

Der Urologe

Organ der Deutschen Gesellschaft für Urologie
Organ des Berufsverbandes der Deutschen Urologen

Elektronischer Sonderdruck für G. Unteregger

Ein Service von Springer Medizin

Urologe 2011 · 50:961–967 · DOI 10.1007/s00120-011-2630-7

© Springer-Verlag 2011

zur nichtkommerziellen Nutzung auf der
privaten Homepage und Institutssite des Autors

M. Saar · J. Kamradt · V. Jung · M. Stöckle · G. Unteregger

Vom Gewebe über die Primärzellkultur zum Xenograftmodell

Patientennahe und funktionelle Prostatakarzinomforschung

Redaktion
 H. Rübber, Essen

Vom Gewebe über die Primärzellkultur zum Xenograftmodell

Patientennahe und funktionelle Prostatakarzinomforschung

Hintergrund

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung des Mannes und in Deutschland für 26% der inzidentellen Karzinomfälle und ca. 10% der tumorbedingten Todesfälle verantwortlich. Jährlich wird bei ca. 60.000 Männern ein Prostatakarzinom diagnostiziert, ca. 12.000 sterben an dieser Erkrankung [30]. Trotz des wissenschaftlich und klinisch großen Interesses an einem verbesserten Verständnis der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms und der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind unsere Kenntnisse hierüber noch sehr lückenhaft. Vor allem ist noch unklar, war-

um einige Tumoren nie zu einer Metastasierung und klinischen Symptomen führen, andere dagegen einen sehr aggressiven Verlauf zeigen.

Für den klinischen Alltag ist es von größtem Interesse, Patienten mit einer schlechten Prognose, wenn nicht im Frühstadium eine Therapie erfolgt, von Patienten mit guter Prognose ohne Therapie besser abgrenzen zu können. Eine der Hauptursachen für unsere lückenhaften Kenntnisse und das Fehlen valider prognostischer Marker ist darin zu sehen, dass geeignete, patientennahe Tumormodellsysteme fehlen, an denen die Entstehungs- und Progressionsmechanismen des Prostatakarzinoms schrittweise untersucht und unterschiedliche Wachstumsmuster besser charakterisiert werden können [28]. Die Etablierung solcher Modellsysteme soll die Definition der klinisch signifikanten Karzinomzelle erleichtern und damit als ein weiteres Ziel die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien ermöglichen.

Diese Modellsysteme sollten folgende Eigenschaften aufweisen:

1. Die in vitro kultivierten Zellen sollten repräsentativ für die im Tumor des Patienten vorhandenen Zellen sein.
2. Dynamische Prozesse wie Zellteilung, Migration und Invasion müssen erfasst werden können.

3. Die Umgebung der Tumorzellen unter besonderer Berücksichtigung des Stromas soll abgebildet werden.
4. Eine genetische Manipulation der kultivierten Zellen sollte möglich sein.

In der vorliegenden Arbeit soll veranschaulicht werden, wie ausgehend von der Etablierung der Primärkultur, deren Weiterentwicklung zur Kokultur bis hin zum funktionellen Invasionsmodell und standardisierten Xenograftmodellen unterschiedliche Ansätze zur Entwicklung solcher Modellsysteme für das Prostatakarzinom verfolgt worden sind. Das primäre Ziel für die Entwicklung dieser patientennahen Modelle ist es, die funktionelle Bedeutung der im Paraffin eingebetteten Präparate und am Frischmaterial beschriebenen molekularen bzw. genetischen Änderungen für die Tumorentstehung und -progression erkennen zu können. Außerdem eröffnen diese Modelle neue Perspektiven zur funktionellen und molekularen Typisierung klinisch relevanter Krebszellen.

Derzeit kommen in der experimentellen Prostatakarzinomforschung vorwiegend folgende Modelle zur Anwendung:

Abkürzungen	
CGH	Comparative genomic hybridization = komparative genomische Hybridisierung
ECM	Extracellular matrix = extrazelluläre Matrix
EMT	Epithelial-mesenchymal transition = epitheliale mesenchymale Transition
FISH	Fluorescence in situ hybridization = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase = humane telomerase-reverse Transkriptase
RNA	Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
SKY	Spectral karyotyping = spektrale Karyotypisierung
SOP	Standard operating procedure = Standardvorgehensweise

Forschungsförderung: Stiftung Europrofession; Deutsche Krebshilfe; HOMFOR (Homburger Forschungsförderungsprogramm); Südwestdeutsche Gesellschaft für Urologie.

