedener Zellpopulationen problemlos möglich; die Auswertung kann sehr einfach mit Hilfe des Phasenkontrast-Mikroskopes erfolgen. Auch *während* der Versuche können Stoffe hinzugefügt und das Ergebnis direkt auf Einzelzell-Ebene verfolgt werden. Zusätzlich stehen im Monolayer-System allen Zellen dieselben Wachstumsbedingungen zur Verfügung, welche sehr genau von außen kontrolliert werden können. Mit diesen Vorteilen erkaufte man sich jedoch auch Nachteile. Das Monolayer-System ist zwar einfach und elegant in der Handhabung, ist aber relativ weit von der Situation *in vivo* entfernt. Räumliche, dreidimensionale Interaktionen können nicht untersucht werden, und besonders das große Medium-Volumen, das den Zellen zur Verfügung steht, sorgt für eine starke Verdünnung freigesetzter Stoffe. Effekte, die auf der Wirkung kurzlebiger ROS oder anderer kritischer Substanzen beruhen, finden deshalb möglicherweise nur *abgeschwächt* statt. Folglich sollte in dieser Arbeit das Konzept der interzellulären Induktion der Apoptose in einem System überprüft werden, das der komplexen Situation *in vivo* näher kommt: im dreidimensionalen Sphäroid.

1.5 Das Sphäroid als dreidimensionales Zellkultursystem

Dreidimensionale Zellkultursysteme werden schon seit Jahrzehnten in den unterschiedlichsten Bereichen medizinischer und biologischer Forschung eingesetzt, da sie ein wertvolles Bindeglied zwischen *in vitro* Zellsystemen (wie zum Beispiel der Monolayerkultur) und der Situation *in vivo* darstellen (Mueller-Klieser, 1997, review). Bereits 1944 führte Holtfreter mit Amphibienembryonen erste Experimente zur Morphogenese in der dreidimensionalen Zellkultur durch (Holtfreter, 1944). Später wurden neben Zellen embryonaler Herkunft (Moscona, 1952) auch *ex vivo* Tumorzellen verwendet (Moscona, 1957) sowie die Gewebeinvasion durch Tumorzellen simuliert (Moscona, 1957; Dabrowska-Piaskowska, 1959). Heute werden bevorzugt etablierte Zelllinien verwendet, da diese eine weitgehende Standardisierung und damit Vergleichbarkeit garantieren (Mueller-Klieser, 1987; Knüchel et al., 1990).

Das Problem der Herstellung und Kultivierung dreidimensionaler Zellaggregate konnte durch die Entwicklung zahlreicher neuer Methoden gelöst werden. Prinzipiell werden Zellaggregate hergestellt, indem entweder Zellsuspensionen adhärent wachsender Zellen auf nicht-adhäsiven Oberflächen (wie z.B. Agarose; Holtfreter, 1944) kultiviert und durch zusätzliche kontinuierliche

Bewegung (Moscona, 1961) deren Aggregation herbeigeführt wird, oder indem das Auswachsen einzelner Zellen zu kleinen Zellklonen in Weichagar ausgenutzt wird (McAllister et al., 1967). In beiden Fällen bestehen interessante Unterschiede im Verhalten maligner und nicht-maligner Zellen. Maligne Zellen zeigen generell eine größere Tendenz, sich zu Zellaggregaten zusammenzulagern (Halpern et al., 1966; Rak et al., 1995); das Wachstum in Weichagar wird sogar als *Kriterium* für Malignität eingesetzt (z.B. Bruland et al., 1985).

Die Kultivierung dreidimensionaler Zellaggregate (sogenannter Sphäroide) erfolgt in Gefäßen mit nicht-adhäsiver Oberfläche. Man unterscheidet dabei Methoden, die ruhig stehende Gefäße einsetzen und solche, bei denen die Gefäße kontinuierlich bewegt werden („roller bottle“-Technik). Da man je nach verwendeter Kulturtechnik große Unterschiede in den Eigenschaften der Sphäroide beobachten kann, werden Anstrengungen unternommen, auch diese Bedingungen zu standardisieren (Acker et al., 1987; Mueller-Klieser, 1987).

Die Forschung an dreidimensionalen Zellaggregaten liefert insbesondere in den drei Bereichen Entwicklungsbiologie (Keller, 1995), Herstellung künstlicher Gewebe (z.B. Gerlach, 1994) und Tumorforschung (Kunz-Schughart et al., 1998; Mueller-Klieser, 1987/1997; Knüchel et al., 1990) wertvolle Ergebnisse. Im folgenden soll detaillierter auf die Bedeutung dreidimensionaler Zellkultursysteme für die Tumorforschung eingegangen werden. Anfänglich konzentrierten sich die Bemühungen darauf, an dreidimensionalen Tumormodellen systematische Studien zur Wirksamkeit verschiedener Therapieformen (vor allem der Chemo- und Strahlentherapie) durchzuführen (Sutherland et al., 1970/1971; Inch et al., 1970). Davon erwartete man sich Aussagen über die Wirksamkeit dieser Therapieformen *in vivo* (nicht zuletzt, um Tierexperimente einsparen zu können). Es zeigte sich jedoch, daß die verwendeten Sphäroidmodelle zwar hinsichtlich Morphologie und Verhalten gegenüber der Therapie eine gute Übereinstimmung mit der Situation *in vivo* ergaben (Sutherland et al., 1971), die verwendeten Meßmethoden aber zu ungenau waren und nur wenige Aspekte der ablaufenden Vorgänge berücksichtigten. Mehr und mehr setzte sich die Überzeugung durch, daß Sphäroide keine in sich homogenen Gebilde darstellen, sondern große Variationen hinsichtlich der Zelleigenschaften innerhalb des Sphäroids bestehen können (z.B. Freyer et al., 1986; Heppner et al., 1989). Insbesondere wurden radiale Sauerstoff- und Nährstoffgradienten sowie entgegengesetzte „Abfallstoff“-Gradienten (z.B. Laktat) für die beobachteten morphologischen und biochemischen Unterschiede verantwortlich gemacht (Carlsson et al., 1988; Adam et al., 1990; Byrne et al., 1996). In vielen Sphäroid-Modellen kann ein dreischichtiger, konzentrischer Aufbau aus einer „äußeren Zone“, einer „Intermediärzone“ und einer „zentralen Nekrosezone“ beobachtet werden (Mueller-Klieser, 1987). Diese morphologische Struktur korreliert mit der Funktion. In der „äußeren Zone“ finden sich vitale, proliferierende

Zellen, in der „Intermediärzone“ vitale, nicht-proliferierende Zellen (G_0 -Phase) und in der „zentralen Nekrosezone“ abgestorbene Zellen und Zelltrümmer. Diese funktionellen Unterschiede im Sphäroid korrelieren gut mit Befunden an Tumormodellen. Es zeigt sich, daß Sphäroide exzellente Nachbildungen der Situation in avaskulären Mikrotumoren bzw. in schlecht versorgten Anteilen größerer Tumoren darstellen (Sutherland, 1988). Insbesondere die relative Resistenz hypoxischer Tumorzellen gegenüber verschiedenen Therapieformen konnte im Sphäroid erforscht werden (z.B. Durand et al., 1989; Rofstad et al., 1996; Phillipovich et al., 1997; Frankel et al., 1997) und erlaubt demnächst vielleicht therapeutische Interventionen (Dachs et al., 1996; Brown et al., 1998). Aufgrund der dargestellten zellulären Heterogenität im Sphäroid wurden in den letzten Jahren zahlreiche neue Verfahren entwickelt, die es erlauben, gezielt einzelne Zellpopulationen zu analysieren. In diesem Zusammenhang sei beispielsweise die selektive automatisierte Dissoziation von Sphäroiden genannt, die es erlaubt, Zellen aus unterschiedlichen, definierten Lokalisationen innerhalb des Sphäroids hinsichtlich ihrer Eigenschaften (Vitalität, Metabolismus u.a.) zu untersuchen (Freyer et al., 1988a; Kunz-Schughart et al., 1997a). Diese Methode soll als ein Beispiel für den Trend in der Sphäroidforschung dienen, zunehmend genauere Kenntnisse auf Einzelzellebene (z.B. Kunz-Schughart et al., 1997b) bzw. sogar auf molekularer Ebene zu gewinnen.

Die in dieser Arbeit verwendete Sphäroidtechnik knüpft an diese Entwicklung mit dem Ziel an, die Tumorentstehung im dreidimensionalen Zellsystem in einer *frühen Phase* zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Kokulturen (Heterosphäroide) aus transformierten und nicht-transformierten Zellen eingesetzt, um deren Interaktion im System der interzellulären Induktion der Apoptose zu prüfen. Um diesen Ansatz realisieren zu können, war es nötig, einzelne Zellen im Sphäroid zu verfolgen, was durch die Methode der Markierung mit phagozytierbaren Fluospheres erreicht werden konnte (H. Deng, unpublished). Damit steht eine Methode zur Verfügung, die es auch in anderen dreidimensionalen Systemen erlaubt, bestimmte Zellpopulationen voneinander zu unterscheiden und so deren Interaktionen zu studieren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß dreidimensionale Zellaggregate eine wichtige Verbindung zwischen übersichtlichen Monolayer-Zellkulturversuchen und der Situation im lebenden Organismus darstellen. Es lassen sich frühe Stufen der Tumorentstehung unter gut standardisierbaren Bedingungen untersuchen. Eine direkte Übertragung auf die Situation *in vivo* erscheint jedoch (noch) nicht möglich, da viele bekannte und unbekannte Mechanismen der Kontrolle der Tumorentstehung im Sphäroidsystem (noch) nicht ausreichend simuliert werden können. So bleibt zum Beispiel der Einfluß von Hormonen, Zytokinen und der Tumorangiogenese weitgehend unberücksichtigt.

1.6 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, inwieweit sich das in der Monolayer-Zellkultur etablierte System der interzellulären Induktion der Apoptose auf die dreidimensionale Zellkultur übertragen läßt und damit ein kleiner Schritt von der künstlichen Situation *in vitro* hin zum lebenden Organismus getan werden. Insbesondere sollte die Entstehung von „Mikrotumoren“ und deren Verhalten simuliert werden. Zugrundeliegender Gedanke war, daß möglicherweise einzelne transformierte Zellen in einem Überschuß von nicht-transformierten Zellen (als Simulation der Tumorentstehung im natürlichen Gewebe) nicht eliminiert werden könnten (zum Beispiel aufgrund mangelnder Stimulation der nicht-transformierten Zellen durch TGF- β), größere Gruppen transformierter Zellen aber durchaus, wobei möglicherweise eine Grenze erreicht werden könnte, ab der die Elimination ineffektiv wäre. Deshalb sollte zunächst das Verhalten einzelner transformierter Zellen in einem Überschuß nicht-transformierter Zellen untersucht werden und anschließend ein Verfahren entwickelt werden, das es ermöglichen sollte, unterschiedlich große, genau definierte Gruppen transformierter Zellen in diesem System zu untersuchen (**Abbildung 6**). Es fand ein Zellsystem (208F/208Fsrc3) Verwendung, das sich in der Monolayer-Zellkultur als besonders empfindlich gegenüber der interzellulären Induktion der Apoptose erwiesen hatte. Durch Markierung mit phagozytischen Fluospheres sollten die transformierten Zellen markiert werden, um sie später in (gefärbten) Dünnschnitten der Sphäroide wieder identifizieren zu können. Die Methode zur Sphäroidherstellung und Kultivierung wurde aufbauend auf dem von F. Lerch (Lerch, 1997) und H. Deng (unpublished) etablierten Verfahren weiterentwickelt.

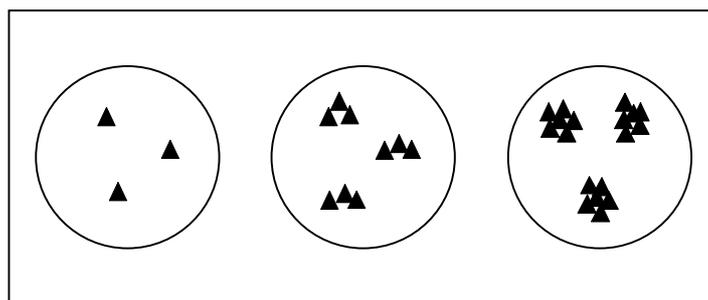


Abbildung 6: Simulation der Entstehung von „Mikrotumoren“

Von links nach rechts sind schematisch drei Ansätze dargestellt, die einzelne markierte transformierte Zellen und zunehmend größere Gruppen markierter transformierter Zellen (dreieckige Symbole) in einem Überschuß nicht-transformierter Zellen enthalten. Durch die Variation der Größe dieser „Mikrotumoren“ sollte die Effektivität der interzellulären Induktion der Apoptose im Sphäroidsystem geprüft werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Nicht-transformierte Zelllinien

208F

Bei der nicht-transformierten Zelllinie 208F handelt es sich um permanent wachsende, nicht-maligne Rattenfibroblasten (zur Verfügung gestellt von R. Schäfer, Charité, Berlin). Sie zeichnet sich in der Monolayer-Kultur durch ausgeprägte Kontaktinhibition, eine niedrige spontane Transformationsrate, Unempfindlichkeit gegenüber der interzellulären Induktion der Apoptose sowie ein sehr stabiles Wachstumsverhalten aus. Sie ist nicht in der Lage, in Weichagar Kolonien zu bilden (Quade, 1979).

C127

Dabei handelt es sich um eine nicht-transformierte, permanent wachsende Maus-Fibroblasten-Zelllinie (zur Verfügung gestellt von L. Gissmann, German Cancer Center, Heidelberg). In der Monolayerkultur zeigt sie ausgeprägte Kontaktinhibition sowie Unempfindlichkeit gegenüber der interzellulären Induktion der Apoptose. Die Zelllinie weist keine Fokusbildung in Weichagar auf.

Transformierte Zelllinien

208Fsrc3

Diese permanent wachsende Zelllinie wurde durch Transfektion der Parentallinie 208F mit dem pSV2gpt-Plasmid erzeugt. Sie erhält dadurch das virale Onkogen V-src, das für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps notwendig ist (Iten et al., 1989). Die Zelllinie wurde ebenfalls von R. Schäfer, Charité, Berlin zur Verfügung gestellt. Sie zeichnet sich in der Monolayer-Kultur durch fehlende Kontaktinhibition, criss-cross-Wachstum, starke Proliferation und eine hohe Reversionsrate zum normalen Phänotyp aus. Durch ihr spindelförmiges Aussehen lassen sich V-src exprimierende Zellen deutlich von Revertanten unterscheiden. Wachstum in der Weichagar-Kultur als Zeichen des transformierten Zustandes ist möglich.

C127M2 / C127M5

Diese permanent wachsenden Zelllinien wurden durch chemische Transformation von der nicht-transformierten Parietallinie C127 abgeleitet (Melchinger et al., 1996). Die Zelllinien zeigen in der Monolayer-Kultur typisches criss-cross-Wachstum, sind empfindlich gegenüber der interzellulären Induktion der Apoptose und sind zur Koloniebildung in Weichagar fähig.

Zellen der genannten Linien wurden maximal bis Passage 50 eingesetzt. Durch Auftauen und rekultivieren von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden wieder neue Zellen niedriger Passagezahl erhalten.

2.1.2 Zellkulturmedien

Medium

Für alle Versuche in Monolayer- und Sphäroid-Technik wurde Eagle's Minimum Essential Medium EMEM (im Hause hergestellt) eingesetzt. Sterilem EMEM wurden folgende Substanzen zugesetzt:

Glutamin (280 µg/ml)

Penicillin (40 U/ml)

Streptomycin (50 µg/ml)

Neomycin (10 µg/ml)

Moronal (10 U/ml)

FKS (5% bzw. 15%)

Falls nicht anders angegeben wurde 5% FKS eingesetzt. Um Kontaminationen zu verhindern wurde für jede Zelllinie eine getrennte Mediumflasche benutzt (Lagerung bei 4°C).

Einfríermedium

Einfríermedium dient zum Schutz der Zellen beim Einfrieren und Auftauen. Dadurch können Zellen über lange Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert und nach dem Auftauen rekultiviert werden. Es besteht aus EMEM, das mit 20% FKS und 7,5% DMSO versetzt wird.

2.1.3 Stammlösungen, Puffer, Reagenzien

Fötale Kälberserum (FKS)

FKS wird dem Zellkulturmedium als Quelle für Nährstoffe und Wachstumsfaktoren zugesetzt. Es wurde zunächst von C.C. pro GmbH, Neustadt und später von GibcoBRL LifeTechnologies, Eggenstein bezogen. Vor der ersten Benutzung wurde die bei -20°C gelagerte Flasche im 37°C-

Wasserbad aufgetaut anschließend für 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad zur Komplement-Inaktivierung behandelt (anschließend Lagerung bei 4°C).

Trypsin-Versengemisch 1:4

Trypsin wird zur proteolytischen Verdauung der Interzellulärsubstanz eingesetzt und erlaubt damit, in Zellkultur-Gefäßen anhaftende Zellen von ihrer Unterlage zu lösen und voneinander zu separieren. Verwendung fand eine im Hause hergestellte Lösung bestehend aus 0,05% Trypsin und 0,016% EDTA in PBS. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden für jede Zelllinie getrennte Trypsin-Flaschen verwendet (Lagerung bei 4°C).

Phosphate Buffered Saline (PBS)

PBS ist eine sterile, isotone Pufferlösung mit einem pH von 7,5 (im Hause hergestellt). Sie wurde zum Spülen der Sphäroid-Schnitte sowie zum Waschen von Mini-Sphäroiden eingesetzt. Die Lösung enthält (in Aqua bidest.):

| | |
|-------------------|--------|
| NaCl | 140 mM |
| KCl | 25 mM |
| MgCl ₂ | 0,5 mM |
| CaCl ₂ | 1 mM |
| Na/K Phosphat | 10 mM |

Dimethylsulfoxid (DMSO)

DMSO (C₂H₆OS) ist ein Hydroxyl-Radikalfänger mit guter Membrangängigkeit. Er schützt Zellen während des Vorgangs des Einfrierens und Auftauens vor Schäden. Die Stammlösung (Firma Merck, Darmstadt) wurde vor Verwendung in der Zellkultur steril filtriert.

Transforming-Growth-Factor Typ β_1 (TGF- β_1)

Hier verwendetes TGF- β_1 wurde aus menschlichen Thrombozyten (bereitgestellt von C.-H. Heldin, Uppsala) gereinigt (Bauer et al., 1991). Die verwendeten Aliquots der Stammlösung enthielten 50 μ l der Konzentration 15 ng/ μ l aktives TGF- β_1 und wurden bei -20°C gelagert. Zum Gebrauch wurden sie aufgetaut und durch 1:10 Verdünnung mit Medium auf 1,5 ng/ μ l eingestellt. Um die in den Versuchen verwendete Konzentration von ca. 20 ng/ml zu erreichen, wurden 500 μ l der Verdünnung 1,5 ng/ μ l pro 40 ml Medium eingesetzt.

Taurin

Die Aminosäure Taurin ist ein spezifischer HOCl-Fänger. Die Stammlösung enthielt Taurin ($C_2H_7NO_3S$, bezogen von Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 500 mM. Um die verwendete Endkonzentration von 20 mM zu erhalten, wurde die Stammlösung 1:25 mit Medium verdünnt.

Fluospheres

Phagozytische Fluospheres sind kleine, nahezu inerte Polystyrol-Kügelchen, die einen Fluoreszenz-Farbstoff enthalten und somit zur Markierung von Zellen eingesetzt werden können. Dadurch ermöglichen sie die spätere Identifikation markierter Zellen. Verwendung fanden Fluospheres der Firma Molecular Probes, Eugene, USA, die in verschiedenen Größen (Durchmessern), mit verschiedenen Emissions-Wellenlängen (Fluoreszenz-Farbe) und unterschiedlicher Beschichtung angeboten werden (**Tabelle 3**).

| Durchmesser | Farbe / Nr. | Exzitation | Emission | Beschichtung | Konzentration |
|-------------------|---------------|------------|----------|--------------|--------------------------|
| 0,1 μm | rot / F-8801 | 580 nm | 605 nm | carboxyliert | $2,7 \cdot 10^{13}$ p/ml |
| 0,5 μm | rot / F-8812 | 580 nm | 605 nm | carboxyliert | $2,1 \cdot 10^{11}$ p/ml |
| 0,1 μm | blau / F-8797 | 350 nm | 440 nm | carboxyliert | $4,5 \cdot 10^{13}$ p/ml |
| 1,0 μm | blau / F-8815 | 350 nm | 440 nm | carboxyliert | $3,6 \cdot 10^{10}$ p/ml |

Tabelle 3: Verwendete Fluospheres

Aus dem Volumen der eingesetzten Fluosphere-Suspension läßt sich die Zahl der enthaltenen Fluospheres berechnen (p/ml=particles pro ml).

Während aller Versuche wurden Aliquots aus jeweils demselben Fläschchen verwendet, sodaß die Konzentration an Fluospheres in den Aliquots stets konstant blieb (unterschiedliche Chargen enthalten unterschiedliche Konzentrationen an Fluospheres). Vor Verwendung wurden die Aliquots kräftig geschüttelt, da die Fluospheres nach kurzer Zeit sedimentieren.

Agarosestammlösung - 1,25%

Agarose wird zur Beschichtung hydrophiler Zellkultur-Gefäße eingesetzt, um Zellen bzw. Sphäroiden die Möglichkeit zur Anheftung zu nehmen. Die Agarose-Stammlösung wurde hergestellt, indem 2,5 g Seaplaque, low jelling temperature Agarosepulver (Agar FMC Corporation, USA) in 200 ml Aqua bidest. eingewogen und die Lösung anschließend autoklaviert wurde (115°C,

25 Minuten). Danach wurde die Agarose-Lösung offen für 30 Minuten unter dem UV-Licht der sterilen Hood bestrahlt (anschließend Lagerung bei 4°C).

Paraformaldehyd - 3%

Paraformaldehyd dient zur schonenden Fixierung von Gewebe und wurde hier zur Fixierung von Sphäroiden vor deren Weiterverarbeitung verwendet. Paraformaldehyd-3% wurde von Sigma, Deisenhofen (P-6148) bezogen und bei -20°C aufbewahrt.

Saccharose-Lösung - 15%

Saccharose-Lösung (15%) wird ebenfalls zur Fixierung von Sphäroid-Schnitten verwendet (Wasserentzug). Die Saccharose-Lösung wurde durch Einwiegen von 15 g Saccharose (Fa. Roth, Karlsruhe) in 100 ml Aqua bidest. hergestellt und bei 4°C aufbewahrt.

Giemsa-Lösung

Die Giemsa-Farbstofflösung (bezogen von Diagnostika Merck, Darmstadt) besteht aus der Kombination dreier Farbstoffe (Azur, Eosin, Methylenblau). Sie wurde zum Anfärben von Sphäroid-Proben vor dem Einbett- und Schneidevorgang verwendet, um das Sphäroid auf der Schnittfläche lokalisieren zu können. Zu diesem Zweck wurde die Stammlösung direkt vor Verwendung 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt.

O.C.T Tissue-Tek-Einbettmedium

Das Einbettmedium (bezogen von Miles, USA) ist bei Raumtemperatur ein zähflüssiges, transparentes Gel, das bei Abkühlung gefriert und ein weißliches Aussehen annimmt. Es besteht aus einer Mischung verschiedener Polymere und langkettiger Alkohole. Bei einer Temperatur von -20°C bis -25°C (Optimal Cutting Temperature) ist die gefrorene Mischung am besten für den Schneidevorgang im Kryomikrotom geeignet.

Bis-Benzimidin-Stammlösung

Die Bis-Benzimidin-Färbung wurde in den meisten Versuchen zum Apoptose-Nachweis eingesetzt. Der Farbstoff (Hoechst 33258) färbt die DNA der Zellen an und erlaubt so die Beurteilung des Chromatins (Chen, 1977; Elstein et al., 1994). Zur Anfertigung der Stammlösung wurden 0,1 mg/ml Farbstoff (Hoechst 33258) in saurem Kaliumacetat-Puffer (90 mM Essigsäure, 100 mM Kaliumacetat in Methanol) gelöst. Von der Stammlösung wurden Aliquots hergestellt und bei -20°C aufbewahrt. Vor Verwendung wurde der Farbstoff aufgetaut (lichtgeschützt) und 1:100 mit

Methanol (Firma Roth, Karlsruhe) verdünnt (entspricht 1 µg/ml Hoechst 33258).

McIlvane's-Lösung

McIlvane's-Lösung dient zum Einbetten Bis-Benzimidin gefärbter Sphäroidschnitte unter Deckgläser. Dadurch werden die Schnitte konserviert; es ist sogar möglich, diese bei -20°C einzufrieren und Monate später wieder zu betrachten. Die Lösung wurde folgendermaßen hergestellt: Man wiegt 0,66 g Kaliumhydrogenphosphat (Merck 4873) und 0,95 g Zitronensäure (Sigma C-0759) in 100 ml Aqua bidest. ein und mischt gut. Anschließend wird der pH mittels Phosphorsäure bzw. KOH auf 5,5 eingestellt. Nach erfolgter pH-Einstellung wird Glycerin (Merck, Darmstadt) im Verhältnis 1:1 dazugegeben.

TUNEL-Reagenz

Mittels der TUNEL-Reaktion können DNA-Strangbrüche als typisches Merkmal apoptotischer Zellen spezifisch angefärbt werden. Dabei wird der enzymatische Einbau Fluorescein-markierten dUTPs zur Anfärbung der Strangbrüche genutzt (Gorcycya et al., 1993). Hier wurde ein kommerziell erhältlicher Kit der Firma Boehringer, Mannheim verwendet (Lagerung bei -20°C). Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurden 100 µl der Substrat-Lösung für die Negativkontrolle abpipettiert und der Rest zur Enzym-Lösung hinzugefügt.

Rinderserum-Albumin (BSA) - 1%

BSA (Calbiochem, Bad Soden) wurde eingesetzt, um unspezifische Bindungsstellen bei der TUNEL-Reaktion abzusättigen (Lagerung der Lösung bei -20°C).

Elvanol-Lösung

Elvanol-Lösung verzögert das Ausbleichen der Fluorescein-Markierung bei der TUNEL-Färbung und konserviert die Sphäroid-Schnitte. Es wird dabei (anstatt McIlvane's-Lösung) zum Einbetten der Sphäroid-Schnitte unter Deckgläser verwendet. Die Fluoreszenz hält trotz der Elvanol-Lösung nur wenige Minuten an; deshalb wurde später ein verbessertes Anti-Bleichmittel (siehe unten) verwendet. Herstellung: 5 g Elvanol (Serva, Heidelberg) werden in 80 ml PBS gelöst und anschließend 40 ml Glycerin (Merck, Darmstadt) hinzugefügt. Die Lösung wird autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Anti-Bleichmittel für TUNEL-Färbung (Brandner)

Das Anti-Bleichmittel (Brandner) zeigt verbesserte Eigenschaften gegenüber Elvanol-Lösung und

erlaubt die Betrachtung TUNEL-gefärbter Schnitte im Fluoreszenzlicht über längere Zeit. Der Zusatzstoff DTT wirkt dabei als Radikalfänger. Herstellung: Man wiegt 1,92 g DTT (Dithiothreitol, Sigma, Deisenhofen) und 1 g Elvanol (Serva, Heidelberg) in 25 ml 0,5 M TRIS-Puffer (pH 8,2) ein und fügt anschließend 10 ml Glycerin (Merck, Darmstadt) hinzu. Die Mischung wird 1 Stunde bei 70°C im Wasserbad erhitzt und durchmischt, bis die Bestandteile in Lösung gegangen sind (Lagerung bei Raumtemperatur).

TESPA

TESPA (3-Aminopropyltriethoxysilan, $C_7H_{23}NO_3Si$, Sigma, Deisenhofen) dient zur Beschichtung von gereinigten Objektträgern und gewährleistet eine feste Haftung der Sphäroid-Schnitte, sodaß diese mehrfach gewaschen und gefärbt werden können.

PNIPAAm-Stammlösung (0,5%)

Das Polymer PNIPAAm (Poly-N-Isopropylacrylsäureamid) stellt den Prototyp eines thermoresponsiven Kunststoffes dar. Das Polymer ist bei 37°C wasserunlöslich (sichtbar durch weissliche Trübung der Lösung) und geht bei Unterschreitung der LCST (Lower Critical Solution Temperature, ca. 30°C) in den wasserlöslichen Zustand über (sichtbar durch Aufklaren der Lösung bis zur vollständigen Transparenz). Das Polymer ist - im Gegensatz zum Monomer - nicht zytotoxisch (Takezawa et al., 1990). Das Monomer N-Isopropylacrylsäureamid ($H_2C=CHCONHCH(CH_3)_2$) wurde von Sigma-Aldrich, Deisenhofen bezogen (Nr. 41,532-4) und freundlicherweise von Dr. R. Hanselmann, Institut für Makromolekulare Chemie, Universität Freiburg polymerisiert, gereinigt und charakterisiert (Protokoll entsprechend Takezawa et al., 1990). Die gaschromatographische Analyse des Polymerisates ergab einen hohen Reinheitsgrad mit sehr niedrigem Gehalt an Monomeren. Probeweise Bestrahlung mit UV-Licht über 24 Stunden führte zu keinem messbaren Zerfall des Polymers. Die 0,5%ige PNIPAAm-Stammlösung wurde durch einwiegen von 500 mg PNIPAAm in 100 ml Aqua bidest. bei 4°C hergestellt, anschließend steril filtriert (0,45 µm-Filter) und bei 4°C gelagert.

Kollagen-Typ-1-Stammlösung (0,5%)

Kollagen-Typ-1 wird in Kombination (1:1 Mischung) mit PNIPAAm zur Beschichtung von Zellkulturgefäßen verwendet. Das Kollagen ermöglicht den Zellen dabei überhaupt erst das Anwachsen auf der Beschichtung im hydrophoben Zustand bei 37°C. Verwendung fand säurelösliches Typ-1-Kollagen aus Kälberhaut (Sigma, Deisenhofen, C 9791). Die 0,5%ige Stammlösung wurde folgendermaßen hergestellt: 50 mg Kollagen-Typ-1 wurden in 10 ml 0,1 M

CH₃COOH (Riedel-de-Haen, Seelze; 600 mg CH₃COOH, rein in 100 ml Aqua bidest.) bei Raumtemperatur gelöst. Die Lösung wurde mit 1 ml Chloroform (Merck, Darmstadt) unterschichtet und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Dann wurde vorsichtig der Überstand abgenommen und in einem sterilen Gefäß bei 4°C aufbewahrt. Die Lösung kann nicht steril filtriert oder autoklaviert werden. Eine Sterilisation durch UV-Licht ist denkbar, wurde aber nicht durchgeführt (Gefahr der Zersetzung des Kollagens).

2.1.4 Geräte

Zählkammer

Zur Bestimmung von Zellzahlen wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Firma Brand, Wertheim/Main) verwendet. Ein Zählquadrat (bestehend aus 4 mal 4 Kleinstquadraten) hat eine Fläche von 1 mm² und damit (bei einer Zählkammer-Tiefe von 0,2 mm) ein Volumen von 0,2 mm³. Um die Zellzahl pro ml zu berechnen, muß der gefundene Wert (Mittelwert mehrerer Zählquadrate) mit dem Faktor 5000 multipliziert werden.

Zentrifugen

Verwendet wurden Zentrifugen der Firma Heraeus, Hanau zur Bestimmung von Zellzahlen (Heraeus Megafuge 1.0R, Tragringrotor 3360) und zur Voraggregation von Zellen bei der Herstellung von Sphäroiden („Eppendorf-Zentrifuge“; Heraeus Biofuge 15, Rotor 3743).

Brutschränke, Brutraum

Die Brutschränke arbeiteten mit 37°C, 5% CO₂ und wasserdampf-gesättigter Atmosphäre. Der Brutraum erzeugte ebenfalls konstant 37°C, der Raumluft wurden jedoch weder Wasserdampf noch CO₂ zugesetzt. Deshalb war es notwendig eine feuchte Kammer zur Durchführung von Zellkultur-Versuchen zu verwenden.

Rollmaschine

Die Rollmaschine ist eine Spezialanfertigung der Feinmechanischen Werkstatt (im Hause). Sie ermöglicht eine kontinuierliche, langsame Rotation von Sphäroid-Ansätzen um die horizontale Achse im Brutschrank (siehe **Abbildung 7**). Durch die kontinuierliche Bewegung wird den Zellen die Adhäsion an der Oberfläche der Eppendorf-Röhrchen erschwert und sie somit gezwungen, sich zu Zellhaufen zusammenzulagern. Der Motor der Rollmaschine wurde mit 4,2 V betrieben (Umdrehungszahl der Sphäroid-Ansätze ca. 4 rpm).

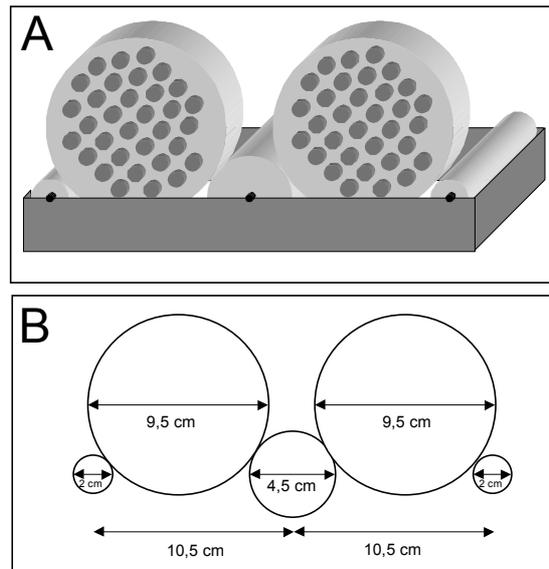


Abbildung 7: Rollmaschine

A: zeigt schematisch den Aufbau und die Wirkungsweise der Rollmaschine. Die Sphäroid-Ansätze sind in Eppendorf-Gefäßen enthalten, die durch Schaumstoff-Einsätze in den beiden großen Rollen fixiert sind. Die mittlere kleine Rolle wird durch einen Niederspannungs-Elektromotor angetrieben, sodaß die ganze Apparatur im feuchten Klima des Brutschrankes benutzt werden kann.

B: verdeutlicht die Maße der Apparatur.

Kryomikrotom

Ultradünne Gefrierschnitte wurden mit einem Cryostat MTE der Firma SLEE-Technik GmbH, Mainz hergestellt. Die Kammer-Temperatur lag zwischen -20°C und -25°C .

Mikroskope, Fluoreszenzfilter, Kameras, Filme

Für die Fluoreszenzlicht-Mikroskopie wurde ein Leitz DMRB-Mikroskop der Firma Leica, Wetzlar eingesetzt. Dabei wurden folgende Filtersätze verwendet (**Tabelle 4**):

| Nr. | Bezeichnung | Exzitation | Teiler | Sperrfilter | Eignung |
|-----|-------------|------------|--------|-------------|--|
| 1 | A | 340-380 nm | 400 nm | 425 nm | Bis-Benzimidin-Färbung, Fluospheres (blau>>rot) |
| 2 | N2.1 | 515-560 nm | 580 nm | 590 nm | Fluospheres (rot>>blau) |
| 3 | I3 | 450-490 nm | 510 nm | 515 nm | TUNEL-Färbung, (Immunfluoreszenz) |
| 4 | D | 355-425 nm | 455 nm | 470 nm | Bis-Benzimidin-Färbung, Fluospheres (blau>rot) |

Tabelle 4: Filtersätze zur Fluoreszenz-Mikroskopie und deren Einsatzbereich (Eignung)

Von den zur Verfügung stehenden Objektiven wurde die 10, 20 und 40fache Vergrößerung (ohne Ölimmersion) benutzt. Mit dem 10er Okular ergab sich also eine Gesamtvergrößerung von 100 (Übersicht), 200 (mittlere Vergrößerung) und 400 (starke Vergrößerung). Der Strahlengang kann auf eine montierte automatische Kamera der Firma Leica, Wetzlar umgeleitet und zur fotografischen Dokumentation benutzt werden. Dabei wurden Diafilme mit 1600 ASA (Fujichrome Provia Professional, RSP 135, Fuji) verwendet.

Zur Beurteilung der Monolayer-Kulturen und der Kulturen in Kunststoff-Technik wurde ein invertiertes Phasenkontrast-Mikroskop Leitz Labovert FS der Firma Leica, Wetzlar eingesetzt. Benutzt wurden Objektive mit 2,5facher, 10 und 25facher Vergrößerung mit jeweils entsprechendem Phasenkontrast-Filter. Mit dem 10er Okular ergab sich eine Gesamtvergrößerung von 25 (Übersicht), 100 (mittlere Vergrößerung) und 250 (starke Vergrößerung). Zur Dokumentation wurde die montierte automatische Kamera der Firma Leica und Diafilme mit 200 ASA (Agfa) benutzt.

2.1.5 Plastikmaterial

Zellkulturgefäße

Zur Zellkultur wurden Plastik-Zellkulturflaschen (75cm² und 175 cm²; „kleine“ bzw. „große“ Flasche), einzelne 35mm-Zellkultur-Schalen und 35mm-6-Loch-Gefäße der Firma Greiner, Frickenhausen sowie 9,8mm-48-Loch-Gefäße der Firma Costar, Corning, USA verwendet.

Zentrifugen-Gefäße

Verwendet wurden 50 ml Zentrifugen-Röhrchen der Firma Falcon (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) und 2 ml Eppendorf-Röhrchen (Firma Eppendorf, Hamburg).

Cryotubes (NUNC)

Zum Einfrieren von Zellen und fixierten Sphäroiden wurden kältestabile Einfrierröhrchen mit Schraubverschluß, bezogen von NUNC Intermed (Dänemark), verwendet.

2.1.6 Verschiedenes

Agarose-beschichtete Zellkulturgefäße

Um Sphäroide in der statischen Costar-Technik zu kultivieren, müssen die verwendeten hydrophilen 35mm-6-Loch-Zellkulturgefäße mit einer Agarose-Schicht überzogen werden, die den Sphäroiden nicht erlaubt, sich am Boden des Gefäßes anzuheften. Dazu wird die Agarose-Lösung

(1,25%) auf 70-80°C erhitzt und gleichzeitig Medium im 37°C Wasserbad erwärmt. Agarose-Lösung und Medium werden dann unter sterilen Bedingungen in einem 50 ml Falcon-Röhrchen 1:1 gemischt und in einem Wasserbad (70-80°C) weiterhin warmgestellt. Die Löcher eines 6-Loch-Gefäßes werden mit jeweils 1 ml dieser Lösung beschichtet. Die beschichteten Gefäße müssen anschließend mindestens 45 Minuten ruhig stehend abkühlen, bevor sie verwendet werden. Sie können bei 4°C auch über längere Zeit gelagert werden.

Gereinigte und beschichtete Objektträger

Um störende Partikel von den Objektträgern zu entfernen und die Haftung der Sphäroid-Schnitte zu verbessern, werden die Glas-Objektträger (Firma Langenbrinck, Emmendingen) gereinigt und beschichtet. Dazu sind mehrere Arbeitsschritte notwendig. Die zu behandelnden Objektträger werden zunächst in Glas-Halterungen fixiert, dann werden mehrere Färbewannen vorbereitet. Eine Färbewanne enthält 200 ml 0,1 M HCl (Merck, Darmstadt), eine weitere 200 ml Leitungswasser und eine dritte 200 ml Aqua dest. Die Halterung mit den Objektträgern wird für 20 Minuten in die Wanne mit HCl eingetaucht, anschließend zweimal in der Wanne mit Leitungswasser und zweimal in der Wanne mit Aqua dest. geschwenkt. Daraufhin werden die Objektträger über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag werden erneut drei Färbewannen vorbereitet. Eine Färbewanne enthält 2% TESPА in Aceton (4 ml TESPА in 200 ml Aceton), eine weitere enthält 200 ml Aceton (Firma Roth, Karlsruhe) und eine dritte 200 ml Aqua dest. Die getrockneten Objektträger werden 20 Sekunden in der 2%igen TESPА-Lösung geschwenkt, anschließend zweimal kurz in Aceton getaucht und dann zweimal kurz in Aqua dest. geschwenkt (Trocknung über Nacht).

Pipetten mit abgeschnittener Spitze

Plastik-Pipetten mit abgeschnittenen Spitzen wurden zum Transfer von Sphäroiden beim Mediumwechsel und bei der Fixierung verwendet. Dazu wurde eine Schere kurz über der Brennerflamme der sterilen Hood erhitzt und damit die Spitze der bereits aufgesetzten, sterilen Plastik-Pipettenspitze wie gewünscht abgeschnitten.

2.2 Methoden

2.2.1 Monolayer-Zellkulturtechnik

Monolayer-Kultur, Trypsinieren, Splitten

Fibroblasten wachsen in herkömmlichen Plastik-Zellkulturgefäßen als einschichtiger Zellrasen (Monolayer). Verwendet wurden Plastik-Zellkulturflaschen mit 75 cm² bzw. 175 cm² Bodenfläche („kleine“ bzw. „große“ Flasche). Die kleinen Flaschen enthielten 20 ml Medium, die großen Flaschen 40 ml. Die Zellkulturen wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C mit einem CO₂-Gehalt der wasserdampf-gesättigten Atmosphäre von 5% gehalten (bei leicht geöffnetem Schraubverschluß der Zellkulturflaschen). Die verwendeten Medien und Zusätze wurden steril gehandhabt und vor Verwendung in der Zellkultur im Wasserbad auf 37°C erwärmt und durchmischt. Zwei bis dreimal pro Woche (je nach Zellart) ist es nötig, die Zellzahl in den konfluent gewachsenen Zellkulturen zu reduzieren und gleichzeitig das Medium zu erneuern. Dieser Vorgang wird als „Splitten“ bezeichnet. Vor dem eigentlichen „Splitten“ müssen die Zellen trypsinisiert werden.

Trypsinieren: Dazu wird zunächst das alte Medium aus den Flaschen entfernt und dann der Zellrasen mit 5 ml (kleine Flasche) bzw. 10 ml (große Flasche) Trypsin zweimal gespült. Dieses Trypsin wird wieder abgenommen. Dann werden 3 ml bzw. 5 ml Trypsin hinzugefügt, verteilt und die Flaschen für ca. 2 Minuten im Brutschrank warmgestellt. Nach dieser Zeit können die Zellen durch einen „Handkantenschlag“ an die Flasche abgelöst und durch Schwenken separiert werden. Sodann wird zügig Medium hinzugefügt, um die proteolytische Wirkung des Trypsins zu unterbrechen (2 ml bei den kleinen, 5 ml bei den großen Flaschen). Gleichzeitig wird die Zellsuspension mehrfach mit der Pipette resuspendiert und „ausgespritzt“, um die Zellen weiter zu separieren.

Splitten: Von der erhaltenen Zellsuspension verbleiben 0,5 ml bzw. 1 ml in der Flasche, sodaß die Zellzahl auf 1/10 reduziert wird (1:10 splitten). Andere Verhältnisse werden entsprechend erzeugt. Anschließend wird frisches Medium (20 ml bzw. 40 ml) hinzugefügt. Die übrigen Zellen können für Versuche oder zur Weiterzucht verwendet werden.

Bestimmung und Einstellung von Zellzahlen

Um Versuchsbedingungen exakt zu definieren, ist es nötig, Zellzahlen genau bestimmen und definieren zu können (z.B. Zellzahl zum Aufbau eines Sphäroids). Zu diesem Zweck werden frisch trypsinisierte Zellen (siehe oben) in 10 bis 20 ml Medium in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen

suspendiert und für 7 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge). Sofort danach wird der Medium-Überstand vorsichtig abgenommen und das zurückbleibende „Pellet“ in Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension werden 20 µl entnommen und in die Zählkammer eingebracht. Dort werden 3-5 verschiedene Zählquadrate ausgezählt und der Mittelwert dieser Zählungen gebildet. Daraus läßt sich die Zellzahl pro ml Medium berechnen (Multiplikation mit dem Faktor 5000). Durch Multiplikation mit dem eingesetzten Medium-Volumen läßt sich die Gesamt-Zellzahl berechnen; dividiert man diesen Wert anschließend durch die *gewünschte* Zellzahl (z.B. 400.000 Zellen/ml), so erhält man direkt das hinzuzufügende Medium-Volumen. Nach Hinzufügen dieses Volumens und guter Durchmischung wird die Zellzahl zur Kontrolle erneut bestimmt und bei Bedarf korrigiert.

Einfrieren und Auftauen

Einfrieren: Die Zellen einer semikonfluent bewachsenen kleinen Flasche werden trypsiniert, in 10 ml Medium für 7 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge) und das gewonnene „Pellet“ anschließend in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Diese Suspension wird zügig in NUNC-Einfrierröhrchen verteilt, in mehrere Lagen Zellstoff eingewickelt und im -80°C-Schrank eingefroren. Nach ca. 4 Tagen können die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und dort über Monate bis Jahre gelagert werden.

Auftauen: Die gefrorene Zellsuspension im NUNC-Röhrchen wird schonend aufgetaut, in 10 ml Medium gelöst und für 7 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge) um das DMSO zu entfernen. Das „Pellet“ wird in 20 ml Medium resuspendiert und in einer kleinen Flasche weitergezüchtet.

2.2.2 Markierung von Zellen mit Fluospheres

Markierung

Die Markierung von Zellen mit phagozytierbaren Fluospheres stellt einen - im Vergleich zu anderen Markierungsmethoden - relativ einfachen und unkomplizierten Vorgang dar. Nach kräftigem Schütteln des Eppendorf-Röhrchens, das ein Aliquot der gewünschten Fluospheres enthält, entnimmt man die gewünschte Menge (z.B. 100 µl) und tropft die Fluosphere-Suspension vorsichtig in das Medium einer senkrecht stehenden Zellkulturflasche. Sofort danach wird das Medium durchmischt. Es erwies sich als günstig, die Markierung möglichst spät nach Anwachsen der Zellen durchzuführen (semikonfluente Zellkultur), da bestimmte Fluospheres (0,5 µm und 1,0 µm Durchmesser) besonders schnell sedimentieren und dann das Anwachsen der Zellen behindern. Unter dem Phasenkontrast-Mikroskop läßt sich der Phagozytose-Vorgang beobachten (weitere

Details zur Markierungstechnik siehe 3.1.3).

Kontrolle der Markierung

Zur Beurteilung des Erfolges der Markierung hat sich die Kontrolle in der Zählkammer unter dem Fluoreszenzmikroskop bewährt. Dazu wird nach dem Trypsinieren, Zentrifugieren und Resuspendieren der Zellen eine kleine Probe entnommen, in die Zählkammer eingebracht und unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet (Beispiel siehe **Abbildung 13 E, F**). Gegenüber der direkten Betrachtung der Zellkulturflasche unter einem (invertierten) Fluoreszenzmikroskop bietet die Methode mehrere Vorteile: Zum einen kann eine Schädigung der für Versuchszwecke verwendeten Zellen (durch UV-Licht) ausgeschlossen werden, zum anderen stören nicht-phagozytierte Fluospheres nicht bei der Beobachtung.

2.2.3 Sphäroidtechnik

Die Herstellung von Sphäroiden unterscheidet sich je nach „Bauplan“. Einige prinzipielle Vorgehensweisen ähneln sich jedoch stets; diese sind exemplarisch in **Abbildung 8** dargestellt.

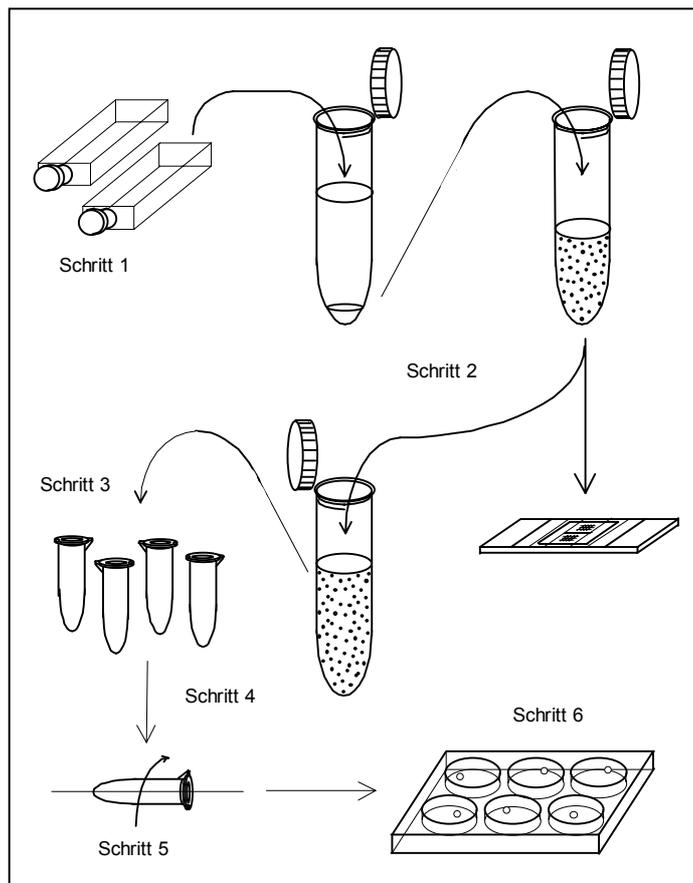


Abbildung 8: Sphäroidtechnik

Man erkennt folgende grundlegende Schritte:

1. Kultivierung (evtl. Markierung) der zu verwendenden Zellen im Monolayer; Trypsinieren
2. Einstellen der gewünschten Zellzahl (ggf. Herstellung einer Mischung)
3. Verteilung der hergestellten, definierten Zellsuspension in kleine Gefäße (Eppendorf)
4. Voraggregation (milde Zentrifugation und Ruheperiode)
5. Rollperiode: Rotation der Gefäße um die horizontale Achse
6. Sphäroidkultur (hier: "statische Costar-Kultur"), Probengewinnung und Weiterverarbeitung (ggf. Herstellung eines Mantels)

Diese Schritte können je nach gewünschter Bauart variiert und kombiniert werden. Die Grafik wurde freundlicherweise von A. Schmidtmann zur Verfügung gestellt.

