

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 14.4.2014

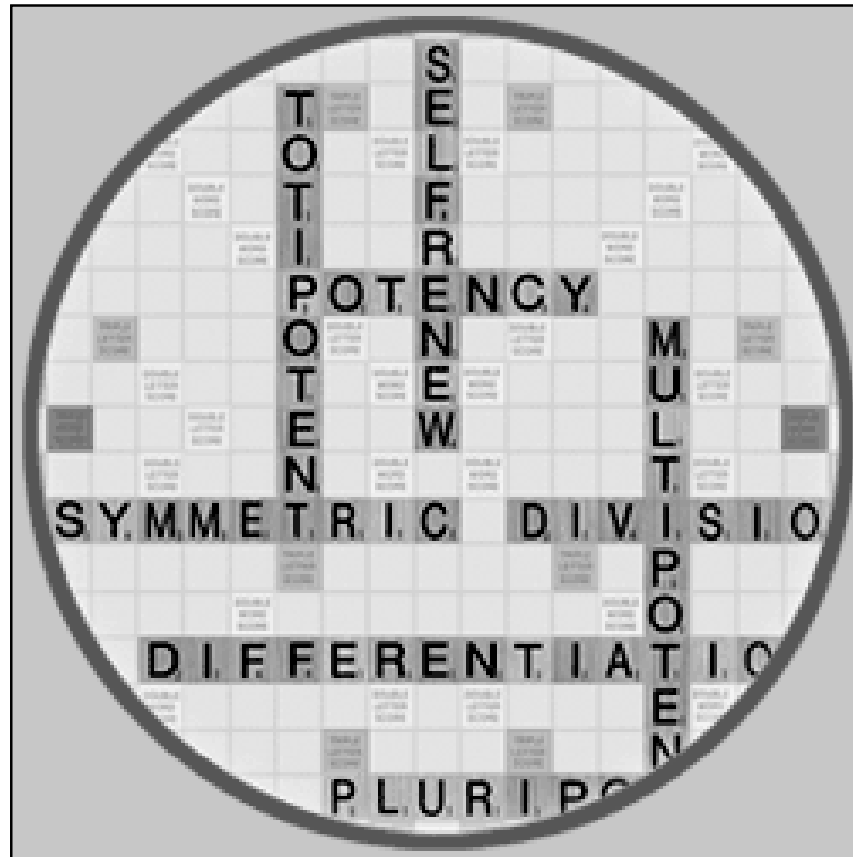
# Adultní a nádorové kmenové buňky

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

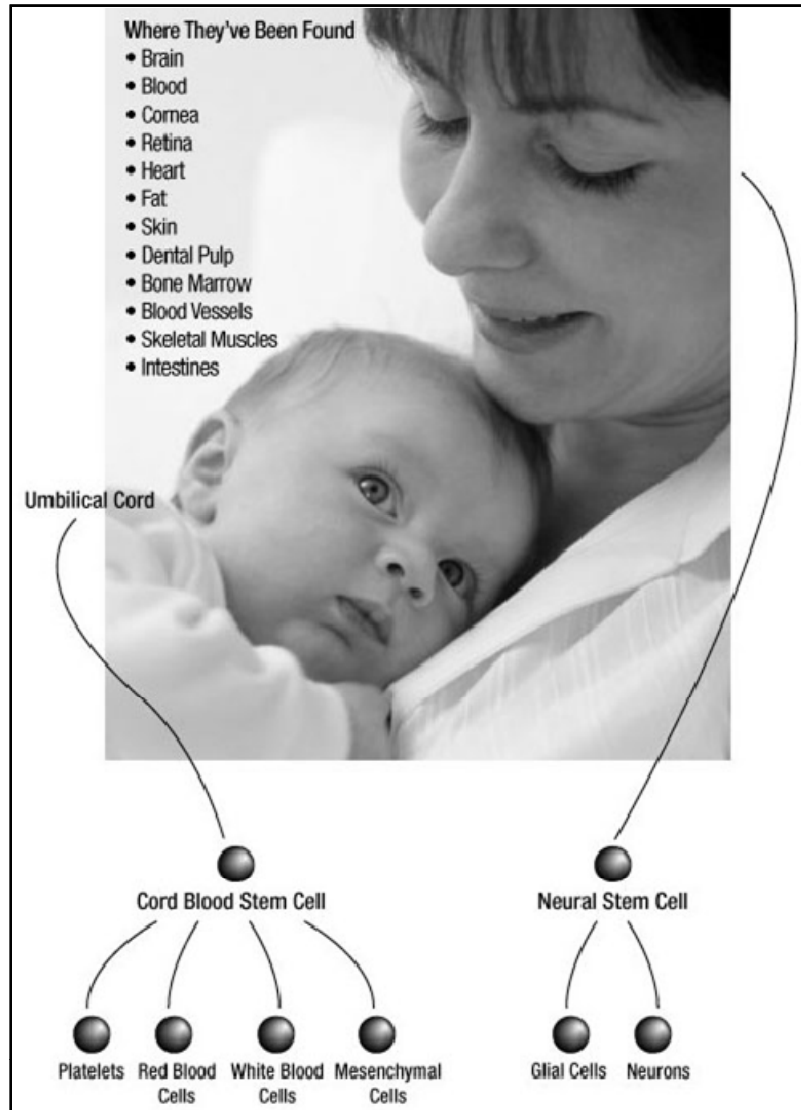


## Program přednášky:

- Adultní kmenové buňky (ASCs)  
biologické vlastnosti a diferenciační potenciál  
transdiferenciace, EMT  
mikroprostředí (niche) ASCs  
využití ASCs pro buněčné terapie → 28.4.2014
- Nádorové kmenové buňky (CSCs)  
biologické vlastnosti a hypotézy vzniku CSCs  
markery CSCs  
možnosti cílené protinádorové terapie

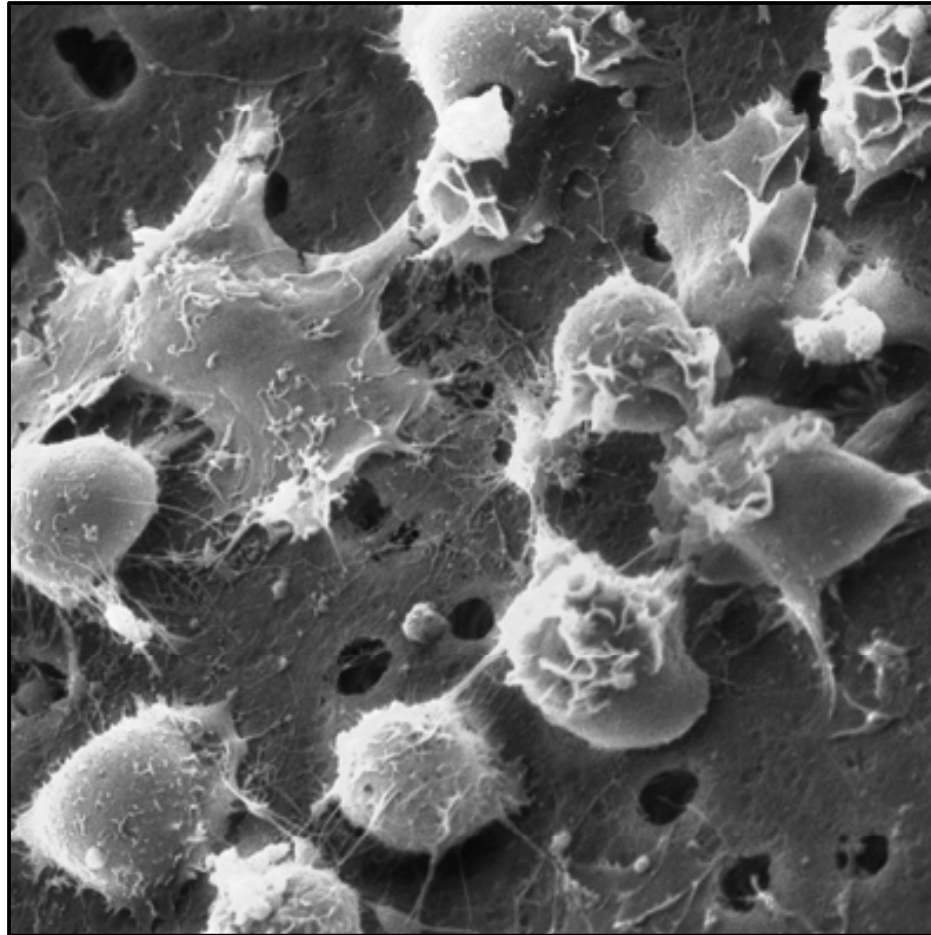
# ADULTNÍ KMENOVÉ BUŇKY (ADULT STEM CELLS, ASCs)



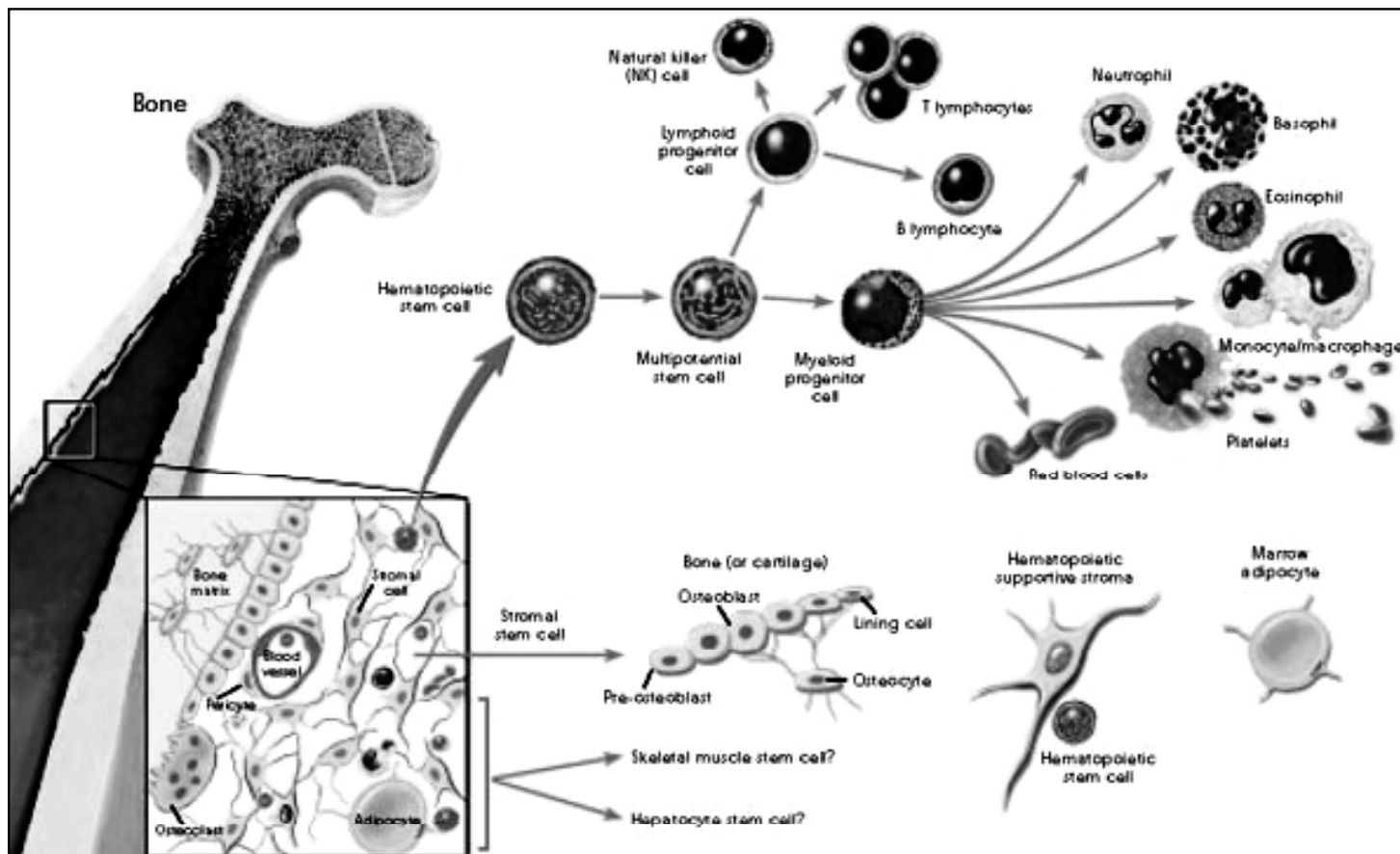


## Typy ASCs:

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



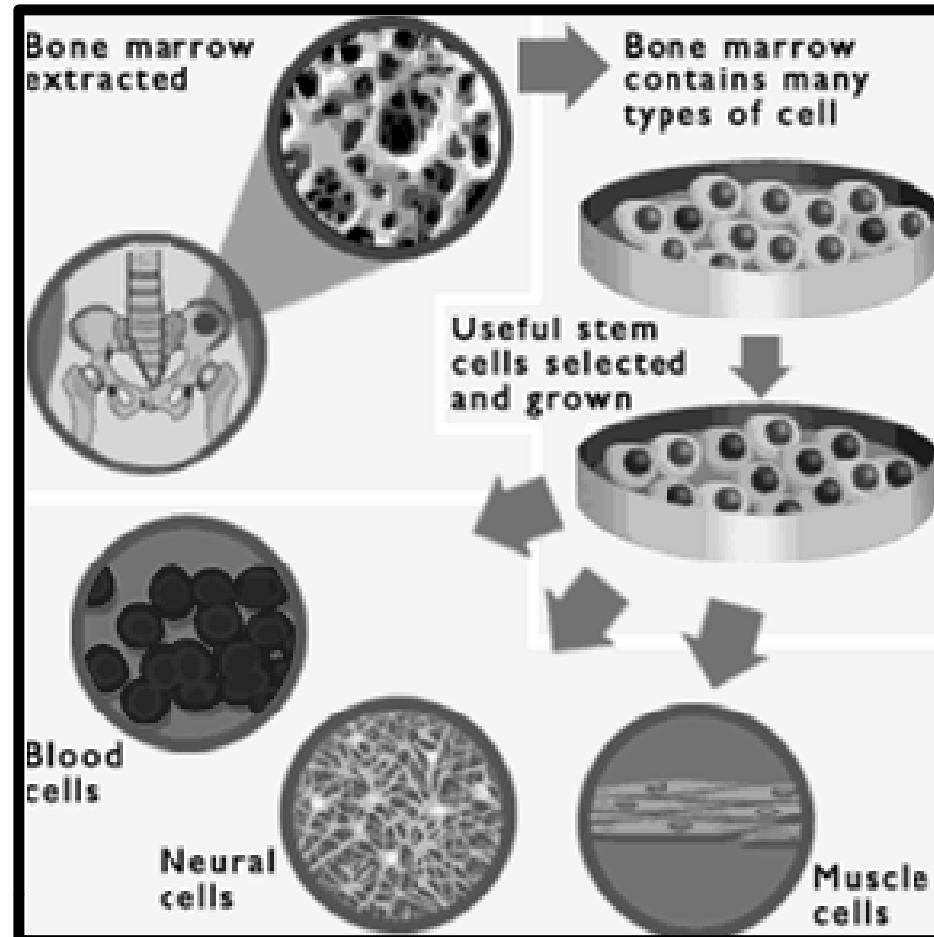
Lidské SCs kostní dřeně



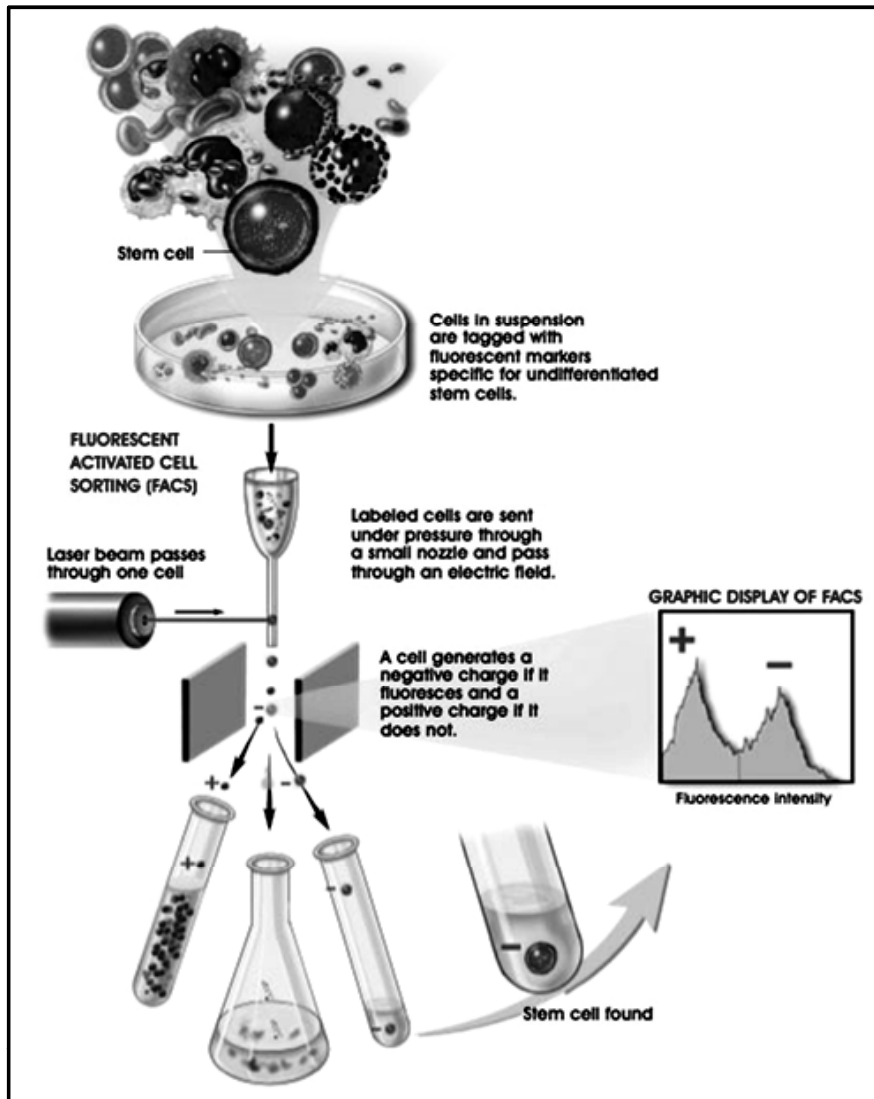
## Diferenciační potenciál hematopoetických a stromálních SCs

