

In vitro Modelle in der Krebsforschung

Helmut A. Tritthart

Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Graz
ZeT – Zentrum für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen, A-Graz

Zusammenfassung

In der Krebsforschung werden zunehmend in vitro Techniken verwendet, sowohl bei der Suche nach mutagenen und karzinogenen Risikofaktoren als auch zur Verbesserung von Diagnose und Therapie bzw. zum Verständnis der Krebsentstehung und der Metastase-Fähigkeit von Krebszellen. Die Krebsforschung hat für die Verbesserung solcher in vitro Techniken, die in vielen Bereichen Tierversuchen überlegen sind, eine Vorreiterrolle übernommen.

In dieser Übersicht werden verfeinerte Methoden der Zellkultur, der 3D-Zellkultur, der Immunologie, der Membran- und Organellen-Forschung sowie der Molekularbiologie und Gentechnik vorgestellt und die Forschungsstrategien (z.B. der EU – Europa im Kampf gegen Krebs) erläutert. In vitro-Techniken zur Analyse der Einzelschritte der metastatischen Kaskade sowie histologische und bildanalytische Zellkultur-Verfahren haben die Metastasenforschung entscheidend verbessert. Diese Forschung ist auf die Bekämpfung der Haupttodesursache des Krebses gerichtet, setzt aber meist hochbelastende Tierversuche ein. Dank neuer in vitro Techniken kann heute auf viele Tierversuche der Metastasenforschung verzichtet werden. Auch die Suche nach gentoxischen und nicht-gentoxischen Kanzerogenen

kann vor allem durch metabolisch kompetente Säugetierzellen zunehmend in vitro durchgeführt werden.

Summary: In vitro test systems in cancer research. An increasing variety of in vitro test systems is used in cancer research to detect mutagenic or carcinogenic factors, to improve diagnosis and therapy and to study cancer cell functions and metastasis. This short review indicates that these in vitro techniques are not only superior to some animal experiments but often are the leading techniques. Improved 3D cell culture techniques, studies of membrane or organell functions as well as molecular biology and genetic techniques will be discussed in the light of the cancer research strategic recommendations of the European Community (Europe against cancer). The multistep cascade of events during metastasis can be studied by in vitro techniques with outstanding precision, making many painful animal experiments avoidable. Metabolically competent human cells are superior tools to uncover cancerogenic compounds and mutagenic factors.

Keywords: metastasis, Europe against cancer, radioimmunotherapie, cancer cell motility

1 Einleitung

Krebs ist nach Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache, und unsere Erfolge im Kampf gegen Krebs sind trotz vieler Detailerfolge im gesamten weiterhin enttäuschend. Die Häufigkeit von Krebs als Todesursache ist nach wie vor im Ansteigen.

Derzeit erkrankt jeder vierte Europäer während seines Lebens an Krebs, im Jahre 2000 wird es vermutlich schon jeder dritte sein, und die EU bemüht sich mit ihrem Regierungsprogramm, „Europa im Kampf gegen Krebs“, diesen Anstieg der Krebsinzidenz zu verhindern (Abb.1) (Vermorken et al., 1994). Die Hoffnung, daß die Krebsfor-

schung rasch wesentliche Ergebnisse liefern kann, erzeugt einen Erwartungsdruck, potentiell lebensrettende Ergebnisse zu finden, und die sinnvolle Reduktion von Tierversuchen ist dabei keine zwingende Motivation. Dennoch hat die Krebsforschung aus guten wissenschaftlichen Argumenten das Ziel der Reduktion von Tierversuchen intensiv verfolgt, und *in vitro* Modelle sind heute ein Vorbild beim Einsatz von tierversuchsfreien Forschungsmethoden in einem großen und medizinisch eminent wichtigen Gebiet.

Die *in vitro* Techniken dominieren in der gesamten Krebsforschung in hohem Grade, und sie hat selbst eine Vorreiterrolle in der Förderung von *in vitro* Techniken für andere For-

schungsbereiche, z.B. unsterblich gemachte Zelllinien als Forschungsobjekt.

