

Kmenové buňky a vznik nádorového onemocnění

Tumorigeneze jako onemocnění kmenových buněk (1. část)

1. Úvod

Letos uplynulo 220 let od narození jednoho z nejslavnějších českých vědců **Jana Evangelisty Purkyně**. Tento rodák z Lichovic u Lovosic se svými objevy dotkl řady významných objevů v přírodních vědách, především ve fyziologii. V polské Bratislavi založil první evropský fyziologický ústav. Po návratu do Čech vystudoval medicínu na pražské univerzitě (doktorát r. 1818), stál u založení přírodovědného časopisu *Živa*, byl spoluzakladatelem *Sokola*, *Hlaholu*, *Umělecké Besedy* a *Spolku lékařů českých*. Patří mezi objevitele *buněčné teorie*, která říká, že základní jednotkou těl živočichů i rostlin je **buňka**, obsahující *protoplastu* (dnešní termín: *cytoplasma*). V současné době víme o buňkách mnohem více než Purkyně, který měl k dispozici jen velmi nedokonalý mikroskop. Moderní technologie umožňuje studovat buňku a pochody v ní probíhající až na molekulové úrovni. Máme termíny genom, transkriptom, proteom, metabolom, které dohromady představují základ pochodů v živých buňkách. Poznatky z této oblasti výrazně ovlivnily a ovlivňují medicínu. Dnes dovedeme rozpoznat příčinu a správně léčit a vyléčit řadu chorob, na které se v minulosti často umíralo.

Nemůžeme však toto říci o nádorových onemocněních. Před šedesáti lety diagnóza „rakovina“ znamenala rozsudek smrti, ke kterému došlo dříve (to nejčastěji) nebo později, s pražádnou nadějí na vyléče-

ní. Současné objevy tuto hrozbu snížily, ale zdaleka neodstranily. Rakovina je ve vyspělých zemích stále na předním místě morbidity a mortality. Ani nejnovější protinádorová terapie nedovede beze zbytku odstranit všechny nádorové buňky a zabránit tak úplně návratu choroby nebo rozšíření metastáz.

Podle koncepce v současnosti velmi studované po celém světě je buněčné složení nádoru heterogenní; **hlavní příčinou rekurence onemocnění je existence velmi malé frakce buněčné populace tumoru, tzv. nádorové kmenové buňky**. Pokud se i tyto buňky nepodaří eradikovat, nádor není vyléčen. Na tento problém je zaměřen současný onkologický výzkum.

2. Typy kmenových buněk

Všechny tkáně živočichů vznikají z *organově specifických kmenových buněk*, které jsou obdařeny schopností jednak opakující se samoobnovy, jednak diferenciace na typy buněk určitého orgánu nebo tkáně. Tyto organově specifické buňky se odvozují v průběhu vývoje jedince (ontogeneze) od *embryonálních kmenových buněk*.

Jsou tři druhy kmenových buněk:

- embryonální*
- terminální*
- somatické neboli adultní kmenové buňky*

Embryonální kmenové buňky vznikají při prvních děleních oplozeného vajíčka (zygoty), jsou omnipotentní, tj. mohou se z nich vyvinout všechny buňky dospělého organismu (tuto vlastnost - omnipotenci - si zachovávají všechny *rostlinné buňky* po celou dobu svého života; rovněž tak někteří primitivní živočichové jako nezmar nebo ploštěnky). Dalším dělením se z embryonálních buněk tvoří tři zárodečné listy: endoderm, ektoderm a mesoderm. Lidské embryonální kmenové buňky si zachovávají plnou omnipotenci pouze do začátku organogeneze, pak tato schopnost začíná být omezena - stávají se multipotentní.

Germinální kmenové buňky jsou lokalizovány v gonádách; v dospělém organismu jsou základem pro tvorbu vajíčka anebo spermie, které umožňují reprodukci jedince.

Somatické kmenové buňky mají užší diferenciální potenciál; různé typy těchto kmenových buněk proliferují a diferencují různě. *Adultní kmenová buňka* je determinovaná orgánem (tkání), z kterého pochází. Má dlouhodobý replikační potenciál a schopnost jak samoobnovy tak diferenciace až na zralou buňku příslušného orgánu (Obr. 1).

