

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 14.4.2014

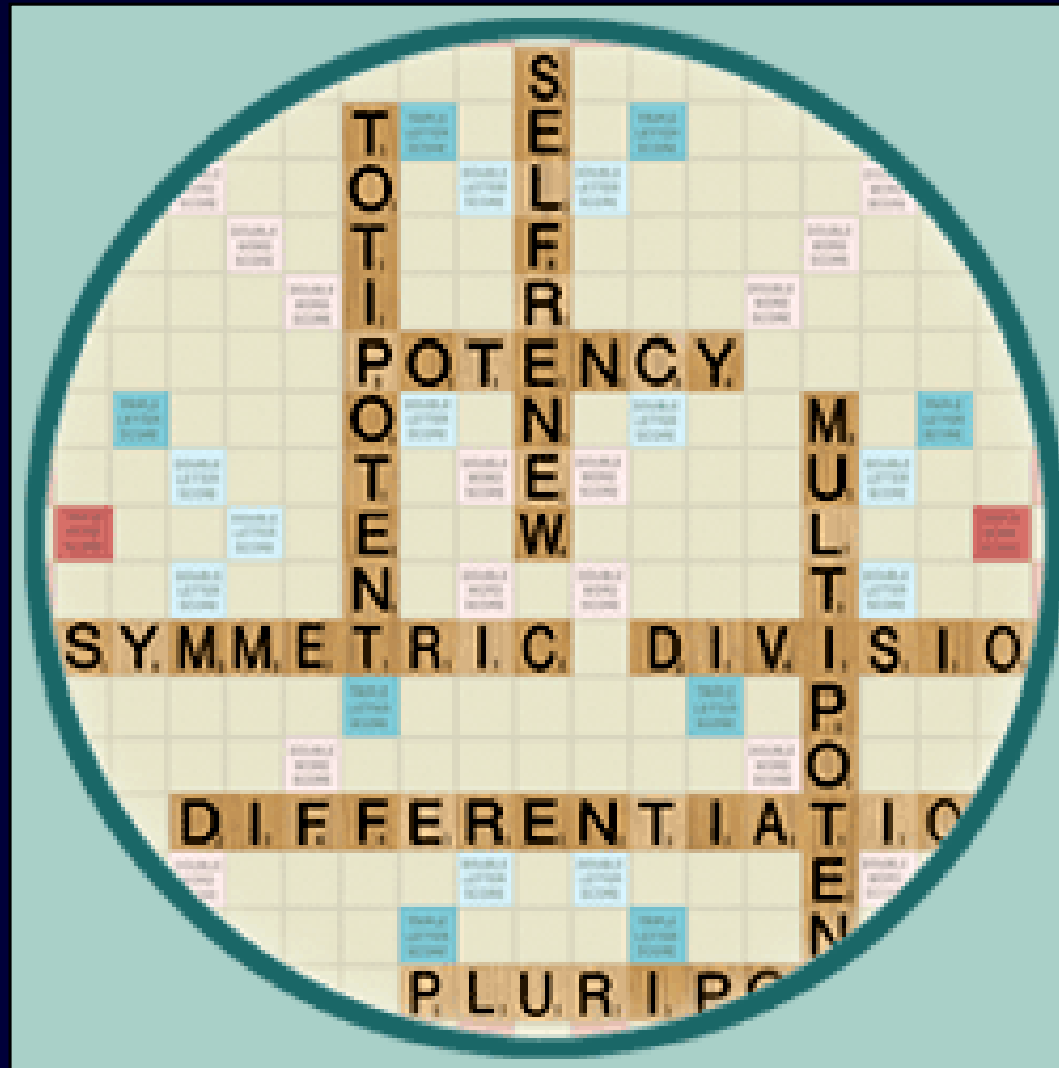
Adultní a nádorové kmenové buňky

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

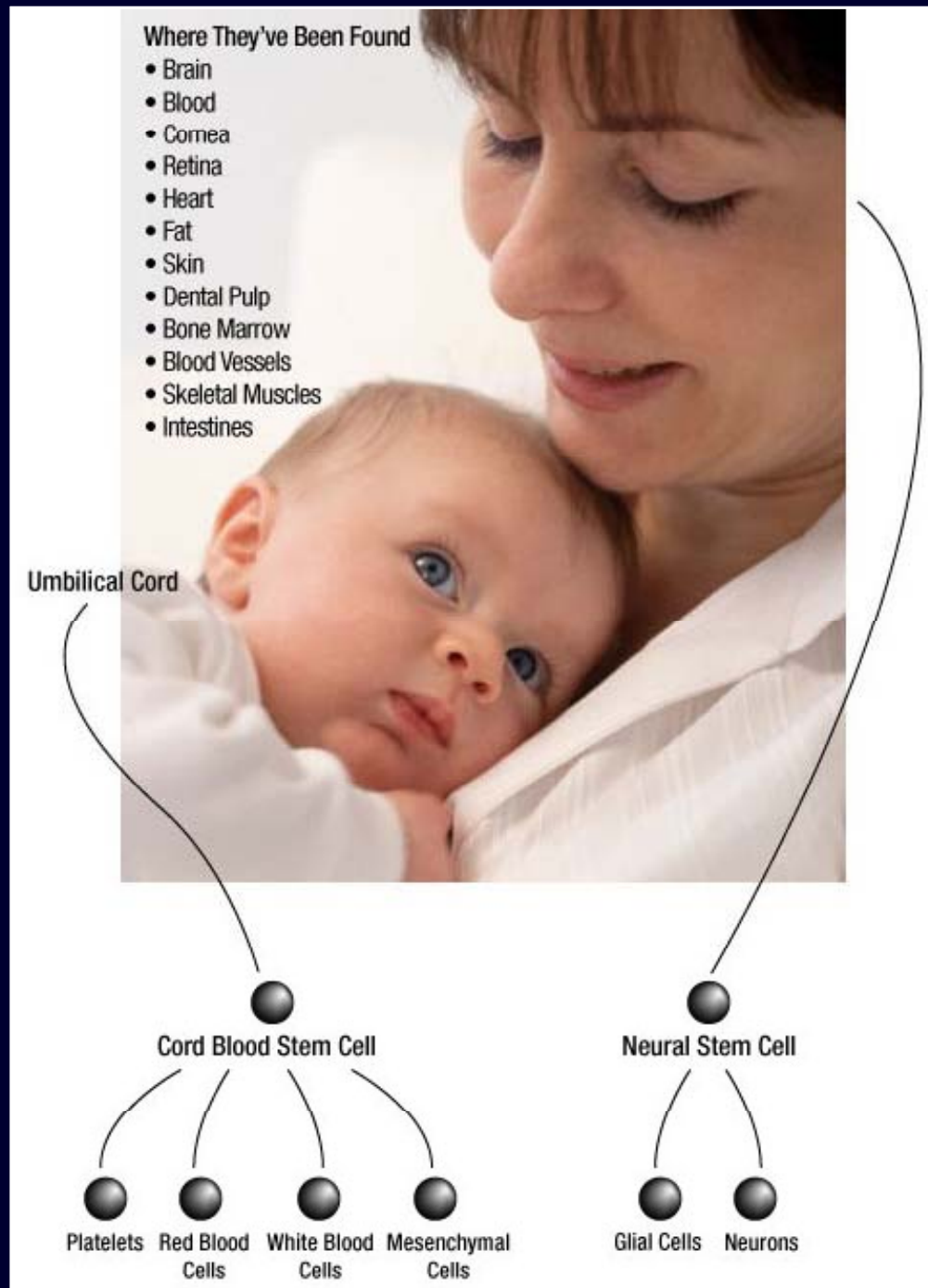
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



Program přednášky:

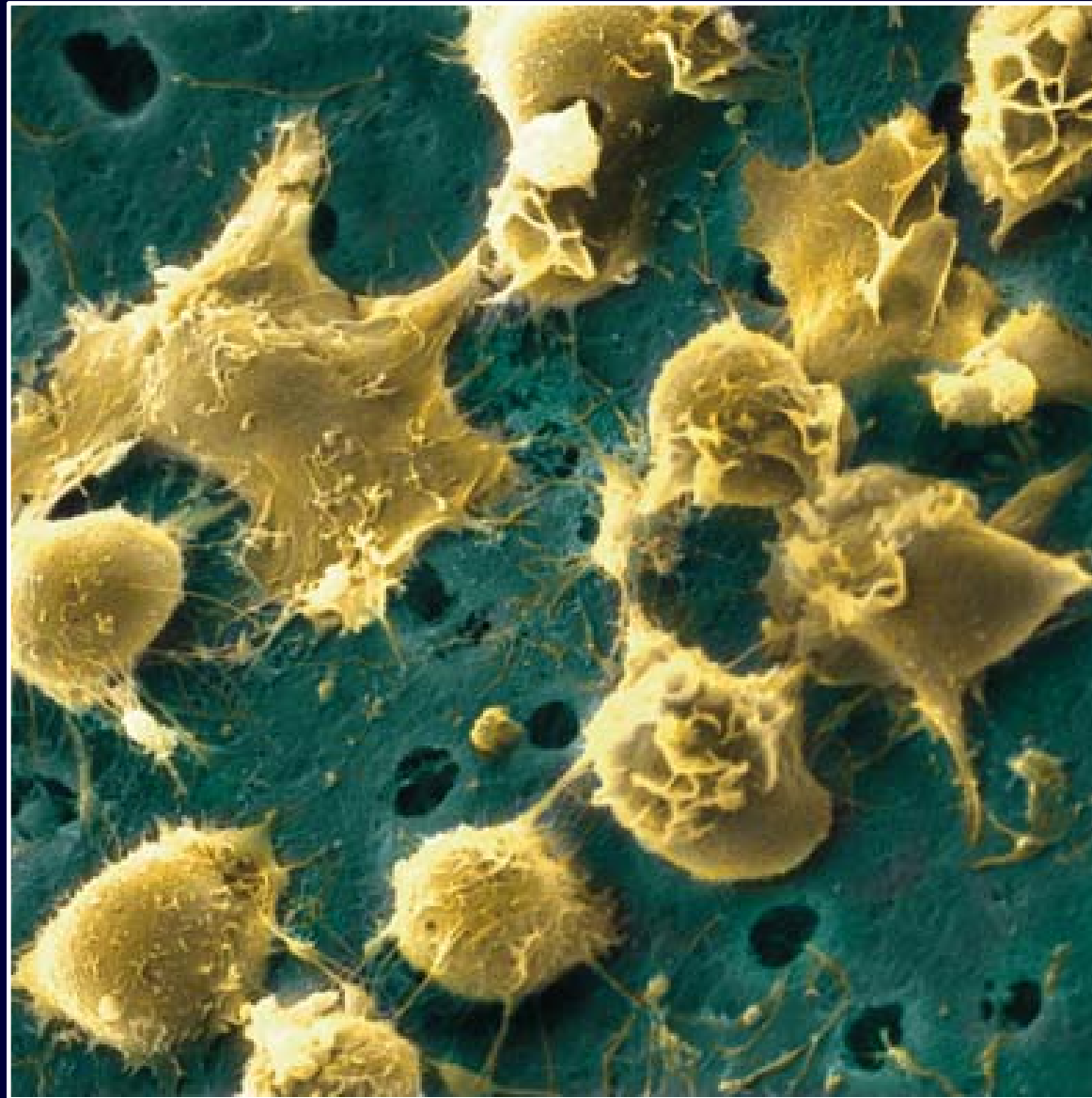
- Adultní kmenové buňky (ASCs)
biologické vlastnosti a diferenciační potenciál
transdiferenciace, EMT
mikroprostředí (niche) ASCs
využití ASCs pro buněčné terapie → 28.4.2014
- Nádorové kmenové buňky (CSCs)
biologické vlastnosti a hypotézy vzniku CSCs
markery CSCs
možnosti cílené protinádorové terapie

ADULTNÍ KMENOVÉ BUŇKY (ADULT STEM CELLS, ASCs)

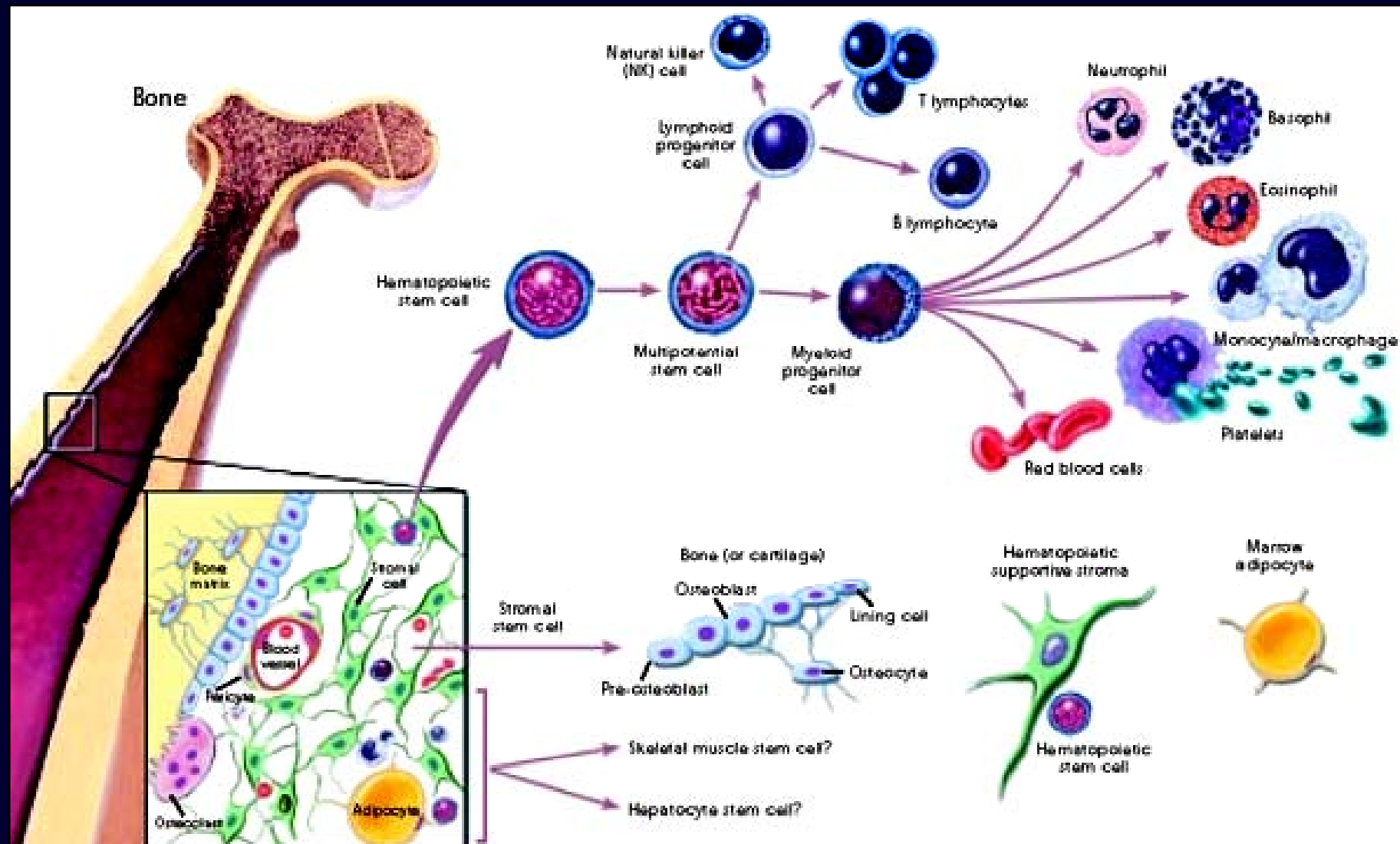


Typy ASCs:

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

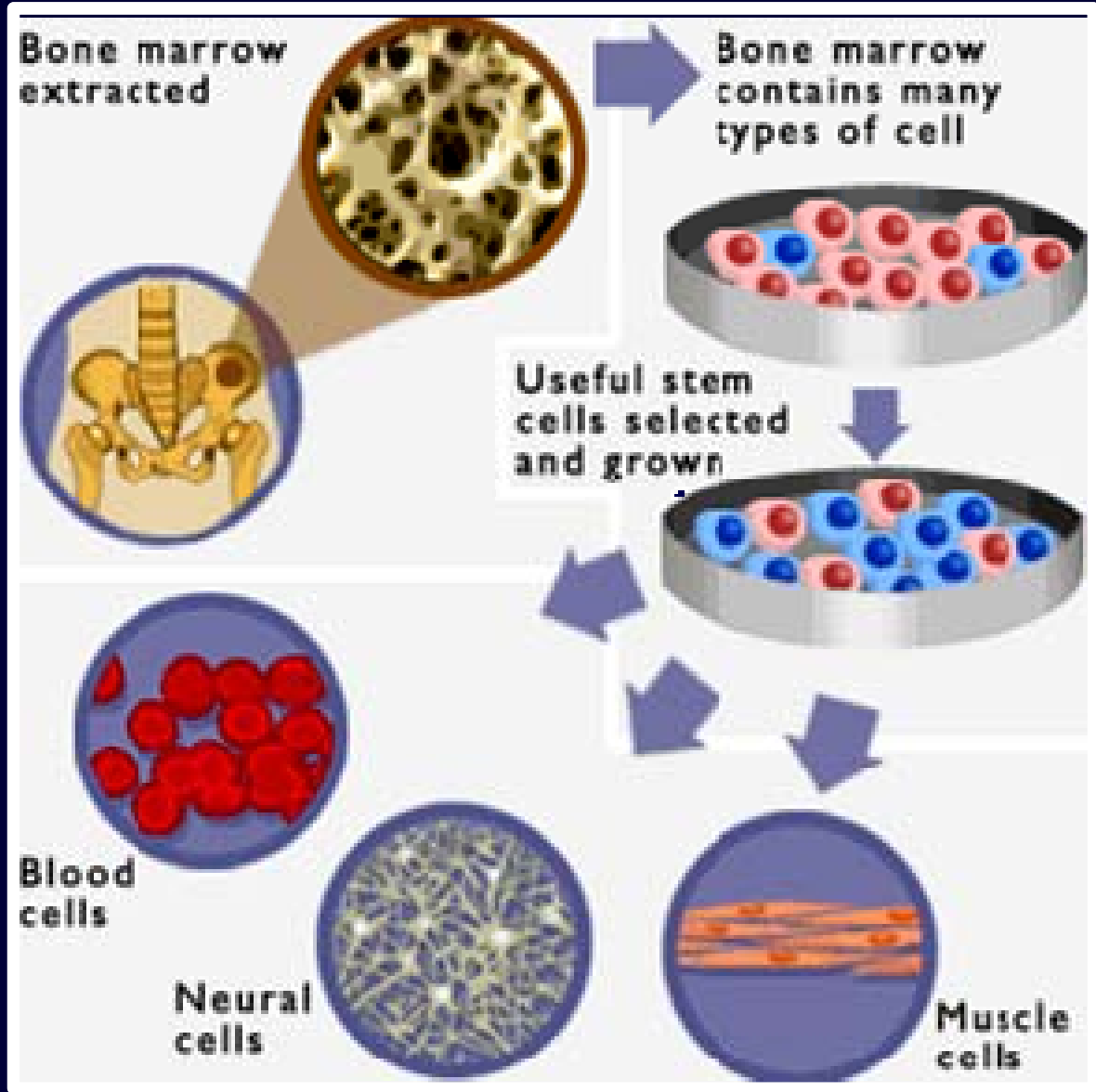


Lidské SCs kostní dřeně

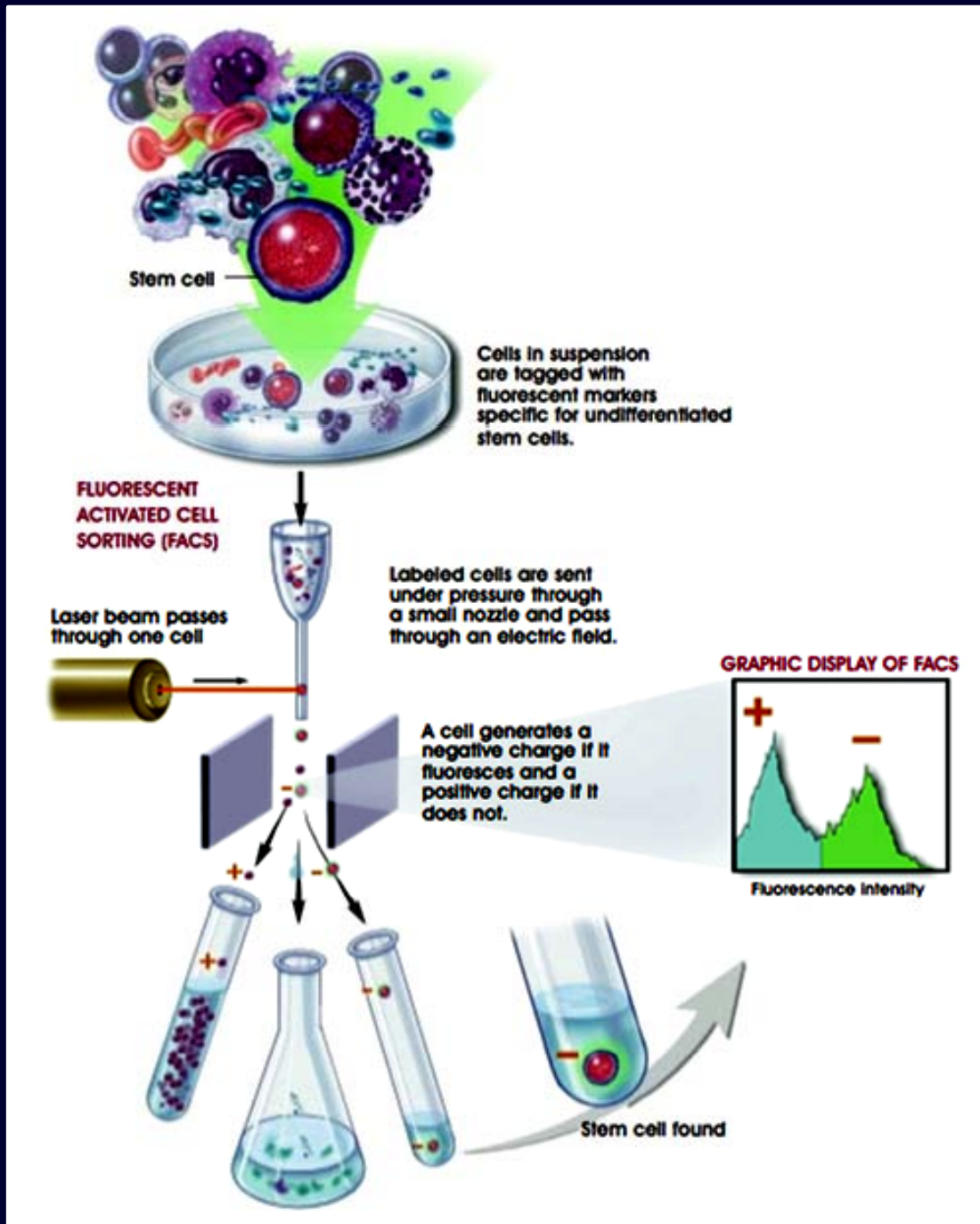


Diferenciační potenciál hematopoetických a stromálních SCs

Plasticita hematopoetických SCs



Izolace hematopoetických SCs pomocí FACS



Transdiferenciace

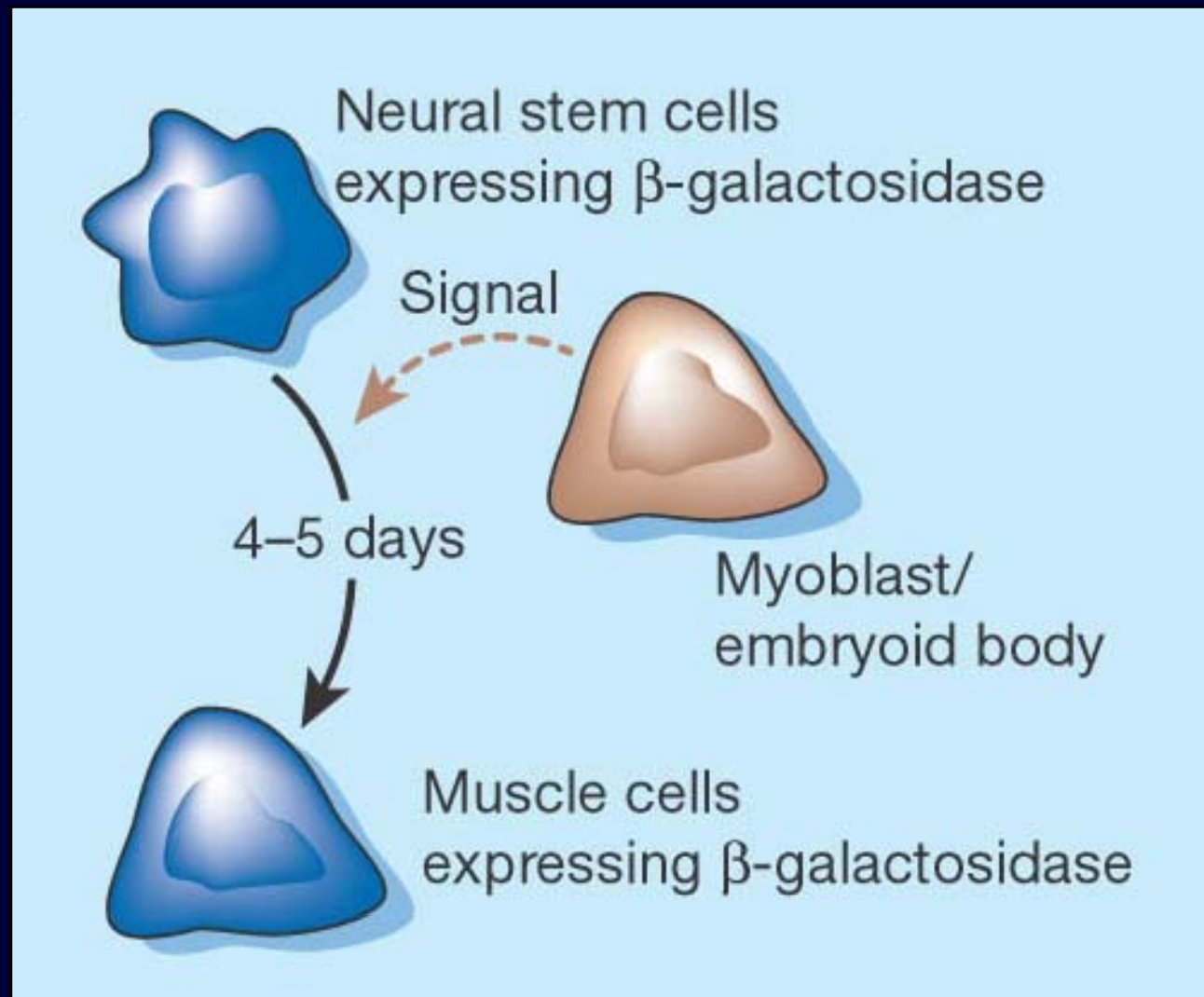
= schopnost buněk diferencovat do fenotypu charakteristického pro jiný typ tkáně nebo orgánu, než byla tkáň původní

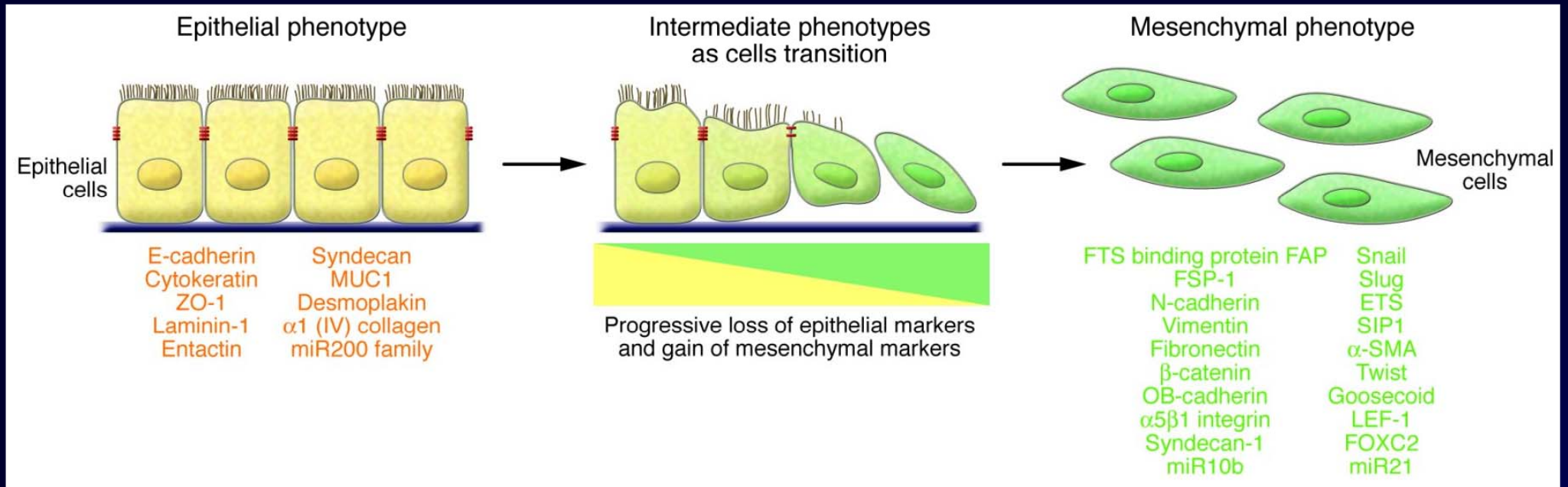
- hematopoetické SCs → kardiomyocyty, hepatocyty

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

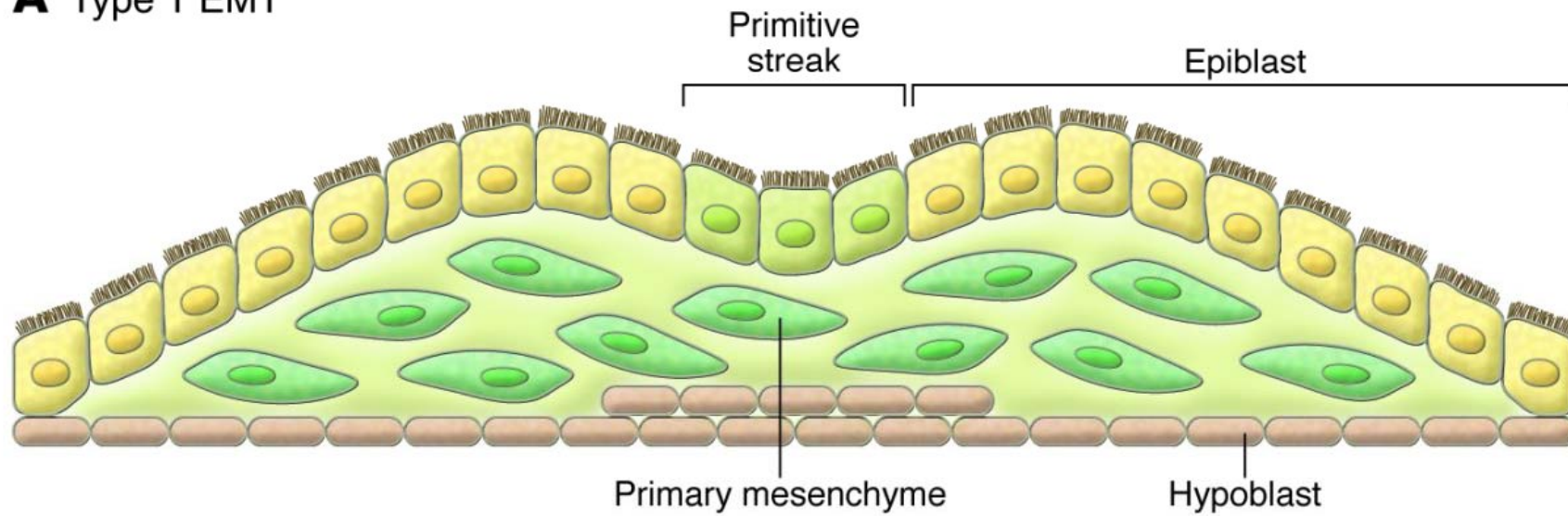
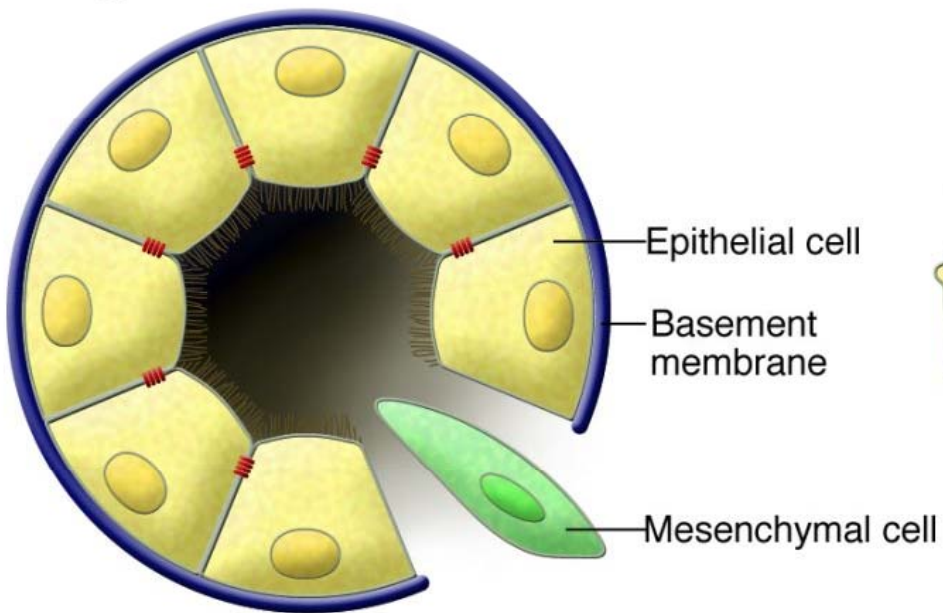
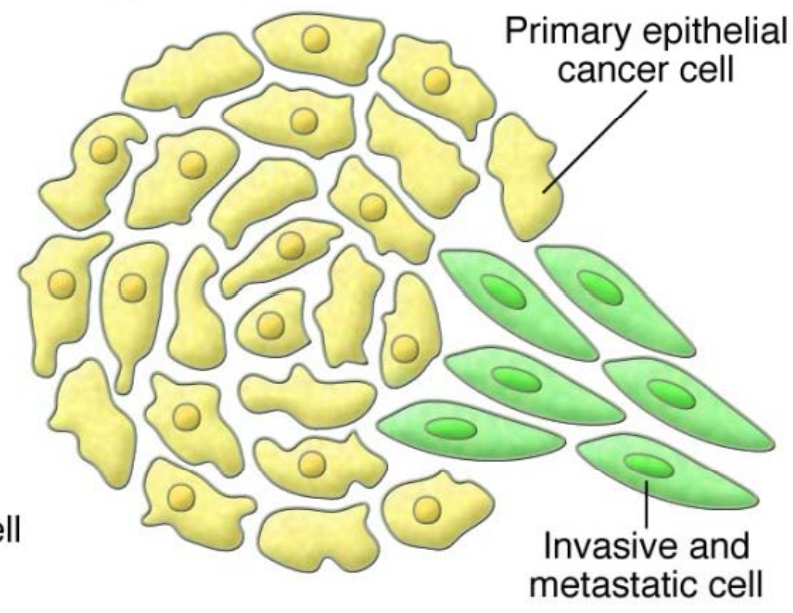
Příklad transdiferenciace neurálních SCs





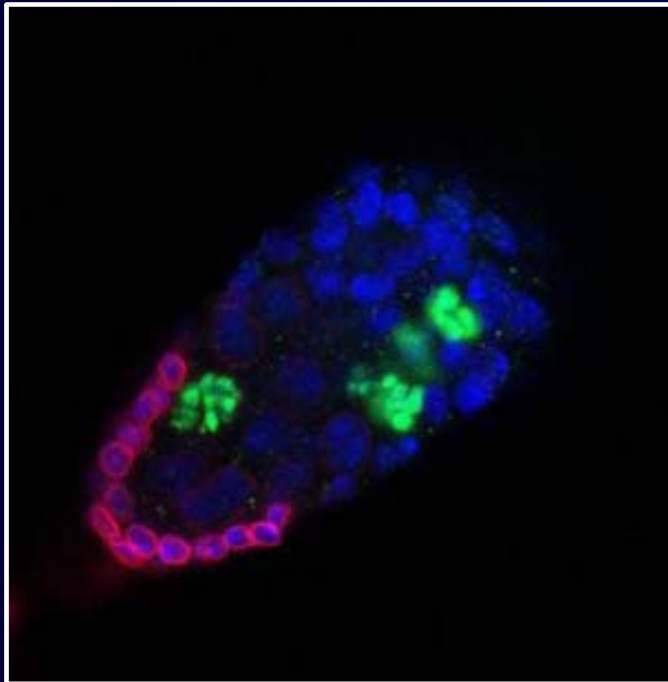
Epiteliálně mezenchymální tranzice (EMT)

= 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" (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)

Nádorové kmenové buňky:

cancer stem cells, **CSCs** / tumor-initiating cells, **TICs**



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

BBRC

www.elsevier.com/locate/ybbr

REVIEW ARTICLE

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

GANG-MING ZOU*

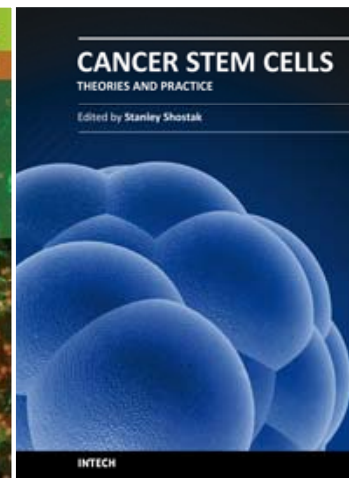
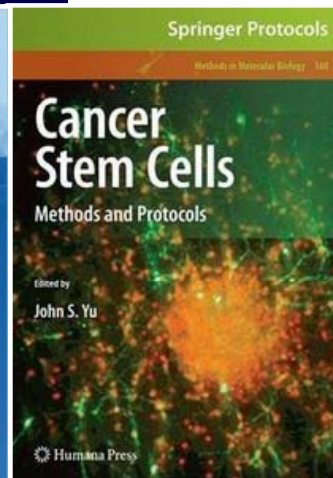
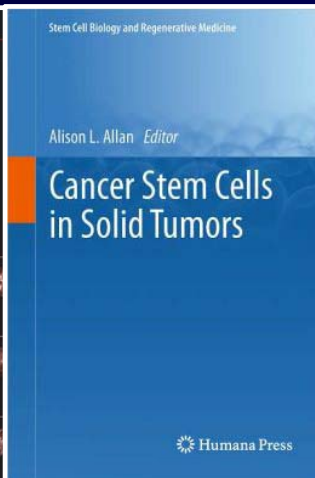
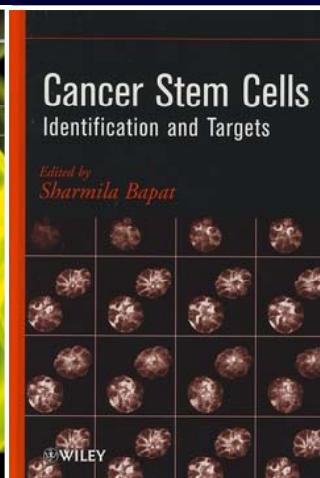
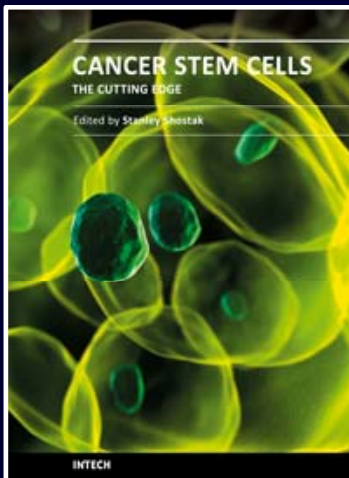
[Cancer Biology & Therapy 7:3, 1-6; March 2008]; ©2008 Landes Bioscience

Review

Tumor-initiating stem cells in liver cancer

Shan Yong Yi and Ke Jun Nan*

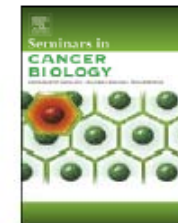
Journal of
Cellular
Physiology





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Seminars in Cancer Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcancer

Review

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

Zafira Castaño^{a,b,1}, Christine M. Fillmore^{c,d,e,f,1}, Carla F. Kim^{c,d,e,f}, Sandra S. McAllister^{a,b,f,g,*}

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.¹, Jens-Peter Volkmer, M.D.^{1,*}, Daniel Rottke, M.D.,
Rolf Ackermann, M.D.²

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
 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"

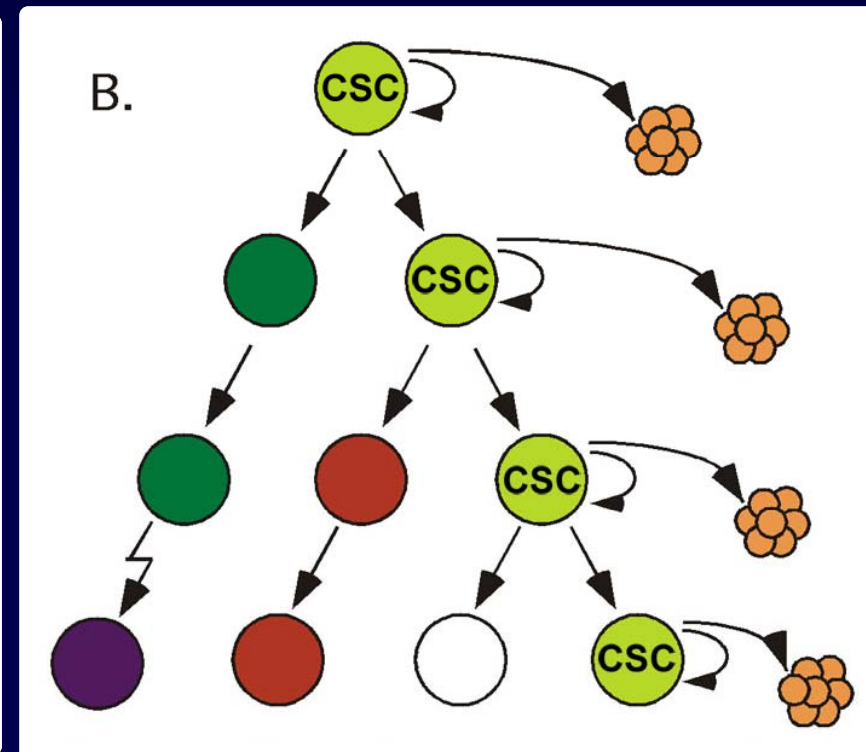
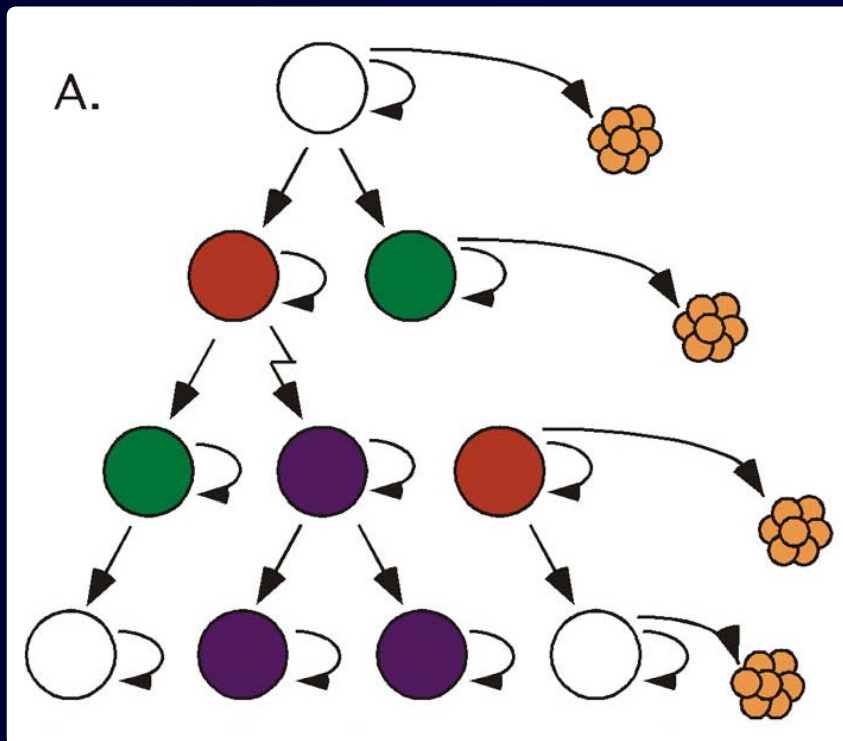
Mariusz Z. Ratajczak



Zásadní změna pohledu na biologii nádorů:

A. stochastický/klonálně evoluční model

B. CSCs model



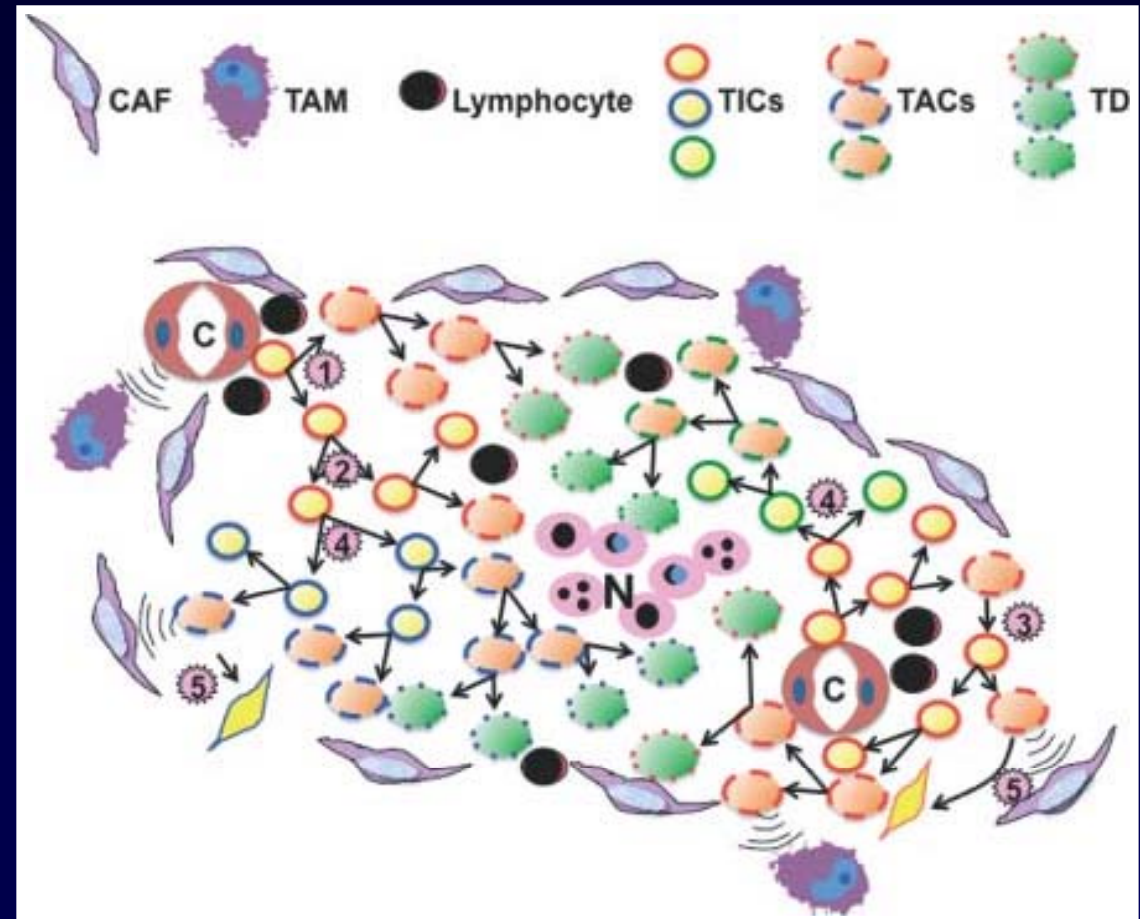
Heterogenní prostředí solidního nádoru

C = kapilára

N = nekróza

TAM

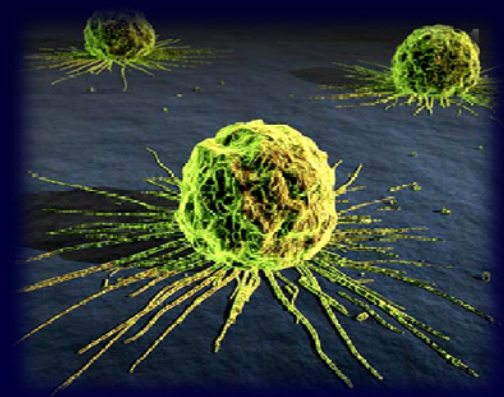
= tumor-associated
macrophages



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

TACs = transiently amplifying cells

TD = terminally differentiated cells

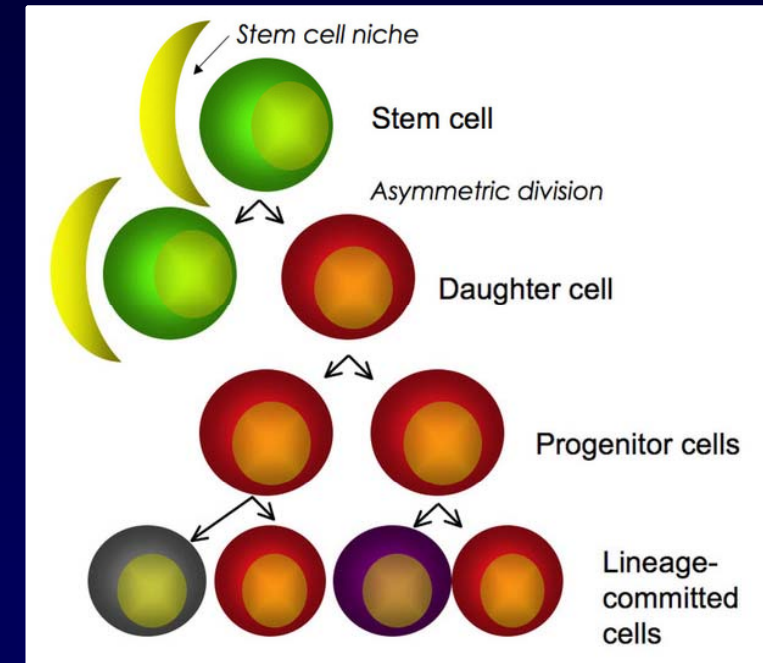
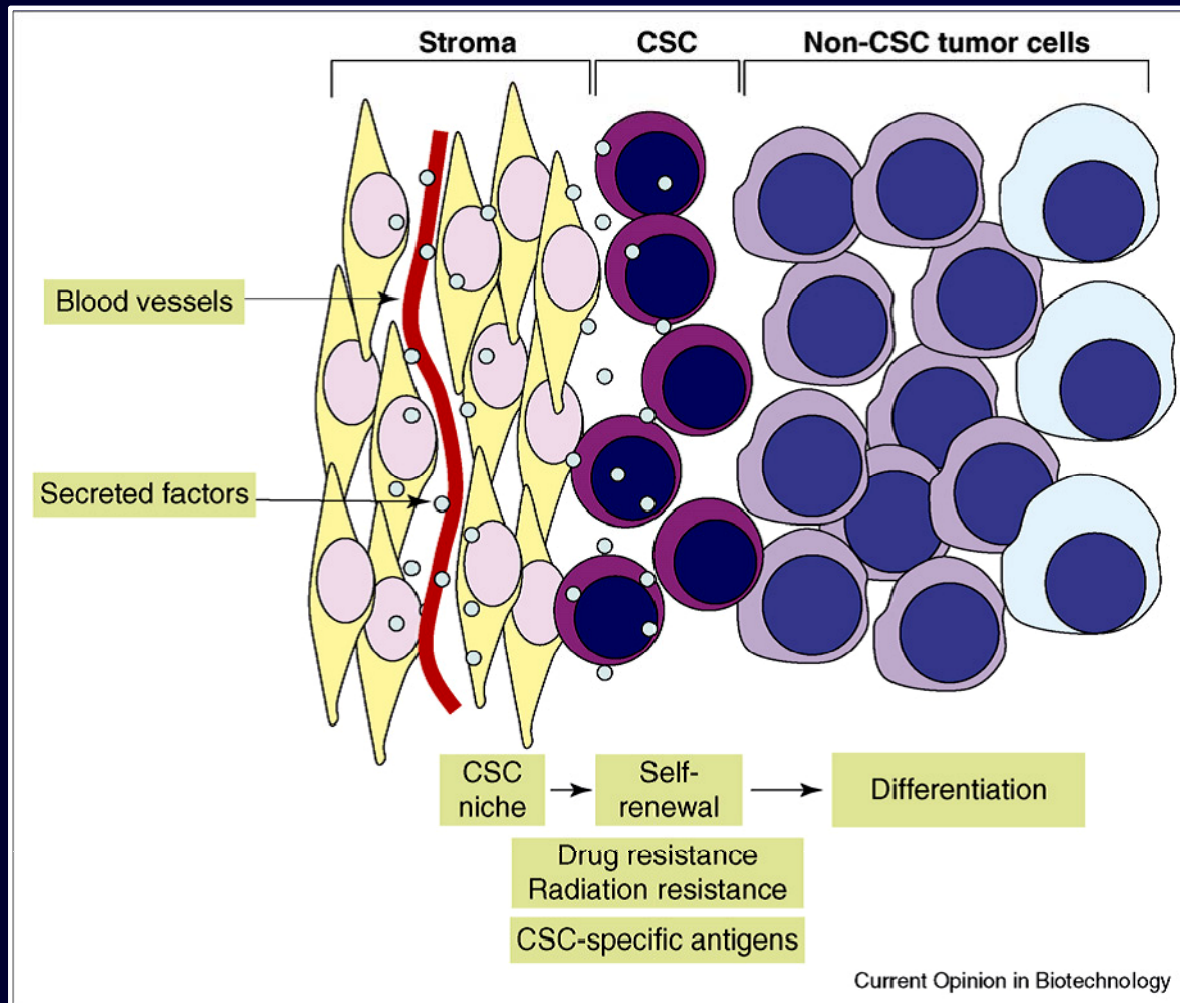


Přehled biologických vlastností CSCs:

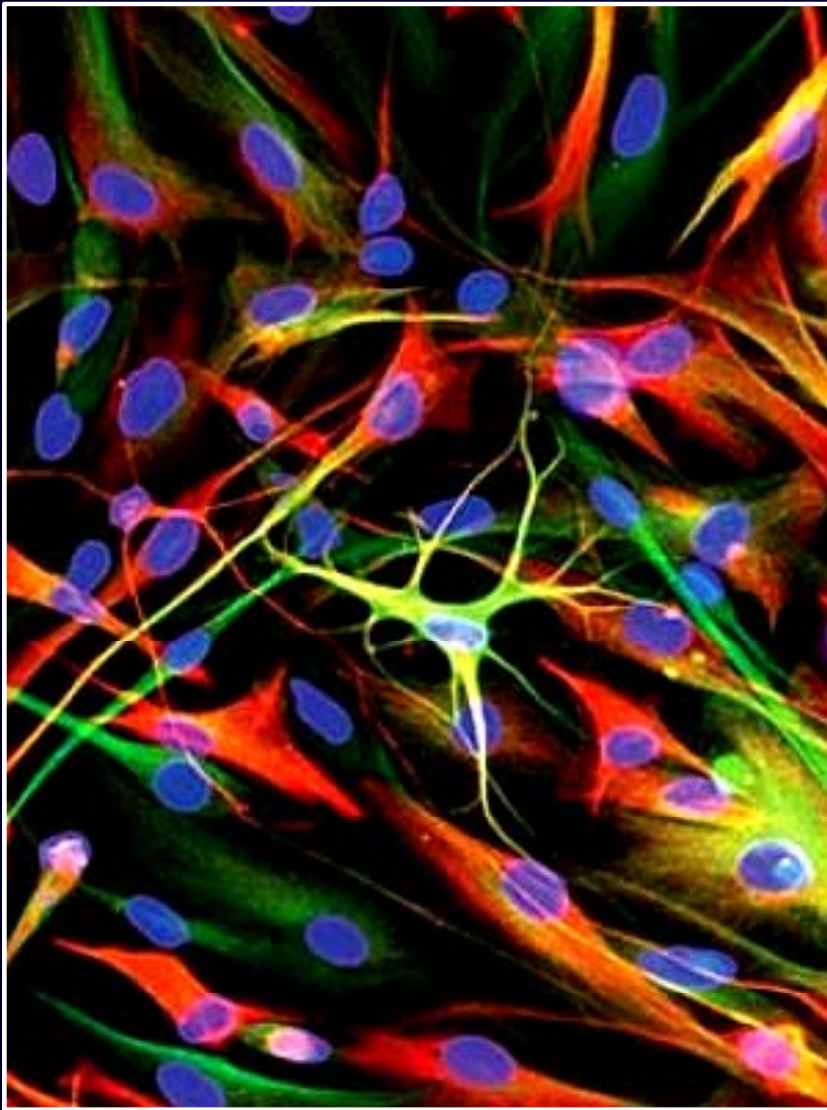
- specifické mikroprostředí (niche)
- schopnost sebeobnovy (self-renewal)
- proliferační potenciál / schopnost asymetrického dělení
- diferenciační potenciál
- vysoká telomerázová aktivita
- specifické markery, resp. jejich kombinace
- specifické signální dráhy (Wnt, Notch, SHH)
- rezistence vůči apoptóze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

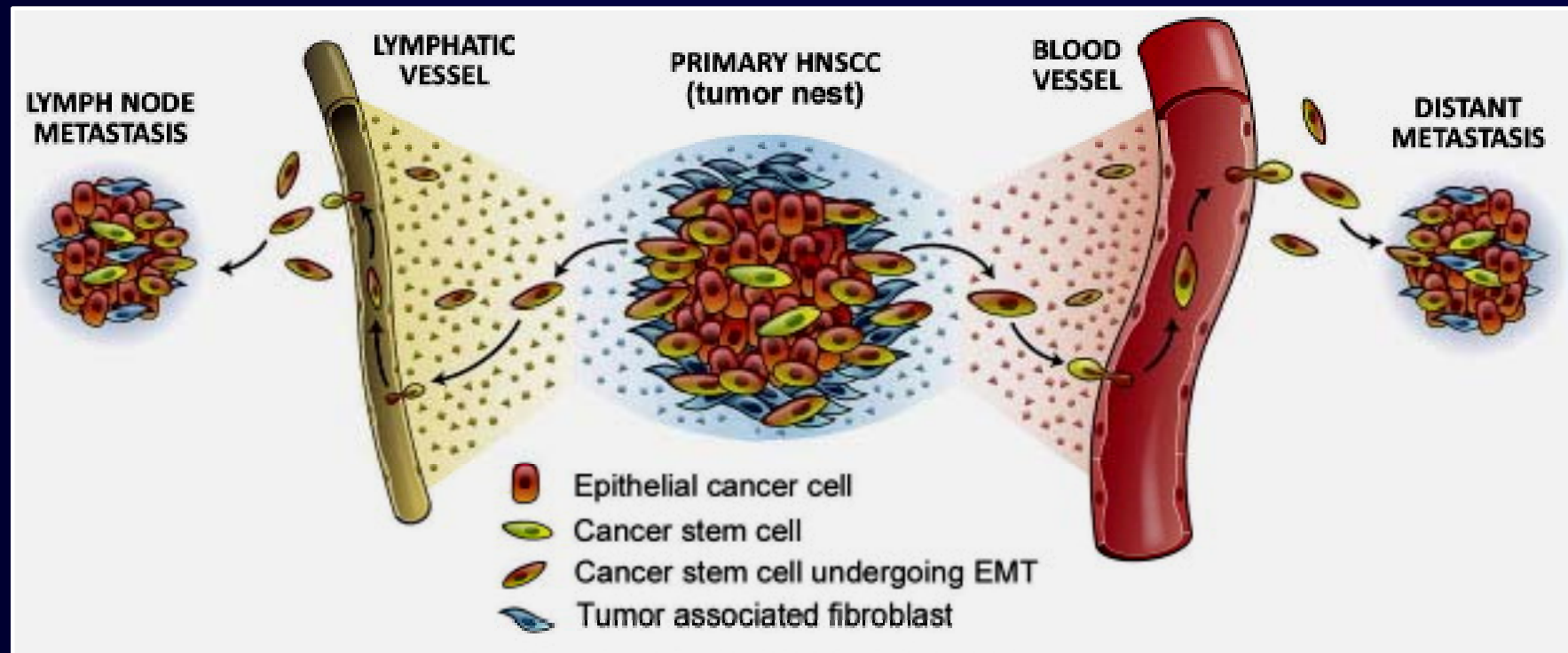
neurony

astrocyty

nediferencované CSCs

Metastatický potenciál CSCs

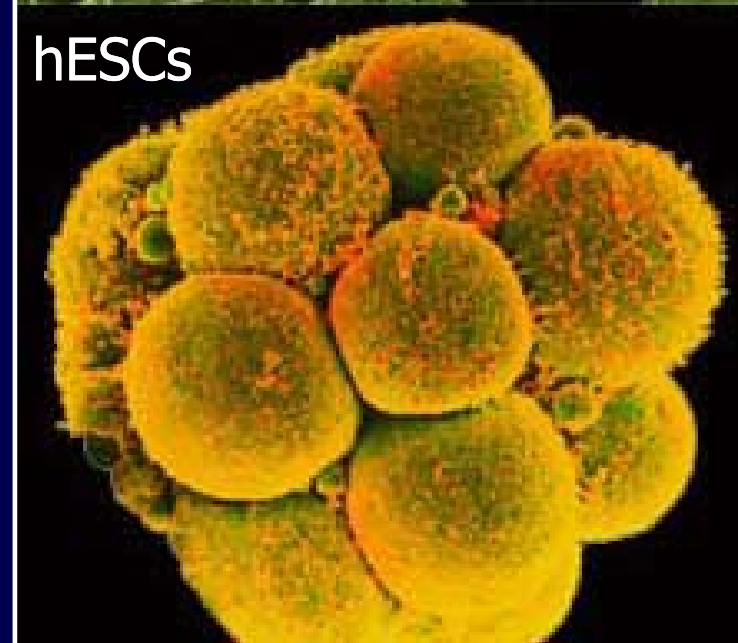
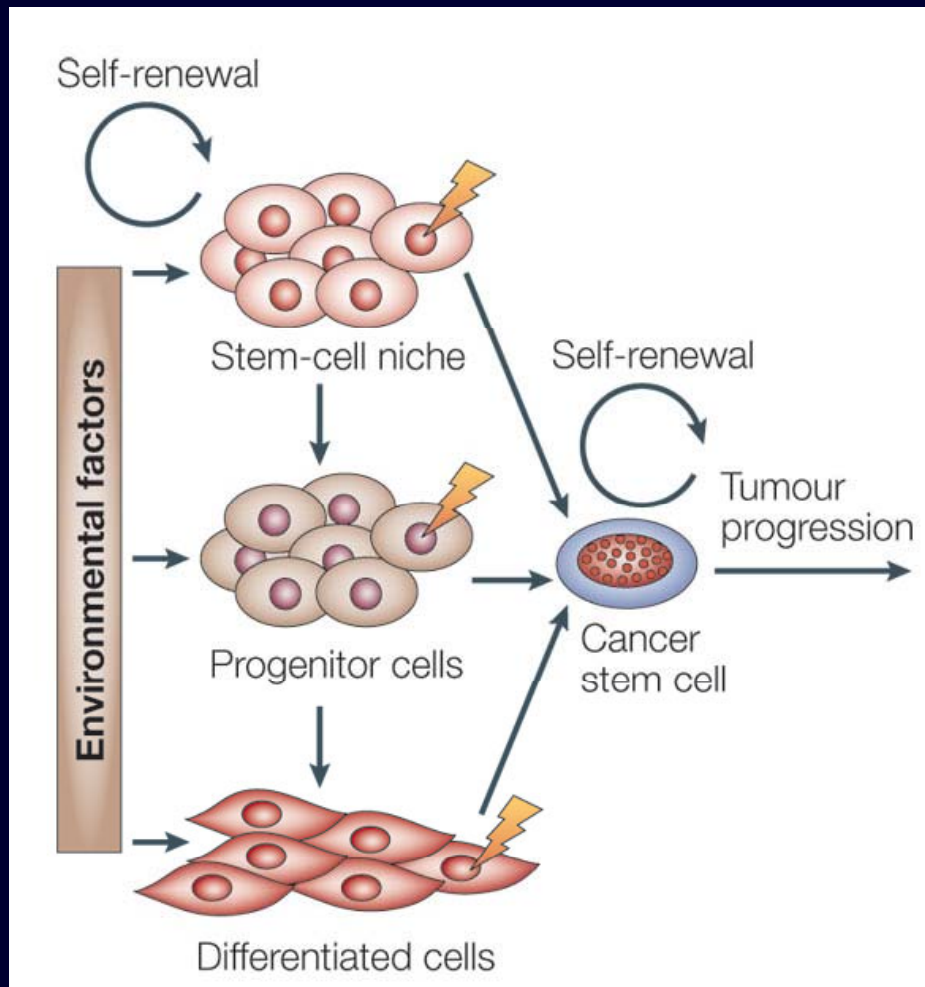
- změny interakcí s ECM
- vytváření invadopodií (participace CD133?)
- u CSCs karcinomů schopnost EMT/MET



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:



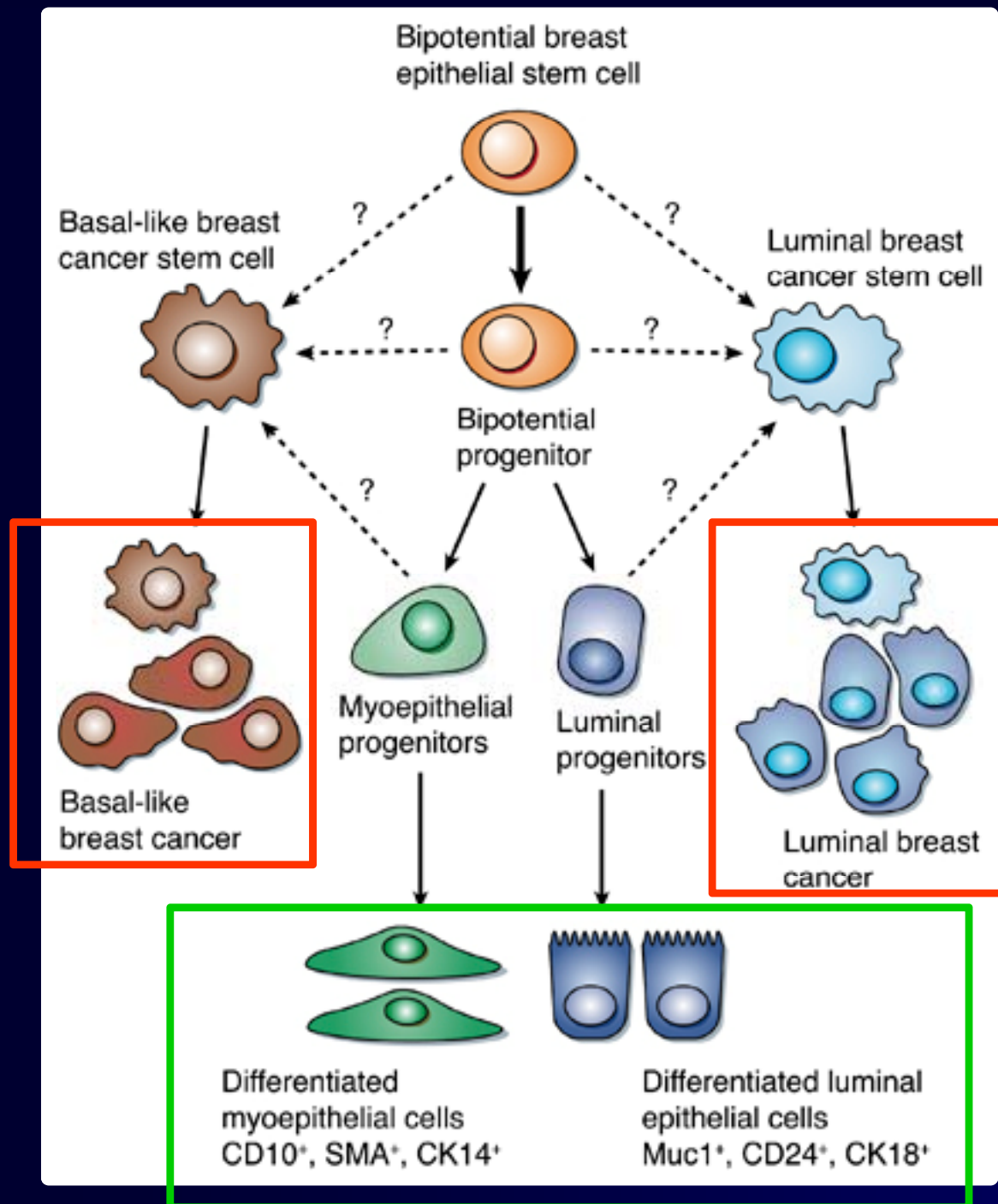
SCs normální tkáně:

- 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
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:**

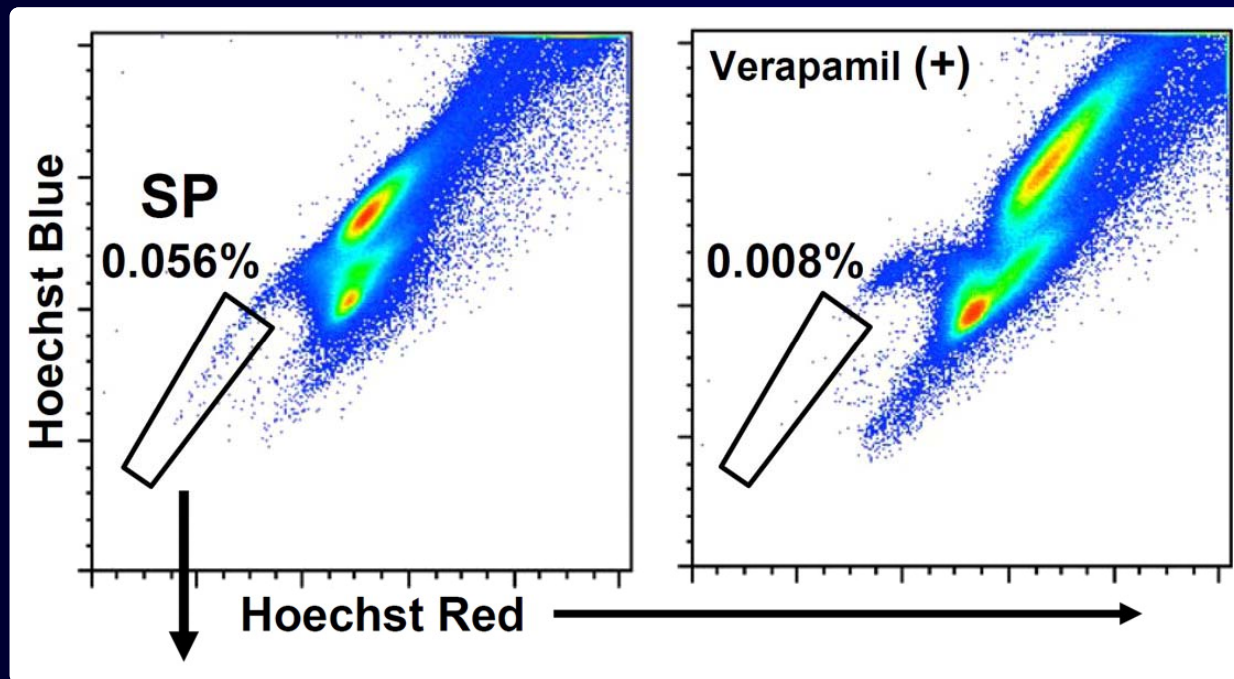
imunodetekční metody

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

↳ detekce "side population" (SD)

Detekce "side population" (= SP):

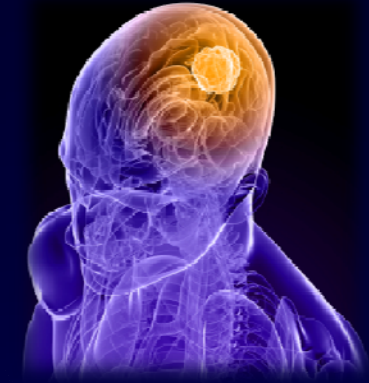
- barvivo **Hoechst 33342**
- hodnocení při dvou emisních délkách:
450 nm (Hoechst blue) a **670 nm** (Hoechst red)
- aktivita transmembránových ABC-transportérů
v CSCs



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

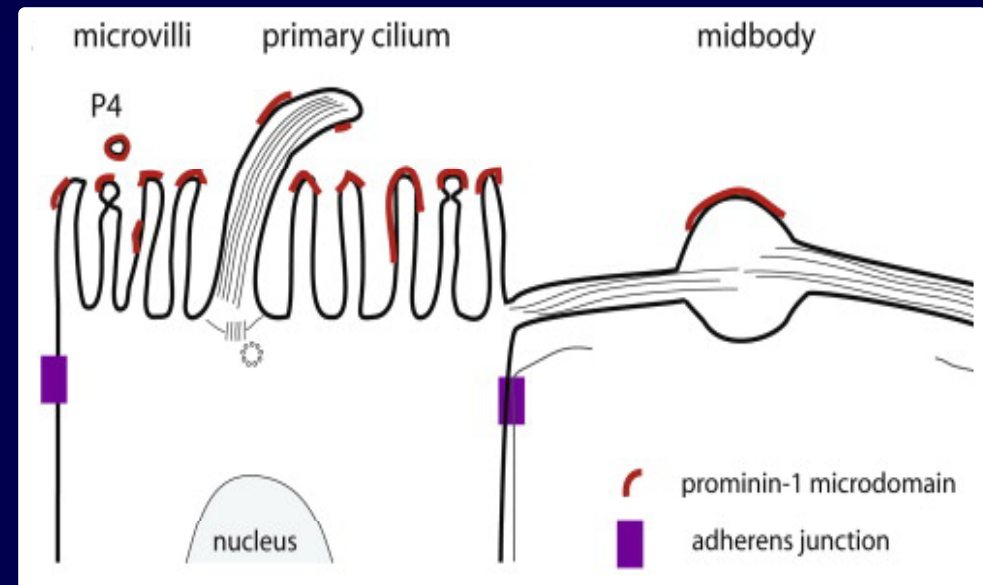
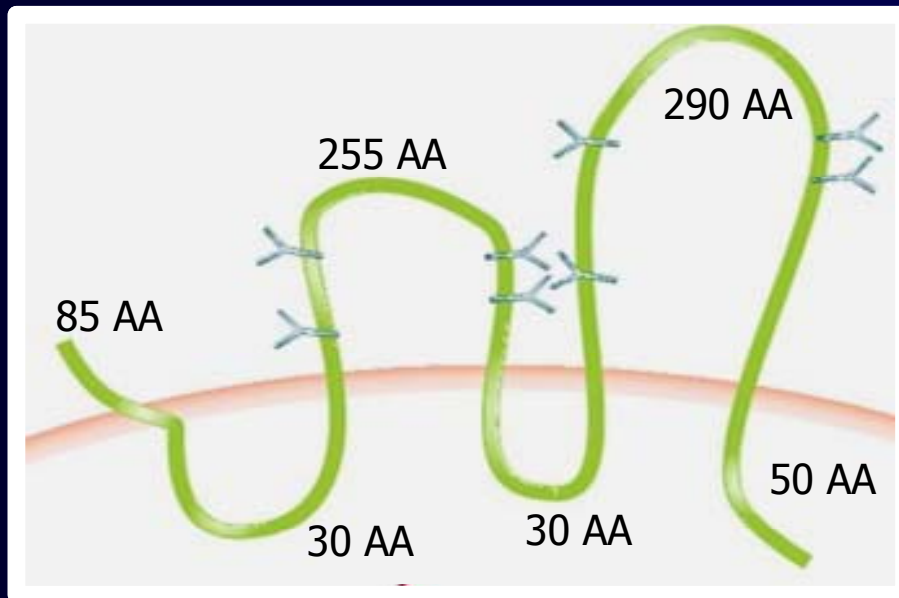
- nejčastější zhoubný nádor CNS u dětí (2-6 případů na 1 milion dětí do 15 let ročně)
- CD133, CD15 (SSEA1), nestin

Neuroblastom

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

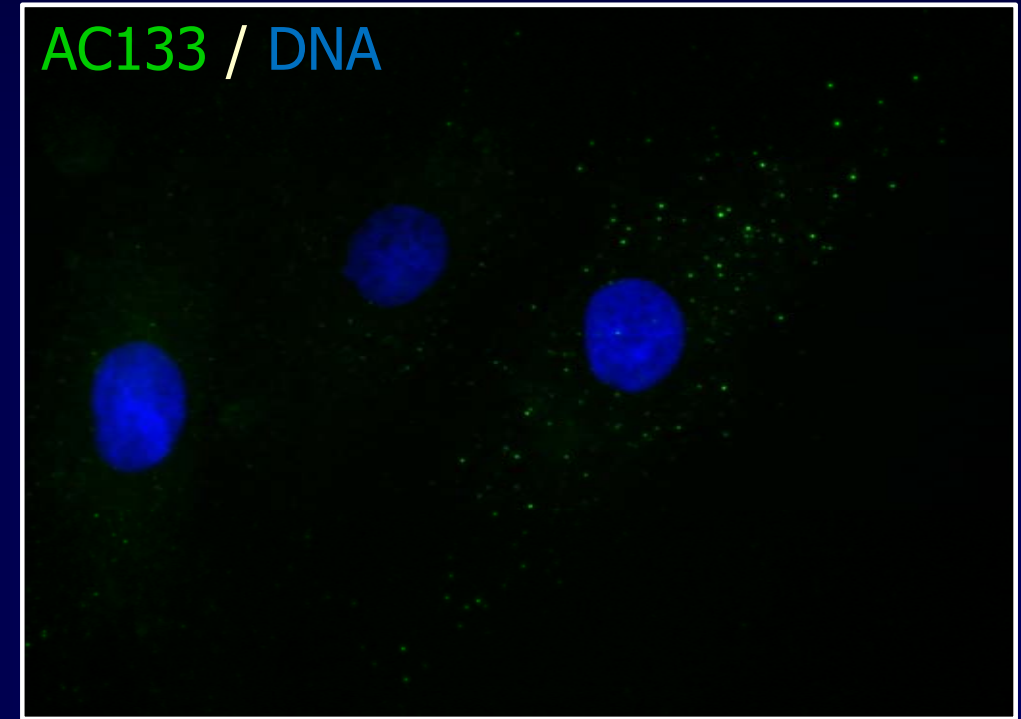
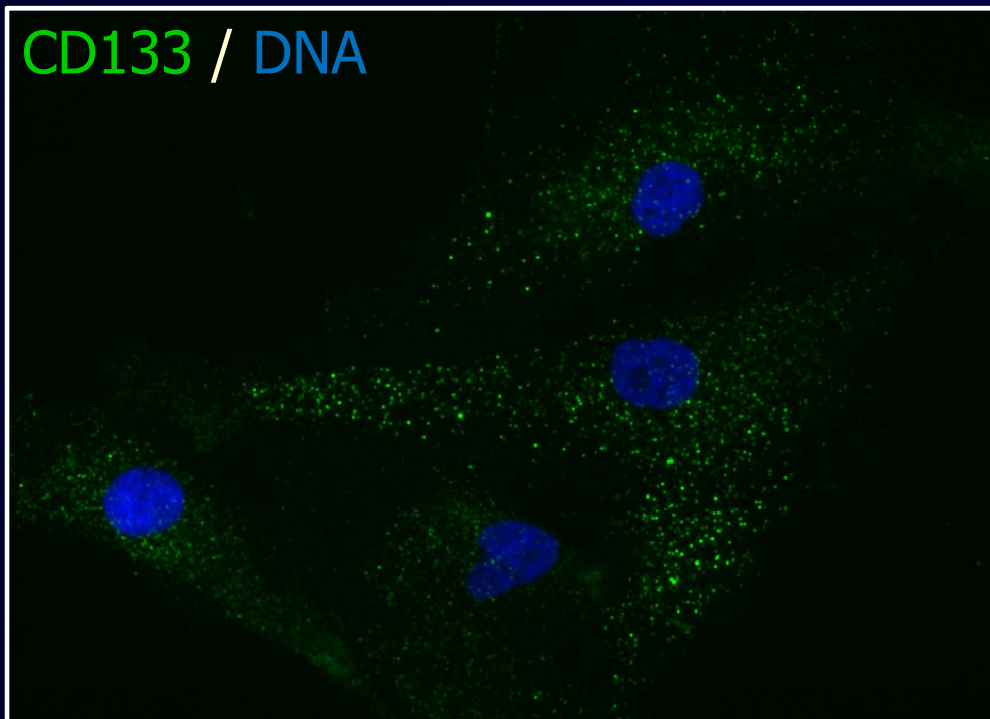
CD133 (Prominin-1)

- 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

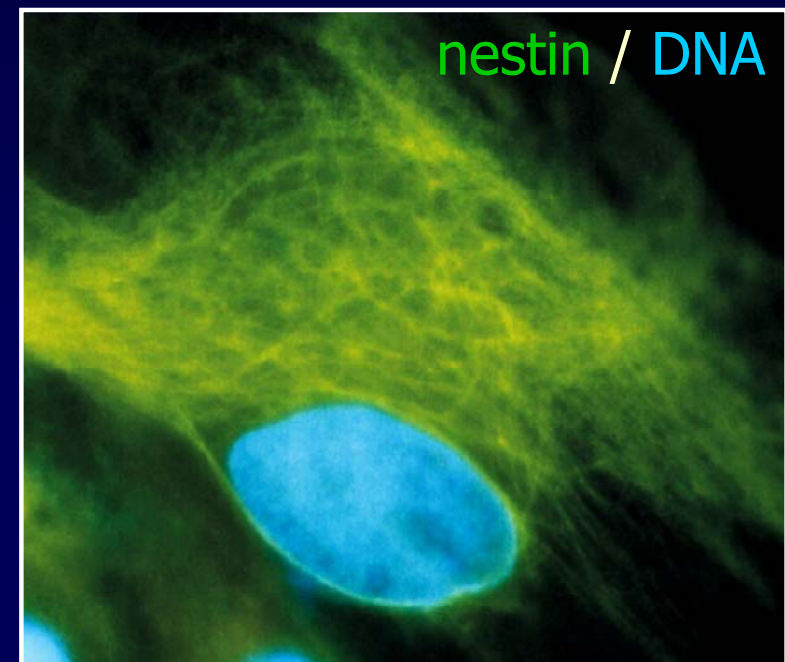
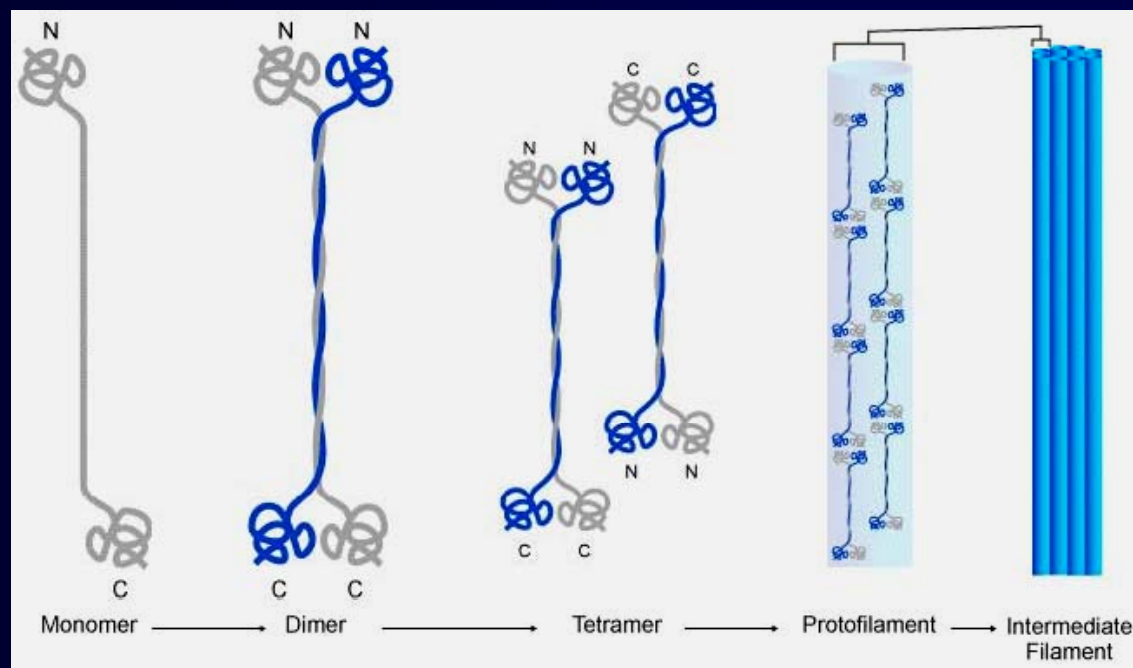


Osteosarkomová buněčná linie OSA-02

Nestin

= **N**euronal **S**tem 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(?)



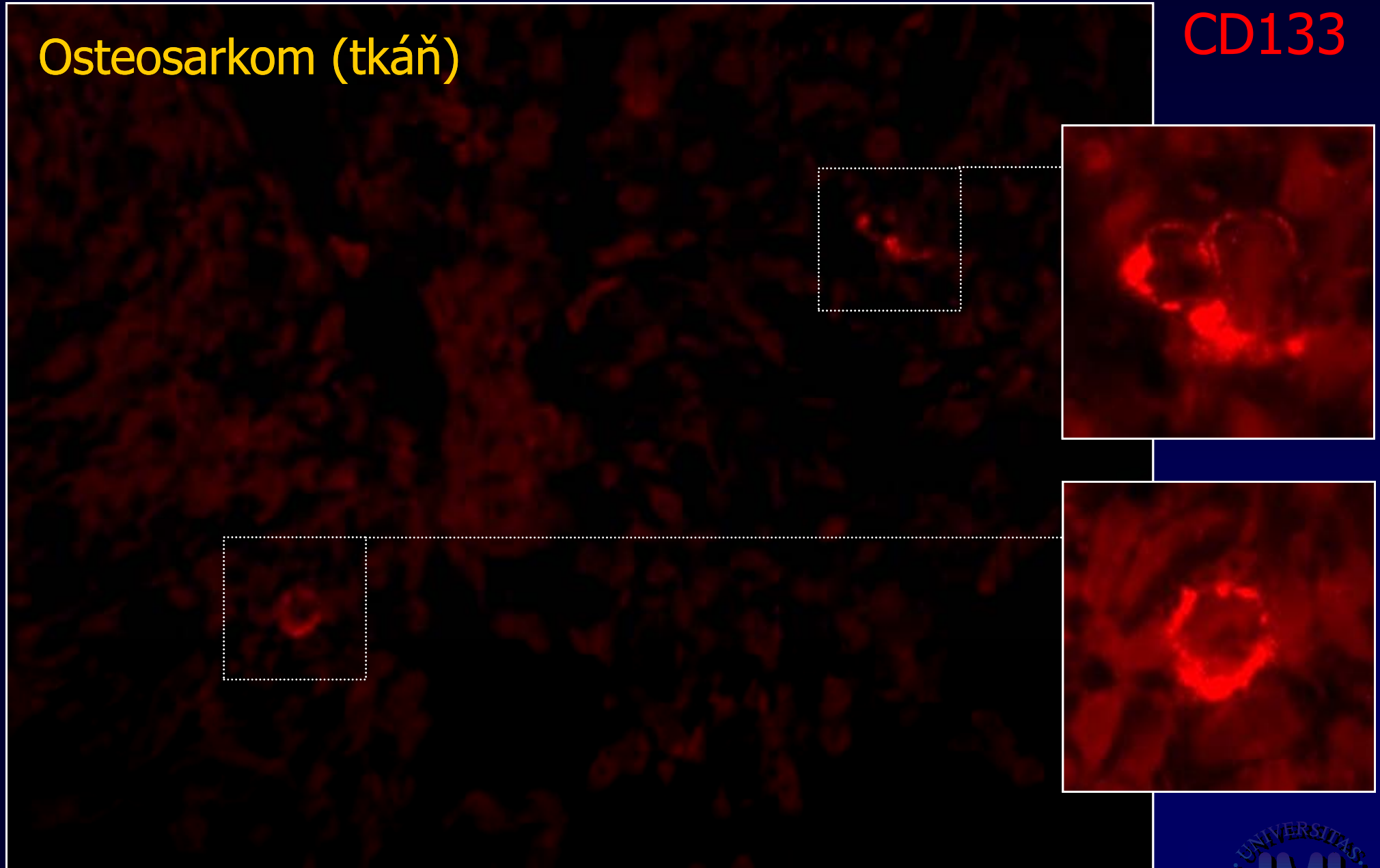
Rhabdomyosarkom

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

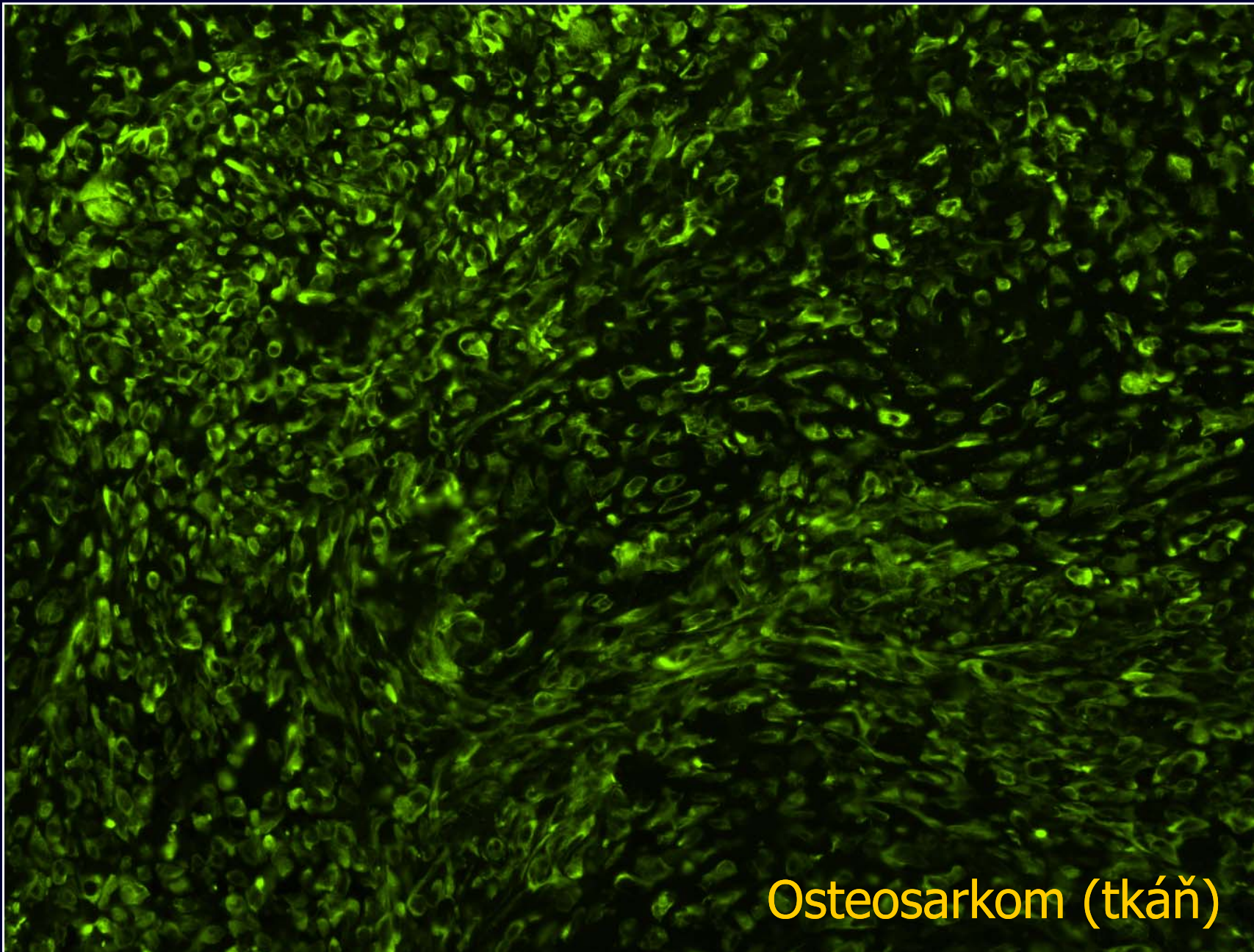


Osteosarkom (tkáň)