2.2.3.1 Herstellung von Sphäroiden nach „Bauplan“

Reinkultur-Sphäroide ohne Mantel - Bauplan I

Dies ist der einfachste denkbare Bauplan (siehe **Abbildung 9**). Folgende Schritte werden ausgeführt:

1. Kultivierung (evtl. Markierung) der zu verwendenden Zellen im Monolayer (je nach gewünschter Sphäroid-Anzahl und Größe mehrere große Zellkultur-Flaschen; Richtwert: 10 Sphäroide mit 800.000 Zellen pro konfluenter großer Zellkultur-Flasche); bei Markierung der Zellen zweimaliges Waschen mit jeweils 20 ml Medium; Trypsinieren
2. Einstellen der gewünschten Zellzahl (zum Beispiel 800.000 Zellen/ml)
3. Verteilung der hergestellten, definierten Zellsuspension in kleine Gefäße (1 ml pro Eppendorf-Röhrchen)

4. Voraggregation (Zentrifugation 2 Minuten bei 800 rpm, Eppendorf-Zentrifuge; 4-stündige Ruheperiode im Brutschrank; Zentrifugation 2 Minuten bei 800 rpm, Eppendorf-Zentrifuge)
5. Rollperiode: Rotation um die horizontale Achse; Rollmaschine im Brutschrank; > 8 Stunden)
6. Sphäroidkultur, Probengewinnung und Weiterverarbeitung

Kokultur-Sphäroide (bzw. Reinkultur-Sphäroide mit Markierung einzelner Zellen) ohne Mantel - Bauplan II

Diese Bauart wird verwendet, um die Interaktion verschiedener Zellpopulationen im Sphäroid-System zu prüfen (siehe **Abbildung 9**). Folgende Schritte werden ausgeführt:

1. Kultivierung (evtl. Markierung) der zu verwendenden Zellen im Monolayer (je nach gewünschter Sphäroid-Anzahl und Größe mehrere große Flaschen der Zellen im Überschuss; kleine Flasche der Zellen in der Minderheit); bei Markierung der Zellen zweimaliges Waschen mit jeweils 20 ml Medium; Trypsinieren
2. Einstellen der gewünschten Zellzahlen und Herstellung der Mischung: zum Beispiel werden 10 ml der Zellen im Überschuss (780.000 Zellen/ml) mit 360 µl der Zellen in der Minderheit (555.000 Zellen/ml) gemischt. Dadurch sind in der entstehenden Mischung (ca. 10 ml) schließlich ca. $10\text{ml} \cdot 780.000 \text{ Zellen/ml} = 7.800.000$ der Zellen im Überschuss und ca. $0,360\text{ml} \cdot 555.000 \text{ Zellen/ml} = 199.800$ der Zellen in der Minderheit enthalten. Dies entspricht etwa einer Gesamt-Zellzahl von 800.000 Zellen/ml und einem Verhältnis von 40:1. Um den Fehler möglichst gering zu halten und eine homogene Verteilung zu erreichen, werden die Zellen in der Minderheit in einem kleinen Medium-Volumen aufgenommen, in die Suspension der Zellen im Überschuss eingebracht und die entstandene Suspension mehrmals durchmischt. Die Zellzahl sowie das Verhältnis werden mittels der Zählkammer unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.
3. Verteilung der hergestellten, definierten Zellsuspension in kleine Gefäße (1 ml pro Eppendorf-Röhrchen)
4. Voraggregation (Zentrifugation 2 Minuten bei 800 rpm, Eppendorf-Zentrifuge; 4-stündige Ruheperiode im Brutschrank; Zentrifugation 2 Minuten bei 800 rpm, Eppendorf-Zentrifuge)
5. Rollperiode: Rotation um die horizontale Achse; Rollmaschine im Brutschrank; > 8 Stunden)
6. Sphäroidkultur, Probengewinnung und Weiterverarbeitung

Sphäroide mit Mantel - Bauplan III

In der oben dargestellten Art und Weise hergestellte Reinkultur bzw. Kokultur-Sphäroid-„Kerne“ (Bauplan I bzw. Bauplan II) können mit einem „Mantel“ versehen werden (siehe **Abbildung 9**). Dadurch soll entweder - bei Kokultur-Sphäroiden - die allseitige Umhüllung der Zellen im „Kern“ durch Zellen im Überschuss gewährleistet werden, oder - bei Reinkultur-Sphäroiden - ein Mantel bestehend aus einer anderen Zellart (oder derselben) angebracht werden, um deren Interaktion an der Grenzfläche Mantel-Kern zu untersuchen. Dazu wird grundsätzlich ähnlich vorgegangen, wie oben beschrieben; die „Anleitungen“ unterscheiden sich bis Punkt 5 nicht. Nach der Rollperiode werden die entstandenen Sphäroide jedoch zusätzlichen Schritten unterworfen:

6. Waschen (zweimal 20 ml Medium; falls Zellen markiert) und trypsinieren der gewünschten Zellart und einstellen der gewünschten Zellzahl für den Mantel (zum Beispiel 400.000 Zellen/ml)
7. Verteilung der hergestellten, definierten Mantel-Zellsuspension in kleine Gefäße (1 ml pro Eppendorf-Röhrchen)
8. Transfer der Sphäroid-Kerne in die Eppendorf-Gefäße (mit jeweils 1 ml Mantel-Zellsuspension gefüllt) mittels abgeschnittener Pipettenspitze
9. Zweite Rollperiode: Rotation um die horizontale Achse; Rollmaschine im Brutschrank; 4 Stunden)
10. Sphäroidkultur, Probengewinnung und Weiterverarbeitung

Sphäroide mit Mantel in zeitlichem Abstand - Bauplan IV

Diese Bauart stellt eine Variation der vorher genannten Manteltechnik dar. Der Unterschied besteht darin, daß der Mantel nicht sofort nach Aufbau der „Kerne“ angebracht wird, sondern mit zeitlicher Verzögerung (siehe **Abbildung 9**). Dieser zeitliche Abstand kann genutzt werden, um den „Kern“ mit Fluospheres „nachzufärben“ und um die Entstehung einer Apoptosezone (siehe 3.5) zu provozieren. Die „Anleitungen“ gleichen sich wiederum bis Punkt 5 (Rollperiode); danach werden zusätzliche Schritte eingeführt:

6. Sphäroidkultur (z.B. über zwei Tage); „Nachfärbung“ durch Einbringen von Fluospheres in das Sphäroidkultur-Gefäß; Probengewinnung und Weiterverarbeitung
7. Waschen der „nachgefärbten“ Sphäroid-Kerne (3 ml Medium)
8. Waschen (zweimal 20 ml Medium; falls Zellen markiert) und trypsinieren der gewünschten Zellart und einstellen der gewünschten Zellzahl für den Mantel (zum Beispiel 400.000 Zellen/ml)
9. Verteilung der hergestellten, definierten Mantel-Zellsuspension in kleine Gefäße (1 ml pro

Eppendorf-Röhrchen)

10. Transfer der („nachgefärbten“) Sphäroid-Kerne in die Eppendorf-Gefäße (mit jeweils 1 ml Mantel-Zellsuspension gefüllt) mittels abgeschnittener Pipettenspitze
11. Voraggregation (Zentrifugation 2 Minuten bei 800 rpm, Eppendorf-Zentrifuge; 4-stündige Ruheperiode im Brutschrank; Zentrifugation 2 Minuten bei 800 rpm, Eppendorf-Zentrifuge)
12. Zweite Rollperiode: Rotation um die horizontale Achse; Rollmaschine im Brutschrank; >8 Stunden)
13. Sphäroidkultur, Probengewinnung und Weiterverarbeitung

Sphäroide mit Zwischenschicht und Mantel - Bauplan V

Durch die Herstellung einer „Zwischenschicht“ (siehe **Abbildung 9**) soll die Interaktionsfläche zweier verschiedener Zellsorten vergrößert werden und dabei - durch Markierung mit Fluospheres - eine Aussage über das Verhalten der Zellen an den Grenzflächen ermöglicht werden. Außerdem soll es möglich sein, die Breite der Zwischenschicht zu variieren. Bis Schritt 5 (Rollperiode) gleicht die „Anleitung“ wiederum den Vorgenannten; danach werden zusätzliche Schritte eingeführt:

6. Waschen (zweimal 20 ml Medium; falls Zellen markiert) und trypsinieren der gewünschten Zellart und einstellen der gewünschten Zellzahl für die Zwischenschicht (zum Beispiel 100.000 Zellen/ml)
7. Verteilung der hergestellten, definierten Zwischenschicht-Zellsuspension in kleine Gefäße (1 ml pro Eppendorf-Röhrchen)
8. Transfer der Sphäroid-Kerne in die Eppendorf-Gefäße (mit jeweils 1 ml Zwischenschicht-Zellsuspension gefüllt) mittels abgeschnittener Pipettenspitze
9. Zweite Rollperiode: Rotation um die horizontale Achse; Rollmaschine im Brutschrank; 1 Stunde bzw. 2 Stunden zur Herstellung unterschiedlicher Zwischenschicht-Breiten)
10. Waschen (zweimal 20 ml Medium; falls Zellen markiert) und trypsinieren der gewünschten Zellart und einstellen der gewünschten Zellzahl für den Mantel (zum Beispiel 400.000 Zellen/ml)
11. Verteilung der hergestellten, definierten Mantel-Zellsuspension in kleine Gefäße (1 ml pro Eppendorf-Röhrchen)
12. Transfer der Sphäroid-Kerne mit Zwischenschicht in die Eppendorf-Gefäße (mit jeweils 1 ml Mantel-Zellsuspension gefüllt) mittels abgeschnittener Pipettenspitze
13. Dritte Rollperiode: Rotation um die horizontale Achse; Rollmaschine im Brutschrank; 4 Stunden)
14. Sphäroidkultur, Probengewinnung und Weiterverarbeitung

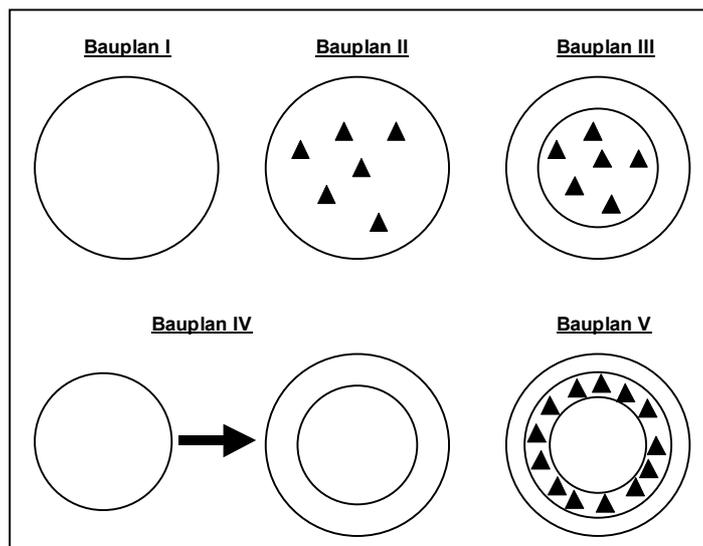


Abbildung 9: Verwendete “Baupläne” zur Sphäroidherstellung (schematisch)

Bauplan I: Das Sphäroid besteht lediglich aus *einer* Zellpopulation (Reinkultur); diese kann entweder markiert sein oder nicht.

Bauplan II: Das Sphäroid besteht aus zwei Zellpopulationen (Kokultur) in einem bestimmten Mischungsverhältnis (z.B. 1:40); hier sind beispielsweise einzelne (markierte) transformierte Zellen (dreieckige Symbole) in einem Überschuß nicht-transformierter Zellen dargestellt. Als Variation dieser Technik können einzelne Zellen *derselben* Zellpopulation markiert und verfolgt werden (Reinkultur).

Bauplan III: In Kern-Mantel-Technik hergestellte Sphäroide können *ein und dieselbe* Zellpopulation in Kern- und Mantel (Reinkultur) oder *zwei unterschiedliche* Zellpopulationen enthalten (Kokultur). Es ist auch möglich, Kern- und Mantelzellen unterschiedlich anzufärben. Dargestellt ist eine Kombination aus Bauplan I und II (Kokultur im Kern, Reinkultur im Mantel).

Bauplan IV: Als Variation von Bauplan III kann der Mantel nicht unmittelbar nach Aufbau des Kerns, sondern nach einer gewissen Zeit (z.B. nach 2 Tagen) angebracht werden. Diese Zeit kann genutzt werden, um den Kern *nachzufärben* (dargestellt ist ein Reinkultur-Sphäroid).

Bauplan V: Sphäroide mit Zwischenschicht erhalten gewissermaßen einen “doppelten Mantel”. Alle drei Schichten können unterschiedliche Zellpopulationen enthalten, die sich zur Identifizierung unterschiedlich anfärben lassen. Theoretisch sind beliebige Breiten der Zwischenschicht denkbar. Dargestellt ist eine Zwischenschicht, die (markierte) transformierte Zellen enthält (dreieckige Symbole).

2.2.3.2 Sphäroidkultur-Techniken

Nach Herstellung der Sphäroide nach „Bauplan“ müssen diese weiter kultiviert werden. Dazu wurden zwei Methoden verwendet:

Eppendorf-Rotationskultur

Das Sphäroid wird im gleichen Gefäß, in dem es entstanden ist, weiterkultiviert (Eppendorf-Röhrchen). Die Eppendorf-Röhrchen, die jeweils 1 Sphäroid in 1 ml Medium enthalten, werden dabei in kontinuierlicher, horizontaler Rotation auf der Rollmaschine (im Brutschrank) gehalten. Das Medium wird täglich gewechselt, indem das alte Medium vorsichtig abgenommen und neues Medium (1 ml) zugesetzt wird.

Statische Costar-Kultur

Das Sphäroid wird nach seiner Entstehung mittels Pipette mit abgeschnittener Spitze in ein anderes Gefäß überführt (35mm-6-Loch-Gefäß mit Agarose Beschichtung). Die 6-Loch-Gefäße, die jeweils 1 Sphäroid pro Loch in 3 ml Medium enthalten, werden stehend im Brutschrank aufbewahrt. Das Medium wird täglich gewechselt, indem das alte Medium vorsichtig abgenommen und neues Medium (3 ml) zugesetzt wird.

2.2.3.3 Probengewinnung und Weiterverarbeitung

Entnahme von Sphäroiden - Definition der Entnahmezeitpunkte

Sphäroide werden zum gewünschten Entnahme-Zeitpunkt mittels Pipette mit abgeschnittener Spitze entnommen. Der Zeitpunkt 0 Tage bezeichnet dabei den frühestmöglichen Entnahmezeitpunkt, das heißt direkt nach komplettem Aufbau der Sphäroide (je nach Bauplan). Spätere Entnahme-Zeitpunkte beziehen sich dabei auf den 0. Tag (Tag 2 bedeutet z.B., daß das Sphäroid ca. 48 Stunden nach dem Tag 0-Sphäroid entnommen wird).

Fixierung

Entnommene Sphäroide werden mittels abgeschnittener Pipettenspitze in ein neues Eppendorf-Röhrchen umgesetzt, in das 100 µl Paraformaldehyd (3%) vorgelegt werden. Dabei ist darauf zu achten, daß möglichst wenig Medium mit eingebracht wird. Dort werden die Sphäroide bei 4°C über Nacht belassen. Am nächsten Tag wird das Paraformaldehyd möglichst vollständig entfernt, und durch 100 µl Saccharose (15%) ersetzt. Dort verbleiben die Sphäroide wiederum über Nacht bei 4°C.

Einbetten

Giemsa-Lösung (1:5 mit Aqua dest. verdünnt) wird in einem separaten Eppendorf-Röhrchen vorbereitet. Von dieser Lösung werden 5 µl in jedes Eppendorf-Röhrchen mit Sphäroid in Saccharose (siehe oben) gegeben und gut durchmischt. Nach ca. 5 Minuten hat das Sphäroid die blaue Farbe angenommen. Währenddessen füllt man ca. 1-2 ml Einbettmedium (Tissue-Tek) in Einfrierröhrchen (NUNC) und wartet, bis etwaige Luftblasen entwichen sind. Gleichzeitig stellt man flüssigen Stickstoff bereit. Wenn diese Vorbereitungen getroffen sind, überführt man die Giemsa-gefärbten Sphäroide mittels abgeschnittener Pipettenspitze in das Einbettmedium im Einfrierröhrchen. Dabei achtet man darauf, daß möglichst wenig Giemsa-Lösung und Saccharose mitgeführt werden. Das Sphäroid wird in die Mitte des Einbettmediums entlassen, Luftblasen und

Farblösung abgesaugt, das Einfrierröhrchen zugeschraubt und das eingebettete Sphäroid zügig für ca. 30 Sekunden in den flüssigen Stickstoff eingetaucht. Das Einbettmedium gefriert und wird weiß. Die gefrorenen Proben können sofort verarbeitet (geschnitten) werden, können aber auch über Monate bei -20°C gelagert werden.

Schneiden

Eingebettete, gefrorene Sphäroide können mit dem Kryomikrotom ultradünn geschnitten werden. Dazu wärmt man das Einfrierröhrchen mit der Hand leicht an und entnimmt den weißen Einbettmedium-Zylinder mit einer Pinzette (leichtes Drehen). Diesen Zylinder setzt man - mit einem Tropfen Einbettmedium (Tissue Tek) - auf eine kalte Kryomikrotom-Halterung (-25°C) auf und stellt diese dann in die Kühlkammer des Gerätes, bis das Einbettmedium gefroren ist. Sodann kann man die Halterung einspannen und Schnitte anfertigen. Verwendet wird zunächst eine Schnittdicke von 25 µm, bis der maximale Durchmesser des Sphäroids sichtbar ist (blaue Giemsa-Farbe). Dann wird auf 6 µm umgestellt. Diese Schnittdicke gewährleistet, daß stets nur eine Zellage angeschnitten wird (keine Überlagerung). Die dünnen Schnitte werden auf gereinigte, beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach jedem erfolgreichen Schnitt werden mindestens 2-3 Leerschnitte durchgeführt, um die nächste Zellage anzuschneiden. Pro Objektträger werden 10-40 Schnitte aufgezogen; diese dann ca. 2-24 Stunden luftgetrocknet.

2.2.3.4 Färbemethoden

Bis-Benzimidin-Färbung

Objektträger mit getrockneten Sphäroid-Schnitten (bzw. nach der TUNEL-Färbung) werden zweimal in einer Färbewanne mit PBS geschwenkt und anschließend leicht getrocknet (stehend). Gleichzeitig wird die Bis-Benzimidin-Stammlösung 1:100 mit Methanol (Firma Roth, Karlsruhe) verdünnt und in einem lichtgeschützten Gefäß (Falcon mit Alufolie umwickelt) aufbewahrt (Handschuhe tragen). Die leicht getrockneten Objektträger werden in eine Glasschale gelegt und jeweils 1 ml der verdünnten Bis-Benzimidin-Färbelösung auf jedem Objektträger gleichmäßig verteilt. Die Glasschale wird verschlossen und lichtgeschützt für 15 Minuten stehen gelassen. Nach 15 Minuten trägt man erneut jeweils 1 ml der verdünnten Bis-Benzimidin-Färbelösung auf und läßt diese wiederum 15 Minuten einwirken (verschlossen und lichtgeschützt). Nach insgesamt 30 Minuten entnimmt man die Objektträger, schwenkt sie zweimal in einer Färbewanne mit Aqua bidest. und läßt sie trocknen (stehend). Dann legt man sie auf eine ebene Unterlage, trägt einen Tropfen McIlvaine's Lösung auf und deckelt sie mit einem Deckglas ein (Fixierung des Deckglases mit Klebefilm hat sich als günstig erwiesen). Man achtet darauf, daß keine Luftblasen unter dem

Deckglas eingeschlossen werden.

TUNEL-Färbung + Bis-Benzimidin-Färbung

Die TUNEL-Färbung muß zeitlich vor der Bis-Benzimidin-Färbung ausgeführt werden.

Objektträger mit getrockneten Sphäroid-Schnitten werden zweimal in einer Färbewanne mit PBS geschwenkt und leicht getrocknet (stehend). Anschließend werden die Objektträger mit BSA (1%) überschichtet und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert; daraufhin werden sie wiederum zweimal mit PBS gewaschen und getrocknet. In der Zwischenzeit setzt man das TUNEL-Reagenz an und trägt es dann tropfenförmig (sparsamst) auf die Sphäroid-Schnitte auf (inkl. Negativkontrolle). Die Objektträger werden für 60 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend Bis-Benzimidin-gefärbt (siehe oben). Sie werden dann jedoch nicht mit Mc Ilvaine's Lösung eingebettet, sondern mit Elvanol-Lösung bzw. dem verbesserten Anti-Bleichmittel (Brandner). Anleitung nach C. Henke.

Eingebettete Sphäroid-Schnitte können über Tage bei 4°C und über Monate bei -20°C aufbewahrt werden. Fixierung der Deckgläser mit Klebefilm verhindert ein Verrutschen der Deckgläser (Zerstörung der Schnitte).

2.2.3.5 Auswertung und fotografische Dokumentation

Apoptotische Zellen - Bis-Benzimidin-Färbung

Zellen wurden in der Bis-Benzimidin-Färbung als apoptotisch gewertet, wenn ihr Chromatin eindeutig als kondensiert und fragmentiert einzustufen war. Beispiele dazu sind in **Abbildung 10 A-C** dargestellt. Man erkennt jeweils einen oder mehrere apoptotische Zellkerne, umgeben von nicht-apoptotischen Zellkernen (siehe Pfeil und Beschriftung). War ein Zellkern nicht eindeutig zu klassifizieren, blieb er unberücksichtigt.

Zähl- und Meßtechniken

Die Auszählung apoptotischer Zellen erfolgte meist an mehreren Schnitten zweier Sphäroid-Proben des jeweiligen Zeitpunktes (Ausnahmen sind angegeben). Innerhalb des jeweiligen Schnittes wurde mäanderförmig vorgegangen, sodaß (zusätzlich zur erwähnten Durchführung von „Leerschnitten“, siehe 2.2.3.3) gewährleistet war, daß identische Zellen nicht mehrfach beurteilt wurden. Insgesamt wurden pro Meßzeitpunkt stets mindestens 200 Zellen beurteilt und anschließend der Prozentsatz apoptotischer Zellen berechnet. Markierte Zellen wurden nur beurteilt, wenn ihre Markierung (subjektiv) eindeutig war; Zweifelsfälle blieben unberücksichtigt. Beispiele dazu sind in **Abbildung 10 D-F** dargestellt. Mit Pfeil markiert sind eindeutig zuzuordnende apoptotische Kerne und ein

apoptotischer Kern, dessen Markierung keine sichere Zuordnung erlaubt. Messungen der Breite der Mantel- bzw. Apoptosezone erfolgten durch Auszählung der an einem bestimmten Radius in der jeweiligen Zone sichtbaren Zellkerne. Waren in der Apoptosezone keine Zellkerne beurteilbar (Leerräume), so wurde deren Breite im Vergleich zur jeweiligen Mantelzone abgeschätzt (Beispiel zur Meßtechnik siehe **Abbildung 31 A-B**).

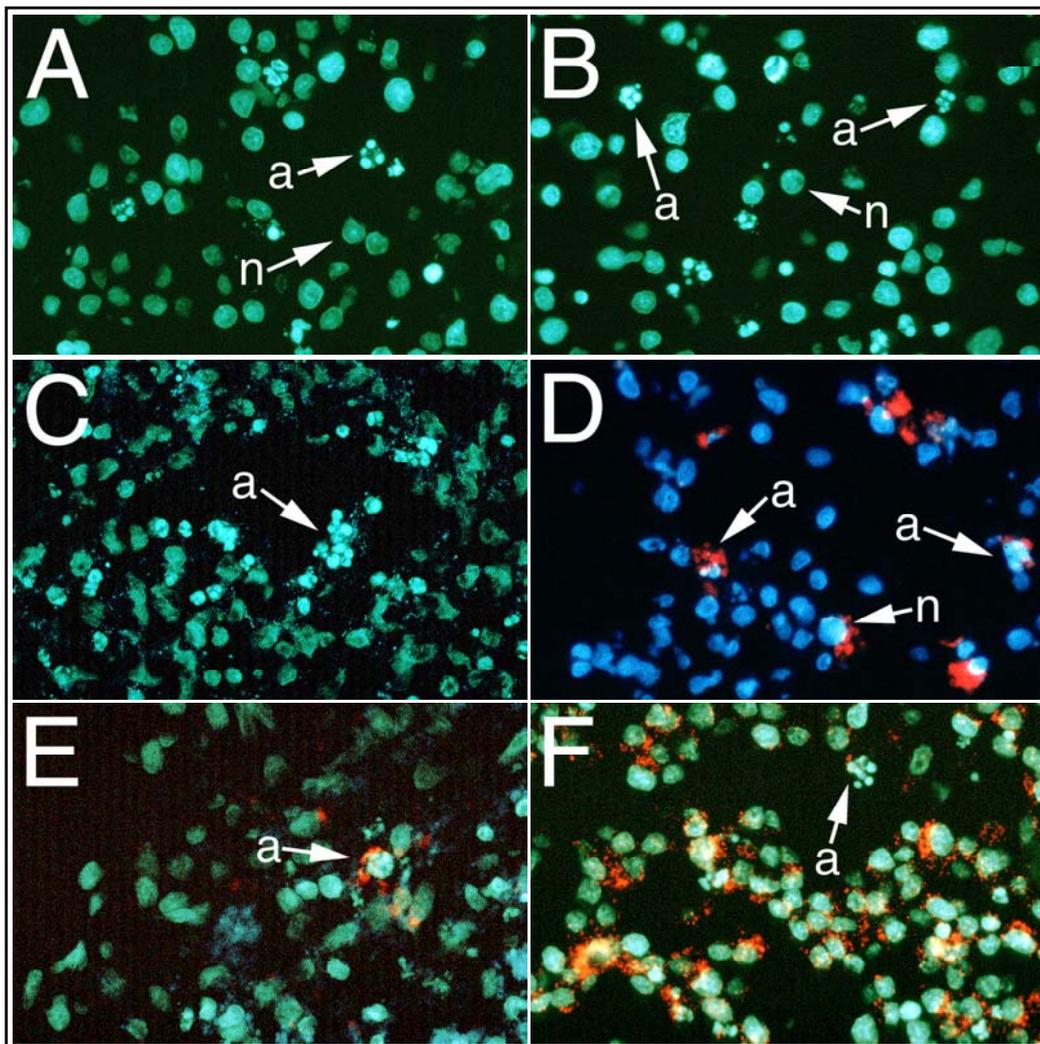


Abbildung 10: Differenzierung apoptotischer / nicht-apoptotischer Kerne und Markierung

A-C: Gezeigt wird die Differenzierung zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen Kernen in der Bis-Benzimidin-Färbung. Kerne wurden als apoptotisch klassifiziert, wenn ihr Chromatin kondensiert *und* fragmentiert erschien (Beispiele gekennzeichnet mit a=apoptotisch und n=nicht-apoptotisch).

D-E: Falls eine nach Markierung getrennte Auswertung erfolgen sollte, wurden nur solche Kerne berücksichtigt, die (subjektiv) eindeutig markiert waren (Beispiele gekennzeichnet mit Pfeil und Buchstabe a=apoptotisch und n=nicht-apoptotisch). **F:** zeigt eine apoptotische Zelle, die wegen ihrer schwachen Markierung *nicht* eindeutig als markiert zu klassifizieren ist.

(**A-F:** starke Vergrößerung, zweifache Ausschnittsvergrößerung; **A-C** und **E-F:** Filter 4; **D:** Filter 1; Alle Schnitte Bis-Benzimidin gefärbt)

Fotografische Dokumentation

Zur fotografischen Dokumentation wurden die automatischen Kameras der Mikroskope verwendet.

Die automatisch berechneten Belichtungszeiten waren meist geeignet; in einigen Fällen mußte die Belichtungszeit aber manuell eingestellt werden. Dies war dann der Fall, wenn die zu fotografierenden Objekte sehr lichtschwach waren und keine Belichtungszeit berechnet werden konnte, oder wenn einzelne, lichtstarke Zonen auf dunklem Hintergrund vorhanden waren. Im ersten Fall wurden günstige Belichtungszeiten (im Minutenbereich) durch Probieren ermittelt; im zweiten Fall wurde die halbe berechnete Belichtungszeit gewählt, um die Bilder nicht überzubelichten.

2.2.4 Kunststofftechnik

Die Kunststofftechnik wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelt. Details zur zugrundeliegenden „Idee“ und zur Problematik sind im Ergebnisteil (3.6) dargestellt. Die unten genannte Anleitung stellt das Ergebnis einer Versuchsreihe zur Optimierung der Methodik dar (**Versuch 27**).

Beschichtung der Zellkultur-Gefäße

Verwendet werden einzelne 35mm (9,6 cm²) Plastik-Zellkulturgefäße (hydrophil, Greiner). Zur Beschichtung werden jeweils 1 ml PNIPAAm-Lösung (0,5%) und 1 ml Kollagen-Typ-1-Lösung (0,5%) bei 4°C in einem spitzen Reagenzglas gemischt (entsprechend 5 mg PNIPAAm und 5 mg Kollagen-Typ-1 pro 35mm-Gefäß). Diese Polymer-Kollagen-Mischung (2 ml) wird gleichmäßig auf dem Boden des Gefäßes verteilt. Dabei achtet man darauf, daß keine Luftblasen enthalten sind. Mit einigen Tropfen verbleibender Mischung wird die LCST geprüft: Bei Erwärmung auf 37°C soll die Lösung trüb werden und bei Abkühlung unter ca. 30°C wieder aufklaren. Die beschichteten Gefäße werden 18 Stunden offen unter der sterilen Hood (20°C) getrocknet und anschließend (abgedeckt) in den Brutraum (37°C, keine feuchte Kammer) überführt. Dort werden die beschichteten Gefäße dreimal mit jeweils 3 ml Medium (37°C) gewaschen und anschließend getrocknet (2 Stunden bei 37°C, keine feuchte Kammer). Die beschichteten Gefäße können dann verwendet oder bei 4°C aufbewahrt werden.

Tropfentechnik

Die zu verwendenden Zellen werden in üblicher Art und Weise im Monolayer vermehrt (ggf. markiert), gewaschen (zweimal 20 ml Medium, falls Zellen markiert), trypsiniert und die erforderliche Zellzahl eingestellt. Bewährt haben sich Tropfen mit 7 µl Volumen. Soll der zu erzeugende Zellrasen also beispielsweise ca. 5000 Zellen enthalten, so benötigt man ca. 714.000 Zellen/ml (entsprechend ca. 5000 Zellen pro 7 µl). Nach sehr guter Durchmischung der

Zellsuspension sollte das Auftragen der Tropfen zügig erfolgen (um die Bildung kleiner Zellaggregate und Sedimentation der Zellen zu verhindern). Zum Auftragen der Tropfen verwendet man eine 10 µl Pipette (weiße Spitze); alle folgenden Schritte müssen selbstverständlich bei 37°C im Brutraum erfolgen. Man entnimmt 7 µl Zellsuspension und tropft diese (ohne den Stempel der Pipette loszulassen) auf den Boden des Gefäßes. Dabei wird die Pipettenspitze nicht aufgesetzt; man nutzt vielmehr die Adhäsionskräfte zwischen Tropfen und Boden des Gefäßes aus. Pro 35mm-Gefäß werden maximal 4 Tropfen aufgetragen. Anschließend erhalten die Zellen Zeit zum Anwachsen (2 Stunden im Brutraum bei 37°C, feuchte Kammer) und werden dann mit 2,2 ml Medium überschichtet (vorsichtig). Die Ansätze verbleiben im Brutraum (feuchte Kammer), um die Ausbildung von Zelladhäsionsmolekülen und Interzellulärsubstanz zu gestatten (z.B. für 48 Stunden).

Der Ablösevorgang

Nach erfolgter Synthese von Interzellulärsubstanz und Adhäsionsmolekülen kann versucht werden, die entstandenen kreisförmigen Zellrasen abzulösen. Dazu ist es lediglich notwendig, das Zellkulturgefäß in Umgebungstemperatur (ca. 20°C) zu überführen und abzuwarten. Nach ca. 15-30 Minuten beginnen die Zellrasen spontan, sich abzulösen. Durch leichtes „Schnipsen“ an den Rand des Gefäßes läßt sich der Vorgang beschleunigen.

Transfer der Mini-Sphäroide

Sobald die Zellrasen komplett abgelöst sind (Beobachtung unter dem invertierten Phasenkontrast-Mikroskop) kann man diese mittels Pipette mit abgeschnittener Spitze in ein anderes, hydrophobes Gefäß mit Medium (oder PBS) transferieren. Dazu saugt man die Zellrasen unter mikroskopischer Sicht vorsichtig an und entläßt sie (ohne den Stempel der Pipette loszulassen) im neuen Gefäß.

Weiterverwendung

Die weiteren Schritte wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt. Die transferierten Zellrasen sollten durch kontinuierliche Bewegung (z.B. Rütteltisch) zur Faltung angeregt (Tendenz dazu auch ohne kontinuierliche Bewegung erkennbar) und dann, nachdem sie annähernd Kugelform angenommen hätten, in eine Zellsuspension zur Sphäroid-Herstellung nach der üblichen Technik (siehe oben) eingebracht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Sphäroidtechnik

3.1.1 Erhöhung der Ausbeute an brauchbaren Sphäroiden durch Zentrifugation

In mehreren Vorversuchen stellte sich heraus, daß die Ausbeute an **brauchbaren** Sphäroiden nach der konventionellen Sphäroidtechnik (ohne 2 mal 2-minütige Zentrifugation bei 800 rpm zur Voraggregation) für Experimente in großem Maßstab (mit mehreren parallelen Ansätzen) zu gering war. „**Brauchbar**“ bedeutet in diesem Zusammenhang, daß das Sphäroid nach der ca. 8-stündigen Rollperiode kompakt (d.h. nicht fragmentiert) und mittels Pipette mit abgeschnittener Spitze transferierbar sein sollte. Fragmentierte Sphäroide sind unbrauchbar, weil die Zellzahl des jeweiligen Fragments unkontrollierbar geworden ist.

Zur Verdeutlichung dieser Problematik sei ein typischer Versuch genannt (**Versuch 1**). Es sollten gemischte Sphäroide (Kokultur, Bauplan II+III) aus 208F- und 208Fsrc3-Zellen hergestellt werden (ohne Voraggregation). Nach der ca. 8-stündigen Rollperiode zur Herstellung der Sphäroid-Kerne zeigte sich, daß 8 der 8 angesetzten Sphäroid-Kerne fragmentiert und damit zunächst unbrauchbar waren.

Angesichts dieser geringen Ausbeute wäre es bei künftigen Versuchen nötig gewesen, entweder eine enorme Zahl von Sphäroid-Ansätzen mit entsprechendem Material- und Arbeitsaufwand herzustellen, oder aber stattdessen zu versuchen, die Ausbeute an brauchbaren Sphäroiden zu steigern. Dies führte zu der Überlegung, in Zukunft die Ausbeute an brauchbaren Sphäroiden durch eine „Voraggregation“ der Zellen zu erhöhen, da die Entstehung eines dreidimensionalen Zellgebildes in der Rotationskultur vom zufallsgesteuerten Zusammentreffen frei flottierender Zellen abhängt. Probeweises Zentrifugieren der 8 fragmentierten Sphäroid-Kerne bei 800 rpm für 2 Minuten in der Eppendorf-Zentrifuge und anschließendes Ruhenlassen ergab tatsächlich 8 frei flottierende, scheibenförmige Gebilde, die zur Ummantelung weiterverwendet werden konnten.

Auf diese Beobachtung aufbauend sollte in **Versuch 2** die Voraggregation durch Zentrifugation genauer untersucht werden. Folglich wurden gemischte Sphäroide (Kokultur, Bauplan II+III) hergestellt, wobei zwei Ansätze in verschiedener Weise behandelt wurden:

A: (5 Stück) keine Zentrifugation → 4-stündige Ruheperiode → keine Zentrifugation

B: (5 Stück) 2 Minuten bei 800 rpm → 4-stündige Ruheperiode → 2 Minuten bei 800 rpm

Direkt nach den Zentrifugationsschritten (B-Ansätze) sah man mit bloßem Auge eine feine, trübe Schicht an der Wand des Eppendorf-Röhrchens, die spontan begann, sich von der Wand abzulösen

und zusammenzurollen. Nach der ca. 8-stündigen Rollperiode waren alle A-Ansätze „unbrauchbar“ (da fragmentiert); sie wurden zur histologischen Aufarbeitung aber trotzdem weiterverwendet (**Ausbeute 0%**). Von den 5 B-Ansätzen war lediglich einer unbrauchbar (**Ausbeute 80%**). Neben dem Aspekt dieser deutlich höheren Ausbeute war es interessant zu klären, ob zwischen zentrifugierten und nicht-zentrifugierten Ansätzen Unterschiede hinsichtlich Morphologie und Zellvitalität bestehen. Dazu wurden Schnittpräparate hergestellt und untersucht. **Abbildung 11** zeigt die zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, 2 und 6) entnommenen Sphäroide der zwei Ansätze (nach Ummantelung) im Vergleich. Es fällt auf, daß das A-Sphäroid an Tag 0 (**Abbildung 11 A-B**) deutlich weniger kompakt und strukturiert erscheint als sein Gegenstück aus Ansatz B (**Abbildung 11 C-D**), welches bereits den typischen dreischichtigen Aufbau (siehe 3.2) zeigt. Außerdem sind zu diesem Zeitpunkt diffus verteilte apoptotische Zellen in Ansatz A zu erkennen (**Abbildung 11 A-B**), wohingegen in Ansatz B die Ausbildung einer sogenannten Apoptosezone (siehe 3.5) auffällt (**Abbildung 11 C-D**). Die Unterschiede der beiden Ansätze relativieren sich zu späteren Zeitpunkten hin; morphologisch ist dann keine Unterscheidung mehr möglich (Tag 2 bzw. Tag 6; **Abbildung 11 E-F bzw. G-H**).

Zusammenfassung: Die zusätzliche Zentrifugation erhöht die Ausbeute an brauchbaren Sphäroiden von nahezu 0% auf 80%-100%. Am günstigsten scheint eine 2-minütige Zentrifugation bei 800 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge vor **und** nach der 4-stündigen Ruheperiode zu sein. Morphologisch unterscheiden sich die gewonnenen, zentrifugierten Sphäroide zu Anfang makroskopisch durch ihre größere Kompaktheit und Stabilität sowie mikroskopisch durch ihre bereits früh bestehende Strukturierung von den nicht-zentrifugierten Sphäroiden. Diese Unterschiede relativieren sich jedoch zu späteren Zeitpunkten hin; eine Unterscheidung ist dann morphologisch nicht mehr möglich.

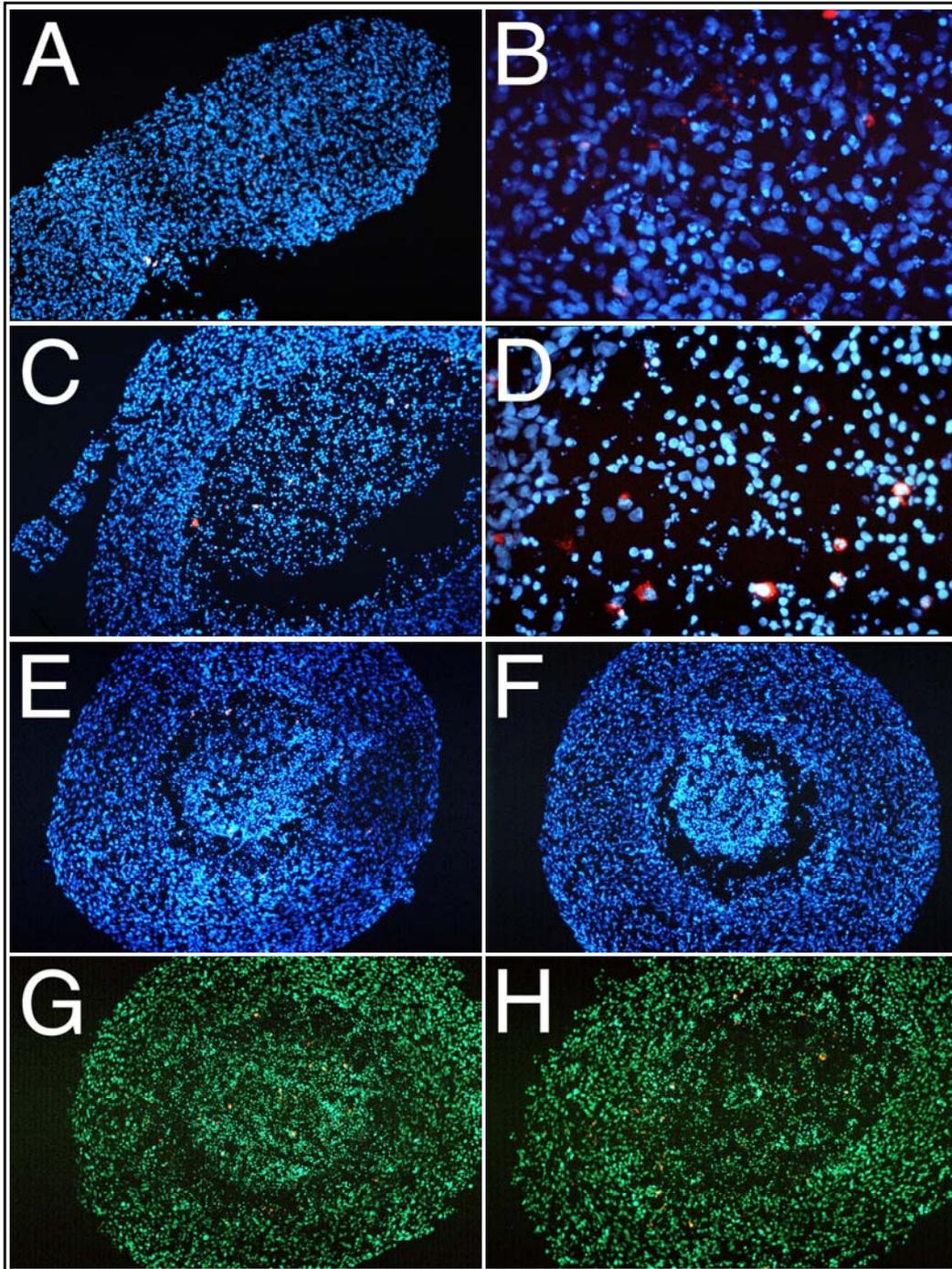


Abbildung 11: Morphologie zentrifugierter und nicht-zentrifugierter Sphäroide

Versuch 2 (V5): Gemischte Sphäroide (Kokultur, Bauplan II+III) aus 208F, Passage 10 und 208Fsrc3*, Passage 24 (*= markiert mit 100 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 20 ml Medium, 24h) im Verhältnis 40:1; Kern mit insgesamt 800.000 Zellen; Mantel mit 400.000 208F, Passage 10. Eppendorf-Rotationskultur, Bis-Benzimidin-Färbung.

A-B: Ansatz A (nicht-zentrifugiert), Tag 0; **C-D:** Ansatz B (zentrifugiert), Tag 0; **E-F:** Ansatz A/B, Tag 2; **G-H:** Ansatz A/B, Tag 6.

A: Übersicht, Filter 1; **B:** starke Vergrößerung, Filter 1; **C:** Übersicht, Filter 1; **D:** starke Vergrößerung, Filter 1; **E:** Übersicht, Filter 1; **F:** Übersicht, Filter 1; **G:** Übersicht, Filter 4; **H:** Übersicht, Filter 4.

3.1.2 Variation der initialen Sphäroidgröße durch Veränderung der Zellzahl

Durch die hier verwendete Sphäroidtechnik ist es möglich, die eingesetzte Zellzahl, und damit den initialen Sphäroiddurchmesser, reproduzierbar zu variieren und zu kontrollieren (sofern der Großteil der eingesetzten vitalen Zellen reproduzierbar in das Sphäroid eingebaut wird, siehe 3.1.2.1). Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde bei den meisten Versuchen eine Ausgangs-Zellzahl von 800.000 Zellen gewählt. Die entstehenden Sphäroide waren genügend groß, um ohne mikroskopische Hilfe gehandhabt zu werden und wiesen keine *zentrale Nekrosezone* als Zeichen von extremen Mangelbedingungen auf (auch nicht bei Erhöhung der Ausgangs-Zellzahl auf 1.200.000 Zellen; siehe 3.2). Messungen des tatsächlichen Sphäroiddurchmessers wurden - angesichts der Möglichkeit, die Ausgangs-Zellzahl mit deutlich höherer Genauigkeit zu bestimmen - nicht durchgeführt. Trotzdem lassen sich einige Aussagen machen. Die entstandenen Sphäroide hatten etwa einen geschätzten initialen Durchmesser von 0,5 mm bei einer Zellzahl von 800.000 Zellen. Höhere Zellzahlen ergaben initial deutlich größere Sphäroide (geschätzt 0,75 mm bei einer Zellzahl von 1.200.000).

Alle Sphäroide, die nicht-transformierte 208F-Zellen im Überschuß oder ausschließlich enthielten, zeigten eine deutliche Abnahme des Durchmessers innerhalb von Tagen (Durchmesser geschätzt 0,2 mm an Tag 6), wohingegen Sphäroide, die mehrheitlich transformierte 208Fsrc3 enthielten, einen konstanten Durchmesser beibehielten (geschätzt 0,5 mm an Tag 6), jedoch weniger Tendenz zeigten, sich zur Kugelform hin zu entwickeln und deutlich weniger stabil waren.

3.1.2.1 Kritische Betrachtung: eingesetzte Zellzahl und Zellzahl im Sphäroid

Die Annahme, die eingesetzte Zellzahl entspräche der (initialen) Zellzahl im Sphäroid gilt strenggenommen nur, wenn alle eingesetzten vitalen Zellen tatsächlich in das Sphäroid eingebaut werden. In der Realität muß man jedoch davon ausgehen, daß ein Teil der eingesetzten Zellen **nicht** in das Sphäroid inkorporiert wird, sondern weiterhin im Medium der Rollkultur schwimmt bzw. an der Oberfläche des Gefäßes anhaftet. Wie kann man die Größe dieser drei Fraktionen näherungsweise bestimmen?

Die Zellzahl im Sphäroid läßt sich mit einfachen Methoden nicht mit hinreichender Genauigkeit ermitteln; deshalb liegt es nahe, die verbleibende Zellzahl im Medium der Rollkultur zu bestimmen, um eine Vorstellung davon zu bekommen, wieviele Zellen tatsächlich in das Sphäroid eingebaut werden. Dies wurde in folgendem Versuch (**Versuch 3**) durchgeführt. Gleichzeitig wurde untersucht, ob eventuell Unterschiede zwischen zentrifugierten und nicht-zentrifugierten Sphäroiden hinsichtlich der verbleibenden Zellzahl im Medium bestehen. Das Ergebnis ist in **Tabelle 5** dargestellt:

| Ansatz / Zeitpunkt | direkt nach Herstellung der Kerne (Tag 0) | direkt nach Herstellung der Mäntel (Tag 0) | Tag 1 |
|---------------------|---|--|------------------|
| nicht zentrifugiert | 125.000 Zellen/ml | 100.000 Zellen/ml | 50.000 Zellen/ml |
| zentrifugiert | 25.000 Zellen/ml | 100.000 Zellen/ml | 50.000 Zellen/ml |

Tabelle 5: Zellzahl im Medium der Sphäroide zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Versuch 3 (V5): Herstellung gemischter Sphäroide (Kokultur, Bauplan II+III) aus 208F, Passage 10 und 208Fsrc3*, Passage 24 (*= markiert mit 100 µl 0,5 µm Fluospheres rot in 20 ml Medium, 24h) im Verhältnis 40:1; Kern mit insgesamt 800.000 Zellen; Mantel mit 400.000 208F, Passage 10. Die Ansätze wurden entweder zentrifugiert oder nicht. Eppendorf-Rotationskultur. Das Medium mehrerer gleichartiger Ansätze wurde gemischt und so ein Mittelwert bestimmt.

Zusammenfassung: Durch die Feststellung der Zellzahl im Medium läßt sich abschätzen, wieviele der eingesetzten Zellen tatsächlich in das Sphäroid eingebaut wurden. Ein nicht unerheblicher Teil der eingesetzten Zellen (bisweilen mehr als 10%) wird nicht in das Sphäroid aufgenommen, wobei früh nach Aufbau der Sphäroide ein Unterschied zwischen zentrifugierten und nicht-zentrifugierten Ansätzen besteht. Eventuell an der Oberfläche des Kunststoff-Gefäßes (Eppendorf) anhaftende Zellen blieben unberücksichtigt.

3.1.3 Markierung von Einzelzellen durch Fluospheres

Um transformierte Fibroblasten im Sphäroid-Schnitt verfolgen zu können, ist es nötig, diese dauerhaft zu markieren, da es andernfalls unmöglich ist, sie morphologisch von nicht-transformierten Fibroblasten zu unterscheiden (Lerch, 1997). H. Deng (unpublished) hatte zu diesem Zweck die Methode der Markierung mit phagozytierbaren Fluospheres eingeführt. Diese Methode erlaubt es, Zellen auf einfache Art und Weise anzufärben, indem ihnen im Medium der Monolayerkultur suspendierte Polystyrol-Kügelchen angeboten werden, die einen Fluoreszenzfarbstoff enthalten. Nach einer bestimmten Zeitdauer haben die Zellen genügend Fluospheres phagozytiert, um später im Sphäroid-Schnitt deutlich als markiert zu erscheinen. Diese elegante Methode mußte zur Verfolgung von *Einzelzellen* im Sphäroid-Schnitt hinsichtlich der Art der verwendeten Fluospheres, der Menge und der Markierungszeit angepaßt werden, um optimale Markierungen zu erhalten. Für die Verfolgung einzelner Zellen im Sphäroid-Schnitt erwies sich die Färbung mit ca. 100-150 µl 0,5 µm Fluospheres rot in 20 ml Medium (entsprechend ca. $1,1 \cdot 10^9$ - $1,6 \cdot 10^9$ particles/ml) für 24 Stunden als geeignet. Zur Veranschaulichung soll **Versuch 4** genannt werden. **Abbildung 12 A-B** zeigt einen in beschriebener Weise behandelten Ansatz. Man erkennt deutlich einzelne markierte, transformierte Zellen. Die Zuordnung Kern zu Zytoplasma ist problemlos möglich. Viel größere oder viel kleinere Fluosphere-Mengen ergaben entweder zu

starke Färbungen, die es erschwerten, die Kerne der Zellen zu beurteilen, oder zu schwache Färbungen, die eine Zuordnung von Einzelzellen nicht erlaubten.

Von den zur Verfügung stehenden Fluospheres waren diejenigen mit 0,5 μm (rot) und 0,1 μm (blau) am geeignetsten. Kleinere (0,1 μm , rot) waren kaum sichtbar, größere (1,0 μm , blau) machten Verwechslungen mit Kernfragmenten möglich (nicht gezeigt). Beispielfhaft soll **Versuch 5** genannt werden. Bei Verwendung des normalerweise für die Bis-Benzimidin-Färbung geeigneten Filters (1 bzw. 4) war keine Markierung zu erkennen. Bei Verwendung von Filter 2 (mit Durchlass-Maximum im Bereich der Wellenlänge der roten Fluospheres) zeigte sich jedoch, daß sehr wohl eine Markierung vorhanden war. **Abbildung 12 C-D** illustriert diese Situation. Selbst in der stärksten Vergrößerung ist die Markierung mit Filter 1 nicht zu erkennen (**Abbildung 12 C**); mit Filter 2 jedoch gut sichtbar (**Abbildung 12 D**). Auffallend sind dabei die „freien“ Fluospheres (siehe 3.1.3.1). Die roten Fluospheres waren generell besser als die Blauen zur Verfolgung von Einzelzellen geeignet, da sie mehr Kontrast zur Bis-Benzimidin-Färbung boten.

Die Färbezeit war ein relativ unkritischer Parameter. Nach 8-24 Stunden war stets eine gute Färbung gegeben; längere Färbezeiten schädeten jedoch nicht.

Zusammenfassung: Für die Verfolgung einzelner Zellen im Sphäroid-Schnitt erwies sich die Färbung mit 100-150 μl 0,5 μm Fluospheres rot in 20 ml Medium (entsprechend ca. $1,1 \cdot 10^9$ - $1,6 \cdot 10^9$ particles/ml) für 24 Stunden als geeignet.

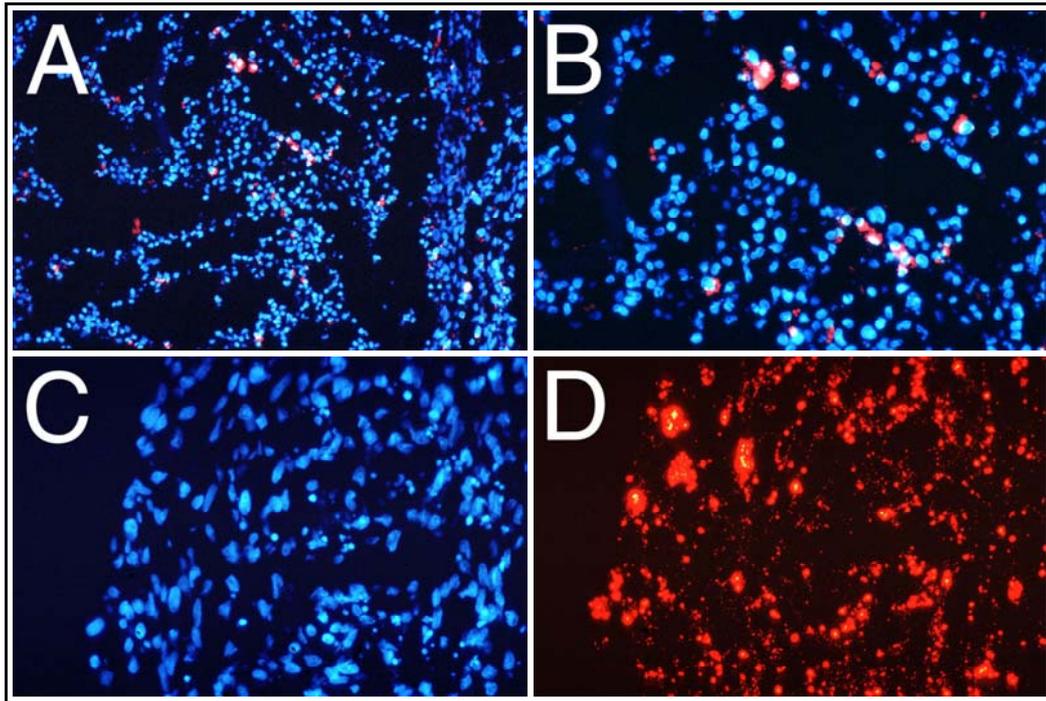


Abbildung 12: Markierung mit Fluospheres

A-B: Versuch 4 (V3): Herstellung gemischter Sphäroide (Kokultur, Bauplan II+III) aus 208F, Passage 50 und 208Fsrc3*, Passage 42 (*= markiert mit **120 µl 0,5 µm Fluospheres rot** in 20 ml Medium, 24h) im Verhältnis 20:1; Kern mit insgesamt 400.000 Zellen; Mantel mit 400.000 208F, Passage 50. Zentrifugation, Eppendorf-Rotationskultur, Bis-Benzimidin-Färbung. **A:** Tag 1, Übersicht, Filter 1; **B:** Tag 1, starke Vergrößerung, Filter 1.