Kmenové buňky v dospělém organismu jsou většinou v klidovém („spícím“) stádiu, ale jsou připraveny na podnět, který navodí regeneraci poškozené tkáně. Předpokládá se, že normální adultní kme-

nové buňky se vyskytují v příslušné tkáni (orgánu) na určitém místě označovaném jako „stem cell niches“ (ložiska, útluky kmenových buněk), v němž jsou „ukotveny“ (Moore K. A., 2006). Toto ložisko se skládá z různých buněk stromatu, které jednak slouží pro výživu kmenových buněk a udržování v klidovém stavu, jednak mohou aktivně ovlivňovat biochemické pochody při samoobnově nebo diferenciaci působením na signální transdukcii. Při interakci mezi buňkami stromatu a nádorovými kmenovými buňkami působí řada různých cytokinů a adhezních molekul jako je IL-6, IL-7, VEGF, CXCR-4, RANTES, MIP-1, JAGGPP-1 a IGF-1 (Dierks Ch., 2000). Hovoří se o fyziologické homeostáze kmenových buněk. Dysregulace signálních drah narušuje normální funkci tohoto ložiska (útluku). Tato funkční dysregulace způsobí, že kmenové buňky se vymaní dozoru v místě pobytu, který ho udržuje v klidovém stádiu, a nastoupí cestu samoobnovy vstupem do cyklu buněčného dělení a k rozvoji prekancerózních mechanismů, vyústujících až k maligní nádorové transformaci a ke vzniku tumoru (Clarke M. F., 2006). Těchto ložisek může být v určité tkáni více, i když jsou nepatrná. Hovoří se o submikroprostředí (submicroenvironment, submicroniches), které může rozdílně působit (rozdílná signalizace) na lokální nádorové kmenové buňky, z kterých pak vznikají nádory různé agresivní. Jako příklad jsou uváděny dva typy

astrocytomu mozkové tkáně zvaného také glioblastoma multiforme, který může být od počátku velmi zhoubný (primární glioblastom), na rozdíl od sekundárního glioblastomu, progredujícího i několik let (Zhu Y., 2002; Sanai N., 2005).

U hemopoetických nebo intestinálních kmenových buněk a u systému vlasových váčků homeostáza kmenových buněk odvisí od rovnováhy mezi růst-inhibujícími signály BMP a růst-podněcujícími signály Wnt. Dále bylo zjištěno, že signalizace osy SDF-1/CXCR4 vyvolává tvorbu nádorových metastáz; exprese CXCR4 identifikuje migrující nádorové kmenové buňky.

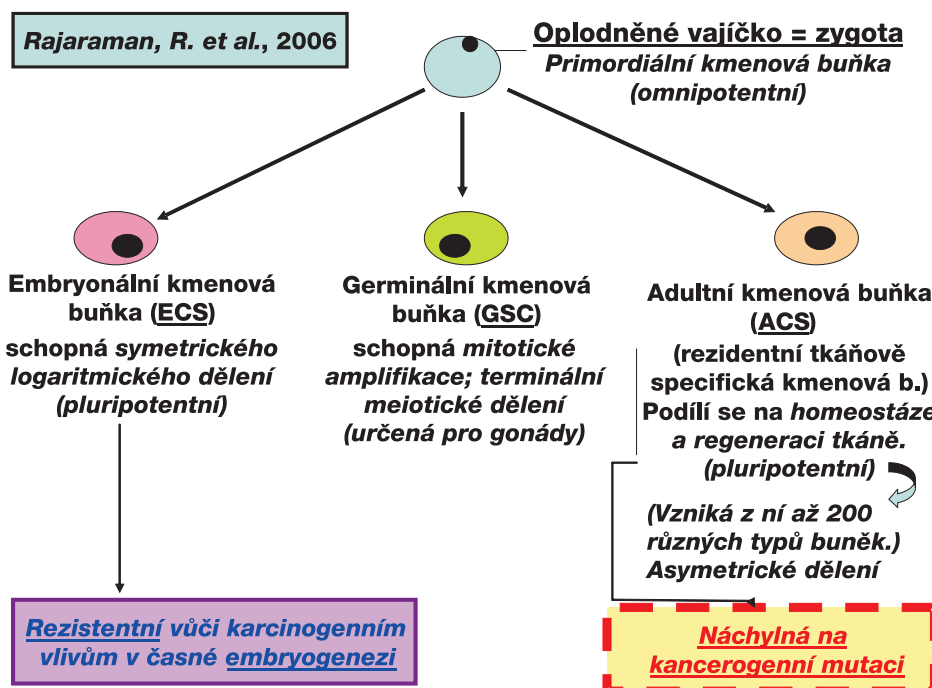
Kmenové buňky se mohou dělit nejen *symetricky*, ale též *asymetricky*, kdy jedna dceřinná buňka si zachová charakter původní kmenové buňky, kdežto druhá se stává *rychle proliferujícím progenitorem* se schopností diferenciaci až na *terminální zralou buňku* příslušné tkáně (orgánu). Progenitorová buňka má omezený počet buněčných dělení, pak diferencuje nebo zanikne.