CD133

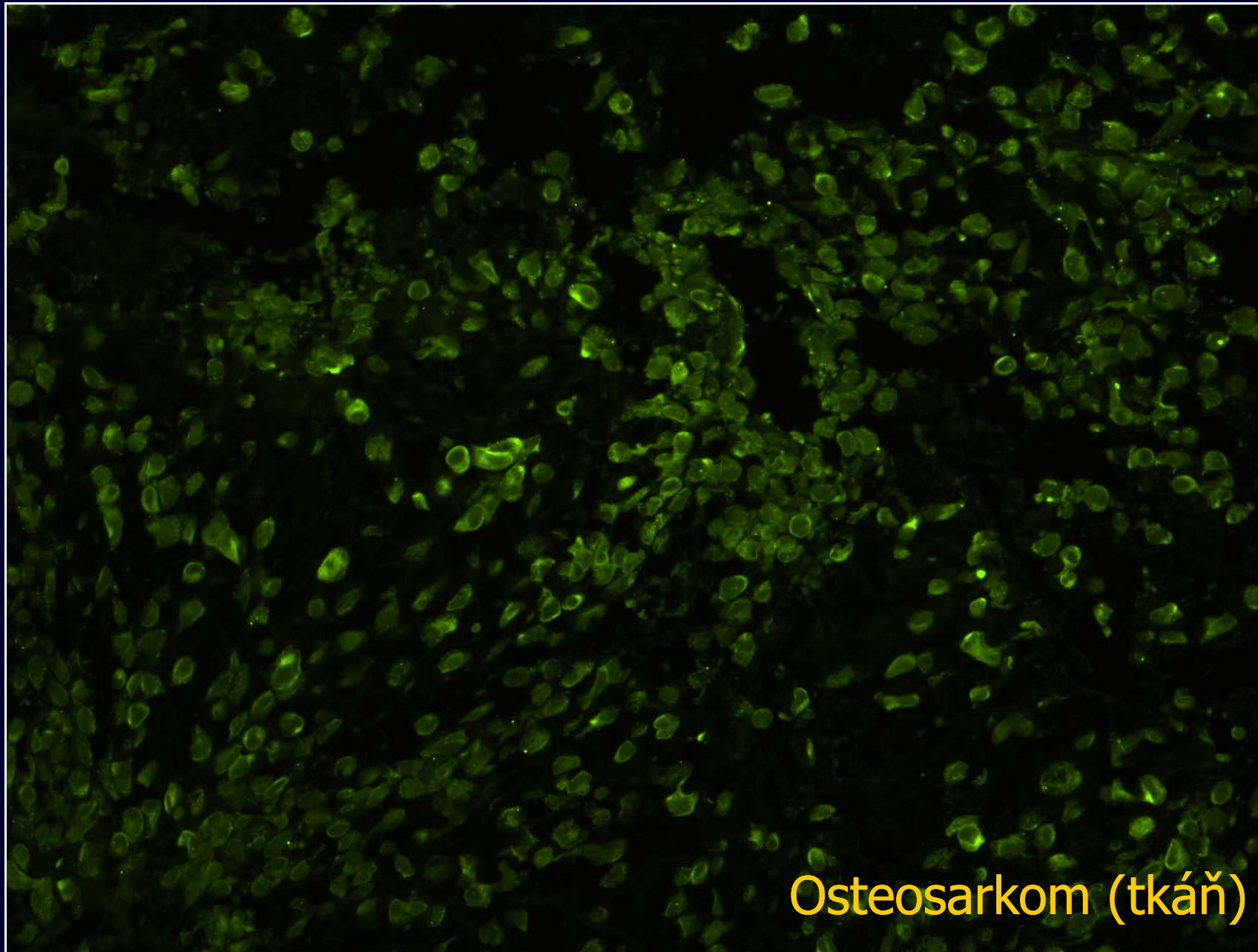


M/15
Nestin

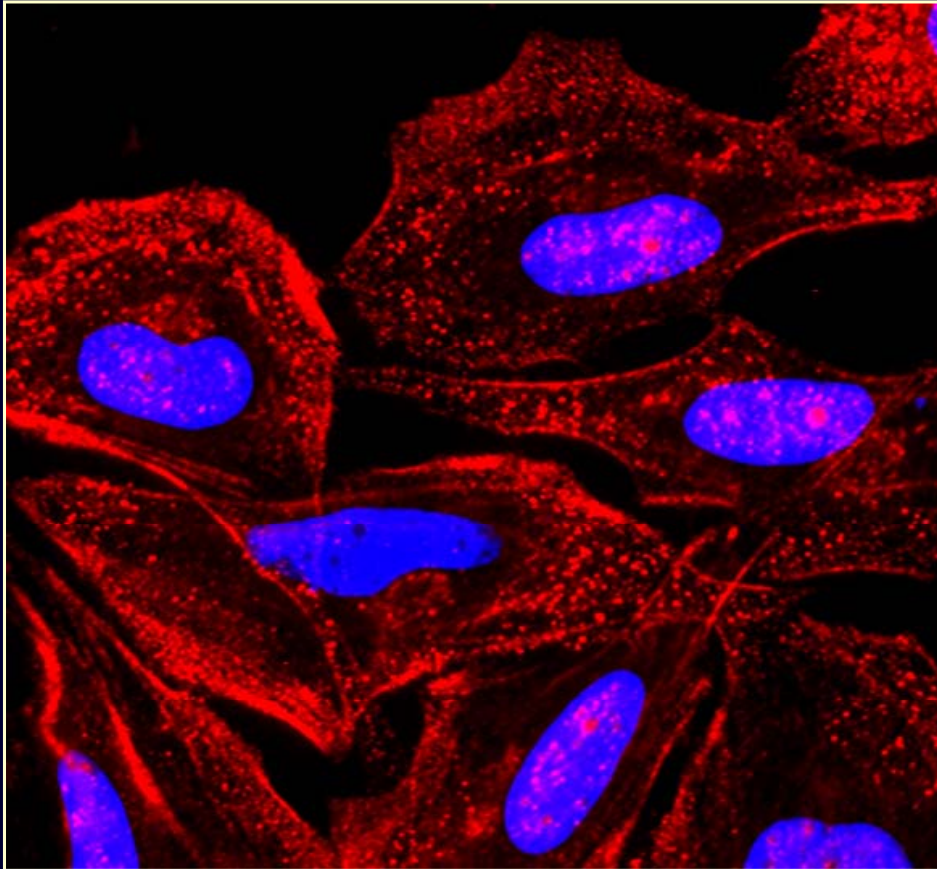


Osteosarkom (tkáň)

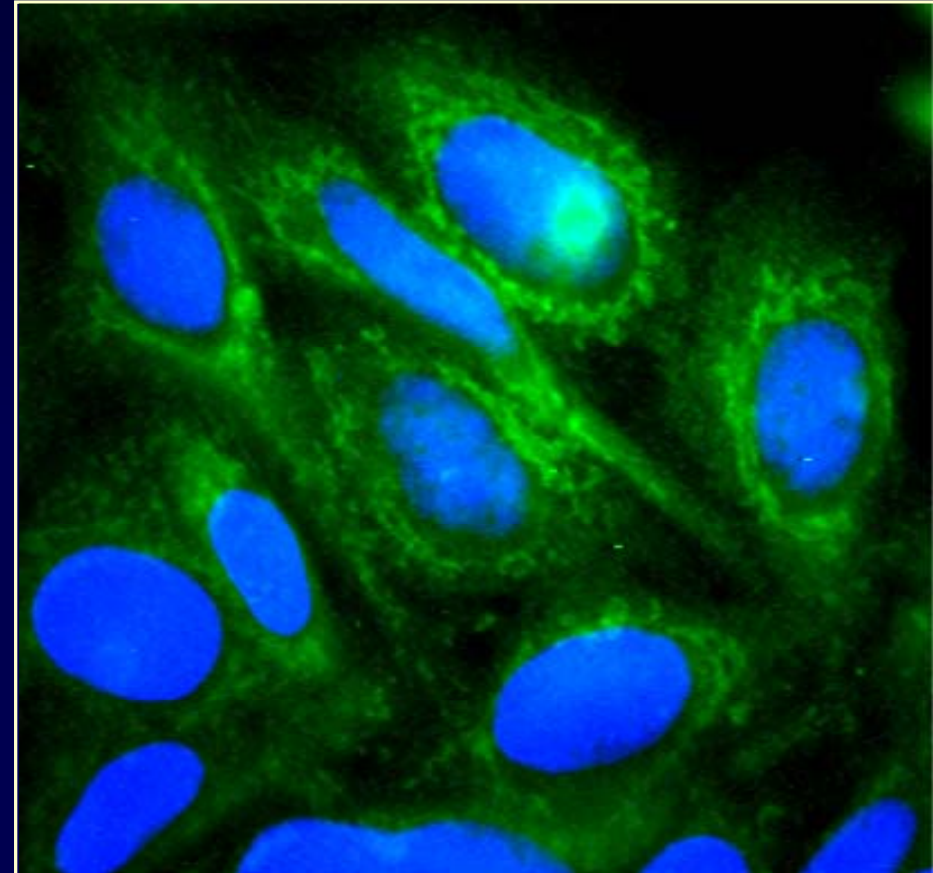
F/14
Nestin



Buněčná linie Saos-2 (ATCC) – osteosarkom

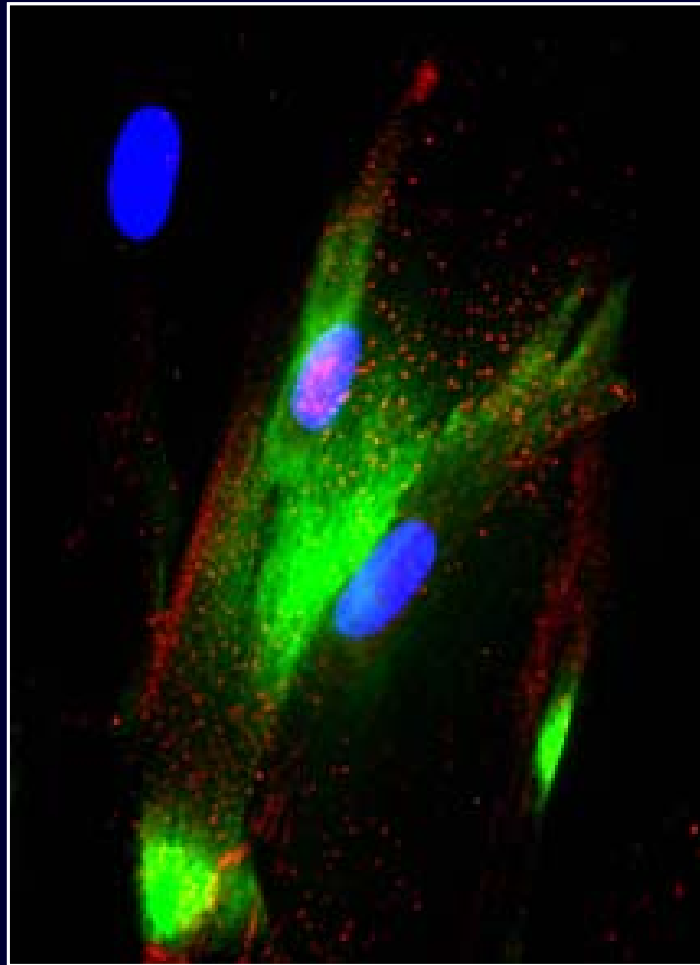


CD133 / DAPI

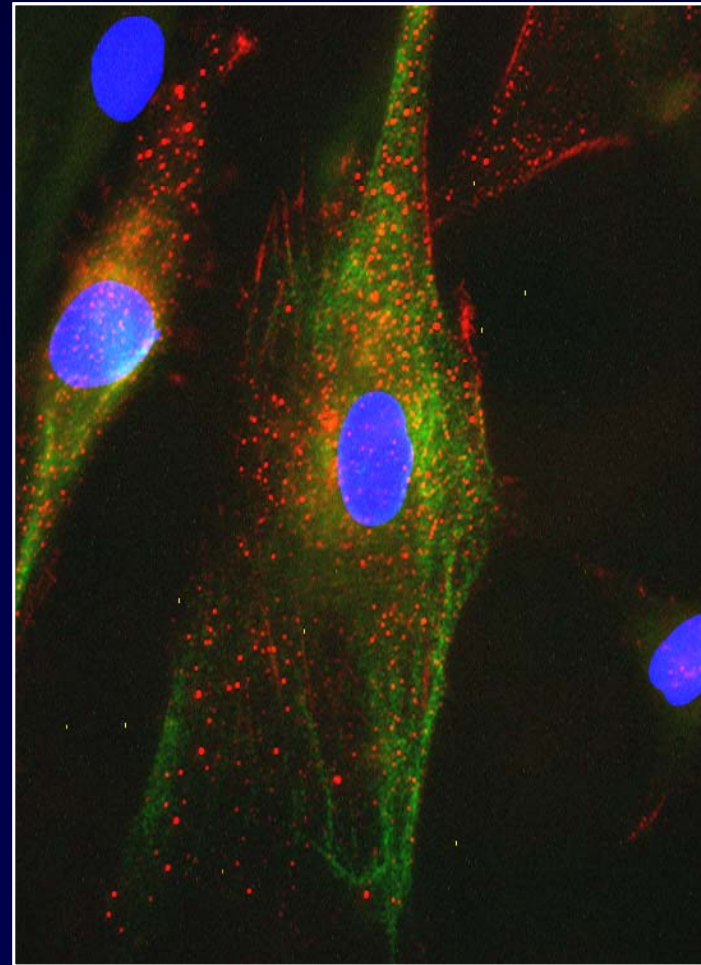


Nestin / DAPI

Identifikace markerů CSCs v sarkomových buněčných liniích



Rhabdomyosarkom

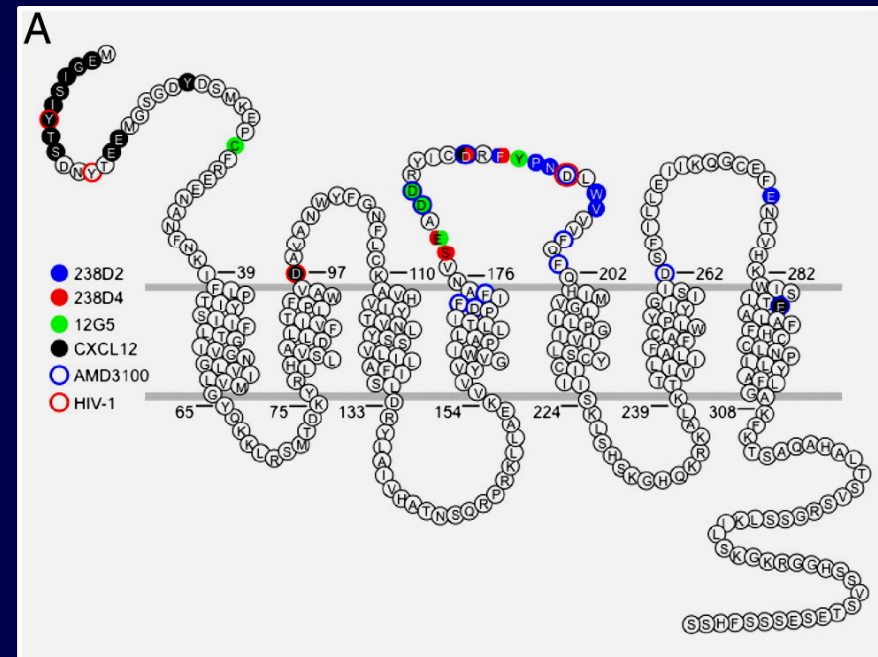
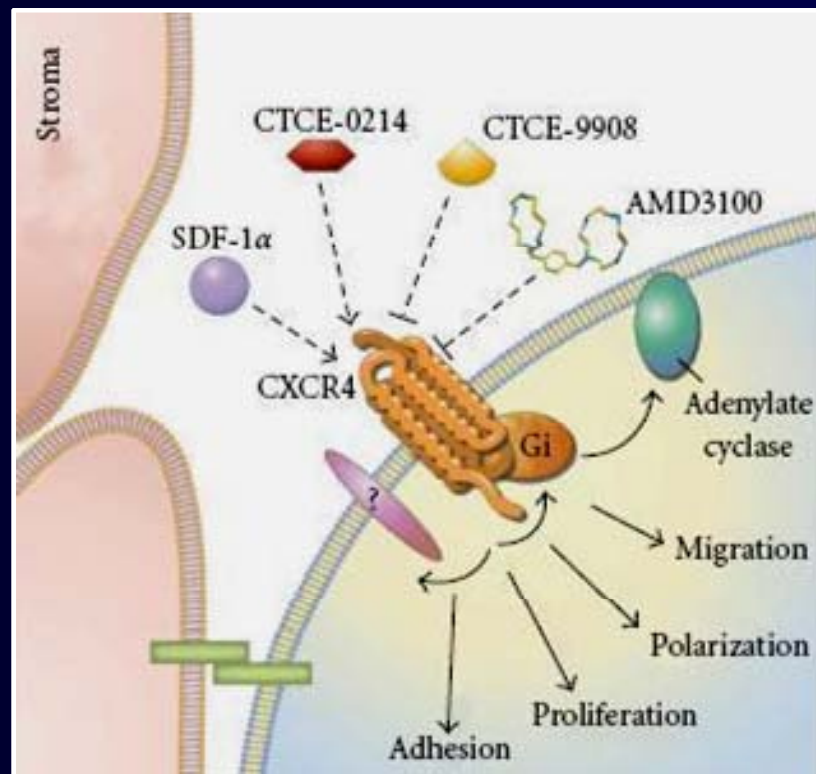


