

Aus der Medizinischen Klinik-Innenstadt der Universität in München.

Komm. Direktor: Prof. Dr. D. Schlöndorff

**Regulation der Invasion von Bronchialkarzinomzellen unterschiedlicher
Differenzierung in die Basalmembran in Kokulturen und in Matrigel-Kammern.**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dana Krajciova

aus

Ruzomberok (Slowakei)

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. M. Huber

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. H. Allgayer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. S.T. Astner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2003

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Das Bronchialkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Histomorphologische Klassifikation	2
1.1.3 Prognose des Bronchialkarzinoms	3
1.2 Mechanismen der malignen Progression	4
1.2.1 Invasion	5
1.3 Invasionsmodelle	10
1.3.1 In-vivo Modelle.....	10
1.3.2 In-vitro Modelle	11
2 PROBLEMSTELLUNG	15
3 MATERIALIEN UND METHODEN.....	17
3.1 Labormaterial und Geräte	17
3.2 Kulturmedien und Fertiglösungen	18
3.3 Zellkultur	19
3.3.1 Beschichtung mit Agar.....	19
3.3.2 Kultur der Bronchusbiopsien	20
3.3.3 Verwendete Tumorzelllinien.....	20
3.3.4 Kulturbedingungen.....	22
3.3.5 Kokultivierung	23

Inhaltverzeichnis

3.4	Histologische Färbetechniken	25
3.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	25
3.4.2	Immunhistochemische Färbung	26
3.5	Auswertung der Invasion von Tumorzellen in den Kokulturen	27
3.5.1	Lichtmikroskopie	27
3.5.2	Raster-Elektronenmikroskopie.....	28
3.6	Messung der Invasion in den Boyden-Kammern	28
3.6.1	Beschichtung der Membraneinsätze mit dem Matrigel®.....	29
3.6.2	Bestimmung der Invasion mit dem Lichtmikroskop.....	29
3.6.3	Bestimmung der Invasion mittels Fluoroblockmethode	30
3.7	Messung der Invasion in der Boyden-Kammer mit konditioniertem Medium....	32
3.7.1	Herstellung von konditioniertem Medium der Zelllinie LCLC 103H	32
3.7.2	Bestimmung der Invasion nach Inkubation mit konditioniertem Medium	32
3.8	Statistische Auswertung.....	33
3.9	Raster-Elektronenmikroskopie.....	33
3.9.1	Vorbereitung und Auswertung der Präparate.....	33
4	ERGEBNISSE.....	34
4.1	Freilegung der Basalmembran.....	34
4.2	Invasion von Tumorzellen in 3D Kokulturen	36
4.3	Transmigration der Tumorzellen durch Matrigel®	38
4.3.1	Einfluss von Matrigel® auf Invasionsfähigkeit der Zellen	38
4.3.2	Invasion der Zellen durch die Matrigel®-beschichtete Membran	44
4.3.3	Ergebnisse der Invasionsversuche mit DiO markierten Zellen.....	47
4.3.4	Invasion DiO markierter Zellen mit konditioniertem Medium.....	48
4.4	Elektronenmikroskopie	49
4.4.1	Zeitpunkt der Freilegung der Basalmembran an der Späroidkultur.....	49

Inhaltverzeichnis

4.4.2	Invasionsmuster der Zelllinien an Matrigel	49
5	DISKUSSION	53
5.1	Auswahl des Kulturmodells zur Untersuchung der Invasionsfähigkeit von Tumorzellen	53
5.2	Invasionsverhalten der einzelnen Zelllinien	56
5.3	Vergleich der Ergebnisse aus Kokultur- und Matrigel®-Modell	58
5.4	Invasionsverhalten der Zelllinien in konditioniertem Medium	59
5.5	Elektronenmikroskopie	59
6	ZUSAMMENFASSUNG	61
7	LITERATURVERZEICHNIS	63
8	DANKSAGUNG	72
9	LEBENS LAUF	73

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BEGM	Bronchial Epithelial Cell Basal Medium
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CK-BB	Creatin-Kinase Fraktion BB
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNS	Deoxyribonucleinsäure
E 64	L-trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido(4-guanidino)butan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EZM	Extrazelluläre Matrix
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
hCG	humanes Choriogonadotropin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HTS	high throughput screening
incl.	inclusive
min	Minute
mM	milimollar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NSE	neuronenspezifische Enolase
NCS	newborn calf serum
PET	Polyethylentetraphtalat
PBS	Phosphat Puffer
RNS	Ribonucleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium
SCID Maus	severe combined immuno deficiency
Tab.	Tabelle

Abkürzungsverzeichnis

TBS	Tris-HCl-Puffer
TNM Klasifikation	Tumor, Node and Metastasis- Klassifikation
Upm	Umdrehung pro Minute
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
3D	dreidimensional
5-JÜR	5 Jahres-Überlebensrate

1 Einleitung

1.1 Das Bronchialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Weltweit ist das Bronchialkarzinom der häufigste bösartige Tumor des Mannes. Seine Inzidenz nimmt in den westlichen Ländern weiter zu (Negri 1994). In Deutschland steht das Bronchialkarzinom nach dem Mammakarzinom und dem Kolonkarzinom an dritter Stelle der malignen Erkrankungen der Frau (Statistisches Bundesamt 1999).

Trotz weitreichender Bemühungen in der Weiterentwicklung von Diagnose und Therapie stieg für Patienten mit Bronchialkarzinom die Fünfjahresüberlebensrate in den letzten 25 Jahren nur gering und liegt derzeit bei ca. 13 %. Die Analyse der Überlebenszeiten ergibt eine mediane Überlebenszeit von 10 Monaten für Männer und von 12 Monaten für Frauen (Krebsregister Rheinland-Pfalz 2002). Im Jahr 1999 verstarben in Deutschland 37.615 Menschen an einem Bronchialkarzinom. Damit war das Bronchialkarzinom bei Männern mit 62,29 Todesfällen pro 100.000 Einwohner für ca. ein Drittel der Krebstodesfälle und bei Frauen mit 14,98 Todesfällen pro 100.000 für knapp 10% der Krebstodesfälle verantwortlich (Statistisches Bundesamt 2002). Diese Zahlen belegen eindrücklich, welchen Stellenwert das Bronchialkarzinom in der Reihe der malignen Erkrankungen derzeit einnimmt.

Hauptursache des Bronchialkarzinoms ist mit 85% das inhalative Rauchen, für das eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen ist. 8% der Bronchialkarzinom-Todesfälle werden durch überwiegend berufsbedingte Karzinogene wie Asbest und Uran hervorgerufen, 5% werden durch Luftverschmutzung und 2% durch andere Faktoren verursacht (Samett 1993). Ein weiterer relevanter Risikofaktor ist die familiäre Belastung. Angehörige von Bronchialkarzinom-Patienten erkranken im Vergleich zur Normalbevölkerung mehr als doppelt so häufig (Wu 1996). Auch wenn dabei soziale Aspekte eine Rolle spielen können, ist vor diesem Hintergrund verständlich, dass sich das Forschungsinteresse in den letzten Jahren vermehrt auf genetische Faktoren in der Karzinogenese fokussierte. In der frühen Phase der Karzinomentstehung findet sich, vor allem beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, ein Allelverlust auf dem langen Arm von Chromosom 3 (fragile histidine triad-Gen), sowie den kurzen Armen der Chromosome 13 (Retinoblastom-Gen) und 17 (p53-Gen). Im weiteren Verlauf der Karzinogenese kann die Aktivierung von

Onkogenen der myc- und ras-Familie hinzukommen. Mutationen des Ki-ras Gens kommen häufig bei Adeno- und großzelligen Karzinomen vor und sind assoziiert mit Zigarettenrauchen, Asbestexposition und weiblichem Geschlecht. Vor allem bei Rauchern mit einem Adenokarzinom der Lunge werden häufiger Ki-ras Mutationen im Tumor gefunden (Ahrendt 2001). Das myc-Onkogen dagegen ist oft bei den kleinzelligen Karzinomen überexprimiert. Bei den Tumorsuppressorgenen spielt das p53 eine wichtige Rolle, da es in mehr als 80% der kleinzelligen und in ca. 60% der nicht kleinzelligen Karzinome mutiert oder verlorengegangen ist (Colby 1995).

1.1.2 Histomorphologische Klassifikation

Das Bronchialkarzinom wird als epitheliale Neoplasie histomorphologisch entsprechend der WHO-Klassifizierung (Travis 1999) in folgende Hauptgruppen eingeteilt:

Plattenepithelkarzinom

Kleinzelliges Karzinom

Adenokarzinom

Großzelliges Karzinom

Adenosquamöses Karzinom

Karzinome mit pleomorphen, sarkomatoiden oder sarkomatösen Anteilen

Karzinoidtumor

Karzinome vom Speicheldrüsentyp (Bronchialdrüsenkarzinom)

Unklassifizierbare Karzinome

Aus klinischen Gesichtspunkten hat sich die Einteilung der Bronchialkarzinome nach ihrem biologischen Verhalten in zwei Entitäten, in das nichtkleinzellige (**Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC**) und in das kleinzellige (**Small Cell Lung Cancer, SCLC**) Bronchialkarzinom durchgesetzt. Die erste Gruppe umfasst 70-80% aller Bronchialkarzinome, für die eine lokoregionale Tumorausbreitung mit relativ später hämatogener Metastasierung charakteristisch ist. Die Versuche, die Gruppe der nicht kleinzelligen Bronchialkarzinome prognostisch differenten Subgruppen zuzuordnen, spielen bislang in der Praxis keine Rolle. Dies mag auch daran liegen, dass eine signifikante Unterscheidung des klinischen Verlaufs innerhalb der Gruppe der NSCLC nicht gelingt.

Einleitung

Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist ein hochgradig maligner Tumor neuroendokrinen Ursprungs. Klinisch imponiert es durch rasche Progredienz, frühzeitige auch hämatogene Metastasierung sowie hohe lokoregionale Rezidivneigung. Bei fast allen Patienten liegt bei Diagnosestellung bereits ein Befall regionärer sowie extrathorakaler Lymphknoten vor. Eine weitere Besonderheit des SCLC sind die damit assoziierten paraneoplastischen Syndrome wie das Cushing-, das Hyperkalzämie-Syndrom und die Hyponatriämie. Dies ist vermutlich Ausdruck der neuroendokrinen Abstammung, die auch beim Karzinoid vorliegt.

1.1.3 Prognose des Bronchialkarzinoms

Die Tumorausbreitung und Metastasierung bestimmt, wie auch bei anderen Tumoren, die Prognose der Patienten (Tab. 1). Die Unterschiede in den 5-JÜR bei klinischer Einteilung gegenüber einer Einteilung nach histopathologischen Gesichtspunkten erklärt sich durch eine Unterschätzung von Tumorgöße bzw. Lymphknotenstatus bei untersuchungstechnischer Bestimmung. Mithilfe der Stadieneinteilung wird die erforderliche bzw. mögliche Therapie (chirurgische, Strahlen- oder Chemo-Therapie) bestimmt.

Stadium	Klassifikation	5-Jahres-Überlebensrate in %
Stadium 0	TisN0M0 (Carcinoma in situ)	
Klinische Stadieneinteilung		
Stadium IA	T1N0M0	61
Stadium IB	T2N0M0	38
Stadium II A	T1N1M0	34
Stadium IIB	T2N1M0, T3N0M0	24
Stadium IIIA	T3N1M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N2M0	13
Stadium IIIB	T1-4N3M0, T4N0-4M0	5
Stadium IV	T1-4N0-4M1	1
Pathologische Stadieneinteilung		
Stadium IA	T1N0M0	67
Stadium IB	T2N0M0	57
Stadium II A	T1N1M0	55
Stadium IIB	T2N1M0, T3N0M0	39
Stadium IIIA	T3N1M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N2M0	23

Tabelle 1 TNM-Klassifikation, klinische und pathologische Stadieneinteilung mit 5-Jahres-Überlebensraten (Mountain 1997)

1.2 Mechanismen der malignen Progression

„Neoplasie“ oder „Tumor“ ist definiert als abnorme Vergrößerung eines Gewebes, welches durch autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen entsteht. Maligne Tumoren unterscheiden sich von benignen durch infiltratives und destruktives Wachstum in fremdem Gewebe (Invasion) sowie durch die Fähigkeit zur Metastasenbildung. Im Verlauf der malignen Transformation kommt es durch zunehmende Entdifferenzierung des Epithels von der Hyperplasie zum Carcinoma in situ. Wenn die Tumorzellen die Basalmembran überschreiten, erfüllen sie damit ein wesentliches Definitionskriterium der Malignität, das invasive Wachstum. Nach der Drei-Schritt-Hypothese besteht die Invasion aus folgenden Schritten: Adhäsion der Tumorzellen an die Matrix, Degradation der Matrix und Migration der Tumorzellen durch die degradierte Matrix (Liotta 1986). D.h. die Tumorzellen wandern in das subepitheliale Bindegewebe und können aktiv Bestandteile des Bindegewebes abbauen. Nach Verlust der Zell-Zell-Adhäsion kommt es zum Einbruch von Tumorzellen in die Lymph- oder Blutgefäße, was als erster Schritt der Fernmetastasierung angesehen werden kann. Die Tumorzellen dringen in die Lymphabflusswege ein, bilden Absiedlungen in den regionären Lymphknoten und gelangen dann weiter über die Lymphabflusswege in die Blutbahn. In den Tumorzellen, die sich in der Blutbahn befinden, muss ein Mechanismus zum Schutz gegen Apoptose aktiv sein. In etwa 90% aller Tumoren bilden sich die Metastasen in denjenigen Kapillarbetten, in die Tumorzellen entsprechend der anatomischen Lokalisation des Tumors zuerst gelangen. Dies kann über die Embolisierung der Endstrombahn oder durch Adhärenz der Tumorzellen an das Epithel geschehen. Die Tumorzellen durchdringen die endotheliale Basalmembran, invadieren das subendotheliale bindegewebige Stroma und im weiteren Verlauf das Parenchym des betreffenden Organs. Hier bilden sich schließlich die Metastasen.

Die verschiedenen Ausbreitungs- und Metastasierungsmuster des Bronchialkarzinoms können in folgende Gruppen eingeteilt werden: Wachstum per continuitatem in benachbarte Strukturen, aerogene, lymphogene oder hämatogene Metastasierung. Die Metastasierung auf lymphatischem Wege ist beim Bronchialkarzinom sehr häufig. Die regionären Lymphknoten sind bei der Diagnosestellung beim kleinzelligen Karzinom in 78% infiltriert. Beim Plattenepithelkarzinom beträgt die Rate 40% und beim großzelligen Karzinom 32%. Die hämatogene Metastasierung ist bei kleinzelligem Bronchialkarzinom zu 99% und beim großzelligen Bronchialkarzinom zu 97% festzustellen (Colby 1995).

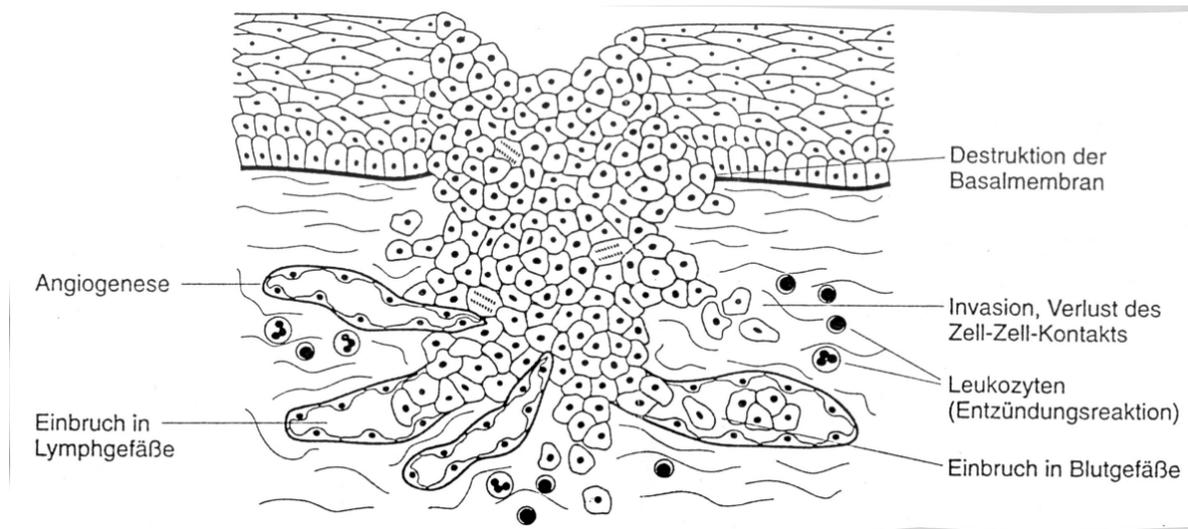
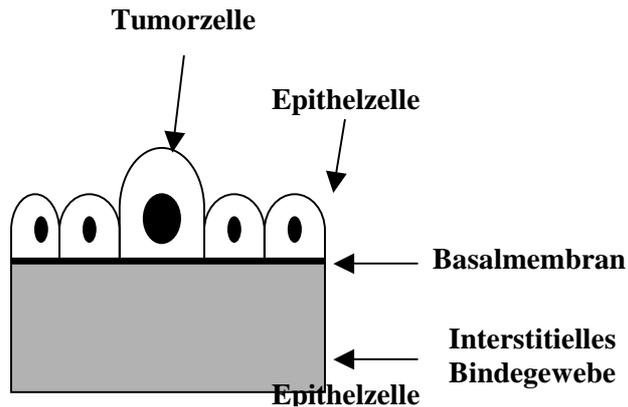


Abbildung 1 Eigenschaften eines invasiv wachsenden Karzinoms (Wagner 1999)

1.2.1 Invasion

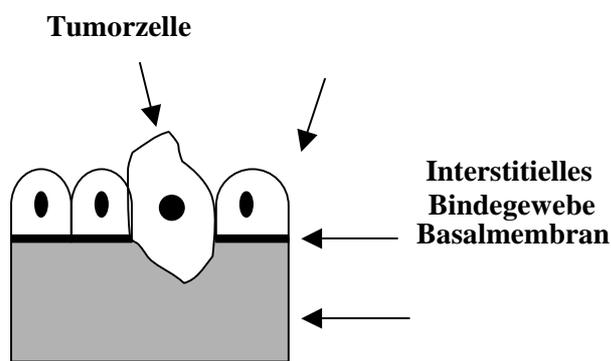
Die Durchwanderung der Basalmembran durch die Tumorzellen, auch Invasion genannt, ist Voraussetzung für die Metastasierung. Die Basalmembran ist ein spezialisierter Teil der extrazellulären Matrix. Meist stellt sie eine Grenzfläche dar, wie z. B. zwischen alveolären und endothelialen Zellen der Lunge. Die Basalmembran entsteht embryonal durch Verschmelzung eines epithelialen und endothelialen Basalmembranblattes. Sie erfüllt vielfältige Funktionen: Indem sie Zellen eine Haftfläche bietet, beeinflusst sie einerseits das Wachstums-, Regenerations- und Differenzierungsverhalten und wirkt andererseits aufgrund ihrer selektiven Permeabilität als Filtrationsschranke. Lichtmikroskopisch stellt sich die Basalmembran wegen ihres Glykoproteingehaltes mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion als homogenes rotes Band dar.

Alle Basalmembranen enthalten den spezifischen Kollagentyp IV, der die wesentliche strukturelle Komponente darstellt. Das Kollagen IV unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung von anderen Kollagentypen (I, II und III) durch sehr häufig unterbrochene Peptidketten, was zu einer erhöhten Flexibilität und Elastizität wie auch zu einer vermehrten proteolytischen Anfälligkeit führt. Desweiteren enthält Kollagen IV mehr hydroxylierte Aminosäuren und mehr Oligosaccharide als die interstitiellen Kollagene.



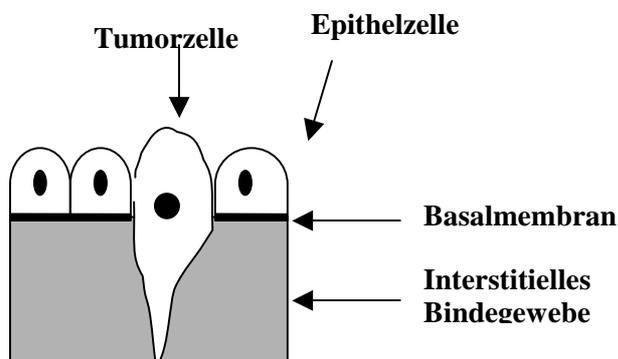
1. Adhäsion der Tumorzellen an die Basalmembran

Die Tumorzellen binden sich mittels eigener Adhäsionsmoleküle an Laminin. Damit stellt Laminin ein Haftprotein für die Zellen zum Kollagen IV dar. Kollagen IV stellt die wesentliche strukturelle Komponente der Basalmembran.



2. Degradation der Basalmembran mittels lokaler Proteolyse

Die zur Proteolyse benötigte Enzyme werden von den Tumorzellen selbst oder vom gesunden Bindegewebe nach der Stimulation durch die Tumorzellen produziert.



3. Migration der Tumorzellen

Durch die degradierte EZM bewegen sich die Tumorzellen durch Chemotaxis oder mittels eigener Motilitätsfähigkeiten in das gesunde Bindegewebe.

Abbildung 2 Schematische Darstellung der „three step theory of invasion“ (Liotta 1986)

Ein wichtiger Anteil der Basalmembran besteht aus nichtkollagenen Glykoproteinen. Als Adhäsionsmoleküle regulieren sie die Adhäsion von Zellen, die der Basalmembran aufsitzen. Sie steuern deren biologische Aktivität und regulieren damit selbst die Bildung der Matrix. Diese setzt sich nach dem heutigen Kenntnisstand aus Laminin, Heparansulfat-Proteoglykan,

Einleitung

Fibronectin, Entaktin und Nidogen zusammen. Laminin wird morphologisch in der internen und externen Lamina rara der Basalmembran beobachtet, bindet an Zelloberflächen und stellt damit das Haftprotein für endotheliale und epitheliale Zellen zum Kollagen IV dar.

Die Tumorzellen heften sich bei der Adhäsion mittels Oberflächenproteinen an bestimmte Glykoproteine der EZM, die aus zwei Kompartimenten besteht: aus der Basalmembran und dem interstitiellen Bindegewebe. Die funktionell bedeutsamsten Glykoproteine der Basalmembran sind Laminin und Kollagen IV, im Bindegewebe vor allem Fibronectin. Die Adhäsionsmoleküle vermitteln nicht nur die Adhärenz von Zellen an Bestandteile der EZM, wie Integrine, die die wichtigsten Zellmembranrezeptoren sind, sondern auch den Kontakt von Zellen untereinander, wobei das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin von besonderer Bedeutung ist. Da Zelladhäsionsmoleküle die Struktur eines Gewebes wesentlich bestimmen, kann der Verlust adhäsiver Eigenschaften ursächlich für eine verminderte Differenzierung und invasive Wachstumseigenschaften des Tumors verantwortlich sein.

1.2.1.1 Adhäsion

Zelladhäsionsmoleküle, die durch Funktionsverlust die maligne Progression fördern, sind funktionell als Tumorsuppressoren zu betrachten. Die Adhäsionsmoleküle kann man in folgende Gruppen einteilen: Integrine, E-Cadherin, E-Selektin und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie.