Normální tkáň obsahuje tři rozdílné kompartmenty buněk:

- (i) *kompartiment se schopností samoobnovy, který obsahuje klidové kmenové buňky*
- (ii) *kompartiment proliferujících progenitorů*
- (iii) *terminální kompartiment s diferencovanými a apoptotickými buňkami.*

Velmi důležitou funkcí kmenových buněk je regulace samoobnovy. Samoobnova je u nich nutná, protože jejich životnost musí trvat po celou dobu života příslušného jedince. Udržují přitom rovnováhu mezi replikací a diferenciací buněk. Na mechanismech, které toto realizují, se podílejí signální dráhy, řídící vývoj jedince (ontogenezi).

Patří sem kupř. Oct-4, BMP (Bone Morphogenic Protein), rodina *Janus-kinasy*, *Notch* (regulace samoobnovy a diferenciaci u nervových kmenových buněk), *Sonic hedgehog (Shh)* (regulace adultních nervových progenitorů a samoobnovy, význam pro biologii mozkových nádorů) a *Wnt-signalizace* (Wnt-proteiny jsou extracelulární proteiny aktivující *receptor Frizzled-rodiny* a tím dráhu inhibující proteolýzu β -kateninu, což umožňuje transkripci genu pro *TCF/LEF-proteiny*, podílející se na samoobnově a diferenciaci buněk) (Taipale J., 2001; Reya T., 2003). *Bmi-1 gen* (člen Polycomb rodiny) je důležitý faktor pro samoobnovu kmenových buněk. Polycomb proteiny tvoří komplex DNA-vázajících proteinů s gen-supresorovou aktivitou. Mechanismus spočívá pravděpodobně v „umlčování“ (silencing) genů navozením modifikace chromatinu. Mutantní varianta se podílí na buněčné proliferaci (Raaphorst F. M., 2001). Zvýšená exprese *Bmi-1* genu byla prokázána u několika nádorů (Vogelstein B., 2004). Patří sem dále signalizační kaskáda epidermálního růstového faktoru a jeho recepturu ([EGF]/EGFR), růstového faktoru kmenových buněk a recepturu ([SCF]/KIT), destičkového růstového faktoru s receptorem ([PDGF]/PDGFR) a „sonic hedgehog“ transkripčního faktoru (SHH/PTCH/GLI), jejichž reaktivace byla prokázána v kmenových nádorových buňkách nebo v tumor-iniciujících buňkách (Mimeault M., 2007). Hematopoetické kmenové buňky (HSCs) pro jejich relativní snadnou dostupnost jsou často studované, i když ani u nich nejsou plně objasněny mechanismy, které vedou ke změně stavu relativního klidu (G_0 -fáze) do rychle proliferující fáze buněčného cyklu dělení navozené kupř. stresem. Tento přechod potlačují regulační faktory p27 (KIP), což je inhibitor cyklin-dependentní kinázy (E-CDK-2) a Mad-1, působící jako antagonist MYC (Walkley C. R., 2005; McArthur G. A., 2002). Studium mechanismů, kterými