Krebs ist eine Krankheit, die dadurch charakterisiert ist, daß Zellen einer bestimmten Art ihre physiologische Wachstumskontrolle durch bleibende und weitervererbare Veränderungen verlieren. Sie sind dadurch praktisch unsterblich und in ihrer Neigung zur Vermehrung von äußeren Einflüssen unabhängig. Welche Reize an welcher Stelle und in welchen Stufen eine krebsige Entartung bewirken können, und welche Schäden am genetischen Material bzw. an der transmembranären und intrazellulären Signalübermittlung dafür entscheidend sind, ist derzeit Gegenstand der Forschung; es ist

PROGRAMM: EUROPA IM KAMPF GEGEN KREBS

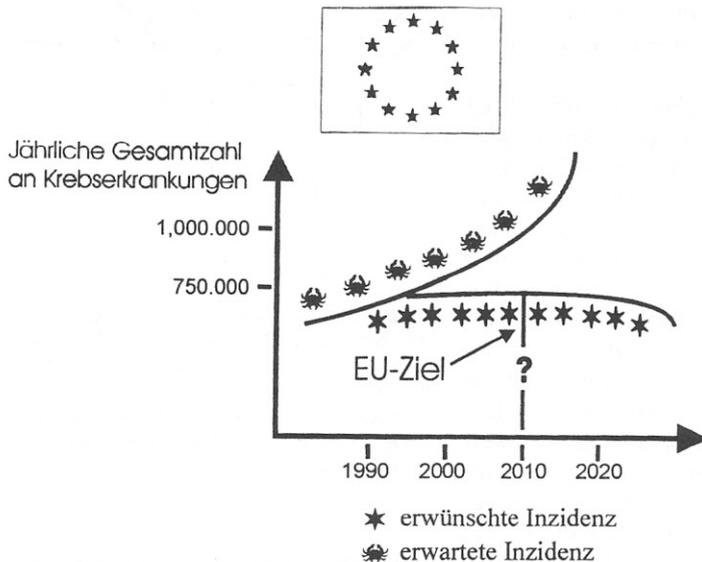


Abbildung 1: Die Inzidenz der Krebserkrankungen in Europa nicht weiter ansteigen zu lassen, ist das Ziel der EU-Aktion: „Europa im Kampf gegen Krebs“.

aber sicher, daß dies ein vielstufiger Prozeß ist.

2 Mutations- und Metastasenforschung

Die Bewertung des gentechnischen und kanzerogenen Risikos von Umweltschadstoffen und von Medikamenten unter Berücksichtigung der Dosiszeit-Wirkungsbeziehung, vor allem für die Tumorinduktion, gelingt zunehmend besser und verlässlicher mit metabolisch kompetenten humanen Zellen (vgl. den Tagungsbericht in ALTEX 13, 1, 96, über Tierversuche in der Mutations- und Krebsforschung: Notwendigkeiten und *in vitro* Alternativen).

Nach Krebsentstehung ist für den menschlichen Körper selten das ungewohnte Wachstum lebensbedrohlich, vielmehr ist es die Fähigkeit von krebsig entartetem Gewebe, Absiedlungen, sogenannte Metastasen, an vielen und verschiedenen Stellen des Körpers zu bilden. Die Ablösung von Krebszellen vom primären Krebsgewebe ist die erste unverzichtbare Stufe der Metastasierung und erfordert homeotypische Ablö-

sung, also die Trennung von Krebszelle und Krebszelle. Dabei dürfte die Fähigkeit zu aktiver Wanderung wichtig sein, denn Wachstumsdruck von hinten ist weniger wichtig für das Eindringen einzelner Krebszellen in gesundes Gewebe oder gar für das Einwandern in Gefäße.

Es ist sicher, daß die Krebszellmotilität für das fatale Ereignis der Metastasierung eine noch wenig verstandene Schlüsselrolle spielt (Liotta und Kohn, 1990; Grimstad, 1987). Aber auch der Zell-Zellkontakt zwischen Krebszellen sowie zwischen Krebszellen und gesundem Gewebe, und die Fähigkeit, Adhäsionspunkte für die aktive Fortbewegung zu finden, spielen ebenso, wie die Fähigkeit, Gewebegrenzen durch Krebszellen-eigene Enzyme zu durchbrechen, eine zentrale Rolle.

