

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 17.4.2013

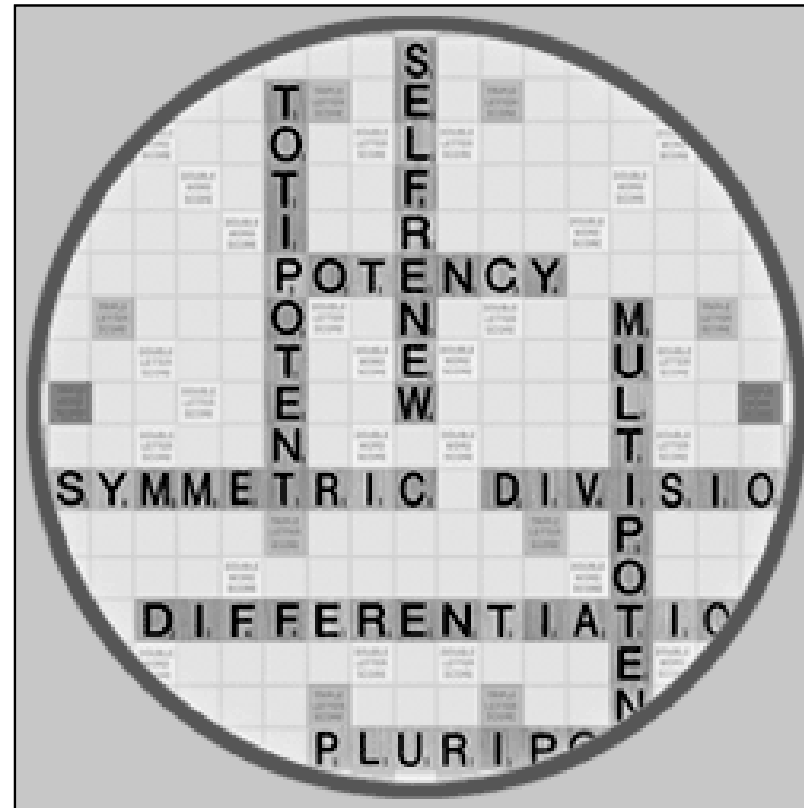
# Adultní a nádorové kmenové buňky

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 / 09 / 17.4.2013

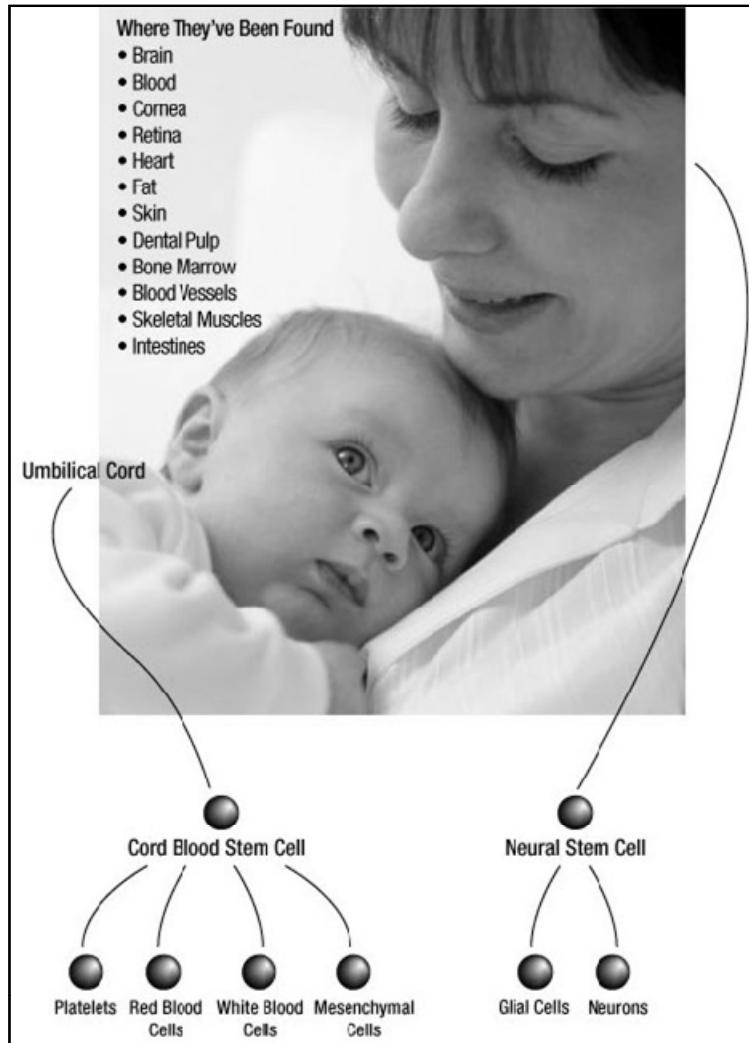
## Program přednášky:

- Adultní kmenové buňky (ASCs)  
biologické vlastnosti a diferenciační potenciál  
transdiferenciace, EMT  
mikroprostředí (niche) ASCs  
využití ASCs pro buněčné terapie → 24.4.2013
- Nádorové kmenové buňky (CSCs)  
biologické vlastnosti a hypotézy vzniku CSCs  
markery CSCs  
možnosti cílené protinádorové terapie

# ADULTNÍ KMENOVÉ BUŇKY (ADULT STEM CELLS, ASCs)

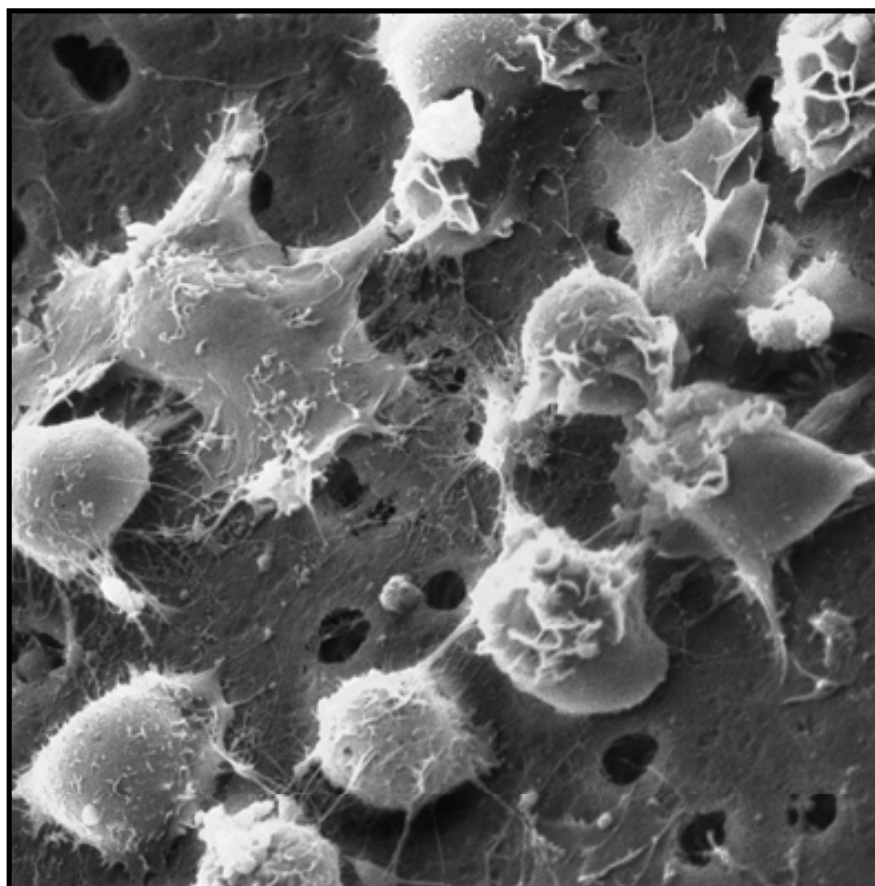
---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013



## Typy ASCs:

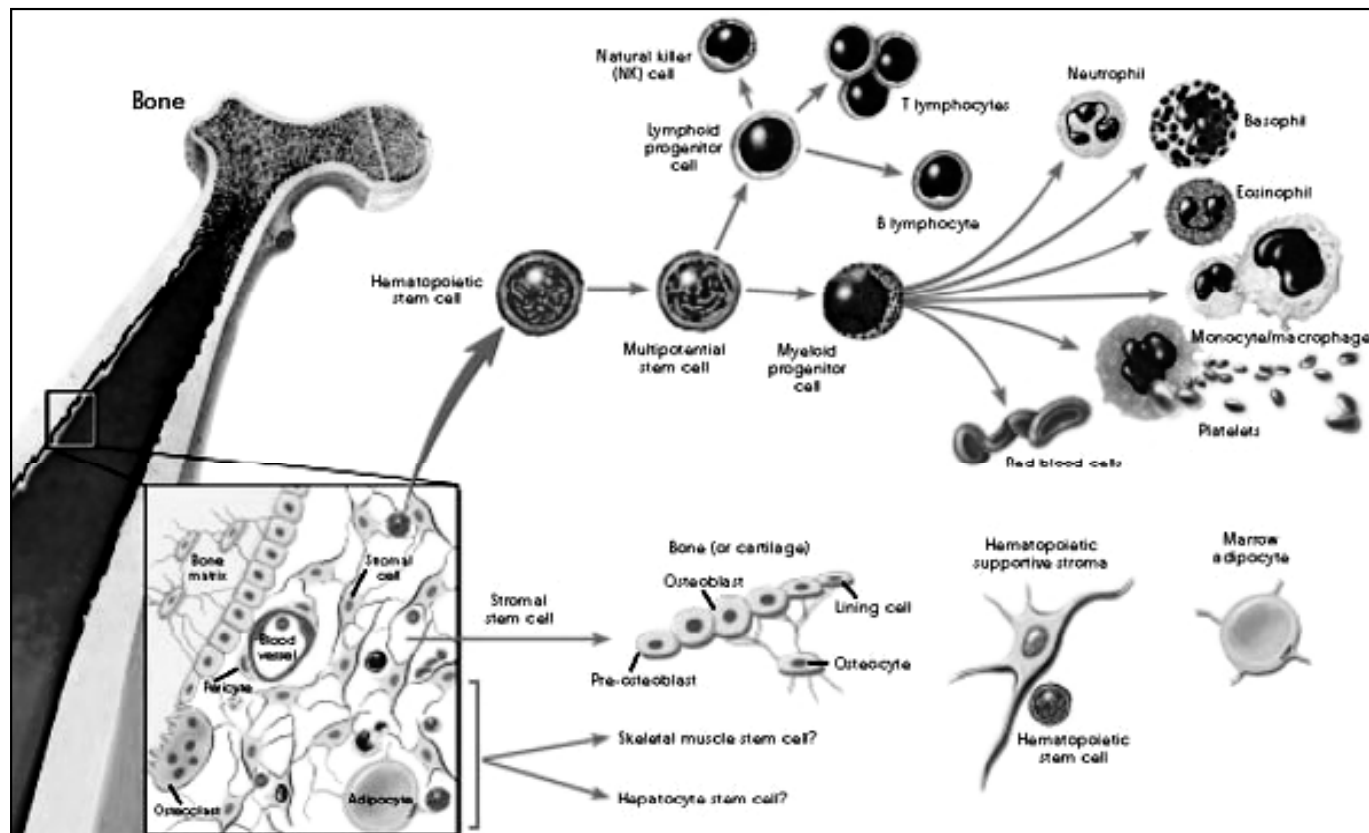
- mozek
- krev
- rohovka
- sítnice
- srdce
- tuková tkáň
- kůže
- dřeň zubu
- kostní dřeň
- cévy
- kosterní svalstvo
- střeva
- pupečnicková krev



Lidské SCs kostní dřeně

---

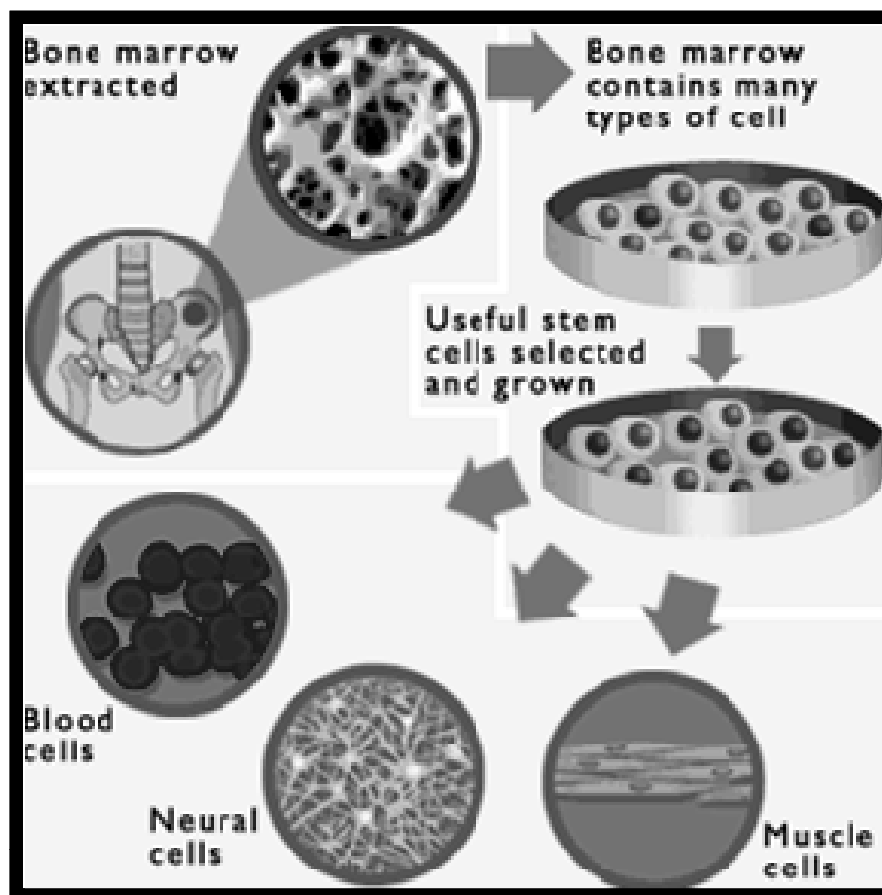
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013