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 14.4.2014

## Plasticita hematopoetických SCs



# Izolace hematopoetických SCs pomocí FACS



## Transdiferenciace

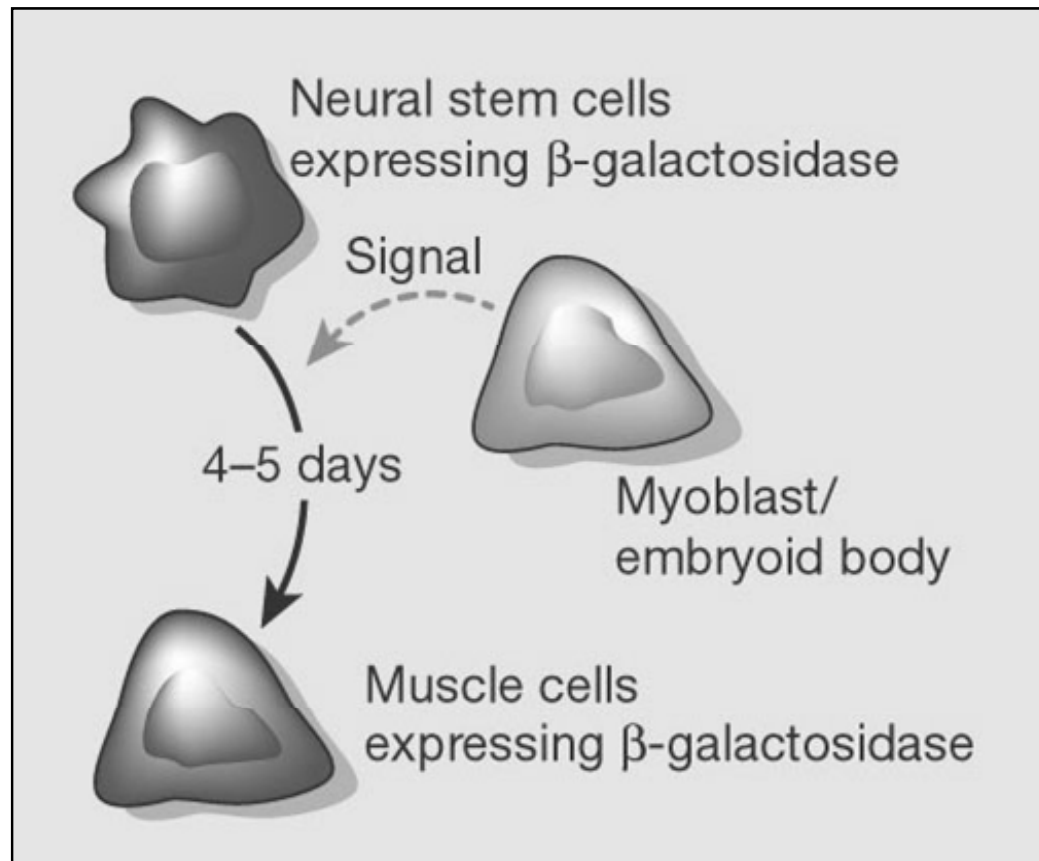
= schopnost buněk diferencovat do fenotypu charakteristického pro jiný typ tkáně nebo orgánu, než byla tkáň původní

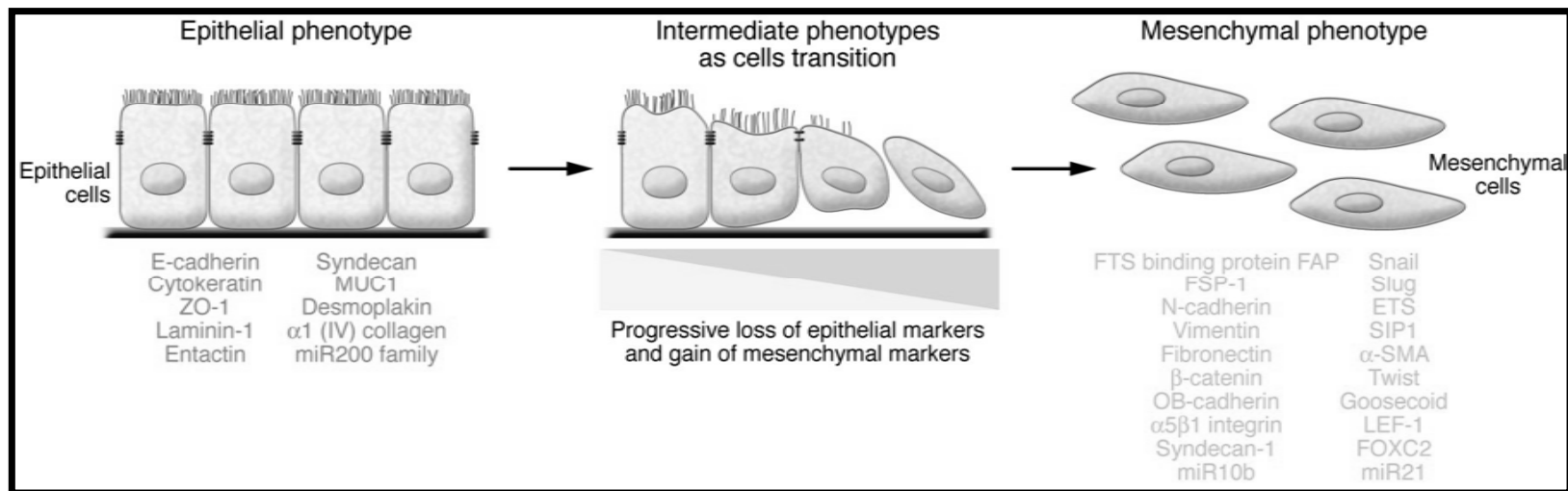
- hematopoetické SCs → kardiomyocyty, hepatocyty

### *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

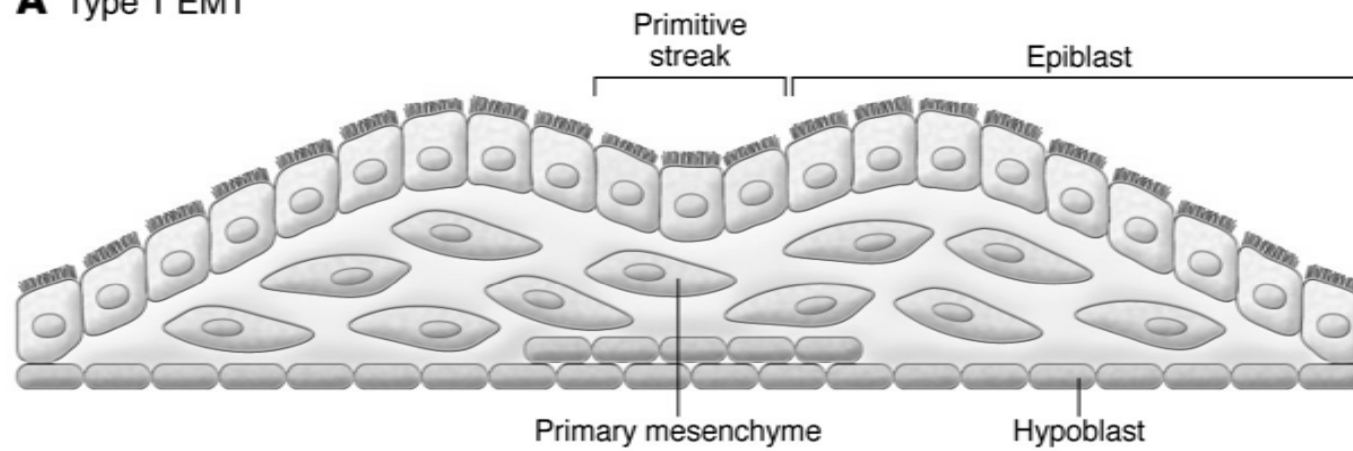
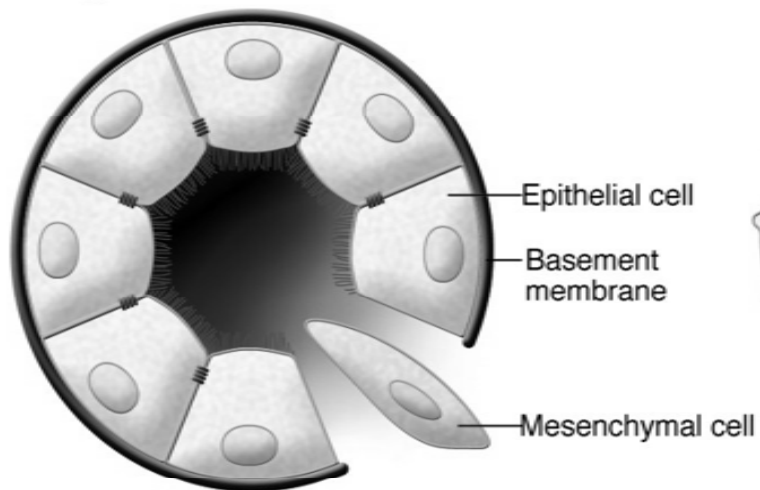
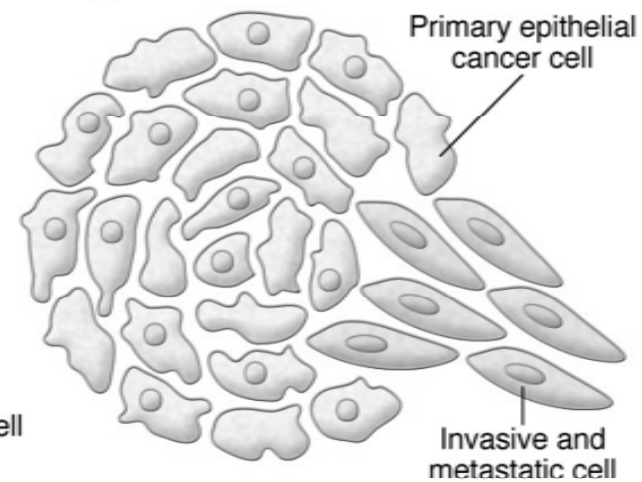




## Epiteliálně mezenchymální tranzice (EMT)

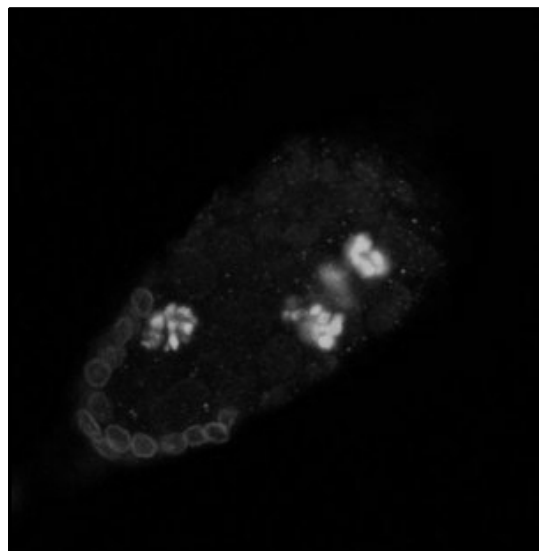
= biologický proces, při němž polarizovaná epiteliální buňka, která svým bazálním povrchem interaguje s bazální laminou (ECM), prochází řadou biochemických změn, díky nimž získá mezenchymální fenotyp (zesílená schopnost migrace, invazivita, vyšší rezistence k apoptóze a zvýšená produkce komponent ECM)



**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



buňky tvořící niche  
SCs (mitóza)

# NÁDOROVÉ KMENOVÉ BUŇKY (CANCER STEM CELLS, CSCs)

# Nádorové kmenové buňky: cancer stem cells, CSCs / tumor-initiating cells, TICs



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>

BBRC

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

REVIEW ARTICLE

## Cancer Initiating Cells or Cancer Stem Cells in the Gastrointestinal Tract and Liver

GANG-MING ZOU\*

[Cancer Biology & Therapy 7:3, 1-6; March 2008]; ©2008 Landes Bioscience

Review

## Tumor-initiating stem cells in liver cancer

Shan Yong Yi and Ke Jun Nan\*



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 14.4.2014



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Seminars in Cancer Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/semcancer](http://www.elsevier.com/locate/semcancer)

## Review

## The bed and the bugs: Interactions between the tumor microenvironment and cancer stem cells

Zafira Castaño<sup>a,b,1</sup>, Christine M. Fillmore<sup>c,d,e,f,1</sup>, Carla F. Kim<sup>c,d,e,f</sup>, Sandra S. McAllister<sup>a,b,f,g,\*</sup>Stem Cell Rev and Rep (2011) 7:227–237  
DOI 10.1007/s12015-010-9194-6**Seeing is Believing: Are Cancer Stem Cells the Loch Ness Monster of Tumor Biology?**Justin D. Lathia • Monica Venere • Mahendra S. Rao •  
Jeremy N. Rich

Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 26 (2008) 581–589

UROLOGIC  
ONCOLOGY

Review article

## “Cancer stem cells”—Lessons from Hercules to fight the Hydra

Felix Roman Moltzahn, M.D.<sup>1</sup>, Jens-Peter Volkmer, M.D.<sup>1,\*</sup>, Daniel Rottke, M.D.,  
Rolf Ackermann, M.D.<sup>2</sup>

Journal of Pathology  
*J Pathol* 2009; 217: 282–298  
 Published online 23 September 2008 in Wiley InterScience  
 (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/path.2453

Invited Review

### Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly



REVIEW ARTICLE

### Cytometry

PART A  
 Official journal of the  
 International Society for  
 Advancement of Cytometry

### Die Hard: Are Cancer Stem Cells the Bruce Willises of Tumor Biology?



FOLIA HISTOCHEMICA  
 ET CYTOBIOLOGICA  
 Vol. 43, No. 4, 2005  
 pp. 175-181

Review article

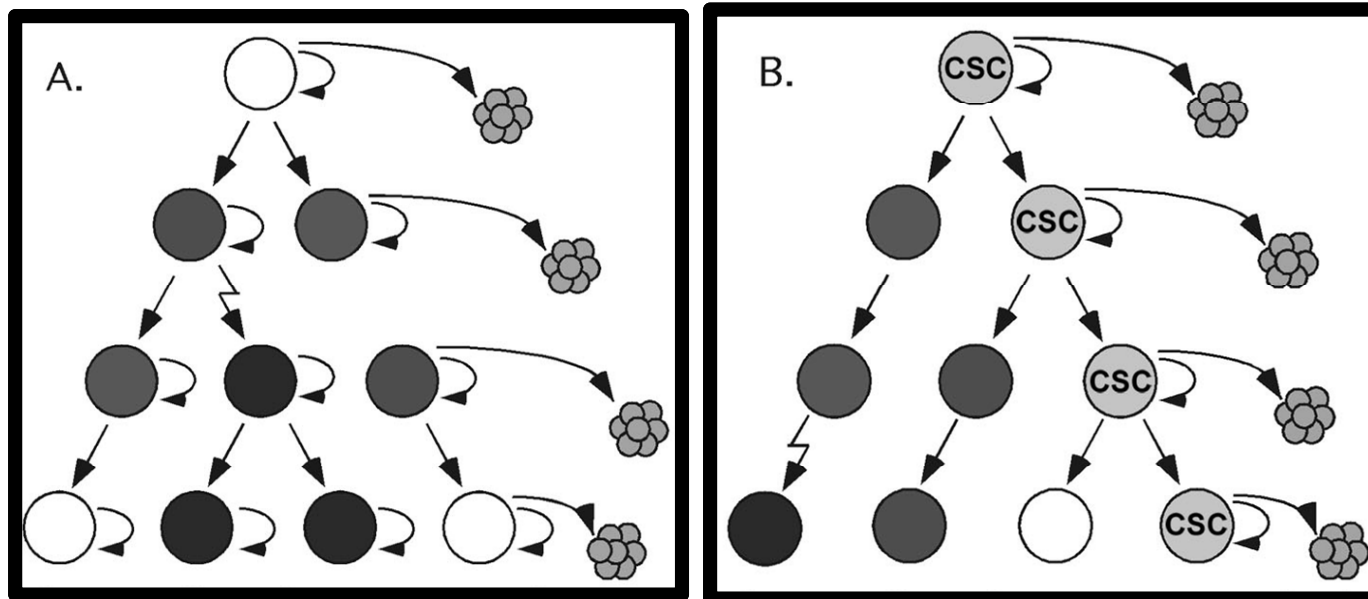
### Cancer stem cells - normal stem cells "Jedi" that went over to the "dark side"

