

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 11.4.2012

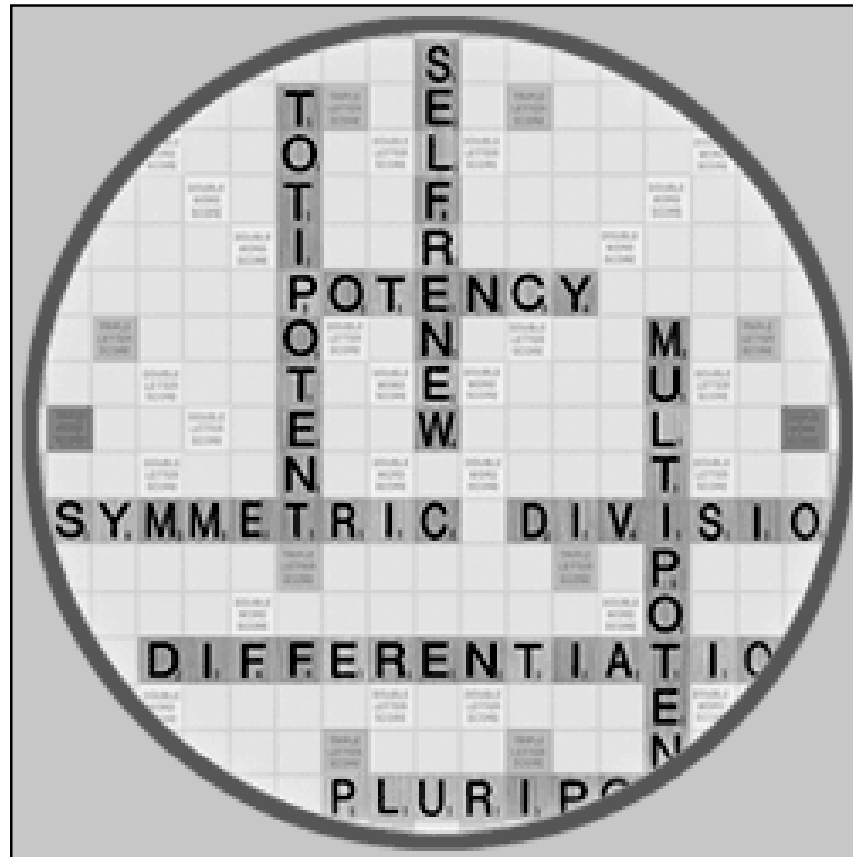
Adultní a nádorové kmenové buňky

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



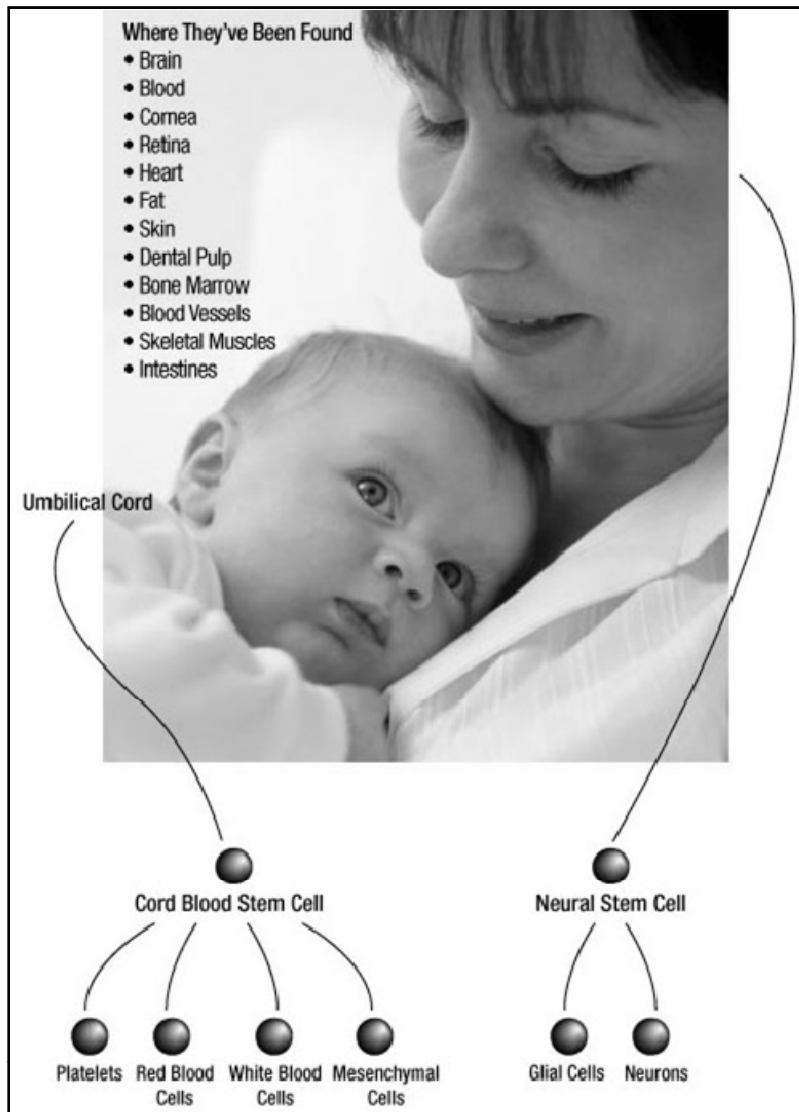
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 08 / 11.4.2012

Program přednášky:

- Adultní kmenové buňky (ASCs)
biologické vlastnosti a diferenciační potenciál
transdiferenciace, EMT
mikroprostředí (niche) ASCs
využití ASCs pro buněčné terapie → 18.4.2012
- Nádorové kmenové buňky (CSCs)
biologické vlastnosti a hypotézy vzniku CSCs
markery CSCs
možnosti cílené protinádorové terapie

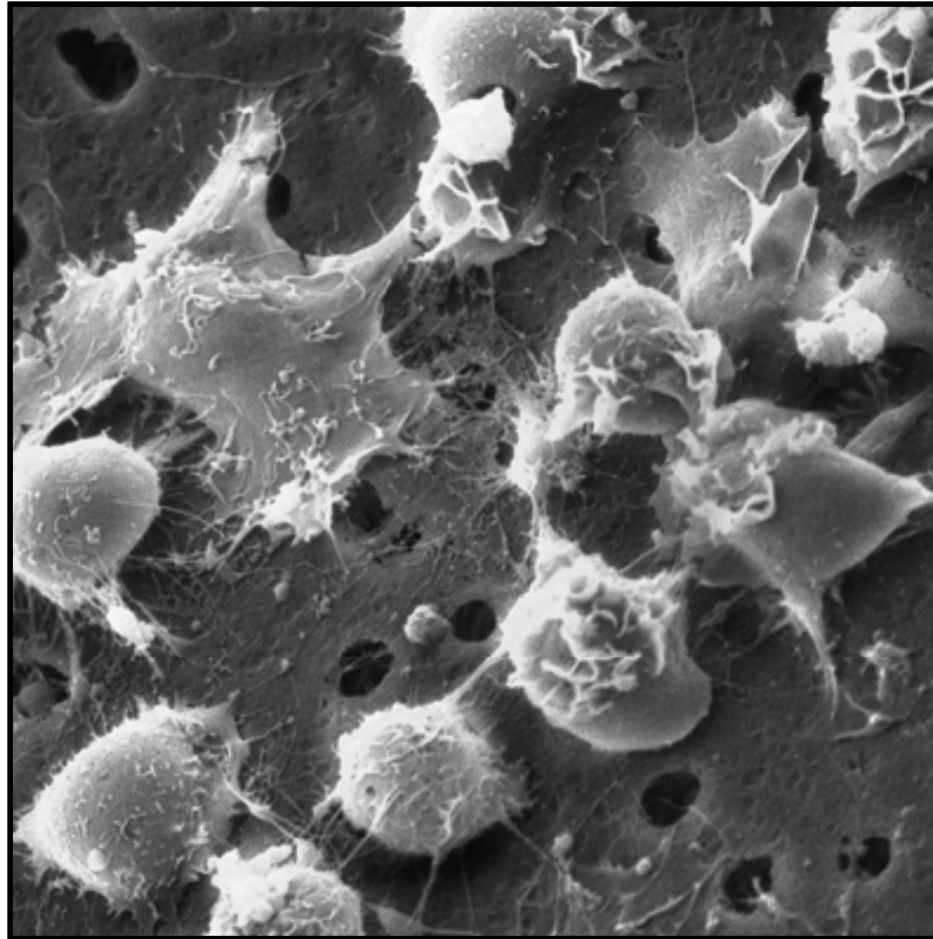
ADULTNÍ KMENOVÉ BUŇKY (ADULT STEM CELLS, ASCs)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 08 / 11.4.2012



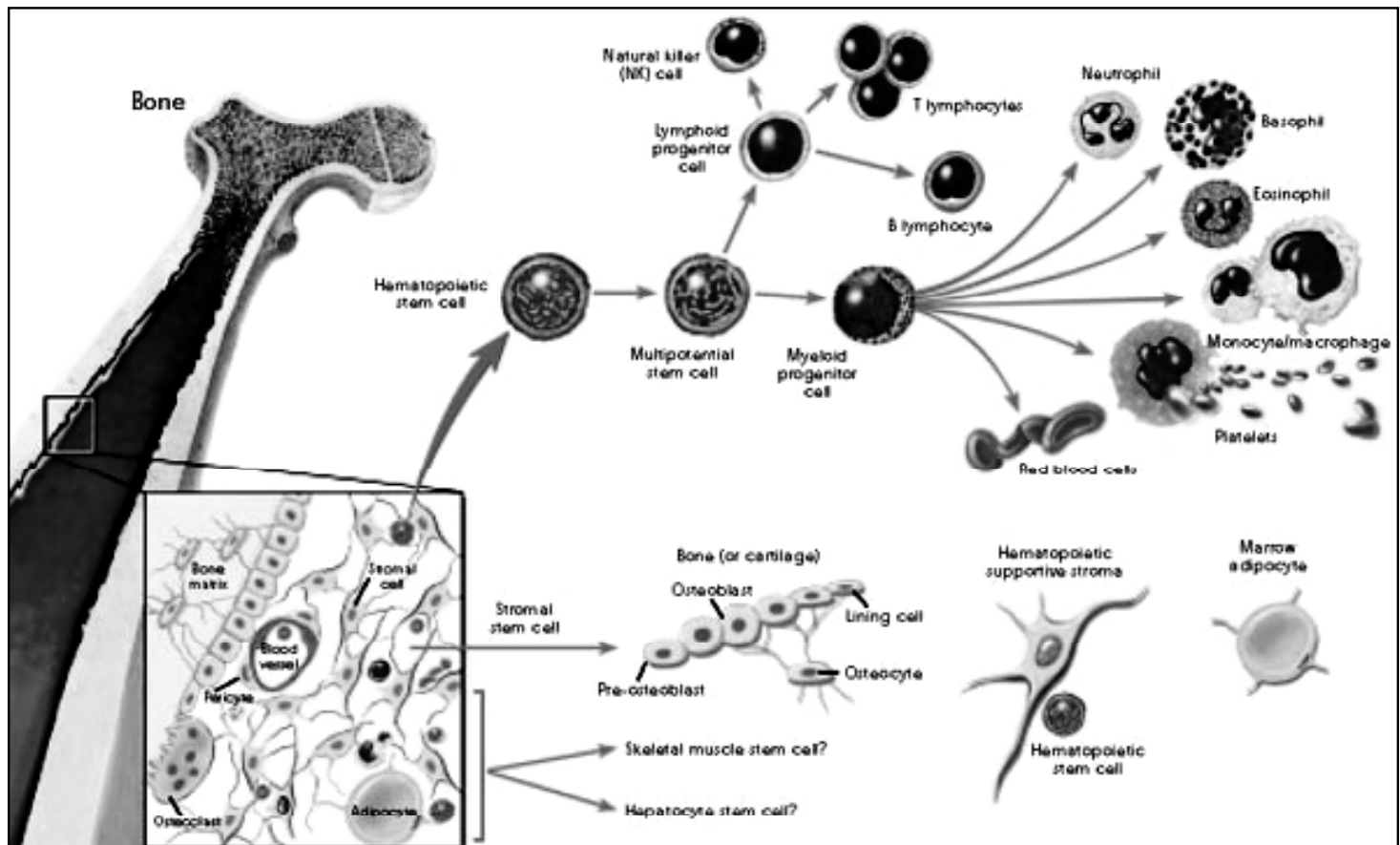
Typy ASCs:

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



Lidské SCs kostní dřeně

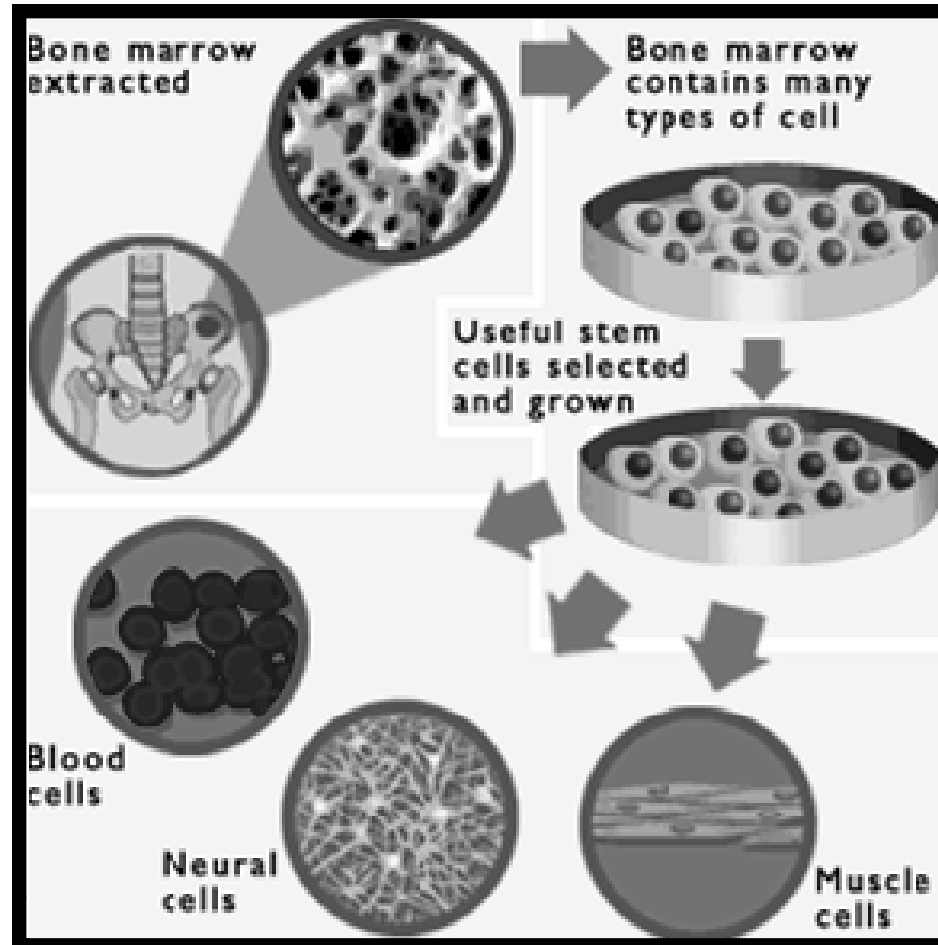
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 08 / 11.4.2012



