

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
(Direktor: Prof. Dr. K. Roosen)

Entwicklung eines organotypischen in vitro Assays zur
Analyse der Gliominvasion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Christian Schichor
aus Ulm

Würzburg, Februar 2000

Christian Schichor
Silcherstraße 33a
97074 Würzburg
Telefon: 0931-7843097

Antrag auf Zulassung zur Promotion

Angestrebter Doktorgrad: Doktorwürde der Medizinischen Fakultät

Ehrenwörtliche Erklärung:

Der Bewerber hat die Dissertation selbständig angefertigt und keine andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die Dissertation wurde keiner anderen Fakultät vorgelegt. Der Bewerber hat keine früheren akademischen Grade erworben, zu erwerben versucht, ihm wurde kein akademischer Grad entzogen. Es wurde kein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren gegen den Bewerber eingeleitet.

Referent: Prof. Dr. med. J.-C. Tonn (Neurochirurgische Klinik)

Koreferent: Prof. Dr. med. W. Roggendorf (Abteilung für Neuropathologie)

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Christian Schichor

Referent: Prof. Dr. med. J.-C. Tonn

Koreferent: Prof. Dr. med. W. Roggendorf

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.02

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern und meiner Frau gewidmet

EINLEITUNG	A
FRAGESTELLUNG	4
MATERIAL UND METHODEN	5
1. Invasionsmatrix	5
1.1. Präparation der Matrix	5
1.2. Anatomie des Schnittes	5
1.3. Haltbarkeit des Blockes	6
2. Zellen	6
3. Kammer	6
3.1. Filter	6
3.2. Kammer	7
3.3. Deckelschraube	7
4. Vorbereitung von Kammer, Filter und Hirnschnitt	8
4.1. Schnittdicke	8
4.2. Schnittfläche	8
4.3. Transport des Schnittes vom Kryotommesser in die Kammer	8
4.4. Inhalt des unteren Kammerschachtes	9
4.5. Temperatur von Kammer und Filter	9
4.6. Verschuß der Kammer mit der Deckelschraube	10
4.7. Inhalt des oberen Kammerschachtes	11
4.8. Kontrollen	11
4.9. Vincristin/ Taxol	12
4.10. Inkubation	12
4.11. Färbungen	12
4.12. Inhalt der unteren und der oberen Kammer	12
4.13. Untersuchung im Konfokalen Mikroskop	13
4.14. Untersuchung im Elektronenmikroskop	13

ERGEBNISSE	14
1. Versuchsdurchführung	14
1.1. Präparation der Matrix	14
1.2. Faserrichtung des Marklagerschnittes	15
1.3. Haltbarkeit des Präparates	15
1.4. Vorbereitung von Kammer, Filter und Hirnschnitt	16
1.5. Inhalt des unteren Kammerschachtes	17
2. Optimale Versuchsdurchführung	19
3. Versuchsergebnisse	22
3.1. Lichtmikroskopie	22
3.2. Konfokale Mikroskopie	37
4. Lichtmikroskopische Analyse von Semi-Dünnschnitten	45
5. Elektronenmikroskopische Analyse von Ultra-Dünnschnitten	47
6. Zusammenfassung	50
DISKUSSION	52
1. Klinik der Gliominvasion	52
1.1. Abhängigkeit der Invasion von der Umgebung	52
1.2. Veränderung der Umgebung der Tumorzelle durch Sekretion	54
2. Versuche zur Untersuchung der Invasion	55
2.1. Tierversuche	55
2.2. In vitro Versuche zur Invasivität	56
SCHLUßFOLGERUNG	71
LITERATURVERZEICHNIS	72

Einleitung

Maligne Gliome sind Tumoren des zentralen Nervensystems, die eine astrozytäre, oligodendrogliale oder ependymale Differenzierung aufweisen. Kernpleomorphie, Mitosen, vaskuläre Proliferation und Nekrosen sind histologische Kennzeichen ihrer Malignität. Gliomatöse Tumoren sind die häufigsten intrakraniellen Tumoren, deren Mehrzahl als maligne (WHO-Grad III-IV) eingestuft werden ¹. Die mittlere Überlebensrate sinkt mit zunehmender Malignität und beträgt 9-12 Monate für Glioblastom-Patienten (WHO-Grad IV), beziehungsweise 2 Jahre für Patienten mit anaplastischen Gliomen (WHO-Grad III). Trotz multimodaler Therapieansätze konnte die Lebenserwartung nicht wesentlich verbessert werden, was die Aggressivität dieser Erkrankung kennzeichnet ². Dabei ist die Letalität nicht durch eine systemische Metastasierung gegeben, die gliomatösen Tumoren unterscheiden sich hierin von anderen malignen Erkrankungen. Es fehlt ihnen die Eigenschaft zum Eindringen in Blutgefäße und zum Verlassen derer, um entfernte Organe zu befallen ³. Vielmehr führen die Tumoren durch lokales Wachstum zu intrakranieller Gewebekompression und zu einem Zusammenbruch der lokalen Zytoarchitektur und Histoanatomie.

Der Grund für das Versagen lokaler therapeutischer Strategien liegt jedoch in der ausgedehnten, diffusen Invasion des umgebenden Gehirngewebes. Einzelne Zellen wurden bis zu 7 cm entfernt vom Haupttumor im histologisch normal aussehenden Gehirn entdeckt. Diese Zellen sind nach einer lokalen Therapie (Operation) der Ausgangspunkt eines stets auftretenden erneuten Tumorwachstums, welches für die Lebenserwartung der Patienten den limitierenden Faktor darstellt.

Die diffuse Invasion des Gehirns stellt somit eines der Hauptprobleme in der Therapie maligner Gliome dar.

Das Verhalten humaner Gliomzellen ist neben der Invasion auch durch die Fähigkeit zur Proliferation und Migration gekennzeichnet. Diese Fähigkeiten sind Entitäten, die sich zwar gegenseitig beeinflussen, jedoch auch getrennt voneinander gesehen werden können. Diese Trennung wird aus der Beobachtung gefolgert, daß für jede der oben genannten Verhaltensweisen humaner Gliomzellen Chemotherapeutika, Interleukine,

Antikörper und andere Agenzien bekannt sind, die eine selektive Inhibition oder Förderung bewirken können^{4 5}.

Jede dieser Funktionen ist auch eine physiologische Fähigkeit gesunder embryonaler und adulter Zellen: zum Beispiel die Migration der Leukozyten durch die Gefäßwand oder die der Spermien im Zervikalschleim, die Proliferation von faserbildenden Zellen im Rahmen der proliferativen Entzündungsphase, die Invasion der Trophoblastzellen in die Uterusschleimhaut im Rahmen der Einnistung. Die Fehlregulation dieser Funktionen ist das Kennzeichen maligner Tumoren.

Die Invasion von Tumorzellen in die umgebende Matrix wird als dreistufiger Prozeß gesehen, der von der Adhäsion eingeleitet wird. In der Adhäsion nimmt die Zelle den ersten Kontakt zu einem extrazellulären Substrat auf. Anschließend sezerniert die Zelle Proteasen zur Proteolyse der Barriere, um einen frei zugänglichen Raum zu schaffen, in den die Zelle hineinwandern – migrieren – kann, bis sie erneut auf eine Barriere extrazellulärer Matrix stößt, hier adhäriert und der Prozeß von neuem beginnt⁵.

Der Invasionsprozeß ist definiert als das gerichtete, aktive Eindringen der Zelle in ein vorgegebenes Substrat – in vivo cerebrales Gewebe, - in vitro Substanzen, die entweder dessen Eigenschaften möglichst optimal imitieren sollen oder als selektives Substrat den Zellen unter einer bestimmten Fragestellung angeboten werden.

In vivo ist die Zellinvasion im humanen Gehirn abhängig von der Interaktion der Gliomzelle mit strukturellen Komponenten, wie myelinisierten Fasern, Blutgefäßen, extrazellulären Matrixproteinen, lokaler Mikroglia und Neuronen. Dieser Prozeß stellt das Ergebnis einer komplexen Reihe von Signalabfolgen, Rezeptor-Ligand-Interaktionen und Enzymreaktionen dar. Klinisch konnte nachgewiesen werden, daß die invadierenden Zellen zumeist den Bahnen der weißen Substanz, des Marklagers folgen. Läsionen, die nahe dem Balken entstehen, invadieren diesen bevorzugt in Faserverlaufsrichtung, ebenso im Bereich der Capsula interna und der Sehstrahlung (50).

Mit Hilfe von experimentellen Untersuchungen sollen Faktoren quantitativ und qualitativ bestimmt werden, die die Gliomzellinvasion beeinflussen und Therapeutika entwickelt werden, die antiinvasive Effekte haben. Die engste Verzahnung von Klinik und Labor liegt bei Sensitivitäts-Testreihen vor, die die individuelle Wirksamkeit von

Medikamenten gegen den Tumor des einzelnen Patienten vorhersagen sollen⁶. Es wurden zahlreiche in vitro Versuchsaufbauten entwickelt, die die Invasion in vivo möglichst gut imitieren sollten. Die Zellen wurden zum Beispiel mit Proteinbeschichteten Membranen oder fetalen Gehirnzellverbänden konfrontiert. Dies beschränkt die Ergebnisse auf das Verhalten der Zellen in dem gewählten Protein oder auf die Interaktion mit fetalen Zellen, die bei Gliomen adulter Patienten keine Rolle spielen und ihrerseits auch selbst die Fähigkeit zur Migration und Invasion besitzen. Andere anerkannte Modelle zur Untersuchung der Invasion sind Tierversuche, die die Untersuchung des Zellverhaltens in vivo erlauben, insbesondere der Interaktion Tumor-Wirt wie neoangiogenetische Vorgänge oder Reaktionen der Mikroglia und letztlich der Verstoffwechslung und Wirksamkeit gegebener Chemotherapeutika. Trotz dieser enormen Vorteile bergen sie den systematischen Fehler, daß sich die gefundenen Aussagen immer auf die Reaktion des tierischen Organismus beschränken müssen. Es läßt sich nie ausschließen, daß Ergebnisse aus Tierversuchen auf Grund einer anderen Gehirnanatomie, Histomorphologie und Immunreaktion von humanen Gegebenheiten abweichen könnten. Tierversuche können zudem meist nur qualitative oder semiquantitative Ergebnisse liefern.

Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, einen neuen in vitro Versuchsaufbau zu entwickeln, der

- eine Untersuchung der Interaktion humaner Gliomzellen mit einer Matrix erlaubt, deren Zusammensetzung mit der der weißen Substanz in vivo vergleichbar ist und die somit ein „naturidentisches Korrelat“ darstellt
- ein Proteingemisch einsetzt, das dem adulten Gewebe nahekommt und nicht fetaler Herkunft ist
- einen Zusatz von fixierenden Fremdmaterialien weitgehend vermeidet
- die dreidimensionale Zusammensetzung des zu invadierenden Gewebes so weit wie möglich erhält
- bei einer Variation des vorgegebenen Substrates (der räumlichen Orientierung seiner Komponenten) zu einer vergleichbaren Morphologie wie in vivo führt
- den Zusatz von Substanzen (zum Beispiel Chemotherapeutika) erlaubt, die eine validierbare Reaktion der Tumorzellen in Abhängigkeit von der Konzentration der Substanz hervorruft.

Material und Methoden

1. Invasionsmatrix

1.1. Präparation der Matrix

Als Matrix wurde Gehirngewebe vom Schwein verwendet. Dazu wurde dieses unmittelbar nach Tötung des Schweines im Schlachthof sofort gekühlt (Eisbeutel) transportiert und unmittelbar präpariert. Bei der Darstellung der Anatomie des Schweinehirns wurde darauf geachtet, möglichst gut erhaltenes frontales Marklager in großen Blöcken zu gewinnen (0,5-1 x 1-2 cm). Es sollte kein anderes Gewebe (graue Substanz, Arachnoidea, große Gefäße) anheften. Anschließend wurden die Blöcke in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70°C asserviert. Der gesamte Prozeß dauerte von der Tötung des Schweines bis zum Einfrieren bei -70°C maximal 1,5 - 2 Stunden. Für die Versuche wurden die Blöcke auf Trockeneis transportiert, im Kryotom bei -20°C zum Schneiden und während der Vorbereitung der Versuchsansätze gehalten und unmittelbar nach Versuchsende wieder bei -70°C verwahrt.

1.2. Anatomie des Schnittes

Die Kontrolle der in den Versuchen ausgewählten Schnittanatomie (Marklager) und der Ausschluß ungewollter anderer Strukturen als weißer Substanz erfolgte mittels H.-E.-Färbung.

Die Verlaufsrichtung der Fasern im Schnitt wurde anhand einer H.-E.-Färbung des noch unbehandelten Materials bestimmt und mit den Versuchsergebnissen korreliert.

Zur Etablierung einer schnellen Färbung als Kontrolle vor der eigentlichen Versuchsdurchführung wurden Schnitte unterschiedlicher Verlaufsrichtung mit Hämalaun gefärbt.

Zum Vergleich des Invasionsverhaltens in unterschiedlichen Matrices wurde graue Substanz des Kortex verwendet.

1.3. Haltbarkeit des Blockes

Die Haltbarkeit der Blöckchen (bei stets erhaltener Kühlkette) wurde anhand der Morphologie von zwei 10µm dicken Schnitten eines Blockes nach 8 Versuchsreihen und eines frisch verwendeten Blockes kontrolliert (H.-E.-Färbung).

2. Zellen

Die Versuche wurden einerseits mit einer Glioblastom-Zelllinie, U373, durchgeführt. Diese Zelllinie wurde 1981 etabliert, ihr invasives Potential in anderen Modellen wurde ausführlich untersucht. Der Zelldurchmesser wird mit $21,6 \pm 7,8 \mu\text{m}$ angegeben⁷.

Andererseits wurden U87 GFP Zellen untersucht, ebenfalls eine Gliom-Zelllinie, die jedoch mit einem grün fluoreszierenden Protein – GFP (green fluorescent protein) – transfiziert sind, um sie im Konfokalen Mikroskop darstellen zu können.

Monolayer-Kulturen beider Zelllinien wurden in 75 cm² Kulturflaschen (Nunc) unter Standardbedingungen in einem Brutschrank gehalten (5% CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit). Als Kulturmedium wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) eingesetzt mit einem Zusatz von 10% Kälberserum, 4-fache Konzentration an nicht-essentiellen Aminosäuren, 4mM L-Glutamin, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Bei den GFP-transfizierten Zellen wurden außerdem noch 1,2mg/ml Geneticin (G418) zugesetzt.

3. Kammer

3.1. Filter

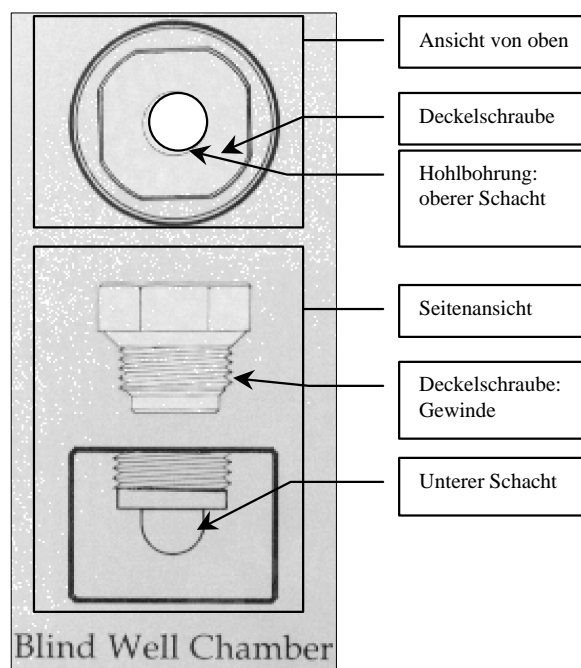
Die verwendeten Filter (Corning Separations Division™, Nucleopore®, Polycarbonate) haben einen Durchmesser von 13mm, eine Dicke von 0,5mm und regelmäßig verteilte Poren der Größe 8µm. Sie besitzen zwei leicht zu unterscheidende Seiten: eine glänzende und eine matte. Die Zellen befinden sich im vorliegenden Modell auf der glänzenden Seite, welche nach oben gerichtet in der Kammer zu liegen kommt (entsprechend den Herstellerangaben für die Durchführung von Boyden Kammer Versuchen).

3.2. Kammer

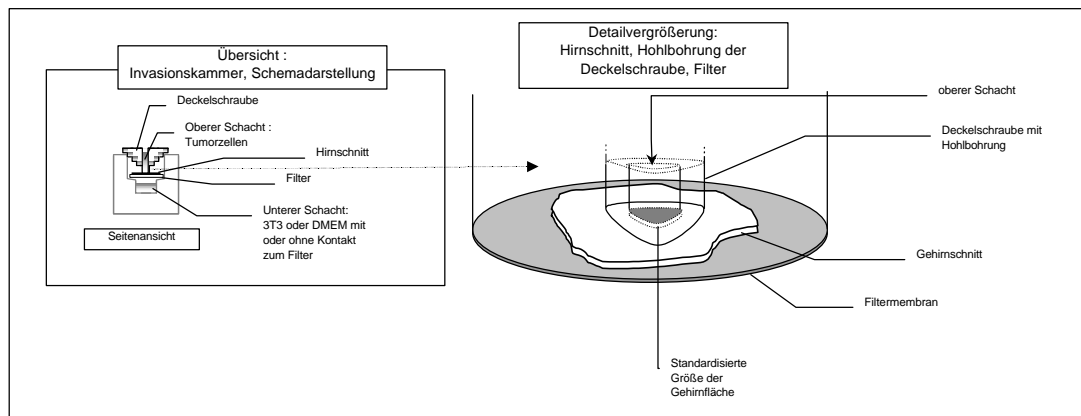
Die Costar™-Kammer (Neuro Probe®) besteht aus Acryl und besitzt zwei durch die oben genannte Membran von einander getrennte Schächte. Der obere hat ein Gewinde, in das die Deckelschraube eingedreht wird, der untere mißt 200µl Volumen.

3.3. Deckelschraube

Die Deckelschraube der Costar™-Kammer besteht aus weißem Acetat und besitzt eine



innere Hohlbohrung mit einem Volumen von ebenfalls 200µl. Ihr unteres Ende, das die Oberfläche des Filters zu den Seiten des oberen Schachtes hin dicht abschließt hat einen flachen, kreisförmigen Durchmesser, der eine exponierte Fläche des Filters von 18mm² freiläßt.



4. Vorbereitung von Kammer, Filter und Hirnschnitt

4.1. Schnittdicke

Der Marklagerschnitt wurde in 10, 20, 30 und 40 μm Dicke eingesetzt, um die optimale Schnittdicke zur Invasion zu ermitteln.

Die H.-E.- Färbung zur Bestimmung der Morphologie wurden alle an 10 μm dicken Schnitten durchgeführt.

4.2. Schnittfläche

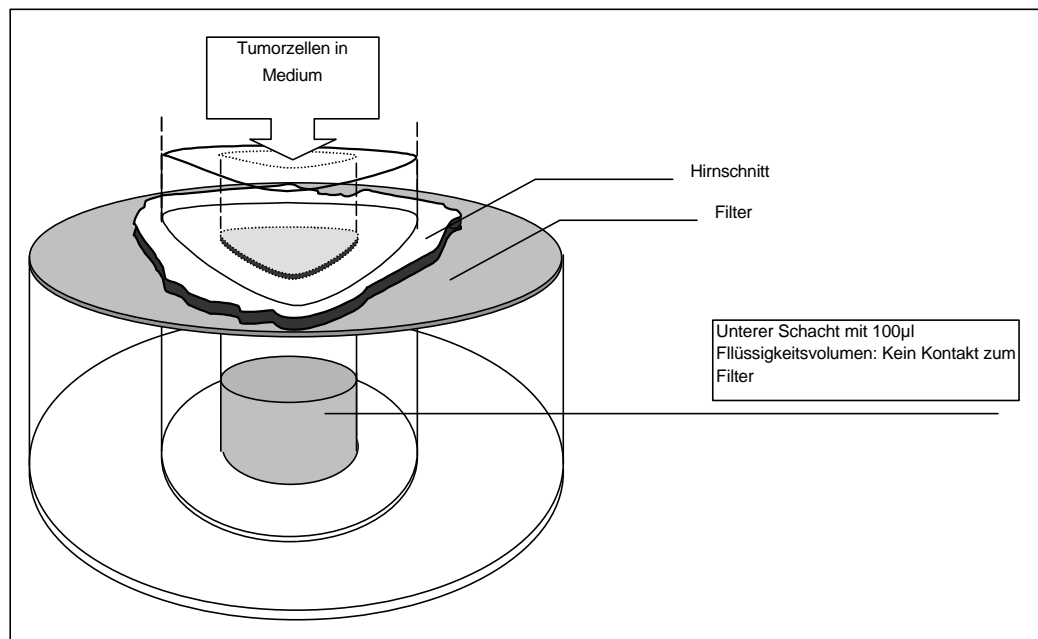
Mit Ausnahme der Versuche, bei denen bewußt nur eine Hälfte der Membran bedeckt werden sollte, wurde darauf geachtet, daß das Gewebe die Membran so weit bedeckt, daß der Unterrand der Deckelschraube an allen Seiten mit dem Hirnschnitt Kontakt hat.

4.3. Transport des Schnittes vom Kryotommeser in die Kammer

Nach erfolgtem Schneiden sollte das Gewebe möglichst schonend vom Kryotommeser in die Kammer transportiert werden. Hierzu wurden a) vorgekühlte Pinzetten (-20° C im Kryostaten), b) vorgekühlte Pinzetten mit Armierung (feine Plastikummantelung der Pinzettenspitzen) und c) vorgekühlte Pinzetten mit unterstützendem Abstreifen des Schnittes in korrekter Position mit Hilfe eines feinen Pinsels getestet.

4.4. Inhalt des unteren Kammerschachtes

Das Flüssigkeitsvolumen des unteren Kammerschachtes wurde variiert, um den Hirnschnitt möglichst gut zu erhalten. Dazu wurden in die untere Kammer 100 bzw. 200µl Medium gegeben, wobei 200µl einen Kontakt mit dem Filter ermöglichten, 100µl nicht. Nach 6 Stunden und am Folgetag wurde kontrolliert, ob der Flüssigkeitsspiegel der Kammern mit 100µl Volumen ungewollt durch ein undichtes Abschließen der Deckelschraube angestiegen ist und Kontakt mit der Membran bekommen hat. Wenn dies der Fall war, wurden diese Versuche ausgeschlossen.



Um zu ermitteln, ob das beobachtete Zellverhalten vorwiegend auf Eigenschaften des Hirnschnittes beruht oder lediglich von der „Anziehung“ des Inhaltes des unteren wells abhängt, wurde als sogenanntes „Chemoattractant“ 3T3-konditioniertes Medium bzw. als Kontrolle das in dieser Beziehung neutrale DMEM (5%) verwendet.

4.5. Temperatur von Kammer und Filter

Um den Erhalt des Hirnschnittes zu optimieren wurde die Temperatur von Kammer und Filtermembran einerseits und die des enthaltenen Mediums andererseits variiert. Dazu

wurde das immer bei -20°C geschnittene Material auf die Membran in der Kammer gelegt, wobei

- die Kammer Zimmertemperatur hatte
- die Kammer im Kryostaten bei -20° so abgekühlt wurde, daß die Kontaktfläche zum Schnitt auch gefroren war, der Inhalt des unteren Schachtes aber noch nicht oder
- beide, die Kammer und die darin enthaltene Flüssigkeit die gleiche Temperatur wie der Schnitt (-20°C) hatten.

4.6. Verschuß der Kammer mit der Deckelschraube

Das Verschließen der Kammer wurde variiert, um den Gewebeschnitt möglichst gut zu erhalten. Dabei sollte so wenig mechanischer „Streß“ auf den zarten Gewebsschnitt wie möglich ausgeübt werden, um ihn beim Verschließen nicht zu zerstören, jedoch ausreichend, um ihn ohne Zusatz von chemischen Überschichtungen, allein durch den mechanischen Druck, zu fixieren.

Nach Aufbringen des Gewebeschnittes wurde

- der Deckel im Kryostaten gekühlt (-20°C) und die Kammer bei -20°C verschlossen.
- die Kammer im gekühlten Zustand (-20°C) mit dem Zimmertemperatur warmen Deckel unmittelbar verschlossen
- die gekühlte Kammer aus dem Kryostaten heraus in Zimmertemperatur gebracht und kurz (wenige Minuten) gewartet, bis sich der schmelzende Gewebeschnitt eng an die Filtermembran angelegt hatte und dann erst mit dem Zimmertemperatur warmen Deckel verschlossen.

Um die Notwendigkeit des Deckels zu prüfen wurde dieser im Rahmen einer Kontrolle weggelassen und die Zellen direkt auf den Hirnschnitt auf dem Filter aufgebracht.

Eine Versuchsreihe wurde gebildet, um festzustellen, ob bei lockerem Verschuß des Deckels (ohne Kontakt zum Hirn) ein Abdichten der Ränder mit Agar Vorteile bringt. Dazu wurden die Kammerdeckel in den Flüssigkeitsspiegel des noch heißen Agars so gestellt, daß die unteren 3 mm der Deckel eintauchten. Nach der Aushärtung des Agars wurden die unteren Ränder der Deckel mit einem Skalpell aus dem Agar ausgeschnitten, so daß ein Agar- Ring haften blieb. Die Innenfläche der Hohlbohrung wurde mit einem Wattestäbchen gesäubert und der Deckel locker verschlossen. So sollte ein mechanisches Abdichten des Deckels erreicht werden.

Um das Anheften des Schnittes an den Filter beim Schmelzen zu optimieren wurde ein Versuchsarm gebildet, bei dem unmittelbar nach dem Verschließen 100µl Medium in den oberen Schacht eingebracht wurden und erst in einem zweiten Schritt die Zellen. So sollte vermieden werden, daß die Zellen unmittelbar mit –20°C kalten Oberflächen in Berührung kommen.

4.7. Inhalt des oberen Kammerschachtes

Je nach Fragestellung wurden 10000-40000 Zellen in 200µl Medium in der oberen Kammer eingesetzt.

4.8. Kontrollen

Als Kontrollen wurden Versuchsansätze gebildet, die zwar einen Filter enthielten, jedoch keinen Hirnschnitt. So sollte untersucht werden, ob das beobachtete Zellverhalten eine Auseinandersetzung mit der Filtermembran darstellt, die unabhängig von dem eingebrachten Gewebe ist.

Weiterhin wurde eine Versuchsreihe mitgeführt, bei der zwar ein Hirnschnitt eingebracht, jedoch keine Zellen zugegeben wurden, um auszuschließen, daß die später gefärbten Zellen Teil des Schnittes sind und als Tumorzellen fehlinterpretiert werden.

Die Verlaufsrichtung der Fasern im Gewebeschnitt wurde kontrolliert (H.-E.-Färbung) und das Invasionsverhalten der Zellen in Abhängigkeit von dieser erfasst.

Das Invasionsverhalten der Zellen in grauer Substanz bei ansonsten identischen Versuchsbedingungen wurde ermittelt.

Bei einer weiteren Versuchsreihe wurde der Filter vor seinem Einsatz in der Kammer nicht mit Hirn sondern mit Poly-L-Lysin bedeckt, um zu kontrollieren, ob der neu entwickelte Versuchsansatz die Invasion in einer bereits etablierten Matrix zuläßt und sich das Verhalten der Zellen in einer homogenen Proteinmatrix von der Invasion des komplexeren Hirnschnittes unterscheidet.

4.9. Vincristin/ Taxol

Vincristin und Taxol zerstören das Zytoskelett von humanen Gliomzellen in vitro. Bei zerstörtem Zytoskelett sollte eine aktive Invasion nicht mehr möglich sein, da keine Migration mehr erfolgt, die behandelten Zellen bleiben jedoch vital. In zwei Versuchsreihen wurde die Zellen mit Vincristin beziehungsweise Taxol in ansteigender Konzentration behandelt, um die dosisabhängige Beeinflussung der Invasion zu ermitteln.

4.10. Inkubation

Die Kammern wurden bei 37°C inkubiert und nach 24 Stunden gefärbt. Lediglich die Zeitreihenversuche wurden nach 12, 36, 48 Stunden ausgewertet.

4.11. Färbungen

Nach dem Öffnen der Deckelschraube wurden die Filter zusammen mit den darauf liegenden Schnitten vorsichtig mit Pinzetten aus der Kammer gehoben und nach Papanicolaou gefärbt. Dabei ist der sorgsame Umgang mit dem Filter, auf dem der Gewebeschnitt nicht festklebt, sondern nur durch Adhäsion gehalten wird essentiell. Insbesondere der Wechsel zwischen den Färbebädern kann zu Scherkräften führen, die eine Ablösung begünstigen. Als ein mögliches Hilfsmittel wurde deshalb eine Pinzette verwendet, deren Enden die Form zweier flacher Rechtecke haben und mit der der Filter nicht gepackt, sondern aus den Bädern „herausgelöffelt“ wurde. Anschließend erfolgte das Aufbringen auf einen Objektträger und Abdecken dessen mit Aquatex™ und Abdeckglas.