Die Adhäsionsmoleküle aus der Gruppe der Integrine sind an der Zelloberfläche lokalisierte heterodimerische Glykoproteine (α - und β -Subeinheiten). Sie beeinflussen wichtige Aspekte des Verhaltens der Tumorzellen wie Motilität, Invasion, Zellwachstum und Zellmorphologie. Die Integrine verbinden die EZM mittels ihrer cytoplasmatischen Domänen mit den Komponenten des Aktinskeletts der Zelle. Auf diese Weise erfüllen die Integrine eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion (Aplin 1999, Giancotti 1999). Der Kontakt der Integrine mit den Proteinen der EZM aktiviert die Gruppe der Rho-Proteine der kleinen GTP-ase; umgekehrt beeinflussen die Proteine aus der Rho- und Ras-Gruppe die Fähigkeit der Bindung von Integrinen an ihre Liganden. Eine Studie zeigt, dass das $\alpha\beta_3$ -Integrin einen Einfluss auf die Endothelproliferation beim menschlichen Bronchialkarzinom hat (Max 1997). Eine Hemmung dieses Integrins konnte die Angiogenese im Primärtumor beeinflussen. In Mammakarzinomen beobachtet man häufig einen Verlust des $\alpha_2\beta_1$ -Integrins.

Dieses Integrin bindet an die basalamembranspezifischen Bestandteile Kollagen IV und Laminin und ist auf diese Weise am Erhalt der Gewebsstruktur beteiligt (Zutter 1995).

Es ist auch bekannt, dass die Veränderungen der Expression oder Struktur der E-Cadherine oder Catenine zur Zerstörung der Adhäsionsbindung und in Folge dessen maligne Progression begünstigen. Die E-Cadherin-Mutationen finden sich in mehr als der Hälfte der infiltrativen lobulären Mammakarzinome (Bex 1995, 1996). Da in Tumoren mit mutierten E-Cadherin-Genen das zweite Allel häufig deletiert ist, ist hier das invasive Wachstum mit dem Verlust der E-Cadherin-Funktion zu erklären. E-Cadherin wurde als Tumorsuppressor bezeichnet, vor allem weil Zellen E-Cadherin-negativer Epitheliumtumoren zur Invasion neigen, während die Mehrzahl der Zellen E-Cadherin-positiver Mammakarzinome keine Neigung zur Invasion zeigen (Sommers 1991, 1994, Pierceall 1995). In einer Studie von Nieman scheint die Expression eines nicht epithelialen Cadherins (N-Cadherin) in einem Zusammenhang mit der gestörten Motilität und Invasion von Mammakarzinomzellen zu stehen (Nieman 1999).

1.2.1.2 Degradation der extrazellulären Matrix

Die Degradation des Bindegewebes wird als wichtiger Schritt angesehen, um den malignen Zellen die lokale Invasion zu erlauben, weiter in die Lymph- und Blutzirkulation zu gelangen und schließlich Fernmetastasen zu bilden. Mittels lokaler Proteolyse wird ein Zugang durch die Basalmembran und weiter in das Bindegewebe geschaffen. Die dazu benötigten Enzyme werden von den Tumorzellen selbst oder vom gesunden Gewebe nach Stimulation durch die Tumorzellen produziert. Die 4 bisher bekannten Klassen der Proteinase, die sich an der Proteolyse beteiligen, sind: Serin-Proteinase, Cystein-Proteinase, Asparagin-Proteinase und Matrix-Metalloproteinase.

Viele Studien über die Degradation beschäftigten sich mit der Expression von MMP bei malignen Zellen. Sie untersuchten die direkte Korrelation zwischen der Anzahl der von Tumorzellen produzierten MMP und den Invasivitätseigenschaften der Zellen in-vitro sowie dem Metastasierungspotenzial in-vivo. Die Studien zeigten, dass die Invasivitätskapazität direkt mit der Produktion der MMP korreliert (Liotta 1980, Nakajima 1987, Garbisa 1988).

Die Anwendung von Methoden wie in-situ Hybridisation und Immunhistochemie lassen die Produktion vom MMP und auch deren Distribution in menschlichem Tumorgewebe erkennen. Die Lokalisation der MMP-2 im 3D Kokulturmodell aus normalen endometrialen Stromazellen und endometrialen Karzinomzellen zeigte, dass die Expression der MMP-2

gleichzeitig im Cytoplasma der Stromazellen und auf der Oberfläche der endometrialen Karzinomzellen lokalisiert sind (Dong-Wook 2001). Auch andere Studien legen dar, dass Proteasen von Stromazellen in der Invasionszone exprimiert werden (Poulson 1992, McDonnell 1999).

Die neutrophile Elastase konnte in mehreren nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden. Dass deren Konzentration in Tumoren im T4-Stadium signifikant höher ist als in den als T3 klassifizierten Tumoren und sich eine besonders hohe Konzentration bei Tumoren, welche die Aorta invadierten, fand, spricht für die klinische Signifikanz dieser Protease. Die neutrophile Elastase ist die einzige neutrale Protease, die neben den anderen Matrixkomponenten auch Elastin degradieren kann (Yamashita 1997).

In Bronchialkarzinomen findet man häufig eine Überexpression der Cathepsine B, L und H, die zu den Cysteinproteinasen gehören. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde der Einfluss der Cathepsine auf die Invasivität von Tumorzellen untersucht. An künstlichen Basalmembranmodellen konnte die Invasion von Zelllinien eines malignen Melanoms (Bjornland 1996) und eines Lungenkarzinoms (Navab 1997) durch die Zugabe des Cathepsin B Inhibitors E64 signifikant gehemmt werden. Am 3D-Kokulturmodell werden für eine signifikante Beeinflussung der Invasionstiefe wesentlich höhere Hemmstoffkonzentrationen benötigt.

1.2.1.3 Migration

Die Tumorzellen bewegen sich durch die degradierte Matrix mittels Chemotaxis. Die Motilitätsfaktoren werden dabei sowohl vom gesunden Gewebe als auch von den Tumorzellen selbst ausgeschüttet. Die Motilität der Tumorzellen ist Voraussetzung für deren Metastasierung. Eine wichtige Rolle bei Zellmotilität spielen Integrine, die sich auch bei der Adhäsion von Tumorzellen an die Extrazelluläre Matrix beteiligen. Besonders entscheidend als Regulator der Migration ist die Rolle der von Integrin-abhängigen Thyrosin-Kinasen (Parise 2000).

Die einzelnen Rho-ähnlichen GTP-asen bewirken die Modulation des Aktin-Zytoskeletts als eine Reaktion auf die Rezeptorstimulation. In den meisten Studien ließ das Vorhandensein von spezifischen Veränderungen des Zytoskeletts der Zellen, wie die Bildung von Filopodien, Lamellipodien und Stressfasern auf den Aktivierungszustand von Cdc42, Rac und Rho schließen, so dass man davon ausgeht, dass die Zellmotilität durch

Integrinaktivierung durch die Proteine Ras, CDc42 und Rho koordiniert wird (Nobes 1995, 1999, Sander 1999).

1.3 Invasionsmodelle

Die Tumordinvasion kann anhand verschiedener Invasionsmodelle untersucht werden. Um Ergebnisse der Studien möglichst auf den Menschen übertragbar zu machen und sie so für neue Therapiestrategien zu nützen, sollten die Untersuchungsbedingungen möglichst der in-vivo Situation gleichen. Grundsätzlich kann man zwischen in-vivo und in-vitro Modellen unterscheiden.

1.3.1 In-vivo Modelle

Das invasive Wachstum der Tumorzellen kann in-vivo unter Verwendung geeigneter Tiermodelle untersucht werden. Dabei kommen vor allem solche Species in Frage, in welchen die Immunantwort gegen die Tumorzellen reduziert ist. Die Untersuchung menschlicher Tumoren erfolgt häufig an sogenannten SCID-Nacktmäusen, bei denen das Immunsystem durch einen Defekt der V(D)-Rekombinase weitgehend ausgeschaltet ist. Zum Studium lokaler Invasion werden die Tumorzellen subkutan injiziert. Die untersuchten Stufen der malignen Progression entsprechen hierbei der Invasion des Bindegewebes unterhalb der Basalmembran. Als typische Metastasierungsmodelle im Mausmodell kommen intravenöse oder intraperitoneale Tumordinjektion in Frage. Nach intraperitonealer Injektion durchdringen die Tumorzellen Mesothel, die Basalmembran und submesotheliales Stroma. Dieses Modell entspricht so am ehesten den ersten Schritten der Fernmetastasierung.

Ein weiteres Modell sind Hühnerembryonen in frühen Entwicklungsstadien. Die Immunabwehr ist bei diesen erst ab einem Alter von 18 Tagen aktiv (Weber 1977). Die Tumorzellen werden entweder direkt auf der Amnionmembran kultiviert oder in den Embryo injiziert, wie in der Studie von Ossowski. Dieser hatte Wachstum und Metastasierung eines menschlichen Epidermoid-Karzinoms im Hühnerembryo untersucht (Ossowski 1980). Die Amnionmembran ist inzwischen auch ein beliebtes Modell für die Untersuchung der Angiogenese. Für beide Modelle ist die Vergleichbarkeit mit menschlichem Gewebe in Frage zu stellen.

1.3.2 In-vitro Modelle

Es gibt eine Vielzahl an in-vitro Modellen, die mehr oder weniger den Bedingungen in-vivo gleichen. In-vitro Modelle bieten im Vergleich zu in-vivo Modellen Vorteile für eine systematische Untersuchung: Die bindegewebige Matrix ist besser definiert, immunologische Abwehrmechanismen spielen keine Rolle und die Handhabung ist meist einfacher.

Bei der Auswahl des geeigneten in-vitro Modells sollte beachtet werden, dass das System über einen längeren Zeitraum beobachtbar ist. Wichtige in-vitro Systeme umfassen die Invasion von Tumorzellen in parenchymatöse Organfragmente sowie in natürliche und rekonstruierte Membranen (Kokulturen). Als Organfragmente wurden z.B. Gewebstücke des embryonalen Hühnerherzens verwendet. Als menschliches Material können Organfragmentkulturen aus Operations- oder Biopsiematerial verwendet werden. Ein der physiologischen Situation entsprechendes Modell für den initialen Schritt der Adhäsion von metastasierenden Tumorzellen an Endothelien sind isolierte Gefäße, z.B. die Nabelschnurvene.

	3D Invasionsmodell (Organkultur)	2D Invasionsmodell (Gelkultur)
interzelluläre Interaktion	erhalten	verändert
interzelluläre Matrix	erhalten	entfernt
Interaktion zwischen Zellen und künstlichem Substrat	fehlt	ist vorhanden
Proliferation	begrenzt	unterstützt
Funktion	erhalten	erhalten
Subkultivierung	ja	nein
Zeitverlauf	einige Wochen	Monate-Jahre

Tabelle 2 Charakterisierung von 2- und 3-dimensionalen Invasionsmodellen (Mareel 1980)

Die Untersuchungen an Invasionsmodellen und Organkulturmodellen können viele verschiedene Gesichtspunkte betreffen. So ist es möglich, neben den Mechanismen des Zellwachstums, der Zellproliferation, der Zellkontaktbildung, der Zelldifferenzierung und des Zelltodes auch pathobiologische Aspekte wie Invasion, Angiogenese und Genexpression zu untersuchen. Ein großes Anwendungsgebiet finden die 3D Invasionsmodelle für die

Untersuchungen von experimentellen Therapieansätzen, wie der Pharmakologie, Radiotherapie oder photodynamischen Therapie.

1.3.2.1 Zweidimensionale Invasionsmodelle

Die zweidimensionalen Invasionsmodelle sind meist Systeme, bei denen der Empfänger aus einem bestimmten Gel und das Transplantat aus Zellen einer Zelllinie besteht. Das Gel kann je nach Herstellungsmethode aus künstlichem, tierischem oder menschlichem Material bestehen. In Abhängigkeit von der molekularen Zusammensetzung können die verschiedenen Gele entweder als Basalmembran (Matrigel®) oder Ersatz für interstitielle Stromamatrix (Kollagen) verwendet werden. Um die beiden Komponenten im Medium getrennt voneinander während des Invasionsvorgangs untersuchen zu können, gibt es Kulturschalen mit zwei Kammern, die durch Filter unterschiedlicher Porengröße voneinander getrennt sind. Kleinmann und Mitarbeitern gelang es, eine Basalmembran in-vitro zu rekonstruieren (Kleinman 1986). Die künstliche Basalmembran ist ein Gel (Matrigel®), welches aus dem Extrakt eines Tumors mit hohem Basalmembrananteil, dem Englebreth-Holm-Swarm-Tumor, hergestellt wird. Hauptbestandteile des Gels sind Kollagen IV, Laminin und Heparansulfat-Proteoglykane. Durch Verwendung eines zweikammerigen Zellkultursystems konnte ein Modell etabliert werden, das eine genaue Analyse und Quantifizierung der Invasion der Tumorzellen durch das Gel ermöglicht. Die rekonstruierte Basalmembran befindet sich auf einem porösen Filter, welcher die obere von der unteren Kammer des Kultursystems trennt. Die Membran ist von der Flüssigkeit der oberen Kammer bedeckt. In die Flüssigkeit der unteren Kammer können z.B. chemotaktische Substanzen eingebracht werden. Die Tumorzellen, die durch Basalmembran und Filterporen hindurchgetreten sind, lassen sich in der unteren Kammer bzw. auf der unteren Seite des Filters mikroskopisch nachweisen und quantifizieren. Anstelle von Matrigel® kann auch Kollagen-Gel verwendet werden. Das beschriebene Modell erlaubt Rückschlüsse auf Adhärenz und invasives Wachstum sowie auf den Abbau von Bestandteilen der bindegewebigen Matrix.

Um die Destruktion von Bindegewebskomponenten isoliert nachzuweisen, können die Tumorzellen auf definierten, radioaktiv markierten Substanzen kultiviert werden. Die markierten Spaltprodukte werden dann im Zellkulturüberstand nachgewiesen.

Einleitung

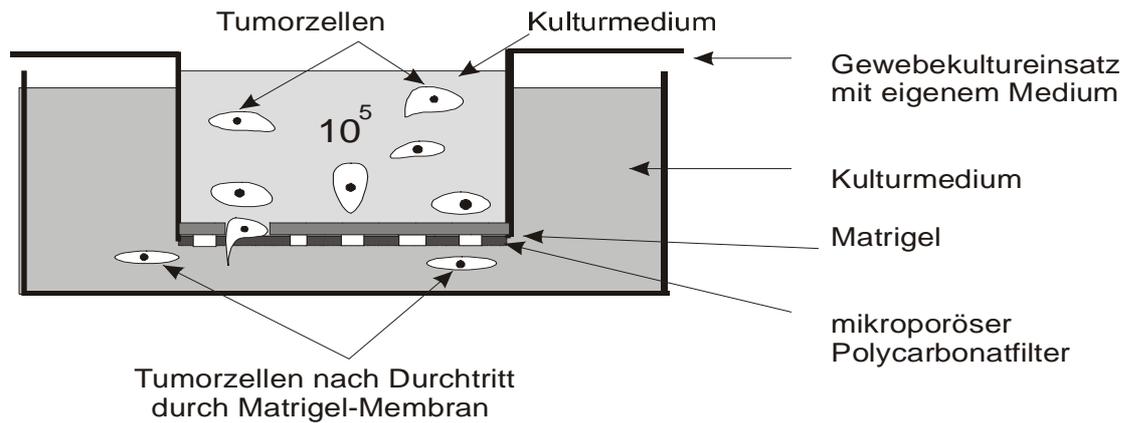


Abbildung 3 in-vitro Nachweis des invasiven Wachstums von Tumorzellen anhand von Matrigel®-beschichteten Kammern.

1.3.2.2 Dreidimensionale Invasionsmodelle

Die Kultur in drei Dimensionen wurde erstmals Anfang des 20. Jahrhunderts von Harrison beschrieben. Das Empfängergewebe einer 3D Kokultur ist eine Organkultur oder ein multizelluläres Sphäroid. Als Transplantat werden meist Zelllinien verwendet. In der Literatur sind Organkulturen aus respiratorischem Gewebe wie nasaler Schleimhaut (Jakson 1999, Steinsvag 1991) oder Bronchialmukosa (Barrett 1976, Gamarra 1993, Fjellbirkeland 1996) beschrieben. Alle Organkulturen konnten über mehrere Wochen kultiviert werden, währenddessen sie strukturell und funktionell intakt blieben (Bals 1998). Die Regeneration einer Biopsie aus der Bronchialschleimhaut ist bereits 24 Stunden nach Entnahme als komplette Epithelialisierung der Biopsie zu sehen. Nach 72 Stunden enthält das Epithel rund um die Biopsie sekretorische, basale sowie ziliäre Zellen (Bals 1998). Die Sekretion und Proliferation der epithelialen Zellen von Biopsien aus den Atemwegen sind Zeichen der normalen Funktion des Gewebes. Die Komponenten der Basalmembran sind ein wichtiger Faktor beim Wachstum und bei der Differenzierung des respiratorischen Epithels in-vitro (Van Scott 1991, Chevillard 1991). Für die Untersuchung physiologischer Vorgänge in der Zellkultur eignet sich ein Modell, bei dem die Schnittfläche von Biopsien aus der Nase in Agar gesetzt und die Schleimhautoberfläche der feuchten Luft exponiert wird (Jakson 1996). Für die Untersuchungen der Invasion an den Kokulturmodellen werden die Tumorzellen entweder als Sphäroide, z.B. Bronchialkarzinom (Fjellbirkeland 1997, 1998), Blasenkarzinom (Schuster 1994), humanes Choriokarzinom (Grummer 1994) oder als in Monolayer

Einleitung

wachsende Tumorzellen, z.B. Plattenepithelkarzinom, bronchiales Adenokarzinom (Al-Batran 1999) und Urothelkarzinom (Schuster 1994) verwendet. Tumorzellsphäroide verfügen über ausgeprägte interzelluläre Kontakte, eine hohe Proliferationsrate und andere Zeichen der Vitalität. Es wird ihnen eine große Ähnlichkeit gegenüber avaskulären, proliferierenden und teils nekrotisierenden Mikrotumoren in-vivo zugeschrieben. (Kunz-Schughart 1998, Müller-Klieser 1987, Hoffman 1991). Das in dieser Arbeit beschriebene Kokulturmodell besteht aus Bronchialmukosa als Organkultur und Tumorzellen sechs verschiedener als Monolayer wachsenden Zelllinien des Bronchialkarzinoms.

Durch den technischen Fortschritt ist es inzwischen möglich, die 3D fixierten oder lebenden Strukturen mit der konfokalen Mikroskopie und fluoreszenzmarkierten Proben zu visualisieren. Ein Beispiel ist die Untersuchung der Invasion menschlicher DiI-markierter Glioblastom-Sphäroide in DiO-markierte fetale Hirnaggregate von Ratten (Khoshyomn 1998).

2 Problemstellung

Invasion und Metastasierung sind die entscheidenden Kriterien, in denen sich maligne von benignen Tumoren unterscheiden. Auch die Prognose der Patienten mit einem Bronchialkarzinom ist vor allem von diesen Vorgängen abhängig. Der Vorgang der Invasion von Tumorzellen in gesundes Gewebe und die Ausbreitung im Körper durch Metastasierung sind komplexe Vorgänge, die bis heute noch nicht ausreichend aufgeklärt sind. Es ist bekannt, dass diese in 3 Schritten erfolgen: Adhäsion der Tumorzellen an die Matrix, deren Degradation, und Migration der Tumorzellen durch die degradierte Matrix (Liotta, 1986). Viele für die Invasivität wichtige Signalwege wurden an Einzelzellkulturen und in-vitro Invasionsmodellen untersucht. Es ist jedoch unklar, was die echte Bedeutung dieser Mechanismen im Zellverband und somit für die Aggressivität eines Tumors in-vivo ist. Durch die Verwendung von Kokulturmodellen soll versucht werden, die Situation in-vivo möglichst realistisch nachzuahmen.

Das Epithel und die Basalmembran mit ihrer Barrierefunktion spielen als Ort der Tumorausbreitung im menschlichen Organismus eine entscheidende Rolle. Bei intaktem Epithel wurde mangelnde Invasionsbereitschaft von malignen Zellen in die apikale Zone für in-vitro als auch für in-vivo Modelle beschrieben (de Rider 1977, Schleich 1973, Easty 1963). Ziel dieser Arbeit war Etablierung eines Kokulturmodells, bestehend aus Tumorzellen des Bronchialkarzinoms und Organkulturen des Bronchialgewebes, bei dem die Tumorzellen direkten Kontakt zur Basalmembran haben. Diese Methodik basiert auf Untersuchungen der Invasion von Zellen eines kleinzelligen Bronchialkarzinomes in das humane Bronchialepithel (Fjellbirkeland 1998). In einem solchen Modell ist es möglich, die Anheftung der Tumorzellen an die Basalmembran und deren Degradation durch die Tumorzellen zu untersuchen. Die Kokulturen von Bronchialgewebe und 3 Bronchialkarzinomzelllinien (LCLC 103H, das aus einem großzelligen Karzinom stammt; EPLC 32M1 aus einem Plattenepithelkarzinom und NCI H125 aus der Lymphknotenmetastase eines Adenokarzinomes) wurden histologisch sowie immunhistochemisch ausgewertet bezüglich:

- Adhäsion der Tumorzellen an die Basalmembran
- Invasivität der Tumorzellen durch die Basalmembran
- Adhäsions- und Degradationsgeschwindigkeit der Tumorlinien

Problemstellung

Um die Ergebnisse der Untersuchungen am Kokulturmodell mit einem seit langem etablierten Modell zu vergleichen wurde im Rahmen dieser Arbeit auch am 2D Modell, den Matrigel®-beschichteten Boyden-Kammern gearbeitet. Es wurde dabei das Verhalten der einzelnen Bronchialkarzinom-Zelllinien hinsichtlich der Invasionsgeschwindigkeit und deren Regulierung charakterisiert. Das Invasionsmuster und die Morphologie der an Matrigel haftenden Tumorzellen während der Durchwanderung wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Eine eigene Versuchsreihe hatte zum Ziel lösliche Faktoren, die den Invasionsvorgang beschleunigen, nachzuweisen. Dabei wurde konditionierte Medium der Linie, die Matrigel®-Beschichtung am stärksten transmigrierte, als Kulturmedium für die Tumorzelllinien verwendet. Die Invasionsgeschwindigkeit wurde erneut analysiert.