C-D: Versuch 5 (V6): Herstellung gemischter Sphäroide (Kokultur, Bauplan II+III) aus 208F, Passage 12 und 208Fsrc3*, Passage 25 (*= markiert mit **100 µl 0,1 µm Fluospheres rot** in 20 ml Medium, 24h) im Verhältnis 40:1; Kern mit insgesamt 400.000 Zellen; Mantel mit 400.000 208F, Passage 12. Teilweise Zentrifugation, Eppendorf-Rotationskultur, Bis-Benzimidin-Färbung. **C:** Tag 3, starke Vergrößerung, Filter 1; **D:** Tag 3, starke Vergrößerung, Filter 2.

3.1.3.1 Das Problem der freien Fluospheres

Bei Betrachtung von Sphäroid-Schnitten mit einem Filter, der sein Durchlass-Maximum im Bereich der Wellenlänge der roten Fluospheres hat (Filter 2), erkennt man bereits an frühen Beobachtungszeitpunkten viele „freie“, d.h. scheinbar diffus verteilte Fluospheres (keiner einzelnen Zelle zuzuordnen). Dieses Phänomen tritt auch bei Sphäroiden mit Markierung *einzelner Zellen* in einem *Überschuß nicht-markierter Zellen* auf und verwundert deshalb umso mehr, als doch in dieser Situation eigentlich keine Fluospheres zwischen (oder in) den nicht-markierten Zellen zu erwarten sein sollten. Dadurch ergibt sich potentiell ein Problem hinsichtlich der Eindeutigkeit der Markierung. Zur Verdeutlichung dieses Sachverhaltes soll **Versuch 6** dargestellt werden. **Abbildung 13 A-D** zeigt jeweils denselben Ausschnitt eines Sphäroids mit unterschiedlichen Filtern aufgenommen. Man erkennt mit Filter 1 deutlich einzelne markierte, transformierte Zellen; „freie“ Fluospheres sind mit diesem Filter kaum wahrnehmbar (**Abbildung 13 A, C**). Bei Verwendung von Filter 2 erkennt man viele einzelne, scheinbar unsystematisch verteilte Fluospheres **zwischen** den

markierten, transformierten Zellen (**Abbildung 13 B, D**).

Um die Frage zu klären, ob es sich bei den beschriebenen „freien“ Fluospheres um solche handelt, die bei der Färbung nicht phagozytiert wurden, sondern noch im Medium vorhanden waren oder an der Oberfläche der Zellen lose adhärirten, wurden Zellgemische direkt vor Aufbau der Sphäroide in eine Zählkammer eingebracht, und diese unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (**Versuch 7**). **Abbildung 13 E-F** zeigt solchermaßen behandelte Zellen in der Zählkammer (Fluoreszenzmikroskopie). Man sieht, daß Fluospheres streng zellgebunden sind. In der starken Vergrößerung sind intrazellulär einzelne Fluospheres erkennbar, wohingegen im umgebenden Medium keine „freien“ einzelnen Fluospheres erkennbar sind (**Abbildung 13 F**).

Zusammenfassung: In der Sphäroid-Kultur sind schon an frühen Beobachtungs-Zeitpunkten mit spezifischen Filtern „freie“, einzeln liegende Fluospheres zu erkennen, die bei Verwendung anderer Filter optisch „verschwinden“. Beobachtet man markierte Zellen in der Zählkammer im Fluoreszenzlicht, so fällt auf, daß die Fluoreszenz streng intrazellulär auftritt. Einzelne „freie“ Fluospheres sind nicht zu erkennen, obwohl die verwendete Vergrößerung das Erkennen einzelner Fluospheres prinzipiell ermöglicht.

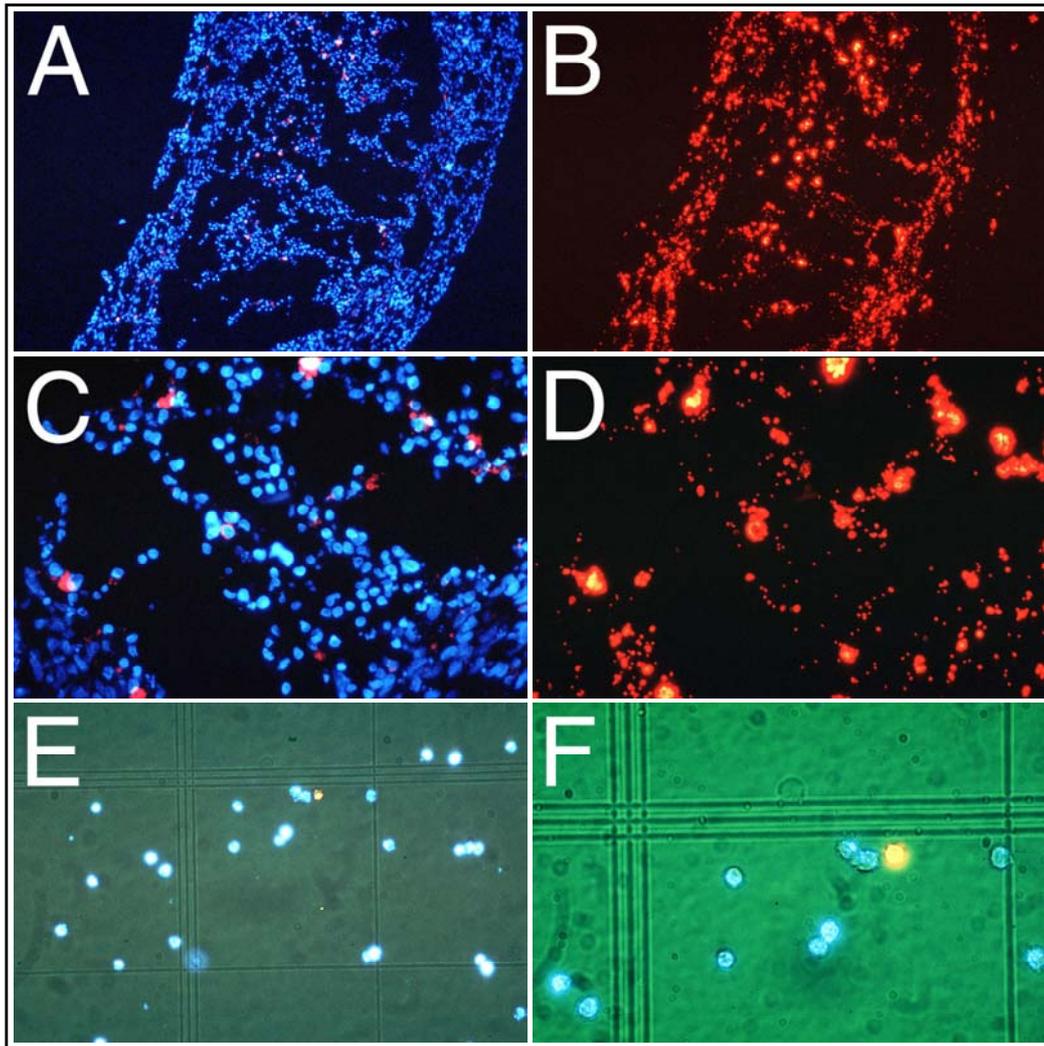


Abbildung 13: Das Problem der “freien Fluospheres”

A-D: Versuch 6 (V3): Herstellung gemischter Sphäroide (Kokultur, Bauplan II+III) aus 208F, Passage 50 und 208Fsrc3*, Passage 42 (*= markiert mit 120 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 20 ml Medium, 24h) im Verhältnis 20:1; Kern mit insgesamt 400.000 Zellen; Mantel mit 400.000 208F, Passage 50. Zentrifugation, Eppendorf-Rotationskultur, Bis-Benzimidin-Färbung. **A:** Tag 1, Übersicht, Filter 1; **B:** Tag 1, Übersicht, Filter 2; **C:** Tag 1, starke Vergrößerung, Filter 1; **D:** Tag 1, starke Vergrößerung, Filter 2.

E-F: Versuch 7 (V12): Herstellung einer Zellsuspension aus 208F*, Passage 21 (*= markiert mit 2*50 μ l 0,1 μ m Fluospheres blau in 40 ml Medium, 72h) und 208Fsrc3*, Passage 14 (*= markiert mit 150 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 40 ml Medium, 8h); Verhältnis 40:1; 800.000 Zellen/ml Medium. Die Zellsuspension wurde frisch angesetzt, gemischt, und eine Probe in die Zählkammer eingebracht. **E:** mittlere Vergrößerung, Filter 1; **F:** starke Vergrößerung, Filter 4.

3.2 Morphologie des Sphäroids im Schnittpräparat - dreischichtiger Aufbau

Die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen scheint in avaskulären Tumor- und Gewebemodellen einen entscheidenden Einflußfaktor darzustellen, da für viele Stoffe (besonders Sauerstoff, Glucose und z.B. Chemotherapeutika) ein radialer Diffusionsgradient mit kritischen Werten im Zentrum von Sphäroiden nachgewiesen werden konnte (Carlsson et al., 1988; Acker et al., 1987).

Kritische Sauerstoff- und Nährstoffkonzentrationen gehen in vielen Sphäroidmodellen mit dem Entstehen einer *zentral gelegenen Nekrosezone* einher, wobei deren Auftreten und Ausmaß vom Sphäroiddurchmesser (Diffusionsstrecke) und damit indirekt von der Zellzahl abzuhängen scheint (Freyer, 1988b). Abweichend davon fand sich im 208F/208Fsrc3-System ein anderer morphologischer Aufbau, der anhand eines typischen Experimentes erläutert werden soll (**Versuch 8**). Bei diesem Experiment wurde eine **höhere Gesamt-Zellzahl** (1.200.000 Zellen) eingesetzt, um unter diesen „erschweren Bedingungen“ zu prüfen, ob sich eine zentrale Nekrosezone ausbilden würde. Sphäroide wurden u.a. an Tag 6 entnommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet; **Abbildung 14** zeigt ein solches typisches Sphäroid. Man erkennt einen dreischichtigen, konzentrischen Aufbau (von außen nach innen):

1. In der sog. **Mantelzone** findet man relativ große, ovale Kerne, die in der Bis-Benzimidin-Färbung mäßig stark fluoreszieren und einen deutlichen Nucleolus erkennen lassen. Die Zelllagen zeigen ein „epithelartiges“ Aussehen (**Abbildung 14, m-Markierung**).
2. Weiter zum Zentrum hin schließt sich die sog. **Apoptosezone** mit kondensierten, fragmentierten Kernen, Zelltrümmern sowie zahlreichen Leerräumen an (**Abbildung 14, a-Markierung**). Weitere Details zur Apoptosezone werden in 3.5 dargestellt.
3. Im Zentrum schließlich (**Innenzone**) findet man relativ kleine, rundliche und dicht gepackte Zellkerne, die in der Bis-Benzimidin-Färbung kondensiert erscheinen, jedoch (im Vergleich zur Apoptosezone) wenig fragmentiert sind (**Abbildung 14, i-Markierung**). In keinem der ausgewerteten Ansätze zeigte sich eine *zentrale Nekrosezone* (charakterisiert durch Kernschwellung und Zelltrümmer).

Zusammenfassung: Sphäroide des 208F/208Fsrc3-Systems zeigen einen typischen dreischichtigen, konzentrischen Aufbau. Von außen nach innen lassen sich Mantelzone (große ovale Kerne, mäßige Fluoreszenz, deutlicher Nucleolus, epithelartig), Apoptosezone (kondensierte, fragmentierte Kerne, Zelltrümmer, Hohlräume) und Innenzone (kleine, rundliche, dicht gepackte und kondensierte Kerne, wenig Fragmentierung) deutlich unterscheiden. Die verwendeten Gesamt-Zellzahlen von 800.000 bzw. 1.200.000 Zellen führen in diesem Sphäroidmodell nicht zur Entstehung einer zentralen Nekrosezone (Kernschwellung, Zelltrümmer).

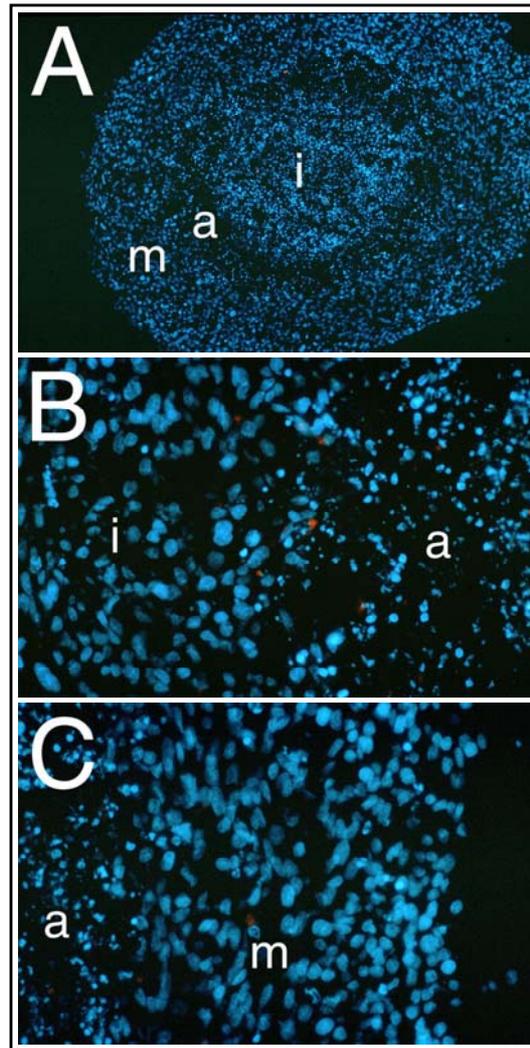


Abbildung 14: Morphologischer Aufbau der Sphäroide im 208F/208Fsrc3-System

Versuch 8 (V5): Herstellung gemischter Sphäroide (Kokultur, Bauplan II+III) aus 208F, Passage 10 und 208Fsrc3*, Passage 24 (*= markiert mit 100 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 20 ml Medium, 24h) im Verhältnis 40:1; Kern mit insgesamt 800.000 Zellen; Mantel mit 400.000 208F, Passage 10. Die Ansätze wurden entweder zentrifugiert oder nicht. Eppendorf-Rotationskultur, Bis-Benzimidin-Färbung.

Dargestellt sind Übersichts- und starke Vergrößerungen desselben Sphäroids (Tag 6). Die typischen konzentrischen Zonen sind durch Kleinbuchstaben markiert (**m**=Mantelzone, **a**=Apoptosezone, **i**=Innenzone). **A:** Übersicht, Filter 1; **B:** starke Vergrößerung, Filter 1; **C:** starke Vergrößerung, Filter 1.

3.3 Proliferationskontrolle im Sphäroid

Die Kontrolle der Proliferation transformierter Zellen durch nicht-transformierte Zellen in der Monolayerkultur ist ein seit langem bekannter Vorgang (Berwald and Sachs, 1963; Stoker et al., 1966; Bignami et al., 1988). Will man überprüfen, ob eine solche Proliferationskontrolle auch im Sphäroidsystem stattfindet, muß man eine Möglichkeit finden, Proliferation nach Zellart getrennt zu quantifizieren. Im Gegensatz zum Monolayersystem ist es ohne technische „Tricks“ im Sphäroidsystem jedoch nicht möglich, transformierte Zellen von nicht-transformierten Zellen zu unterscheiden (siehe 3.1.3). Durch die Markierung mit phagozytierbaren Fluospheres ließ sich

dieses Problem lösen. Gleichzeitig stellen die inkorporierten Fluospheres unter Umständen eine Möglichkeit dar, Proliferation zu messen. Teilt sich eine Zelle, kann man annehmen, daß die aufgenommenen Fluospheres mehr oder weniger gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben werden. Dadurch müßten aus einer einzeln vorliegenden stark markierten Zelle zwei schwächer markierte Tochterzellen hervorgehen, bis die Markierung irgendwann (nach weiteren Zellteilungen) so schwach würde, daß sie nicht mehr sichtbar wäre (C. Schermer, unpublished). Die Gültigkeit dieser Annahme sollte am vorliegenden System geprüft werden. Es zeigte sich, daß - gemäß dem komplizierten dreidimensionalen Aufbau der Sphäroide (siehe 3.2) - eine differenzierte Betrachtung nötig ist.

3.3.1 Transformierte und nicht-transformierte Fibroblasten in der Mantelzone

Im folgenden Versuch (**Versuch 9**) wurde das Verhalten einzelner transformierter 208Fsrc3*-Zellen im Überschuß von nicht-transformierten 208F-Zellen in der **Mantelzone** getestet. Die markierten, transformierten Zellen fanden sich in der Mantelzone, obwohl der Sphäroidmantel - nach Bauplan - eigentlich nur aus nicht-transformierten 208F-Zellen bestand. Die Ursache dieses Phänomens bleibt zu diskutieren. Sphäroide wurden an Tag 0, 2 und 6 entnommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. **Abbildung 15** zeigt die gewonnenen Schnittpräparate in Übersichtsvergrößerung mit zwei unterschiedlichen Filtern. Filter 2 stellt ausschließlich die roten Fluospheres da, während Filter 1 die Kerne in Bis-Benzimidin-Färbung *sowie* die roten Fluospheres darstellt. Es fällt auf, daß im Laufe der Zeit in der Mantelzone die lokalisierte, einzelnen transformierten Zellen zuzuordnende rote Fluoreszenz zugunsten diffus verteilter roter Fluoreszenz abnimmt (**Abbildung 15 B, D, F**). Außerdem erkennt man an späteren Zeitpunkten zunehmend eine Anhäufung roter Fluoreszenz an der Grenze zwischen Mantel- und Apoptosezone (**Abbildung 15 F**).

Zusammenfassung: In der Mantelzone, bestehend aus einzelnen rot markierten, transformierten 208Fsrc3*-Zellen und unmarkierten, nicht-transformierten 208F-Zellen im Überschuß, zeigt sich mit zunehmender Dauer der Sphäroidkultur eine Abnahme roter, einzelnen Zellen zuzuordnender Fluoreszenz zugunsten diffus verteilter roter Fluoreszenz.

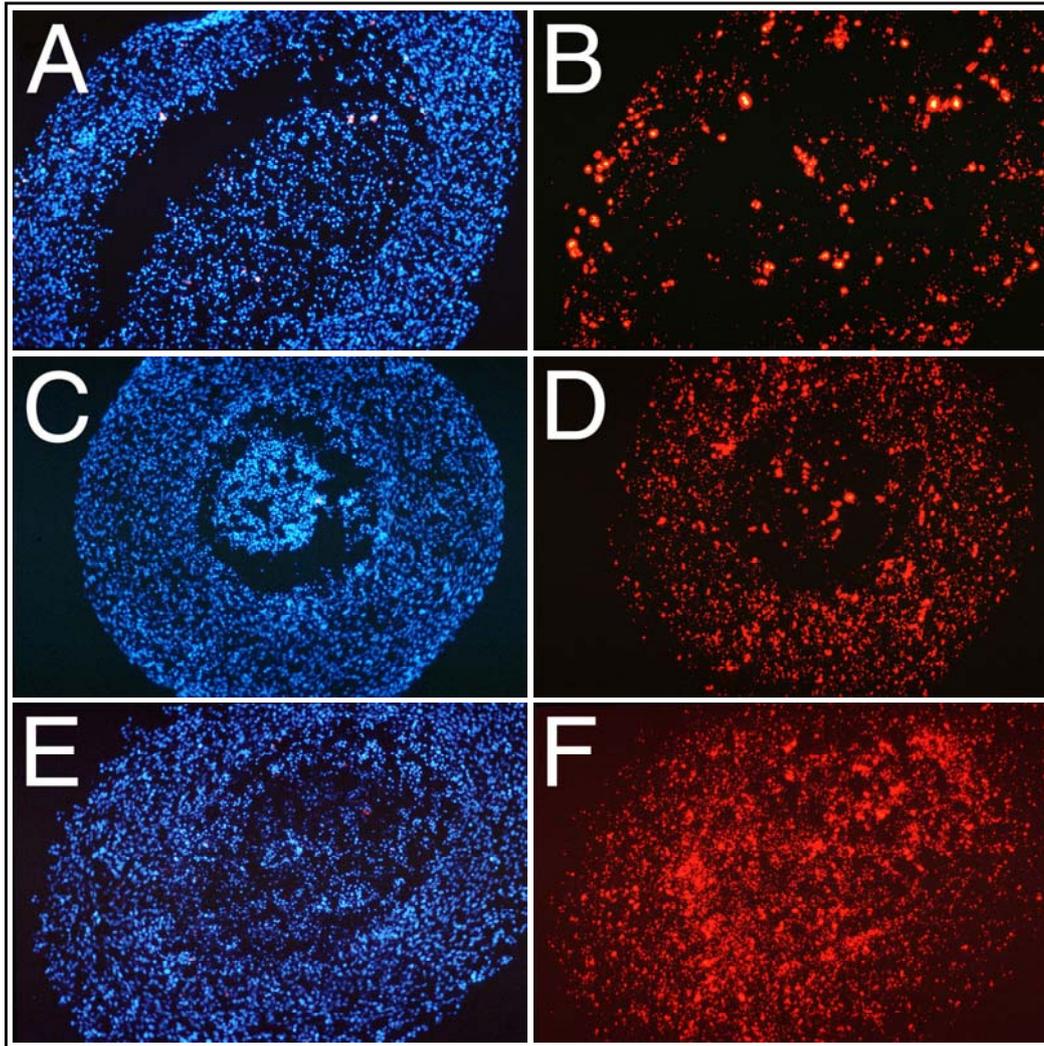


Abbildung 15: Proliferationsverhalten transformierter Fibroblasten in der Mantelzone

Versuch 9 (V5): Herstellung gemischter Sphäroide (Kokultur, Bauplan II+III) aus 208F, P10 und 208Fsrc3*, P24 (*= 100 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 20 ml Medium, 24h) im Verhältnis 40:1; Kern mit insgesamt 800.000 Zellen; Mantel mit 400.000 208F, P10. Die Ansätze wurden entweder zentrifugiert oder nicht. Eppendorf-Rotationskultur, Bis-Benzimidin-Färbung. Nebeneinander dargestellt sind stets Ausschnitte desselben Sphäroids, jedoch mit unterschiedlichen Fluoreszenzfiltern aufgenommen. **A:** Tag 0, Übersicht, Filter 1; **B:** Tag 0, Übersicht, Filter 2; **C:** Tag 2, Übersicht, Filter 1; **D:** Tag 2, Übersicht, Filter 2; **E:** Tag 6, Übersicht, Filter 1; **F:** Tag 6, Übersicht, Filter 2.

3.3.2 Transformierte und nicht-transformierte Fibroblasten in der Innenzone

Transformierte Fibroblasten in der **Innenzone** wurden ebenfalls beobachtet. Um einen möglichen proliferationshemmenden Einfluß nicht-transformierter 208F-Zellen von einer generellen Proliferationshemmung in der Innenzone (z.B durch Nährstoffmangel) zu unterscheiden, wurden folgende zwei Versuche durchgeführt: im ersten Versuch (**Versuch 10**) waren markierte 208Fsrc3*-Zellen von nicht-markierten 208F-Zellen umgeben (Kokultur), im zweiten Versuch (**Versuch 11**) von nicht-markierten 208Fsrc3-Zellen (Reinkultur). Falls eine mögliche Proliferationshemmung auf der Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen beruhen sollte, wäre zu erwarten

gewesen, daß diese in **Versuch 11** nicht wirksam sein würde. **Abbildung 16** stellt Ansätze der beiden Versuche dar (**Abbildung 16 A-B: Versuch 10; Abbildung 16 C-D: Versuch 11**), die sehr früh (Tag 0) sowie spät (Tag 4 bzw. 6) entnommen wurden. An frühen (**Abbildung 16 A, C**) und späten (**Abbildung 16 B, D**) Beobachtungs-Zeitpunkten **beider** Versuche erkennt man einzelne, rot markierte, transformierte 208Fsrc3*-Zellen zwischen unmarkierten Zellen. Die Intensität der Markierung hat an Tag 4 bzw. 6 nicht wesentlich abgenommen; insbesondere erkennt man keine Gruppen schwächer markierter Zellen, sondern weiterhin Einzelzellen, die auch etwa im gleichen Zahlen-Verhältnis zu nicht-transformierten Zellen wie an Tag 0 vorliegen. Daraus läßt sich ableiten, daß die beobachtete Proliferationshemmung (konstante Markierung, keine Zellgruppen) **nicht** auf ein Zusammenwirken transformierter und nicht-transformierter Zellen zurückzuführen ist.

Zusammenfassung: Einzel vorliegende, rot markierte, transformierte 208Fsrc3*-Zellen behalten in der Innenzone im Verlauf der Sphäroidkultur ihre starke Markierung, unabhängig davon, ob sie von nicht-transformierten (208F) oder transformierten (208Fsrc3) Zellen umgeben sind. Insbesondere findet man auch zu späteren Beobachtungszeitpunkten keine Gruppen schwächer markierter Zellen, sondern stets Einzelzellen. Das eingesetzte Zahlen-Verhältnis markierter Zellen zu nicht-markierten Zellen bleibt in der Innenzone erhalten. Daraus läßt sich ableiten, daß eine Proliferationshemmung transformierter Zellen stattfindet, die **nicht** auf der Interaktion mit nicht-transformierten Zellen beruht.

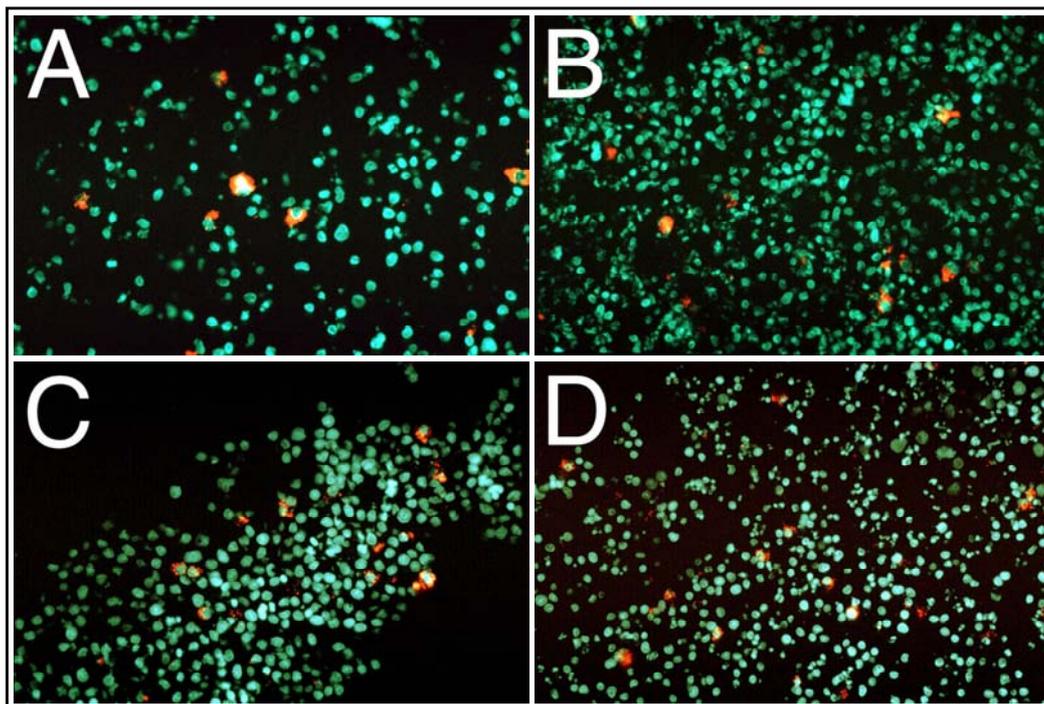


Abbildung 16: Proliferationsverhalten transformierter Zellen in der Innenzone

A-B: Versuch 10 (V5): Herstellung gemischter Sphäroide (Kokultur, Bauplan II+III) aus 208F, Passage 10 und 208Fsrc3*, Passage 24 (*= markiert mit 100 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 20 ml Medium, 24h) im Verhältnis 40:1; Kern mit insgesamt 800.000 Zellen; Mantel mit 400.000 208F, Passage 10. Die Ansätze wurden entweder zentrifugiert oder nicht. Eppendorf-Rotationskultur, Bis-Benzimidin-Färbung. **A:** Tag 0, starke Vergrößerung, Filter 4; **B:** Tag 6, starke Vergrößerung, Filter 4.

C-D: Versuch 11 (V11): Herstellung von Reinkultur-Sphäroiden mit Markierung einzelner Zellen (Bauplan II) aus 208Fsrc3, Passage 10 und 208Fsrc3*, Passage 10 (*= markiert mit 100 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 20 ml Medium, 24h) im Verhältnis 40:1; Sphäroid mit insgesamt 800.000 Zellen, kein Mantel, Zentrifugation nach Schema, statische Costar-Kultur, Bis-Benzimidin-Färbung. **C:** Tag 0, starke Vergrößerung, Filter 4; **D:** Tag 4, starke Vergrößerung, Filter 4.

3.3.3 Bemerkung zur Apoptosezone

Innerhalb der Apoptosezone ist es nicht möglich, Aussagen zum Proliferationsverhalten zu treffen, da hier einerseits die Markierung der Zellen verlorengeht und andererseits fast ausschließlich apoptotische Zellen vorliegen.

3.4 Interzelluläre Induktion der Apoptose im Sphäroidsystem

Zusätzlich zu der seit langem bekannten Proliferationskontrolle transformierter Fibroblasten durch umliegende, nicht-transformierte Fibroblasten *in vitro* wurde in unserer Arbeitsgruppe ein weiteres, sehr effizientes System zur Kontrolle transformierter Zellen (*in vitro*) entdeckt. Das System der interzellulären Induktion der Apoptose beschreibt die spezifische Elimination transformierter Fibroblasten durch nicht-transformierte Nachbarzellen mittels Induktion der Apoptose (siehe 1.3).

Zentrale Frage dieser Studie war, zu klären, ob einzelne transformierte 208Fsrc3-Fibroblasten und größere Gruppen derselben Zelllinie im Sphäroidsystem spezifisch eliminiert werden können, wie in der Monolayerkultur (unter Zugabe von exogenem TGF- β) beobachtet. Dabei wurde vermutet, daß die Elimination möglicherweise sogar mit höherer Effizienz (durch engen Zellkontakt) und ohne Zugabe von exogenem TGF- β (wegen geringerer Verdünnung des von transformierten Fibroblasten produzierten Wachstumsfaktors im Medium-Überstand) stattfinden könnte. Diese Vermutungen sollten durch geeignete Versuchsansätze überprüft werden. Zunächst sollte also das Verhalten einzelner transformierter 208Fsrc3*-Zellen in einem Überschuß nicht-transformierter Zellen überprüft werden (Kokultur, Bauplan II), um dann Schrittweise zu größeren Gruppen transformierter Zellen überzugehen und deren Verhalten zu untersuchen.

3.4.1 Verhalten einzelner transformierter Fibroblasten in der Innenzone

Nicht-transformierte, blau markierte 208F*-Fibroblasten wurden mit transformierten, rot markierten 208Fsrc3*-Fibroblasten im Verhältnis 40:1 im Sphäroid-System in Kontakt gebracht und das Verhalten transformierter und nicht-transformierter Zellen getrennt in der Innenzone im zeitlichen Verlauf verfolgt (**Versuch 12**). Die Innenzone wurde gewählt, da ausschließlich hier zu späteren Zeitpunkten eine Zuordnung zu den zwei Zellpopulationen (durch die farbige Markierung) möglich war. Parallel wurde in diesem Versuch die Eignung einer neuen Sphäroid-Kulturtechnik geprüft („statische Costar-Kultur“), die eine bessere Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sicherstellen sollte; Details dazu in 3.4.1.1.

Sphäroide wurden an Tag 0-6 täglich entnommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. **Abbildung 17** soll den Versuchsaufbau verdeutlichen und die erhobenen Befunde illustrieren (repräsentative Bilder). Dargestellt sind Übersichts- und starke Vergrößerung (zweifache Ausschnittsvergrößerung) der Beobachtungszeitpunkte 0 und 6 Tage. Man sieht in der starken Vergrößerung zu beiden Zeitpunkten einzelne rot markierte, transformierte Zellen mit geringer Zahl apoptotischer Kerne. Daneben sieht man in der Überzahl blau markierte, nicht-transformierte Zellen mit ebenfalls geringer Zahl apoptotischer Kerne (**Abbildung 17 B, D**). In der Übersicht fällt die

Bildung einer Apoptosezone auf (**Abbildung 17 A, C**).

An jedem Beobachtungstag wurden die Ansätze nach Zellart getrennt ausgewertet und so der jeweilige Prozentsatz apoptotischer Zellen ermittelt. **Abbildung 18** stellt das Ergebnis dieser Auswertung graphisch dar. Es zeigt sich, daß kein kontinuierlicher Anstieg des Prozentsatzes apoptotischer, transformierter Zellen im Vergleich zu apoptotischen, nicht-transformierten Zellen im Beobachtungszeitraum festzustellen ist. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen bewegt sich im gesamten Beobachtungszeitraum für beide Zellarten zwischen ca. 10% und 25%, wobei derjenige apoptotischer, nicht-transformierter Zellen sogar meist leicht über dem apoptotischer, transformierter Zellen liegt. An Tag 1 und 2 sieht man einen leichten Anstieg des Prozentsatzes apoptotischer, nicht-transformierter Zellen.

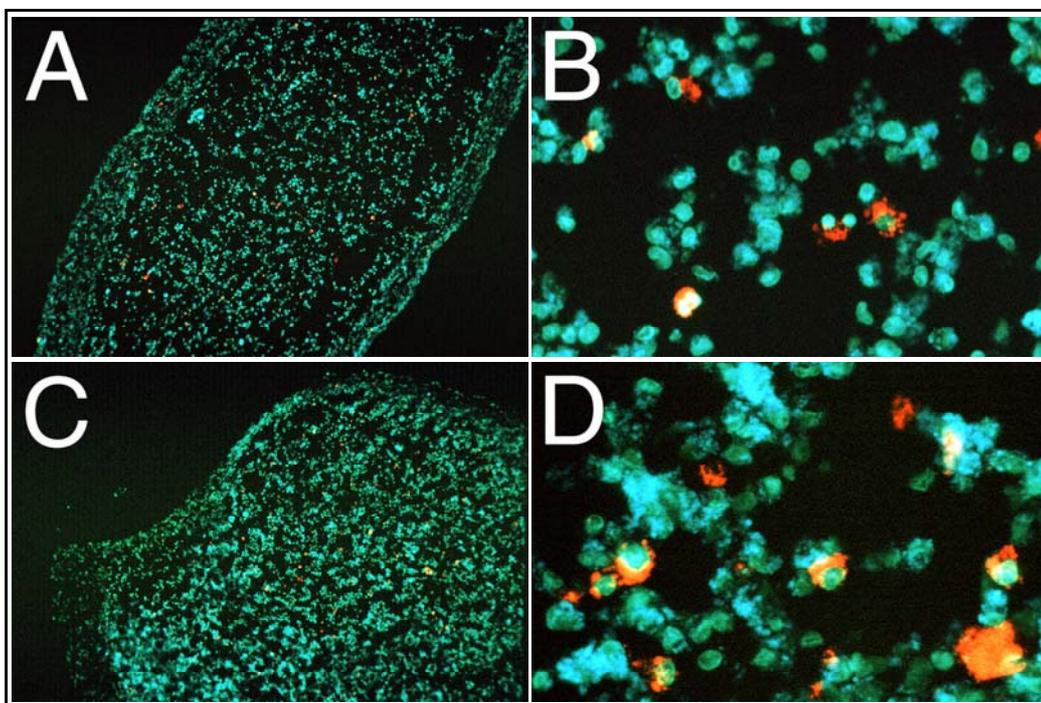


Abbildung 17: Interzelluläre Induktion der Apoptose: Verhalten von Einzelzellen in der Innenzone

Versuch 12 (V8): Herstellung gemischter Sphäroide (Kokultur, Bauplan II) aus 208F*, Passage 16 (*= markiert mit 150 μ l 0,1 μ m Fluospheres blau in 40 ml Medium, 96h) und 208Fsrc3*, Passage 29 (*= markiert mit 100 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 20 ml Medium, 48h) im Verhältnis 40:1; insgesamt 800.000 Zellen, kein Mantel, Zentrifugation nach Schema, Eppendorf-Rotationskultur und statische Costar-Kultur, Bis-Benzimidin-Färbung. **A:** Tag 1, Costar-Kultur, Übersicht, Filter 4; **B:** Tag 1, Costar-Kultur, starke Vergrößerung, zweifache Ausschnittsvergrößerung, Filter 4; **C:** Tag 6, Costar-Kultur, Übersicht, Filter 4; **D:** Tag 6, Costar-Kultur, starke Vergrößerung, zweifache Ausschnittsvergrößerung, Filter 4.

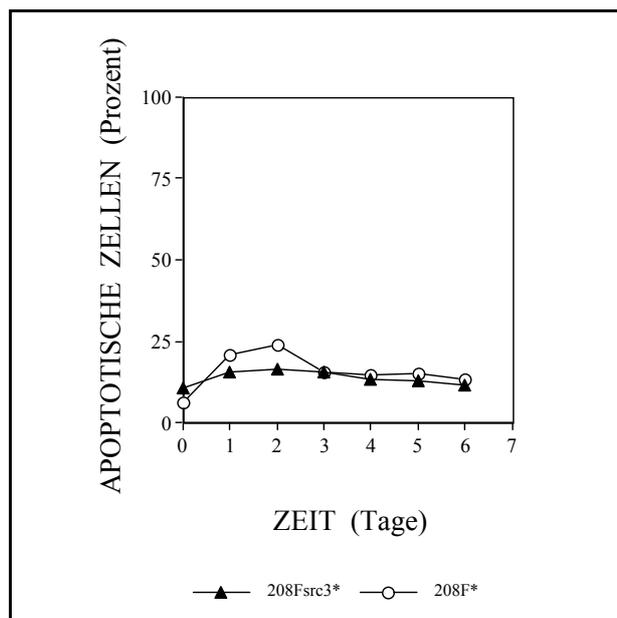


Abbildung 18: Interzelluläre Induktion der Apoptose: Verhalten von Einzelzellen in der Innenzone

An jedem Meßzeitpunkt wurden an 4 unterschiedlichen Sphäroiden (2 Eppendorf-Rotationskultur, 2 statische Costar-Kultur) insgesamt pro Meßpunkt zwischen 400-1000 Zellen ausgewertet. Die Zählung erfolgte an unterschiedlichen Schnittebenen des jeweiligen Sphäroids. Durch die Wahl der Schnitt- und Zähltechnik war sichergestellt, daß identische Zellen nicht mehrfach ausgezählt wurden. Auf der X-Achse sind die Entnahmetage (0 bis 6) aufgetragen, auf der Y-Achse der zugeordnete Prozentsatz (0 bis 100%) apoptotischer Zellen in der Bis-Benzimidin-Färbung. Ausgefüllte Dreiecke symbolisieren transformierte 208Fsrc3*-Zellen, nicht-ausgefüllte Kreise symbolisieren nicht-transformierte 208F*-Zellen.

Zusammenfassung: Unter den dargestellten Bedingungen ist eine selektive Elimination einzelner transformierter 208Fsrc3*-Fibroblasten durch nicht-transformierte 208F*-Fibroblasten bis Tag 6 in der Innenzone des Sphäroids nicht zu beobachten. Beide Zellarten zeigen einen Prozentsatz apoptotischer Zellen zwischen 10% bis 25%, wobei die nicht-transformierten 208F*-Fibroblasten meist einen etwas höheren Prozentsatz apoptotischer Kerne zeigen, mit einem leichten Anstieg an Tag 1 und 2.

3.4.1.1 Umstellung der Sphäroidtechnik

In dem oben dargestellten Versuch (**Versuch 12**) sollte parallel die Eignung einer anderen Sphäroid-Kulturtechnik (Costar-Kultur: offenes, Agarose-beschichtetes Gefäß mit 3 ml Medium pro Sphäroid, täglicher Mediumwechsel, stehend im Brutschrank) geprüft werden, die eine bessere Sauerstoff- und Nährstoffversorgung als die bisherige Eppendorf-Rotationskultur (abgeschlossenes Gefäß, 1 ml Medium pro Sphäroid, täglicher Mediumwechsel, kontinuierliche Rotation) gewährleisten sollte. Speziell sollte untersucht werden, ob sich dadurch Vorteile hinsichtlich der *Zellvitalität* erreichen lassen. Andererseits sollte geprüft werden, ob die ausbleibende Apoptose-Induktion bei einzeln vorliegenden transformierten Zellen (siehe 3.4.1) eventuell durch

Mangelbedingungen *verursacht* und durch Verbesserung der Lebensbedingungen eventuell zu beeinflussen sein könnte.

Zunächst wurden die gewonnenen Sphäroid-Schnitte morphologisch untersucht. **Abbildung 19** zeigt einen Vergleich zweier Sphäroide (Tag 4) in statischer Costar-Kultur (**Abbildung 19 A**) und Eppendorf-Rotationskultur (**Abbildung 19 B**). Man sieht morphologisch kaum einen Unterschied zwischen Sphäroiden, die mit den verschiedenen Techniken kultiviert wurden. In beiden Sphäroid-Schnitten fällt der typische dreischichtige Aufbau mit Ausbildung einer Apoptosezone auf; diese enthält zwar in **Abbildung 19 A** mehr Leerräume; dieser Unterschied war jedoch nicht spezifisch für eine der verwendeten Sphäroidkultur-Techniken und stellt damit vermutlich einen Schnitt-Artefakt dar. Um diese doch recht grobe Beobachtung zu quantifizieren, wurden Zählungen apoptotischer Zellen nach Sphäroid-Kulturtechnik und Zellart getrennt durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in **Abbildung 20** graphisch dargestellt. Es zeigt sich, daß kein kontinuierlicher Anstieg des Prozentsatzes apoptotischer, transformierter Zellen im Vergleich zu apoptotischen, nicht-transformierten Zellen im Beobachtungszeitraum festzustellen ist, unabhängig von der verwendeten Kulturtechnik. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen bewegt sich im gesamten Beobachtungszeitraum für beide Zellarten und beide Sphäroid-Kulturtechniken zwischen ca. 10% und 25%, wobei derjenige apoptotischer, nicht-transformierter Zellen sogar meist leicht über dem apoptotischer, transformierter Zellen liegt. An Tag 1 sieht man einen leichten Anstieg des Prozentsatzes apoptotischer Zellen in der Eppendorf-Rotationskultur, an Tag 2 entsprechend in der statischen Costar-Kultur; die Unterschiede relativieren sich jedoch zu späteren Beobachtungszeitpunkten hin.

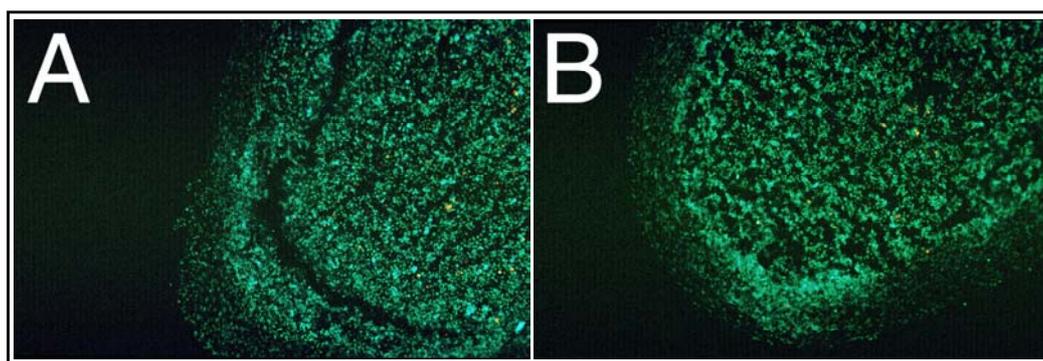


Abbildung 19: Costar-Kultur und Eppendorf-Rotationskultur

Versuch 12 (V8): Versuchsbeschreibung siehe Legende zu Abbildung 17. **A:** Tag 4, Costar-Kultur, Übersicht, Filter 4; **B:** Tag 4, Eppendorf-Rotationskultur, Übersicht, Filter 4.

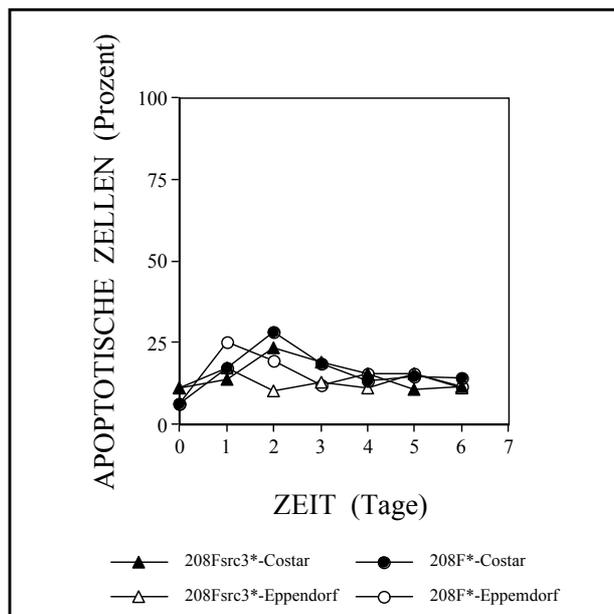


Abbildung 20: Costar-Kultur und Eppendorf-Rotationskultur (Innenzone)

Pro Meßzeitpunkt wurden 4 unterschiedliche Sphäroide (2 Eppendorf-Rotationskultur, 2 statische Costar-Kultur), insgesamt pro Meßpunkt zwischen 200-600 Zellen, ausgewertet. Auf der X-Achse sind die Entnahmetage (0 bis 6) aufgetragen, auf der Y-Achse der zugeordnete Prozentsatz (0 bis 100%) apoptotischer Zellen in der Bis-Benzimidin-Färbung. Ausgefüllte Dreiecke symbolisieren transformierte 208Fsrc3*-Zellen (statische Costar-Kultur), ausgefüllte Kreise nicht-transformierte 208F*-Zellen (statische Costar-Kultur), nicht-ausgefüllte Dreiecke transformierte 208Fsrc3*-Zellen (Eppendorf-Rotationskultur) und nicht-ausgefüllte Kreise symbolisieren nicht-transformierte 208F*-Zellen (Eppendorf-Rotationskultur).

Zusammenfassung: Die beiden Sphäroid-Kulturtechniken (Eppendorf-Rotationskultur und statische Costar-Kultur) ergeben auf Einzelzellebene in der Innenzone keinen Unterschied im Prozentsatz apoptotischer Zellen (zwischen 10% und 25%); unter den dargestellten Bedingungen ist eine selektive Elimination einzelner transformierter 208Fsrc3*-Fibroblasten durch nicht-transformierte 208F*-Fibroblasten bis Tag 6 in der Innenzone des Sphäroids nicht zu beobachten. Morphologisch ist kein Unterschied zwischen Sphäroiden, die mit den zwei Techniken kultiviert wurden, festzustellen. Eine genaue Messung (z.B. der Mantelzone oder der Apoptosezone) wurde jedoch nicht durchgeführt.

3.4.2 Vergrößerung der Kontaktfläche - Zwischenschicht-Versuch

Aufbauend auf der Untersuchung des Verhaltens einzelner transformierter 208Fsrc3*-Zellen gegenüber einem Überschuß nicht-transformierter 208F-Zellen sollte das Verhalten größerer Gruppen transformierter 208Fsrc3-Zellen im gleichen System untersucht werden, zumal sich abzeichnete, daß im Monolayer-System die Zahl und die Dichte der transformierten Zielzellen für die Elimination von entscheidender Bedeutung sei (M. Herdener, unpublished).

Da es aus methodischen Gründen zunächst schwierig erschien, markierte Zellpopulationen definierter Größe in ein Sphäroid einzubringen, wurde ein anderer Weg beschritten, um die Kontakt- und damit Interaktionsfläche zwischen transformierten und nicht-transformierten Zellen zu vergrößern. Die Idee bestand darin, zunächst einen Kern aus markierten, nicht-transformierten Zellen herzustellen, diesen dann mit einer Schicht (variabler Breite) markierter, transformierter Zellen zu umgeben, und schließlich einen weiteren „Mantel“ markierter, nicht-transformierter Zellen anzubringen, um sicherzustellen, daß die transformierten Zellen von beiden Seiten von nicht-transformierten Zellen umgeben sind (siehe **Abbildung 9 V** sowie 2.2.3.1). Bei Gelingen dieses (komplizierten) Aufbaus sollten dann gezielt die Grenzflächen zwischen transformierten und nicht-transformierten Zellen untersucht werden (**Versuch 13**). Zusätzlich sollte in diesem Versuch die Auswirkung der TGF- β -Vorbehandlung der nicht-transformierten Zellen in einem Parallelansatz untersucht werden (siehe 3.4.2.1); dieser bleibt zunächst unberücksichtigt. Sphäroide wurden u.a. an Tag 0 und 5 entnommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. **Abbildung 21 A-B** zeigt Tag 0-Ansätze (ohne TGF- β -Vorbehandlung). Es fällt auf, daß eine etwa einschichtige Lage aus rot fluoreszierenden, transformierten 208Fsrc3*-Fibroblasten den blau markierten Kern aus 208F* umgibt, jedoch kein „Mantel“ aus blau markierten 208F* zu sehen ist (wie es ursprünglich beabsichtigt war). **Abbildung 21 C-D** zeigt Tag 5-Ansätze (ohne TGF- β -Vorbehandlung). Die an Tag 0 vorhandene dünne Schicht roter Fluoreszenz hat an Breite zugenommen, parallel zur hier sichtbaren Verbreiterung der Mantelzone. Die rote Fluoreszenz erscheint diffus verteilt und kann kaum mehr einzelnen Zellen zugeordnet werden. **Abbildung 21 E-F** schließlich zeigt Tag 5-Ansätze (ohne TGF- β -Vorbehandlung). Man erkennt den typischen dreischichtigen Aufbau, bestehend aus Mantelzone, Apoptosezone und Innenzone. In der Apoptosezone ist eine Zuordnung der Zellart (transformiert oder nicht-transformiert) durch Verlust der Markierung nicht mehr möglich, ebenso zum Großteil in der Mantelzone. Aufgrund der Unmöglichkeit, apoptotische Zellen nach Zellpopulation differenziert auszuwerten, wurde auf eine quantitative Erfassung verzichtet.