Mariusz Z. Ratajczak



## Zásadní změna pohledu na biologii nádorů:

- A. stochastický/klonálně evoluční model
- B. CSCs model



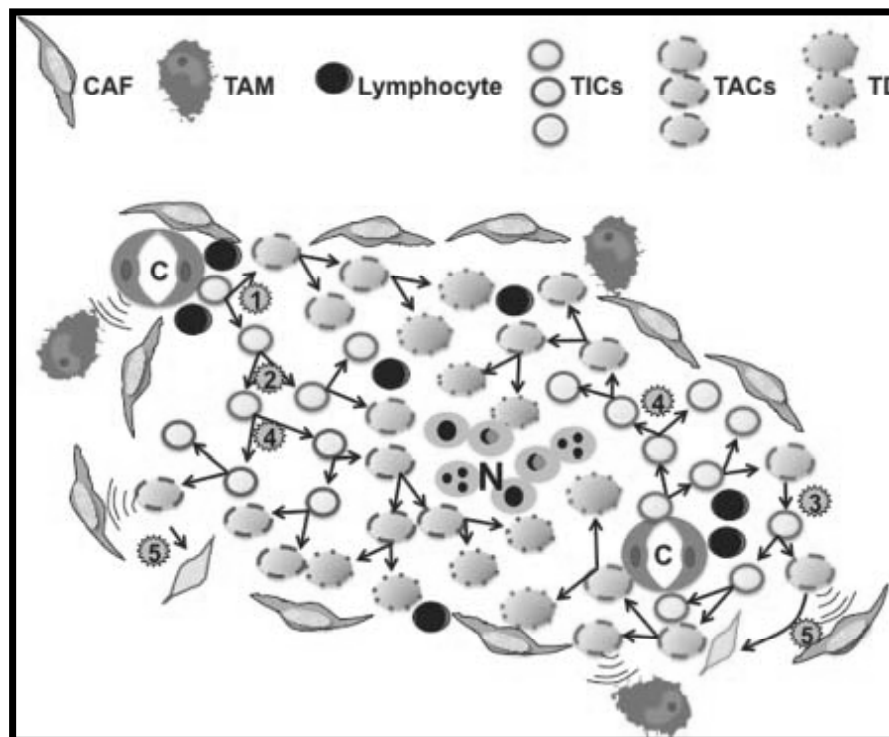
## Heterogenní prostředí solidního nádoru

C = kapilára

N = nekróza

TAM

= tumor-associated  
macrophages



TICs = tumor initiating cells (= CSCs)

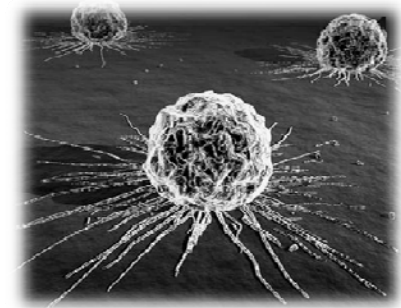
TACs = transiently amplifying cells

TD = terminally differentiated cells

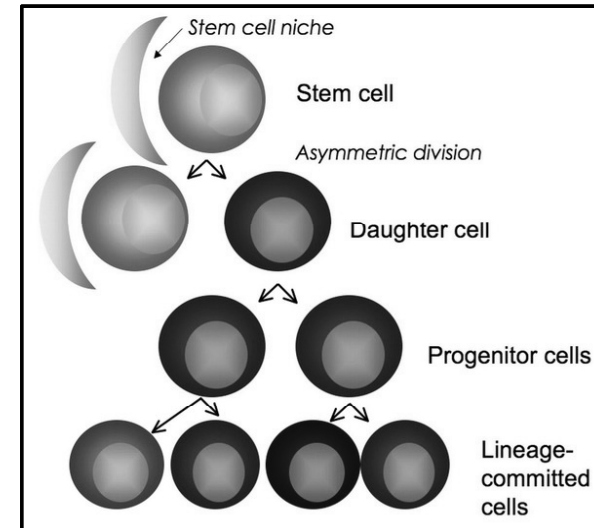
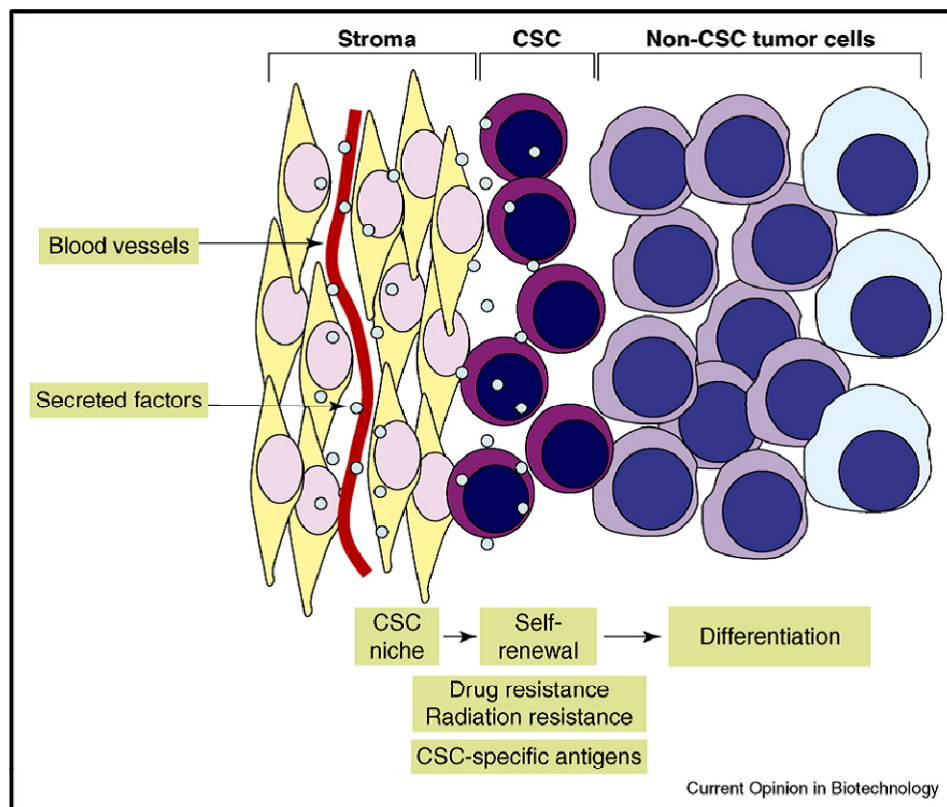


## Přehled biologických vlastností CSCs:

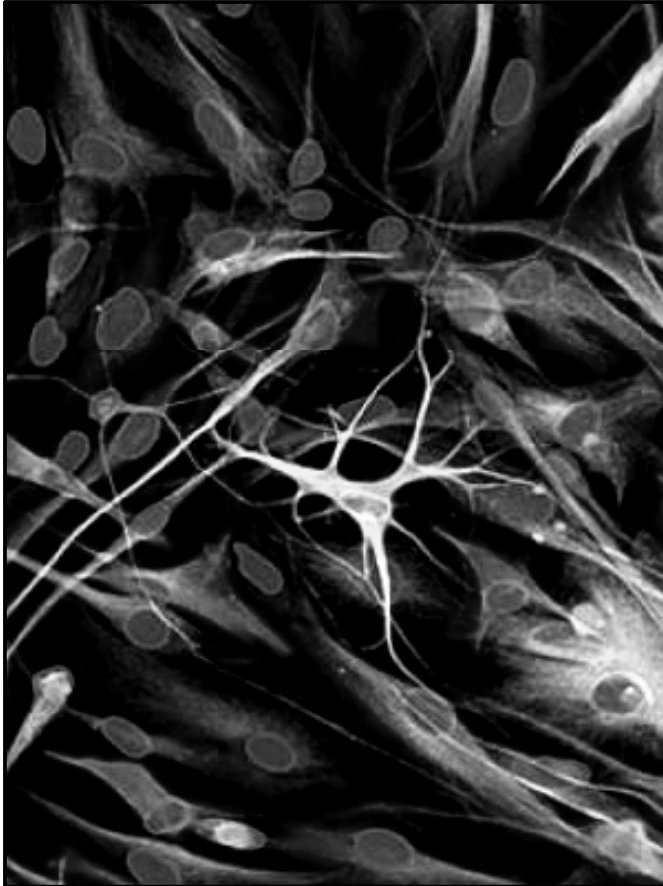
- specifické mikroprostředí (niche)
- schopnost sebeobnovy (self-renewal)
- proliferační potenciál / schopnost asymetrického dělení
- diferenciační potenciál
- vysoká telomerázová aktivita
- specifické markery, resp. jejich kombinace
- specifické signální dráhy (Wnt, Notch, SHH)
- rezistence vůči apoptóze
- metastatický potenciál / schopnost epiteliálně-mesenchymální transice (EMT)



Mikroprostředí (niche) CSCs v solidních nádorech:  
hypoxie, ECM, mezibuněčné interakce, extracelulární  
(secernované) faktory a signály = "tissue makeup"



## Diferenciační potenciál CSCs



Diferenciace CSCs  
z nádoru mozku v  
podmínkách *in vitro*:

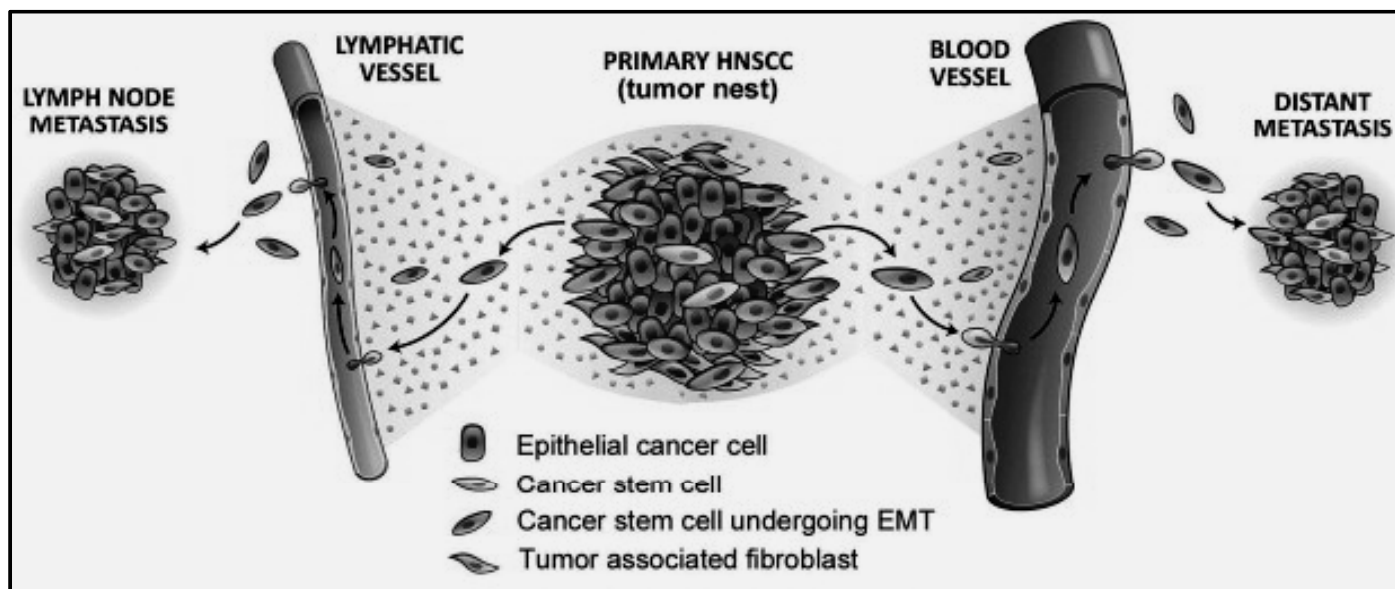
neurony

astrocyty

nediferencované CSCs

## Metastatický potenciál CSCs

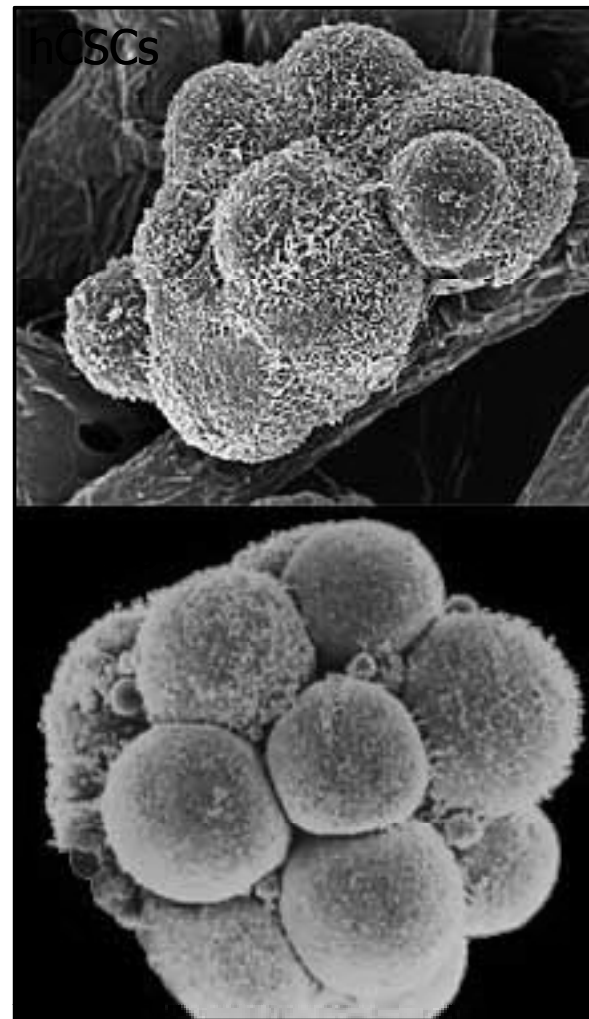
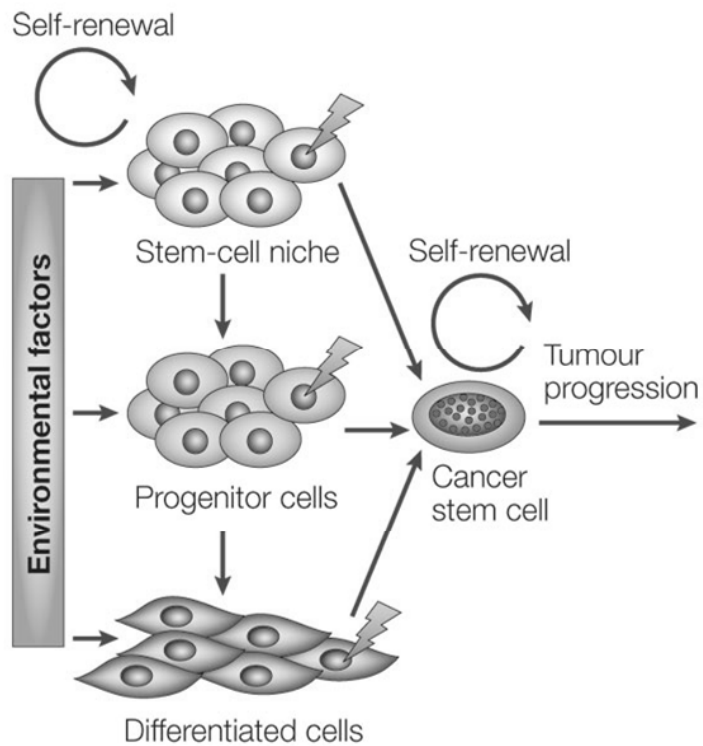
- změny interakcí s ECM
- vytváření invadopodií (participace CD133?)
- u CSCs karcinomů schopnost EMT/MET



## Hypotézy vzniku CSCs

- nádorová transformace embryonálních SCs (aberrantní depozity embryonálních SCs v organismu)
- nádorová transformace adultních SCs, resp. progenitorových buněk v příslušné tkáni
- nádorová transformace diferencovaných buněk ve tkáni (mutace podmiňující dediferenciaci na fenotyp CSCs)

## Hypotézy vzniku CSCs:

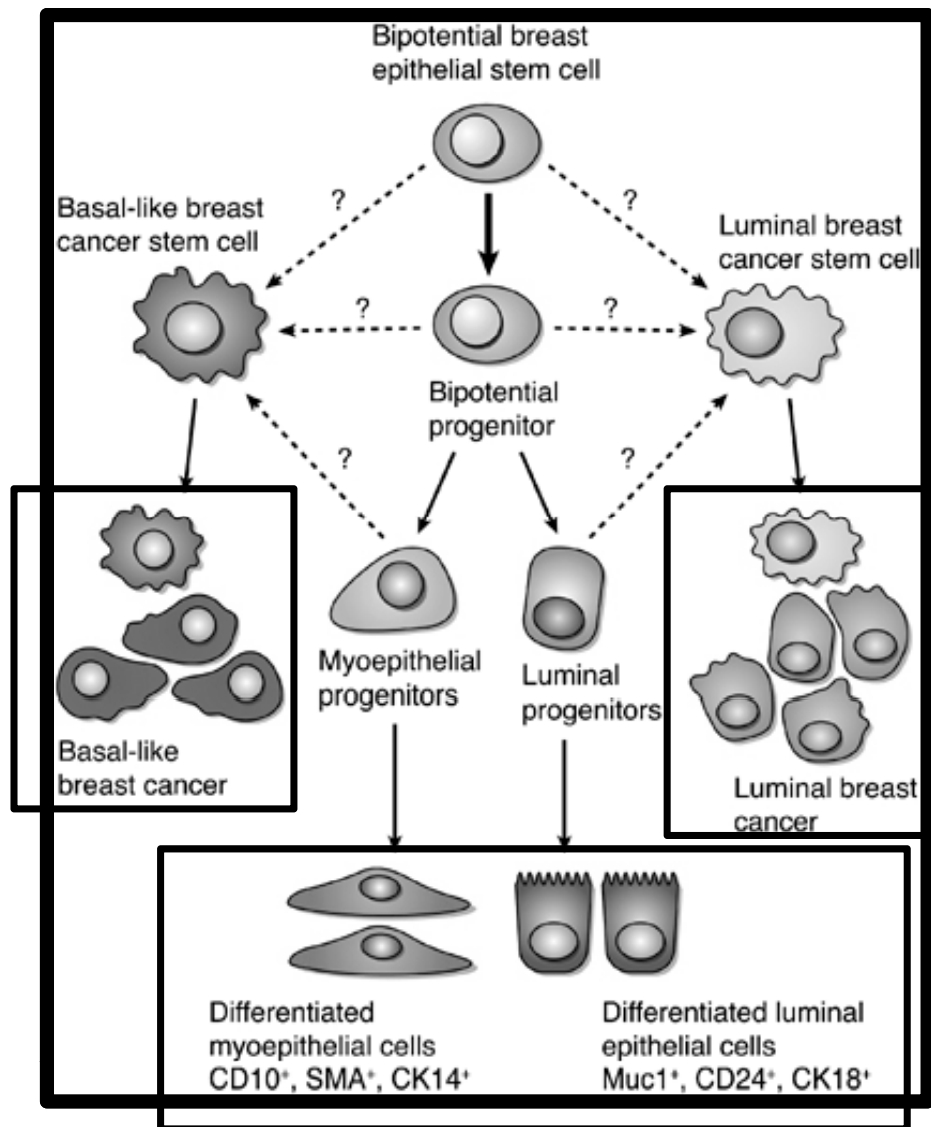


SCs normální tkáně:

- 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



Vznik nádoru  
v důsledku  
transformace ASCs  
nebo progenitorů:  
karcinom prsu



## Kategorie markerů CSCs u různých typů malignit:

- membránové / povrchové proteiny:  
CD15, CD24, CD44, CD133, CXCR4, NCAM,  
ABC transportéry
- cytoplazmatické proteiny:  
nestin, Musashi-1, ALDH
- jaderné proteiny (transkripční faktory):  
Sox2 , Oct3/4, Nanog

## Markery CSCs u nádorů dětského věku:

Malignancy	Cell Surface Proteins	Nuclear/Cytoplasmic Proteins	Transcription Factors	Functional/Enzymes
AT/RT	CD133			
Ependymoma	CD133	CD15 Nestin	BLBP, RC2	
Ewing's Sarcoma/PNET	CD133			SP
Glioma	CD133	CD15 Musashi-1, bmi-1	Sox-2	
Hepatoblastoma				SP
Malignant rhabdoid tumor of the kidney	CD133			
Medulloblastoma	CD133	CD15 Nestin		SP
Melanoma, childhood	CD133			
Neuroblastoma	CD133	Nestin		SP
Osteosarcoma	CD133	Nestin	Oct3/4, Nanog	SP
Retinoblastoma	CD133	CD44 Nestin	musashi-1, bmi-1	Oct3/4, Nanog, ALDH1, SP
Rhabdomyosarcoma	CD133			SP
Wilms Tumor	CD133	NCAM		

Friedman and Gillespie, Cancers 2011

## Metodické možnosti detekce markerů CSCs:

- transkript:

RT-PCR / Real-time PCR

- protein:

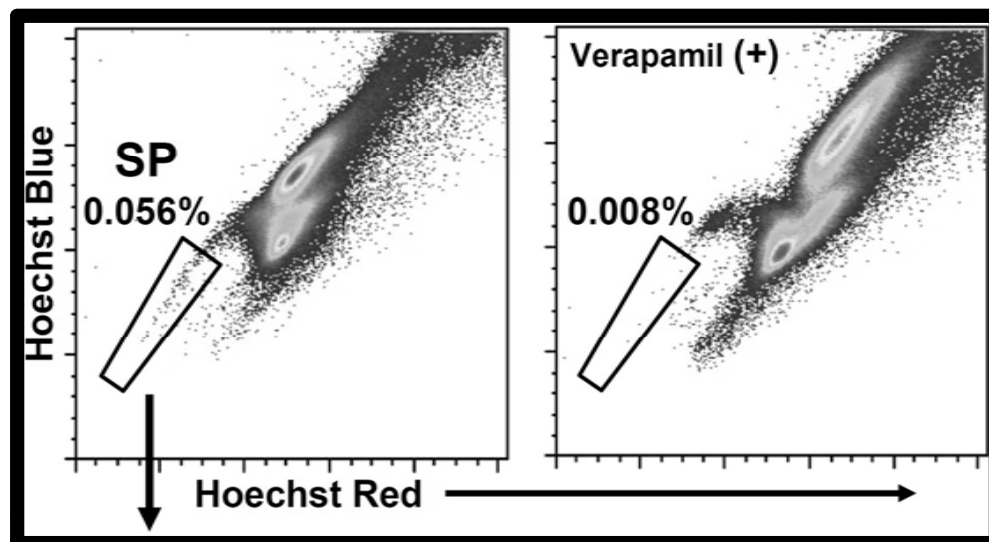
imunodetekční metody

(imunohistochemie, imunocytochemie,  
imunofluorescence, imunoznačení pro ELM,  
imunoblotting, flow cytometrie / FACS)

↳ detekce "side population" (SD)

## Detekce "side population" (= SP):

- barvivo Hoechst 33342
- hodnocení při dvou emisních délkách:  
450 nm (Hoechst blue) a 670 nm (Hoechst red)
- aktivita transmembránových ABC-transportérů  
v CSCs



## Markery CSCs u neurogenních nádorů



### Multiformní glioblastom

- nejčastější zhoubný nádor mozku u dospělých (30-40 případy na 1 milion obyvatel ročně)
- CD133, CD15 (SSEA1), Sox-2, Musashi-1, nestin

### Meduloblastom

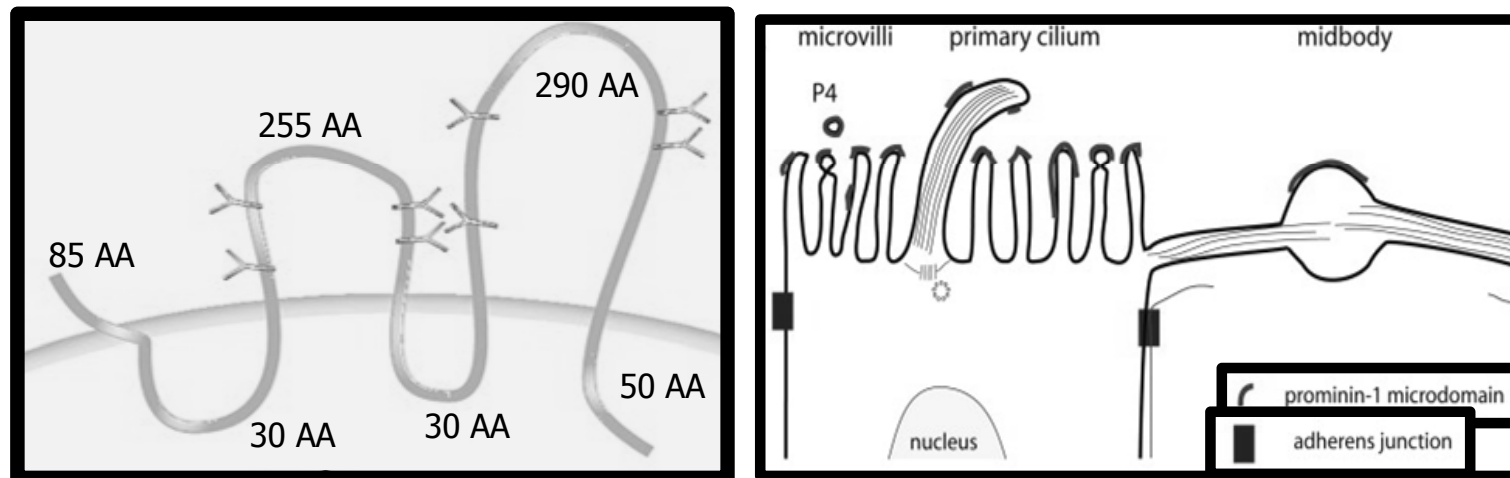
- nejčastější zhoubný nádor CNS u dětí (2-6 případů na 1 milion dětí do 15 let ročně)
- CD133, CD15 (SSEA1), nestin

### Neuroblastom

- nejčastější extrakraniální solidní nádor u dětí (6-8 případů na 1 milion dětí do 15 let ročně)
- CD133, nestin

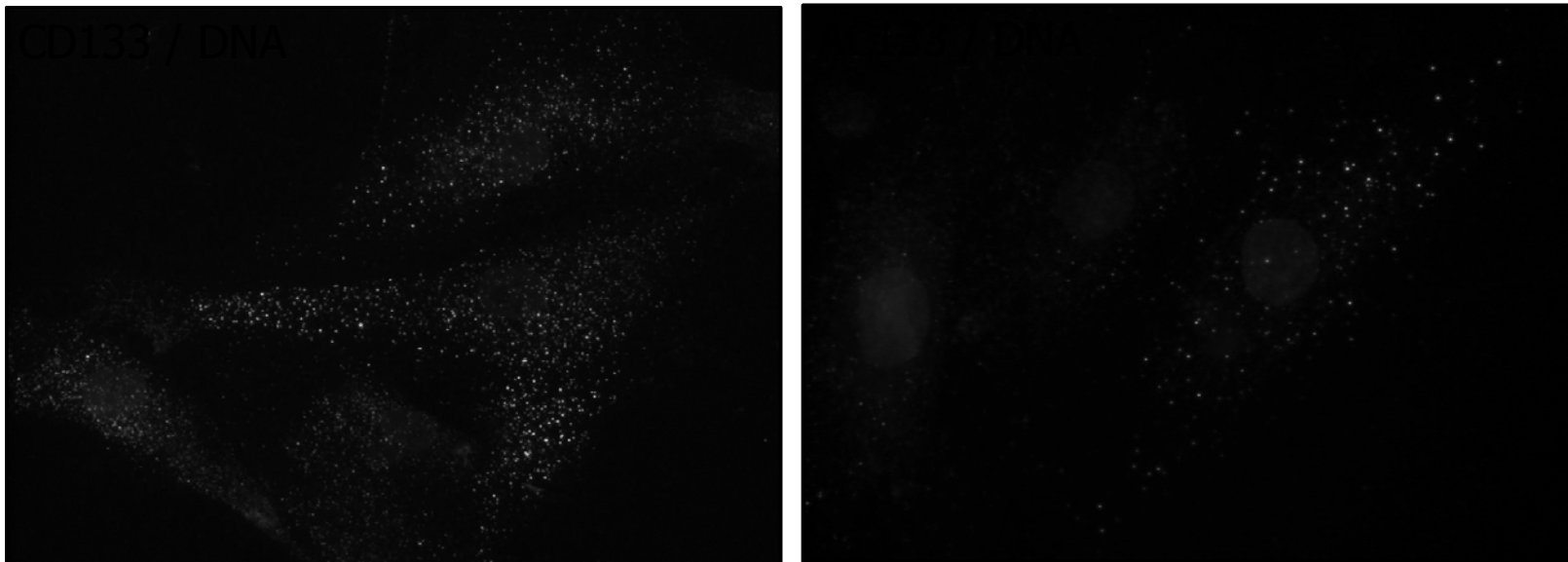
## CD133 (Prominin-1)

- membránový glykoprotein (5-TM family)  
865 AA, 97 kDa
- apikální strana epitelí, membránové vezikly
- SCs i CSCs: organizace membránových protruzí
- účast v regulační dráze potlačující diferenciaci (?)



## CD133 (Prominin-1)

- AC133 – glykosylovaná forma
- epitop AC133: specifický pro CSCs  
přístupný v závislosti na glykosylaci

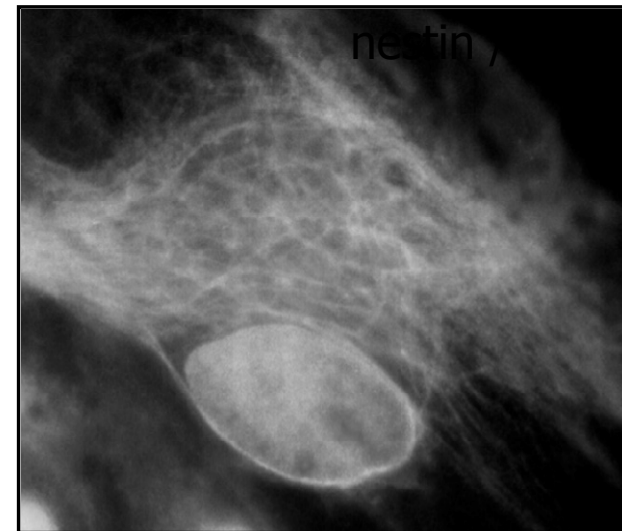
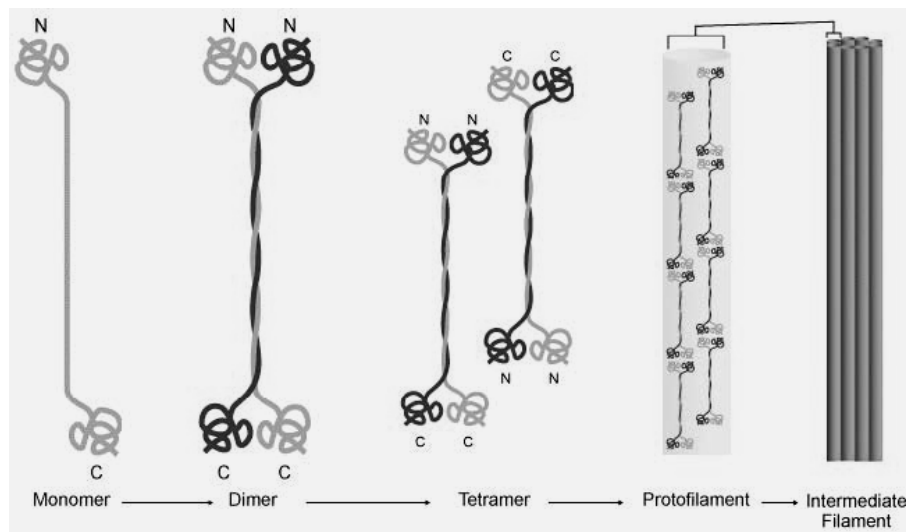


Osteosarkomová buněčná linie OSA-02

## Nestin

= Neuronal Stem Cell Protein

- třída VI intermediárních filament (1621 AA, 177 kDa)
- proliferující neuroepitelium během vývoje
- v dospělosti exprese za patologických podmínek





## Markery CSCs u sarkomů

### Osteosarkom

- zhoubný nádor skeletu  
(4-5 případů na 1 milion obyvatel ročně)
- CD133, nestin, Oct3/4, Nanog, ALDH, ABCG2, CXCR4(?)



### Rhabdomyosarkom

- zhoubný nádor svalové tkáně, nejčastější u dětí  
(5-8 případů na 1 milion dětí do 15 let ročně)
- CD133, nestin, ALDH, ABCG2, CXCR4(?)





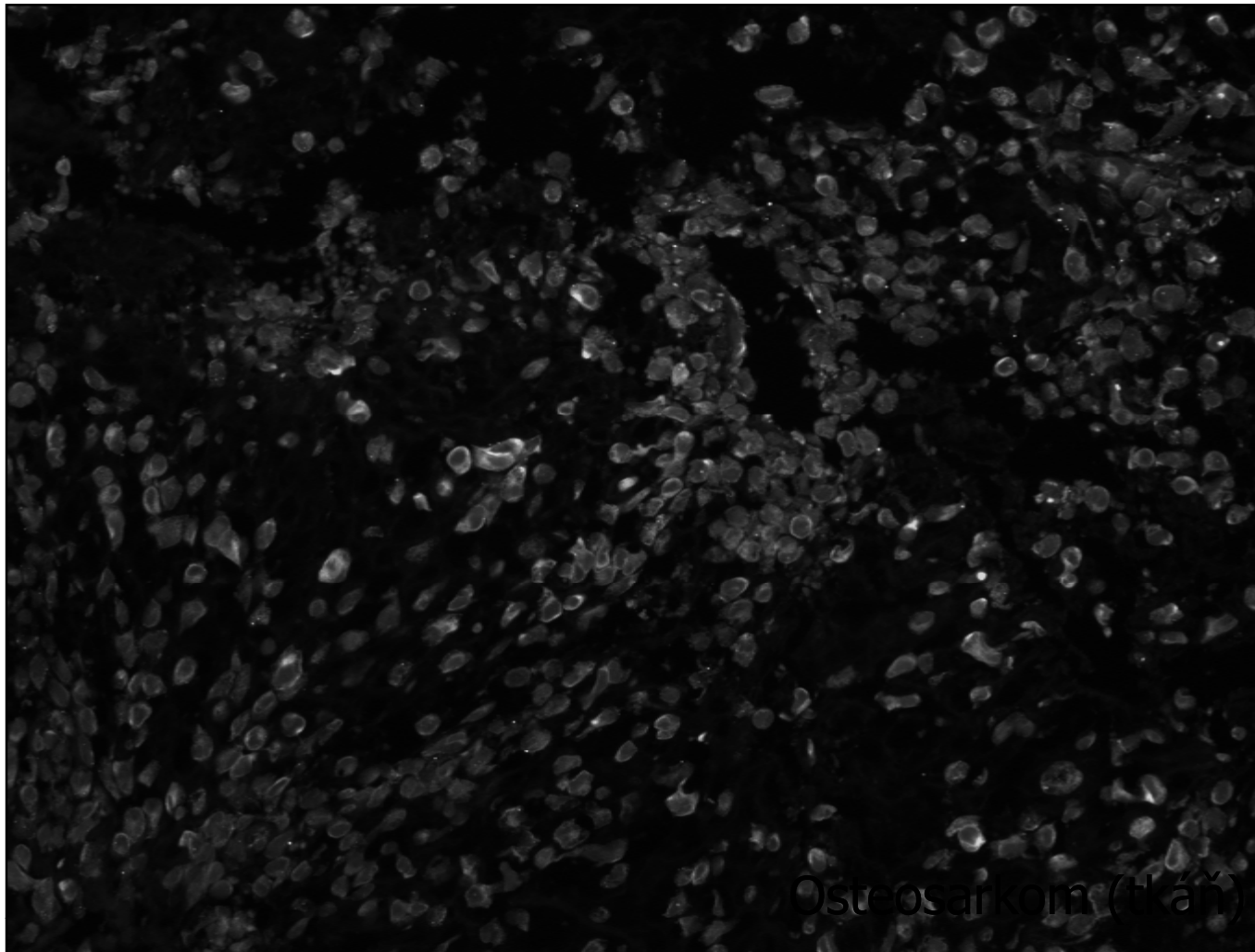
M/15  
Nestin



Osteosarkom (tkáň)