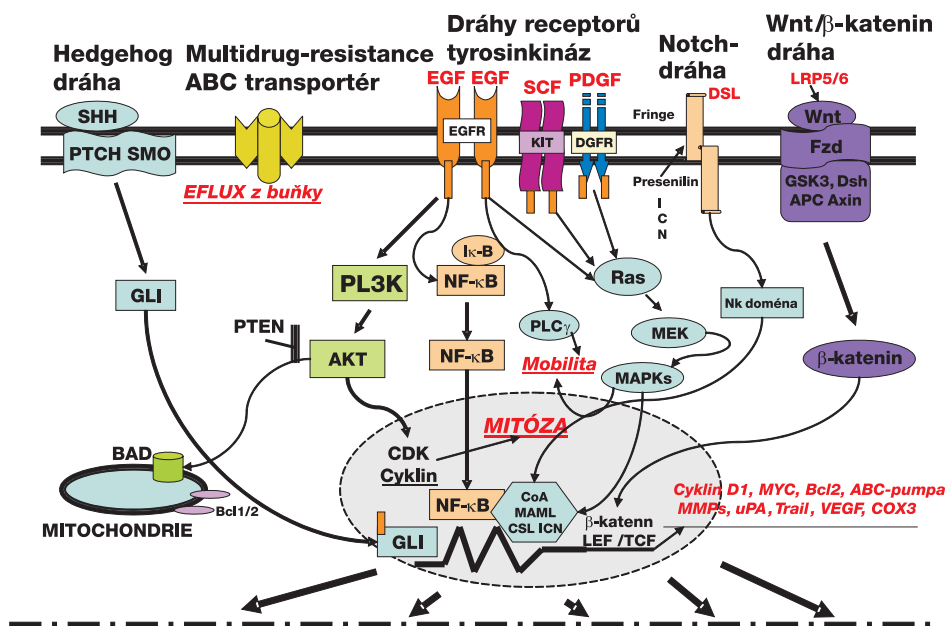


Obr. 1: Základní typy normálních kmenových buněk a jejich vlastnosti

HSCs navozují samoobnovu a diferenciaci jako je aktivace nebo inhibice transkripčních faktorů, regulátorů buněčného cyklu a genů ovlivňujících strukturu chromosomů, je důležité pro hledání cílových elementů terapeutického zásahu (Stein M. I., 2004) (obr. 2, 3).

světlovala různorodostí mikroprostředí nádorových buněk a spolupůsobením genetických subklonů, vzniklých při postupně se hromadících různorodých somatických mutacích. Další vysvětlení může být takové, že nádor je komplexní útvar trojrozměrné tkáně, v níž nádorové buňky se

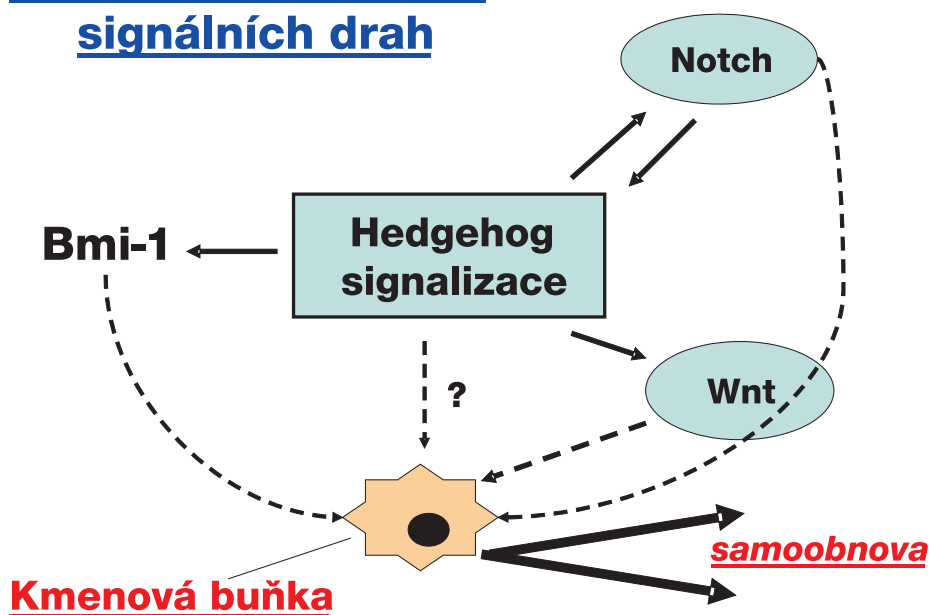
jim odpovídajících patologických nádorových kmenových buněk. Nádorové buňky a jejich prostředí, tj. buňky stromatu jako jsou fibroblasty, myofibroblasty, endotelové buňky, pericyty, a četné zánětlivé buňky spolu s buňkami imunitního systému na sebe vzájemně působí a vytváří komplexní signalizační síť, která může výrazně ovlivnit rozvoj nádoru (obr. 4).