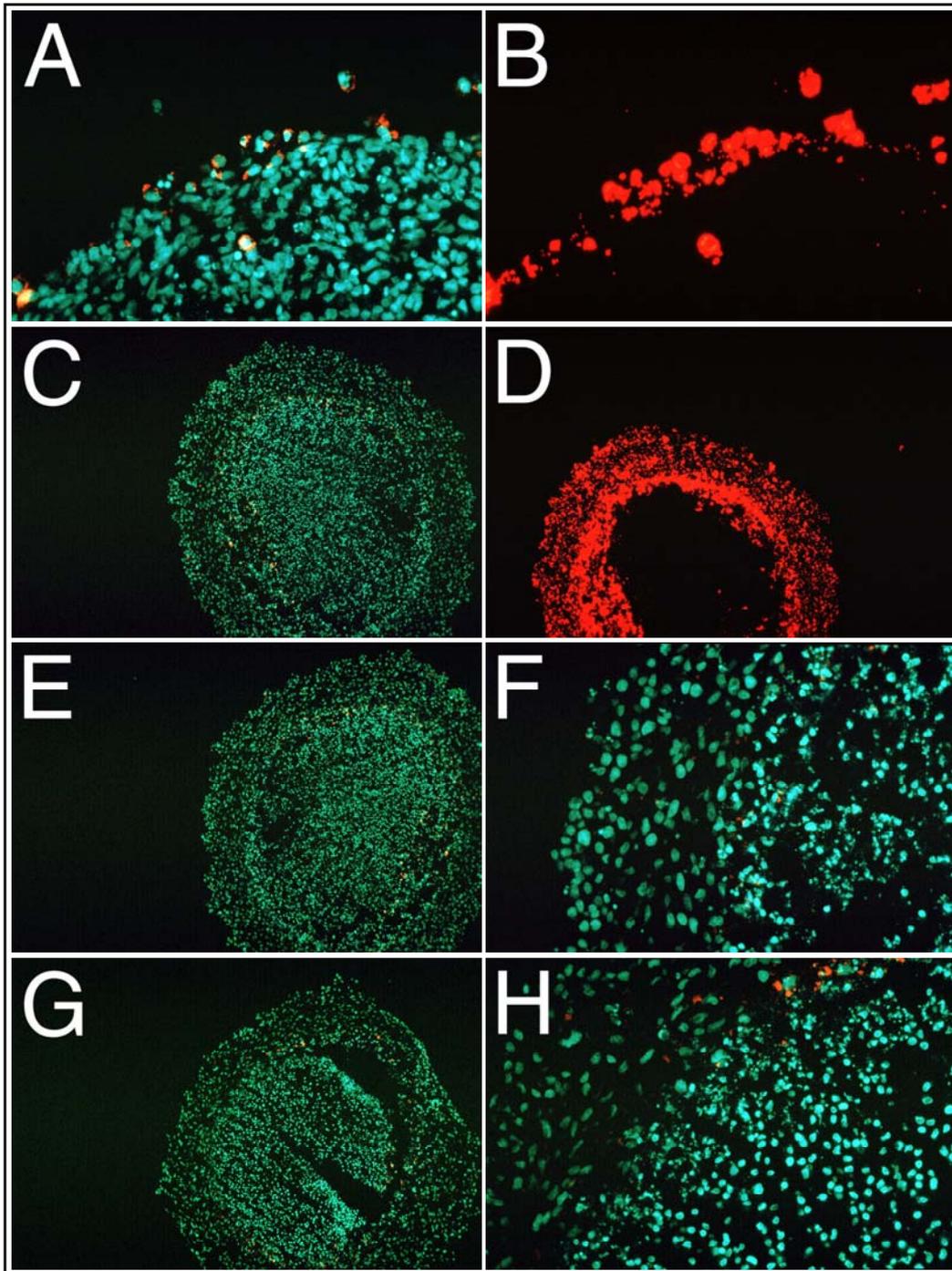


Abbildung 21: Zwischenschicht-Versuch und TGF- β -Vorbehandlung der 208F*-Zellen

Versuch 13 (V10): Bauplan V: **Kern** aus 400.000 208F*, P14 (*= 50 μ l 0,1 μ m Fluospheres blau in 40 ml Medium, 48h), +/- TGF- β -Vorbehandlung (20 ng/ml, 24h). **Zwischenschicht** aus 208Fsrc3*, P40 (*= 150 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 20 ml Medium, 48h); Zellsuspension mit 100.000 Zellen/ml; 2. Rollperiode 1h/2h. **Mantel** aus 400.000 208F*, P14 (*= 50 μ l 0,1 μ m Fluospheres blau in 40 ml Medium, 72h), +/- TGF- β -Vorbehandlung (20 ng/ml, 48h). Zentrifugation, statische Costar-Kultur, Bis-Benzimidin-Färbung. **A-F:** kein TGF- β ; **G-H:** +TGF- β . **A:** Tag 0, starke Vergrößerung, Filter 4; **B:** Tag 0, starke Vergrößerung, Filter 2; **C:** Tag 5, Übersicht, Filter 4; **D:** Tag 5, Übersicht, Filter 2; **E:** Tag 5, Übersicht, Filter 4; **F:** Tag 5, starke Vergrößerung, Filter 4; **G:** Tag 5, Übersicht, Filter 4; **H:** Tag 5, starke Vergrößerung, Filter 4.

Zusammenfassung: Die Herstellung von Sphäroiden mit Zwischenschicht gestaltete sich schwierig. Zwei unterschiedliche Zwischenschicht-Breiten konnten mit den 2 unterschiedlichen Rollperioden von 1h und 2h bei einer Zellsuspension mit 100.000 Zellen/ml nicht hergestellt werden (kein Unterschied, Daten nicht gezeigt). Ein Mantel konnte ebenfalls nicht hergestellt werden; nach der üblichen 4-stündigen Rollperiode zur Herstellung des Mantels fanden sich keine anhaftenden Zellen. Aussagen bezüglich der Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen gestalteten sich ebenfalls problematisch. Zwar ist eine zirkuläre Apoptosezone nachweisbar, jedoch erlaubt diese keine Aussage über die Spezifität der Induktion der Apoptose (da keine eindeutige Markierung mehr erkennbar ist). Wiederholt zeigte sich aber die diffuse Verteilung roter Fluoreszenz, die zunächst eindeutig den transformierten 208Fsrc3*-Zellen zuzuordnen war, parallel zur hier sichtbaren Zunahme der Breite der Mantelzone.

3.4.2.1 Vorbehandlung der nicht-transformierten Fibroblasten mit TGF- β

Im geschilderten Zwischenschicht-Versuch (**Versuch 13**) sollte in einem Parallelansatz die etwaige Wirkung einer TGF- β -Vorbehandlung der nicht-transformierten Zellen geprüft werden (in der Annahme, daß durch diese Vorbehandlung die Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen ähnlich wie in der Monolayer-Kultur verstärkt werden könnte). Zu diesem Zweck wurden in diesem Parallelansatz die nicht-transformierten 208F*-Zellen im Kern mit 20 ng/ml TGF- β für 24h vorbehandelt und die (- wie sich herausstellen sollte - nicht anhaftenden) 208F*-Mantelzellen mit 20 ng/ml TGF- β für 48h vorbehandelt. **Abbildung 21 G-H** zeigt Tag 5-Ansätze (mit TGF- β -Vorbehandlung). Man erkennt wiederum den typischen dreischichtigen Aufbau, bestehend aus Mantelzone, Apoptosezone und Innenzone. In der Apoptosezone ist eine Zuordnung der Zellart (transformiert oder nicht-transformiert) durch Verlust der Markierung nicht mehr möglich, ebenso zum Großteil in der Mantelzone. Verglichen mit **Abbildung 21 E-F** erkennt man keinen grundlegenden Unterschied. Aufgrund der Unmöglichkeit, apoptotische Zellen differenziert auszuwerten, wurde auf eine quantitative Erfassung verzichtet.

Zusammenfassung: Im gezeigten Versuch war es nicht möglich, etwaige Wirkungen der TGF- β -Vorbehandlung nicht-transformierter Zellen auf die interzelluläre Induktion der Apoptose im Sphäroidsystem zu prüfen. Morphologisch zeigten sich keine Unterschiede zwischen den TGF- β -vorbehandelten und nicht-vorbehandelten Sphäroiden. Messungen z.B. der Mantelzone oder der Apoptosezone wurden jedoch nicht vorgenommen.

3.4.3 Ein glücklicher Zufall - Verhalten größerer Gruppen transformierter Fibroblasten in der Innenzone

Wie bereits dargestellt, erschien es aus methodischen Gründen zunächst schwierig, größere Gruppen markierter, transformierter Zellen in ein Sphäroid einzubringen und zu beobachten. Hierbei kam jedoch der Zufall zu Hilfe. Bei einem Versuch zur Untersuchung der Apoptosezone (siehe 3.5.3) entstanden durch zufällige Faltung der hergestellten Kern-Mantel-Ansätze Sphäroide, die tatsächlich größere, zusammenhängende Gruppen markierter, transformierter Zellen in der Innenzone enthielten. Dieser Umstand ermöglichte es, quantitative Aussagen über das Verhalten größerer Gruppen transformierter Zellen in der Innenzone in Gegenwart nicht-transformierter Zellen zu machen, wobei jedoch berücksichtigt werden muß, daß die Größe dieser Zellpopulationen durch deren zufallsgesteuertes Entstehen nicht genau definiert war (**Versuch 14**). Sphäroide wurden an Tag 0, 2, 4 und 6 entnommen, unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und solche Sphäroide der beiden Ansätze (siehe Legende zu **Abbildung 22**) selektiert, die (durch zufällige Faltung) größere Gruppen rot fluoreszierender, transformierter Zellen in der Innenzone enthielten (entgegen „Bauplan“). Zur Veranschaulichung sind typische Exemplare (Tag 4 und 6) in **Abbildung 22** dargestellt. Man erkennt in der starken Vergrößerung zu beiden Zeitpunkten Areale rot markierter, transformierter Zellen mit geringer Zahl apoptotischer Kerne. Daneben sieht man Areale blau markierter, nicht-transformierter Zellen mit etwas höherer Zahl apoptotischer Kerne. Insbesondere fällt auf, daß selbst transformierte Zellen, die in direktem Kontakt zu nicht-transformierten Zellen stehen, keine ausgeprägteren apoptotischen Veränderungen zeigen, als weiter entfernt gelegene transformierte Zellen. In **Abbildung 22 D** (und in der Übersichtsvergrößerung, nicht dargestellt) fällt die Bildung einer Apoptosezone auf. Um quantitative Aussagen machen zu können, wurden die Ansätze nach Zellart getrennt ausgewertet. Dies geschah an Arealen (Innenzone), wo rot fluoreszierende, transformierte Zellen und blau fluoreszierende, nicht-transformierte Zellen direkt aneinandergrenzten. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in **Abbildung 23** dargestellt. Es zeigt sich, daß kein kontinuierlicher Anstieg des Prozentsatzes apoptotischer, transformierter Zellen im Vergleich zu apoptotischen, nicht-transformierten Zellen im Beobachtungszeitraum festzustellen ist. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen bewegt sich im gesamten Beobachtungszeitraum für die transformierten Zellen zwischen ca. 5% und max. 30% und für die nicht-transformierten Zellen zwischen ca. 10% und max 50%. Der Prozentsatz apoptotischer, transformierter Zellen ist an jedem Meßpunkt deutlich niedriger als derjenige apoptotischer, nicht-transformierter Zellen. Beide Zellarten zeigen einen Anstieg des Prozentsatzes apoptotischer Zellen an Tag 2 und 4.

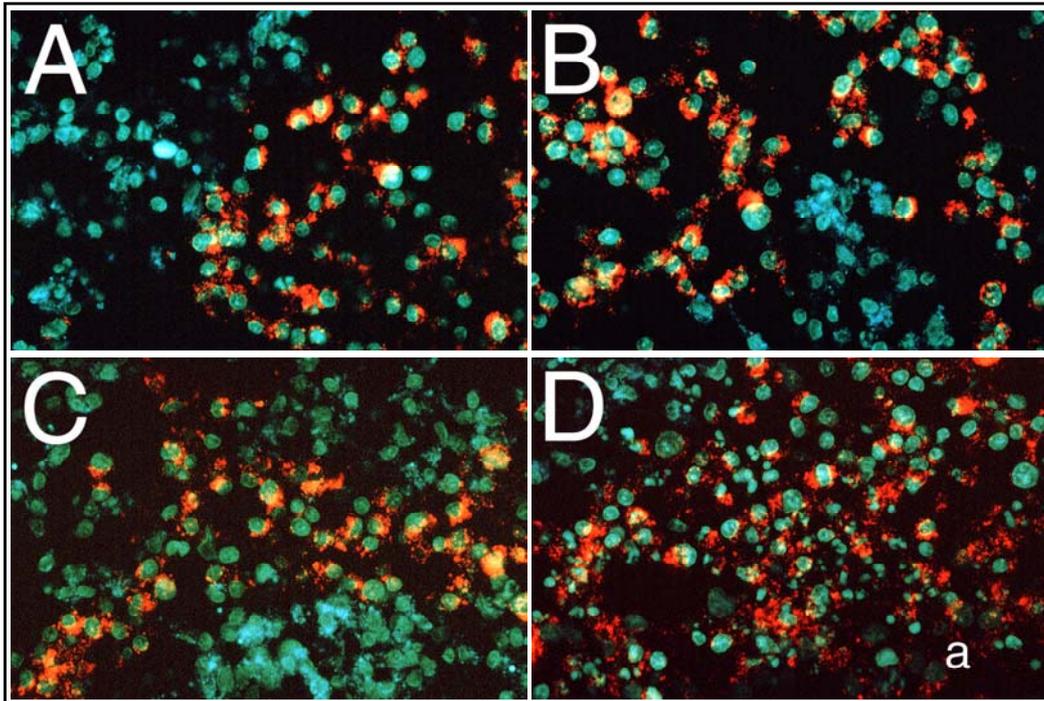


Abbildung 22: Verhalten größerer Gruppen transformierter Zellen in der Innenzone

Versuch 14 (V12): Herstellung von Sphäroiden in Kern-Mantel-Technik (Bauplan I+III): Insgesamt wurden 4 parallele Ansätze hergestellt; hier werden nur 2 davon betrachtet (benannt mit Ansatz A-B). **Ansatz A:** Kern bestehend aus 400.000 208F*, Passage 21 (*= markiert mit 2*50 μ l 0,1 μ m Fluospheres blau in 40 ml Medium, 72h); Mantel bestehend aus 400.000 208Fsrc3*, Passage 14 (*= markiert mit 150 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 40 ml Medium, 8h). **Ansatz B:** Kern bestehend aus 400.000 208Fsrc3*, Passage 14 (*= markiert mit 150 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 40 ml Medium, 8h). Mantel bestehend aus 400.000 208F*, Passage 21 (*= markiert mit 2*50 μ l 0,1 μ m Fluospheres blau in 40 ml Medium, 72h). Zentrifugation, statische Costar-Kultur, Bis-Benzimidin-Färbung. **A-C:** Ansatz A, Tag 6, starke Vergrößerung, zweifache Ausschnittsvergrößerung, Filter 4; **D:** Ansatz A, Tag 4, starke Vergrößerung, zweifache Ausschnittsvergrößerung, Filter 4 (a=Apoptosezone-Anschnitt).

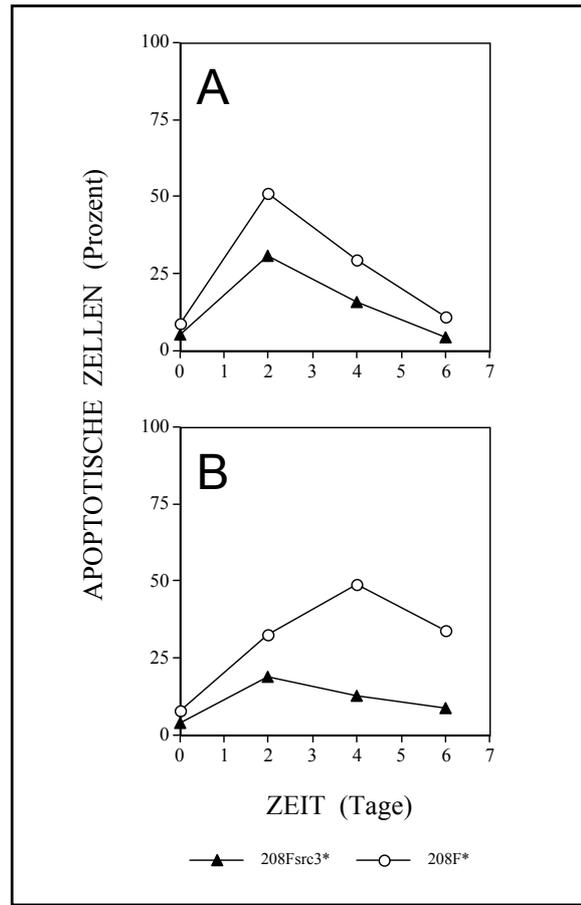


Abbildung 23: Verhalten größerer Gruppen transformierter Zellen in der Innenzone

Solche Sphäroide der beiden Ansätze wurden selektiert, die (durch zufällige Faltung) größere Gruppen rot fluoreszierender, transformierter Zellen in der Innenzone enthielten (entgegen „Bauplan“). Die so gewonnenen Sphäroide enthielten also Areale, wo rot fluoreszierende, transformierte Zellen und blau fluoreszierende, nicht-transformierte Zellen direkt aneinandergrenzten. Dort wurde (nach Zellart getrennt) der Prozentsatz apoptotischer Zellen in der Bis-Benzimidin-Färbung ermittelt. An jedem Meßzeitpunkt wurden an jeweils einem Sphäroid pro Ansatz mindestens 200 transformierte und mindestens 200 nicht-transformierte Zellen ausgezählt. Die Zählung erfolgte an unterschiedlichen Schnittebenen des jeweiligen Sphäroids. Durch die Wahl der Schnitt- und Zähltechnik war sichergestellt, daß identische Zellen nicht mehrfach ausgezählt wurden. Auf der X-Achse sind die Entnahmetage (0 bis 6) aufgetragen, auf der Y-Achse der zugeordnete Prozentsatz (0 bis 100%) apoptotischer Zellen in der Bis-Benzimidin-Färbung. Ausgefüllte Dreiecke symbolisieren transformierte 208Fsrc3*-Zellen, nicht-ausgefüllte Kreise stellen nicht-transformierte 208F*-Zellen dar. **A:** Ansatz A; **B:** Ansatz B.

Zusammenfassung: Das Verhalten größerer Gruppen transformierter Zellen in der Innenzone ähnelt dem Verhalten einzelner transformierter Zellen in der Innenzone. Unter den dargestellten Bedingungen ist eine selektive Elimination transformierter 208Fsrc3*-Fibroblasten durch nicht-transformierte 208F*-Fibroblasten bis Tag 6 in der Innenzone des Sphäroids nicht zu beobachten. Auch transformierte Zellen in direktem Kontakt mit nicht-transformierten Zellen zeigen keine ausgeprägteren apoptotischen Veränderungen als weiter entfernt gelegene transformierte Zellen. Beide Zellarten zeigen einen Prozentsatz apoptotischer Zellen zwischen ca. 5% bis 50%, wobei die nicht-transformierten 208F*-Fibroblasten stets einen deutlich höheren Prozentsatz apoptotischer Kerne aufweisen.

3.5 Die Apoptosezone

3.5.1 Entwicklung einer Apoptosezone

Die mikroskopische Morphologie der Sphäroide im 208F/208Fsrc3-System und derer im C127/C127M5-System (A. Schmidtman, unpublished) unterschied sich deutlich voneinander, obwohl ansonsten die gleiche Technik verwendet wurde. Auch unterschied sich die Morphologie der Sphäroide im 208F/208Fsrc3-System vom sonst häufig beobachteten dreischichtigen Aufbau in anderen Zellsystemen (Mueller-Klieser, 1987). Die wesentlichsten Unterschiede bestehen dabei im Auftreten einer sogenannten Apoptosezone und dem Fehlen einer zentralen Nekrosezone im 208F/208Fsrc3-System. Das Auftreten einer Apoptosezone war ein Phänomen, das sich durch alle Versuche im 208F/208F-System hindurch verfolgen ließ.

Stellvertretend und zur Illustration sei hier ein Versuch genannt, bei dem die Entwicklung einer Apoptosezone im zeitlichen Verlauf sehr gut verfolgt werden konnte (**Versuch 15**). Es handelte sich dabei um Kokultur-Sphäroide, die einzelne 208Fsrc3*-Zellen in einem Überschuß aus 208F-Zellen enthielten (sowie einen Mantel aus 208F). Entstandene Sphäroide wurden an Tag 0, 2 und 6 entnommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. **Abbildung 24** zeigt die gewonnenen Schnitte von Tag 0 und 2 in Übersichts-, mittlerer und starker Vergrößerung, sowie Übersichts- und Detailaufnahmen von Tag 6. Bereits an Tag 0 (**Abbildung 24 A-C**) ist der in 3.2 beschriebene dreischichtige Aufbau zu erkennen, jedoch mit zu diesem Zeitpunkt noch schwach ausgeprägter Apoptosezone (geringe Breite). Im weiteren Verlauf (Tag 2) erkennt man eine massive Breitenzunahme der Apoptosezone, die man leicht durch die vielen fragmentierten, kondensierten Kerne und Zelltrümmer von der intakten Mantel- und Innenzone unterscheiden kann (**Abbildung 24 D-F**). Schließlich zeigen die Detailaufnahmen von Tag 6 den Übergangsbereich zwischen Apoptosezone und Innenzone (**Abbildung 24 H**) sowie Mantel- und Apoptosezone (**Abbildung 24 I**); die Apoptosezone hat nicht mehr wesentlich an Breite zugenommen; Zellen in der Innenzone erscheinen in der Bis-Benzimidin-Färbung zum Großteil weiterhin intakt.

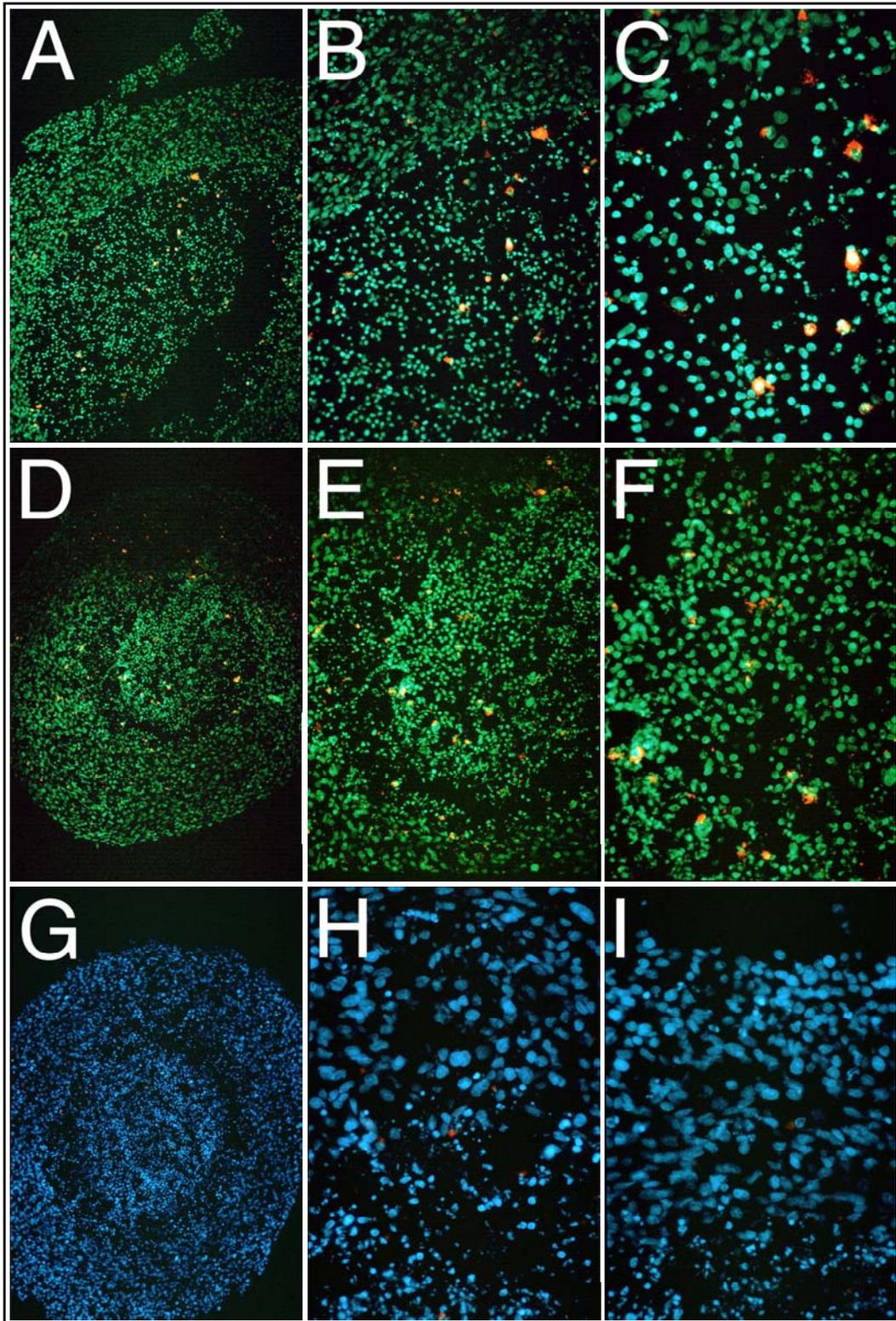


Abbildung 24: Entwicklung einer Apoptosezone im zeitlichen Verlauf

Versuch 15 (V5): Versuchsbeschreibung siehe Legende zu Abbildung 14. **A-C:** Tag 0; **D-F:** Tag 2; **G-I:** Tag 6; Nebeneinander sind stets Ausschnitte desselben Sphäroids dargestellt. **A, D:** Übersicht, Filter 4; **B, E:** mittlere Vergrößerung, Filter 4; **C, F:** starke Vergrößerung, Filter 4; **G:** Übersicht, Filter 1; **H:** Zentrum, starke Vergrößerung, Filter 1; **I:** Randbereich, starke Vergrößerung, Filter 1.

Zusammenfassung: Im 208F/208Fsrc3-System entwickelt sich im Verlauf der Sphäroid-Kultur eine charakteristische Apoptosezone, die sich durch fragmentierte, kondensierte Kerne, Zelltrümmer und zahlreiche Leerräume von der Mantel- und Innenzone unterscheiden läßt. Das Ausmaß dieser Apoptosezone nimmt anfangs zu, meist bleibt jedoch ein intaktes Zentrum (Innenzone) über den gesamten Beobachtungszeitraum erhalten.

3.5.2 Keine Abhängigkeit der Apoptosezone von der Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen – Teil 1

Es stellte sich die Frage, ob das Auftreten einer Apoptosezone eventuell durch die Interaktion transformierter Zellen mit nicht-transformierten Zellen im Sphäroid-Ansatz bedingt sein könnte, da bis zu diesem Zeitpunkt stets Kokulturen transformierter und nicht-transformierter Zellen verwendet worden waren. Folglich lag es nahe, parallel zu Kokulturen (einzelne transformierte Zellen in einem Überschuß von nicht-transformierten Zellen) auch Reinkulturen der entsprechenden Zellart auf das Auftreten einer Apoptosezone zu testen (**Versuch 16**). Zu diesem Zweck wurden vier verschiedene parallele Ansätze hergestellt:

- A) Reinkultur aus nicht-transformierten Zellen (Bauplan I)
- B) Kokultur aus einzelnen markierten, transformierten Zellen und nicht-transformierten Zellen im Überschuß (Bauplan II)
- C) Reinkultur aus transformierten Zellen (Bauplan I)
- D) Reinkultur aus transformierten Zellen, jedoch einzelne davon markiert (Bauplan II)

Sollte die Apoptosezone auf der Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen beruhen, so wäre zu erwarten, daß diese ausschließlich in Ansatz B auftreten sollte. Ansatz D diene einem anderen Zweck (Untersuchung des Proliferationsverhaltens transformierter Zellen in der Innenzone, siehe 3.3.2), kann jedoch als interne Kontrolle verwendet werden. Zur Veranschaulichung soll zunächst das morphologische Aussehen der verschiedenen Ansätze (A-C) an Tag 0 (**Abbildung 25**) und 6 (**Abbildung 26**) dargestellt werden (Ansatz D entspricht Ansatz C bis auf das Vorhandensein markierter Zellen; nicht gezeigt). Ansatz A (**Abbildung 25 A-B**) und B (**Abbildung 25 C-D**) zeigen an Tag 0 bereits deutlich die Ausbildung einer Apoptosezone, während Ansatz C (**Abbildung 25 E-F**) sehr locker erscheint und keine sichtbare Apoptosezone erkennen läßt (in Ansatz B fallen die rot markierten 208Fsrc3*-Zellen auf). An Tag 6 (**Abbildung 26**) ist in allen drei dargestellten Ansätzen eine Apoptosezone nachweisbar, wobei diese in Ansatz C (**Abbildung 26 E-F**) schwer zu lokalisieren ist. Wiederum erscheint Ansatz C sehr viel lockerer und weniger strukturiert als die restlichen Ansätze. Generell hat an Tag 6 der Prozentsatz apoptotischer Zellen stark zugenommen.

Die Entstehung einer Apoptosezone sollte in diesem Versuch nicht nur festgestellt, sondern

möglichst auch quantifiziert werden. Dazu wurde an jedem Beobachtungszeitpunkt der Prozentsatz apoptotischer Zellen nach Ansatz und Zone getrennt bestimmt. **Abbildung 27** zeigt die in dieser Weise erhobenen Befunde. Man sieht, daß sich in allen Ansätzen zu mindestens einem Zeitpunkt eine Apoptosezone (mit höherem Prozentsatz apoptotischer Zellen als in den zwei benachbarten Zonen) ausbildete. Zu späteren Zeitpunkten hin nahm auch in der Innenzone in allen Sphäroiden der Prozentsatz apoptotischer Zellen zu, während die Mantelzone meist einen sehr niedrigen Anteil apoptotischer Zellen zeigte. Ansätze, die nicht-transformierte 208F-Zellen in der Mehrzahl enthielten (A und B) zeigten insgesamt gesehen einen deutlich höheren Prozentsatz apoptotischer Zellen sowie einen früheren Beginn (Tag 0 im Gegensatz zu Tag 2) der apoptotischen Veränderungen als Ansätze, die ausschließlich transformierte 208Fsrc3-Zellen enthielten (C und D).

Zusammenfassung: Die Ausbildung einer Apoptosezone tritt in 208F und 208Fsrc3-Reinkultur-Sphäroiden ebenso auf, wie in Kokultur-Sphäroiden. Es scheint sich damit nicht um eine Interaktion zwischen transformierten und nicht-transformierten Zellen zu handeln. 208Fsrc3-Reinkultur-Sphäroide sind deutlich lockerer aufgebaut und weniger strukturiert als 208F-Reinkultur oder 208F/208Fsrc3-Kokultur-Sphäroide. Apoptotische Veränderungen treten in 208Fsrc3-Reinkultur-Sphäroiden später und weniger stark ausgeprägt auf.

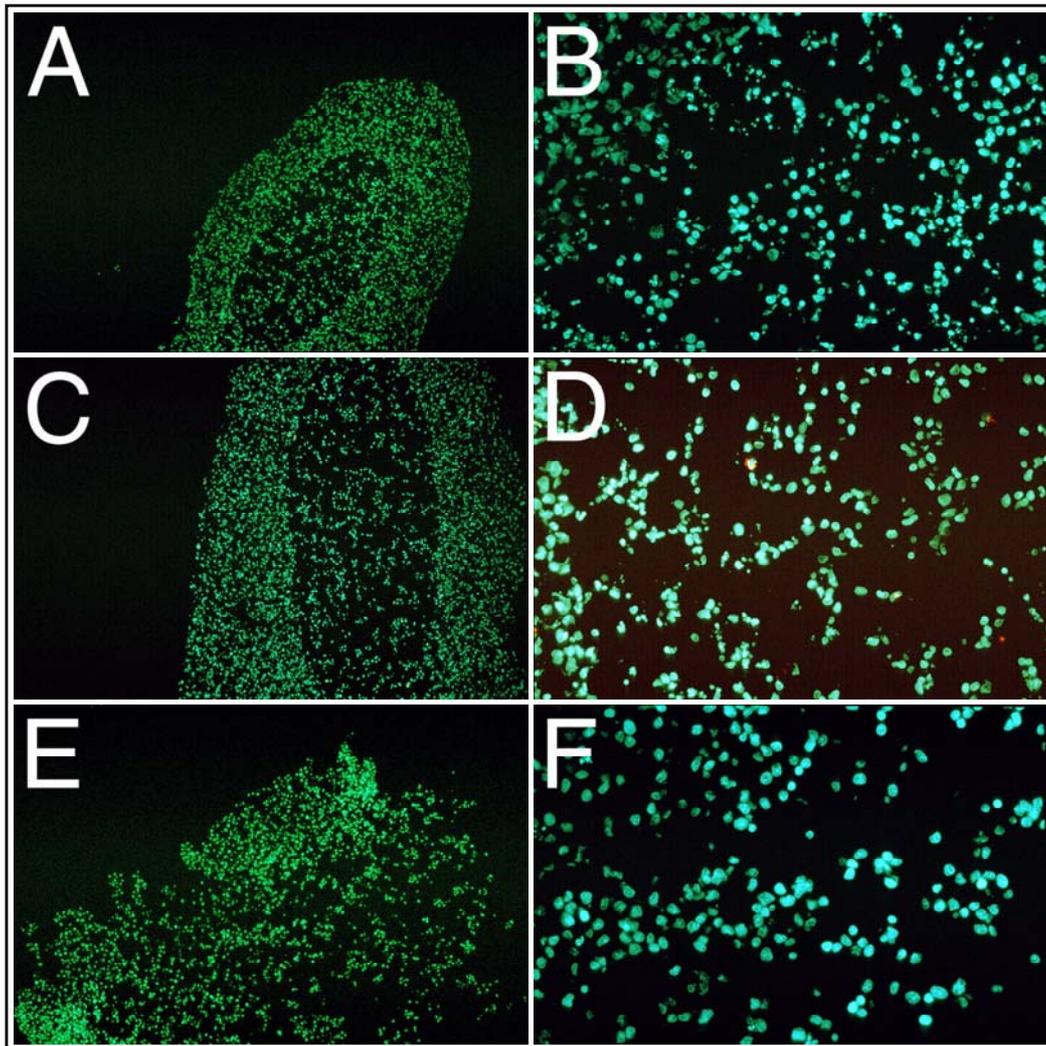


Abbildung 25: Apoptosezone und Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen

Versuch 16 (V11): Herstellung von Kokultur- und Reinkultur-Sphäroiden (Bauplan II bzw. I): Insgesamt wurden 4 Ansätze hergestellt (benannt mit Ansatz A-D); bildlich dargestellt sind nur Ansatz A-C.

A-B: Ansatz A: Reinkultur aus 208F, Passage 17; Sphäroid bestehend aus 800.000 Zellen, kein Mantel.

C-D: Ansatz B: Kokultur aus 208F, Passage 17 und 208Fsrc3*, Passage 10 (*= markiert mit 100 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 20 ml Medium, 24h) im Verhältnis 40:1; Sphäroid mit insgesamt 800.000 Zellen, kein Mantel.

E-F: Ansatz C: Reinkultur aus 208Fsrc3, Passage 10; Sphäroid bestehend aus 800.000 Zellen, kein Mantel. (Ansatz D: Reinkultur aus 208Fsrc3, Passage 10 und 208Fsrc3*, Passage 10 (*= markiert mit 100 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 20 ml Medium, 24h) im Verhältnis 40:1; Sphäroid mit insgesamt 800.000 Zellen, kein Mantel). Zentrifugation, statische Costar-Kultur, Bis-Benzimidin-Färbung. **A, C, E:** Tag 0, Übersicht, Filter 4; **B, D, F:** Tag 0, starke Vergrößerung, Filter 4.

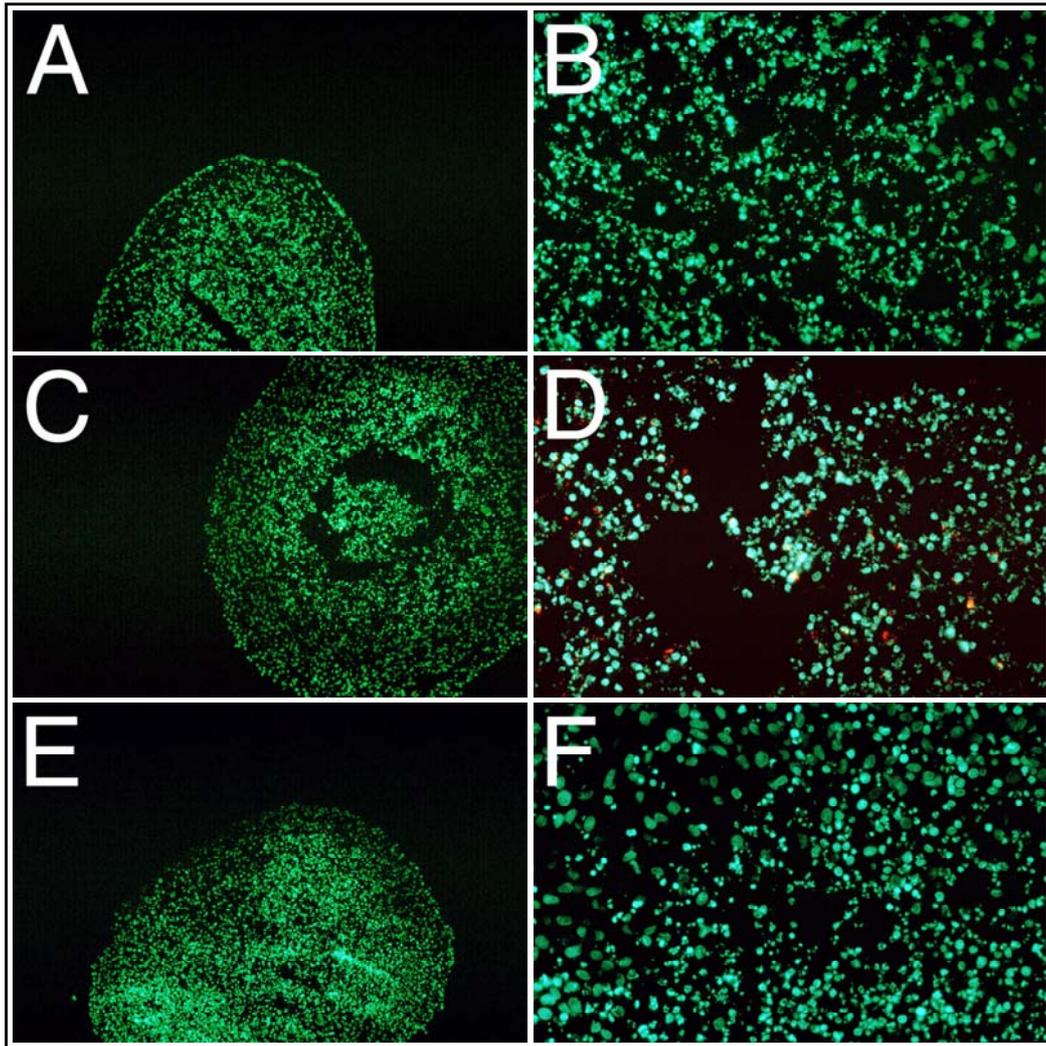


Abbildung 26: Apoptosezone und Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen
Versuch 16 (V11): Versuchsaufbau siehe Legende zu Abbildung 25.
A-B: Ansatz A; C-D: Ansatz B; E-F: Ansatz C.
A, C, E: Tag 6, Übersicht, Filter 4; **B, D, F:** Tag 6, starke Vergrößerung, Filter 4.

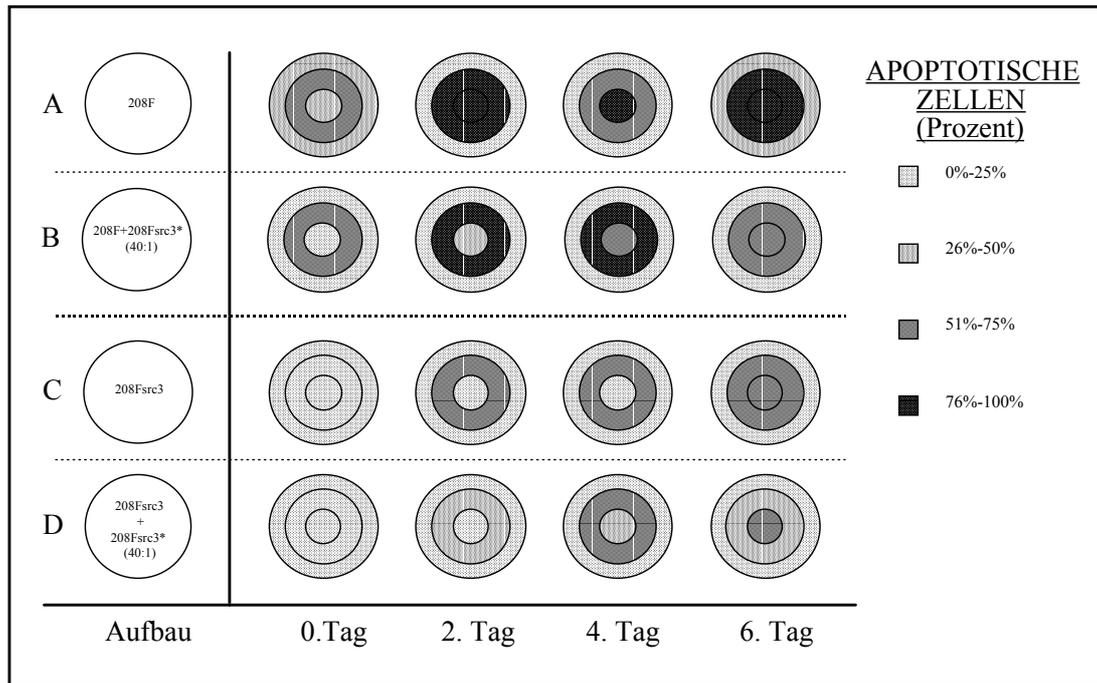


Abbildung 27: Apoptosezone und Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen

Sphäroide (jeweils 2 pro Ansatz) wurden an Tag 0, 2, 4 und 6 entnommen und der Prozentsatz apoptotischer Zellen nach Zone (Mantelzone, Apoptosezone, Innenzone) und Ansatz getrennt ermittelt (ohne Berücksichtigung der Markierung mit Fluospheres). Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: In der Mantelzone wurde von außen nach innen gezählt (um möglichst den Übergangsbereich Mantelzone-Apoptosezone auszusparen), bis mindestens 200 Zellen ausgewertet waren. In der angrenzenden Apoptosezone wurde ebenso verfahren, wobei sich die Zählung angesichts der Zelltrümmer und Leerräume sehr schwierig gestaltete. Zur Zählung apoptotischer Zellen in der Innenzone wurde von innen nach außen gezählt, um wiederum den Übergangsbereich Innenzone-Apoptosezone möglichst auszusparen; es wurden ebenfalls mindestens 200 Zellen beurteilt. Durch die Schnitt- und Zähltechnik war gewährleistet, daß identische Zellen nicht mehrfach ausgezählt wurden. Um der Genauigkeit der Zählung Rechnung zu tragen, wurden die gewonnenen Werte in vier Kategorien eingeteilt (0%-25%, 26%-50%, 51%-75% und 76-100% apoptotischer Zellen in der Bis-Benzimidin-Färbung). In x-Richtung sind die Entnahme-Zeitpunkte aufgetragen, in y-Richtung die vier verschiedenen Ansätze (**A-D: Ansatz A-D** von oben nach unten); links ist jeweils der schematische Aufbau nochmals dargestellt. Die schematische Einteilung der Ansätze in 3 konzentrische Zonen entspricht der Einteilung in Mantelzone, Apoptosezone und Innenzone. Je dunkler die jeweilige Zone schraffiert ist, desto höher war der Anteil apoptotischer Zellen in der Bis-Benzimidin-Färbung (Skala rechts von der Grafik).

3.5.3 Keine Abhängigkeit der Apoptosezone von der Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen – Teil 2

Weiterhin war die Frage zu klären, ob eventuell die dreidimensionale Anordnung transformierter und nicht-transformierter Zellen für die Entstehung einer Apoptosezone verantwortlich sein könnte, insbesondere aber, ob die Herstellung von Sphäroiden in Kern-Mantel-Technik aus transformierten und nicht-transformierten Zellen (Kokultur) eine spezifische Interaktion zwischen den beiden Zellarten durch Entstehung einer Apoptosezone an der (vermuteten) Grenzfläche *vortäuschen* konnte.

Zu diesem Zweck wurden Kokultur- und Reinkultur-Sphäroide in Kern-Mantel-Technik hergestellt, und die mögliche Entwicklung einer Apoptosezone beobachtet (**Versuch 17**). Dazu wurden

insgesamt vier Ansätze verfolgt:

- A) Kern und Mantel bestehend aus blau markierten, nicht-transformierten Zellen (Reinkultur, Bauplan I+III)
- B) Kern bestehend aus blau markierten, nicht-transformierten Zellen, Mantel bestehend aus rot markierten, transformierten Zellen (Kokultur, Bauplan I+III)
- C) Kern und Mantel bestehend aus rot markierten, transformierten Zellen (Reinkultur, Bauplan I+III)
- D) Kern bestehend aus rot markierten, transformierten Zellen, Mantel bestehend aus blau markierten, nicht-transformierten Zellen (Kokultur, Bauplan I+III)

Durch diese vier Ansätze wurden alle denkbaren Möglichkeiten der Anordnung transformierter und nicht-transformierter Zellen in Kern-Mantel-Technik durchgespielt. Sollte die Entstehung einer Apoptosezone auf der räumlichen Interaktion der beiden Zellpopulationen beruhen, so sollte diese ausschließlich in den Ansätzen B und D nachweisbar sein. Zunächst soll wiederum die Morphologie der entstandenen Sphäroide (Ansatz A-D) an Tag 0 und 6 dargestellt werden (**Abbildung 28 und 29**).

An Tag 0 (**Abbildung 28**) erkennt man in Ansatz B (**Abbildung 28 B**) und D (**Abbildung 28 D**) deutlich den jeweiligen Aufbau aufgrund der unterschiedlich gefärbten Kerne und Mäntel. Es fällt auf, daß die aufgelagerten Mäntel sehr dünn erscheinen. Eine typische Apoptosezone ist nicht sichtbar. An Tag 6 (**Abbildung 29**) erkennt man in allen Ansätzen den typischen dreischichtigen Aufbau, der in reinen 208Fsrc3*-Sphäroiden (Ansatz C, **Abbildung 29 C**) schwerer erkennbar ist (lockerer Aufbau). Es erscheint in Kokultur-Sphäroiden nicht möglich, die Apoptosezone mit einer spezifisch gefärbten Zellart zu identifizieren.

Um die entstehende Apoptosezone zu quantifizieren, wurde wieder an jedem Beobachtungszeitpunkt der Prozentsatz apoptotischer Zellen nach Ansatz und Zone getrennt bestimmt. **Abbildung 30** zeigt die in dieser Weise erhobenen Befunde. Man sieht, daß sich in allen Ansätzen zu mehreren Zeitpunkten eine Apoptosezone ausbildete (mit höherem Prozentsatz apoptotischer Zellen als in den zwei benachbarten Zonen). An Tag 0 war in keinem der Ansätze eine deutliche Apoptosezone nachweisbar. Bei diesem Versuch blieb bei allen Ansätzen bis Tag 6 eine relativ intakte Innenzone erhalten, ebenso wie die Mantelzone stets einen sehr niedrigen Anteil apoptotischer Zellen auf. Es zeigten sich keine deutlichen Unterschiede in der Zellvitalität zwischen Sphäroiden, die ausschließlich nicht-transformierte (Ansatz A) oder transformierte Zellen (Ansatz C) enthielten.

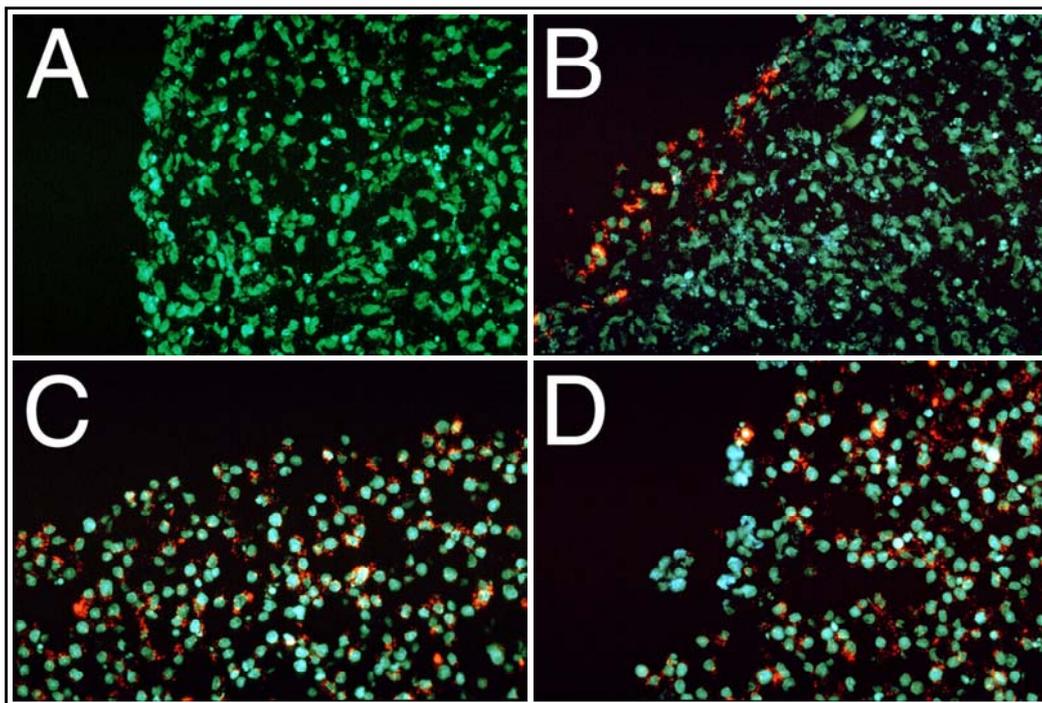


Abbildung 28: Apoptosezone und Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen

Versuch 17 (V12): Herstellung von Sphäroiden in Kern-Mantel-Technik (Bauplan I+III): Insgesamt wurden 4 parallele Ansätze hergestellt (benannt mit Ansatz A-D).

A: Ansatz A: Kern bestehend aus 400.000 208F*, Passage 21 (*= markiert mit 2*50 µl 0,1 µm Fluospheres blau in 40 ml Medium, 72h). Mantel bestehend aus 400.000 208F*, Passage 21 (*= markiert mit 2*50 µl 0,1 µm Fluospheres blau in 40 ml Medium, 72h).

B: Ansatz B: Kern bestehend aus 400.000 208F*, Passage 21 (*= markiert mit 2*50 µl 0,1 µm Fluospheres blau in 40 ml Medium, 72h). Mantel bestehend aus 400.000 208Fsrc3*, Passage 14 (*= markiert mit 150 µl 0,5 µm Fluospheres rot in 40 ml Medium, 8h).

C: Ansatz C: Kern bestehend aus 400.000 208Fsrc3*, Passage 14 (*= markiert mit 150 µl 0,5 µm Fluospheres rot in 40 ml Medium, 8h). Mantel bestehend aus 400.000 208Fsrc3*, Passage 14 (*= markiert mit 150 µl 0,5 µm Fluospheres rot in 40 ml Medium, 8h).

D: Ansatz D: Kern bestehend aus 400.000 208Fsrc3*, Passage 14 (*= markiert mit 150 µl 0,5 µm Fluospheres rot in 40 ml Medium, 8h). Mantel bestehend aus 400.000 208F*, Passage 21 (*= markiert mit 2*50 µl 0,1 µm Fluospheres blau in 40 ml Medium, 72h). Zentrifugation, statische Costar-Kultur, Bis-Benzimidin-Färbung. **A-D:** Tag 0, starke Vergrößerung, Filter 4.

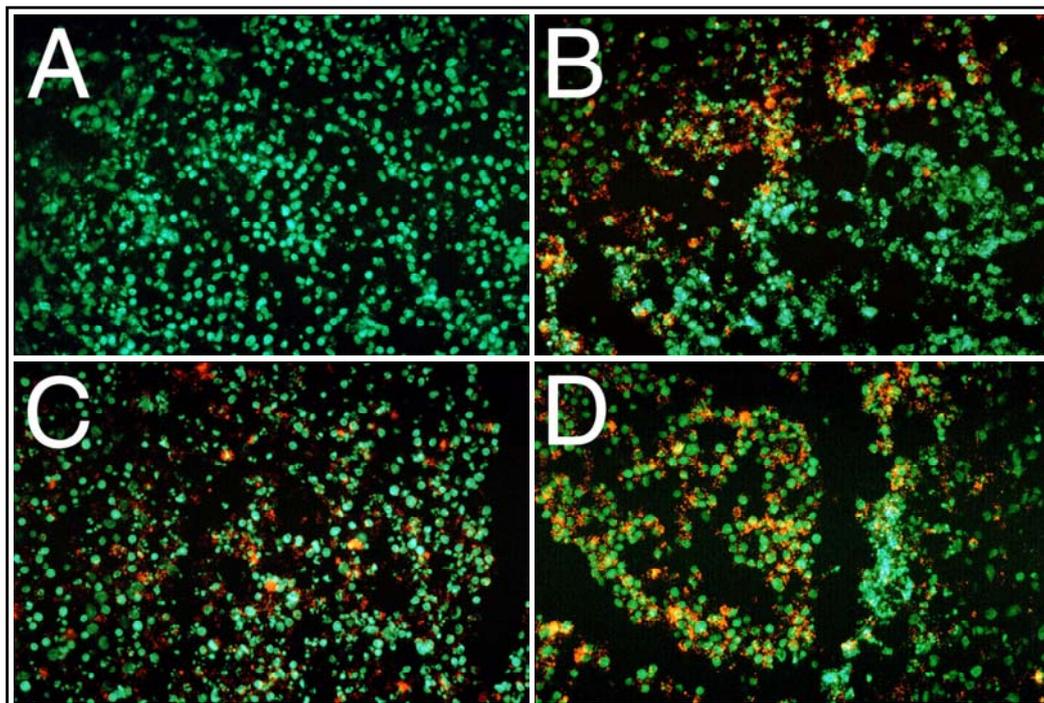


Abbildung 29: Apoptosezone und Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen
Versuch 17 (V12): Versuchsaufbau siehe Legende zu Abbildung 28.
A: Ansatz A; B: Ansatz B; C: Ansatz C; D: Ansatz D; A-D: Tag 6, starke Vergrößerung, Filter 4.