3 Immuno- und Chemotherapie

Wo stehen wir heute in der Krebsbehandlung? Zum Zeitpunkt der Diagnose hängen die Zukunftsaussichten vor allem davon ab, ob bereits Absiedlungen, also Metastasen, gebildet wurden. Wo immer möglich, ist die Vorsorge bzw. Früherkennung einzusetzen, denn ein im Frühstadium vor Metastasierung entdeckter Krebs läßt sich mit chirurgischen und/oder strahlentherapeutischen Methoden mit gutem Erfolg und hoher Sicherheit entfernen. Nach Metastasierung sind alle Methoden, vor allem auch jene der Chemotherapie, bisher enttäuschend (Abbildung 2).

ZUM ZEITPUNKT DER DIAGNOSE

	primärer Tumor	metastasierter Tumor	
Angewandte Therapie			
- nur chirurgischer Eingriff	22%		
- nur Strahlentherapie	12%		
- beide kombiniert	6%		
alle anderen Therapien und Kombinationen einschl. Chemotherapie		5%	(45%)
gegenwärtig heilbare Patienten	40%	5%	
Heilung nicht erzielbar	18%	37%	(55%)

Abbildung 2: Nur bei frühzeitig erkanntem Krebs (vor Metastasierung) bestehen gute Chancen für eine erfolgreiche Krebstherapie.

Diese unbefriedigenden Ergebnisse der Chemotherapie hängen auch damit zusammen, daß sie zumeist nur bei metastasierenden Tumoren eingesetzt wird. Erfolge wurden hauptsächlich bei Tumoren des blutbildenden Gewebes, bei Tumoren embryonalen Ursprungs und bei pädiatrischen Tumoren mit etwa 2/3 Erfolgsrate beschrieben. Doch machen diese Tumorarten nur etwa 4 % aller Krebsformen aus; eine Chemotherapie zur spezifischen Hemmung der Metastasenbildung gibt es nicht.

Eine grundlegende Schwierigkeit jeder Krebstherapie ist die Tatsache, daß Krebs aus normalen Zellen entsteht, und daß deshalb wenige Unterschiede zum gesunden Gewebe bestehen, die einen therapeutischen Ansatz erlauben. Dieser Mangel an Spezifität ist der wesentliche limitierende Faktor der Therapie, vor allem auch der Immunotherapie. Bei Abwehrschwäche, insbesondere bei Aids, treten einige Krebsformen, wie z.B. Lymphome, sehr häufig auf. Deshalb ist die Annahme naheliegend, daß bestimmte Krebsformen durch ein funktionierendes Abwehrsystem unter Kontrolle gehalten werden könnten. Auch könnte ein aggressiveres Abwehrsystem noch mehr ausrichten, vor allem, wenn es gelänge, den kleinen von außen erkennbaren Unterschied zwischen Krebszellen und normaler Zelle auszunutzen und die Aggressivität des Abwehrsystems zu steigern. Es gibt folgende Hauptwege:

- Monoklonale Antikörper
- Aktive Immunisierung
- Förderung der Antigen-Präsentation
- Tumorf infiltrierende Lymphozyten

Krebsformen, die eine Häufung bestimmter Moleküle in der Zelloberfläche aufweisen, wie z.B. Melanome, Dickdarmtumoren und Leberkrebs, schienen gut geeignete Kandidaten für den Einsatz monoklonaler Antikörper unter Ausnutzung einer möglichen zellzerstörenden Wirkung zu sein. Diese Hoff-

nungen haben sich aber kaum erfüllt, doch die vielen *in vitro* Techniken des „antibody-engineering“ werden mit zunehmendem Erfolg eingesetzt.

Ein diagnostischer Durchbruch ist durch szintigraphische Antikörpertechniken, den Einbau von Technetium in monoklonale Antikörper, gelungen (Abbildung 3). Für Dickdarmtumoren konnten mit einer Nachweisrate von 93 % Tumoren und Metastasen nachgewiesen werden (Trampert et al., 1982).

Die Anlagerung von Zellgiften an monoklonale Antikörper versucht auch diese hochspezifische Vehikelfunktion auszunutzen; die immun-spezifische Enzym-medierte Chemotherapie ist ein Gebiet großer Hoffnung (Abbildung 3). Monoklonale Antikörper können durch eine zweite Bindungsstelle auch zur spezifischen Anreicherung von radioaktiven Nukliden an Tumorzellen führen und so eine Radioimmunotherapie ermöglichen, die die Ortsprobleme der Strahlentherapie elegant umgeht.

Auch die zytotoxischen Zellen des Körpers, die bei Organtransplantationen über MHC Klasse I Antigene angreifen, könnten auf Tumorzellen gelockt werden. Dies könnte durch MHC Antigene geschehen, die an tumorspezifische monoklonale Antikörper gekoppelt sind.