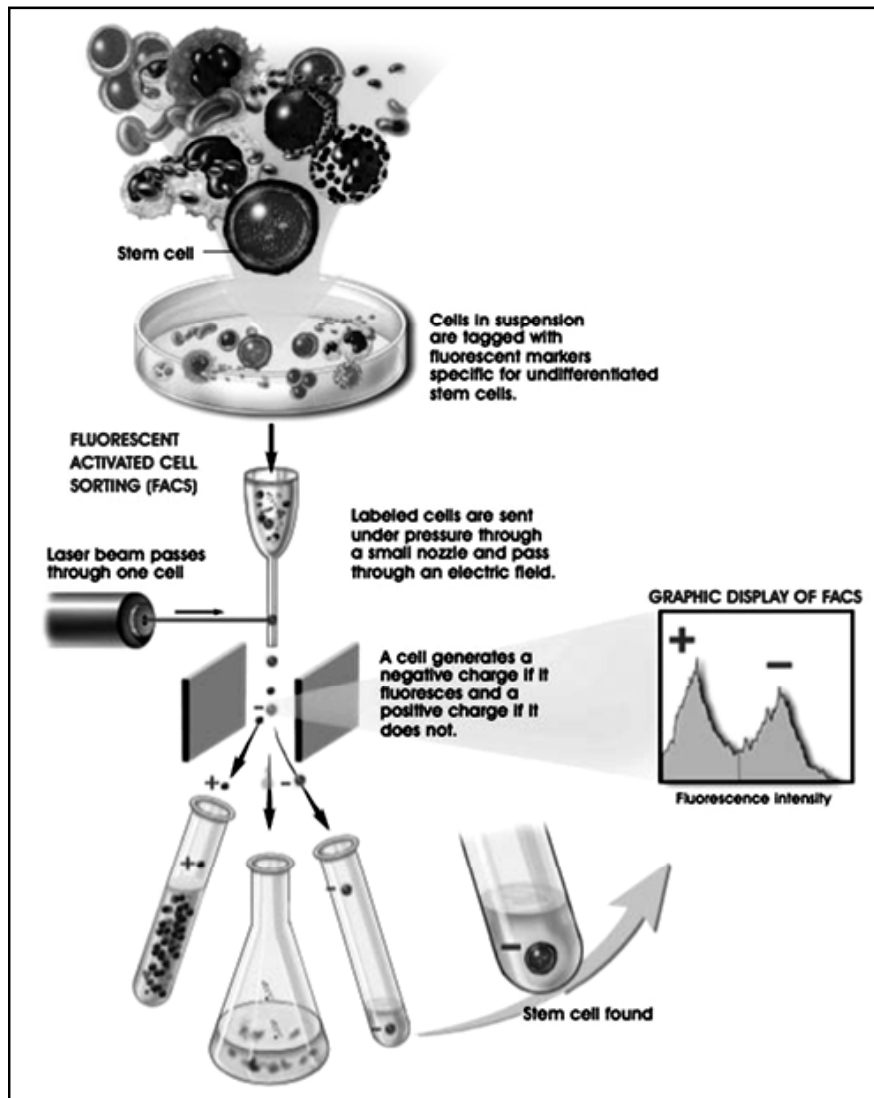
Diferenciační potenciál hematopoetických a stromálních SCs

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 08 / 11.4.2012

Plasticita hematopoetických SCs



Izolace hematopoetických SCs pomocí FACS



Transdiferenciace

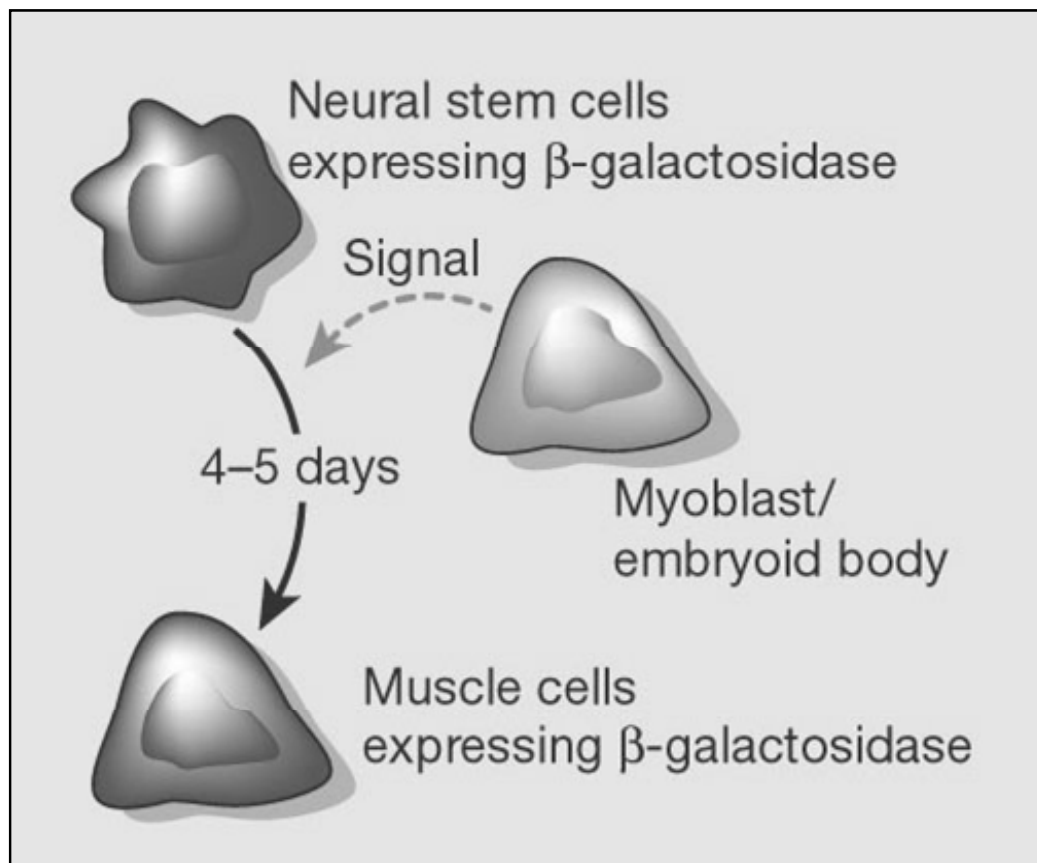
= schopnost buněk diferencovat do fenotypu charakteristického pro jiný typ tkáně nebo orgánu, než byla tkáň původní

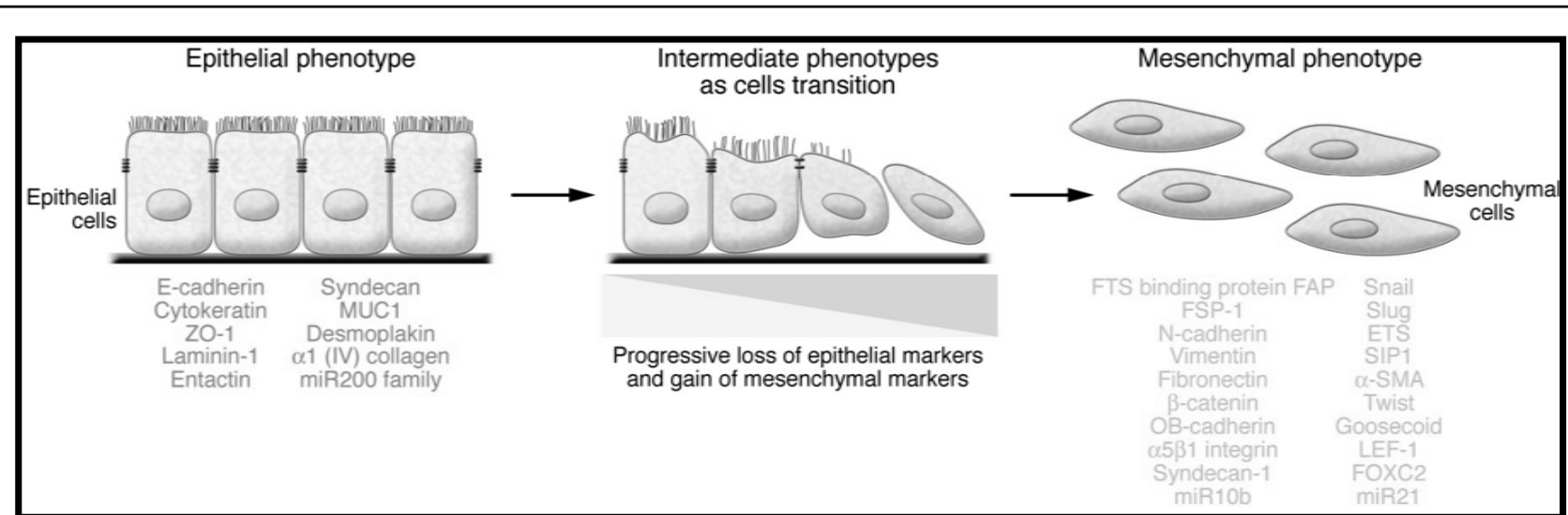
- hematopoetické SCs → kardiomyocyty, hepatocyty

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

Příklad transdiferenciace neurálních SCs

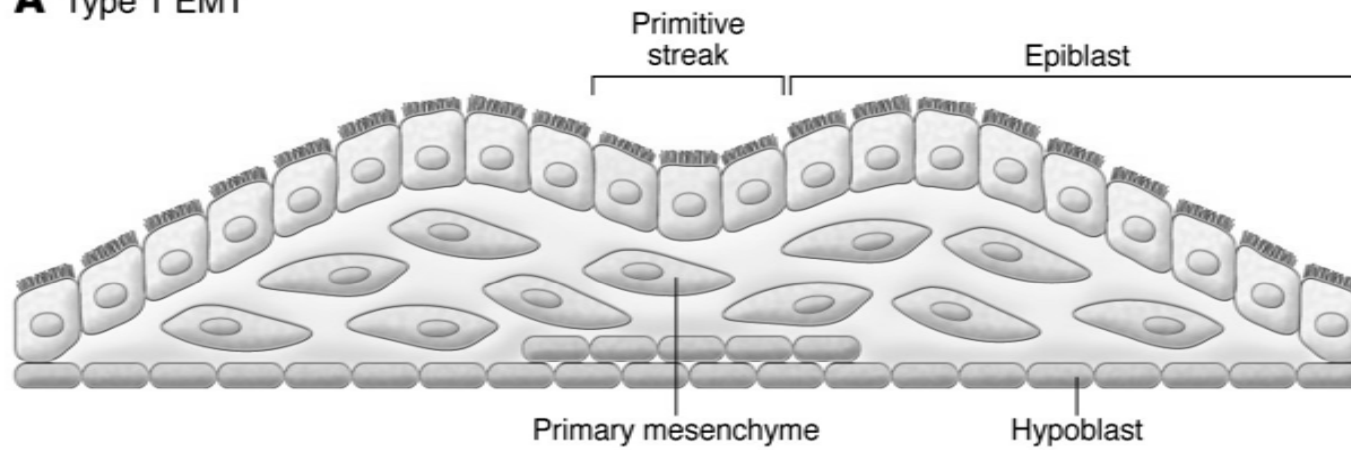




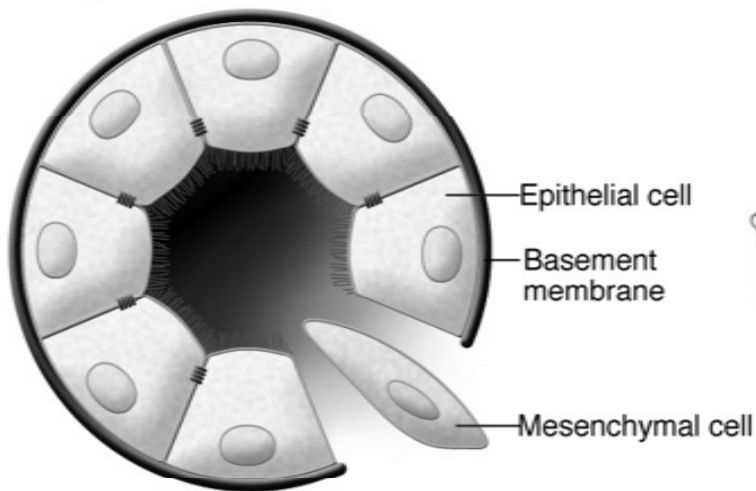
Epiteliálně mezenchymální tranzice (EMT)

= biologický proces, při němž polarizovaná epiteliální buňka, která svým bazálním povrchem interaguje s bazální laminou (ECM), prochází řadou biochemických změn, díky nimž získá mezenchymální fenotyp (zesílená schopnost migrace, invazivita, vyšší rezistence k apoptóze a zvýšená produkce komponent ECM)