3 Materialien und Methoden

3.1 Labormaterial und Geräte

- **24 Well-Zellkulturplatte**, Falcon Multiwell™ (Fa. Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont de Clair, Frankreich)
- **Zellkultur-Einsatz, Porengröße 8 µm, PET track-etched membrane, 24 Well-Format** (Fa. Falcon, Becton Dickinson, USA)
- **HTS FluoroBlok™ Cell Culture Insert**, Einsätze 8 µm Porengröße (Fa. Falcon, Becton Dickinson, USA)
- **2 ml Pipette Sterilin** (Fa. Bibby Sterilin Ltd., USA)
- **Mikrodispenserpipette 3-000-510**, (Fa. Drummond, Broomall, USA)
- **Petrischale**, Zellkulturschale Falcon (Fa. Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont de Clair, Frankreich)
- **Reagiergefäße** Micro tubes 1,5 ml (Fa. Sarstedt AG& Co, Nümbrecht, Deutschland)
- **0,22 µm Filter** Minisart (Fa. Sartorius, Deutschland)
- **Objekträger** Menzel Super Frost Color 76 mm x 26 mm (Fa. Menzel-Gläser, Deutschland)
- **Skalpell** Feather Disposable Scalpel No. 11 (Fa. Feather safety Razor co., Ltd., Japan)
- **Dampfsterilisator** Varioklav, (Fa. H+P Labortechnik GmbH, Deutschland)
- **Brutschrank** Typ B 5060 EC/CO, (Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland)
- **Lichtmikroskop** Nikon Diaphot-TMD (Fa. Nikon, Tokio, Japan)
- **Gewebeeinbettautomat** Histomaster Modell 2050/2L7DI (Fa. Bavimed, Birkenau, Deutschland)
- **Schlittenmikrotom** (Fa. Jung, Heidelberg, Deutschland)
- **Zytospin** Cytospin 3 (Fa. Thermo Shandon, Pittsburgh, USA)
- **Spektrafluor** (Fa. Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland)
- **Rasterelektronenmikroskop** (Fa. Yeol, Tokyo, Japan)
- **Critical Point Dryer** BAL-TEC CPD 030 (Fa. Balzers, Lichtenstein)
- **Kathodenzerstäuber** E-5000 (Fa. Polaron Equipment Ltd., Großbritannien)

3.2 Kulturmedien und Fertiglösungen

- **Bronchial Epithelium Cell Growth Medium (BEGM)**

Bronchial Epithelial Cell Basal Medium wird von der Firma PromoCell, Heidelberg, als Kit geliefert. Es wurde vor Gebrauch mit den folgenden Supplementen versetzt:

0,4%	Bovin Pituitary Extract
0,5 ng/ml	Epidermal Growth Factor
5 µg/ml	bovines Insulin
0,5 µg/ml	Hydrokortison
0,5 µg/ml	Epinephrin
6,7 µg/ml	Trijodtyronin
10 µg/ml	Transferrin
0,1 ng/ml	Retinoinsäure
50 ng/ml	Amphotericin B
50 µg/ml	Gentamycin

- **Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium**

500ml RPMI Medium (Fa. Seromed, Biochrom, Berlin, Deutschland) wurden vor Gebrauch folgende Substanzen zugefügt:

5 ml	L-Glutamin 200 MM (100x), (Fa. Life Technologies, Deutschland)
50 ml	NCS
2,5 ml	Amphotericin B
1,2 ml	Penstrep®, Penicillin-Streptomycin 10000 IU/ml-10000 µg/ml (Fa. Life Technologies, Deutschland)

- **RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot** 25 mM HEPES (Fa. Promocell, Heidelberg)
- **Kokulturmedium** (BEGM:RPMI=4:1)
- **Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)** 25 mM HEPES Pulver (Fa. Gibco BRL/Life Technologies, Scotland)
- **HEPES** N-2-Hydroxyethylpiperacin-N'-2-Ethansulfonsäure, (Fa. Gibco BRL/Life Technologies, Scotland)
- **MEM nichtessentielle Aminosäuren** 100x (Fa. Gibco, Life Technologies, Scotland)
- **0,02% EDTA** Ethylendiamintetraessigsäure (Fa. Sigma Diagnostic, Steinheim, Deutschland)
- **Formaldehyde** 37% Solution (Fa. Sigma Chemical, Steinheim, Deutschland)

- **Xylol** Isomerengemisch (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz)
- **MATRIGEL® Matrix** (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- **Entellan** (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- **Fixierspray Resofix** (Fa. Resolab Laborbedarf, Bad Oeynhausen, Deutschland)
- **Eosin-Methylenblau in Methylalkohol** (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- **Giemsa Lösung** (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

3.3 Zellkultur

3.3.1 Beschichtung mit Agar

1,5% Agar

2,25 g	Agar noble Pulver (Fa. Difco Laboratories, Detroit, USA)
150 ml	Aqua destillata

Das Agarpulver wurde in Wasser bei 50°C gelöst und im Dampfsterilisator sterilisiert. Die Lagerung bis zum Gebrauch erfolgte bei Raumtemperatur.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

9,99 g	DMEM Pulver
11,96 g	HEPES
500 ml	Aqua destillata

Die Einstellung des pH 7,2 erfolgte mittels 10N NaOH. Die fertige Lösung wurde steril filtriert.

Agar-Medium

30 ml	1,5% Agar
30 ml	DMEM Medium (doppelt konzentriert)
6 ml	NCS
75 µl	MEM nichtessentielle Aminosäuren 100x
240 µl	Amphotericin B 250 mg/ml
120 µl	Penstrep®, Penicillin-Streptomycin

1,5%iger Agar wurde in der Mikrowelle gelöst, das vorbereitete Medium aus den oben genannten Chemikalien mit dem abgekühlten Agar vermischt und jede Vertiefung der 24 Well-Zellkulturplatte mit 200µl Agar-Medium gleichmäßig bedeckt. Die beschichteten Kulturplatten wurden bei 4°C für maximal 4 Wochen gelagert.

3.3.2 Kultur der Bronchusbiopsien

Die Bronchialschleimhautbiopsien wurden im Rahmen von diagnostischen Bronchoskopien aus der Oberlappenkarina gewonnen. Eine Genehmigung durch die Ethikkommission sowie das Einverständnis der Patienten lag jeweils vor. Das Biopsiematerial wurde in Bronchial Epithelium Cell Growth Medium transportiert.

Die Proben wurden 5-10 min in Waschmedium gewaschen und anschließend in Agar beschichtete 24 Well-Kulturplatten überführt. Pro Well wurden 250 µl BEGM zugegeben. Diese dreidimensionale Organkulturen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO und 100% Luftfeuchtigkeit mit 2-tägigem Mediumwechsel und wöchentlichem Plattenwechsel inkubiert.

3.3.3 Verwendete Tumorzelllinien

Adenokarzinom NCI H125

Die Zelllinie NCI H125 wurde über die American Type Culture Collection bezogen. Sie wurde aus einer Hautmetastase eines Patienten mit Adenokarzinom der Lunge, welche vor Therapiebeginn entnommen wurde, etabliert. Die Zellen sind mittelgroß und gering kohäsiv. Die aneuploiden Zellkerne weisen zum Teil prominente Nucleoli auf. In der Monolayerkultur wachsen die Tumorzellen adhärent mit einer Generationszeit von 39 h und einer Kolonieformationseffizienz von 22%. Die Tumorzellen exprimieren c-myc und haben eine Mutation im p53 Tumorsupressorgen. Es wurden auch verschiedene Komponenten von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren gefunden. Die Adenokarzinomzellen produzieren Muzine und sind immunhistochemisch anfärbbar mit verschiedenen Keratinen und Vimentin (Gazdar 1989, Carney 1985, Banks-Schlegel 1985, Takahashi 1989, Brower 1986, Forsberg 1993, Carbone 1991).

Großzelliges Karzinom LCLC 103H

Die Zelllinie LCLC 103H wurde von Dr. G. Jaques, Philipps-Universität, Marburg, zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie des großzelligen Karzinoms wurde aus Tumorzellen eines malignen Pleuraergusses nach bereits erfolgter lokaler Strahlen- sowie Chemotherapie etabliert. Die Zellen sind auffallend groß und stark pleomorph. Es kommen ein- und mehrkernige Zellen mit vakuolenreichem Zytoplasma vor. Die aneuploiden Zellkerne mit vielen prominenten Nucleoli umgibt eine perinukleäre Granulation. In der Monolayerkultur wachsen die Tumorzellen adhärent mit einer Generationszeit von 40 h und einer

Kolonienformationseffizienz von nur 0,1%. Die Sättigungsdichte liegt bei 150 000 Zellen/cm². Die Zellen exprimieren Marker wie die NSE, hCG und Cathepsin B. Ebenso wurde eine Überexpression des c-myc Onkogens nachgewiesen sowie der Rezeptor für EGF. (Bepler 1988, Heidtmann 1997).

Plattenepithelkarzinom EPLC-32M1

Die Zelllinie wurde von Dr. G. Jaques, Philipps-Universität, Marburg, zur Verfügung gestellt. Sie stammt von einem Patienten mit mittelmäßig differenziertem Plattenepithelkarzinom der Lunge. Die Zellen mit adhärentem Wachstum haben eine epitheloide Form. Um den Kern, welcher ein regelmäßiges Chromatinmuster aufweist, findet sich eine perinukleäre Granulation sowie zwei oder mehr Nukleoli. Die Generationszeit der Zelllinie liegt zwischen 16 und 20 Stunden und die Kolonienformationseffizienz von 5,12%. Die Tumorzellen exprimieren das c-myc Onkogen sowie biochemische Marker wie NSE, hCG und EGF. Die Zellen produzieren pro-Cathepsin L, den Prekursor der lysosomalen Cystein-Protease und Cathepsin B. Immunhistochemisch wurden Glucocorticoid-Rezeptoren nachgewiesen (Heidtmann 1993, 1997, Hofmann 1995).

Kleinzelliges Karzinom NCI-H82

Die Zelllinie NCI-H82 wurde von Dr. G. Jaques, Philipps Universität, Marburg zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms wächst im Gegensatz zu den anderen als Suspensionskultur und nicht adhärent. Die Tumorzelllinie wurde aus den malignen Zellen eines Pleuraergusses nach Therapie etabliert. Es handelt sich um verhältnismäßig kleine Zellen, die in der Suspensionskultur große Zellaggregate bilden. Die Kerne der Tumorzellen besitzen elektronenmikroskopisch dichte Granula. Berücksichtigt man die Einteilung der Tumorzelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms in zwei unterschiedliche Klassen (klassische und variante), so handelt es sich bei dieser Zelllinie um eine der varianten Klasse mit Expression von NSE, Neural Cell Adhesion Molekule und CK-BB. In dieser Zelllinie werden Rezeptoren für den insulin-like growth factor sowie das atrial natriuretic peptide gefunden. Sie exprimieren das c-myc-Onkogen, das p53 Tumorsupressorgen ist mutiert. Die Zellen sind immunhistochemisch für Neurofilament und Vimentin anfärbbar (Takahashi 1989, Forsberg 1993, Carney 1985, Gazdar 1980, Carbone 1991, Ohsaki 1993).

Kleinzelliges Karzinom NCI H841

Die Zelllinie wurde aus dem National Cancer Institut, Maryland, Bethesda, bezogen. Etabliert wurde sie im Jahr 1984. Die Zellen stammen aus einem Lymphknoten eines 51-jährigen Patienten, Raucher, bei dem die Diagnose des varianten kleinzelligen Bronchialkarzinoms gestellt wurde. Der Patient wurde chemo- und radiotherapiert. Es handelt sich um eine gemischte, adhärenz und in Suspension wachsende Zelllinie. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Zellen insulin-like growth factor II exprimieren (Schardt 1993).

Karzinoid NCI-H727

Die Zelllinie NCI H125 wurde über die American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA, bezogen. Das Tumorgewebe wurde aus der Lunge einer 65-jährigen Patientin mit Lungenkarzinoid vor Beginn der Therapie entnommen. Die Tumorzellen wachsen als Monolayer und sie produzieren verschiedenste endokrine Substanzen wie das Neuromedin B und das parathyroid hormone like protein. Die mRNA des p53 Suppressorgens zeigt kleinen Mutationen, die aber vergleichbar mit dem gesunden Lungengewebe sind und somit als Polymorphismen anzusehen sind. Das Wachstum der Tumorzellen kann durch Blockade der EGF-Rezeptoren inhibiert werden (Takahashi 1989, Giaccone 1992).

Bronchialepithelzellen BEAS 2B

Die Zelllinie BEAS-2B wurde uns von Prof. Gillissen von der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Die Zellen stammen von normalem Bronchialepithel. Um eine immortalisierte Zelllinie zu erhalten, wurden die von einem gesunden Individuum bei der Autopsie isolierten Epithelzellen mit Adenovirus 12 SV40-transfiziert und weiter kloniert. Die Zellen wachsen in Monolayer. Die Keratinfärbung ist positiv. Bei der Kultivierung dieser Zelllinie muß die regelmäßige Subkultivierung vor Erreichen des konfluenten Wachstums beachtet werden, da sonst eine Entdifferenzierung in Plattenepithel erfolgt.

3.3.4 Kulturbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bronchialkarzinomzellen der Linien NCI H727, NCI H125, NCI H848, NCI H82, LCLC 103M, EPLC32M1 und einer Zelllinie des Bronchialepithels BEAS 2B wurden in mit 10% Serum versetztem RPMI 1640 Medium kultiviert. Der

Medienwechsel fand zweitägig statt. Bei Konfluenz wurden die adhärenen Zellen mittels 0,02% EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:4 - 1:10 weiterkultiviert.

3.3.5 Kokultivierung

3.3.5.1 Freilegung der Basalmembran

Zur schonenden Freilegung der Basalmembran wurden die Zell-Zell Kontakte des Bronchialepithels und Kontakte der Zellen zur Basalmembran mit 5 mM EDTA (Titriplex) gelöst. Aus der Literatur ist bekannt, dass mit 5mM EDTA behandeltes Bronchialepithel nach 3 Tagen von Tumorzellen invadiert werden kann (Fjellbirkeland 1998). Um die richtige Zeitspanne für die Wirkung von 5mM EDTA am Bronchialepithel und infolge dessen der Freilegung der Basalmembran festzustellen, wurden zuerst die Bronchialbiopsien nach der Behandlung mit 5 mM EDTA zu verschiedenen Zeiten fixiert, histologisch bearbeitet und mit HE und immunhistochemisch gegen Kollagen IV gefärbt. Bei der Auswertung wurde der Zeitpunkt bestimmt, an dem die Zell-Zell Kontakte des Epithels der Organkultur an der Stelle der EDTA-Einwirkung gelockert wurden, die Basalmembran aber immer noch für Kollagen IV Färbung positiv dargestellt werden konnte.

50 mM EDTA-Lösung

1,86 g	Titriplex III. zur Analyse (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
300 mg	Glucose (3 mg/ml)
100 ml	10 x PBS Ca ²⁺ und Mg ²⁺ frei (Fa. Gibco, Life Technologies, Scotland)

Die Lösung wurde mit NaOH auf pH=7,4 eingestellt.

Die dreidimensionale Organkultur war 7 bis 10 Tage vorkultiviert worden. Mit der 2 ml Pipette wurde die Organkultur aus der Agarplatte entnommen, 5 min in PBS gewaschen und in die 150 µl 5mM EDTA/l enthaltende Vertiefung einer 24 Well-Kulturplatte gegeben. Die Organkulturen wurden über verschieden lange Zeiträume (ein bis drei Stunden) im Brutschrank belassen und anschließend in einer Petrischale mit 20% NCS gewaschen. Das überschüssige NCS wurde abgesaugt, die Organkultur in 5% Formaldehyd für mindestens 48 Stunden inkubiert und damit zur Anfertigung eines histologischen Präparates vorbereitet.

Nach Feststellung des Zeitpunktes, der der Schädigung des Epithels und gleichzeitig noch nicht der Zerstörung der Basalmembran entspricht, wurden die mit 5 mM EDTA behandelten Organkulturen nach oben genannter Anleitung bis zu dem Schritt NCS-Waschen behandelt und zur Herstellung von Kokulturen weiter verwendet.

3.3.5.2 Herstellung der Kokulturen

Die Tumorzellen aus den konfluenten Monolayerkulturen wurden mittels 0,02% EDTA abgelöst. Die Wirkung des EDTA wurde anschließend mit NCS blockiert. Die gesamte Zellsuspension wurde für 5 min bei 800 Upm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. 10 µl des Zellpellets wurden mit einer Mikrodispenserpipette aufgenommen und jeweils 1µl davon gezielt an die freigelegte Basalmembran der Organkultur anpipettiert. Die Agarplatte mit der Kokultur wurde für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert, um Kontakten zwischen Tumorzellen und Organkulturgewebe zu ermöglichen. Anschließend wurden 150 µl Kokulturmedium zugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde die Organkultur in eine neue Vertiefung der Platte umgesetzt und 250 µl frisches Kokulturmedium zugegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ bei zweitägigem Mediumwechsel.

3.3.5.3 Aufarbeitung der Kokulturen

Die Kokulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten in 4% Formalin, für mindestens drei und maximal 72 Stunden fixiert. Nach der Formalinfixierung folgte die schrittweise Entwässerung und Paraffinierung der Kokulturen in Einbettkassetten mit Hilfe des Gewebereinbettautomaten in der Anatomischen Anstalt der LMU München. Die in Paraffinblöcke eingebetteten Kulturen wurden mittels eines Schlittenmikrotoms in 4,5 µm dicken Schnitte auf die Objektträger Menzel Super Frost aufgebracht, bis die ganze Kokultur verarbeitet war. Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Objektträger über Nacht im Trockenschrank bei 37°C getrocknet.

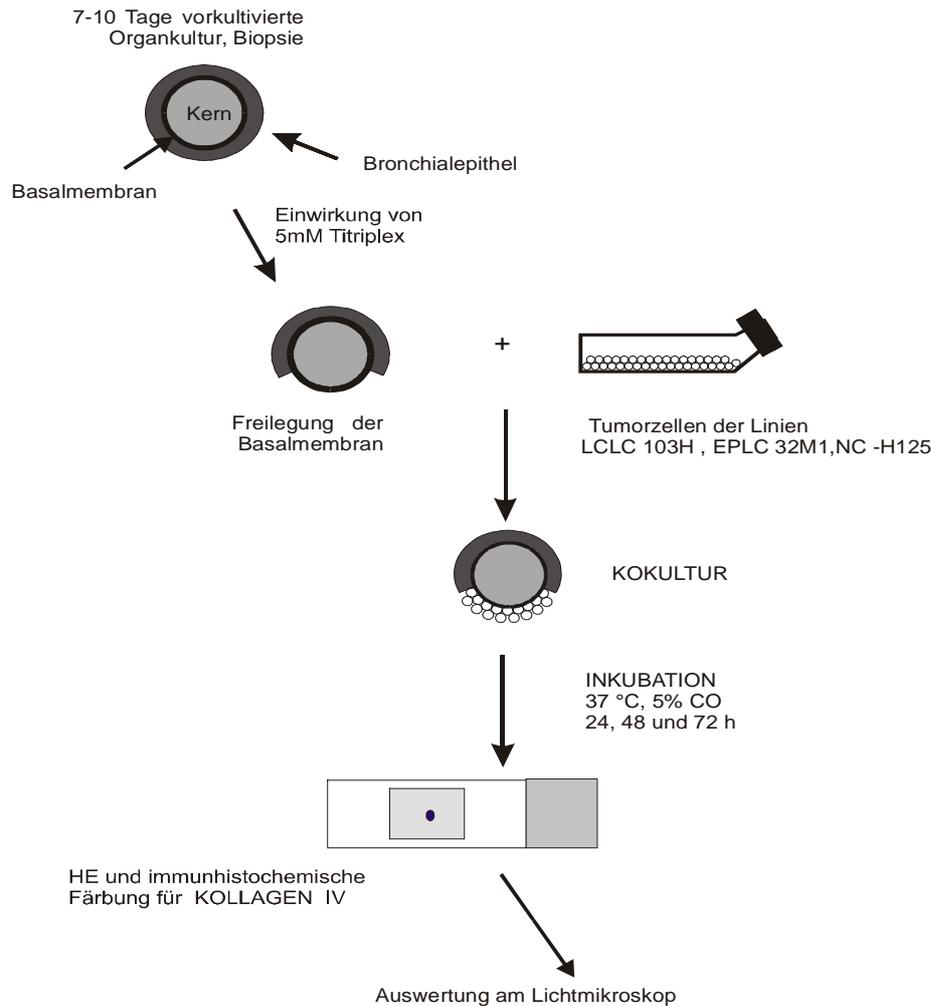


Abbildung 4 Herstellung und Verarbeitung einer Kokultur

3.4 Histologische Färbetechniken

3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist die am weitesten verbreitete Routine-Färbung in der normalen und pathologischen Histologie. Hämatoxylin ist für die Färbetechnik der wichtigste Kernfarbstoff. Das Pulver wird in heißem Wasser oder Ethanol gelöst. Hämatoxylin ist kein Farbstoff im eigentlichen Sinne, sondern eine farblose Verbindung, die erst durch die Oxidation in den Farbstoff Hämatein umgewandelt wird. Eosin dagegen färbt das Zytoplasma, kollagene und elastische Fasern. Nach der Entparaffinierung durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe wurden die Gewebeschnitte in Aqua destillata gewässert und für 5 min in Mayers Hämalaun (künstlich gereifte Hämatoxylin Lösung, sofort gebrauchsfertig) gefärbt. Danach wurden die Schnitte für 5 min in fließendem Wasser

Materialien und Methoden

gewaschen. Drei Minuten lang wurden die Schnitte in 0,1% Eosin belassen. Nach kurzem Eintauchen in Aqua destillata wurden sie über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol gebracht. Die fertig gefärbten Schnitte wurden mit Entellan® eingedeckt. Durch die Färbung werden alle Zellkerne blauviolett und das Zytoplasma blassrot eingefärbt. Kollagenfasern imponieren rot, die Basalmembran nimmt eine blaßrote Farbe an.

3.4.2 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Darstellung der Antigene sind vier Immunperoxidase-Färbemethoden bekannt: direkte, indirekte, Peroxidase-Antiperoxidase und Avidin-Biotin-Methode. Jede der Methoden hat gewisse Vor- und Nachteile. Für unsere Zwecke wurden die Paraffinpräparate mit der Avidin-Biotin-Methode gefärbt.

Die drei benötigten Reagenzien sind: ein Primärantikörper, der spezifisch gegen das bestimmende Antigen gerichtet ist, der Sekundärantikörper, der sich an den ersten binden kann und mit Biotin konjugiert ist, sowie ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Die freien Stellen des Avidin-Moleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase als das gesuchte Antigen wird mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht. Trotz Verwendung konjugierter Antikörper besitzt diese Methode gegenüber direkten und indirekten Techniken, aufgrund der stark ausgeprägten Affinität des Avidins zum Biotin, eine höhere Empfindlichkeit. Es können ausgezeichnete Ergebnisse auf fixiertem, in Paraffin eingebettetem Material erzielt werden.

Tris-HCl-Puffer Herstellung

Tris-HCl	12,2 g	Tris
	100 ml	Aqua destillata
	<u>74 ml</u>	<u>1M HCl Lösung</u>
	ad 200 ml	Aqua destillata
0,85% NaCl Lösung	17 g	NaCl
	200 ml	Aqua destillata

Für den Puffer werden zu **900 ml der 0,85% NaCl Lösung 100 ml der Tris-HCl Lösung** gegeben.

Für die immunhistochemische Färbung wurden Gewebeschnitte in der absteigenden Xylolreihe für jeweils 10 min belassen. Danach folgte die absteigende Alkoholreihe. Die

Schnitte wurden anschließend für 2 min in TBS gewaschen. 0,02g Trypsin (Fa. Sigma Chemical, St. Louis, USA) wurde in 10 ml TBS gelöst, auf 37°C erwärmt und die Schnitte jeweils mit 100 µl beschichtet. Die Präparate wurden 20 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und danach in TBS gewaschen. Die endogene Peroxidase für 5 min mit 3% Wasserstoffperoxid (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) gehemmt. Um unspezifische Bindungen zu blocken, wurden die Schnitte mit 100 µl 10% NCS beschichtet und 20 min bei Raumtemperatur belassen. Nach Abkippen des NCS wurde als primärer Antikörper das polyklonale Anti-Collagen Typ IV (Fa. Dako, Dänemark), in einer Verdünnung von 1:50 in TBS aufgetragen und die Schnitte über Nacht bei 4°C belassen. Am nächsten Tag wurden die Proben nach gründlichem Waschen in TBS 30 min mit dem sekundären Antikörper, anti-Maus IgG, Biotin conjugated (Fa. Sigma Chemical, St. Louis, USA) in einer Verdünnung von 1:300 in TBS überschichtet. Es erfolgte erneutes Waschen in TBS. Peroxidase-conjugated Streptavidin (Fa. Dako, Dänemark) wurde im Verhältnis 1:150 in TBS verdünnt. Die Präparate jeweils mit 100 µl beschichtet und 30 min bei Raumtemperatur belassen. Diaminobenzidin wurde mit einem Tropfen 3% Wasserstoffperoxid aktiviert und ein Volumen von 100 µl auf die Objektträger gegeben. Nach 10 min wurde das Diaminobenzidin abgespült und getrennt entsorgt. Die Präparate wurden erneut für 10 min in einem Gefäß mit Aqua destillata gewaschen und daraufhin kurz in Hämalaun gegengefärbt. Nach dem Durchlaufen der aufsteigenden Alkoholreihe und Xylolreihe wurden die Gewebeschnitte mit Entellan® eingedeckt.