Viele Krebsarten können auch in anderen Organismen ungestört wachsen, weil ihnen auf der Zelloberfläche jene Moleküle fehlen (MHC Klasse I bzw. Histokompatibilitäts Antigene), die zum Erkennen fremder Zellen notwendig sind. Könnte man die Gene für die MHC Antigen-Expression wieder anschalten, würden Tumorzellen erkannt und bekämpfbar. Interferone scheinen diese Antigenpräsentation in der Zelloberfläche bestimmter Krebsarten zu fördern. Interferone zählen zu den Biomodulatoren, wie der Tumornekrosefaktor, Kolonie-stimulierende Faktoren und viele andere, welche die ersten meßbaren Erfolge der gentechnologischen Methoden für die Therapie brachten.

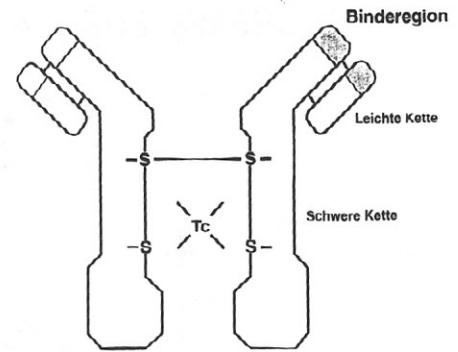


Abbildung 3: Antikörpertechniken für die Diagnose (Szintigraphie) und für die Therapie (Enzym-medierte Chemotherapie, Radioimmunotherapie) sind bei einigen Krebsformen erfolgreich. Beispiel eines Antikörpers mit eingelagertem Technetium (Tc).

Lymphozyten, die in Tumorgewebe einwandern, kann man entnehmen und in optimalen Zellkulturbedingungen gezielt vermehren. Diese aktivierten Lymphozyten wandern dann nach Reinfusion in den Tumor zurück. Ein gentechnischer Einbau von Genen des Tumornekrosefaktors ist in solchen Lymphozyten möglich, und Tumorzellen reagieren besonders empfindlich auf diesen Faktor. Leider brachte diese trickreiche Kombination von Zellkultur- und Gentechnik nur bei einigen Melanompatienten vermutlich völlige Heilung, bei anderen versagte sie vollständig.

4 Tumorsuppressor-Gene

Science hat das Molekül p53 als einen vielfältigen Schutzfaktor vor Krebs zum Molekül des Jahres ernannt. Anfangs hielt man dieses Eiweiß für ein Produkt eines Krebsgens, eines sogenannten Oncogens, welches eine gesunde in eine Krebszelle verwandeln kann. Heute weiß man, daß das Protein eine Erbanlage aktiviert, die über ein 21K Dalton Protein einen wichtigen Motor der Zellteilung, die Zyklin-Kinasen, lahmlegt. Dadurch gewinnt die Zelle Zeit, genau nach Fehlern im Erbmolekül zu fahnden und diese zu beseitigen, bevor Tochterzellen entstehen.

Erbfehler, die zu Krebs führen können, werden so präventiv beseitigt. Dieses Eiweißmolekül kann in bestimmten Zellen durch einen physiologischen Zelltod, als Apoptose bezeichnet, zum Untergang unerwünschter Zellen führen. Bei etwa der Hälfte aller Krebspatienten findet man im Tumor ein verändertes p53 Protein. Solche veränderten Proteine haben gestörte Funktionen und fördern in manchen Fällen das Krebswachstum aktiv. Auch Viren, wie z.B. die Papillomviren, die am Gebärmutterhalskrebs mitbeteiligt sind, hemmen diesen Krebschutzfaktor und lassen so mehr Zellen entstehen, in denen sie sich rascher vermehren können. Hinter der Produktion dieses Krebschutzfaktors stehen Gene, die man als Tumorsuppressor-Gene bezeichnet.