Osteosarkom

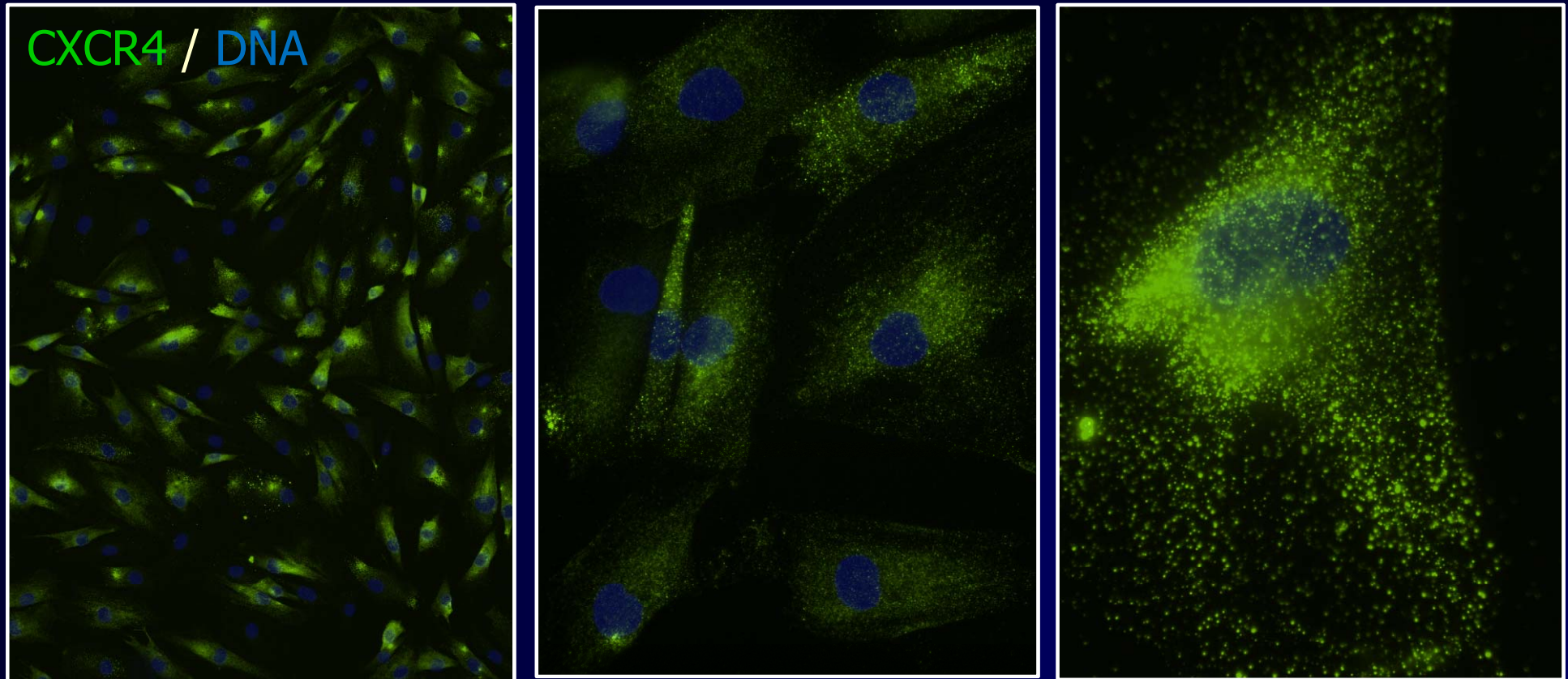
CD133
Nestin

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



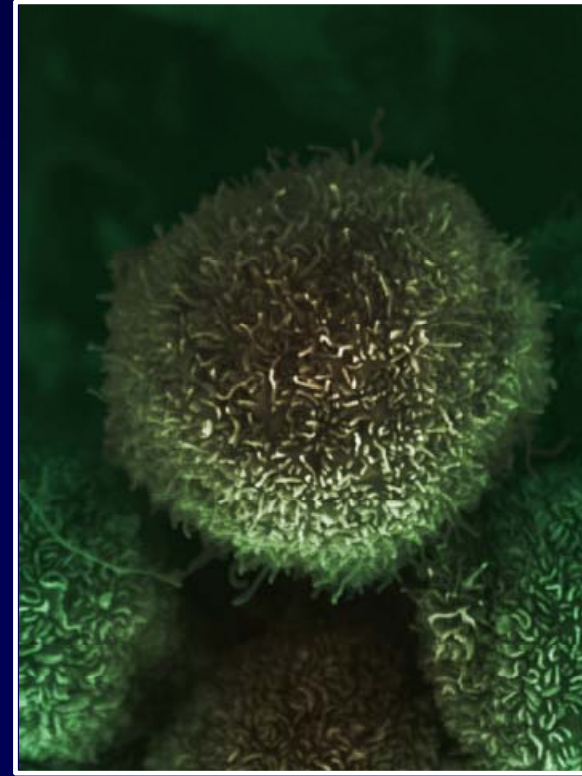
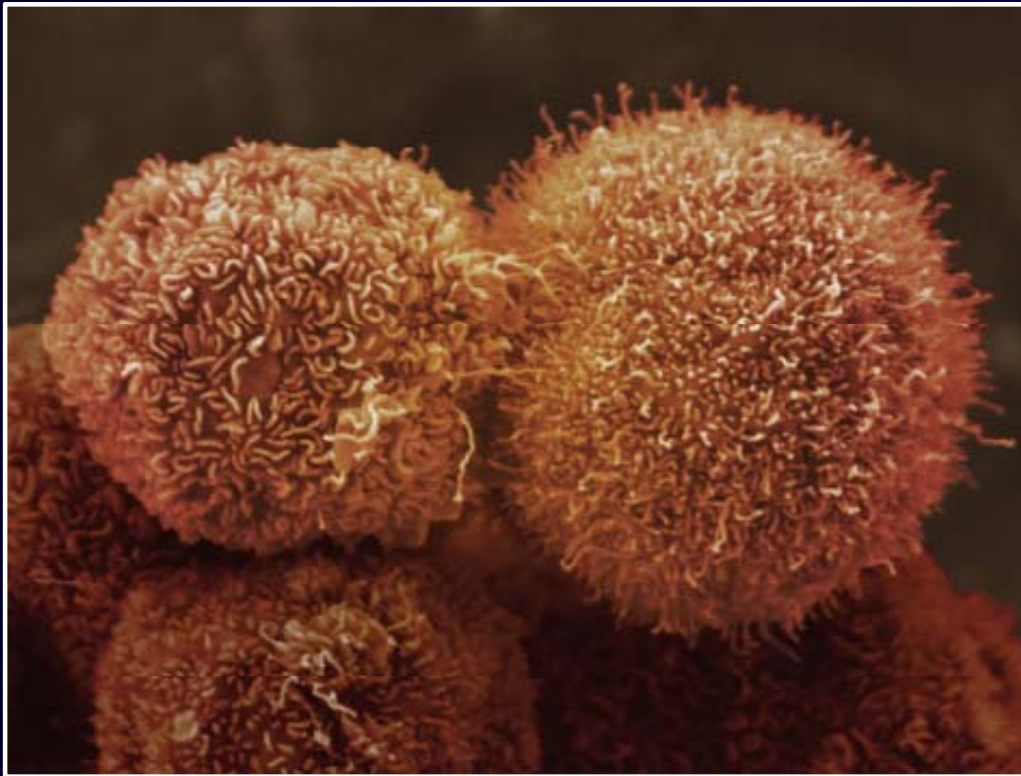
Identifikace CXCR4/SDF-1 v sarkomech



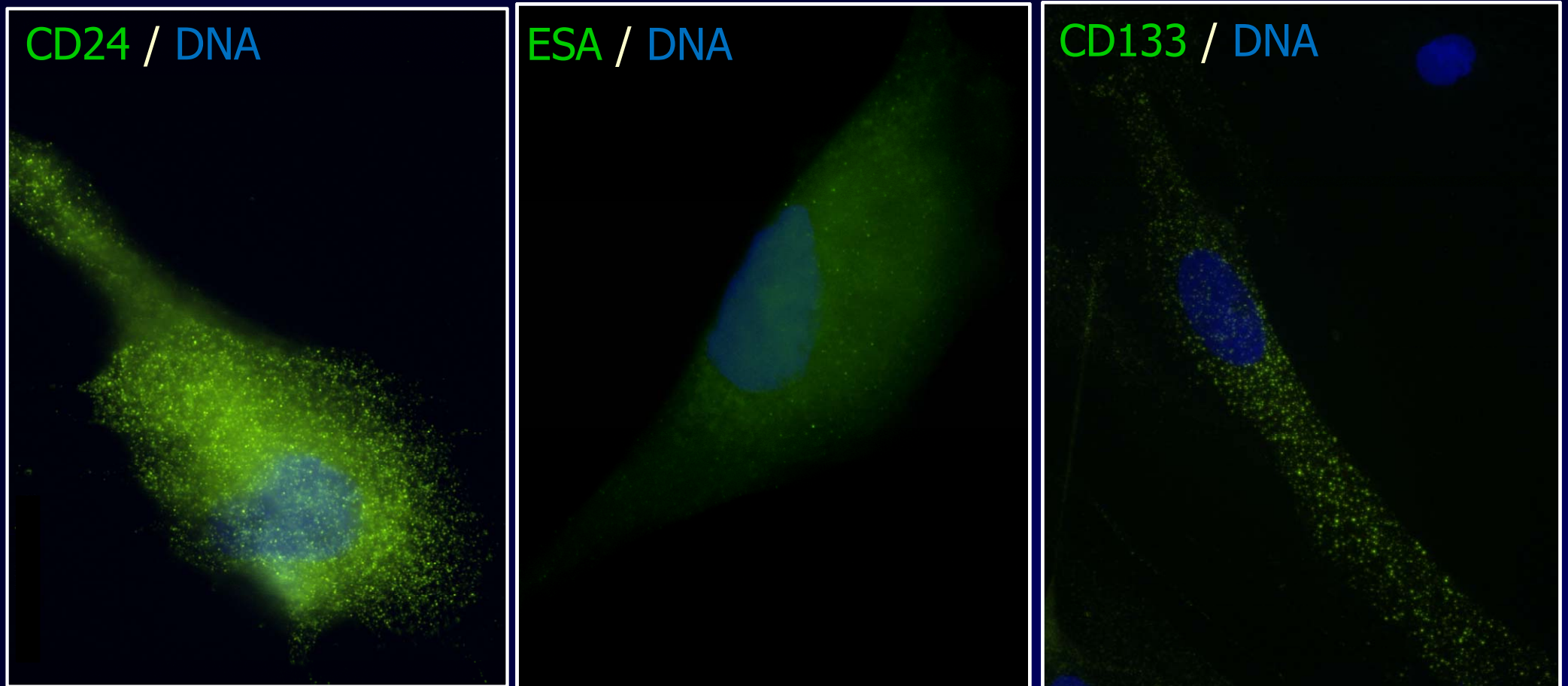
Rhabdomyosarkomová buněčná linie NSTS-11

Markery CSCs u karcinomu pankreatu

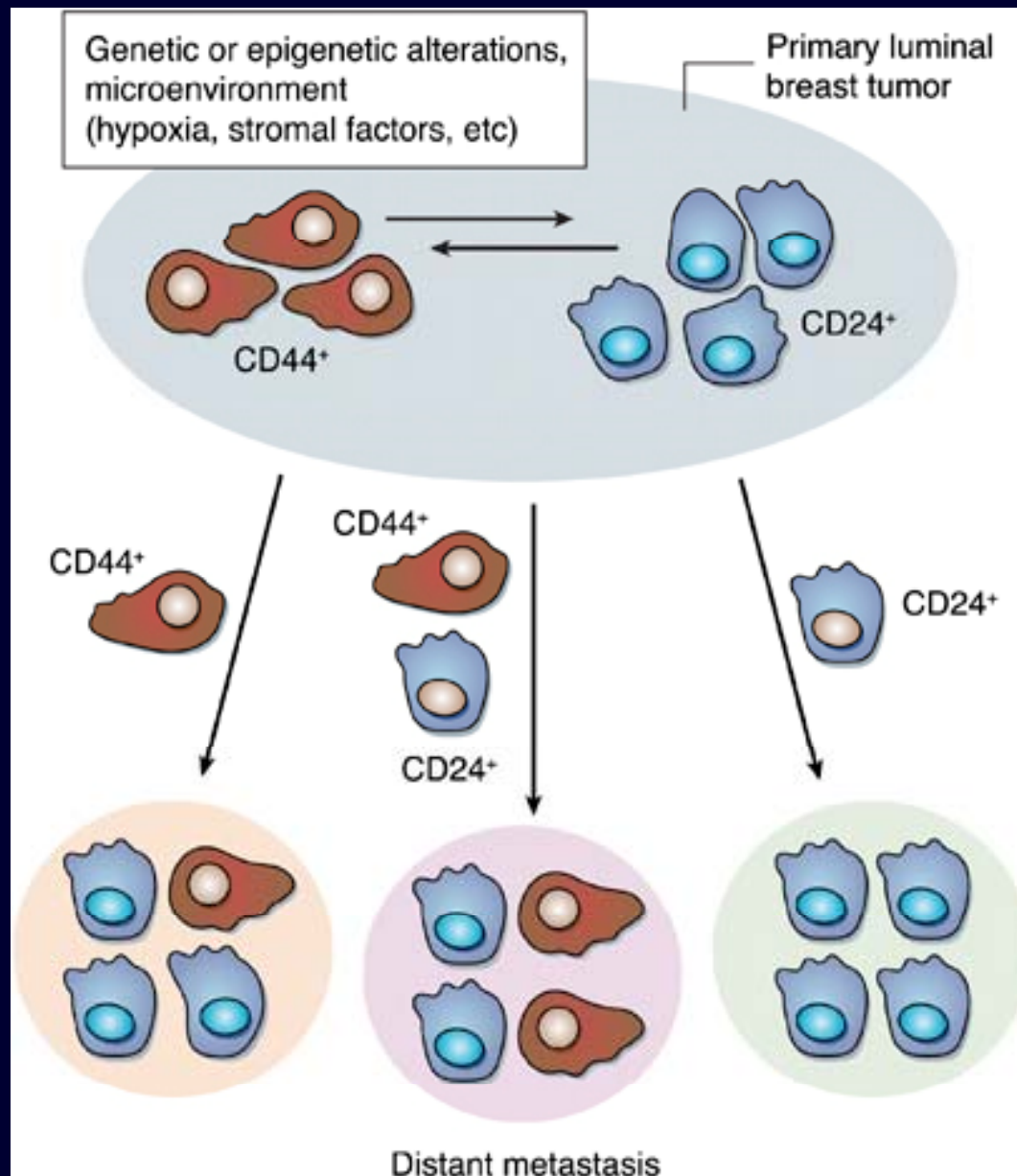
- 110-150 případů na 1 milion obyvatel ročně
- CD24, CD44, ESA, Ep-CAM
ALDH1, CXCR4, CD133, nestin



Detekce markerů CSCs u adenokarcinomu pankreatu



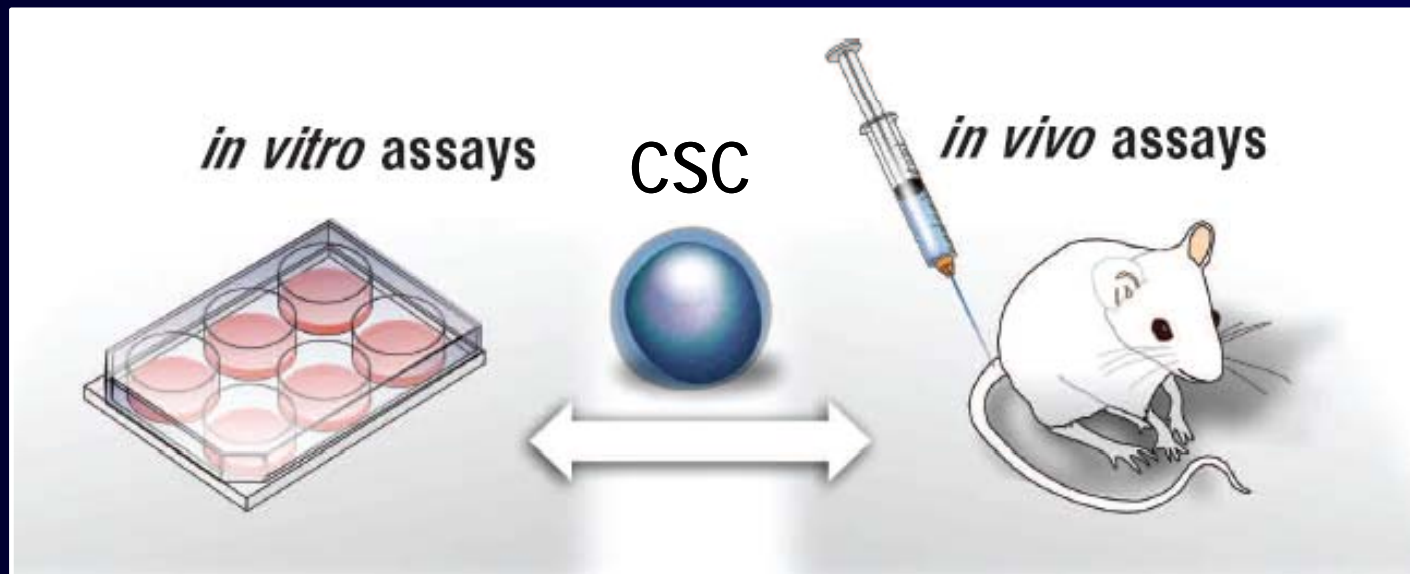
Pankreatická buněčná linie P06



Možné fenotypové rozdíly mezi primárním nádorem a metastázami:
karcinom prsu

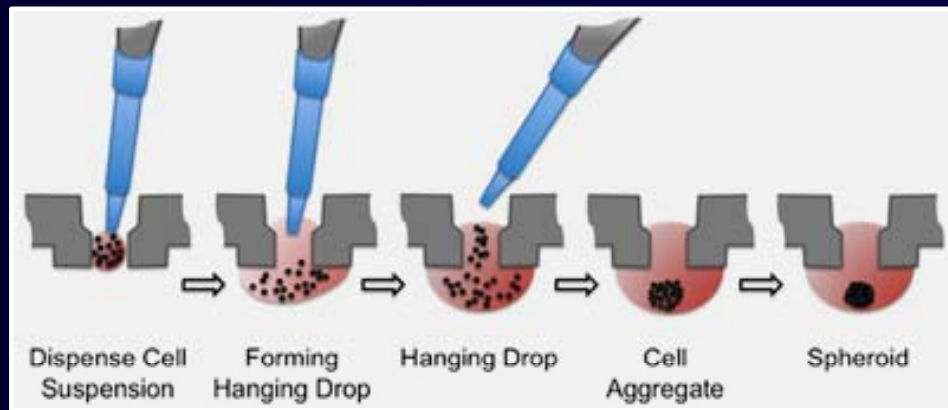
Funkční testy fenotypu CSCs

- 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)

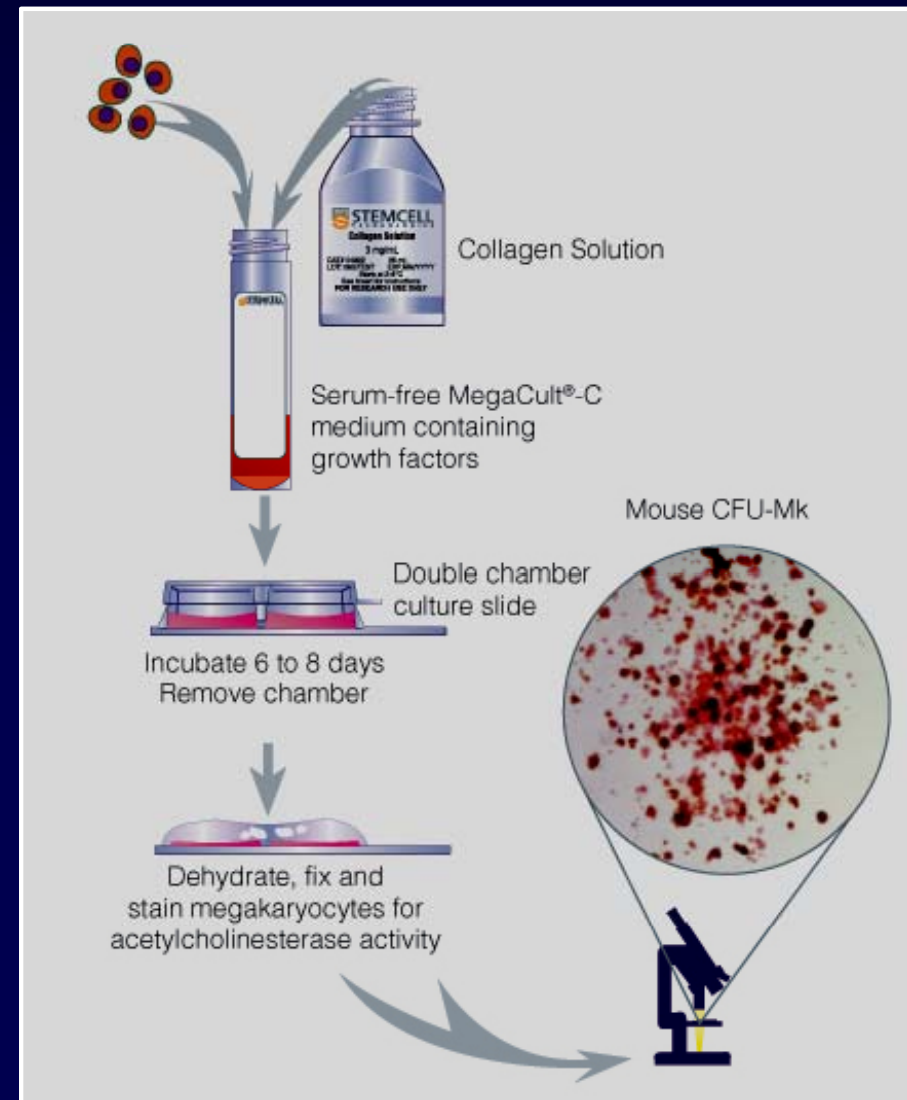
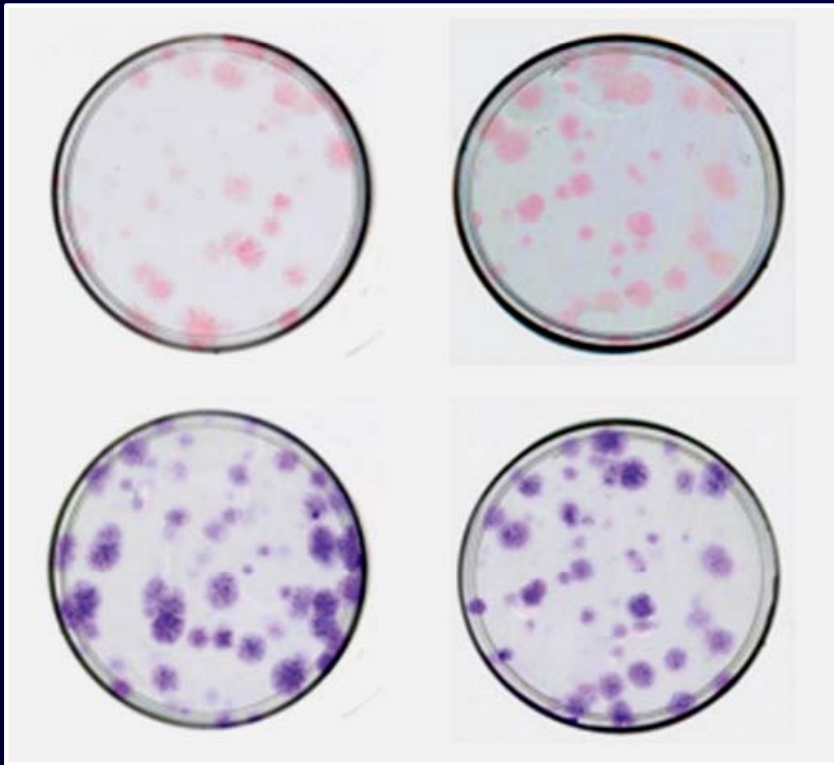
- kultivace buněčných suspenzí v nádobkách s neupraveným povrchem nebo metoda visících kapek (hanging drops)