Účinek na: vývoj buňky anti-apoptóza angiogeneze invaze metastázy

Obr. 2: Signální dráhy podílející se na samoobnově tumor-iniciujících buněk (onkogenní signalizace)

Hypotetická interakce signálních drah



Obr. 3: Předpokládaná interakce signalizace onkogenní kaskády tumor-iniciujících buněk

3. Nádorové kmenové buňky

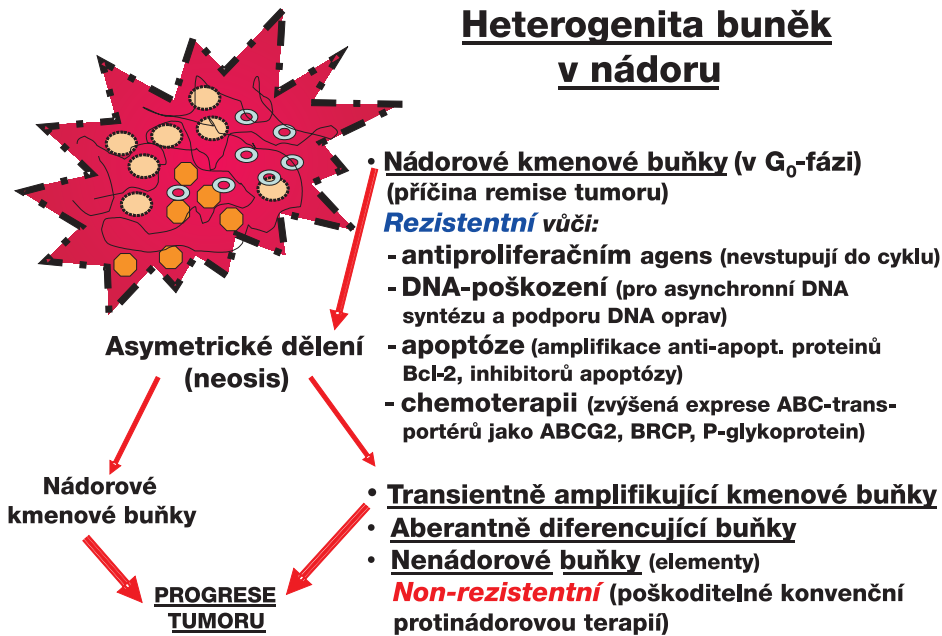
Ačkoliv nádor začíná monoklonální expanzí, většina nádorů obsahuje v dalším vývoji **heterogenní populaci nádorových buněk**. Tato pozorování se obvykle vy-

staly funkcionálně heterogenní jako důsledek jejich diferenciaci. Podle tohoto scénáře působí nádor jako „karikatura“ příslušné normální tkáně, jejíž rozvoj je udržován proliferací nikoliv normálních kmenových buněk určitého orgánu, ale