Derzeit sind erst wenige Tumorsuppressor-Gene genauer untersucht worden, aber es ist natürlich eine sehr wichtige Perspektive der Genschirurgie, eine Einschleusung solcher krebshemmender Gene zu erreichen. Gentechnische Versuche zielen darauf, durch homologe Rekombinationstechniken mit speziellen, in die Zellen eingebrachten Nuklein-

säuresequenzen die Funktion von sogenannten Krebsgenen gezielt auszuschalten. Schon bisher spielt das gentechnisch gezielte Abschalten spezifischer Genfunktionen, z.B. mittels Anti-sense RNA, in der Krebsgrundlagenforschung eine wichtige Rolle. Diese Techniken erlauben es, die Rolle von Genen, die am Krebsgeschehen beteiligt sind, gezielt zu untersuchen.

5 Tierversuche und *in vitro* Alternativen zur Metastasenforschung

Wie steht es aber mit der Metastasierung, dem entscheidenden Unterschied zwischen gutartigem und bösartigem Wachstum? Je rascher und je erfolgreicher ein Primärtumor metastatische Absiedelungen an entfernten Stellen bildet, umso bösartiger ist er, umso schlechter sind die Heilungschancen. Manchmal besteht der Verdacht, daß nur eine Unterpopulation an Zellen des Primärtumors hohe metastatische Potenz gewinnt, die Metastasen sind nicht immer das präzise Abbild des Primärtumors.

Im Tierexperiment haben wir die Möglichkeit, aus einer fast unendlichen Vielfalt von Krebszelllinien auszuwählen und einen Bolus solcher Zellen intravenös, subkutan oder in Organe zu applizieren. Die Geschwindigkeit bzw. Dichte der Metastasenbildung können ebenso wie das lokale Tumorwachstum gemessen und Faktoren mit Einfluß auf diese Größen untersucht werden. Besonders einfach sind Tests mit Melanomzellen; die Metastasen in der Lunge sind schwarze Pünktchen, die mit freiem Auge ausgewertet werden können. Diese Tierversuche haben eine sehr hohe Leidenskomponente, aber auch einige grundsätzliche Nachteile. Der Vorgang der Ablösung vom Primärtumor, des Eindringens in Gefäße, ist mit einer intravenösen Bolusinjektion nicht nachzubilden. Auch die subkutane Einbringung eines Zellhaufens entspricht nicht der metastatischen Aussaat von Einzelzellen und deren Hinauswandern aus Gefäßen in gesundes Gewebe. Es ist deshalb durchaus sinnvoll, die vielen Schritte der metastatischen Kaskade in Form von klar definierten Einzelschritten mit *in vitro* Techniken zu untersuchen. Im Tierversuch haben wir – wie erwähnt – unzuweckmäßige Startbedingungen und können nur das Endergebnis bewerten; der Stellenwert der einzelnen Zellfunktionen in der metastatischen Kaskade bleibt völlig im Dunklen. Selbst wenn wir wesentliche Hemmeffekte auf die Metastasierung im Tierversuch nachweisen können, können wir über den Angriffspunkt dieser Wirkung nur spekulieren. *In vitro* Techniken erlauben die genaue Analyse der Einzelschritte in der metastatischen Kaskade.

Wir haben einen Mikroinkubator zur Langzeitverwendung am invertierten Mikroskop entwickelt, welcher Zeitrafferaufnahmen für Zellkulturen sehr einfach macht und das Studium der homeotypischen Trennung von Krebszellen von einem Primärtumor erlaubt. Auch die Wanderungsgeschwindigkeit in frei wählbaren Oberflächen, die auch Endothelzellen sein können, bzw. im je-