3.5 Auswertung der Invasion von Tumorzellen in den Kokulturen

3.5.1 Lichtmikroskopie

Die gefärbten Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop von 2 unabhängigen Untersuchern ohne Kenntnis der Vorbehandlung ausgewertet. Die HE gefärbten Präparate wurde nach dem Kriterium **Adhäsion der Tumorzellen an die Basalmembran** bzw. **erhaltene Basalmembran** beurteilt. Die Basalmembran färbt sich bei der HE-Färbung rosarot und stellt eine sichtbare Grenzlinie zu den blaugefärbten Kernen der Tumorzellen dar. Beim Durchdringen der Basalmembran kann man die Tumorzellen im Stroma der Organkultur sehen. Bei den immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten wurde als Kriterium der Invasion festgelegt: **Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein der Basalmembran**. Diese

lässt sich in der Kollagen IV Färbung als braune Linie erkennen. Ein Fehlen des positiven Färbeergebnisses wurde als Degradation der Basalmembran bei der Invasion durch die invadierenden Tumorzellen interpretiert.

3.5.2 Raster-Elektronenmikroskopie

Die Freilegung der Basalmembran an der Organkultur, als Voraussetzung der Kokultivierung, wurde mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Zur Vorbereitung wurden die Organkulturen für eineinhalb Stunden in 5 mM EDTA inkubiert. Anschließend wurden sie in PBS 3 mal für fünf Minuten gewaschen und in 5% Formalin für drei Stunden fixiert. Danach wurden sie jeweils 3 mal 10 Minuten in 30%, 50%, 60% und 70% Alkohol eingelegt und über Nacht in 70% Alkohol belassen. Am nächsten Tag wurde die Alkoholreihe mit jeweils 3 mal 10 Minuten in 80%, 96% und schließlich reinem Alkohol zu Ende geführt und daraufhin im Critical Point Dryer getrocknet. Im Kathodenzerstäuber wurde das Präparat mit einer 30 nm dicken Goldschicht überzogen. Das Objekt konnte nun direkt am Bildschirm des Raster-Elektronenmikroskops hinsichtlich der Epithelialisierung der Organkultur und die Freilegung der Basalmembran nach Einwirkung von EDTA bewertet werden.

3.6 Messung der Invasion in den Boyden-Kammern

Die in-vitro Methode zur Quantifizierung des Invasionspotenzials der Tumorzellen mittels des sogenannten "Boyden chamber assay" wurde erstmals von Albini beschrieben (Albini 1987). Dieses Modell ermöglicht Untersuchungen zur Adhäsion der Zellen an die EZM, ihrer lokalen Degradation und der direkten Lokomotion der Zellen in die EZM. Die Versuchsanordnung besteht aus zwei Kammern, die durch eine beschichtete poröse Membran voneinander getrennt sind. In unserer Arbeit verwendeten wir als künstliche Basalmembran eine Matrigel®-Beschichtung. Bei Matrigel handelt es sich um ein lösliches Basalmembran-Extrakt des Englebreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkom, das bei Temperaturen um 37°C geliert und dabei die Zusammensetzung, Struktur und physikalischen Eigenschaften einer Basalmembran einnimmt. Die wichtigsten Komponenten der Matrigel®-Matrix sind: Laminin, Kollagen IV, Entactin und Proteoglykan Heparansulfat.

Komponente	Prozent im Matrigel®
Laminin	56 %
Kollagen Typ IV	31%
Entactin	8%

Tabelle 3 Zusammensetzung von Matrigel®

3.6.1 Beschichtung der Membraneinsätze mit dem Matrigel®

In dieser Arbeit wurden Boyden-Kammern im 24 Well-Format mit PET Membran-Einsätzen der Porengröße 8 µm verwendet. Die Membraneinsätze wurden unter sterilen Bedingungen gleichmäßig mit 30µl verdünntem Matrigel® (1:1 Verdünnung mit der RPMI-Lösung ohne Serum) bedeckt und für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank belassen. Die Konzentration entspricht 50µl/cm², welche nach der Literaturangabe als optimal angesehen wird (Janiak 1994). Die beschichteten Einsätze wurden für maximal eine Woche bei 4°C gelagert.

3.6.2 Bestimmung der Invasion mit dem Lichtmikroskop

Die Tumorzellen der konfluenten Monolayerkulturen wurden mittels EDTA abgelöst. In den Membraneinsatz wurden jeweils 10⁵ Tumorzellen mit 500 µl RPMI Medium zugegeben. In die Vertiefungen der 24 Well-Kulturplatte wurden ebenfalls 500µl RPMI Medium gegeben. Nach 6, 14 oder 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Tumorzellen samt Matrigel®-Beschichtung mit einem Wattestäbchen vom Membraneinsatz abgehoben. Die verbliebene Membran wurde aus dem Einsatz mit einem Skalpell freipräpariert und auf einem Objektträger mit Fixierspray fixiert. Nach dem Trocknen wurde die am Objektträger anhaftende Filtermembran mit adhärenen Tumorzellen in Hämatoxylinlösung, Gill No. 3 (Fa. Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) für 5 min inkubiert und danach vorsichtig mit Wasser gespült. Unter dem Lichtmikroskop wurde dann die Zellzahl der sich am Filter befindenden Tumorzellen bestimmt (Abb. 5a). Um die Zellzahl in der unteren Kammer zu bestimmen, wurden Zytospin-Präparate angefertigt. Diese wurden mit der Zellfärbung nach Pappenheim gefärbt (eine kombinierte May-Grünwald-Giemsa Färbung: Giemsa-Gebrauchslösung besteht aus Methylenazur, Methylenviolett, Methylenblau und Eosin in Methanol und Glycin. Diese wurde aus 20 ml Giemsa Lösung und 80 ml Puffer (pH 7,0) vorbereitet. May-Grünwald Lösung besteht aus Eosin-Methylenblau in Methylalkohol) und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet (Abb. 5b).

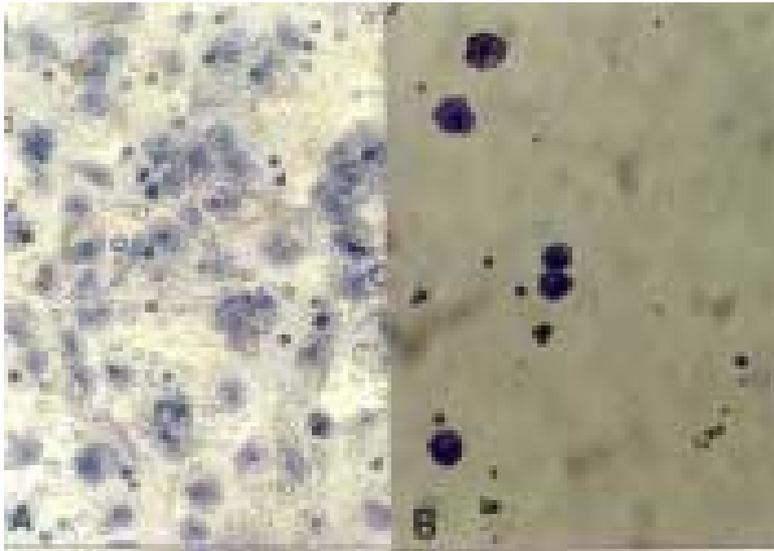


Abbildung 5 a; Adhärenente Zellen der Linie LCLC 103H auf der unteren Seite des Filters, Hämalaun gefärbt b; Zytospin-Präparat, Zellen der Linie NCI H125, Pappenheim Färbung, Vergrößerung jeweils 20x.

Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Zytospin-Präparate 20 min zum Trocknen bei Raumluft belassen. Die Zellen auf dem Objektträger wurden für 4 min in konzentrierte May-Grünwald Lösung eingetaucht und dann kurz in Aqua destillata gewaschen. Anschließend wurden sie 17 min mit Giemsa-Gebrauchslösung gefärbt. Die Objektträger wurden gut abgespült und zum Lufttrocknen aufgestellt. Bei dieser Färbung erscheinen die Zellkerne purpur bis violett.

Die Gesamtzahl der durchgewanderten Zellen ergab sich aus der Anzahl der Zellen, die sich auf der unteren Seite der Filtermembran befanden und der Zellen, die im Medium der unteren Kammer enthalten waren.

3.6.3 Bestimmung der Invasion mittels Fluoroblockmethode

Der Fluoreszenzfarbstoff Karbocyanin DiO ist ein lipidlöslicher Farbstoff und wird unabhängig von Transportmechanismen in die Zellmembran eingelagert.

Herstellung der DiO Stocklösung

25 mg DiO DiOC₁₆(3), 3,3'-dihexadecyloxacarbocyanine perchlorate (Fa. Molekular Probes, Eugene, Oregon, USA)

8,33 ml Alkohol-DMSO Gemisch

- 1 ml DMSO, C₂H₆SO, Dimethylsulfoxid (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)
- 9 ml 99,5 % Alkohol

DiO Pulver wurde zu dem Alkohol-DMSO Gemisch zugefügt, aufgelöst und mit Minisart 0,22 µm Filter filtriert. Die Stocklösung kann bei 5°C aufbewahrt werden.

3.6.3.1 DiO-Fluoreszenz-Markierung der Tumorzellen

In 500 ml RPMI Kultur-Medium wurde 0,5 ml der DiO Stocklösung zugegeben, um eine Endkonzentration von 30 ng/ml DiO zu erreichen. Die bis zur Konfluenz kultivierten Tumorzellen wurden nach Passagierung mit dem eben hergestellten Medium weiter in Kultur gehalten. Nach 2 Tagen wurden die Zellen geerntet. Pro Einsatz wurden aus jeder Zelllinie 10⁵ DiO markierte Zellen zugegeben. Die bei dieser Methode verwendeten HTS FluoroBlok™ Einsätze sind auf der unteren Seite mit einer PET Folie bezogen, die die Transmission im Bereich 490-700 nm blockiert und damit die Fluoreszenz der in der oberen Kammer sich befindenden DiO markierten Tumorzellen absorbiert. Die untere Kammer enthält 500 µl phenolrotfreies Kulturmedium RPMI. Die Messung der Fluoreszenzintensität der in die untere Kammer migrierten Tumorzellen erfolgte mit dem Gerät Spektrafluor. Die Messungen wurden zu den Zeitpunkten 2, 4, 6, 14, 24 und 48 Stunden nach Kulturbeginn durchgeführt. Die Einstellungen des Absorptionsfilters des Gerätes waren: Extention 485 nm/Emission 530 nm.

3.6.3.2 Auswertung der Invasion von DiO markierten Tumorzellen

Um dem Messergebnis des Spectrafluor eine Zellzahl zuzuordnen, wurde für jede Zelllinie eine Verdünnungsreihe erstellt. Für die definierten Zellzahlen in der Verdünnungsreihe wurden die Fluoreszenzintensitäten bestimmt und so für jede Zelllinie eine Eichkurve erstellt. Die im Spektrafluor gemessene Fluoreszenzintensität stellt so annähernd ein Maß für die Anzahl der Tumorzellen dar, die durch das Matrigel® gewandert sind.

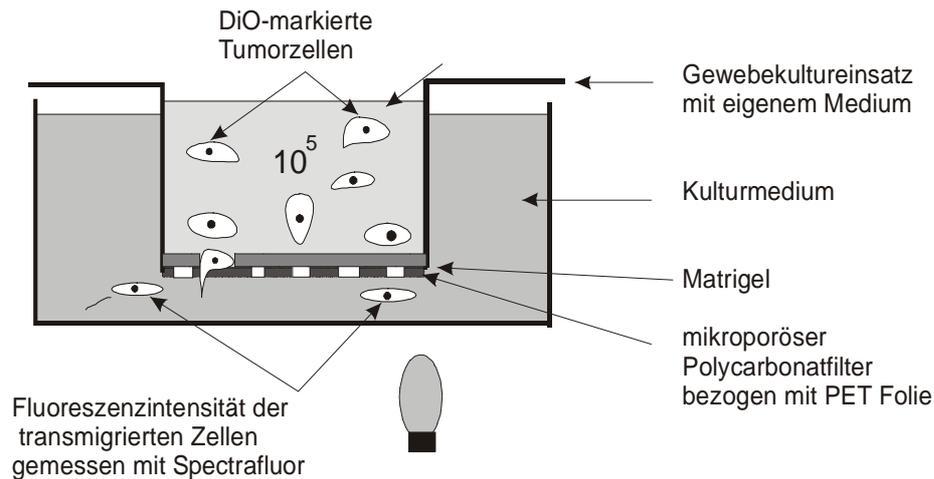


Abbildung 6 Versuchsanordnung zur Bestimmung der Invasion mittels DiO-Fluoreszenz-Markierung.

3.7 Messung der Invasion in der Boyden-Kammer mit konditioniertem Medium

Die Zellen des großzelligen Bronchialkarzinoms LCLC 103H zeigten in Vorversuch die stärkste Invasionsfähigkeit. Um lösliche Faktoren, die den Invasionsvorgang beschleunigen nachzuweisen, wurden alle Zelllinien mit dem Zellüberstand der Linie LCLC 103H kultiviert.

3.7.1 Herstellung von konditioniertem Medium der Zelllinie LCLC 103H

Die Tumorzellen der Zelllinie LCLC 103H wurden in der Kulturflasche mit 15 ml RPMI 1640 Medium kultiviert. Kurz vor Erreichen eines konfluenten Wachstums wurde das Medium aus der Kulturflasche abpipettiert, die Zellen 1x gewaschen und 15 ml frisches RPMI 1640 Medium zugegeben. Die Kulturflasche wurde für 15 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium (konditioniertes Medium) aus der Flasche entnommen, durch Filter mit Porengröße $0,22\mu\text{m}$ filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

3.7.2 Bestimmung der Invasion nach Inkubation mit konditioniertem Medium

Die Invasionsgeschwindigkeit wurde erneut mittels FluoroBlok-Methode bestimmt. Anstelle des RPMI Kulturmediums wurde den DiO markierten Zellen der jeweiligen Zelllinie $500\ \mu\text{l}$ konditioniertes Medium zugegeben. Die unteren Kammern enthielten $500\ \mu\text{l}$ Kulturmedium (RPMI 1640 ohne Phenolrot). Die Messungen wurden zu den Zeitpunkten 2, 4, 6, 14, 24 und

48 Stunden nach Kulturbeginn durchgeführt. Die Einstellungen des Absorptionsfilters des Gerätes waren: Extension 485 nm/Emission 530 nm.

3.8 Statistische Auswertung

Die Unterschiede der Messergebnisse einzelner Zelllinien während der Untersuchungen der Invasion in der Boyden-Kammer wurden mit statistischer Methode One Way Analysis of Variance verglichen und ausgewertet. Bei fehlender Normalverteilung wurde die Kruskal Wallis One Way Varianzanalyse gewählt.

3.9 Raster-Elektronenmikroskopie

Um die Morphologie und das Invasionsmuster der Tumorzellen zu beschreiben, wurden die Matrigel®-beschichteten Membranen mit darauf anhaftenden Tumorzellen elektronenmikroskopisch untersucht.

3.9.1 Vorbereitung und Auswertung der Präparate

Matrigel®-beschichtete Membraneinsätze wurden jeweils mit 10^3 Tumorzellen in 500 μ l RPMI 1640 Medium in der oberen Kammer für 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Membraneinsätze mit den am Matrigel® anhaftenden Zellen zur Elektronenmikroskopie vorbereitet (siehe Kapitel 3.5.2).

Morphologie und Invasionsverhalten der Tumorzellen wurden direkt am Bildschirm des Elektronenmikroskops ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Freilegung der Basalmembran

Um eine Methode zu finden, die es erlaubt, das Epithel von Organkulturen an einer umschriebenen Stelle verlässlich und reproduzierbar zu entfernen, wurde ein Vorversuch durchgeführt, bei dem die Wirkung einer 5 mM EDTA-Lösung untersucht wurde. Die Kulturen wurden mit der Hälfte ihrer Oberfläche der Lösung exponiert, gewaschen und für die histologische Untersuchung aufbereitet. Mittels HE Färbung wurde die Intaktheit des Epithels beurteilt und durch Kollagen IV Färbung die Intaktheit der Basalmembran überprüft. Aus diesen Untersuchungen wurden zwei Stunden als optimaler Zeitraum für die Freilegung der Basalmembran bestimmt und so für die weiteren Versuche verwendet.

Inkubationszeit (Stunden)	Anzahl der Organkulturen	Kulturen mit freigelegter BM (HE-Färbung)	Kulturen mit intakter Basalmembran (Kollagen IV Färbung)
1	14	6 (43%)	14 (100%)
1,5	2	2 (100%)	2 (100%)
2	4	4 (100%)	4 (100%)
3	3	Kein Epithel mehr vorhanden	0 (0%)
4	1	Kein Epithel mehr vorhanden	0(0%)

Tabelle 4 Wirkung von EDTA auf Organkultur.

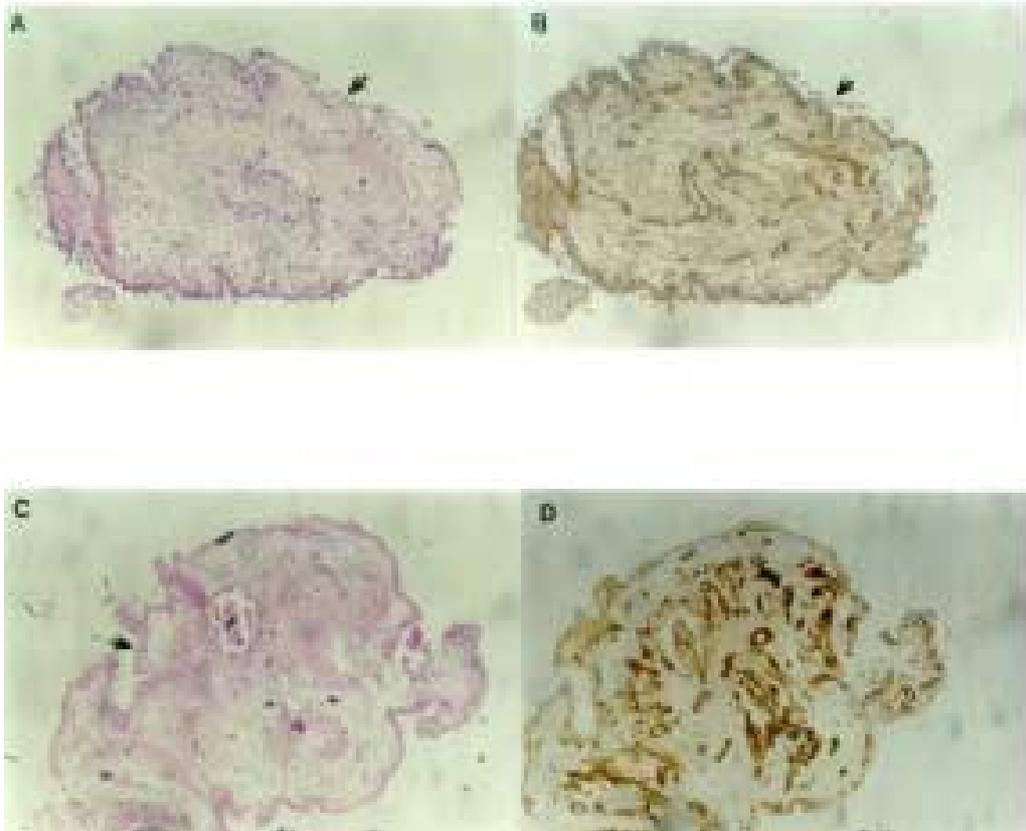


Abbildung 7 Histologische Schnitte von Organkulturen nach Einwirkung von EDTA **(a)** nach 1 Stunde: Die Epithelzellen bedecken dicht die Basalmembran. Die Pfeile zeigen die Wirkung von EDTA, die Freilegung der Basalmembran ist noch nicht vollständig. HE-Färbung. Vergrößerung 10x. **(b)** gleiches Präparat wie **(a)** in der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IV. Vergrößerung 10x. **(c)** nach 2 Stunden: Nur wenige Epithelzellen sind sichtbar. Die Basalmembran ist rund um die Organkultur freigelegt. HE-Färbung. Vergrößerung 10x. **(d)** gleiches Präparat wie **(c)** in der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IV. Die freigelegte Basalmembran ist morphologisch intakt. Vergrößerung 10x.

4.2 Invasion von Tumorzellen in 3D Kokulturen

Um die frühe Phase der Invasion von Tumorzellen an der Basalmembran untersuchen zu können, wurden Kokulturen aus Bronchialepithel und Tumorzellen von den Zelllinien LCLC 103H (großzelliges Bronchialkarzinoms), NCI H125 (Adenokarzinom) und EPLC 32M1 (Plattenepithelkarzinom) hergestellt. Die Tumorzellen wurden auf eine vom Epithel befreite Organkultur gegeben und die Kokulturen zu drei unterschiedlichen Zeiten histologisch ausgewertet. In der HE Färbung wurde die Adhäsion der Tumorzellen an die Basalmembran analysiert. In der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IV wurde die Degradation untersucht.

Die Adhärenz als Voraussetzung für die Kokultivierung nach der hier angewendeten Methode erfolgte in allen drei Tumorzelllinien schon am ersten Tag nach Konfrontation der Tumorzellen mit dem Bronchialgewebe. Nach 24 Stunden der Kokultivierung war die Basalmembran an 2 Kokulturen der Linie EPLC 32M1 und bei den Kokulturen der Linie LCLC 103H bereits vollständig durchgebrochen. Bei der Linie NCI H125 wurde nach 24 Stunden Inkubationszeit die Degradation der Basalmembran in 75% der ausgewerteten Kokulturen gesehen. Nach 48 Stunden der Kokultivierung wurde ein Abbau der Basalmembran bei der Linie NCI H125 in 100%, bei der Linie LCLC 103H in 89% und bei der Linie EPLC 32M1 in 50% der ausgewerteten Präparaten beobachtet. Nach 72 Stunden wurde der Durchbruch der Basalmembran in allen drei Linien in 100% der ausgewerteten Kokulturen gesehen. Aufgrund der nach längerer Kultivierungszeit sich entwickelnden kryptenförmigen Oberfläche der Kokultur waren nicht alle hergestellten Kulturen auswertbar. Insgesamt zeigte sich kein deutlicher Unterschied im Invasionsverhalten der einzelnen Zelllinien.

Zelllinie	Zeit [h]	Anzahl der ausgewerteten Kokulturen	Adhäsion der Zellen an die Organkultur	Degradation der Basalmembran
NCI H 125	24	4	4 (100%)	3 (75%)
	48	5	5 (100%)	5 (100%)
	72	4	4 (100%)	3 (100%) 1 n.a.
LCLC 103H	24	2	2 (100%)	2 (100%)
	48	9	9 (100%)	8 (89%)
	72	4	1 (100%) 3 n.a.	1 (100 %) 3 n.a.
EPLC 32M1	24	2	2 (100%)	2 (100%)
	48	4	4 (100%)	2 (50%)
	72	2	2 (100%)	1 (100%) 1 n.a.

