

Interaktion von Stammzellen und Tumorzellen unter Hypoxie

Stephan Hackenberg, Agmal Scherzad, Christian Wilhelm, Rudolf Hagen, Norbert Kleinsasser

Einleitung

Die Interaktionen von Tumorzellen und mesenchymalen Stammzellen (MSC) unterliegen einer Vielzahl von Einflüssen. Neben Literaturdaten, die eine tumorinhibierende Wirkung von MSC darlegen^[1], werden v. a. proliferationsfördernde Eigenschaften von MSC auf Tumorzellen beschrieben^[2,3]. Untersuchungen zu derartigen Interaktionen finden üblicherweise unter Normoxie statt. Allerdings herrschen innerhalb einer Tumormetastase vielerorts hypoxische Bedingungen. Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Interaktionen von MSC und HNSCC unter Hypoxie.

[1]Chanda et al.,2009,Clin Cancer Res; [2]Karnoub et al.,2007,Nature; [3]Bergfeld et al.,2009.Cancer Metastasis Rev

Material und Methoden

Humane MSC wurden aus Knochenmark von 8 freiwilligen Spendern akquiriert und isoliert. Es erfolgte die Kultivierung von MSC und der HNSCC Zelllinie FaDu für 24, 48 und 72 Stunden in Normoxie (21% O₂-Sättigung) und Hypoxie (5% O₂-Sättigung). Die konditionierten Mediumüberstände von MSC wurden für eine zusätzliche 24-stündige Kultivierung von FaDu in Normoxie und Hypoxie verwendet. Zur Autophagiebestimmung wurde der Lysotracker und die Elektronenmikroskopie angewandt. Es erfolgte die morphologische und funktionelle Analyse der FaDu-Zellen. Zielparameter waren hierbei die Ultra-morphologie, die Vitalität, die Proliferation und der Zellzyklus von MSC und FaDu Zellen. Das durch MSC sezernierte Zytokinmuster wurde mit dem Dot-blot Assay bestimmt. Der Nachweis von Markern für die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) erfolgte durch Immunfluoreszenz (E-Cadherin) und PCR (SNAIL, Vimentin).

Ergebnisse

MSC und Tumorzellen zeigten unter Hypoxie Zeichen von Autophagie (Abb. 1) sowie eine Proliferationshemmung. Durch eine Kultivierung in der Hypoxiekammer kam es zu keinen Änderungen im Zellzyklus von MSC (Abb. 2). Die Proliferation von FaDu Zellen war unter Verwendung von Normoxie-MSC-Medium (NM) gemindert im Vergleich zur Kultivierung mit unkonditioniertem Medium (FM). Bei Hypoxie-MSC-Medium (HM) waren diese Effekte wieder rückläufig (Abb. 3). Im Dot-blot Assay stellte sich IL 6 als ein Schlüsselenzym der Interaktionen zwischen Tumorzellen und MSC unter Hypoxie dar (Abb. 4). FaDu Zellen wurden durch eine Kultivierung in Hypoxie-MSC-Medium nicht zur EMT angeregt, sie behielten ihre epithelialen Charakteristika bei (Abb. 5).

Autophagie

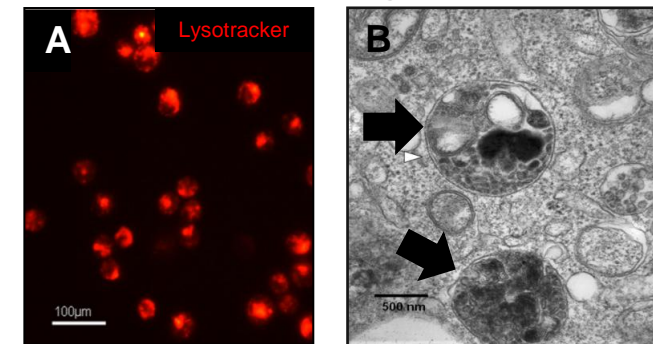


Abb. 1: Lysosomale Aktivitätssteigerung (A) und Nachweis von Autophagosomen (B; Pfeile) als Zeichen für Autophagie von MSC nach 24-stündiger Kultivierung unter Hypoxie

Zellzyklus

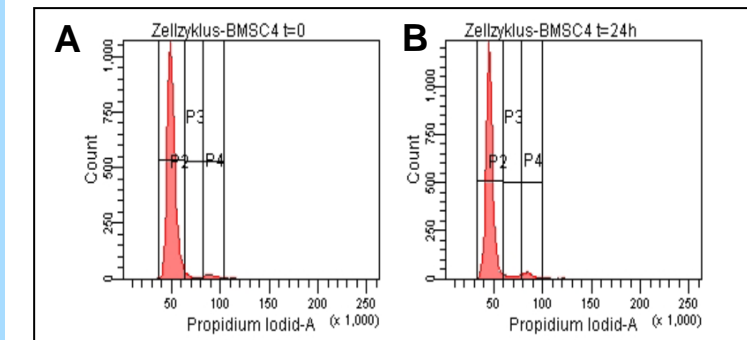


Abb. 2: durchflusszytometrisch keine Änderung des Zellzyklus von mesenchymalen Stammzellen vor (A) und nach 24-stündiger Kultivierung (B) unter Hypoxie mit einem Überwiegen der G0/G1-Phase