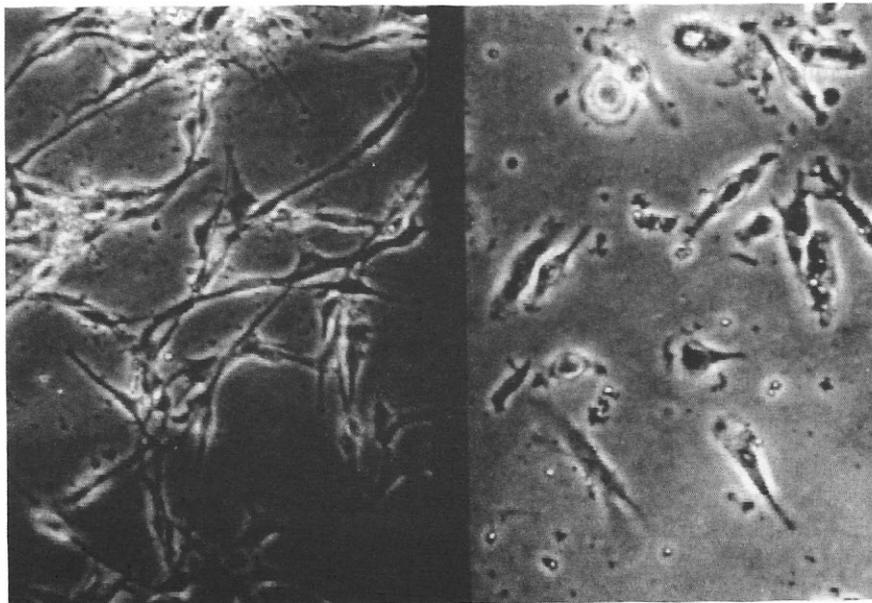


Abbildung 4: Im Vergleich zu Naevus-Zellen (links) zeigen Melanom-Zellen hohe Motilität. Die Motilität von Krebszellen ist für die metastatische und die invasive Potenz mitentscheidend.

weiligen Medium, läßt sich so genau studieren (Hofmann-Wellenhof et al., 1994).

Sogenannte *gap junctions*, transmembranäre Kanäle zwischen Krebszellen, scheinen wesentlichen Einfluß auf die Haftfestigkeit zwischen Krebszellen zu haben, und die Förderung der Bildung von *gap junctions*, z.B. durch die dem Vitamin A verwandten Retinoide, hemmt die Metastasierung. Mehr *gap junctions* zwischen normalen Zellen und Krebszellen könnten auch eine verbesserte Zellkommunikation durch verschiedenartige Stoffe und so z.B. eine Wachstumskontrolle durch gesunde Zellen bewirken (Mehta et al., 1989).

Es ist offensichtlich, daß für das Lösen von Krebszellen ein Halt in der Umgebung gefunden werden muß; Kraftentwicklung, Zellverkürzung bzw. gerichtete Bewegung ist erforderlich. Für das Verständnis der Metastasierung ist es sehr wichtig zu wissen, welcher Adhäsionsmolekül sich Krebszellen bedienen in ihrer Wanderschaft durch das Gewebe, aber auch in ihrer Fähigkeit, in Gefäßwänden Halt zu finden und einzudringen. Es gibt auch Faktoren, wie z.B. Zytokine, die die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen steuern können.

Krebszellen finden nicht nur Kontaktpunkte im gesunden Gewebe, sondern sie produzieren auch gewebezerstörende Enzyme, um sich den Weg freizuschlagen. Verschiedene Kollagentypen, Fibronectin, Laminin, Vitronectin u.a., bilden z.B. als Basalmembran natürliche Barrieren für die Krebszellenwanderung, und Krebszellen setzen Enzyme zur Zerstörung dieser Barriere frei.

6 Lokomotion und Zytokinese von Krebszellen

Schon der Vergleich der Zellform, normale Naevus-Zellen im Vergleich zu Melanomzellen in Abbildung 4, zeigt, daß die bösartigen Krebszellen eine hohe Motilität besitzen.

Die Wanderung von Krebszellen ist am besten mit jungen Fibroblasten vergleichbar; wenige fokale Kontakte, wenig strukturierte Aktinbündel, hohe Membranfluidität sind typische Eigenschaften. Das Zusammenspiel zwischen den kontaktsuchenden Membranrezeptoren und den kontraktile Bündeln in der Zelle ist überaus kompliziert. Nur Aktin-Filamente und Mikrotubuli haben die nötige strukturelle Polarität, und mechanochemische ATPasen wie Myosin, Dynein und Kinesin steuern die Wanderung der eukarotischen Zellen, wobei intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen eine Schlüsselrolle spielen dürften (Bray 1992).

Krebszellen zeigen dabei nicht nur einfache Fortbewegung, sondern auch zytokinetische Formänderungen und hektisches Aus- und Einfahren von Zellausläufern an Ort und Stelle, was für das Finden des Weges des geringsten Widerstandes wichtig ist. Mikrospeikes mit 0.1 bis 0.2 μ m Durchmesser und Lamellipodia, flügelähnliche Membranausläufer, die ähnlich dünn sind, werden typischerweise gefunden. Mit Zeitraffertechniken lassen sich sowohl die stationäre Motilität wie die Wanderungsgeschwindigkeit von Krebszellen *in vitro* in den verschiedensten Oberflächen genau vermessen. In dieser Weise lassen sich auch viele Faktoren mit Einfluß auf die Krebszellmotilität exakt untersuchen, vor allem, welche Signale Stop- bzw. Go-Signale sind. Würden Krebszellen nach Eindringen in ein entfernt gelegenes gesundes Gewebe endlos weiterwandern, würden keine Metastasen gebildet. Die Zelle muß in geeigneter Umgebung von Wanderung auf Vermehrung umschalten, vermutlich unter Verwendung naheverwandter Systeme.