Linie OSA-02

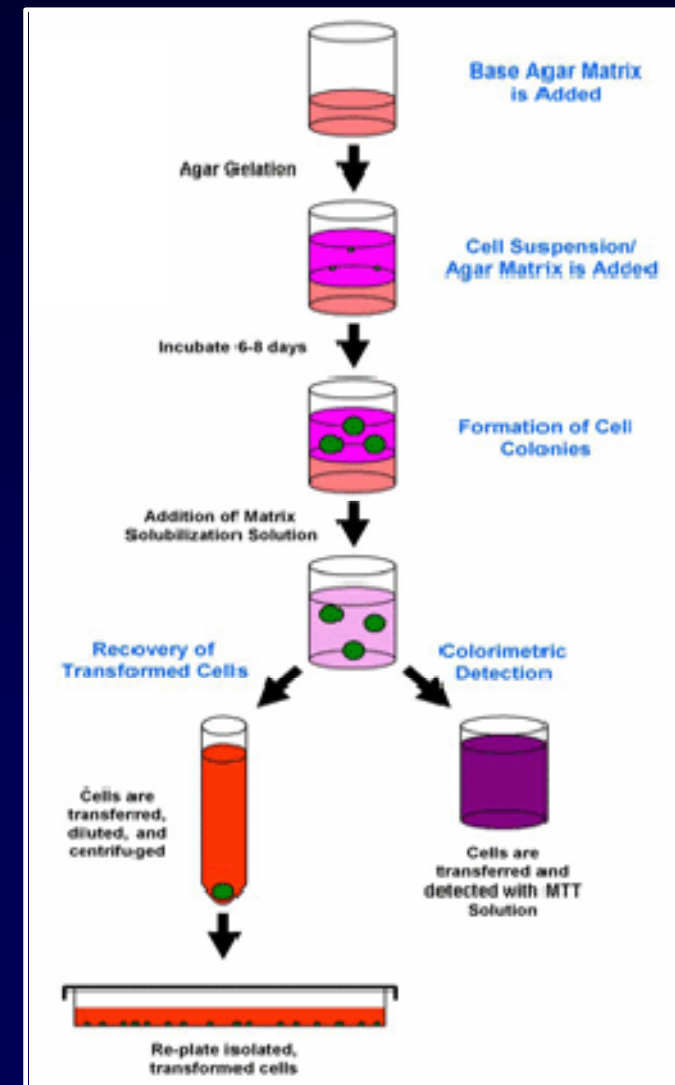
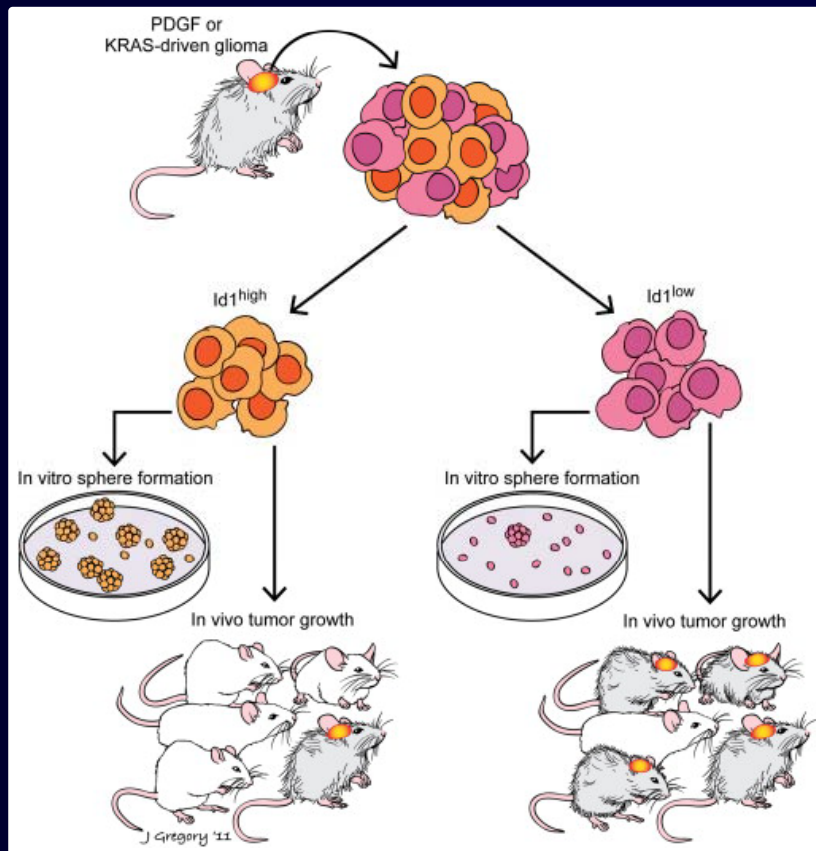
Tvorba kolonií (colony-forming assay)

- vyšetří naředěné buněčné na kulturační misky
→ vytváření kolonií



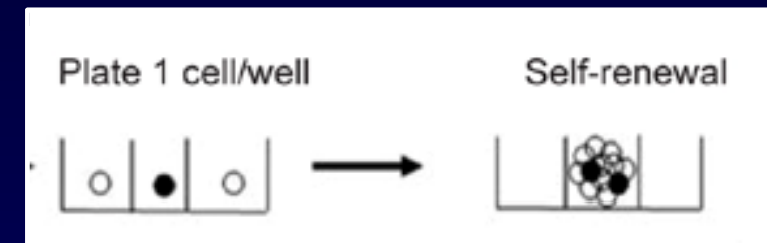
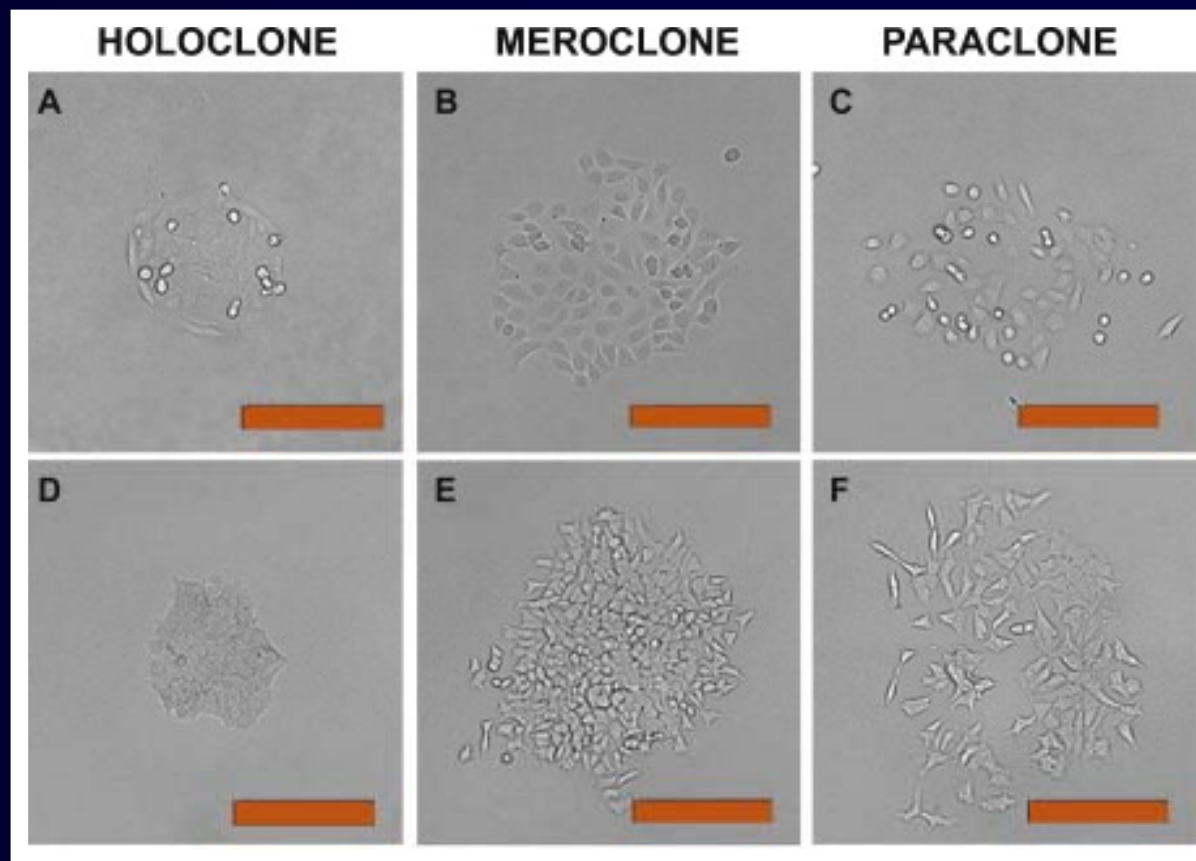
Tvorba sfér (sphere-formation assay)

- vyšetří naředěné buněčné suspenze do měkkého agaru
→ vytváření kolonií



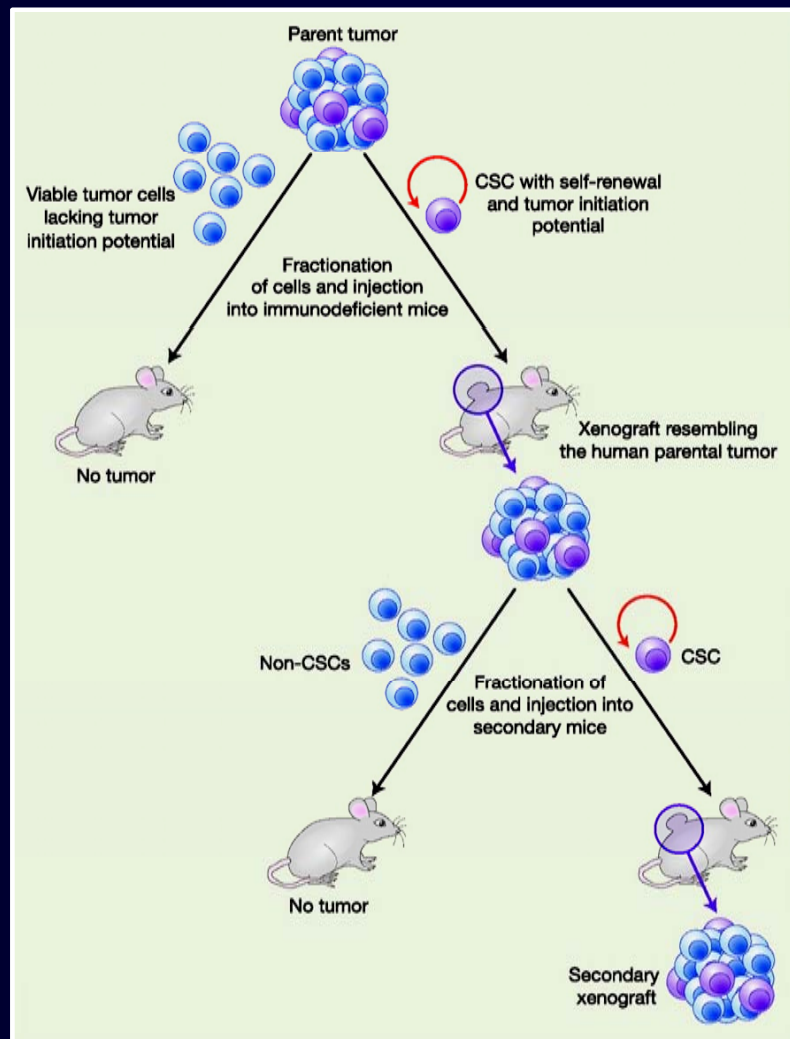
Testy klonogenity (clonogenicity assay)

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

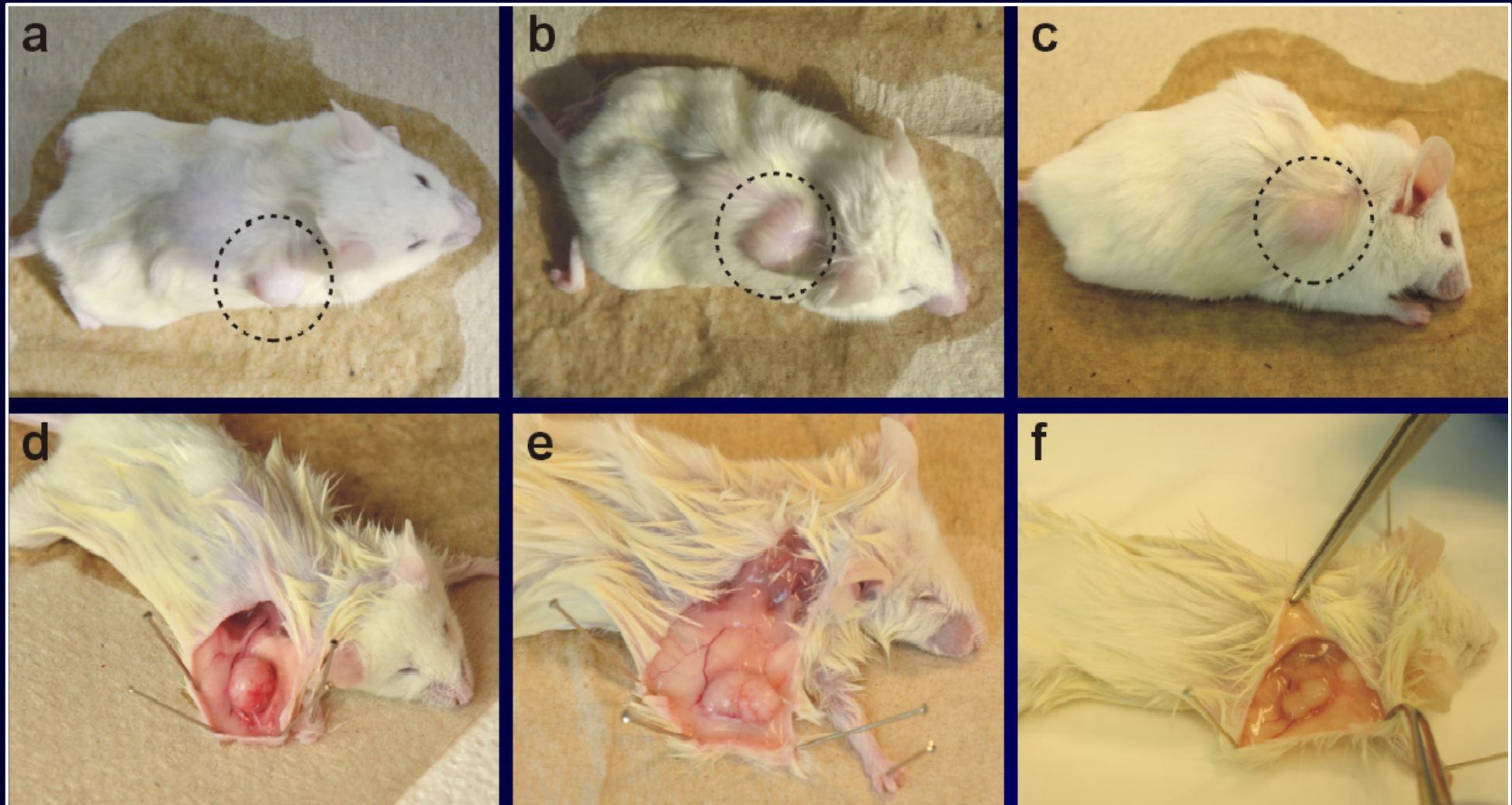


Testy tumorigenicity (tumorigenicity assay)

