

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 26.4.2011

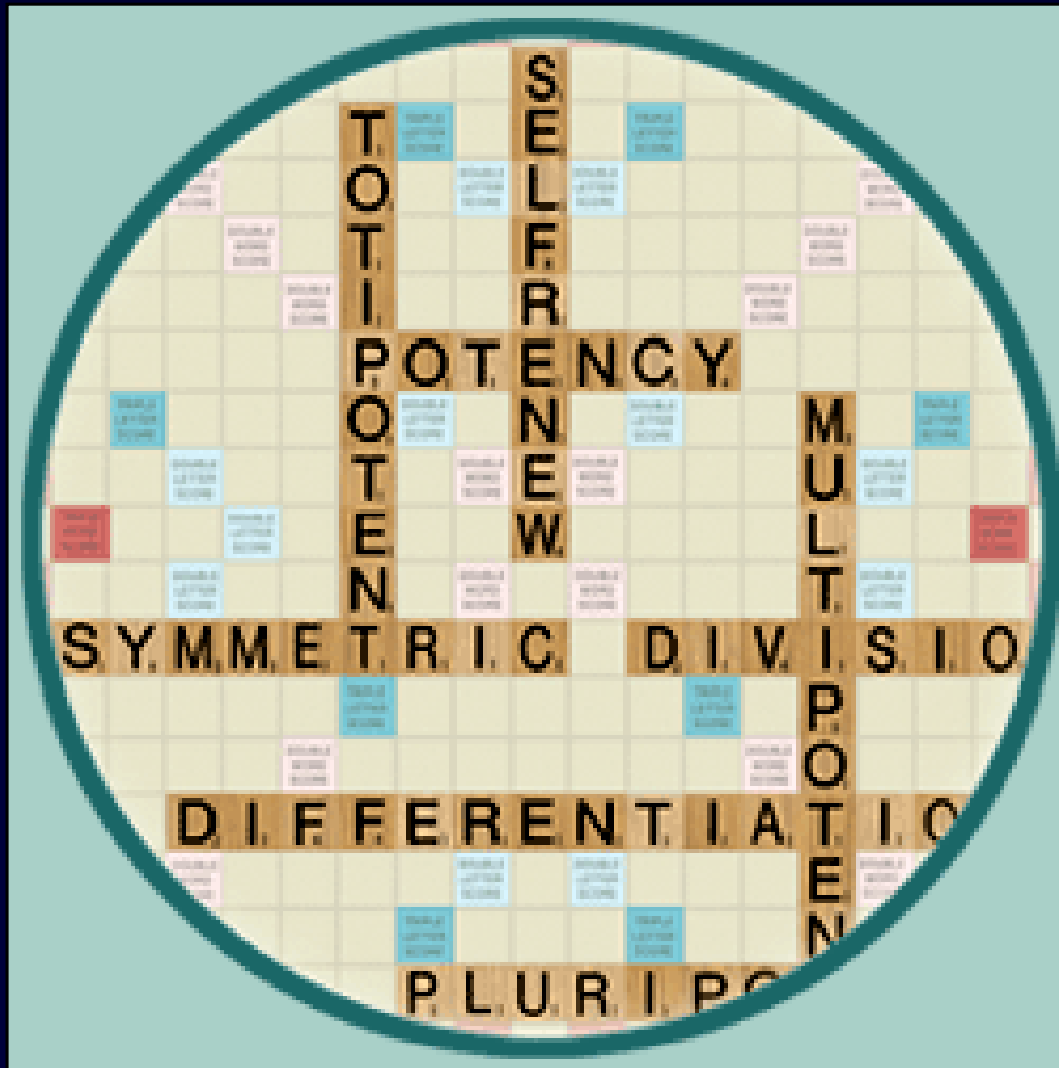
# Adultní a nádorové kmenové buňky

doc. RNDr. Renata Veselská, Ph.D., M.Sc.  
Ústav experimentální biologie  
Přírodovědecká fakulta MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky



## Program přednášky:

- Adultní kmenové buňky (ASCs)  
biologické vlastnosti a diferenciační potenciál  
mikroprostředí (niche) ASCs  
využití ASCs pro buněčné terapie → 4.5.2011
- Nádorové kmenové buňky (CSCs)  
biologické vlastnosti a hypotézy vzniku CSCs  
markery CSCs  
možnosti cílené protinádorové terapie

# ADULTNÍ KMENOVÉ BUŇKY (ADULT STEM CELLS, ASCs)

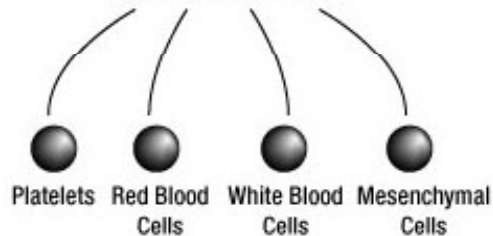
#### Where They've Been Found

- Brain
- Blood
- Cornea
- Retina
- Heart
- Fat
- Skin
- Dental Pulp
- Bone Marrow
- Blood Vessels
- Skeletal Muscles
- Intestines

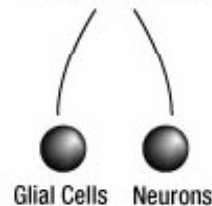
Umbilical Cord



Cord Blood Stem Cell

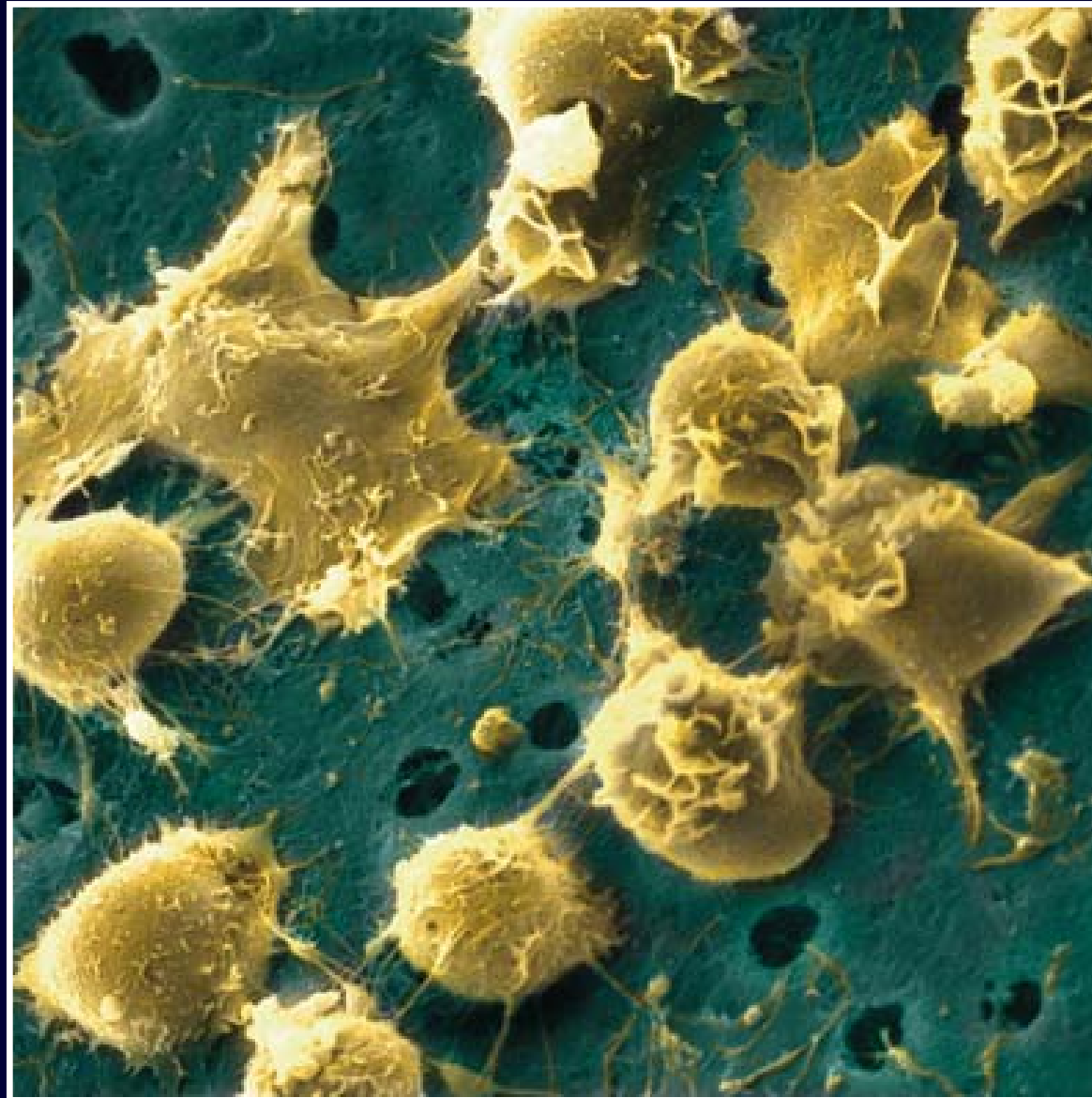


Neural Stem Cell

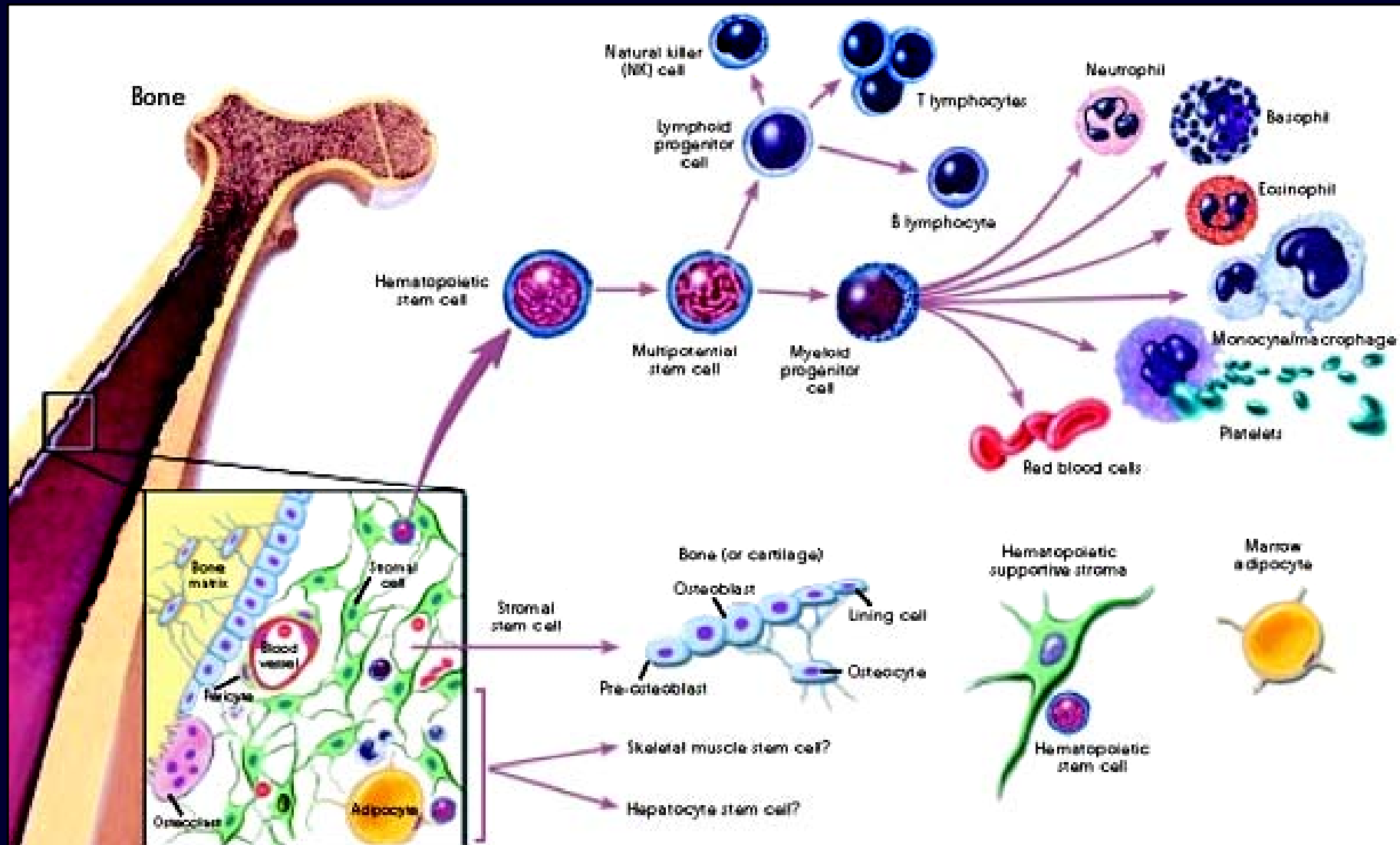


## Typy ASCs:

- mozek
- krev
- rohovka
- sítnice
- srdce
- tuková tkáň
- kůže
- dřeň zubu
- kostní dřeň
- cévy
- kosterní svalstvo
- střeva
- pupečnicková krev

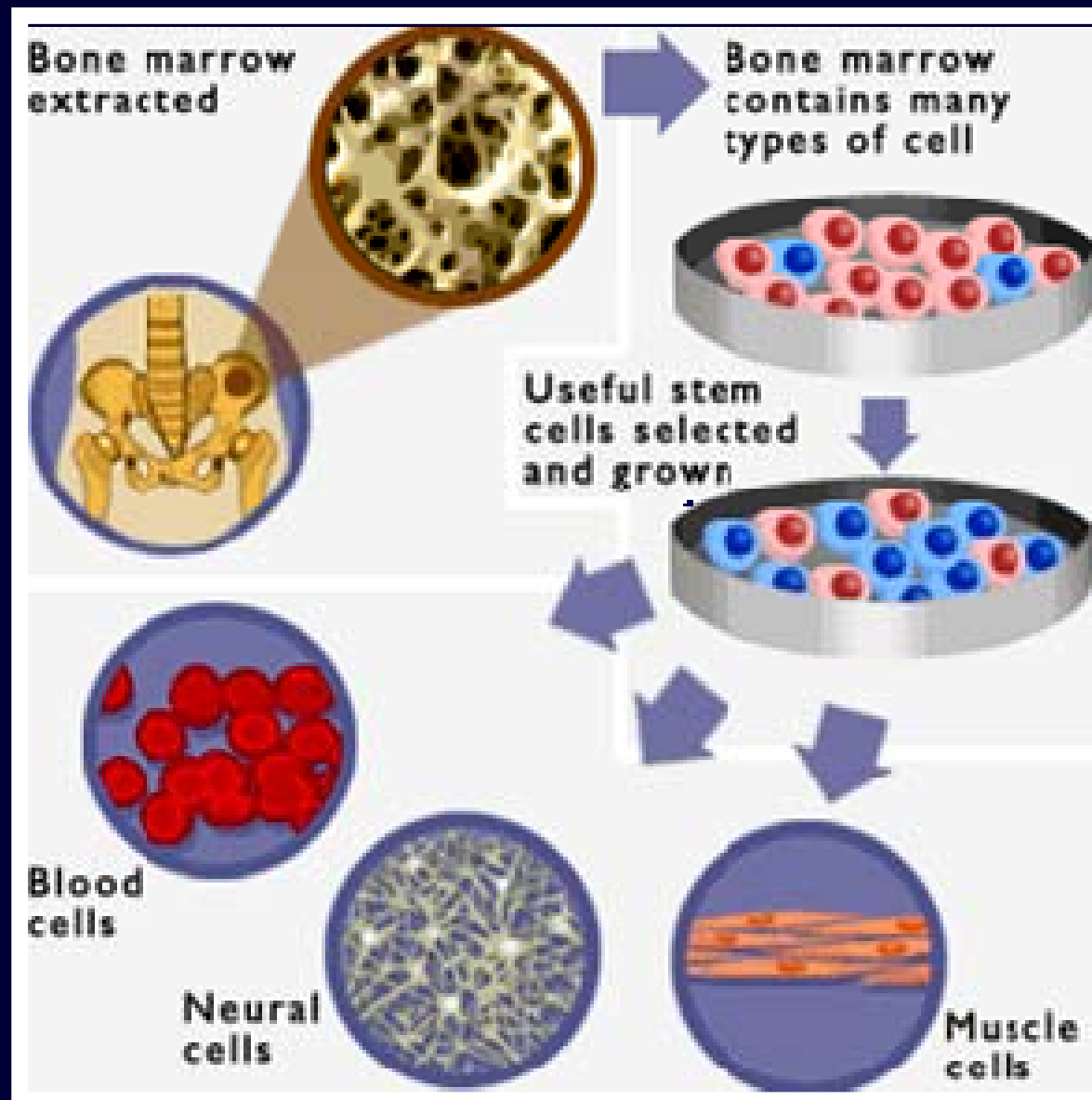


## Lidské SCs kostní dřeně



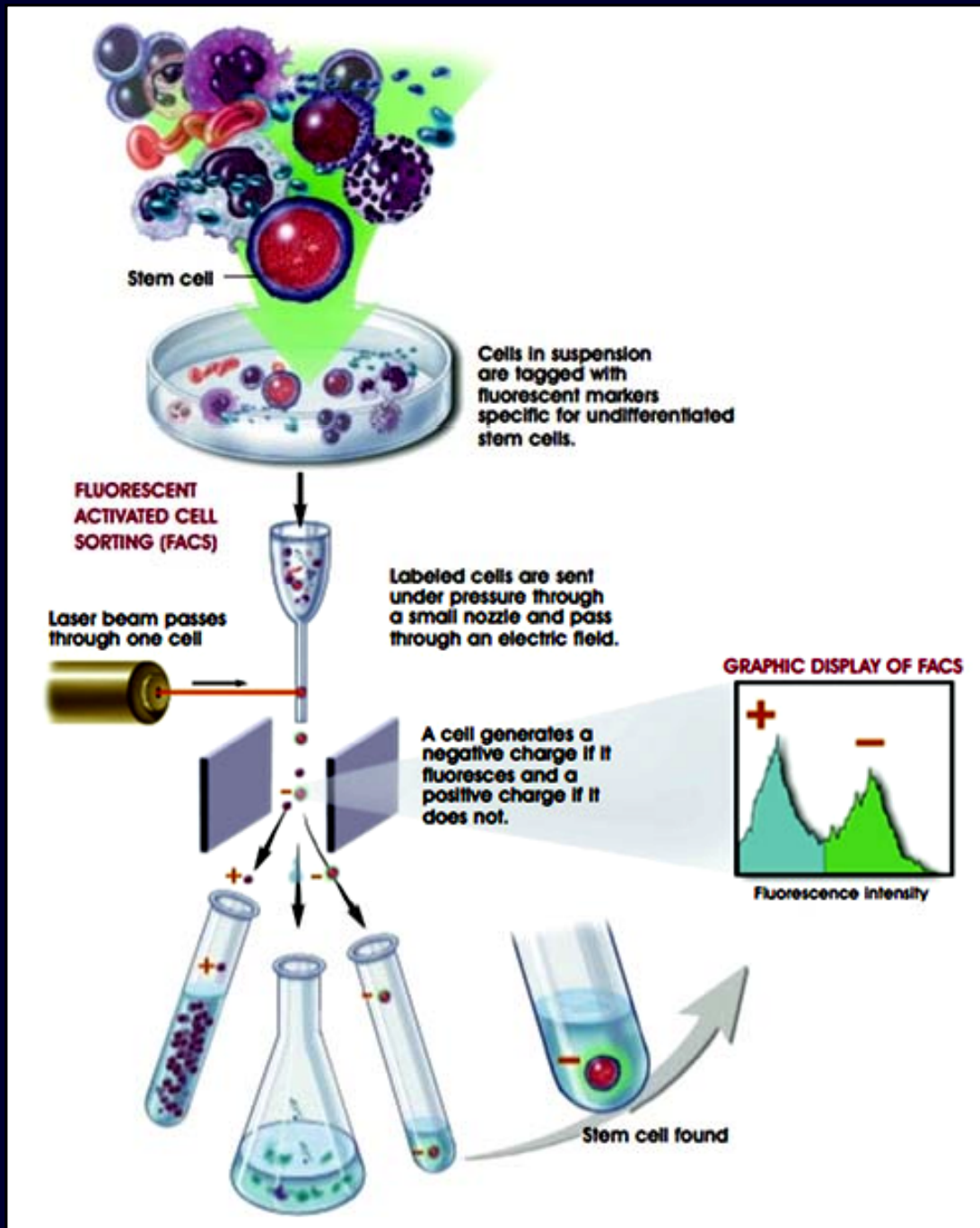
## Diferenciační potenciál hematopoetických a stromálních SCs