Tabelle 5 Invasionsverhalten der Tumorzelllinien in der 3D Kokultur. n.a. = nicht auswertbar

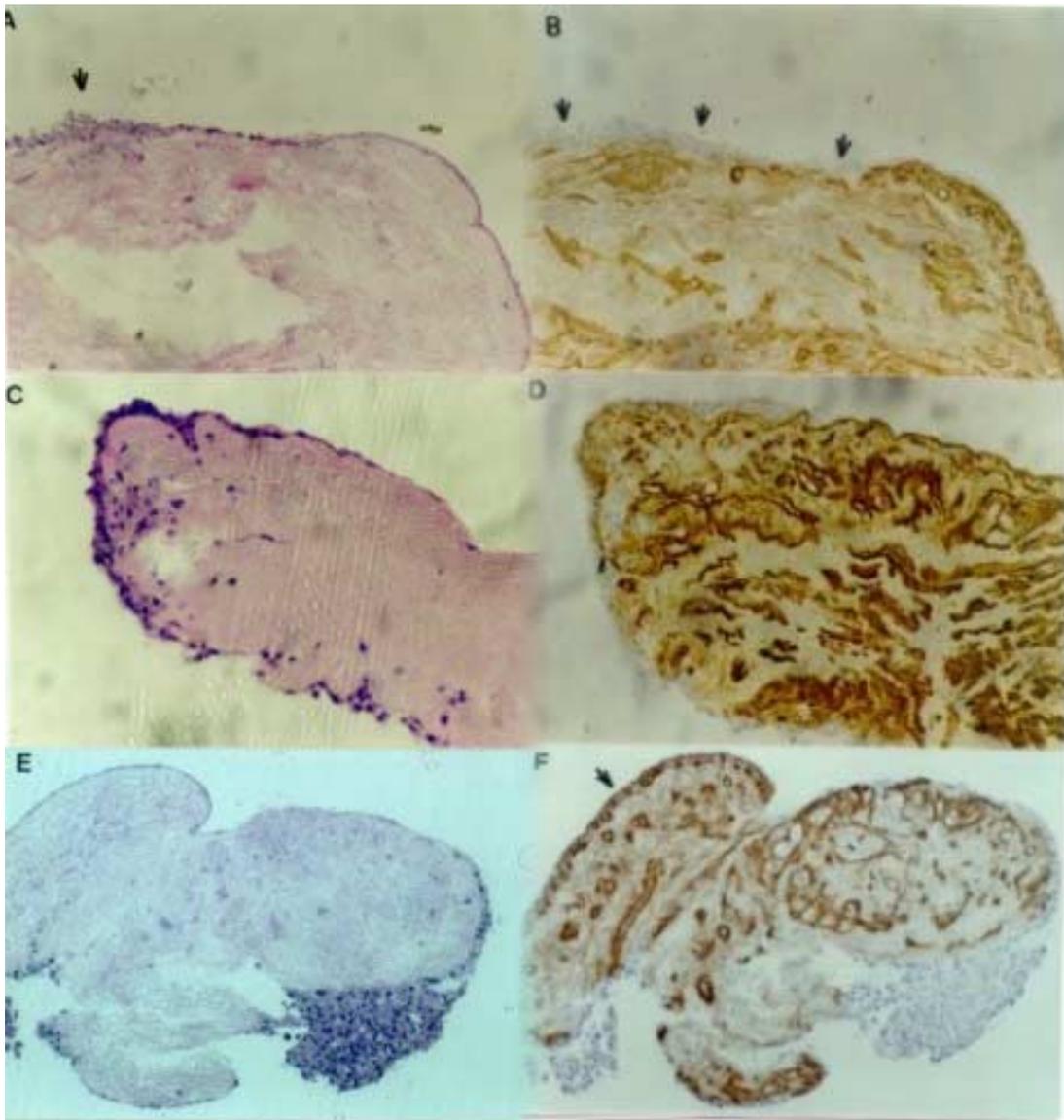


Abbildung 8 Auswertung der Invasion in 3D Kokulturen. **a**; Tumorzellen der Linie NCI H125 beginnen nach 2 Tagen die Basalmembran zu durchdringen (Pfeile). HE Färbung **b**; Die immunohistochemische Färbung gegen Kollagen IV zeigt eine Unterbrechung der Basalmembran an der Stelle der Tumorzelladhäsion. **c**; Zellen der Linie EPLC 32M1 nach 3 Tagen Inkubation in der Kokultur. HE Färbung. **d**; teilweise Unterbrechung der Basalmembran als Hinweis für die Degradation. Kollagen IV Färbung. **e**; Zellen der Linie LCLC 103H nach 2 Tagen Inkubation in der Kokultur. HE Färbung. **f**; Die intakte Basalmembran, außerhalb der Konfrontationsstelle mit den Tumorzellen färbt sich in immunohistochemischer Färbung für Kollagen IV. braun (Pfeile). Die braune Linie ist an der Konfrontationsstelle mit den Tumorzellen durchbrochen. Vergrößerung jeweils 10x.

4.3 Transmigration der Tumorzellen durch Matrigel®

4.3.1 Einfluss von Matrigel® auf Invasionsfähigkeit der Zellen

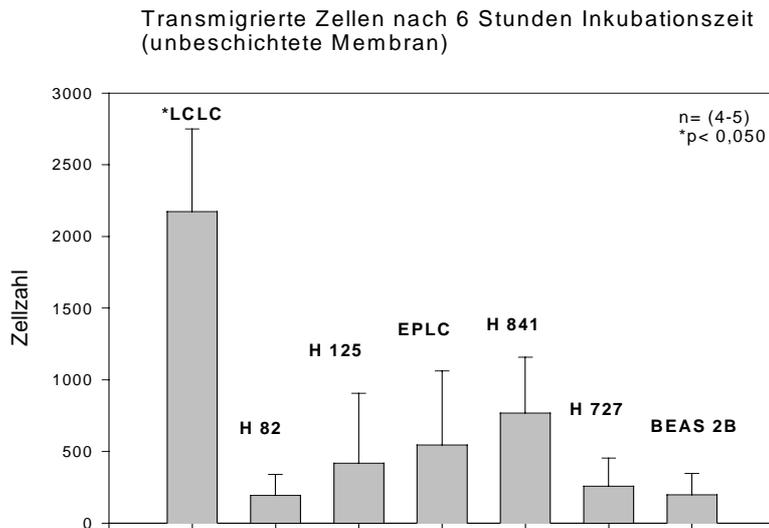
Tumorzellen der 6 Zelllinien des Bronchialkarzinoms und Zellen des Bronchialepithels wurden in unbeschichtete und Matrigel®-beschichtete Invasionskammern gegeben. Nach 6, 14 und 24-stündiger Inkubation wurde die Anzahl der durchgewanderten Zellen bestimmt. Dabei wurden sowohl die an der Unterseite der Membran adhärenen Zellen als auch die Zellen im Medium berücksichtigt.

Nach **6 Stunden** transmigrieren die Tumorzellen häufiger durch die unbeschichtete Membran als durch die Matrigel®-beschichtete Membran. Die poröse Membran stellt folglich keine Barriere im Sinne einer Basalmembran dar. Die Durchwanderung der unbeschichteten Membran ist Ausdruck der Fähigkeit der Zellen zur Adhärenz und Migration. In den Matrigel®-beschichteten Invasionskammern ist nach 6 Stunden innerhalb der Zelllinien kein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl der durchgewanderten Zellen zu verzeichnen ($p=0,612$ nach One Way Analysis of Variance).

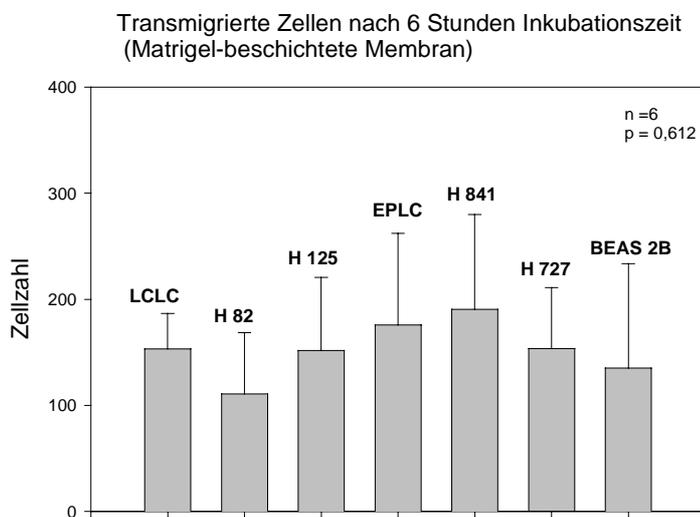
Zelllinie	Zelltyp	0 µl Matrigel® (Zellzahl)	50 µl Matrigel® (Zellzahl)
LCLC 103H	großzelliges Karzinom	2174±577	153±33
NCI H82	kleinzelliges Karzinom	192±149	111±58
NCI H125	Adenokarzinom	419±488	152±69
EPLC 32 M1	Plattenepithelkarzinom	546±517	176±86
NCI H841	kleinzelliges Karzinom	768±388	191±89
NCI H727	Karzinoid	258±195	154±57
BEAS 2B	Bronchialepithel	198±149	135±98

Tabelle 6 Transmigration an **unbeschichteten** und **Matrigel®-beschichteten** Membranen **nach 6 Stunden** Inkubation. Ergebnisse sind als Mittelwert ±Standardabweichung angegeben.

Ergebnisse



— a;



b;

Abbildung 9 Invasionsverhalten der Zelllinien nach 6 Stunden Inkubationszeit **a**; Transmigrierte Zellen in der **unbeschichteten Invasionskammer** (Auswertung nach One Way Analysis of Variance) **b**; Transmigrierte Zellen in der **Matrigel® beschichteten Invasionskammer** (Auswertung nach One Way Analysis of Variance)

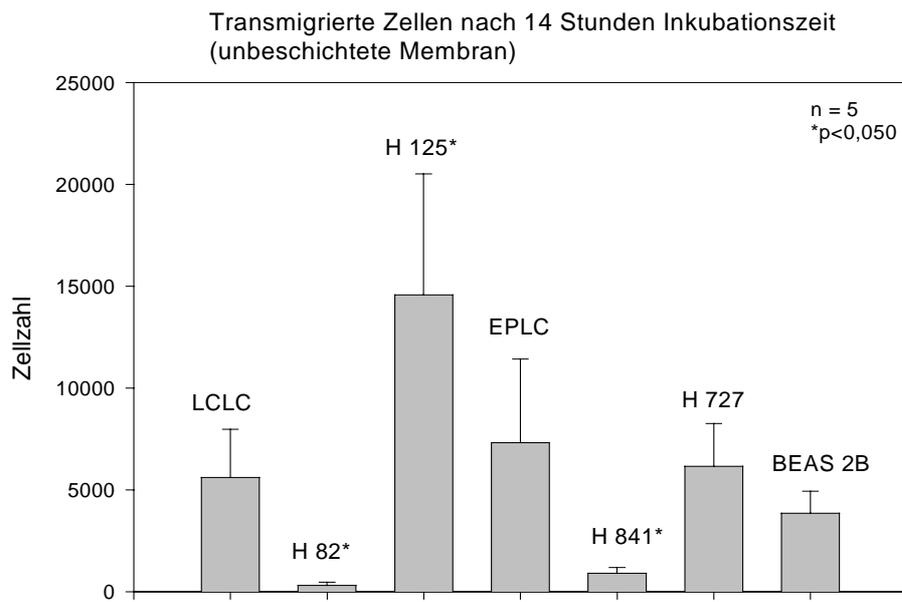
Ergebnisse

Die Anzahl der Zellen, die die unbeschichtete Membran nach **14 Stunden** durchwandern, nimmt im Vergleich zu 6 Stunden bei allen Zelllinien zu (Abb. 16). Zellen der Linie NCI H125 zeigen an der unbeschichteten Membran die stärkste Transmigration; der Unterschied ist gegenüber den Linien NCI H82 und H841 statistisch signifikant. Die Transmigrationstendenz an der unbeschichteten Membran war bei den Zellen der Linie NCI H82 am geringsten. An den Matrigel®-beschichteten Membranen ließen nach 14 Stunden ebenfalls alle Zelllinien eine deutliche Zunahme der transmigrierten Zellen gegenüber der sechsständigen Inkubationszeit erkennen. Die Anzahl der durchgewanderten Zellen der Linie BEAS 2B ist im Vergleich zu den anderen Zelllinien am geringsten. Hier zeigte sich eine statistische Signifikanz.

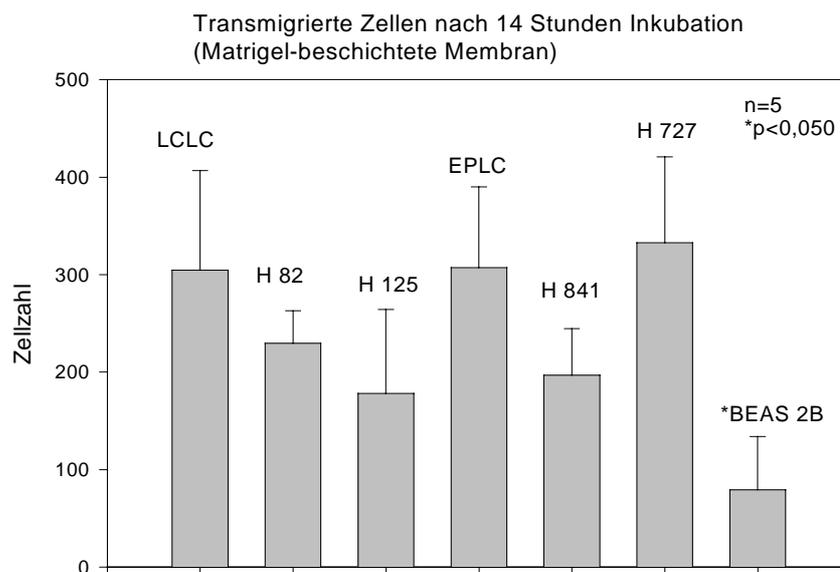
Zelllinie	Zelltyp	0 µl Matrigel® (Zellzahl)	50 µl Matrigel® (Zellzahl)
LCLC 103H	großzelliges Karzinom	5618_±2357	304_±102
NCI H82	kleinzelliges Karzinom	311_±156	229_±33
NCI H125	Adenokarzinom	14570_±5945	178_±85
EPLC 32 M1	Plattenepithelkarzinom	7323_±4112	307_±82
NCI H841	kleinzelliges Karzinom	913_±278	196_±47
NCI H727	Karzinoid	6160_±2094	332_±87
BEAS 2B	Bronchialepithel	3859_±1072	79_±54

Tabelle 7 Transmigration an **unbeschichteten** und **Matrigel®-beschichteten** Membranen **nach 14 Stunden** Inkubation. Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Ergebnisse



a



b

Abbildung 10 Invasionsverhalten der Zelllinien nach **14 Stunden** Inkubationszeit **a**; Transmigrierte Zellen in der **unbeschichteten Invasionskammer** (Auswertung nach One Way Analysis of Variance und Dunn's Methode) **b**; Transmigrierte Zellen in der **Matrigel® beschichteten Invasionskammer** (Auswertung nach One Way Analysis of Variance und Student-Newman-Keuls Methode)

Ergebnisse

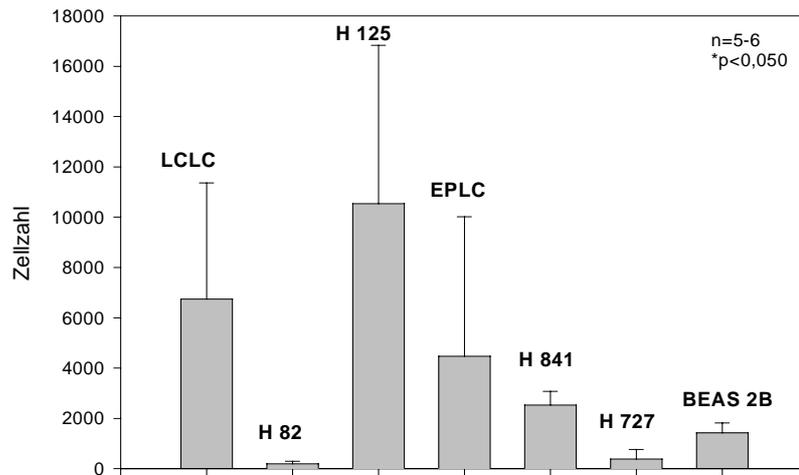
Die Ergebnisse nach **24 Stunden** Inkubationszeit in der unbeschichteten Invasionskammer stellen sich folgendermaßen dar: Zellen der Linie NCI H125 und LCLC 103H haben die unbeschichtete Membran zu diesem Zeitpunkt am häufigsten durchwandert, die Zellen der Linie NCI H82 am wenigsten. Die Unterschiede zwischen diesen Tumorklinen sind statistisch signifikant. In der Matrigel®-beschichteten Kammer invadieren Zellen der Linie LCLC 103H am häufigsten (Abb.17 b;). Die Beobachtung, dass Zellen der Linie NCI H727 die beschichtete Membran sehr träge durchwandern, korreliert sehr gut mit dem klinischen Bild des Karzinoids, das sich häufig nicht rasch progredient verhält. Die Bronchialepithelzellen zeigen während des gesamten Beobachtungszeitraums kaum Zeichen der Invasivität.

Zelllinie	Zelltyp	0 µl Matrigel® (Zellzahl)	50 µl Matrigel® (Zellzahl)
LCLC 103H	großzelliges Karzinom	6746±4624	595±339
NCI H82	kleinzelliges Karzinom	194±96	373±76
NCI H125	Adenokarzinom	10541±6286	277±149
EPLC 32 M1	Plattenepithelkarzinom	4465±5556	219±70
NCI H841	kleinzelliges Karzinom	2526±543	153±52
NCI H727	Karzinoid	376±393	125±105
BEAS 2B	Bronchialepithel	1422±392	100±83

Tabelle 8 Transmigration an **unbeschichteten** und **Matrigel®-beschichteten** Membranen **nach 24 Stunden** Inkubation. Ergebnisse sind als Mittelwert ±Standardabweichung angegeben.

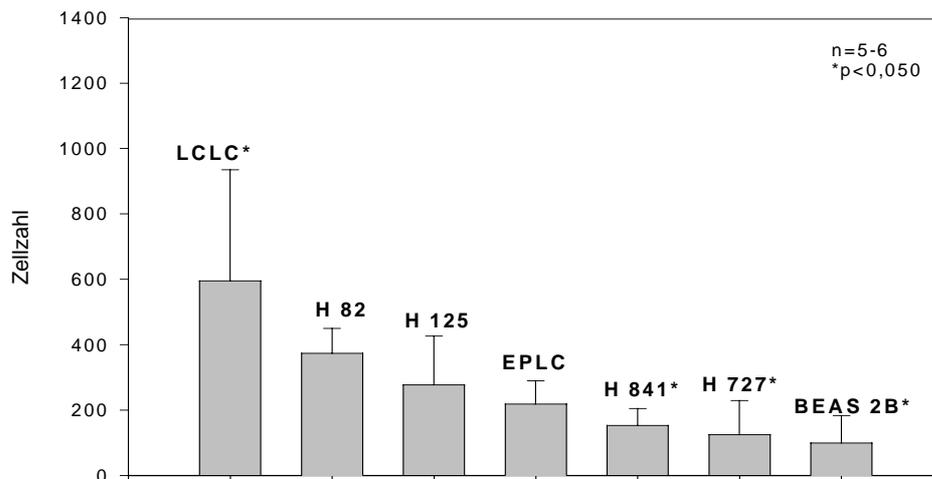
Ergebnisse

Durchwanderung der Zellen nach 24 Stunden (unbeschichtete Einsätze)



a;

Transmigrierte Zellen nach 24 Stunden Inkubation
(Matrigel-beschichtete Membran)



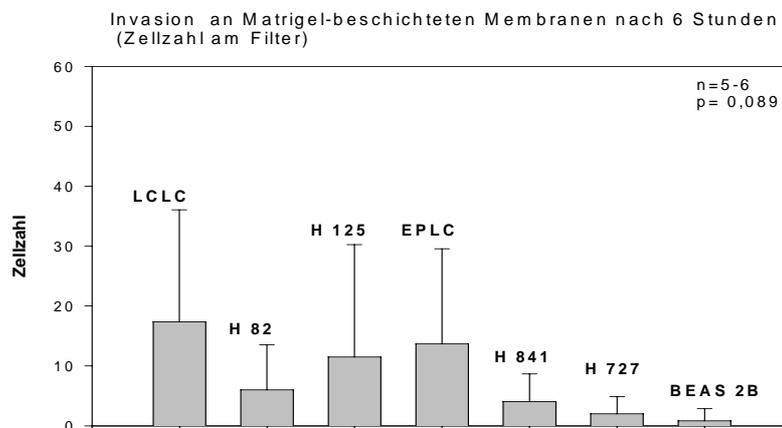
b;

Abbildung 11 Invasionsverhalten der Zelllinien nach **24 Stunden** Inkubationszeit **a;** Transmigrierte Zellen in der **unbeschichteten Invasionskammer**. (Auswertung nach One Way Analysis und Dunn's Method) **b;** Transmigrierte Zellen in der **Matrigel® beschichteten Invasionskammer** (Auswertung nach One Way Analysis of Variance und und Dunn's Method)

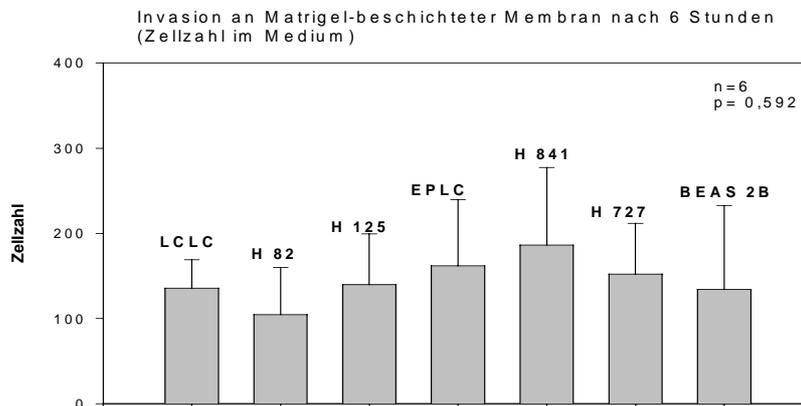
4.3.2 Invasion der Zellen durch die Matrigel®-beschichtete Membran

Um die Invasionseigenschaften der Zelllinien zu erfassen, wurde die Gesamtzahl der durchgewanderten Zellen nach zwei Fraktionen getrennt untersucht. Wir bestimmten die Zellen, die sich auf der **unteren Seite der Membran** befanden; getrennt davon untersuchten wir die Zellen, die bereits **das Medium der unteren Kammer** erreicht hatten. Die beiden Zählungen wurden jeweils nach 6, 14 und 24 Stunden Inkubation durchgeführt.