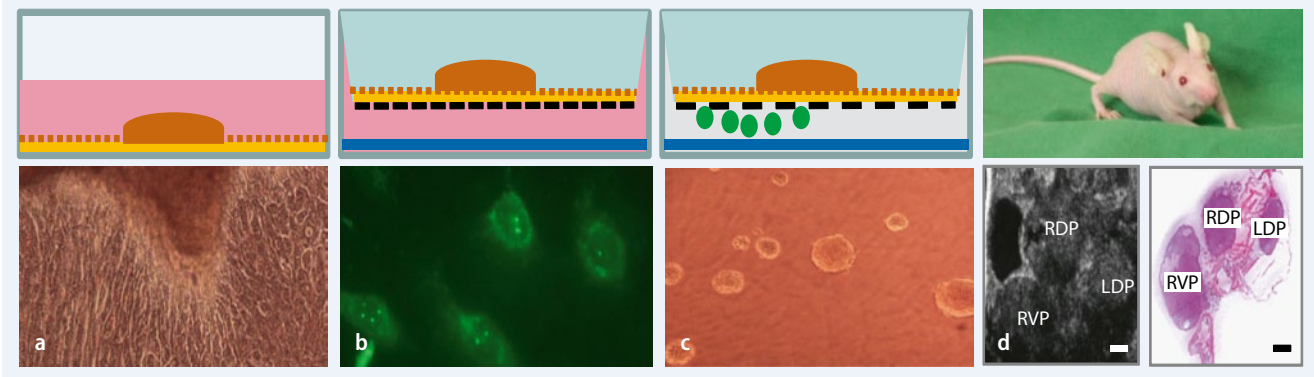


Abb. 1 ▲ **a** Gewebepartikel (Explantatkultur, Skalierung 2 mm) auf ECM-beschichtetem Objektträger; Phasenkontrast. **b** Explantatkultur auf Membran mit 0,4-µm-Poren; Fibroblasten (blau) in der Companionplate (FISH). **c** Explantatkultur auf Membran mit 8-µm-Poren. Fibroblasten (blau) + CI/Matrigel™ (grau) in der Companionplate. Invasive Tumorzellen im Gel (grün). **d** Nacktmausmodell mit sonographischer Übersicht 6 Wochen nach Tumorzellinokulation in alle 3 Prostatalappen (unten links), sowie histologischer Darstellung der Tumore in den verschiedenen Lappen (unten rechts). (RVP rechter ventraler Prostatalappen, RDP rechter dorsaler Prostatalappen, LDP linker dorsaler Prostatalappen)

1. Permanente Zelllinien wie DU145, PC-3 und die hormonabhängige Linie LNCaP werden bevorzugt verwendet. Diese aus Metastasen generierten Zelllinien repräsentieren allerdings nur einen relativ engen Ausschnitt in der Pathogenese des Prostatakarzinoms [41]. Darüber hinaus existieren mehrere Sublinien, die teilweise nur ungenügend charakterisiert sind. Die genetische Instabilität bei der Langzeitkultivierung sowie häufig auftretende Kontaminationen durch Mykoplasmen reduzieren zusätzlich die Aussagefähigkeit experimenteller Untersuchungen an diesem Material.

2. Primärkulturen aus Patientenproben nach Prostatektomie oder aus Metastasen sind aufwändig und schwierig zu handhaben. Ein großer Vorteil ist die direkte Abstammung vom Patientenmaterial, weshalb immer wieder neue methodische Ansätze zu einer Verbesserung und Standardisierung dieser Technik entwickelt werden [26]. Aufgrund der geringen Menge des Ausgangsmaterials und der begrenzten Kultivierbarkeit ist die Verfügbarkeit von Primärkulturen auf wenige Zellpassagen beschränkt. Aus diesem Grund findet diese Technik bisher nur bei wenigen experimentellen Fragestellungen eine Anwendung. Durch eine Immortalisierung von Primärkulturen (z. B. durch retrovirale Transfektion mit hTERT) kann u. U. eine permanente Zelllinie etabliert werden [20].

3. Transgene Tiermodelle basieren auf einer Tumorinduktion durch gezielte Manipulationen des Tiergenoms. Mit diesen Modellen können z. B. Ergebnisse, welche an Zelllinien erhoben wurden, überprüft werden. Darüber hinaus ermöglichen sie die In-vivo-Kontrolle neuer therapeutischer Strategien. Die Grundzüge dieses Modells wurden in mehreren Übersichtsarbeiten diskutiert [1, 14].

4. Xenograftmodelle entstehen durch die Übertragung von Gewebematerial oder Zellkulturen auf einen Host (z. B. Maus), wodurch Tumorzellen vermehrt und in ihrem biologischen Verhalten zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken untersucht werden können.

Primärkulturen: das Prostatakarzinom – ein anspruchsvoller Tumor

In der Prostatakarzinomforschung sind die Heterogenität des Tumors, das vergleichsweise langsame Zellwachstum, sowie die ausgesprochene Abhängigkeit von der Zellumgebung maßgebliche Gründe dafür, dass nur wenige Arbeitsgruppen sich routinemäßig mit dem Anzichten von Primärkulturen beschäftigen. Hinzu kommt, dass Tumorherde in Prostatektomiepräparaten häufig klein und makroskopisch nur sehr schwer erkennbar sind, weshalb im Vergleich zu anderen Tumorentitäten die für eine Zellkultur verfügbare Materialmenge sehr limitiert ist. Eine

weitere Schwierigkeit ergibt sich aus der Tatsache, dass keine Marker verfügbar sind, mit denen der Erfolg einer In-vitro-Kultivierung von Tumorzellen eindeutig dokumentiert werden kann.

Bereits König et al. [19] und auch die eigene Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die klassische Initiierung von Primärkulturen aus Tumorgewebe durch enzymatischen Verdau kleiner Gewebefragmente zu einer raschen Selektion chromosomal unauffälliger, diploider Epithelzellen führt [17].

Als Alternative zum enzymatischen Verdau der Tumorproben kann die sog. „Partikel- oder Explantatkultur“ angewendet werden. Der Verzicht auf eine Vorbehandlung des Gewebes soll die Selektion auf „normale“ Epithelzellen aus den Patientenproben verhindern (■ Abb. 1a).