4.12. Inhalt der unteren und der oberen Kammer

Zum Ausschluß beziehungsweise Nachweis von Zellen im Inhalt des unteren Kammerschachtes wurde dessen Inhalt abpipettiert und unter dem Licht- beziehungsweise Konfokalen Mikroskop (U87 GFP) analysiert.

Zur Bestimmung der nicht invadierten Zellen der oberen Kammer wurde deren Inhalt vor Entfernung der Deckelschraube abpipettiert und die Zellen, getrennt nach noch

lebenden und toten Zellen gezählt.

4.13. Untersuchung im Konfokalen Mikroskop

Die Versuche wurden unter Einsatz eines Confokal Laser scanning Mikroskope (Leica TCS NT, Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg) durchgeführt. Die optischen Schnitte wurden mit Hilfe der Leica software (Version 1.6.587) berechnet. In der Regel wurden 32 optische Schnitte je Präparat erstellt mit einer Auflösung von 512x512 pro Kanal. Zur Optimierung der Bildauflösung wurden bis zu 16 Bilder im langsamen Scan Modus gemittelt. Jeder Hirnschnitt wurde in 4 verschiedenen Arealen untersucht. Die Extinktion bei 488nm (Ar-Kr Laser mit Band Pass Filter) (FITC) beziehungsweise bei 568nm(Ar-Kr-Laser mit Long Pass Filter). Die Pinhole Einstellung wurde möglichst klein gehalten, um eine optimale konfokale Analyse zu ermöglichen.

4.14. Untersuchung im Elektronenmikroskop

Die invadierten Hirnschnitte, anheftend am Filter wurden in 4% depolymerisiertem Paraformaldehyd und 2% Glutaraldehyd 6 Stunden bei Zimmertemperatur fixiert und anschließend in 2% OsO₄ 2 Stunden osmifiziert. In ansteigenden Konzentrationen an Aceton erfolgte die Dehydrierung und schließlich das Einbetten in Spurr`s Medium. Semidünnschnitte wurden unter einem Zeiss Axiaphot Mikroskop analysiert, die Ultradünnschnitte in einem Zeiss 10B Elektronenmikroskop.

Ergebnisse

1. Versuchsdurchführung

1.1. Präparation der Matrix

Die schnelle Präparation des Gewebeblöckchens aus Schweinehirn (innerhalb von 1-2 Stunden) nach der Tötung des Tieres im Schlachthof zielte darauf ab, dessen empfindliche Proteinstruktur zu erhalten.

Der strukturelle Erhalt der weißen Substanz wurde mikroskopisch (10µm Schnitte, H.-E.-Färbung) als Marklager ohne Beimengung von Arachnoidea oder grauer Substanz bestätigt (Abb. 1),.

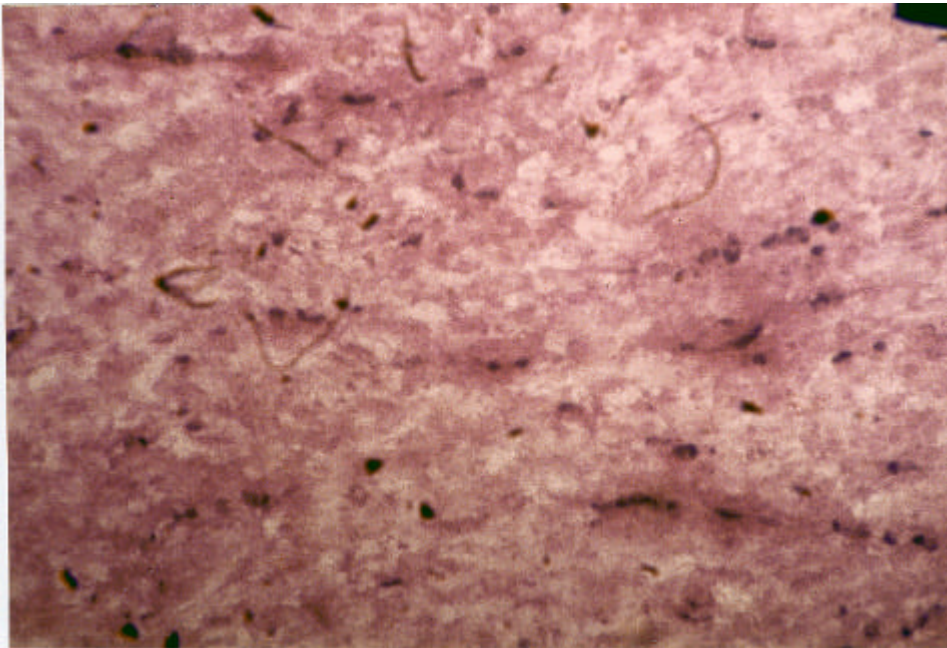


Abbildung 1: H.-E.-Färbung eines typischen Marklagerschnittes. Deutlich erkennbar sind die gebündelten Faserverbände, dazwischen einzelne Gefäße. Es finden sich keine Anteile von grauer Substanz oder Arachnoidea . Vergrößerung: 10x

1.2. Faserrichtung des Marklagerschnittes

Die unten geschilderten Versuche wurden bei konstanter Schnittrichtung zum Faserverlauf am Gewebeblock durchgeführt.

Wie noch gezeigt werden wird, beeinflusst eine Änderung der Myelinfaserausrichtung im Hirnschnitt bei ansonsten gleichen Bedingungen die Invasionsrate. Diese Versuche waren die einzigen, bei denen bewusst mit variabler Schnittrichtung gearbeitet wurde. Eine Kontrolle der Faserrichtung des unbehandelten Schnittes ist zur Interpretation der Ergebnisse bei jeder neuen Versuchsreihe erforderlich. Auf deren Durchführung wird weiter unten noch eingegangen.

1.3. Haltbarkeit des Präparates

Es stellte sich jedoch heraus, daß nach 8 Versuchen zunehmend die Struktur der Fasern aufweichte, ein schwächeres Färbeverhalten zeigte und schlechter differenzierbare Fasern und Zellen zeigte. Dabei wurden keine Gefrierartefakte nachgewiesen, die für eine fehlerhafte Kühlkette gesprochen hätten. Vielmehr muß davon ausgegangen werden, daß ein zu häufiges Verwenden des empfindlichen Gewebes mit unvermeidbaren Temperaturwechseln zwischen -70 (Gefrierschrank) und -20°C (Kryotom) pro Versuchsreihe zu einer Degeneration der Fasern führen kann. Ein Gewebeblock wurde daher in der Folge nicht öfter als fünf mal (fünf Versuchsreihen) verwendet.

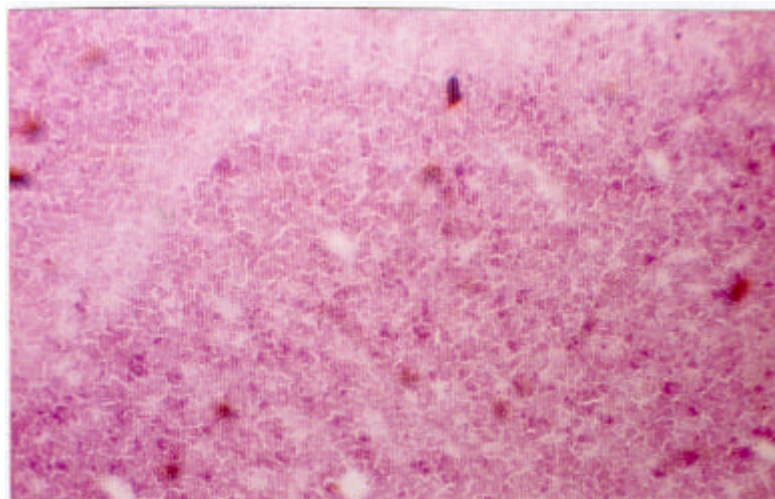


Abbildung 2: Schwächer werdendes Färbeverhalten eines mehrfach verwendeten Hirnschnittes. Kein Hinweis auf Gefrierartefakte. H.-E.-Färbung. Vergrößerung: 10x

1.4. Vorbereitung von Kammer, Filter und Hirnschnitt

Im Folgenden wird auf vorbereitende Arbeiten eingegangen, die für den Erhalt des Hirnschnittes unverzichtbar sind. Die Erprobung dieser Vorarbeiten war wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit, da der infiltrierte Hirnschnitt nur durch mechanische Kräfte ohne chemische Fixierung erhalten werden sollte. Auf die Ergebnisse der Infiltrationsversuche wird im vierten Teil (Ergebnisse) näher eingegangen.

1.4.1. Schnittdicke

Die optimale Schnittdicke lag bei 20 bis 40 μm . 10 μm waren zu zart, um vom Messer des Kryostaten zur Kammer transportiert werden zu können und eigneten sich nur zur H.-E.-Färbung. Bei höheren Schnittdicken (30 μm , 40 μm) war ein homogeneres Abdecken des Filters möglich. Auf das Infiltrationsverhalten bei unterschiedlichen Schnittdicken wird weiter unten noch eingegangen.

Die H.E.-Färbungen zur Bestimmung der Myelinfaser - Richtung wurden an 10 μm dicken Schnitten durchgeführt, die Hämalaun-Färbungen an 20 μm dicken Schnitten, um nach der abschließenden Bestimmung der Schnittrichtung keine Verstellung am Messer des Kryostaten mehr durchführen zu müssen.

1.4.2. Größe der Schnittfläche

Bei der makroskopischen Präparation des Marklagers wurde darauf geachtet, eine Schnittfläche entsteht, die so groß ist, daß sie die Deckelunterseite lückenlos abdecken kann.

Da man makroskopisch den Faserverlauf im Gewebeblock nicht bestimmen kann, wurde dieser so präpariert, daß mehrere Schnittflächen ausreichender Größe (18mm²) zur Verfügung stehen.

1.4.3. Transport des Schnittes vom Kryotommesser in die Kammer

Der Transport stellte eine große physikalische Beanspruchung des nur wenige μm dicken Schnittes dar. Es kam wiederholt zu Rissen, Auffaserungen und zu einem Aufrollen des Schnittes. Auch war eine exakte Platzierung in der Mitte des Filters durch adhäsive Kräfte oftmals erschwert.

Die Handhabung gestaltete sich am sichersten, wenn der Schnitt mit einer spitzen, nicht armierten, sorgfältig vorgekühlten Pinzette vom Kryotommesser genommen wird. Da der Schnitt an den Branchen der Pinzette stark anhaftet war es am zuverlässigsten, ihn auf die Filterfläche zu halten und mit einem feinen, ebenfalls gekühlten Pinsel abzustreifen.

1.5. Inhalt des unteren Kammerschachtes

1.5.1. Volumen

Bei einem eingesetzten Volumen von 200µl (entsprechend den Herstellerangaben (Costar™) für die Durchführung des Boyden-Kammer-Versuches mit Matrigel) kam es zu einem innigen Kontakt von Filter beziehungsweise Hirnschnitt und Flüssigkeitsspiegel des unteren Schachtes. Hier konnte der Erhalt des Gehirnschnittes jedoch nicht gewährleistet werden.

Nur bei einem reduzierten Flüssigkeitsvolumen (100µl Medium) im unteren Schacht konnte der Hirnschnitt erhalten werden.

1.5.2. Substanz

Bei den typischen Boyden Kammer – Versuchen wird in die untere Kammer eine Substanz – ein sogenanntes Chemoattractant - eingesetzt, die auf die wandernden Zellen einen Anziehungsreiz ausübt und so die Invasion fördert. Um zu unterscheiden, ob die Zellen in den Hirnschnitt einwandern, weil dieser schon selbst genügend Anreiz zur Invasion darstellt oder ob die Zellen ein Chemoattractant benötigen, wurde der Inhalt der unteren Kammer variiert. Dabei fand sich kein Unterschied zwischen einem Chemoattractant und dem Medium, das auch in der oberen Kammer enthalten ist und nicht als Chemoattractant fungieren kann.

Der Hirnschnitt wird unabhängig von der Art des Inhaltes der unteren Kammer invadiert.

1.5.3. Reduzierter Inhalt der unteren Kammer

Bei reduziertem Flüssigkeitsvolumen der unteren Kammer konnte der Hirnschnitt erhalten werden. Es entsteht eine Grenze Flüssigkeit-Luft (oberer – unterer Schacht der Kammer), in der der Hirnschnitt zu liegen kommt. Die Flüssigkeits-Luft-Grenzschicht ist für die Erhaltung des Hirnschnittes essentiell (siehe unten). Dennoch war ein gewisses Flüssigkeitsvolumen (100µl) in der unteren Kammer notwendig – durch Verdunstung entsteht ein günstiges Milieu für den Erhalt des Schnittes.

1.5.4. Temperatur von Kammer, Filter und Hirnschnitt

Die Handhabung der Temperatur von Kammer und Hirnschnitt spielte eine entscheidende Rolle für die Platzierung des Hirnschnittes, da dieser in gefrorenem Zustand rigide und zerreißbar ist, bei geringen Temperaturschwankungen jedoch schnell schmilzt. Weiterhin konnte durch die Handhabung von Kammer-, Deckelschrauben- und Schnitt-Temperatur der Erhalt des Gehirnschnittes über die Invasionszeit von 24 bis 48 Stunden ohne chemische Fixierung auf dem Filter überhaupt erst gewährleistet werden. Das genaue Vorgehen ist unter „2. Optimale Versuchsdurchführung“ zusammengefasst.

Dabei ist die unterschiedliche Temperatur von Kammer und Deckel ein ganz entscheidender Schritt, der folgende Vorteile bietet:

- Haben Kammer- und Deckelgewinde identische Temperaturen kann der Deckel zu fest geschlossen werden und den Schnitt durch die mechanische Krafteinwirkung zerreißen. Die gefrorene Kammer dehnt sich jedoch erst allmählich bei Zimmertemperatur aus und läßt im gefrorenen Zustand nicht zu, daß der warme Deckel ganz zuzuschrauben ist. Vielmehr übt er einen sanften Druck auf den Schnitt aus, der gerade hoch genug ist, um den Schnitt auf dem Filter festzuhalten, ohne jedoch so stark zu sein, daß er den Schnitt zerstören würde.
- Der (geringe) Druck, mit dem der Deckel zugeschraubt wird, ist innerhalb einer Versuchsreihe konstant und weniger vom Gefühl des Durchführenden abhängig.
- Nur auf eine gefrorene Unterlage (die Filtermembran) läßt sich der Schnitt problemlos aufbringen und exakt plazieren.
- Nach dem Verschließen des Deckels (wie unter „2. Optimale Versuchsdurchführung“ beschrieben) wird warmes (37°C) Medium eingebracht (100µl), um sicherzustellen, daß die Zellen nicht durch einen starken Temperaturunterschied geschädigt werden.

2. Optimale Versuchsdurchführung

Die Variationen der Versuchsdurchführung wurden bei „Material und Methoden“ aufgeführt, als optimal stellte sich folgender Ablauf heraus:

1. Präparation des Invasionssubstrates

- *Unverzüglich* nach Schlachtung des Tieres (Schwein) sollte die zu invadierende Region präpariert werden.
- Eine Beteiligung *mehrer* Regionen (graue Substanz, weiße Substanz, große Gefäße) ist -wenn nicht ausdrücklich gewünscht- zu vermeiden.
- Die Größe des Blockes ist so zu wählen, daß *jede* Seite groß genug ist, den Filter so zu bedecken, daß die Öffnung der Deckelschraube komplett bedeckt ist. Dies gewährleistet, daß die Schnittebene beliebig variiert werden kann, um eine andere Faserverlaufsrichtung zu treffen und trotzdem einen genügend großen Schnitt zu erhalten.
- Der Block wird im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei - 70°C gehalten.
- Auch bei stets erhaltener Kühlkette (zwischen Tiefkühltruhe und Kryostaten) sollte nach *maximal 5* Versuchsreihen ein neuer Block verwendet werden.

2. Vorbereitung der Invasionskammer

- In die untere Kammer werden *100µl* Medium pipettiert. Der *Flüssigkeits-Luft-Spiegel* darf weder zu Beginn noch am Versuchsende (durch unerwarteten Flüssigkeitsübertritt aus der oberen Kammer) den Filter erreichen. Geschieht dies doch, so sind diese Versuche nicht auszuwerten.
- Anschließend wird ein Filter mit Porengröße 8µm in die Kammer eingelegt.
- Die so vorbereitete Kammer wird zum *Vorkühlen* in das Kryotom (-20°C) gegeben, wo später auch das Präparat geschnitten wird und *erst* wieder weiterverwendet, wenn der Inhalt der unteren Kammer *gefroren* ist.
- Die Deckelschraube behält *Zimmertemperatur*, sie darf nicht mitgekühlt werden.

3. Einbringen von Invasionssubstrat und Zellen

- Zunächst wird im Kryotom (-20°C) ein 10µm –Schnitt angefertigt.
- Dieser Anfangsschnitt dient der *Bestimmung des Faserverlaufes* im Gewebe und wird unmittelbar gefärbt (Hämatoxilin-Eosin oder Hämalaun). Diese Bestimmung des Faserverlaufs ist auch am letzten Schnitt einer Versuchsreihe notwendig, um zu sicherzustellen, daß keine, innerhalb des Präparates kreuzenden Fasern die Versuchsergebnisse einer Versuchsreihe beeinflussen.
- Die weiteren Schnitte werden bei 20 - 40µm durchgeführt.
- Der Gehirnschnitt wird mit Hilfe einer nicht armierten Pinzette oder nur mit Hilfe eines Pinsels auf den Filter in der vorgekühlten Invasionskammer gehoben.
- Die Kammer wird aus dem Kryotom in *Zimmertemperatur* gebracht und *gewartet*, bis der Hirnschnitt beim langsamen Auftauen sich dem Filter eng *anlegt*, die gesamte Kammer aber noch nicht Zimmertemperatur erreicht hat .
- Die warme Deckelschraube wird nun vorsichtig und *sanft zuge dreht*, ohne ein kraftvolles Schließen zu erzwingen.
- Der oberen Kammer werden 100µl *Medium (noch ohne Zellen)* zugefügt, um die später zugefügten Zellen keinen allzu hohen Temperaturschwankungen auszusetzen.
- In weiteren 100µl Medium werden schließlich (je nach Fragestellung 10.000 – 40.000) Zellen zugefügt.
- Die Kammer wird bei 37°C für 24 – 48 Stunden inkubiert.

4. Färbung des Hirnschnittes

Die Färbung erfolgt nach Papanicolaou (wie auch sonst die herkömmlichen Boyden Kammer Versuche bei Verwendung der Costar™-Kammer). Wichtig ist es, den Filter mit dem darauf nur aufliegenden Hirnschnitt vorsichtig von Färbeschale zu Färbeschale zu heben, da dieser sonst „abgewaschen“ werden könnte. Hierzu eignet sich eine Pinzette mit Löffelartigen Branchen, mit denen der Filter nicht gegriffen, sondern gehoben wird. Alternativ kann auch der Filter in einem Bad belassen werden und die einzelnen Färbelösungen werden hinzu- und wieder abpipettiert.

5. Fixierung des Hirnschnittes

Der gefärbte Hirnschnitt wird zusammen mit dem Filter umgedreht auf einen Objektträger gelegt und mit Aquatex™ unter einem Deckglas eingedeckt.

6. Untersuchung am Konfokalen Mikroskop

Der unbehandelte Hirnschnitt wird kurz in PBS gewaschen, um unvollständig adhätierende Zellen abzulösen und ohne weitere Vorbereitung auf einem Objektträger sofort analysiert.

3. Versuchsergebnisse

3.1. Lichtmikroskopie

1. Unvollständig gefüllte untere Kammer – erste Versuche

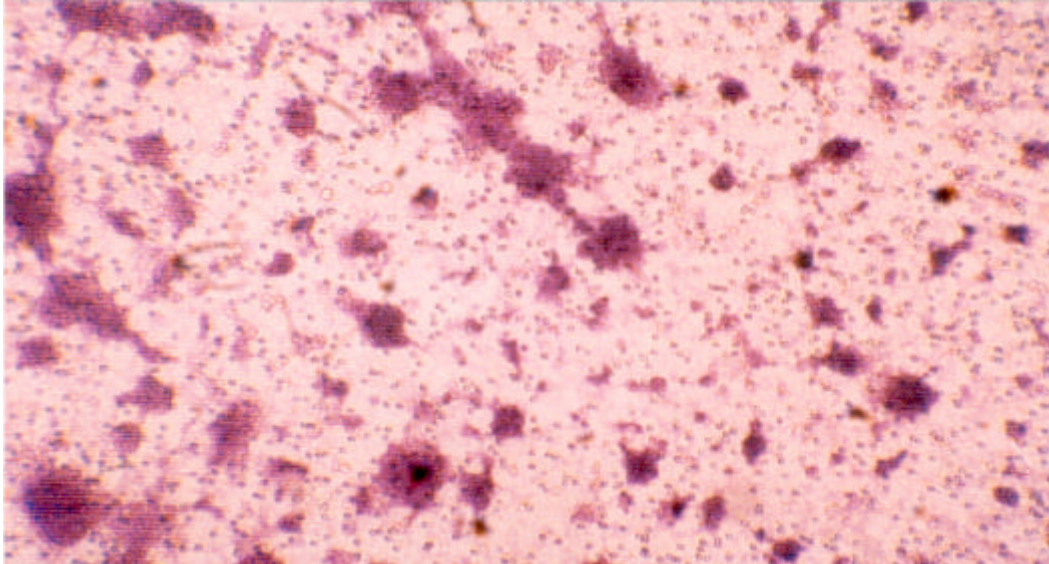


Abbildung 3: Bei unvollständig gefüllter unterer Kammer aber schlechter Temperaturangleichung invadieren die Zellen in Zellverbänden, weniger als einzelne Zellen. Die Zellen bilden untereinander Zell-Zellkontakte aus und Zellanhäufungen, die über Brücken miteinander verbunden sind. Vergrößerung: 4x

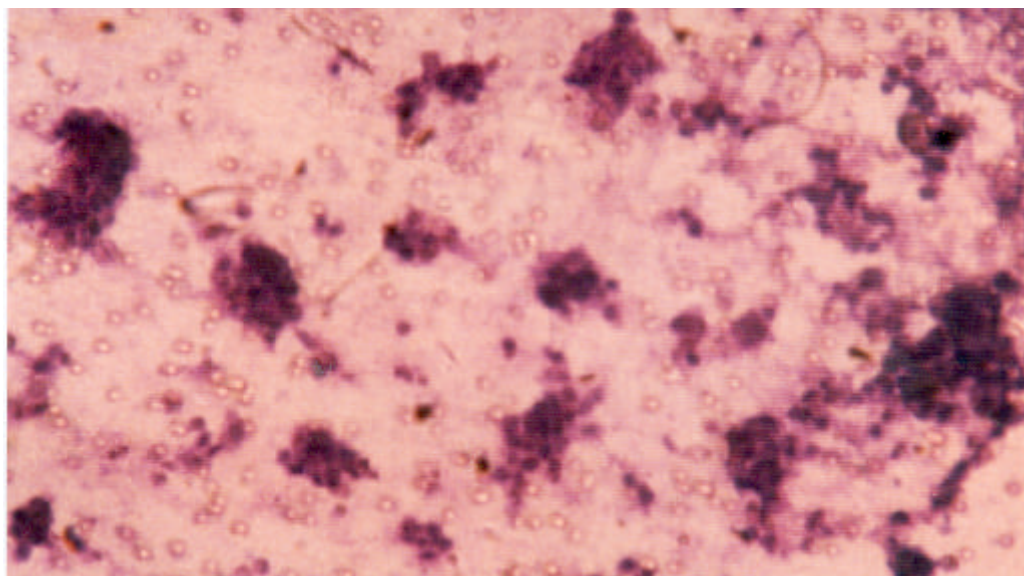


Abbildung 4: Die oben gezeigten Zellanhäufungen sind streng auf den Hirnschnitt begrenzt. Man kann lichtmikroskopisch die Grenze des Hirnschnittes sehen und das auf diesen begrenzte Anhäufen von Zellen in Konglomeraten. Vergrößerung: 10x

2. Variation der Zellen

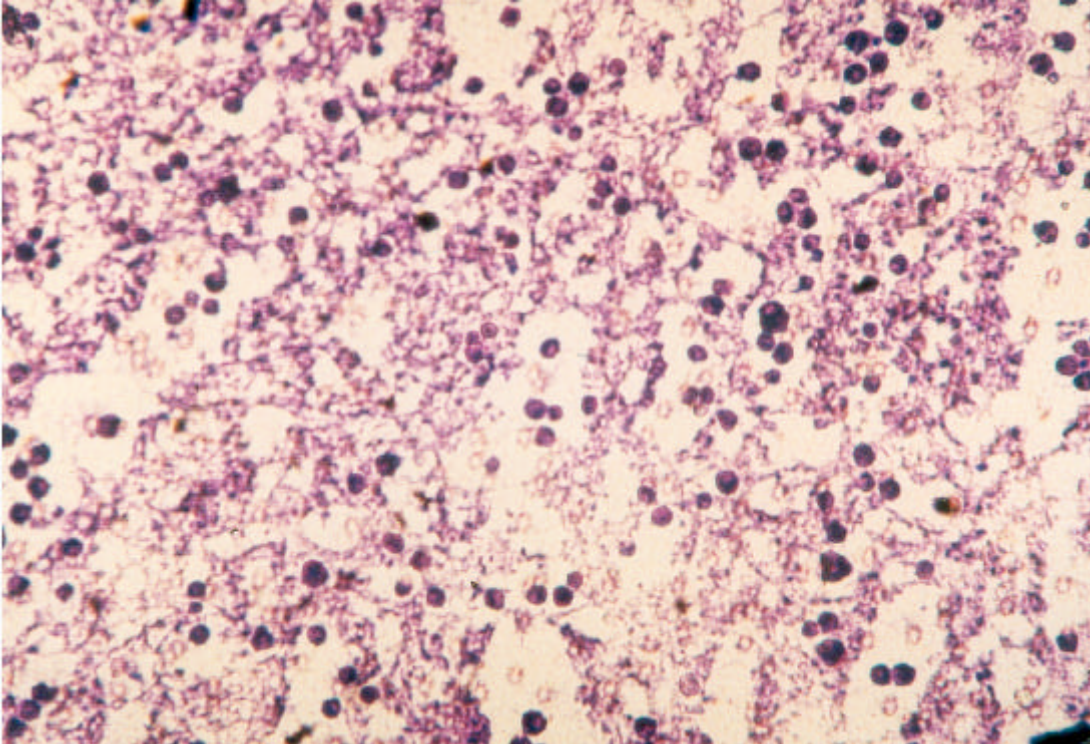


Abbildung 5: Variation der eingesetzten Zellzahl: Bei Verwendung von 20.000 Zellen sind diese gleichmäßig über das Präparat verteilt. Die Zellen waren keinen Temperaturunterschieden (Schnitt-Medium) ausgesetzt. Vergrößerung: 10x

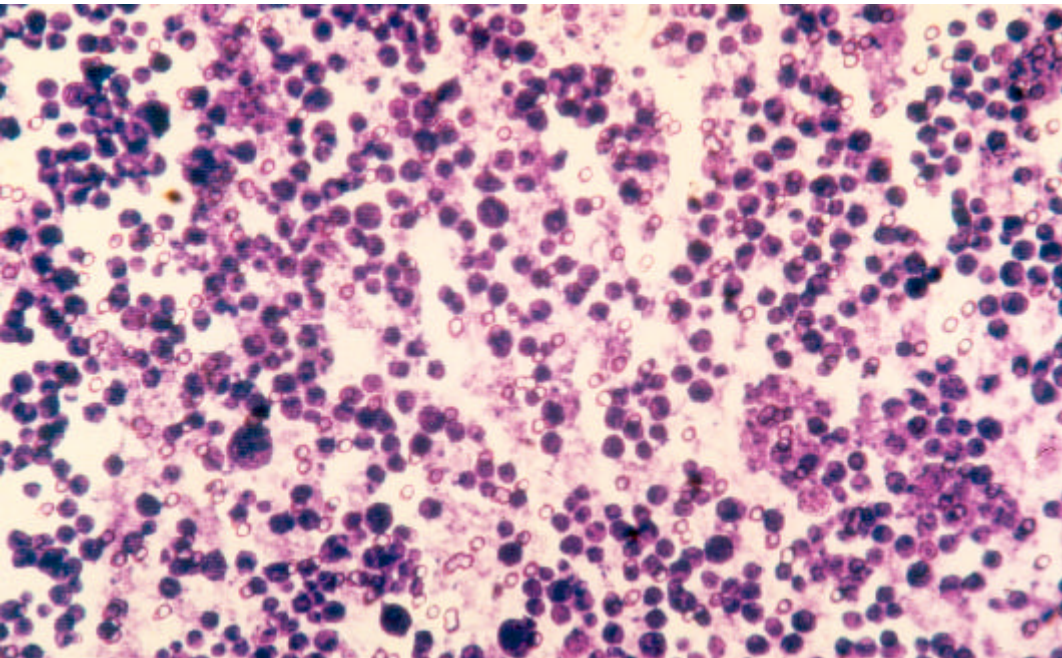


Abbildung 6: Variation der Zellzahl: Bei Verwendung von 40.000 Zellen sind auch entsprechend mehr Zellen im Präparat zu finden. Der Versuchsaufbau ist somit in der Lage, verschiedene Zellzahlen korrekt darzustellen.