# Plasticita hematopoetických SCs

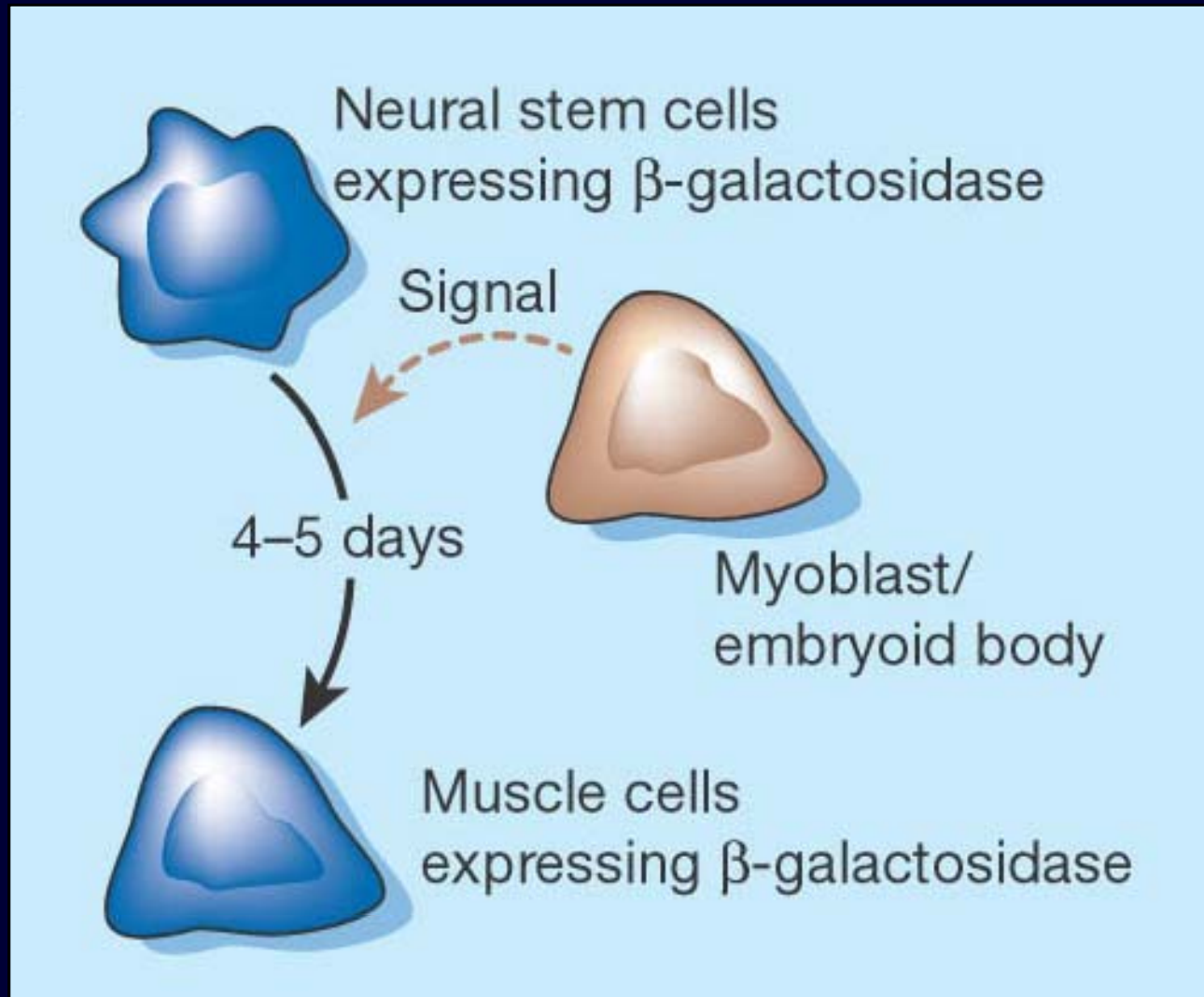




# Izolace hematopoetických SCs pomocí FACS



# Příklad transdiferenciace neurálních SCs



## Transdiferenciace

= schopnost buněk diferencovat do fenotypu charakteristického pro jiný typ tkáně nebo orgánu, než byla tkáň původní

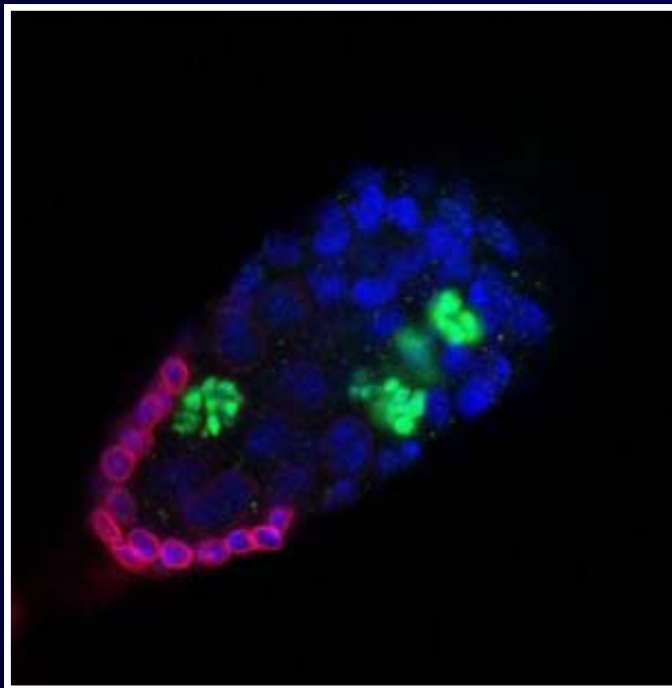
- hematopoetické SCs → kardiomyocyty, hepatocyty

## Ratajczak et al. 2006

- populace velmi malých buněk v kostní dřeni, které se podobají ESCs, mají morfologii a markery shodné s nediferencovanými SCs
- *in vitro* diferenciace do fenotypu kardiomyocytů, neurálních a pankreatických buněk

## "Niche" (hnízdo) SCs

- mikroprostředí (microenvironment):  
podpůrné buňky, extracelulární matrix, adhezní molekuly a signální molekuly
- ASCs - po celou dobu života organismu



niche cells  
SCs (mitóza)

# NÁDOROVÉ KMENOVÉ BUŇKY (CANCER STEM CELLS, CSCs)

## Nádorové kmenové buňky (Cancer SCs, CSCs)

- prokázány u hematologických malignit i různých typů solidních nádorů

### Vlastnosti

- proliferační a diferenciační potenciál
- schopnost self-renewal
- metastatický potenciál
- sekrece růstových faktorů, cytokinů
- vysoká telomerázová aktivita
- specifické markery (CD133...)
- specifické signální dráhy (Wnt, Notch, Hedgehog)
- rezistence vůči apoptóze



# CANCER STEM CELLS

Redefining the Paradigm of Cancer Treatment Strategies



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



Biochemical and Biophysical Research Communications 355 (2007) 855–859

Mini review

## Tumour-initiating cells vs. cancer ‘stem’ cells and CD133: What’s in the name?

Jiri Neuzil <sup>a,b,\*</sup>, Marina Stantic <sup>a</sup>, Renata Zobalova <sup>a,b</sup>, Jaromira Chladova <sup>b</sup>, Xiufang Wang <sup>a</sup>,  
Lubomir Prochazka <sup>a,c</sup>, Lanfeng Dong <sup>a</sup>, Ladislav Andera <sup>d</sup>, Stephen J. Ralph <sup>e</sup>

## COMMENTARY

### Cancer Stem Cells: Are We Missing the Target?

*Richard J. Jones, William H. Matsui, B. Douglas Smith*

Journal of Pathology  
J Pathol 2006; 209: 287–297  
Published online in Wiley InterScience  
([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)) DOI: 10.1002/path.2016



Review Article

### Stem cells and cancer: an intimate relationship

J Burkert,<sup>1\*</sup> NA Wright<sup>1,2</sup> and MR Alison<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Histopathology Unit, Cancer Research UK, 44 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX, UK  
<sup>2</sup>QMS, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, London E1 2AT, UK

POLIA HISTOCHEMICA  
ET CYTOBIOLOGICA  
Vol 43, No. 4, 2007  
pp. 175–181

Review article

### Cancer stem cells - normal stem cells "Jedi" that went over to the "dark side"

Mariusz Z. Ratajczak

Stem Cell Biology Program at James Graham Brown Cancer Center, University of Louisville, KY, USA  
and European Union Stem Cell Therapeutic Excellence Center, Jagiellonian University, Kraków, Poland

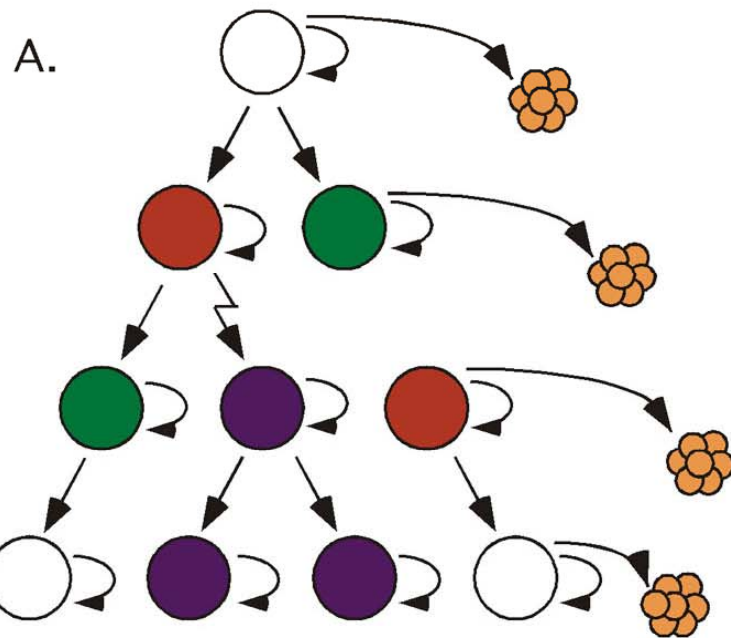


[www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

# Důsledek:

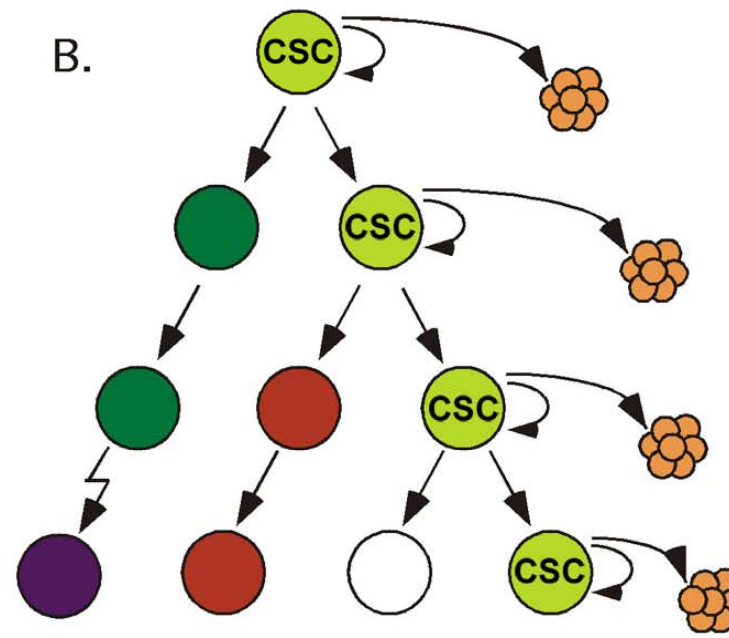
## zásadní změna pohledu na biologii nádorů

Stochastic/ clonal evolution model



Cancer cells are heterogeneous, but most cells can proliferate extensively and form new tumors. All cancer cells must be eliminated to cure the patient.

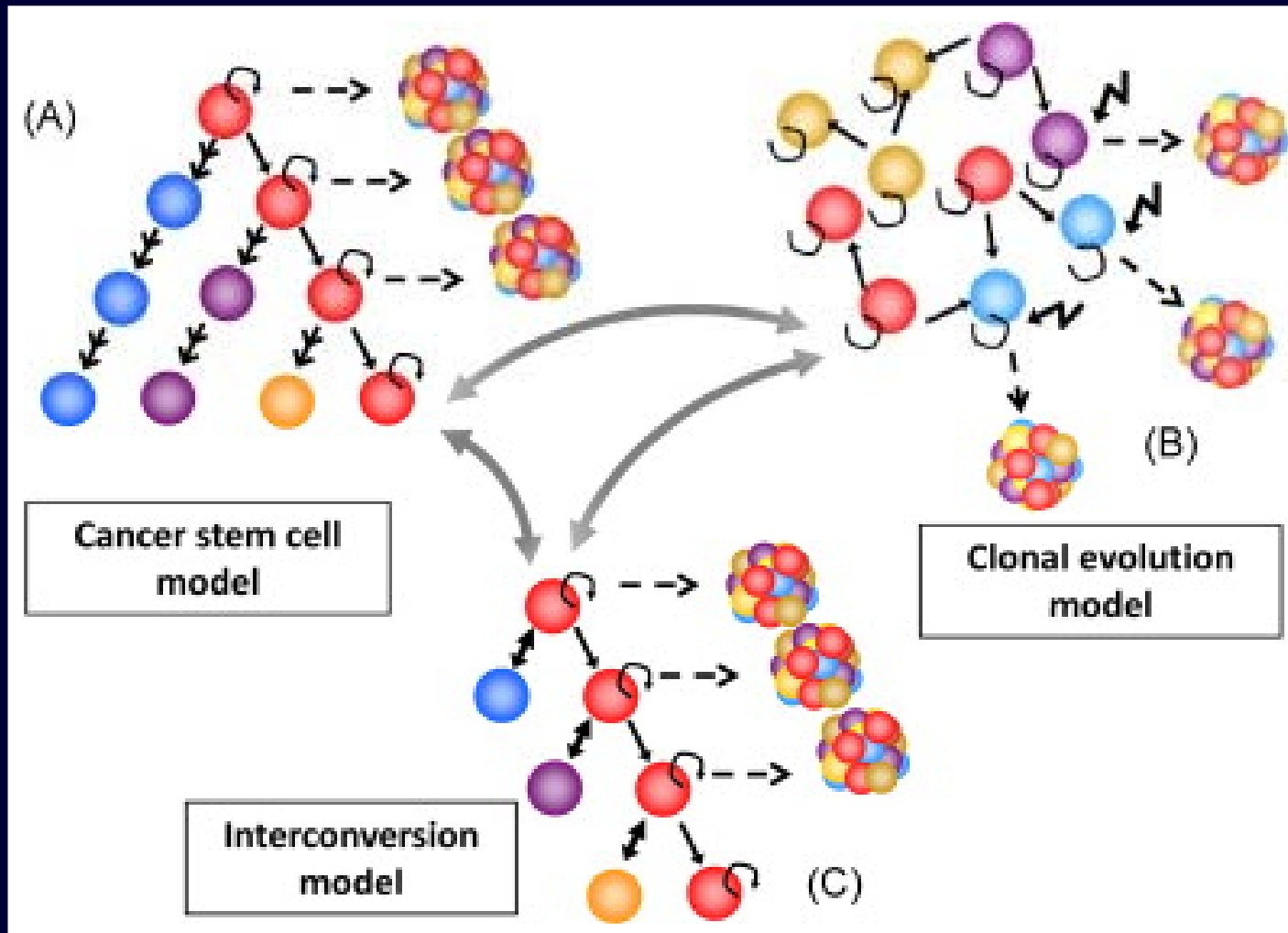
Cancer stem cell model



Cancer cells are heterogeneous and only the cancer stem cells (CSC; green) have the ability to proliferate extensively and form new tumors. Other cancer cells have little capacity to divide. To cure cancer it may be necessary and sufficient to eliminate the cancer stem cells



