Interzelluläre Kommunikation

Prof. Dr. Dieter F. Hülser, Stuttgart
Biologisches Institut der Universität

Bäume wachsen nicht in den Himmel – wie schon ein Sprichwort feststellt – aber auch Tiere erreichen nur eine artspezifische Größe, die genetisch festgelegt ist und eine Optimierung auf Grund von chemischen und physikalischen Naturgesetzen erfahren hat. Warum aber teilen sich Leberzellen nicht mehr, wenn dieses Organ die dem zugehörigen Tier angepaßte Form und Größe erreicht hat? Wie verständigen sich Herzzellen, damit es zu einer koordinierten Kontraktion des Herzens kommt? Den zentralen Fragen nach der Regulation über die direkte interzelluläre Kommunikation sowie nach der Natur der signaltragenden Moleküle wird heute verstärkt nachgegangen. Diese Klärung ist nicht nur von allgemeinem naturwissenschaftlichem Interesse, sondern trägt auch zum Verstehen des ungeregelten Wachstums bei und kann damit neue Wege zur Therapie einer Reihe von Krankheiten eröffnen.

Die direkte interzelluläre Kommunikation

Die direkte interzelluläre Kommunikation ist eine der drei Möglichkeiten zur Informationsübertragung im Organismus, die im Tierreich ausgebildet worden sind. Eine rasche Signalfortleitung ist durch Nervenzellen gegeben, die frequenzmodulierte elektrische Impulse mittels häufiger „Nachverstärkung" über meterlange Strecken weiterleiten. Der Transport spezifischer Moleküle, wie Hormone, erlaubt eine Nachrichtenübermittlung zu entfernt liegenden Zielzellen. Die Geschwindigkeit dieser Signalausbreitung ist jedoch wesentlich langsamer als bei der Übertragung durch Nervenzellen. Zellen in Organen oder Geweben stehen über feine, proteinausgekleidete Kanäle in unmittelbarem Kontakt. Diese direkte Zell-zu-Zell Kopplung läßt mannigfachen Informationsaustausch zu, wobei die Geschwindigkeit der Informationsübermittlung von der Diffusionsfähigkeit der signaltragenden Moleküle abhängt.

Diese Zell-zu-Zell Poren entstehen bei einigen Arten schon während der frühesten Embryonalentwicklung, etwa nach der dritten Teilung des befruchteten Eies, wenn erst acht Zellen vorhanden sind. Aus der Kopplung zwischen

Dottersack und den sich entwickelnden spezialisierten Organen wird auf eine interzelluläre Nährstoffversorgung geschlossen, eine Aufgabe, die später vom Blutkreislauf übernommen wird. Während der Differenzierung von Zellen zu einem Gewebe oder Organ entkoppeln sich diese von den umgebenden undifferenzierten Zellen. Im vollständig ausdifferenzierten Zustand sind die Zellen eines Organs nur dann ständig über Zell-zu-Zell Poren gekoppelt, wenn eine funktionelle physiologische Notwendigkeit besteht. Diese ist für den koordinierten Herzschlag genauso gegeben wie für die Peristaltik des Darmes oder die gezielte Hormonausschüttung von Drüsenzellen. So produzieren die Langerhansschen Inselzellen der Bauchspeicheldrüse drei unterschiedliche Hormone: Insulin, Glukagon und Somatostatin. Eine präzise Regulation des Blutzukkerspiegels bedingt eine koordinierte Sekretion dieser Hormone, was nicht möglich ist ohne eine Feinabstimmung der drei beteiligten unterschiedlichen Inselzellen. Diese A-, B- und D-Zellen sind untereinander über die Zell-zu-Zell-Poren gekoppelt und regeln auf diesem Wege ihre Hormonausschüttung. Während man ziemlich sicher weiß, daß die Art des Signals zwischen Herzzellen ein elektrischer Impuls ist, kann man über die Natur des Signals zwischen Zellen in anderen Organen im Moment nur spekulieren. Einige Ionen und Moleküle, wie Calciumionen und cyclisches Adenosinmonophosphat, für die bereits eine Botenfunktion innerhalb der Zelle nachgewiesen wurde, scheinen die Öffnung und Schließung der Poren zu beeinflussen, als daß sie als signaltragende Moleküle für die interzelluläre Kommunikation in Frage kämen.