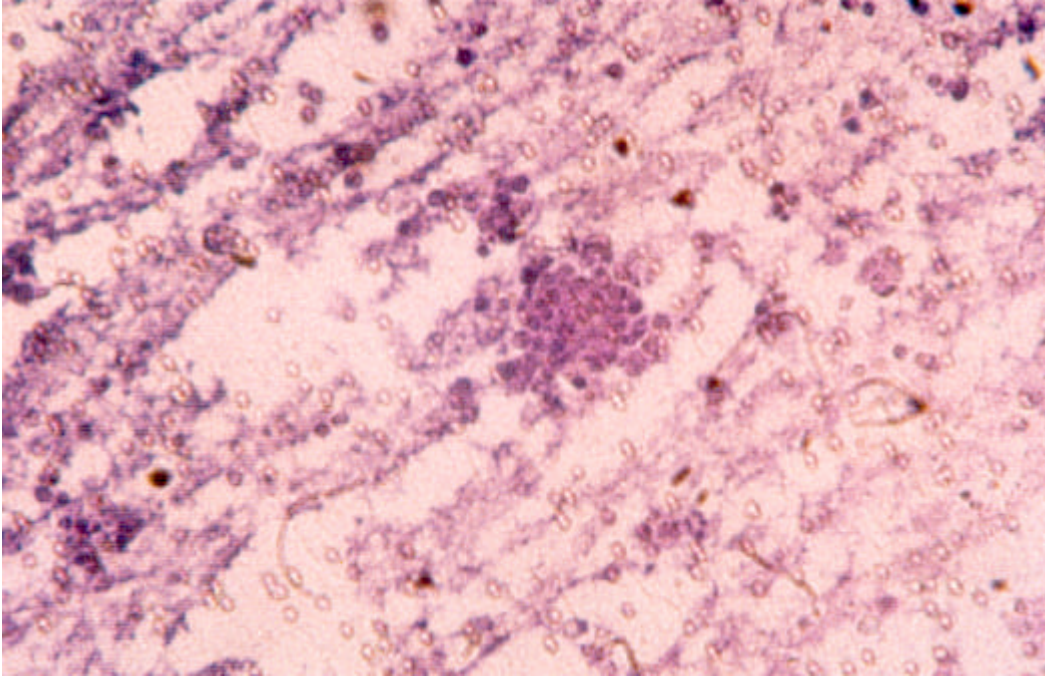


Abbildung 7: Abhängigkeit von der Zeit: Nach 24 Stunden bilden sich bei einem Ansatz von 10.000 Zellen die ersten Konglomerate aus. Vergr. 10x

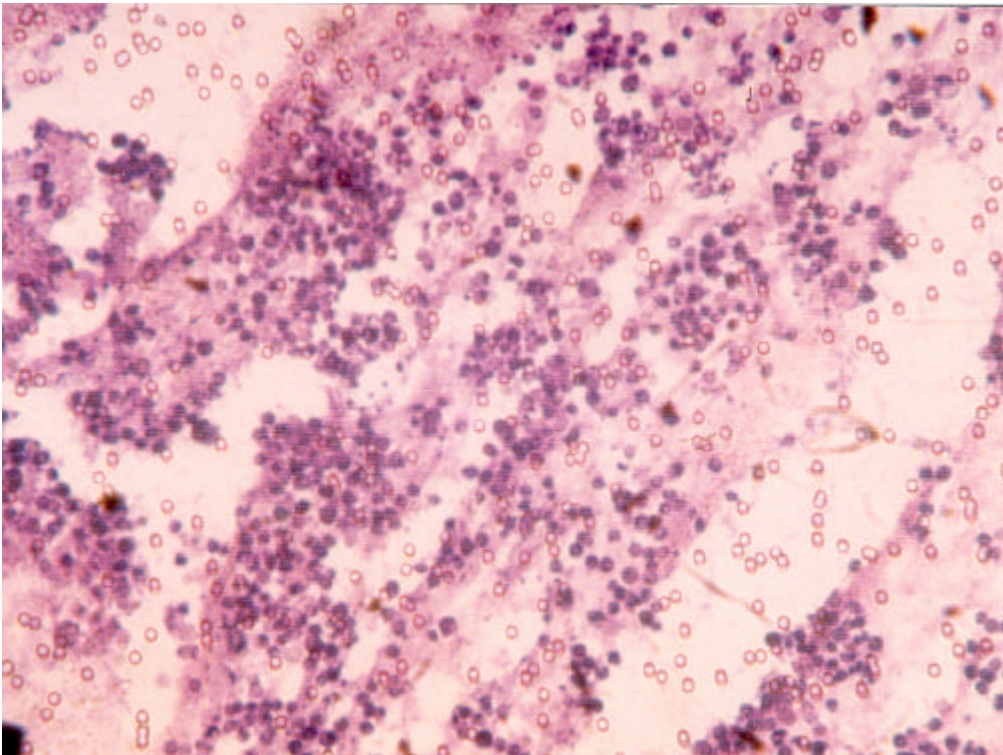


Abbildung 8: Abhängigkeit von der Zeit: Nach 36 Stunden sind deutlich mehr Zellen invadiert.

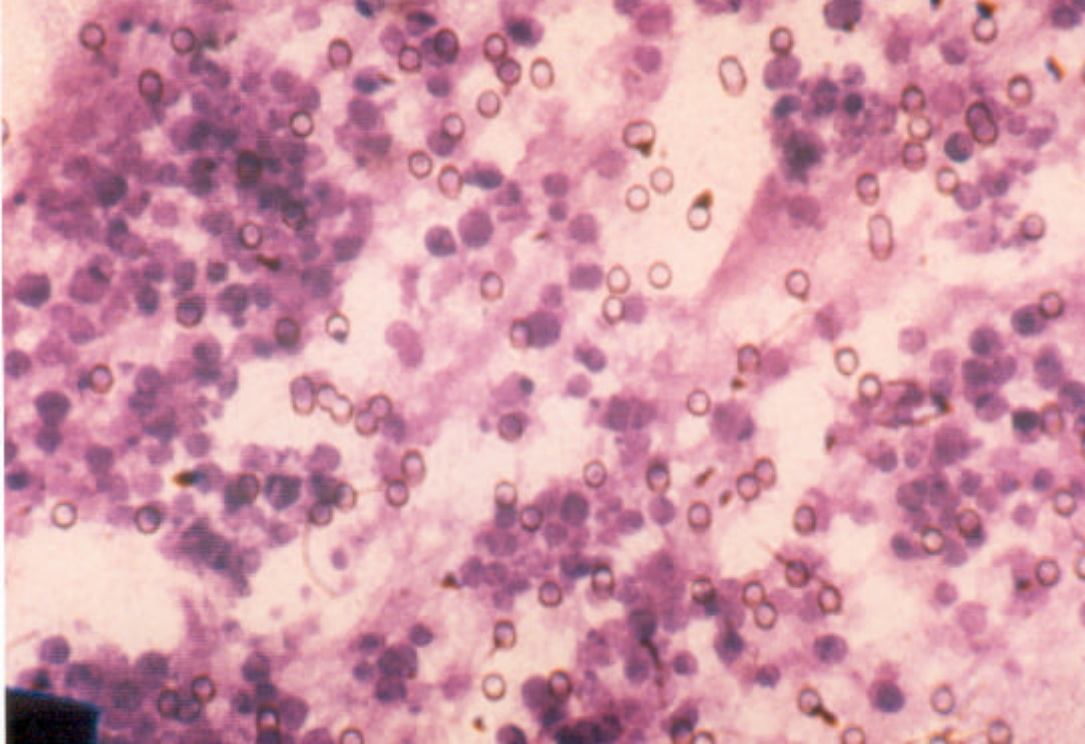


Abbildung 9: Detailvergrößerung aus obiger Abbildung, die lokale Anhäufungen, begrenzt auf das Invasionssubstrat zeigt.

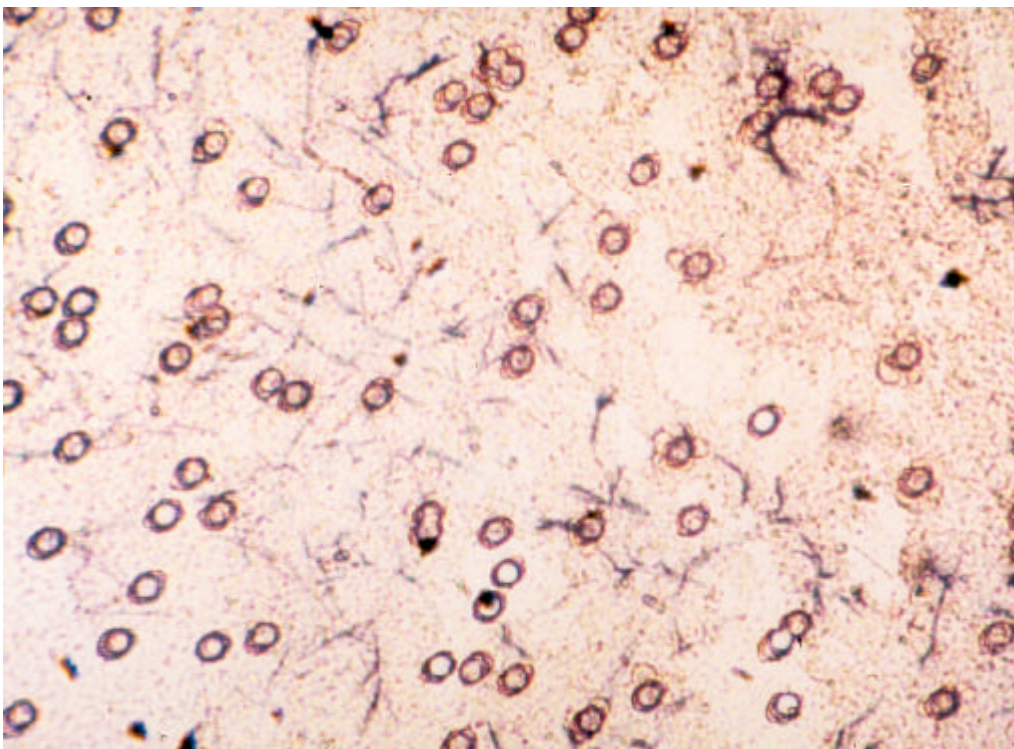


Abbildung 10: Kontrolle der Zellinvasion im Präparat: Bei Zusatz von MTT ohne weiteren Färbeschritt wird dieses zu Sternförmigen Komplexen mitochondrial umgewandelt. Die invadierten Zellen haben einen in situ nachweisbaren aktiven Stoffwechsel, es sind nicht etwa nur tote Zellen, die artifiziell am Schnitt haften bleiben. Vergrößerung: 20x.

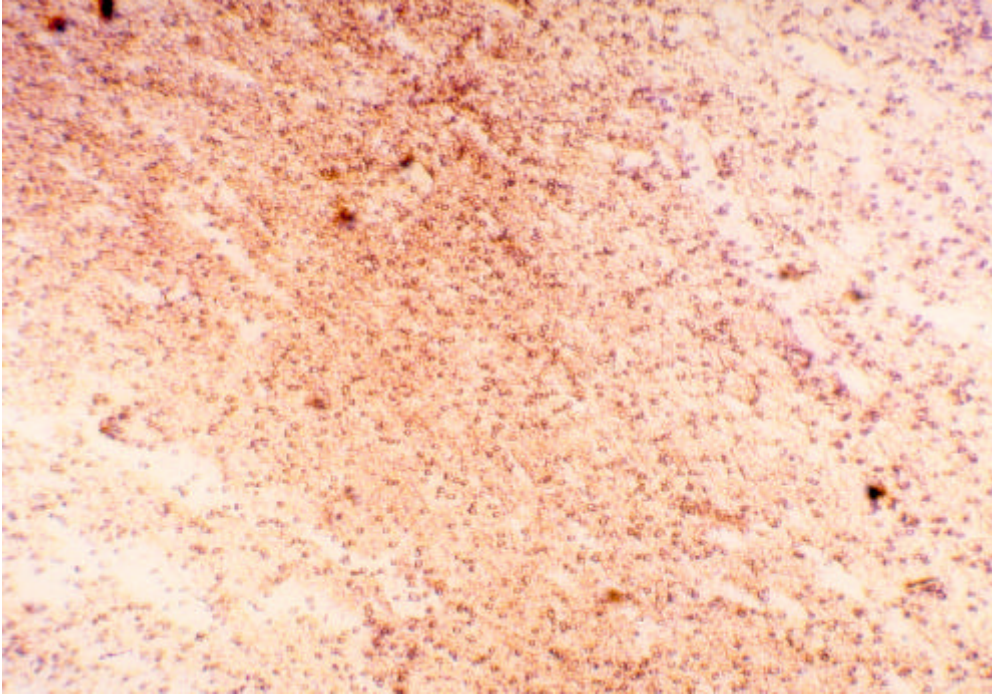


Abbildung 11: Kontrolle mit Zellen, die mit 100%igem Alkohol abgetötet worden waren: es finden sich keine Zellen mehr im Schnitt. Die in den oben gezeigten Präparaten enthaltenen Zellen sind somit ausschließlich lebende Zellen, die aktiv in Gehirngewebe invadieren und nicht etwa einfach nur tote Zellen, die auf dem Hirnschnitt liegen. Vergrößerung: 4x.

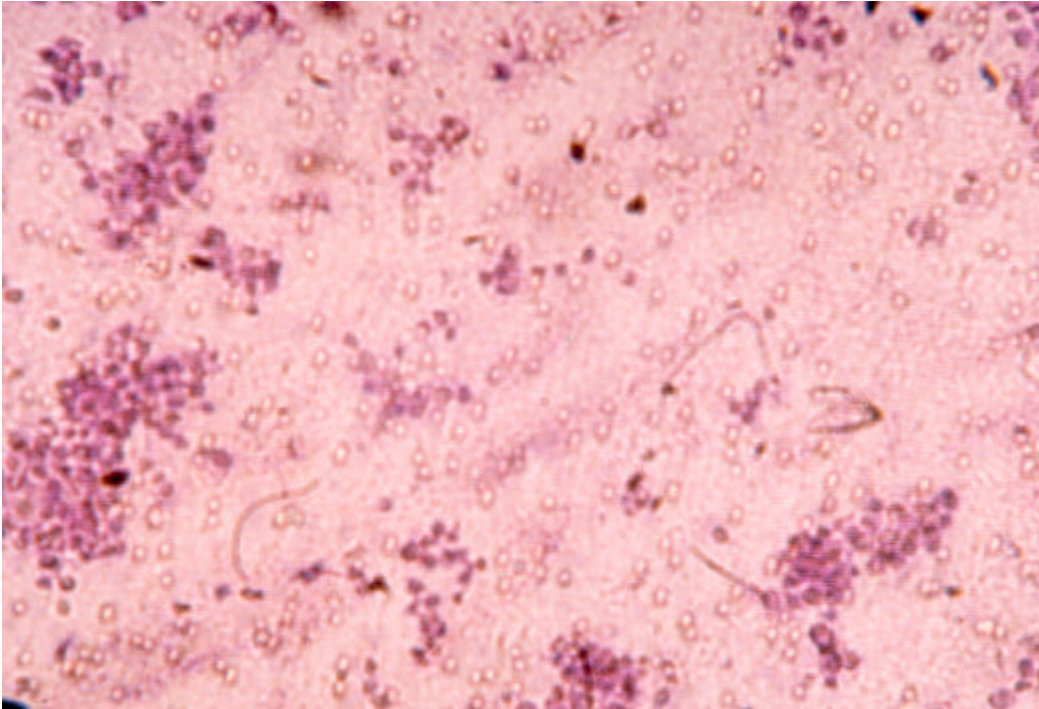


Abbildung 12: Kontrolle der Zellinvasion anhand von Zellen, die vorher mit Vincristin behandelt worden waren. Vincristin, ein Chemotherapeutikum, das das Zytoskelett der Zellen zerstört und sie so immobilisiert, wurde in ansteigenden Konzentrationen zugesetzt. Bei 10 ng/ml sind deutlich weniger Zellen invadiert.

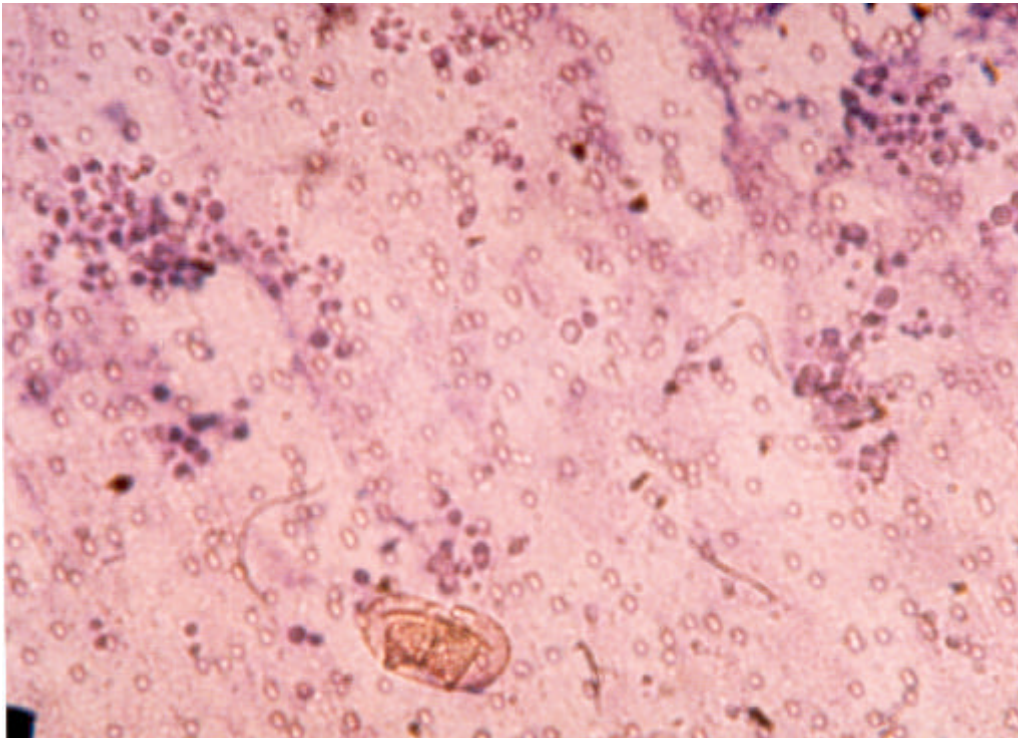


Abbildung 13: Bei ansteigender Vincristin – Konzentration (50ng/ml) sind deutlich weniger Zellen invadiert, sie sehen kleiner und unregelmäßig begrenzt aus. Bei 100ng/ml waren keine Zellen mehr im Präparat nachweisbar.

3. Variation der Matrix

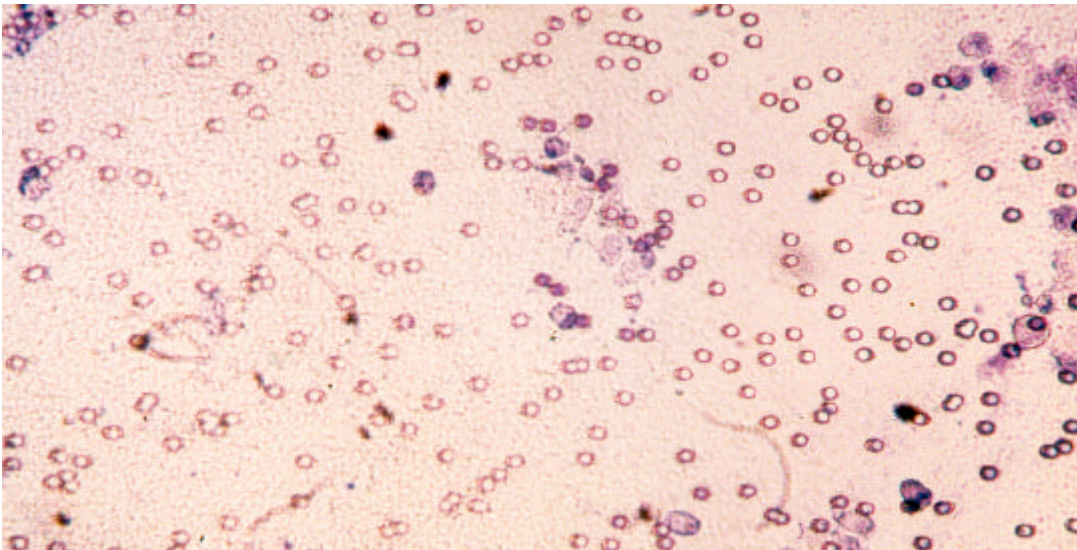


Abbildung 14: Kein Hirnschnitt: Durchführung einer Kontrolle mit Einsetzen von 20.000 Zellen, die ohne Hirnschnitt an dem Filter anhaften könnten, was unter den gegebenen Versuchsbedingungen jedoch nicht passiert. Die Zellen haften folglich nicht einfach nur an dem Filter, sondern ausschließlich an dem Hirnschnitt.

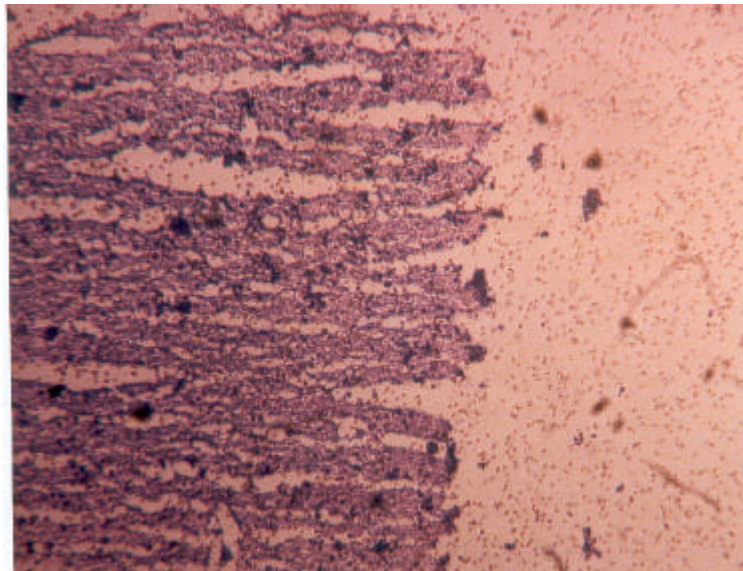
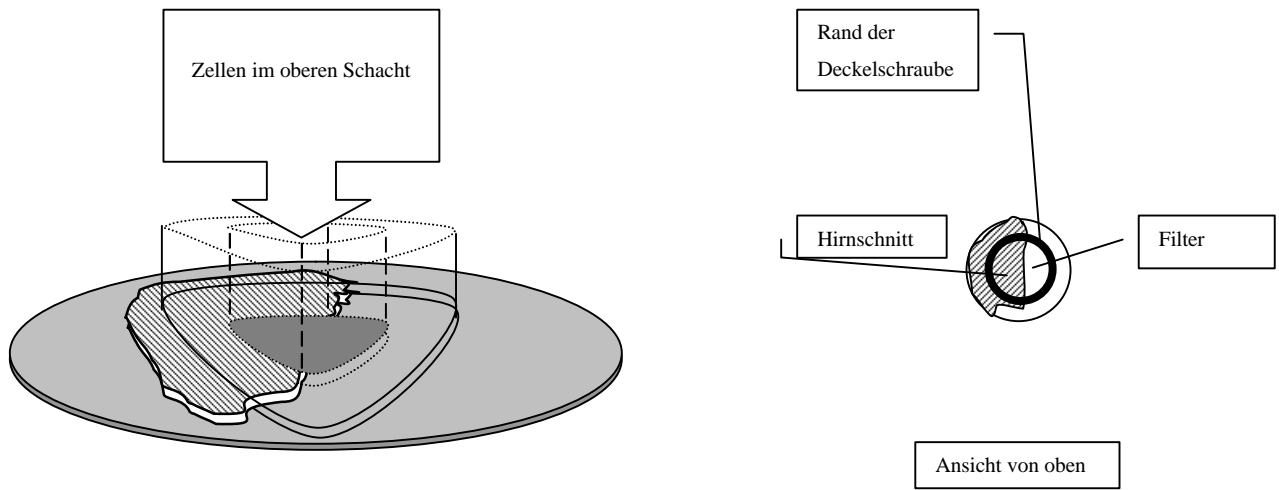


Abbildung 15: Bei gleichzeitiger Konfrontation der Zellen mit Hirnschnitt und unbedecktem Filter in einem Ansatz finden sich lediglich im Gehirngewebe Zellen, nicht auf dem Filter. Dies unterstützt erneut die Aussage, daß die Zellen nicht am Filter adhären, sondern den Gehirnschnitt aktiv invadieren. Vergr.: 2,5x

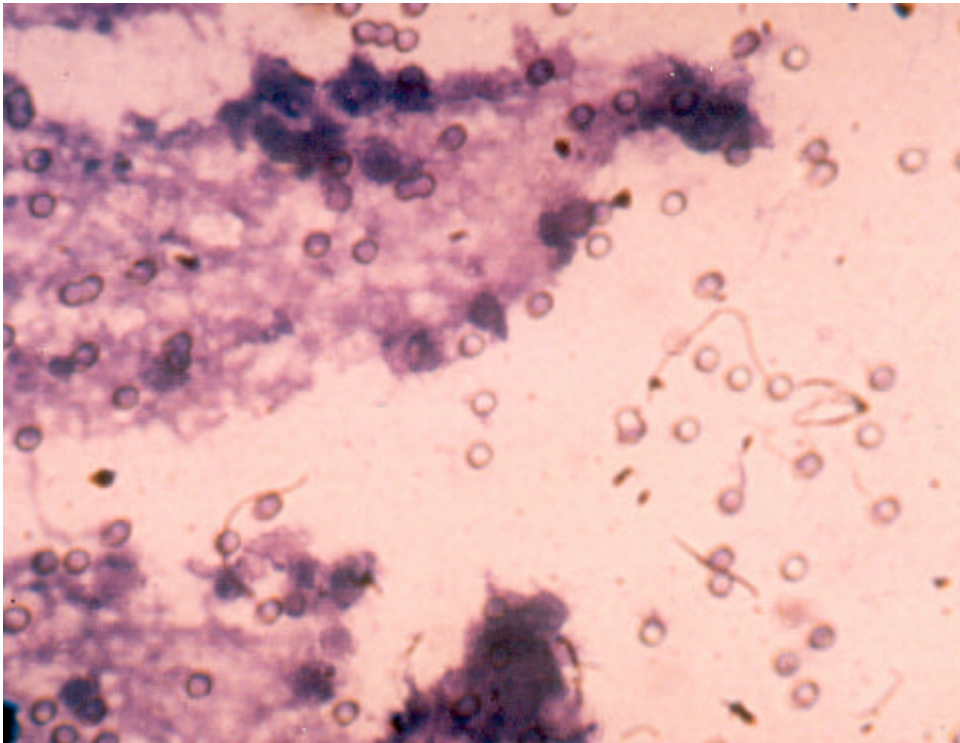


Abbildung 16: Detailvergrößerung aus obiger Abbildung: Die Zellen sind streng auf das Präparat begrenzt. Vergr.: 20x

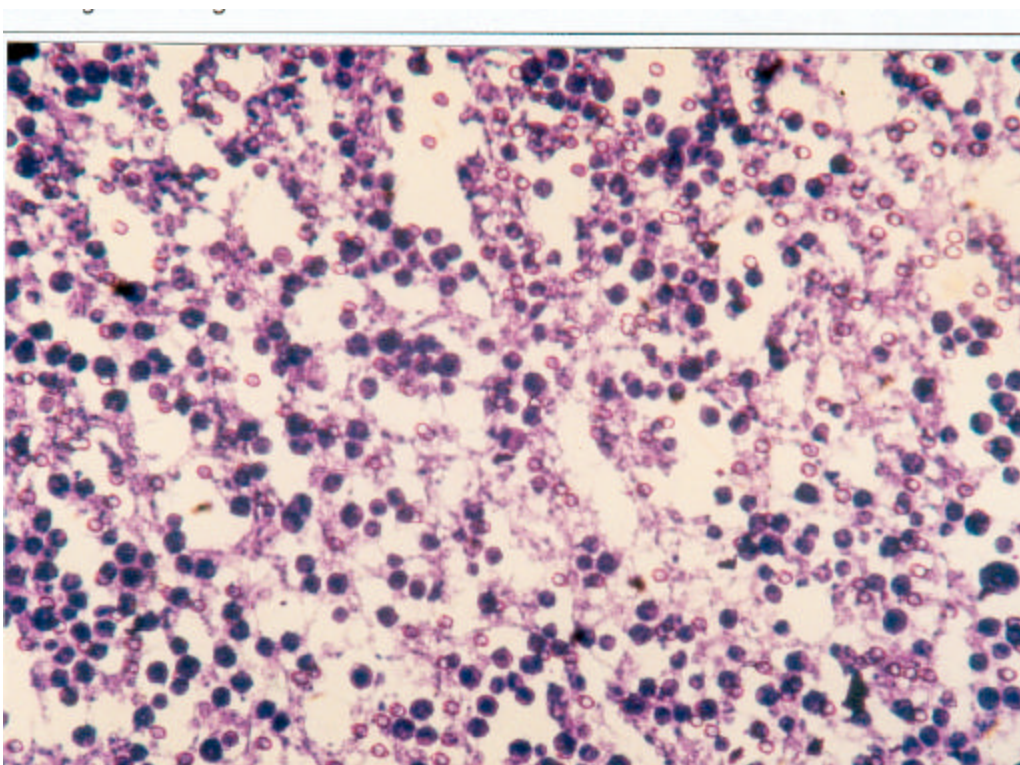


Abbildung 17: Variation der Schnittdicke des Präparates: Bei 20µm Schnittdicke kommt es zu einer gleichmäßigen Verteilung der Zellen. Kleine Risse im Präparat sind dargestellt. Diese sind frei von Zellen, welche ausschließlich den Hirnschnitt invadieren, nicht am Filter adhären. Vergr.:10x

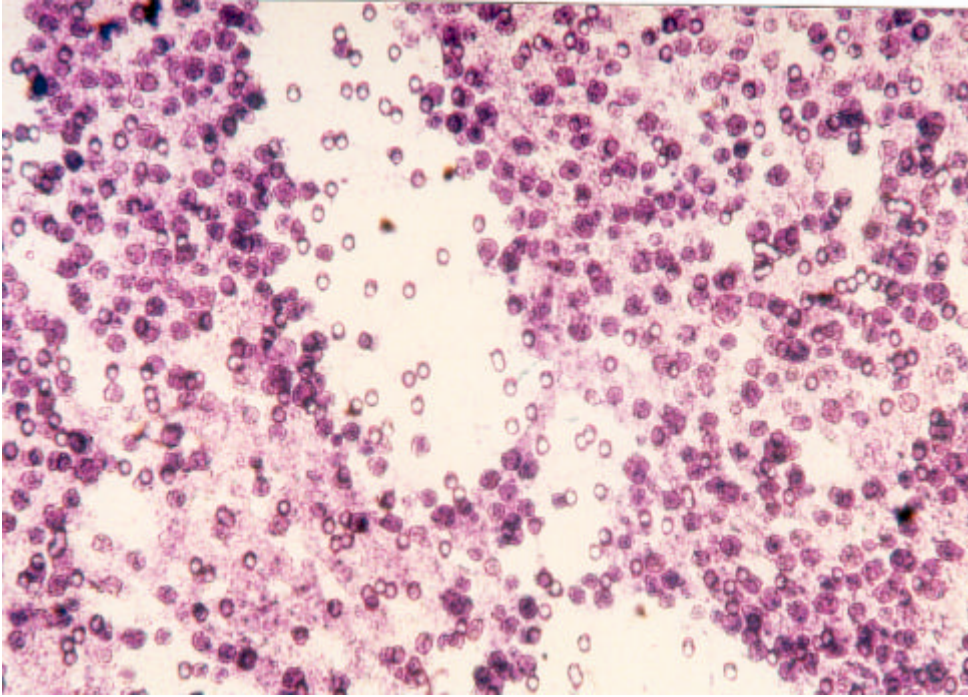


Abbildung 18: Variation der Schnittdicke des Präparates: Bei 30µm Schnittdicke kommt es seltener zu kleinen, Zell-freien Rissen im Präparat.

