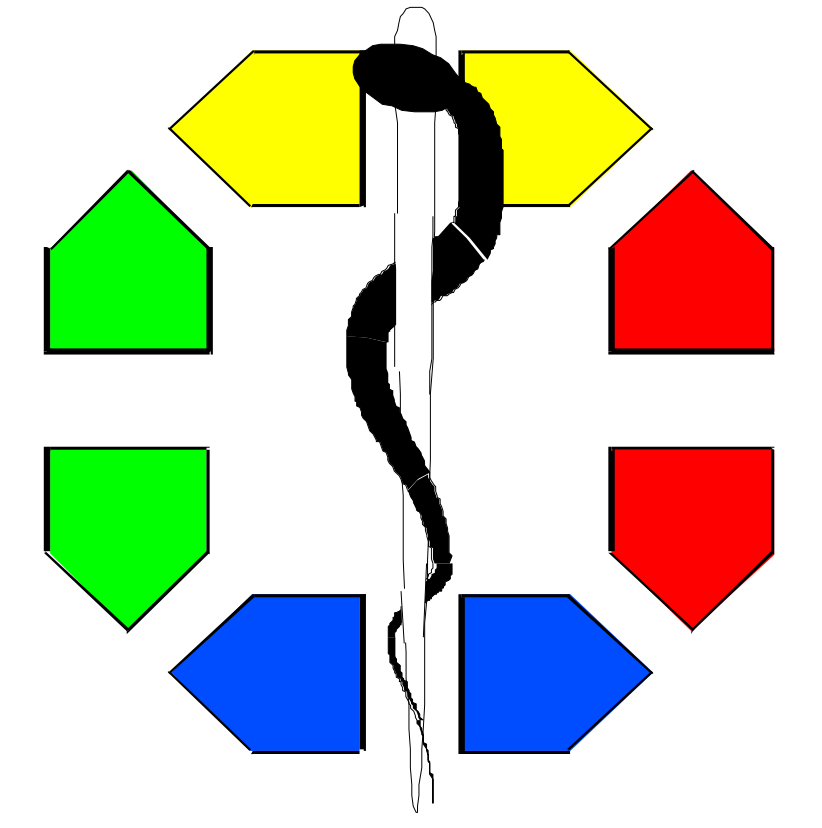




Versuch der Etablierung einer Stammzelllinie aus einem Plattenepithelkarzinom der bulbären Conjunctiva



Dirk Dekowski, Henning Thomsen, Klaus-Peter Steuhl, Daniel Meller

Klinik für Erkrankungen des vorderen Augenabschnitts, Zentrum für Augenheilkunde Universitätsklinikum Essen
Dirk.Dekowski@uk-essen.de

Einführung

Plattenepithelkarzinome der bulbären Conjunctiva sind ein ophthalmologisches Krankheitsbild mit einer geringen Inzidenzrate. Trotz maximaler Therapie mit R_0 Resektion und lokaler Chemotherapie kommt es zu Rezidiven. Gemäß der derzeit diskutierten Cancer Stem Cell- Theorie sind adulte Stammzellen innerhalb eines Tumors für seine Ausprägung, Proliferation, sowie Rezidive maßgeblich verantwortlich. In okulären Tumoren wurden solche Zellen bisher nicht nachgewiesen. In unserem Forschungsprojekt beschäftigen wir uns mit der Suche nach möglichen Cancer Stem Cells im Plattenepithelkarzinomen der bulbären Conjunctiva. Ziel der Arbeiten ist der Versuch der Isolierung solcher Zellen aus Plattenepithelkarzinomen der Conjunctiva, um daraus ein besseres Verständnis für die Biologie dieser Tumore zu gewinnen.

Material und Methoden

Von Plattenepithelkarzinomen der bulbären Conjunctiva wurden Tumorbiopsien entnommen und als Ausgangsmaterial verwendet. Das biopsierte Gewebe wurde zerkleinert und mit Trypsin enzymatisch verdaut. Die so entstehende Zellsuspension wurde gleichmäßig mit DMEM-Medium mit 15% FBS in 24-Well Platten eingebracht und bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert. Diese Zellkulturen wurden alle zwei Tage bezüglich ihrer Zellmorphologie kontrolliert. Zellen mit epithelialer Morphologie wurden passagiert und von anderen Zelltypen separiert.