Nach 6 Stunden Inkubationszeit gibt es innerhalb der Zelllinien für beide Fraktionen keinen signifikanten Unterschied.



a;

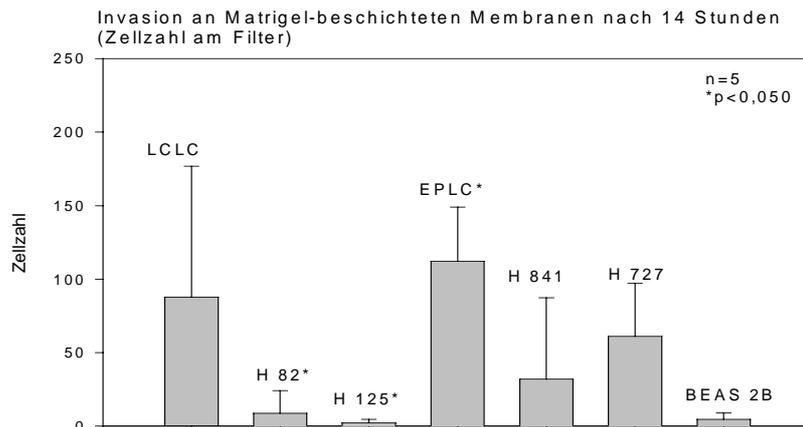


b;

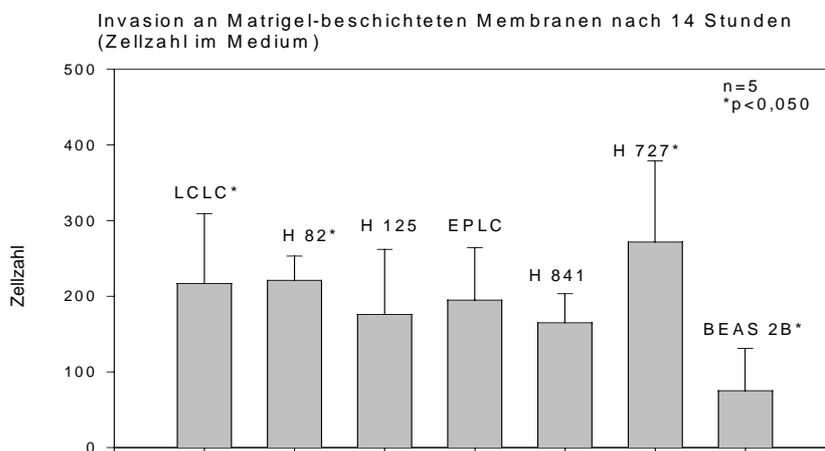
Abbildung 12 Invasionsverhalten der Zelllinien nach 6 Stunden Inkubationszeit. **a;** Transmigrierte Zellen an der Unterseite der Matrigel®-beschichteten Membran (Auswertung nach Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance) **b;** Transmigrierte Zellen im Medium der unteren Kammer (Auswertung nach Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance)

Ergebnisse

Nach **14 Stunden** Inkubationszeit lässt sich eine Zunahme der transmigrierten Zellen feststellen. Die Zellen der Linien EPLC 32M1 und LCLC 103H finden sich in hoher Anzahl sowohl an der beschichteten Membranunterseite als auch im Medium. Im Medium der unteren Kammer wurden am wenigsten Zellen der Linie BEAS 2B gezählt. Der Unterschied war statistisch signifikant gegenüber den Zelllinien: NCI H727, NCI H82 und LCLC 103H.



a;

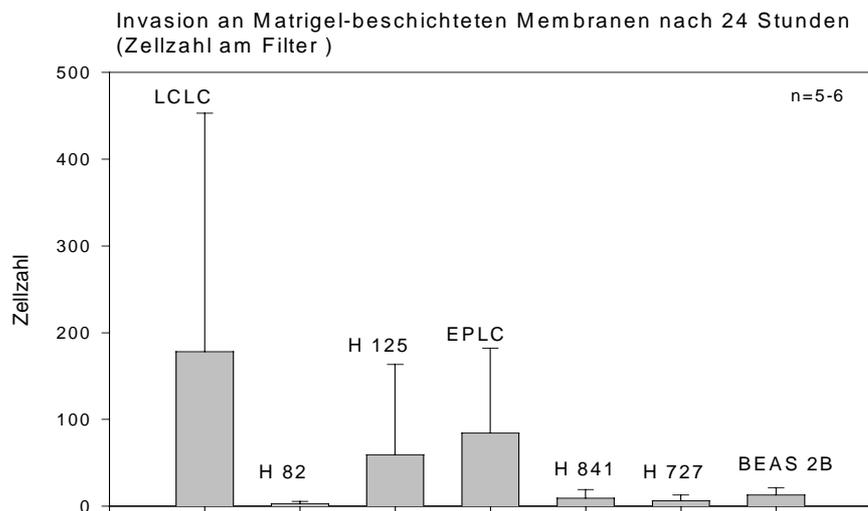


b;

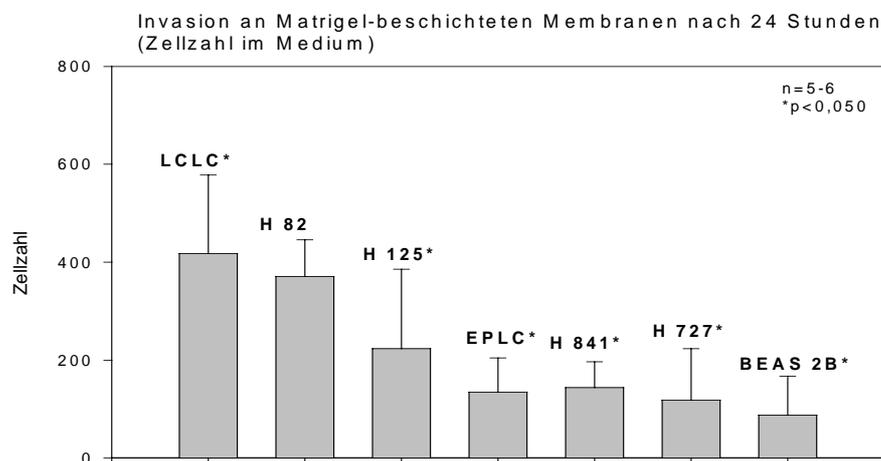
Abbildung 13 Invasionsverhalten der Zelllinien nach 14 Stunden Inkubationszeit. **a;** Transmigrierte Zellen an der Unterseite der Matrigel®-beschichteten Membran (Auswertung nach ANOVA, Dunns' Methode) **b;** Transmigrierte Zellen im Medium der unteren Kammer (Auswertung nach One Way Analysis of Variance)

Ergebnisse

Nach **24 Stunden** Inkubation wurden an der unteren Seite der Membran am meisten Zellen der Zelllinie LCLC 103H gezählt. Auch im Medium wurden Zellen dieser Linie gegenüber den Linien NCI H125, EPLC 32M1, NCI H841, NCI H727 und BEAS 2B statistisch signifikant häufiger vorgefunden.



a;



b;

Abbildung 14 Invasionsverhalten der Zelllinien nach 24 Stunden Inkubationszeit. **a;** Transmigrierte Zellen an der Unterseite der Matrigel®-beschichteten Membran (Auswertung nach One Way Analysis) **b;** Transmigrierte Zellen im Medium der unteren Kammer (Auswertung nach One Way Analysis und Student-Newman-Keuls Methode)

4.3.3 Ergebnisse der Invasionsversuche mit DiO markierten Zellen

Die Analyse der Invasion DiO markierten Zellen zeigte für die einzelnen Zelllinien folgende Ergebnisse: In den Matrigel®-beschichteten Invasionskammern transmigrierten Zellen der Linie LCLC 103H am ausgeprägtesten. Die gemessene Fluoreszenzintensität entspricht nach der Eichkurve (Abb. 16a; b;) 10^4 Zellen, die nach 48 Stunden durch das Matrigel® in die untere Kammer gelangten. Für die anderen Zelllinien lässt sich nach den jeweiligen Eichkurven eine Zellzahl von 10^3 Zellen bestimmen. Legt man die gemessenen Fluoreszenzintensitäten zugrunde, so zeigen die Zellen der Linie LCLC 103H einen statistisch signifikanten Unterschied in ihrer Invasionsfähigkeit (Abb. 15). Der Nachweis stärkerer Transmigrationskapazität der Zellen der LCLC 103H-Linie im Vergleich mit anderen Zelllinien in dieser Versuchsreihe steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorausgehenden Versuche.

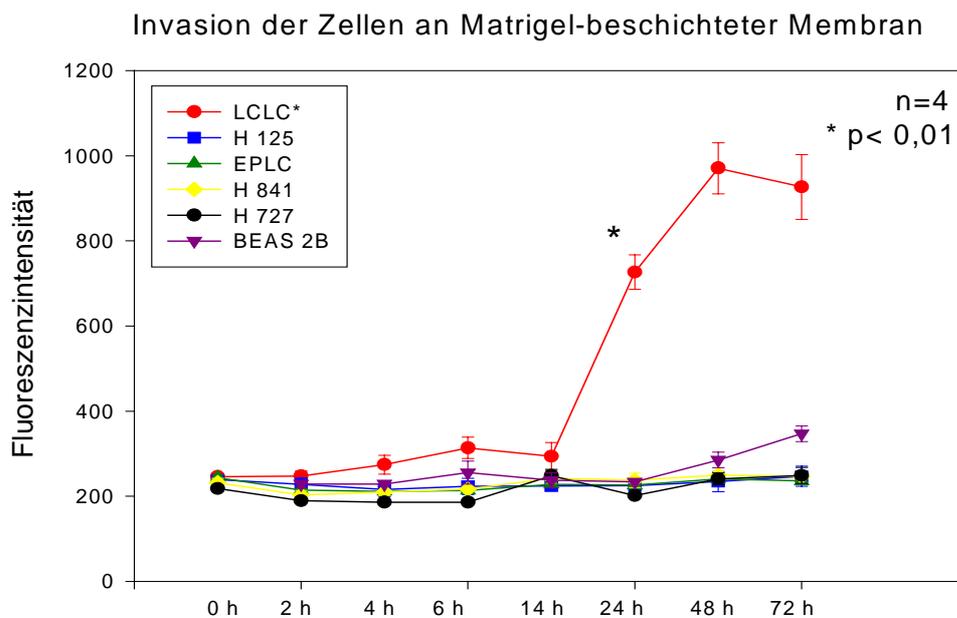


Abbildung 15 Invasionsverhalten der DiO-markierten Zellen an der Matrigel®-beschichteten Membran im Verlauf (Auswertung nach Tukey Test)

Ergebnisse

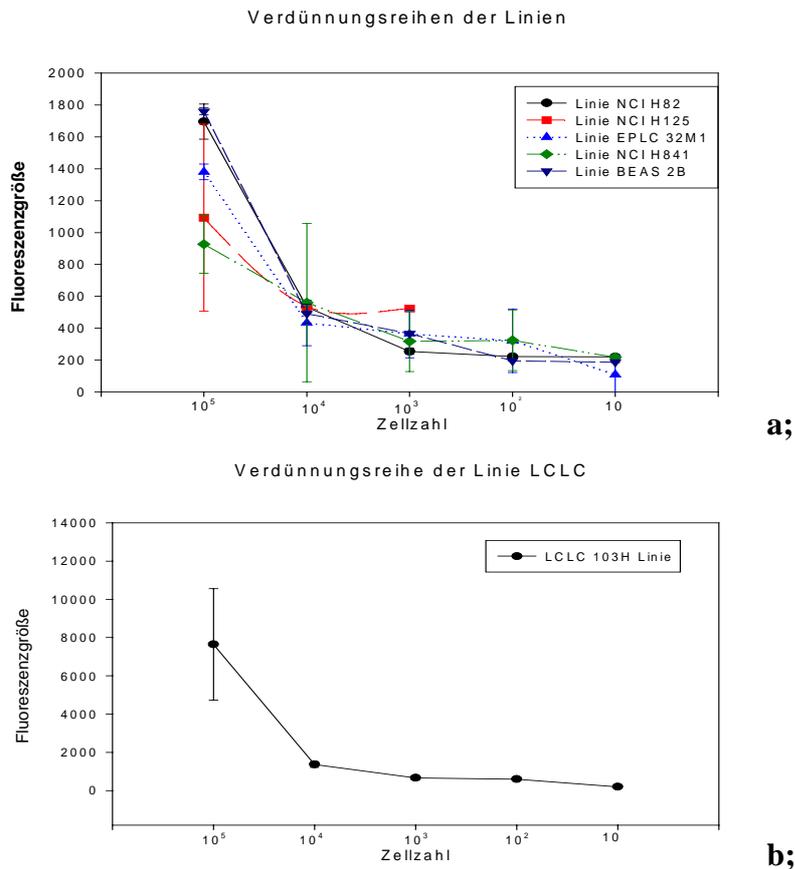


Abbildung 16 a; Verdünnungsreihen der Linien NCI H82, H125, H841, H727, EPLC, BEAS 2B
b; Verdünnungsreihe der Linie LCLC 103H

4.3.4 Invasion DiO markierter Zellen mit konditioniertem Medium

Die vorausgehenden Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zellen der Linie LCLC 103H die Matrigel®-beschichteten Kammern am stärksten transmigrierten. Mit der Überlegung, dass das Medium dieser Zelllinie lösliche Faktoren enthält, die den Invasionsvorgang begünstigen, wurde konditioniertes Medium dieser Linie für die übrigen Zelllinien verwendet. Um eine mögliche Änderung des Invasionsverhaltens festzustellen, wurde die DiO markierten Zellen in der Matrigel®-beschichteten Kammer der Wirkung vom konditioniertem Medium der Linie LCLC 103H ausgesetzt. Die Fluoreszenzintensität der transmigrierten Zellen wurde dann nach 2, 4, 6, 14, 24, und 48 Stunden Inkubationszeit untersucht. Zu allen Messzeitpunkten konnte kein signifikanter Anstieg in der Anzahl der durchgewanderten Zellen im Vergleich zur Messung mit herkömmlichem Kulturmedium RPMI 1640 nachgewiesen werden (Abb. 17).

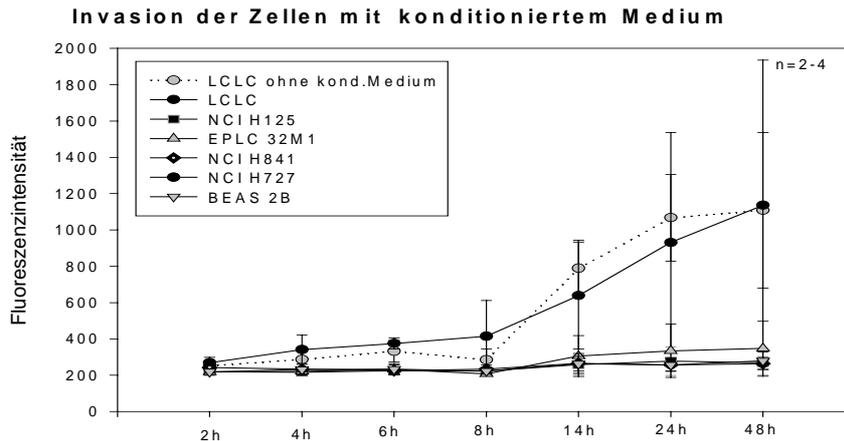


Abbildung 17 Invasionsverhalten der DiO markierten Zellen in konditioniertem Medium an der Matrigel®-beschichteten Membran im Verlauf

4.4 Elektronenmikroskopie

4.4.1 Zeitpunkt der Freilegung der Basalmembran an der Organkultur

Am histologischen Präparat der Bronchialbiopsie wurde gezeigt, dass sich die Zell-Zellkontakte des Epithels und die Zellkontakte zur Basalmembran nach eineinhalbständiger Einwirkung von 5 mM EDTA lösen und die Basalmembran freigelegt war. Für die Vorbereitung der Organkultur war es notwendig, dass die Basalmembran erhalten bleibt und möglichst wenig Schaden davonträgt. Um zu untersuchen, inwiefern das umliegende, nicht dem EDTA exponierte Epithel tatsächlich unbeschädigt bleibt, wurden die Organkulturen unter dem Elektronenmikroskop untersucht. Dabei konnte die Grenzlinie von voll funktionsfähigem zilierten Epithel der Organkultur und freigelegter Basalmembran dokumentiert werden. Die elektronenmikroskopische Analyse zeigte die freigelegte Basalmembran und gelösten Zellkontakte am Einwirkungsort der EDTA. Die Regionen, die der Wirkung von EDTA nicht ausgesetzt waren, blieben unbeschädigt.

4.4.2 Invasionsmuster der Zelllinien an Matrigel

Das Invasionsverhalten der Tumorzelllinien und der Zellen des Bronchialepithels wurden an Matrigel®-beschichteten Membranen nach sechs Stunden Inkubationszeit ausgewertet (Abb. 19-24). Die Membranen wurden von beiden Seiten untersucht. Es zeigte sich, dass die Zelllinien durchaus unterschiedliche Invasionsmuster aufwiesen. So bildeten die Zellen der Linien LCLC 103H, NCI H841 und EPLC 32M1 Pseudopodien. Die Zellen der Linien NCI H125 und NCI H82 fielen durch vesikuläre Strukturen an ihrer Oberfläche auf.

Ergebnisse

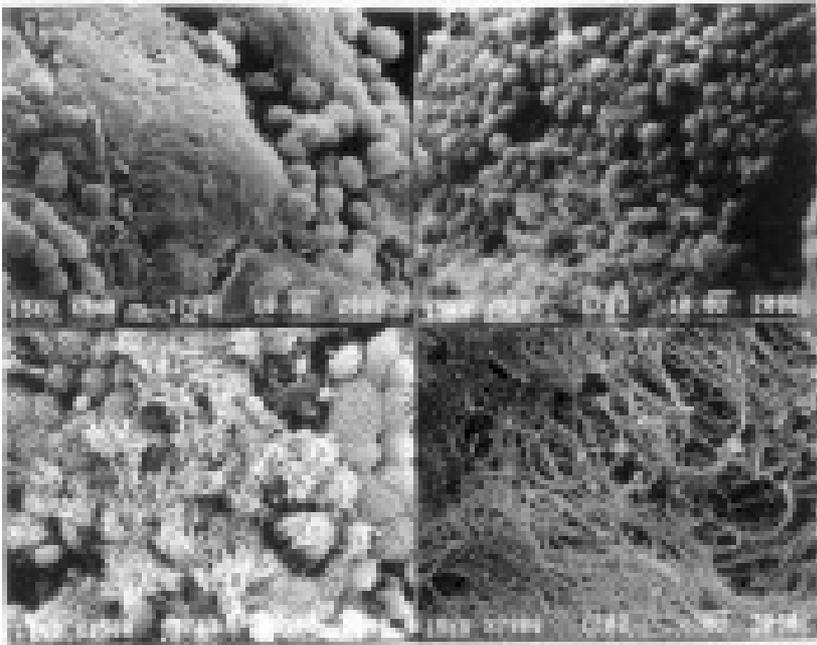


Abbildung 18 1, Organkultur nach 2 Stunden EDTA Einwirkung. Die Basalmembran ist freigelegt, einzelne noch anhaftende Epithelzellen sind zu sehen (Pfeile). **2**, Grenzlinie (Pfeile) zwischen dem funktionsfähigen zilierten Epithel und dem EDTA exponiertem Epithel. **3**, zilienbesetztes Bronchialepithel. **4**, Freigelegte Basalmembran

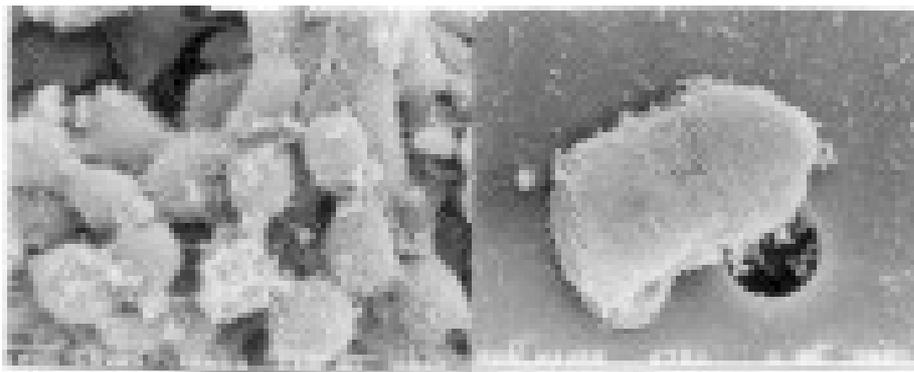


Abbildung EPLC 32 M1 auf Matrigel Das Matrigel® ist dicht von adhärennten Zellen bedeckt. Die polymorphen Zellen bilden feine Pseudopodien aus. Eine eben an der Unterseite der Membran durch eine Mikropore durchgetretene Tumorzelle. Auch hier sind Pseudopodien sichtbar.

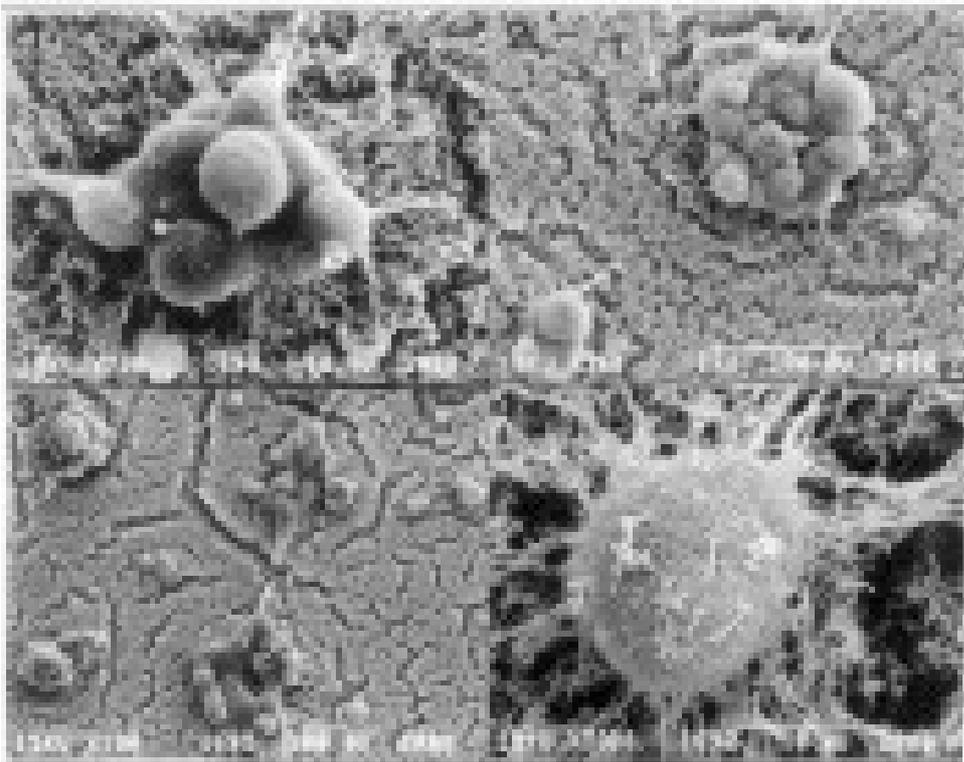


Abbildung 20 LCLC 103 H auf Matrigel

1, Die Zellen des großzelligen Karzinoms bilden häufig Zellkonglomerate. 2, Pseudopodien am Rand des Konglomerates nehmen Kontakt mit der Matrigel®-Beschichtung auf. 3, Die Zellkonglomerate scheinen eine muldenförmige Vertiefung in die Matrigel®-Beschichtung auszubilden und vertikal in diese einzudringen. 4, Einzelne Tumorzellen mit zahlreichen Pseudopodien

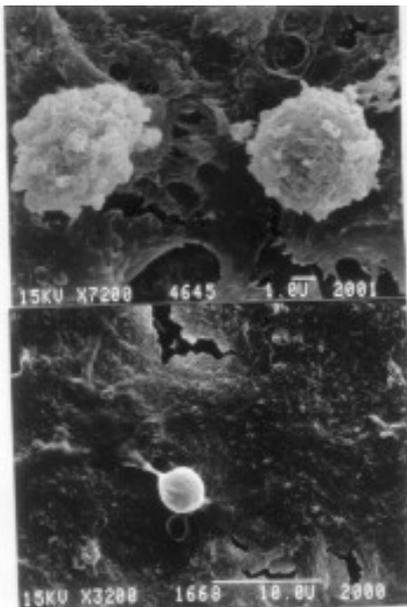


Abbildung 21 NCI H125 auf Matrigel

Einzelne Zellen mit vesikulären Strukturen durchdringen die in ihrer Struktur aufgelöste Matrigel®-Beschichtung

Abbildung 22 BEAS 2B auf Matrigel

1, Die kugeligen Zellen sitzen der nahezu vollständig erhaltenen Matrigel®-Beschichtung als einzelne Zellen oder Gruppen von wenigen Zellen auf.