## Diferenciační potenciál hematopoetických a stromálních SCs

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013

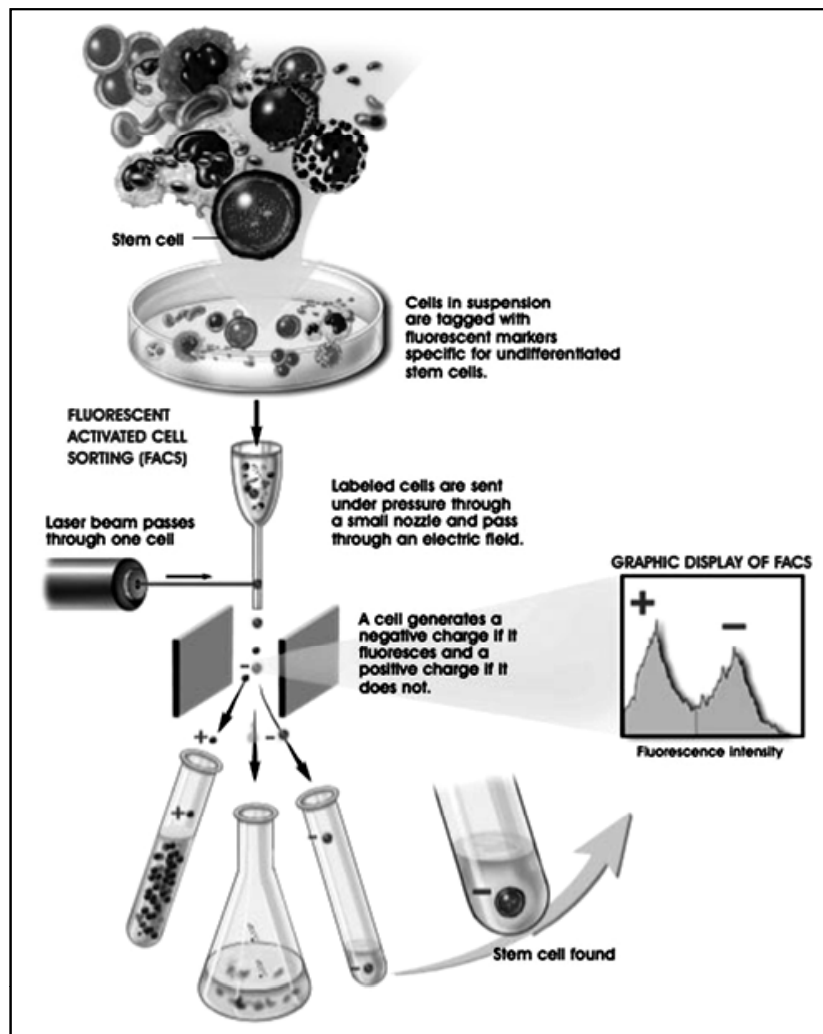
## Plasticita hematopoetických SCs



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013



## Izolace hematopoetických SCs pomocí FACS



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013

## Transdiferenciace

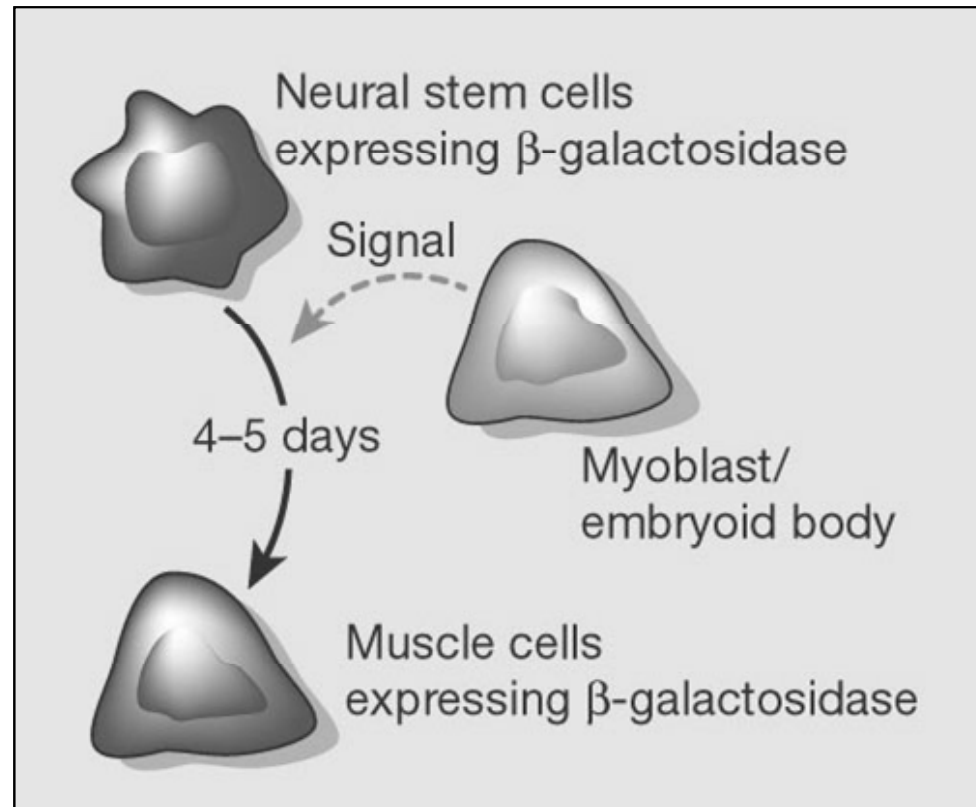
= schopnost buněk diferencovat do fenotypu charakteristického pro jiný typ tkáně nebo orgánu, než byla tkáň původní

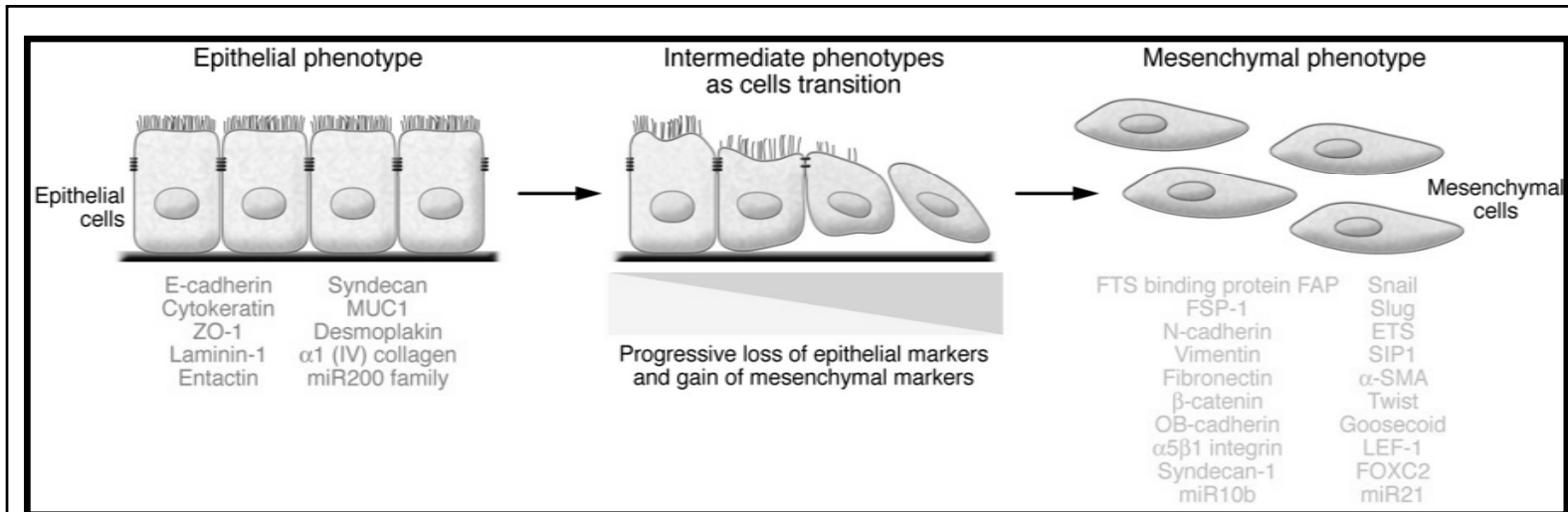
- hematopoetické SCs → kardiomyocyty, hepatocyty

### *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

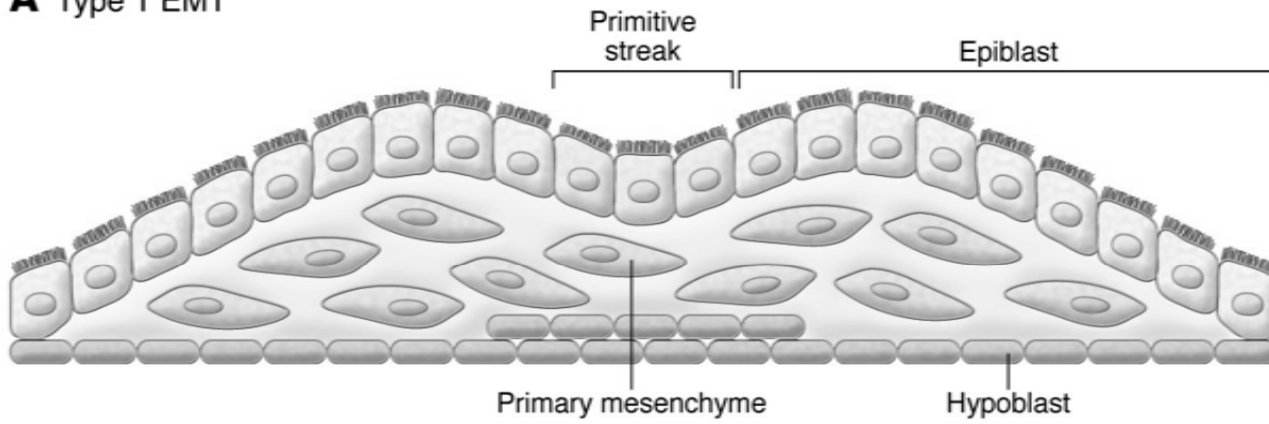




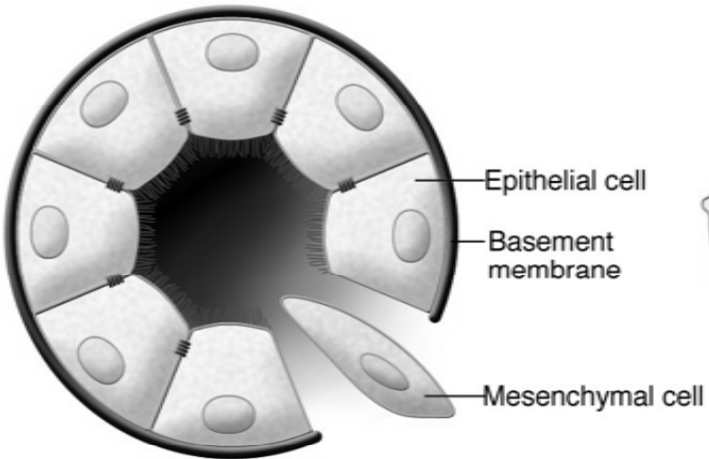
## Epiteliálně mezenchymální tranzice (EMT)

= 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)

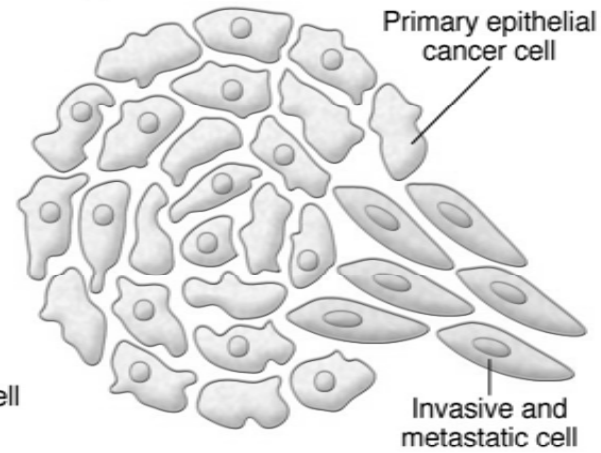
**A** Type 1 EMT



**B** Type 2 EMT

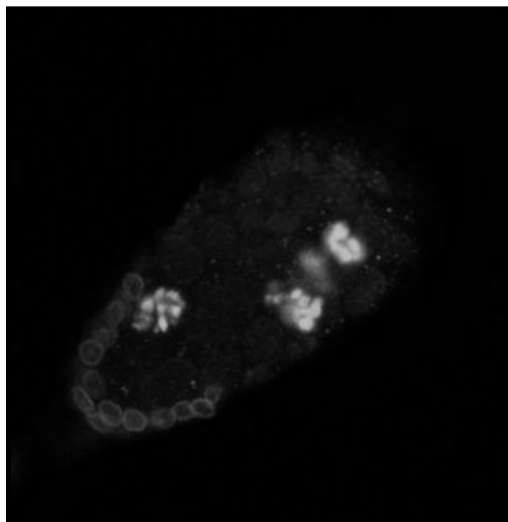


**C** Type 3 EMT



## "Niche" (hnízd) SCs

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



buňky tvořící niche  
SCs (mitóza)