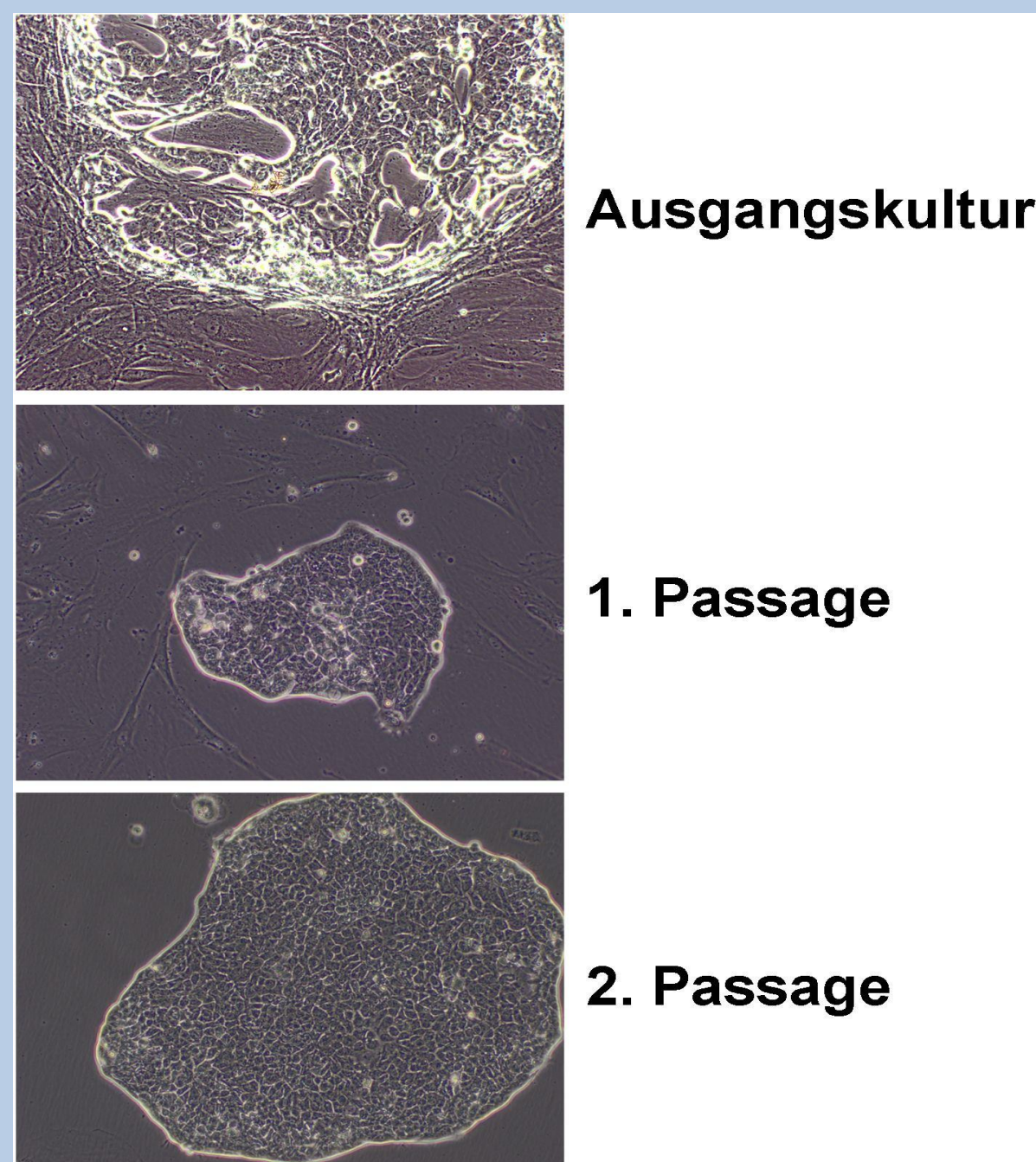
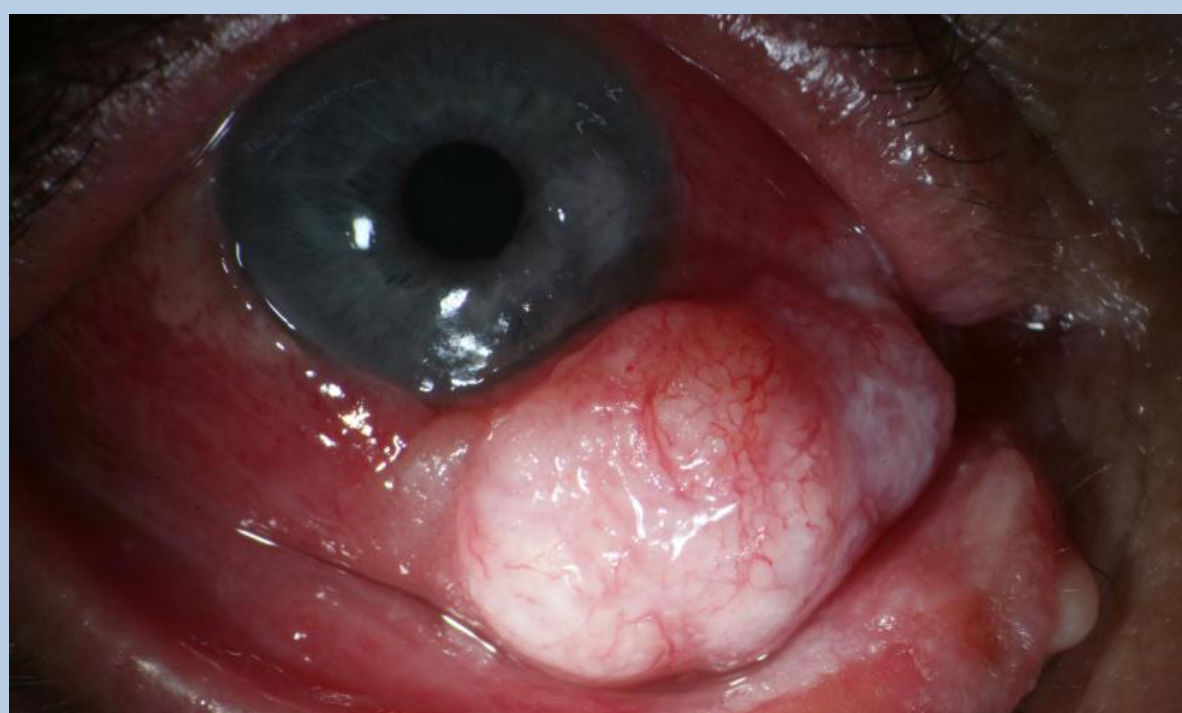