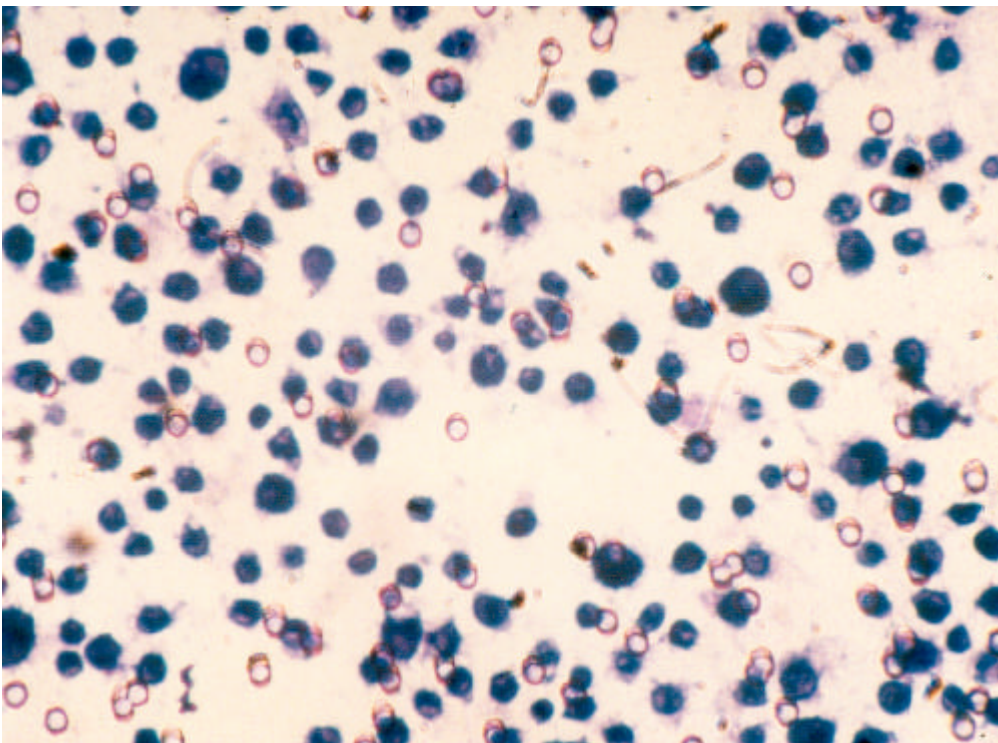


Abbildung 19: Versuchsdurchführung mit Poly-L-Lysin anstelle eines Hirnschnittes als Invasionsmatrix. Die Zellen sind sehr gleichmäßig verteilt. Keine Zellanhäufungen. Die Versuchsdurchführung ohne vollständig gefüllte untere Kammer ist kein Hindernis für einen Invasionsversuch, da Poly-L-Lysin ein normales Invasionssubstrat darstellt. Vergrößerung: 10x

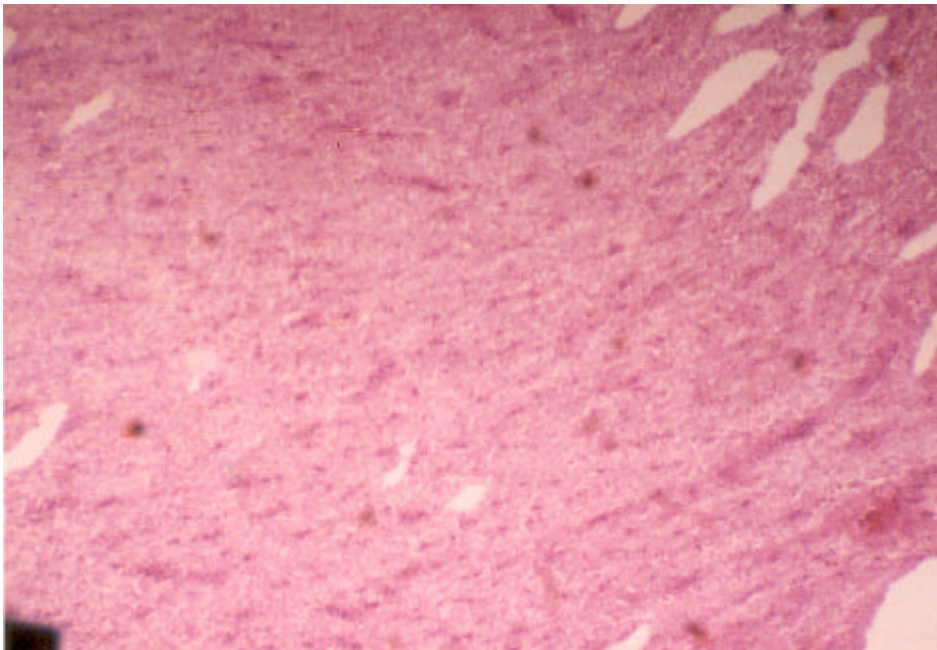
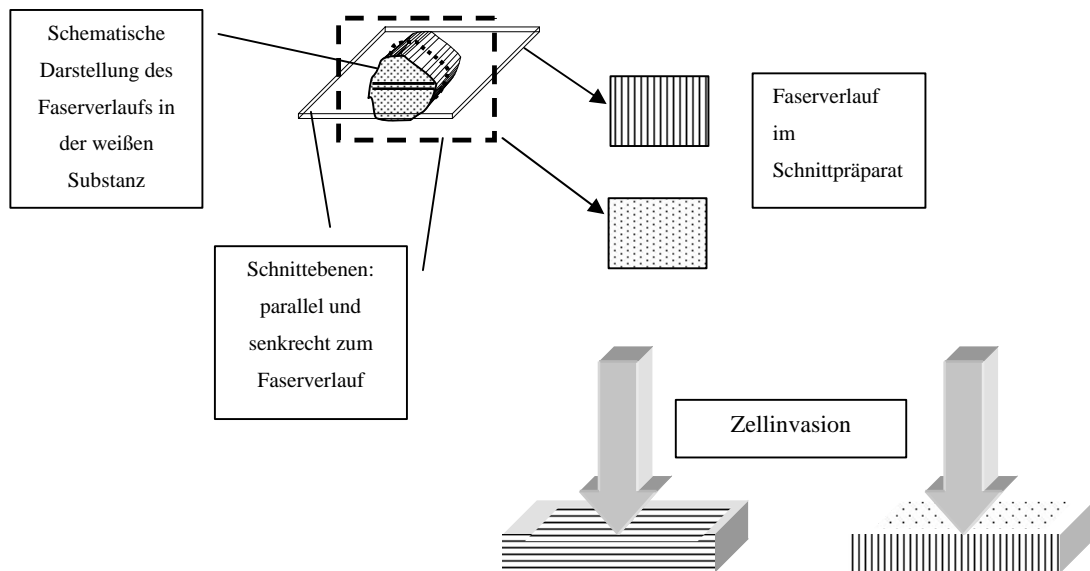


Abbildung 20: H.-E.-Färbung des nativen Präparates zur Bestimmung der Faserverlaufsrichtung: Die Fasern sind nahezu alle parallel ausgerichtet, kleine Gefäße sind erkennbar längs getroffen.

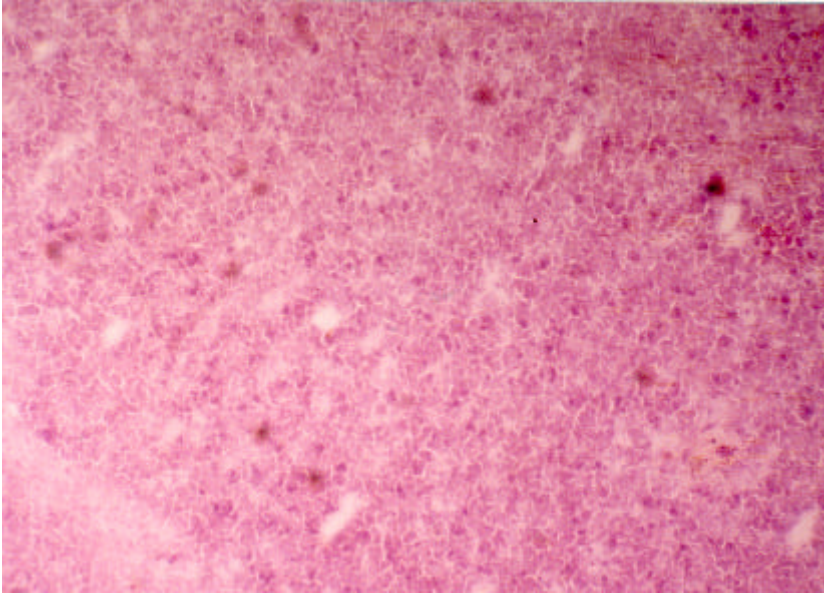


Abbildung 21: H.-E.-Färbung des nativen Präparates, welches um 90° gedreht wurde, zur Bestimmung der Faserverlaufsrichtung: Die Fasern sind senkrecht getroffen, einzelne Gefäßquerschnitte sind zu sehen.

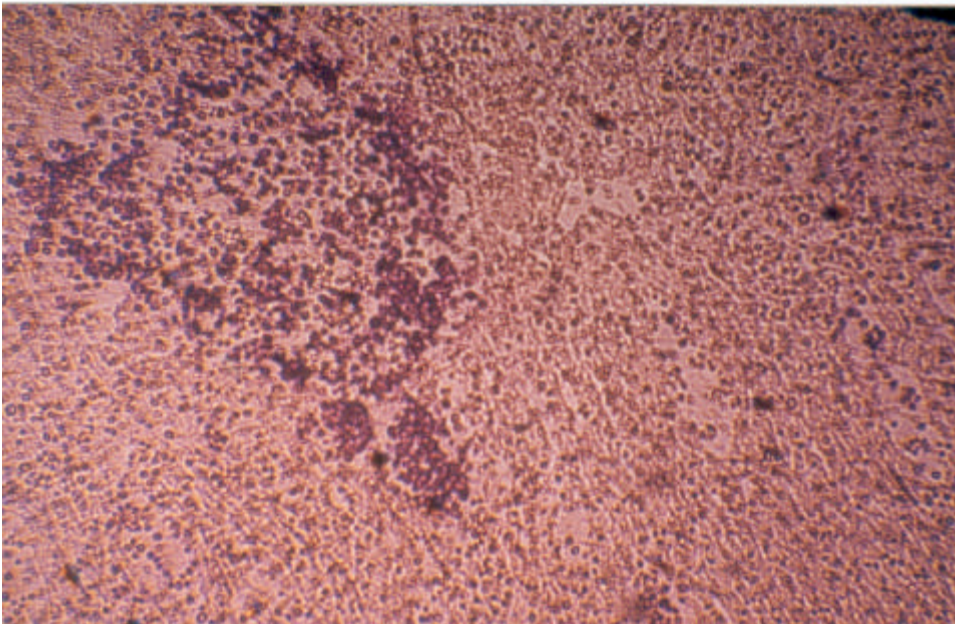


Abbildung 22: Invasionsverhalten bei Fasern, die parallel geschnitten wurden: Die Zellen treffen senkrecht auf den Faserverlauf und zeigen lediglich in einer Ecke eine beginnende Invasion, die -diagonal im Bild - parallel zum angedeutet erkennbaren Faserverlauf liegt.

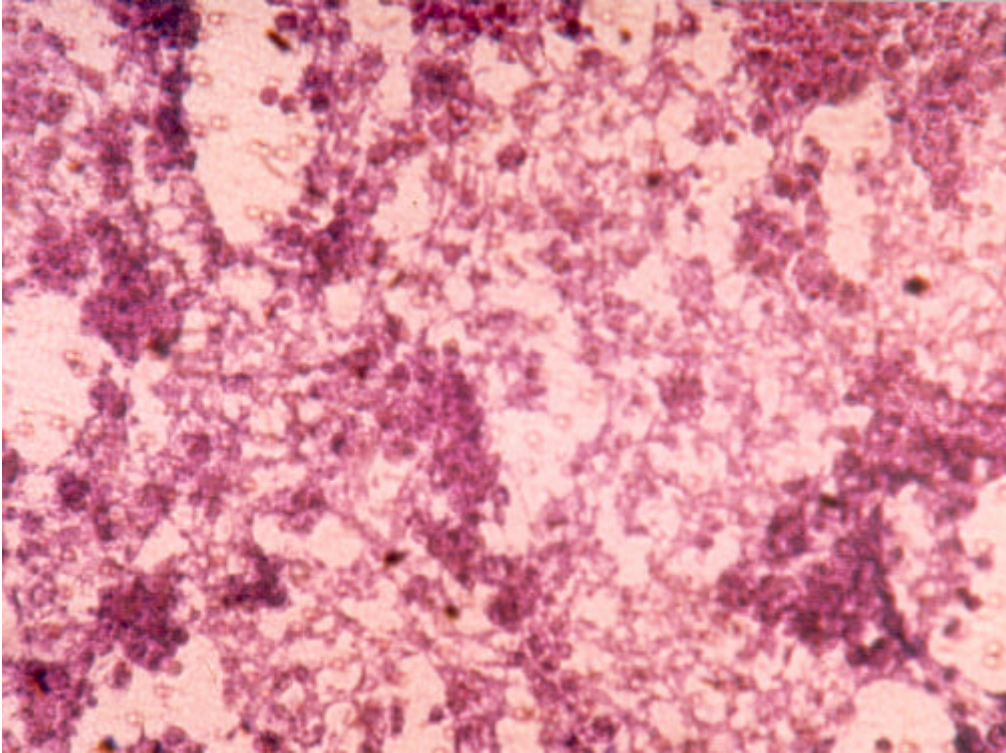


Abbildung 23: Invasionsverhalten bei senkrecht getroffenen Fasern, in die die Zellen direkt einwandern können: deutlich mehr invadierende Zellen im Vergleich zum Ansatz mit parallel geschnittenen Fasern. Vergr.:10x

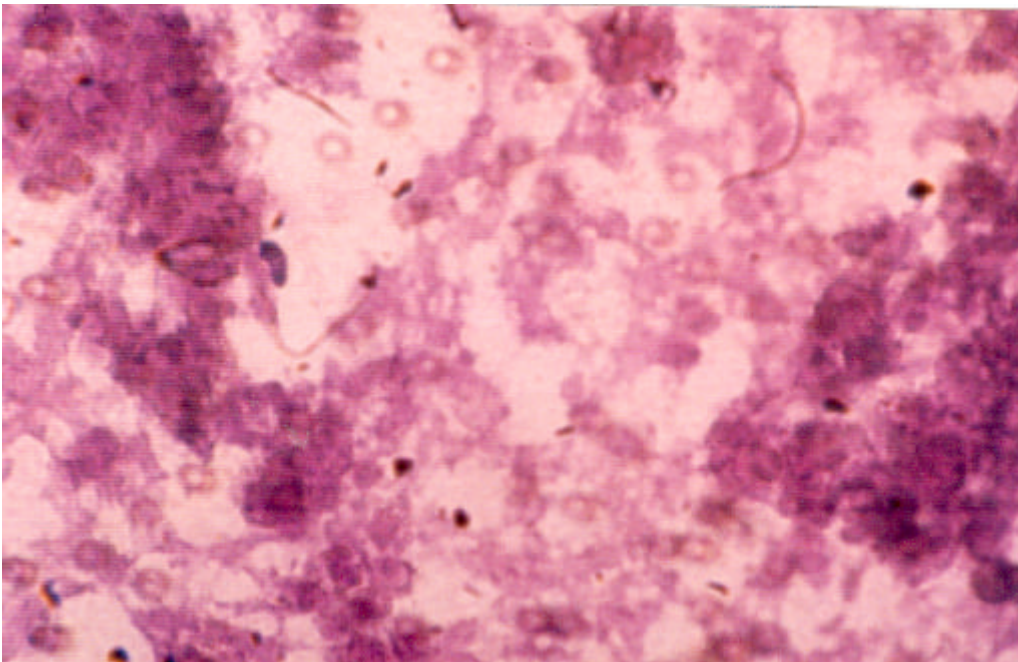


Abbildung 24: Detailvergrößerung aus oben beschriebener Abbildung, die die Zellen auf das Gehirngewebe beschränkt zeigt.

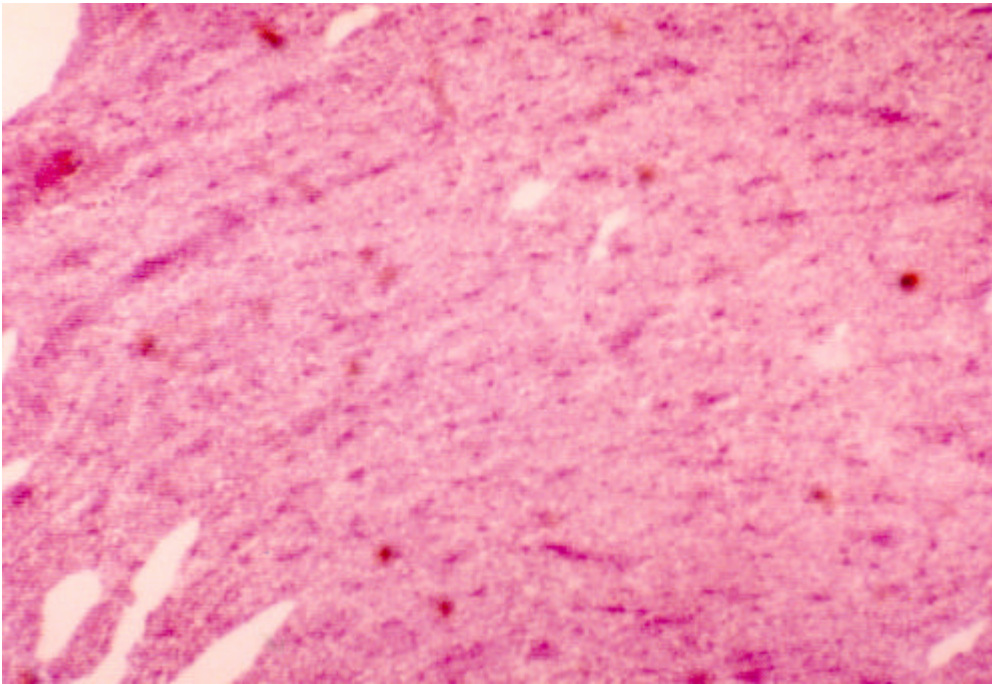
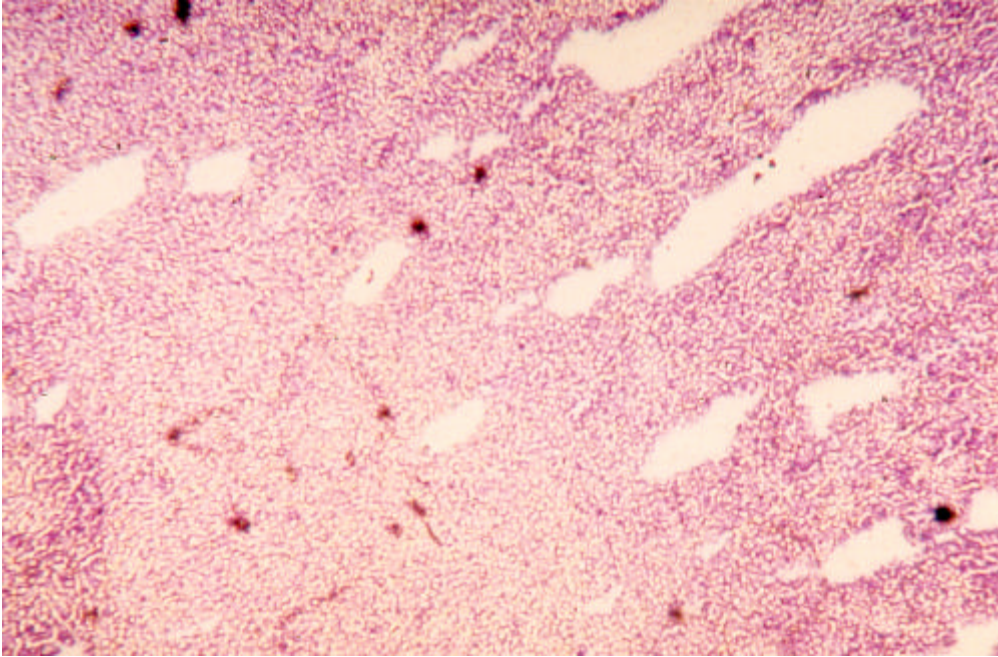


Abbildung 25: Papanicolaou – Färbung des unbehandelten, frischen Hirnschnittes. Im Vergleich zur H.E. – Färbung des Nativgewebes (unten) eine etwas flauere Darstellung. Zellen und Gefäße kommen zwar auch zur Darstellung, jedoch in sehr viel geringerem Maße. Diese Färbung eignet sich somit besonders, um den Hirnschnitt in seinen Begrenzungen und seiner Struktur darzustellen, ohne jedoch die Darstellung der invadierten Tumorzellen durch gleichzeitige Überlagerung mit anderen Zellen zu verschlechtern.

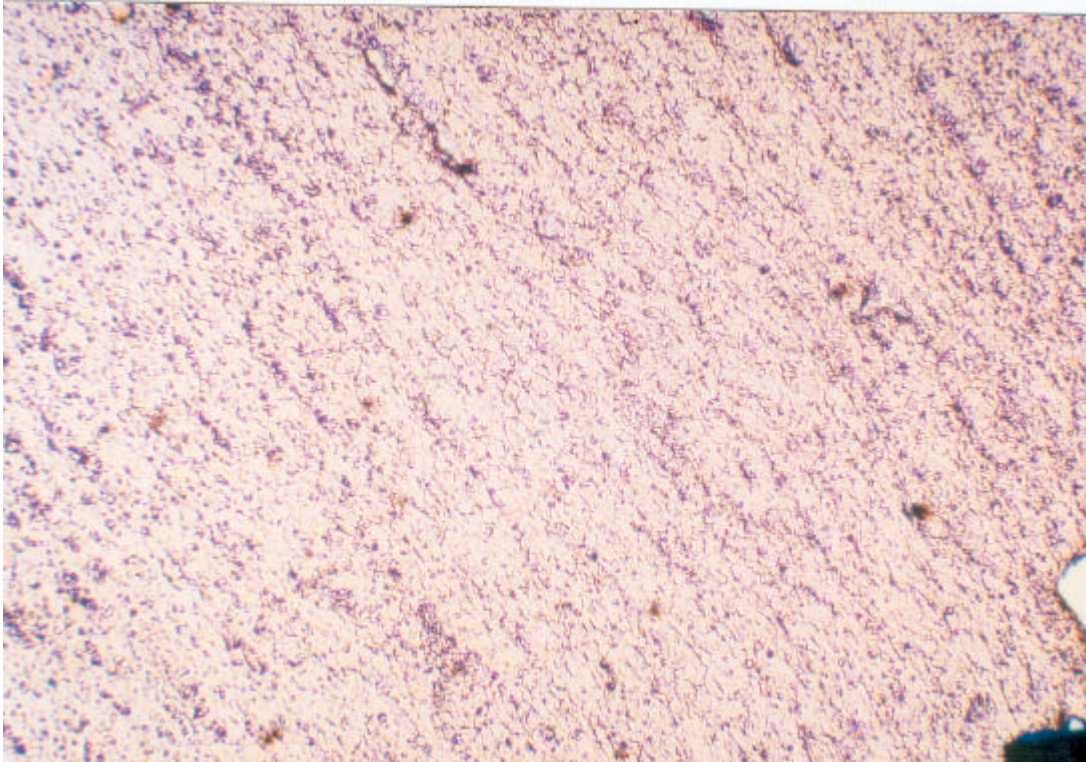


Abbildung 26: Kontrolle der Faserverlaufsrichtung vor Durchführung der eigentlichen Versuchsreihe mittels Hämalaun-Färbung: Deutliche Darstellung paralleler Fasern, die längs geschnitten wurden. Vergrößerung: 4x

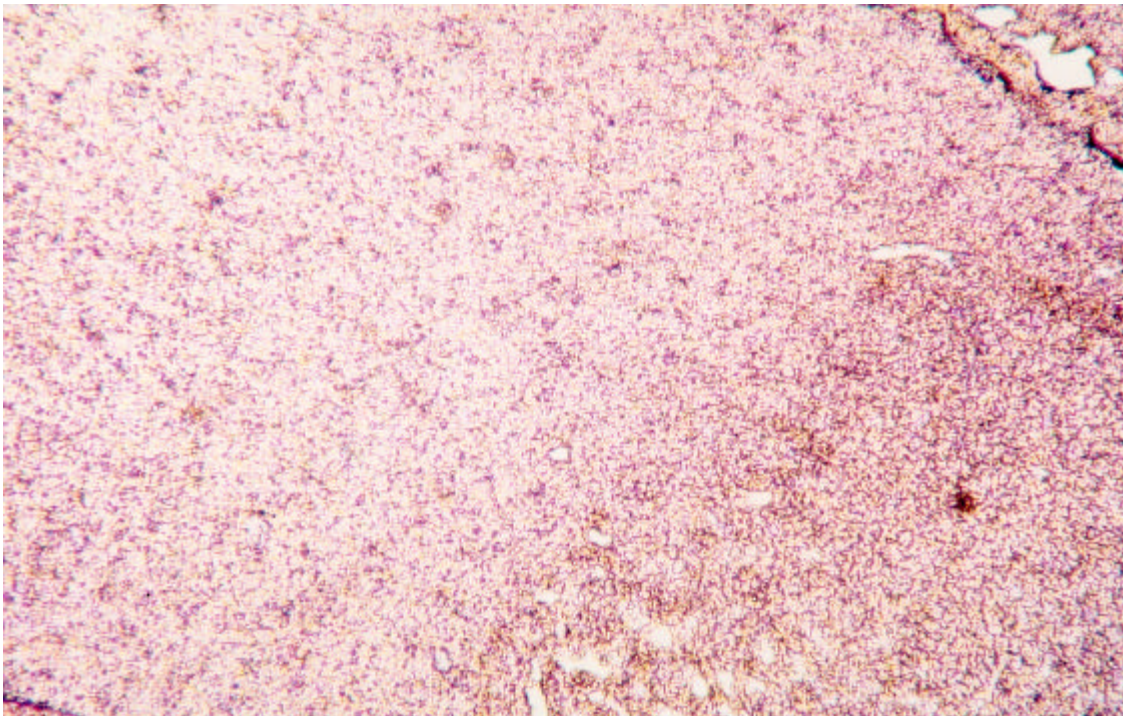


Abbildung 27: Kontrolle der Faserverlaufsrichtung vor Durchführung der eigentlichen Versuchsreihe mittels Hämalaun-Färbung: querschnittene Fasern. Vergrößerung: 4x

Die Hämalaun-Färbung könnte somit vor jeder Versuchsreihe genutzt werden, um den Faserverlauf für das jeweils geplante Experiment zu bestimmen. Die schnelle Durchführung (im Vergleich zur H.-E.-Färbung) ist nützlich, da in dieser Zeit die Matrix vor dem eigentlichen Versuchsbeginn umso kürzer den Temperaturwechseln ausgesetzt ist.