Tumorzellproliferation

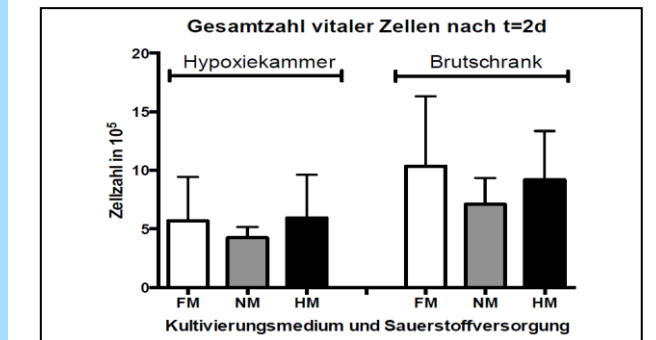


Abb. 3: Proliferationshemmung von FaDu nach Kultivierung unter Hypoxie oder mit Normoxie Medium (NM). Hypoxie Medium (HM) hebt diese Effekt wieder auf.

Zytokinsekretion

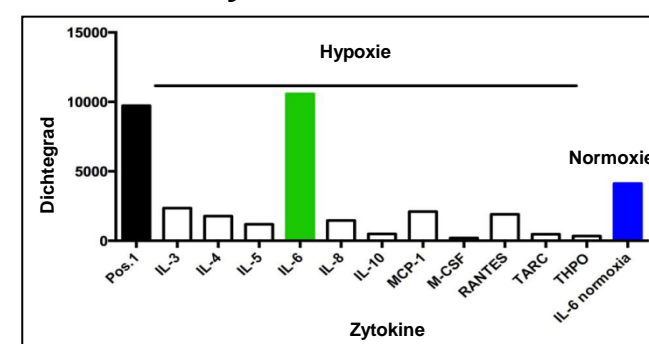


Abb. 4: Zytokinsekretionsmuster von MSC unter Hypoxie. IL-6 (grün) wird im Gegensatz zur Kultivierung in Normoxie (blau) deutlich stärker sezerniert.

Epithelial-mesenchymale Transition

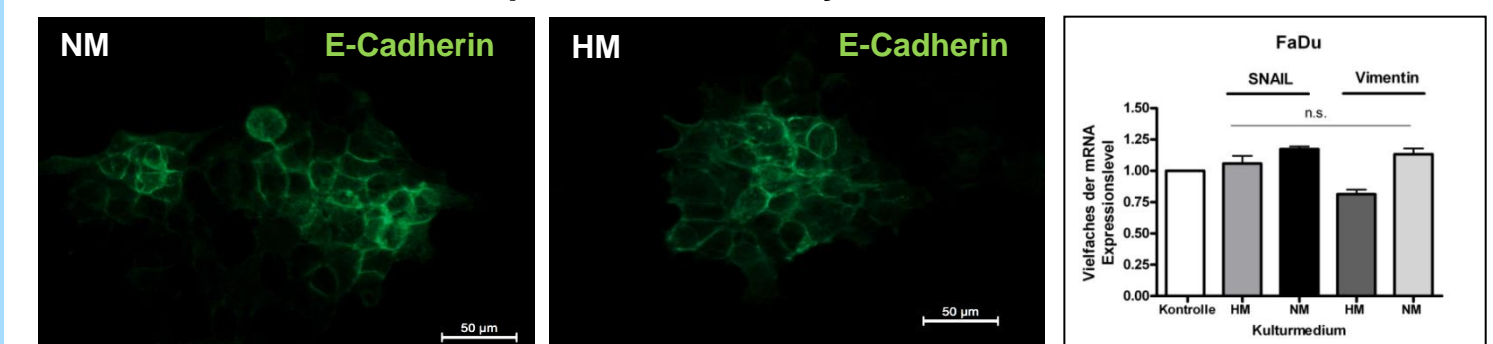


Abb. 5: In der Immunfluoreszenz kann bei FaDu Zellen unter Kultivierung in NM und HM kein Unterschied in der Expression von E-Cadherin festgestellt werden. Die Expression von SNAIL und Vimentin zeigte keine Unterschied sowohl bei NM- als auch HM-kultivierten Tumorzellen im Vergleich zur Kontrolle (FaDu Zellen in unkonditioniertem Medium)

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie demonstrieren, dass der Parameter der Sauerstoffversorgung sich signifikant auf die Interaktionen von Stammzellen und Tumorzellen auswirkt. Es ergeben sich Hinweise, dass MSC unter Hypoxiebedingungen ihr Zytokinsekretionsmuster verändern und durch parakrine Effekte Einfluss auf das Tumorzellverhalten nehmen. Die größten Unterschiede zwischen MSC unter Normoxie und Hypoxie fanden sich in der Ausschüttung von IL-6, welches bekanntermaßen ein tumorproliferationsförderndes Zytokin darstellt. Kein Einfluss scheint der Faktor Hypoxie auf das EMT-Verhalten von Tumorzellen zu haben, da sich keine signifikanten Änderungen des epithelialen Markerprofils zeigten.

Fazit: Die Beachtung der Sauerstoffverhältnisse bei *in vitro* und *in vivo* Testsystemen ist für die standardisierte Beurteilung der Interaktionen von Tumor- und Stammzellen unabdingbar.