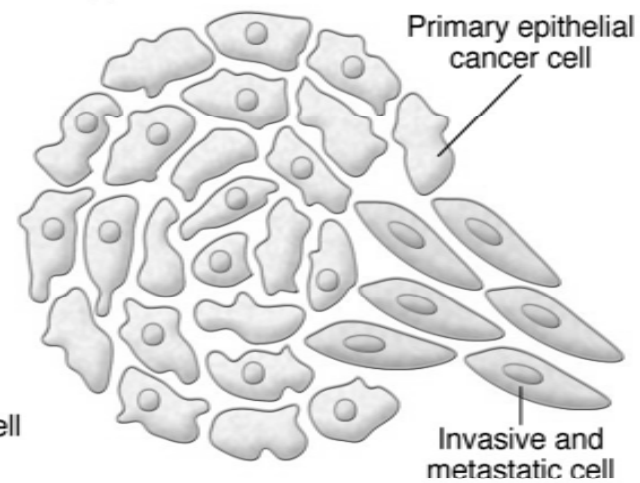
A Type 1 EMT



B Type 2 EMT

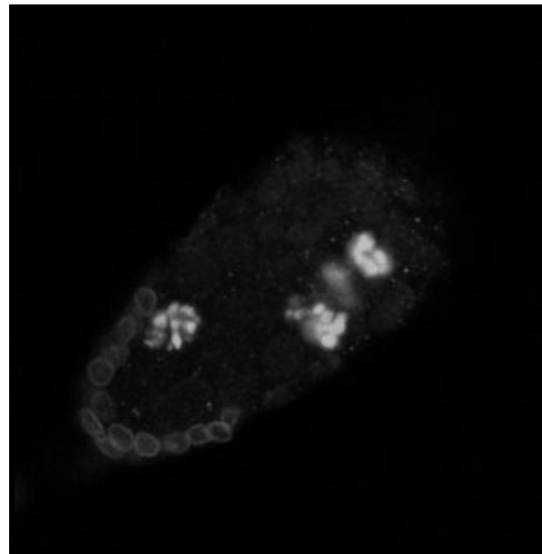


C Type 3 EMT



"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)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 08 / 11.4.2012

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



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 ^{a,b,*}, Marina Stantic ^a, Renata Zobalova ^{a,b}, Jaromira Chladova ^b, Xiufang Wang ^a,
 Lubomir Prochazka ^{a,c}, Lanfeng Dong ^a, Ladislav Andera ^d, Stephen J. Ralph ^e

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) DOI: 10.1002/path.2016



Review Article

Stem cells and cancer: an intimate relationship

J Burkert,¹ NA Wright^{1,2} and MR Alison^{1,2}
¹Histopathology Unit, Cancer Research UK, 44 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX, UK
²QMS, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, London E1 2AT, UK

POLIA HISTOCHEMICA
 ET CYTOBIOLOGICA
 Vol. 43, No. 4, 2005
 pp. 175–181

Review article

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

Mariusz Z. Ratajczak

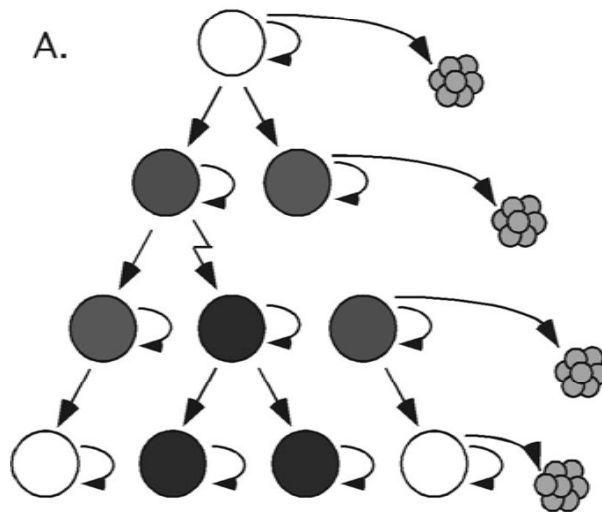
Stem Cell Biology Program at James Graham Brown Cancer Center, University of Louisville, KY, USA
 and European Union Stem Cell Therapeutic Excellence Center, Jagiellonian University, Kraków, Poland



www.elsevier.com/locate/ybbrc

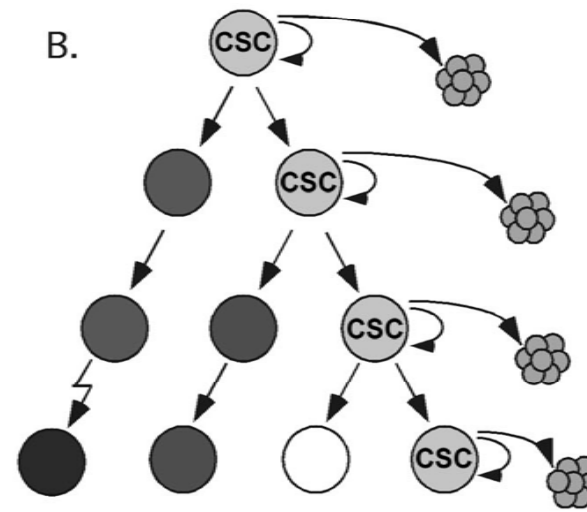
Důsledek: zásadní změna pohledu na biologii nádorů

Stochastic/ clonal evolution model



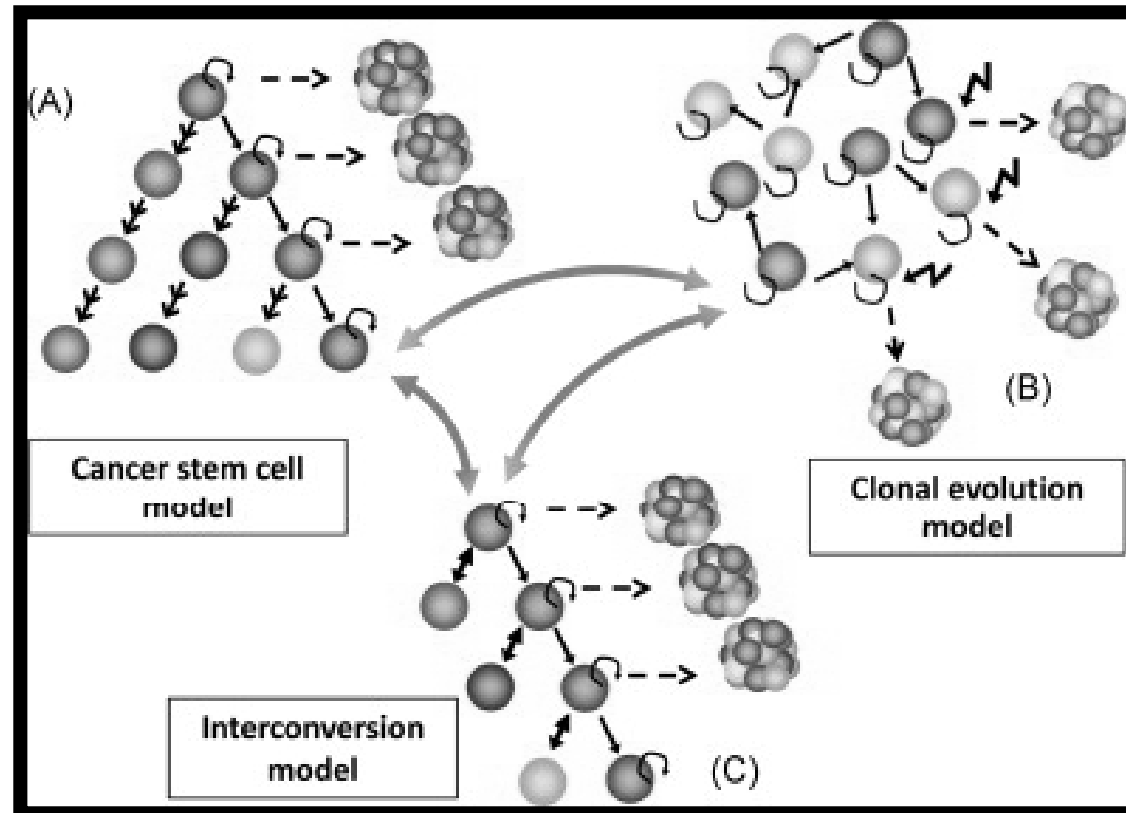
Cancer cells are heterogeneous, but most cells can proliferate extensively and form new tumors. All cancer cells must be eliminated to cure the patient.

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



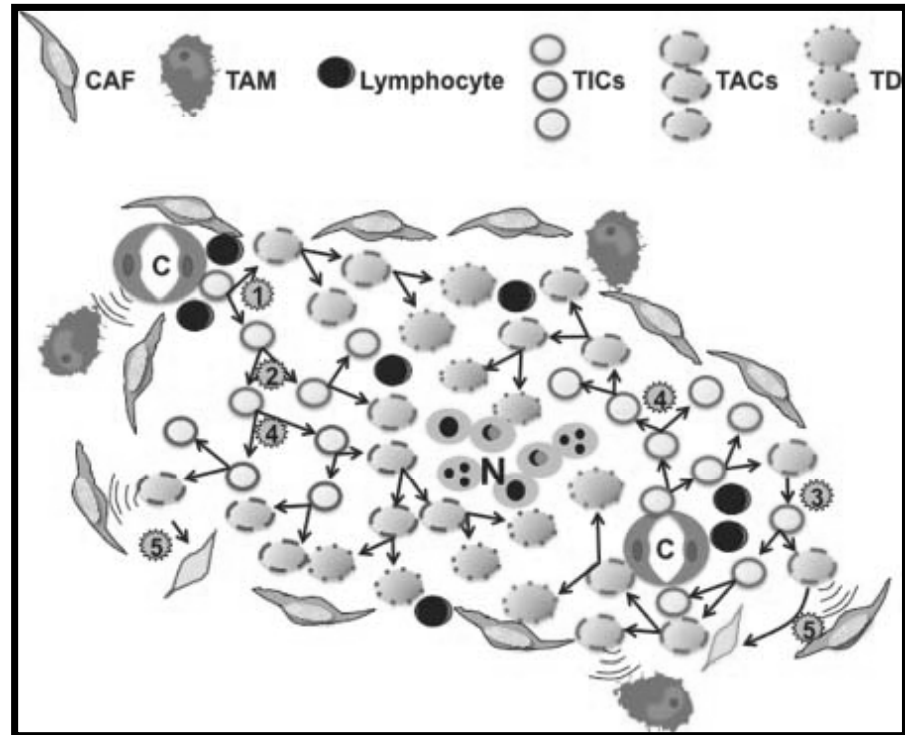
Heterogenní prostředí solidního nádoru

C = kapilára

N = nekróza

TAM

= tumor-associated
macrophages

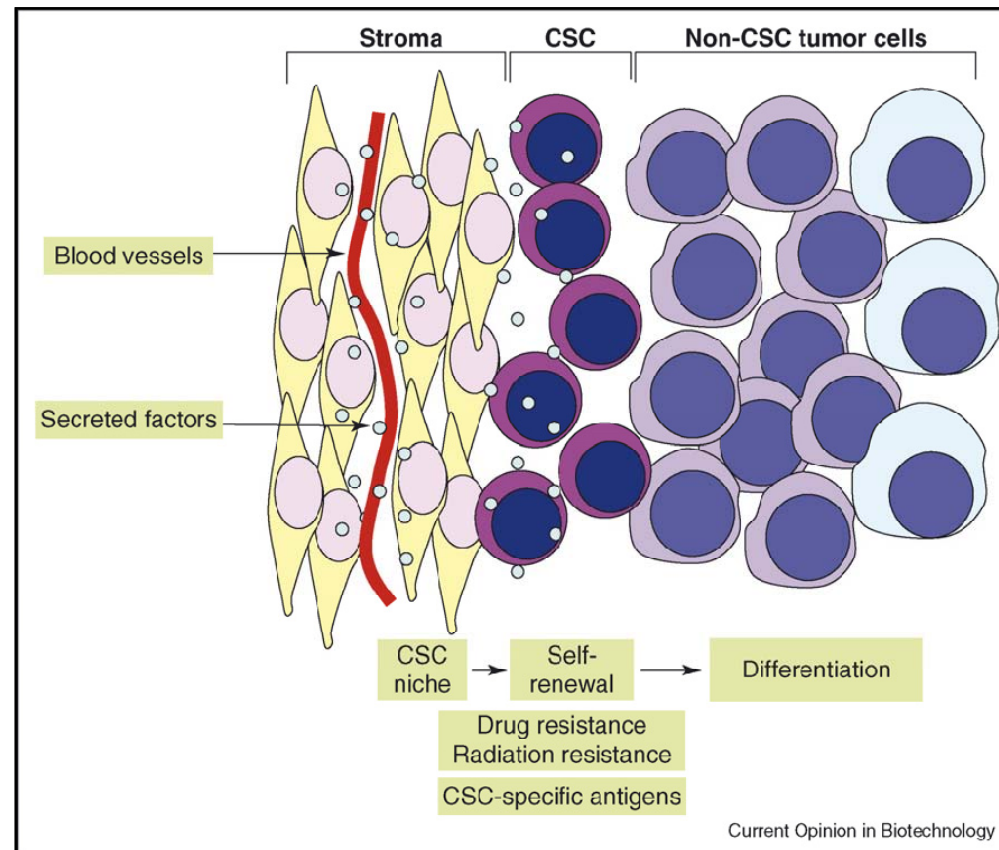


TICs = tumor initiating cells (= CSCs)