Zell-zu-Zell Poren sind auch bei sehr vielen Zellstämmen anzutreffen, die sich permanent in Kultur züchten lassen.

Messungen der Signale

Zellkulturen erlauben uns, homogenes Material in ausreichender Menge unter definierten Bedingungen herzustellen und gezielte Eingriffe in die Physiologie der Zellen vorzunehmen. Hierzu werden die Zellen in Plastikschalen oder Flaschen gehalten, deren Oberfläche so behandelt worden ist, daß die Zellen sich daran festsetzen, und einen Zellrasen bilden, eine Monolayerschicht.

Mit Hilfe feinster Mikropipetten – aus Glaskapillaren vor dem Versuch frisch gezogen – gelingt es, einer Zelle in der Kultur elektrische Signale aufzuprägen und diese nach Durchgang durch die Zell-zu-Zell Poren aus benachbarten Zellen wieder abzuleiten. Aus dem Vergleich der Signalamplituden läßt sich der Kopplungsgrad der Zellen quantifizieren. Die elektrophysiologischen

Messungen erlauben eine weitere Charakterisierung der Zellen: Man kann ihre Membranpotentiale und ihre Membranwiderstände messen. Außerdem eignen sich die Mikropipetten zum Injizieren fluoreszierender Substanzen, die die interzelluläre Ausbreitung dieser „Botenmoleküle" sichtbar machen.

Die Abb. 1 zeigt sechs Zellen einer dünnbesiedelten Monolayerkultur von Brusttumorzellen der weiblichen Marshall Ratte (BICR/M1R-k). Die langen Ausläufer der Zellen und ihre Kontaktstellen mit Nachbarzellen sind deutlich auszumachen. Dieselben Zellen sind in Abb. 2 im Fluoreszenzauflicht dargestellt, zwei Minuten nachdem in eine Zelle der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer yellow injiziert worden ist. Die injizierte Zelle ist aufgrund der stärkeren Fluoreszenzintensität deutlich auszumachen. Die Farbstoffmoleküle (Molekulargewicht $M_r = 457$) haben sich nur in den Zellen ausgebreitet, die direkt oder über eine andere Zelle mit der injizierten Zelle in Kontakt stehen. In die isoliert liegende Zelle konnte daher kein Farbstoff übertreten. Unabhängig von der Dichte des Zellrasens oder dem Alter der Zellen in Kultur bleiben diese Zellen im Monolayer stets gekoppelt. Jede der beteiligten Zellen steuert zur Porenbildung in den Kontaktstellen einen Halbkanal (Connexon) bei, der an sein Gegenstück in der anderen Zelle binden muß. Vermutlich öffnen die Connexone jedoch erst dann, wenn einige hundert zu einer charakteristischen Ansammlung in der Membran aggregiert sind. Jedenfalls ergaben hochauflösende elektrophysiologische Untersuchungen einen kooperativen Effekt für die Zunahme des Signalflusses bei erstmaligem Kontakt zweier Zellen: Nach Registrieren eines ersten interzellulären Signaltransfers nimmt die Signalamplitu-