7 Membranrezeptoren und transmembranäre Signaltransduktion

Auch die Zellvermehrung hat etwas mit Zellkontakten zu tun. Wachstumshormon-Rezeptoren haben

meist Tyrosin-spezifische Proteinkinasen an der Membraninnenseite, die Proteine der fokalen Kontakte, wie Integrin, Talin und Vinkulin, phosphorylieren und so die Kontakte lösen. Die Zelle kann sich abrunden und teilen; aber ohne Kontaktmöglichkeit, z.B. in Suspension ist keine Zellvermehrung möglich. Auch SRC Proteine des Rous Sarkomvirus sind solche tyrosinspezifische Protein-Kinasen, die fokale Kontakte lösen und so das Wachstum und die Vermehrung fördern können.

Es gibt natürlich noch viele andere Wege der transmembranären Signalübermittlung in Krebszellen, die derzeit untersucht werden. Dabei scheint die Proteinkinase C an der Schlüsselstelle vieler Signalwege zu sitzen. Wir und andere haben unter Verwendung solcher *in vitro* Techniken gezeigt, daß Hemmstoffe der Proteinkinase C hochwirksame Inhibitoren der Krebszellmotilität und auch der Invasivität sind (Helige et al., 1993).

8 Systeme zum Studium der Invasivität

Es gibt viele *in vitro* Techniken, mit denen Krebszellen natürliche oder künstliche Barrieren überwinden müssen, z.B. Arterienwände, Venenwände, Amnion, Netzwerke bzw. Filter, z.B. mit Kollagen-Gel definierter Dicke.

Ein besonders erfolgreiches System, welches zum Nachweis metastatischer Potenz von Krebszellen Tierversuchen wenigstens gleichwertig oder überlegen ist, wurde von Mareel und Mitarbeitern 1979 beschrieben. Es wird dabei Krebsgewebe mit gesundem Gewebe konfrontiert und dabei untersucht, wie rasch bzw. destruktiv Krebszellen in gesundes Gewebe einmarschieren.

Abbildung 5 zeigt ein Sphäroid aus lebenden embryonalen Herzmuskelzellen von ca. 400 μ m Durchmesser, an dem ein Sphäroid aus Krebszellen von ca. 200 μ m Durchmesser gerade angewachsen ist. Die Proteoglykan- und Laminin-Zusammensetzung von

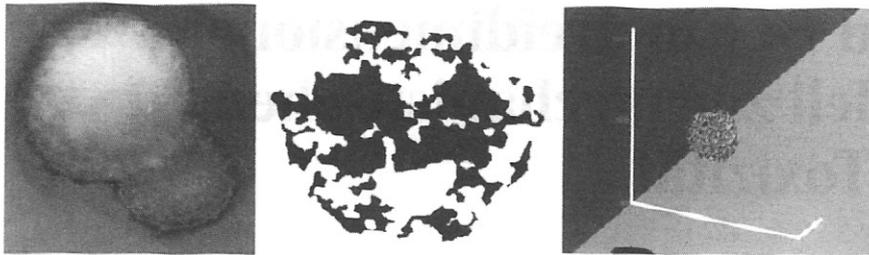


Abbildung 5: Das 3D *in vitro* Invasivitätsmodell von Mareel dient der Evaluierung von Faktoren mit Einfluß auf die Invasivität von Krebszellen (Sphäroide aus gesundem Gewebe in Kontakt mit Krebsphäroiden, links). Bildanalytische Auswertungen erlauben die Quantifizierung der Invasivität analog zur klinischen Erfahrung (Mitte, weiss Krebsgewebe). 3D-Laserscan-Rekonstruktion der Invasivität mit Fluoreszenz-techniken in diesem Modell zeigt der rechte Teil der Abbildung.