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



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

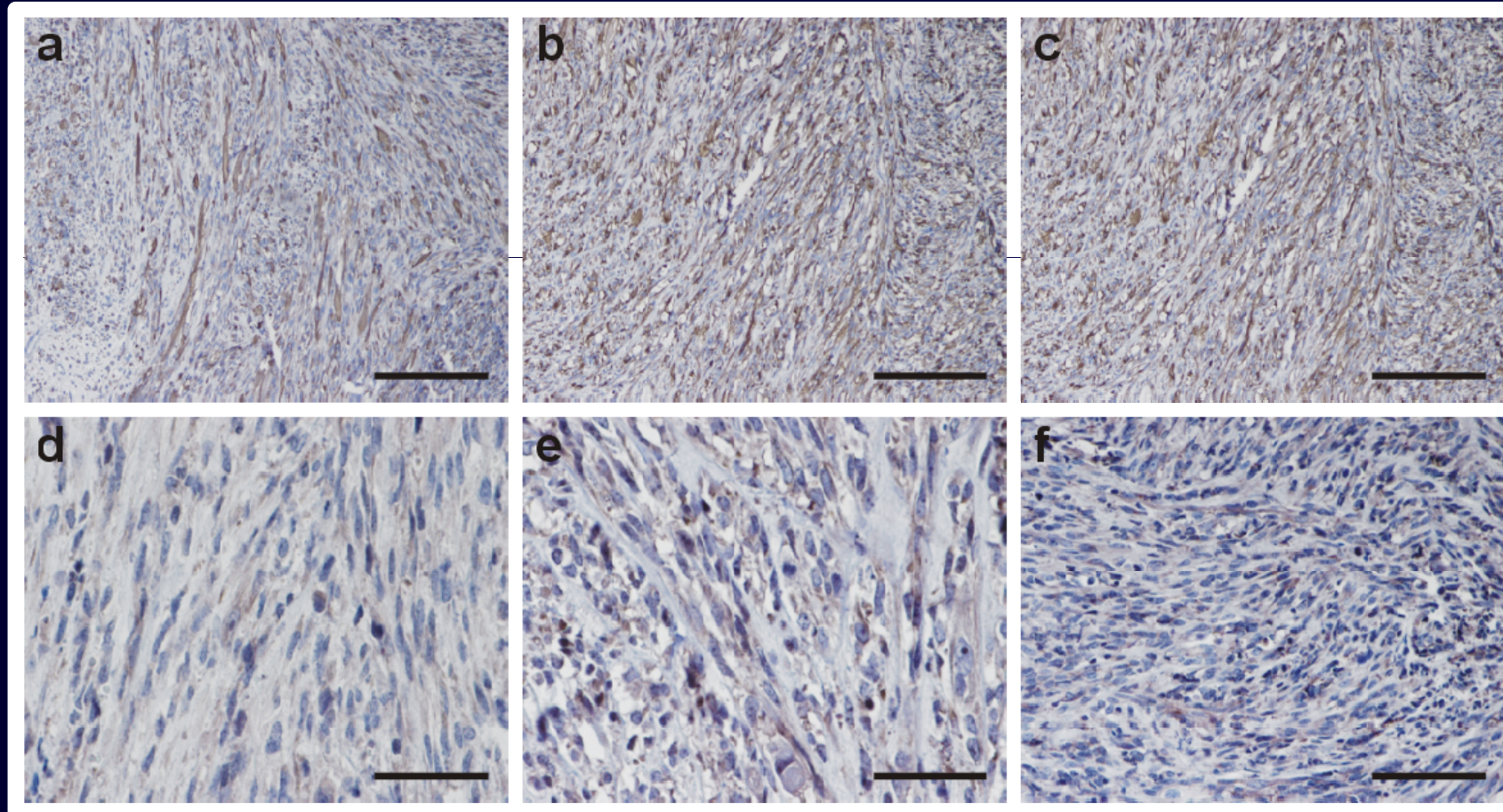


Rhabdomyosarkomová linie NSTS-11: IHC analýza xenograftů

M3A138

M3B138

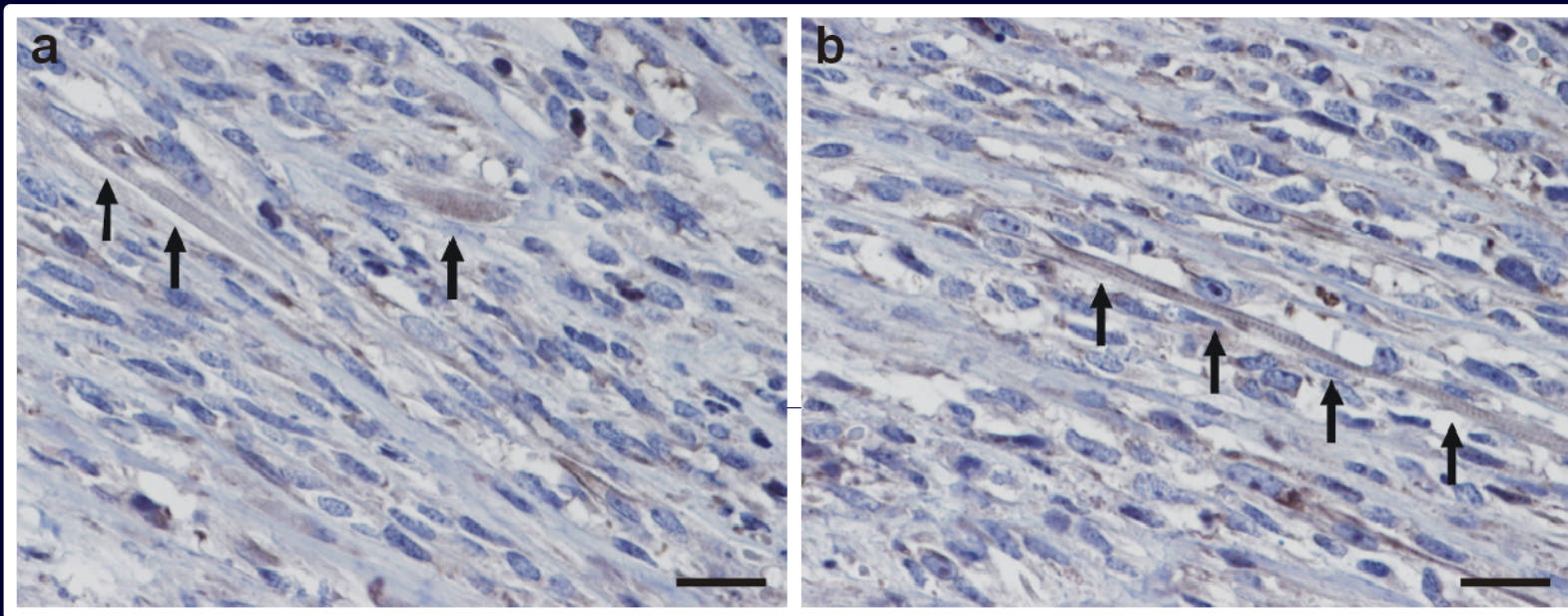
M3C138



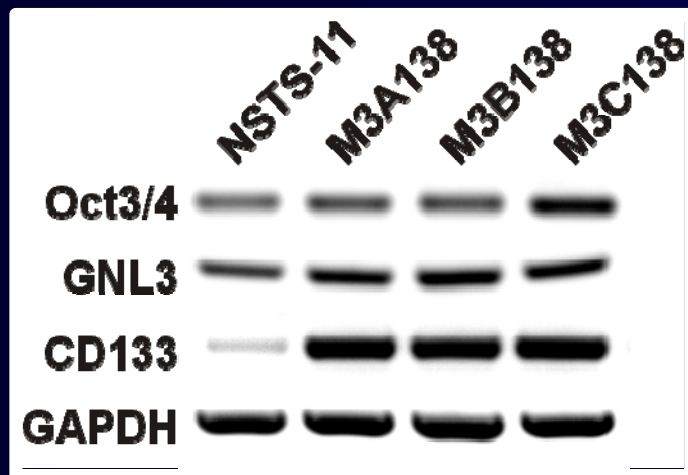
nestin

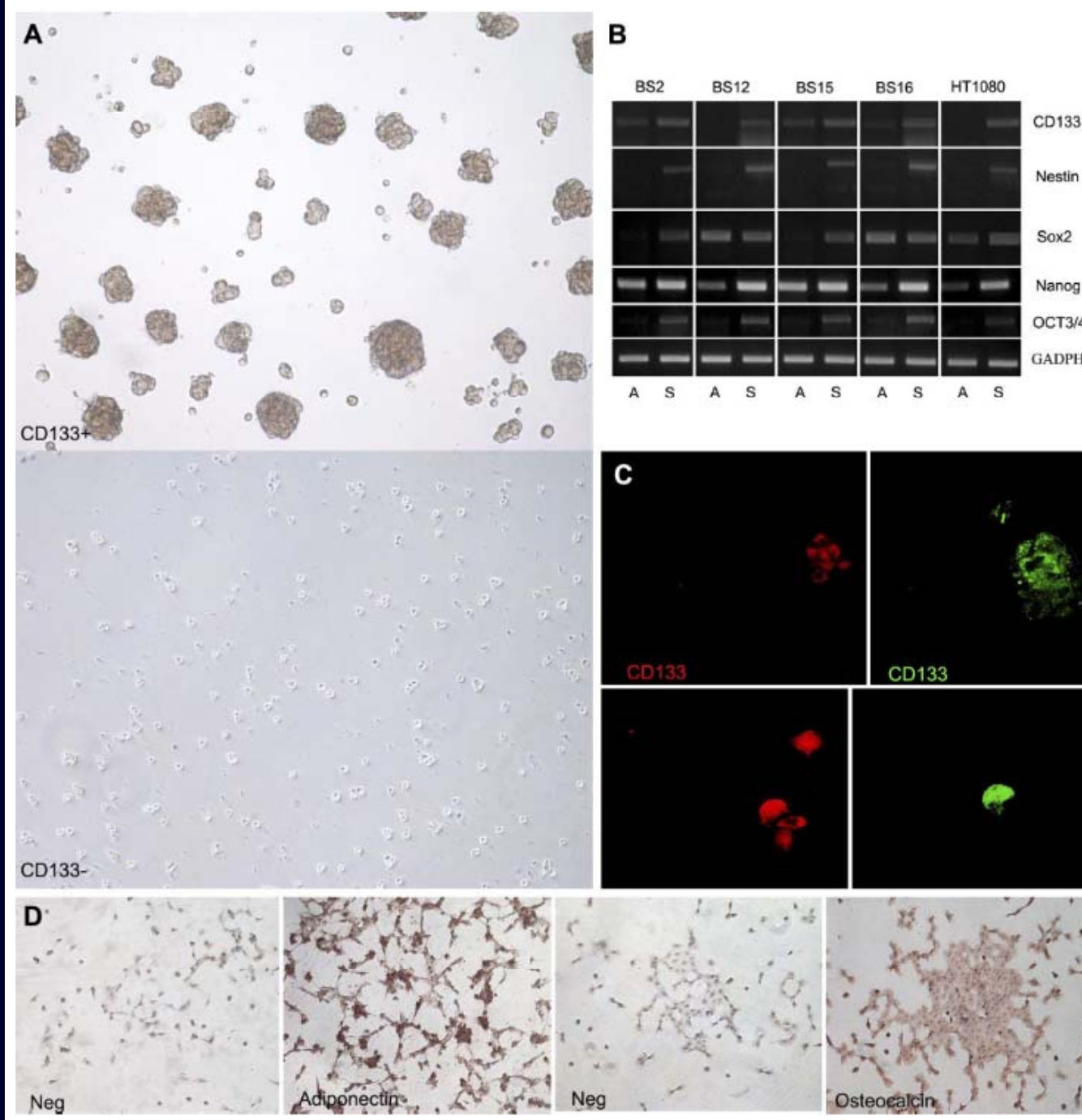
CD133

Rhabdomyosarkomová linie NSTS-11: IHC analýza xenograftů



M3A138

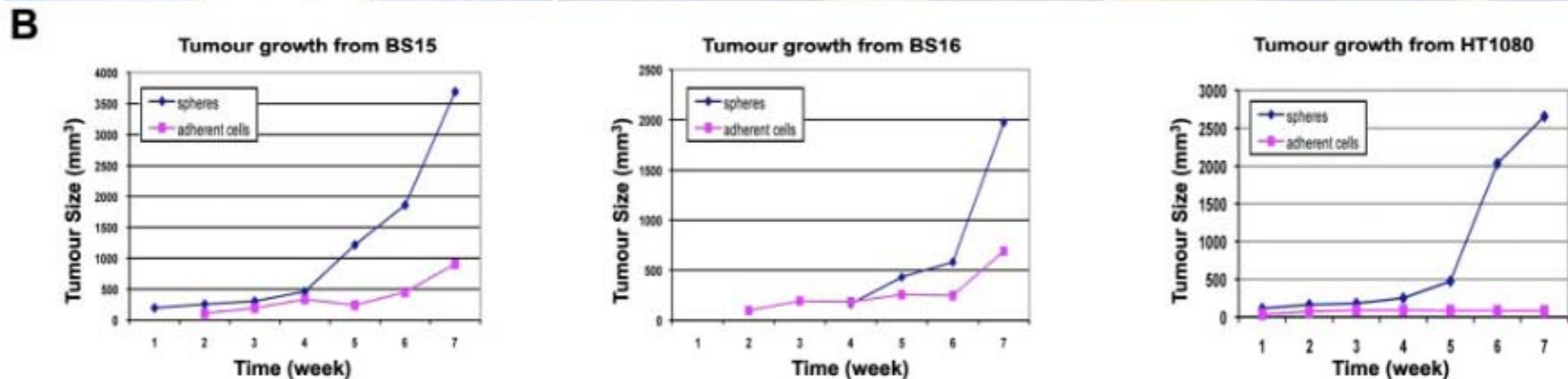
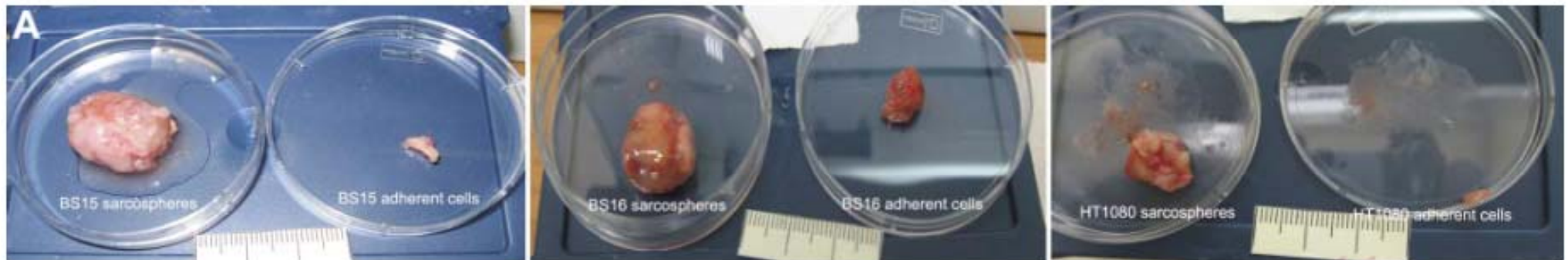




Příklad komplexní analýzy CSCs *in vitro* (osteosarkom)

(Tirino et al., FASEB J, 2011)

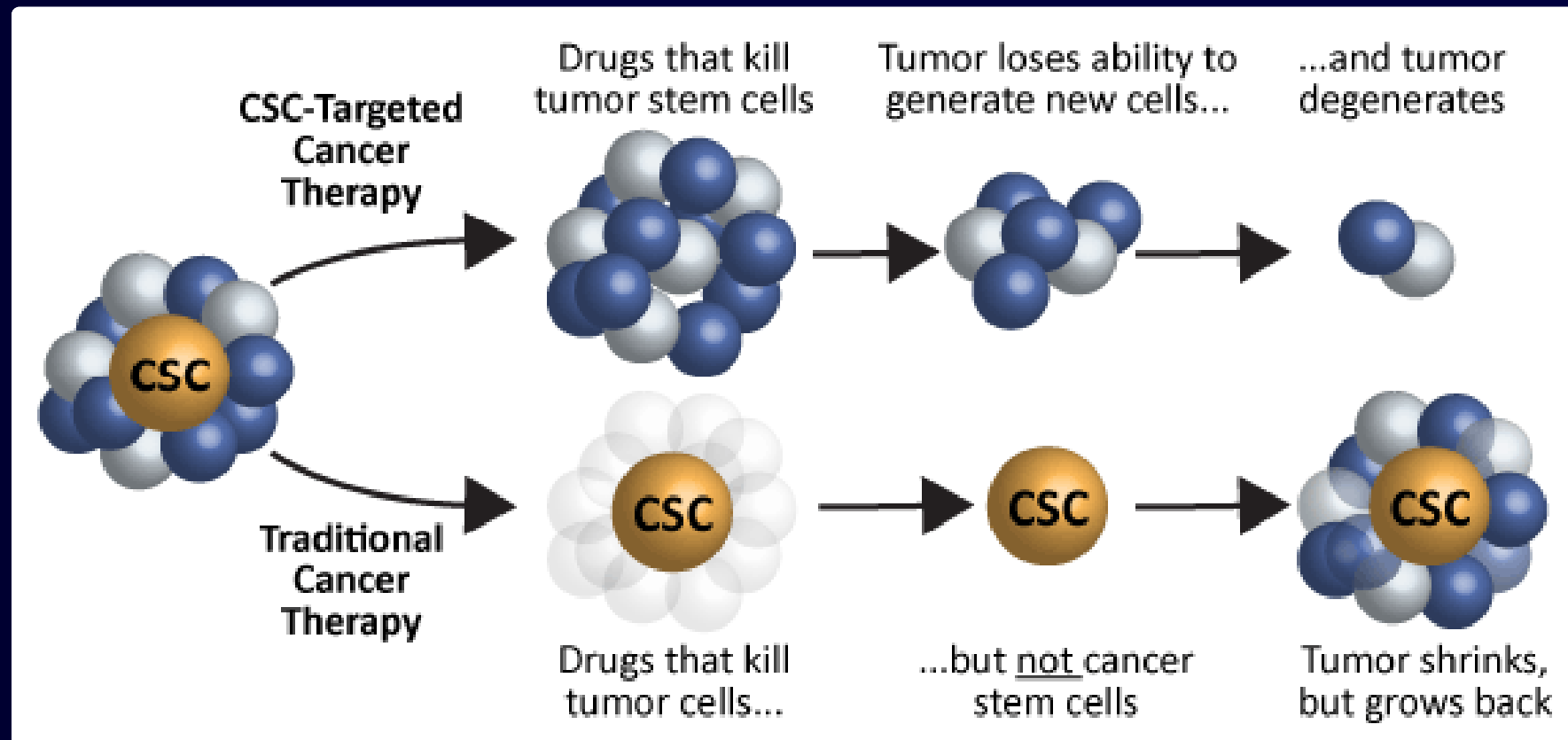
Příklad komplexní analýzy CSCs *in vitro* (osteosarkom)



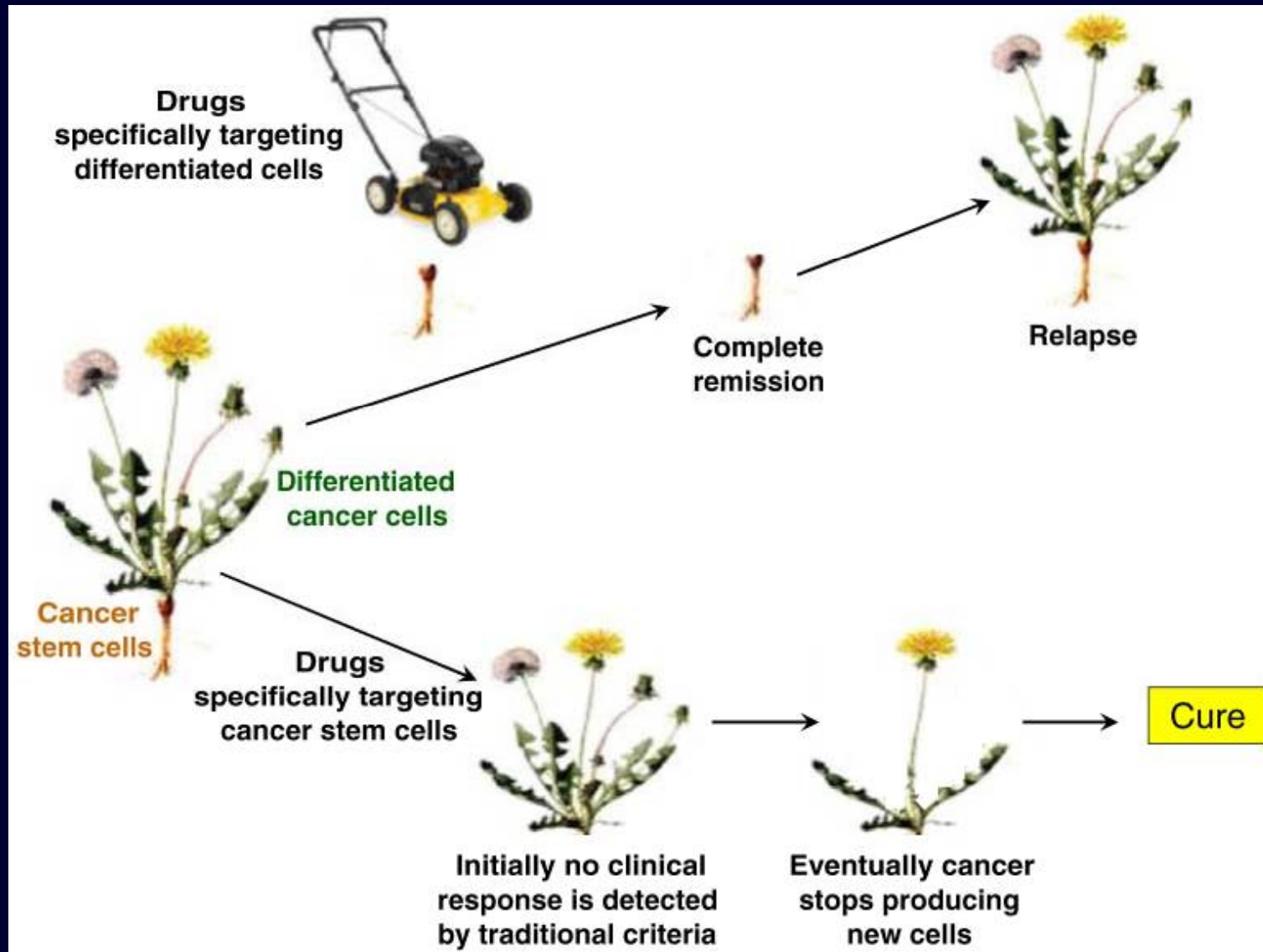
(Tirino et al., FASEB J, 2011)

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)

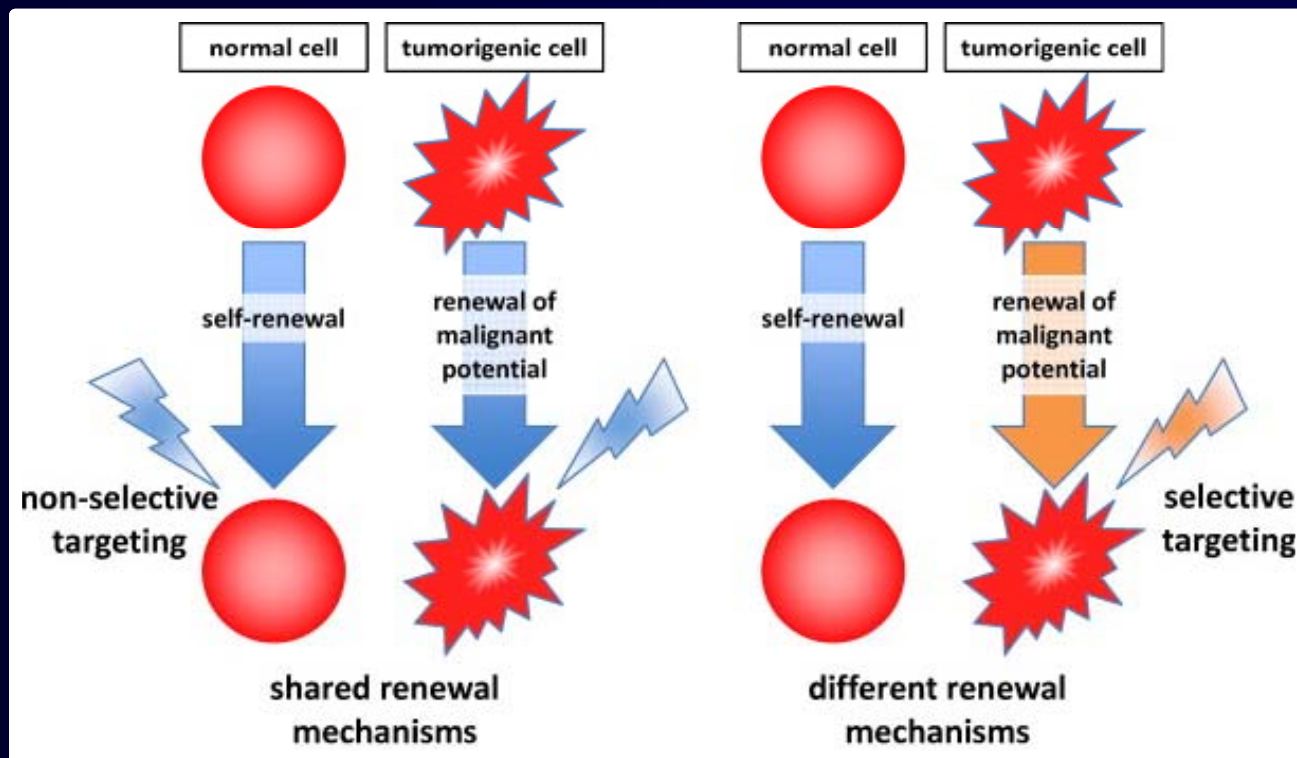
Mechanismy radiorezistence CSCs:

- 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

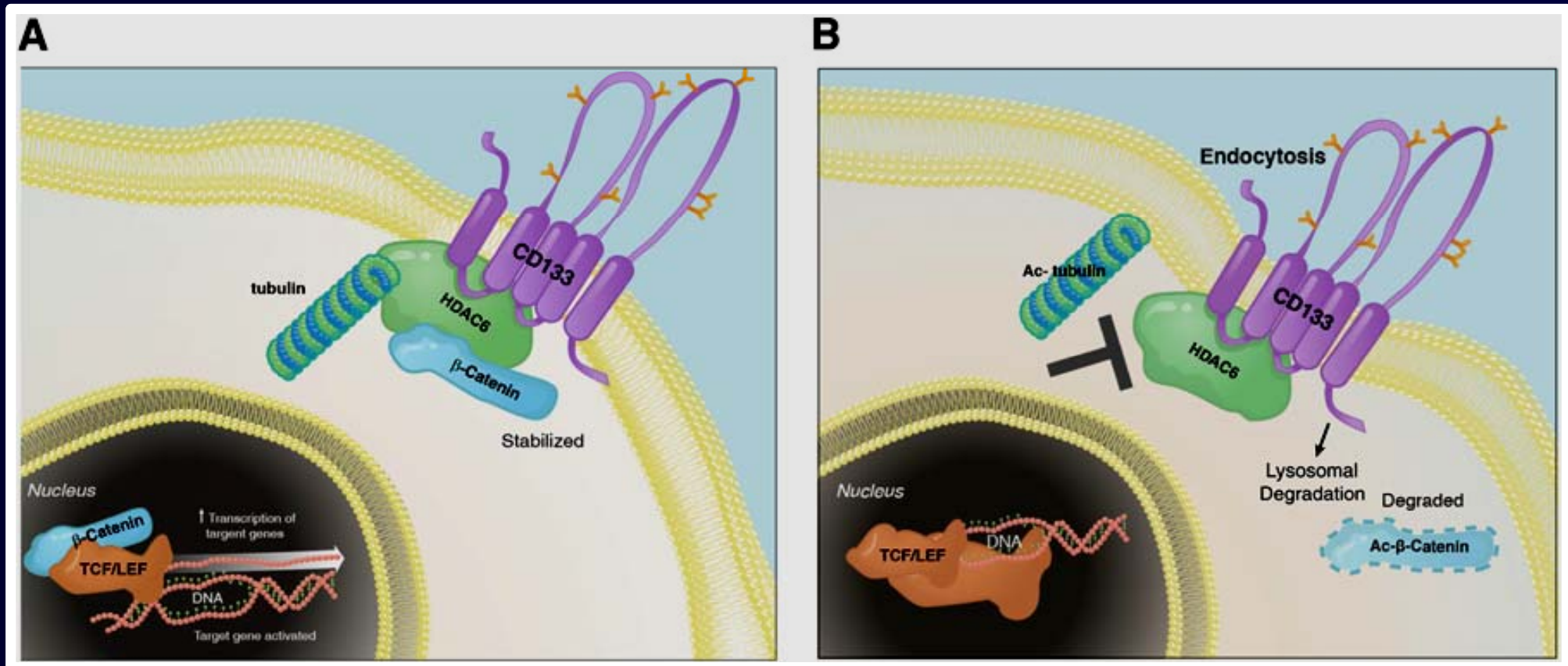


Příklady konkrétních strategií léčby cílené proti CSCs:

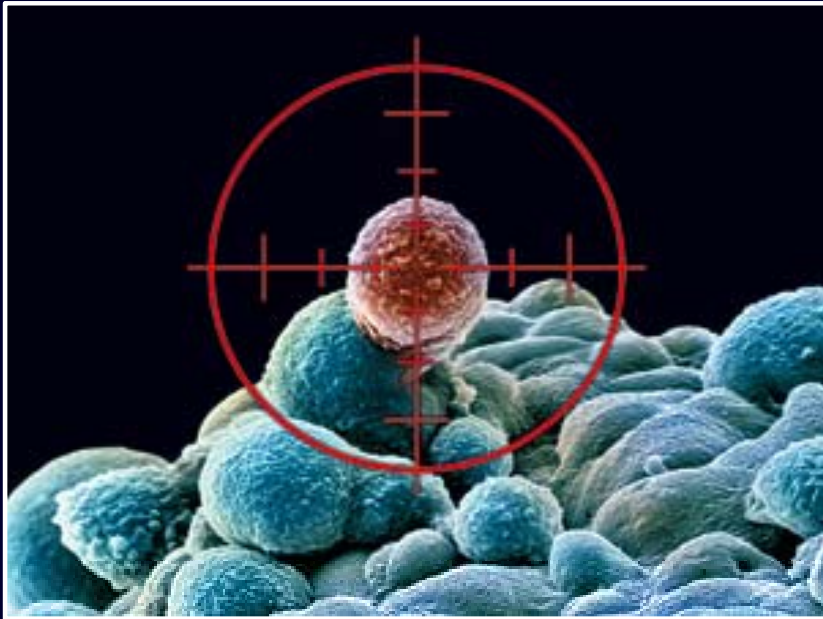
- onkolytická virová terapie s využitím modifikovaných adenovirových vektorů proti CD44⁺/CD24⁻ buňkám – **karcinom prsu**
- anti-EpCAM monoklonální protilátka – **karcinom pankreatu**
- ATRA-indukovaná diferenciace – **neuroblastom**

Hypotéza: interakce CD133/HDAC6/ β -catenin

- využití inhibitorů histonových deacetyláz – degradace β -cateninů?



Mak *et al.*, Cell Rep 2012



Review

Pharmacogenomics and cancer stem cells: a changing landscape?

Francesco Crea¹, Maria Ana Duhagon², William L. Farrar³ and Romano Danesi¹

STEM CELLS

TRANSLATIONAL AND CLINICAL RESEARCH

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

RICHARD T. FRANK,^{a,b} JOSEPH NAJBAUER,^a KAREN S. ABOODY^{a,c}

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*