Einen wichtigen Fortschritt der In-vitro-Kulturbedingungen zeigte die Arbeit von Fong et al. 1991 [5] auf. Die Autoren beschrieben erstmals die reversible Änderung der Morphologie und Differenzierung (z. B. Expression von PSA) von Prostataepithelzellen, wenn die Kultivierung in Zellkulturflaschen erfolgte, die mit extrazellulärer Matrixmischung (in deren Fall: Matrigel™) beschichtet waren. Seither hat sich die elementare Bedeutung des „Microenvironments“, d. h. extrazelluläre Matrix und v. a. benachbarter Fibroblasten für die Differenzierung und Funktion von Tumorzellen in zahlreichen Publikationen bestätigt [4, 23].

Das Kokulturmodell

Die Kokultur ermöglicht es, unterschiedliche Zellen – in diesem Falle Tumorzellen und Fibroblasten – in direkter Nachbarschaft zu kultivieren. Diese Methode ist allerdings technisch aufwändig und erfordert gewisse Erfahrungen in der Zellkultur. Mit diesem experimentellen Ansatz kann die Wechselwirkung zwischen Stromazellen, extrazellulärer Matrix und Tumorzellen simuliert werden. Die Verwendung von Membranen mit Poren von 0,4 µm erlaubt dabei eine parakrine Wechselwirkung zwischen den beiden Zellarten, ohne dass diese in direkten Kontakt treten (■ **Abb. 1b**). Damit wird prinzipiell die Situation im Tumorgewebe imitiert und der Tatsache Rechnung getragen, dass neben der extrazellulären Matrix beim Prostatakarzinom auch benachbarte Stromazellen als „epigenetische Faktoren“ bei der Zellkultivierung eine bedeutende Rolle spielen. Eine individuelle Analyse beider Zellarten nach Versuchsende ist mit standardisierten Verfahren (Proliferation, Apoptose, FISH etc.) möglich.

Die Beobachtung, dass die Proliferation von Prostatakarzinomzellen durch eine Kokultur stimuliert werden kann, wurde von Lang et al. 2000 [22] exemplarisch nachgewiesen. Allerdings spielt dabei das Verhältnis Tumorzellen zu Fibroblasten sowie deren Herkunft eine maßgebliche Rolle. Unter Anwendung dieser Technik erzielte Ergebnisse dieser und zahlreicher anderer Arbeitsgruppen haben eine zentrale Rolle tumorassoziierter Fibroblasten für Progression und Metastasierung eines Tumors dokumentiert. Kürzlich wurde diese Abhängigkeit eindrucksvoll im Tiermodell gezeigt [38]. In eigenen Untersuchungen mit diesem Zellkulturmodell konnten wir eine deutliche Steigerung der Auswachsrate und eine Erhaltung der tumorassozierten Aneuploidie der Epithelzellen über einen längeren Kultivierungszeitraum zeigen. Im direkten Vergleich mit Prostatanormalgewebe des gleichen Patienten wurden mit diesem experimentellen Ansatz aus dem Tumorstück genetisch aberrante Zellen gezüchtet, was als Beleg für die spezifische Selektion von Tumorzellen gewertet werden kann [44, 45].

Urologe 2011 · 50:961–967 DOI 10.1007/s00120-011-2630-7
© Springer-Verlag 2011

M. Saar · J. Kamradt · V. Jung · M. Stöckle · G. Unteregger
Vom Gewebe über die Primärzellkultur zum Xenograftmodell. Patientennahe und funktionelle Prostatakarzinomforschung

Zusammenfassung

Der klinische Verlauf eines Prostatakarzinoms, der häufigsten Krebserkrankung des Mannes, ist sehr variabel. Trotz intensiver Forschung fehlen bis heute – abgesehen von den klassischen histopathologischen Kriterien – prognostische Marker, die den Verlauf der Tumorerkrankung valide vorhersagen und eine gute Einschätzung der Therapiebedürftigkeit erlauben. Ein Grund hierfür liegt wahrscheinlich in dem Fehlen guter, patientennahe Tumormodellsysteme. Diese sind nicht nur von elementarer Bedeutung für ein besseres Verständnis der Pathogenese des Prostatakarzinoms, sondern spielen auch in der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien eine wichtige Rolle. Da die an permanenten Zelllinien gewonnenen Ergebnisse nur bedingt

auf die Klinik übertragbar sind und Primärkulturen aus Patientenproben nicht beliebig gezüchtet werden können, müssen neue Lösungsansätze geschaffen werden, die eine nachhaltige, patientennahe Prostatakarzinomforschung ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung unterschiedlicher Strategien der Zellkultivierung aus Prostatakarzinomgewebe und die Kombination mit einem Mausxenograftmodell dargestellt und damit ein Ausblick auf zukünftige Forschungsziele gegeben.

Schlüsselwörter

Prostatakarzinom · Primärzellkultur · Invasionsassay · 3D-Kultur · Xenograft-Mausmodell

From tumor tissue via primary cultures to xenograft models. A functional approach in prostate cancer research

Abstract

The clinical course of prostate cancer, the most common cancer in men, is very variable. Despite intense research activities over the years and besides histopathological criteria, prognostic markers that reliably predict tumor behavior and the necessity for treatment are still missing. A likely explanation for this fact is the lack of good tumor models, mimicking the in vivo situation. These models are not only essential for a better understanding of the pathogenesis of prostate cancer but also play an important role in the development of new therapeutic strategies. Since results of permanent cell culture experiments reflect only in part real tumor behavior and prima-

ry cultures from patient material cannot be grown indefinitely, novel approaches need to be developed to achieve reliable and clinically relevant prostate cancer research.

In this work the development of several approaches for culturing primary prostate cancer tissue is illustrated and a forecast of future research plans utilizing xenograft models in mice is made.