embryonalem Herzmuskelgewebe entspricht sehr gut jenem von Gewebe, in das zumeist Metastasen angesiedelt werden. Wir haben auch Sphäroide aus Gehirn- oder Lebergewebe ausprobiert. Vor allem aber war es uns möglich, verschiedene bildanalytische Verfahren so einzusetzen, daß wir objektive Zahlenwerte der metastatischen Potenz erheben konnten, die die subjektive Bewertung erfahrener Pathologen exakt widerspiegeln (Smolle et al., 1990). Wir haben mit dieser sehr verlässlichen Methode sehr viele Ergebnisse erheben und sie für 3D Techniken verfeinern können, unter Verwendung des Laserscan-Mikroskopes und von Fluoreszenztechniken. Abbildung 5 zeigt ein Beispiel dieser *in vitro* Registriertechnik der Invasivität an lebendem Gewebe. Folgende Schritte der metastatischen Kaskade können so mit *in vitro* Techniken untersucht werden:

- A) Trennung Tumorzelle – Tumorzelle
- B) Wanderungsgeschwindigkeit von Tumorzellen
- C) Adhaesionseigenschaften von Tumorzellen
- D) Disintegration von Gewebebarrieren durch Tumorzellen
- E) Tumor-Adhaesion an und Penetration durch Endothelzellen von Gefäßen
- F) Wachstums- und Motilitätsfaktoren für Tumorzellen
- G) transmembranäre Signalwege für Wachstum und Motilität

Diese neuen *in vitro* Techniken erlauben die genaue Analyse der metastatischen Kaskade, und es ist zu hoffen, daß so auch die Suche nach gezielten Hemmstoffen der Metastasierung aussichtsreicher wird, und daß wir dazu auf besonders belastende, quälende Tierversuche verzichten können.

Literatur

- Bray, D. (1992). *Cell Movements*. New York – London: Garland Publishing Inc.
- Grimstad, I. A. (1987). Direct evidence that cancer cell locomotion contributes importantly to invasion. *Exp. Cell. Res.* 17, 515–523.
- Helige, C., Smolle, J., Zellnig, G., Fink-Puches, R. und Tritthart, H. A. (1993). Effect of Dequalinium on K1735-M2 Melanoma Cell Growth, Directional Migration and Invasion *in vitro*. *Eur. J. Cancer* 29 A (1), 124–128.
- Hofmann-Wellenhof, R., Smolle, J., Helige, C., Gottlieb, G., Tritthart, H. A. und Kerl, H. (1994). Quantitative assessment of melanoma single-cell motility *in vitro*. *Exp. Dermatol.* 3, 219–226.
- Liotta, L. A. und Kohn, E. (1990). Cancer invasion and metastasis. *J. Am. Med. Assoc.* 26, 1123–1126.
- Mareel, M. M., Kint, J. und Meyvisch, C. (1979). Methods of study of the invasion of malignant C3H-mouse fibroblasts into embryonic chick heart *in vitro*. *Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin B: Cell Pathology* 30, 95–111.

Mehta, P. P., Bertram, J. S. und Loewenstein, W. R. (1989). The actions of retinoids on cellular growth correlate with their action on gap junctional communications. *J. Cell. Biol.* 108, 1053–1065.

Smolle, J., Helige, C., Soyer, H.-P., Hoedl, S., Popper, H., Stettner, H., Tritthart, H. A. und Kerl, H. (1990). Quantitative evaluation of melanoma cell invasion in three-dimensional confrontation cultures *in vitro* using automated image analysis. *J. Invest. Dermatol.* 94, 114–119.

Trampert, L., Villena, C., Benz, P., Keweloh, H. C., Schmidt, W. und Oberhausen, E. (1992). A clinical evaluation of Mab BW 935/6 in breast and ovarian cancer. *Nuklearmedizin* 31 (6), 249–253.

Vermorken, A. J. M. (Ed.) und Schermer, F. A. J. M. (Co-Ed.) (1994). *EC, Commission of the European Communities, Towards Coordination of Cancer Research in Europe*. Amsterdam – Oxford – Washington – Tokyo: IOS Press.

Danksagung

Gefördert durch einen Forschungsauftrag des Bundesministeriums für Wissenschaft, Forschung und Kunst, Österreich.

Korrespondenzadresse

o.Univ.-Prof.Dr. Helmut A. Tritthart
 Institut für Medizinische Physik und Biophysik
 Harrachgasse 21/IV
 A-8010 Graz