Abb. 1: Schema der Aufreinigung der mutmaßlichen Stammzellen
A: Ursprungstumor der Zellkultur
B: Ausgangssituation in der Zellkultur. Die mutmaßlichen Stammzellen sind mit Fibroblastenartigen Zellen vergesellschaftet
C: 1. Passage der Zellkultur nach Entnahme von Fibroblasten durch Trypsin
D: 2. Passage der Zellkultur. Die Fibroblasten wurden komplett entfernt und die Zellen von Interesse befinden sich in Reinkultur.

Die separierten Zellen wurden schließlich auf Stammzeleigenschaften hin untersucht. Es wurde dazu das Wachstumsverhalten über mehrere Passagen hinweg kontrolliert. Die Expression von Biomarkern für epitheliale Stammzellen und Pluripotenz (ABCG2, p63, OCT4) und Differenzierung (K19, MUC4) wurde mittels semi-quantitativer real-time PCR und immunhistochemischer Färbungen untersucht.

Ergebnisse

Es wurden aus der Biopsie eines Plattenepithelkarzinoms Zellen mit epithelialer Morphologie isoliert, welche in Kolonien wuchsen. Diese Zellen wurden mittels Trypsinbehandlung von anderen fibroblastenartigen Zellen abgetrennt. Sie exprimieren sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene alle der untersuchten Biomarker. Bisher sind die Zellen mehrfach passagiert worden, ohne dass es zu Veränderungen des Expressionsmusters und des Wachstumsverhaltens kam.