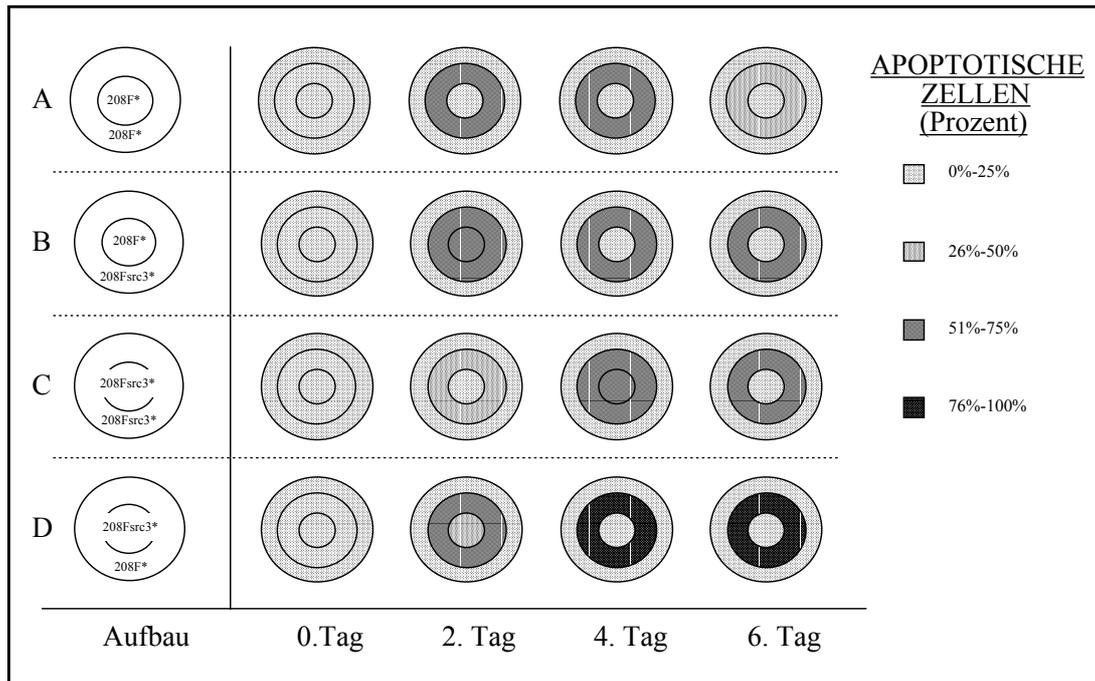


Abbildung 30: Apoptosezone und Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen

Sphäroide wurden an Tag 0, 2, 4 und 6 entnommen und der Prozentsatz apoptotischer Zellen nach Zone (Mantelzone, Apoptosezone, Innenzone) und Ansatz getrennt ermittelt (ohne Berücksichtigung der Markierung mit Fluospheres). Zähl- und Auswertungstechnik siehe Legende zu Abbildung 27. In x-Richtung sind die Entnahme-Zeitpunkte aufgetragen, in y-Richtung die vier verschiedenen Ansätze (**A-D: Ansatz A-D** von oben nach unten); links ist jeweils der schematische Aufbau nochmals dargestellt. Die schematische Einteilung der Ansätze in 3 konzentrische Zonen entspricht der Einteilung in Mantelzone, Apoptosezone und Innenzone. Je dunkler die jeweilige Zone schraffiert ist, desto höher war der Anteil apoptotischer Zellen in der Bis-Benzimidin-Färbung (Skala rechts von der Grafik).

Zusammenfassung: Eine Apoptosezone tritt in Kern-Mantel Sphäroiden unabhängig davon auf, ob es sich um Rein- oder Kokulturen transformierter und nicht-transformierter Zellen handelt. Die entstehende Apoptosezone läßt sich dabei in Kokultur-Sphäroiden keiner bestimmten Zellart zuordnen. Sie scheint damit unabhängig von der Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen zu sein, kann aber eine solche Interaktion in Kern-Mantel-Versuchen *vortäuschen*. Unter den dargestellten Versuchsbedingungen erschienen die Zellen insgesamt deutlich vitaler als z.B. in **Versuch 16**; auch waren keine deutlichen Unterschiede in der Zellvitalität zwischen 208F* und 208Fsrc3*-Reinkultur-Sphäroiden festzustellen.

3.5.4 Verschiedene mögliche Einflussfaktoren

Nachdem der Einfluß der Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen auf die Entstehung der Apoptosezone untersucht worden war, stellte sich die Frage, welche anderen möglichen Einflußfaktoren vorhanden sein könnten. Die Vermutung lag nahe, daß es sich bei der Apoptosezone eventuell um ein Phänomen handeln könnte, das mit der initialen Vitalität und Energieversorgung im Sphäroid zusammenhängt, da Tendenzen zur Entwicklung einer

Apoptosezone teilweise schon an Tag 0, also sehr kurz nach Aufbau der Sphäroide, sichtbar waren. Um die Wirkung der zu prüfenden Einflüsse messen zu können, mußte eine andere Möglichkeit zur Quantifizierung der Apoptosezone gefunden werden, da die bisher verwendete Auszählung apoptotischer Zellen in der Apoptosezone zu ungenau erschien.

3.5.4.1 Zelldichte der Zellkulturflaschen

Bei der Herstellung von Sphäroiden wurden in den vorherigen Versuchen stets möglichst dicht bewachsene Zellkulturflaschen verwendet, da hiermit die Ausbeute an Sphäroiden pro Zellkulturflasche am höchsten war. Dabei blieb jedoch unberücksichtigt, daß konfluente Zellkulturen durchaus andere Eigenschaften hinsichtlich Nährstoffverbrauch und Zellzyklusverteilung haben, als in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche (Bredel-Geissler et al., 1992).

Ein Einfluß auf die Ausbildung der Apoptosezone schien nicht unwahrscheinlich; deshalb wurden in folgendem Versuch (**Versuch 18**) parallel Sphäroide aus „wenig dicht bewachsenen“ Zellkulturflaschen (**Ansatz A**) und „dicht bewachsenen (konfluenten)“ Zellkulturflaschen (**Ansatz B**) hergestellt und der Einfluß auf die Apoptosezone mit einer neuen Meßmethode (Breite der Apoptose- bzw. der Mantelzone; Quotient) quantifiziert. Berücksichtigt wurden nur 208F-Reinkultur-Sphäroide; 208Fsrc3-Reinkultur-Sphäroide wurden zwar hergestellt, eine genaue quantitative Auswertung erwies sich aber als nicht machbar (lockerer Aufbau). Zur Veranschaulichung der Meßmethode soll **Abbildung 31** dienen. Gezeigt wird ein A-Ansatz („wenig dicht“, Tag 2). Dabei handelt es sich um zwei Ausschnitte aus ein- und demselben Sphäroid. Man erkennt einmal eine breite Mantelzone mit darunterliegender breiter Apoptosezone (**Abbildung 31 A**) und zum anderen eine schmale Mantelzone mit darunterliegender schmaler Apoptosezone (**Abbildung 31 B**). Die zwei Meßparameter (Breite der Apoptose- bzw. Mantelzone) wurden zur Verdeutlichung eingetragen. Unter Verwendung dieser Parameter wurden die Ansätze folgendermaßen ausgewertet: Zu jedem Meßpunkt wurden (nach Ansatz getrennt) die Breite der Apoptose- bzw. Mantelzone mehrfach bestimmt und der Quotient (Breite der Apoptosezone / Breite der Mantelzone) berechnet. Dadurch sollte ein eventueller Einfluß der Breite der Mantelzone auf die Breite der Apoptosezone vom Einfluß der Dichte der Zellkulturflaschen getrennt werden. **Abbildung 32** zeigt die gewonnenen Ergebnisse für die Breite der Mantel- und Apoptosezone der zwei Ansätze. Die Breite der Mantelzone zeigt kaum eine Abhängigkeit von der Dichte der Zellen in der Zellkulturflasche. Es ist kein eindeutiger Trend erkennbar (zumindest, wenn man die Standardabweichungen berücksichtigt). Die Breite der Mantelzone bewegt sich ca. zwischen 10-20 Zellagen. Die Breite der Apoptosezone läßt jedoch eine geringe Abhängigkeit vermuten. Stets ist

die Apoptosezone in den Sphäroiden des B-Ansatzes (dicht) breiter als in denen des A-Ansatzes (wenig dicht); besonders ausgeprägt an Tag 2. Eine sichere Aussage läßt sich jedoch angesichts der Standardabweichungen nicht machen. **Abbildung 33** zeigt die Ergebnisse für den Quotienten (Breite der Apoptosezone / Breite der Mantelzone). Auch in dieser Darstellung kann man eine Abhängigkeit der Apoptosezone bzw. der Mantelzone von der Dichte der Zellkulturflaschen vermuten. Der Quotient der B-Ansätze ist stets größer (schmalere Mantelzone bzw. breitere Apoptosezone) als derjenige der A-Ansätze (breitere Mantelzone bzw. schmalere Apoptosezone), spricht also insgesamt für eine größere Vitalität von Sphäroiden aus weniger dichten Zellkulturflaschen. Allerdings verbieten die großen Standardabweichungen definitive Aussagen.

Zusammenfassung: Die gewonnenen Daten lassen einen Einfluß der Dichte der Zellkulturflaschen auf die „Vitalität“ von 208F-Reinkultur-Sphäroiden vermuten. Definitive Aussagen verbieten sich jedoch aufgrund der großen Standardabweichungen.

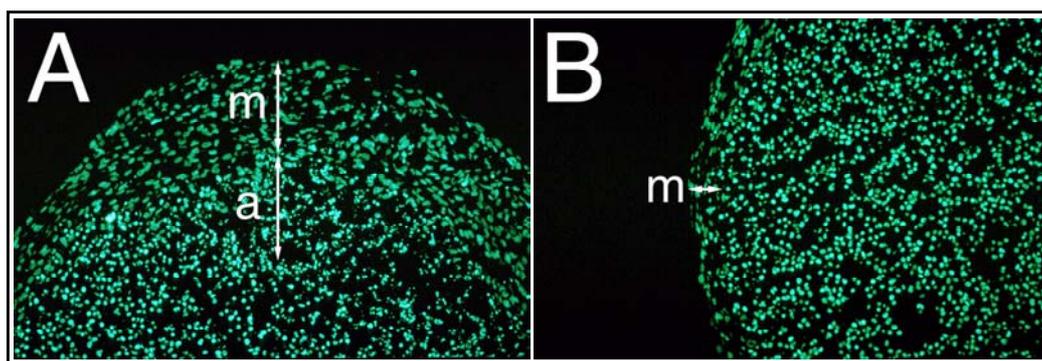


Abbildung 31: Einfluß der Zelldichte der Zellkulturflaschen; neue Meßmethode

Versuch 18 (V13): Herstellung von Reinkultur-Sphäroiden (Bauplan I): Es wurden 2 Ansätze hergestellt (benannt mit Ansatz A-B).

Ansatz A: Reinkultur aus 208F, Passage 24; Zellen aus „wenig dicht bewachsenen Flaschen“ (nach 2-tägigem Wachstum nach 1:5 splitten; ca. 2.500.000 Zellen pro Zellkulturflasche); Sphäroid bestehend aus 800.000 Zellen, kein Mantel.

Ansatz B: Reinkultur aus 208F, Passage 24; Zellen aus „dicht bewachsenen Flaschen“ (nach 4-tägigem Wachstum nach 1:5 splitten; ca. 9.510.000 Zellen pro Zellkulturflasche, konfluent); Sphäroid bestehend aus 800.000 Zellen, kein Mantel. Zentrifugation, statische Costar-Kultur, Bis-Benzimidin-Färbung. Dargestellt sind zwei unterschiedliche Ausschnitte aus demselben Sphäroid. **A-B:** Ansatz A, Tag 2, mittlere Vergrößerung, Filter 4 (**m**= Breite der Mantelzone, **a**= Breite der Apoptosezone).

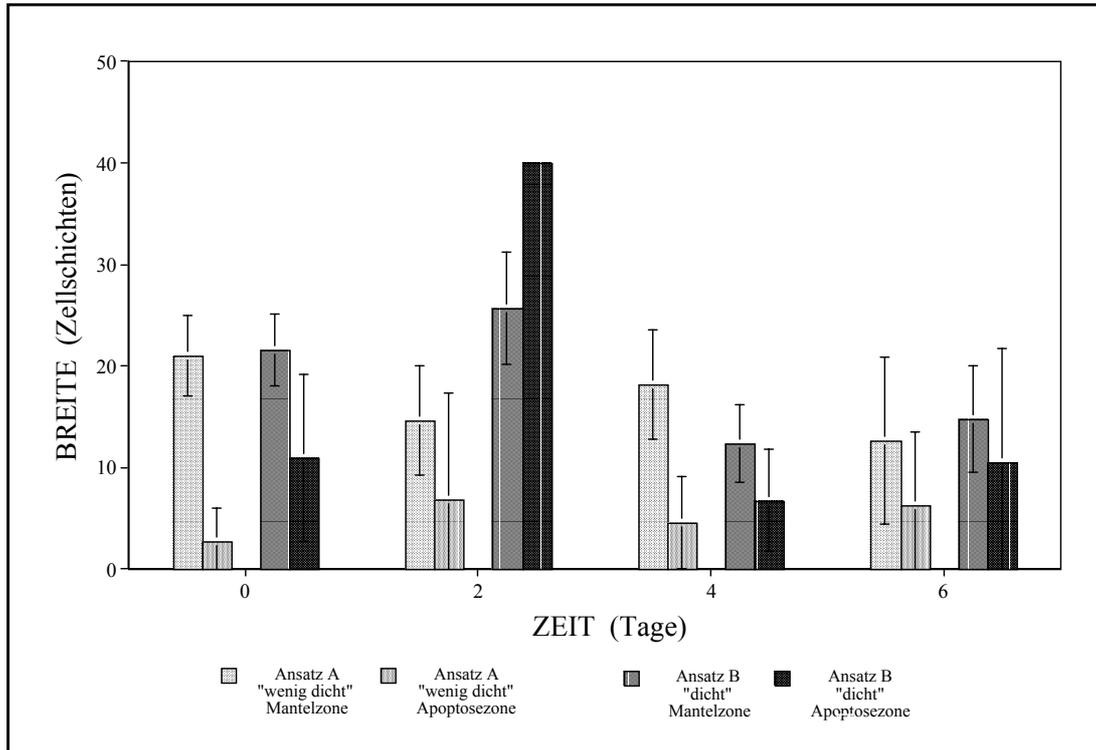


Abbildung 32: Einfluß der Zelldichte der Zellkulturflaschen; neue Meßmethode

Sphäroide (jeweils 2 pro Ansatz) wurden an Tag 0, 2, 4 und 6 entnommen und folgendermaßen ausgewertet: Zu jedem Meßpunkt wurden pro Ansatz 29 Messungen der Breite der Mantelzone (in Zellschichten) und der Breite der Apoptosezone (in Zellschichten) vorgenommen (an unterschiedlichen Schnittebenen der jeweils 2 entnommenen Sphäroide). Daraus wurden jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. In x-Richtung sind die Entnahme-Tage aufgetragen (0 bis 6), in y-Richtung die Breite der jeweiligen Zellschicht (0 bis 50 Zellagen). An jedem Entnahme-Tag symbolisieren die zwei linken Säulen (helle Schraffur) Ansatz A (wenig dicht), davon die Linke die Breite der Mantelzone und die Rechte die Breite der Apoptosezone. Die zwei rechten Säulen (dunklere Schraffur) symbolisieren Ansatz B (dicht), davon die Linke die Breite der Mantelzone und die Rechte die Breite der Apoptosezone (Legende unterhalb der Grafik). Standardabweichungen sind eingetragen.

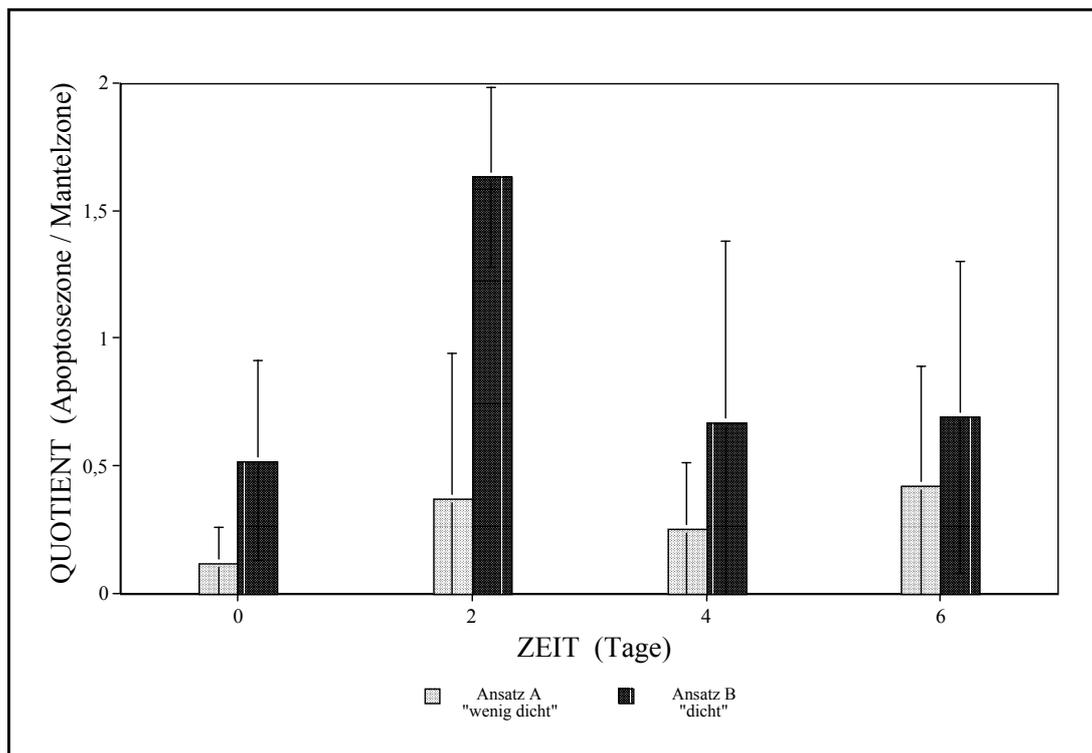


Abbildung 33: Einfluß der Zelldichte der Zellkulturflaschen; neue Meßmethode

Auswertungs- und Meßtechnik siehe Legende zu Abbildung 32. Der Quotient (Breite der Apoptosezone / Breite der Mantelzone) wurde zu jedem Meßwertepaar berechnet und anschließend Mittelwert und Standardabweichung gebildet. In x-Richtung sind wiederum die Entnahme-Tage aufgetragen (0 bis 6), in y-Richtung der berechnete Quotient (0 bis 2, dimensionslos). An jedem Entnahme-Tag symbolisiert die linke Säule (helle Schraffur) Ansatz A (wenig dicht), die rechte Säule (dunkle Schraffur) Ansatz B (dicht). Standardabweichungen sind eingetragen (Legende unterhalb der Grafik).

3.5.4.2 Serumkonzentration und Taurin

Als weiterer Einflußfaktor war die Nährstoffkonzentration im Zellkultur-Medium denkbar, da die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Diffusion in vielen Sphäroidmodellen einen kritischen Punkt darstellt. Zusätzlich sollte der Einfluß von Taurin, einem spezifischen HOCl-Fänger, getestet werden. Dazu wurden 4 parallele Ansätze (A-D) hergestellt, die FKS in unterschiedlicher Konzentration enthielten, bzw. zu denen FKS in höherer Konzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten zugesetzt wurde, sowie ein Ansatz mit 20 mM Taurin (**Versuch 19**):

- A) Medium mit 5% FKS während der gesamten Versuchsdauer
- B) Medium mit 5% FKS während der Monolayer-Kultur und 15% FKS während der Sphäroidkultur
- C) Medium mit 15% FKS während Monolayer- und Sphäroidkultur
- D) Medium mit 5% FKS während Monolayer- und Sphäroidkultur und zusätzlich 20 mM Taurin während der Sphäroidkultur

Ausgewertet wurden ausschließlich 208F-Reinkultur-Sphäroide (Bauplan I). 208Fsrc3-Sphäroide

wurden zwar hergestellt; durch ihren lockeren Aufbau war eine quantitative Auswertung jedoch nicht machbar. Um auch geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen erkennen zu können, wurde wieder dieselbe Meßtechnik wie im vorhergehenden Versuch (siehe Legende zu den **Abbildungen 31-33**) verwendet. **Abbildung 34** stellt die gewonnenen Ergebnisse dar. Das obere Schaubild zeigt die Messungen der Breite der Mantelzone, das Mittlere die Breite der Apoptosezone und das Untere den beschriebenen Quotienten. Die Breite der Mantelzone zeigt keine ausgeprägte Abhängigkeit von der verwendeten FKS-Konzentration bzw. dem Zusatz von Taurin. Sie bewegt sich während des gesamten Versuchsablaufes zwischen ca. 15-30 Zellagen mit einem Mittelwert von ca. 20 und nimmt bis Tag 6 etwas an Breite ab. Die Breite der Apoptosezone und der berechnete Quotient (Breite der Apoptosezone / Breite der Mantelzone) zeigen Unterschiede in den vier Ansätzen, jedoch läßt sich kein eindeutiger Trend erkennen. An Tag 2 zum Beispiel ist die Apoptosezone in Ansatz C („15% FKS früh“) stark ausgeprägt, während sie in Ansatz A („5% FKS“) schwächer ausgeprägt ist. Die Verhältnisse kehren sich an Tag 4 um, und ähneln an Tag 6 wieder denen von Tag 2. Beachtet man zusätzlich die relativ großen Standardabweichungen, lassen sich kaum definitive Aussagen treffen, außer daß Taurin ebenso wie höhere FKS-Konzentrationen nicht vor der Entstehung einer Apoptosezone zu schützen vermochten.

Zusammenfassung: Die Erhöhung der FKS-Konzentration während der Sphäroidkultur bzw. während der Monolayer- und Sphäroidkultur sowie der Zusatz von Taurin während der Sphäroidkultur schützen in 208F-Reinkultur-Sphäroiden nicht vor der Entstehung einer Apoptosezone. Die Breite der Mantelzone bleibt von den erwähnten Bedingungen nahezu unbeeinflusst, sie nimmt jedoch während des Versuchsablaufs leicht ab.

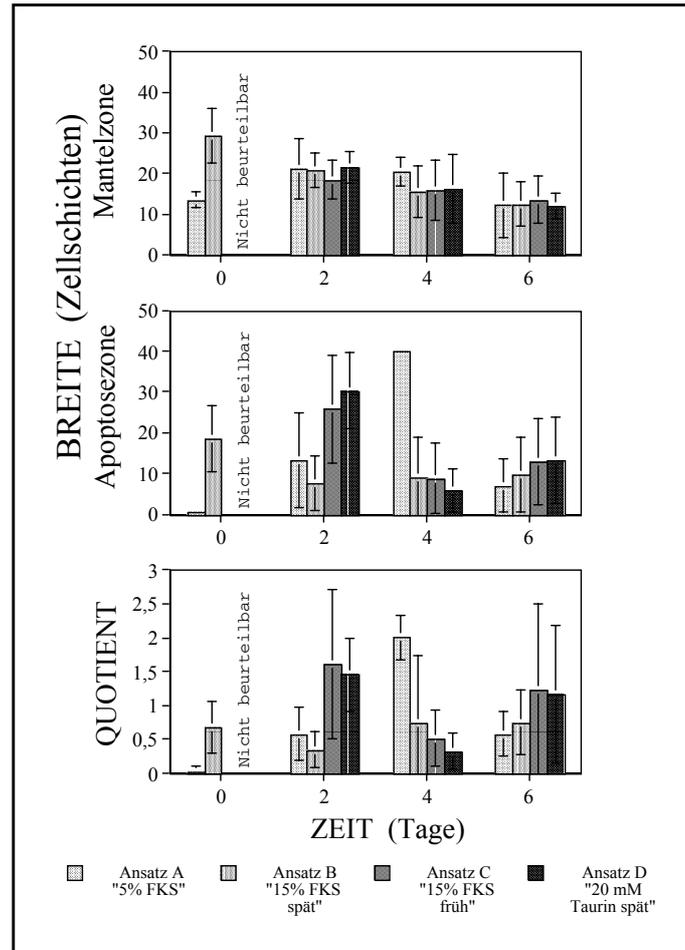


Abbildung 34: Einfluß unterschiedlicher Serumkonzentrationen sowie von Taurin

Versuch 19 (V14): Herstellung von Reinkultur-Sphäroiden (Bauplan I): Insgesamt wurden 8 Ansätze hergestellt; ausgewertet wurden jedoch nur 4 (benannt mit Ansatz A-D).

Ansatz A: Reinkultur aus 208F, Passage 29; Medium mit 5% FKS (Standard) während der gesamten Versuchsdauer („**Medium mit 5% FKS**“); Sphäroid bestehend aus 800.000 Zellen, kein Mantel.

Ansatz B: Reinkultur aus 208F, Passage 29; Medium mit 5% FKS während der Monolayer-Kultur (Standard) und mit 15% FKS während der Sphäroidkultur („**15% FKS spät**“); Sphäroid bestehend aus 800.000 Zellen, kein Mantel.

Ansatz C: Reinkultur aus 208F, Passage 29; Medium mit 15% FKS während der Monolayer-Kultur und der Sphäroidkultur („**15% FKS früh**“); Sphäroid bestehend aus 800.000 Zellen, kein Mantel.

Ansatz D: Reinkultur aus 208F, Passage 29; Medium mit 5% FKS (Standard) während der gesamten Versuchsdauer, zusätzlich 20mM Taurin während der Sphäroidkultur („**20 mM Taurin spät**“); Sphäroid bestehend aus 800.000 Zellen, kein Mantel. Das Medium wurde während der Sphäroidkultur täglich durch dem Ansatz entsprechendes Medium ersetzt. Zentrifugation, statische Costar-Kultur, Bis-Benzimidin-Färbung.

Sphäroide (jeweils 2 pro Ansatz, außer Tag 0: 1 pro Ansatz) wurden an Tag 0, 2, 4 und 6 entnommen und ausgewertet (Auswertung- und Meßtechnik siehe Legende zu den Abbildungen 31-33). Das obere Schaubild zeigt die Messungen der Breite der Mantelzone, das Mittlere die Breite der Apoptosezone und das Untere den beschriebenen Quotienten. In x-Richtung sind jeweils die Entnahme-Tage aufgetragen (0 bis 6), in y-Richtung die Breite der jeweiligen Zellschicht (0 bis 50 Zellagen) bzw. der berechnete Quotient (0 bis 3, dimensionslos). An jedem Entnahme-Tag symbolisieren die Säulen von links nach rechts (helle bis dunkle Schraffur) jeweils Ansatz A bis D (Legende unterhalb der Grafik). Standardabweichungen sind eingetragen. An Tag 0 waren Ansatz C und D (von denen jeweils nur ein Exemplar existierte, das durch Probleme beim Schneidevorgang verloren ging) nicht beurteilbar.

3.5.5 Charakterisierung des Zelluntergangs mit Hilfe der TUNEL-Reaktion

Bisher wurde die entstehende Apoptosezone aufgrund ihrer Morphologie in der Bis-Benzimidin-Färbung als solche charakterisiert. Im folgenden sollte durch eine zweite Färbemethode überprüft werden, ob es sich bei dem beobachteten Phänomen tatsächlich um apoptotische Veränderungen handelte. Dazu wurden Sphäroid-Schnitte zunächst mit der TUNEL-Färbung angefärbt, die DNA-Strangbrüche darstellt (typisches Apoptose-Merkmal, siehe 2.1.3), und anschließend mit der Bis-Benzimidin-Färbung, um einen direkten Vergleich im selben Sphäroid-Schnitt zu ermöglichen (durch Verwendung eines spezifischen Fluoreszenz-Filters). Hergestellt wurden 208F- (**Ansatz A**) und 208Fsrc3- (**Ansatz B**) Reinkultur-Sphäroide (**Versuch 20**), die 5% FKS während der Monolayer-Kultur und 15% FKS während der Sphäroid-Kultur erhielten. Sphäroide wurden an Tag 2 und 6 (**Ansatz A**) bzw. an Tag 8 (**Ansatz B**) entnommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop (mit spezifischen Filtern) betrachtet. **Abbildung 35-36** zeigen Ansatz A, Tag 2 (**Abbildung 35**) und 6 (**Abbildung 36**). Man erkennt in der TUNEL-Färbung (**Abbildung 35-36 A,C,E**) deutlich eine mäßig hell fluoreszierende innere Zone, sowie eine schwach fluoreszierende, zirkulär angeordnete äußere Zone. In der äußeren Zone sowie daran angrenzend sieht man einige einzelne, stark fluoreszierende Zellkerne. Verglichen mit der Bis-Benzimidin-Färbung (**Abbildung 35-36 B, D, F**) erkennt man, daß die innere, mäßig hell fluoreszierende Zone der Apoptosezone und der Innenzone sowie die äußere, schwach fluoreszierende Zone der Mantelzone entspricht. Wesentliche Unterschiede zwischen Tag 2 und 6 sind nicht erkennbar. **Abbildung 37** zeigt Ansatz B, Tag 8. In der TUNEL-Färbung (**Abbildung 37 A, C, E**) erkennt man deutlich eine zirkulär angeordnete, hell fluoreszierende Zone, die nach außen und innen an kreisförmige, weniger stark fluoreszierende Zonen angrenzt. Verglichen mit der Bis-Benzimidin-Färbung (**Abbildung 37 B, D, F**) erkennt man, daß die hell fluoreszierende Zone mit der Apoptosezone übereinstimmt, und die zwei weniger stark fluoreszierenden Zonen mit der Mantel- bzw. Innenzone.

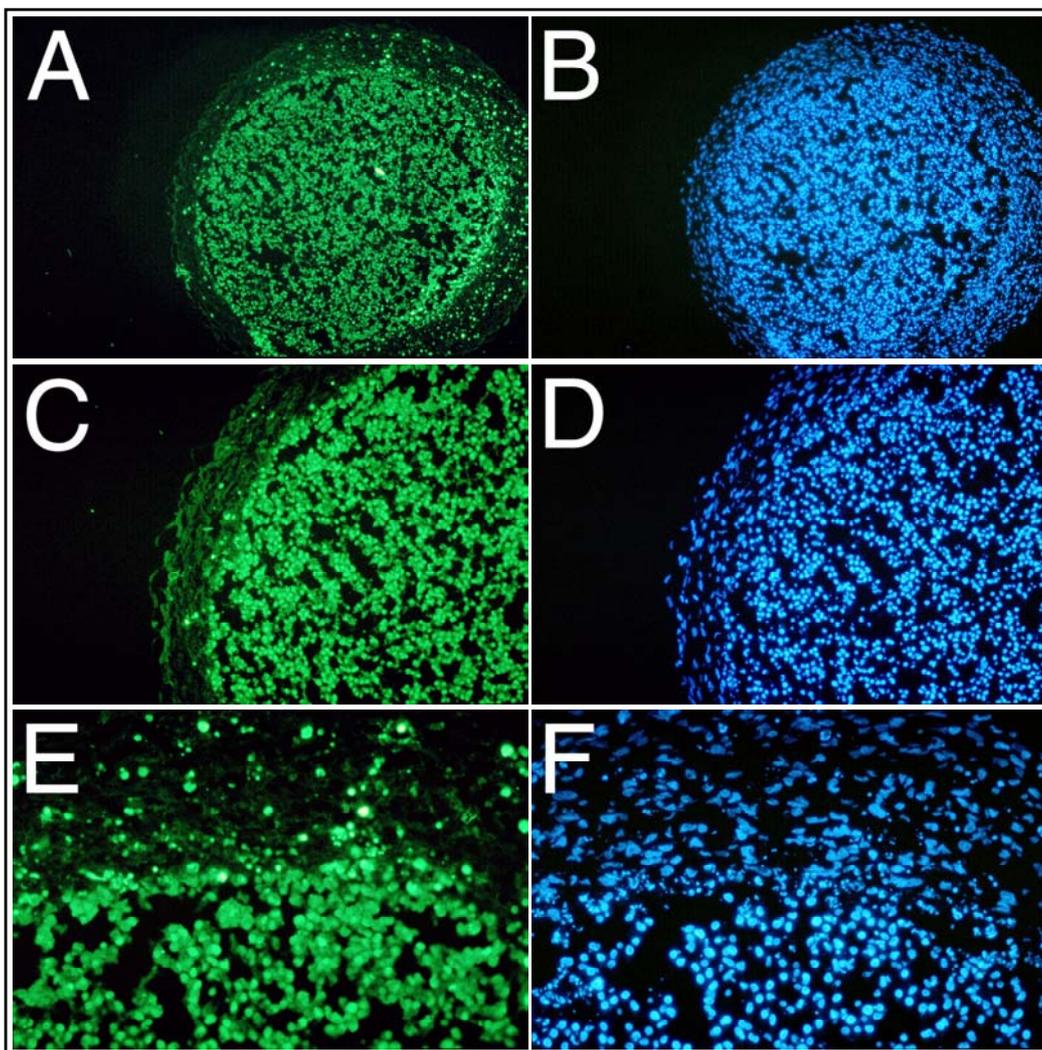


Abbildung 35: Charakterisierung des Zelluntergangs mit Hilfe der TUNEL-Reaktion

Versuch 20 (V14): Herstellung von Reinkultur-Sphäroiden (Bauplan I): Insgesamt wurden 8 Ansätze hergestellt; beobachtet wurden jedoch nur 2 (benannt mit Ansatz A-B).

Ansatz A: Reinkultur aus **208F**, Passage 29; Medium mit 5% FKS während der Monolayer-Kultur (Standard) und mit 15% FKS während der Sphäroidkultur („15% FKS spät“); Sphäroid bestehend aus 800.000 Zellen, kein Mantel.

Ansatz B: Reinkultur aus **208Fsrc3**, Passage 22; Medium mit 5% FKS während der Monolayer-Kultur (Standard) und mit 15% FKS während der Sphäroidkultur („15% FKS spät“); Sphäroid bestehend aus 800.000 Zellen, kein Mantel. Das Medium wurde während der Sphäroidkultur täglich durch dem Ansatz entsprechendes Medium ersetzt. Zentrifugation, statische Costar-Kultur, TUNEL- und Bis-Benzimidin-Färbung. Ansatz A und B wurden mit unterschiedlichen TUNEL-Färbetechniken angefärbt und aufgrund dessen mit unterschiedlichen Belichtungszeiten fotografiert (Ansatz A: Einbettung mit verbessertem Antibleichmittel (Brandner); Ansatz B: Einbettung mit Elvanol-Lösung).

A-F: Dargestellt sind unterschiedliche Vergrößerungen desselben Sphäroids (**Ansatz A, 208F-Reinkultur, Tag 2**), mit zwei verschiedenen Filtern aufgenommen. **A:** Übersicht, Filter 3; **B:** Übersicht, Filter 1; **C:** mittlere Vergrößerung, Filter 3; **D:** mittlere Vergrößerung, Filter 1; **E:** starke Vergrößerung, Filter 3; **F:** starke Vergrößerung, Filter 1.

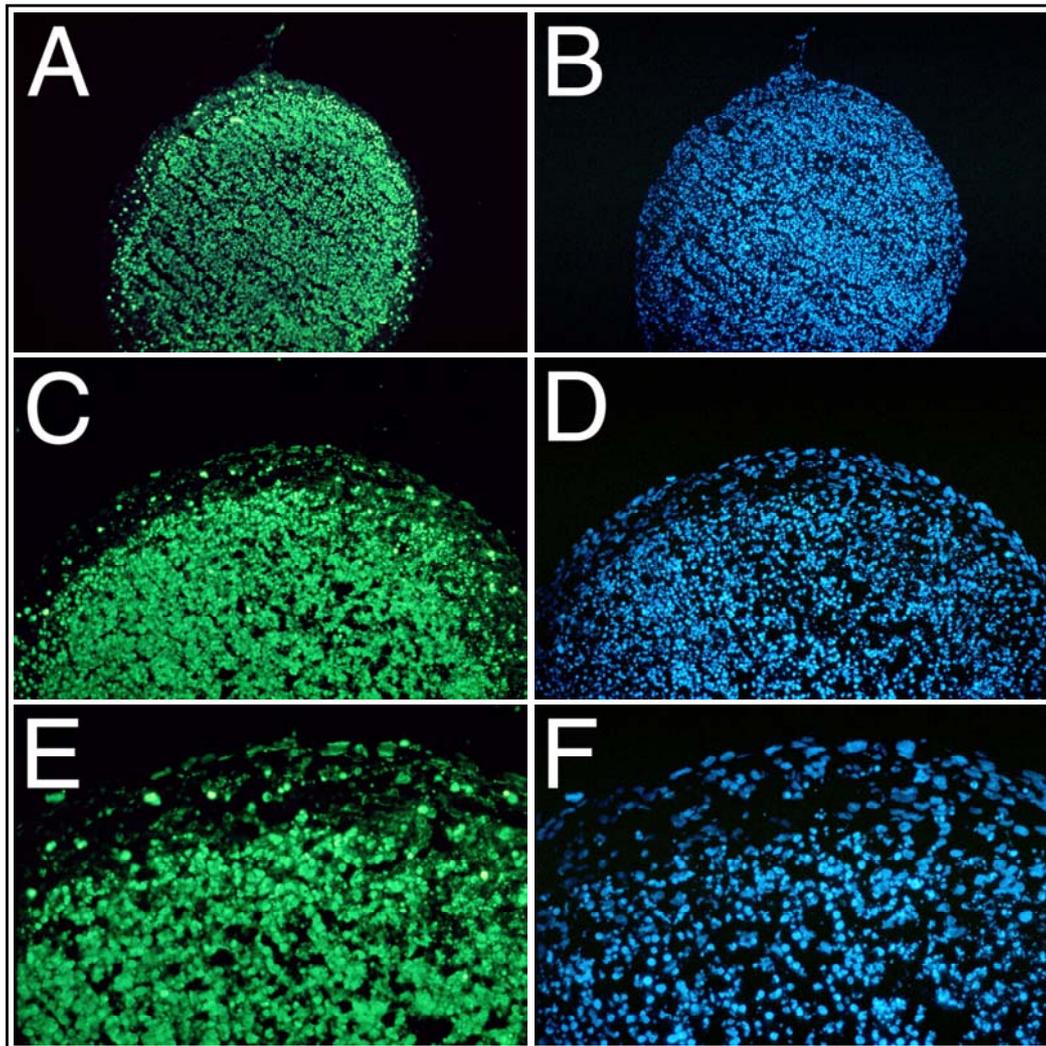


Abbildung 36: Charakterisierung des Zelluntergangs mit Hilfe der TUNEL-Reaktion

Versuch 20 (V14): Versuchsaufbau siehe Legende zu Abbildung 35. **A-F:** Dargestellt sind unterschiedliche Vergrößerungen desselben Sphäroids (**Ansatz A, 208F-Reinkultur, Tag 6**), mit zwei verschiedenen Filtern aufgenommen. **A:** Übersicht, Filter 3; **B:** Übersicht, Filter 1; **C:** mittlere Vergrößerung, Filter 3; **D:** mittlere Vergrößerung, Filter 1; **E:** starke Vergrößerung, Filter 3; **F:** starke Vergrößerung, Filter 1.

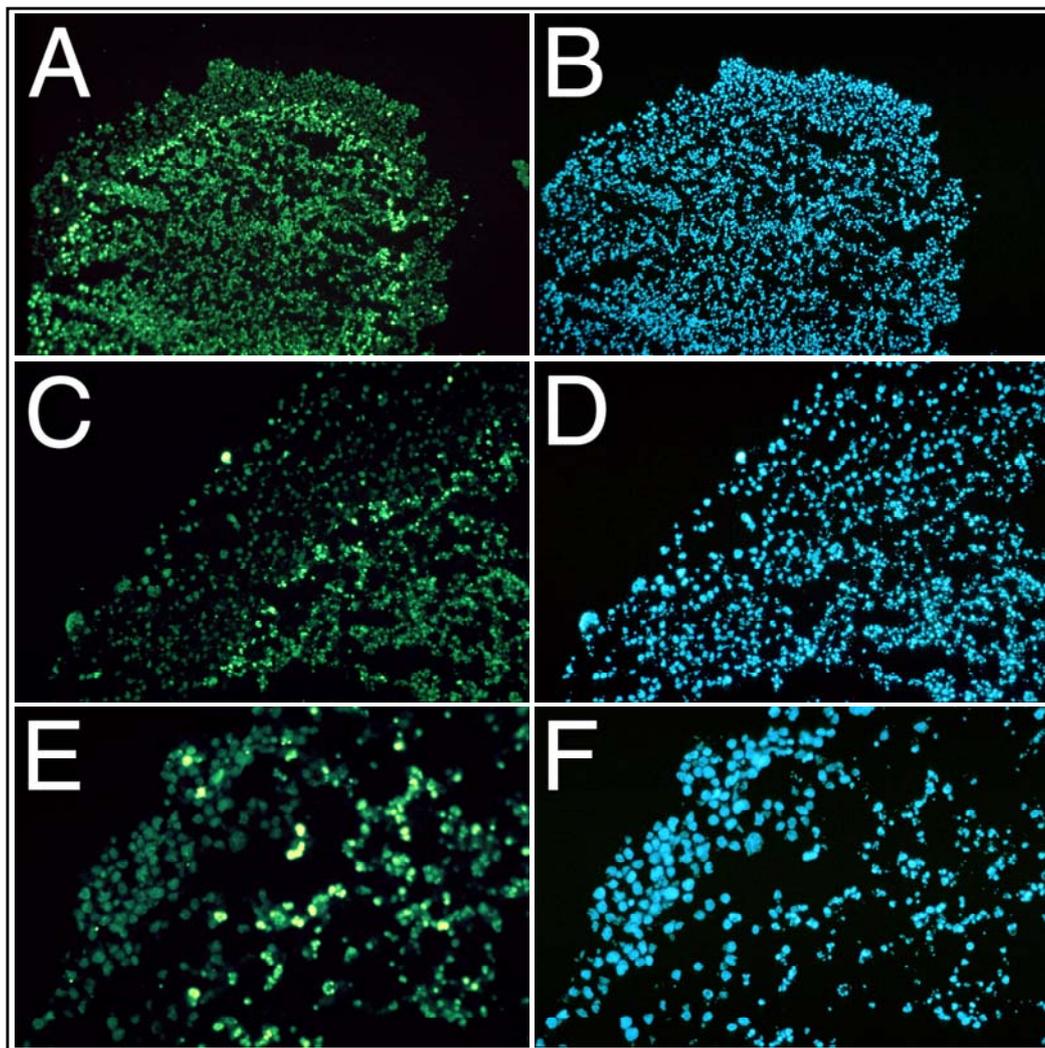


Abbildung 37: Charakterisierung des Zelluntergangs mit Hilfe der TUNEL-Reaktion

Versuch 20 (V14): Versuchsaufbau siehe Legende zu Abbildung 35. **A-F:** Dargestellt sind unterschiedliche Vergrößerungen desselben Sphäroids (**Ansatz B, 208Fsrc3-Reinkultur, Tag 8**), mit zwei verschiedenen Filtern aufgenommen. **A:** Übersicht, Filter 3; **B:** Übersicht, Filter 1; **C:** mittlere Vergrößerung, Filter 3; **D:** mittlere Vergrößerung, Filter 1; **E:** starke Vergrößerung, Filter 3; **F:** starke Vergrößerung, Filter 1.

Zusammenfassung: 208F-Reinkultur-Sphäroide zeigen in der TUNEL-Färbung eine deutliche Zweiteilung in eine schwach fluoreszierende äußere Zone und eine mäßig stark fluoreszierende innere Zone. Diese lassen sich in der Bis-Benzimidin-Färbung mit der Mantelzone (schwache TUNEL-Fluoreszenz) und der Apoptose- bzw. Innenzone (mäßige TUNEL-Fluoreszenz) identifizieren. Einzelne, stark TUNEL-fluoreszierende Zellen finden sich ausschließlich im Bereich der Mantelzone und der Apoptosezone

208Fsrc3-Reinkultur-Sphäroide zeigen in der TUNEL-Färbung eine deutliche Dreiteilung in eine mäßig stark fluoreszierende äußere Zone, eine stark fluoreszierende mittlere Zone und eine mäßig stark fluoreszierende innere Zone. Diese lassen sich in der Bis-Benzimidin-Färbung mit der Mantelzone (mäßige TUNEL-Fluoreszenz), Apoptosezone (starke TUNEL-Fluoreszenz) und

Innenzone (mäßige TUNEL-Fluoreszenz) identifizieren.

Zu beachten ist die unterschiedliche Färbetechnik und Belichtungszeit der beiden Ansätze.

3.5.5.1 Korrelation zwischen TUNEL- und Bis-Benzimidin-Färbung

Aus dem im letzten Abschnitt gesagten ergab sich die Frage nach der Korrelation zwischen TUNEL- und Bis-Benzimidin-Färbung im Sphäroid-System. Eine detaillierte Auswertung wurde von C. Henke und C. Kuttner (C.Henke, C. Kuttner, unpublished) erstellt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die meisten Zellen in der Innenzone eine mäßige Fluoreszenz in der TUNEL-Färbung zeigten, obwohl keine Fragmentierung (wohl aber Kondensierung) erkennbar war. Auch gab es in der Innenzone Kerne, die eindeutige Zeichen der Fragmentierung in der Bis-Benzimidin-Färbung zeigten, jedoch in der TUNEL-Färbung nur mäßige Fluoreszenz zeigten. Starke Fluoreszenz trat in der Innenzone nicht auf.

Die Apoptosezone zeigte - je nach Färbetechnik - kondensierte, fragmentierte Kerne in der Bis-Benzimidin-Färbung und mäßige bis starke Fluoreszenz in der TUNEL-Färbung.

In der Mantelzone schließlich fand sich eine gute Korrelation der beiden Färbemethoden. In der Bis-Benzimidin-Färbung nicht-kondensierte, nicht-fragmentierte Kerne zeigten in der TUNEL-Färbung keine bis schwache Fluoreszenz, während in der Bis-Benzimidin-Färbung kondensierte, fragmentierte Kerne in der TUNEL-Färbung meist starke Fluoreszenz zeigten.

Zur Illustration sei folgender Versuch genannt (**Versuch 21**), wobei Sphäroide aus 208Fsrc3-Reinkulturen (Bauplan I) verwendet wurden, die lediglich an den Polen angeschnitten waren und damit ausschließlich **Mantelzone** enthielten. **Abbildung 38** zeigt zwei solche Schnittpräparate in starker Vergrößerung in TUNEL- (**Abbildung 38 A, C**) und Bis-Benzimidin-Färbung (**Abbildung 38 B, D**) im Vergleich; die beiden Färbungen zeigen jeweils denselben Ausschnitt; einzelne Zellkerne können damit direkt verglichen werden. Man erkennt eine sehr gute Korrelation zwischen in der Bis-Benzimidin-Färbung kondensierten, fragmentierten Kernen und stark fluoreszierenden Kernen in der TUNEL-Färbung. In der Bis-Benzimidin-Färbung intakte Kerne zeigen in der TUNEL-Färbung keine bis schwache Fluoreszenz.

Zusammenfassung: TUNEL- und Bis-Benzimidin-Färbung zeigen unterschiedlich gute Korrelation, je nachdem, welche Zone im Sphäroid betrachtet wird. Mantelzone und Apoptosezone zeigen gute bis mäßige Korrelation; die Innenzone scheint ein Sonderfall zu sein.

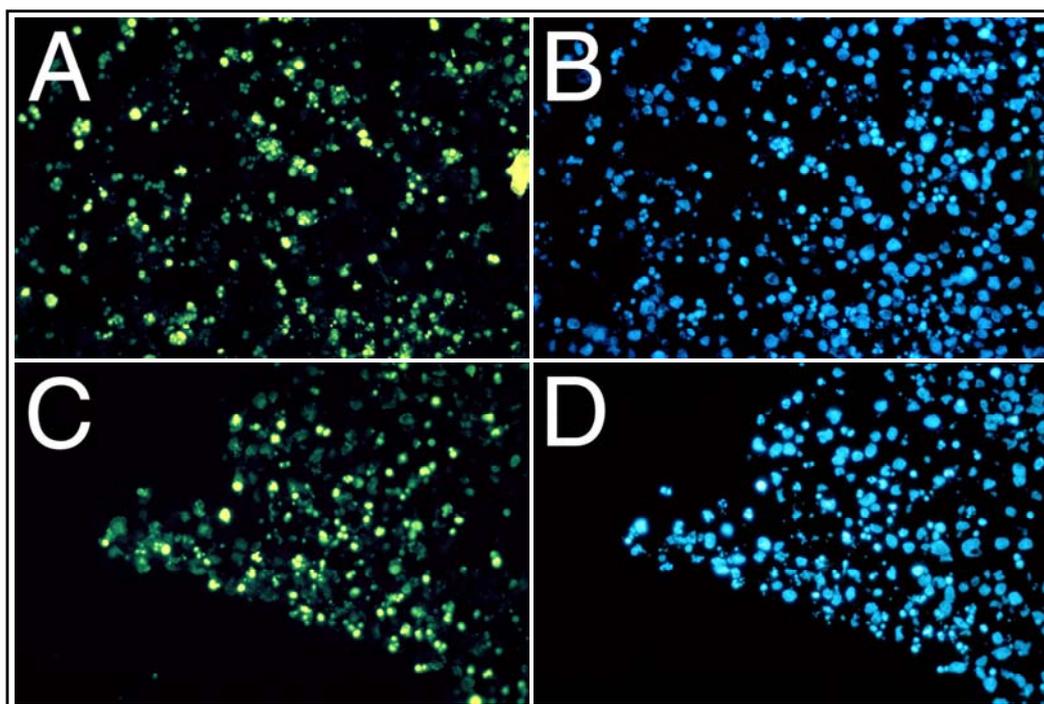


Abbildung 38: Korrelation zwischen TUNEL- und Bis-Benzimidin-Färbung (Mantelzone)

Versuch 21 (V14): Herstellung von Reinkultur-Sphäroiden (Bauplan I): Insgesamt wurden 8 Ansätze hergestellt; beobachtet wurde nur ein Ansatz:

Reinkultur aus **208Fsrc3**, Passage 22; Medium mit 5% FKS (Standard) während der gesamten Versuchsdauer („Medium mit 5% FKS“); Sphäroid bestehend aus 800.000 Zellen, kein Mantel.

Das Medium wurde während der Sphäroidkultur täglich durch dem Ansatz entsprechendes Medium ersetzt. Zentrifugation, statische Costar-Kultur, TUNEL- und Bis-Benzimidin-Färbung. Nebeneinander sind dieselben Sphäroid-Schnitte (**Tag 6**) abgebildet, jedoch mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Filtern aufgenommen. Angeschnitten war nur die Polregion, die ausschließlich Mantelzone enthielt. **A, C:** starke Vergrößerung, Filter 3; **B, D:** starke Vergrößerung, Filter 1.

3.5.6 Versuch zur Herstellung einer Doppel-Apoptosezone

Aus den vorausgehenden Experimenten ergab sich die Idee, die Entstehung einer **zweiten, konzentrischen** Apoptosezone zu provozieren (**Versuch 22**). Dies sollte geschehen, indem zunächst Sphäroide aus blau markierten, nicht-transformierten Zellen hergestellt, diese nach zwei Tagen Sphäroid-Kultur (nachdem man davon ausgehen konnte, daß sich eine Apoptosezone gebildet hatte) nachgefärbt (um eine klare Grenzschicht zu erhalten), und anschließend von einem Mantel aus rot markierten, nicht-transformierten Zellen umgeben werden sollten (**Ansatz B**) oder nicht (**Ansatz A**). Dann sollte in den B-Ansätzen die eventuelle Entstehung einer zweiten Apoptosezone zirkulär um die erste Apoptosezone beobachtet werden, unter Berücksichtigung der roten und blauen Markierung.

Zugrundeliegende Annahme war, daß unter Umständen die Umwandlung einer Monolayer-Kultur in eine dreidimensionale Zellkultur die Entstehung einer Apoptosezone (abhängig vom zonenabhängigen Proliferationsverhalten und Energieverbrauch der Zellen) induzieren könnte

(Bredel-Geissler et al., 1992); dies würde eine Unterscheidung von Phänomenen ermöglichen, die durch radiale Diffusionsgradienten entstehen, falls trotz der zweiten Apoptosezone eine intakte Innenzone erhalten bliebe. **Abbildung 39** zeigt die gewonnenen Sphäroidschnitte. Ansatz A zeigt an Tag 4 einen deutlich blau gefärbten Sphäroid-Kern mit Ausbildung einer Apoptosezone (**Abbildung 39 A**). Ansatz B zeigt ebenfalls einen blauen Sphäroidkern mit Ausbildung einer Apoptosezone und zusätzlich einen roten „Mantel“, der sich jedoch nicht wie beabsichtigt um den blauen Kern herum angelagert hat, sondern zum Großteil nur anhaftete (**Abbildung 39 B**). Dieser zweite, rote Kern zeigt jedoch auch eine Apoptosezone. Mit zwei unterschiedlichen Filtern lassen sich die unterschiedlich markierten Zellen sehr schön darstellen (**Abbildung 39 C, D**). An Tag 8 (Ansatz B) erkennt man zwei aneinanderhaftende, rot bzw. blau markierte Kerne mit jeweils einer typischen Apoptosezone (**Abbildung 39 E**).