# Současné hypotézy vzniku nádorů



# Heterogenní prostředí solidního nádoru

**C** = kapilára

**N** = nekróza

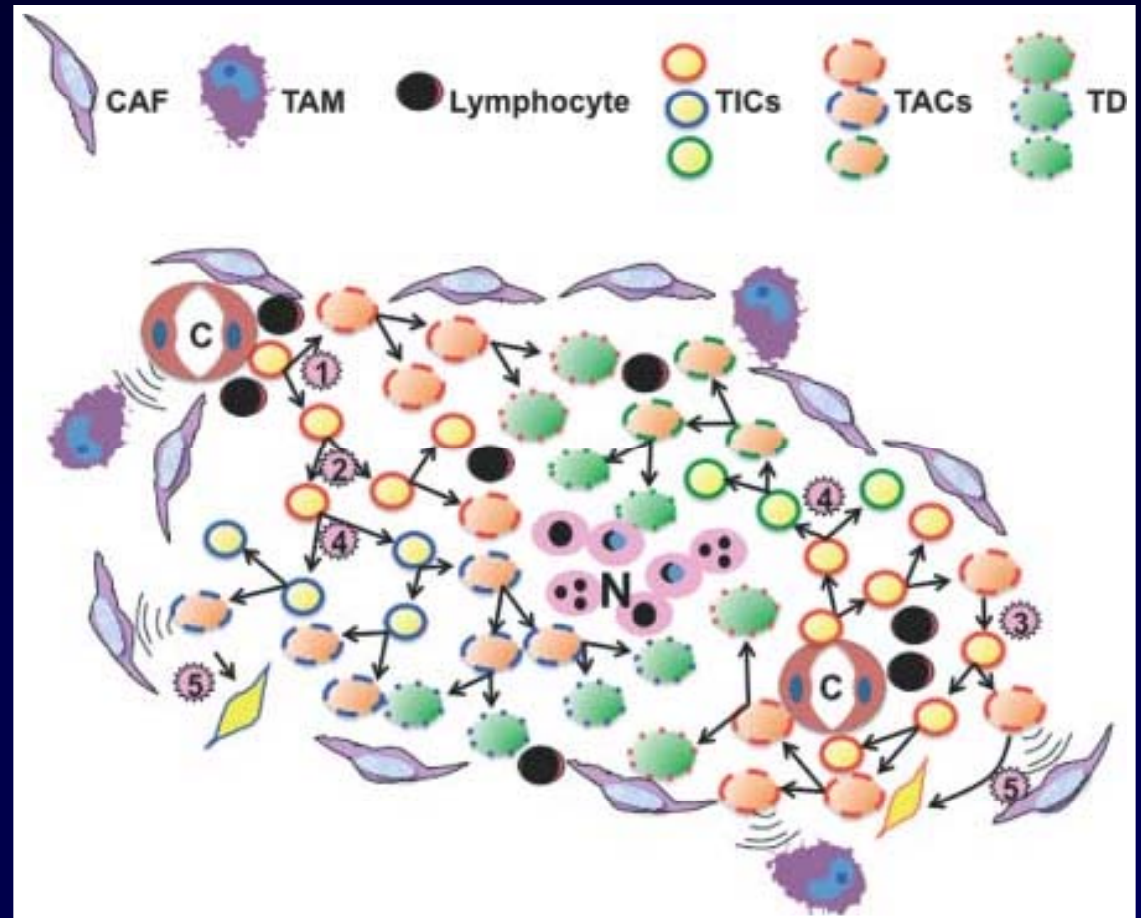
**TAM**

= tumor-associated  
macrophages

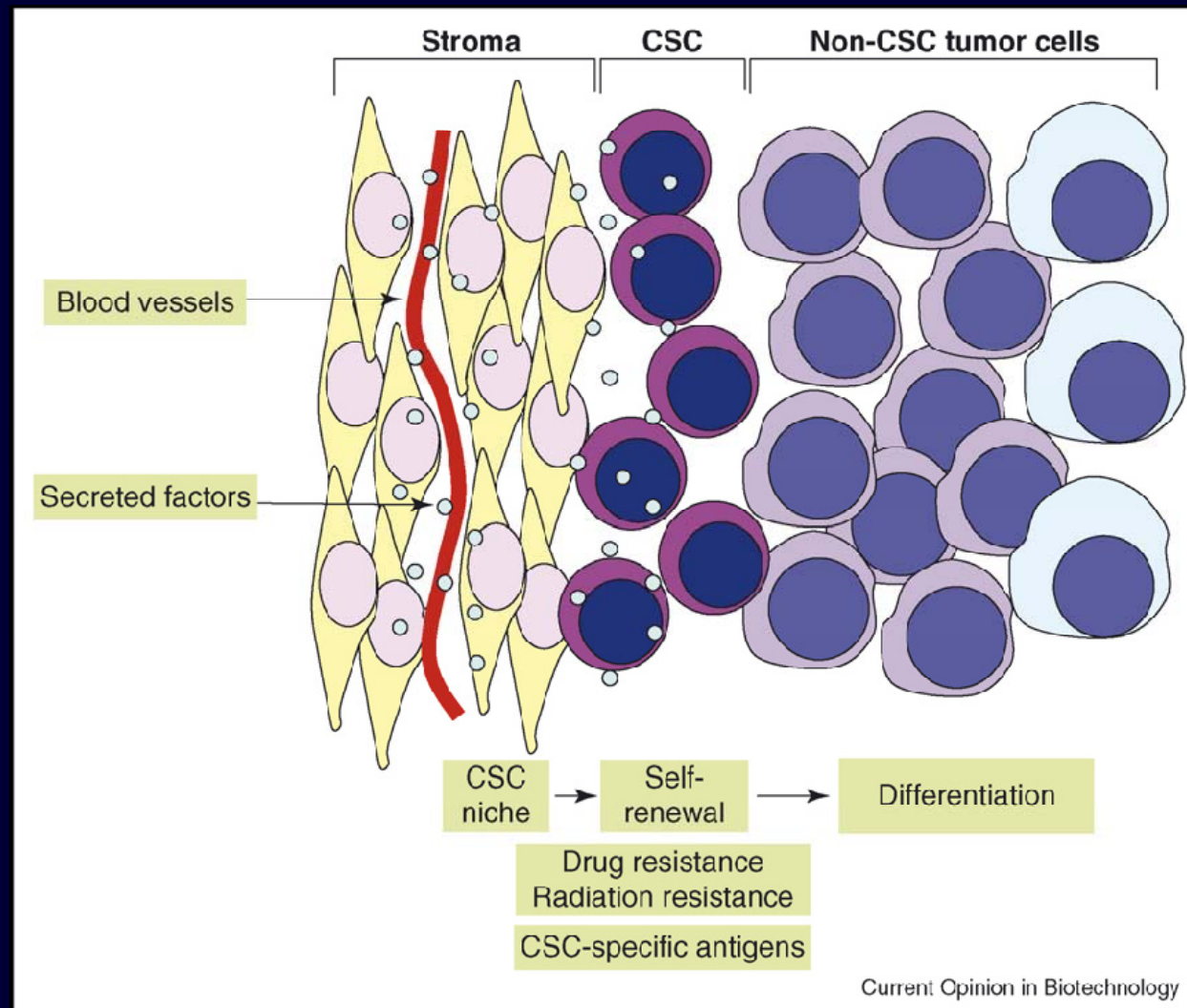
**TICs** = tumor initiating cells (= CSCs)

**TACs** = transit amplifying cells

**TD** = terminally differentiated cells

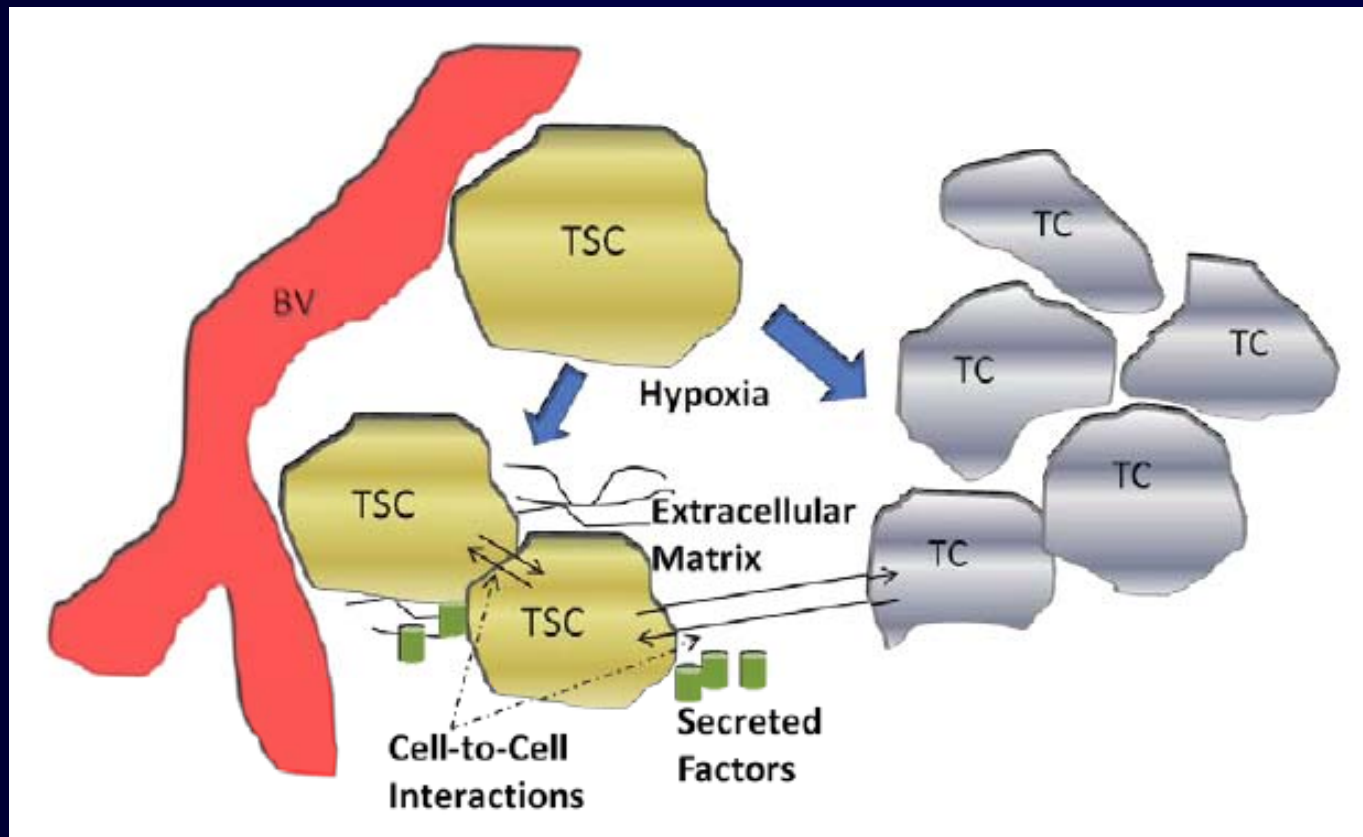


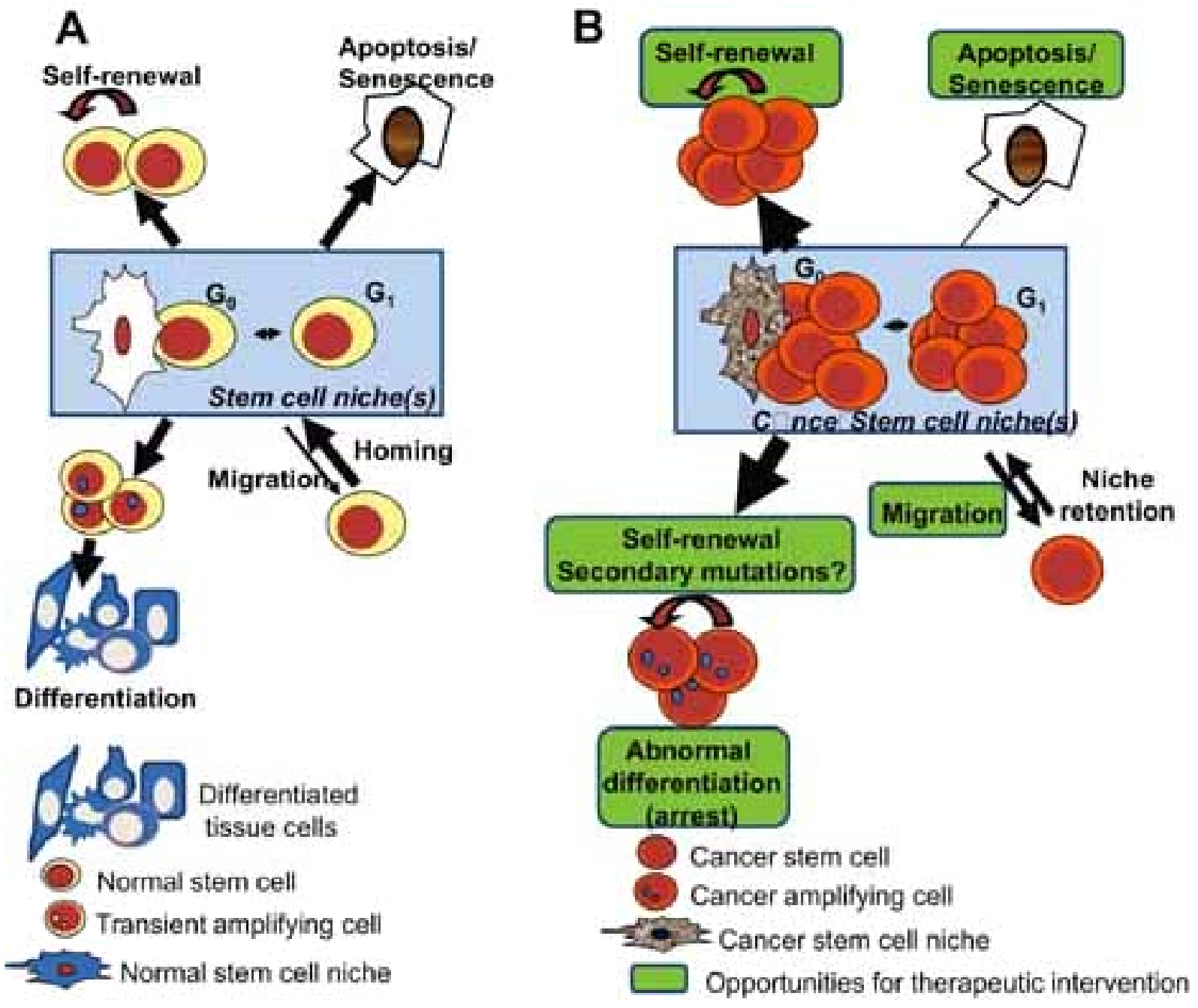
# Mikroprostředí (niche) CSCs v solidních nádorech



# Komponenty mikroprostředí v solidních nádorech

- hypoxie, ECM, mezibuněčné interakce, extracelulární (secernované) faktory a signály, „tissue makeup“



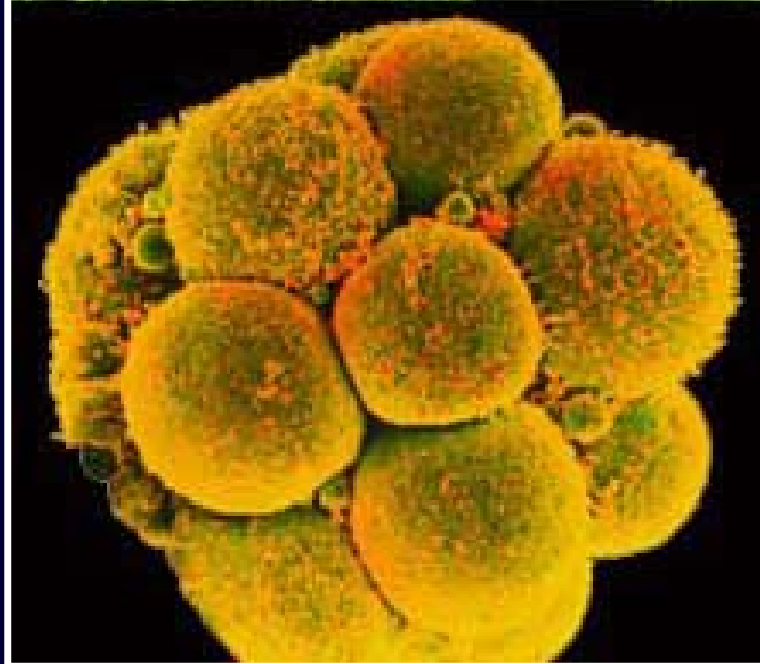


# Hypotézy vzniku CSCs

- nádorová transformace ASCs, resp. progenitorových buněk
- chybná inkorporace buněk kostní dřeně
- aberantní depozity ESCs (transformovaných)
- mutace podmiňující dediferenciaci a imortalizaci diferencovaných buněk ve tkáni



lidské CSCs



lidské ESCs

## SCs normální tkáně:

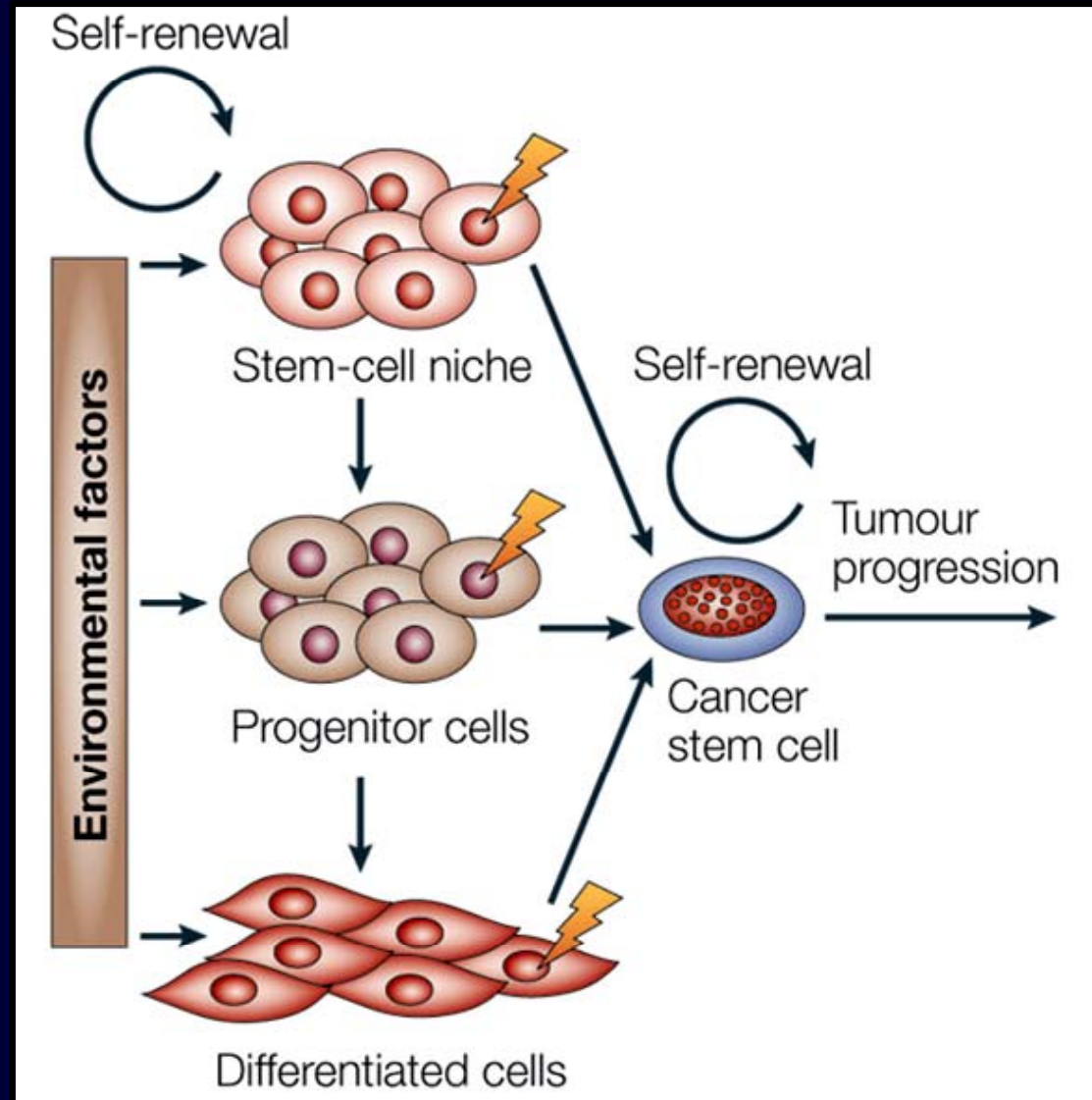
- hematopoetické SCs
- neurální SCs
- neuroektodermální SCs
- epiteliální SCs prsní žlázy
- epiteliální SCs renálních tubulů
- SCs jaterní tkáně
- ovariální epiteliální SCs
- cervikální epiteliální SCs
- epiteliální SCs sítnice