40

F/14  
Nestin

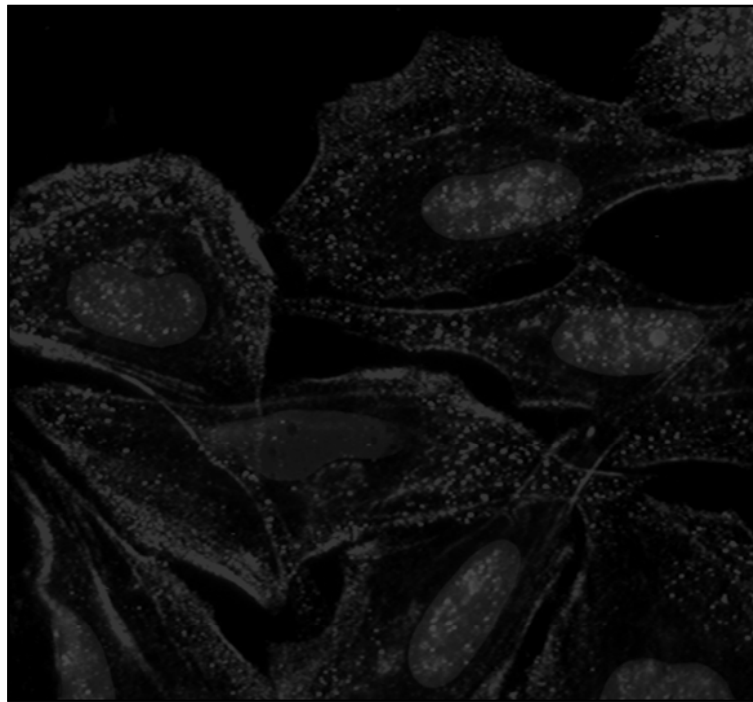


Osteosarkom (tláň)

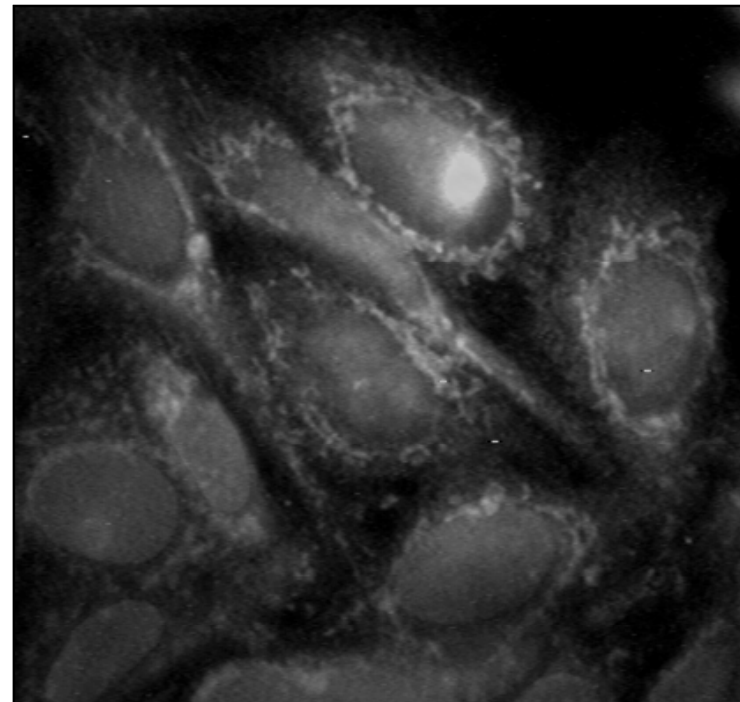
---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 09 / 14.4.2014

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

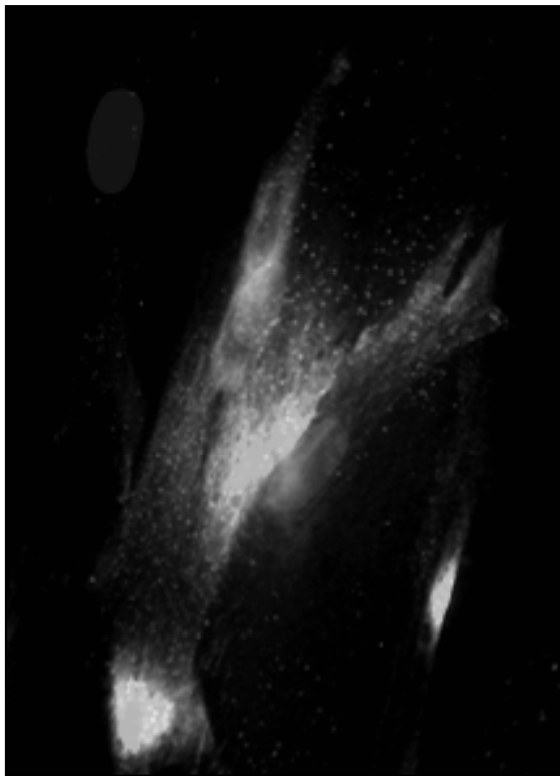


CD133 / DAPI

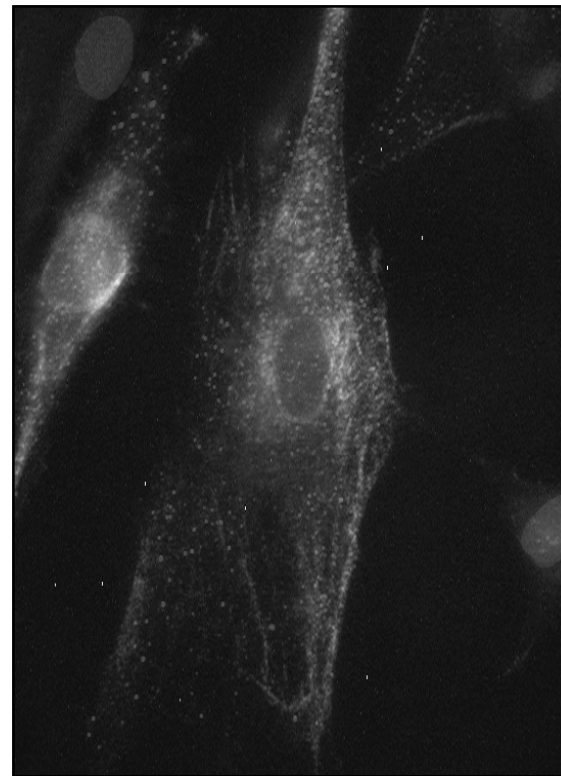


Nestin / DAPI

## Identifikace markerů CSCs v sarkomových buněčných liniích



Rhabdomyosarkom

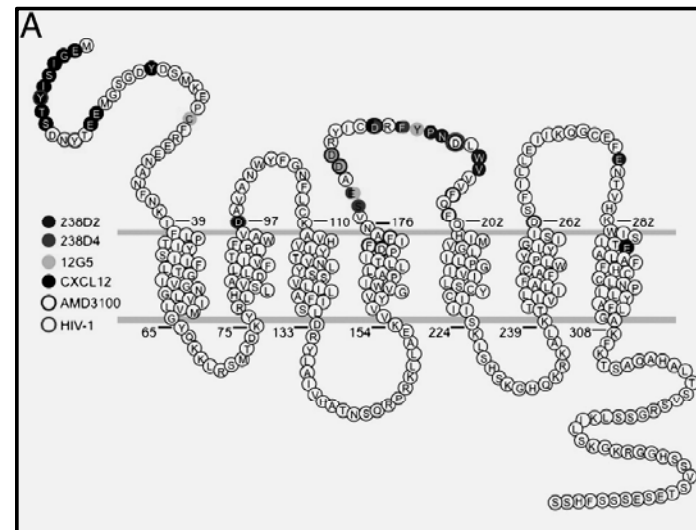
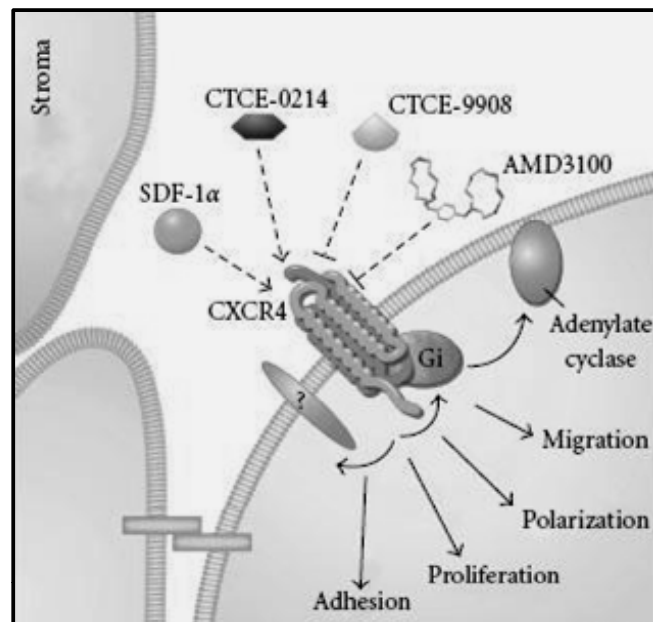


Osteosarkom

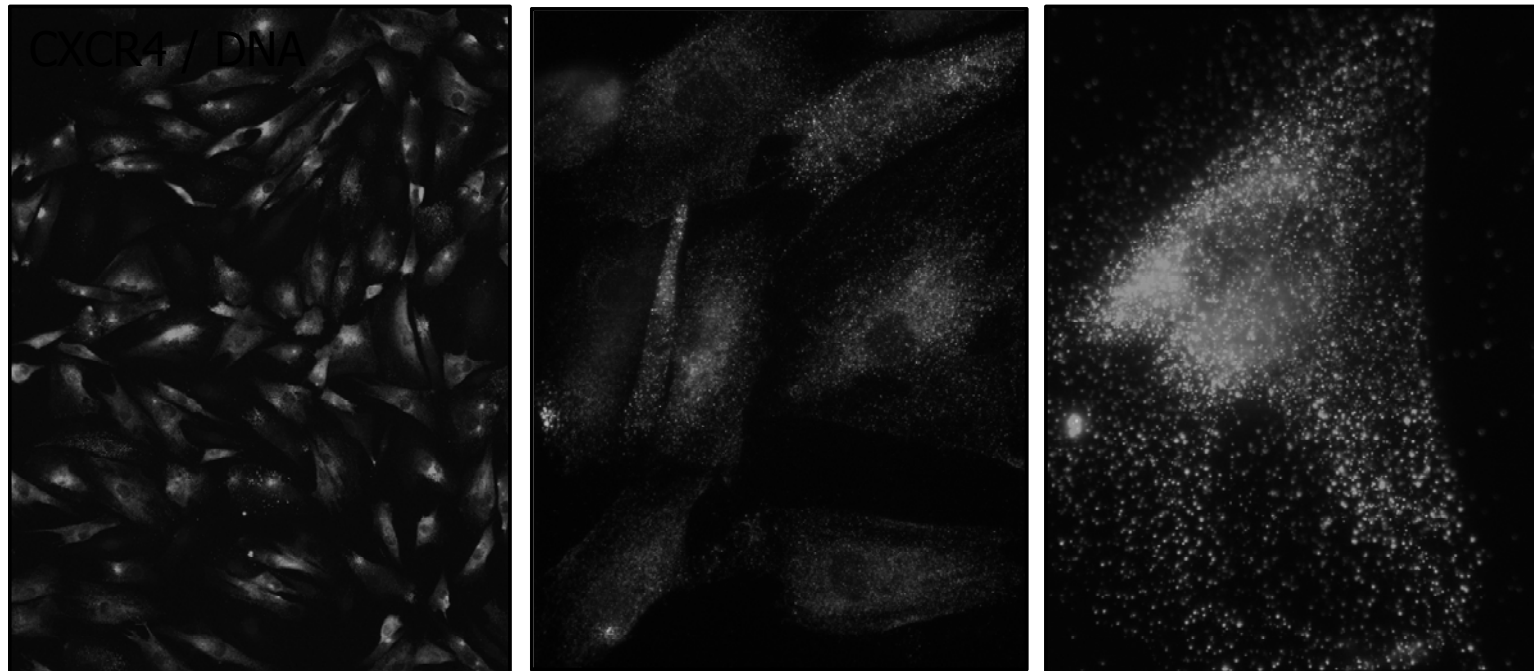
CD133  
Nestin

## CXCR4 (CD184, fusin)

- chemokinový receptor pro ligand SDF-1 (CXCL 12)  
352 AA, 40 kDa
- exprese za fyziologického stavu i v důsledku působení stresových faktorů
- embryonální i adultní SCs, CSCs



## Identifikace CXCR4/SDF-1 v sarkomech

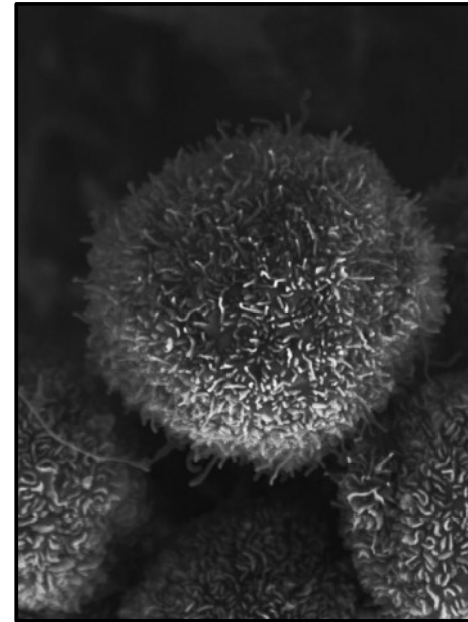
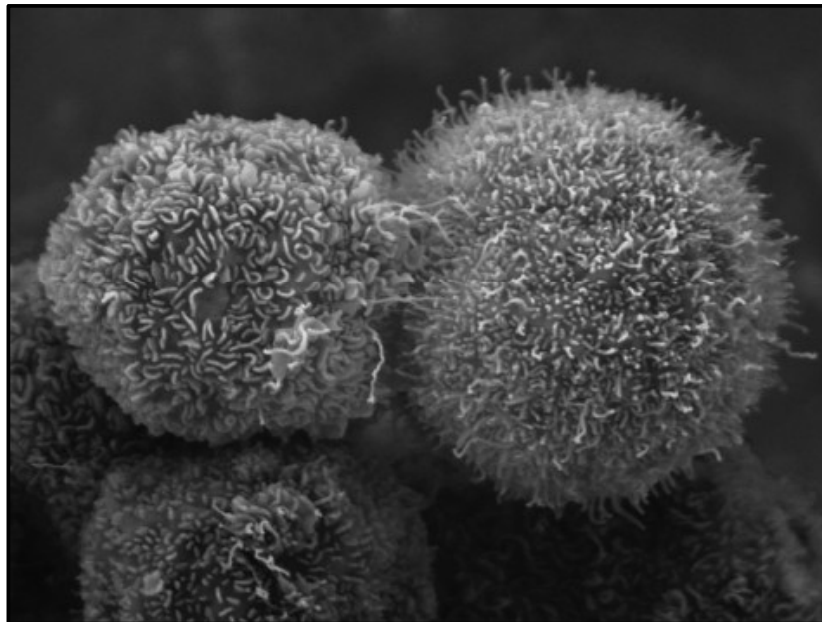