4. Variation des Inhaltes des unteren Schachtes

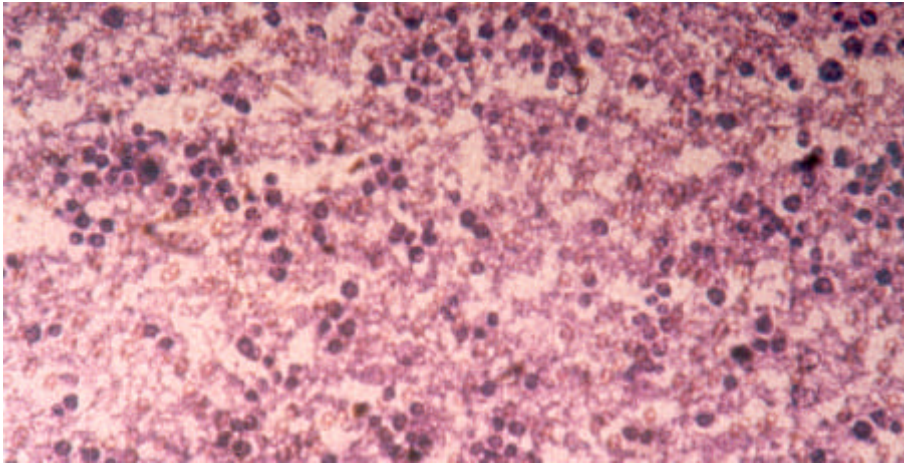


Abbildung 28: Bei Einsatz von DMEM in der unteren Kammer an Stelle von 3T3 – Medium ist das Invasionsverhalten der Zellen unbeeinflusst. Ein Chemoattractant – eine Substanz, die einen zusätzlichen „anziehenden“ Reiz auf die Zellen ausübt ist nicht notwendig. Der Gehirnschnitt ist allein schon hinreichendes Invasionssubstrat.

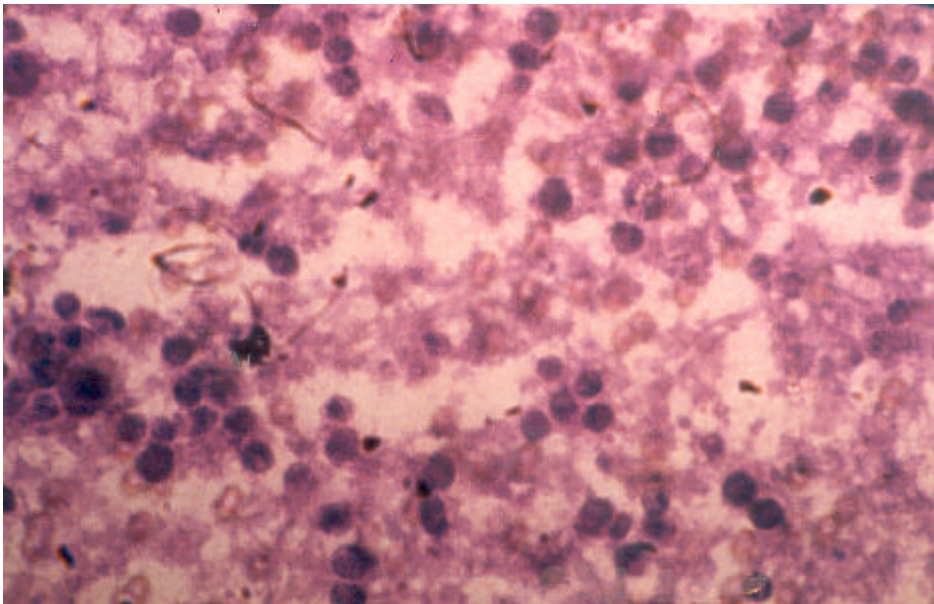


Abbildung 29: Ausschnitt aus obiger Abbildung. Deutlich zu erkennen sind die von einander separierten Zellen, die keine Kontakte ausbilden und gleichmäßig verteilt sind. Kern-Plasma-Relation und gelegentlich Mitosefiguren sind in einzelnen Zellen gut zu beurteilen. Vergrößerung: 20x.

3.2. Konfokale Mikroskopie

3.2.1. Morphologie

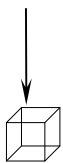
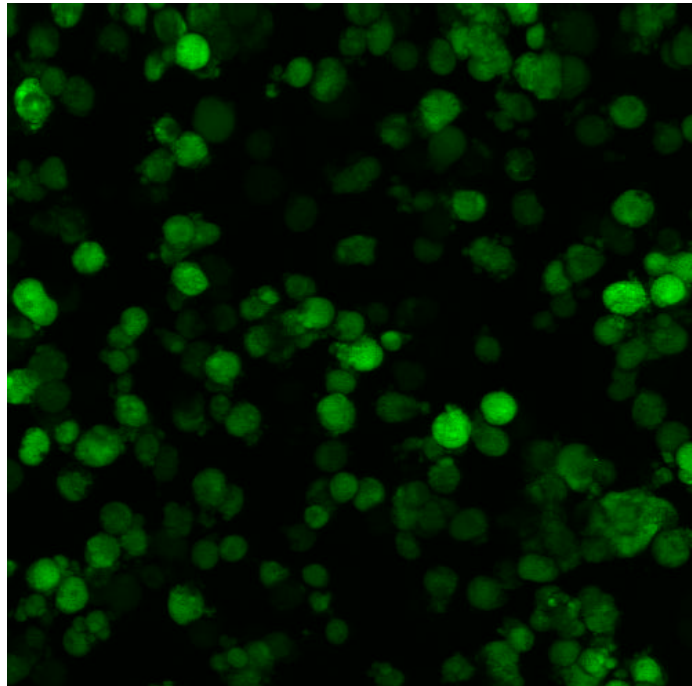


Abb. 28: Aufsichtdarstellung invadierender U87 GFP-Zellen im Hirnschnitt (30 μ m) nach 12h. Die fluoreszierenden Zellen werden durch die Konfokale Mikroskopie dargestellt, der nicht fluoreszierende Hirnschnitt nicht. Dies erlaubt eine gute Beurteilbarkeit von Zellzahl und Morphologie.

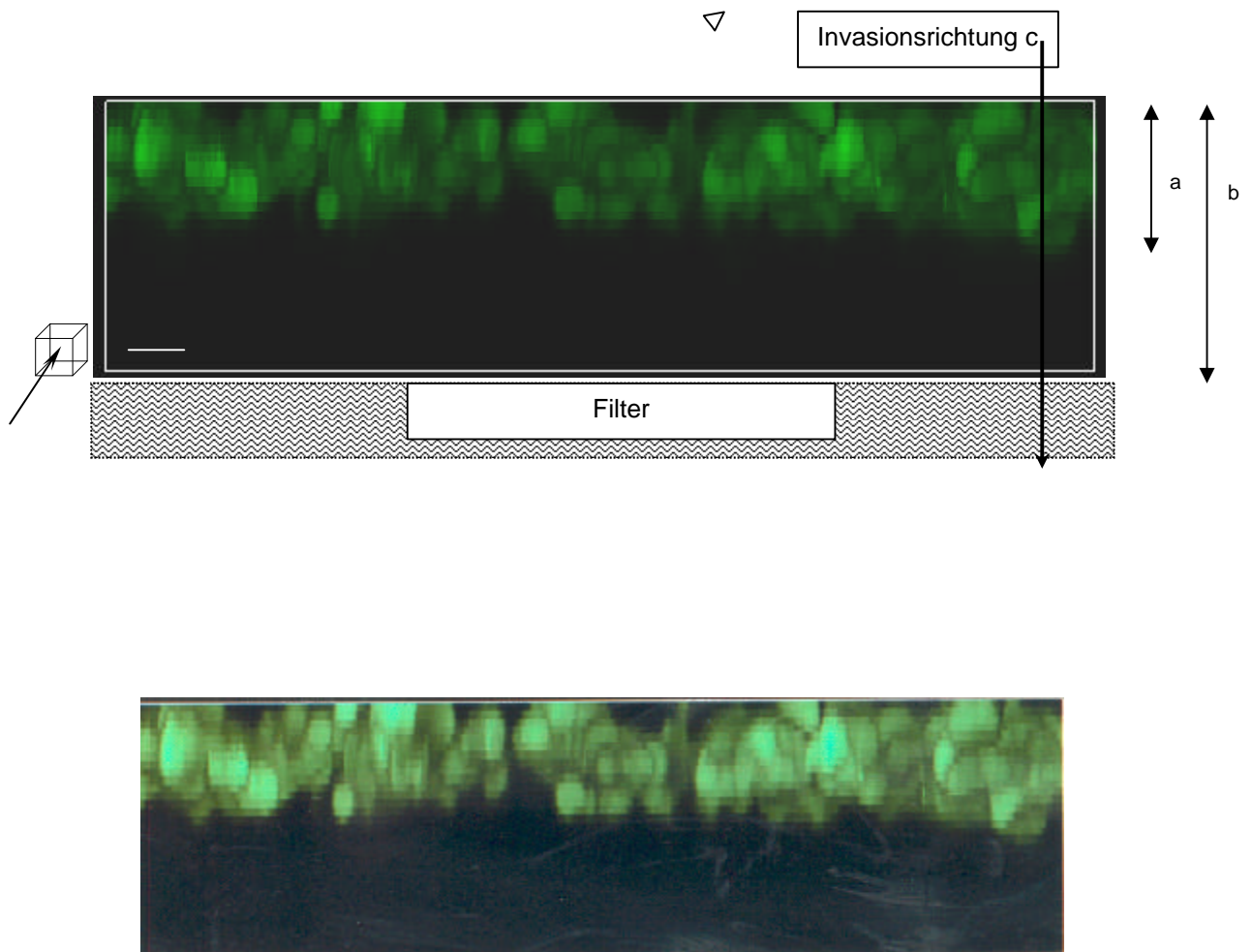


Abb. 29: Darstellung des Schnittes aus Abb. 28 in der dreidimensionalen Rekonstruktion und seitlichen Ansicht. Die Zellen haben nach 12 Stunden eine gewisse Eindringtiefe [a] (innerhalb eines nicht fluoreszierenden) Schnittes der Dicke [b] erreicht. Manche Zellen sind weiter in den Schnitt eingedrungen als andere, was unterschiedliche Aktivitätszustände einzelner Zellen im Rahmen der Invasion vermuten läßt. Die weiter unten angeführte Quantifizierung der Invasion in Abhängigkeit von der Zeit und unter dem Einfluß invasionshemmender Agentien entspricht einer Analyse entlang der Invasionsachse [c]. (- entspricht $30\mu\text{m}$)

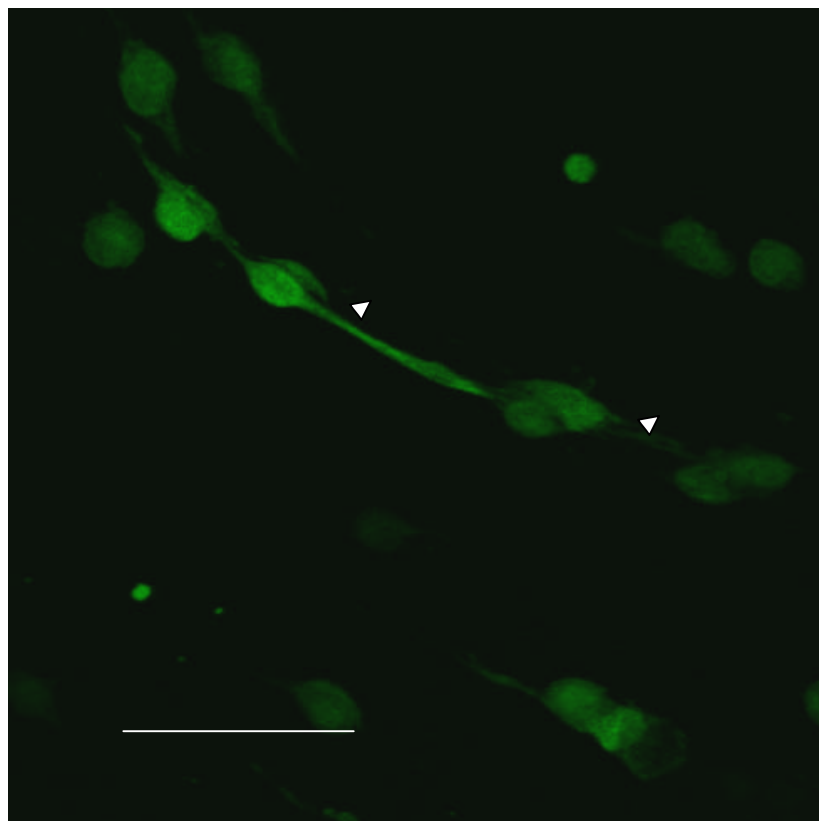
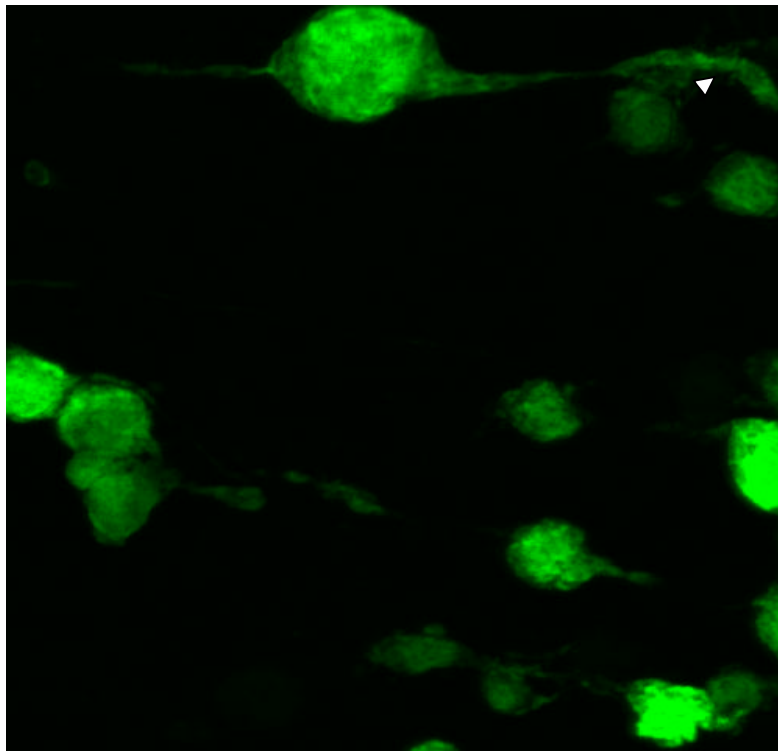


Abb. 30, 31: Bei Schnitten, deren Faserrichtung parallel zur Analyserichtung des Konfokalen Mikroskopes getroffen wurde, läßt sich die Ausbildung langer Zellfortsätze als morphologisches Korrelat der Invasion darstellen.

3.2.2. Quantitative Analyse

Die Invasionsrate wie auch die Proliferationsrate der transfizierten U87 GFP Zellen entsprach nahezu den nicht transfizierten Gliomzellen. Unter dem konfokalen Mikroskop konnte das Intensitätssignal der fluoreszierenden Zellen im nicht fluoreszierenden Hirnschnitt gemessen werden.

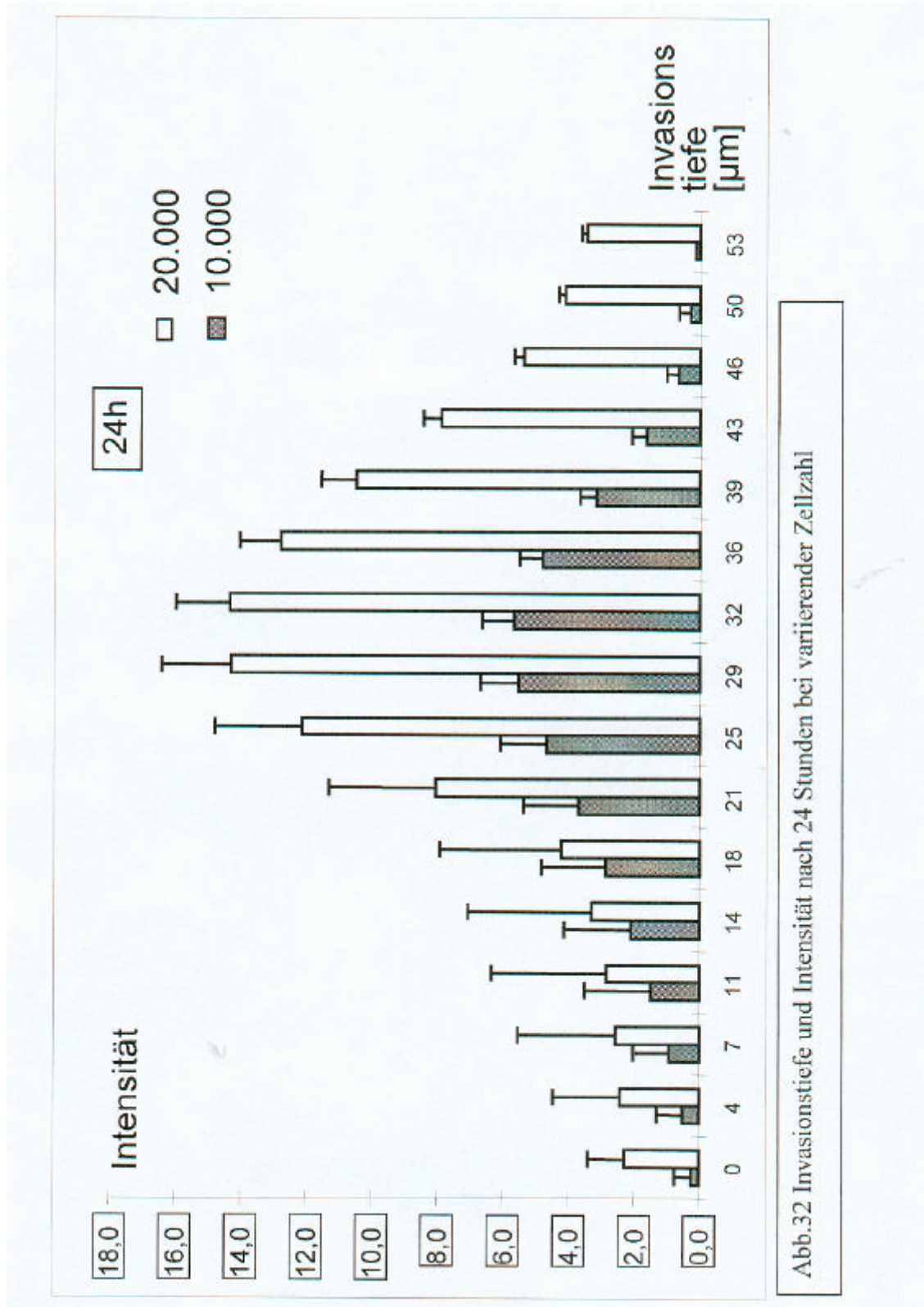


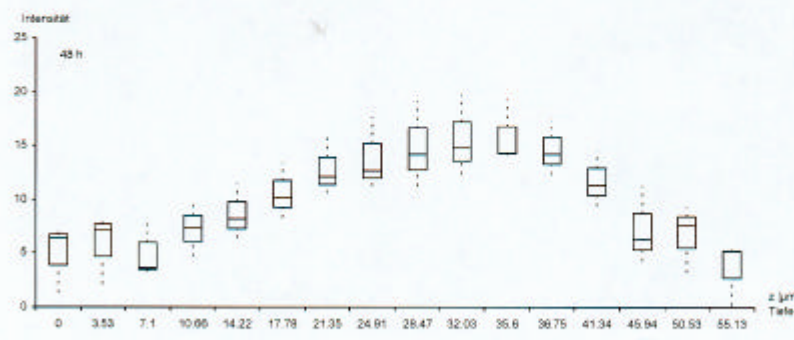
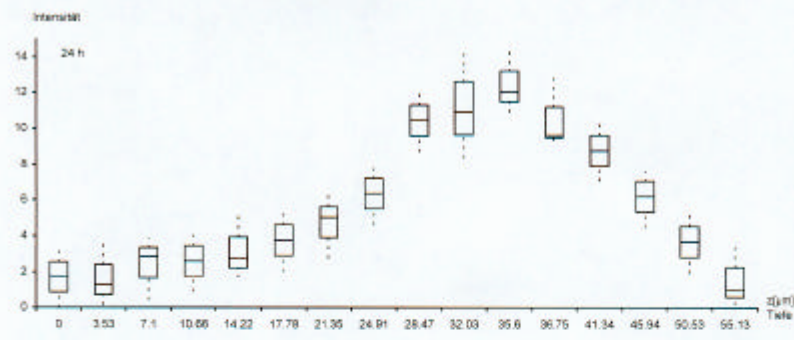
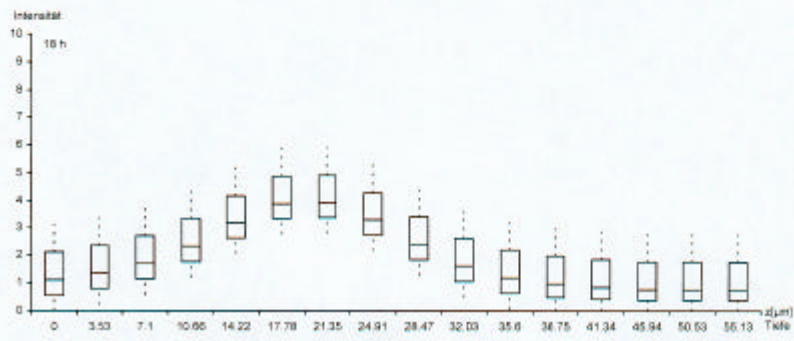
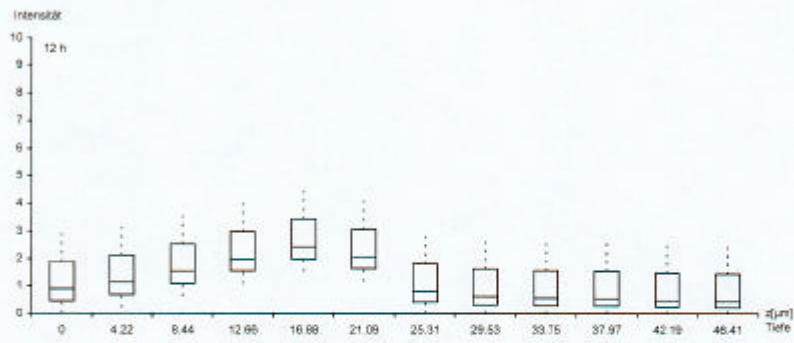
Abb.32 Invasions tiefe und Intensität nach 24 Stunden bei variierender Zellzahl

Abb.32 Die Messung des Intensitätssignals im Invasionsassay nach einer vorgegebenen Zeit korrelierte mit den ansteigend zugesetzten Zellzahlen. Das Intensitätssignal ist eine einfach zu bestimmende quantifizierbare Größe, die der Anzahl an Zellen im Hirnschnitt entspricht.

Andererseits bietet der Versuchsansatz die Möglichkeit, differierende Zellzahlen korrekt wiederzugeben – eine wesentliche Voraussetzung, um zum Beispiel den Einfluß invasionshemmender Substanzen zu bestimmen.

Die Invasionstiefe (nach 24 Stunden) wurde durch die Zellzahl, die im Versuch eingesetzt wurde, nicht beeinflusst. Eine gegenseitig hemmende oder fördernde Komponente der einzelnen Zellen war nicht nachweisbar. Die maximal erreichte Tiefe im Hirnschnitt nach 24 Stunden lag bei 25 µm.

Abb.33 Die Invasionstiefe konnte auch zur Inkubationszeit korreliert werden. Bei konstanter Zellzahl (30000 Zellen pro Ansatz) konnten nur wenige Zellen nach 12 Stunden nachgewiesen werden. Diese Zellen waren nahe der Oberfläche des Schnittes im Gewebe nachgewiesen. Nach 18 und 24 Stunden stiegen die Invasionstiefe und das Maximum des Intensitätssignals an. Dies entspricht mehr Zellen weiter in der Tiefe des Schnittes. Nach 48 Stunden hatte die Mehrzahl der Zellen die Unterseite des Schnittes erreicht. Über die gesamte Breite des Hirnschnittes war jedoch ein höheres Intensitätssignal zu messen – Zellen befanden sich in allen Ebenen des Schnittes. Dies läßt die Vermutung nahe, daß die einzelnen Zellen ein unterschiedliches Invsionpotential besitzen oder sich in unterschiedlichen Aktivitätszuständen befinden.



Median,
1.-3. Quartil,
Extreme

Sowohl in der Konfokalen Mikroskopie wie auch in der Lichtmikroskopie konnten Zellen nur in den Bereichen gefunden werden, in denen Hirn den Filter bedeckte. Da das Hirn selbst nicht fluoresziert, wären am Filter adhärierende Zellen unter dem Konfokalen Mikroskop mit einer noch größeren Sicherheit als in der Papanicolaou Färbung nachzuweisen gewesen. Auch im Inhalt des unteren Schachtes waren keine fluoreszierenden Zellen nachzuweisen.