## Odpovídající typ nádoru:

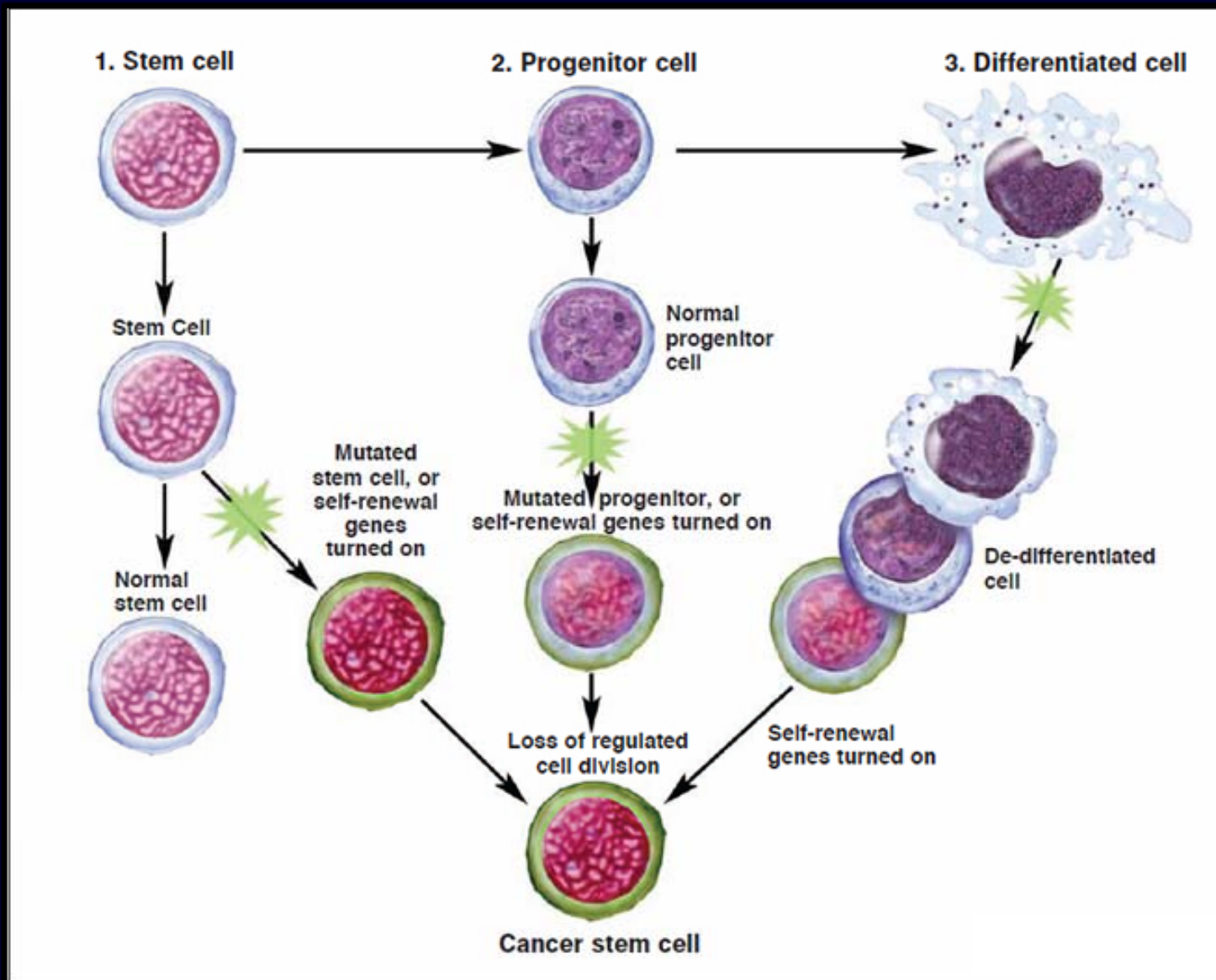
- leukemie
- nádory mozku
- neuroblastom
- nádor prsu
- Wilmsův tumor
- hepatoblastom
- karcinom vaječníků
- karcinom děložního krčku
- retinoblastom

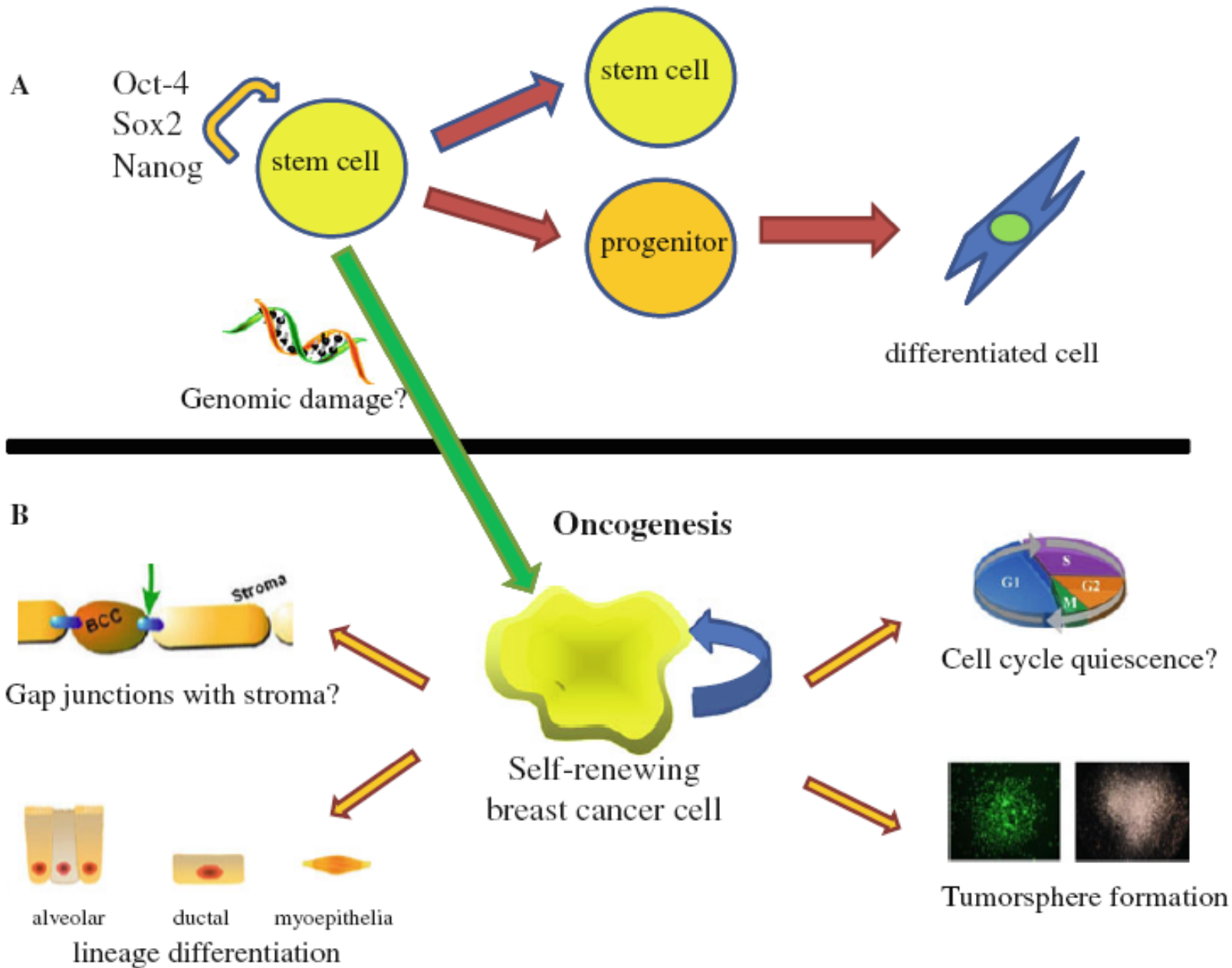


# Hypotézy vzniku CSCs:

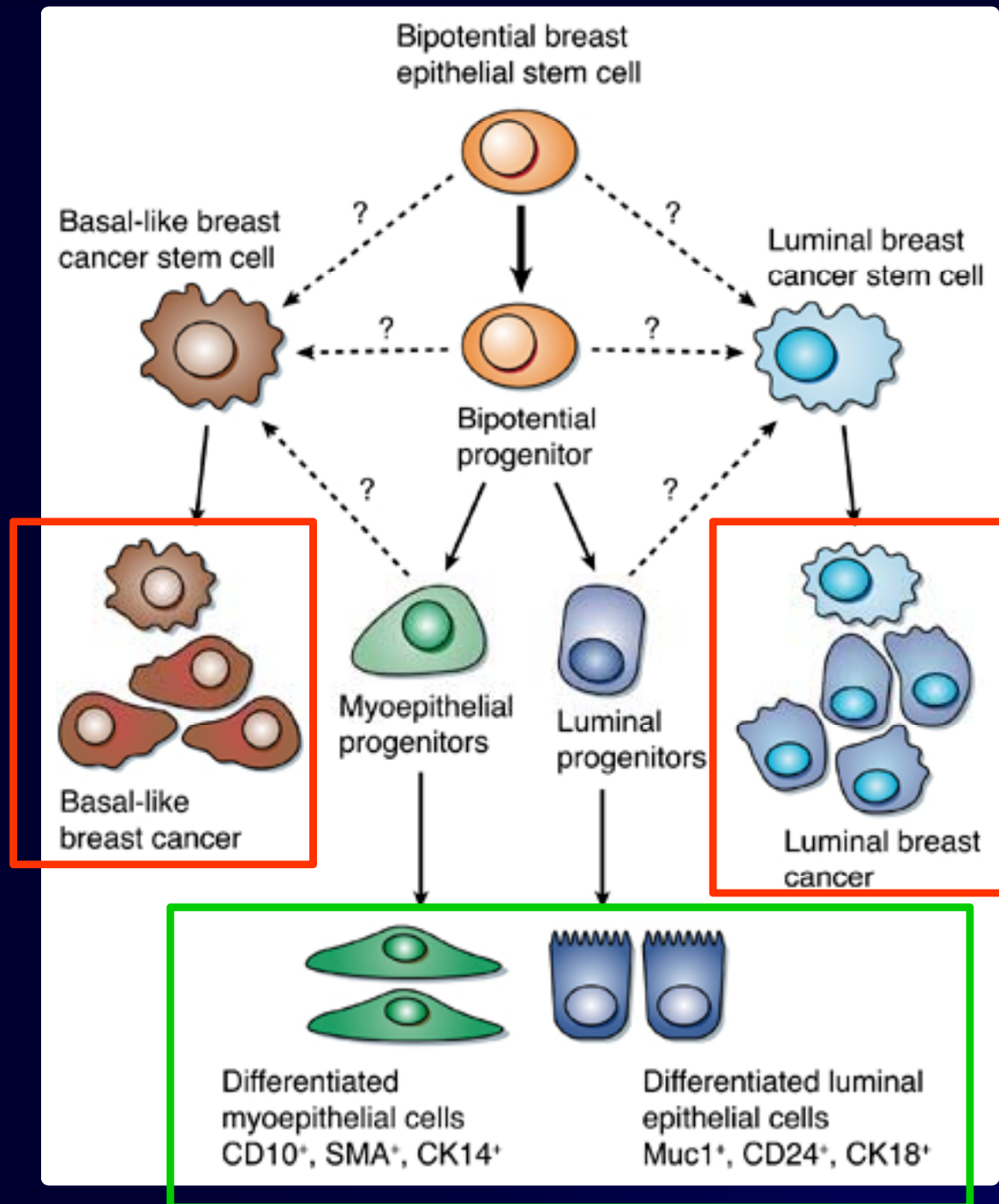


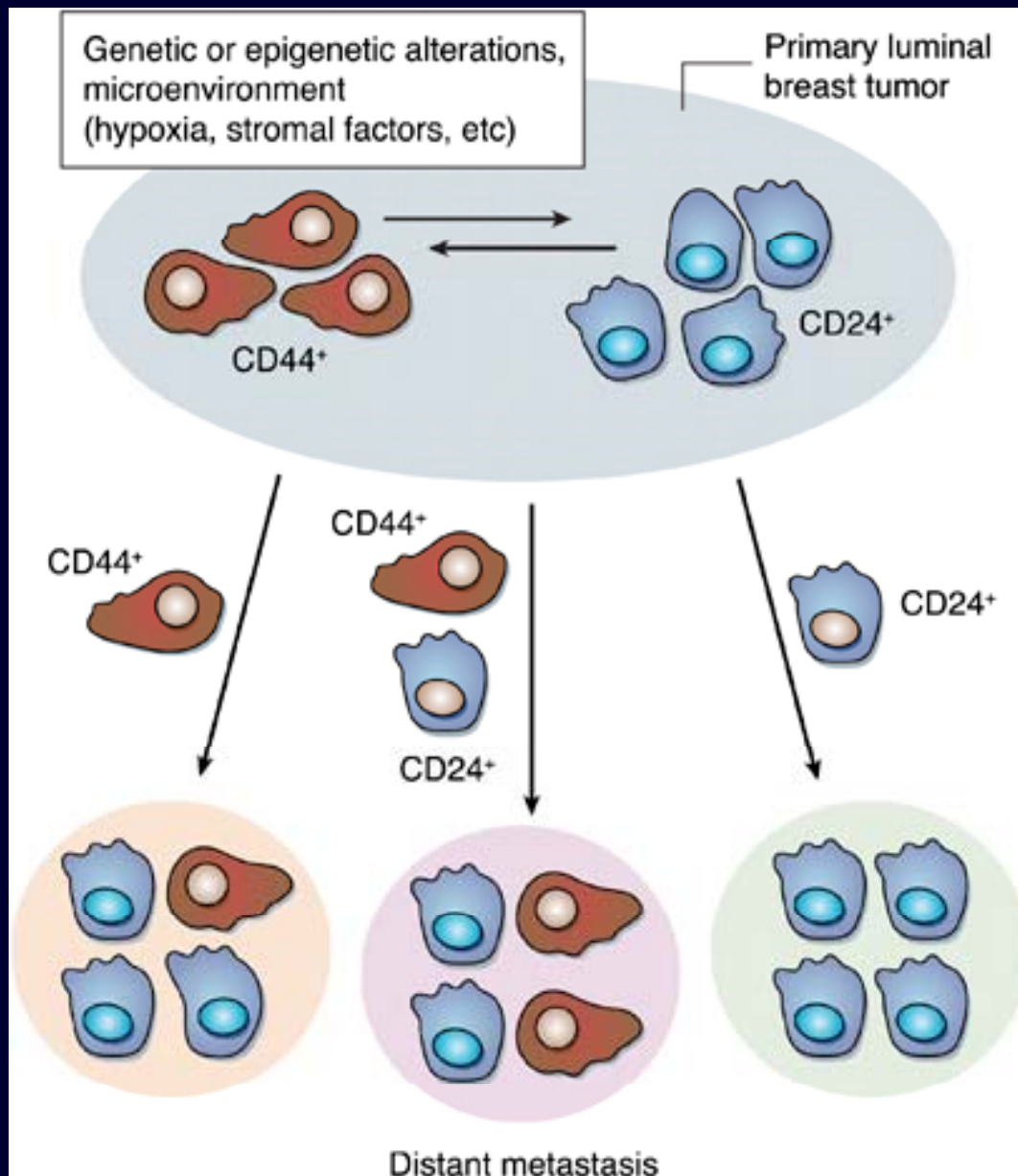
# Hypotézy vzniku CSCs:





# Vznik nádoru v důsledku transformace ASCs: karcinom prsu





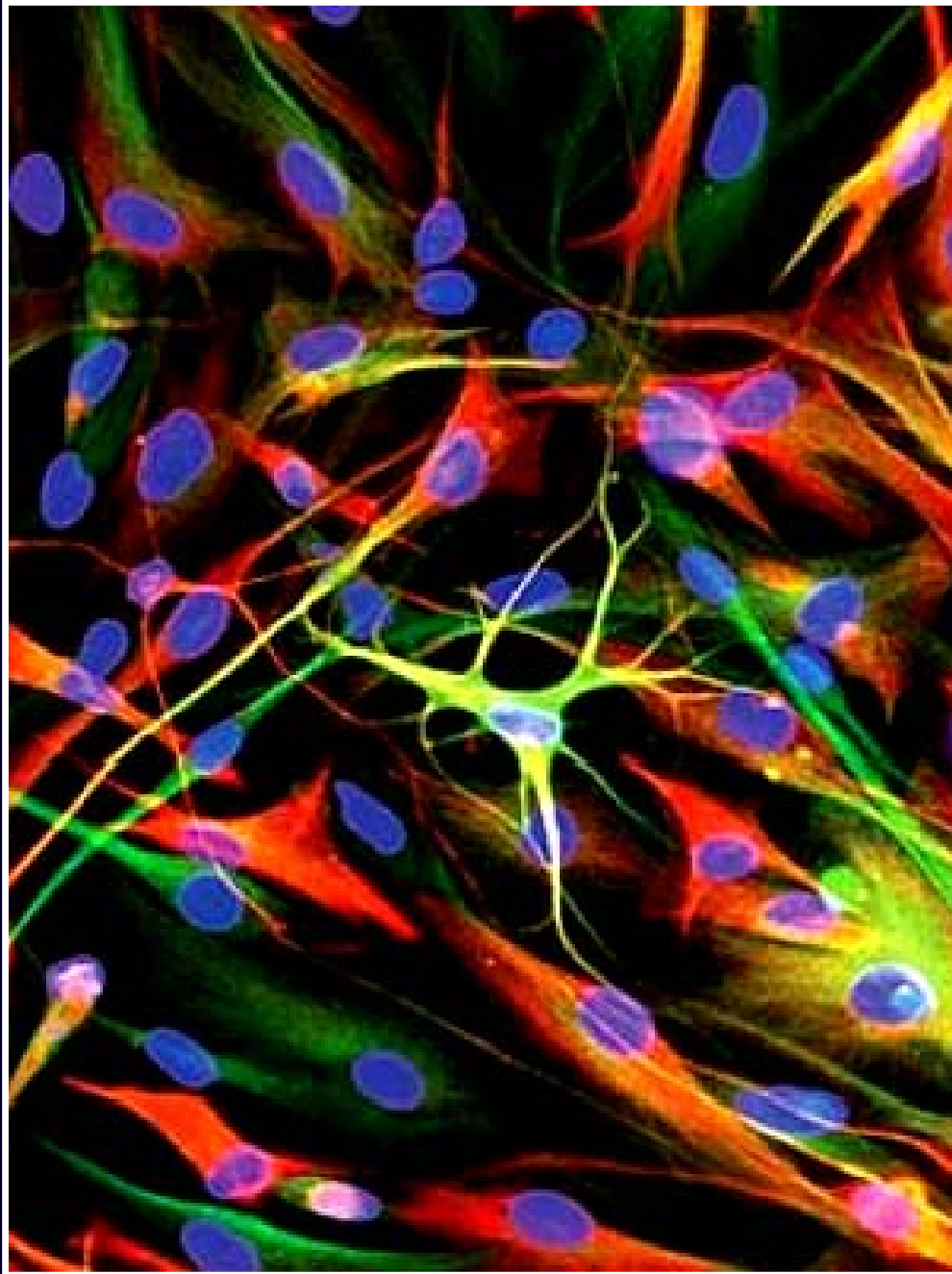
## Markery různých typů CSCs:

Orgán	Markery
kostní dřeň	CD34+, CD38-, Thy1-, Lin-
prs	CD44+, ESA+, CD24- , Lin-
kůže	CD20+, MCAM+, CD166+, Nestin+
prostata	CD44+, $\alpha 2\beta 1^{hi}$ , <b>CD133+</b>
GIST	<b>CD133+</b>
ústní dutina	CD44+
CNS	<b>CD133+</b> , Nestin+, Mushasi-1+
pankreas	CD24+, CD44+, <b>CD133+</b> , ESA+, ABCG2

*Burket et al. 2006, Guo et al. 2006, Li et al. 2007, Neuzil et al. 2007, Olempska et al. 2007, Vaish et al. 2007*

## Markery CSCs u nádorů mozku:

- **nestin** (IF protein, nediferencované buňky CNS)
- **Musashi-1** (neural RNA-binding protein)
- **CD44** (CAM, CNS nádory)
- **CD133** (transmembránový protein, neurální SCs)
- **Sox2** (transkripční faktor, neurální SCs)
- **Bmi-1** (self-renewal, proliferace SCs)



*In vitro* diferenciace  
CSCs z nádoru mozku:

- neurony
- astrocyty
- nediferencované  
CSCs



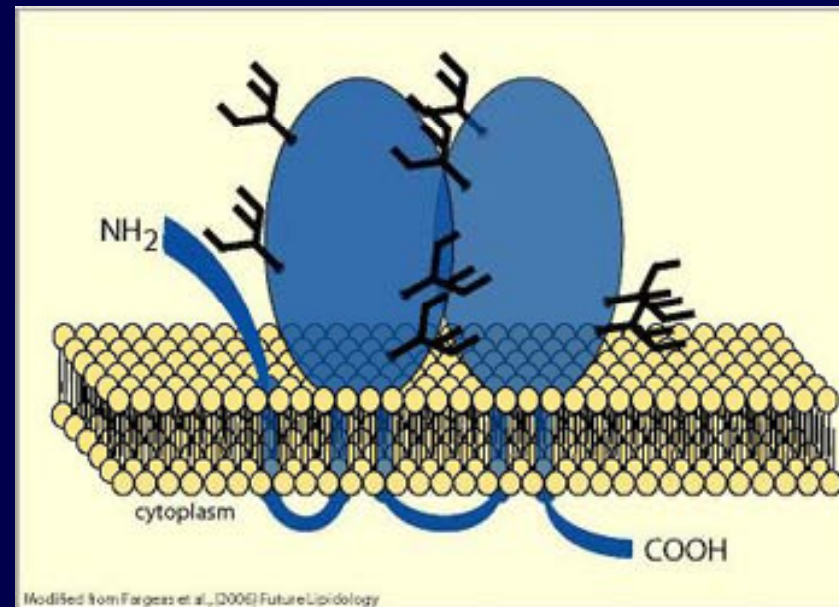
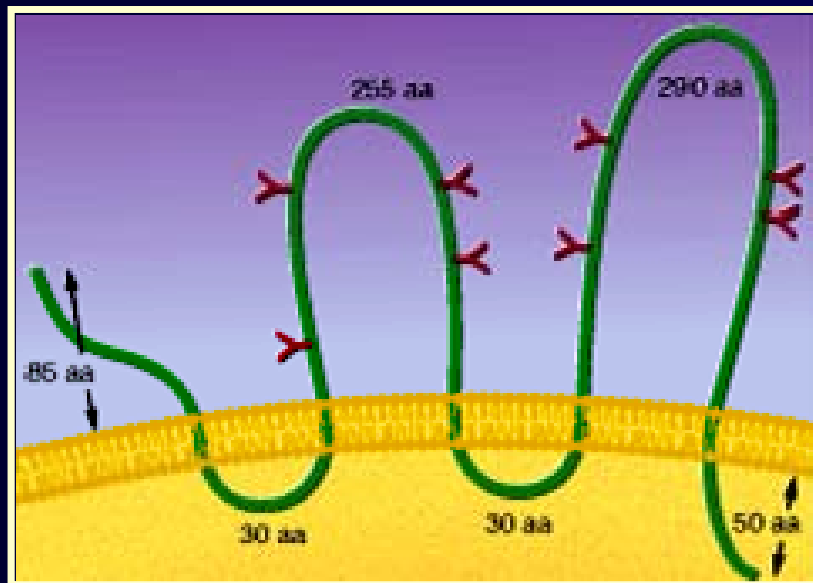
# Markery CSCs u nádorů dětského věku:

Malignancy	Cell Surface Proteins	Nuclear/Cytoplasmic Proteins	Transcription Factors	Functional/ Enzymes	Ref.
AT/RT	CD133				[31]
Ependymoma	CD133 CD15	Nestin, BLBP, RC2			[29,30,32]
Ewing's Sarcoma/PNET	CD133			SP	[58,74]
Glioma	CD133 CD15	Musashi-1, bmi-1	Sox-2		[24,25,32]
Hepatoblastoma				SP	[76]
Malignant rhabdoid tumor of the kidney	CD133				[45]
Medulloblastoma	CD133 CD15	Nestin		SP	[24-28,32-34]
Melanoma, childhood	CD133				[44]
Neuroblastoma	CD133	Nestin		SP	[42,43,74,77]
Osteosarcoma	CD133	Nestin	Oct3/4, Nanog	SP	[48-51,75]
Retinoblastoma	CD133 CD44	Nestin, musashi-1, bmi-1	Oct3/4, Nanog, pax-6, chx10	ALDH1, SP	[36-39]
Rhabdomyosarcoma	CD133			SP	[57,74]
Wilms Tumor	CD133 NCAM				[46]

(Friedman and Gillespie, Cancers, 2011)

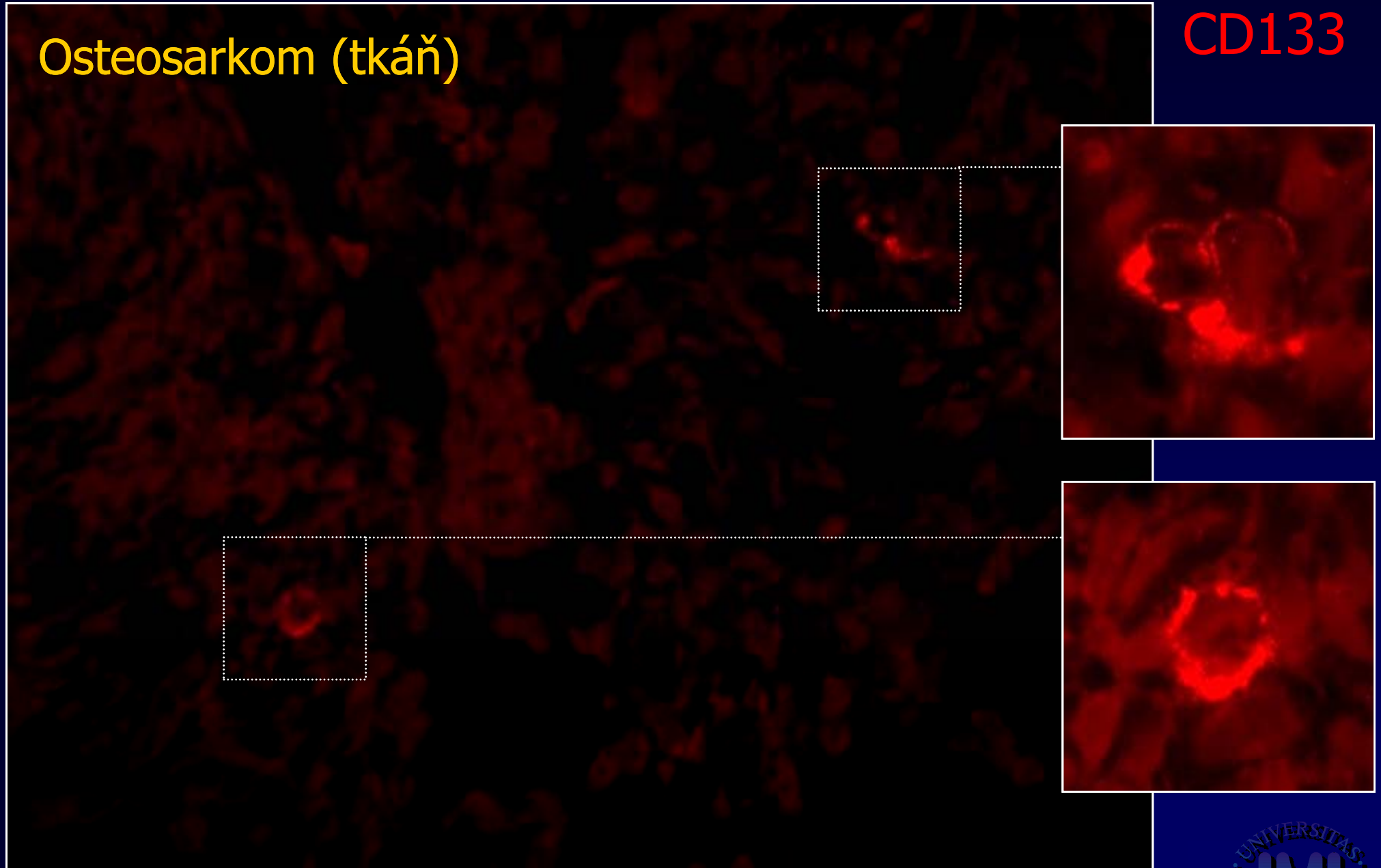
## CD133 (Prominin-1)

- membránový glykoprotein
- 4p15.32, 865 AA, 97 kDa
- 5 transmembránových segmentů: **5-TM family**
- organizace membránových protruzí
- SCs i CSCs