Keywords

Prostate cancer · Primary cell culture · Invasion assay · 3D-cell culture · Mouse xenograft model

Heute wissen wir, dass „aktivierte“ Fibroblasten als Myofibroblasten die epitheliale, mesenchymale Transition (EMT) von Tumorzellen katalysieren [23, 43]. Im Rahmen dieser EMT vollziehen die beteiligten Zellen einen Phänotypwechsel, der wesentlich das Migrationsverhalten der Zellen bestimmt.

Im Wesentlichen ist dieses Modell auf individuelle Fragestellungen beschränkt, da es sich als generelles Zellkultursystem nur bedingt eignet. Vergleichsweise hoher experimenteller und finanzieller Aufwand, eine nicht immer einfache Übertragung von Standardtechniken auf das Kokultursystem und die technisch schwierige Passagierung limitieren die Einsatzmöglichkeiten. Die Verwendung genauer charakterisierter ECM-Komponenten und sezernierter Zellproteine des Stromaaanteils haben in der „normalen“ Monolayerzellkultur zwischenzeitlich dafür gesorgt, dass das Microenvironment im Tumor auch dort recht gut simuliert werden kann.

Grundsätzlich verlangt das Anlegen von Primärkulturen neben dem obligatorischen Ethikvotum und der Einverständniserklärung des Patienten auch eine Kooperation mit dem Pathologen. In unserer Klinik besteht daher seit vielen Jahren eine enge Zusammenarbeit mit den Kollegen aus der Pathologie bei Probenentnahme. In einem eigens hierfür eingerichteten Arbeitsbereich werden nach gemeinsam erarbeiteten SOP unter sterilen Kautelen direkt nach operativer Entfernung repräsentative Proben aus der frischen Prostata für die Zellkultur entnommen.

Trotz verbesserter Kultursysteme ist es nach wie vor schwer, die Karzinomzellen über einen längeren Zeitraum zu kultivieren. Ursachen hierfür könnten u. a. an dem ausgewählten Patientenmaterial liegen. Üblicherweise werden viele Patienten mit einem Gleason-Summenscore von 6–7 und aufgrund von Früherkennungsmaßnahmen zunehmend geringer Tumorgöße radikal operiert. Es ist zu erwarten, dass in diesen Patientenproben nur wenige Tumorzellpopulationen vorhanden sind, die *in vitro* zum Auswachsen aus der Gewebeprobe fähig sind. Ob es sich dabei um Stammzellen oder „cancer-initiating cells“ handelt, ist gegenwärtig noch unklar. Es könnte also im Falle

des Prostatakarzinoms schlicht und einfach daran liegen, dass im Ausgangsmaterial zu viele terminal differenzierte Tumorzellen vorhanden sind und die proliferationsfähigen Zellen nur eine Minderheit ausmachen.

Man vermutet, dass maximal 0,1% der Tumorzellen Stammzellen darstellen. Eine Anreicherung über ein Zell-Sorting bietet einen guten Lösungsansatz, allerdings wird dies nur unter gewissen Voraussetzungen erfolgreich sein: Zum einen muss genügend Ausgangsmaterial vorhanden sein und zum anderen muss ein verlässlicher Marker als Anreicherungskriterium existieren. In jüngster Zeit wurde dieses Verfahren erfolgreich zur Anreicherung von Stammzellen als „side population“ aber auch zur Isolierung von Stromazellsubpopulationen angewandt [43].

Von der Kokultur zum Invasionsmodell

Aufgrund der begrenzten Aussagen, die mit der Karyotypisierung getroffen werden können, und der Beschränkung dieser Technik ausschließlich auf teilungsfähige Zellen wurde die zytogenetische Charakterisierung des Prostatakarzinoms auf Techniken wie SKY, CGH und FISH erweitert [31]. Mit diesen umfassenden molekulargenetischen Untersuchungen an Frisch- und in Paraffin eingebetteten Gewebe konnten wir eine Amplifikation der 3q25–q26-Region beim Prostatakarzinom nachweisen. Als Zielgen dieser Amplifikationseinheit konnte *TLOC/Sec62* eingegrenzt werden [15]. Diese Genamplifikation und Überexpression von *Sec62* fand sich auch in der Zelllinie DU-145, wohingegen PC-3 ebenfalls eine erhöhte Expression aber keine Amplifikation der 3q25–q26-Region zeigte.

Da die Bedeutung dieses Gens bzw. dessen Produkt bis dato bei keinem Malignom bekannt war, erfolgten funktionellen Studien mittels „gene silencing“ und Transfektion. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von *Sec62* zu einer signifikanten Abnahme des Invasionspotentials von Prostatakarzinomzellen führt [10]. Für diese Untersuchungen wurde ein Standardmodell verwendet, bei welchem Tumorzellen auf einem Matrigel™-beschichte-

ten Membraneinsatz mit 8 µm Porengröße kultiviert werden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass funktionelle Studien an permanenten Zelllinien durchaus ihre Bedeutung haben, wenn einzelne Gene analysiert werden, die gleichermaßen im primären Tumormaterial und den Zelllinien verändert sind. Auch Primärkulturen und komplexe 3D-Modelle können zur Lösung solcher Fragestellungen hilfreich sein.

Die Invasion von Tumorzellen wird durch eine Modifikation des Kokultursystems und der Migration untersucht. Den verschiedenen Ansätzen gemeinsam ist immer eine Anordnung, in der kultivierte Zellen auf Matrigel™-beschichteten Membranen (Porendurchmesser 3–8 µm) über einem „Attractant“ im unteren Kompartiment aktiv diese Barriere aus Matrigel™ durchbrechen und auf die Unterseite der Membran wandern. Die Detektion der durchgewanderten invasiv gewachsenen Zellen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen.