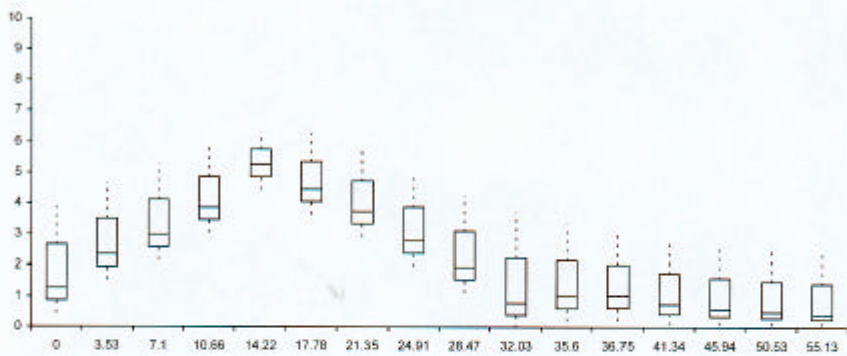
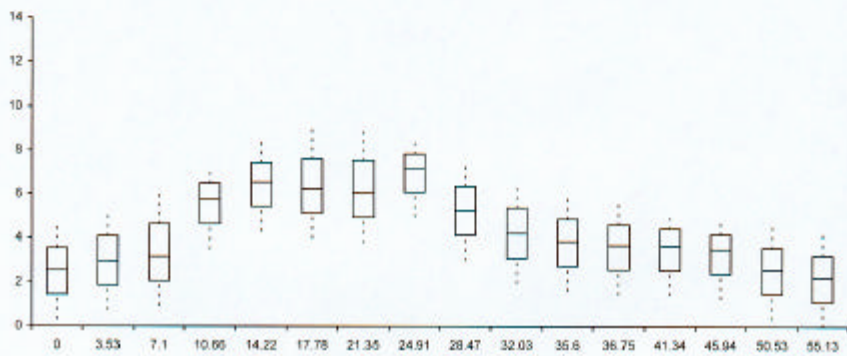
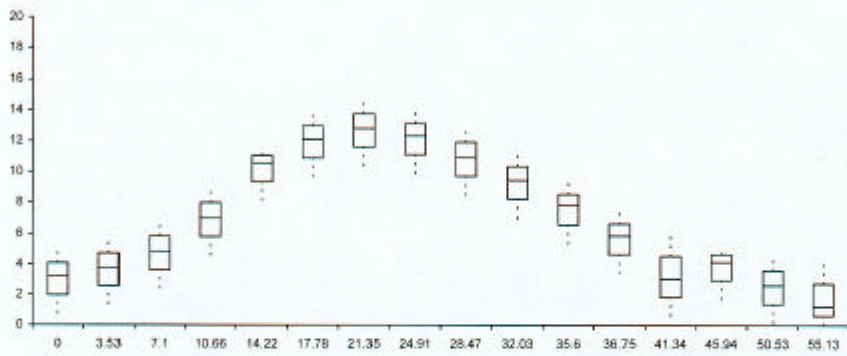
Der Einfluß invasionshemmender Substanzen (Vincristin, Taxol) wurde auch unter dem Konfokalen Mikroskop gemessen. Korrelierend zu den Ergebnissen der Lichtmikroskopie führte die Behandlung der Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an Taxol zu einer Reduktion der Zellzahl, was sich auch in der Quantifizierung mittels Intensitätsmessung widerspiegelt.

Abb. 34 10µg/ml Taxol hatte nur einen geringen Effekt auf die im Hirnschnitt nachgewiesenen Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Invasionstiefe blieb unbeeinflusst. Mit ansteigender Taxolkonzentration sank die Anzahl der Zellen, die den Schnitt invadierten (repräsentiert durch ein sinkendes Intensitätsmaximum). Gleichzeitig nahm auch deren Potential ab, im Hirnschnitt größere Tiefen innerhalb derselben Zeit zu erreichen.

Abb. 34

Taxol in ansteigender Konzentration

Box-and whisker- Plot



Median,
1.-3. Quartile,
Extreme

4. Lichtmikroskopische Analyse von Semi-Dünnschnitten

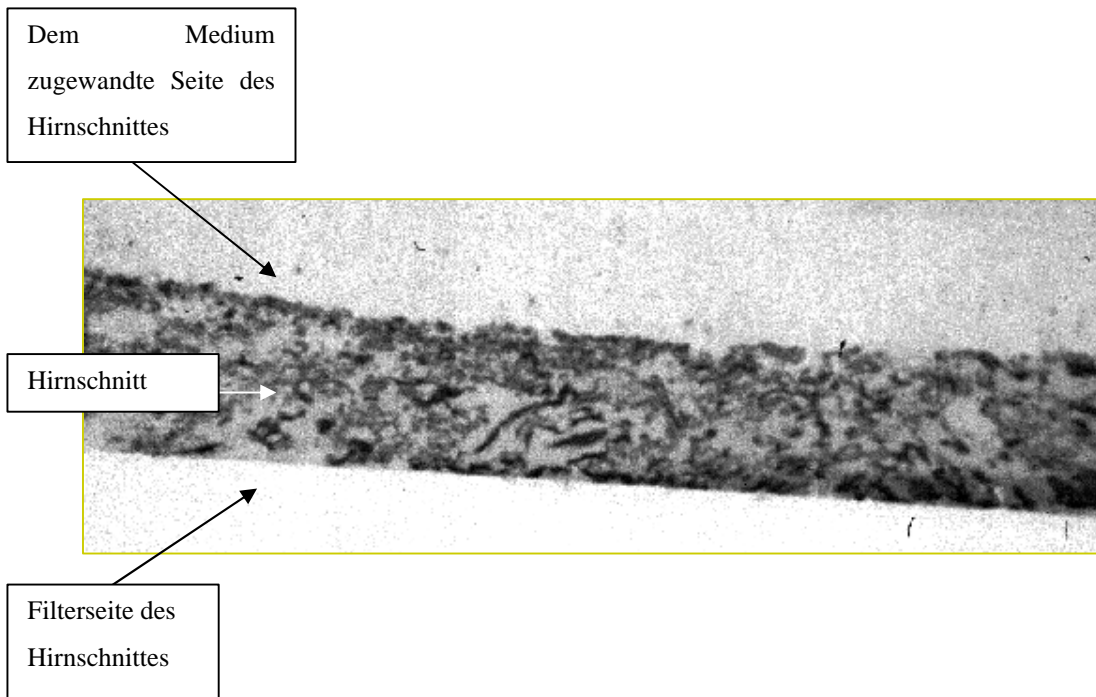


Abb. 35 Die Kontrollen (gleichbehandelter Hirnschnitt ohne Gliomzellen) zeigten, daß der Hirnschnitt in seiner Struktur und Oberfläche nach bis zu 48 Stunden gut erhalten werden konnte. Er wurde durch das Medium nicht zersetzt und stellte eine homogene Invasionsoberfläche den invadierenden Zellen entgegen.

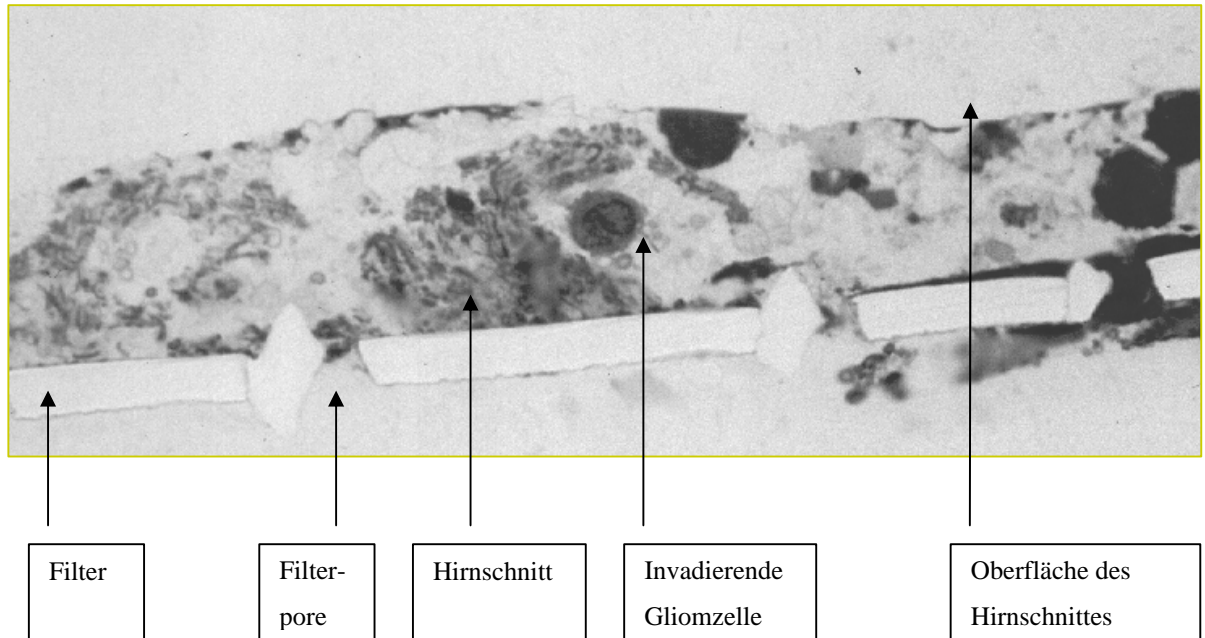


Abb. 36 Nach 24 Stunden Inkubationszeit konnten Zellen tief im Hirnschnitt nachgewiesen werden, aber auch nahe der Oberfläche des Hirnschnittes. Die Struktur des Schnittes wurde in unmittelbarer Nähe zu den invadierenden Zellen durch diese zerstört. Einige Zellen sowohl in der Tiefe wie auch an der Oberfläche des Hirnschnittes zeigten unter Methylen Blau eine mehr kräftigere Anfärbung als andere.

5. Elektronenmikroskopische Analyse von Ultra-Dünnschnitten

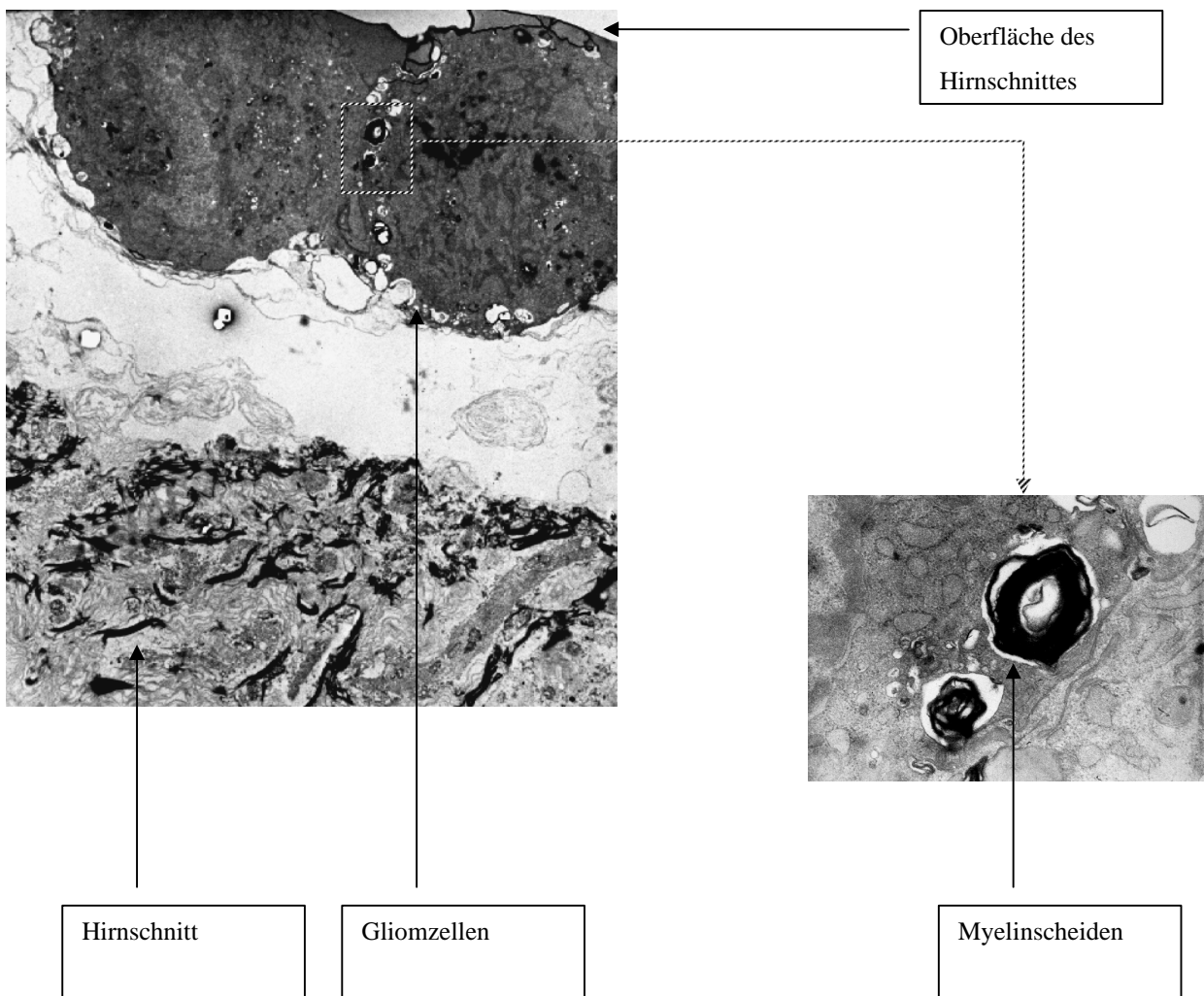


Abb. 37 Auch nachdem der Hirnschnitt dem Medium ausgesetzt war, stellten sich die neuralen Strukturen gut erhalten dar. Axone, astrozytäre Zellfortsätze, Zellsomata glialer und neuronaler Zellen können unterschieden werden. Von den zahlreichen neuralen Strukturen sind die Myelinscheiden am besten erhalten. Die invadierenden Gliomzellen bilden einen „Hof“ im Schnitt, in den sie dann einwandern. Die Auseinandersetzung mit Myelin ist im Detail vergrößert.

An der Oberfläche des Hirnschnittes, die dem Medium ausgesetzt war stellte sich ein leicht beginnender Prozess der Dysorganisation von Myelin und anderen neuronalen Strukturen dar. Dieser Prozess könnte mit verantwortlich für die vollständige Zerstörung des Hirnschnittes sein, wenn der untere Kammerschacht mit Medium vollständig aufgefüllt wird. Dies führt zu einer Auflösung des Schnittes von beiden Seiten in erheblich stärkerem Maße, so daß nach 24 Stunden kein Hirnschnitt mehr nachzuweisen ist. Bei halbgefülltem unterem Schacht bleibt der Hirnschnitt weitestgehend intakt.

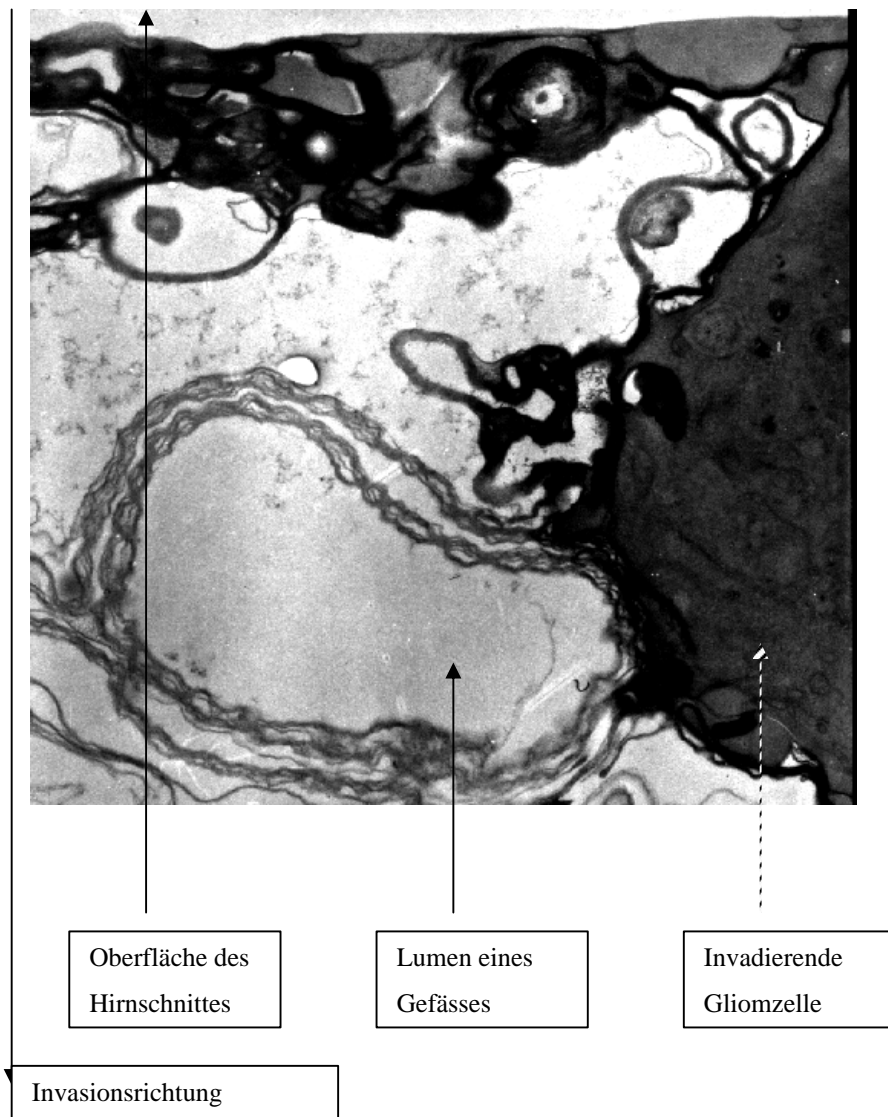
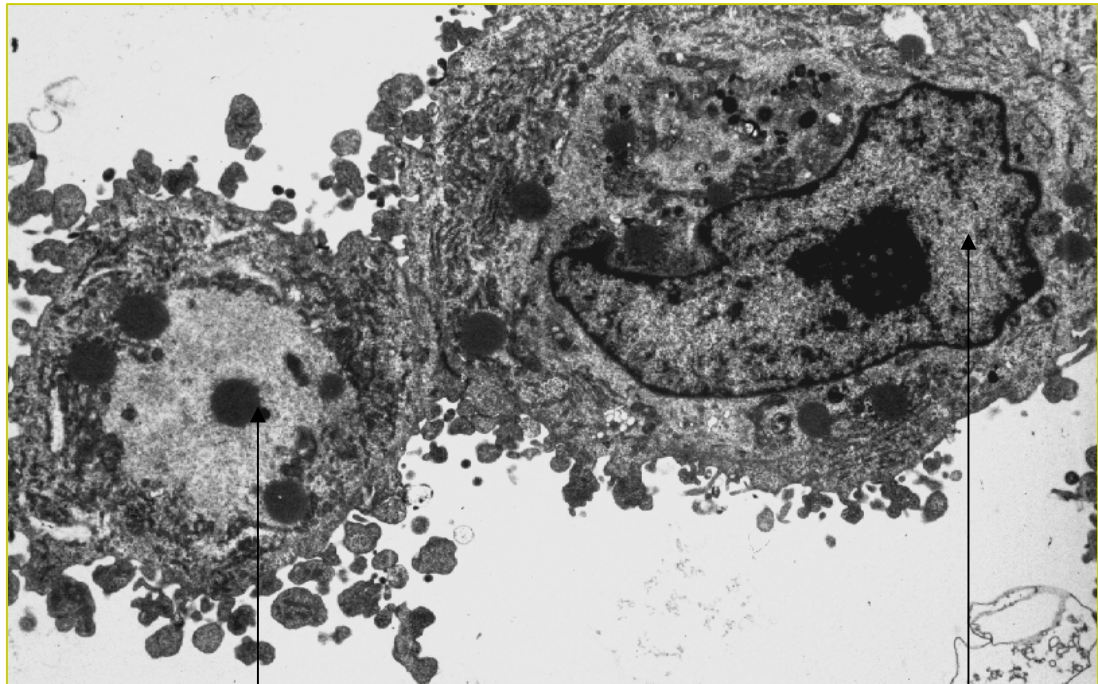


Abb. 38 Detail einer invadierenden Gliomzelle in Auseinandersetzung mit Elementen des Hirnschnittes



Sekretorische
Vesikel

Gliomzelle mit
aktiviertem
Zellkern

Abb. 39 Manche invadierenden Gliomzellen zeigten eine ausgeprägte sekretorische Aktivität. Dies könnte zum Beispiel einer Produktion und Freisetzung von Proteasen entsprechen.

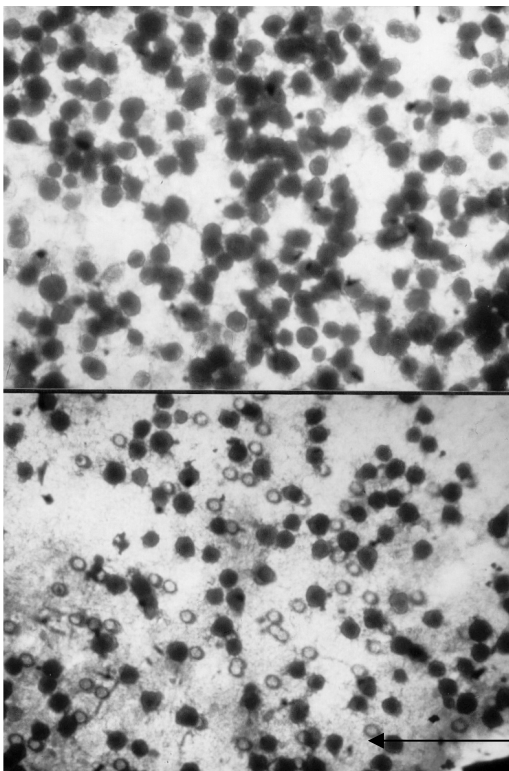


Abb. 40: Bei Einsatz verschiedener anatomischer Regionen innerhalb einer Versuchsreihe kann durch Zellzählung im Lichtmikroskop die Invasionsrate im jeweiligen Substrat bestimmt werden. Die Invasion im parietalen Kortex (unten) ist im Vergleich zur weißen Substanz (oben) vermindert.

Vergrößerung: 10x

Filterporen

6. Zusammenfassung

Das hier vorgestellte, neu entwickelte Verfahren zur Untersuchung der Invasionseigenschaften humaner Gliomzellen ist eine Erweiterung des Repertoires bisheriger in vitro Methoden.

Der erarbeitete Versuchsaufbau bietet folgende Vorteile:

a) Invasionssubstrat

- Die Untersuchung der Glioblastom-Invasion wird am Gehirngewebe adulter Lebewesen durchgeführt, nicht an Föten, was auch der Epidemiologie der Glioblastome in vivo entspricht. Eine fetale Matrix, wie sie bei Spheroid-Konfrontationskulturen zum verwendet wird, konnte so umgangen werden.
- Es ist möglich, die Invasion an einem Hirnschnitt vom Marklager ohne Beimengung anderer anatomischer Regionen zu untersuchen.
- Es könnten jedoch beliebige andere anatomische Gehirnregionen (zum Beispiel Graue Substanz) eingesetzt und selektiv untersucht werden.
- Es sind keine fixierenden Zusätze oder Vorbehandlungen notwendig, um den Hirnschnitt in seiner Struktur zu erhalten. Die Invasion erfolgt ausschließlich in Auseinandersetzung mit dem unbehandelten Hirnschnitt ohne Beteiligung einer (artificialen) Fixierung.
- Die Anatomie des Hirnschnittes wird in ihrer dreidimensionalen Struktur erhalten, die Invasion findet in Abhängigkeit von ihr statt. Die Tumorzellen wandern in vitro entlang der Myelinfaserichtung, was der Situation in vivo entspricht.
- Den invadierenden Zellen wird eine – innerhalb einer Versuchsreihe – konstante Menge an Invasionssubstrat angeboten. Dessen Volumen ist definiert durch die Schnittdicke und den Durchmesser der Hohlschraube .
- Die Invasion erfolgt unabhängig von Invasionsfördernden Substanzen (sogenannten Chemoattractants), nur in Auseinandersetzung mit dem Gehirnschnitt.

b) Validität und Reliabilität

- Die Invasion ist auf die Gehirnstrukturen beschränkt und nicht das Ergebnis einer Anheftung am unbeschichteten Filter.
- Der Versuchsaufbau mit einer homogenen Proteinschicht (Poly-L-Lysin) an Stelle des Hirnschnittes bei ansonsten gleichen Versuchsbedingungen läßt ebenfalls eine Invasion zu.
- Ansteigend zugesetzte Zellzahlen werden als ansteigende Invasionsraten im Hirnschnitt nachgewiesen.
- Höhere Zellzahlen erreichen innerhalb desselben Zeitraums eine konstante Tiefe innerhalb des Schnittes.
- Ansteigende Konzentrationen von anti-invasiven Substanzen (Vincristin, Taxol) werden durch eine entsprechend verminderte Invasion wiedergegeben.
- Mit Alkohol abgetötete Zellen, die keine Invasion mehr vollführen können, werden auch nicht im Hirnschnitt nachgewiesen. Die hier erfassten Zellen sind somit stets auch aktiv den Hirnschnitt invadierende, lebende Zellen.
- Die invadierten Zellen zeigen einen in situ nachweisbaren Stoffwechsel.
- Die Analyse der Zellinvasion ist sowohl lichtmikroskopisch wie auch im konfokalen Lasermikroskop (mit GFP-transfizierten Zellen) möglich. Hier kann neben der Zellmorphologie auch die Invasionstiefe im Schnitt, und die Invasionsgeschwindigkeit analysiert werden.
- Die Versuchsdurchführung ist schnell (24 Stunden), einfach, reproduzierbar und kostenarm.

Diskussion

1. Klinik der Gliominvasion

Die diffuse Infiltration des umliegenden Gewebes durch Gliomzellen ist ein entscheidender Faktor für das Rezidivtumorstadium und damit für die Morbidität und Mortalität betroffener Patienten. Dabei spielt weniger die systemische Metastasierung eine pathogenetische Rolle für das Versagen lokaler Therapien als vielmehr die extensive Invasion der unmittelbaren Umgebung⁵ und selbst weit entfernter Gehirnregionen, zum Beispiel der kontralateralen Hemisphäre. Die Invasion bevorzugt anatomische Landmarken: Prädilektionsstellen sind parallele und kreuzende Bahnen der weißen Substanz, zum Beispiel im Bereich des Balkens, der Capsula interna und der Sehbahn. Diese klinische Beobachtung konnte auch im Tierversuch bestätigt werden⁸. Die Invasion ist ein komplexer Prozeß einer Interaktion der Tumorzelle mit ihrer Umgebung. Im humanen Gehirn sind Zellen der Mikroglia entscheidend an immunologischen Prozessen beteiligt. Ihnen werden phänotypische und funktionelle Charakteristika zugeschrieben, die denen von Makrophagen und Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen ähneln⁹. Gliome induzieren die Neubildung von Gefäßen, die Neoangiogenese.

Eine entscheidende Rolle kommt bei der Invasion jedoch der cerebralen Extrazellulärmatrix zu, die das Invasionssubstrat der Gliomzellen darstellt.

1.1. Abhängigkeit der Invasion von der Umgebung

Extrazellulärmatrix

Die Extrazellulärmatrix wird als das natürlich vorkommende extrazelluläre Substrat beschrieben, in dem Zellen *in vivo* migrieren, proliferieren und sich differenzieren¹⁰. Eine einmal synthetisierte Extrazellulärmatrix ist unter normalen Bedingungen relativ stabil, bei Traumen, Infektionen oder Neoplasien kann sie allerdings substanziellen Änderungen ihrer Struktur und Funktion unterliegen. Die Extrazellulärmatrix des ZNS ist weit weniger untersucht als die anderer Organe¹¹.

Hinzu kommt, daß eine vollständige biochemische Analyse der Matrix dadurch erschwert ist, daß eine scharfe, statische Grenze zwischen Zelle und Extrazellulärraum schwierig zu definieren ist und sich beide gegenseitig beeinflussen. Deshalb wird die

Zelle mit ihrer umgebenden Matrix als „strukturelles und funktionelles Kontinuum“ bezeichnet.

Von den Komponenten der Extrazellulärmatrix des ZNS wurden regionspezifisch bestimmt: Kollagen Typ I und III und Fibronectin im Bereich der Glia limitans externa und der Gefäße, Glykosaminoglykane, Hyaluronsäure, vorwiegend in der weißen Substanz Hyaluronectin¹⁰. Eine Sonderstellung nehmen innerhalb der Extrazellulärmatrix des menschlichen Körpers geformte Komponenten ein. Im Parenchym des ZNS ist der Extrazellulärraum vorwiegend amorph, eine Basalmembran existiert lediglich im Bereich der Lamina limitans externa und cerebraler Gefäße.

Interaktion der Tumorzelle mit der Extrazellulärmatrix

Die Interaktion der invadierenden Gliomzelle mit dem Extrazellulärraum ist noch nicht vollständig erfasst. Spezifische extrazelluläre Proteine des ZNS beeinflussen auf mechanischem und chemischem Weg die Gestalt und den Stoffwechsel der Zelle über die Zellmembran.

Eine gerichtete Zellbewegung entlang eines Konzentrationsgradienten kleiner Moleküle, die von Oberflächenrezeptoren erkannt werden bezeichnet man als Chemotaxis. Die Haptotaxis ist hingegen eine Rezeptor-vermittelte Bewegung entlang adhäsiver Extrazellulär-Matrix-Proteine¹².