# NÁDOROVÉ KMENOVÉ BUŇKY (CANCER STEM CELLS, CSCs)

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013





## Nádorové kmenové buňky (Cancer SCs, CSCs)

- prokázány u hematologických malignit i různých typů solidních nádorů

### Vlastnosti

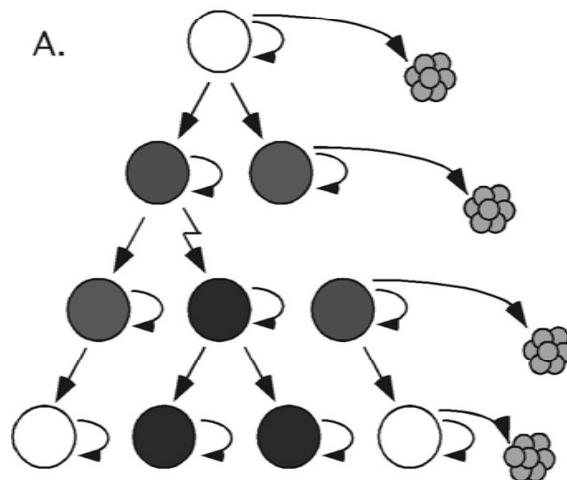
- proliferační a diferenciační potenciál
- schopnost self-renewal
- metastatický potenciál
- sekrece růstových faktorů, cytokinů
- vysoká telomerázová aktivita
- specifické markery (CD133...)
- specifické signální dráhy (Wnt, Notch, Hedgehog)
- rezistence vůči apoptóze



 <p><b>CANCER STEM CELLS</b> <i>Redefining the Paradigm of Cancer Treatment Strategies</i></p>	<p style="text-align: right;">COMMENTARY</p> <p><b>Cancer Stem Cells: Are We Missing the Target?</b></p> <p><i>Richard J. Jones, William H. Matsui, B. Douglas Smith</i></p>
	<p>Journal of Pathology J Pathol 2006; 209: 287–297 Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/path.2016</p> <p style="text-align: right;"></p> <p><b>Review Article</b></p> <p><b>Stem cells and cancer: an intimate relationship</b></p> <p>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>ICM, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, London E1 2AT, UK</p>
<p>Available online at <a href="http://www.sciencedirect.com">www.sciencedirect.com</a></p> <p> <b>ScienceDirect</b></p> <p>Biochemical and Biophysical Research Communications 355 (2007) 855–859</p> <p> <b>ELSEVIER</b></p> <p style="text-align: center;">Mini review</p> <p style="text-align: center;"><b>Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: What's in the name?</b></p> <p style="text-align: center;">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></p>	<p style="text-align: right;"><i>Review article</i></p> <p><b>POLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA</b> Vol 42, No. 4, 2005 pp. 175-181</p> <p><b>Cancer stem cells - normal stem cells "Jedi" that went over to the "dark side"</b></p> <p>Mariusz Z. Ratajczak</p> <p>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</p>
<p style="text-align: center;"><b>BBRC</b></p> <p style="text-align: center;"><a href="http://www.elsevier.com/locate/ybbrc">www.elsevier.com/locate/ybbrc</a></p>	

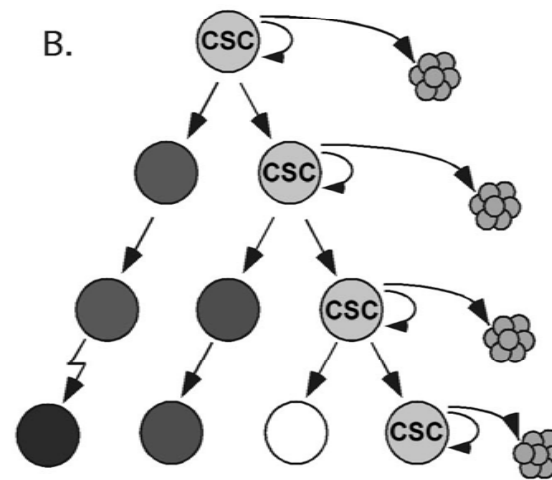
# Důsledek: zásadní změna pohledu na biologii nádorů

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

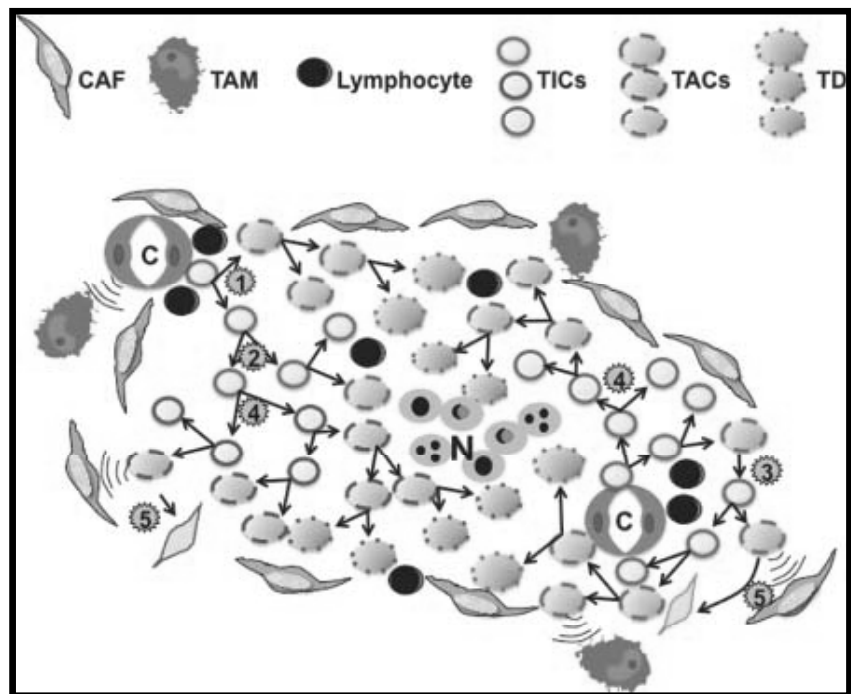
## Heterogenní prostředí solidního nádoru

C = kapilára

N = nekróza

TAM

= tumor-associated  
macrophages

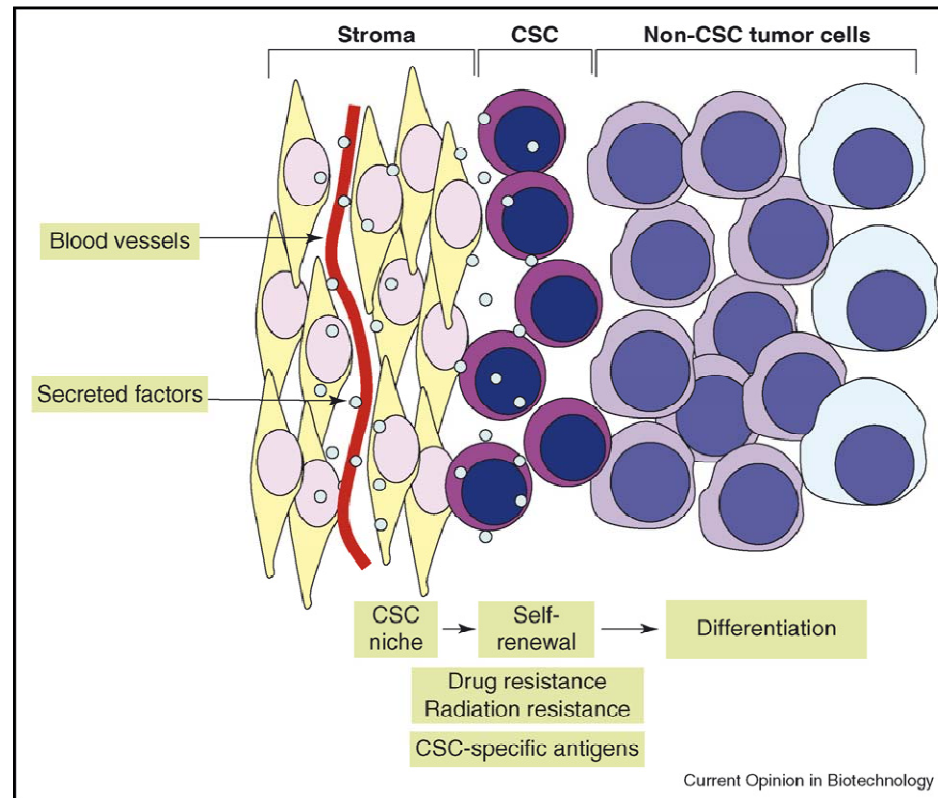


TICs = tumor initiating cells (= CSCs)

TACs = transiently amplifying cells

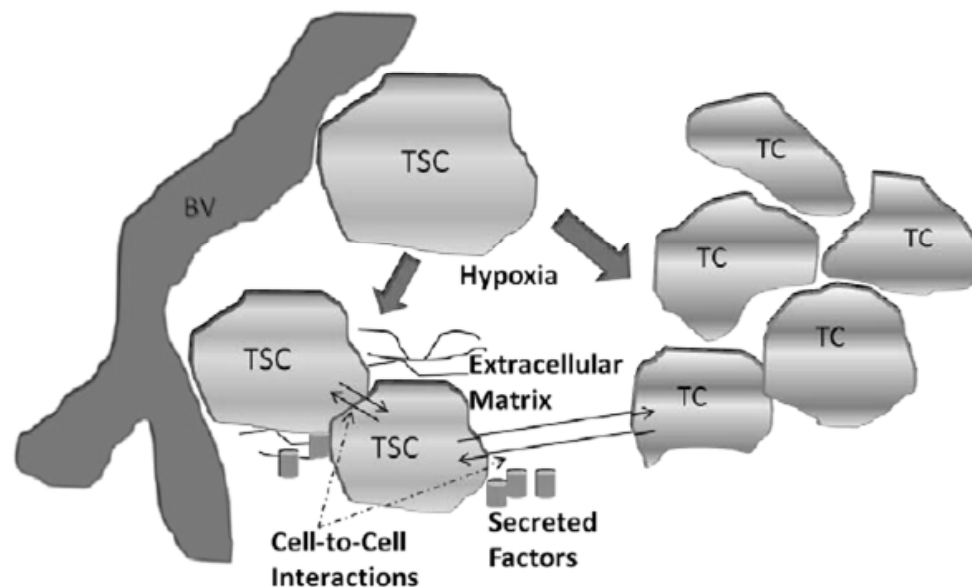
TD = terminally differentiated cells

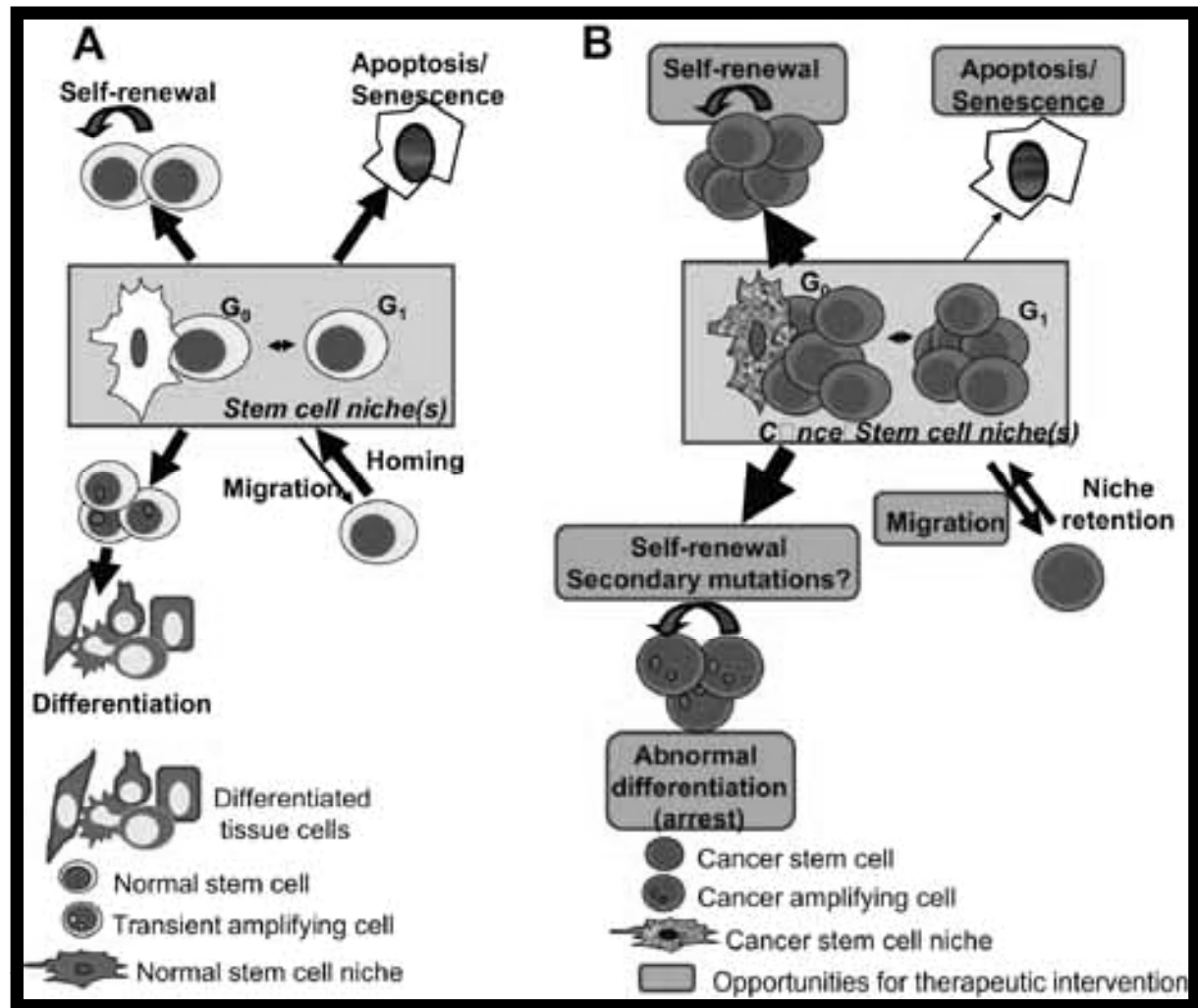
# Mikroprostředí (niche) CSCs v solidních nádorech