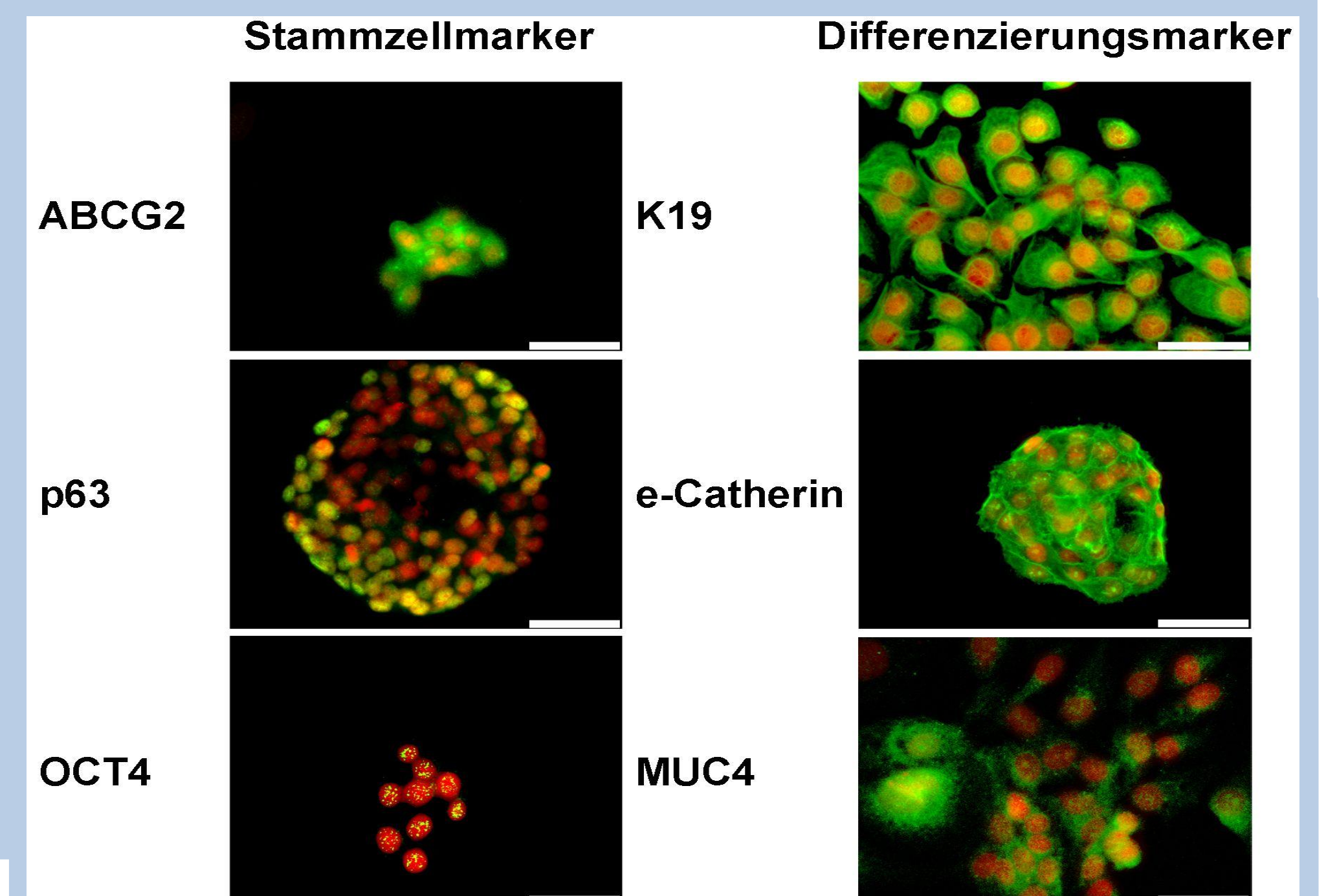


Abb. 2: repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen der isolierten Zellen
Kernfärbung mit Hoechst 33342 in Falschfarbendarstellung (rot) und FITC Färbung der Zielproteine (grün); der weiße Balken stellt eine Länge von 50µm dar
A: Marker für Pluripotenz und epitheliale Stammzellen der Augenoberfläche
B: Epitheliale Differenzierungsmarker