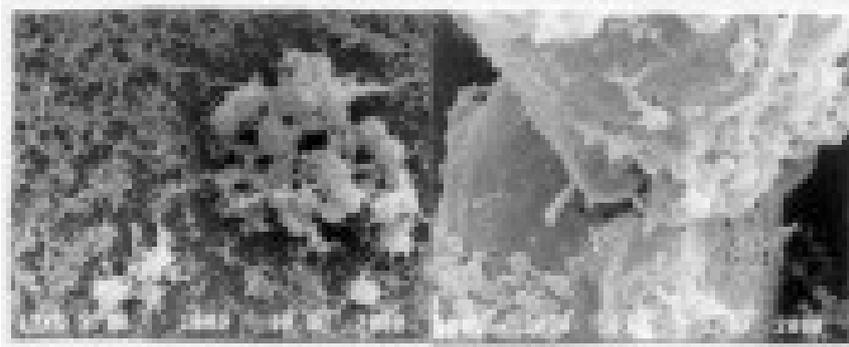


Abbildung 23 NCI H82 auf Matrigel

1, Zellkonglomerat um eine Mikropore an der Oberfläche der Membran. Die Matrigel®-Beschichtung ist nahezu vollständig aufgelöst. **2**, An der Zelloberfläche finden sich zahlreiche vesikuläre Strukturen

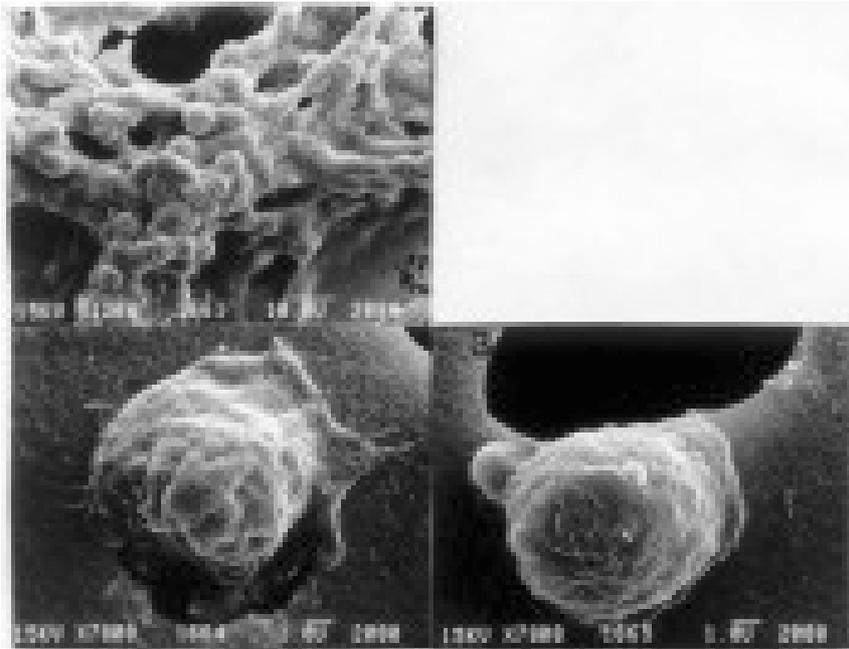


Abbildung 24 NCI H841 auf Matrigel

1, Konfluierende Zellformation auf Matrigel®-Beschichtung. **2-3**, An der Unterseite der Membran durch eine Mikropore durchgetretene Tumorzelle. Feine Pseudopodien vermitteln die Adhärenz.

5 Diskussion

5.1 Auswahl des Kulturmodells zur Untersuchung der Invasionsfähigkeit von Tumorzellen

In dieser Arbeit wurden als Arbeitsgrundlage zur Untersuchung der Invasion von Tumorzellen in Normalgewebe ein zweidimensionales sowie ein dreidimensionales Kulturmodell verwendet. Beide Modelle sind mit Vor- und Nachteilen behaftet, so dass je nach Fragestellung das richtige System gewählt werden muss. Ein Vergleich der Ergebnisse aus beiden Systemen kann zu ergänzenden Schlußfolgerungen führen.

Dreidimensionale Kokulturen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden besitzen die natürliche Architektur des Gewebes, lassen aber trotzdem eine Manipulation im Experiment zu. Das Epithel in der Organkultur hat im Gegensatz zu Monolayerkulturen den natürlichen mehrreihigen Aufbau. Es ist eine Interaktion zwischen den einzelnen Zelltypen möglich. Zudem wachsen Zellen in der Organkultur nicht auf künstlicher Umgebung, sondern auf ihrer eigenen Basalmembran. Es ist bekannt, dass Primärkulturen als Monolayerkulturen eine begrenzte Lebensdauer aufweisen und aufgrund der künstlichen Kulturbedingungen entdifferenzieren. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden modifizierte Methoden zur Kultivierung dreidimensionaler Organkulturen menschlichen respiratorischen Epithels etabliert. Zahlreiche Untersuchungen der morphologischen und funktionellen Eigenschaften der Organkulturen haben den Nachweis erbracht, dass diese nach 2 bis 3 Tagen der Kultivierung vollständig epithelisiert sind. Nach 14 Tagen sitzt ein teilweise ziliertes respiratorisches Epithel auf dem zellarmen, bindegewebigen Kernstück. Neben einer Basalmembran sind zilierte und nichtzilierte Zellen, basale Zellen und die sezernierenden Becherzellen vorhanden. Der Zilienschlag ist bei ca. 80% der Kulturen nachweisbar und läuft koordiniert ab. Das morphologische Bild entspricht dem des respiratorischen Epithels.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die frühen Phasen der Tumordinvasion zu untersuchen. In einem in der Arbeitsgruppe etablierten Kokulturmodell für das Bronchialkarzinom wurde durch Schneiden der Organkultur der bindegewebige Kern freigelegt (Al-Batran 1999). Für die frühen Schritte der Invasion ist jedoch insbesondere die Interaktion zwischen Tumorzellen und Basalmembran interessant, so dass das etablierte Modell für diese Untersuchungen zunächst dahingehend modifiziert wurde. Dazu wurde in der durchgeführten Arbeit das

Diskussion

Bronchialepithel lokal mit 5 mM EDTA entfernt. Dadurch wird die Basalmembran freigelegt und den experimentell aufgetragenen Tumorzellen der direkte Zugang zur Basalmembran ermöglicht. Die verwendete Methodik basiert auf Untersuchungen der Invasion von Zellen eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms in humanes Bronchialepithel von Fjellbirkeland et al. (Fjellbirkeland 1998). Zur Optimierung der Methode wurde zunächst die Dauer der EDTA-Einwirkung, welche für die Freilegung der Basalmembran notwendig ist, definiert. Durch histologische sowie immunhistochemische Aufarbeitung der Kulturen wurde der Zeitpunkt bestimmt, zu dem die Zell-Zell-Kontakte des Epithels und die Kontakte zur Basalmembran an der Stelle der EDTA-Einwirkung gelöst sind, die Basalmembran selbst aber intakt bleibt. Eine 1,5- bis 2-stündige Exposition der Organkulturen gegenüber 5 mM EDTA stellte sich als optimal heraus.

Um die Invasivität von Zellen anhand der Fähigkeit Basalmembranen zu durchdringen untersuchen zu können wurden auch mit künstlichen Basalmembranen beschichtete poröse Membranen in sog. Boyden-Kammern verwendet. Im Vergleich zu Kokulturen mit Organfragmenten können dabei unabhängig von Biopsiematerial beliebig viele Experimente angesetzt werden. Die Ergebnisse sind rasch erhältlich und die Messung der durchgewanderten Zellen ist sehr einfach. Die aktive Rolle des Gewebes, d.h. Vorgänge wie Angiogenese, Immunabwehr oder Stromareaktion des Organismus können bei Invasionsassays in Boyden-Kammern allerdings nicht untersucht werden.

Bei Untersuchungen der in-vitro Invasionskapazität verschiedener Tumore in solchen Kammern wird in der Literatur von klaren Unterschieden berichtet (Siewerts 1997, Albini 1987, Terranova 1986). Inwiefern diese mit der realen Situation übereinstimmen, d.h. mit der Prognose von Patienten korrelieren, bleibt unbeantwortet. Matrigel® wird aus dem Überstand eines Maus-Tumors gewonnen. Somit bestehen damit rekonstruierte Basalmembranen nicht aus menschlichem Gewebe. Die Zusammensetzung von Matrigel® ist jedoch der Zusammensetzung natürlicher Basalmembranen sehr ähnlich. Ob die gewonnenen Ergebnisse auf menschliche Basalmembranen übertragbar sind, ist nicht bewiesen. Trotz der relativ guten Standardisierbarkeit der Methode bringt sie eine hohe Variabilität der Ergebnisse mit sich. Auch andere Arbeitsgruppen, die die Invasion anhand von Matrigel®-beschichteten Kammern untersuchten berichten von einer großen Schwankungsbreite der Ergebnisse (Janiak 1994, Mackinnon 1992, La Riviere 1993). Die technische Durchführung ist nicht ganz einfach, Schwierigkeiten bringen v.a. die gleichmäßige, intakte Beschichtung sowie die

Diskussion

Inkubationszeit mit sich. Matrigel® hat die Eigenschaft, bei Raumtemperatur rasch und irreversibel zu gelieren, so dass für die gleichmäßige Beschichtung das Arbeiten auf Eis sowie eine gewisse Übung in der Handhabung unabdingbare Voraussetzung ist.

In dieser Arbeit wurden die Membraneinsätze der Kammer mit dem Matrigel® in einer Konzentration von $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ beschichtet. Aus der Studie vom Janiak geht hervor, dass bei dieser Konzentration ein signifikanter Unterschied zu unbeschichteten Kammern besteht. Albini berichtete, dass $50 \mu\text{g}$ Matrigel® eine dünne Barriere darstellen, die gerade die Poren bedecken kann. Die Arbeitsgruppe von Mackinnon zeigte, dass Matrigel® frei durch die Poren laufen konnte, wenn die Membran im Kontakt zu anderen Flächen war (Albini 1987, Janiak 1997, Mackinnon 1992). Hendrix machte die Dicke der Matrigel®-Beschichtung von der Inkubationszeit abhängig (Hendrix 1987).

In der Arbeit von Mackinnon wurden die Zellen, die die $50 \mu\text{g}$ Matrigel®-Barriere in großer Anzahl penetrieren, als hoch invasive Zellen betrachtet. Die Zellen, die zwar eine $25 \mu\text{g}$ dicke Barriere, aber nicht die $50 \mu\text{g}$ Barriere penetrieren, wurden als niedrig invasive Zellen eingestuft (Mackinnon 1992). Lange Inkubationszeiten rufen neue Probleme, wie die Stabilität des chemotaktischen Gradienten, der Matrigel®-Matrix, Sterilität und Zellvitalität hervor. Die Integrität von Matrigel® in den Kontrollfiltern wurde regelmäßig mit Coomasielblau kontrolliert. Dabei wurden keine spontanen Degradationen der Matrix beobachtet. Auch Bakterienwachstum wurde nach 16 Stunden nur selten festgestellt (Mackinnon 1992). Da die Inkubationszeiten in den hier durchgeführten Versuchen relativ kurz waren, konnten mögliche Unterschiede in der Anzahl der invadierten Zellen aufgrund der Zellproliferation eliminiert werden. Die Anzahl der Zellen, die durch die Beschichtung passieren, nimmt mit der Zeit zu und ist umgekehrt proportional zur Menge von Matrigel®-Beschichtung auf dem Filter (Albini 1987, Hendrix 1987, Repesh 1989). Obwohl man glauben könnte, dass bei größeren Zellen die Deformation durch die $8\mu\text{m}$ Poren des PET Filters schwieriger und damit auch die Migration erschwert ist, scheint die Zellgröße laut den Invasionsversuchen mit gynäkologischen Karzinomzellen an Matrigel®-beschichteten Kammern keine wichtige Rolle zu spielen (Sieuwerts 1997). Möglicherweise beeinflusst aber die zufällige Verteilung der Poren das Messergebnis der Invasion. Zellen, die sich nicht direkt oberhalb einer Pore befinden, benötigen unter Umständen mehr Zeit, bis sie eine Pore erreichen und sie passieren können. Diesem Problem kann durch eine dichte Aussaat der Zellen in der oberen Kammer entgegengewirkt werden.

Die Adhäsionsfähigkeit an die untere Seite der Membran kann das Messergebnis der Invasion verfälschen, da nicht alle Zellen an die untere Seite der Membran adhären. Viele Autoren verwenden eine Fibronektin-Beschichtung (adhäsives Protein) für die Membranunterseite (Siewerts 1997). Da in dieser Arbeit auch eine nicht adhären Zelle des Bronchialkarzinoms (NCI H82) verwendet wurde, wurde die in der Literatur beschriebene Methode zur Auswertung modifiziert. Die Gesamtanzahl der durchgewanderten Zellen wurde aus der Anzahl der am Filter adhären Zellen sowie aus der Zahl der Zellen im Medium bestimmt.

Insgesamt haben sowohl die zwei- als auch die dreidimensionalen Kultursysteme jeweils Vor- und Nachteile, so daß vergleichende Untersuchungen nötig sind.

5.2 Invasionsverhalten der einzelnen Zelllinien

Die Invasion der Tumorzellen, bzw. die Degradation der Basalmembran in Organkulturen wurde in der immunhistochemischen Färbung für Kollagen IV untersucht und lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Ergebnisse zeigten, dass nach 24 Stunden der Kokultivierung die Tumorzellen des großzelligen Bronchialkarzinoms in 100% der ausgewerteten Präparate die Basalmembran degradierten, bei den Tumorzellen des Adenokarzinoms war dies nach 48 Stunden der Fall. Beim Plattenepithelkarzinom war nach 24 Stunden in 100% der ausgewerteten Präparate die Degradation der Basalmembran festzustellen, nach 48 Stunden der Kokultivierung zeigten 50 % der Präparate diesen Befund. Dieses widersprüchliche Ergebnis kann durch die geringe Anzahl an ausgewerteten Kokulturen erklärt werden. Da die histologischen Auswertungen durch ihre kleine Probenzahl in ihrer Aussagekraft limitiert sind, geben wir den Ergebnissen nach 24 Stunden größere Bedeutung. Hier war in nahezu allen Tumorzelllinien der Durchbruch der Basalmembran im Präparat zu sehen.

Es wurde auch versucht, eine Kokultur mit Zellen der Linie NCI H841, eines schwach adhären wachsenden kleinzelligen Bronchialkarzinoms, herzustellen. Diese Zellen lassen sich bereits durch mechanische Kräfte vom Kulturboden ablösen. Eine Kokultivierung war mit diesen Zellen nicht möglich. Dies ist zunächst kein überraschendes Ergebnis, da die Adhäsion als Voraussetzung für invasives Wachstum gilt.

Die Ergebnisse dieser Experimente haben Unterschiede im Invasionsverhalten zwischen den beiden Gruppen des Bronchialkarzinoms, der SCLC und der NSCLC, gezeigt. Die Zelllinie

Diskussion

des kleinzelligen Bronchialkarzinoms zeigt widersprüchliche Ergebnisse in den Transmigrationsversuchen. Die Anzahl der durchgewanderten Zellen in den unbeschichteten Invasionskammern war niedriger als in den Matrigel®-beschichteten. Dieses Ergebnis überrascht, da man von den nicht adhären Zellen eigentlich erwarten würde, dass sie die unbeschichtete Membran schneller passieren.

Als eine spekulative Erklärung kommt die kurzfristige Expression von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche von Tumorzellen in Anwesenheit der Matrigel® Beschichtung in Frage. Die Anzahl der transmigrierten Zellen nimmt in den beschichteten Invasionskammern kontinuierlich zu. Das fehlende Erreichen eines Plateaus nach 72 Stunden Inkubation ist ein Hinweis, dass das Invasionspotential der Zellen noch nicht ausgeschöpft ist. Im Vergleich mit den adhären Zellen der Linie NCI H841 wurde beobachtet, dass diese das Matrigel® wesentlich langsamer als die Zellen der Linie NCI H82 invadierten. Es wird postuliert, dass der Verlust der Fähigkeit zur Adhäsion ein Zeichen für erhöhte Malignität des Tumors darstellt. Das korreliert mit den vorliegenden Ergebnissen (Abb.25).

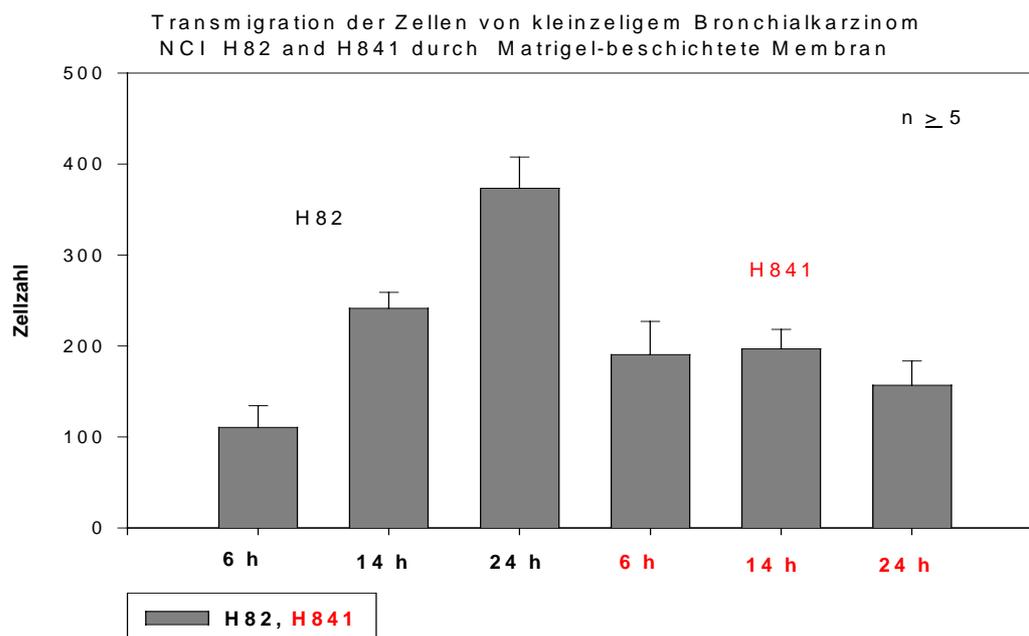


Abbildung 25 Vergleich der Durchwanderung der Zellen von Linien NCI H82 und H841 durch das Matrigel®

Als Kontrolle für alle Versuche wurde die Zelllinie BEAS 2B verwendet. Diese Zellen stammen von normalem Bronchialepithel ab und sind durch Transfektion mit einem SV40-Fragment immortalisiert. Diese Zellen sind in geringem Ausmaß fähig, Matrigel® zu invadieren, obwohl sie nicht aus einem Karzinom abstammen. Möglicherweise wird durch die Sekretion von Enzymen bei einer hohen Zelldichte die Matrigel-Beschichtung degradiert.

Von den in der Untersuchung verwendeten Tumorzelllinien ist leider nichts genaueres über den klinischen Verlauf der Patienten, von denen sie abstammen, bekannt. Eine Abhängigkeit der Prognose von Patienten mit NSCLC ist nur für das Tumorstadium bei Diagnosestellung bekannt. Statistisch ist bei großzelligen Bronchialkarzinomen allerdings bei Erstdiagnose das Vorliegen von Fernmetastasen häufig. Das Plattenepithelkarzinom ist bei Diagnosestellung statistisch häufiger noch auf den Primärtumor begrenzt. (Yamaoka 1991, Usuda 1994). Für Adenokarzinome wurde beobachtet, dass häufiger als beim Plattenepithelkarzinom eine Gefäßinvasion vorliegt, so dass es früher zu hämatogener Metastasierung kommt.

5.3 Vergleich der Ergebnisse aus Kokultur- und Matrigel®-Modell

Bei einem Vergleich der beiden verwendeten Methoden Kokultur und Matrigel®-Invasionskammer stellen sich die Ergebnisse unterschiedlich dar. Im Matrigel®-Modell konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der Invasionsfähigkeit des großzelligen Karzinoms gegenüber den anderen Zelllinien gemessen werden. Dies war im Kokulturmodell nicht eindeutig zu beobachten. Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse in den beiden Modellen sind vor allem in den unterschiedlichen Gegebenheiten der beiden Methoden zu suchen. Bei der Invasion von Tumorzellen in gesundes Gewebe spielt in-vivo die Stromareaktion eine entscheidende Rolle. Diese Reaktion entfällt am Matrigel®-Modell. Das Matrigel® enthält zwar wesentliche Komponenten der Basalmembran (Kollagen IV, Laminin, Glykoproteine), aufgrund seiner Abstammung aus einem Mausarkom kann es aber nicht vollständig die physiologischen Verhältnisse an der humanen Basalmembran abbilden. Aufgrund technischer Einschränkungen (Mediumwechsel, Metabolismus von DiO in den markierten Zellen) kann die Tumordinvasion nicht über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Dies ist hingegen beim Kokulturmodell möglich.

Diese Überlegungen untermauern die Auffassung, dass zweidimensionale Modelle zwar für die Untersuchung von molekularen Vorgängen geeignet sind, nicht jedoch für klinisch relevante Fragestellungen, wie sie z.B. für Medikamentenstudien eine Rolle spielen.

Der Mechanismus der Invasion der Linie NCI H82 ist in der Matrigel®-beschichteten Kammer unklar. Obwohl die Zellen dieser Linie als in Suspension wachsende, nicht adhärenente Zellen definiert sind, sind sie fähig, sich der Matrigel®-beschichteten Membran zu nähern und sie zu invadieren. Es ist möglich, dass die Anwesenheit von Matrigel® die Zellen zur kurzfristigen Expression von Adhäsionsmolekülen anregt, die Voraussetzung für die Invasion schaffen.