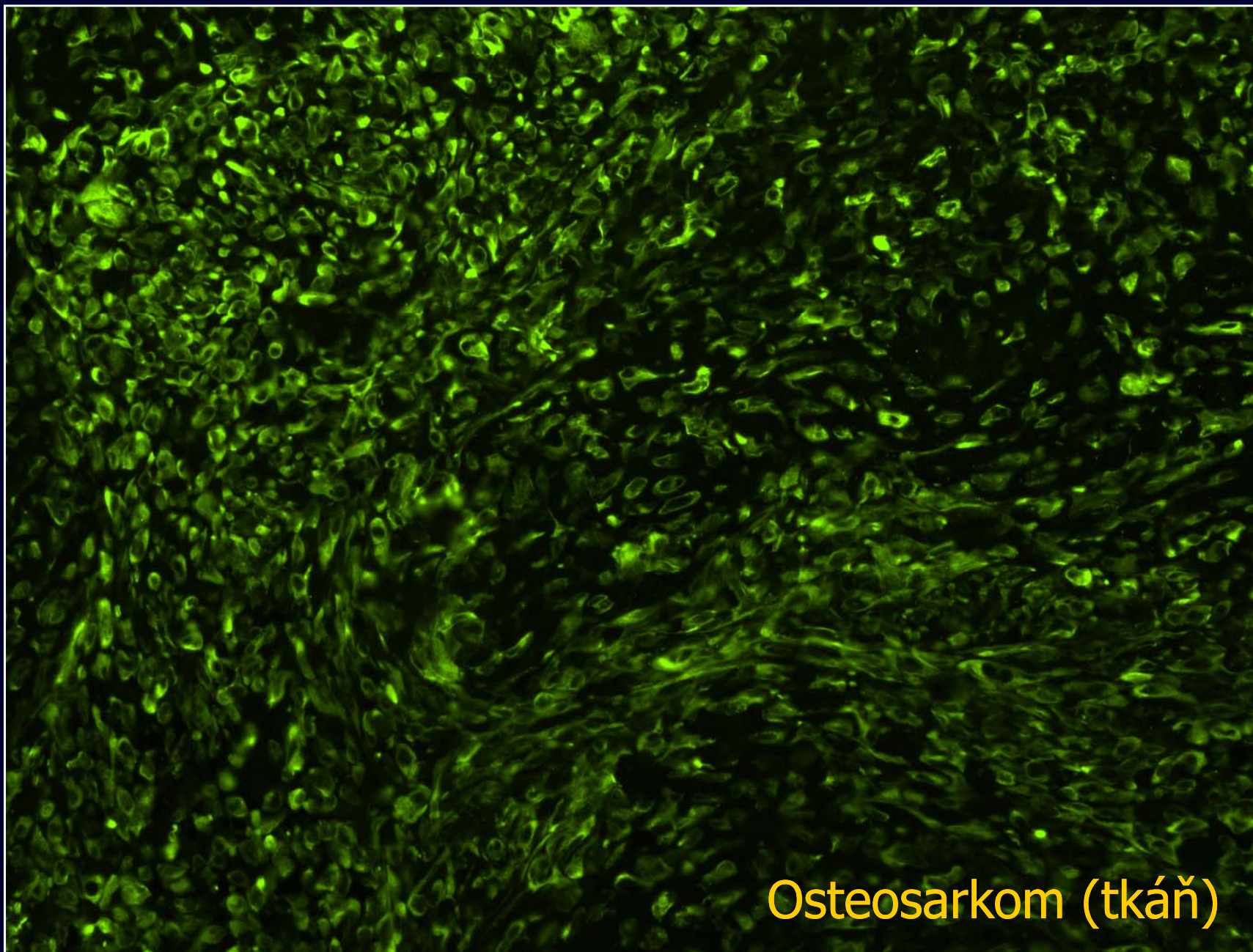


# Osteosarkom (tkáň)

CD133

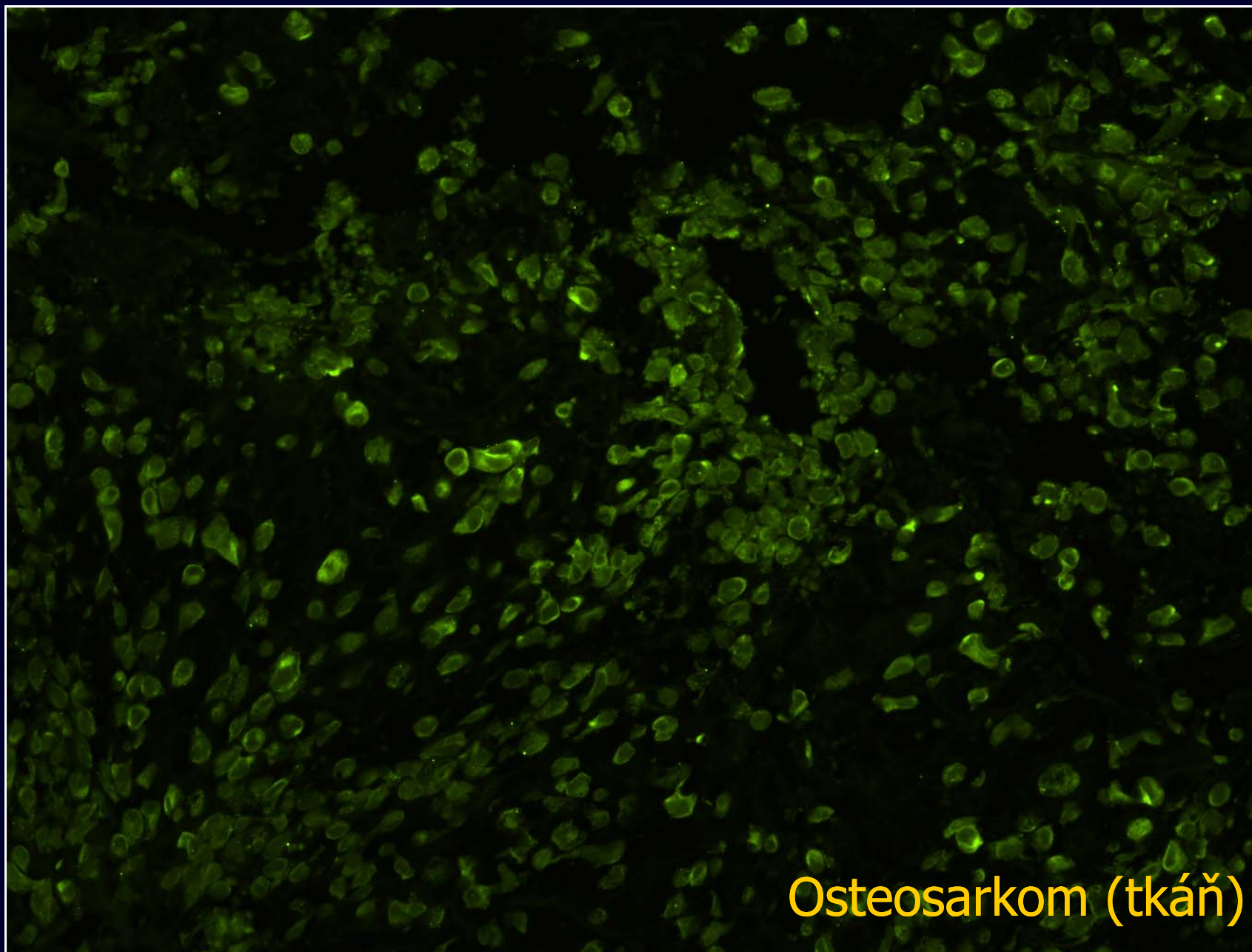


M/15  
Nestin



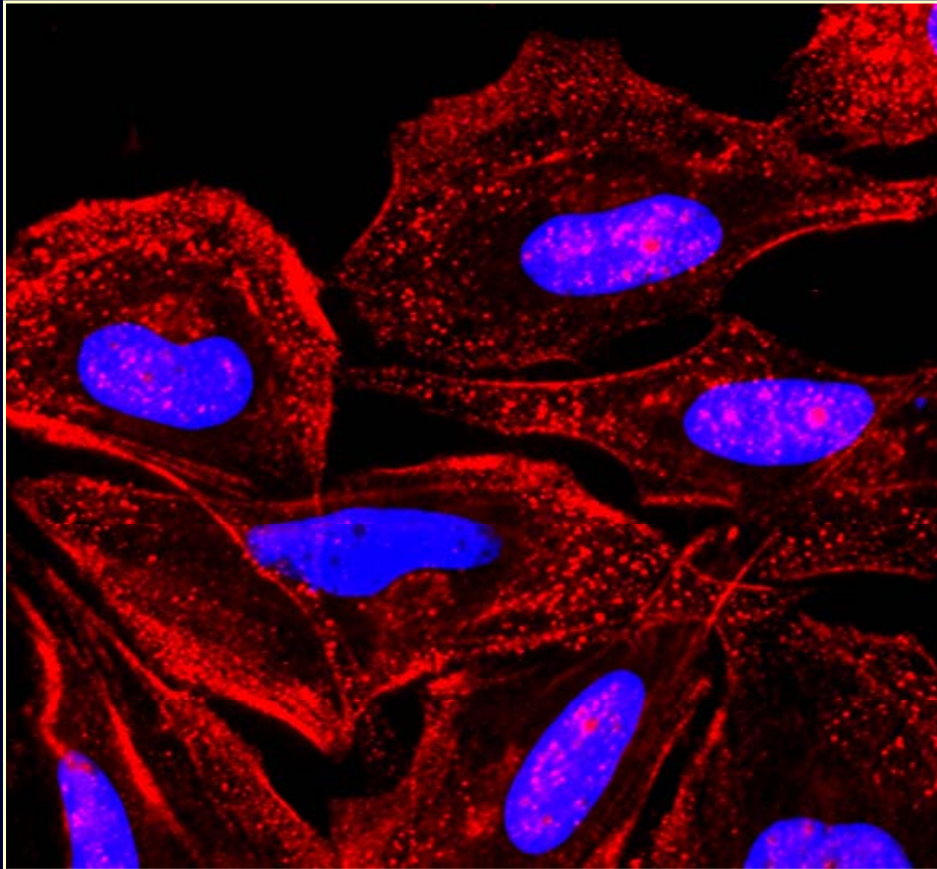
Osteosarkom (tkáň)

F/14  
Nestin

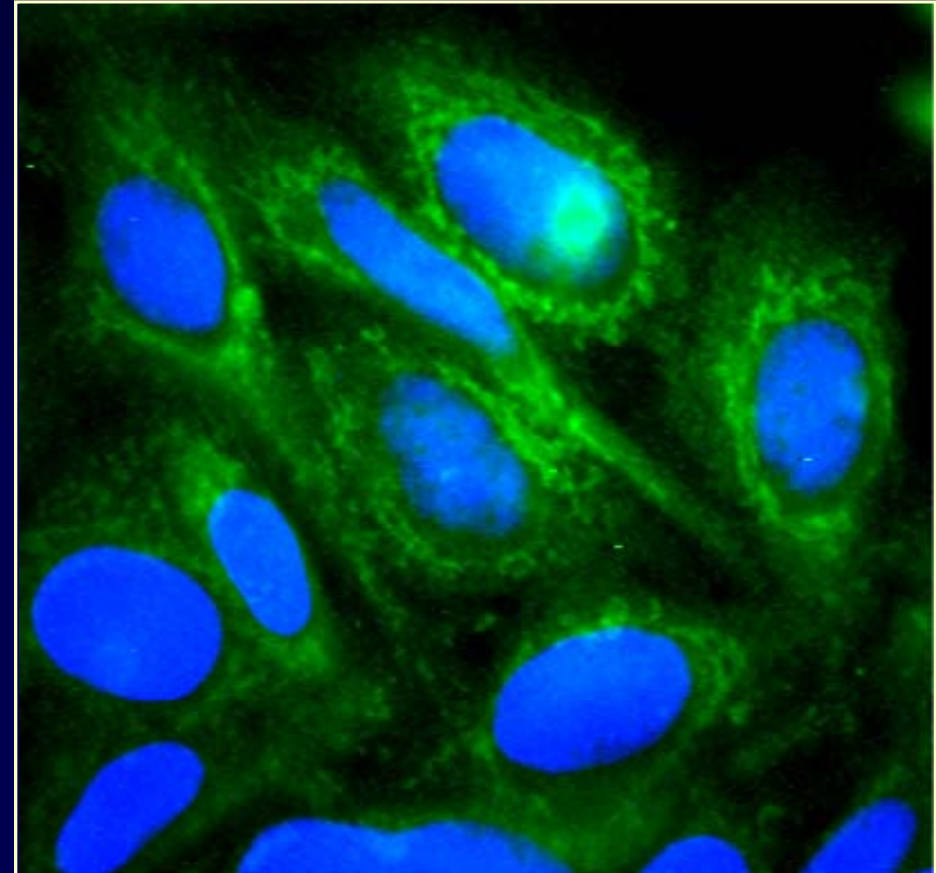


Osteosarkom (tkáň)

# Buněčná linie Saos-2 (ATCC) – osteosarkom

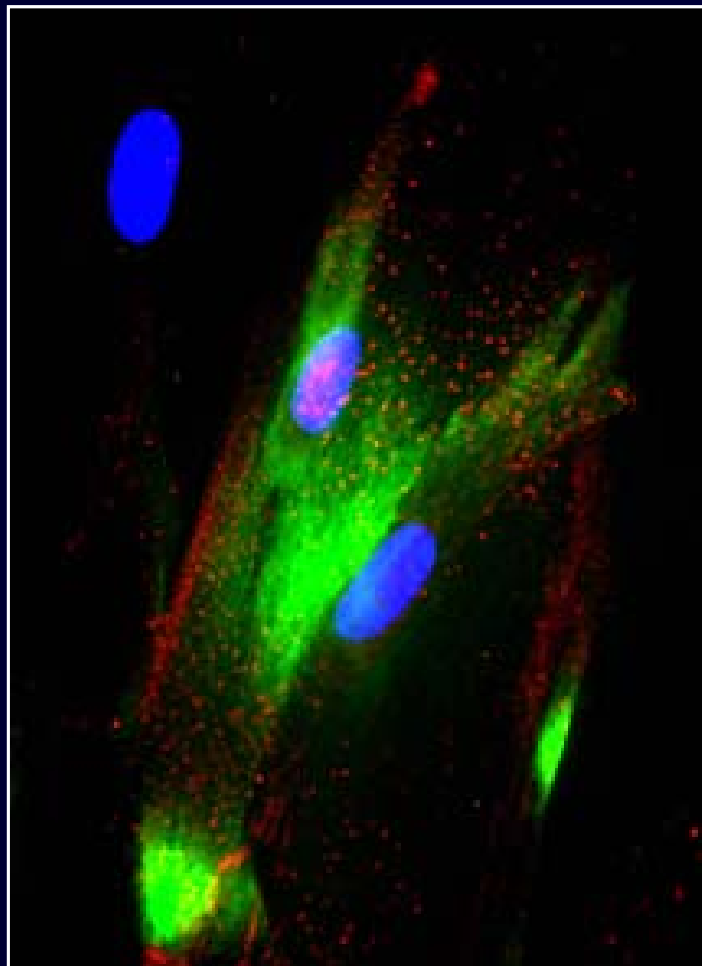


CD133 / DAPI

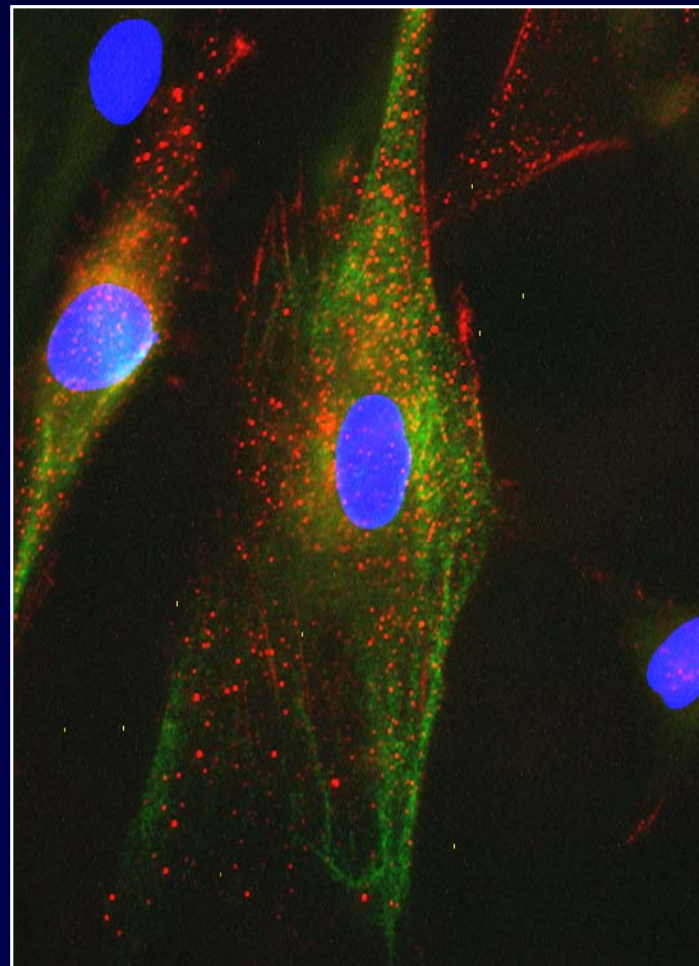


Nestin / DAPI

# Identifikace markerů CSCs v sarkomových buněčných liniích



Rhabdomyosarkom

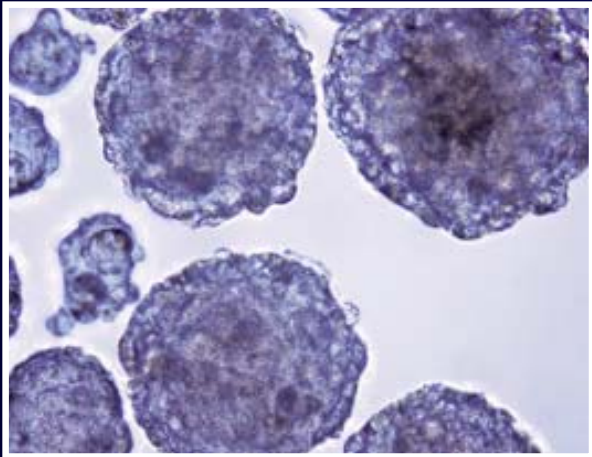


Osteosarkom

CD133  
Nestin

## Funkční testy (functional assays) na fenotyp CSCs

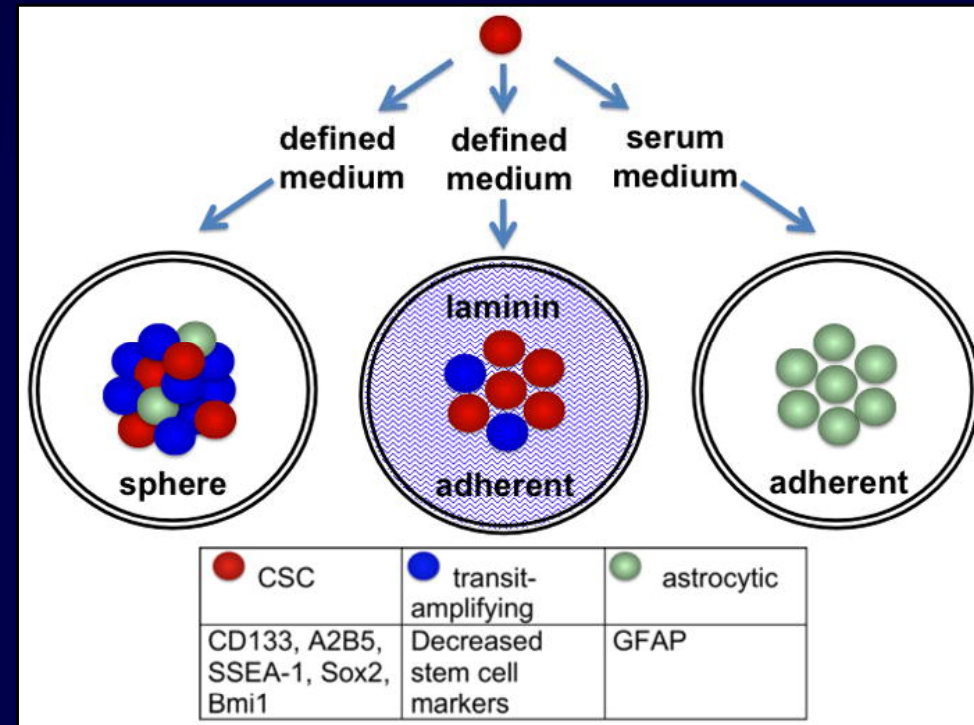
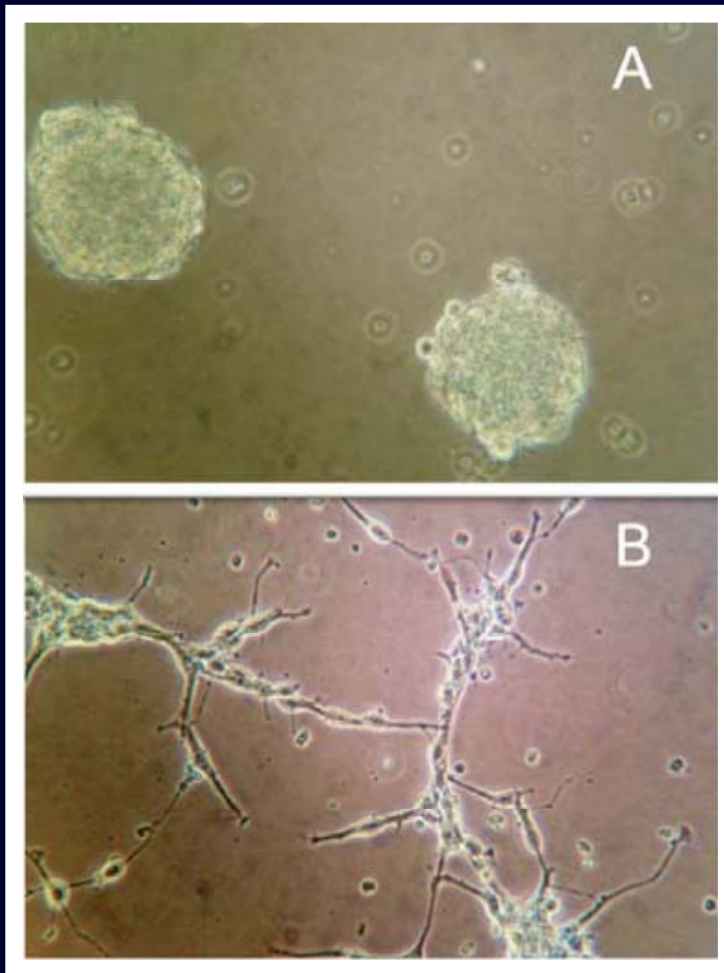
- tvorba sfér (sphere formation assay)
- tvorba kolonií (colony forming assay)
- testy klonogenity (clonogenicity assay)
- testy tumorigenicity (tumorigenicity assay)