## Komponenty mikroprostředí v solidních nádorech

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



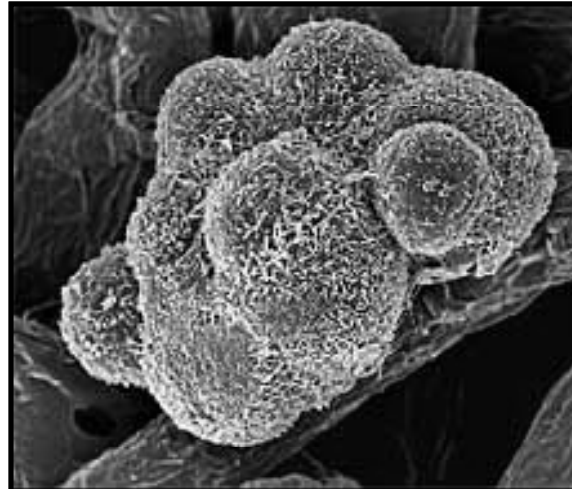


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013

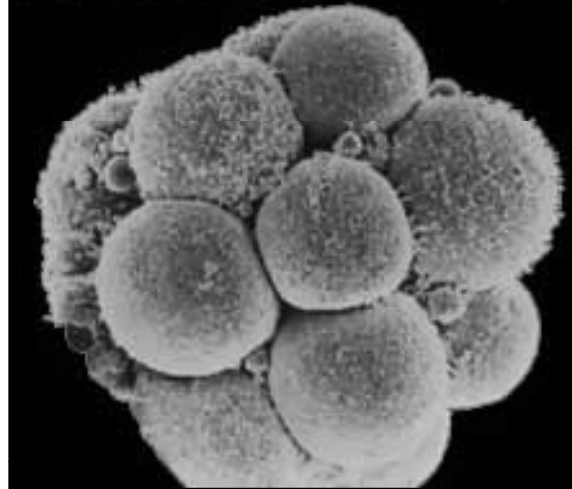
## Hypotézy vzniku CSCs

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

Nádor jako "onemocnění kmenových buněk"?



lidské CSCs



lidské ESCs



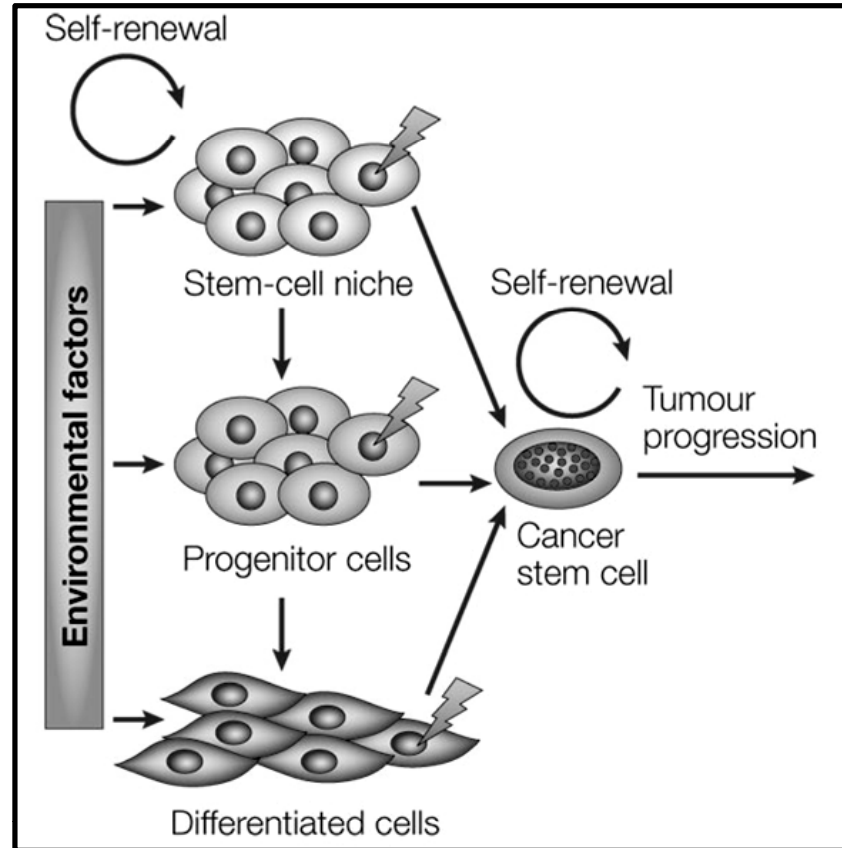
### SCs normální tkáně:

- 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:

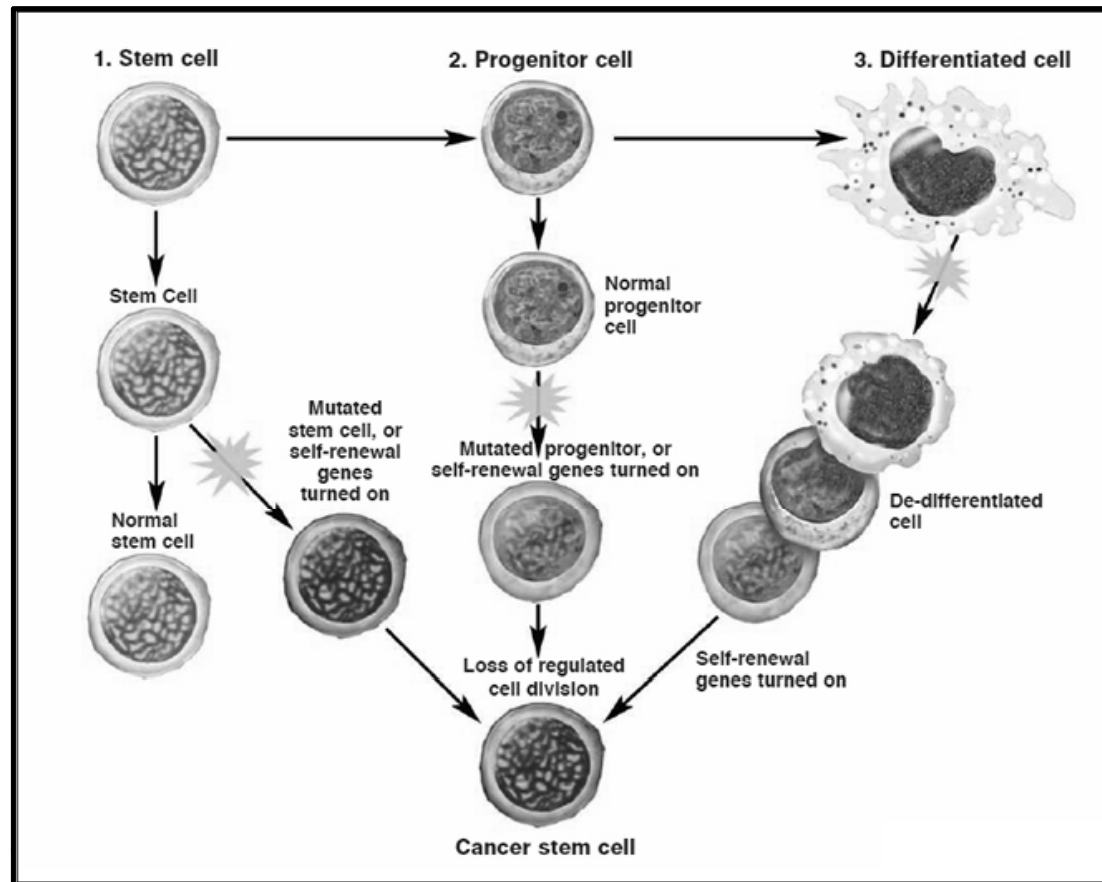
- leukemie
- nádory mozku
- neuroblastom
- nádor prsu
- Wilmsův tumor
- hepatoblastom
- karcinom vaječníků
- karcinom děložního krčku
- retinoblastom