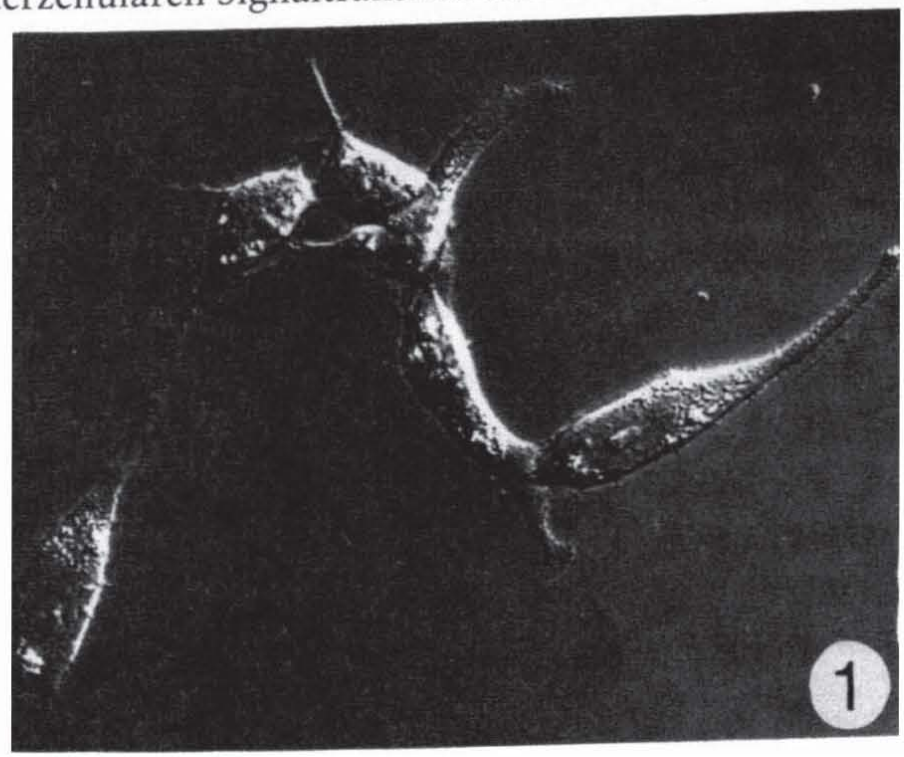

Abb. 1. Zellen eine. Brusttumors der weib lichen Marshall Ratte Interferenzkontrast Aufnahme. Vergr. 450fach.

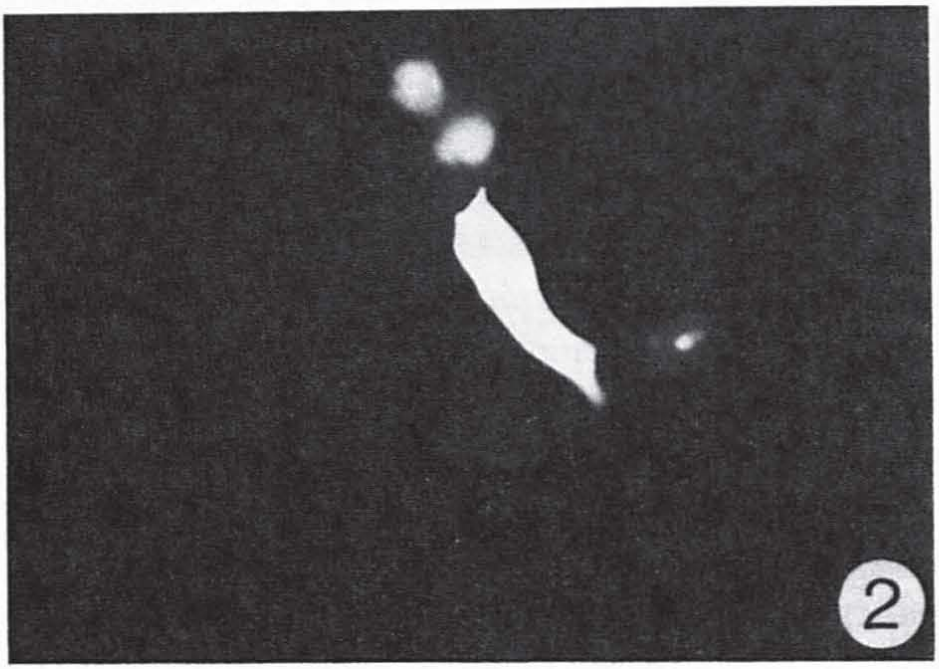

Abb. 2. Dieselben Zellen wie in Abb. 1 nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffs Lucifer yellow in die hell strahlende Zelle. Der Farbstoff hat sich nur in die Zellen ausgebreitet, die direkt oder über eine andere Zelle mit der injizierten Zelle in Kontakt stehen. Auflicht Fluoreszenz Aufnahme. Vergr. 450fach.

de stets exponentiell zu und erreicht nach zehn Minuten einen Wert, der dem vollständigen Öffnen von mehr als tausend Poren entspricht.