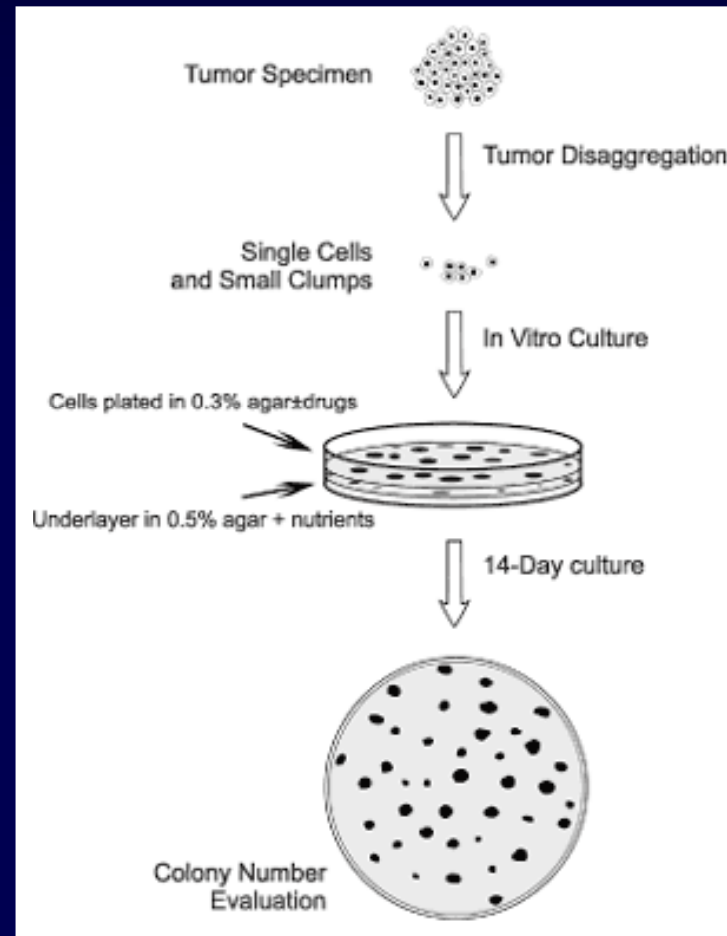
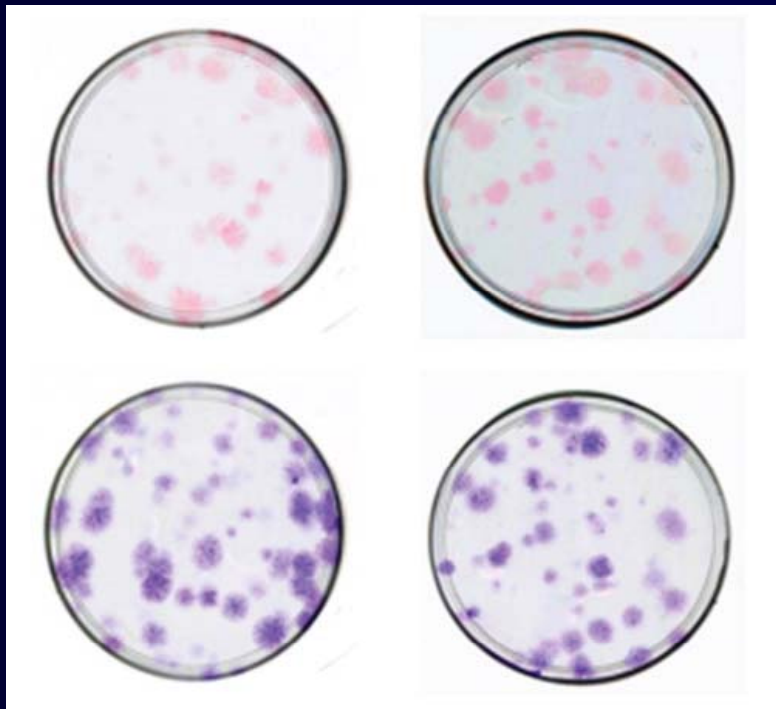
# Tvorba sfér (sphere formation assay)

- vytváření suspenzních buněčných agregátů



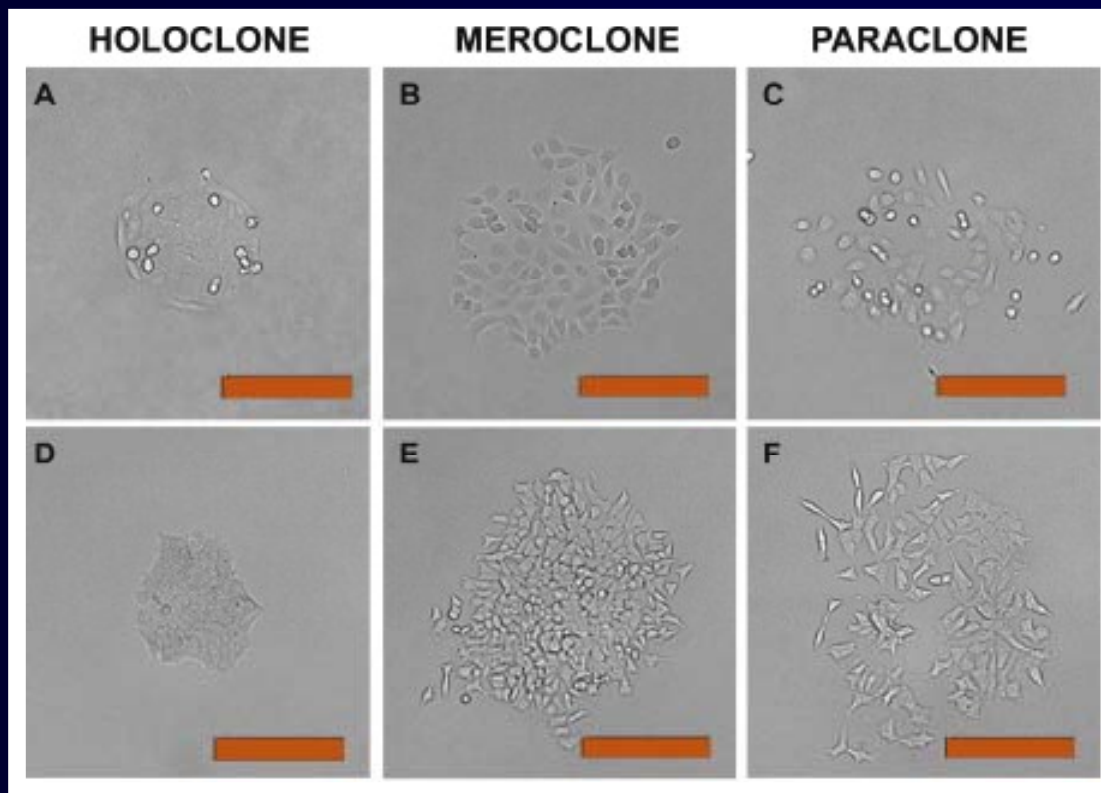
## Tvorba kolonií (colony-forming assay)

- vysetí naředěné buněčné suspenze do měkkého agaru → vytváření kolonií



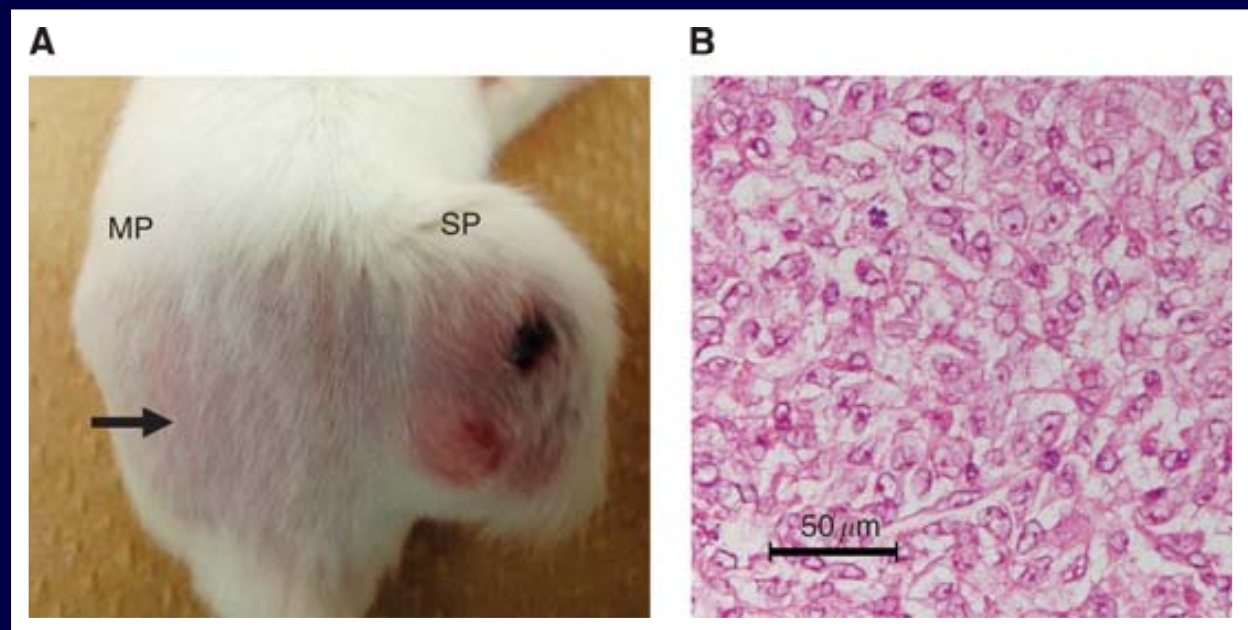
## Testy klonogenity (clonogenicity assay)

- inokulace izolovaných buněk do 96-jamkových destiček (ředěním nebo pomocí mikropipety)
- proliferace a tvorba kolonií (>50 buněk)



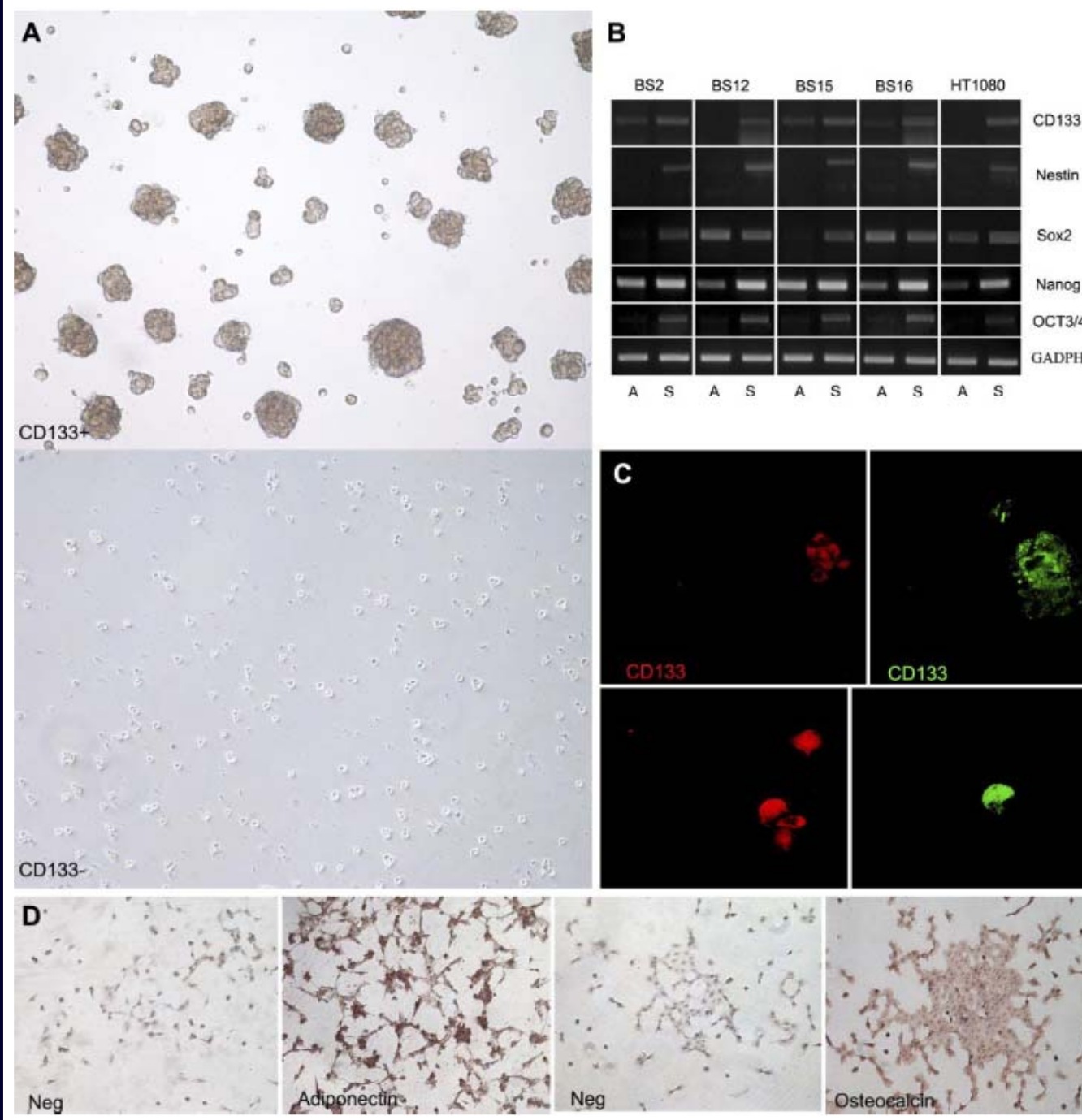
## Testy tumorigenicity (tumorigenicity assay)

- subkutánní injekce buněčné suspenze NOD/SCID myším (koncentrace cca  $10^7$ /ml)
- monitorování růstu nádorů, histologická analýza

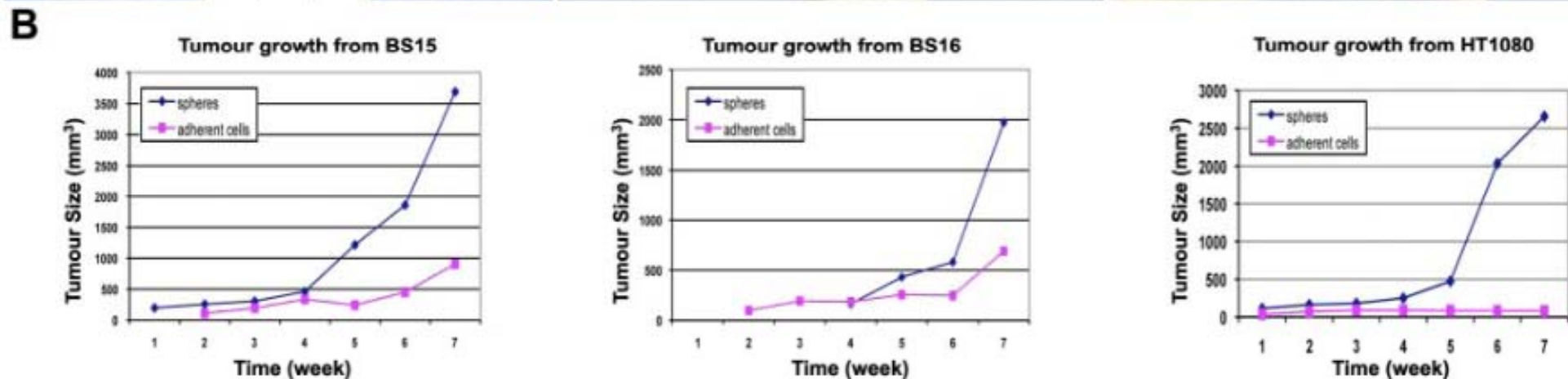
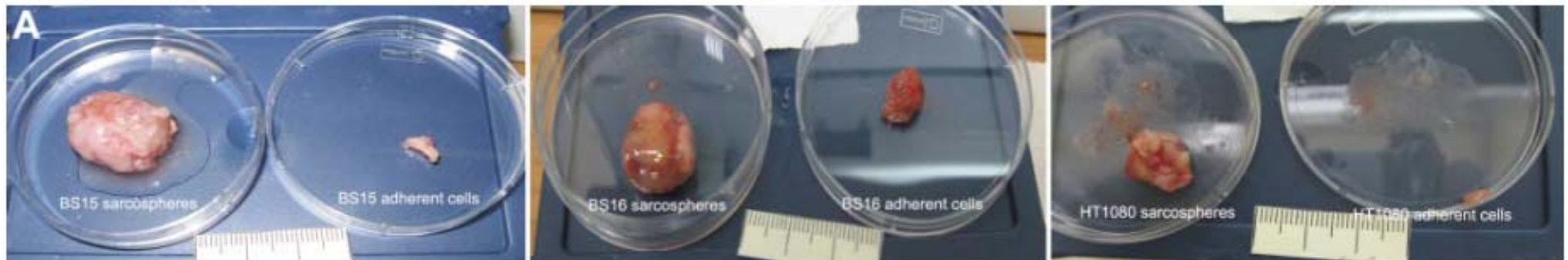


# Příklad komplexní analýzy CSCs *in vitro* (osteosarkom)

(Tirino et al., FASEB J, 2011)