Zusammenfassung: Mit der dargestellten Technik ließ sich eine zirkuläre Anordnung der Mantelschicht nicht erreichen; deshalb ist keine Aussage über die Entstehung einer zweiten konzentrischen Apoptosezone (bei evtl. weiterhin intakter Innenzone) möglich. Die zwei aneinanderhaftenden Kerne entwickeln jedoch beide eine Apoptosezone mit intakter Innenzone. Durch die Technik der Nachfärbung der Kerne ließ sich eine klare Grenzschicht erzeugen, die vielleicht für spätere Versuche genutzt werden kann.

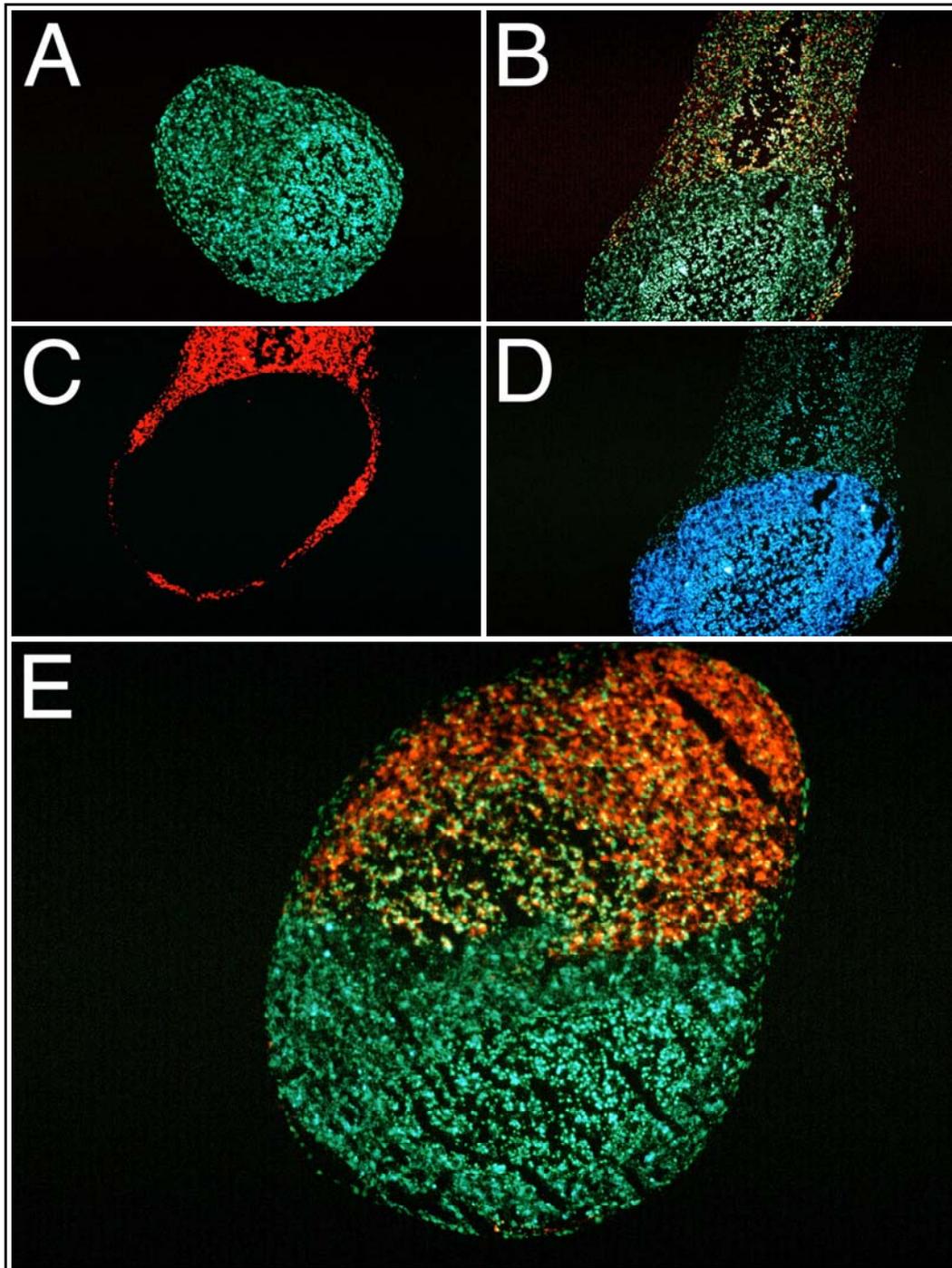


Abbildung 39: Versuch zur Herstellung einer Doppel-Apoptosezone

Versuch 22 (V16): Herstellung von Sphäroiden nach Bauplan IV: Sphäroid-Kerne aus 400.000 208F*, P24 (*=markiert mit 100 μ l 0,1 μ m Fluospheres blau in 40 ml Medium, 24h). Zentrifugation, statische Costar-Kultur für 48h. Am 2. Tag nachfärben der Sphäroid-Kerne (mit 2,5 μ l 0,1 μ m Fluospheres blau pro 1 ml Medium je Sphäroid, 24h); Mediumwechsel. Am 4. Tag waschen der Sphäroid-Kerne; **Ansatz A:** kein Mantel; **Ansatz B:** Mantel aus 400.000 208F*, P25 (*= markiert mit 100 μ l 0,5 μ m Fluospheres rot in 40 ml Medium, 24h). Zentrifugation, statische Costar-Kultur, Bis-Benzimidin-Färbung. **A-D:** Übersicht; **A:** Ansatz A, Tag 4, Filter 4; **B:** Ansatz B, Tag 4, Filter 4; **C:** Ansatz B, Tag 4, Filter 2; **D:** Ansatz B, Tag 4, Filter 1; **E:** Ansatz B, Tag 8, Übersicht zweifach vergrößert, Filter 4.

3.6 Herstellung von Mini-Sphäroiden - die Kunststofftechnik

Mit Hilfe der Kunststofftechnik sollte versucht werden, definiert große Gruppen markierter, transformierter Zellen in ein Sphäroid (bestehend aus mehrheitlich nicht-transformierten Zellen) einzubringen, um deren Verhalten im System der interzellulären Induktion der Apoptose zu prüfen. Von entscheidender Bedeutung war es dabei, die Größe dieser „Mini-Sphäroide“ variieren und exakt definieren zu können; so sollten zum Beispiel Mini-Sphäroide mit 10, 100 und 1000 Zellen (später enthalten in einem Sphäroid aus z.B. 800.000 nicht-transformierten Zellen) hergestellt werden. Außerdem sollte eine große Zahl solcher Mini-Sphäroide herstellbar sein. Die Idee zur Lösung dieses Problems bestand in einer Kombination verschiedener Methoden:

1. Markierung von Zellen mit Fluospheres (H. Deng, C. Schermer, unpublished)
2. Tropfentechnik (C. Schermer, unpublished)
3. Verwendung eines thermoresponsiven Polymers (+Kollagen-Typ-1) zur Beschichtung der Zellkulturgefäße (Takezawa et al., 1990)
4. Transfer der Mini-Sphäroide mittels Pipette (Lerch, 1997)
5. herkömmliche Sphäroidtechnik (Lerch, 1997; H. Deng, unpublished)

Durch die Markierung mit Fluospheres sollte das Mini-Sphäroid im späteren Sphäroidschnitt wieder lokalisierbar gemacht werden, da ansonsten keine Unterscheidung zwischen transformierten und nicht-transformierten Zellen möglich wäre. Die Variation der Zellzahl in der Tropfentechnik erlaubt die Herstellung praktisch beliebig großer kreisförmiger Zellrasen. Diese Zellrasen können dann durch die Verwendung eines thermoresponsiven Polymers zur Beschichtung der Zellkulturgefäße (+ Kollagen-Typ-1) bei Unterschreitung der LCST (Lower Critical Solution Temperature, ca. 30°C) praktisch ohne Beschädigung (im Gegensatz zur Ablösung durch z.B. Trypsin) von ihrer Unterlage abgelöst werden. Dabei wird die spezifische Eigenschaft des Polymers ausgenutzt, bei Unterschreitung der LCST in den hydrophilen Zustand überzugehen. Dadurch löst sich die Beschichtung im Medium; den Zellen wird schlagartig die Möglichkeit zur Anheftung genommen. Anschließend kann der flottierende Zellrasen mittels Pipette (mit abgeschnittener Spitze) in ein hydrophobes Gefäß überführt und dort durch kontinuierliche Bewegung (z.B. Rütteltisch) eine Faltung des abgelösten Zellrasens zur Kugelform hin erreicht werden („Mini-Sphäroid“). Dieses Mini-Sphäroid kann dann in eine Zellsuspension aus z.B. 800.000 Zellen (nicht-markiert) eingebracht und in der üblichen Sphäroid-Technik weiterverarbeitet werden; ebenso kann auch mit mehreren solcher Mini-Sphäroide verfahren werden. Der gesamte Vorgang ist zur Veranschaulichung in **Abbildung 40** dargestellt. Hier sollen die Etablierung der Methodik und die dabei zu lösenden Probleme dargestellt werden (weitere Details zur Methodik siehe 2.2.4).

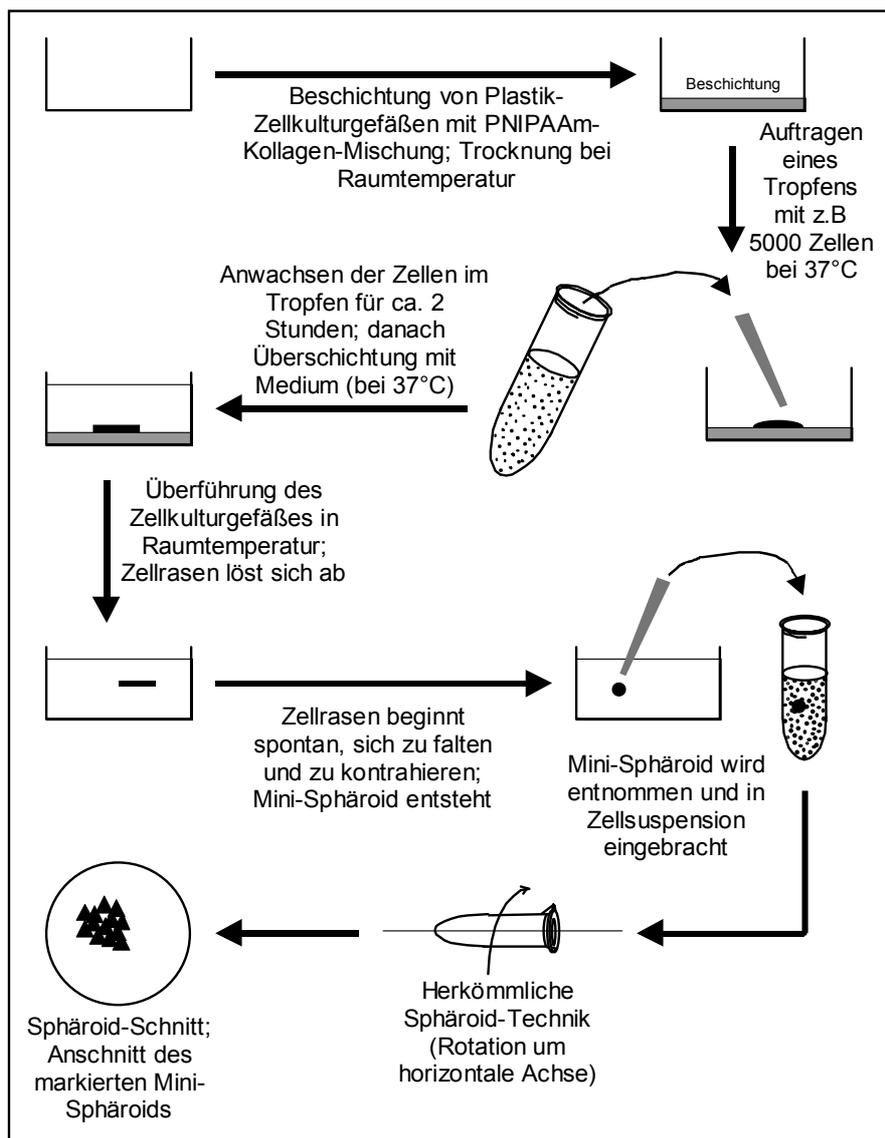


Abbildung 40: Kunststofftechnik

Dargestellt ist der sequentielle Ablauf zur Herstellung von Mini-Sphäroiden definierter Größe in einem in der konventionellen Technik hergestellten Sphäroid.

3.6.1 Etablierung der Methode

Zunächst sollte der Ablösevorgang markierter, transformierter Zellen in Tropfenform bei Unterschreitung der LCST-Temperatur beobachtet und dokumentiert werden (unter Verwendung der in der Literatur (Takezawa et al., 1990) angegebenen Standardbedingungen).

3.6.1.1 Konstanthaltung der Umgebungstemperatur-Wasserbad

Während des Aufbringens der Tropfen und der nachfolgenden Anwachssphase muß die Temperatur des thermoresponsiven Polymers stets über der LCST-Temperatur gehalten werden, da der Kunststoff sonst wasserlöslich wird und seinen Zweck nicht mehr erfüllt. Wegen des geringen

Aufwandes (und der zu fordernden Sterilität) wurde zunächst versucht, diesen Schritt unter der sterilen Hood in einem **Wasserbad** (auf einer Wärmeplatte stehend) durchzuführen (**Versuch 23**). Die 35mm Plastik-Zellkulturgefäße wurden mit 0,4 ml Polymer-Kollagen-Lösung (entsprechend 1 mg PNIPAAm und 1 mg Kollagen-Typ-1 pro 35mm-Gefäß) beschichtet; ein Waschschrift wurde nach der Beschichtung nicht durchgeführt. Zur Herstellung des Tropfens wurden 5.000 C127M2-Zellen verwendet. Sonstige Schritte wie in 2.2.4 beschrieben. Nach Anwachsen der Zellen im Tropfen und Überschichtung mit Medium wurden die Zellkulturgefäße nach 0, 6, 18, 24 und 42 Stunden in Umgebungstemperatur (ca. 20°C) überführt und der Ablösevorgang unter dem invertierten Phasenkontrast-Mikroskop beobachtet: die Zellen waren angewachsen und vital; sie zeigten kaum apoptotische Veränderungen. Nach 30 Minuten Umgebungstemperatur (und später) war jedoch kein Ablösevorgang zu beobachten; auch mechanische Manipulationen (schnipsen an Zellkulturgefäß) lösten keinen Ablösevorgang aus. Die Prüfung der LCST der Polymer-Kollagen-Mischung ergab ca. 30°C. Mehrmalige Überprüfung der Temperatur des Wasserbades während des Aufbringens der Tropfen ergab stark schwankende Werte, die teilweise die LCST unterschritten. Es muß deshalb davon ausgegangen werden, daß die Beschichtung der Gefäße in den hydrophilen Zustand übergegangen war. Insbesondere erschien auch die Überführung der Tropfen und die Überführung der Gefäße mit aufgebracht Tropfen in den Brutschrank hinsichtlich der Temperatur als kritisch.

Zusammenfassung: Die Handhabung der beschichteten Zellkulturgefäße im Wasserbad erwies sich als unbrauchbar, da eine konstante Temperatur oberhalb der LCST nicht gewährleistet werden konnte; insbesondere erschien auch das Überführen der Tropfen auf die Gefäße und das Überführen der Gefäße in den Brutschrank als kritisch. Ein Ablösevorgang war nicht auslösbar. Zur Konstanthaltung der Temperatur wurden die folgenden Versuche im Brutraum bei konstanter Umgebungstemperatur von 37°C durchgeführt; auch alle verwendeten Materialien und Geräte wurden dort aufbewahrt.

3.6.1.2 Kollagen-Konzentration

In einem weiteren Versuch (**Versuch 24**), der bei 37°C im Brutraum während der relevanten Schritte durchgeführt wurde, sollte die Kollagen-Konzentration im Polymer-Kollagen-Gemisch gesenkt werden (von 0,25% auf 0,01%). Dieser Gedanke entstand aufgrund unterschiedlicher Angaben in der Literatur. Die 35mm Plastik-Zellkulturgefäße wurden mit 0,4 ml Polymer-Kollagen-Lösung (entsprechend 1 mg PNIPAAm und **0,04 mg Kollagen-Typ-1** pro 35mm-Gefäß) beschichtet; ein Waschschrift wurde nach der Beschichtung nicht durchgeführt. Zur Herstellung des Tropfens

wurden 5.000 C127M2-Zellen verwendet. Sonstige Schritte wie in 2.2.4 beschrieben. Nach Anwachsen der Zellen im Tropfen und Überschichtung mit Medium wurden die Zellkulturgefäße nach 0 und 8 Stunden in Umgebungstemperatur (ca. 20°C) überführt und der Ablösevorgang unter dem invertierten Phasenkontrast-Mikroskop beobachtet: wenige Zellen waren angewachsen; viele schwammen im Medium. Nach 30 Minuten Umgebungstemperatur (und später) war kein Ablösevorgang der angewachsenen Zellen zu beobachten; auch mechanische Manipulationen (schnipsen an Zellkulturgefäß) lösten keinen Ablösevorgang aus. Die Prüfung der LCST der Polymer-Kollagen-Mischung ergab ca. 30°C.

Zusammenfassung: Die Senkung der Kollagen-Konzentration und/oder die Durchführung des Versuchs im Brutraum führte dazu, daß weniger Zellen als mit der Standard-Konzentration anwachsen. Ein Ablösevorgang der wenigen angewachsenen Zellen war wiederum nicht auslösbar.

3.6.1.3 Schichtdicke

Aufgrund der Beobachtungen aus den zwei vorgenannten Versuchen (**Versuch 23 und 24**) ergab sich die Vermutung, daß eventuell die Schichtdicke des verwendeten Polymer-Kollagen-Gemisches zu gering sein könnte, und die Zellen deshalb die Möglichkeit haben könnten, sich an hervorstehenden „Bergspitzen“ (Unebenheiten) des Zellkulturgefäßes anzuheften, die höher als die Beschichtungsdicke herausragen könnten. Diese Vermutung erschien wahrscheinlich, da trotz erfolgreicher Testung der LCST kein Ablösevorgang eintrat und andere Zellkulturgefäße, als in der Literatur beschrieben, verwendet werden mußten. Aus diesem Grund wurde die Beschichtungsdicke verfünffacht, allerdings zunächst weiterhin mit niedriger Kollagen-Konzentration (0,01%) in der Polymer-Kollagen-Mischung (**Versuch 25**). Die 35mm Plastik-Zellkulturgefäße wurden **mit 2,0 ml Polymer-Kollagen-Lösung** (entsprechend **5 mg PNIPAAm** und **0,2 mg Kollagen-Typ-1** pro 35mm-Gefäß) beschichtet; ein Waschschrift wurde nach der Beschichtung nicht durchgeführt. Zur Herstellung des Tropfens wurden 5.000 C127M2-Zellen verwendet. Sonstige Schritte wie in 2.2.4 beschrieben. Auffällig war eine **Entfärbung des Mediums** nach Aufbringen der Tropfen und Überschichten der anwachsenden Tropfen. Da das Medium einen Indikator enthält, der sich im sauren Bereich entfärbt, lag die Vermutung nahe, daß die große Menge zugesetzter Essigsäure (= Lösungsmittel des Kollagens) diese Entfärbung verursacht hatte; andere Effekte konnten aber nicht ausgeschlossen werden. Nach Anwachsen der Zellen im Tropfen und Überschichtung mit Medium wurden die Zellkulturgefäße nach 0 und 5 Stunden in Umgebungstemperatur (ca. 20°C) überführt und der Ablösevorgang unter dem invertierten Phasenkontrast-Mikroskop beobachtet. **Abbildung 41 A-C** zeigt solchermaßen behandelte Zellsuspensions-Tropfen (sofort nach Überführung in

Umgebungstemperatur). Man sieht, daß wenige Zellen fest anhaften; die meisten sind abgerundet. In der mittleren Vergrößerung erkennt man gut den Rand des ehemaligen Tropfens. Nach 15 Minuten zeigte sich ein spontaner Ablösevorgang der schwach haftenden, abgerundeten Zellen. Die Prüfung der LCST der Polymer-Kollagen-Mischung ergab ca. 30°C. Da nicht klar war, ob die Zellen aufgrund beobachteter Entfärbung des Mediums (durch pH-Änderung oder andere Effekte) oder durch die geringe Kollagen-Konzentration (0,01% in der Polymer-Kollagen-Mischung) nicht anwuchsen, wurde ein weiterer Versuch mit fünffacher Schichtdicke, jedoch Standard-Kollagen-Konzentration (0,25%) in der Polymer-Kollagen-Mischung durchgeführt (**Versuch 26**). Die 35mm Plastik-Zellkulturgefäße wurden mit 2,0 ml Polymer-Kollagen-Lösung (entsprechend 5 mg PNIPAAm und **5 mg Kollagen-Typ-1** pro 35mm-Gefäß) beschichtet; ein Waschschrift wurde nach der Beschichtung nicht durchgeführt. Zur Herstellung des Tropfens wurden 5.000 C127M2-Zellen verwendet. Sonstige Schritte wie in 2.2.4 beschrieben. Auffällig war wiederum eine **Entfärbung des Mediums** nach Aufbringen der Tropfen und Überschichten der anwachsenden Tropfen. Die Ansätze wurden nach 32 Stunden Wachstum im Brutraum in Umgebungstemperatur überführt und unter dem Phasenkontrast-Mikroskop betrachtet: wenige Zellen hafteten fest an; die meisten waren abgerundet. Nach 15 Minuten zeigte sich ein spontaner Ablösevorgang der schwach haftenden, abgerundeten Zellen. Die Prüfung der LCST der Polymer-Kollagen-Mischung ergab ca. 30°C.

Zusammenfassung: Eine Verfünffachung der Schichtdicke des Polymer-Kollagen-Gemisches bewirkte ein Funktionieren des Ablösevorgangs, jedoch waren wenige Zellen fest angewachsen; die meisten waren abgerundet. Auffällig war die Entfärbung des Mediums nach Aufbringen der Tropfen und Überschichten der anwachsenden Tropfen.

3.6.1.4 Entfärbung des Mediums - relevant für die Vitalität der Zellen ?

Da sich die Verfünffachung der Schichtdicke des Polymer-Kollagen-Gemisches im Prinzip als günstig erwiesen hatte, wurde damit weitergearbeitet; ebenso wurde wieder die Standard-Kollagen-Konzentration (0,25%) im Polymer-Kollagen-Gemisch eingesetzt.

Um die Auswirkungen der Entfärbung des Mediums (durch Verschiebung des pH-Wertes oder durch andere Effekte) auf die Vitalität der Zellen zu untersuchen, wurden zusätzliche Waschschriffe mit Medium eingeführt mit dem Ziel, den sauren pH-Wert zu normalisieren und/oder andere (möglicherweise toxische) Stoffe zu entfernen. Im folgenden Versuch wurde zusätzlich ein Parallelansatz in Tropfentechnik ohne Beschichtung des Zellkulturgefäßes mitgeführt, um die Vitalität der Zellen mit (**Ansatz A**) und ohne (**Ansatz B**) Beschichtung des Zellkulturgefäßes vergleichen zu können (**Versuch 27**). Die 35mm Plastik-Zellkulturgefäße (**Ansatz A**) wurden mit 2,0

ml Polymer-Kollagen-Lösung (entsprechend 5 mg PNIPAAm und 5 mg Kollagen-Typ-1 pro 35mm-Gefäß) beschichtet; zusätzlich wurde jetzt ein **Waschschritt** nach der Beschichtung durchgeführt. Zur Herstellung des Tropfens wurden 5.000 C127M2-Zellen verwendet. Sonstige Schritte wie in 2.2.4 beschrieben. Eine Entfärbung des Mediums trat nach dem zusätzlichen Waschschritt nicht mehr ein. Die Ansätze wurden nach 48 Stunden Wachstum im Brutraum in Umgebungstemperatur überführt und unter dem Phasenkontrast-Mikroskop betrachtet. **Abbildung 41 D-F** zeigt den Kontrollansatz B (Zellkulturgefäße ohne Beschichtung). Man erkennt in der Übersichtsvergrößerung klar die runde Form des ehemaligen Tropfens und in der starken Vergrößerung angewachsene, vitale C127M2-Zellen, die teilweise criss-cross-Wachstum zeigen. **Abbildung 42 A-C** zeigt Ansatz A (Zellkulturgefäße mit Beschichtung) sofort nach Überführung in Umgebungstemperatur. In der Übersichtsvergrößerung sieht man wiederum deutlich die runde Form des ehemaligen Tropfens. In der starken Vergrößerung sieht man angewachsene C127M2-Zellen, die jedoch weniger proliferiert sind als im Parallelansatz B (**Abbildung 41 D-F**); es existieren Areale, die innerhalb der ehemaligen Tropfengrenze liegen, aber nicht von Zellen bedeckt sind. Der Pfeil markiert einen Zellhaufen, dessen Lage weiter verfolgt werden soll. **Abbildung 42 D-E** zeigt Ansatz A (gleicher Ansatz wie **Abbildung 42 A-C**) zum Zeitpunkt 35 Minuten nach Überführung in Umgebungstemperatur. Man erkennt, daß der Zellrasen sich abgelöst hat und frei flottiert (Pfeil). **Abbildung 42 F** zeigt den mittels Pipette mit abgeschnittener Spitze transferierten Zellrasen in einem hydrophoben Zellkulturgefäß mit PBS, kurz nach der Überführung. Der Zellrasen hat bereits begonnen sich zu kontrahieren. Die Prüfung der LCST der Polymer-Kollagen-Mischung ergab ca. 30°C.

Zusammenfassung: Der zusätzliche Medium-Waschschritt nach Trocknung der Polymer-Kollagen-Beschichtung führte dazu, daß sich das Medium nach Auftragen der Tropfen und Überschichten der Tropfen nicht mehr entfärbte. Die Zellen zeigten (verglichen z.B. mit **Versuch 25, Abbildung 41 A-C**) ein deutlich besseres Anwachs- und Proliferationsverhalten, das jedoch noch immer unterhalb dessen eines Parallelansatzes mit unbeschichteten Zellkulturgefäßen (Ansatz B) liegt. Der Ablösevorgang war erfolgreich (in Ansatz B zeigte sich keine Ablösung), auch war es möglich, den frei flottierenden Zellrasen mittels Pipette mit abgeschnittener Spitze in ein hydrophobes Zellkulturgefäß zu transferieren.

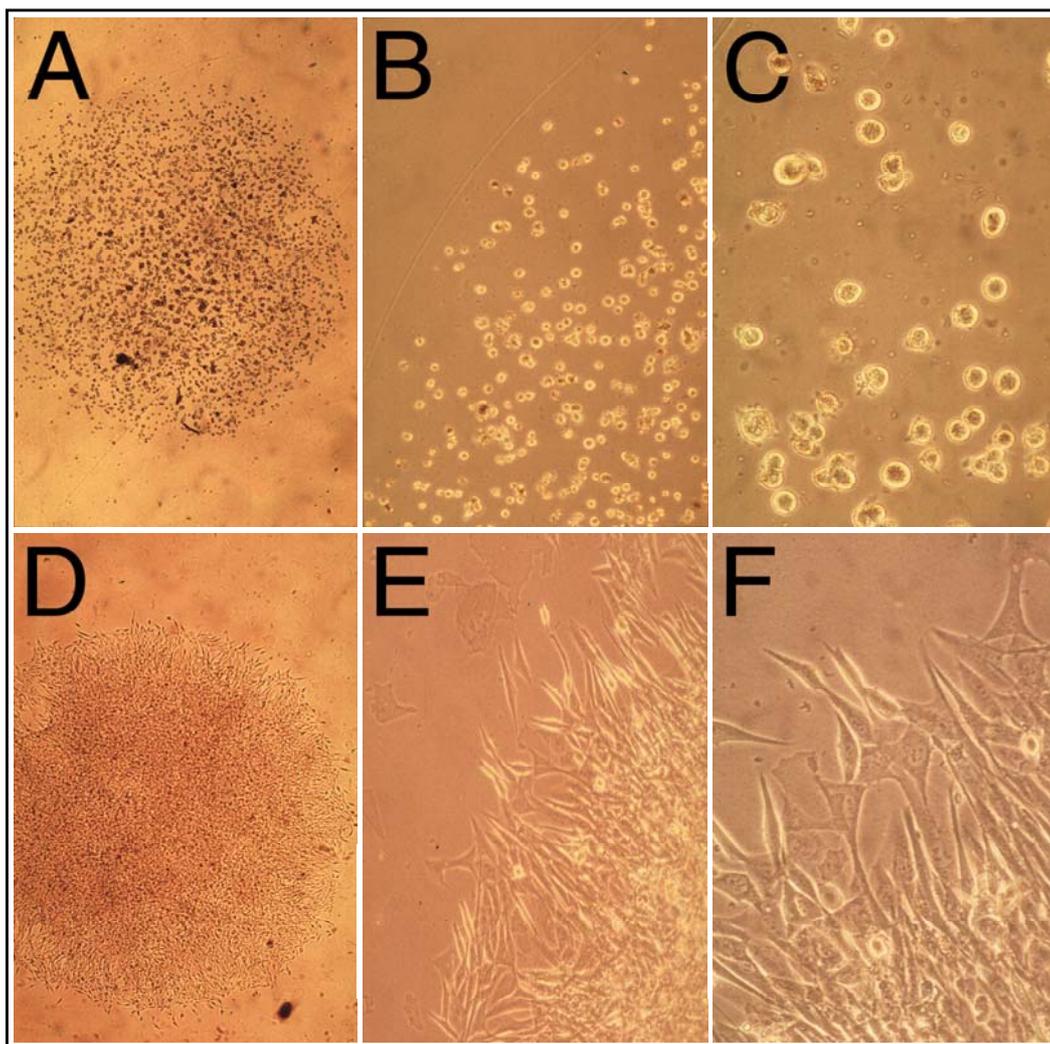


Abbildung 41: Kunststofftechnik

A-C: Versuch 25 (V15C): Beschichtung von 35mm (9,6 cm²) Plastik-ZellkulturgefäÙen mit 2,0 ml Polymer-Kollagen-Lösung, entsprechend 5 mg PNIPAAm und 0,2 mg Kollagen-Typ-1 pro 35mm-GefäÙ. Aufbringen von 4 Tropfen zu jeweils 7 µl Zellsuspension, bestehend aus jeweils 5.000 C127M2*, Passage 22 (*= markiert mit 100 µl 0,5 µm Fluospheres rot in 40 ml Medium, 96h) auf die beschichteten ZellkulturgefäÙe (Brutraum, 37°C, feuchte Kammer). Anwachsen der Zellen im Tropfen für 3h im Brutraum (bei 37°C, feuchte Kammer). Überschichten der Zellen mit 2,2 ml Medium (Brutraum, 37°C); anschließend weiterhin im Brutraum (37°C, feuchte Kammer). Überföhrung der ZellkulturgefäÙe in Umgebungstemperatur (ca. 20°C) nach 0 und 5 Stunden. **A-C:** 5 Stunden anwachsen; 0 Minuten nach Überföhrung. Dargestellt ist jeweils derselbe Ansatz in unterschiedlichen Vergrößerungen. **A:** Übersicht; **B:** mittlere Vergrößerung; **C:** starke Vergrößerung.

D-F: Versuch 27 (V15E): Beschichtung von 35mm (9,6 cm²) Plastik-ZellkulturgefäÙen mit 2,0 ml Polymer-Kollagen-Lösung, entsprechend 5 mg PNIPAAm und 5 mg Kollagen-Typ-1 pro 35mm-GefäÙ. **Zusätzlicher Waschschrift:** 3-maliges Waschen der beschichteten ZellkulturgefäÙe mit jeweils 3 ml Medium bei 37°C. Anschließend trocknen im Brutraum (2h bei 37°C, keine feuchte Kammer). Aufbringen von 4 Tropfen zu jeweils 7 µl Zellsuspension, bestehend aus jeweils 5.000 C127M2, Passage 24 auf die beschichteten ZellkulturgefäÙe (**Ansatz A**) bzw. auf unbeschichtete ZellkulturgefäÙe (**Ansatz B**). Anwachsen der Zellen im Tropfen für 2h im Brutraum (bei 37°C, feuchte Kammer). Überschichten der Zellen mit 2,2 ml Medium (Brutraum, 37°C, feuchte Kammer); anschließend weiterhin im Brutraum (37°C, feuchte Kammer). Überföhrung der ZellkulturgefäÙe (**Ansatz A** und **B**) in Umgebungstemperatur (ca. 20°C) nach 48 Stunden. **D-F:** Ansatz B (Kontrolle). Dargestellt ist jeweils derselbe Ansatz in unterschiedlichen Vergrößerungen. **D:** Übersicht; **E:** mittlere Vergrößerung; **F:** starke Vergrößerung.

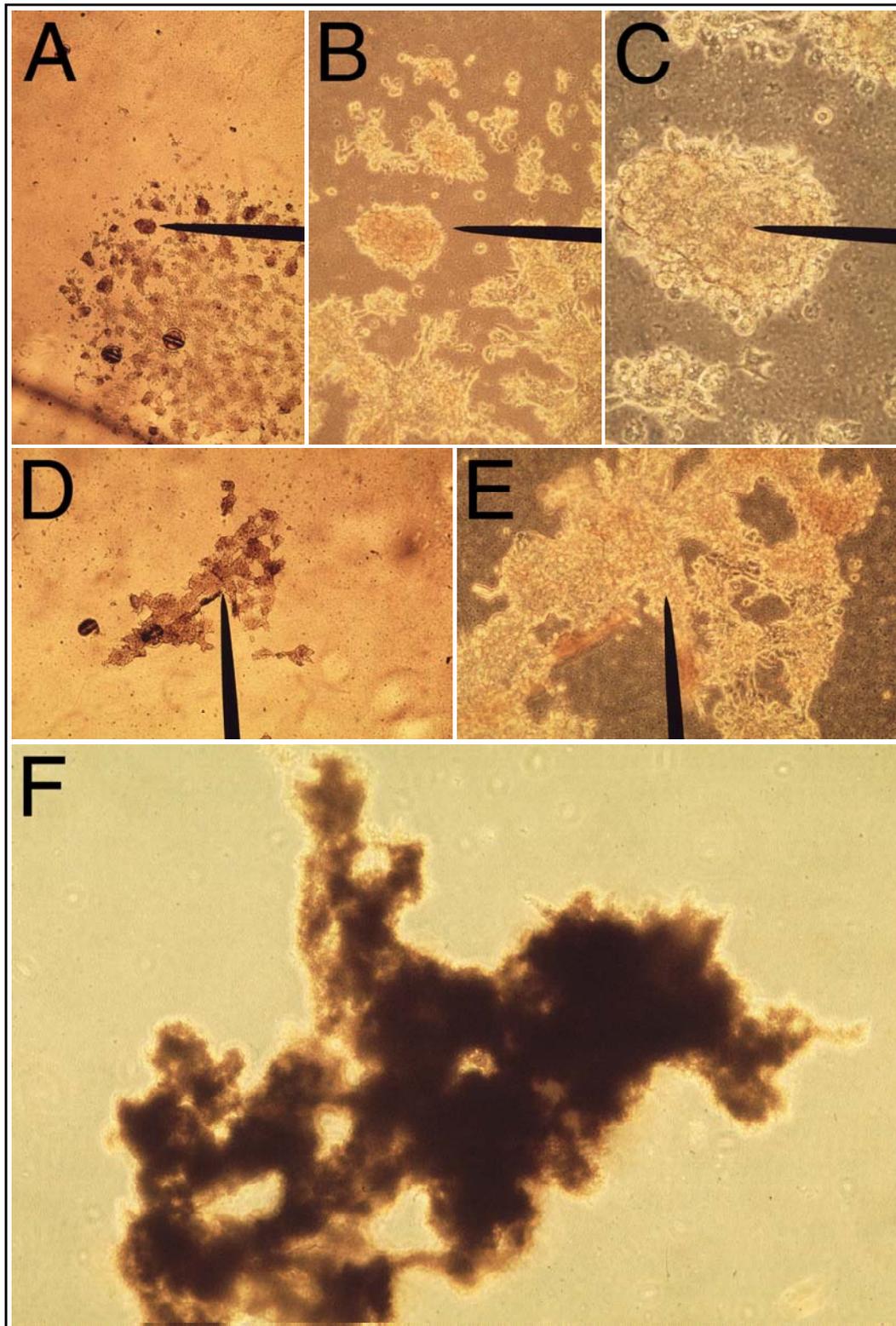


Abbildung 42: Kunststofftechnik

Versuch 27 (V15E): Versuchsbeschreibung siehe Legende zu Abbildung 41. **A-F: Ansatz A. A:** 0 Minuten, Übersicht; **B:** 0 Minuten, mittlere Vergrößerung; **C:** 0 Minuten, starke Vergrößerung; **D:** 35 Minuten, Übersicht; **E:** 35 Minuten, mittlere Vergrößerung; **F:** 35 Minuten; Mini-Sphäroid in PBS; mittlere Vergrößerung zweifach vergrößert.

3.6.1.5 Nutzung der neuentwickelten Methode

Nachdem der entscheidende Schritt geglückt war, sollte (6 Monate später) die Methode zur Erzeugung größerer Stückzahlen gefalteter „Mini-Sphäroide“ genutzt werden (**Versuch 28**). Dazu sollten nicht mehr einzelne 35mm-Zellkulturgefäße, sondern **9,8mm-48er-Gefäße** genutzt werden, um die Handhabbarkeit zu verbessern (weiterhin unter Verwendung der fünffachen Dicke der Polymer-Kollagen-Beschichtung, mit Standard-Kollagen-Konzentration (0,25%) und mit zusätzlichem Medium-Waschschritt). Die 9,8mm Plastik-Zellkulturgefäße wurden mit 150 µl ml Polymer-Kollagen-Lösung (entsprechend 0,4 mg PNIPAAm und 0,4 mg Kollagen-Typ-1 pro 9,8mm-Gefäß) beschichtet. Zur Herstellung des Tropfens wurden 500 C127M5-Zellen verwendet. Sonstige Schritte wie in 2.2.4 beschrieben. Eine Entfärbung des Mediums trat nach dem zusätzlichen Waschschritt nicht mehr ein. Die Ansätze wurden nach 24 Stunden Wachstum im Brutraum in Umgebungstemperatur überführt und unter dem Phasenkontrast-Mikroskop betrachtet: eine Anheftung der Zellen fand nicht statt. Es fanden sich frei schwimmende apoptotische und zum Teil nekrotische Zellen. Die Prüfung der LCST der Polymer-Kollagen-Mischung ergab ca. 30°C.

Zusammenfassung: Die Herstellung von Mini-Sphäroiden in großer Zahl in anderen Zellkulturgefäßen scheiterte 6 Monate später. Es fanden sich frei schwimmende apoptotische und nekrotische Zellen in den beschichteten Zellkulturgefäßen. Eine Ursachensuche war im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr möglich.

4 Diskussion

4.1 Möglichkeiten und Grenzen der verwendeten Sphäroidtechnik

4.1.1 Effektivität der Sphäroid-Entstehung

Die Herstellung von Sphäroiden mittels der hier dargestellten Technik nutzt das Bestreben adhärent wachsender Zellen aus, sich zu Gruppen zusammenzulagern, falls ihnen die Möglichkeit zur Anhaftung an einer Oberfläche genommen wird (in unserem System durch kontinuierliche Rotation und hydrophobe Oberflächen).

Ohne den zusätzlich eingeführten Zentrifugationsschritt, der eine Art Voraggregation der Zellen bewirken soll, war es in unserem System jedoch zunächst praktisch nicht möglich, brauchbare Sphäroide zu erhalten.

Für die Effektivität der Entstehung von Zellaggregaten während der Rollperiode scheinen mehrere Einflußfaktoren denkbar, die mehr oder weniger gut beeinflussbar sind:

1. Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens der im Medium flottierenden Zellen
2. Vorhandensein einer ausreichenden Zahl von funktionsfähigen Zelladhäsionsmolekülen
3. Fähigkeit, sich an der Gefäß-Oberfläche anzuheften

Im folgenden sollen diese Faktoren diskutiert werden.

Erhöhung der Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens von Zellen

Die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens der Zellen während der Rollperiode läßt sich erhöhen durch:

1. Verringerung des Medium-Volumens (bei gleichbleibender Zellzahl)
2. Verlängerung der Rollperiode
3. Verminderung der Rotationsgeschwindigkeit
4. Modifikation der Rotationsgeometrie
5. Voraggregation

Die genannten Maßnahmen haben Vor- und Nachteile. Durch die Verringerung des Medium-Volumens bzw. Verlängerung der Rollperiode würden die primär schon kritischen Lebensbedingungen der Zellen (800.000 Zellen in 1 ml Medium unter Sauerstoffabschluß) weiter verschlechtert; man muß davon ausgehen, daß sich die Zahl apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen stark erhöhen würde. Außerdem verschiebt eine Verlängerung der Rollperiode den ersten Entnahmezeitpunkt (Tag 0) weiter nach hinten; schnelle Vorgänge im Sphäroid entgehen damit der

Beobachtung.

Durch eine Verminderung der Rotationsgeschwindigkeit verringert sich die Durchmischung der Zellsuspension; die Zellen zeigen die Tendenz, zum Boden hin zu sedimentieren. Dadurch erhöht sich zwar die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens, ebenso steigt aber die Wahrscheinlichkeit, daß einzelne Zellen doch an der Oberfläche des Gefäßes anhaften.

Die Modifikation der Rotationsgeometrie bedarf vielleicht der Erläuterung. Durch Rotation der Eppendorf-Gefäße um die horizontale Achse (wie hier verwendet) entstehen Fliehkräfte, die Zellen eher vom Mittelpunkt des Gefäßes wegbewegen und damit die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens senken. Eine kreisförmige Bewegung um die vertikale Achse (spezielle Apparatur) zwingt Zellen jedoch dazu, sich im Mittelpunkt des Gefäßes anzusammeln, wodurch diesen die Adhäsion erleichtert wird.

Die Voraggregation durch leichte Zentrifugation, Ruhenlassen und erneute leichte Zentrifugation beschleunigt den Vorgang des Sedimentierens und erlaubt die Ausbildung schwacher Zellverbindungen bevor die Zellsuspension in kontinuierliche Rotation gebracht wird. Dieser Vorgang war makroskopisch sichtbar. Es bildete sich nach den Zentrifugationsschritten ein weißlicher „Zellteppich“ an der Wand des Gefäßes, der relativ stabil war und langsam begann, sich abzurollen. Dem voraggregierten „Zellteppich“ wurde anschließend während der Rollperiode die Möglichkeit zur Bodenadhäsion genommen. Die gewonnenen Daten zeigen, daß sich durch Einführung des zusätzlichen Zentrifugationsschrittes die Effektivität der Sphäroid-Entstehung erhöhen läßt. Auf die Zellvitalität läßt sich aufgrund der gewonnenen Daten kein negativer Einfluß erkennen; die Sphäroid-Entstehung und Differenzierung in verschiedene Zonen scheint lediglich beschleunigt zu werden. Dadurch besteht wiederum die Möglichkeit, die Rollperiode zu verkürzen (mit den oben genannten Vorteilen).

Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle sind für den Zusammenhalt von Zellen untereinander und für den Kontakt mit Oberflächen (z.B. Basalmembran) verantwortlich. Bei der Sphäroid-Entstehung lassen sich zwei Phasen der Zellkontakt-Ausbildung unterscheiden (Takezawa et al., 1993). Zunächst ermöglichen schwache Bindungskräfte (hauptsächlich über endständige Zuckermoleküle glycosylierter Proteine, Microvilli) einen losen Zusammenhalt der Zellen. Starke Bindungskräfte können zu diesem Zeitpunkt noch nicht wirksam werden, da einerseits Zelladhäsionsmoleküle durch die vorherige Behandlung mit Trypsin möglicherweise beschädigt sind, und andererseits keine Interzellulärsubstanz vorhanden ist, die gebunden werden könnte. Im Laufe der Zeit werden Zelladhäsionsmoleküle und Interzellulärsubstanz synthetisiert; die Bindungen werden stabiler. Es

ist denkbar, daß die oben geschilderte Voraggregation auf schwachen Bindungskräften beruht und nicht zwingend von Zelladhäsionsmolekülen abhängt. Hinweise darauf ergeben sich aus dem Verhalten transformierter und nicht-transformierter Zellen. Diese zeigen zunächst keinen Unterschied im Aggregationsverhalten; die „Voraggregation“ ist mit beiden Zellpopulationen gleichermaßen möglich. Später jedoch sind 208F-Reinkultur-Sphäroide wesentlich stabiler als 208Fsrc3-Reinkultur-Sphäroide. Man könnte in diesem Zusammenhang eine mangelhafte Synthese von Zelladhäsionsmolekülen oder Interzellulärsubstanz durch 208Fsrc3-Zellen bzw. Produktion eines Faktors, der Zelladhäsion vielleicht sogar behindert, vermuten, was eminente Bedeutung für das Metastasierungsverhalten haben könnte (Behrens, 1993).

Um die Effektivität der Sphäroid-Entstehung positiv zu beeinflussen, sind wiederum mehrere Möglichkeiten denkbar. Man könnte zum Beispiel – im Falle von Fibroblasten-Sphäroiden – durch Zusatz exogener Interzellulärsubstanz (Kollagen) den anfänglichen Mangel zu kompensieren versuchen. Zusätzlich sollte die Schädigung von Zelladhäsionsmolekülen durch Trypsin vermindert werden (durch Minimierung der Trypsinierungs-Zeit bzw. Verwendung einer anderen Methode zur Sphäroid-Herstellung).

Andererseits stellt die Fähigkeit zur Zellaggregation eine intrinsische Eigenschaft der verwendeten Zellen dar, deren Erforschung sicher von enormer Bedeutung sein kann. Es erscheint deshalb mindestens ebenso interessant, die Ursachen des Verlustes der Adhäsionsfähigkeit zu erforschen, als solche Zellen „mit Gewalt“ dazu zu zwingen, sich zusammenzulagern.

Nicht-adhäsive Oberflächen

Zellen, die nicht in das entstehende Sphäroid inkorporiert werden, schwimmen entweder weiterhin frei im Medium oder haben sich an der Oberfläche des Rotations-Gefäßes angeheftet. Um diese Fraktion möglichst klein zu halten, müssen Gefäße mit möglichst hydrophober Oberfläche verwendet werden, da benetzbare Oberflächen zur Zelladhäsion notwendig sind. Dies kann durch Verwendung eines entsprechenden Kunststoffes erfolgen, dessen Oberfläche möglicherweise sogar geladen ist und Zellen abstößt.

4.1.2 Gesteuerte Zellaggregation

Ein wesentlicher Vorteil unserer Methode ist die weitgehende Steuerbarkeit der Zellaggregation. Im Gegensatz zu anderen Methoden, wie zum Beispiel der Generierung von Sphäroiden durch Zellaggregation über Agarose und anschließende aufwendige Separierung der Sphäroide nach Größe, erlaubt unsere Methode eine exakte Festlegung der Ausgangszellzahl (in bestimmten Grenzen). Dadurch entfällt die relativ ungenaue Messung von Sphäroiddurchmessern und die

Berechnung von genäherten Zellzahlen aus diesen Messungen.

Man sollte jedoch nicht den Fehler machen, die Zellzahl im Sphäroid ungeprüft mit der eingesetzten Zellzahl gleichzusetzen. Die gewonnenen Daten zeigen, daß ein nicht unerheblicher Teil der eingesetzten Zellen weiterhin im Medium schwimmt und nicht in das Sphäroid aufgenommen wird. Ein anderer Teil haftet vermutlich trotz Verwendung hydrophober Gefäße an der Gefäß-Oberfläche an; der Anteil dieser Zellen wurde jedoch nicht quantitativ erfasst. Es wäre aber kein Problem, auch diesen Anteil durch Trypsinierung und anschließendes Auszählen zu ermitteln.

Durch Berücksichtigung dieser zwei Fraktionen ist es tatsächlich möglich, auch die (initiale) Zellzahl im Sphäroid mit hoher Genauigkeit zu ermitteln, falls dies nötig ist. Im Regelfall wird es jedoch ausreichen, die eingesetzte Zellzahl genau zu definieren und die Sphäroide unter stets gleichen Bedingungen herzustellen, sodaß der Anteil der inkorporierten Zellen möglichst konstant bleibt.

4.1.3 Herstellung von Sphäroiden nach „Bauplan“

Unsere Methode erlaubt es prinzipiell, Sphäroide nach fast beliebigen „Bauplänen“ herzustellen. Verschiedene Variationsmöglichkeiten wurden in dieser Arbeit verwendet (siehe 2.2.3.1), weitere sind denkbar. Durch Auswahl eines bestimmten „Bauplanes“ können unterschiedliche Aspekte der Tumorentstehung in vitro beleuchtet werden. So ist es aufschlußreich, das Verhalten einzelner transformierter Zellen gegenüber nicht-transformierten Zellen im Überschuß zu untersuchen (Mischkultur-Sphäroide) und stufenweise größere Gruppen transformierter Zellen einzubringen, um das Verhalten von „Mikrotumoren“ zu simulieren. Durch Verwendung von Kern-Mantel-Sphäroiden kann die Interaktionsfläche zwischen verschiedenen Zellpopulationen vergrößert und das Verhalten von Zellen in dieser Grenzzone untersucht werden. Man kann diese Gedankenexperimente beliebig komplex gestalten, es zeigte sich jedoch, daß es in der Praxis leider oft nicht ohne Weiteres gelingt, diese umzusetzen. Die Herstellung von Reinkultur- bzw. Mischkultur-Sphäroide gestaltete sich relativ problemlos. Sie ließen sich reproduzierbar herstellen; eine genaue Kontrolle ihrer Zusammensetzung war möglich. Schwieriger gestaltete sich die Herstellung von Kern-Mantel-Sphäroiden. Es zeigte sich, daß nach der relativ kurzen zweiten Rollperiode (4 Stunden) sehr wenige Zellen als „Mantel“ an den Sphäroid-Kernen anhafteten (Identifikation der zwei Zellpopulationen durch Fluosphere-Markierung, siehe unten). Im Laufe der Zeit entsteht zwar eine dickere „Mantelzone“, es ist jedoch zu bezweifeln, daß sich diese Zone ausschließlich aus den eingesetzten „Mantelzellen“ bildet. Beispielhaft sei **Versuch 9** (siehe 3.3.1) genannt. Trotz Herstellung eines Mantels ausschließlich aus nicht-markierten, nicht-transformierten Zellen finden sich massenhaft Fluospheres in der Mantelzone. Dies kann mehrere Ursachen haben

(siehe 4.3). Eine Interpretationsmöglichkeit ist, daß nur ein dünner Mantel nicht-markierter, nicht-transformierter Zellen entstand, daraufhin markierte Zellen (aus der Innenzone) in der Mantelzone stark proliferierten und dadurch ihre Markierung „verdünnt“ wurde. Diese Erklärung wird durch die Beobachtung unterstützt, daß an frühen Beobachtungszeitpunkten (bei Markierung der Mantelzellen) stets nur ein sehr dünner Mantel sichtbar war (**Versuch 17**, siehe 3.5.3).

Aufgrund genannter Beobachtungen muß man davon ausgehen, daß nur ein sehr geringer Teil der eingesetzten Mantelzellen wirklich am Sphäroid-Kern anhaftete. Es wurde versucht, diesen Anteil zu erhöhen, indem wiederum eine Art Voraggregation durch Zentrifugation durchgeführt wurde (**Versuch 22**, siehe 3.5.6). Dies führte dazu, daß sich der Mantel nicht zirkulär um den Sphäroid-Kern anordnete, sondern an einem Pol des Sphäroid-Kerns anhaftete. Denkbar wäre eine Verlängerung der zweiten Rollperiode, um den Anteil anhaftender Zellen zu erhöhen, was jedoch wiederum ungünstige Auswirkungen auf die Zellvitalität haben könnte.