## Hypotézy vzniku CSCs:

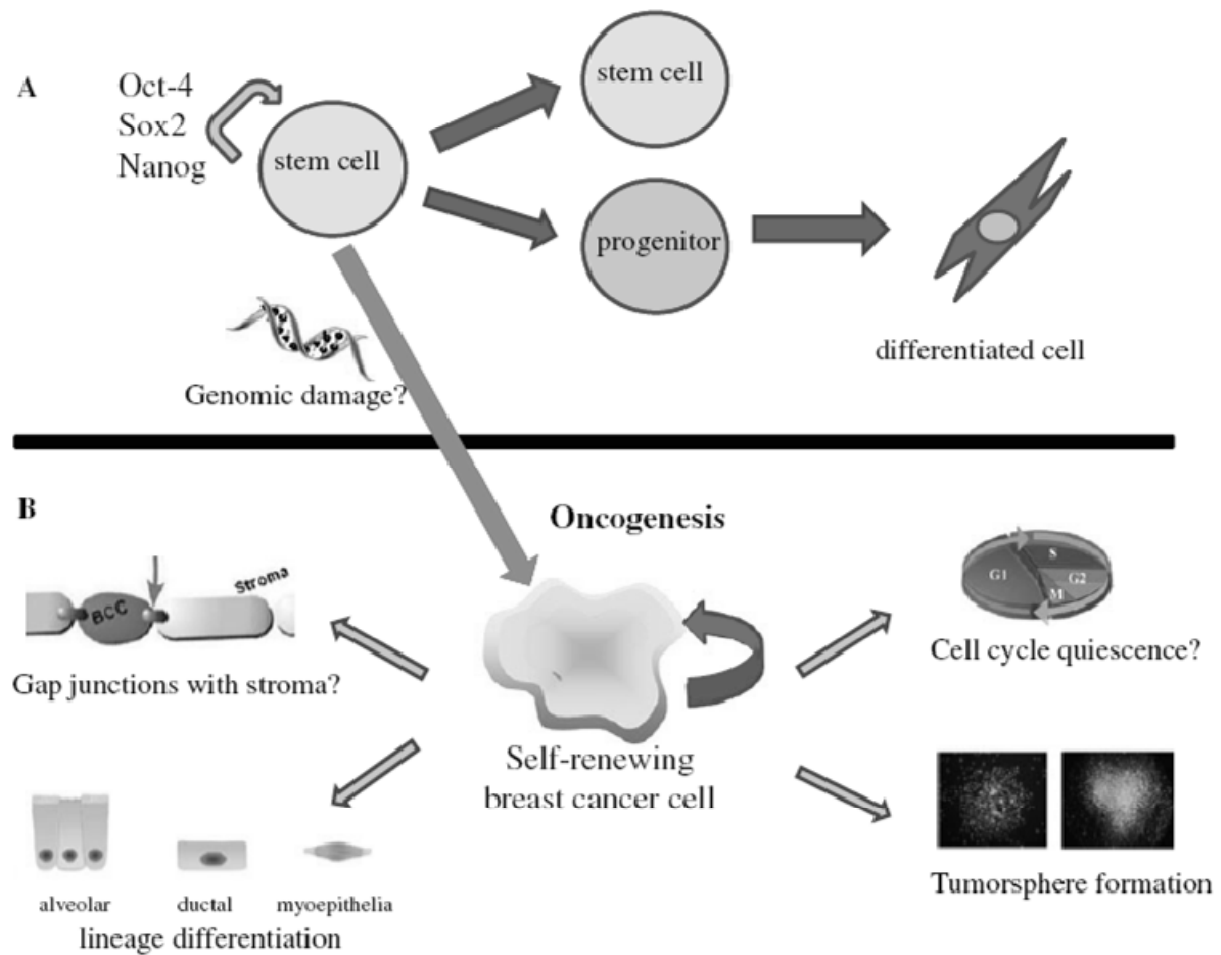


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013

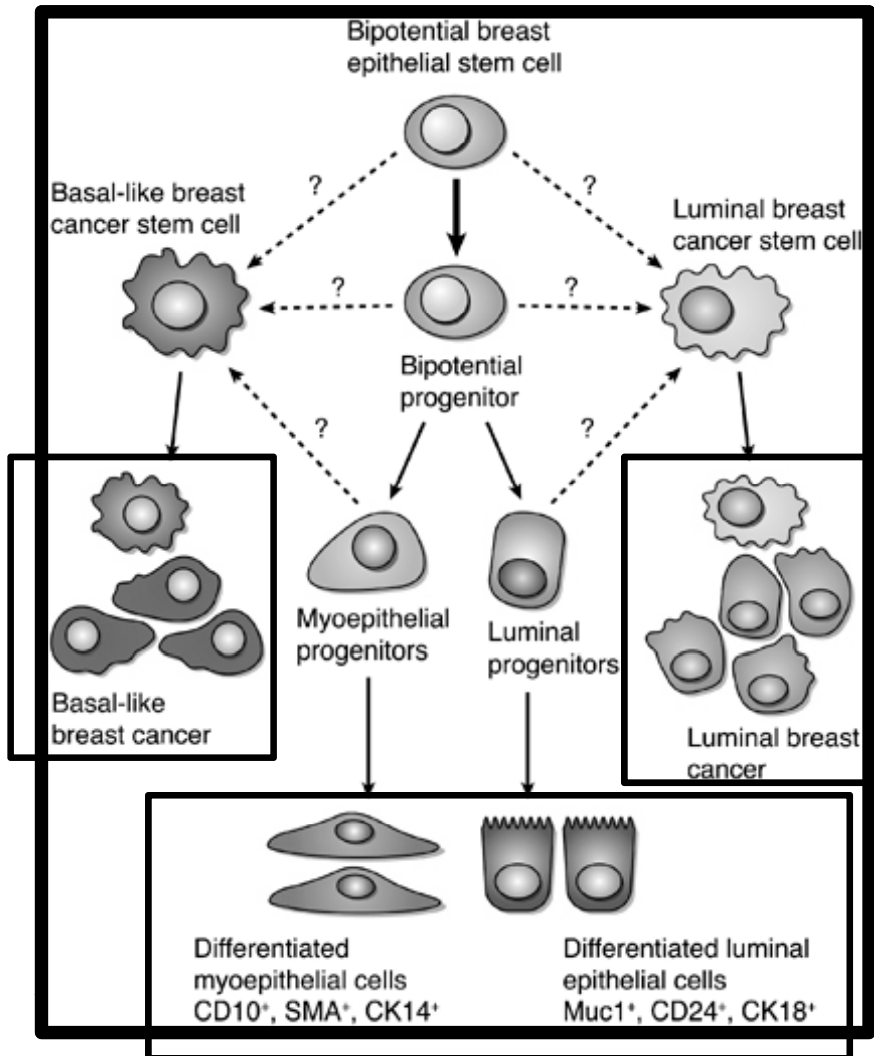
## Hypotézy vzniku CSCs:



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013

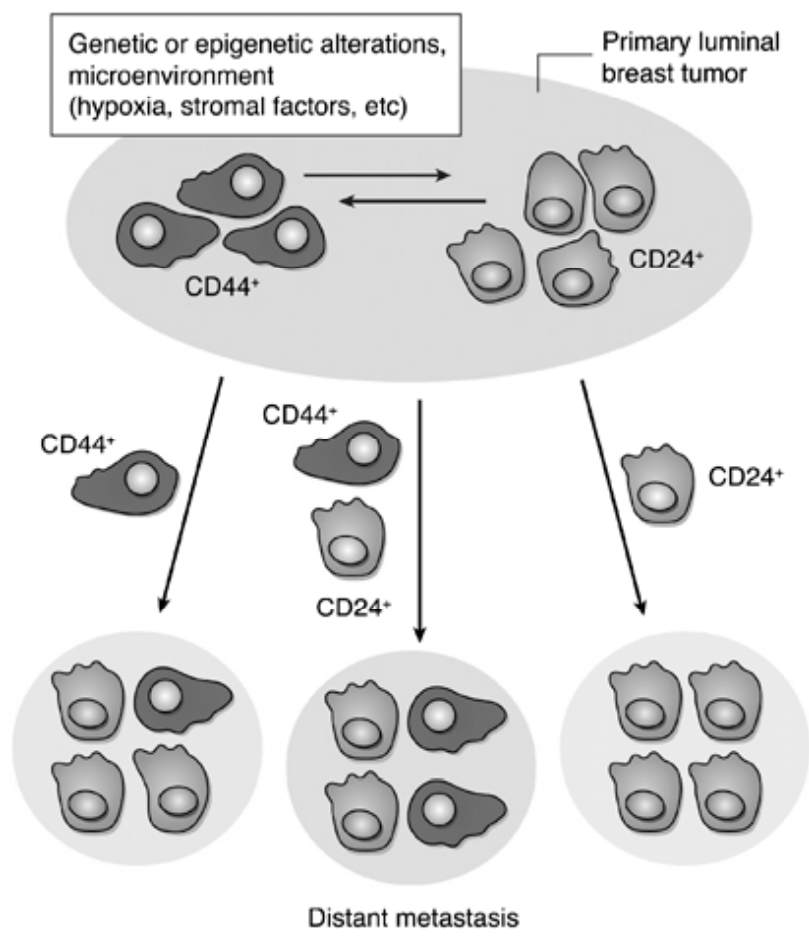


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013



Vznik nádoru  
v důsledku  
transformace ASCs  
nebo progenitorů:  
karcinom prsu

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013



Možné fenotypové rozdíly mezi primárním nádorem a metastázami: karcinom prsu

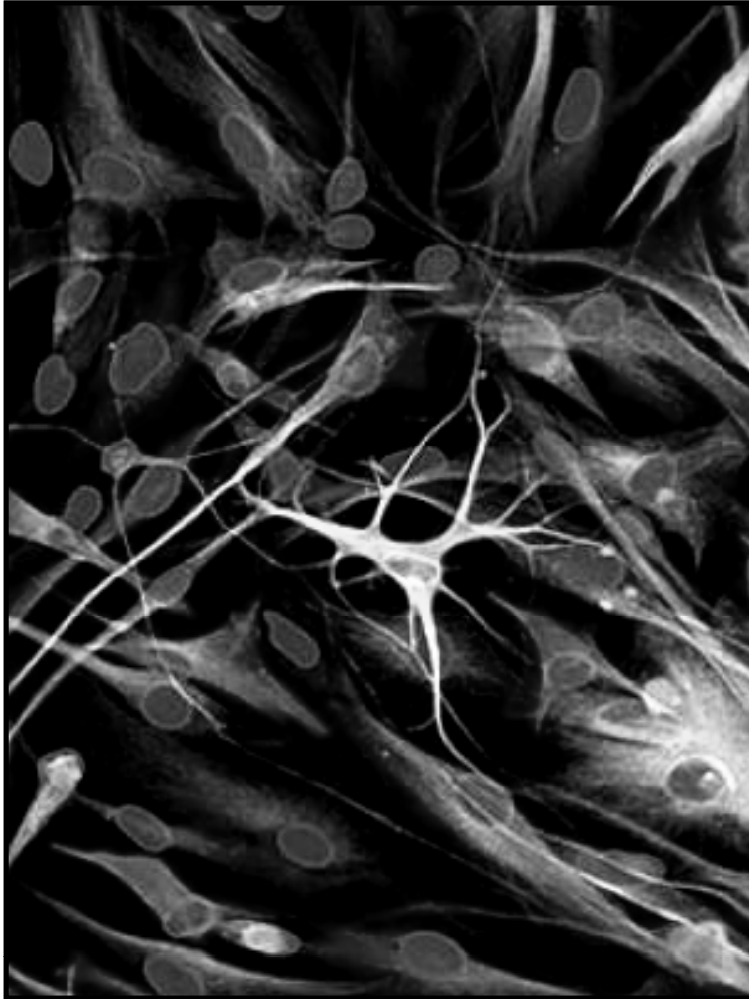
## Markery různých typů CSCs:

Orgán	Markery
	CD133+
	CD133+
	CD133+,
	CD133+,

### 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

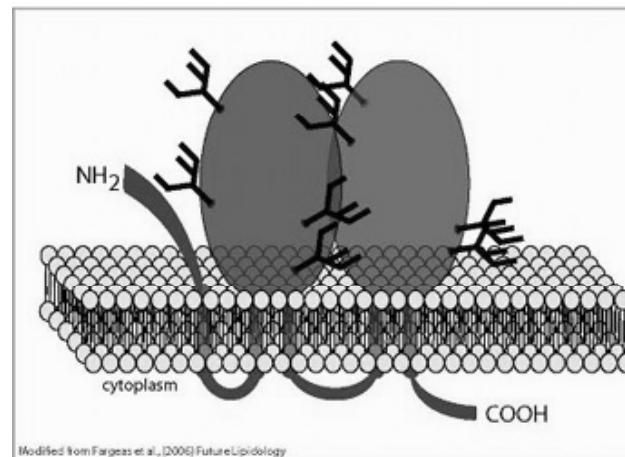
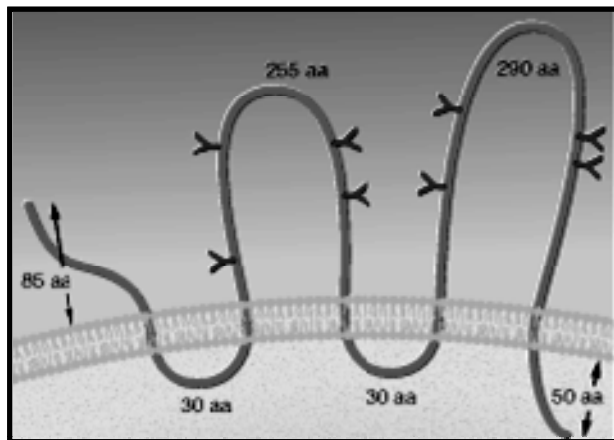
## Markery CSCs u nádorů dětského věku:

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			Oct3/4, Nanog	[48-51,75]
Retinoblastoma	CD133	CD44	Nestin, musashi-1, bmi-1	Oct3/4, Nanog, ALDH1, SP	[36-39]
Rhabdomyosarcoma	CD133			SP	[57,74]
Wilms Tumor	CD133	NCAM			[46]

(Friedman and Gillespie, Cancers, 2011)

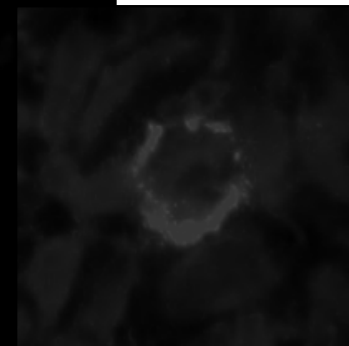
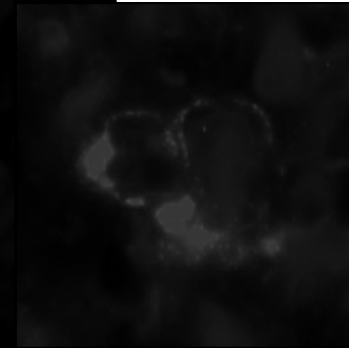
## CD133 (Prominin-1)

- membránový glykoprotein
- 4p15.32, 865 AA, 97 kDa
- 5 transmembránových segmentů: 5-TM family
- organizace membránových protruzí
- SCs i CSCs (epitop AC133)