Es werden als Ausgangspopulation Gewebeprobe, die direkt nach Prostatektomie aus dem Präparat entnommen wurden (s. oben), verwendet. Die invasiv wachsenden Zellpopulationen werden dabei nach dem Durchwandern der Membran auf der Unterseite in einem Gelkissen bestehend aus einer Mischung von Matrigel™ und Kollagen I aufgefangen. Zusätzlich können in Kollagen I eingebettete Fibroblasten oder „stromal cell derived factor“ (SDF-1) als „attractant“ verwendet werden (■ **Abb. 1c**). Nach 2–4 Wochen befinden sich die invasiv wachsenden Tumorzellen im Gel des unteren Kompartiments in Form unterschiedlicher Spheroide: Deren Struktur reicht von runden, gleichmäßigen Formen bis hin zu einer flächigen, teilweise irregulären Architektur oder einem Netz, welches an „tube like structures“ erinnert [16]. Diese Zellaggregate können anschließend mittels enzymatisch-mechanischer Techniken unter dem Mikroskop aus dem Gel herausgelöst, weiterkultiviert, fixiert und eingebettet oder für DNA/RNA-Isolierung verwendet werden. So erlaubt dieser innovative experimentelle Ansatz nicht nur die Anreicherung einer vorselektionierten Zellpopulation sondern bietet auch die Möglichkeit, invasiv wachsende Prostata-

karzinomzellen (im Gel auf der Unterseite) mit nichtinvasiv bzw. noch nicht invasiv wachsenden Zellen (auf der Oberseite der Membran) bezüglich phänotypischer/genomischer/epigenetischer Veränderungen vergleichend zu untersuchen.

Da es sich bei diesem Versuchsansatz um ein In-vitro-Modell mit Patientenproben handelt, können die Daten mit klinischen Daten des jeweiligen Patienten, den histopathologischen Ergebnissen und auch mit anderen Untersuchungen an dem Frischmaterial verglichen werden.

Die bisherigen Analysen ergaben überwiegend einheitliche genetische Veränderungen der invasiv wachsenden Zellen (CGH) sowie einen meist basalen Phänotyp in immunhistochemischen Färbungen. Auch die differentielle Expression verschiedener MicroRNA während der Invasion und Metastasierung wird derzeit an diesem Modell untersucht. Da die Fähigkeit einer Zelle zur Invasion mit einer Änderung der Genexpression einhergeht, eignet sich dieser Versuchsaufbau hervorragend, um die molekularen Veränderungen während der Invasion an individuellen Patientenproben zu analysieren. Im Mittelpunkt der eigenen gegenwärtigen Experimente steht dabei die EMT. Zahlreiche Publikationen beschreiben einen Zusammenhang zwischen der Expression von Stammzellmarkern und einem erhöhten malignen Potential sowie der Metastasierung [24, 25, 29, 34]. Spannend dabei scheint die Rolle der MicroRNA zu sein, deren direkte Beteiligung am Prozess der Invasion bereits gut dokumentiert ist [21].

Die Weiterkultivierung der Spheroide außerhalb des Invasionsmodells ist erschwert, da auch hier die optimale Umgebung einen entscheidenden Einfluss auf die Kultur und Qualität der Zellen ausübt. So wie im Tumorgewebe das Stroma einen Einfluss auf die maligne Differenzierung der Zellen hat [11], war es auch früh möglich, in Kultur von Prostatastromazellen nachzuweisen, dass hier anwesende Umgebungsfaktoren in der Lage sind, posttranskriptionale Veränderungen hervorzurufen und so die Progression zu beeinflussen [35]. Die möglichst exakte Simulation dieser „Mikroumgebung“ in einem In-vitro-Modell ist nach wie vor eine große Herausforderung in der onkologischen Forschung, der regenerativen Medizin

und dem „tissue engineering“. Als alternativer Weg bietet sich die orthotope Übertragung dieser funktionell vorselektierten Zellpopulation in ein Tiermodell an.

Etablierung eines Tiermodells: Ansprüche und Wirklichkeit

In der Prostatakarzinomforschung sind In-vivo-Modelle zur Evaluation experimenteller Daten aus Gewebe und Zellkultur dringend erforderlich, um diese auf ihre klinische Relevanz überprüfen zu können. Je besser diese Modelle sind, desto schneller können gewonnene Erkenntnisse auch für eine klinische Prüfung angewandt werden. Eine Vielzahl von Tiermodellen wurde entwickelt, um die Einschränkungen der Zellkultur zu überwinden. Ein Tiermodell eignet sich für das Prostatakarzinom unter Beachtung einiger Besonderheiten gleich mehrfach: Einerseits kann Patientenmaterial z. B. auf der Maus propagiert und expandiert werden. Hierzu sind vor allem Modelle der subkutanen Tumorgewebeimplantation beschrieben, die in seriell subkultivierten Xenografflinien als Materialreservoir für In-vitro-Untersuchungen und In-vivo-Therapieversuche dienen [37, 40]. Die als Xenograft „kultivierten“ Gewebe aus radikalen Prostatektomien könnten als Ausgangsmaterial für Primärkulturen dienen oder auch direkt als Gewebeproben verwendet werden. Andererseits haben Tiermodelle auch den Vorteil, das biologische Verhalten der Tumorzellen in einer natürlichen und bestenfalls auch dem Primärorgan zugehörigen Umgebung repräsentieren zu können. Gute Tiermodelle für das Prostatakarzinom sind aber nach wie vor selten, aufwändig und technisch schwierig, was eine regelmäßige Anwendung bisher verhindert [39].