Rhabdomyosarkomová buněčná linie NSTS-11

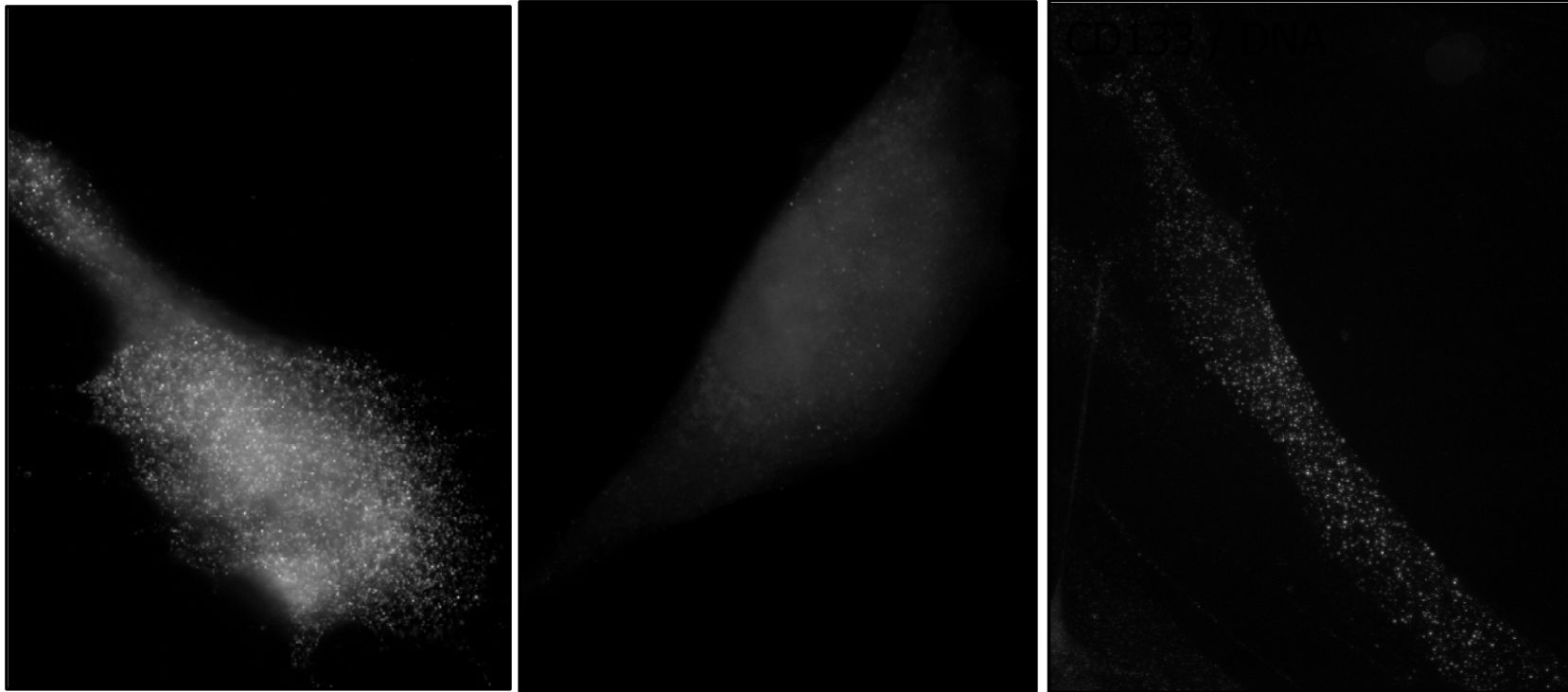


## Markery CSCs u karcinomu pankreatu

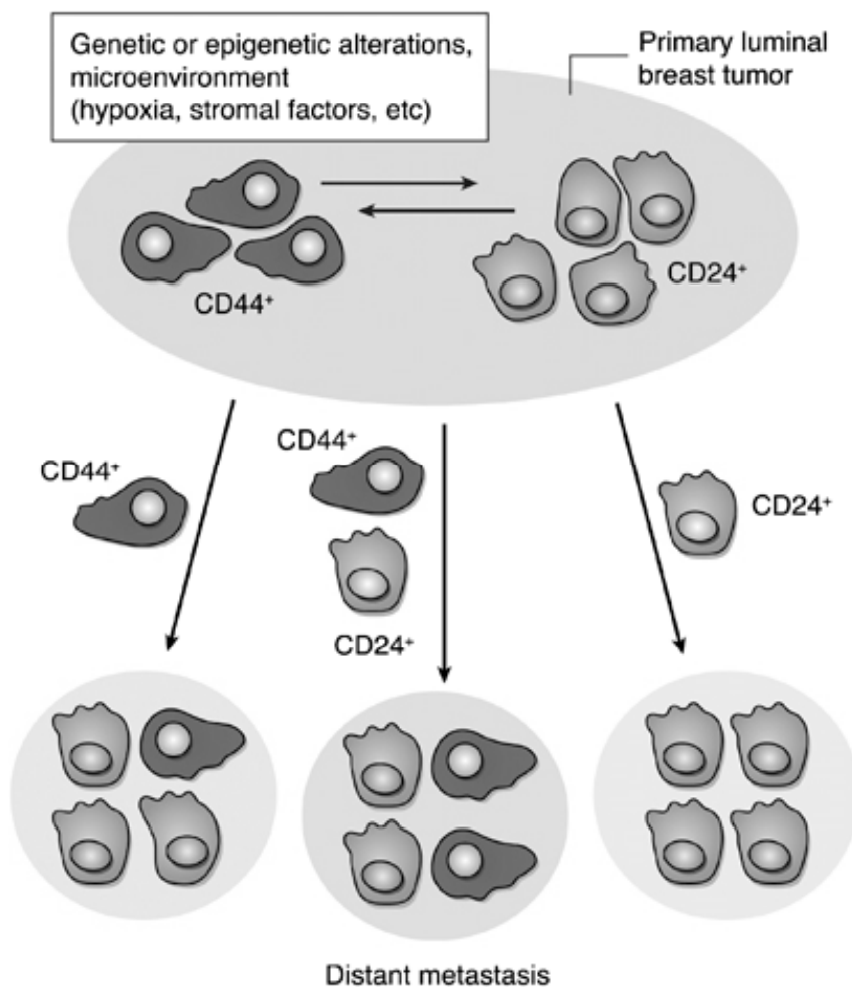
- 110-150 případů na 1 milion obyvatel ročně
- CD24, CD44, ESA, Ep-CAM  
ALDH1, CXCR4, CD133, nestin



## Detekce markerů CSCs u adenokarcinomu pankreatu



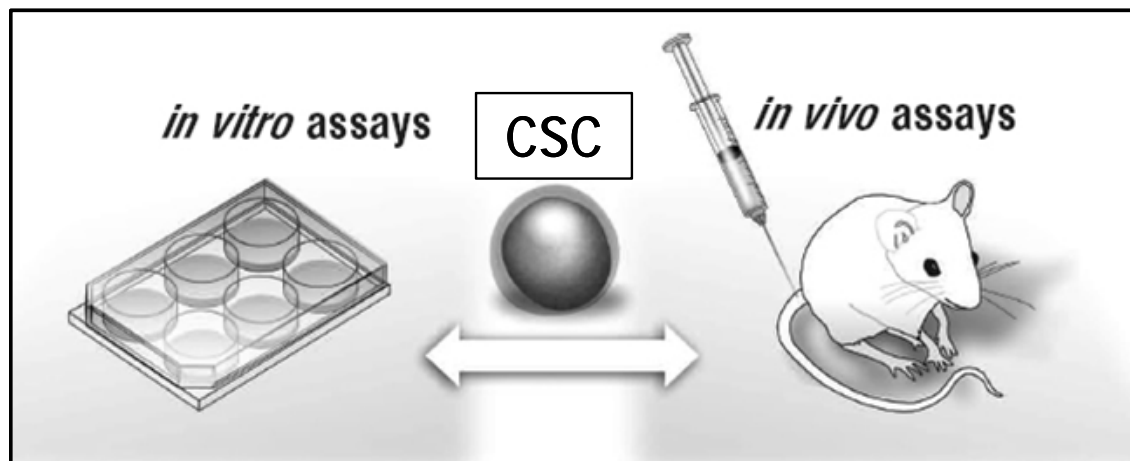
Pankreatická buněčná linie P06



Možné fenotypové rozdíly mezi primárním nádorem a metastázami: karcinom prsu

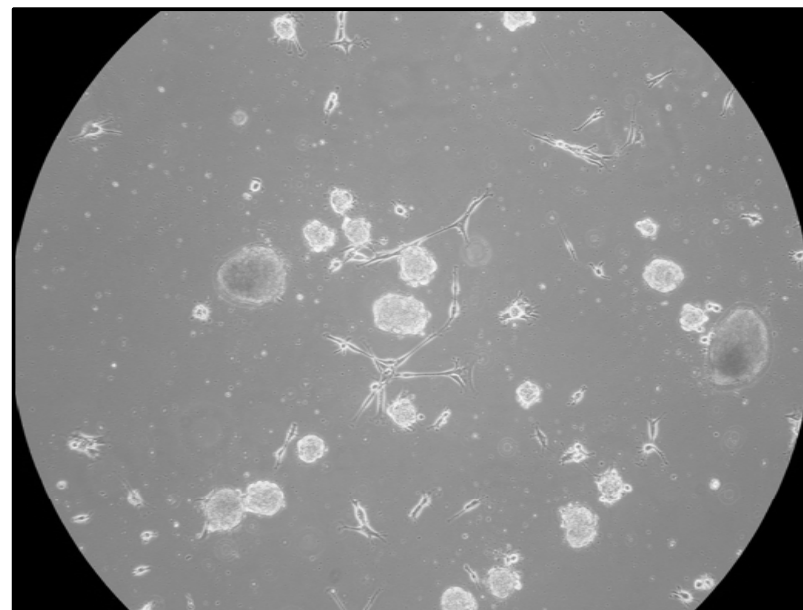
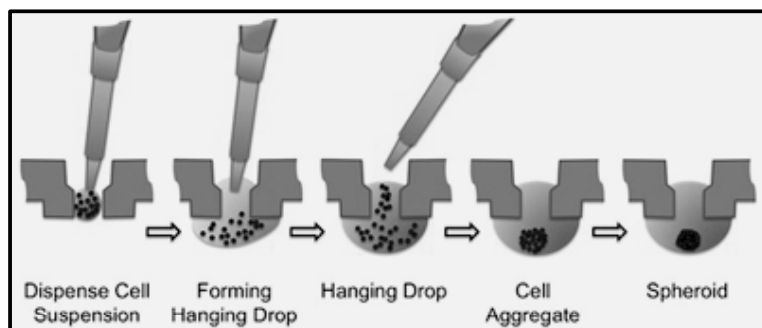
## Funkční testy fenotypu CSCs

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



## Tvorba agregátů (aggregation assay)

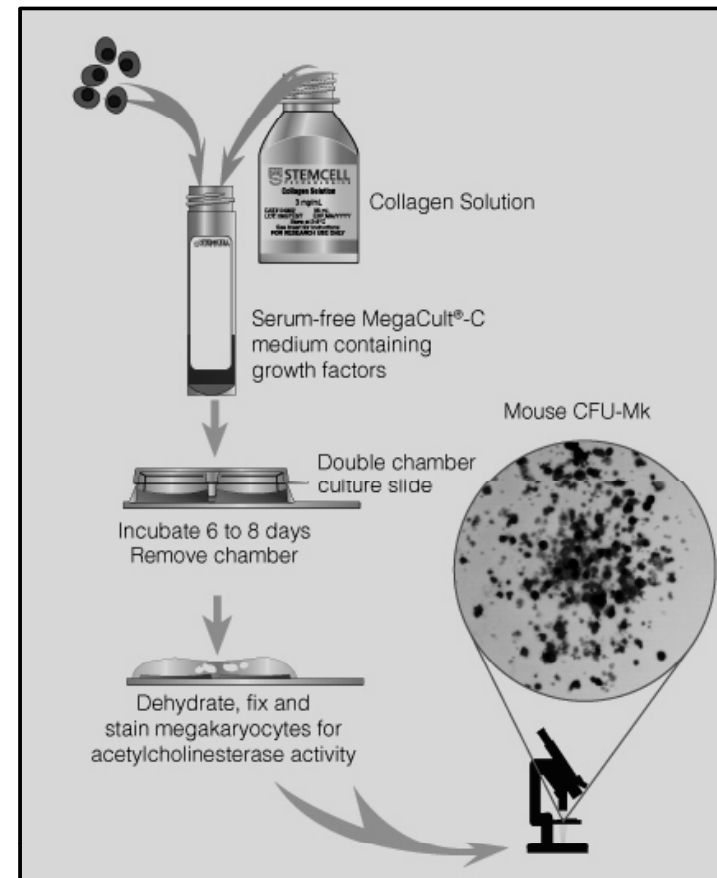
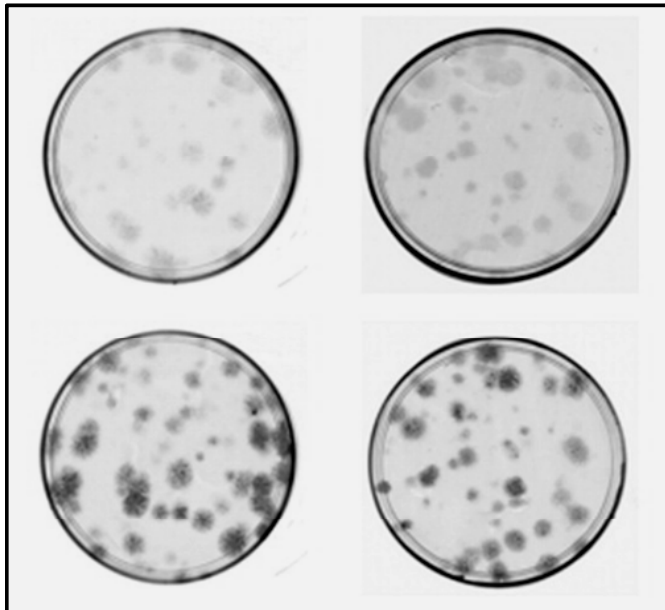
- kultivace buněčných suspenzí v nádobkách s neupraveným povrchem nebo metoda visících kapek (hanging drops)



Linie OSA-02

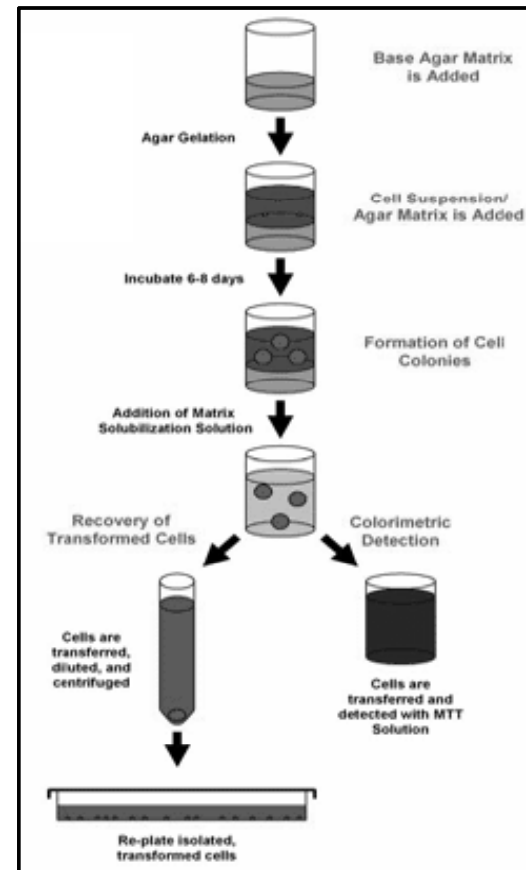
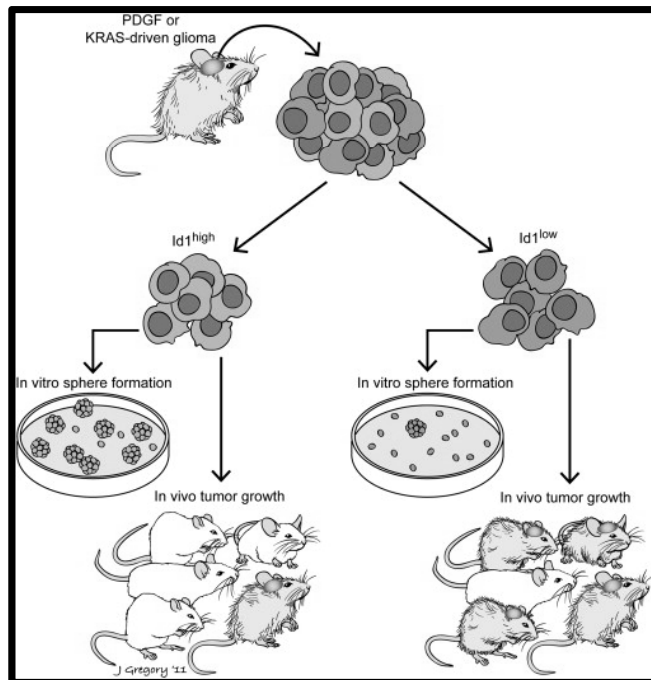
## Tvorba kolonií (colony-forming assay)

- vyšetí nařaděné buněčné na kulturační misky  
→ vytváření kolonií



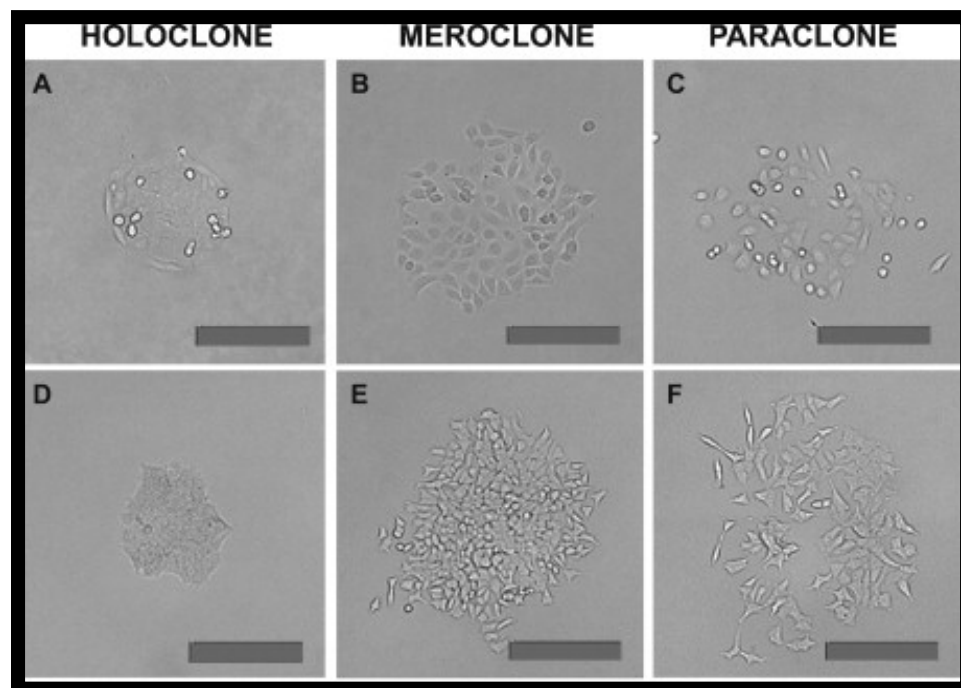
## Tvorba sfér (sphere-formation assay)