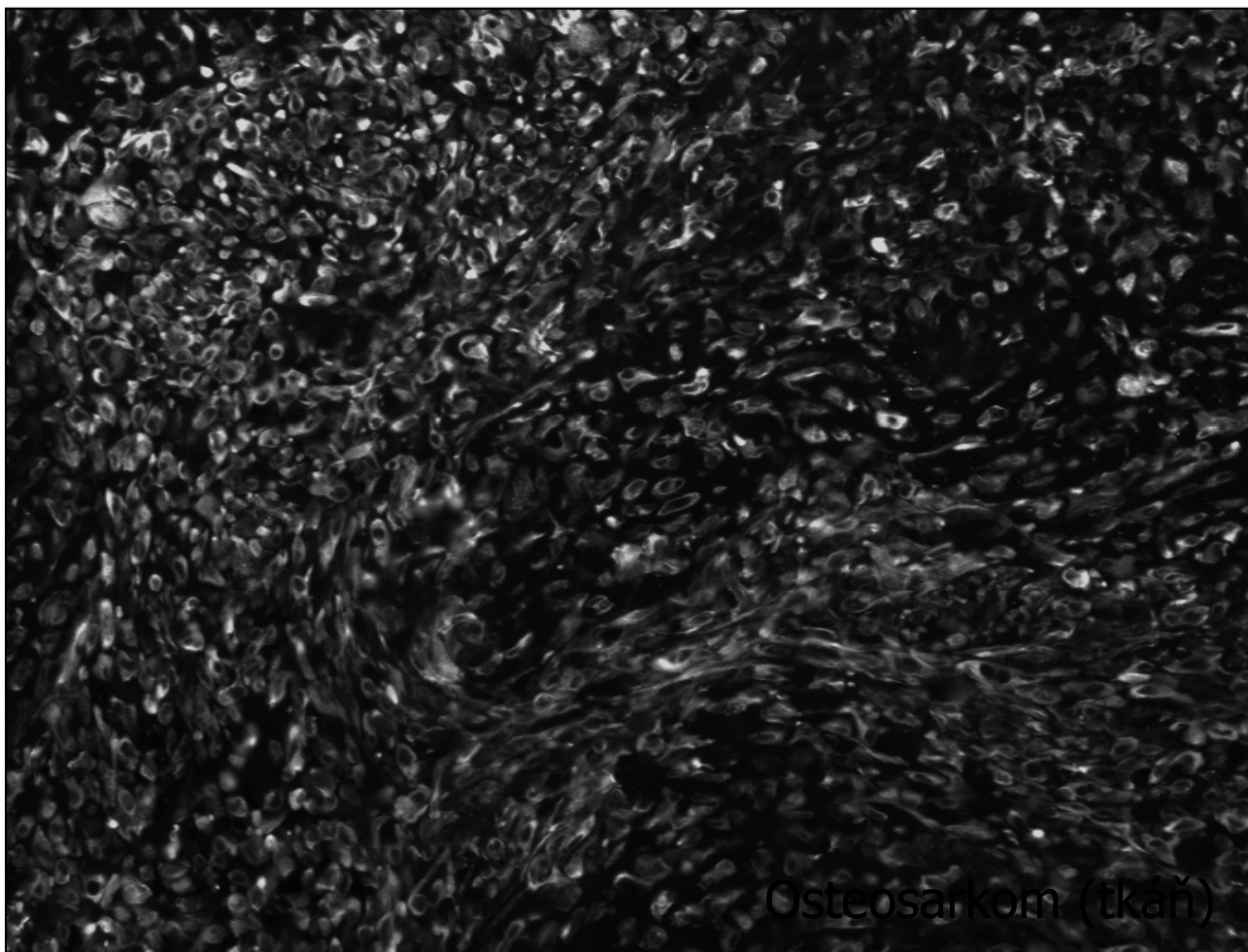


CD133



---

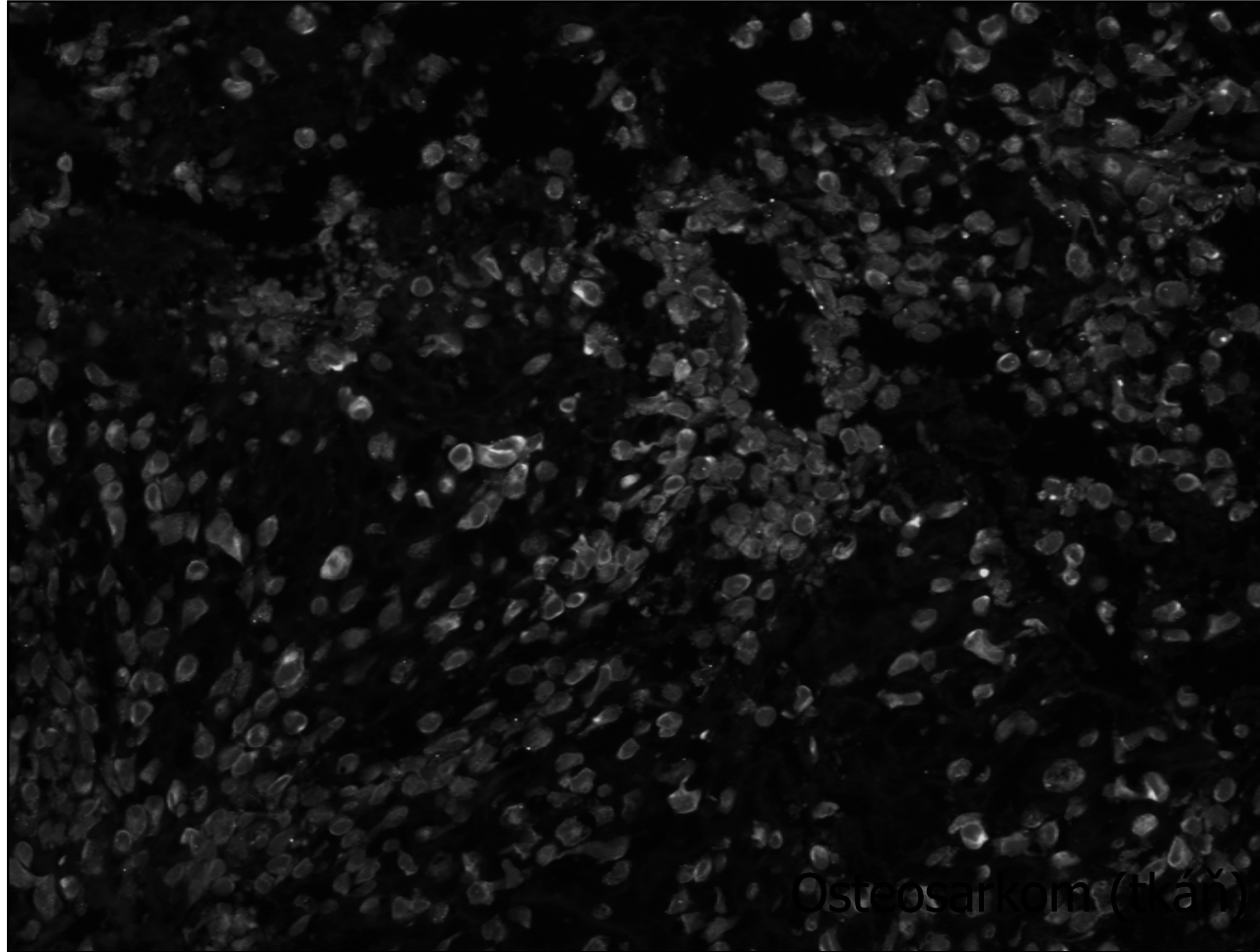
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013



M/15  
Nestin

Osteosarkom (tkáň)

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013



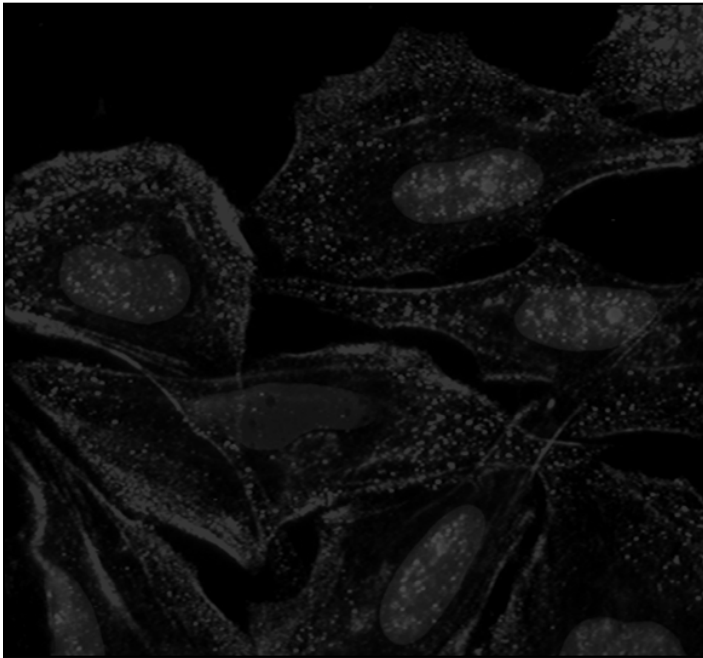
F/14  
Nestin

Osteosarkoma (třáň)

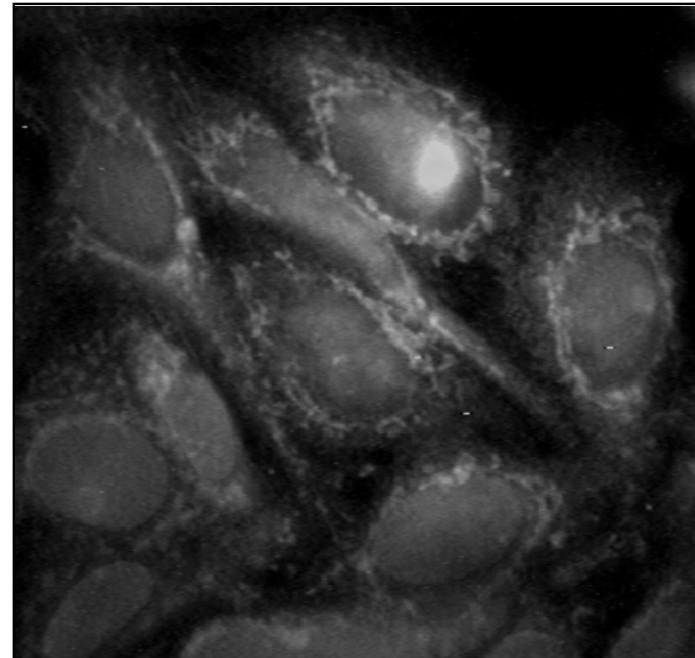
---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013

## Buněčná linie Saos-2 (ATCC) – osteosarkom

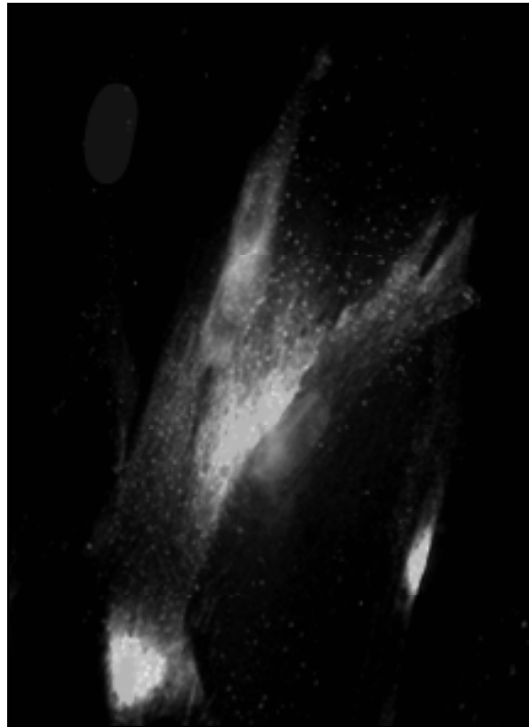


CD133 / DAPI

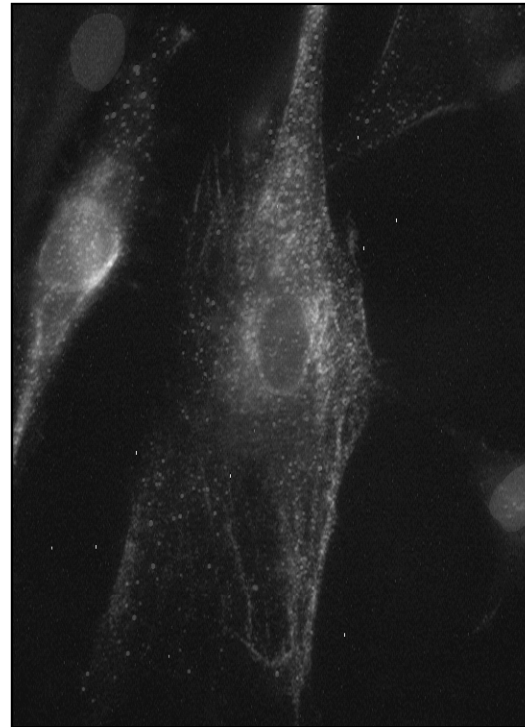


Nestin / DAPI

## Identifikace markerů CSCs v sarkomových buněčných liniích



Rhabdomyosarkom



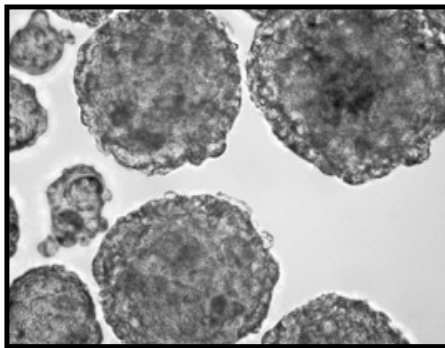
Osteosarkom

CD133  
Nestin



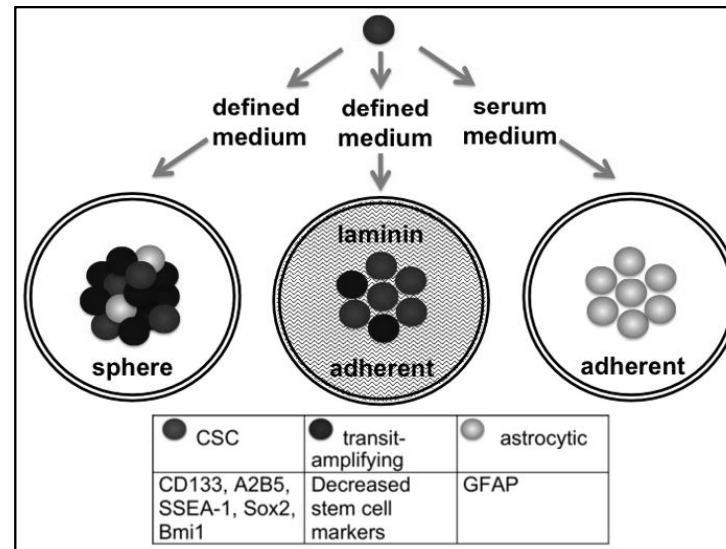
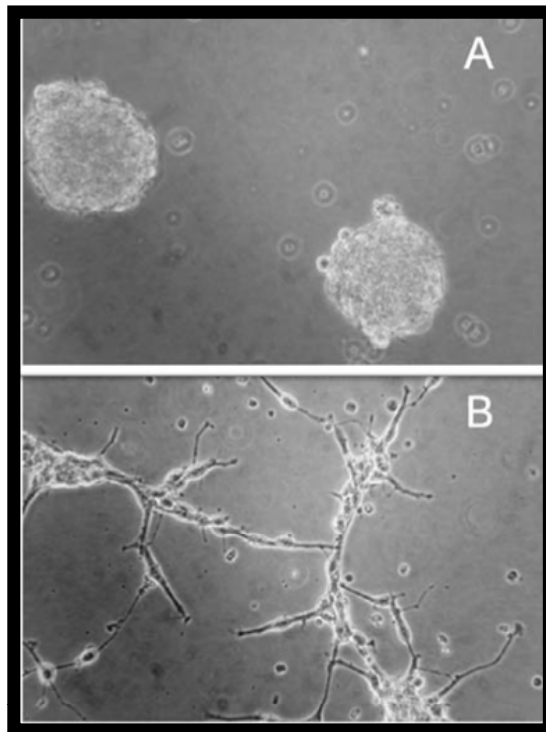
## Funkční testy (functional assays) na fenotyp CSCs