TACs = transit amplifying cells

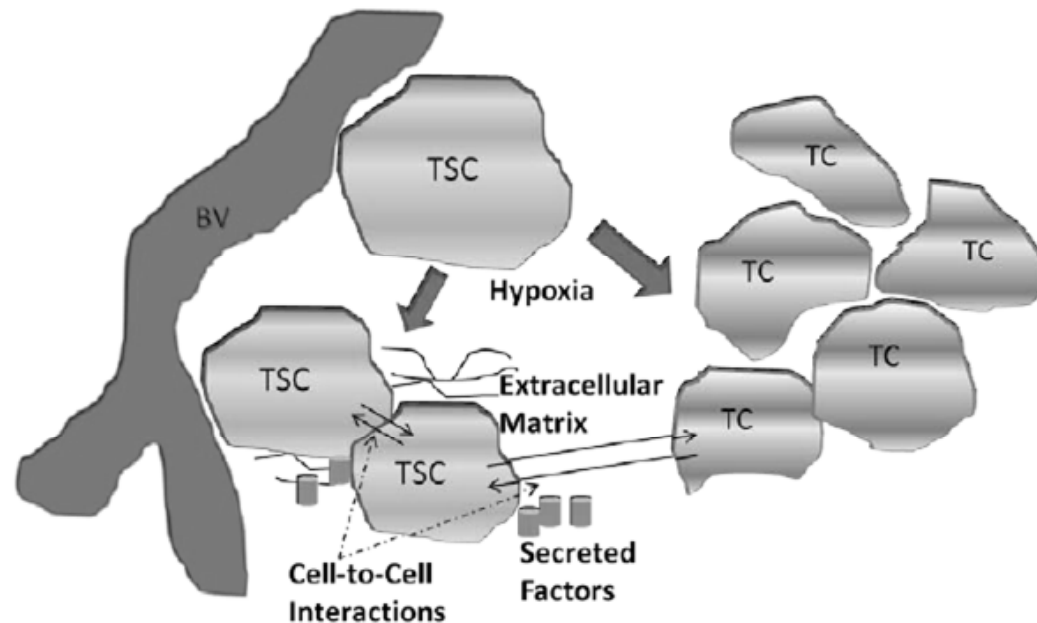
TD = terminally differentiated cells

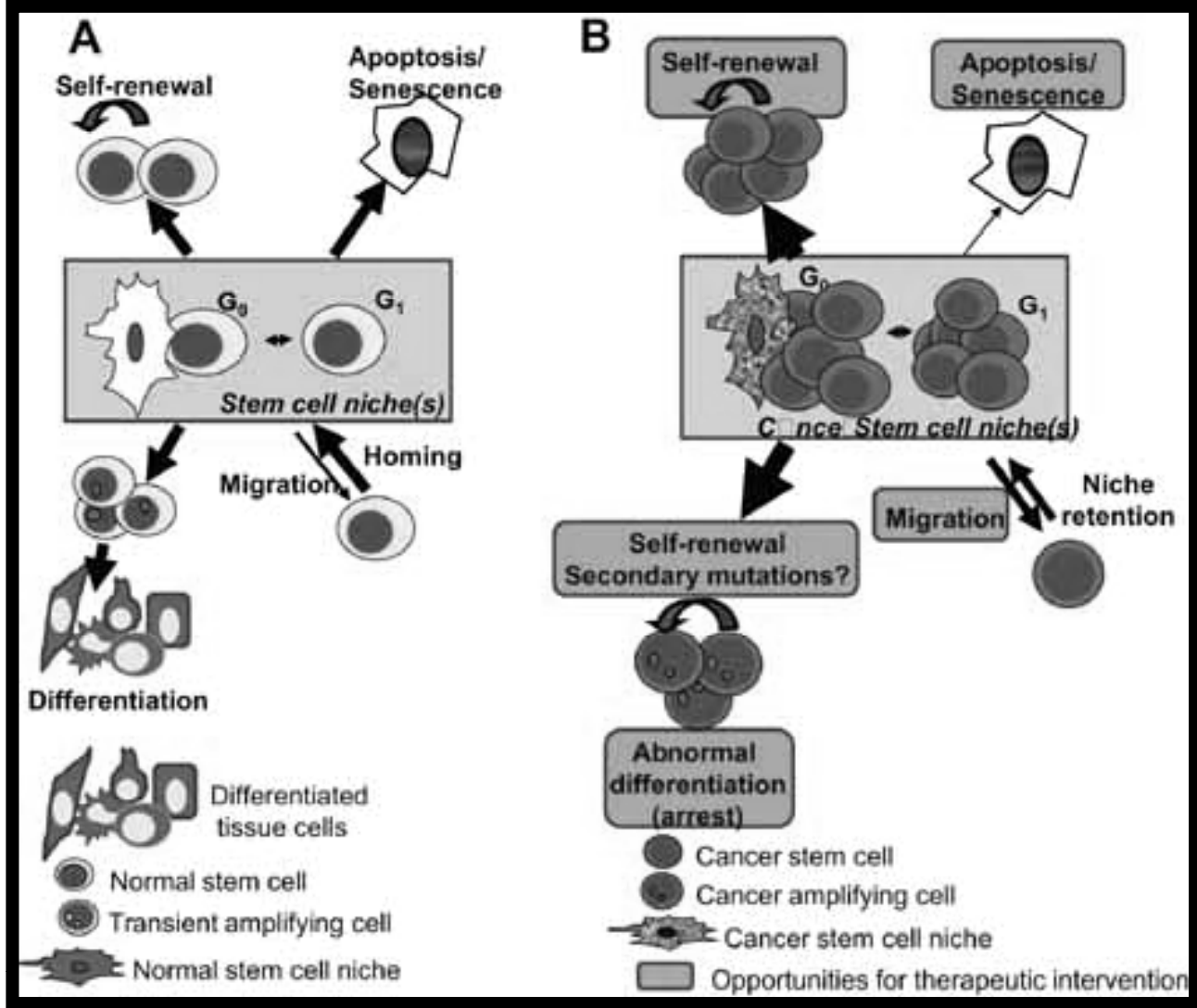
Mikroprostředí (niche) CSCs v solidních nádorech



Komponenty mikroprostředí v solidních nádorech

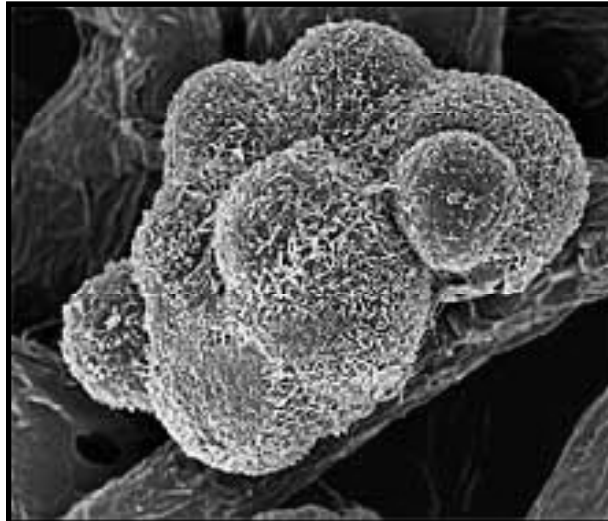
- hypoxie, ECM, mezibuněčné interakce, extracelulární (secernované) faktory a signály, "tissue makeup"



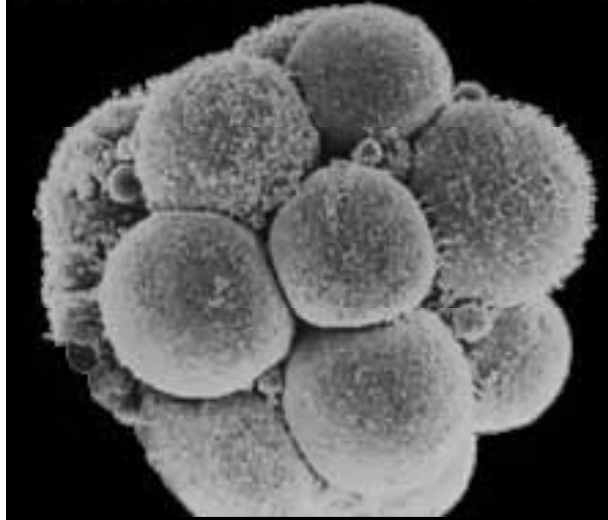


Hypotézy vzniku CSCs

- 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

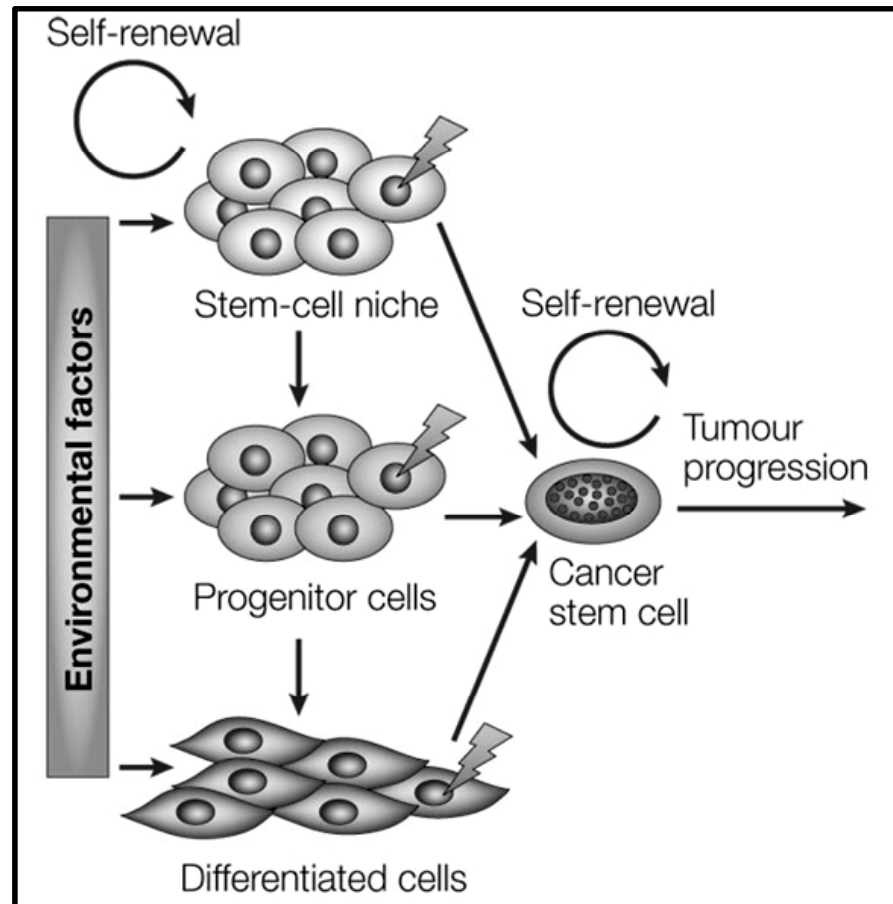
SCs normální tkáně:

- 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

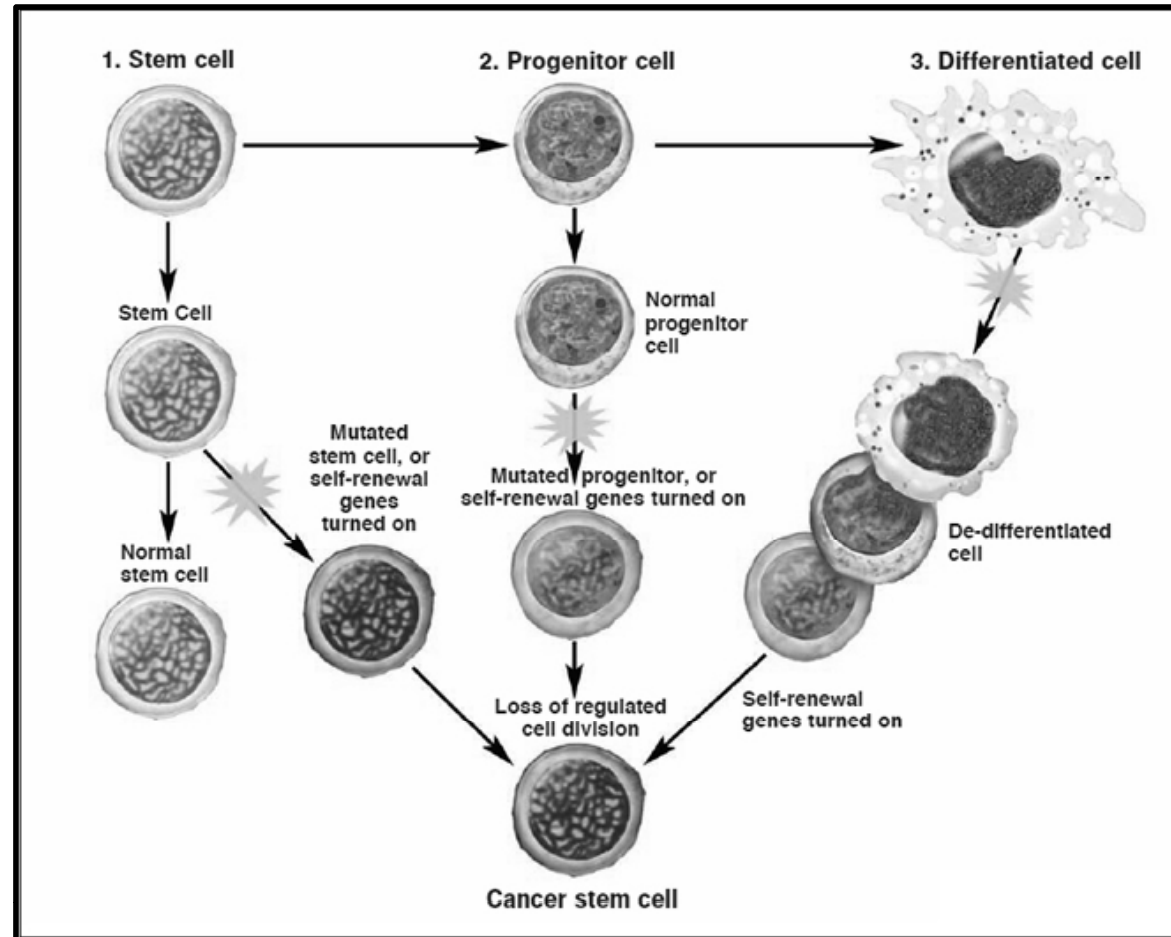
Odpovídající typ nádoru:

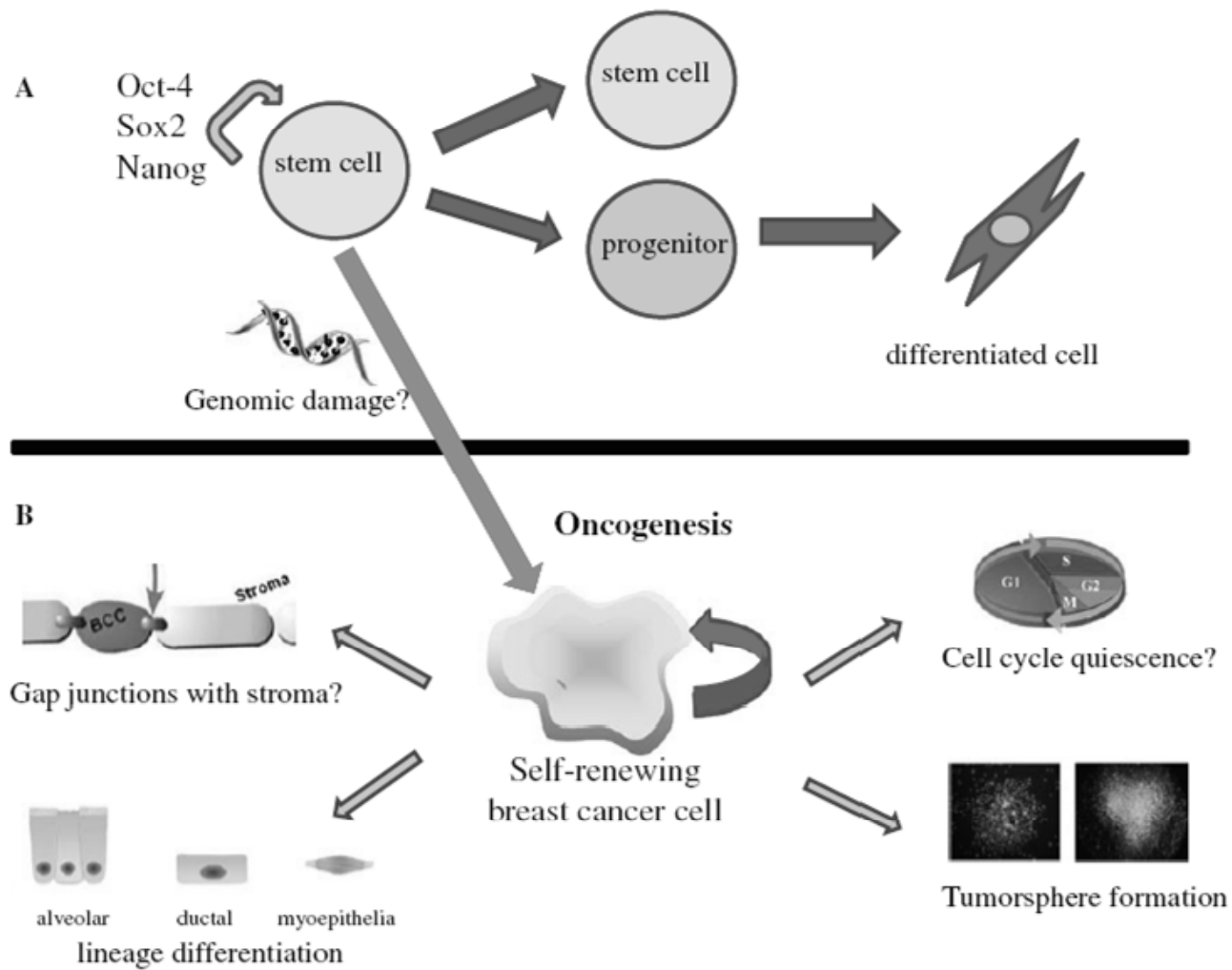
- leukemie
- nádory mozku
- neuroblastom
- nádor prsu
- Wilmsův tumor
-
- hepatoblastom
- karcinom vaječnicků
- karcinom děložního krčku
- retinoblastom

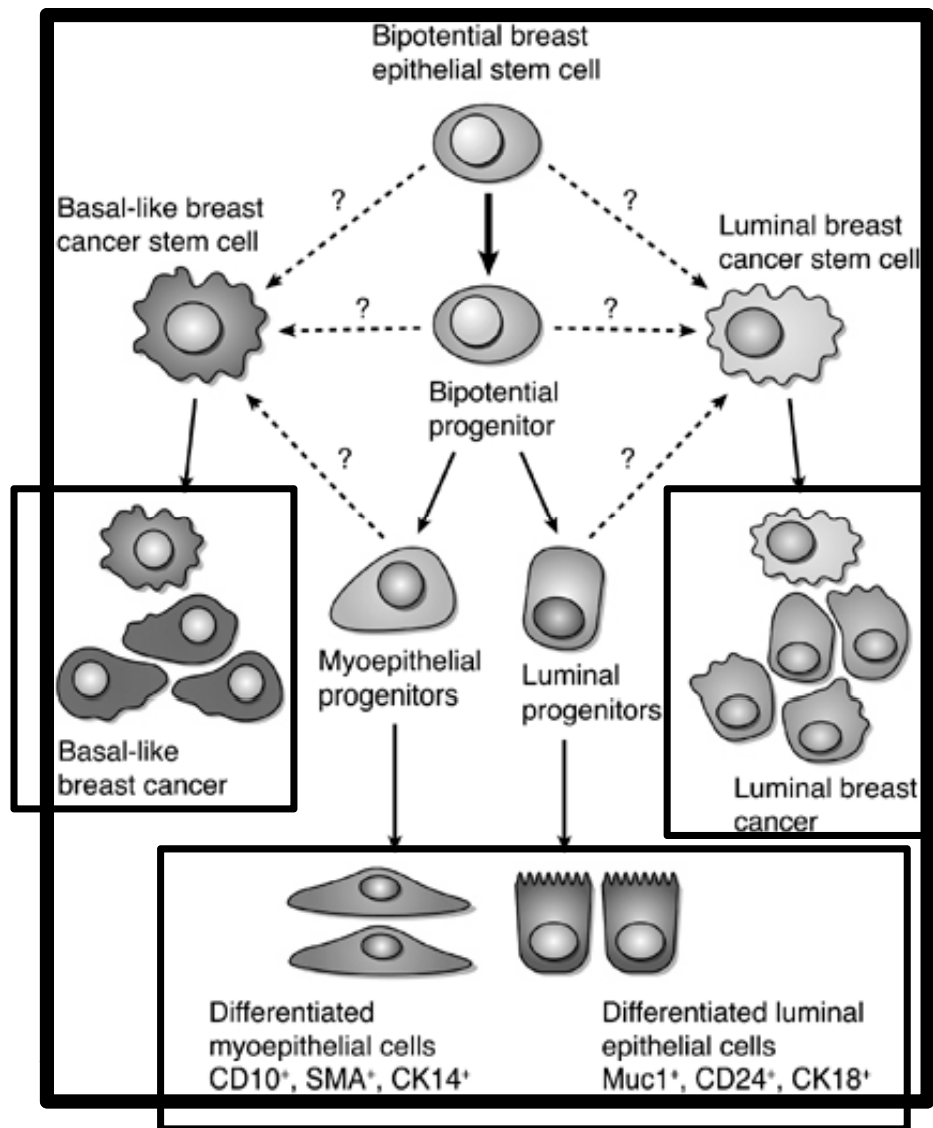
Hypotézy vzniku CSCs:



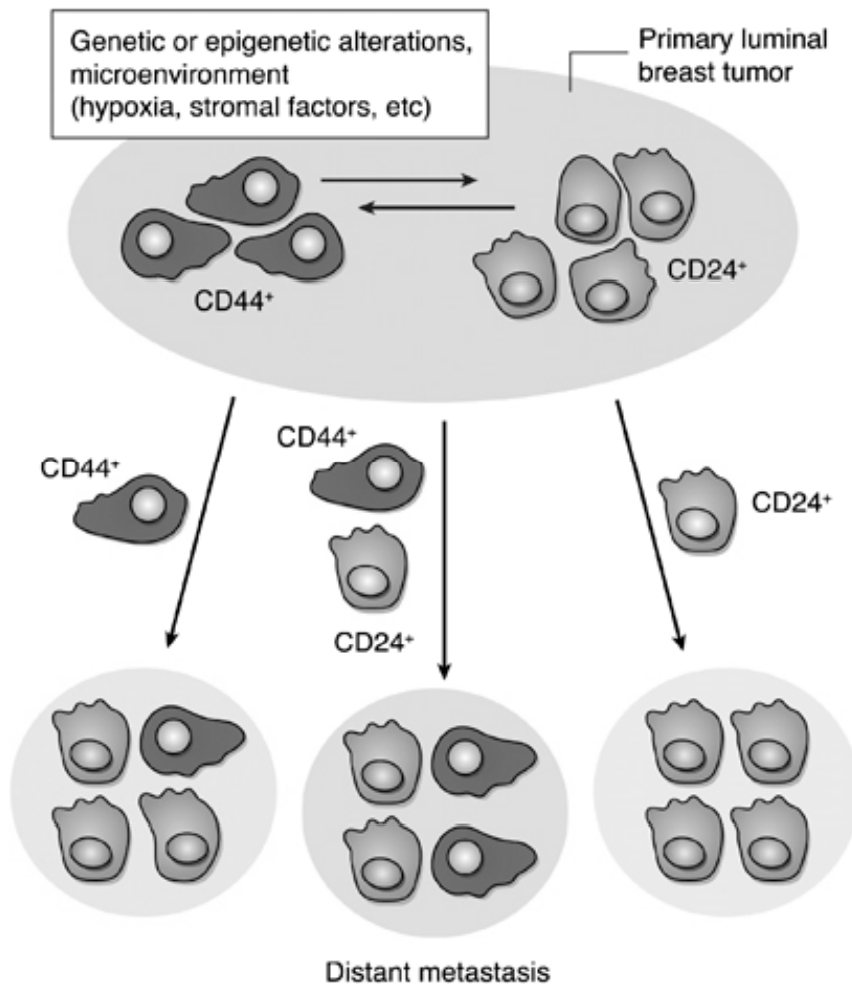
Hypotézy vzniku CSCs:







Vznik nádoru
v důsledku
transformace ASCs:
karcinom prsu



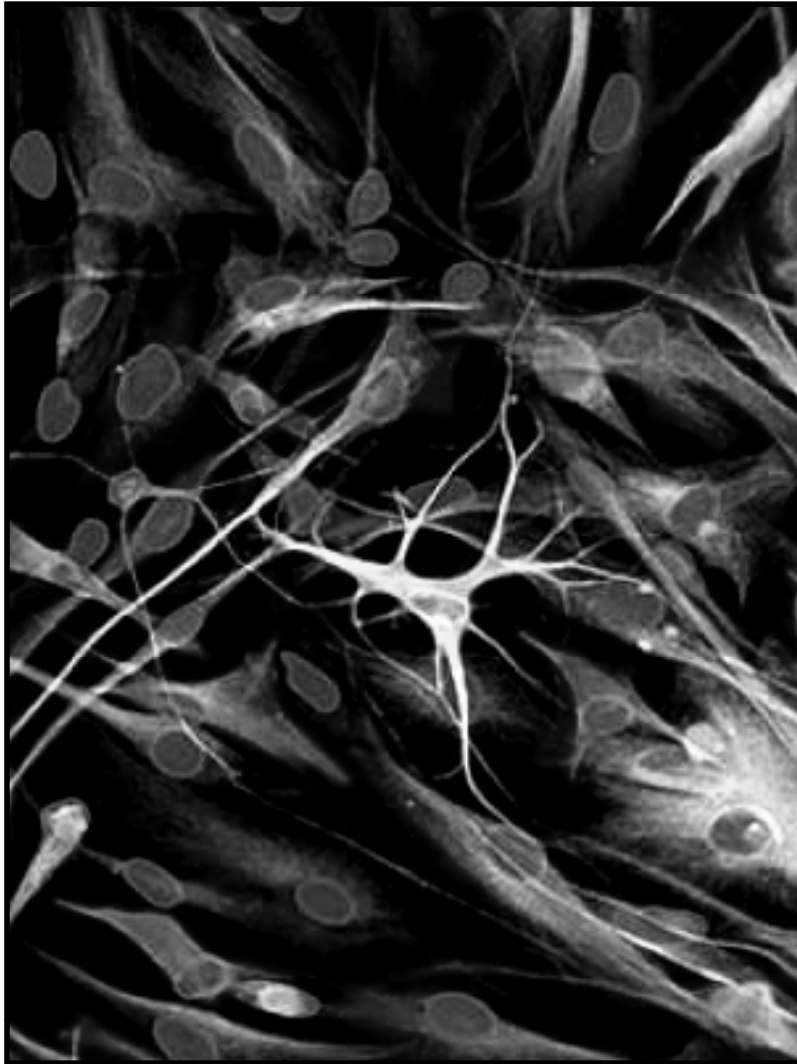
Markery různých typů CSCs:

| Orgán | Markery |
|-------|---------|
| | |
| | |
| | |
| | CD133+ |
| | CD133+ |
| | |
| | CD133+, |
| | CD133+, |

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

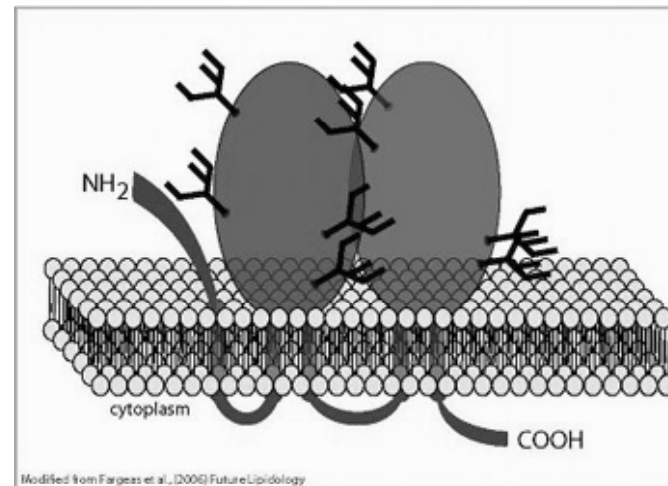
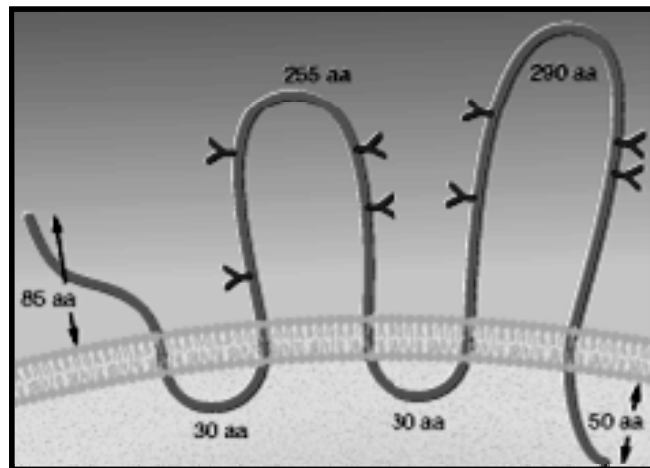
Markery CSCs u nádorů dětského věku:

| 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 | [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)

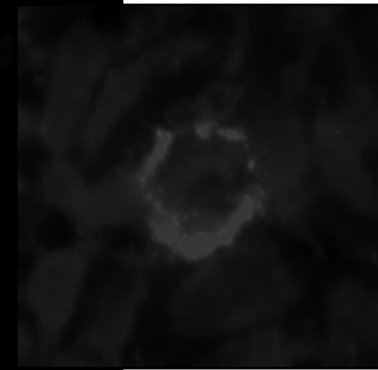
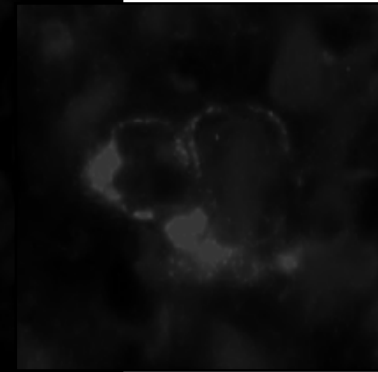
CD133 (Prominin-1)