Dem Wirtsorgan wird eine große Bedeutung für die Qualität eines Xenograftmodells zuteil. In der Prostatakarzinomforschung wurden bisher v. a. heterotope, subkutane Modelle beschrieben [33]. Diese Modelle sind von der Methodik leicht erlern- und anwendbar. Zudem erlauben sie eine einfache visuelle Kontrolle des Wachstumserfolgs. Im Vergleich hierzu ist eine Implantation des Zellmaterials in die Prostata des Versuchstieres (orthotope) wesentlich aufwändiger und schwie-

riger. Sie bietet allerdings physiologische und tumorbiologische Vorteile. Kein anderer Wachstumsort simuliert die natürliche Umgebung der Tumorzellen besser und bietet daher vergleichbar optimale Voraussetzungen für Angiogenese und Stromainteraktion wie das Ursprungsorgan [8, 27]. Diese offensichtlichen Vorteile des orthotopen Modells werden auch durch die Tatsache, dass im Gegensatz zum subkutanen Modell Lymphknotenmetastasen im Sinne einer systemischen Tumorerkrankung gefunden werden, untermauert [2, 3, 27]. Des Weiteren konnten bereits Stephenson et al. [36] beim Vergleich subkutaner und orthotoper Zellenokulation zeigen, dass v. a. bei geringer Zellmenge die Tumorigenität nach orthotoper Implantation deutlich höher ist. Dies bestätigt die tumorbiologischen Vorteile des Modells. Daher wird die orthotope Implantationstechnik v. a. bei der Arbeit mit Primärtumormaterial favorisiert. Ebenso wie in der In-vitro-Kultivierung spielen offensichtlich auch in vivo die gleichen Faktoren wie z. B. das „Microenvironment“ eine wichtige Rolle.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums Homburg haben wir die orthotope Zellenokulation von Prostatakarzinomzellen aus etablierten Zelllinien an Nacktmäusen durchgeführt und diese bisher nur lückenhaft beschriebene Methode optimiert (■ **Abb. 1d**, [32]). Ein innovatives Element dieses Ansatzes ist die nicht invasive Dokumentation des Tumorwachstums mittels Kleintierultraschall, was eine wiederholte Verlaufskontrolle der Tumore erlaubt, ohne die Tiere töten zu müssen. Die bisherigen Befunde zeigen, dass für eine erfolgreiche intraprostatiche Implantation von etablierten Zelllinien nur ca. 50.000 Zellen (ohne Vorselektion) benötigt werden, was bereits eine erhebliche Reduzierung der Materialmenge – v. a. im Hinblick auf die Übertragung des Modells auf Primärkulturen – gegenüber den publizierten Daten bedeutet.

Neben dem wichtigen Faktor der Tumorumgebung konnte bei der Induktion von Tumoren im Mausmodell gezeigt werden, dass mit einer Vorselektion bestimmter Zellklone die notwendige Zellzahl für die Tumorbildung deutlich redu-

ziert werden kann. Allerdings muss hierzu bereits in der vorangehenden Zellkultur dafür gesorgt werden, dass die Ausbreitung eines bestimmten, mindervertretenen Klons unter dem Selektionsdruck durch die Überwucherung mit anderen Zellen nicht ausbleibt [6]. Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass in Kultur invasiv ins Matrigel™ eingewachsene DU145-Zellen nach subkutaner Injektion in NOD/SCID-Mäuse deutlich tumorigener sind als nicht invasive Klone der gleichen Zelllinie. So reichten hier bereits 100 Zellen aus, um einen subkutanen Tumor zu induzieren [18]. Ob es durch die Invasion zu einer Anreicherung von Tumorstammzellen kam und/oder ob eine Änderung der Genexpression durch eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) stattfand, ist gegenwärtig unklar. Allerdings sehen wir uns durch diese Ergebnisse in unserem experimentellen Ansatz bestärkt, dass vorselektionierte Zellen aus unserem Invasionsmodell ein ähnlich tumorigenes Potential in der Maus aufweisen werden. Der überzeugendste Beweis dafür, dass es sich hierbei um Tumorstammzellen handelt wäre dann erbracht, wenn wenige dieser vorselektionierten Zellen in der Lage wären, im orthotopen Tiermodell heterotope Tumore zu induzieren [9].

Perspektiven

Die raschen Entwicklungen in der experimentellen Tumorbilologie erfordern mehr denn je repräsentative Modellsysteme, an denen die in der Systembiologie und im Hochdurchsatzscreening erhobenen Daten hinsichtlich ihrer Bedeutung sowohl bei der Tumorentwicklung und Progression als auch bei der Metastasierung und Hormonunabhängigkeit weiter untersucht werden können. Im Vordergrund stehen hierbei gegenwärtig die Rolle der Tumorstammzelle sowie die EMT bzw. deren Umkehr (mesenchymal-epitheliale Transition, MET) bei der Fähigkeit der Tumorzelle zur Invasion und Metastasierung. Hierbei scheinen auch die MicroRNA eine wichtige regulatorische Rolle zu spielen. Zur weiteren Aufklärung dieser molekularen funktionellen Zusammenhänge werden intelligente Modellsysteme benötigt, welche durch Eingriff

in die genetischen Regulationsmechanismen – Transfektion bzw. „gene silencing“ – mögliche neue Signaltransduktionswege und Zielgene offenlegen und eine weitere Validierung erlauben. Dabei ist es wichtig zu erkennen, dass es nicht das perfekte Modellsystem für alle Untersuchungen gibt, sondern dass jeder der hier exemplarisch gezeigten experimentellen Ansätze seine Berechtigung für spezifische Fragestellungen hat.