Diese Kontaktstellen mit den Porenansammlungen (engl. gap junctions) in den Zellmembranen können im Elektronenmikroskop eindeutig identifiziert werden. Nach raschem Einfrieren in unterkühltem Stickstoff bei etwa −200° C lassen sich die Zellen im Hochvakuum noch im tiefgefrorenen Zustand auseinanderbrechen. Als vorteilhaft für Membranuntersuchungen erweist sich dabei die Tatsache, daß im tiefgefrorenen Zustand die Lipiddoppelschicht einer Membran wie die Sollbruchstelle zwischen zwei Eisklumpen wirkt. Daher verlaufen die Bruchflächen in den meisten Fällen innerhalb der

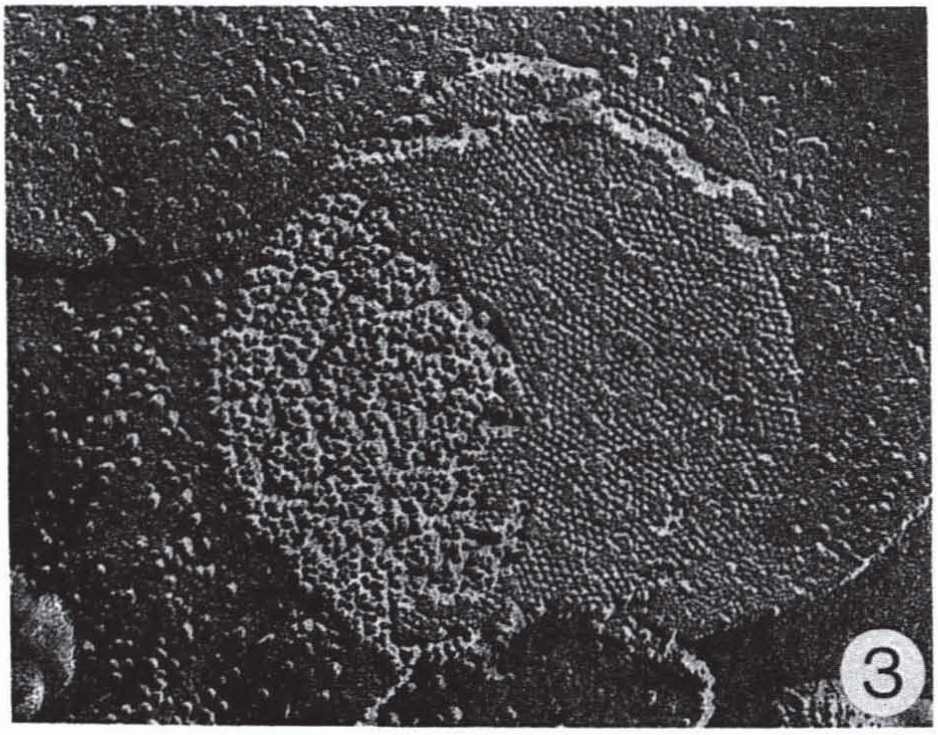

Abb. 3. Kontaktstelle mit Zell-zu-Zell Poren (gap junction) zwischen Zellen eines Brusttumors der weiblichen Marshallratte. Elektronenmikroskopische Gefrierbruch Aufnahme. Vergr. 137 000fach.

Zellmembranen, von denen dann durch Aufdampfen von Platin und Kohle ein Abdruck hergestellt wird. In Abb. 3 ist ein Membranabdruck der oben erwähnten Brusttumorzellen gezeigt, in dem eine charakteristische gap junction zu sehen ist. Der innere Kanal, der eine Zelle mit der Nachbarzelle verbindet, hat nur 1,5 nm (1,5 millionstel Millimeter) lichte Weite und ist mit diesem Abbildungsverfahren natürlich nicht darstellbar. Elektrophysiologische, elektronenmikroskopische und biochemische Untersuchungen an Monolayerzellkulturen trugen zur Bestimmung der physikalischen Daten der Poren bei. Neben der lichten Weite kann man heute Angaben machen über die Länge der Poren (15 nm), ihre maximale Leitfähigkeit (330 pS) und ihre chemische Zusammensetzung (hexagonale Anordnung von Polypeptiden eines Molekulargewichts von etwa M_r 25 000).

Zur Regulation des interzellulären Informationsflusses

Wie aber regulieren die Zellen über diese Poren ihren interzellulären Informationsfluß? Können die Poren ihre lichte Weite ändern – ähnlich einer Lichtblende im Photoapparat – oder kennen sie nur den offenen und den geschlossenen Zustand? Die Beantwortung dieser Fragen ist mit Monolayerkulturen nicht mehr möglich, da porengesteuerte Regulationsprozesse unter diesen künstlichen, zweidimensionalen Lebensbedingungen nicht mehr ablaufen. Man muß aber nicht auf Tierversuche übergehen, da wir gefunden haben, daß Zellen teilweise wieder diese Regulationsleistungen ausüben, wenn sie – wie im Körper auch – als dreidimensionaler Zellverband wachsen können.