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





CD133

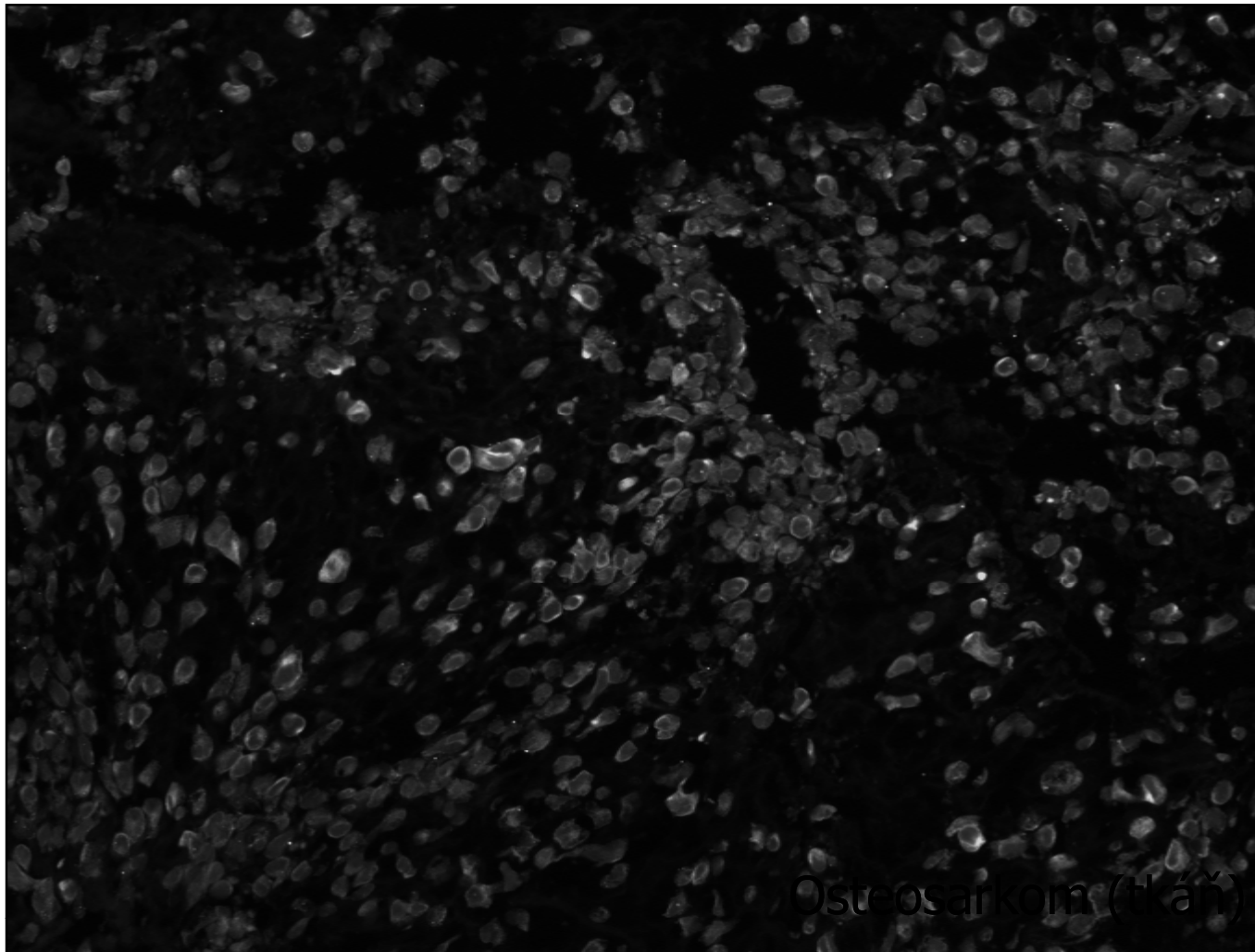




M/15
Nestin

Osteosarkom (tkáň)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 08 / 11.4.2012

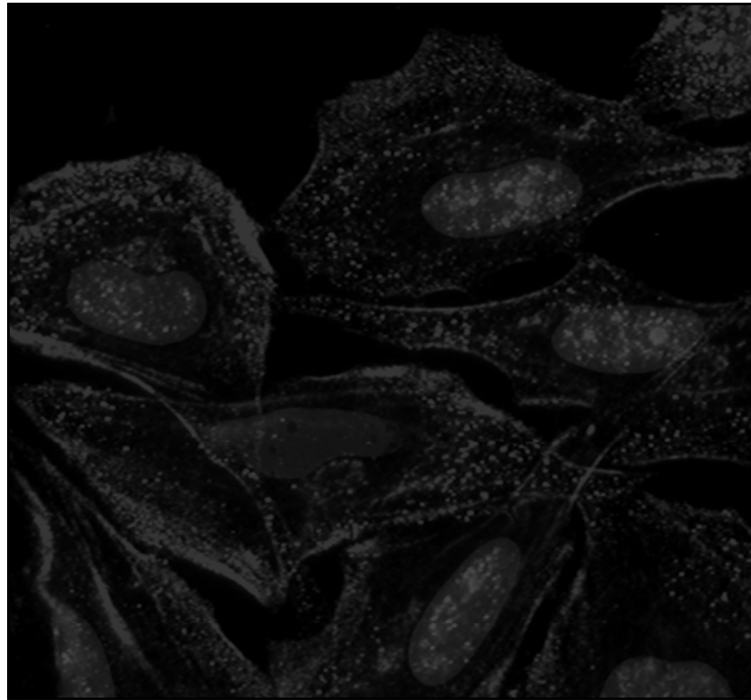


F/14
Nestin

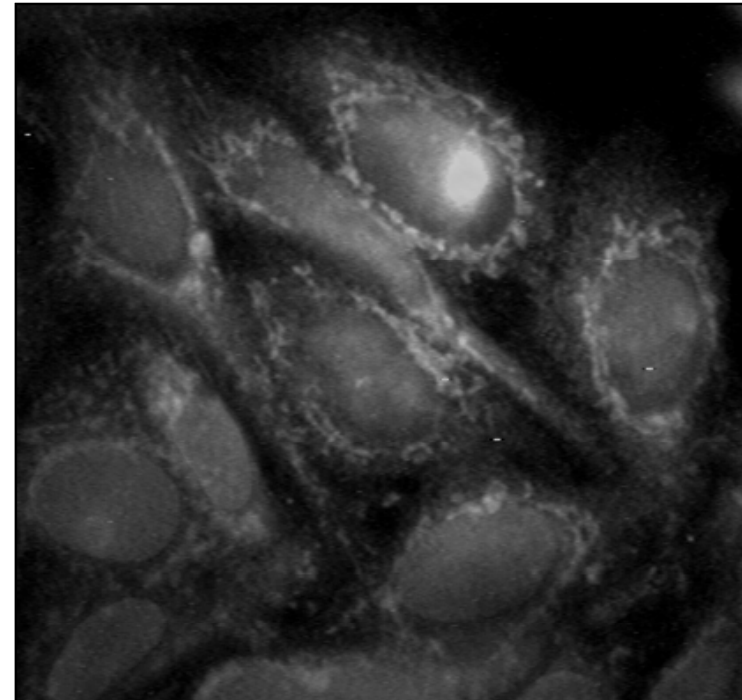
Osteosarkom (tláň)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 08 / 11.4.2012

Buněčná linie Saos-2 (ATCC) – osteosarkom

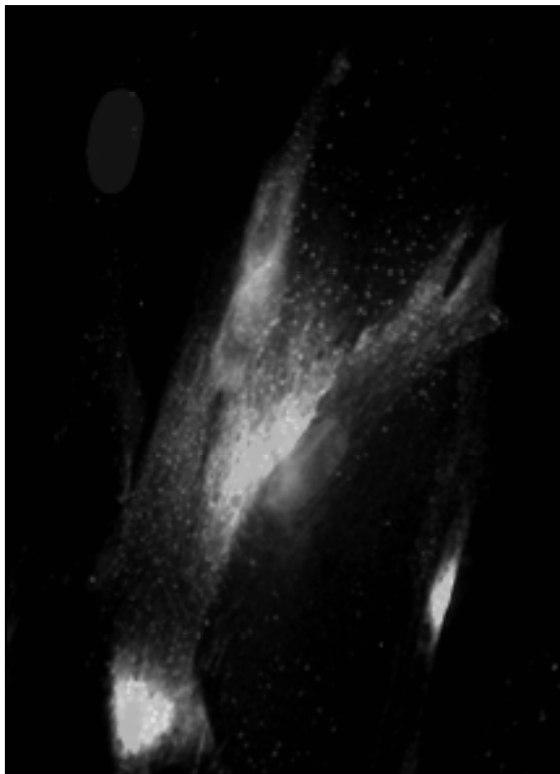


CD133 / DAPI

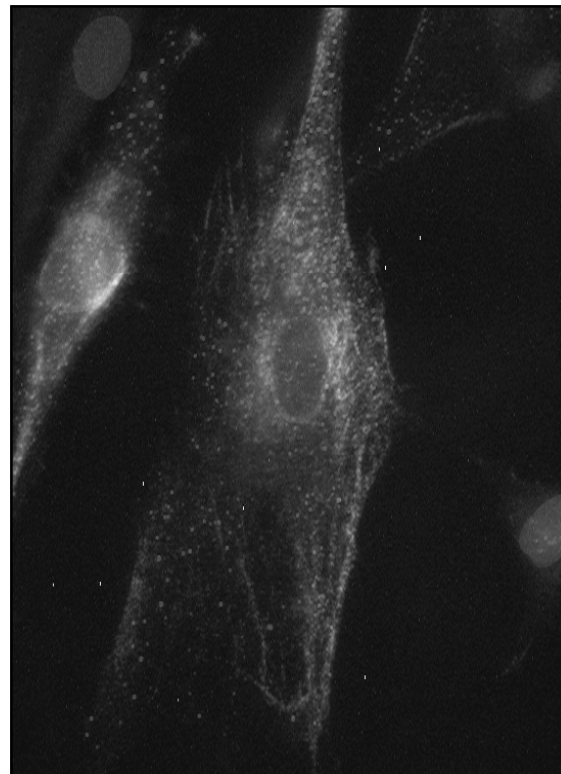


Nestin / DAPI

Identifikace markerů CSCs v sarkomových buněčných liniích



Rhabdomyosarkom

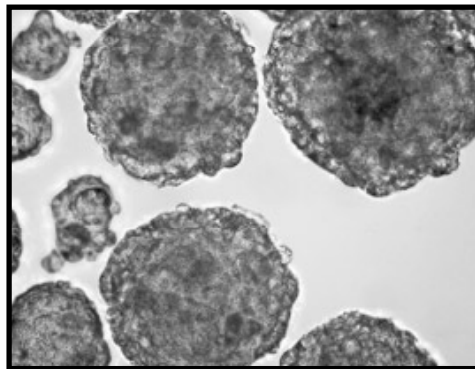


Osteosarkom

CD133
Nestin

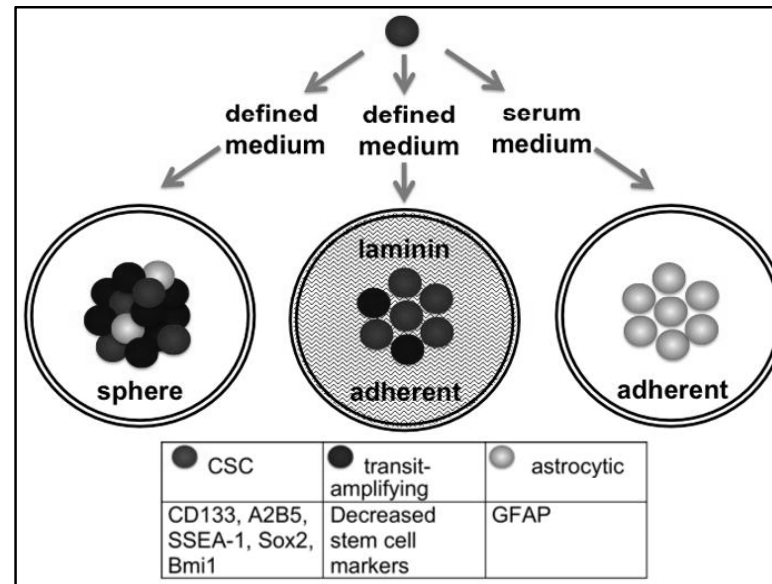
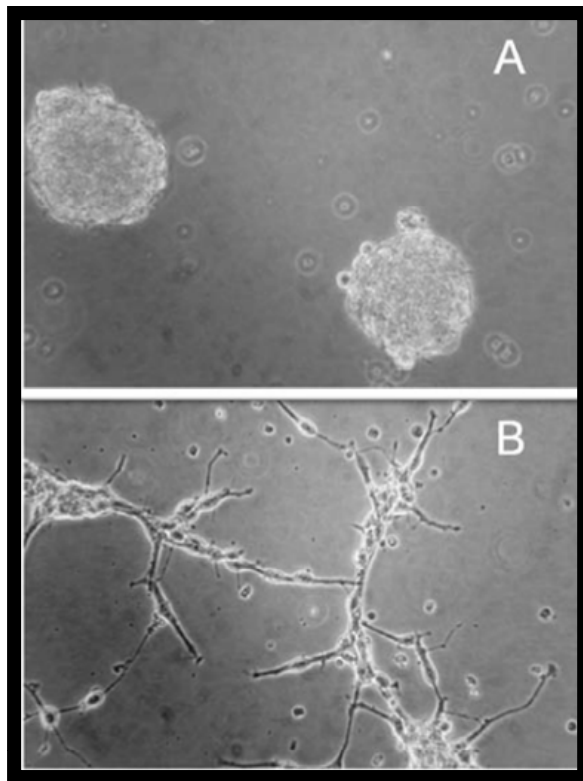
Funkční testy (functional assays) na fenotyp CSCs