Einleitung der Invasion durch die Adhäsion

Die Invasion wird eingeleitet von der Adhäsion, dem Anheften der Tumorzelle an einer Matrixkomponente. Dieses Anheften – der Kontakt – der Zelle mit dem Substrat darf nicht zu innig sein, da es sonst lediglich zu einer Adhäsion kommt- die Zelle bewegt sich nicht weiter. Der Kontakt muß auch schwach genug sein, um die Zelle sich von ihm entfernen zu lassen. Es konnte nachgewiesen werden, daß ein direkter Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der migrierenden Zelle und Rezeptor- und Ligand-Konzentrationen beziehungsweise der Rezeptor-Ligand-Affinität besteht. Bei hoher Liganden-Konzentration ist eine niedrigere Rezeptor-Expression für eine schnellere Bewegung notwendig und umgekehrt¹².

Die Tumorzellen „erkennen“ ihre Umgebung mit Hilfe einer Vielzahl von Transmembran-Rezeptoren: Cadherine, Zell-Adhäsions-Moleküle (Cell attachment molecules =CAM) oder Integrine¹³. Diese Integrine sind keineswegs starr in der Zellmembran fixiert, vielmehr kommt es beim Anbinden einzelner Liganden zu einer

Ansammlung weiterer Rezeptoren in dieser Region der Zellmembran, in der sie „schwimmen“¹⁴. Eine weiter zunehmende Adhäsion am Substrat führt schließlich zur Migration der Zelle in diese Richtung¹².

1.2. Veränderung der Umgebung der Tumorzelle durch Sekretion

Tumorzellen sezernieren Proteasen, wie zum Beispiel die Metalloproteinasen (MMPs), Cysteinproteasen und Serinproteasen zum Verdau der Extrazellulärmatrix¹⁵, in die sie dann hineinmigrieren. Die Produktion von Proteasen ist ein physiologischer Prozeß auch im gesunden Gewebe, in dem sich neben diesen Proteasen auch deren Inhibitoren (zum Beispiel tissue inhibitors of metalloproteases = TIMPs) finden und die mit diesen ein Gleichgewicht bilden¹⁶.

Unter den Serinproteasen sind die Plasminogenaktivatoren (PA) von besonderer Bedeutung. Diese sind in zwei Formen in den Gewebeabbau im Rahmen der Tumordinvasion involviert: als Urokinasetyp (uPA) und als Gewebetyp (tPA). Diese Plasminogenaktivatoren wandeln das inaktive extrazelluläre Plasminogen in aktives Plasmin um. Plasmin ist wiederum eine Protease, die Kollagen (deren nicht triple-helikalen Anteile) und andere extrazelluläre Proteine abbauen kann. Humane und Ratten-Gliomzellen produzieren Plasminogenaktivatoren, insbesondere uPA in vivo und in vitro. Eine andere Serinprotease ist die Guanidinbenzoatase (GBZ), die vorwiegend in Zusammenhang mit migrierenden Zellen gebracht wird, wo sie vor allem am voranrückenden Ende der Tumormasse gefunden wird. GBZ spaltet die Verbindungspeptide zu Fibronectin und scheint an der Loslösung von Zellen von ihrer Umgebung innerhalb der Extrazellulärmatrix beteiligt zu sein, um die Migration in den frei gewordenen Raum zu ermöglichen.

Mehrere Matrix Metalloproteinasen (MMP`s), die für die Tumorzellinvasion von Bedeutung sind, wurden in der Vergangenheit beschrieben. An Melanom- und Mammakarzinomzellen konnte eine Interaktion von MMP9 und dem Oberflächenrezeptor CD44 nachgewiesen werden. Beide bilden einen Komplex, der an die Hyaluronsäure der Extrazellulärmatrix bindet und die Kollagen Typ IV – Spaltung im Rahmen der Invasion fördert¹⁷.

Auch sogenannte „freie Sauerstoffradikale“ werden von invadierenden Tumorzellen unabhängig von den Proteasen sezerniert, die zu einem Abbau der Extrazellulärmatrix beitragen¹⁸.

Zusätzlich zu den Proteasen können Gliomzellen extrazelluläre Matrix-Moleküle sezernieren, denen eine „permissive“ Funktion zugeschrieben wird - wie zum Beispiel Tenascin, welches Axone auseinander spreizen oder Hyaluronsäure, die auf Grund ihres höheren Wassergehaltes einen Weg mit geringerem Widerstand eröffnen könnte. Dies wurde unter anderem auch aus der Beobachtung gefolgert, daß mit steigendem Malignitätsgrad das Ausmaß der Hyaluronsäureproduktion in Gliomen zunahm¹⁶. Zusammenfassend ist die Invasion ist nicht etwa ein simpler Vorgang, bei dem die Tumorzelle ihre Umgebung wahllos zerstört und in den geschaffenen Raum hineinwandert. Vielmehr stellt sie das Ergebnis einer komplexen Interaktion zwischen Zelle und Matrix dar. Im Laborversuch wird diese Interaktion wesentlich davon beeinflusst, wie die Matrix beschaffen ist, die der Tumorzelle angeboten wird. Die Übertragbarkeit jedes Laborversuches auf die Situation in vivo muß sich daran messen lassen, wie ähnlich die Invasionsmatrix der Situation in vivo ist.

Die Invasion ist für den klinischen Verlauf der Erkrankung entscheidend und deshalb Untersuchungsgegenstand zahlreicher Laborverfahren, um eine bessere Einsicht in ihre vielfältigen Regulationsmechanismen zu bekommen und Behandlungsstrategien zu entwickeln.

2. Versuche zur Untersuchung der Invasion

2.1. Tierversuche

Durch die Implantation von Sphroiden (kugeligen Tumorzell-Aggregaten, die unter speziellen Kulturbedingungen in vitro erzeugt werden können) in den Kortex von jungen Ratten kann das Invasionsverhalten von Gliomzellen in vivo studiert werden. Dabei sind insbesondere systemische Vorgänge zwischen Tumor und Wirt, wie die Interaktion mit dem Immunsystem des Tieres oder die Angiogenese von besonderem Interesse, da sie nicht in vitro simuliert werden können.

Es gelang bei solchen Versuchen auch, eine Invasion der Zellen entlang der Bahnen der weißen Substanz nachzuweisen – so wie es auch in klinischen Untersuchungen für humane Tumoren in vivo beschrieben ist⁸.

Allerdings ist hier lediglich eine qualitative Aussage möglich, eine Quantifizierung ist schwierig.

Jede Aussage dieser Tierversuche kann sich immer nur auf das Verhalten von Rattengliomzellen im Rattengehirn beschränken. Nicht jedes Ergebnis kann auf den Menschen übertragen werden. Zudem werden die Spheroide in den Kortex der Ratte implantiert, einer anatomischen Region, die beim Menschen nicht Prädilektionsstelle für gliomatöse Tumoren ist. Auch ist das Verhältnis von grauer zu weißer Substanz bei Mensch und Ratte unterschiedlich.

Es können an diesem Modell bei immunkompetenten Ratten auch nur Gliomzelllinien der Ratte untersucht werden. Menschliche Zelllinien rufen eine starke Immunreaktion hervor, die zu einer Zerstörung der Spheroide führt¹⁹.

2.2. In vitro Versuche zur Invasivität

2.2.1. Konfrontationskulturen von Zellaggregaten

Tumorzellen bilden unter speziellen Kulturbedingungen Spheroide (dreidimensionale Zellgebilde) aus, deren Eigenschaften eher der Situation in vivo ähneln als Einzelzellsuspensionen. Diese Tumorzell-Spheroide wurden mit Spheroide anderer Gewebe konfrontiert, in die sie dann invadierten. Meist werden hierzu fetale (Ratten) Gehirnzellverbände verwendet.

Jedoch besitzen auch die fetalen Zellen selbst ein enormes invasives Potential, so daß immer unterschieden werden muß, welches Spheroid das andere invadierte. Läßt man hingegen die fetalen Spheroide reifen (20Tage), so differenzieren sie sich aus in eine dreidimensionale Struktur mit etwa 28% Astrozyten, 20% Oligodendrozyten und 28% Neuronen. Sie besitzen jedoch keine klar geformte parallele Struktur dreidimensionaler Myelinfasern. Weiterhin wurden Ependymzellen, Makrophagen und Mikrogliazellen beschrieben. Diese reifen Spheroide haben ihr invasives Potential verloren.. Deshalb konnten fetale Zell-Spheroide zwar im Rattengehirn gut invadieren, in ein reifes Spheroid jedoch nicht²⁰. Dies ist zwar nicht unmittelbar auf die Gliomzellinvasion zu übertragen, zeigt jedoch, daß auch die bloße Zusammensetzung aus identischen „Bausteinen“ noch nicht den gleichen „Bauplan“ bedeutet.

2.2.2. Versuche zur Invasion von Basalmembranen und lebendem Gewebe in vitro

Um den Vorgang der Invasion von menschlichen Tumorzellen beliebiger Herkunft zu untersuchen, wurden verschiedene Versuchsmethoden etabliert, um den Tumorzellen möglichst „naturnahe“ Substrate als Zielgewebe anzubieten. Dabei wurden rekonstruierte Basalmembranen zum Beispiel Matrigel im Rahmen des Boyden Kammer Versuches), devitalisierte natürliche Membranen^{21 22} oder lebende Organgewebe kulturen wie etwa bronchiale Mucosa²³ verwendet. Beispielsweise wurde eine Membran aus Amnionepithel mit dem anliegenden avaskulären Stroma aus der Plazenta präpariert. Deren Aussagekraft wurde daran gemessen, daß der erste Schritt zur Metastasierung - die Invasion dieser „Basalmembran“ durch metastasierende Tumoren (Melanomzelllinien) - in vitro simuliert wird²¹. Ebenso erfolgte die Präparation einer Basalmembran aus der bovinen Linsenkapsel, in die die Autoren (Mäuse-) Mammaadenokarzinom-, (Mäuse-)Melanom- und (Ratten-)Hepatokarzinom-Zell-Linien invadieren ließen. Auch hier wurde die Invasion in vitro mit dem Invasions- und Metastasierungsverhalten in vivo korreliert²².

Da die Invasion ein komplexes Zusammenspiel von Tumorzelle und Umgebung ist (wie oben gezeigt) ist das Ergebnis der Invasionsversuche stark abhängig von dem gewählten Invasionssubstrat. Im Folgenden werden deshalb einige etablierte Methoden mit anderen Substraten mit dem vorliegenden Modell verglichen. Eine der am häufigsten verwendeten in vitro-Methoden im Bereich der Gliomforschung ist der Boyden Kammer Versuch, auf den deshalb weiter unten noch näher eingegangen wird.

2.2.3. Dreidimensionale Kollagen-Invasionsversuche

Um die Invasion eines dreidimensionalen Tumorzell-Verbandes zu untersuchen, wurden Spheroide in Kollagen TypI – Gele implantiert. Dabei wurde bovines Kollagen enzymatisch vorbehandelt und anschließend zum Gelieren gebracht. Es kam es zu einem radiären Auswandern einzelner Zellen aus dem Zellverband. Die Autoren konnten mit Hilfe dieses Modells die Interaktionen zwischen einzelnen Zellen im Zellverband untersuchen wie auch die Interaktion der invadierenden Zellen mit verschiedenen Matrixkomponenten, die dem Gel selektiv zugesetzt wurden (62). Ratten-(C6)-Gliomzelllinien und fetale Astrozyten wurden in ihrem Invasionsverhalten

in dieser Matrix untersucht¹⁹. Beide Zellarten konnten innerhalb eines Tages durch 1,5cm dieser Matrix migrieren. Innerhalb von 2 bis 3 Tagen hatten die Zellen die Matrix komplett zerstört. Zum Vergleich: an derselben Zelllinie konnte in Matrigel nur eine maximale Invasionstiefe von 1,8mm in 4 Tagen nachgewiesen werden²⁴. Die Unterschiede liegen in der Zusammensetzung und der Beschaffenheit beider Substrate: Während Matrigel etwa 25% Kollagen Typ IV enthält, bestehen die angeführten Kollagengele nur aus Kollagen Typ I. Während die Kollagengele ein offenes Netzwerk darstellten, ist Matrigel eine kompakte Substanz, die ein größeres physikalisches Hindernis darstellt.

In anderen Kollagen-Gel-Versuchen wurde Kollagen aus Schweinehaut verwendet. Die Autoren nutzten dieses System, um Gliomzellen über lange Zeit (14 Tage) in Kultur zu halten und die Sensitivität der Tumoren verschiedener Patienten für Chemotherapeutika zu testen. Sie stellten eine weit geringere Invasivität fest: Nach 7 Tagen waren erst wenige Zellen im Gel nachzuweisen, nach 14 Tagen kam es erst zur vollständigen Invasion und Formation dreidimensionaler Tumorgebilde.

Auch diese Kollagen-Gel-Modelle beschränken ihre Aussagekraft auf die Zusammensetzung der gewählten Matrix. In vivo ist das Invasionssubstrat – die weiße Substanz - ein komplexes Netzwerk unterschiedlichster Proteine und neuraler Strukturen in einer fein differenzierten Struktur, kein homogenes Gel eines einzelnen Proteins.

2.2.4. Matrigel-Invasionsversuche

Beschreibung der Boyden Kammer

Eines der am häufigsten verwendeten in vitro Systeme ist die Messung der Invasionsrate anhand des sogenannten Boyden Kammer Versuches. Da zudem Ähnlichkeiten mit dem hier vorgestellten Modell bestehen, wird auf jenen etwas näher eingegangen.

Der Boyden Kammer Versuch besteht ebenfalls aus zwei durch eine poröse Filtermembran getrennten Kammern, von dem einige Charakteristika für das vorliegende Modell abgeleitet wurden, zu dem jedoch auch entscheidende Unterschiede bestehen:

Matrigel

- Beschreibung -

Der Filter im Boyden Kammer Versuch wird mit Matrigel - einer Mischung extrazellulärer Matrixkomponenten – beschichtet. Matrigel ist ein Produkt des Engelbroth-Holm-Swarm Sarkoms der Maus. Seine Hauptkomponenten sind Laminin mit geringem Anteil an Kollagen IV, Heparan-Sulfat-Proteoglykane, Entactin und Nidogen⁴.

Während Basalmembranen und andere extrazelluläre Matrices komplexe dreidimensionale Netzwerke sind, stellt Matrigel eine relativ einfache, homogene Substanz dar. Im Matrigel überwiegen zwei weitgehend voneinander unabhängige homopolymere Netzwerke aus Laminin und Kollagen Typ IV, die über Entactin- und Heparan-Sulfat-Proteoglykan-Brücken miteinander verbunden sind. Diese dreidimensionale Struktur ähnelt der komplex strukturierten Extrazellulärmatrix in vivo nur gering²⁵.

Nicht nur die räumliche Struktur des Matrigels, auch die molekulare Zusammensetzung (des Laminins und des Kollagens Typ IV) unterscheidet sich von der humaner Basalmembranen^{25 26}.

- Vergleich mit dem vorliegenden Modell -

Das Marklager des adulten Gehirns stellt in vivo das bevorzugte Substrat humaner Gliomzellen dar und wird hier den Zellen als Invasionsmatrix in vitro nahezu unverändert angeboten. Chemische oder sonstige künstliche Fixierungsmethoden zum Erhalt des Schnittes konnten umgangen werden.

- Vorteile des Schweinehirnes als Invasionssubstrat -

Das Gehirn des Schweins wurde bewußt gewählt, um ein Substrat zur Verfügung zu haben, das in seiner Zusammensetzung dem menschlichen Gehirn möglichst ähnlich und in beliebiger Menge verfügbar ist.

Es bietet den Vorteil, daß es ausreichend groß ist, um die Fläche von 18mm², die den Zellen angeboten wird, ausschließlich mit weißer Substanz abzudecken. Lediglich auf eine schnellstmögliche Aufbereitung nach dem Tod des Schweines ist zu achten, um die sensiblen Myelinscheiden zu erhalten.

Das Gehirn des Schweines bietet als Säugerhirn anatomische Ähnlichkeiten mit dem des Menschen. Es gibt ausführliche anatomische Abhandlungen, die die Anatomie und Histomorphologie des Schweinehirnes beschreiben²⁷⁻³⁰.

Aus Schweinehirnen wurden Kulturen von Endothelzellen und Mikroglia angelegt. Es gibt Untersuchungen, die eine größere Ähnlichkeit der Mikroglia mit der des menschlichen Gehirnes nachweist als dies für das Gehirn von Nagern zutrifft³¹. Schließlich bietet das Gehirn des Schweines auch eine vergleichbare Histopathologie, da auch hier astrozytäre Tumoren beschrieben sind^{32;33}.

- Nachteile des Schweinehirnes als Invasionssubstrat -

Die menschlichen Tumorzellen werden mit einem Material einer fremden Spezies (Schwein) konfrontiert. Auch wenn die oben genannten Ähnlichkeiten mit dem menschlichen Gehirn bestehen, läßt sich nicht ausschließen, daß die Ergebnisse dadurch negativ beeinflusst werden. Die Verwendung von humanem Material als Invasionsmatrix ist zwar denkbar (etwa nach Hemisphärektomien oder nach epilepsiechirurgischen Eingriffen), es ist aber für die Routineanwendung doch zu selten erhältlich. Für ausgewählte Fragestellungen könnte jedoch ohne jede Umstellung des Versuchsaufbaus humanes Gewebe zur Anwendung kommen.

Verglichen mit anderen häufig verwendeten *in vitro*-Invasionsmatrices ist die Ähnlichkeit des Marklagers vom Schwein mit dem Invasionssubstrat humaner Gliome *in vivo* jedoch sehr viel größer. Solche anderen Invasionsmatrices wären zum Beispiel das vom Engelbroth-Holm-Swarm-Sarkom der Maus produzierte Proteingemisch - das Matrigel der Boyden Kammer Versuche (worauf weiter unten noch näher eingegangen wird) - oder andere homogene Proteingemische.

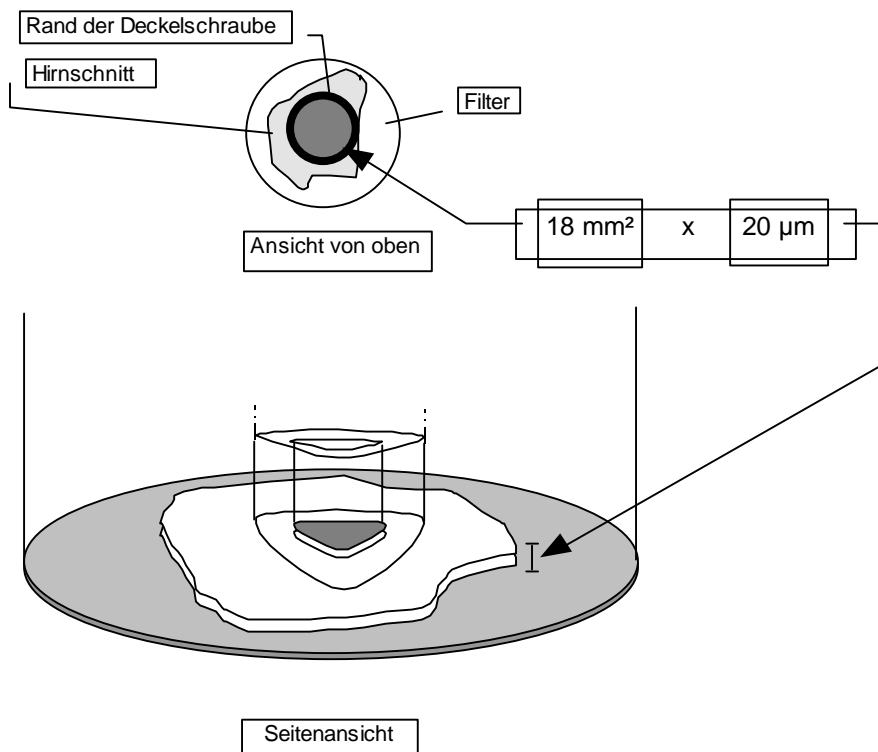
Die Untersuchung erfolgt am toten Gewebe, die *in vivo* stattfindende Interaktion mit Astrozyten, Mikrogliazellen oder Endothelzellen des Wirtes kann ein *in vitro* Versuch naturgemäß nicht erfassen. Auch die Substratversorgung im vitalen Hirngewebe ist denkbar anders als im nährstoffreichen Zellkulturmedium. Dennoch wird den Zellen *in vitro* ein strukturell erhaltenes Stück weißer Substanz zur Invasion angeboten. Durch die schnelle Präparation des Invasionssubstrates innerhalb von zwei Stunden nach der Tötung des Schweines ist der Erhalt der empfindlichen Myelinscheiden überhaupt erst möglich.

- Standardisierbarkeit des Invasionssubstrates -

Es sind immer nur Ergebnisse ein und derselben Versuchsreihe mit einem Gehirnpräparat miteinander vergleichbar:

- das Gehirn von verschiedenen Schweinen könnte (noch so geringe) Unterschiede in der Zusammensetzung aufweisen
- exakt dieselbe anatomische Region kann nicht mit beliebiger Genauigkeit aus verschiedenen Gehirnen präpariert werden
- innerhalb eines Blockes können verschiedene Faserverläufe kreuzen, die Einfluß auf die Invasion haben könnten.

Dies sind Nachteile, die in Kauf genommen werden müssen, wenn man bedenkt, daß der Vorteil der einzigartigen Komplexität des Invasionssubstrates „weiße Substanz“ auch ein Nachteil hinsichtlich der Standardisierbarkeit ist. Dennoch konnte durch die Art der Versuchsanordnung ein gewisses Maß an Standardisierbarkeit erreicht werden, da die Menge an Invasionssubstrat bei jedem Versuchsansatz konstant ist: Dessen Volumen ist durch die Schnittdicke ($20\mu\text{m}$) einerseits und die Fläche der Deckelschraube (18mm^2) andererseits gegeben.



Auch bei noch so sorgfältiger Behandlung des gefrorenen Hirnschnittes läßt sich eine vergleichbar homogene Abdeckung des porösen Filters wie mit dickflüssigen Substanzen (wie zum Beispiel das Matrigel der Boyden Kammer Versuche) nicht erreichen.

Gleichwohl konnte ausgeschlossen werden, daß Zellen fälschlich erfasst werden, die nicht mit dem Gehirn, sondern mit dem Filter interagieren.

Konzentration des Matrigels

- Beschreibung -

Die Konzentration des Matrigels, in das die Zellen einwandern sollen, läßt sich beliebig einstellen, was erheblichen Einfluß auf das Ergebnis hat. Mit zunehmender Matrigel-Konzentration sinkt die Invasionsrate. Als eine mögliche Konzentration werden $100\mu\text{g}/\text{cm}^3$ angegeben- ein relativ willkürlicher Wert, der sich nicht an in vivo gemessenen Proteinkonzentrationen orientiert⁴, sondern nur empirisch ermittelt wird. Manche Autoren favorisieren die halbe Konzentration ($50\mu\text{g}/\text{cm}^3$), ohne dies näher zu begründen, führen aber abweichende Ergebnisse auf unterschiedliche Konzentrationen zurück²⁶.

Dem Matrigel können beliebige Konzentrationen anderer Proteine zugesetzt werden, um deren Einfluß auf die Invasivität zu bestimmen.

- Vergleich mit dem vorliegenden Modell -

Die Menge des angebotenen Substrates im vorliegenden Versuchsaufbau läßt sich durch die Schnittdicke und die durch die Deckelschraube abgedeckte Fläche gut reproduzierbar steuern. Trotzdem muß davon ausgegangen werden, daß eine so homogene Abdeckung des porösen Filters wie durch Matrigel bedingt durch Schnittartefakte nicht immer erreicht wird. Eine Änderung der Zusammensetzung des Präparates (der Zusatz von einzelnen Proteinen oder Proteingemischen) ist nicht möglich, ohne die dreidimensionale Struktur des Hirnschnittes zu verändern. Angesichts der Zielsetzung, eine möglichst unveränderte Matrix den Gliomzellen anzubieten, erscheint dies auch nicht notwendig.

Aussagekraft der Invasion in Matrigel

- Beschreibung -

Die Invasion von Gliomzellen in Matrigel erfolgt durch Adhäsion, enzymatischen Abbau und Migration, erneute Adhäsion und Neubeginn des enzymatischen Abbaus. Dabei spielen nicht nur sezernierte Proteasen eine Rolle, es kommt auch unabhängig von ihnen zur Bildung von sogenannten „freien Sauerstoffradikalen“, die ebenfalls zum Abbau des Matrigels beitragen. Beim Abbau des Matrigels entstehen in Abhängigkeit von der Konzentration der freien Radikale in zeitlicher Reihenfolge Entactin, Laminin und Kollagen Typ IV. Weiterhin verursachen die freien Radikale eine partielle Dissoziation der Matrix¹⁸.

Diese Prozesse führen zur Bildung eines haarfeinen Tubulus im Matrigel, in den die einzelne Gliomzelle einwandert und ihn unidirektional verlängert²⁴.

In dicken Matrigelschichten konnte eine Invasionstiefe von 1,8mm in 4 Tagen für C6-Zell-Linien nachgewiesen werden. Anschließend stellten die Zellen eine weitere Invasion ein. Jeweils einzelne Zellen bildeten feine Gänge im Gel und an deren Enden kleine Taschen, in denen sich nach 7 Tagen kleine Zellaggregate als Vorläufer einer Tumorformation darstellten. Diese Zellaggregate entstanden teils durch Proliferation einzelner Zellen teils durch konfluierende Gänge mit mehreren Einzelzellen²⁴.

Die Beschreibungen der Ergebnisse müssen sich bei den typischen Boyden Kammer Versuchen immer auf das Zellverhalten in Matrigel beschränken. In wieweit das Matrigel von den Invasionssubstraten des Gehirns in vivo abweicht läßt sich - wie oben bereits dargestellt - nur vermuten. Es wird als rekonstruierte Basalmembran bezeichnet, mit deren Hilfe das Metastasierungsverhalten humaner (zum Beispiel gastrointestinaler Tumoren³⁴, Mamma-, Ovarial-, Endometriumskarzinome³⁵ Tumoren vorhergesagt werden sollte. Andere Autoren konnten diese Korrelation des klinischen Verhaltens metastasierender Tumore mit Matrigelversuchen hingegen widerlegen²⁶. Sie stellten eine Invasion des Matrigels durch normale (nicht transformierte) epitheliale (Keratinocyten) und mesenchymale (mesangiale, dermale Fibroblasten) Zellen fest. Hoch maligne Zellen mancher metastasierender Tumoren (Mamma-Adenokarzinome, Chorionkarzinome) konnten sie nicht zur Invasion in Matrigel bringen, andere (Fibrosarkome und Retikulumzellsarkome) hingegen schon. Sie folgerten, daß das Invasionsverhalten in Matrigel nicht mit dem malignen Phänotyp korreliert. Zudem

konnten sie nachweisen, daß eine Invasion in Matrigel *ohne* nennenswerten proteolytischen Abbau möglich ist – was einer Entsprechung der Invasion *in situ* mit enzymatischem Abbau der Matrix widerspricht.

Fetale Astrozyten können in Matrigel nicht invadieren – im Gegensatz zu Gliomzellen²⁴ und manchen metastasierenden Tumorzellen³⁴. Die Invasion der vaskulären Basalmembran des ZNS und damit die systemische Metastasierung oder die meningeale Dissemination sind jedoch seltenste Ereignisse im klinischen Verlauf von gliomatösen Prozessen, jedoch häufig bei metastasierenden Prozessen zu beobachten. Metastasen hingegen invadieren im amorphen Extrazellularraum des ZNS wenig⁵. Postuliert man nun, daß Matrigel ein gutes Imitat der Basalmembranen des ZNS ist, dann dürften Gliome nicht oder nur wenig invadieren, metastasierende Tumoren hingegen schon. Behauptet man hingegen, das Matrigel könnte den amorphen Extrazellularraum des ZNS gut imitieren, dann müssten gliomatöse Tumoren gut invadieren, Metastasen nicht. Beides ist nicht der Fall. Die Übertragbarkeit der Matrigelversuche auf das Invasionsverhalten von metastasierenden und gliomatösen Tumoren im Gehirn ist somit kritisch zu sehen⁵, auch, wenn man einschränkend mit berücksichtigen muß, daß *in vivo* weitere Faktoren wie Angiogenese und Immunantwort des Wirts eine Rolle spielen, die *in vitro* nicht imitiert werden können. Eine ähnliche Invasionsmorphologie mit unidirektionaler Ausbildung haarfeiner Gänge einzelner Zellen ließ sich bislang *in vivo* nicht nachweisen. Dennoch sind einzelne Vorläuferzellen weit entfernt vom Haupttumor zu finden, die den Ausgangspunkt für spätere Rezidive darstellen.

- Vergleich mit dem vorliegenden Modell -

Im vorliegenden Versuch konnten erstmals auch *in vitro* die *in vivo*-Invasionscharakteristika von Gliomen imitiert werden. *In vivo* erfolgt die Invasion bevorzugt entlang des vorgegebenen Substrates – parallelen myelinisierten Fasern des Marklagers, des Corpus callosum, der Sehstrahlung, der Capsula interna. Dazu korrelierend konnte bei dem vorliegenden Versuchsaufbau eine gesteigerte Invasion entlang der Faserrichtung des Hirnschnittes nachgewiesen werden.