5.4 Invasionsverhalten der Zelllinien in konditioniertem Medium

Durch Inkubation der untersuchten Zelllinien mit konditioniertem Medium sollte überprüft werden, dass von LCLC-Zellen konditioniertes Medium die Invasionsfähigkeit der Zellen steigern kann. Der Versuch mit konditioniertem Medium der Linie LCLC 103H, die sich als die invasivste Linie erwies, zeigte, dass die Invasivität nicht gesteigert werden konnte. Bei Untersuchungen anderer Autoren wurde beobachtet, dass konditioniertes Medium aus der Zelllinie eines Mausfibroblastoms die Migrationsfähigkeit humaner gynäkologischer Tumorzellen an poröser unbeschichteter Membran anheben konnte. In der Matrigel®-Kammer wurde bei eben diesen Zelllinien aber keine Erhöhung der Anzahl transmigrierter Zellen nach 24 Stunden festgestellt (Siewerts 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem das konditionierte Medium der Linie LCLC 103H mit den Medien aller anderen Zelllinien mit Hilfe der Elektrophorese verglichen. Es konnte kein Unterschied in der Verteilung der Proteine innerhalb der Zelllinien festgestellt werden. Die Sensitivität dieser Methode ist allerdings nicht ausreichend, um Unterschiede im Expressionsmuster der sezernierten Proteine erkennen zu können.

5.5 Elektronenmikroskopie

Um im dreidimensionalen Bild den Vorgang der Invasion zu analysieren, wurden Morphologie der Tumorzellen und Invasionsmuster an Matrigel®-beschichteten Kammern unter dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Es wurden Unterschiede in der Morphologie der transmigrierten Zellen gesehen. Die Zellen der Linien LCLC 103H, EPLC 32M1 und NCI H841 bilden Pseudopodien, die Zellen der Linie NCI H125 und H82 sind rund und bilden vesikuläre Oberflächenstrukturen. Es ist bekannt, dass die Zelllinien mit Fibroblast-ähnlicher Morphologie eine schnellere Adhäsion zeigen als die Zelllinien mit eher runder Form. Die beobachteten morphologischen Eigenschaften können eine Adaptation an

Diskussion

die in-vitro Situation darstellen. Allgemein geht man davon aus, dass jeder Zelllinie unterschiedliche Adhäsionsmechanismen zueigen sind und dass die Zellmorphologie eine entscheidende Rolle bei der lymphatisch-endothelialen Zelladhäsion spielt (Bevaqua 1990). Die im Experiment beobachteten Unterschiede in der Adhäsionsfähigkeit könnten daher eine Aussage über die Invasivität der Tumorzellen zulassen und eine Vorhersage über die Metastasierungswahrscheinlichkeit erlauben.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Invasion von Lungenkarzinomzellen unterschiedlicher Histologie bzw. Differenzierung. Dazu wurden die Modelle der Kokultur und der Matrigel-Kammern verwendet und miteinander verglichen. Für diese Arbeit waren folgende Schritte nötig: Etablierung eines Kokulturmodells, bestehend aus einer Organkultur mit freigelegter Basalmembran und Tumorzellen aus 6 verschiedenen Zelllinien des Bronchialkarzinoms. Die Invasion von Tumorzellen durch die Basalmembran der Organkultur wurde in histologischen Präparaten analysiert. Die Durchwanderung der Zellen in Matrigel®-beschichteten Kammern und das Invasionsverhalten in konditioniertem Medium wurde quantitativ ausgewertet. Das Invasionsmuster der Tumorzellen während der Durchwanderung an Matrigel®-beschichteten Kammern wurde elektronenmikroskopisch dokumentiert.

Organkokultur: Um den Tumorzellen einen direkten Zugang zur Basalmembran der Organkultur zu verschaffen, wurden die Kulturen mit EDTA behandelt. Die Wirkung von EDTA auf die Organkultur bestätigte unsere Vermutung, dass die Regionen, die nicht dem direkten Kontakt der EDTA-Wirkung ausgesetzt waren, weiterhin funktionsfähiges zilliertes Epithel aufwiesen. Die Stellen, die EDTA exponiert waren, besaßen keine Epithelzellen mehr. Die Basalmembranstrukturen waren jedoch erhalten. Es war dadurch möglich, eine Kokultur herzustellen und einzelne Schritte der Invasion an der Basalmembran zu beobachten. Eine Adhäsion der Tumorzellen dreier verschiedener Bronchialkarzinomlinien an die Basalmembran der Organkultur fand bereits nach 24 Stunden der Kokultivierung statt. Mittels Kollagen IV-Färbung zeigte sich, dass die Zellen der Linie LCLC 103H, Zellen eines großzelligen Bronchialkarzinoms, am stärksten die Basalmembran degradierten.

Da der Unterschied gegenüber den Linien EPLC 32M1 und NCI H125 keine Signifikanz aufwies, wurde ein zweidimensionales Modell verwendet, um die Frühphasen der Invasion von Tumorzellen besser vergleichen zu können. Dabei wurde die Invasionskapazität der Tumorzellen in Matrigel®-beschichteten Kammern untersucht. Um den Einfluss von Adhäsion und Migration der Zellen auf die Invasionskapazität der Zellen beurteilen zu können, wurde zum Vergleich auch die Durchwanderung der Zellen an unbeschichteten Membranen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die LCLC 103H Linie das stärkste Potential zur Invasion in die Matrigel®-Beschichtung aufwies. Die Adhärenz, der erste Schritt der Invasion, scheint bei dieser Linie eine wichtige Rolle zu spielen. Bei der Linie NCI H125

Zusammenfassung

ist dagegen die Migration am stärksten ausgeprägt. Das konditionierte Medium der Linie LCLC 103H hatte keinen Einfluss auf die Invasionskapazität anderer Zelllinien.

Elektronenmikroskopisch bestätigte sich, dass die Zellen der Linien LCLC 103, EPLC 32M1 und NCI H841 während der Invasion an Matrigel®-beschichteten Membranen Pseudopodien ausbilden, was als Zeichen für erhöhtes Invasionsvermögen angesehen werden kann. Die Zellen der NCI H125 Linie dagegen bilden auf ihrer Oberfläche vesikuläre Strukturen.

Die Linie NCI H82, Zellen eines kleinzelligen Tumors, zeigte im zweidimensionalen Modell ebenfalls ein hohes Invasionspotential. Aufgrund fehlender Adhärenz der Tumorzellen war eine Kokultur nicht durchführbar. In der Matrigel®-Invasionskammer zeigte sich hingegen eine hohe Invasionsbereitschaft der Zelllinie. Wir haben daraus den Schluss gezogen, dass die Matrigel®-Beschichtung für die Zellen dieser Linien ein chemoattraktiv zu sein scheint. Es wäre sinnvoll in dieser Richtung weitere Untersuchungen durchzuführen.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen sind unsere Schlußfolgerungen:

- Unterschiedliche Zelllinien besitzen verschiedene Mechanismus der Invasion.
- Die aus mehreren Schritten bestehende Invasion (Adhäsion, Degradation und Migration der Tumorzellen) schließt auch die Reaktion von gesundem Gewebe nach der Stimulation von Tumorzellen (Stromareaktion) mit ein. Die Stromareaktion, die eine wichtige Rolle spielt, ist im dreidimensionalen Kokulturmodell erhalten. Daher ist dieses Modell für die Untersuchungen der Invasionsfähigkeit der Tumorzellen im menschlichen Organismus gut geeignet und kann die Bedingungen während der Invasion am ehesten nachahmen.

Die Fähigkeit der Zellen, die Matrigel®-beschichtete Membran zu invadieren, lässt nicht unbedingt Rückschlüsse auf die in-vivo Bedingungen zu, weil Matrigel® kein menschliches Gewebe darstellt. Mittels der Matrigel®-beschichteten Kammern ist es dennoch möglich, einzelne Schritte der Invasion, wie Adhäsion der Tumorzellen, die Degradation von Matrigel® und die Migration der Tumorzellen sowie deren Regulierung mittels löslicher Faktoren und Medikamente qualitativ und quantitativ sowie auch morphologisch zu untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

Ahrendt S. A., Decker P., Alawi E. A. 2001 "Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung." *Cancer* 92:1525-1530

Al-Batran S. E., Astner S. T., Supthut M. 1999 "Three-dimensional in vitro cocultivation of lung carcinoma cells with human bronchial organ culture as a model for bronchial carcinoma" *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:200-208

Albini A., Iwamoto Y., Kleinman H. K. 1987 "A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells." *Cancer Research* 47:3239-3245

Aplin A. E., Howe K., Juliano R. 1999 "Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth." *Curr Opin Cell Biol* 11:737-744

Bals R., Gamarra F., Kaps A. 1998 "Secretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ-culture system." *Cell Tissue Res* 293:573-577

Banks-Schlegel, S. P. et al. 1985 "Intermediate filament and cross-linked envelope expression in human lung tumor cell lines." *Cancer Research* 45:1187-1197

Barrett A., McDowell M., Frank A. L. 1976 "Long-term organ culture of human bronchial epithelium." *Cancer Research* 36:1003-1010

Bepler G. et al. 1988 "Characterization of the state of differentiation of six newly establishment human non-small-cell lung cancer cell lines." *Differentiation* 3: 158-171

Berndt A., Borsi L., Hyckel P. 2001 "Fibrillary co-deposition of laminin-5 and large unspliced tenascin-C in the invasive front of oral squamous cell carcinoma in vivo and in vitro." *J Cancer Res Clin Oncol* 127:286-291

Literaturverzeichnis

Berx G., Cleton-Jansen A. M., Nolet F. 1995 "E cadherin is a tumor invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers." *EMBO J* 14:6107

Berx G., Cleton-Jansen A. M., Strumane K. 1996 "E cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain." *Oncogene* 13:1919

Bevacqua S. J., Welch D. R., Diez de Pinos S. M. 1990 "Quantitation of Human Melanoma, Carcinoma and Sarcoma tumor cells adhesion to lymphatic endothelium." *Lymphologie* 23:4-14

Bjornland K., Buo L., Kjonniksen I. 1996, "Cysteineproteinase inhibitors reduce malignant melanoma cell invasion in vitro." *Anticancer Res* 16:1627-1631

Brower M. et al. 1986 "Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small cell lung cancer in a serum free defined medium." *Cancer Research* 15:798-806

Carbone D. P. et al. 1991 "Neural cell adhesion molecule expression and messenger RNA splicing patterns in lung cancer cell lines are correlated with neuroendocrine phenotype and growth morphology." *Cancer Research* 15: 6142-6149

Carney D. N. et al. 1985 "Establishment and identification of small cell cancer cell lines having classic and variant features." *Cancer Research* 45: 2913-2923

Chevillard M., Hinnrasky J., Zahm J. M. 1991 "Proliferation, differentiation and ciliary beating of human respiratory ciliated cells in primary culture." *Cell Tissue Res.* 264:49-55

Colby T.V. 1995 "Tumors of the lower respiratory tract." Vol.3;1-554. *Atlas of tumor Pathology. Edited by Rosai, J. Washington D.C., Armed Forces Institute of Pathology.*

Literaturverzeichnis

De Ridder L., Mareel M., Vakaet L. 1977 "Invasion of malignant cells into cultured embryonic substrates. Three-dimensional histoculture: origins and applications in cancer research." *Arch geschwulforsch* 47:7-27

Dong-Wook P. M. S., Hee-Sug R., Dong-Soon Ch. 2001 "Localisation of Matrix metalloproteinases on endometrial cancer cells invasion in-vitro." *Gynecol Oncologie* 82:442-449

Easty G., Easty D. 1963 "An organ culture for the examination of tumor invasion." *Nature* 199:1104-1105

Fjellbirkeland L., Blerkvig R., Laerum O. D. 1997 „Non small lung carcinoma cells invade human bronchialmucosa in vitro.“ *In Vitro Cell. Dev. Biol-Animal* 33:330-340

Fjellbirkeland L., Laerum O. D., Eide G. E. 1998 „Invasiveness by lacZ transfected non-small cell lung cancer cells into human bronchial tissues in vitro.“ *Lung Cancer* 21:7-19

Forsberg K. et al. 1993 "Expression of functional PDGF β Receptors in a human large cell lung carcinoma cell line." *Inter J Cancer* 53: 556-560

Gamarra F., Baretton G., Grundler S. 1993 "A new technique to culture human bronchial epithelial cells as mini-organ system in vitro." *Eur Respir J Suppl.*17, 6:182

Garbisa S., Negro A., Kalebic T. 1988 "Type IV collagenolytic activity lineage with the metastatic phenotype induced by ras transfection." *Adv Exp Med Biol* 233: 179-186

Gazdar A. F. 1989 "Advances in the biology of non small cell lung cancer." *Chest, Supplement: 227s-283s*

Giancotti F. G., Ruoslahti E. 1999 "Integrin signaling" *Science* 285: 1028-1032

Literaturverzeichnis

Giaccone G., Battey J., Gazdar A. F. 1992 "Neuromedin B is present in lung cancer cell lines." *Cancer Research (Suppl.)* 52:2732s-2736s

Grummer R., Hohn H. P., Mareel M. M. 1994 "Adhesion and Invasion of three human choriocarcinoma cell lines into human endometrium in a three-dimensional organ culture system." *Placenta Jun 15:411-429*

Hart I., Fidler I. 1978 "An in vitro quantitative assay for tumor cell invasion." *Cancer Research* 38:321

Heidtmann H. H., Salge U., Havemann K. 1993 "Secretion of a latent, acid activatable cathepsin L precursor by human non-small cell lung cancer cell lines." *Oncol Res* 5:441-451

Heidtmann H. H., Salge U., Abrahamson M. 1997 "Cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors in human cancer cell lines." *Clin Exp Metastasis Juli 15(4):368-381*

Hendrix M., Seftor E., Seftor R. 1987 "A simple quantitative assay for studying the invasive potential of high and low human metastatic variants." *Cancer Lett* 38:137-147

Hoffmann R. M. 1991 "Three-dimensional histoculture: origins and applications in cancer research." *Cancer-Cells* 3:86-92

Hofmann J., Kaiser U., Maasberg M. 1995 "Glucocorticoid receptors and growth inhibitory effects of Dexamethasone in human lung cancer cell lines." *European Journal of Cancer* 31A, Nr.12:2053-2058

Jakson A. D., Rayner Ch. F. J., Dewar A. 1996 "A human respiratory-tissue organ culture incorporating an air interface." *Am J Respir Crit Care Med* 153:1130-1135

Janiak M., Hashmi H. R., Janowska-Wieczorek A. 1994 "Use of the Matrigel-based assay to measure the invasiveness of leukemic cells." *Experimental Hematology* 22:559-565

Literaturverzeichnis

Kaiser U. 1996 "The neural cell adhesion molecule NCAM in multiple myeloma." *Leukemia and lymphoma* 20:389-395

Khoshyomn S., Penar P. L., McBride W. J. 1998 "Four-dimensional analysis of human brain tumor spheroid invasion into fetal rat brain aggregates using confocal scanning laser microscopy." *J Neurooncol* 38:1-10

Kleinman H. K., McGarvey M., Hassell J. 1986 "Basement membrane complexes with biological activity." *Biochemistry* 25:312

Kramer R. H., Besch K. G., Wong J. 1986 "Invasion of reconstituted basement membrane matrix by metastatic tumor cells." *Cancer Research* 46:1980

Kunz-Schughart L. A., Ktretz M. Knuechel R. 1998 "Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumor biology." *Int J Exp Path* 79:1-23

La Riviere G., Klein Gebbinck J. W. I. M., Schipper C. A. 1993 "In vitro invasiveness of CTL clones and in vivo dissemination of CTL hybridomas." *J Leukocyte Biol* 53:381

Liotta L. A., Tryggvason K., Garbisa S. 1980 "Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen." *Nature* 284:67-68

Liotta L. A. 1986 "Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix" Rhoads memorial Award lecture. *Cancer Research* 46:1-7

Mackinnon W. B., Hancock R., Dyne M. 1992 "Evaluation of an in vitro invasion assay for use on solid tissue samples and cultured cells." *Invasion Metastasis* 12:241

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

Literaturverzeichnis

Mareel M., Meyvisch C. 1981 "Invasion of malignant cells in vivo and in vitro: Similarities and differences." *Arch. Geschwulstforsch.* 51:20-27

Max R. 1997 "Immunohistochemical analysis of Integrin $\alpha\beta 3$ expression on tumor-associated vessels of human carcinomas." *Inter J Cancer* 71:320-324

McDonnell S., Chaudry V., Mansilla-Soto J. 1999 "Metastatic and non-metastatic colorectal cancer cells induce host metalloproteinase production in vivo." *Clin Exp Metastasis* 17:341-349

Montain C. F. 1997 "Revisions in the International System for Staging Lung Cancer." *Chest* 111:1710-1717

Mueller-Kliese W. 1987 "Multicellular spheroids: a review on cellular aggregates in cancer research." *Journal Cancer Clin Oncol* 113:101-122

Nakajima M., Welch D. R., Belloni P. N. 1987 "Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials." *Cancer Research* 47:4869-4876

Navab R., Mort J.S., Brodt P. 1997 "Inhibition of carcinoma cell invasion and liver metastases formation by the cystein proteinase inhibitor E-64." *Clin Exp Metastasis* 15:121-129

Negri E., La Vecchia C., Franceschi S. 1994 "Patterns of mortality from major cancers in Europe." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3: 531-536

Nieman M. T., Prudoff R. S., Johnson K. R. 1999 "N-Cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-Cadherin expression." *J Cell Biol* 147:631-643

Literaturverzeichnis

Nobes C. D., Hall A. 1995 "Rho, Rac and Cdc42 GTPase regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia." *Cell* 81:53-62

Nobes C.D., Hall A 1999 "Rho GTPases control polarity, protrusion and adhesion during cell movement." *J Cell Biol* 144:1235-1244

Ohsaki Y., Yang H. K., Tram Le P. 1993 "Human small cell lung cancer cell lines express functional Atrial natriuretic Peptide receptors." *Cancer Research* 53:3165-3171

Ossowski L., Reich E. 1980 "Experimental model for quantitative study of metastasis." *Cancer Research* 40:2300-2309

Parise L. V, Lee J. W., Juliano R. L. 2000 "New aspects of Integrin signaling in cancer." *Cancer Biology* 10:407-414

Pierceall W. A., Woodard A. S., Morrow J. S. 1995 "Frequent alterations in E-Cadherin and α and β -catenin expression in human breast cancer cell lines." *Oncogene* 11:1319-1326

Poste G. 1982 "Experimental systems for analysis of the malignant phenotype." *Cancer Metastasis rev* 1:99-141

Poulson R., Pignatelli M., Stetler-Stevenson W. G. 1992 "Stromal expression of 72 kda type IV Kollagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia." *Am J Pathol* 141:389-396

Repesh L. 1989 "A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion." *Invasion Metastasis* 9:192-208

Samett J. M. 1993 "The epidemiology of lung cancer." *Chest* 103:20

Literaturverzeichnis

Sander E. E., ten Klooster J.P., van Delft S. 1999 "Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPase determines cellular morphology and migratory behavior." *J Cell Biol* 147:1009-1022

Schardt C., Rotsch M., Erbil C. 1993 "Characterization of Insulin-like growth factor II Receptors in human small cell lung cancer cell lines." *Experimental Cell Research* 204:22-29

Schuster U., Büttner R., Hofstädter F. 1994 "A heterologous in vitro coculture system to study interaction between human cancer cells and fibroblasts." *The Journal of Urology* 151:1707-1711

Sieuwerts A. M., Klijn J. G. M., Foekens J. A. 1996 "Assesment of the invasive potencial of human gynecological tumor cell lines with the in vitro Boyden chamber assay:influences of the ability of cells to migrate through the filter membran." *Clin Exp. Metastasis* 1997,15:53-62

Sommers C. L., Thompson E. W., Tori J. A. 1991 "Cell adhesion molecule uvomurulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities." *Cell Growth Differ* 2:365-372

Sommers C. L., Gelman E.P., Kemler R. 1994 "Alterations in β -catenin phosphorylation and plakoglobin expression in human breast cancer cells." *Cancer Research* 54:3544-3552

Statistisches Bundesamt 2002 "Todesursachenstatistik 1968 bis 1999" *Zweigstelle Bonn*

Steinsvag S. K., Strand M., Berg O. 1991 „Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system.“ *Laryngoskop* 101:1323-1330

Takahashi T. et al. 1989 "p53:a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer." *Science* 246: 491-494

Literaturverzeichnis

Terranova V. P., Hujanen E. S., Loeb D. M. 1986 "Use of a reconstituted basement membrane to measure cell invasiveness and select for highly invasive tumor cells." *Proc Natl Acad Sci USA* 83:465

Travis W. D. 1999 "Pathology of lung cancer." *Clin Chest Med.* 2002, Mar., 23(1):65-81, Review

Usuda K., Saito Y., Sagawa M. 1994 "Tumor doubling time and prognostic assessment of patients with primary lung cancer." *Cancer.* 1994 Oct 15;74(8):2239-44.

Van Scott M. R., Cheng P. W., Henke D. C. 1991 "Cell culture of airway epithelia" *The Airway Epithelium* S. G. Farmer and D. W. P. hay, editors Marcel Dekker , New York:135-167

Wagener Ch. 1999 *Molekulare Onkologie, Entstehung und Progression maligner Tumoren*, Thieme Verlag:221

Weber W. T., Mausner R. 1977 "Migration pattern of avian embryonic bone marrow cells and their differentiation to functional T and B cells." *Avian immunology* :47-59

Wu A. H. et al. 1996 "Family history of cancer and risk of lung cancer among lifetime nonsmoking women in the United States." *Am Journal of Epidemiologie* 143:535-542

Zutter M. M., Santoro W. D., Staats Y. L. 1995 "Re-expression of the $\alpha 2 \beta 1$ integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells." *Proc Natl Acad USA* 92:7411

Yamaoka N., Tagawa Y., Miyashita K. 1995 "Proliferative activity assessed on the basis of DNA ploidy patterns in primary lung cancer." *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 53:205-208

Yamashita J. 1997 "Tumor neutrophil elastase is closely associated with the direct extension of non-small cell lung cancer into the aorta." *Chest* 111:885-890

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R. M. Huber, Leiter der Pneumologie danke ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für das Überlassen dieses sehr interessanten Themas und die Möglichkeit, die Arbeit an der Medizinischen Klinik durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. S. Astner für die engagierte und kompetente Betreuung. Herzlichen Dank für alle die Ratschläge und die Anleitung zur selbstständigen Laborarbeit.

Danken möchte weiterhin Herrn Prof. U. Welsch, Vorstand an der Anatomischen Anstalt der LMU München und seinen Mitarbeitern für die Hilfe und Beratung bei der Aufarbeitung der histologischen Präparate und für die Bereitstellung der Gerätschaft. Herrn Thielke danke ich für die freundliche Einarbeitung in die Elektronenmikroskopie.

Den Bronchoskopeuren der Gruppe, besonders Herrn Dr. med. H. Hautmann und Herrn Dr. med. F. Gamarra vielen Dank für die Bereitstellung der Biopsien.

Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter und Doktoranden der Arbeitsgruppe für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und für das freundschaftliche Arbeitsklima.

9 Lebenslauf

Name	Dana Krajciova	
Geburtsdatum	31. 3. 1973	
Geburtsort	Ruzomberok, Slowakische Republik	
Schulbildung	1979-1987	Grundschule, Ruzomberok
	1987-1991	Gymnasium, Ruzomberok
	14. 5. 1991	Abitur
Studium	1991-1999	Karls Universität zu Prag 1. Medizinische Fakultät, Fach Allgemeinmedizin
	15. 2. 1999	staatliche Abschlussprüfung mit dem Gesamtergebnis sehr gut
	Juli 1999	Beginn der Dissertation
Stipendien	2001-2002	Studienabschlussstipendium aus Mitteln des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD)
Berufliche Ausbildung	2000-2001	Ärztin im Praktikum am Klinikum der LMU Medizinische Klinik-Innenstadt
	2002-2003	Ärztin im Praktikum im Klinikum Rechts der Isar der TU München