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



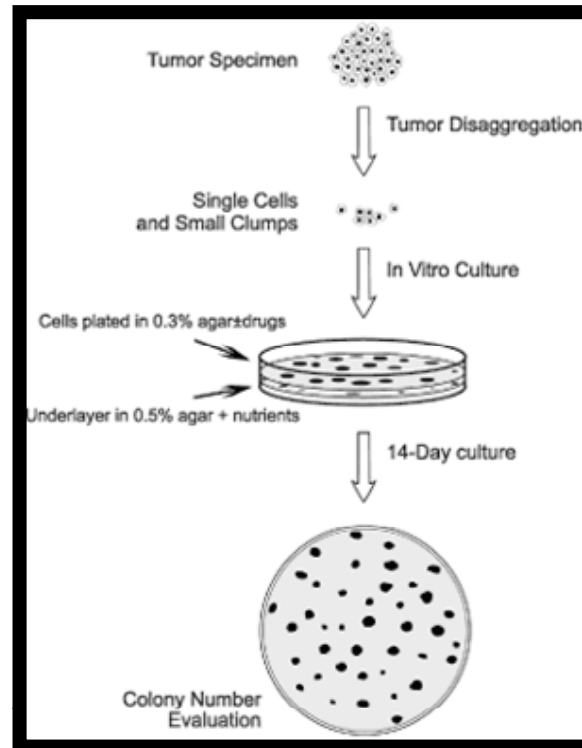
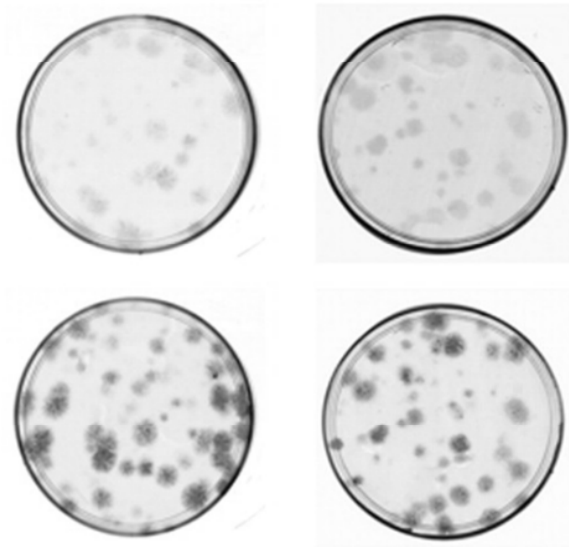
Tvorba sfér (sphere formation assay)

- vytváření suspenzních buněčných agregátů



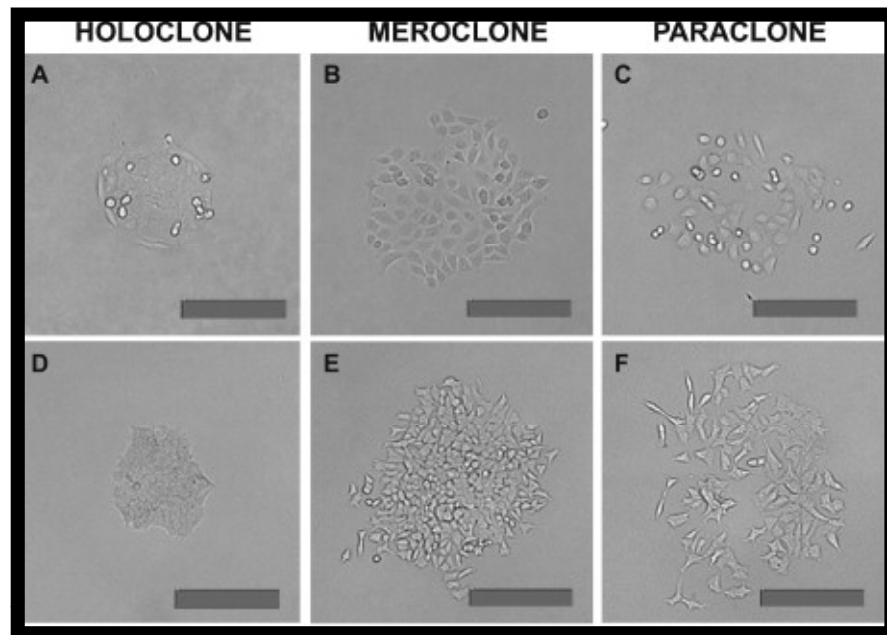
Tvorba kolonií (colony-forming assay)

- vysetí naředěné buněčné suspenze do měkkého agaru → vytváření kolonií



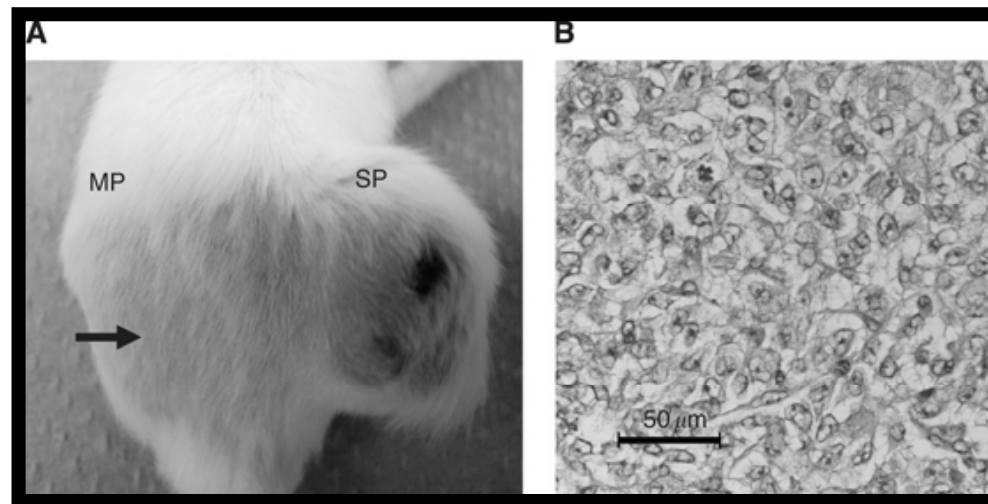
Testy klonogenity (clonogenicity assay)

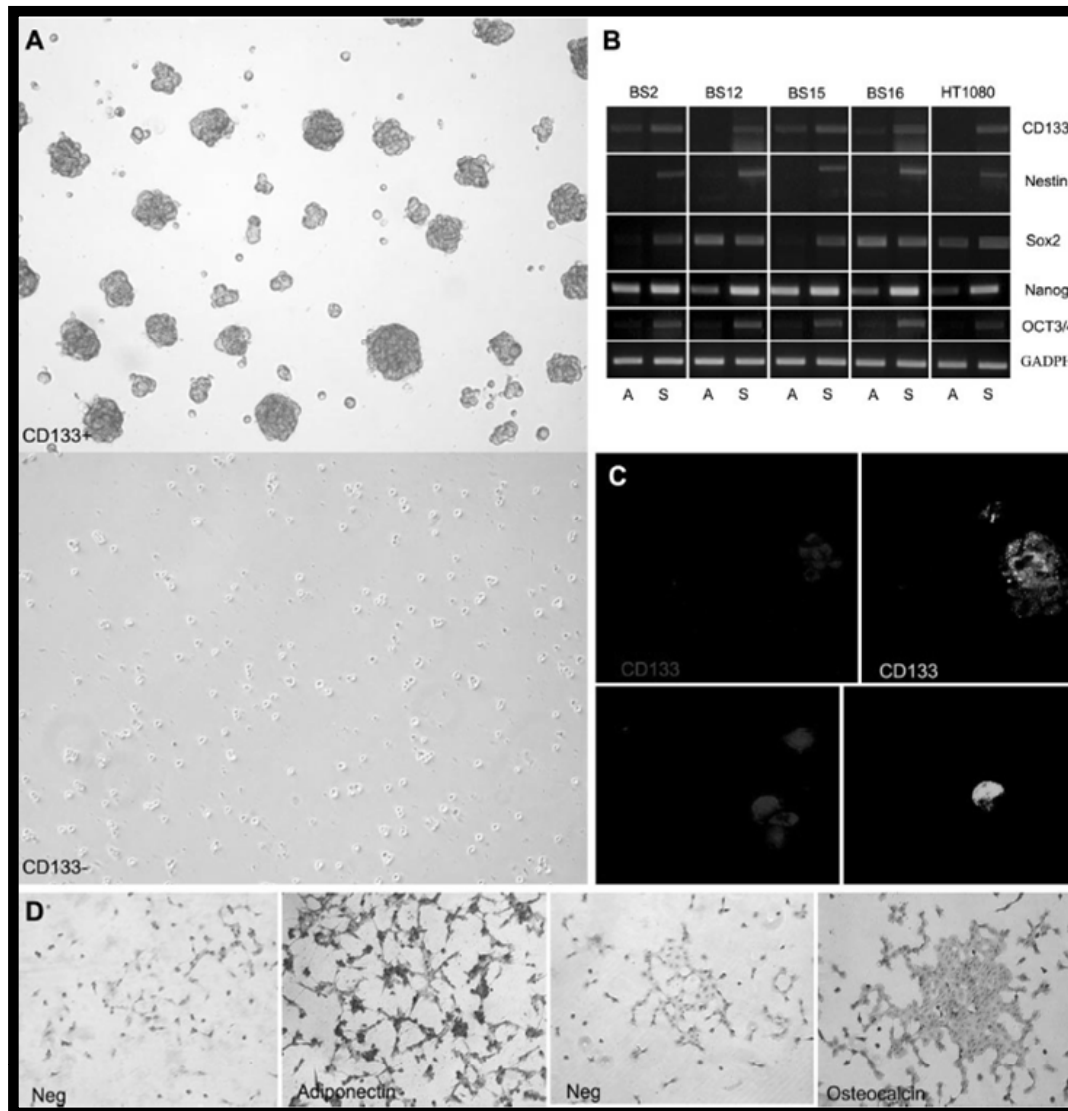
- inokulace izolovaných buněk do 96-jamkových destiček (ředěním nebo pomocí mikropipety)
- proliferace a tvorba kolonií (>50 buněk)



Testy tumorigenicity (tumorigenicity assay)

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

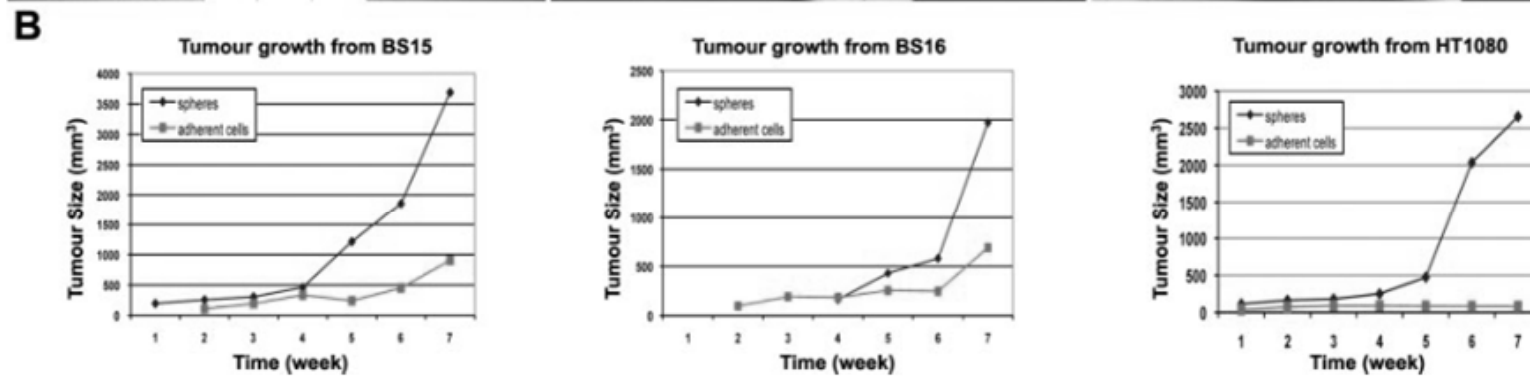
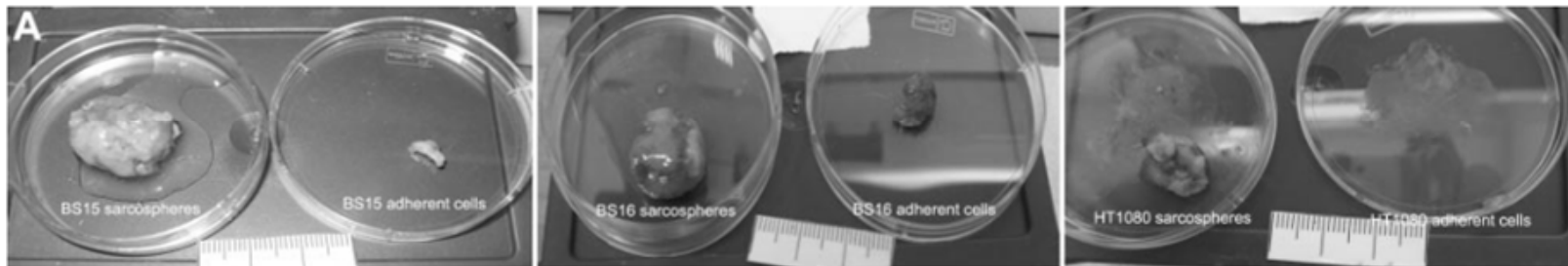




Příklad komplexní analýzy CSCs *in vitro* (osteosarkom)