4.1.4 Einblick in das Innere der Sphäroide

Frühe Studien über Sphäroide mußten sich damit begnügen, Aussagen über das Verhalten des Sphäroids als Ganzes zu machen. Es handelte sich dabei vor allem um Untersuchungen, die sich mit dem Absterben von Tumorzellen in Sphäroiden nach radioaktiver Bestrahlung oder Behandlung mit Chemotherapeutika beschäftigten (Sutherland et al., 1970/1971; Inch et al., 1970). Oft wurde der Rückgang des Sphäroid-Durchmessers als Maß für die Wirksamkeit der Therapie verwendet. Es zeigte sich jedoch, daß diese Messungen aufgrund der zellulären Heterogenität im Sphäroid zu ungenau waren; es war wünschenswert, Aussagen über das Schicksal *einzelner Zellen* zu machen. Dazu muß der künstliche Zellverband irgendwie zugänglich gemacht werden. Dies kann durch histologische Schnitte, selektive Dissoziation (Auswertung im Durchfluß-Zytometer) sowie neuerdings durch „nicht-invasive Verfahren“ wie NMR und PET erreicht werden (Kunz-Schughart et al., 1998, review). Alle Methoden haben ihre spezifischen Vor- und Nachteile. Die hier verwendete histologische Aufarbeitung mittels Gefrierschnitten besitzt den wesentlichen Vorteil, daß sie tatsächlich Aussagen über einzelne Zellen erlaubt, die an Ort und Stelle verbleiben. Dadurch sind Aussagen über räumliche Interaktionen möglich. Der Nachteil des Verfahrens besteht darin, daß es - Fixierung des Sphäroids voraussetzend - nur „post mortem“-Untersuchungen ermöglicht; zudem ist es relativ arbeitsaufwendig. Die selektive Auflösung von Sphäroiden erlaubt keine Aussagen über räumliche Interaktionen, ermöglicht es aber, vitale Zellen zu untersuchen. Die neuen Verfahren wie NMR und PET sind noch Gegenstand der Forschung und haben (noch) nicht das Auflösungsvermögen, um einzelne Zellen zu verfolgen.

4.1.5 Markierung mit Fluospheres

Die Markierung von Zellen mit phagozytischen Fluospheres erlaubt deren spätere Identifikation in Sphäroid-Schnitten. Sie hat den Vorteil, daß sie einfach und unkompliziert durchzuführen und von der Proteinsynthese der markierten Zellen unabhängig ist (im Gegensatz z.B. zur Markierung mit Green Fluorescent Protein). Einige kritische Punkte und offene Fragen bleiben bestehen. Eine Zellmarkierung sollte dauerhaft und eindeutig sein und den Stoffwechsel der markierten Zelle möglichst nicht beeinflussen.

Die beiden ersten Punkte gestalten sich problematisch. Mit Fluospheres markierte Zellen verlieren ihre Markierung zusehends, wenn sie proliferieren, da die vorhandene Fluosphere-Menge sich auf die Nachkommen aufteilen muß (C. Schermer, unpublished). Deshalb kann man nur das Schicksal nicht-proliferierender Zellen dauerhaft verfolgen. Dies stellt sicher eine wesentliche Einschränkung dar, weil nicht-proliferierende Zellen mit Sicherheit andere Eigenschaften besitzen als proliferierende (Bredel-Geissler et al., 1992). Andererseits kann man aus der „Verdünnung“ der Markierung wiederum – mit einiger Vorsicht – Informationen über das Proliferationsverhalten selbst erhalten. Auch die Eindeutigkeit der Markierung stellt einen kritischen Punkt dar. Gerade wenn apoptotische Zellen untersucht werden, stellt sich die Frage, was mit Fluospheres passiert, die aus dem Zytoplasma apoptotischer Zellen möglicherweise austreten. Falls diese von Nachbarzellen phagozytiert oder gar innerhalb des Sphäroids transportiert werden, ist eine eindeutige Zuordnung nicht mehr möglich (siehe auch „freie Fluospheres“, unten).

Der letzte Punkt ist vielleicht am schwierigsten zu untersuchen. Zwar sind Fluospheres relativ inerte Kunststoffpartikel, die kaum chemisch reagieren können; kann man jedoch ausschließen, daß eine große Zahl solcher Partikel, die einen entsprechenden Raum im Zytoplasma der Zelle einnehmen, zum Beispiel intrazelluläre Transportvorgänge behindern? In Monolayer-Versuchen zeigte sich zumindest keine hemmende Wirkung auf die interzelluläre Induktion der Apoptose (C. Schermer, unpublished), alle möglichen Interaktionen können aber schwerlich untersucht werden. In den Sphäroid-Versuchen gab es schwache Hinweise darauf, daß eine Markierung mit Fluospheres die Zellvitalität im Sphäroid beeinflussen könnte (**Versuch 16**, siehe 3.5.2 bzw. **Versuch 17**, siehe 3.5.3).

Das Problem der „freien Fluospheres“

Schon zu Beginn der Sphäroidkultur (Tag 0 bzw. 1) fanden sich in Mischkultur-Sphäroiden (Markierung der transformierten Zellen) bei Verwendung eines geeigneten Fluoreszenz-Filters einzelne, diffus verteilte Fluospheres zwischen den markierten und nicht-markierten Zellen (**Versuch 6**, siehe 3.1.3.1). Das Phänomen verstärkte sich zu späteren Entnahmezeitpunkten hin, dann zeigten sich auch zonale Unterschiede (siehe 4.3). Es kann praktisch ausgeschlossen werden,

daß es sich dabei um einzelne Fluospheres handelt, die trotz Wasch- und Zentrifugationsschritten noch im Medium der zu markierenden Zellen vorhanden waren, da in direkt vor dem Sphäroid-Aufbau untersuchten Zellsuspensionen keinerlei „freie Fluospheres“ sichtbar waren (obwohl die verwendete Auflösung und der verwendete Fluoreszenzfilter prinzipiell dazu geeignet waren; **Versuch 7**, siehe 3.1.3.1).

Es stellt sich die Frage, woher dann diese „freien Fluospheres“ kommen können. Mehrere Möglichkeiten sind denkbar:

1. Es könnte sich um Fluospheres handeln, die an der Oberfläche der zu markierenden Zellen haften und noch nicht phagozytiert wurden. Durch mechanische Kräfte während der Rollperiode könnten diese abgelöst werden, sich diffus verteilen und von Nachbarzellen phagozytiert werden.
2. Durch die verwendete Dünnschnitt-Technik könnten Fluospheres aus markierten Zellen herausgelöst werden, an der Klinge des Messers haften und über die gesamte Schnittfläche verteilt werden.
3. Fluospheres könnten aus apoptotischen (oder sogar nicht-apoptotischen) Zellen austreten, sich diffus verteilen und von Nachbarzellen phagozytiert werden. Dagegen spricht der geringe Anteil markierter apoptotischer Zellen während des gesamten Versuchsablaufes bzw. die konstant starke Markierung apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellen in der Innenzone.
4. Durch Proliferation können aus einer stark markierten Einzelzelle mehrere schwach markierte Zellen hervorgehen. Setzt sich dieser Vorgang fort, kann der Eindruck diffus verteilter Fluospheres entstehen. Dagegen spricht das Vorhandensein „freier Fluospheres“ schon an sehr frühen Entnahmezeitpunkten, an denen praktisch keine Proliferation stattgefunden haben kann. Außerdem spricht die konstant starke Markierung einzelner Zellen gegen den Ablauf dieses Vorganges in der Innenzone (siehe jedoch 4.3).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es sich bei der Technik der Markierung mit Fluospheres um eine brauchbare und zuverlässige Methode handelt, wenn man ihre Einschränkungen beachtet. Die wesentlichste Einschränkung scheint mir dabei zu sein, daß proliferierende Zellen nicht über längere Zeiträume verfolgt werden können. Die Eindeutigkeit der Markierung ist gegeben, wenn ausschließlich stark markierte Zellen berücksichtigt werden, deren Kern zweifelsfrei den Fluospheres im Zytoplasma zuzuordnen ist. Einzelne „freie Fluospheres“ stellten dabei kein gravierendes Problem dar, da sie ausschließlich mit speziellem Filter sichtbar waren und die Auswertung nicht beeinträchtigten. Um die Beeinflussung des Zellstoffwechsels durch Fluospheres zu erfassen, sollte günstigstenfalls stets ein Kontrollansatz mitgeführt werden.

Leider kann aber im Sphäroid-System auf eine Markierung zur Unterscheidung der Zellen nicht verzichtet werden, sodaß diese Beeinflussung wohl in Kauf genommen werden muß, zumal andere Markierungstechniken sicherlich weitergehend in den Zellstoffwechsel eingreifen.

4.1.6 Bedeutung der Sphäroid-Kulturbedingungen

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Sphäroid-Kultur verwendet: „Eppendorf-Rotationskultur“ und später „statische Costar-Kultur“. Die Überlegung, die zum Wechsel der Sphäroid-Kulturbedingungen führte, bestand darin, die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Sphäroids zu verbessern. Man muß davon ausgehen, daß die Bedingungen in der Eppendorf-Rotationskultur (800.000 Zellen in 1 ml Medium unter Sauerstoffabschluß, täglicher Mediumwechsel, kontinuierliche Rotation) kritisch sind. Untersuchungen von Zellen unter Mangelbedingungen (Tropfentechnik; 2.500 Zellen in 7 µl Medium) ergaben einen Abfall der Survival-Faktor-Konzentration während dieser Zeit (M. Herdener, unpublished). In der Literatur wird ein steiler Abfall des Sauerstoff-Partialdruckes und der Glucose-Konzentration mit zunehmender Eindringtiefe im Sphäroid beschrieben (Carlsson et al., 1988; Adam et al., 1990; Byrne et al., 1996). Dieser Abfall setzt bereits *außerhalb* des Sphäroids ein. Ist nun schon der Sauerstoff-Partialdruck *im Medium* stark reduziert, so herrschen im *Zentrum* des Sphäroids wahrscheinlich sehr niedrige Sauerstoff-Partialdrucke.

In der Hoffnung, diese Situation zu verbessern, wurde die statische Costar-Kultur eingeführt (800.000 Zellen in 3 ml Medium, freie Sauerstoffzufuhr, täglicher Mediumwechsel, stehend im Brutschrank). Aus den gewonnenen Daten läßt sich jedoch kein Vorteil einer der beiden Methoden ableiten (**Versuch 12**, siehe 3.4.1.1). Wie läßt sich diese Beobachtung erklären?

1. In der Literatur werden große Unterschiede der Sauerstoffgradienten je nach Zellart und Meßmethode beschrieben (Carlsson et al., 1988). Es könnte also sein, daß selbst in der Eppendorf-Rotationskultur für diese Zellart keine kritischen Bedingungen vorlagen (es entstand niemals eine zentrale Nekrosezone, siehe 3.2). Eine Verbesserung der Bedingungen hätte in diesem Fall keine sichtbaren Konsequenzen.
2. Es wäre möglich, daß selbst durch Umstellung der Sphäroid-Kulturtechnik die Bedingungen nicht soweit verbessert wurden, daß dieses meßbar gewesen wäre. In der Literatur (Acker et al., 1987) finden sich Hinweise, daß selbst bei freier Sauerstoffzufuhr kritische Gradienten im Sphäroid entstehen, wenn das Medium nicht kontinuierlich durchmischt wird.
3. Als letzte Möglichkeit ist denkbar, daß die verwendeten Meßmethoden nicht geeignet waren, um diskrete Unterschiede in der Zellvitalität zu ermitteln.

Letztendlich blieb unklar, ob die Lebensbedingungen innerhalb der Sphäroide kritisch waren und ob diese evtl. durch andere Sphäroid-Kulturbedingungen verbessert werden können. Dazu sind verfeinerte Meßmethoden (Sauerstoff-Partialdruckmessung mit Mikroelektroden, Hypoxie-sensitive Färbemethoden u.a.) nötig. Für zukünftige Experimente sollte ggf. die standardisierte „roller bottle“-Technik verwendet werden, die eine gute Sauerstoffversorgung *und* eine kontinuierliche Durchmischung des Mediums garantiert.

4.1.7 Zusatz exogener Stoffe

Neben der praktisch beliebigen räumlichen Anordnung verschiedener Zellpopulationen stellt deren getrennte Manipulierbarkeit einen entscheidenden Vorteil der hier verwendeten Sphäroidtechnik dar. So können zum einen Zellpopulationen getrennt „vorbehandelt“ werden (**Versuch 13**, siehe 3.4.2.1), bevor sie im Sphäroid in Kontakt kommen, und zum anderen bereits bestehende Sphäroide verschiedensten exogenen Stoffen ausgesetzt werden (**Versuch 19**, siehe 3.5.4.2). Daraus ergeben sich weitere faszinierende Möglichkeiten. Denkbar erscheint zum Beispiel der Zusatz exogener Tumor-Promotoren; entweder direkt im Medium des Sphäroids oder durch Miroinjektion. Falls exogene Stoffe dem Medium zugesetzt werden, muß deren Diffusionsfähigkeit innerhalb des Sphäroids beachtet werden (Carlsson et al., 1989).

4.1.8 Kunststofftechnik

Die Kunststofftechnik wurde innerhalb dieser Arbeit als Kombination verschiedener Methoden entwickelt. Sie soll es ermöglichen, praktisch beliebig große, genau definierte Zellpopulationen (z.B. 10, 100, 1000 Zellen) in ein Sphäroid einzubringen und später wieder zu lokalisieren (Details zur Methodik siehe 3.6 und 2.2.4). Warum eine so aufwendige Methode? Folgende Forderungen mußten erfüllt werden:

1. Die Zellzahl mußte genau definierbar sein.
2. Es mußte möglich sein, eine große Anzahl von Mini-Sphäroiden herzustellen.
3. Es sollte sich nicht um einen *klonalen* Ansatz handeln.
4. Die Mini-Sphäroide mußten ausreichend gut markiert sein.

Die beschriebene Methode erfüllt theoretisch alle diese Anforderungen. Praktisch ergaben sich jedoch einige Probleme, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr vollständig gelöst werden konnten. Es gelang nach mehreren Optimierungsschritten (**Versuch 23-27**, siehe 3.6.1.1 bis 3.6.1.4) zwar, den Ablösevorgang herbeizuführen, der Versuch, 6 Monate später eine größere Anzahl von Mini-Sphäroiden herzustellen, misslang jedoch (**Versuch 28**, siehe 3.6.1.5). Dafür erscheinen zwei Ursachen denkbar. Zum einen wurden Zellkultur-Gefäße eines anderen Herstellers (Costar)

verwendet. Dies kann durchaus einen Einfluß auf das Anwachs-Verhalten der Zellen haben, erklärt jedoch nicht den hohen Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen (**Versuch 28**, siehe 3.6.1.5). Dafür könnte vielmehr die PNIPAAm-Lösung verantwortlich sein, die laut Auskunft von Dr. Hanselmann, Institut für Makromolekulare Chemie, Freiburg, nach 6-monatiger Lagerung (wässrige Lösung) durchaus Zeichen der Zersetzung zeigen könnte (Nachweis durch Gaschromatographie). Die möglicherweise entstehenden Monomere sind zytotoxisch (Takezawa et al., 1990). Das Problem ließe sich umgehen, indem die Kunststoff-Lösung jeweils frisch angesetzt wird.

Auch wenn die Methode nicht vollständig etabliert werden konnte, bietet sie dennoch interessante Perspektiven für zukünftige Experimente. Die Möglichkeit, praktisch beliebig große markierte Zellgruppen in ein Sphäroid einzubringen, kann für verschiedenste Fragestellungen genutzt werden. Zum Beispiel wäre es denkbar, Tumorzellen einzusetzen und damit die Entstehung von Mikrometastasen zu simulieren oder die Differenzierung embryonaler Zellen in Abhängigkeit verschiedener Nachbarzellen zu untersuchen. Je nach Fragestellung kann die Methode modifiziert werden. Soll zum Beispiel ein *klonaler* Ansatz verfolgt werden, vereinfacht sich die Methode deutlich. Es ist dann möglich, die gewünschte Zellpopulation *dispers* im Kunststoff-Kollagenbeschichteten Zellkultur-Gefäß auszusäen, die Entstehung der gewünschten Klone abzuwarten, die Zellen dann zu markieren und abzulösen. Dadurch kann die Anwendung der Tropfentechnik umgangen werden.

4.2 Zonale Heterogenität im Sphäroid

Im Folgenden soll versucht werden, den dreischichtigen Aufbau der Sphäroide im 208F/208Fsrc3-System zu erläutern, mit bestimmten Eigenschaften zu korrelieren und nach Erklärungsmöglichkeiten zu suchen.

4.2.1 Mantelzone

Morphologie und Eigenschaften

In der Mantelzone findet man relativ große, ovale Kerne, die einen deutlichen Nucleolus erkennen lassen. Die Zellagen zeigen ein „epithelartiges“ Aussehen. In der Bis-Benzimidin-Färbung fluoresziert der Großteil der Kerne mäßig stark; einzelne stark fluoreszierende kondensierte, fragmentierte Kerne sind zu erkennen (**Versuch 8**, siehe 3.2). Diese kondensierten, fragmentierten Kerne zeigen auch in der TUNEL-Färbung starke Fluoreszenz, wohingegen der Großteil der Kerne in der Mantelzone kaum Fluoreszenz in der TUNEL-Färbung aufweist (**Versuch 20**, siehe 3.5.5). TUNEL- und Bis-Benzimidin-Färbung zeigen gute Korrelation (**Versuch 21**, siehe 3.5.5.1). Die

Breite der Mantelzone bleibt im gesamten Beobachtungszeitraum relativ konstant bei 10-30 Zellagen bzw. nimmt leicht ab (**Versuch 18**, siehe 3.5.4.1 bzw. **Versuch 19**, siehe 3.5.4.2). Die Breite der Mantelzone läßt sich durch Modifikation der Versuchsbedingungen kaum beeinflussen (**Versuch 19**, siehe 3.5.4.2). Zu Anfang vorhandene markierte Zellen verlieren ihre eindeutige Markierung zugunsten diffus verteilter Fluospheres (**Versuch 9**, siehe 3.3.1).

Deutung

Aus der Zusammenschau dieser Daten läßt sich vermuten, daß es sich bei der Mehrzahl der Zellen in der Mantelzone um vitale, proliferierende Zellen handeln könnte. Dafür sprechen vor allem die Kernmorphologie mit kaum kondensiertem Chromatin und deutlichem Nucleolus sowie die vermutlich ablaufenden Zellteilungen. Auf ablaufende Zellteilungen deutet die diffuse Verteilung zunächst lokalisiert vorhandener Fluospheres hin (siehe 4.3). Der Prozentsatz apoptotischer Zellen in der Bis-Benzimidin- und TUNEL-Färbung ist sehr niedrig und liegt nicht über dem vergleichbarer Monolayer-Zellkulturen. Daraus läßt sich schließen, daß in dieser Zone wohl keine Mangelbedingungen hinsichtlich Sauerstoff- und Nährstoffversorgung bestehen dürften. Bis-Benzimidin- und TUNEL-Färbung zeigen in dieser Zone gute Korrelation; kondensierte und fragmentierte Kerne in der Bis-Benzimidin-Färbung weisen stets auch eine hohe Zahl von DNA-Strangbrüchen auf (sichtbar durch helle Fluoreszenz in der TUNEL-Färbung), wohingegen „ausgestreckte“ Kerne kaum DNA-Strangbrüche zeigen (schwache Fluoreszenz in der TUNEL-Färbung). Es scheint also ein Apoptose-Programm abzulaufen, das in den betroffenen Zellen alle beschriebenen Veränderungen hervorzurufen vermag (und nicht auf einer bestimmten Stufe vorzeitig abgebrochen wird, siehe 4.2.3). Interessanterweise zeigt die Breite der Mantelzone kaum eine Abhängigkeit von den eingesetzten Versuchsbedingungen. Setzt man radiale Diffusionsgradienten für Sauerstoff und Nährstoffe voraus, so sollte eine Erhöhung der Konzentration dieser Stoffe im umgebenden Medium eigentlich zu einer Verbreiterung der Mantelzone führen, wenn man annimmt, daß deren Breite durch eine bestimmte minimale Konzentration der genannten Stoffe limitiert wird. Warum kann dieses Phänomen nicht beobachtet werden? Zum Einen erscheint es denkbar, daß die eingesetzten Variationen der Versuchsbedingungen zu gering waren, um einen meßbaren Effekt hervorzurufen. Es wurde zwar die Serumkonzentration und damit die Konzentration von exogenen Wachstumsfaktoren, Aminosäuren usw. erhöht; die Konzentration des wichtigsten Energielieferanten, der Glucose, wurde dadurch aber wenig beeinflußt. Ebenso wurde zwar versucht, die Sauerstoff-Konzentration durch Umstellung der Sphäroid-Technik zu verbessern, die Effektivität dieser Maßnahme blieb jedoch unklar (fehlende Durchmischung des Mediums in der „statischen Costar-Kultur“, siehe

4.1.6). Zum Anderen ist es denkbar, daß selbst eine drastische Verbesserung der Lebensbedingungen nicht zu einer meßbaren Breitenzunahme der Mantelzone führen könnte, falls diese Veränderung direkt mit einem stärkeren Proliferationsverhalten der äußeren Mantelzone beantwortet würde. Dies würde wiederum einen steileren Sauerstoff- und Nährstoffgradienten induzieren (falls das stärkere Proliferationsverhalten mit einem höheren Sauerstoff- und Nährstoffverbrauch einhergeht). Dadurch könnte ein Gleichgewicht zwischen Proliferation in der äußeren Mantelzone und Zelltod in der inneren Mantelzone entstehen, sodaß im Endeffekt die Breite der Mantelzone relativ gesehen konstant bliebe.

Um genauere Auskunft über die Eigenschaften der Zellen in der Mantelzone zu erhalten, bietet sich der Einsatz spezieller Verfahren wie der selektiven Dissoziation bzw. spezieller Färbetechniken (z.B. der Markierung proliferierender Zellen: Lohr et al., 1995) sowie deren Kombination (selektive Dissoziation und Verwendung eines potentialabhängigen Farbstoffes zur Messung des Mitochondrien-Membranpotentials: Kunz-Schughart et al., 1997b) an. Häufig wird auch der Sauerstoff-Partialdruck mittels Mikroelektroden gemessen, die in definierte Tiefe ins Sphäroid eingebracht werden (Acker et al., 1987). Auf diese Weise gewonnene Daten in anderen Zellsystemen zeigen gute Übereinstimmung mit den oben genannten Vermutungen. Zellen in der „äußeren Zone“ scheinen demnach zu proliferieren (Lohr et al., 1995) und ein intaktes Mitochondrien-Potential zu besitzen (Kunz-Schughart et al., 1997b). Der Sauerstoff-Partialdruck und die Glucose-Konzentration fallen zwar innerhalb der „äußeren Zone“ stark ab, jedoch nicht unterhalb kritischer Werte (Acker et al., 1987).

Zellen in der Mantelzone scheinen daher am ehesten mit Zellen in **einem natürlichen, vaskularisierten Gewebe** vergleichbar zu sein, da sie über eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung verfügen. Die Diffusionsstrecken in der Mantelzone sind mit der interkapillären Distanz im vaskularisierten Gewebe vergleichbar (Sutherland, 1988). Im Unterschied zum ruhenden, nicht-malignen Gewebeverband ist jedoch ein Zellsystem-abhängiges Proliferationsverhalten zu beobachten, welches die Vergleichbarkeit möglicherweise stark einschränkt.

4.2.2 Apoptosezone

Morphologie und Eigenschaften

Weiter zum Zentrum hin schließt sich die Apoptosezone mit kondensierten, fragmentierten Kernen, Zelltrümmern sowie zahlreichen Leerräumen an. In der Bis-Benzimidin-Färbung zeigen diese kondensierten, fragmentierten Kerne starke Fluoreszenz (**Versuch 8**, siehe 3.2), auch in der TUNEL-Färbung fluoreszieren sie mäßig stark bis stark (**Versuch 20**, siehe 3.5.5).

Die Breite der Apoptosezone läßt sich durch Modifikation der Versuchsbedingungen nur wenig beeinflussen (**Versuch 19**, siehe 3.5.4.2); eine leichte Abhängigkeit von der Dichte der Zellkulturflaschen scheint aber zu bestehen (**Versuch 18**, siehe 3.5.4.1). Eine Apoptosezone tritt unabhängig davon auf, ob nicht-transformierte 208F-Zellen oder transformierte 208Fsrc3-Zellen in Rein- oder Kokultur eingesetzt werden (in 208Fsrc3-Reinkultur-Sphäroiden tritt eine Apoptosezone jedoch später und in geringerer Ausprägung auf); auch deren räumliche Anordnung zeigt keinen Einfluß auf die Entstehung einer Apoptosezone (**Versuch 16**, siehe 3.5.2 bzw. **Versuch 17**, siehe 3.5.3). Eindeutig markierte Kerne sind kaum mehr nachweisbar; es tritt eine Anhäufung „freier Fluospheres“ an der Grenze zwischen Mantel- und Apoptosezone auf, falls markierte Zellen verwendet wurden (**Versuch 9**, siehe 3.3.1).

Deutung

Zellkerne in der Apoptosezone zeigen sowohl in der Bis-Benzimidin als auch in der TUNEL-Färbung eindeutige Apoptose-Merkmale. Auch hier scheint also ein Apoptose-Programm abgelaufen zu sein, das in den betroffenen Zellen alle beschriebenen Veränderungen hervorzurufen vermag (und nicht auf einer bestimmten Stufe vorzeitig abgebrochen wird, siehe 4.2.3). Zwei entscheidende Fragen ergeben sich aus den Beobachtungen:

1. Sind die apoptotischen Kerne an Ort und Stelle entstanden oder wurden sie passiv dorthin transportiert?
2. Was ist die Ursache für den massiven programmierten Zelltod?

Setzt man voraus, daß die apoptotischen Kerne an Ort und Stelle entstanden sind (also zirkulär angeordnet zwischen Mantel- und Innenzone), so ergeben sich folgende Erklärungsmöglichkeiten für den massiven programmierten Zelltod:

1. Es könnte sich um Zellen handeln, die zwar zunächst (durch günstige Lebensbedingungen) das Signal erhielten, in die Teilungsphase einzutreten, später jedoch unter Mangelbedingungen gerieten und dadurch den programmierten Zelltod initiierten (zum Beispiel durch p53-abhängige Hypoxie-induzierte Apoptose: Graeber et al., 1996), während Zellen in der Innenzone möglicherweise stets in der G₀-Phase verharren (und deshalb ähnlich einer konfluenten Monolayer-Kultur einen niedrigeren Sauerstoff- und Nährstoffbedarf haben: Bredel-Geissler et al., 1992) beziehungsweise das Apoptose-Programm dort nicht zu Ende ausgeführt werden kann (siehe 4.2.3). Für diese Hypothese spricht die direkte Nachbarschaft der Apoptosezone zur Mantelzone und deren gradueller Übergang, was ein Zeichen für die Rekrutierung der apoptotischen Zellen aus proliferierenden Zellen der Mantelzone sein könnte. Weiterhin spricht die konstante bis abnehmende Breite der Mantelzone dafür, daß Zellen aus diesem

Kompartiment „verschwinden“ müssen, da sonst die Mantelzone – setzt man Proliferation voraus – an Breite zunehmen müßte. Eine Möglichkeit wie dieses geschehen könnte, wäre der programmierte Zelltod an der Grenze zwischen Mantel- und Apoptosezone; eine andere der Verlust von Zellen der Mantelzone in das umgebende Medium.

2. Proliferierende Zellen der Mantelzone könnten Stoffe freisetzen, die dazu führen, daß diese Zellen in Kontakt mit nicht-proliferierenden Zellen der Innenzone erkannt und eliminiert werden. Dies könnte analog zum System der interzellulären Induktion der Apoptose durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erfolgen. Nimmt man zum Beispiel an, daß proliferierende Zellen der Mantelzone Superoxid-Anionen produzieren (Clement et al., 1999; Burdon, 1995), so könnte deren Elimination mit Hilfe *ähnlicher* Mechanismen, wie bei der interzellulären Induktion der Apoptose beschrieben, erfolgen (unklar bliebe jedoch, wodurch die - primär nicht-toxischen - Superoxid-Anionen aktiviert werden). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Freisetzung von H₂O₂ durch proliferierende Zellen der Mantelzone, das schon in niedriger Konzentration direkt apoptose-induzierend wirken kann (B. Ivanovas, unpublished). Zellen in der Innenzone könnten zum Beispiel durch einen hohen Spiegel an Antioxidantien (intra- und/oder extrazellulär) vor einer Initiierung des Apoptose-Programms geschützt sein. Auch könnten Mangelbedingungen im Zentrum des Sphäroids dort die komplette Ausführung des Apoptose-Programmes verhindern (siehe 4.2.3). Dagegen spricht jedoch, daß im Monolayer-System keine Elimination proliferierender nicht-transformierter Zellen zu beobachten ist; ja daß Proliferation der nicht-transformierten Zellen sogar notwendige Voraussetzung zur selektiven Elimination transformierter Zellen zu sein scheint (Bassler et al., 1997). Außerdem ließ sich die Entstehung einer Apoptosezone nicht durch Taurin inhibieren, was gegen die Beteiligung von HOCl bei diesem Phänomen spricht (nicht jedoch gegen NO). Auch gab es keinen Hinweis darauf, daß die Aminosäure Taurin in diesem System einen Schutz gegenüber Mangelbedingungen gewährt (Franek et al., 1995/1996/1997).

Nimmt man dagegen an, daß die apoptotischen Kerne *nicht* an Ort und Stelle (also außerhalb der zirkulären Apoptosezone) entstanden sind, ergeben sich folgende Erklärungsmöglichkeiten:

1. Es könnte sich um einen methodischen Artefakt handeln, der dadurch entsteht, daß apoptotische Zellen, die während der Rollperiode entstehen (Mangelbedingungen), sich aufgrund der Rotationsbewegung unterhalb der relativ kompakten Mantelzone ansammeln. Dagegen spricht jedoch eindeutig die zeitlich verschobene Entstehung einer Apoptosezone in 208Fsrc3-Reinkultur-Sphäroiden; an Tag 0 ist in diesem Fall noch keine Apoptosezone sichtbar; diese bildet sich 1-2 Tage später, obwohl keine Rotation mehr stattfindet („statische Costar-Kultur“).
2. Apoptotische Zellen der Mantel- oder Innenzone könnten durch Druckgradienten unterhalb der

relativ kompakten Mantelzone abgelagert werden (McElwain et al., 1993). Dafür gibt es mehrere Hinweise. Gerade für apoptotische Zellen könnte es durch Verlust der Zell-Zell-Kontakte möglich sein, passiv innerhalb des Sphäroids transportiert zu werden. Derart mobile Zelltrümmer würden sich an einer freien Stelle ansammeln. Dafür kommt die Apoptosezone durchaus in Frage. Nimmt man an, daß Zellen der Innenzone ihr Zytoplasma aufgrund von Mangelbedingungen verkleinern, müßte dieses Kompartiment „schrumpfen“ und ein „Leerraum“ zwischen Mantel- und Innenzone entstehen, der von Zelltrümmern (und freien Fluospheres) ausgefüllt werden könnte.

Apoptosezone und interzelluläre Induktion der Apoptose

Aus den gewonnenen Daten läßt sich zeigen, daß es sich bei der Entstehung einer Apoptosezone nicht um ein Phänomen der interzellulären Induktion der Apoptose handelt, da eine Apoptosezone unabhängig von der Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen auftritt. Auch ist deren Entstehung nicht durch Taurin hemmbar.

Dennoch zeigen 208F- und 208Fsrc3-Reinkultur-Sphäroide interessante Unterschiede in der Ausbildung einer Apoptosezone. In 208Fsrc3-Reinkultur-Sphäroiden tritt eine Apoptosezone später und in geringerem Ausmaß ein. Es bleibt unklar, ob diese auffälligen Unterschiede durch die geringere Stabilität und Kompaktheit von 208Fsrc3-Sphäroiden (und damit bessere Diffusionsbedingungen) oder durch größere Resistenz transformierter Zellen gegenüber Mangelbedingungen entstehen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Ursachen für die Entstehung einer Apoptosezone in diesem Zellsystem weiterhin unklar bleiben. Genauere Aussagen ließen sich durch möglichst frühzeitige und engmaschige Untersuchung der Sphäroide nach deren Aufbau mit speziellen Methoden zur Erfassung von Mangelbedingungen gewinnen (z.B. ATP-Gehalt). Auch erscheint die weitere Variation der Versuchsbedingungen (z.B. verbesserte Sauerstoffversorgung) und der Einsatz verschiedener Inhibitoren (speziell Antioxidantien) sinnvoll.

4.2.3 Innenzone

Morphologie und Eigenschaften

Im Zentrum (Innenzone) findet man relativ kleine, rundliche und dicht gepackte Zellkerne, die in der Bis-Benzimidin-Färbung kondensiert erscheinen und mäßig starke bis starke Fluoreszenz zeigen, jedoch (im Vergleich zur Apoptosezone) wenig fragmentiert sind (**Versuch 8**, siehe 3.2). In

der TUNEL-Färbung fluoreszieren sie mäßig stark (**Versuch 20**, siehe 3.5.5). Man findet keine zentrale Nekrosezone (**Versuch 8**, siehe 3.2).

Eindeutig markierte Kerne sind während des gesamten Versuchsablaufes nachweisbar. Das Verhältnis markierter Zellen zu nicht-markierten Zellen bleibt etwa konstant; die Intensität der Markierung nimmt nicht wesentlich ab (**Versuch 10-11**, siehe 3.3.2).

Deutung

Zellen innerhalb der Innenzone bilden eine relativ homogene und statische Population. Während des Beobachtungszeitraumes finden kaum sichtbare Veränderungen statt. Schon zu Beginn zeigen die Kerne ihre typische Morphologie, in der Bis-Benzimidin-Färbung erscheinen sie kondensiert, jedoch nur sehr wenige sind fragmentiert; in der TUNEL-Färbung fluoreszieren sie mäßig stark. Wendet man die üblichen Apoptose-Kriterien an, würde man diese Zellen in der Bis-Benzimidin-Färbung als nicht-apoptotisch, jedoch in der TUNEL-Färbung als apoptotisch klassifizieren. Wie läßt sich diese Beobachtung erklären, da doch TUNEL- und Bis-Benzimidin-Färbung in Monolayer-Zellkulturen (z.B. Dormann et al., 1999) und in der Mantel- bzw. Apoptoezone (siehe 4.2.1 und 4.2.2) sehr gut übereinstimmen? Faßt man die morphologisch bzw. durch Anfärbung sichtbaren Merkmale des programmierten Zelltodes (membrane-blebbing, Kernkondensation, Kernfragmentierung, DNA-Fragmentierung) als Substrate eines sequentiell und evtl. parallel ablaufenden Vorganges auf, so ist es durchaus denkbar, daß dieser Vorgang auf einer bestimmten Stufe angehalten wird bzw. daß ein parallel ablaufender Vorgang unterbrochen wird, während andere Schritte weiter ablaufen. So wäre es zum Beispiel denkbar, daß die Vorgänge, die zur DNA-Fragmentierung führen, teilweise *parallel* zu Vorgängen ablaufen, die Kernfragmentierung auslösen. Wäre nun etwa der Schritt der Kernfragmentierung gehemmt, während parallel Kernkondensation und DNA-Fragmentierung weiter abliefen, so ließen sich oben genannte Unterschiede zwischen TUNEL- und Bis-Benzimidin-Färbung erklären: Kerne würden zwar kondensiert erscheinen und würden TUNEL-positive DNA-Strangbrüche aufweisen; Kernfragmentierung fände jedoch nicht statt. Ähnliche Konsequenzen hätte die Hemmung eines sequentiell ablaufenden Apoptoseprogrammes, falls die Kernfragmentierung einen späten Schritt darstellt und die Hemmung vor diesem Schritt stattfände (Oberhammer et al., 1993). Wie läßt sich aber eine solche Unterbrechung des sonst sehr zuverlässig ablaufenden Apoptose-Programmes erklären? In letzter Zeit gibt es viele Hinweise auf eine entscheidende Beteiligung der Mitochondrien bei der Ausführung des Apoptose-Programmes: Über verschiedene Mechanismen wird eine Pore (PT-Pore) in der inneren-Mitochondrien-Membran geöffnet, was dazu führt, daß der Protonengradient zusammenbricht und das Mitochondrium in der Art eines „oxidative burst“ ROS

produziert sowie weitere Stoffe wie Cytochrom C und AIF freisetzt, die einerseits weitere Mitochondrien aktivieren und andererseits direkt apoptotische Veränderungen hervorrufen (Wilson, 1998; Vaux et al., 1996). Dieser Vorgang setzt intakte Mitochondrien voraus. Genaue Messungen des Mitochondrien-Potentials in Sphäroiden durch potentialabhängige Farbstoffe und selektive Dissoziation haben jedoch ergeben, daß das Mitochondrien-Potential in der Innenzone des Sphäroids stark reduziert ist, während die Zahl der Mitochondrien konstant bleibt (Kunz-Schughart et al., 1997b). Dieser Abfall des Mitochondrien-Potentials tritt sehr rasch nach Einbau von Zellen in ein Sphäroid auf und stellt wohl einen Adaptionsvorgang an Mangelbedingungen dar. Man könnte spekulieren, daß solche Mitochondrien nicht mehr zur Generierung eines „oxidative burst“ im Stande sind und auf diese Weise das Apoptose-Programm bzw. ein Teil davon angehalten werden könnte. Ein anderer Teil, wie die Aktivierung von Endonukleasen durch Caspasen könnte jedoch weiterhin ablaufen.

Zellen mit geringer metabolischer Aktivität und eingeschränkter Mitochondrien-Funktion generieren intrazellulär möglicherweise weniger ROS als metabolisch aktive Zellen. In solchen metabolisch inaktiven Zellen findet sich dadurch eventuell ein hoher Gehalt an Antioxidantien (speziell Glutathion), die möglicherweise auch in den Interzellularraum sezerniert werden. Dieser hypothetische Anstieg der Konzentration reduzierten Glutathions könnte einen aktiven Anpassungsvorgang oder eine Folge der Reduktion des oxidativen Stresses darstellen. Es gibt experimentelle Hinweise, daß solche Vorgänge stattfinden (Romero et al., 1997). Ein solcher Anstieg intra- oder extrazellulärer Antioxidantien könnte für eine Hemmung des Apoptose-Programmes verantwortlich sein. Paradoxerweise existieren jedoch auch Hinweise, daß Mangelbedingungen und speziell Hypoxie zur *Generierung* von ROS beitragen können (Arteel et al., 1999; Kehrer et al., 1991) und daß Zellen (zumindest Tumorzellen) ihren Gehalt an Antioxidantien als Reaktion auf äußeren oxidativen Stress erhöhen (Kong et al., 1998 (review); Wolff, 1996; Chang et al., 1997; Yanase et al., 1999).

Zuletzt sei noch eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Unterschiede zwischen TUNEL- und Bis-Benzimidin-Färbung genannt. Kerne in der Innenzone erscheinen in der Bis-Benzimidin-Färbung kondensiert, also dichter gepackt als z.B. Kerne in der Mantelzone. Auch Kerne in der Mantelzone zeigen schwache Fluoreszenz in der TUNEL-Färbung; dies spricht dafür, daß auch dort DNA-Strangbrüche vorhanden sein könnten. Geht man nun - hypothetisch - von einer in etwa konstanten Zahl von DNA-Strangbrüchen in Mantelzone und Innenzone aus, so würden Kerne in der Innenzone zwangsläufig aufgrund ihrer Kondensierung auch stärkere TUNEL-Fluoreszenz zeigen, obwohl sie die gleiche Zahl von Strangbrüchen enthielten. Auf diese Weise könnte der Eindruck entstehen, in der Innenzone liefe Apoptose ab. Diese Möglichkeit ist denkbar, erscheint

jedoch unwahrscheinlich, da die Zunahme der TUNEL-Fluoreszenz in der Innenzone viel stärker ist, als sich durch bloße Zunahme der Chromatin-Dichte erklären ließe.

Wie eingangs erwähnt, stellen Zellen in der Innenzone eine relativ statische Population dar. Proliferation findet wahrscheinlich nicht statt. Man kann dies aus dem Verhalten markierter Zellen schließen, deren Markierung während der gesamten Beobachtungszeit relativ unverändert bleibt. Auch das Verhältnis markierter zu nicht-markierten Zellen bleibt konstant; Zellgruppen markierter Zellen entstehen nicht. Warum befinden diese Zellen sich in einer Art „Winterschlaf“, der sie daran hindert, sich zu teilen, aber auch vor dem Zelltod zu schützen scheint? Die Mangelsituation in der Innenzone bietet sich als Erklärungsmöglichkeit an. Zellen in der Innenzone haben sich vermutlich an die kritischen Überlebensbedingungen durch Umstellung ihres Stoffwechsels adaptiert und verharren in der G_0 -Phase. Die Bedingungen sind in unserem System wohl noch ausreichend, um ein Überleben von Zellen zu erlauben (es entsteht keine zentrale Nekrosezone); dabei zeigen sich aber große Unterschiede je nach verwendetem Zellsystem.

Die Situation von Zellen in der Innenzone scheint damit am ehesten mit der Situation innerhalb eines avaskulären Mikrotumors oder innerhalb hypoxischer Regionen eines größeren Tumors vergleichbar. Auch dort findet man nicht-proliferierende Zellen, die sehr resistent gegen die verschiedensten Apoptose-auslösenden Stimuli sind, und die, nachdem sie wieder Zugang zu günstigeren Lebensbedingungen haben, ihr malignes Potential wieder entfalten. Es wäre deshalb interessant zu untersuchen, welches Schicksal nicht-transformierte bzw. transformierte Zellen aus der Innenzone nach Dissoziation des Sphäroids erfahren; ob sie wieder proliferieren, oder ob der programmierte Zelltod eintritt (z.B. durch einen Reoxygenierungs-Schaden). Insbesondere wäre es interessant zu untersuchen, ob sich in dieser Hinsicht Unterschiede zwischen nicht-transformierten Zellen, transformierten Zellen und ex-vivo-Tumorzellen ergeben.

4.2.4 Vergleich mit anderen Zellsystemen

In anderen Zellsystemen entwickelt sich meist ein dreischichtiger Aufbau aus „äußerer Zone“, „Intermediärzone“ und „zentraler Nekrosezone“. Der entstehende Aufbau zeigt eine starke Abhängigkeit vom verwendeten Zellsystem und von der Sphäroidtechnik; insbesondere gilt dies für die zentrale Nekrosezone. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die Sphäroidtechnik zu standardisieren, wenn man Aussagen über das Verhalten verschiedener Zellsysteme machen will.

Bei Verwendung der gleichen Technik, jedoch eines anderen Zellsystems (C127/C127M5) entwickelte sich keine Apoptosezone (A. Schmidtmann, unpublished). Über die Ursachen dieses Unterschiedes kann nur spekuliert werden. Es kann sich jedenfalls nicht um einen methodisch bedingten Effekt handeln, da exakt dieselbe Technik verwendet wurde. Dies unterstreicht

zusätzlich, daß die Entstehung einer Apoptosezone vermutlich keinen methodischen Artefakt darstellt, sondern mit speziellen Eigenschaften der Zellen im 208F/208Fsrc3-System zusammenhängt. Namentlich die Hypoxie-Empfindlichkeit und/oder der zelluläre Antioxidantien-Spiegel dürften dabei eine entscheidende Rolle spielen.

4.3 Proliferationskontrolle im Sphäroid

In der Monolayer-Zellkultur wird das Proliferationsvermögen transformierter Zellen stark durch umliegende nicht-transformierte Zellen gehemmt (Berwald and Sachs, 1963; Stoker et al., 1966; Bignami et al., 1988). Ist dieses Phänomen auch im Sphäroid-System zu beobachten?

Mantelzone

In der Mantelzone liegende markierte, transformierte Zellen verlieren während des Beobachtungszeitraumes ihre starke Markierung zugunsten diffus verteilter Fluospheres (**Versuch 9**, siehe 3.3.1). Für diese Beobachtung gibt es mindestens drei Erklärungsmöglichkeiten:

1. Markierte, transformierte Zellen könnten durch Proliferation ihre Markierung verlieren, indem die vorhandene Menge an Fluospheres zwischen den Tochterzellen aufgeteilt wird, bis schließlich viele schwach oder gar nicht markierte Zellen entstehen.
2. Markierte, transformierte Zellen könnten durch interzelluläre Induktion der Apoptose eliminiert, entstehende freie Fluospheres von umliegenden nicht-transformierten Zellen phagozytiert werden.
3. Fluospheres könnten von intakten transformierten Zellen freigesetzt und von Nachbarzellen phagozytiert werden.

Die verwendete Markierungstechnik erlaubt es leider nicht, zwischen diesen drei Hypothesen exakt zu differenzieren; es kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß mehrere Vorgänge parallel ablaufen. Es gibt aber trotzdem Indizien, die Hinweise geben können. So erscheint es fraglich, ob transformierte Zellen in der Mantelzone durch interzelluläre Induktion der Apoptose eliminiert werden, da in Kokultur-Sphäroiden zwar diffus verteilte apoptotische Zellen sichtbar, diese aber in der Mantelzone von 208F-Reinkultur und 208Fsrc3-Reinkultur-Sphäroiden in ähnlichen Prozentsätzen ebenso vorhanden waren (**Versuch 16**, siehe 3.5.2). Dies spricht gegen eine Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen in der Mantelzone, schließt diese aber (mangels eindeutiger Markierung) nicht aus. Für die Hypothese, Fluospheres könnten von intakten transformierten Zellen freigesetzt werden, gibt es ebenfalls keine positiven Hinweise. In der Innenzone behalten markierte Zellen während des gesamten Beobachtungszeitraumes ihre starke Markierung, man kann aber trotzdem nicht ausschließen, daß dieser Vorgang in der Mantelzone

stattfinden könnte. Falls tatsächlich Proliferation transformierter Zellen die Ursache für die zunehmend diffuse Verteilung von Fluospheres in der Mantelzone sein sollte, müßte es sich um einen sehr raschen Vorgang handeln, da eindeutig markierte Zellen schon sehr früh (Tag 0) kaum mehr vorhanden sind.

Um zu klären, ob die Proliferationskontrolle transformierter Zellen in der Mantelzone tatsächlich aufgehoben ist, muß zwangsläufig eine andere Markierungstechnik verwendet werden, die dauerhaft und eindeutig ist. Hier bietet sich zum Beispiel die Markierung mit GFP an.

Innenzone

In der Innenzone vorliegende markierte, transformierte Zellen behalten ihre eindeutige Markierung während des gesamten Beobachtungszeitraumes. Die Intensität der Markierung sowie das Verhältnis markierter Zellen zu nicht-markierten Zellen bleibt konstant. Insbesondere finden sich zu späteren Zeitpunkten keine Gruppen schwächer markierter Zellen. Diese Beobachtungen sind unabhängig davon, ob markierte, transformierte Zellen von transformierten oder nicht-transformierten Zellen umgeben sind (**Versuch 10-11**, siehe 3.3.2).

Diese Befunde schließen Proliferation markierter, transformierter Zellen in der Innenzone praktisch aus. Würden diese proliferieren, müßte sich die Markierung abschwächen und Gruppen („Klone“) schwächer markierter Zellen entstehen; auch das Verhältnis markierter Zellen zu nicht-markierten Zellen müßte sich verändern. Durch die Unabhängigkeit dieser Beobachtungen vom Vorhandensein nicht-transformierter Zellen kann ausgeschlossen werden, daß diese Proliferationskontrolle durch eine Interaktion der beiden Zellsorten entsteht. Vielmehr muß angenommen werden, daß durch Mangelbedingungen das proliferative Potential in der Innenzone des Sphäroids generell eingeschränkt ist (siehe auch 4.2.3). Es wäre mit Sicherheit interessant, das Verhalten transformierter Zellen in Gegenwart von Tumorpromotoren (wie z.B. TPA) bzw. das Verhalten von ex-vivo-Tumorzellen zu untersuchen. Möglich wäre, daß diese keiner Proliferationshemmung durch Mangelbedingungen unterliegen und so zu Mikrotumoren auswachsen könnten (siehe auch 4.4.4).

4.4 Interzelluläre Induktion der Apoptose im Sphäroid

4.4.1 Einzelzellen und Zellgruppen

Einzel vorliegende transformierte 208Fsrc3-Zellen sowie größere Gruppen dieser Zellreihe werden in der Innenzone des Sphäroids während des Beobachtungszeitraumes nicht durch interzelluläre Induktion der Apoptose eliminiert (**Versuch 12**, siehe 3.4.1 und **Versuch 14**, siehe 3.4.3). Dieser Befund ist umso erstaunlicher, als gerade 208Fsrc3-Zellen sich in der Monolayer-Kokultur bzw. in

Trennkammer-Versuchen als besonders empfindlich gegenüber der interzellulären Induktion der Apoptose erwiesen haben. Auch könnte man vermuten, daß durch kurze Diffusionsstrecken im Sphäroid und geringe Verdünnung sezernierter Stoffe die interzelluläre Induktion der Apoptose im Vergleich zum Monolayer-System sogar noch effizienter ablaufen könnte. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein. Stattdessen verbleiben transformierte 208Fsrc3-Zellen während des gesamten Beobachtungszeitraumes in der Innenzone, ohne apoptotisch zu werden oder zu proliferieren. Wie kann man sich dieses Verhalten erklären? Das komplexe Zusammenspiel transformierter und nicht-transformierter Zellen könnte auf verschiedenen Ebenen gestört sein, auch ist es denkbar, daß mehrere Abläufe gleichzeitig gehemmt sind (vergleiche **Abbildung 4**):

1. Störung auf der Ebene der transformierten Zelle
2. Störung der Signaltransduktion zur nicht-transformierten Effektorzelle
3. Störung auf der Ebene der nicht-transformierten Effektorzelle
4. Störung der Signaltransduktion zur transformierten Zelle

Störung auf der Ebene der transformierten Zelle

Die transformierte Zelle ist an zwei Stellen während der interzellulären Induktion der Apoptose beteiligt. Zum einen muß sie (durch ihren autokrinen TGF- β -Loop) das erste Signal zu ihrer eigenen Elimination liefern, zum anderen muß sie durch Synthese von Superoxid-Anionen und Induktion der Apoptose ihre endgültige Elimination ermöglichen. Beide Vorgänge könnten gestört sein.

Falls die TGF- β -Synthese im Sphäroid durch Umstellung oder Hemmung der Proteinsynthese gestört (Theodorescu et al., 1993) oder die extrazelluläre TGF- β -Aktivierung durch Antioxidantien gehemmt sein sollte, hätte dies mehrere Konsequenzen: zum einen würde keine Signaltransduktion zur Effektorzelle mehr stattfinden, zum anderen könnte die transformierte Zelle ihren transformierten Phänotyp „verbergen“, da der autokrine TGF- β -Loop zu dessen Aufrechterhaltung notwendig ist (Wehrle et al., 1994). Dies könnte zur Folge haben, daß die Superoxid-Anionen-Produktion zum Erliegen kommt und so – trotz eventueller Vorbehandlung der nicht-transformierten Effektorzellen mit TGF- β – keine Induktion der Apoptose stattfinden könnte (Jürgensmeier et al., 1997b). Man könnte dies durch kontinuierlichen Zusatz von exogenem TGF- β testen. Falls jedoch die Synthese des TGF- β -Rezeptors herunterregelt oder die Superoxid-Anionen-Produktion auf anderem Wege gehemmt wäre (bei funktionierenden Effektorzellen), könnte man auch auf diese Weise keine Apoptose induzieren. Die fehlende Elimination von Einzelzellen ließe sich durch zu geringe TGF- β -Synthese gut erklären (überprüfbar durch TGF- β -Vorbehandlung der nicht-transformierten Zellen), **nicht** jedoch die fehlende Elimination von größeren Zellgruppen, da in diesem Fall eine ausreichende TGF- β -Konzentration vorhanden sein dürfte (ungestörte Synthese

vorausgesetzt).