- vyšetí nařaděné buněčné suspenze do měkkého agaru → vytváření kolonií



## Testy klonogenity (clonogenicity assay)

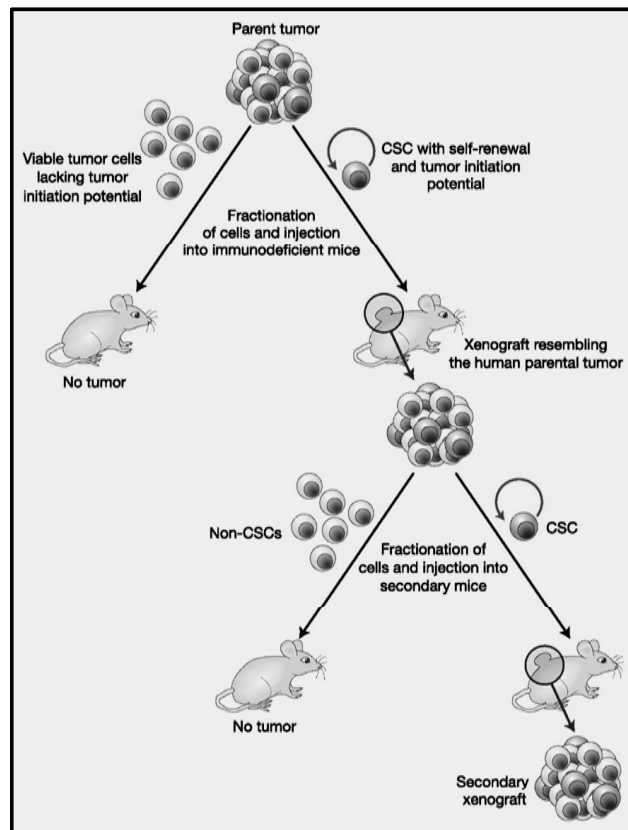
- inokulace izolovaných buněk do 96-jamkových destiček, proliferace a tvorba kolonií (>50 buněk)
- holoklony, meroklony, paraklony



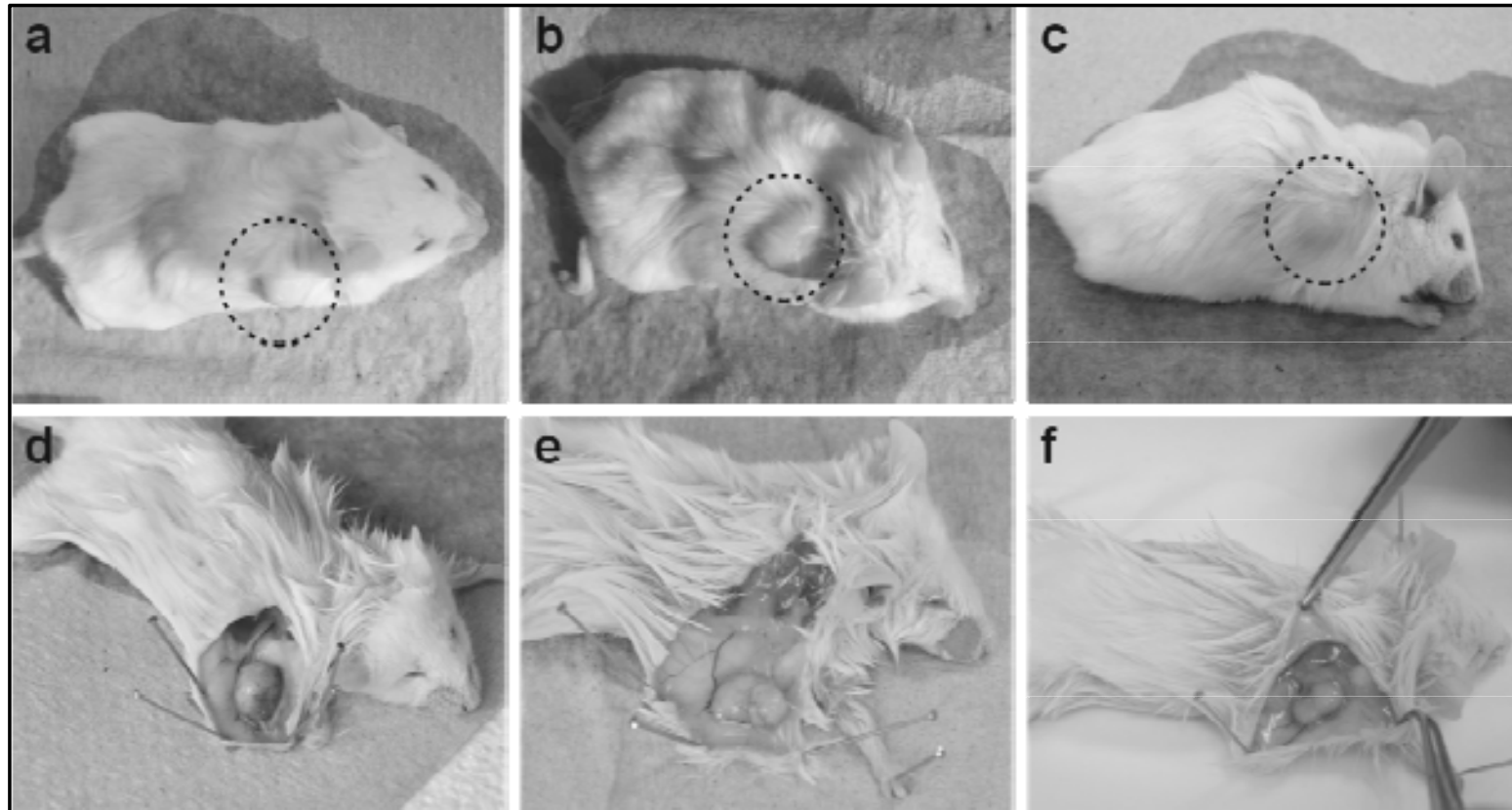


## Testy tumorigenicity (tumorigenicity assay)

- subkutánní injekce buněčné suspenze myším
- monitorování růstu nádorů, histologická analýza



## Rhabdomyosarkomová linie NSTS-11: test tumorigenicity v NOD/SCID myších

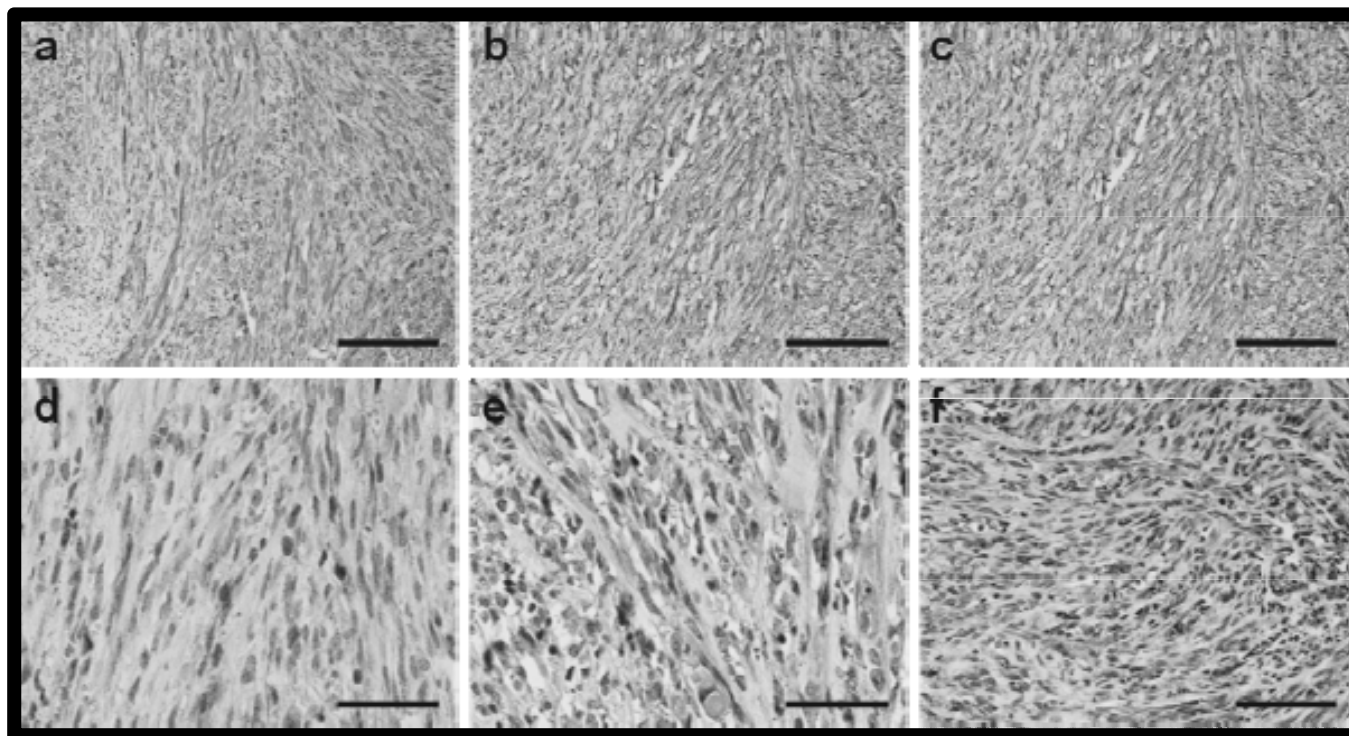


# Rhabdomyosarkomová linie NSTS-11: IHC analýza xenograftů

M3A138

M3B138

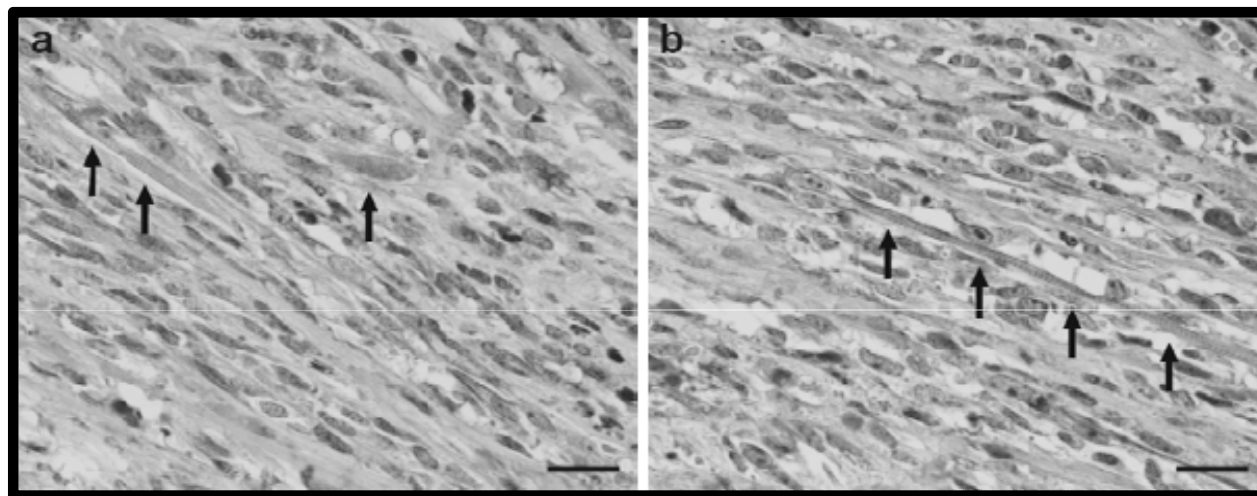
M3C138



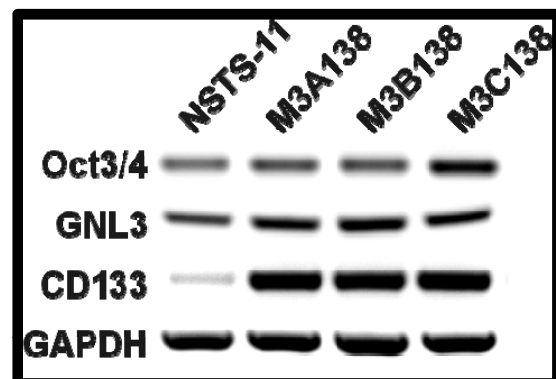
nestin

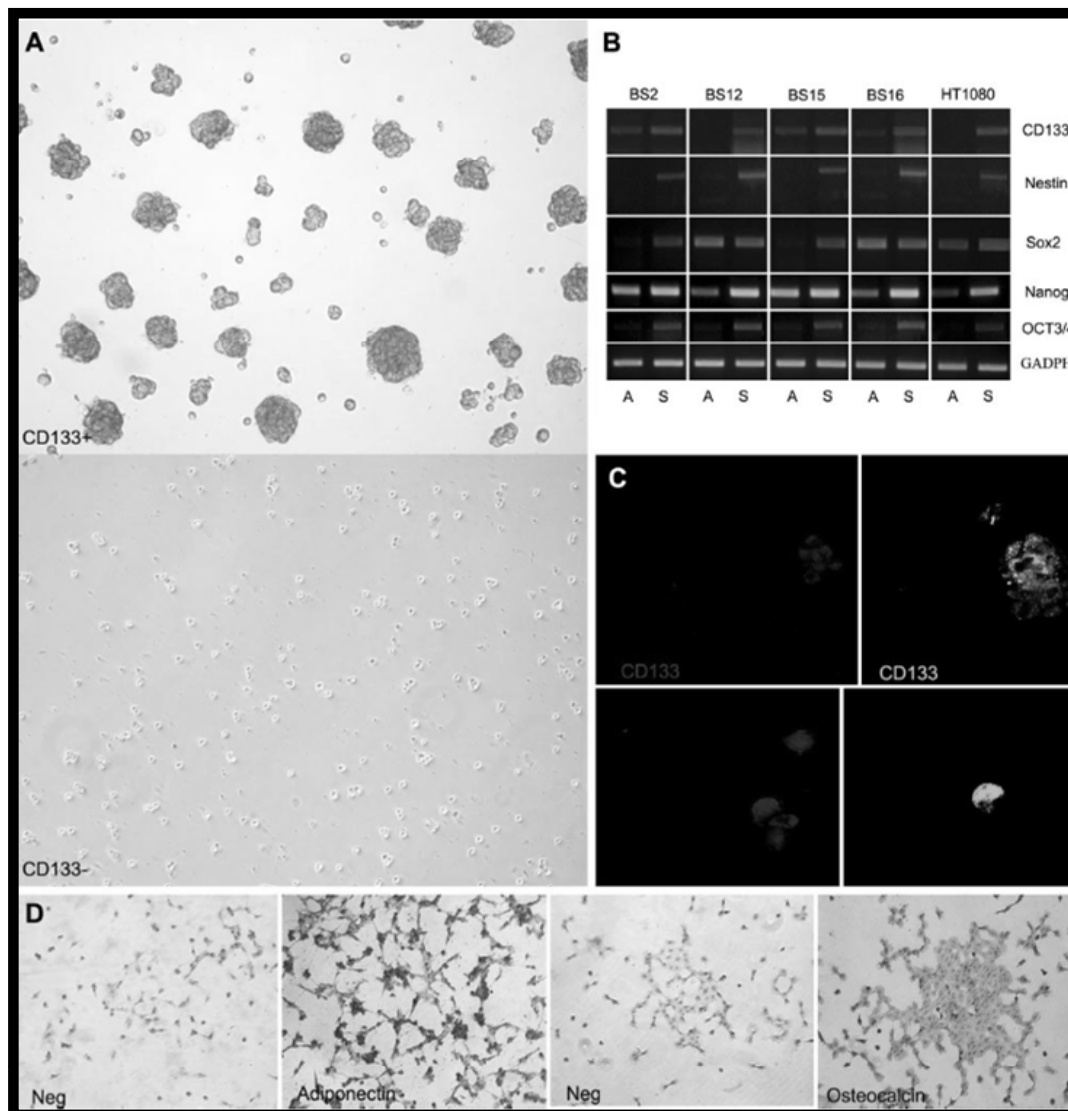
CD133

## Rhabdomyosarkomová linie NSTS-11: IHC analýza xenograftů



M3A138

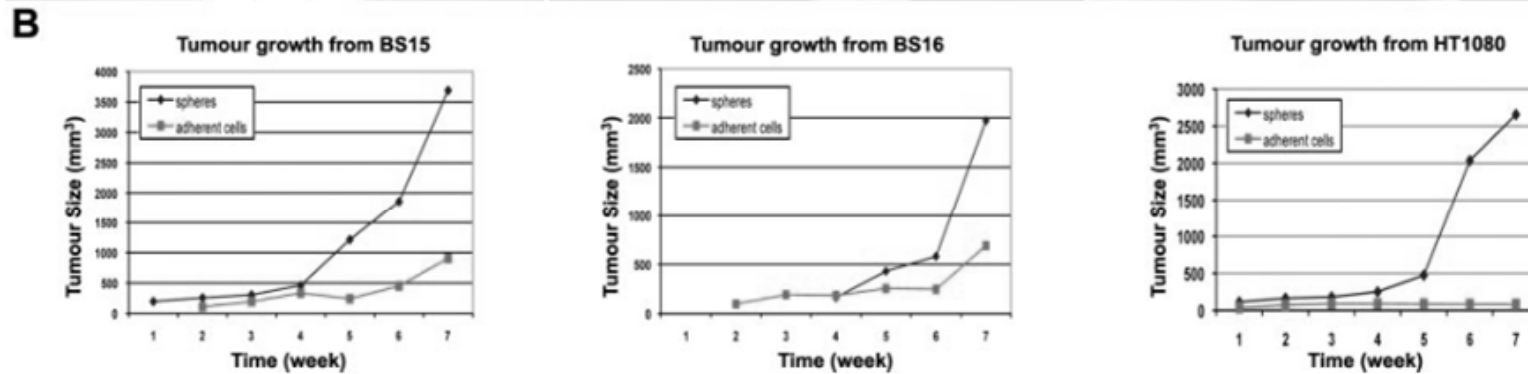
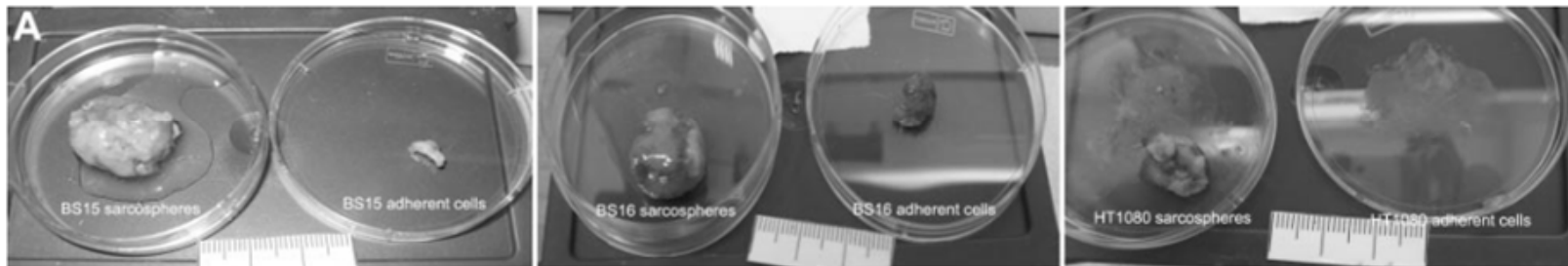