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



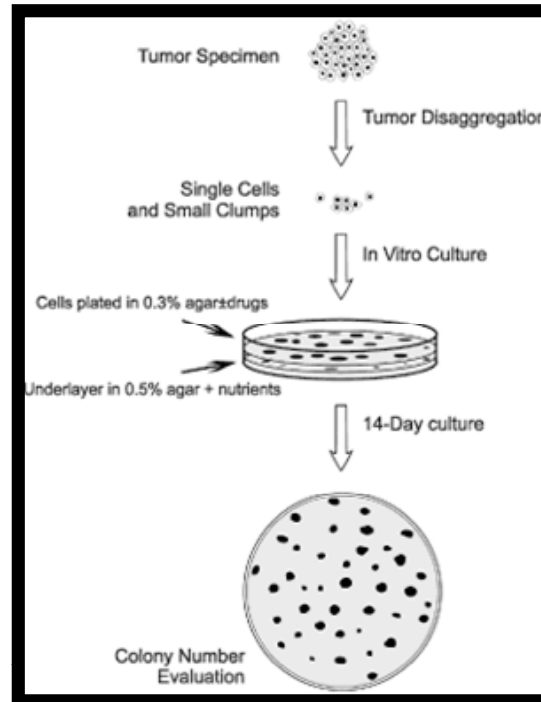
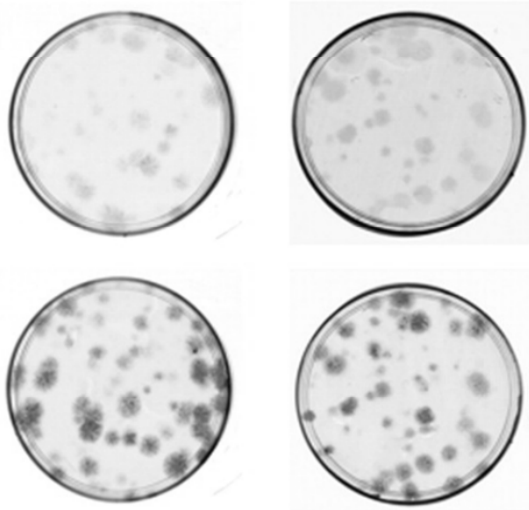
## Tvorba sfér (sphere formation assay)

- vytváření suspenzních buněčných agregátů



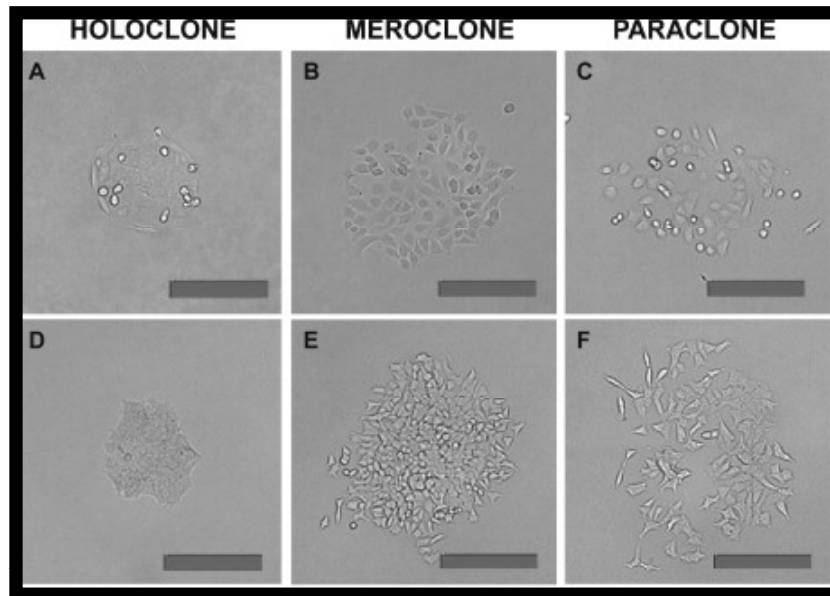
## Tvorba kolonií (colony-forming assay)

- vyšetí naředěné buněčné suspenze do měkkého agaru → vytváření kolonií



## Testy klonogenity (clonogenicity assay)

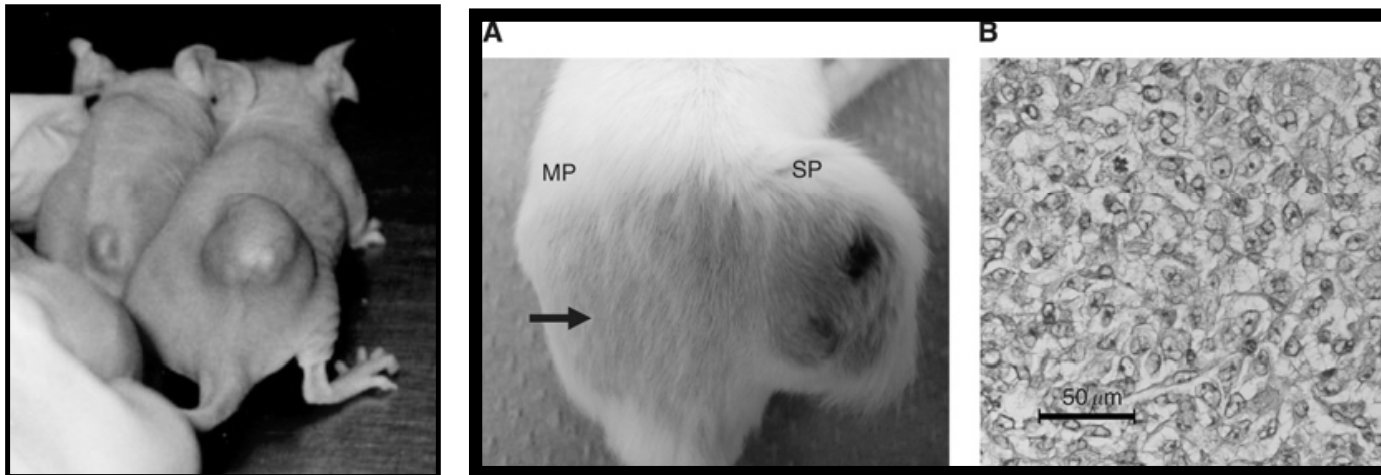
- inokulace izolovaných buněk do 96-jamkových destiček (ředěním nebo pomocí mikropipety)
- proliferace a tvorba kolonií (>50 buněk)

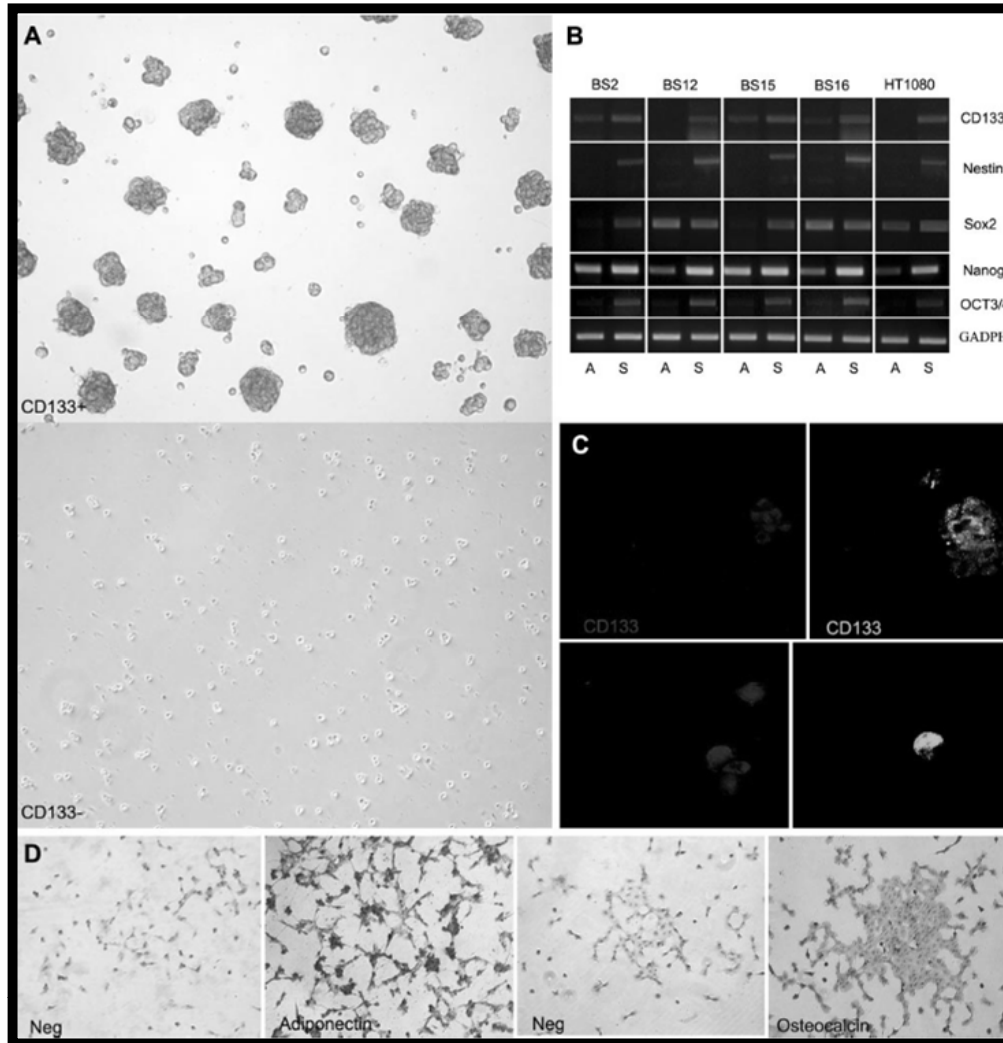


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 17.4.2013

## Testy tumorigenicity (tumorigenicity assay)

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

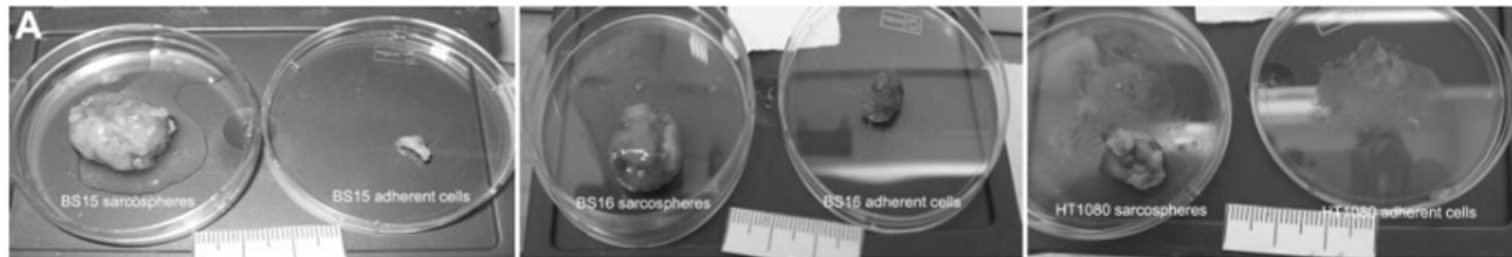




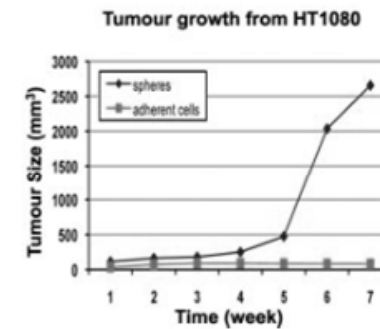
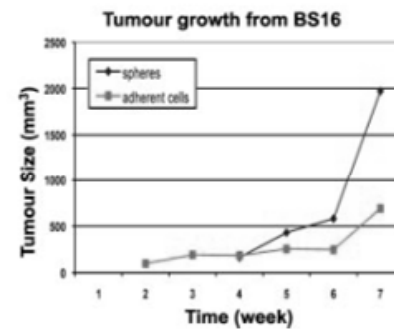
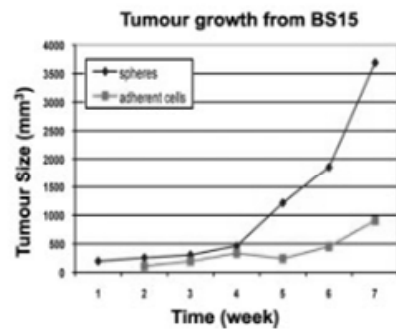
## Příklad komplexní analýzy CSCs *in vitro* (osteosarkom)

(Tirino et al., FASEB J, 2011)