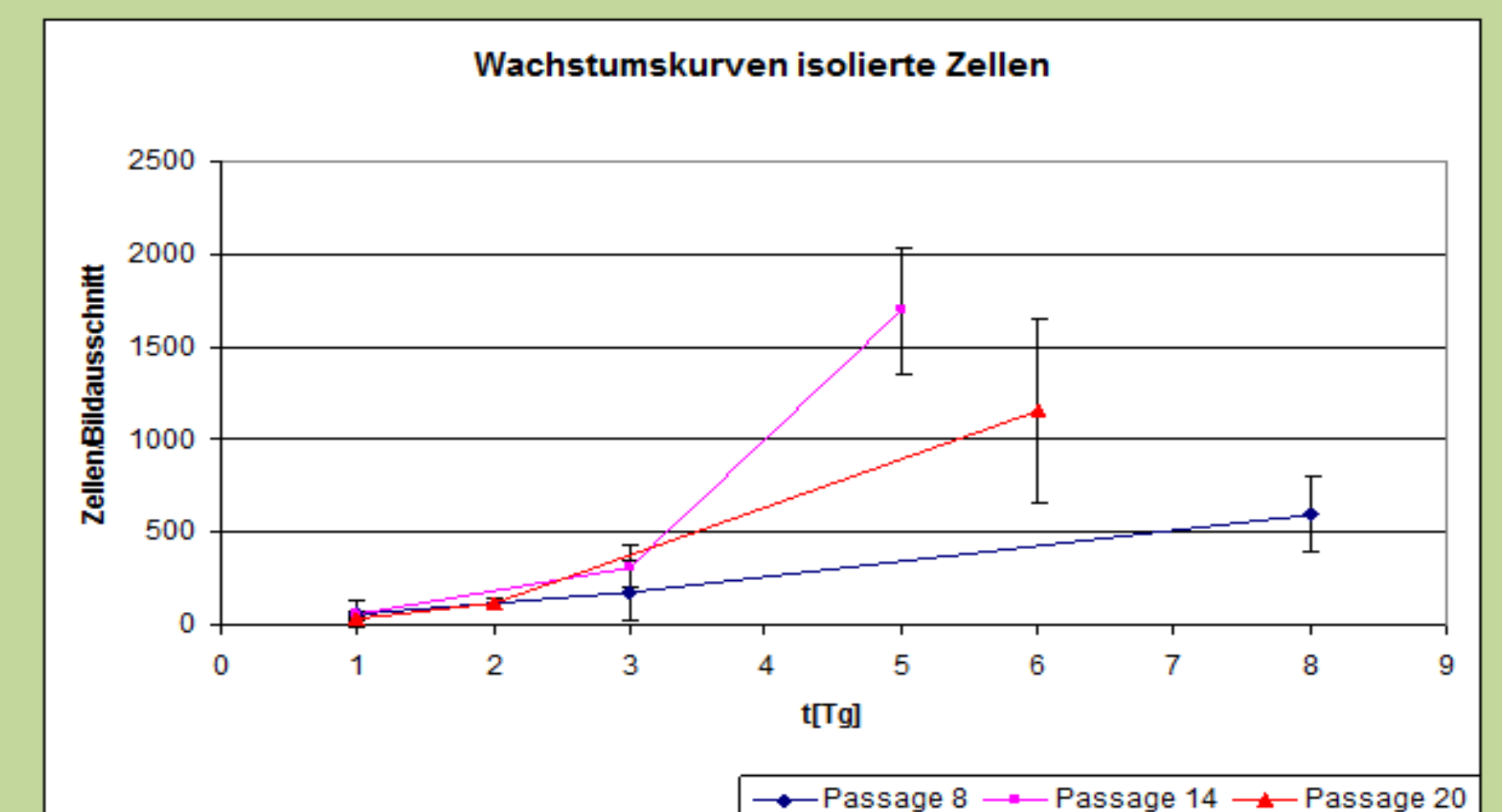


Abb. 3: Wachstumskurven der isolierten Zellen
Mittelwerte der Zellzahlen in einem Bildausschnitt aus zehn Bildern der Zellkultur in Abhängigkeit zur Kulturdauer von drei Passagen.