## Příklad komplexní analýzy CSCs *in vitro* (osteosarkom)

(Tirino et al.,  
FASEB J, 2011)

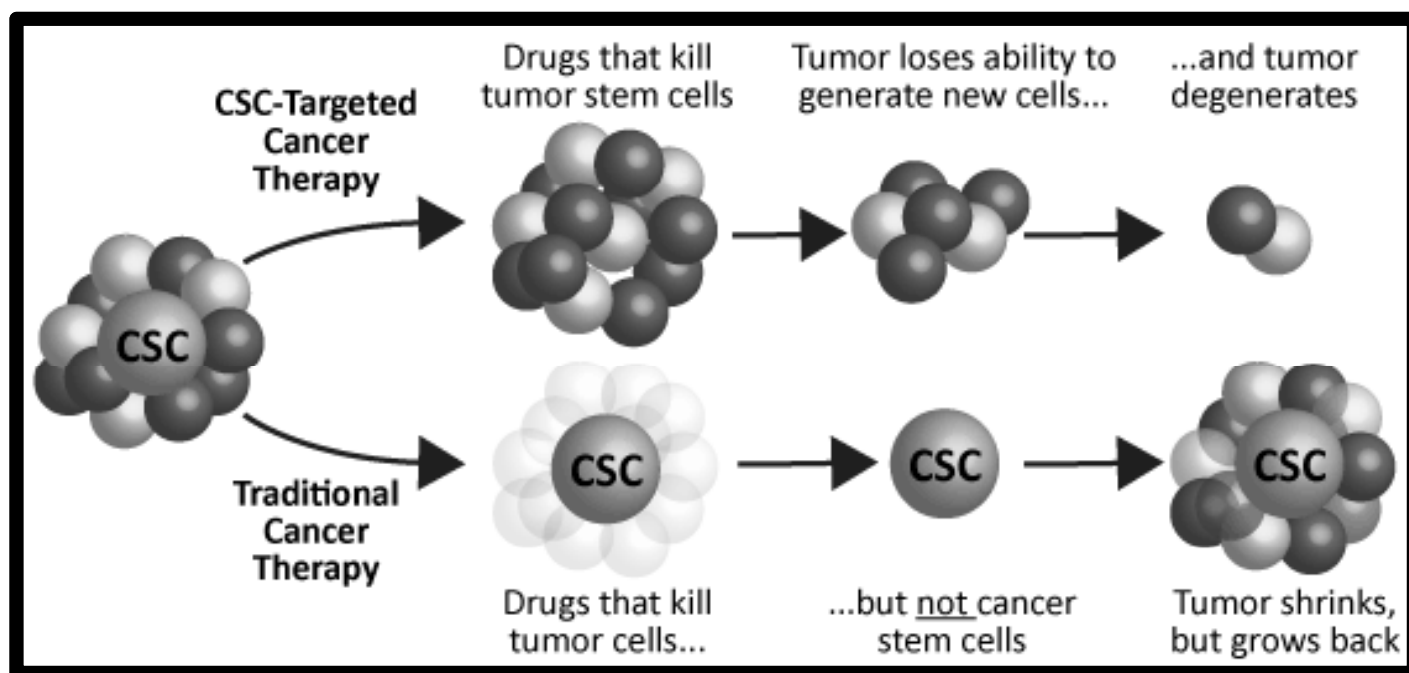
## Příklad komplexní analýzy CSCs *in vitro* (osteosarkom)



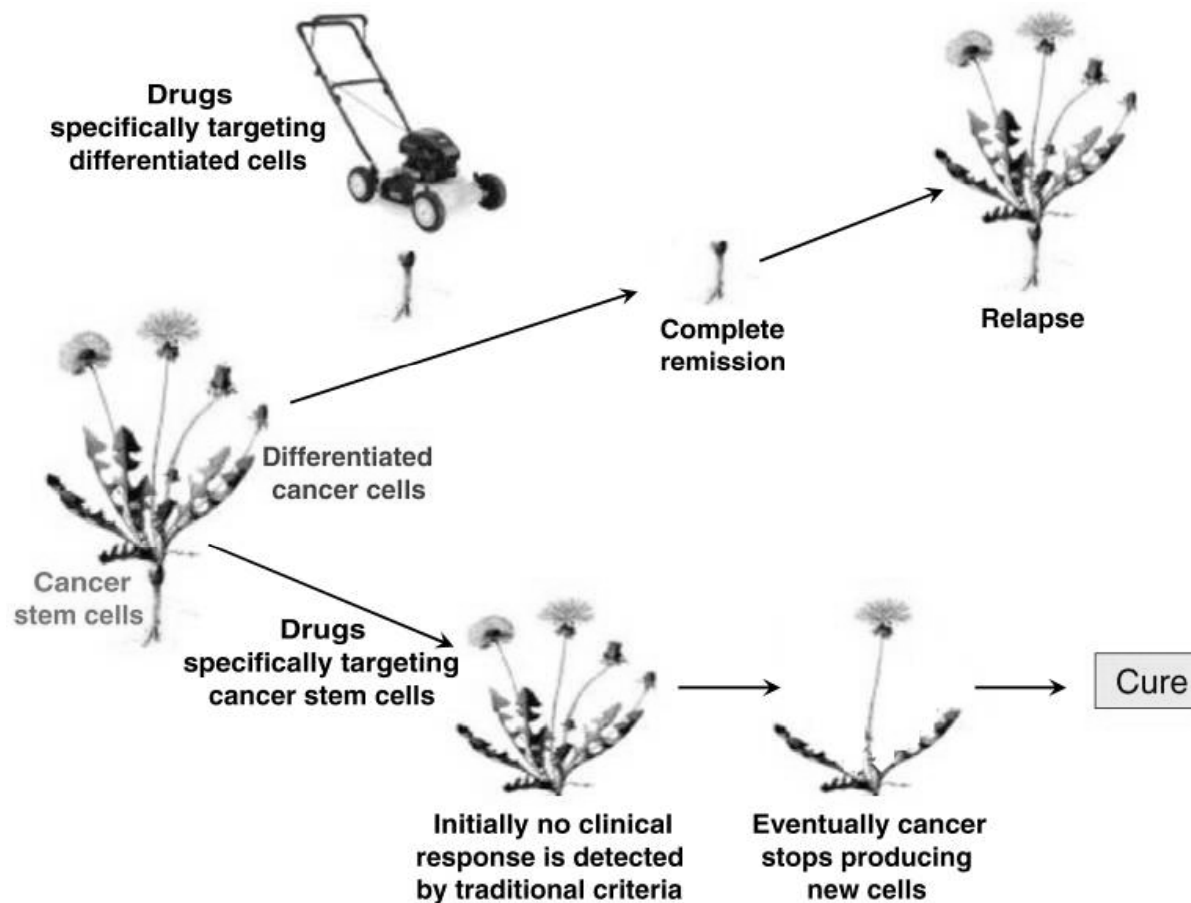
(Tirino et al., FASEB J, 2011)

## Důsledky "paradigmatu CSCs" pro léčbu nádorů:

- selhání klasické protinádorové léčby (chemorezistence a radiorezistence CSCs)



## Konvenční vs. cílená protinádorová léčba:





## Mechanismy chemorezistence CSCs:

- účinná schopnost reparace DNA
- variabilní exprese a fosforylace kináz
- nízká proliferační aktivita (Ki67 index)
- aktivní mechanismy "multidrug resistance" (exprese ABC transportérů)

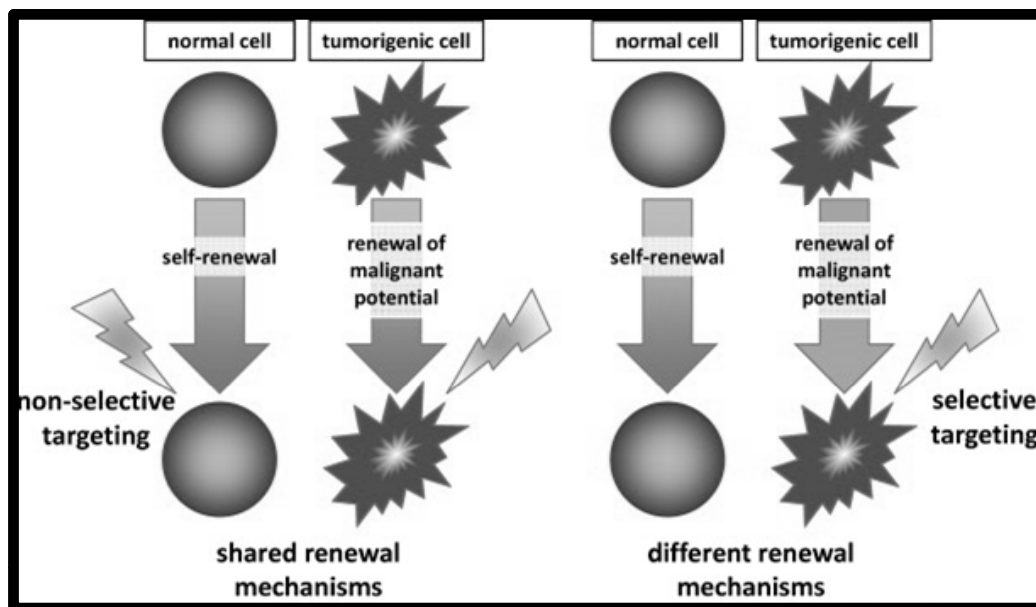
## Mechanismy radiorezistence CSCs:

- účinná schopnost reparace DNA
- nízká proliferační aktivita (Ki67 index)
- overexprese antiapoptotických genů

## Možné strategie léčby cílené proti CSCs:

- ovlivnění interakcí mezi CSCs a mikroprostředím
- indukovaná diferenciace
- ovlivnění signálních drah udržujících sebeobnovu

Riziko: poškození adultních SCs v nenádorové tkáni

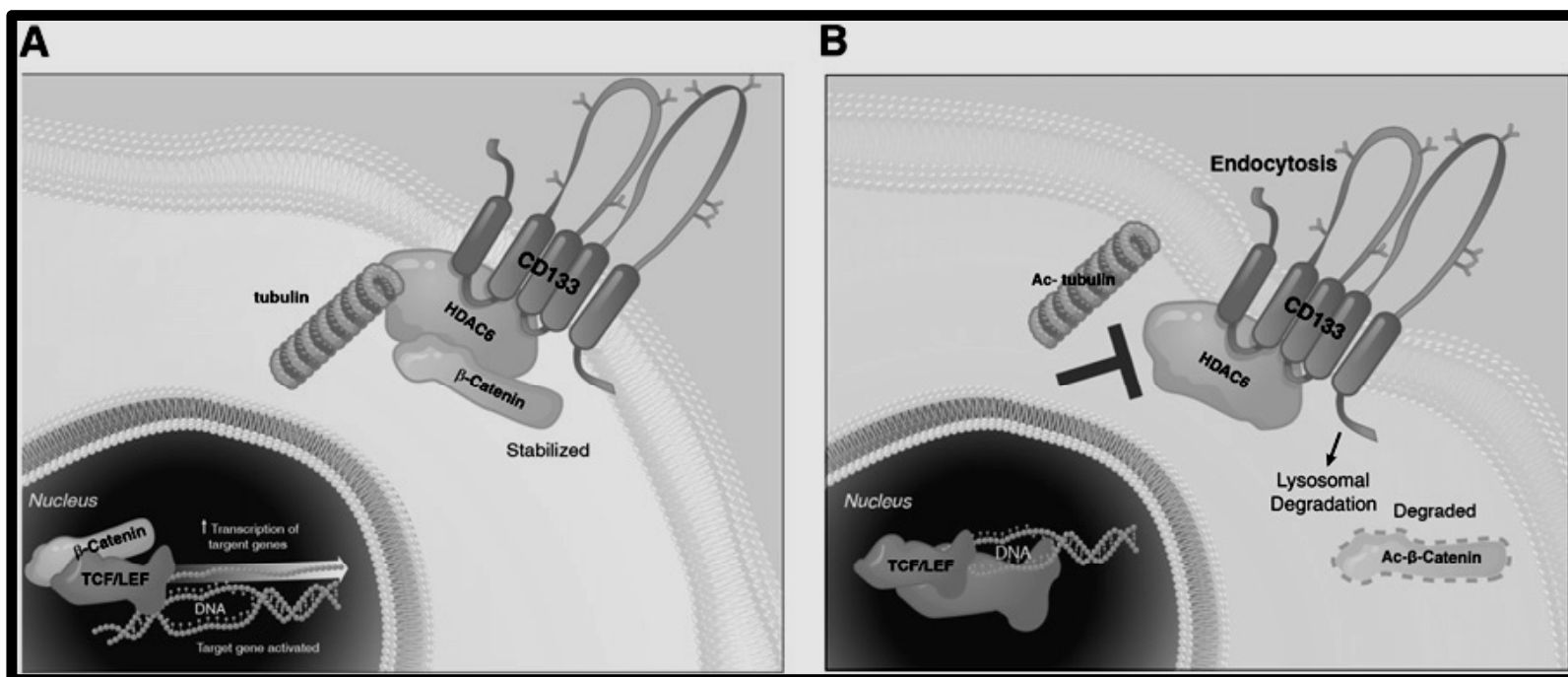


Příklady konkrétních strategií léčby  
cílené proti CSCs:

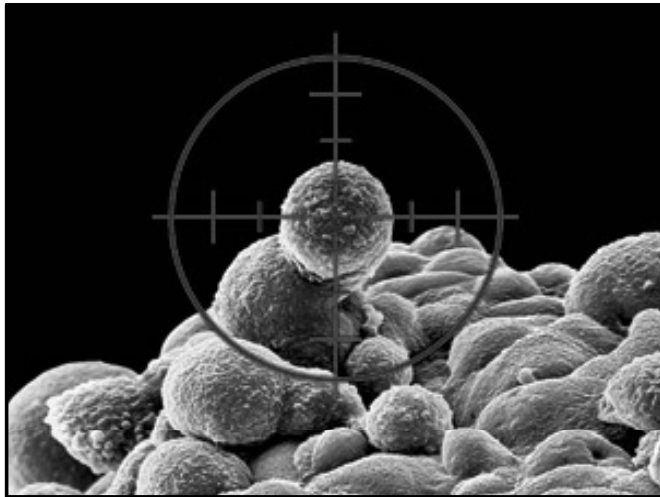
- onkolytická virová terapie s využitím modifikovaných adenovirových vektorů proti CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> buňkám – karcinom prsu
- anti-EpCAM monoklonální protilátka – karcinom pankreatu
- ATRA-indukovaná diferenciaci – neuroblastom

## Hypotéza: interakce CD133/HDAC6/ $\beta$ -catenin

- využití inhibitorů histonových deacetyláz – degradace  $\beta$ -cateninů?



Mak *et al.*, Cell Rep 2012



Review

Cell  
PRESS

## Pharmacogenomics and cancer stem cells: a changing landscape?

Francesco Crea<sup>1</sup>, Maria Ana Duhagon<sup>2</sup>, William L. Farrar<sup>3</sup> and Romano Danesi<sup>1</sup>

### STEM CELLS

#### TRANSLATIONAL AND CLINICAL RESEARCH

#### Concise Review: Stem Cells As an Emerging Platform for Antibody Therapy of Cancer

RICHARD T. FRANK,<sup>a,b</sup> JOSEPH NAJBAUER,<sup>a</sup> KAREN S. ABOODY<sup>a,c</sup>

### Nanomedicine

April 2012, Vol. 7, No. 4, Pages 597-615, DOI 10.2217/nnm.12.22  
(doi:10.2217/nnm.12.22)

### Review

#### Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine

Serguei Vinogradov\* & Xin Wei