Nach wie vor können wir auf Hochdurchsatzanalysen mit permanenten Zelllinien nicht verzichten. Auch hier wurden in der Vergangenheit Entwicklungen angestoßen, welche dem Einsatz dieser Zelllinien eine neue Wertigkeit verleihen, wie die Bildung von homologen und heterologen Spheroidkulturen, die sich eingeschränkt auch für Screeninguntersuchungen eignen [12, 13].

Die Kombination von innovativen In-vitro-Zellkulturtechniken mit In-vivo-Mausmodellen wird einen Fortschritt bei der Untersuchung tumorspezifischer Veränderungen im Prostatakarzinom ermöglichen [42]. Vergleichende Ergebnisse von dreidimensionalen Spheroidkulturen mit klassischer Monolayer-Zellkulturtechnik haben bereits gezeigt, dass sich abhängig von dem verwendeten Modell signifikante Unterschiede der toxischen Wirkungen bei Behandlung mit Krebstherapeutika zeigen [7].

Fazit für die Praxis

Die Verwendung von Patientenproben in Kokultivierungsmodellen zur selektiven Anzüchtung von Tumorzellen, einer funktionellen Selektion im 3D-Invasionsmodell und der Transplantation eventuell vorselektionierter Tumorzellen in ein Mausmodell bieten als in-vivo-nahe Modelle innovative und vielversprechende Ansätze bei der Erforschung von Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms. Mit diesen Methoden könnte es möglich sein, schneller neue brauchbare Marker für das Wachstumsverhalten eines Tumors zu identifizieren. Diese Konzepte stellen damit als präklinisches Modell ein wichtiges Bindeglied zwischen der Grundlagenforschung und der Klinik dar, ganz im Sinne der translationalen Forschung.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. rer. nat. G. Unteregger
Klinik für Urologie und Kinderurologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes,
Kirrberger Straße 1, 66421 Homburg/Saar
gerhard.unteregger@uks.eu

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- Ahmad I, Sansom OJ, Leung HY (2008) Advances in mouse models of prostate cancer. *Expert Rev Mol Med* 10:16
- An Z, Wang X, Geller J et al (1998) Surgical orthotopic implantation allows high lung and lymph node metastatic expression of human prostate carcinoma cell line PC-3 in nude mice. *Prostate* 34:169–174
- Bex A, Wullich B, Endris V et al (2001) Comparison of the malignant phenotype and genotype of the human androgen-independent cell line DU 145 and a subline derived from metastasis after orthotopic implantation in nude mice. *Cancer Genet Cytogenet* 124:98–104
- Chung LW, Baseman A, Assikis V, Zhou HE (2005) Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol* 173:10–20
- Fong CJ, Sherwood ER, Sutkowski DM et al (1991) Reconstituted basement membrane promotes morphological and functional differentiation of primary human prostatic epithelial cells. *Prostate* 19:221–35
- Frese KK, Tuveson DA (2007) Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 7:645–658
- Friedrich J, Eder W, Castaneda J et al (2007) A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *J Biomol Screen* 12:925–937
- Fu X, Herrera H, Hoffman RM (1992) Orthotopic growth and metastasis of human prostate carcinoma in nude mice after transplantation of histologically intact tissue. *Int J Cancer* 52:987–990
- Goldstein AS, Stoyanova T, Witte ON (2010) Primitive origins of prostate cancer: In vivo evidence for prostate-regenerating cells and prostate cancer-initiating cells. *Mol Oncol* 4:385–396
- Greiner M, Kreutzer B, Jung V et al (2010) Silencing of the SEC62 gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells. *Int J Cancer* 128:2284–2295
- Hägglöf C, Hammarstein P, Jodésson A et al (2010) PDGFRbeta expression in prostate tumors and non-malignant prostate tissue predicts prostate cancer survival. *Plos One* 5:10747
- Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C et al (2010) Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* 148(1):3–15
- Hsiao AY, Torisawa YS, Tung YC et al (2009) Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids. *Biomaterials* 30:3020–3027
- Jeet V, Russel PJ, Khatri A (2010) Modeling prostate cancer: a perspective on transgenic mouse models. *Cancer Metastasis Rev* 29:123–142
- Jung V, Kindich R, Kamradt J et al (2006) Genomic and expression analysis of the 3q25–q26 amplification unit reveals TLOC1/SEC62 as a probable target gene in prostate cancer. *Mol Cancer Res* 4:169–176

Neue Impulse für die Stammzellenforschung

Die Nutzung von Stammzellen erfährt in der Medizin eine immer größere Bedeutung. Eine Zukunftsvision ist, aus Stammzellen Organe zu züchten. Im Januar 2011 startete ein Gemeinschaftsprojekt, das Grundlagenwissen im Bereich der Stammzellenforschung in die Anwendung führen möchte. Bis Ende 2013 soll das interdisziplinäre Forscherteam optimale Wachstumsbedingungen für Stammzellen identifizieren und eine Technologie zum Aufbau eines dreidimensionalen mehrschichtigen Stammzelltestsystems entwickeln. Im Vordergrund steht dabei die Frage der genauen Zellpositionierung und deren Einfluss auf die Gewebebildung: Wie müssen unterschiedliche Zelltypen angeordnet sein, damit sie sich selbst zu einer Nische organisieren? Des Weiteren entwickeln die Wissenschaftler momentan eine Bildbearbeitungssoftware, durch die eine einfache Analyse der in-vitro-Stammzellnische möglich wird. Durch die Aufklärung der Funktionsweise adulter Stammzellen können neue therapeutische Ansätze erarbeitet werden, beispielsweise zur Bekämpfung von Leukämie.