Die endgültige Elimination könnte ebenfalls auf verschiedene Weise gestört sein. Zum Einen könnte die Produktion von Superoxid-Anionen durch fehlende TGF- β -Wirkung, mangelhafte Synthese des produzierenden Enzymes (NADPH-Oxidase), extrazelluläre Antioxidantien oder Sauerstoffmangel unzureichend sein. Die fehlende Elimination *einzelner* transformierter Zellen ließe sich – analog zur Dichteabhängigkeit der Elimination im Trennkammer-System (M. Herdener, unpublished) – durch eine zu niedrige Konzentration von Superoxid-Anionen gut begründen. Dies erklärt jedoch **nicht** die fehlende Elimination von Zellgruppen, da in diesem Fall die lokale Superoxid-Anionen-Konzentration ausreichend sein sollte (ungestörte Synthese vorausgesetzt). Experimentell läßt sich diese Möglichkeit elegant prüfen. Durch Zugabe von NO-bildenden Stoffen wie zum Beispiel SNP (Nitroprussid-Natrium) lassen sich transformierte Fibroblasten in der Monolayer-Kultur eliminieren **ohne** daß nicht-transformierte Zellen und deren Produkte anwesend sein müssen (S. Heigold, unpublished). Die Elimination beruht dabei wahrscheinlich auf der Reaktion von Superoxid-Anionen mit NO zu Peroxynitrit, welches schließlich apoptose-induzierend wirkt (siehe **Abbildung 5**). Durch SNP-Zusatz ließe sich also prüfen, ob transformierte Zellen im Sphäroid Superoxid-Anionen in ausreichender Menge produzieren, um ihre eigene Apoptose auszulösen. Falls sich durch SNP-Zugabe selektiv Apoptose in transformierten Zelle auslösen ließe, könnte man auch eine *generelle Hemmung* des Apoptose-Programms als Ursache der beobachteten Resistenz transformierter Zellen im Sphäroid gegenüber der interzellulären Induktion der Apoptose ausschließen; falls nicht, bliebe auch diese Möglichkeit. So könnte die Induktion oder Ausführung des Apoptose-Programmes auf verschiedenen Stufen reversibel oder irreversibel gehemmt sein (zum Beispiel durch Mitochondrien-Dysfunktion oder hohen intrazellulären Antioxidantien-Spiegel, siehe 4.2.3). Einen weiteren interessanten Erklärungsansatz hierzu liefern auch Beobachtungen an kleineren Zellaggregaten (zumeist Tumorzellen), die eine hohe Resistenz gegenüber verschiedenen Apoptose-auslösenden Stimuli besitzen. Erstaunlicherweise ist diese Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, Strahlung und anderen Stimuli reversibel, sobald die Zellen ihren dreidimensionalen Zusammenhalt verlieren (zum Beispiel durch Behandlung mit Kollagenase). Die genaue Ursache dieser „multicellular resistance“ ist noch unbekannt, man vermutet jedoch, daß Interzellularverbindungen über Gap-junctions sowie eine besondere Konformation der DNA eine wichtige Rolle spielen könnten (Desoize et al., 1998a/b). Darüberhinaus ergeben sich aber auch Hinweise auf die Beteiligung bestimmter Proteine bei diesem Phänomen (St. Croix et al., 1997). Es erscheint durchaus denkbar, daß dieses Phänomen auch bei der beobachteten Resistenz transformierter 208Fsrc3-Zellen in der Innenzone des Sphäroids eine Rolle spielt. In Zukunft könnten sich interessante therapeutische Konsequenzen aus der Erforschung

dieser Resistenzmechanismen ergeben.

Störung der Signaltransduktion zur nicht-transformierten Effektorzelle

Die Signaltransduktion zur nicht-transformierten Effektorzelle erfolgt über aktives, LMW- TGF- β , das als inaktives HMW-TGF- β von der transformierten Zelle sezerniert und extrazellulär aktiviert wird. Dieser Schritt kann – wie im vorhergehenden Abschnitt geschildert – durch Veränderung der Proteinexpression im Sphäroid oder fehlende Aktivierung gestört sein. Doch selbst wenn diese Schritte funktionieren, ist eine erfolglose Signaltransduktion nicht ausgeschlossen. Aktives TGF- β könnte an der extrazellulären Matrix im Sphäroid gebunden werden, sodaß es nicht zur Effektorzelle diffundieren könnte; falls die Synthese funktionsfähiger TGF- β -Rezeptoren in den Effektorzellen heruntergeregelt wäre, könnte ebenfalls keine erfolgreiche Signaltransduktion stattfinden (Rizzino, 1988).

Störung auf der Ebene der nicht-transformierten Effektorzelle

Die nicht-transformierte Effektorzelle muß nach Eintreffen des TGF- β -Signals (mindestens) zwei Enzyme bereitstellen: die NO-Synthetase und ein Enzym mit Peroxidase-Aktivität. Durch fehlende Proliferation der Effektorzellen (zum Beispiel durch Sauerstoff- und Nährstoffmangel) und daraus eventuell resultierende Veränderungen der Proteinexpression könnte dieser Vorgang beeinträchtigt sein (Waleh et al., 1998). So zeigt sich im Monolayer-System, daß Proliferation der Effektorzellen eine unbedingte Voraussetzung zur Elimination transformierter Zellen darstellt (Bassler et al., 1997).

Auch ist bekannt, daß zur Aktivierung der nicht-transformierten Effektorzelle die Wirkung von ROS notwendig ist (Jürgensmeier et al., 1994a; Schaefer et al., 1995; Jürgensmeier et al., 1997b). Nimmt man einen stark erniedrigten pO_2 in der Innenzone des Sphäroids mit konsekutiv reduzierter Mitochondrien-Funktion und erhöhtem Antioxidantien-Spiegel an (siehe 4.2.3), so erscheint es durchaus möglich, daß die Aktivierung der Effektorzelle dadurch verhindert werden könnte.

Störung der Signaltransduktion zur transformierten Zelle

Selbst wenn die im letzten Abschnitt genannten Enzyme in ausreichender Menge synthetisiert und – im Falle der Peroxidase – freigesetzt werden, ist nicht unbedingt gewährleistet, daß sie ihren Zweck erfüllen. Dazu ist einerseits ein ausreichendes Substrat-Angebot notwendig und andererseits ein Milieu, das den Synthese-Produkten gestattet, am gewünschten Ort zur Wirkung zu gelangen. Durch einen hohen extrazellulären Antioxidantien-Spiegel könnten beide Faktoren in kritischer Weise beeinflußt werden, da einerseits das Substrat-Angebot der Peroxidase (H_2O_2) sinken könnte

und andererseits die reaktiven Sauerstoff-Verbindungen am Ort ihres Entstehens sofort wieder neutralisiert werden könnten, wodurch letztendlich keine Apoptose-induzierenden Hydroxyl-Radikale bzw. Peroxynitrit wirksam werden könnten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine einfache Übertragung der Beobachtungen vom zweidimensionalen Zellkultursystem auf das Sphäroidsystem nicht möglich erscheint. Besonders in der Innenzone des Sphäroids scheinen völlig andere Voraussetzungen hinsichtlich Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, Proliferationsverhalten, Proteinexpression, Mitochondrienfunktion, Redoxzustand und Apoptose-Empfindlichkeit zu bestehen. Diese Faktoren zu untersuchen hat mit Sicherheit große Bedeutung für die gesamte Tumorforschung (mögliche Konsequenzen dieser Befunde siehe 4.4.4).

4.4.2 Kern-Mantel-Versuche

Auf den ersten Blick erscheinen Kern-Mantel-Versuche (transformierte Zellen im Kern, nicht-transformierte Zellen im Mantel oder umgekehrt) als sehr gut geeignet, um die interzelluläre Induktion der Apoptose im Sphäroid-System zu untersuchen, da sich dadurch die Interaktionsfläche der beiden Zellpopulationen maximal vergrößern läßt (und damit eventuell auch der vermutete Effekt).

Im Laufe dieser Arbeit zeigte sich jedoch, daß solche Versuche auch enorme Risiken der **Fehlinterpretation** bergen können. So kann eine entstehende Apoptosezone eine spezifische Interaktion transformierter und nicht-transformierter an der Grenzfläche *vortäuschen* (**Versuch 13**, siehe 3.4.2 und Versuche zur Apoptosezone, siehe 3.5). Wie sich zeigte, ist die Entstehung einer Apoptosezone in diesem System jedoch unabhängig von der Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen (siehe 4.2.2).

Man kann aber wiederum auch nicht *ausschließen*, daß eine solche Interaktion bei Verwendung von Kern-Mantel-Sphäroiden aus transformierten und nicht-transformierten Zellen stattfindet; es ist jedoch nicht möglich, zwischen dem Phänomen der Apoptosezone und der Interaktion der beiden Zellpopulationen zu unterscheiden.

Aus diesem Grund erscheint die Verwendung von Kern-Mantel-Sphäroiden zur Untersuchung der interzellulären Induktion der Apoptose in diesem System als ungeeignet.

4.4.3 Vergleich mit anderen Zellsystemen

Im Gegensatz zum 208F/208Fsrc3-System wurden einzelne transformierte Zellen im C127/C127M5-System mit hoher Effizienz spezifisch eliminiert; nicht jedoch bei Verwendung

eines anderen chemisch transformierten Klons (C127M2) (A. Schmidtman, unpublished). Wie lassen sich diese Unterschiede zwischen verschiedenen Zellsystemen erklären?

Die verwendeten Zellen stammten von verschiedenen Spezies (Ratten- bzw. Mäusefibroblasten) und wurden durch verschiedene Mechanismen transformiert (virales Onkogen bzw. chemische Transformation durch MCA). Es erscheint denkbar, daß genetische Unterschiede für die differierende Apoptose-Empfindlichkeit verantwortlich sein könnten. Insbesondere die Produktion von Antioxidantien bzw. die Reduktion der Mitochondrien-Funktion könnten in C127M5-Zellen weniger stark ausgeprägt sein als in den beiden anderen Zellsystemen und dadurch die Expression des transformierten Phänotyps ermöglichen.

Auch das Proliferationsverhalten bzw. die Zellzyklusverteilung in der Monolayerkultur könnte eine wichtige Rolle spielen. Da der Redoxzustand der Zelle entscheidend für die Ausführung des Apoptose-Programmes (und für die Fähigkeit nicht-transformierter Zellen zur interzellulären Induktion der Apoptose) zu sein scheint, kann es von großer Bedeutung sein, in welchem Abschnitt des Zellzyklus sich eine Zelle befindet, wenn diese in ein Sphäroid eingebracht wird. Falls eine Zelle durch zellzyklusabhängige Variation bereits einen niedrigen Gehalt an Antioxidantien aufweist, könnte diese sensitiv für die interzelluläre Induktion der Apoptose im Sphäroid sein. Durch unterschiedliches Proliferationsverhalten in der Monolayerkultur (und damit unterschiedliche Zellzyklusverteilung) verschiedener Zellsysteme könnten geschilderte Beobachtungen erklärt werden. Tatsächlich verhalten sich die genannten Zellsysteme in der Monolayerkultur hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens unterschiedlich (gemessen zum Beispiel in der Zeitdauer bis zum nötigen „splitten“ der Zellkulturen). Falls dies eine Rolle für die Empfindlichkeit gegenüber der interzellulären Induktion der Apoptose im Sphäroid-System spielen sollte, müssten die Bedingungen noch weiter standardisiert werden.

4.4.4 Konsequenzen dieser Befunde – das Konzept der „dormant tumor cell“

Welche Konsequenzen haben die geschilderten Beobachtungen im Sphäroid (208F/208Fsrc3-System) für die Situation *in vivo*? Läßt sich daraus ein Konzept zur Tumorentstehung entwickeln? Betrachtet man die Situation im Innern des Sphäroids (**Innenzone**), so drängt sich das Konzept der „*dormant tumor cell*“ geradezu auf. Transformierte Zellen in dieser Zone proliferieren nicht, können aber auch nicht eliminiert werden; der transformierte Phänotyp scheint „*maskiert*“ zu sein. Sie stellen damit ein hohes potentiell Risiko zur späteren Tumorentstehung dar, da sie auf dem Weg der Mehrstufen-Karzinogenese schon fortgeschritten sind und wahrscheinlich nur noch einige wenige Schritte zur Tumorentstehung fehlen. Nach weiterer Applikation von Tumor-Promotoren sind (mindestens) zwei Szenarien denkbar (**Abbildung 43 A-B**): durch Induktion der ROS-Synthese

könnten diese Zellen wieder *sensitiv* für die interzelluläre Induktion der Apoptose werden (durch erneute Expression des transformierten Phänotyps, **Abbildung 43 A**) oder sie könnten durch genetische Mutation ihr proliferatives Potential zurückerhalten und gleichzeitig vor der interzellulären Induktion der Apoptose geschützt sein (zum Beispiel durch extrazelluläre Antioxidantien oder Mitochondrien-Dysfunktion). Wachsen diese Zellen nun aus, könnten durch weitere genetische Mutationen Zellen entstehen, die eine *intrinsische Resistenz* gegen die interzelluläre Induktion der Apoptose besitzen (zum Beispiel durch Produktion und Export von Antioxidantien und/oder Aktivierung anti-apoptotischer Gene); der Weg zur Tumorentstehung wäre geebnet (**Abbildung 43 B**). Es erscheint durchaus denkbar, daß auch beide Mechanismen gleichzeitig ablaufen könnten, und lediglich die **Kinetik** des Wachstums und Absterbens für das Schicksal des „Mikrotumors“ entscheidend ist.

Doch entspricht diese Denkweise tatsächlich der Situation *in vivo*? Wie bereits dargestellt, scheinen in der **Innenzone** des Sphäroids spezielle Bedingungen hinsichtlich der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zu bestehen. Es erscheint wenigstens fraglich, ob diese Situation derjenigen in einem vitalen, vaskularisierten Gewebe entspricht. Viel eher ähneln die Bedingungen in der Innenzone des Sphäroids wohl einem avaskulären Mikrotumor bzw. einer hypoxischen Region innerhalb eines größeren Tumors. Sind damit alle Überlegungen hinfällig? Ich denke nicht, denn einerseits könnte ein solcher schlecht versorgter „Mikrotumor“ auch – wie oben dargestellt – aus transformierten („noch nicht“ Tumorzellen) entstehen, andererseits stellen „echte schlafende Tumorzellen“ ein mindestens ebenso großes Problem dar. Diese sind bekanntermaßen das größte Problem bei der Behandlung solider maligner Tumoren, da sie durch konventionelle Chemo-, Radio- und Immuntherapie praktisch nicht abzutöten sind: die besser versorgten „Tumor-Mantelzellen“ lassen sich zwar gegebenenfalls noch abtöten; es werden jedoch stets neue proliferierende Zellen aus dem Pool der „dormant tumor cells“ rekrutiert. Zur Verbesserung der Therapie solider maligner Tumoren erscheint es deshalb essentiell wichtig, diese Resistenzmechanismen weiter aufzuklären. Dies könnte zur Etablierung neuer Therapieformen führen, wie zum Beispiel der Entwicklung Hypoxie-sensitiver Chemotherapeutika oder zu scheinbar paradoxen Ansätzen wie der Dissoziation von Tumoren durch Proteasen und Hemmstoffe der Zelladhäsion.

Mindestens ebenso interessant erscheint es jedoch, an früheren Stufen der Mehrstufenkarzinogenese anzusetzen, also bei der *transformierten* Zelle. Will man deren Schicksal im Sphäroid-Modell nachspielen, sollte man jedoch nicht unbedingt die Innenzone zur Untersuchung wählen, da man dadurch trotz allem wahrscheinlich eine künstliche Situation schafft, die der realen Situation *in vivo* nicht entspricht: eine relativ frühe Stufe der Karzinogenese (transformierte Zelle) wird mit einer

sehr späten Stufe (hypoxisches Gewebe) kombiniert. Viel eher bietet sich die **Mantelzone** zur Untersuchung an, da hier vermutlich keine Mangelbedingungen bestehen und die Situation damit eher einem vitalen, vaskularisierten Gewebe entspricht. Allerdings erlaubt die verwendete Markierungstechnik keine definitiven Aussagen über das Schicksal transformierter Zellen in der Mantelzone (siehe 4.2.1); die Verwendung einer anderen Markierungstechnik erscheint deshalb unumgänglich (z.B. Markierung mit GFP). Deshalb kann weiterhin nur spekuliert werden, welche Vorgänge *in vivo* ablaufen, wenn vereinzelte transformierte Zellen in einem vitalen, gut vaskularisierten Gewebe entstehen. In diesem Zusammenhang sind viele Szenarien denkbar; zwei wurden bereits oben beschrieben (diese können sowohl in gut versorgten als auch in hypoxischen Geweben stattfinden, **Abbildung 43 A-B**) beispielhaft soll ein Weiteres genannt werden, das zur Tumorentstehung führen könnte (**Abbildung 43 C**): enthält eine Zelle bereits zu Anfang einen Resistenzmechanismus gegenüber der interzellulären Induktion der Apoptose (z.B. Apoptose-inhibierende bcl-2-ähnliche Papillomavirus-Proteine: Jürgensmeier et al., 1997a), so entstehen durch Tumorinduktoren bereits *resistente* transformierte Zellen, die durch weitere Applikation eines Tumorpromotors ohne weiteres zu einem Mikrotumor auswachsen und zusätzliche maligne Mutationen erhalten könnten. Für den Ablauf dieser Sequenz *in vivo* gibt es mehrere Hinweise: Tumorentstehung bei Rindern mit Papillomavirus-Infektion, die Tumorpromotoren einer bestimmte Farn-Art ausgesetzt sind (Campo et al., 1994; Gaukroger et al., 1993) sowie die Pathogenese des Zervix-Karzinoms der Frau (zur Hausen, 1998/1994/1991).

Durch Optimierung der Sphäroid-Technik sollte es möglich sein, diese hypothetischen Schritte der Karzinogenese *in vitro* nachzuspielen. Es sollte dann auch gelingen, Substanzen zu finden, die mit den genannten Resistenzmechanismen interferieren und somit neue Perspektiven der Vorbeugung und Therapie eröffnen.

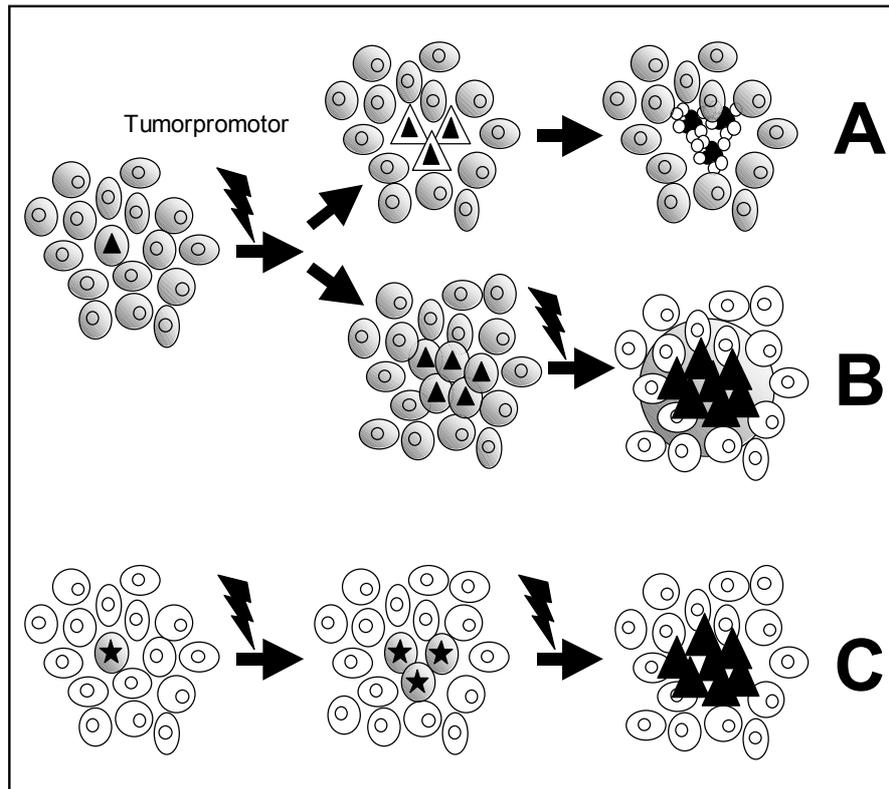


Abbildung 43: Einige mögliche Szenarien zur Tumorentstehung

A: Eine "dormant tumor cell" exprimiert nach Applikation von Tumorpromotoren ihren transformierten Phänotyp und kann durch Interzelluläre Induktion der Apoptose eliminiert werden.

B: Eine "dormant tumor cell" wird durch Tumorpromotoren zur Proliferation angeregt, ohne jedoch den transformierten Phänotyp zu exprimieren (dadurch keine Elimination möglich). Durch sukzessive Applikation des Tumorpromotors entstehen resistente Tumorzellen.

C: Eine transformierte Zelle besitzt bereits zu Beginn einen Resistenzmechanismus gegen die Interzelluläre Induktion der Apoptose. Durch Tumorpromotoren wird diese zur Teilung angeregt und kann nicht eliminiert werden. Durch sukzessive Applikation des Tumorpromotors entstehen resistente Tumorzellen, die schließlich auch unabhängig von der Applikation des Tumorpromotors proliferieren (und metastasieren) können. Schema modifiziert nach Bauer, 1995.

5 Zusammenfassung

1. In dieser Arbeit konnte das von F. Lerch und H. Deng etablierte Sphäroidsystem weiterentwickelt werden. Dadurch war es möglich, größere Stückzahlen brauchbarer Sphäroide herzustellen und durch die Markierung mit phagozytierbaren Fluospheres einzelne Zellen im zeitlichen Verlauf zu beurteilen. Es gelang auch, durch Variation dieser Technik unterschiedliche räumliche Anordnungen zu erzeugen.
2. Eine neue Methode zur Herstellung praktisch beliebig großer, genau definierter Gruppen markierter Zellen in einem Sphäroid konnte entwickelt werden. Diese „Kunststofftechnik“ könnte es ermöglichen, auch in anderen Systemen unterschiedliche Stadien der Tumorentstehung *in vitro* zu simulieren.
3. Die hergestellten Sphäroide im 208F/208Fsrc3-System zeigen einen typischen dreischichtigen, konzentrischen Aufbau. Man kann Mantelzone, Apoptosezone und Innenzone unterscheiden. Dieser Aufbau unterscheidet sich deutlich von der Morphologie anderer Sphäroide.
4. Bei der Untersuchung der interzellulären Induktion der Apoptose im Sphäroidsystem ergaben sich interessante Befunde. Obwohl ein Zellsystem verwendet wurde, welches in der Monolayer-Kultur sehr empfindlich gegenüber der interzellulären Induktion der Apoptose ist, wurden einzelne transformierte Zellen ebenso wie größere Zellgruppen in der Innenzone des Sphäroids während des Beobachtungszeitraumes nicht selektiv eliminiert. In der Innenzone kann zusätzlich mit großer Sicherheit von einer generellen Proliferationshemmung ausgegangen werden. Damit scheinen in dieser Zone sogenannte „dormant tumor cells“ zu existieren, die weder proliferieren noch eliminiert werden können und damit eine potentielle Gefahr darstellen. Das Sphäroidsystem sollte erlauben, die Bedingungen zu definieren, unter denen „dormant tumor cells“ zum Tumor auswachsen können.
5. Eine genaue Untersuchung der Apoptosezone ergab, daß diese unabhängig von der Interaktion transformierter und nicht-transformierter Zellen auftritt. Durch die TUNEL-Färbung konnte gezeigt werden, daß es sich dabei tatsächlich um apoptotische Zellen handelt. Die ringförmige Anordnung dieser Zone kann spezifische Interaktionen verschiedener Zellpopulationen in Kern-Mantel-Versuchen vortäuschen und muß deshalb bei der Interpretation solcher Versuche berücksichtigt werden. Da durch die Variation der Versuchsbedingungen die Entstehung einer Apoptosezone kaum beeinflussbar war, kann über deren Ursachen weiterhin nur spekuliert werden. Die Befunde sprechen jedoch gegen ein zufälliges Phänomen und für eine spezifische Eigenart des verwendeten Zellsystems.

6 Literatur

Acker H, Carlsson J, Mueller-Klieser W, Sutherland RM (1987)

Comparative pO₂ measurements in cell spheroids cultured with different techniques
Br. J. Cancer 56: 325-327

Adam JA, Maggelakis SA (1990)

Diffusion regulated growth characteristics of a spherical prevascular carcinoma
Bulletin of Mathematical Biology Vol. 52, No. 4, pp. 549-582

Arteel GE, Kadiinska MB, Rusyn I, Bradford BU, Mason RP, Raleigh JA, Thurman RG (1999)

Oxidative stress occurs in perfused rat liver at low oxygen tension by mechanisms involving peroxynitrite
Molecular Pharmacology 55(4): 708-715

Bassler D, Brauns HD, Bauer G (1997)

Role of proliferation for intercellular induction of apoptosis
Experimental Cell Research 232: 349-352

Bauer G (1995)

Resistance to TGF- β -induced elimination of transformed cells is required during tumor progression (review-hypothesis)
International Journal of Oncology 6: 1227-1229

Bauer G (1996)

Elimination of transformed cells by normal cells: a novel concept for the control of carcinogenesis
Histol. Histopathol. 11: 237-255

Bauer G (1997)

Interference of papilloma viruses with p53-dependent and -independent apoptotic pathways: clues to viral oncogenesis (review-hypothesis)
Oncology Reports 4: 273-275

Bauer G, Götschl M, Höfler P (1991)

Tumor-promoting activity of Epstein-Barr-virus-inducing factor Transforming Growth Factor type Beta (EIF / TGF- β) is due to the induction of irreversible transformation
Int. J. Cancer 47: 881-888

Bauer G, Höfler P, Simon M (1982b)

Epstein-Barr virus induction by a serum factor. II. Purification of a high molecular weight protein that is responsible for induction
J. Biol. Chem. 257: 11405-11410

Bauer G, Höfler P, Simon M (1982c)

Epstein-Barr virus induction by a serum factor. III. Characterization of the purified molecule and the mechanism of its activation
J. Biol. Chem. 257: 11411-11415

Bauer G, Höfler P, zur Hausen H (1982a)

Epstein-Barr virus induction by a serum factor. I. Induction and cooperation with additional inducers
Virology 121: 184-194

Beck E, Schäfer R, Bauer G (1997)

Sensitivity of transformed fibroblasts for intercellular induction of apoptosis is determined by their transformed phenotype
Experimental Cell Research 234: 47-56

Behrens J (1993)

The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis (review)
Breast Cancer Research and Treatment 24(3): 175-184

Berwald Y, Sachs L (1963)

In vitro cell transformation with chemical carcinogens
Nature 200: 1182-1184

Bignami M, Rosa S, La Rocca SA, Falcone G, Tato F (1988)

Differential influence of adjacent normal cells on the proliferation of mammalian cells transformed by the viral oncogenes myc, ras and src
Oncogene 48: 509-514

Boice JD (1981)

Cancer following medical irradiation
Cancer 47 (5 Suppl.): 1081-1090

Boutwell RK (1984)

Some biological aspects of skin carcinogenesis
Progr. Exp. Tumor Res. 4: 207-250

Bredel-Geissler A, Karbach U, Walenta S, Vollrath L, Mueller-Klieser W (1992)

Proliferation-associated oxygen consumption and morphology of tumor cells in monolayer and spheroid culture
Journal of Cellular Physiology 153: 44-52

Brown JM, Giaccia AJ (1998)

The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy (review)
Cancer Research 58(7): 1408-1416

Bruland O, Fodstad O, Phil A (1985)

The use of multicellular spheroids in establishing human sarcoma cell lines in vitro
Cancer 35: 793-798

Burdon RH (1995)

Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation (review)
Free Radical Biology and Medicine 18(4): 775-794

Byrne HM, Chaplain AJ (1996)

Growth of necrotic tumors in the presence and absence of inhibitors
Mathematical Biosciences 135: 187-216

Campo MS, O'Neil BWO, Barron RJ, Jarret WFH (1994)

Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle
Carcinogenesis 15: 1597-1601

Carlsson J, Acker H (1988)

Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids
Int. J. Cancer 42: 715-720

Carlsson J, Nederman T (1989)

Tumor spheroid technology in cancer therapy research (commentary)
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., Vol. 25, No. 8, pp. 1127-1133

Chang CK, Tsai CT, Lin CS, Jou SB, Liao SS, Cheng JT (1997)

Changes of superoxide dismutase (SOD) mRNA and activity in response to hypoxic stress in cultured wistar rat glioma cells
Neuroscience letters 232(2): 115-118

Chen RR (1977)

In situ detection of Mycoplasma contamination in cell culture by fluorescent Hoechst H 33258 stain
Exp. Cell Res. 104: 255-262

Cifone MA, Fidler IJ (1980)

Correlation of patterns of anchorage-independent growth with in vivo behavior of cells from murine fibrosarcoma
Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 1039-1043

Clement MV, Pervaiz S (1999)

Reactive oxygen intermediates regulate cellular response to apoptotic stimuli: a hypothesis (review)
Free Radical Research 30(4): 247-252

Dabrowska-Piaskowska K (1959)

Observations on the histoformative capacities of tumor cells dissociated by digestion with trypsin
Exp. Cell Res. 16: 315-323

Dachs GU, Stratford IJ (1996)

The molecular response of mammalian cells to hypoxia and the potential for exploitation in cancer therapy
Br. J. of Cancer Suppl. 27: S126-132

Desoize B, Gimonet D, Jardillier J-C (1998a)

Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance (review)
Anticancer Research 18: 4147-4158

Desoize B, Gimonet D, Jardillier J-C (1998b)

La résistance multicellulaire: un autre mécanisme de résistance pléiotropique ?
Bull. Cancer 85 (9): 785-793

Dormann S, Bauer G (1998)

TGF-beta and FGF trigger intercellular induction of apoptosis: analogous activity on non-transformed but differentiated activity on transformed cells
Int. J. Oncol. 13: 1247-1252

Dormann S, Schwieger A, Hanusch J, Häufel T, Engelmann I, Bauer G (1999)

Intercellular induction of apoptosis through modulation of endogenous survival factor concentration: a review
Anticancer Research 19: 87-104

Durand RE, Olive PL (1989)

Radiosensitisation and radioprotection by BSO and WR-2721: the role of oxygenation
Br. J. Cancer 60: 517-522

Eckert S, Bauer G (1998)

TGF-beta isoforms and Fibroblast Growth Factor exhibit analogous indirect antioncogenic activity through triggering of intercellular induction of apoptosis
Anticancer Research Vol. 18, No. 1A: 45-52

Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR (1991)

Mechanisms and functions of cell death (review)
Annu. Rev. Cell Biol. 7: 663-698

Elstein KH, Zucker RM (1994)

Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations
Experimental Cell Research Vol. 211, No. 2: 322-331

Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S (1996)

Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis
Nature Vol. 380: 723-726

Endoh K-I, Ueno K, Miyashita A, Satoh T (1994)

Size-Regulation and biochemical activities of the multicellular spheroid composed of rat liver cells
Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology Vol. 83, No. 3: 317-327

Fearon ER, Vogelstein B (1990)

A genetic model for colorectal tumorigenesis (review)
Cell 61(5): 759-767

Fillipovich IV, Sorokina NI, Robillard N, Chatal J-F (1997)

Radiation-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells growing as a monolayer and as multicell spheroids
Int. J. Cancer Vol. 72, No. 5: 851-859

Franek F, Chladkova-Sramkova K (1995)

Apoptosis and nutrition: involvement of amino acid transport system in repression of hybridoma cell death
Cytotechnology 18: 113-117

Franek F, Sramkova K (1996)

Cell suicide in starving hybridoma culture: survival-signal effect of some amino acids
Cytotechnology 21: 81-89

Franek F, Sramkova K (1997)

Cell suicide in starving hybridoma culture: survival-signal effect of some amino acids
Cytotechnology 23: 231-239

Frankel A, Buckman R, Kerbel RS (1997)

Abrogation of Taxol-induced G₂M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids
Cancer Research 57: 2388-2393

Freyer JP (1988b)

Role of necrosis in regulating the growth saturation of multicellular spheroids
Cancer Research 48: 2432-2439

Freyer JP, Schor PL (1988a)

Automated selective dissociation of cells from different regions of multicellular spheroids
In vitro Cellular & Developmental Biology Vol. 25, No. 1: 9-19

Freyer JP, Sutherland RM (1986)

Proliferative and clonogenic heterogeneity of cells from EMT6/Ro multicellular spheroids induced by the glucose and oxygen supply
Cancer Research 46: 3513-3520

Friedwald WE, Rous P (1944)

The initiating and promoting elements in tumor production
J. Exp. Med. 80: 102-125

Fürstenberger G, Berry DL, Sorg B, Marks F (1981)

Skin-tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 78: 7722-7726

Gaukroger JM, Bradley A, Chandrachud L, Jarrett WFH, Campo MS (1993)

Interaction between bovine papillomavirus type 4 and cocarcinogens in the production of malignant tumors
Journal of General Virology 74: 2275-2280

Gerlach JC (1994)

Use of hepatocyte cultures for liver support bioreactors
Adv. Exp. Med. Biol. 368: 165-171

Gorcycya W, Gong J, Darzynkiewicz Z (1993)

Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in-situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays
Cancer Res. 53: 1945-1951

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ (1996)

Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors
Nature 379: 88-91

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertson H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M (1991)

Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene
Cell 66(3): 589-600

Hackenjös K, Langer C, Zabel S, Bauer G (1996)

Transformed cells trigger induction of their own apoptosis in coculture with normal cells
Oncology Reports 3: 27-31

Häufel T, Dormann S, Hanusch J, Schwieger A, Bauer G (1999)

Three distinct roles for TGF-beta during intercellular induction of apoptosis: a review
Anticancer Research 19: 105-112

Halpern B, Pejsachowicz B, Febvre HL, Barski G (1966)

Differences in patterns of aggregation of malignant and non-malignant mammalian cells
Nature 8: 157-159

Heldin C-H, Miyazono K, ten Dijke P (1997)

TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins
Nature Vol. 390: 465-471

Heppner GH, Miller BE (1989)

Therapeutic implications of tumor heterogeneity
Semin. Oncol. 16: 91-105

Hipp ML, Bauer G (1997)

Intercellular induction of apoptosis in transformed cells does not depend on p53
Oncogene 15: 791-797

Höfler P, Wehrle I, Bauer G (1993)

TGF- β induces an inhibitory effect of normal cells directed against transformed cells
Int. J. Cancer 54: 125-130

Holtfreter J (1944)

A study of the mechanics of gastrulation
J. Exp. Zool. 95: 171-212

Holtzman DM, Deshmukh M (1997)

Caspases: a treatment target for neurodegenerative disease ?
Nature Medicine Vol. 3, No. 9: 954-955

Inch WR, McCredie JA, Sutherland RM (1970)

Growth of nodular carcinomas in rodent compared with multi-cell spheroids in tissue culture
Growth 34: 271-282

Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ (1998)

Ras, superoxide and signal transduction (review)
Biochem. Pharmacol. 55(9): 1339-1346

Iten E, Ziemięcki A, Schäfer R (1989)

The transformation-suppressive function is lost in tumorigenic cells and is restored upon transfer of a suppressor gene
Recent Results Cancer Res. 113: 78-89

Jaruga P (1999)

Oxidation mechanisms and anti-oxidation in HIV infected patients – effects on disease progression (review)
Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej 53(1): 43-54

Jaworowski A, Crowe SM (1999)

Does HIV cause depletion of CD4+ T cells in vivo by the induction of apoptosis? (review)
Immunology and Cell Biology 77(1): 90-98

Jürgensmeier JM, Bauer G (1997a)

Interference of bcl-2 with intercellular control of carcinogenesis
Int. J. Cancer 71: 698-704

Jürgensmeier JM, Höfler P, Bauer G (1994a)

TGF- β -induced apoptosis of transformed fibroblasts by normal fibroblasts: independence of cell-to-cell contact and dependence on reactive oxygen species
International Journal of Oncology 5: 525-531

Jürgensmeier JM, Panse J, Schäfer R, Bauer G (1997b)

Reactive oxygen species as mediators of the transformed phenotype
Int. J. Cancer 70: 587-589

Jürgensmeier JM, Schmitt CP, Viesel E, Höfler P, Bauer G (1994b)

Transforming Growth Factor β -treated normal fibroblasts eliminate transformed fibroblasts by induction of apoptosis
Cancer Research 54: 393-398

Kahn P, Shin SI (1979)

Cellular tumorigenicity in nude mice. Test of associations among loss of cell-surface fibronectin, anchorage independence and tumor-forming ability
J. Cell Biol. 82: 1-16

Kehrer JP, Park Y (1991)

Oxidative stress during hypoxia in isolated perfused rat heart
Advances in Exp. Medicine and Biology 283: 299-304

Keller GM (1995)

In vitro differentiation of embryonic stem cells
Curr. Opin. Cell Biol. 7: 862-869

Kennedy BK, Austriaco NR, Zhang JS, Guarente L (1995)

Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*
Cell 80(3): 485-496

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972)

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics (review)
Br. J. Cancer 26: 239-257

Knudson AG (1996)

Hereditary cancer: two hits revisited (review)
Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 122(3): 135-140

Knüchel R, Sutherland RM (1990)

Recent developments in research with human tumor spheroids
The Cancer Journal Vol. 3, No. 5: 234-243

Kong Q, Lillehei KO (1998)

Antioxidant inhibitors for cancer therapy (review)
Medical Hypotheses 51(5): 405-409

Kunz-Schughart LA, Freyer JP (1997a)

Adaption of an automated selective dissociation procedure to two novel spheroid types (letter to the editor)
In vitro Cell. Dev. Biol - Animal 33: 73-76

Kunz-Schughart LA, Haberset RC, Freyer JP (1997b)

Mitochondrial function in oncogene-transfected rat fibroblasts isolated from multicellular spheroids
American Journal of Physiology 273 (Cell Physiol. 42, 5 Part 1): C1487-C1495

Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R (1998)

Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumor biology (current status)
Int. J. Exp. Path. 79: 1-23

Langer C, Jürgensmeier JM, Bauer G (1996)

Reactive oxygen species act at both TGF- β -dependent and -independent steps during induction of apoptosis of transformed cells by normal cells
Experimental Cell Research 222: 117-124

Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kuhnle S, Nicotera P (1999)

Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis
Experimental Cell Research 249(2): 396-403

Lemasters JJ (1999)

V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis
American Journal of Physiology 276(1 Pt 1): G1-6

Lerch F (1997)

Die Ausweitung des Eliminationssystems auf die dreidimensionale Zellkultur; Etablierung des Spheroidsystems
Med. Dissertation; Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

Lohr F, Wenz F, Haas S, Flentje M (1995)

Comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) staining and BrdUrd-labelling index under different proliferative conditions in vitro by flow cytometry
Cell Prolif. 28: 93-104

Majno G, Joris I (1995)

Apoptosis, Oncosis and Necrosis
American Journal of Pathology 146: 3-15

Martin W, Zempel G, Hülser D, Willecke K (1991)

Growth inhibition of oncogene-transformed rat fibroblasts by cocultured normal cells: relevance of metabolic cooperation mediated by gap-junctions
Cancer Res. 51: 5348-5354

Massagué J (1987)

The TGF- β family of growth and differentiation factors (minireview)
Cell Vol. 49: 437-438

Massagué J (1992)

Receptors for the TGF- β family (minireview)
Cell Vol. 69: 1067-1070

Massagué J (1996)

TGF- β signaling: receptors, transducer and Mad Proteins (minireview)
Cell Vol. 85: 947-950

Massagué J, Hata A, Liu F (1997)

TGF- β signalling through the Smad pathway (review)
Trends in Cell Biology Vol. 7: 187-192

McAllister RM, Reed G, Huebner RJ (1967)

Colonial growth in agar of cells derived from adenovirus-induced hamster tumors
J. Natl. Cancer Inst. 39: 43-53

McElwain DLS, Pettet GJ (1993)

Cell migration in multicell spheroids: swimming against the tide
Bulletin of Mathematical Biology Vol. 55, No. 3: 655-674

Mehta PP, Bertram JS, Loewenstein WR (1986)

Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells
Cell 44: 187-196

Melchinger W, Strauss S, Zucker B, Bauer G (1996)

Antiapoptotic activity of bovine papilloma virus: implications for the control of oncogenesis
International Journal of Oncology 9: 927-933

Miller DG (1980)

On the nature of susceptibility to cancer: the presidential address
Cancer 46 (6): 1307-1318

Mondal S, Heidelberger C (1976)

Transformation of C3H10T1/2 CL8 mouse embryo fibroblasts by ultraviolet irradiation and a phorbol ester
Nature (London) 260: 710-712

Monz B, Karbach U, Groebe K, Mueller-Klieser W (1994)

Proliferation and oxygenation status of WiDr spheroids in different lactate and oxygen environments
Oncology Reports 1: 1177-1183

Moscona A (1952)

Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos
Exp. Cell Res. 3: 535-539

Moscona A (1957)

The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 43: 184-194

Moscona A (1961)

Rotation-mediated histogenic aggregation of dissociated cells
Exp. Cell Res. 22: 455-475

Mueller-Klieser W (1987)

Multicellular spheroids: a review on cellular aggregates in cancer research (guest editorial)
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 113: 101-122

Mueller-Klieser W (1997)

Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical application (invited review)
Am. J. Physiol. 273 (Cell Physiol. 42): C1109-C1123

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996)

FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signalling complex
Cell Vol. 85: 817-827

Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M (1993)

Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation
EMBO Journal Vol. 12, No. 9: 3679-3684

O'Reilly LA, Strasser A (1999)

Apoptosis and autoimmune disease (review)
Inflammation Research 48(1): 5-21

Panse J, Hipp ML, Bauer G (1997)

Fibroblasts transformed by chemical carcinogens are sensitive to intercellular induction of apoptosis: implications for the control of oncogenesis
Carcinogenesis Vol. 18, No. 2: 259-264

Penninger JM, Kroemer G (1998)

Molecular and cellular mechanisms of T Lymphocyte apoptosis
Advances in Immunology Vol. 68: 51-144

Picht G, Hundertmark N, Schmitt CP, Bauer G (1995)

Clonal analysis of the effect of TGF- β on the apoptosis-inducing activity of normal cells
Experimental Cell Research 218: 71-78

Potten CS, Wilson JW, Booth C (1997)

Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium (review)
Stem Cells 15(2): 82-93

Quade K (1979)

Transformation of mammalian cells by avian myelocystomatosis virus and avian erythroblastosis virus
Virology Vol. 98, No. 2: 461-465

Rak J, Mitsuhashi Y, Erdos V, Huang S-N, Filmus J, Kerbel RS (1995)

Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth-conditions: suppression by mutant c-H-ras oncogene expression
The Journal of Cell Biology 131: 1587-1598

Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen SLC, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martindale D, Koop BF, Peterson EP, Thornberry NA, Huang JQ, MacPherson DP, Black SC, Hornung F, Lenardo MJ, Hayden MR, Roy S, Nicholson DW (1998)

Cell death attenuation by „Usurpin“, a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex
Cell death and differentiation 5: 271-288

Reznikoff CA, Bertram JS, Brankow DW, Heidelberger C (1973a)

Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to post-confluence inhibition of cell division
Cancer Research 33: 3239-3249

Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C (1973b)

Establishment and characterization of a cloned Line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division
Cancer Research 33: 3231-3238

Rizzino A (1988)

Regulatory effects of cell density on the binding of TGF-beta, EGF, PDGF and FGF
Cancer Research 48: 4266-4271

Rofstad EK, Eide K, Skoyum R, Hystad ME, Lyng H (1996)

Apoptosis, energy metabolism, and fraction of radiobiologically hypoxic cells: a study of human melanoma multicellular spheroids
Int. J. Radiat. Biol. Vol 70, No. 3: 241-249

Romero FJ, Zukowski D, Mueller-Klieser W (1997)

Glutathione content of V79 cells in two- or three-dimensional culture
Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 41): C1507-C1512

Saran M, Beck-Speier I, Fellerhoff B, Bauer G (1999)

Phagocytic killing of microorganisms by radical processes: consequences of the reaction of hydroxyl radicals with chloride yielding chlorine atoms (hypothesis paper)
Free Radical Biology and Medicine 26(3-4): 482-490

Saran M, Michel C, Bors W (1998)

Radical functions in vivo: a critical review of current concepts and hypotheses
Z. Naturforsch. 53c: 210-227

Schaefer D, Jürgensmeier JM, Bauer G (1995)

Catechol interferes with TGF- β -induced elimination of transformed cells by normal cells: implications for the survival of transformed cells during carcinogenesis
Int. J. Cancer 60: 520-526

Shin SI, Freedman VH, Risser R, Pollack R (1975)

Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage-independent growth in vitro
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 72: 4435-4439

Shub DA (1994)

Bacterial viruses. Bacterial altruism? (review)
Curr. Biol. 4: 555-556

Slaga TJ, Fischer SM, Nelson K, Gleason GL (1980)

Studies on the mechanisms of skin-tumor promotion: evidence for several stages of promotion
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 77: 3659-3663

Slater AF, Stefan C, Nobel I, van den Dobbelsteen DJ, Orrenius S (1995)

Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis (review)
Toxicology Letters 82-83: 149-153

St. Croix B, Kerbel RS (1997)

Cell adhesion and drug resistance in cancer (review)
Current Opinion in Oncology 9(6): 549-556

Stoker MGP, Shearer M, O'Neill C (1966)

Growth inhibition of polyoma-transformed cells by contact with static normal fibroblasts
J. Cell Sci. 1: 297-310

Strasser A (1999)

Dr. Josef Steiner Cancer Research Prize Lecture: the role of physiological cell death in neoplastic transformation and in anti-cancer therapy (review)
International Journal of Cancer 81(4): 505-511

Strauß S, Weber M, Schächtele C, Bauer G (1995)

PKC-dependent and -independent cellular effects induced by recombinant transforming growth factor type beta 1
International Journal of Oncology 7: 565-572

Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD (1999)

Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox-1
Nature 401(6748): 79-82

Sutherland RM (1988)

Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model
Science Vol. 240: 177-184

Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR (1971)

Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas
Journal of the National Cancer Institute Vol. 46, No. 1: 113-120

Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA, Kruuv J (1970)

A multicomponent radiation survival curve using an in vitro tumor model
Int. J. Radiat. Biol. 18: 491-495

Takezawa T, Mori Y, Yonaha T, Yoshizato K (1993)

Characterization of morphology and cellular metabolism during the spheroid formation by fibroblasts
Experimental Cell Research 208: 430-441

Takezawa T, Mori Y, Yoshizato K (1990)

Cell culture on a thermo-responsive polymer surface
Bio/Technology Vol. 8: 854-856

Takezawa T, Yamazaki M, Mori Y, Yonaha T, Yoshizato K (1992)

Morphological and immuno-cytochemical characterization of a hetero-spheroid composed of fibroblasts and hepatocytes
Journal of Cell Science 101: 495-501

Theodorescu D, Sheehan C, Kerbel RS (1993)

TGF- β gene expression depends on tissue architecture (letter to the editor)
In vitro Cell Dev. Biol. 29A: 105-108

Thompson CB (1995)

Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease
Science 267: 1456-1462

Vaux DL, Korsmeyer SJ (1999)

Cell death in development (review)
Cell 96(2): 245-254

Vaux L, Strasser A (1996)

The molecular biology of apoptosis (review)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2239-2244

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988)

Genetic alterations during colorectal tumor development
New England Journal of Medicine 319(9): 525-532

Vogelstein B, Kinzler KW (1993)

The multistep nature of cancer (review)
Trends in Genetics 9, Nr. 4: 138-141

Vogt C (1842)

Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtsschildkröte (*Alytes obstetricans*)
Jent&Gassmann, Solothurn, Switzerland

Waleh NS, Calaoagan J, Murphy BJ, Knapp AM, Sutherland RM, Laderoute KR (1998)

The redox-sensitive human antioxidant response element induces gene expression under low oxygen condition
Carcinogenesis 19(8): 1333-1337

Walsh CM, Wen GW, Chinnayan AM, O'Rourke K, Dixit VM, Hendrick SM (1998)

A Role for FADD in T cell activation and development
Immunity Vol. 8: 439-449

Wehrle I, Jakob A, Höfler P, Bauer G. (1994)

Transformation of murine fibroblasts by UV light and TGF- β : establishment of an autocrine TGF- β loop
International Journal of Oncology 5: 1341-1346

Whitman M (1997)

Feedback from inhibitory SMADs
Nature Vol. 389: 549-551

Wilson MR (1998)

Apoptotic signal transduction: emerging pathways (review)
Biochemistry and Cell Biology 76(4): 573-582

Winterhalder C, Schmidtman A, Deng H, Lerch F, Bauer G (1999)

Vom zweidimensionalen Zellkultursystem zum dreidimensionalen Sphäroid
BIOforum 3/99: 91-95

Wolff S (1996)

Aspects of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents
Mutation research 358(2): 135-142

Wyllie AH (1980)

Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation
Nature (London) 284: 555-556

Yagi K, Tsuda K, Serada M, Yamada C, Kondoh A, Miura Y (1993)

Rapid formation of multicellular spheroids of adult rat hepatocytes by rotation culture and their immobilization within calcium alginate
Artificial Organs Vol. 17, No. 11: 929-934

Yanase S, Hartmann PS, Ho A, Ishii N (1999)

Oxidative stress pretreatment increases the x-radiation resistance of the nematode *Caenorhabditis elegans*
Mutation Research 426(1): 31-39

Yarmolinsky MB (1995)

Programmed cell death in bacterial populations (review)
Science 267(5199): 836-837

Zucker B, Bauer G (1997a)

Intercellular induction of apoptosis of transformed cells is modulated by their intracellular glutathione concentration
International Journal of Oncology 10: 141-146

Zucker B, Hanusch J, Bauer G (1997b)

Glutathione depletion in fibroblasts is the basis for apoptosis-induction by endogenous reactive oxygen species
Cell death and differentiation 4: 388-395

zur Hausen H (1991)

Viruses in human cancers
Science 254: 1167-1173

zur Hausen H (1994)

Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types
Curr. Topics Microbiol. Immunol. 186: 131-156

zur Hausen H (1998)

Papillomavirus and p53
Nature Vol. 393: 217

7 Danke

Jede Doktorarbeit beginnt mit der Suche nach einem Doktorvater. Vor mehr als zwei Jahren betrat ich – eigentlich mehr zufällig – zusammen mit Sonja und Marcus Georgs Labor. Wir wollten uns nach einer Doktorarbeit bei Prof. Bauer erkundigen, waren aber vom Scheitern unserer Mission fast schon überzeugt (da wir gehört hatten, Prof. Bauer sei völlig „ausgebucht“). Es folgte jedoch ein fast zweistündiges *Gespräch* über die „interzelluläre Induktion der Apoptose“ mit dem Ergebnis, daß wir demnächst dort als Doktoranden anfangen würden. Wir waren überrascht, daß wir keine *Zeugnisse* oder sonst etwas vorzeigen oder *auslosen* mußten, *wer* von uns drei denn nun anfangen könnte. Eine für Medizinstudenten ganz und gar ungewohnte Situation... Ich möchte mich dafür und für die darauffolgende schöne (und interessante) Zeit im Labor bei Georg herzlich bedanken. Ich hatte von Anfang an das Gefühl, willkommen zu sein. Durch Georgs Optimismus, Begeisterungsfähigkeit und uneingeschränktes Vertrauen herrschte im Labor (fast) immer eine gute Stimmung, sodaß man trotz eigener Mißerfolge selten den Glauben verlor, alles werde am Ende doch gut ausgehen. Dafür nochmals vielen Dank.

Diese Doktorarbeit wäre ohne die Hilfe vieler anderer lieber Menschen wahrscheinlich niemals zustande gekommen. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern und bei Ada für Geduld, Liebe und Verständnis während dieser Zeit.

Freundschaften sind – laut Georg – während einer Doktorarbeit besonderen Gefahren ausgesetzt. Ich bin froh, daß sich diese These (ausnahmsweise) *nicht* bewahrheitet hat. Ich möchte mich ganz herzlich bei allen meinen Freunden innerhalb und außerhalb des Labors für die schöne Zeit und die Unterstützung jeglicher Art bedanken. Besonderen Dank an Sonja, Marcus, Mareike, Corinna und Claus, die sich trotz eigener Sorgen und viel Arbeit immer auch über meine Sorgen den Kopf zerbrochen haben; ihr habt mir damit sehr geholfen. Allen anderen, die ich jetzt vergessen habe, möchte ich ebenso herzlich danken.

Ein Dankeschön geht außerdem an H. Deng für die Einführung in die Sphäroidtechnik, Andreas für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Sphäroid-Versuche, Jürgen Brandel für das prompte Scannen unzähliger Dias, Dr. Ralf Hanselmann für die Herstellung des Kunststoffes, Susanne Zabel für die Einführung in die Zellkultur-Technik und Prof. Brandner (+ Labor) für das Interesse und die freundliche Unterstützung unserer Arbeit.

8 Lebenslauf

Clemens Winterhalder

Geboren: 14.06.1973 in Rheinfelden/Baden

Eltern: Sigrid Winterhalder, geb. Riegger (Hausfrau)
Adolf Winterhalder (Oberstudiendirektor)

1980-1984 Grund- und Hauptschule Fahrnau

1984-1993 Theodor-Heuss-Gymnasium Schopfheim, Abitur 1993

1993-1994 Zivildienst an der ev. Sozialstation Schopfheim (mobiler sozialer Hilfsdienst mit individueller Schwerstbehindertenbetreuung)

1994 zum WS 1994/1995 Beginn des Medizinstudiums in Freiburg

1996 Physikum

1997 Famulatur am Kreiskrankenhaus Schopfheim (Allgemein- und Unfallchirurgie)

1997 1. Staatsexamen

1997 Famulatur am St. Elisabethen-Krankenhaus Lörrach (Innere Medizin)

1998 Famulatur am St. Elisabethen-Krankenhaus Lörrach (Gynäkologie)

1998 Beginn der exp. Doktorarbeit im Labor von Prof. Dr. G. Bauer, Abteilung Virologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Freiburg

1999 Famulatur in der kardiologischen Ambulanz der Uniklinik Freiburg

2000 2. Staatsexamen

2000-2001 Praktisches Jahr am St. Claraspital Basel (Chirurgie) und an der Kreisklinik Tuttlingen (Innere Medizin und Anästhesie)

2001 3. Staatsexamen