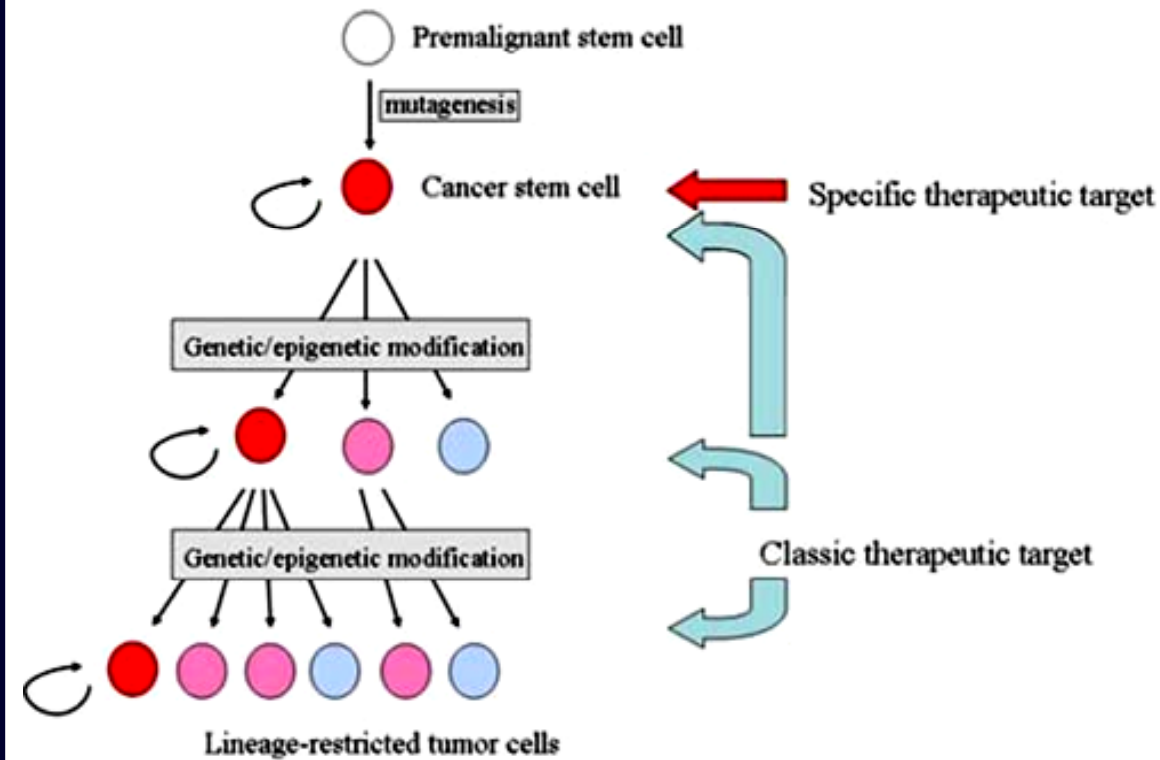
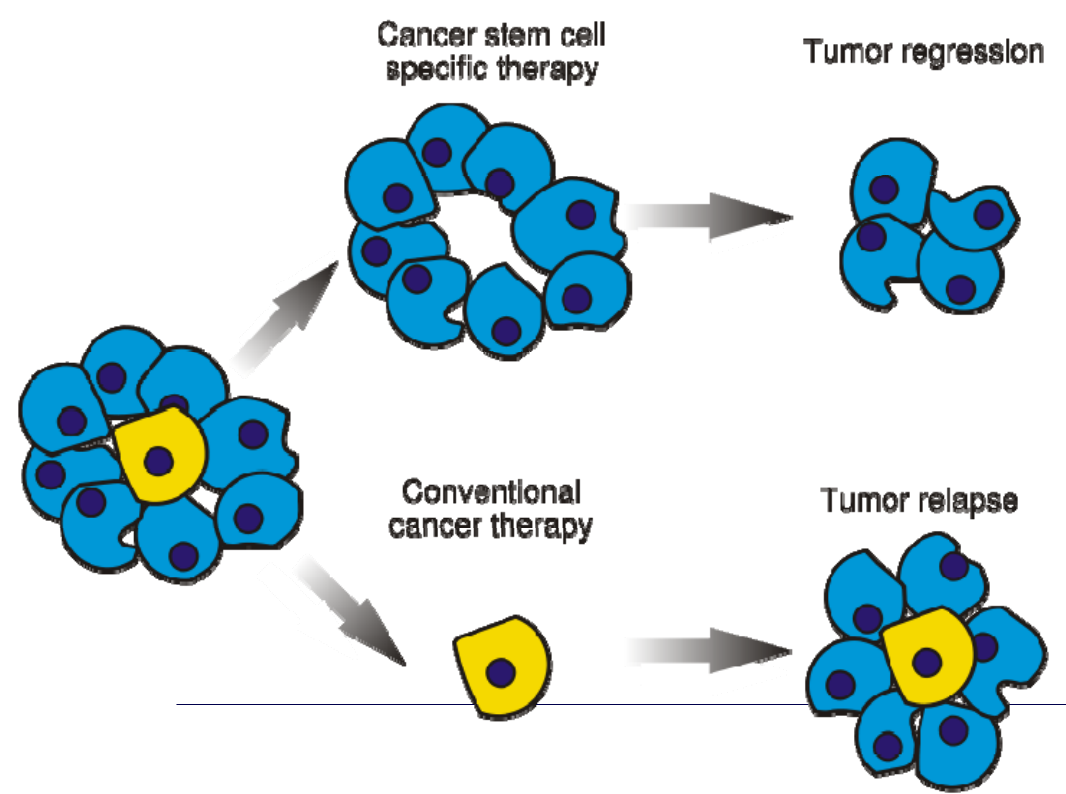


# Příklad komplexní analýzy CSCs *in vitro* (osteosarkom)

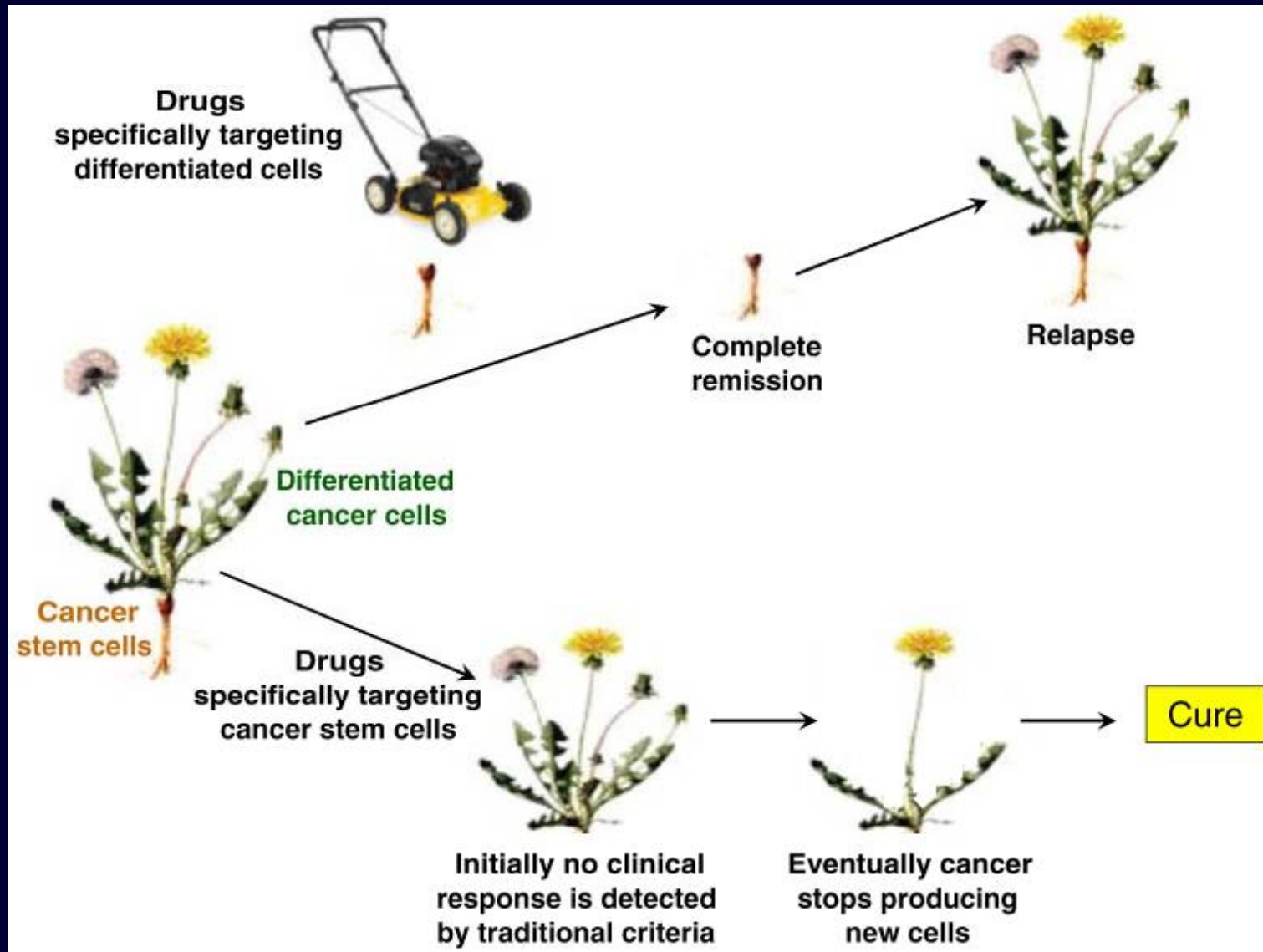


(Tirino et al., FASEB J, 2011)

# Hypotéza CSCs: Důsledky pro protinádorovou léčbu

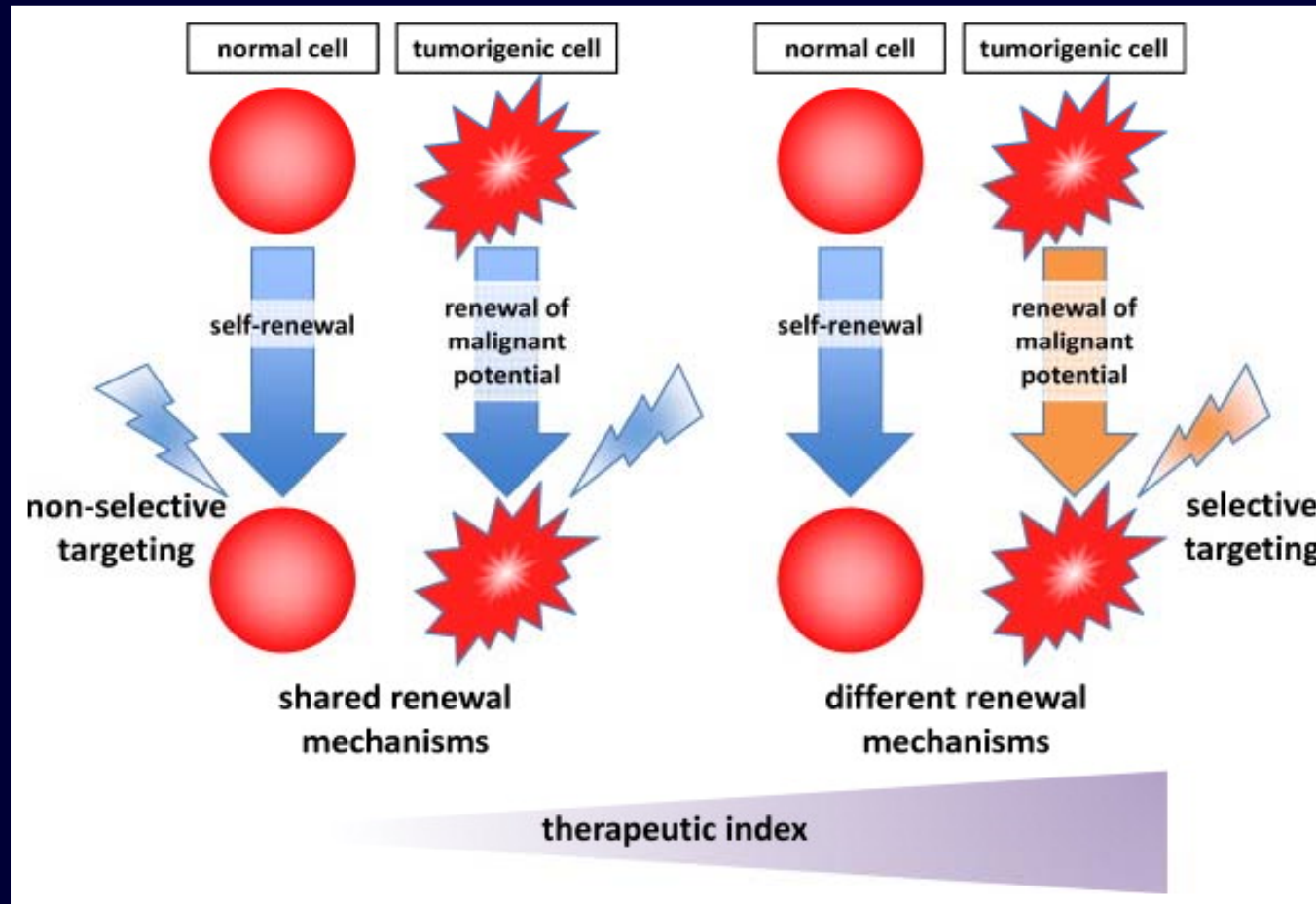


# Konvenční vs. cílená protinádorová léčba:





# Rizika neselektivní léčby cílené proti CSCs: poškození ASCs v nenádorové tkáni



# Problém cílené terapie:

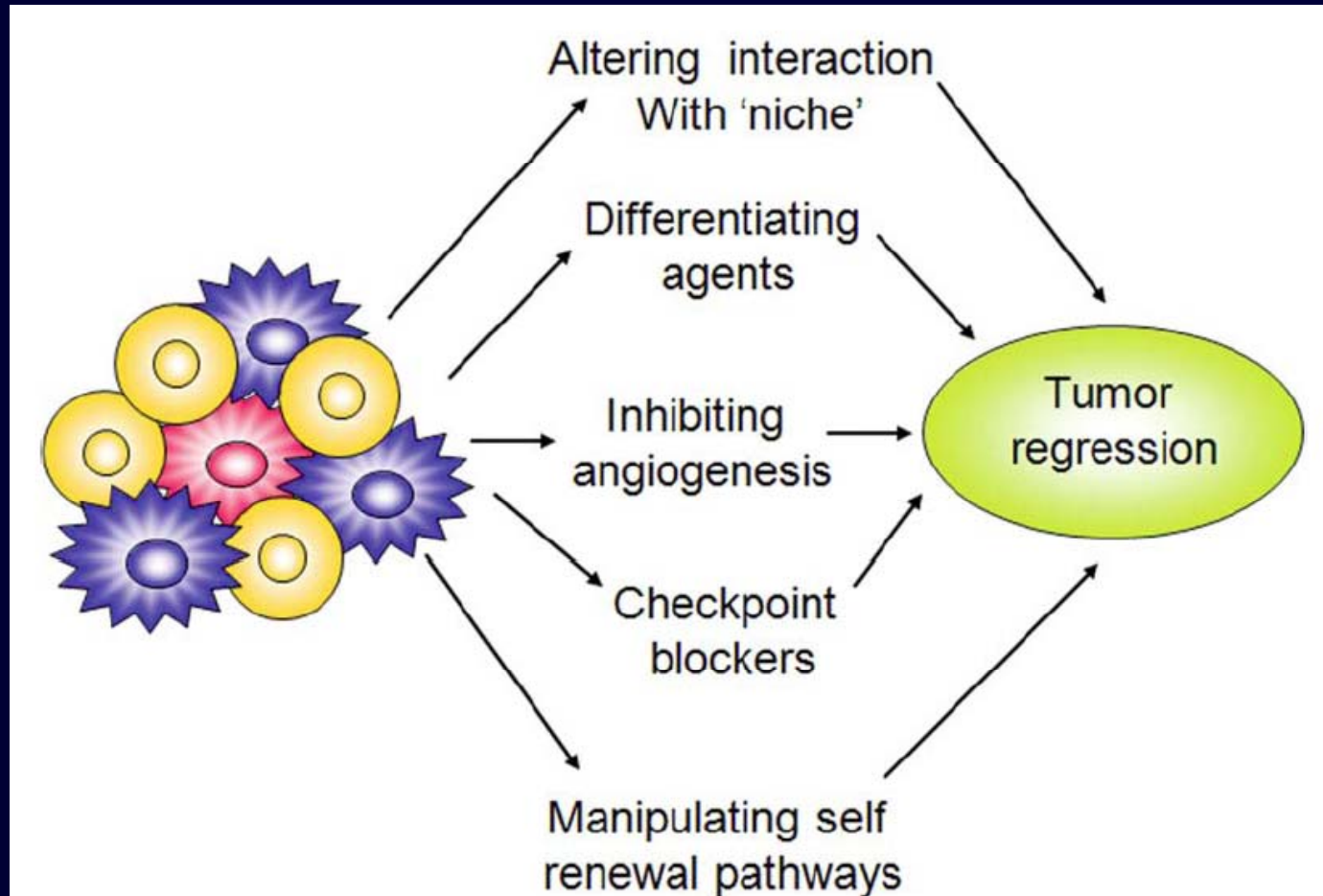
## chemorezistence a radiorezistence CSCs

<b>Chemoresistance Mechanism</b>	<b>Tumor Type</b>	<b>Ref.</b>
Efficient DNA repair ability	Ependymoma, Ewing's sarcoma, GBM, MB, osteosarcoma	[99,102]
Differential expression and phosphorylation of kinases	Neuroblastoma	[100]
Low Proliferative Ki-67 index	Childhood melanoma	[44]
ABC multidrug resistance	MB, neuroblastoma	[42,102]
Quiescence	Ependymoma, GBM, MB, PNET	[102]
<b>Radioresistance Mechanism</b>		
Preferential activation of DNA damage response	Glioblastoma	[103]
Upregulation of anti-apoptotic genes	MB, AT/RT	[31,104]

Předpokládané mechanismy chemorezistence a radiorezistence u nádorů dětského věku

(Friedman and Gillespie, Cancers, 2011)

# Terapie cílená proti CSCs: možné strategie



# Terapie cílená proti CSCs:

## Příklady konkrétních strategií u vybraných typů nádorů

**Table 2** Potential therapeutic avenues against stem-like cancer cells

Therapeutic modality	Tissue-specific example	Reference
Oncolytic viral therapy	Capsid-modified adenoviral vectors against CD44+/CD24- breast cancer cells	[63]
Differentiation therapy	All- <i>trans</i> retinoic acid treatment for neuroblastoma; Oncostatin M (IL-6-related) for hepatocellular carcinoma	[64, 65]
Immunotoxin therapy	Monoclonal antibodies against tumors for neutralization, inhibition, or cytotoxicity purposes; EpCAM antibody for stem-like population in pancreatic cancer	[66]
Pharmacological disruption of intracellular signaling	Perifosine for Akt inhibition in leukemic stem cells and radioresistant breast cancer cells	[67, 68]
Microenvironmental manipulation	Disruption of bone marrow-mediated oncoprotection by inhibiting CXCR4/SDF-1 signaling in rhabdomyosarcoma and leukemia	[69, 70]
Nanotechnology	Highly sensitive detection of disseminated breast tumor cells of CD44+ phenotype using photoacoustic flow cytometry	[71]

(Patel et al., Oncol Rev, 2010)

