



Doctoral Thesis

Wild-type embryonic stem (ES) cells affect growth and differentiation in hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)-deficient ES cell cultures and tumors

Author(s):

Schmid, Vinzenz H.

Publication Date:

2010

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006155092> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 18187

**WILD-TYPE EMBRYONIC STEM (ES) CELLS AFFECT GROWTH
AND DIFFERENTIATION IN HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR-
1 α (HIF-1 α)-DEFICIENT ES CELL CULTURES AND TUMORS**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

VINZENZ H SCHMID

Dipl. Natw. ETH

born July 09th, 1977
citizen of Kyburg-Illnau, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. W. Krek, examiner
Prof. M. Peter, co-examiner
Prof. M. Gassmann, co-examiner

2010

Summary

Cancer ranks as second cause of death in western society. Treating the disease is complicated by its heterogeneous nature. Various types of cancer can be classified in malignant or benign, soft or solid, quiescent or fast-growing. All kinds of cells have been shown to form or to interact with cancerous tissue. In other words: there is no such thing as “the” cancer. Researchers are examining all steps from formation to growth, trying to define common features for distinct tumor types for therapy approaches.

In the early 90’s, a novel protein which appeared under reduced oxygen partial pressures (hypoxia) was isolated and shown to induce expression of the human *erythropoietin* gene. This protein was termed hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). Further experiments showed that the protein consisted of two subunits. One was the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), since then also known as HIF-1 β . The other subunit, named HIF-1 α , was found to be regulated on protein level. In the following years, many additional HIF-1 target genes were identified. Because fast-growing tissues were known to lack proper vascularization and therefore oxygenation, research groups started to examine the importance of HIF-1 for cancer development and/or growth. Elevated levels of HIF-1 were detected in most solid tumors, which proved to correlate with resistance to radiation treatment and poor prognosis. Therefore, targeting or inhibiting HIF-1 α (and the closely related HIF-2 α and HIF-3 α) became a key endeavor in oncology and remains an important research topic until today.

Embryonic stem (ES) cells have originally been isolated from the inner cell mass of the pre-implantation blastocyst. They can be maintained to indefinitely proliferate without losing pluripotent state. If ES cells are subcutaneously injected into immunocompromised mice, they aberrantly differentiate and develop tumors that consist of multiple tissues (neuronal, muscle cartilage, bone, and epidermal-like tissue, among others), termed teratocarcinomas.

We started the present work on the basis of a previous study by our group that showed that teratocarcinomas formed from subcutaneously injected ES cells deficient for HIF-1 α (ko) grew significantly more slowly than wildtype (wt) ones. Growth, however, was re-established when adding 1% wildtype cells to the knockout ES cell population (1:100 mixed, mxd). Furthermore, differentiation of transplanted ES cells was dependent on HIF-1 α availability, since wildtype ES cell-derived tumors preferentially formed neuronal tissue, whereas knockout and mixed tumors generated primarily mesenchymal tissue.

In study at hand, we examined tumor extracts with Western blots for specific marker proteins of cells of mesenchymal or neuronal lineage to further corroborate the morphometric analysis. The new experiments did not support all previously established differentiation patterns. The resulting wt-teratocarcinomas showed a higher amount of mesenchymal cells than ko ones, and the amount of neuronal lineage cells was similar in wt- and ko-teratocarcinomas.

In a subsequent experiment, we investigated the proteome of tumor samples for differentially upregulated pathways between tumors with diverse HIF genotypes. The significant but moderate regulation patterns found for Transketolase (TKT), T-complex protein-1 (TCP-1), and Tropomyosin-1/2 (TPM-1/2), could, however, not be corroborated by Western blots.

To further examine the impact of hypoxia, HIF-1 α , and differentiation, we subjected HIF-1 α wt, ko, and mxd ES cell cultures to an established neuronal differentiation protocol. We were successful in terms of reproducing the morphometric analysis of ES cell teratocarcinomas when judged by the protein levels of neuron-specific marker class III beta-tubulin (TUBB-3), that indicated a significantly higher neuronal outcome for wt cells compared to ko and mxd cultures. In addition, we found that TUBB-3 might be a HIF-1 α target in undifferentiated ES cells. Not unexpectedly, TKT levels were elevated in ES cells and dropped markedly during neuronal differentiation. Transketolase levels are also known to be directly linked to tumor growth. Future experiments will show if it is possible to force-differentiate ES cells towards a defined lineage by TKT inhibition, thereby providing a putative treatment to poorly curable tumors consisting of undifferentiated cells.

Zusammenfassung

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt. Das Problem bei der Therapie dieser Erkrankung ist, dass sie in Ursache und Ablauf sehr unterschiedlich sein kann. Verschiedene Arten von Tumoren werden beschrieben als bösartig oder gutartig, weich oder fest, ruhend oder schnell-wachsend. Es wurde für die verschiedensten Zellen gezeigt, dass sie zu Tumoren entarten oder mit ihnen interagieren können. Mit anderen Worten, „den“ Krebs gibt es nicht. Wissenschaftler untersuchen seit Jahren alle Schritte von Krebsentstehung und -Wachstum und versuchen, Gemeinsamkeiten für Therapieansätze zu finden.