Vor einigen Jahren wurden dreidimensional wachsende Multizell-Sphäroide von R. Sutherland aus Rochester/USA als Minitumore in die Krebsforschung eingeführt. An solchen Modelltumoren wurde die Strahlenempfindlichkeit unterschiedlicher Zellen getestet, aber auch zahlreiche Stoffwechseluntersuchungen sind mittlerweile mit diesem System durchgeführt worden.

In Rührkultur wurden die Brusttumorzellen ebenfalls zu dreidimensionalen Zellverbänden gezüchtet und erneut ihr Kommunikationsverhalten untersucht. In zwei Tage alten Multizell-Sphäroiden sind diese Zellen untereinander gekoppelt: Sowohl der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer yellow als auch elektrischer Strom breiten sich über die Zell-zu-Zell Poren aus. Dagegen werden in vier Tage alten Multizell-Sphäroiden die Farbstoffmoleküle in der injizierten Zelle zurückgehalten und nur noch der Strom passiert die Poren, der von den vergleichsweise kleinen Kaliumionen getragen wird. Nach weiteren zwei Ta-

gen tritt aber auch der injizierte Strom nicht mehr in die benachbarten Zellen über. Da die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Plasmamembranen von Zellen in Sphäroiden stets zahlreiche gap junctions erkennen ließen, schließt man daraus, daß die Zellen die lichte Weite aller Zell-zu-Zell Poren gleichzeitig variieren und die Poren auch ständig geschlossen halten können.

In Zusammenarbeit mit H. Dertinger vom Kernforschungszentrum Karlsruhe wurde nachgewiesen, daß diese Brusttumorzellen ebenso wie andere gekoppelte Zellen in Sphäroiden gegenüber ionisierender Strahlung deutlich unempfindlicher sind als entsprechende Zellen in Monolayerkultur. Dagegen zeigen die gekoppelten Zellen in Monolayerkultur keine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber ionisierender Strahlung als einzeln isolierte Zellen. Stämme, die in Monolayerkultur keine Zell-zu-Zell Poren ausbilden können, sind dazu auch nicht in der Lage, wenn sie zu dreidimensionalen Multizell-Sphäroiden gezüchtet werden. Dazu gehören die aus einem menschlichen Zervixkarzinom gezüchteten HeLa Zellen, die stets gleich strahlenempfindlich sind, unabhängig davon, wie sie kultiviert worden sind. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß in den zweidimensional wachsenden Monolayerkulturen zwar prinzipiell dieselben morphologischen Strukturen vorhanden sind wie in dreidimensional wachsenden Multizell-Sphäroiden, die regulatorischen Funktionen dieser Strukturen aber nicht eingesetzt werden. In den Multizell-Sphäroiden können die Funktionen und Regulationsleistungen jedoch reaktiviert werden, was zu einer Art von Differenzierung führt, die sich beispielsweise in einer verringerten Strahlenempfindlichkeit ausdrückt.

Multizell-Sphäroide sind den In-vivo-Verhältnissen besser angepaßt als Monolayerkulturen und eignen sich daher besonders gut als Modell„organe". Sie erweitern das Spektrum von möglichen Untersuchungen an Kulturzellen und helfen Tierexperimente zu reduzieren. An Sphäroiden aus Mischkulturen von normalen und malignen Zellen wird zur Zeit das invasive Verhalten von Tumorzellen untersucht, bei dem der interzellulären Kommunikation eine besondere Bedeutung zukommt.

Zum Autor

Prof. Dr. Dieter F. Hülser promovierte 1967 nach dem Studium der Physik an der Universität Frankfurt am Max-Planck-Institut für Biophysik. 1974 Assistent am Max-Planck-Institut für Virusforschung Tübingen. 1974 Habilitation, Universität Stuttgart. Seit 1974 Professor für Biophysik an der Universität Stuttgart und Leiter der Abteilung Biophysik des Biologischen Instituts. Forschungsaufenthalte in Kanada und USA. Zur Zeit Gastprofessor an der University of Minnesota in Minneapolis, USA.