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

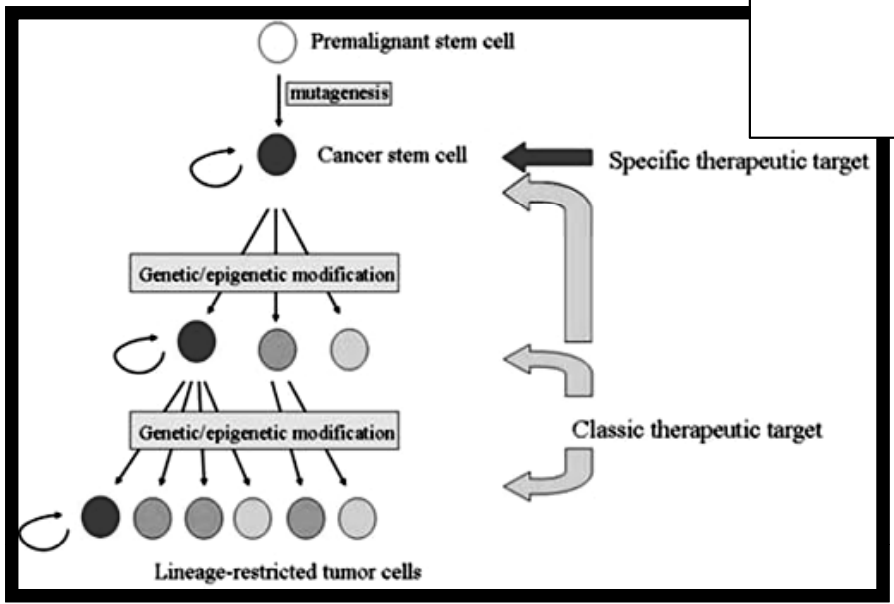
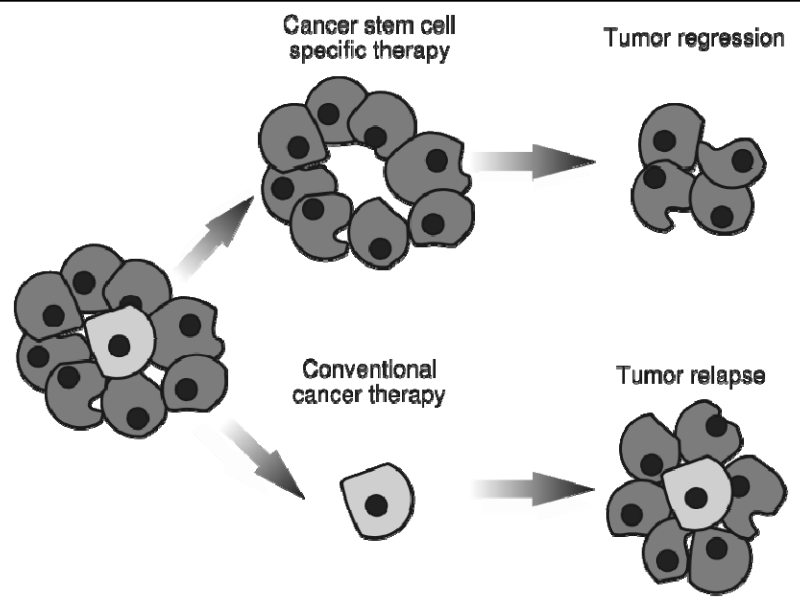


**B**



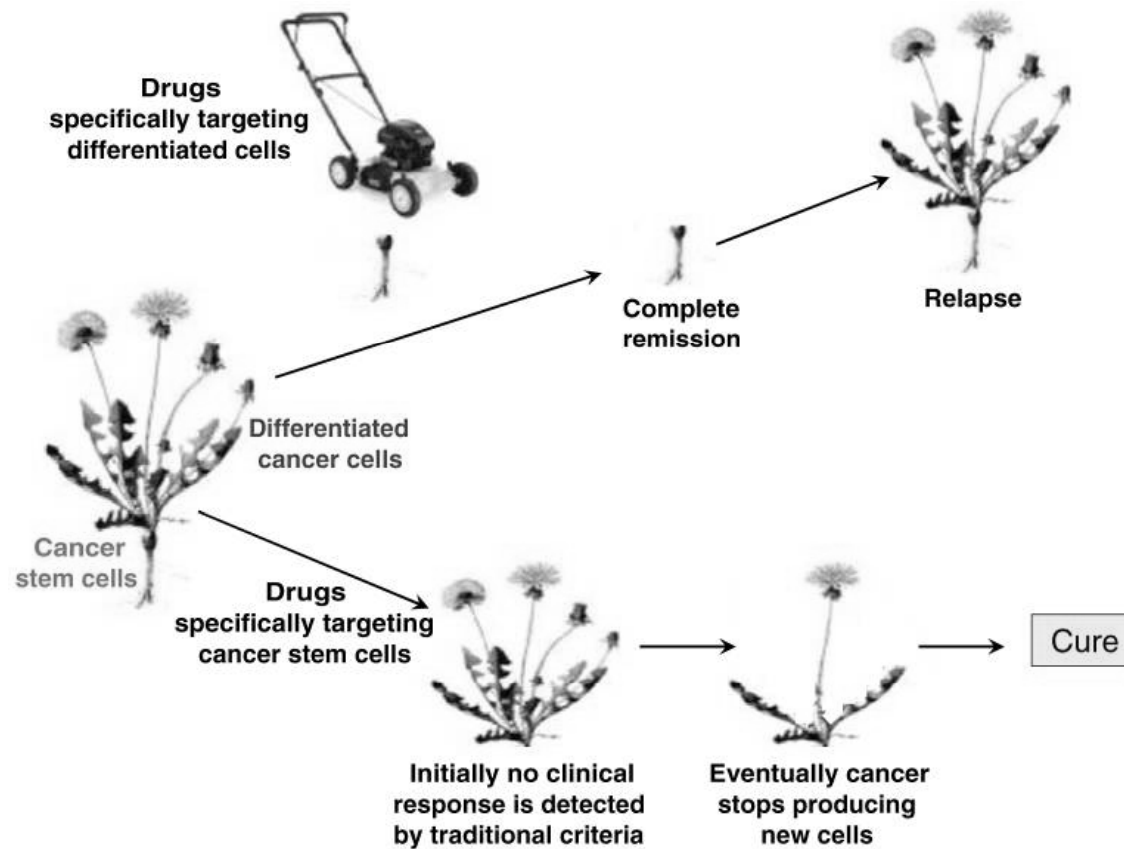
(Tirino et al., FASEB J, 2011)

# Hypotéza CSCs: Důsledky pro protinádorovou léčbu





# Konvenční vs. cílená protinádorová léčba:



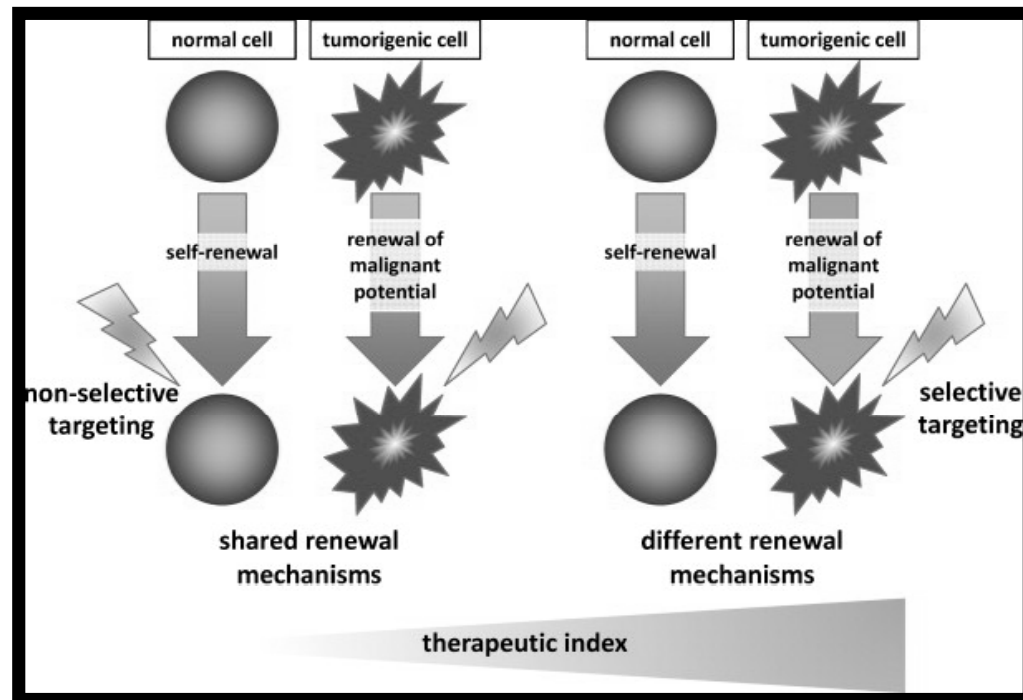
## Problém cílené terapie: chemorezistence a radiorezistence CSCs

<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>Radioreistance Mechanism</b>		
Preferential activation of DNA damage response	Glioblastoma	[103]
Upregulation of anti-apoptotic genes	MB, AT/RT	[31,104]

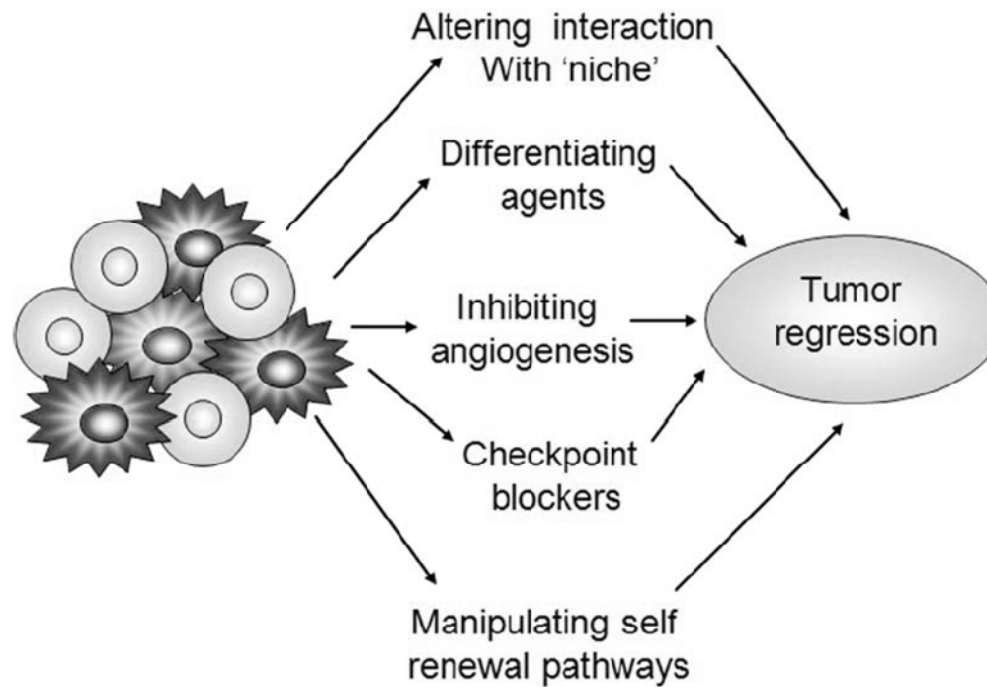
Předpokládané mechanismy chemorezistence a radiorezistence u nádorů dětského věku

(Friedman and Gillespie, Cancers, 2011)

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



## Terapie cílená proti CSCs: možné strategie

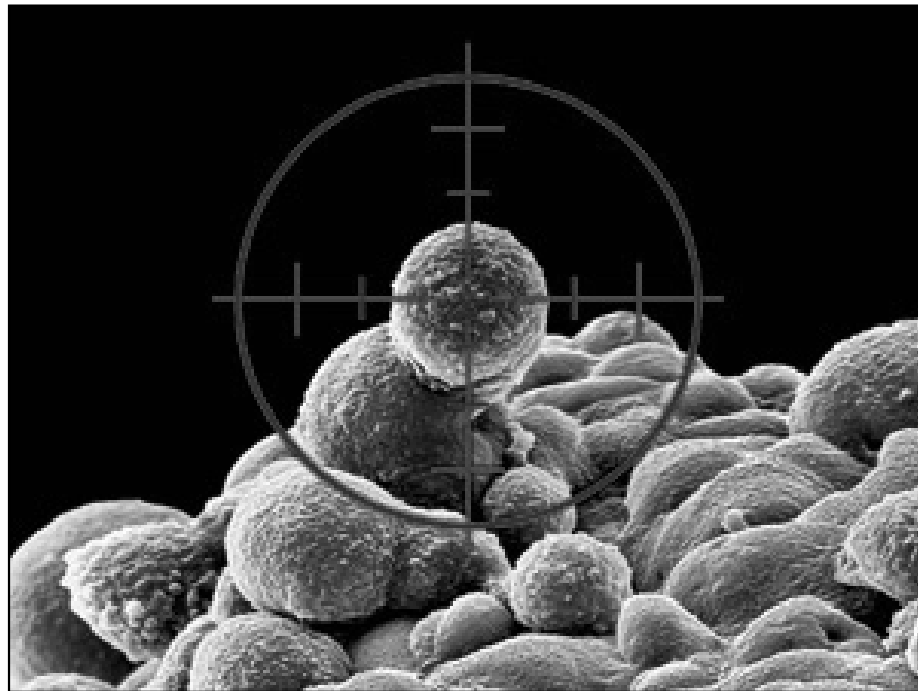


## Terapie cílená proti CSCs: Příklady konkrétních strategií u vybraných typů nádorů

**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 / 09 / 17.4.2013