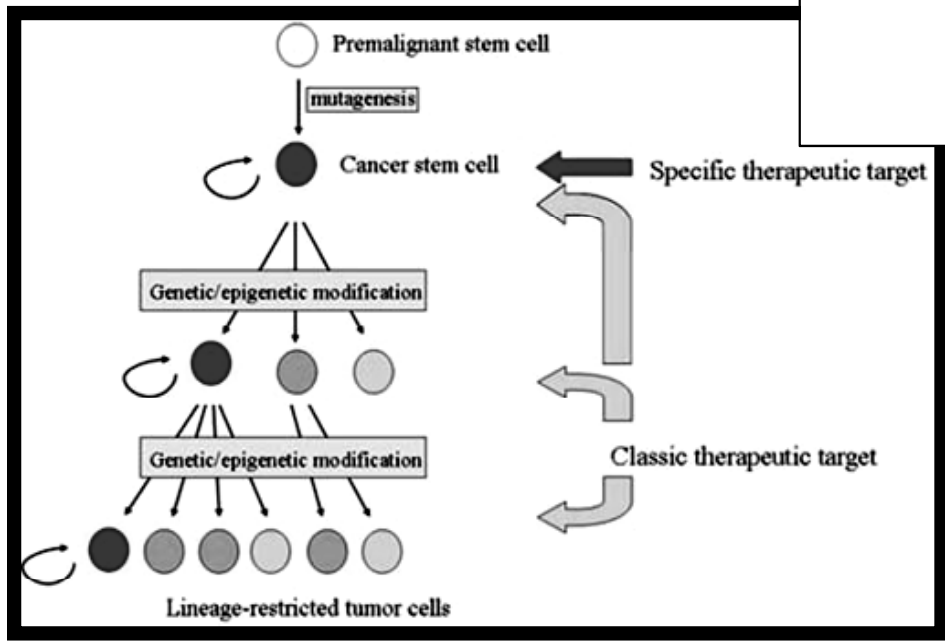
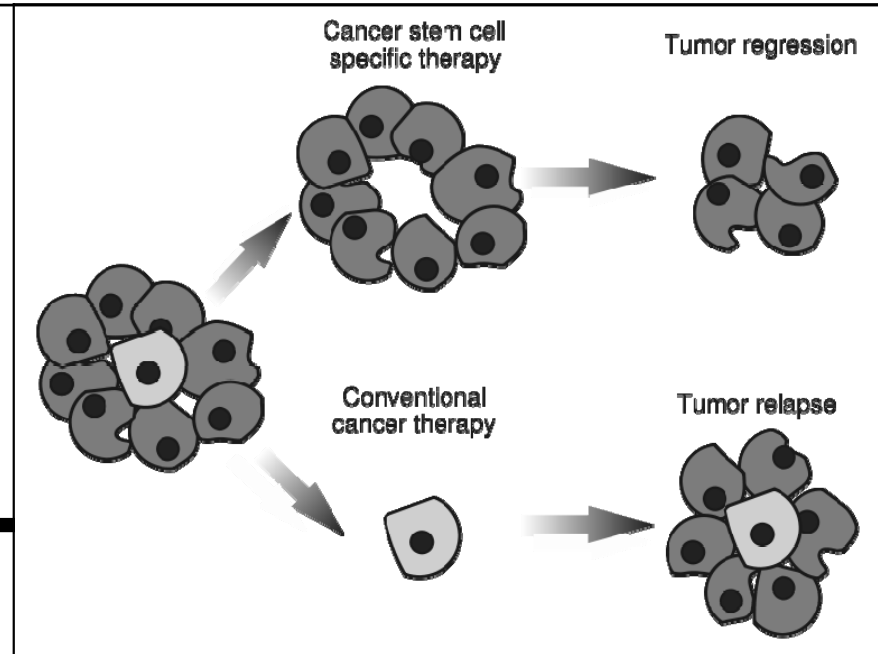
(Tirino et al., FASEB J, 2011)

Příklad komplexní analýzy CSCs *in vitro* (osteosarkom)

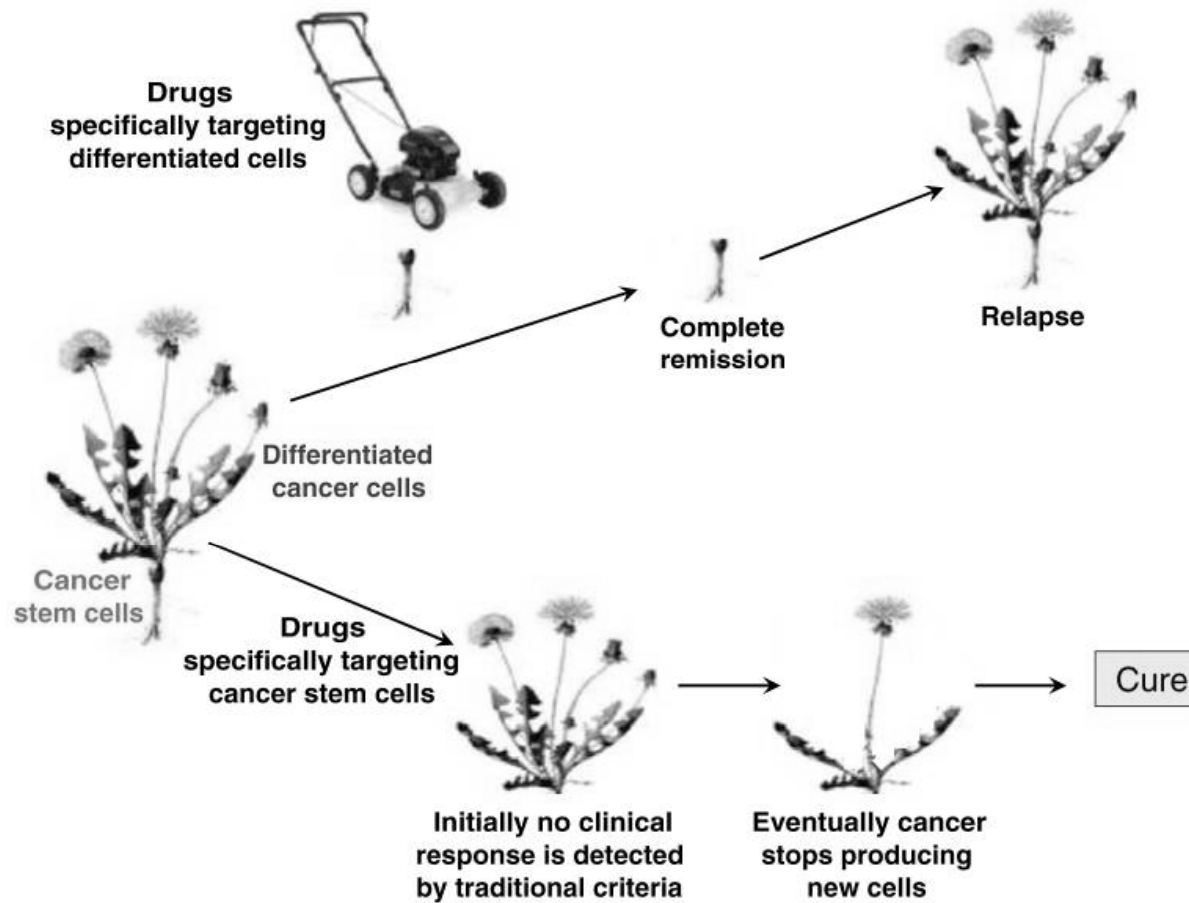


(Tirino et al., FASEB J, 2011)

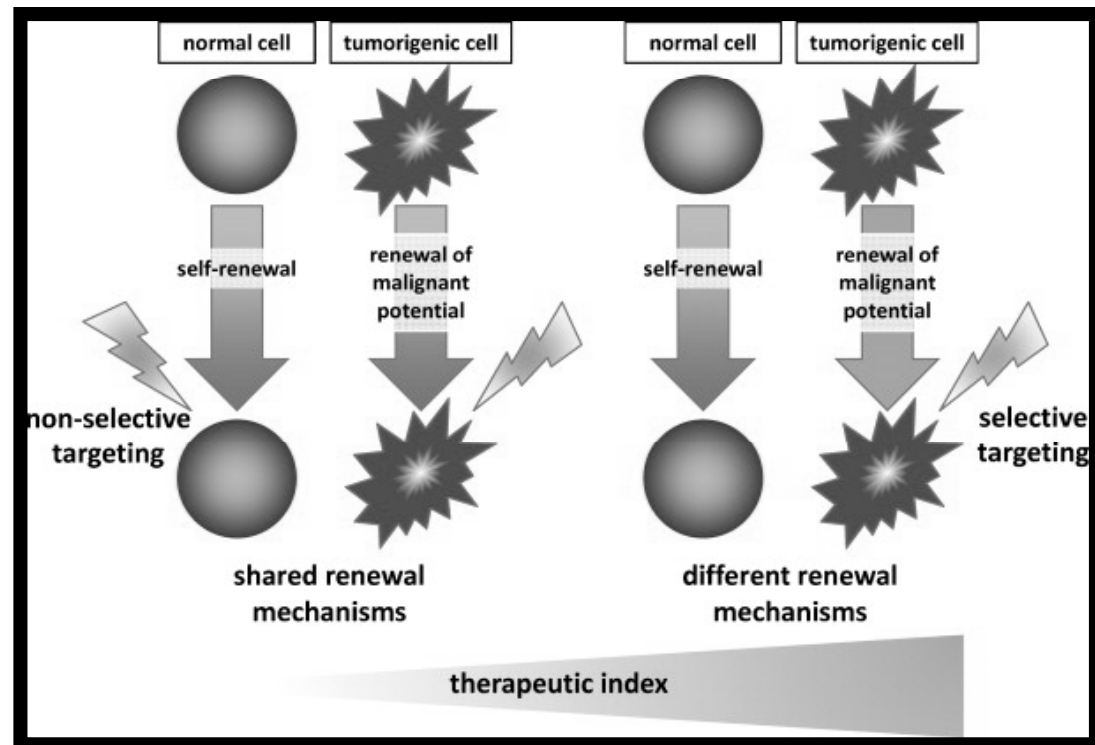
Hypotéza CSCs: Důsledky pro protinádorovou léčbu



Konvenční vs. cílená protinádorová léčba:



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

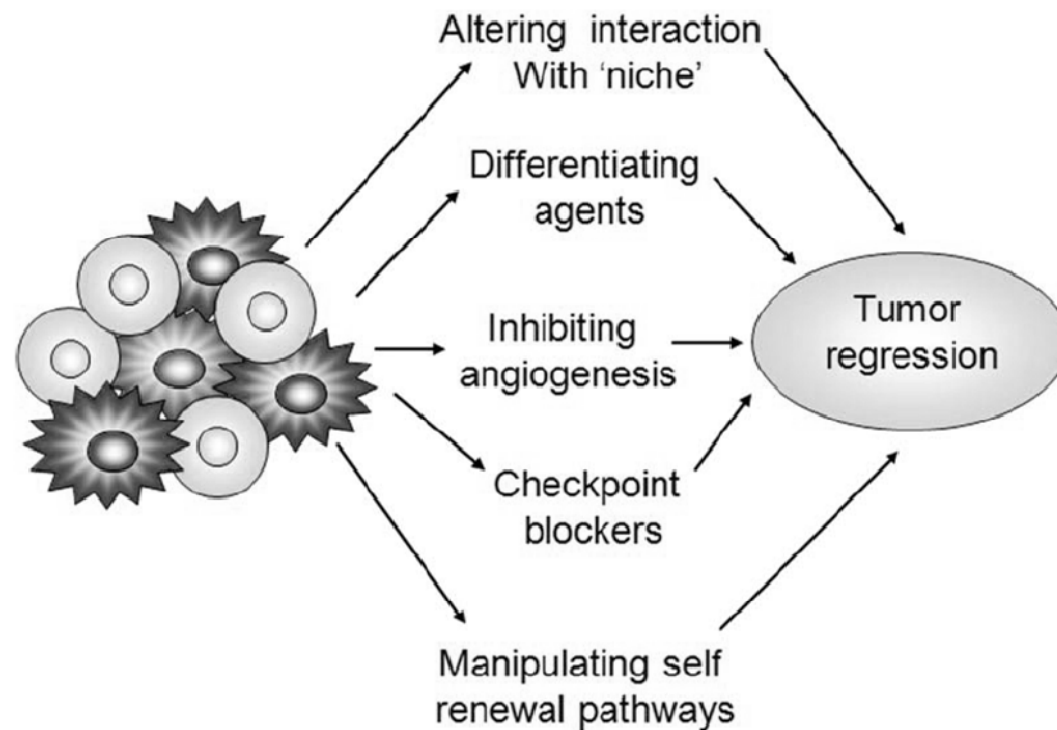


Problém cílené terapie: chemorezistence a radiorezistence CSCs

| Chemoresistance Mechanism | Tumor Type | Ref. |
|--|---|-------------|
| 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] |
| Radioreistance Mechanism | | |
| 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

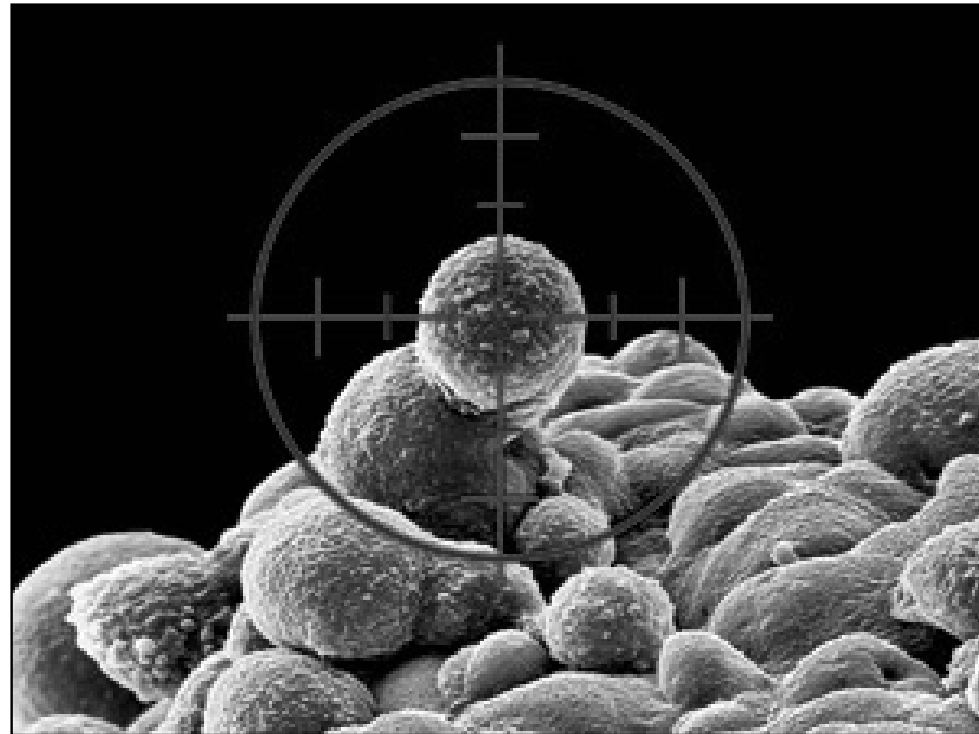


Terapie cílená proti CSCs: Příklady konkrétních strategií u vybraných typů nádorů

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)



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 08 / 11.4.2012