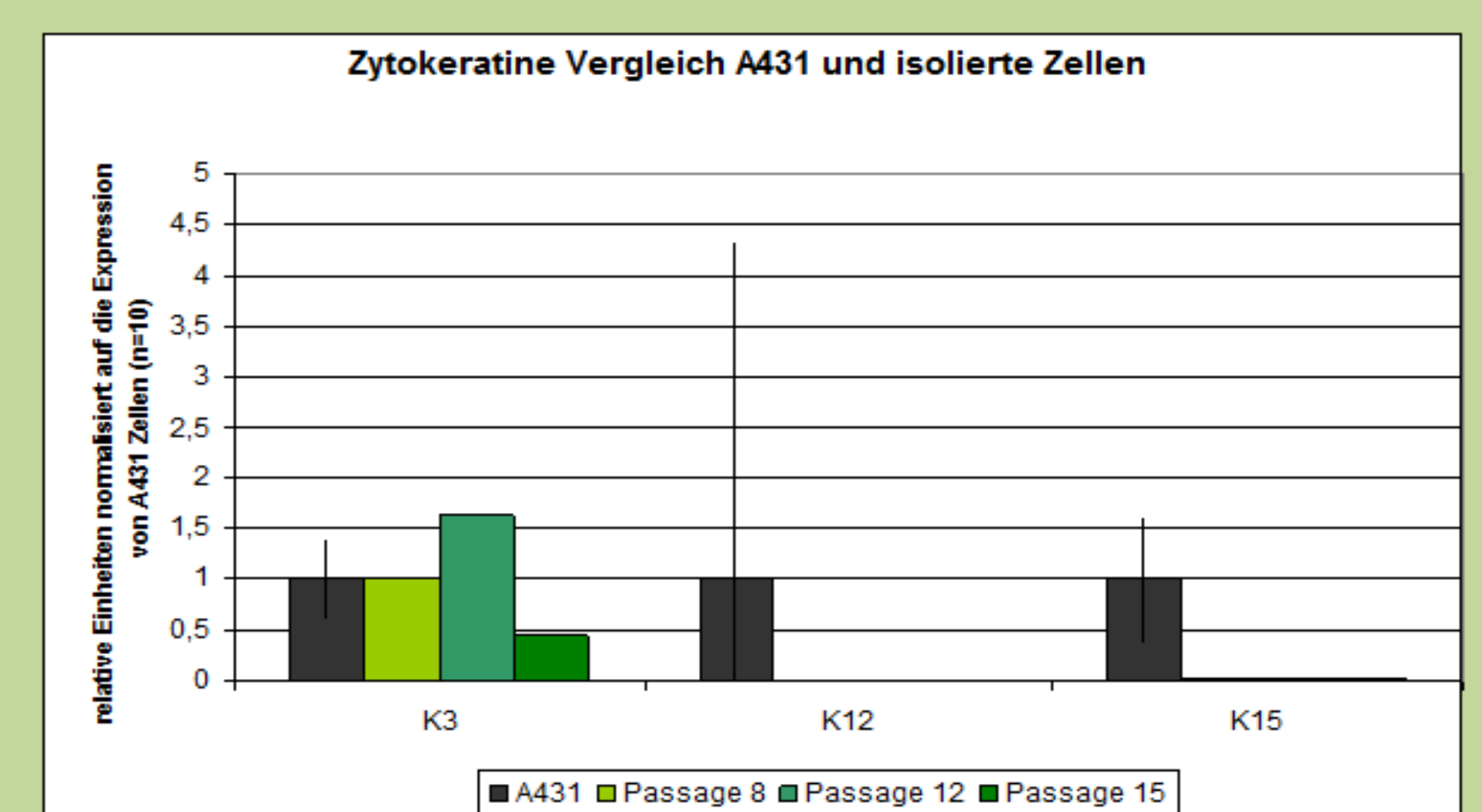
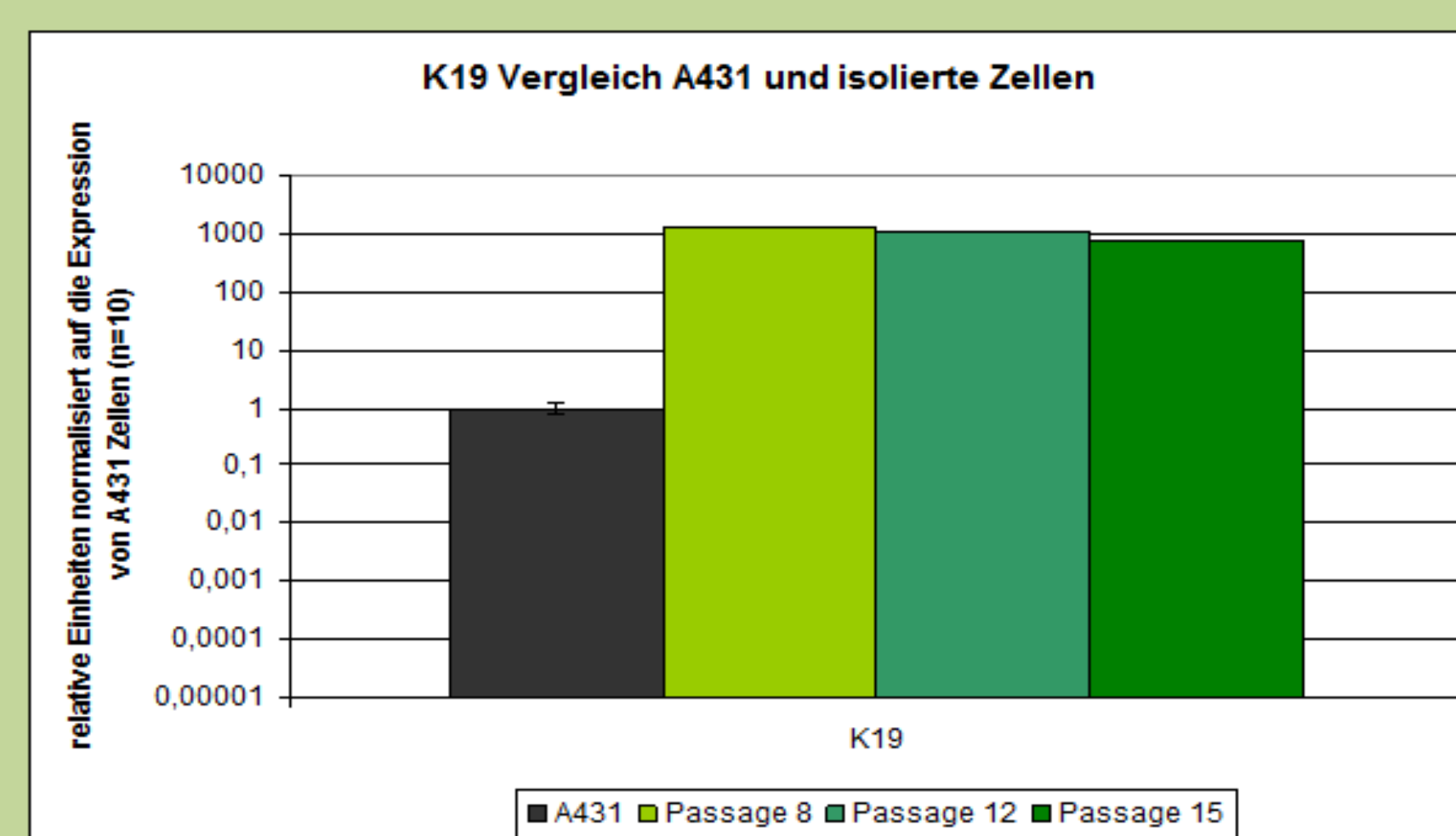