In den frühen Neunzigerjahren wurde ein neues Protein charakterisiert, welches bei Sauerstoffmangel (Hypoxie) in der Zelle akkumuliert und die Expression vom humanen *erythropoietin* Gen induziert. Das Protein wurde hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1) genannt. Weitere Experimente zeigten, dass HIF-1 aus zwei Untereinheiten besteht. Zum einen aus dem konstitutiven aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), seither auch HIF-1 β genannt, zum anderen aus HIF-1 α , welches auf Proteinhäufigkeit reguliert ist. In den folgenden Jahren wurden viele weitere Zielgene von HIF-1 identifiziert. Da schnellwachsende Gewebe bekannt sind für schlechte Vaskularisierung und Oxygenierung begann man mögliche Zusammenhänge von HIF-1 und Krebsentstehung und -wachstum zu untersuchen. Stabilisiertes HIF-1 α wurde in den meisten soliden Tumoren nachgewiesen und mit Resistenz auf Strahlungs- und Chemotherapie sowie schlechter Langzeitprognose in Verbindung gebracht. In den darauffolgenden Jahren wurden HIF-1 α (und die eng verwandten HIF-2 α und -3 α) zu zentralen Schwerpunkten in der Krebsforschung, ein Trend der bis heute unvermindert angehalten hat.

Embryonale Stammzellen (ES Zellen) wurden ursprünglich aus der inneren Zellmasse von nicht-implantierten Blastozysten isoliert. ES Zellen können unbegrenzte Zeit kultiviert werden, ohne dass sie ihre Pluripotenz einbüßen. Wenn ES Zellen immunokomprimierten Mäusen subkutan injiziert werden beginnen sie unkontrolliert zu differenzieren und bilden Tumore, welche aus verschiedenartigen Gewebetypen bestehen (unter anderem neuronales, Muskel, Knorpel, Knochen und Epidermis-ähnliches Gewebe), und deshalb Teratokarcinome genannt werden.

Das vorliegende Projekt basiert auf einer früheren Arbeit aus unserem Labor, in welcher gezeigt werden konnte, dass Teratokarcinome aus subkutan injizierten HIF-1-defizienten (knockout, ko) ES Zellen signifikant langsamer wuchsen als solche aus wildtyp Zellen (wt). Jedoch gelang es durch Beimischung von nur 1% wildtyp Zellen zu den ko-Zellen (1:100 mixed, mxd), die Wachstumsgeschwindigkeit der ko-Zellen zu erhöhen. Im Weiteren war die Differenzierung der injizierten Zellen durch HIF-1 α beeinflusst. So bildeten die aus wildtyp ES-Zellen entstandenen Tumore vorzugsweise neuronales Gewebe, während knockout und mixed Tumore primär mesenchymale Gewebe bilden.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir nun mit Western blots die Tumorextrakte auf spezifische Markerproteine für mesenchymale und neuronale Zellen, um die morphometrische Analyse zu erhärten. Die neuen Experimente bestätigten die klaren Differenzierungsmuster nicht vollumfänglich. Die wt-Teratokarzinome wiesen mehr mesenchymale Zellen auf als ko-, und die Unterschiede in neuronaler Differenzierung zwischen wt- und ko-Teratokarzinomen waren vernachlässigbar. In einem anschliessenden Experiment verglichen wir das Proteom von wt, ko und mxd Tumorgewebebeobachten, um differentiell regulierte Gruppen von Proteinen zu finden. Wir fanden Expressionsunterschiede für Transketolase (TKT), T-complex protein-1 (TCP-1) und Tropomyosin-1/2 (TPM-1/2) in der Proteomanalyse. Die Verifizierung mit Western blots konnte die Regulation dieser Kandidatenproteine aber nicht bestätigen.

Um die Verknüpfung von Hypoxie, HIF-1 α und Gewebstypisierung weiter zu untersuchen, differenzierten wir reine und gemischte ES Zellkulturen (wt, ko, 1:100 mxd) mit einem etablierten Protokoll zu neuronalen Zellen. Wir konnten die morphometrische Analyse des Tumorgewebes anhand der Expression des Neuronen-spezifischen Klasse III beta-tubulin (TUBB3) erfolgreich nachvollziehen. Wildtyp Kulturen wiesen im Vergleich zu den ko und mxd einen signifikant höheren Anteil an neuronalen Zellen auf. Im Weiteren fanden wir Anhaltspunkte dafür, dass TUBB3 in ES Zellen ein HIF-1 α Zielgen sein kann. Die TKT Levels waren in ES Zellen höher als in ausdifferenzierten Neuronen. Für Tumorwachstum wurde gezeigt, dass dieses sehr eng mit Transketolase Aktivität verknüpft ist. Zukünftige Experimente werden zeigen, ob es beispielsweise gelingt, durch spezifische TKT Inhibition ES-Zellen zur Differenzierung zu zwingen. So könnten schlecht therapierbare, undifferenzierte Tumore wieder therapeutischen Ansätzen zugeführt werden.