Variationen des Matrigels

- Beschreibung -

Manche Autoren fügten dem Matrigel fehlende Einzelkomponenten hinzu, um deren Einfluß zu bestimmen, zum Beispiel Hyaluronsäure. Hyaluronsäure ist Bestandteil der cerebralen Extrazellulärmatrix und in gliomatösen Tumoren in erhöhter Konzentration vorhanden⁴. Dabei stellten die Autoren eine dosisabhängige Zunahme der Invasion einer Einzelzellsuspension in Matrigel mit Hyaluronsäure fest, eine Blockade des CD44-Rezeptors führte zu einer Abnahme. Dem widersprechen Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe, die C6-Zell-Spheroide in ein Kollagen Typ I – Gel implantierten und die Invasivität durch Zusatz von Hyaluronsäure dosisabhängig vermindern konnten¹². Kollagen IV, Laminin und Fibronectin hatten in Versuchen mit Monolayer-Zellkulturen einen nachweisbaren Einfluß auf die Zellmotilität, in Versuchsaufbauten mit Spheroïden in dreidimensionalen Gelen jedoch keinen konzentrationsabhängigen Einfluß auf die Invasivität in vitro.

- Vergleich mit dem vorliegenden Modell -

Nicht nur in vitro Versuche mit verschiedenen Parametern können zu untereinander differierenden Ergebnissen führen. Auch läßt das Invasionsverhalten in vitro nicht automatisch auf die Invasivität in vivo schließen.

Diese Unterschiede sind am ehesten auf Variationen des Milieus zurückzuführen, auf das die Tumorzellen treffen.

Da die vollkommen „natur-identische“ synthetische Produktion der cerebralen Extrazellulärmatrix aus Einzelkomponenten nicht möglich ist, war das Ziel, in dem vorliegenden Versuchsaufbau den Gehirnschnitt möglichst gut zu erhalten und als eine Art „black box“ den Tumorzellen anzubieten-ohne daß die molekularen Komponenten bis ins Detail bekannt wären. Die Ähnlichkeit der „black box“ mit dem Invasionssubstrat in vivo ist wichtig, da die Invasion als interaktiver Prozeß von zellulärer Adhäsion, lokaler Proteolyse und Migration das Resultat einer komplexen Reaktion der Gliomzelle auf die Umgebung darstellt. Je ähnlicher die Umgebung dem natürlichen Substrat ist, desto relevanter sind die Versuchsergebnisse für die Situation in vivo (8). Es gelang, das Invasionssubstrat, den Hirnschnitt, ohne Zusatz von Proteinbeschichtungen, Filtervorbehandlungen oder sonstige biochemische Methoden zu fixieren. Durch die rein mechanische Anheftung am Filter ist eine Invasion ohne Beeinflussung durch Fremdstoffe möglich.

Auswertungsmethoden des Boyden-Kammer – Versuches

- Beschreibung -

Manche Autoren färbten den Filter zusammen mit der Matrigelschicht und zählten die Zellen³⁶ oder analysierten die Zellzahl spektrophotometrisch⁵. Zumeist wird der Assay jedoch nicht in der Form ausgewertet, daß die Invasion unmittelbar anhand von in das Gel invadierten Zellen gemessen wird. Vielmehr wird das Gel (mit den darin eventuell enthaltenen Zellen) abgeschabt und jene Zellen werden gezählt, die durch das Gel zum Filter, entlang der Filteroberfläche zu den Poren, durch die Poren an die Unterseite des Filters gewandert und dort haften geblieben sind. Manche Autoren variierten diese Art der Auswertung, indem sie den Zellüberstand verwarfen und die mit einem Wattetupfer abgeschabten Zellen im Gel zählten. Die Beschichtung des Filters mit dem Gel wurde als uneben kritisiert und die Zellzählung an der Unterseite des Filters als schwierig zu objektivieren³⁴. Manche Autoren fügten an Stelle der Zellzählung an der Filterunterseite eine spectrophotometrische Auswertung an^{4;34;37}. Weiterhin wurde auch in Versuchen mit unbeschichteten Filtern nachgewiesen, daß die Invasivität in das Matrigel und das Verhalten an der Membran (Adhärenz, Migration und schließlich Anheftung an die Unterseite) nicht miteinander korrelieren³⁵. Somit ist das gemessene Zellverhalten nicht nur der Prozeß der Invasion sondern auch die artifizielle Interaktion mit einem porösen Filter. In einer anderen Auswertungsmethode werden nur die Zellen gezählt, die durch den Filter in die untere Kammer gefallen sind. Manche Autoren beschreiben, daß mehr als 90% der Zellen von der Unterseite des Filters fallen³⁸ und analysierten dies, andere zählten hier (bei ansonsten identischer Versuchsdurchführung) überhaupt keine Zellen und schlossen daraus, daß alle invadierten Zellen an der Unterseite des Filters haften bleiben⁷. Diese Differenzen lassen nur auf die Unsicherheit schließen, die in der Interpretation der Ergebnisse der Matrigel-Versuche besteht.

- Vergleich mit dem vorliegenden Modell -

In dem vorliegenden Versuchsaufbau können die invadierenden Zellen unmittelbar in ihrem invadierten Substrat bestimmt werden. Eine erneute Interaktion der Tumorzellen mit der Filtermembran nach der Invasion ist nicht notwendig. In der unteren Kammer konnten keine Zellen nachgewiesen werden.

Inhibition der Invasion im Matrigel durch Chemotherapeutika

- Beschreibung -

Durch Invasionsversuche sollen die Mechanismen dieses Vorganges untersucht werden, aber auch Chemotherapeutika auf ihre eventuelle klinische Wirksamkeit getestet werden. Kommt es dabei zu einer dosisabhängigen Invasionshemmung kann dies in einem stufenartigen Vorgehen zu in vivo-Tests bei Tieren führen und schließlich zu ersten klinischen Tests an Patienten. Der Boyden Kammer Versuch ist ein häufig verwendeter Ansatz für unterschiedlichste humane Tumoren, um die Wirksamkeit von Medikamenten zu testen⁵ – auch wenn seine Aussagekraft für die Situation des Gehirns in vivo aus oben genannten Gründen diskutiert wird.

- Vergleich mit dem vorliegenden Modell -

Ein neu entwickelter Versuchsansatz sollte daher auch die Möglichkeit bieten, Medikamente wechselnder Dosierung zuzusetzen und eine Wirksamkeit nachzuweisen oder auszuschließen. Dies erfolgte im vorliegenden Modell anhand der Wirksamkeit von Vincristin Taxol, die dosisabhängig zu einer reduzierten Invasion führten und in hoher Dosierung auch keine Invasion mehr zuließen.

3.3.2.5. Versuche an Hirnschnitten in vitro

Elektrophysiologische Versuche

Die Verwendung von Hirnschnitten bei in vitro Versuchen hat im Bereich der Neurophysiologie längere Tradition. Dabei wird insbesondere auf den Erhalt der Zytoarchitektur Wert gelegt und in vitro die elektrische Aktivität gemessen. Die erhaltene Morphologie der Dendriten von Pyramidenzellen in vitro wurde beschrieben. Exzitatorische und inhibitorische Potentiale sowie Potenzierungen von synaptischen Potentialen konnten gemessen werden³⁹⁻⁴⁶. Verwendet werden Schnitte, die zumeist von Gehirnen wenige Tage alter Ratten stammen und der Situation in situ auch während der Versuche ähneln und mehrere Wochen erhalten werden können. Diese Ähnlichkeit wurde auch genutzt, um die biochemischen Mechanismen der Bluthirnschranke an einer Kokultur aus einer Monolayer-Kultur von Endothelzellen in Interaktion mit einem Hirnschnitt zu untersuchen³⁹.

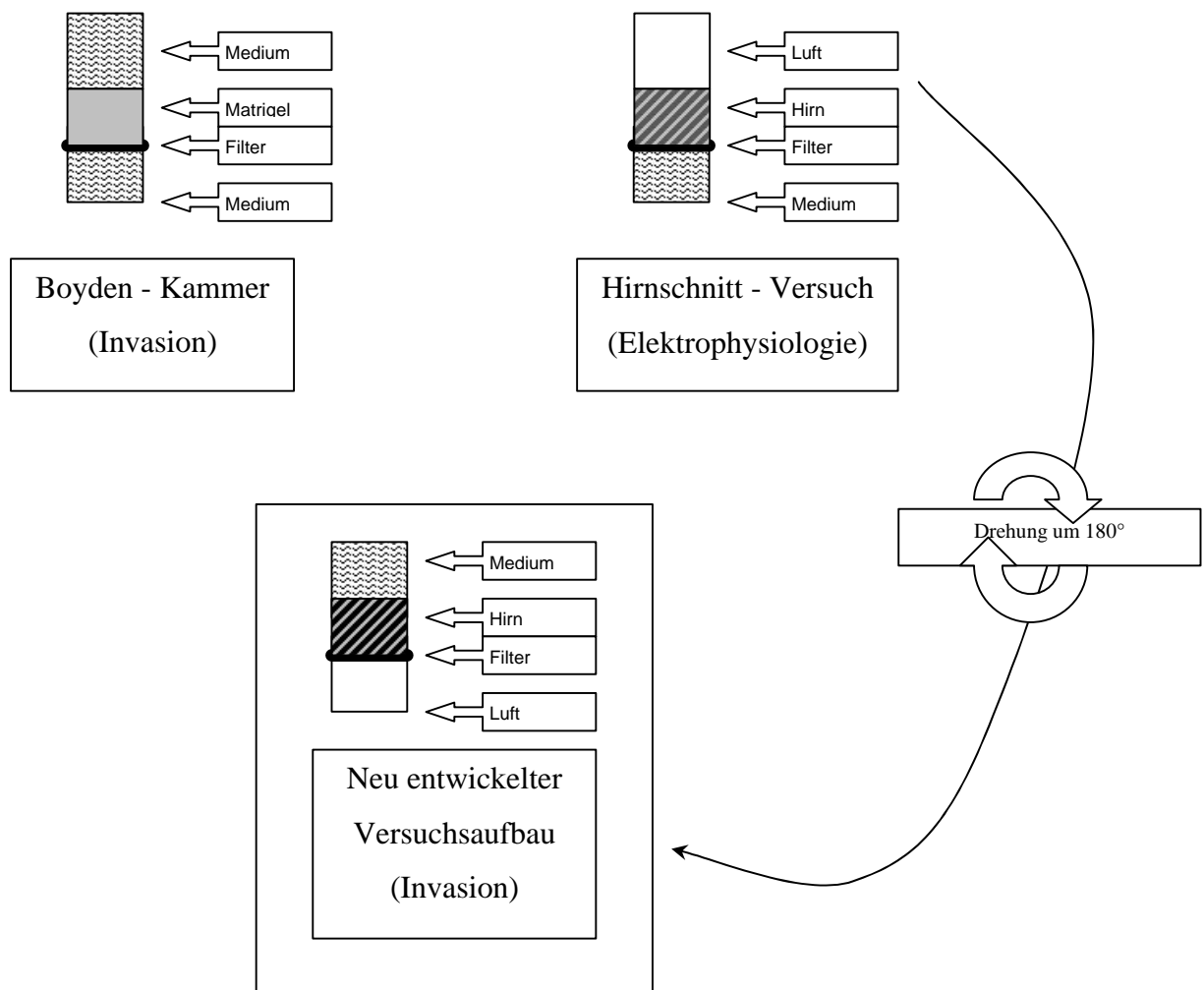
Entscheidend ist zum Erhalt von Zytoarchitektur und elektrischer Aktivität der Zellen des Hirnschnittes die Kultivierung an der Grenzschicht zwischen Flüssigkeit (Medium)

und Luft⁴³. In einem sehr einfachen und zuverlässigen Modell beschrieben die Autoren auch die Kultivierung von Hirnschnitten in einer Petrischale auf einer porösen Membran, die einen diffusionsabhängigen Substrataustausch hinreichend gewährleistet. In aufwendigeren Versuchsaufbauten wurden Hirnschnitten in Apparaturen kultiviert, die einen Anstieg des Flüssigkeits-Pegels nur bis maximal zum Hirnschnitt, jedoch nicht darüber hinaus zuließen⁴⁷ oder die den Hirnschnitt auf einer sanften Schräge kultivierten, über die das Medium kontinuierlich um den Schnitt herumfloß⁴⁸. Andere Versuche mit Hirnschnitten, die auf beiden Seiten mit Flüssigkeit bedeckt waren, ließen zwar bessere Untersuchungen über den Stoffwechsel der Zellen zu, da auf beide Seiten des Schnittes zugegriffen werden konnte, die Morphologie des Schnittes war jedoch schlechter erhalten als bei Versuchen an einer Flüssigkeits-Luft-Grenze. Dies betraf sowohl die Cytoarchitektur wie auch die anatomische Integrität des Gehirnschnittes. Als eine Erklärung führten die Autoren an, daß bei einem vollständigen Bedecken des Schnittes mit Medium ein Heraus-, „waschen“ von Proteinen die Struktur und die Funktion stören könnten⁴⁹.

Invasion von Gliomzellen in Hirnschnitte in vitro

Es gab auch Versuche, um die Invasion von Gliomzellen in derartige Hirnschnitt-Kulturen durchzuführen. Dabei wurden Gehirne wenige Tage alter Ratten verwendet, die in 300µm dicken Schnitten in Kultur an einer Flüssigkeits-Luft-Grenze gehalten werden. Die Analyse der Zellinvasion erfolgte anhand der Zellen, die den Schnitt überwunden hatten und dann durch die 8µm großen Poren eines Filters zwischen diesen und einen weiteren Filter mit 0,4µm Poren gewandert waren⁵⁰.

Die Flüssigkeits-Luft-Grenze spielt auch in dem vorliegenden Versuchsaufbau die entscheidende Rolle, um den (nur 20 bis 40µm dicken) Hirnschnitt strukturell zu erhalten. Nur wurde der Versuchsaufbau „auf den Kopf gestellt“: Bei den elektrophysiologischen Versuchen „schwamm“ der Schnitt mit dem Filter auf dem Medium. Im vorliegenden Versuchsaufbau befindet sich die Luft unter der Membran, auf der der Schnitt liegt – bedeckt von Medium.



Das hier vorgestellte Modell bietet weiter den Vorteil, daß das Gehirn adulter Schweine verwendet werden kann und nicht das neugeborener Tiere oder von Föten. Die Autoren des oben vorgestellten Modells fanden eine erheblich schlechtere Invasion bei Verwendung adulten Materials. Das vorliegende Modell ist auch auf Versuche mit humanem Material (aus der Epilepsiechirurgie oder nach Hemispherektomien) erweiterbar.

Weiterhin bietet die Größe des Schweinehirns den Vorteil, daß die Auseinandersetzung mit einer beliebigen anatomischen Region (hier: Marklager) studiert werden kann. Da das Marklager auch die Prädilektionsstelle der Gliome in vivo darstellt, erscheint eine Untersuchung hier sinnvoll. In den oben genannten Rattenmodellen wird hingegen die Invasion in einen kompletten Hirnschnitt inklusive der grauen Substanz untersucht, wobei das Verhältnis von grauer zu weißer Substanz bei Nagern sicher anders ist als beim Menschen. Auch konnten die Autoren das Invasionsverhalten in beiden Substraten nicht unterscheiden, obwohl gerade dies für das Invasionsverhalten in situ entscheidend ist. Das oben genannte Modell hat den Nachteil, daß die Versuche schlecht validierbar sind. Dies ist im vorliegenden Versuchsaufbau gelöst worden, indem den Zellen in jeder Versuchsreihe eine standardisierte Menge an Substrat angeboten wird. Diese ist einerseits definiert durch den Durchmesser der Deckelschraube, die in dem darunter liegenden Hirnschnitt eine konstante und reproduzierbare Fläche überdeckt. Andererseits wird der Hirnschnitt in einer konstanten Schnittdicke verwendet. Die Tumorzellen haben somit in jedem Versuchsansatz eine konstante Menge an Invasionssubstrat zur Verfügung, dessen Volumen durch die Fläche der Deckelschraube und die Schnittdicke definiert ist.

Das vorliegende Modell bietet auch den Vorteil, daß die Zellen im oberen Schacht im Medium über dem Hirnschnitt in identischer Weise zur Invasion gebracht werden wie im Boyden Kammer Versuch. Somit können zu untersuchende Substanzen (insbesondere Chemotherapeutika) in beliebiger Menge hinzugefügt und in ihrer Wirkung auf die Invasion untersucht werden. Die Flüssigkeits-Luft-Grenze befindet sich erst jenseits des zu invadierenden Substrates und kann die bereits erfolgte Invasion nicht mehr negativ beeinflussen, sie spielt jedoch für den Erhalt des Hirnschnittes die entscheidende Rolle.

Im oben genannten Ratten-Hirnschnittmodell werden die Zellen gezählt, die an der Unterseite der Membran haften. Die Überwindung der Membranporen ist ein von der Invasion eines Substrates unabhängiger Prozeß, der anderen Faktoren unterliegt und

nicht mit der eigentlichen Invasionseigenschaft der Zellen im Substrat korrelieren muß³⁵, aber in diesem Modell in die Auswertung mit einfließt.

Im vorliegenden Modell können die Zellen unmittelbar im invadierten Substrat bestimmt und somit auch morphologische Charakteristika der Invasion wie zum Beispiel die Bildung oben beschriebener Zellanhäufungen erfasst werden.

Schlußfolgerung

Das neu entwickelte System zur Ermittlung der Invasivität von Gliomzellen in vitro stellt eine Ergänzung der bisher zur Verfügung stehenden Versuchsansätze dar. Es bietet neben der Standardisierbarkeit, einer hohen Reliabilität und Validität den Vorteil, daß erstmals die Interaktion mit dem natürlichen Invasionssubstrat – der weißen Substanz – in vitro untersucht werden kann.

Literaturverzeichnis

1. Berens ME, Rutka JT, Rosenblum ML: Brain tumor epidemiology, growth, and invasion. *Neurosurg Clin N Am* 1:1-18, 1990
2. Rosenblum ML, Berens ME, Rutka JT: Recent perspectives in brain tumor biology and treatment. *Clin Neurosurg* 35:314-335, 1989
3. Bernstein JJ, Woodard CA: Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels. *Neurosurg* 36:124-132, 1995
4. Radotra B, McCormick D: Glioma invasion in vitro is mediated by CD44-hyaluronan interactions. *J Pathol* 181:434-438, 1997
5. Jacobs W, Mikkelsen T, Smith R, et al: Inhibitory effects of CAI in glioblastoma growth and invasion. *J Neurooncol* 32:93-101, 1997
6. Von Hoff DD: He's not going to talk about in vitro predictive assays again, is he? *J Natl Cancer Inst* 82:96-101, 1990
7. Narla RK, Liu XP, Klis D, et al: Inhibition of human glioblastoma cell adhesion and invasion by 4-(4'-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazoline (WHI-P131) and 4-(3'-bromo-4'-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazoline (WHI-P154). *Clin Cancer Res* 4:2463-2471, 1998
8. Laws ERJ, Goldberg WJ, Bernstein JJ: Migration of human malignant astrocytoma cells in the mammalian brain: Scherer revisited. *Int J Dev Neurosci* 11:691-697, 1993
9. Ulvestad E, Williams K, Bjerkvig R, et al: Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 56:732-740, 1994
10. Rutka JT, Apodaca G, Stern R, et al: The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J Neurosurg* 69:155-170, 1988

11. Hay ED: Extracellular matrix. *J Cell Biol* 91:205s-223s, 1981
12. Schwarzbauer JE: Cell migration: may the force be with you. *Curr Biol* 7:R292-R294, 1997
13. Paulus W, Tonn JC: Basement membrane invasion of glioma cells mediated by integrin receptors. *J Neurosurg* 80:515-519, 1994
14. Bretscher MS: Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells. *Cell* 87:601-606, 1996
15. Deryugina EI, Bourdon MA, Luo GX, et al: Matrix metalloproteinase-2 activation modulates glioma cell migration. *J Cell Sci* 110 (Pt 19):2473-2482, 1997
16. Rosenblum ML: Factors influencing tumor cell traffic in the central nervous system. *Journal Of Neuro-Oncology* 17 (1993) 175-177:1992
17. Yu Q, Stamenkovic I: Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion.
18. Riedle B, Kerjaschki D: Reactive oxygen species cause direct damage of Engelbreth-Holm-Swarm matrix. *Am J Pathol* 151:215-231, 1997
19. Goldberg WJ, Levine KV, Tadvalkar G, et al: Mechanisms of C6 glioma cell and fetal astrocyte migration into hydrated collagen I gels. *Brain Res* 581:81-90, 1992
20. Marienhagen K, Pedersen PH, Terzis AJ, et al: Interactions between fetal rat brain cells and mature brain tissue in vivo and in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20:130-143, 1994
21. Liotta LA, Lee CW, Morakis DJ: New method for preparing large surfaces of intact human basement membrane for tumor invasion studies. *Cancer Lett* 11:141-152, 1980
22. Starkey JR, Hosick HL, Stanford DR, et al: Interaction of metastatic tumor cells with bovine lens capsule basement membrane. *Cancer Res* 44:1585-1594, 1984

23. Fjellbirkeland L, Bjerkvig R, Laerum OD: Non-small-cell lung carcinoma cells invade human bronchial mucosa in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34:333-340, 1998
24. Bernstein JJ, Laws ERJ, Levine KV, et al: C6 glioma-astrocytoma cell and fetal astrocyte migration into artificial basement membrane: a permissive substrate for neural tumors but not fetal astrocytes. *Neurosurg* 28:652-658, 1991
25. Noel AC, Calle A, Emonard HP, et al: Invasion of reconstituted basement membrane matrix is not correlated to the malignant metastatic cell phenotype [see comments]. *Cancer Res* 51:405-414, 1991
26. Freund E: [Cytoarchitecture of sagittal sections of the mesencephalon of domestic swines (*Sus scrofa domestica*)]. *Anat Anz* 125:539-548, 1969
27. Freund E: [Cytoarchitectonics of the mesencephalon and pons in the domestic pig (*Sus scrofa domestica*)]. *Anat Anz* 125:345-362, 1969
28. Freund E: [Myeloarchitecture of the mesencephalon in the domestic swine (*Sus scrofa domestica*)]. *Anat Anz* 134:445-459, 1973
29. Freund E: [Topography of various nuclear areas in the mesencephalon of *Sus scrofa domestica*]. *Verh Anat Ges* 63:649-654, 1969
30. Hu S, Chao CC, Khanna KV, et al: Cytokine and free radical production by porcine microglia. *Clin Immunol Immunopathol* 78:93-96, 1996
31. Ziemer EL, Kramme PM, Higgins RJ, et al: Astrocytoma in a boar. *J Am Vet Med Assoc* 187:837-838, 1985
32. Cotchin E: Spontaneous tumours in young animals. *Proc R Soc Med* 68:653-655, 1975
33. Saito K, Oku T, Ata N, et al: A modified and convenient method for assessing tumor cell invasion and migration and its application to screening for inhibitors. *Biol Pharm Bull* 20:345-348, 1997
34. Sieuwerts AM, Klijn JG, Foekens JA: Assessment of the invasive potential of

human gynecological tumor cell lines with the in vitro Boyden chamber assay: influences of the ability of cells to migrate through the filter membrane. *Clin Exp Metastasis* 15:53-62, 1997

35. Sasaki CY, Passaniti A: Identification of anti-invasive but noncytotoxic chemotherapeutic agents using the tetrazolium dye MTT to quantitate viable cells in Matrigel. *Biotechniques* 24:1038-1043, 1998
36. Shi Y, Kornovski BS, Savani R, et al: A rapid, multiwell colorimetric assay for chemotaxis. *J Immunol Methods* 164:149-154, 1993
37. Bernstein JJ, Goldberg WJ, Laws ERJ: Migration of fresh human malignant astrocytoma cells into hydrated gel wafers in vitro. *J Neurooncol* 18:151-161, 1994
38. Duport S, Robert F, Muller D, et al: An in vitro blood-brain barrier model: cocultures between endothelial cells and organotypic brain slice cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1840-1845, 1998
39. Muller D, Buchs PA, Stoppini L: Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 71:93-100, 1993
40. Robert F, Bert L, Parrot S, et al: Coupling on-line brain microdialysis, precolumn derivatization and capillary electrophoresis for routine minute sampling of O-phosphoethanolamine and excitatory amino acids. *J Chromatogr A* 817:195-203, 1998
41. Robert F, Parisi L, Bert L, et al: Microdialysis monitoring of extracellular glutamate combined with the simultaneous recording of evoked field potentials in hippocampal organotypic slice cultures. *J Neurosci Methods* 74:65-76, 1997
42. Stoppini L, Buchs PA, Muller D: A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182, 1991
43. Stoppini L, Duport S, Correges P: A new extracellular multirecording system for electrophysiological studies: application to hippocampal organotypic

- cultures. *J Neurosci Methods* 72:23-33, 1997
44. Stoppini L, Parisi L, Oropesa C, et al: Sprouting and functional recovery in co-cultures between old and young hippocampal organotypic slices. *Neuroscience* 80:1127-1136, 1997
 45. Thiebaud P, de Rooij NF, Koudelka-Hep M, et al: Microelectrode arrays for electrophysiological monitoring of hippocampal organotypic slice cultures. *IEEE Trans Biomed Eng* 44:1159-1163, 1997
 46. Dore CF, Richards CD: Proceedings: An improved chamber for maintaining mammalian brain tissue slices for electrical recording. *J Physiol (Lond)* 239:83P-84P, 1974
 47. Tchong TK, Gillette MU: A novel carbon fiber bundle microelectrode and modified brain slice chamber for recording long-term multiunit activity from brain slices. *J Neurosci Methods* 69:163-169, 1996
 48. Aitken PG, Breese GR, Dudek FF, et al: Preparative methods for brain slices: a discussion. *J Neurosci Methods* 59:139-149, 1995
 49. Ohnishi T, Matsumura H, Izumoto S, et al: A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture. *Cancer Res* 58:2935-2940, 1998

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Schichor, Christian Franz Arnold
Geburtsdatum: 13.06.1968
Geburtsort: Ulm
Religion: römisch - katholisch
Eltern: Herr Dr. Erhard Schichor, Urologe
Frau Borghild Schichor, Hausfrau
Familienstand: verheiratet mit Frau Dipl. Betriebswirtin (FH)
Martina Schichor, geb. Obermaier seit
20.8.1994,
Wohnort: Tochter Carlotta 23.05.99
Silcherstraße 33A, 97074 Würzburg

Schul Ausbildung

1974 bis 1978: Grundschule in Ingolstadt
1978 bis 1987: Besuch des Apian-Gymnasiums,
naturwissenschaftlicher Zweig, in Ingolstadt
August 1987: Abitur in den Leistungskursen Latein und
Mathematik
und den Grundkursen Physik und
Sozialkunde

Wehrdienst

Oktober 1987 bis Oktober 1988: Wehrdienst in Ingolstadt, Aufklärungsbataillon

Studium

Oktober 1988 : Beginn des Studiums der Humanmedizin an
der Universität Regensburg,
vorklinischer Teil
August 1990: Physikum
Oktober 1990: Beginn des klinischen Teils an der
Bayerischen Julius-Maximilians-
Universität, Würzburg
August 1991 : Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1994 : Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 1994 : Beginn des praktischen Jahres im Wahlfach
Neurochirurgie an der
Universitätsklinik, Würzburg
August 1994 : Innere Medizin, Juliusspital, Würzburg
Dez. 1994 : Chirurgie, Juliusspital, Würzburg
Mai 1995 : Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Facharztausbildung

1. Juli 1995 bis 31. Juli 1996: Arzt im Praktikum an der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg
1. August 1996 bis 31. Dez. 1997: Arzt im Praktikum an der Neurochirurgischen Klinik, Klinikum Aschaffenburg
1. Januar 1997 bis 30. Sept. 1997: Assistenzarzt an der Neurochirurgischen Klinik, Klinikum Aschaffenburg
- Seit 1. Oktober 1997: Assistenzarzt an der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg

Danksagung

Ich danke

Herrn Prof. Dr. Tonn für die Überlassung des Themas, die überaus kompetente Betreuung und exzellente Wissensvermittlung während der Erstellung der Arbeit

Herrn Prof. Dr. Roosen für die freundliche Bereitstellung der hervorragenden wissenschaftlichen und klinischen Arbeitsmöglichkeiten in seiner Klinik und das entgegengebrachte Interesse

Herrn Prof. Dr. Roggendorf für die Übernahme des Koreferates

meinen Eltern für die liebevolle Unterstützung und die großzügige Ermöglichung meines Studiums

meiner Frau Martina für ihre liebevolle, seelische und moralische Unterstützung, die mich während des Studiums begleitet hat und die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit eine große Hilfe und Ansporn war.