Abb. 4: Vergleich der Genexpression von Zytokeratinen von Epithelien der Augenoberfläche zwischen der Modellzelllinie A431 (grau) und unterschiedlichen Passagen der isolierten Zellen (Grüntöne)
A: Zytokeratin 19 (K19)
B: Zytokeratine 3, 12 und 15

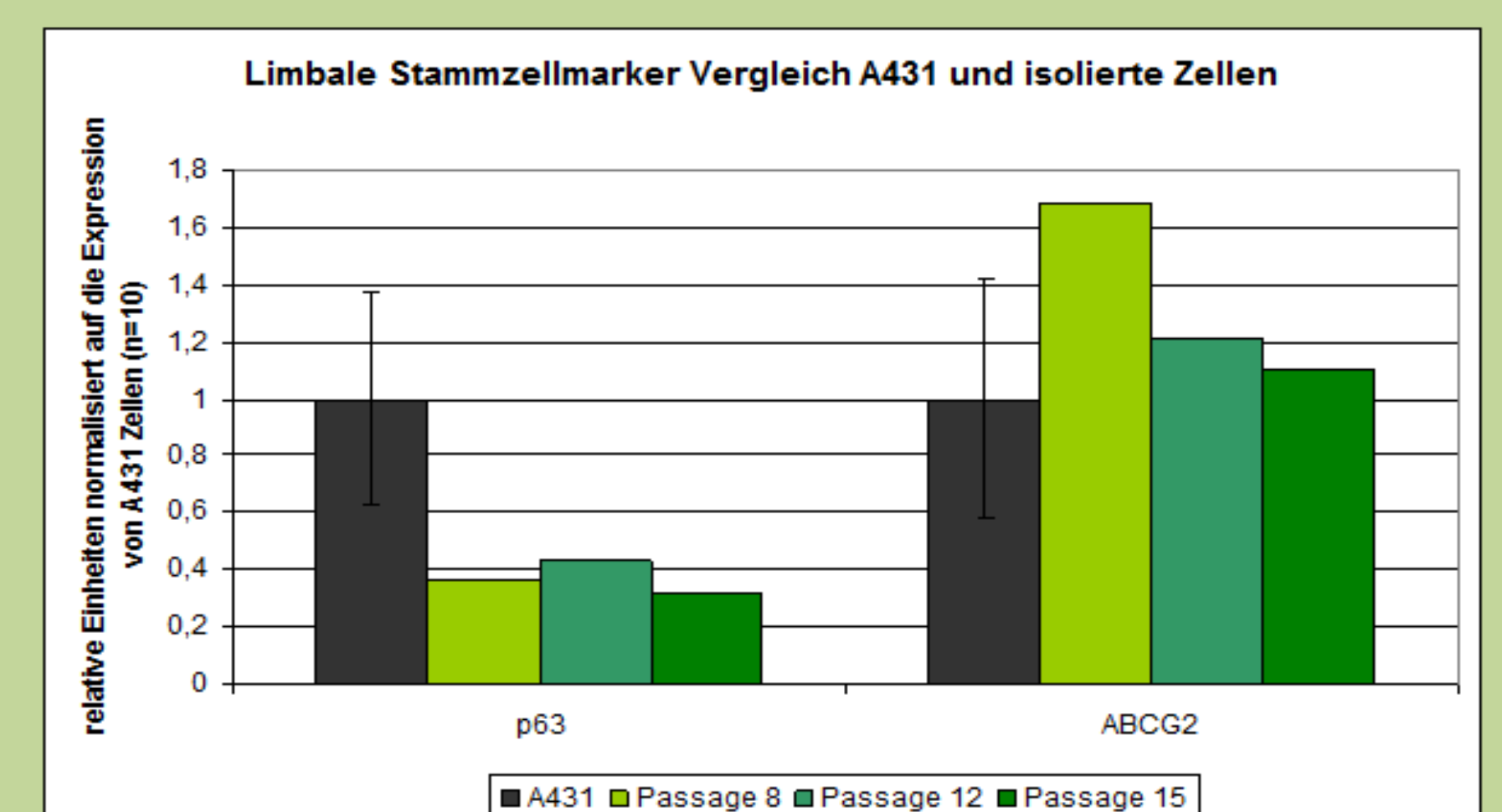
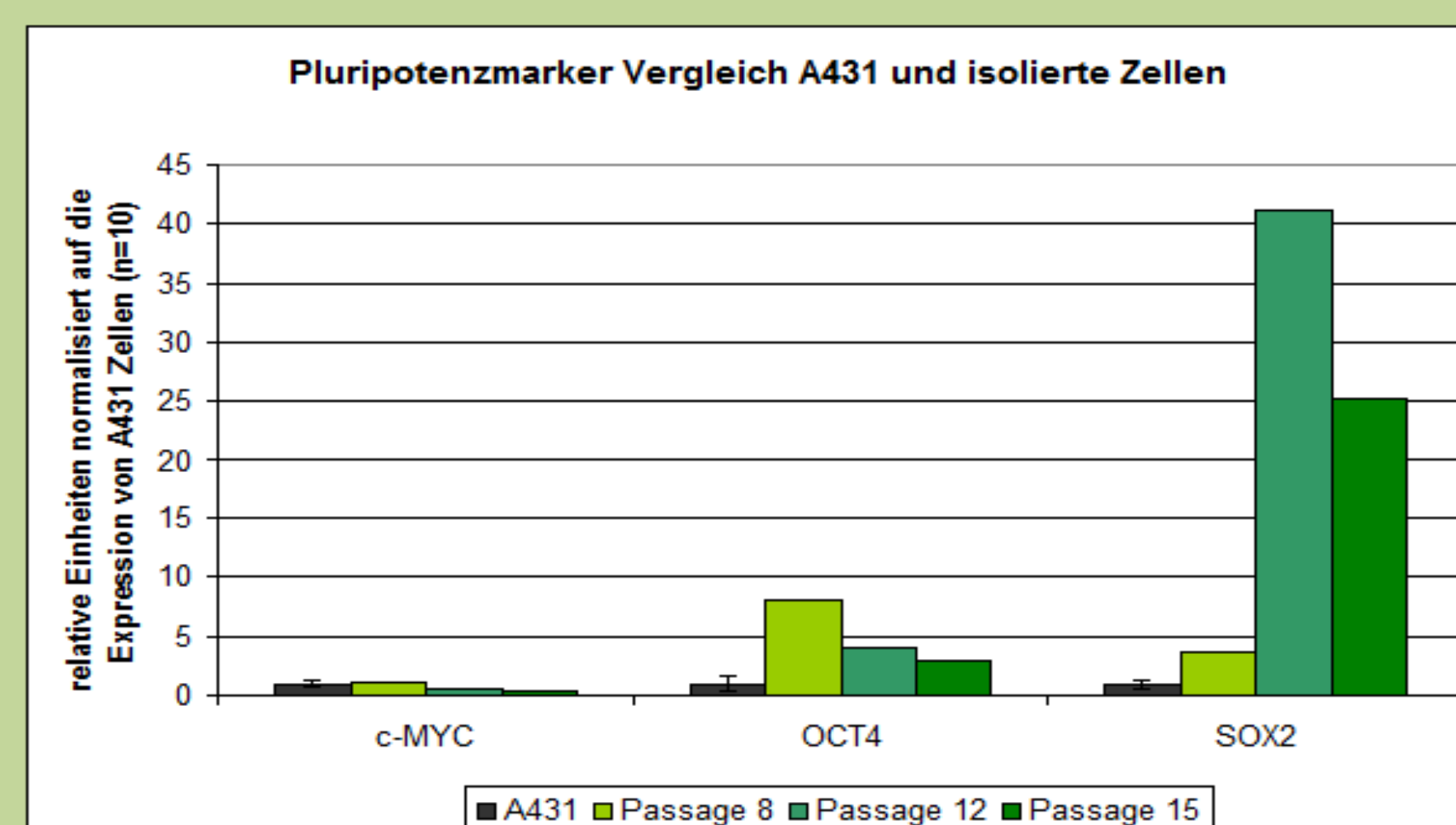


Abb. 5: Vergleich der Genexpression von Pluripotenzmarkern und epithelialen Stammzellmarkern der Augenoberfläche zwischen der Modellzelllinie A431 (grau) und unterschiedlichen Passagen der isolierten Zellen (Grüntöne)
A: Pluripotenzmarker c-MYC, OCT4 und SOX2
B: Limbale Stammzellmarker p63 und ABCG2

Schlussfolgerungen

Es ist uns gelungen Zellen epithelialen Ursprungs aus einem Plattenepithelkarzinom der bulbären Conjunctiva zu isolieren, die Eigenschaften von adulten und pluripotenten Stammzellen aufweisen. Dies macht sie zu potenziellen Kandidaten für Cancer Stem Cells. Weitere Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung sind notwendig um dies zu bestätigen.