Quelle: Fraunhofer-Institut für Lasertechnik ILT, www.ilt.fraunhofer.de

16. Jung V, Wullich B, Kamradt J et al (2007) An improved in vitro model to characterize invasive growing cancer cells simultaneously by function and genetic aberrations. *Toxicol In Vitro* 21:183–190
17. Ketter R, Zwergel T, Romanakis K et al (1996) Selection toward diploid cells in prostatic carcinoma derived cell cultures. *Prostate* 28:364–371
18. Klarmann GJ, Hurt EM, Mathews LA et al (2009) Invasive prostate cancer cells are tumor initiating cells that have a stem cell-like genomic signature. *Clin Exp Metastasis* 26:433–446
19. König JJ, Teubel W, Dongen JW van et al (1993) Tissue culture loss of aneuploid cells from carcinomas of the prostate. *Genes Chromosomes Cancer* 8:22–27
20. Kogan I, Goldfinger N, Milyavsky M et al (2006) hTERT-immortalized prostate epithelial and stromal-derived cells: an authentic in vitro model for differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res* 66:3531–3540
21. Kong D, Banerjee S, Ahmad A et al (2010) Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. *PLoS One* 5:12445
22. Lang SH, Stower M, Maitland NJ (2000) In vitro modelling of epithelial and stromal interactions in non-malignant and malignant prostates. *Br J Cancer* 82:990–997
23. Liao CP, Adisetiyo H, Liang M, Roy-Burman P (2010) Cancer-associated fibroblasts enhance the gland-forming capability of prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 70:7294–7303
24. Mani SA, Guo W, Liao MJ et al (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133:704–715
25. Marian CO, Yang L, Zou YS et al (2010) Evidence of epithelial to mesenchymal transition associated with increased tumorigenic potential in an immortalized normal prostate epithelial cell line. *Prostate* (Epub ahead of print)
26. Peehl DM (2005) Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer* 12:19–47
27. Pettaway CA, Pathak S, Greene G et al (1996) Selection of highly metastatic variants of different human prostatic carcinomas using orthotopic implantation in nude mice. *Clin Cancer Res* 2:1627–1636
28. Pienta KJ, Abate-Shen C, Agus DB (2008) The current state of preclinical prostate cancer animal models. *Prostate* 68:629–639
29. Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9:265–273
30. Robert Koch Institute (RKI), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V (2010) Krebs in Deutschland 2005–2006. Häufigkeiten und Trends. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin
31. Rohde V, Wellmann A, Wernert N et al (2002) From SKY, chips and proteomics. *Molecular medicine in the time of high technology. Urologe A* 41:177–197
32. Saar M, Körbel C, Jung V et al (2010) Experimental orthotopic prostate tumor in nude mice: Techniques for local cell inoculation and three-dimensional ultrasound monitoring. *Urol Oncol* (Epub ahead of print)
33. Schroeder FH, Okada K, Jellinghaus W et al (1976) Human prostatic adenoma and carcinoma. Transplantation of cultured cells and primary tissue fragments in „nude“ mice. *Invest Urol* 13:395–403
34. Sethi S, Macoska J, Chen W, Sarkar FH (2010) Molecular signature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer bone metastasis. *Am J Transl Res* 3:90–99
35. Story MT, Hopp KA, Meier DA (1996) Regulation of basic fibroblast growth factor expression by transforming growth factor beta in cultured human prostate stromal cells. *Prostate* 28:219–226
36. Stephenson RA, Dinney CP, Gohji K et al (1992) Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 84:951–957
37. Sun S, Sprenger CC, Vessella RL et al (2010) Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J Clin Invest* 120:2715–2730
38. Thalmann GN, Rhee H, Sikes RA et al (2010) Human prostate fibroblasts induce growth and confer castration resistance and metastatic potential in LNCaP Cells. *Eur Urol* 58:162–171
39. Weerden WM van, Romijn JC (2000) Use of nude mouse xenograft models in prostate cancer research. *Prostate* 43:263–271
40. Weerden WM van, Bangma C, Wit R de (2009) Human xenograft models as useful tools to assess the potential of novel therapeutics in prostate cancer. *Br J Cancer* 100:13–18
41. Wang H, Huang S, Shou J et al (2006) Comparative analysis and integrative classification of NCI60 cell lines and primary tumors using gene expression profiling data. *BMC Genomics* 7(166):1–11
42. Yu SQ, Lai KP, Xia SJ et al (2009) The diverse and contrasting effects of using human prostate cancer cell lines to study androgen receptor roles in prostate cancer. *Asian J Androl* 11:39–48
43. Zhao H, Peehl DM (2009) Tumor-promoting phenotype of CD90hi prostate cancer-associated fibroblasts. *Prostate* 69:991–1000
44. Zwergel T, Kakirman H, Rohde V et al (1998) Androgen receptor expression, proliferation index and aneuploidy in tissue explant cultures derived prostate carcinoma cells co-cultivated on membranes. *Eur Urol* 33:414–423
45. Zwergel T, Kakirman H, Schorr H et al (1998) A new serial transfer explant cell culture system for human prostatic cancer tissues preventing selection towards diploid cells. *Cancer Genet Cytogenet* 101:16–23