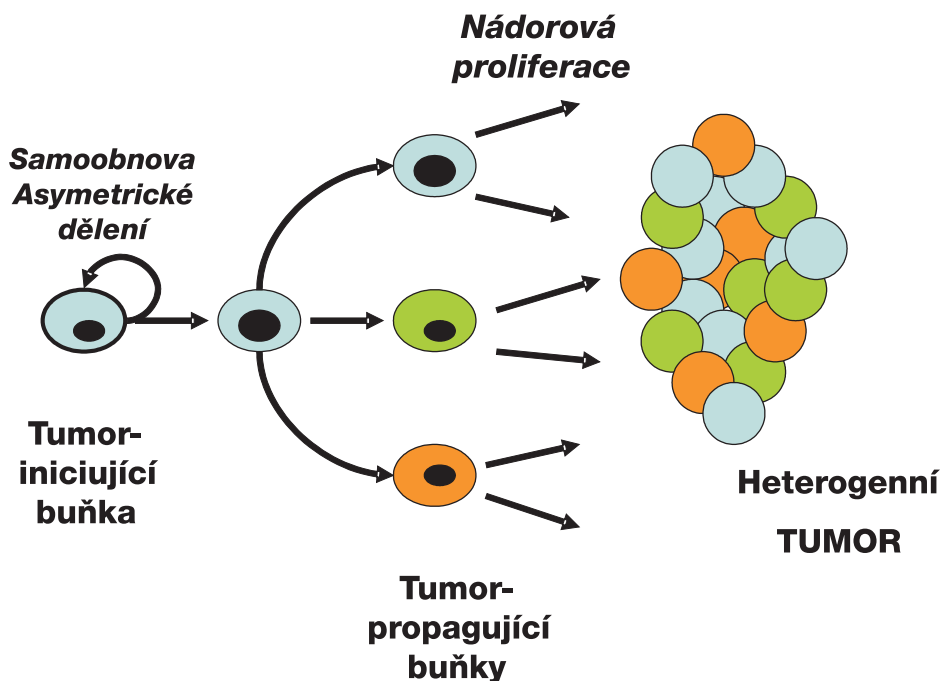
Z této heterogenní skupiny buněk tvořících nádor se vymezuje malá subpopulace, jejíž vlastnosti se podobají kmenovým buňkám a které byly nazvány **nádorové kmenové buňky (CSCs)** (Clarke M. F., 2006). V jejich definici musí být dvě základní charakteristiky: (1) musí mít schopnost samoobnovy, (2) musí poskytnout vznikajícímu nádoru různé buněčné linie, které umožňují jeho rozvoj (Lee J. T., 2007). Další důležitou vlastností nádorových kmenových buněk je rezistence vůči konvenční cytotoxické chemoterapii. Jsou totiž v G₀-fázi, mimo cyklus buněčného dělení, tedy na ně nemůže působit cyklus-specifická chemoterapie. Kromě toho nádorové kmenové buňky jsou rezistentní též vůči poškození DNA, protože jsou schopné asynchronní DNA-syntézy, včetně možnosti DNA opravy. Nádorové kmenové buňky vykazují vyšší obsah anti-apoptózových proteinů (jako je rodina Bcl-2) a inhibitorů apoptózy, než mají buňky diferencované. Dalším faktorem, který je chrání před toxickými látkami, je schopnost exprimovat velké množství transportérových proteinů jako je ABCG2 (BCRP) nebo P-glykoprotein, které případné toxiny z buňky rychle vypudí. Nádorové kmenové buňky také unikají imunologické reaktivitě hostitelského organismu (Wicha M. S., 2006).

Intratumorová heterogenita podle tradiční představy předpokládá, že všechny nádorové buňky jsou obdařeny schopností vytvářet nové nádorové buňky (tumorigenní kapacita) jednoduchou proliferací transformovaných buněk. V tomto modelu je intratumorová heterogenita vysvětlována klonální diverzitou transformovaných buněk na základě různého typu mutací (genetických alterací). Naproti tomu alternativní, tzv. „hierarchický“ model kmenových buněk, je založen na myšlence, že nádor udržuje svoji proliferaci aktivitu pomocí minoritní subpopulace ná-

Heterogenita buněk v nádoru



Obr. 4: Heterogenní složení tumoru



Obr. 5: Vznik nádorové proliferace (jako patologická samoobnova)

porových buněk, které mají vlastnosti podobné kmenovým buňkám („stem-like“ properties):

- (1) schopnost samoobnovy (tj. schopnost proliferace bez jakékoli diferenciaci nebo maturace a bez ztráty proliferací aktivity)
- (2) samoregulace počtu kmenových buněk vyvážením samoobnovy oproti diferenciaci dceřinných buněk
- (3) schopnost diferenciaci a maturace dostatečné pro rekonstituci a dlouhodobé přežití všech funkčních elementů v daném souboru buněk (tj. buněčné linii, orgánu, tkáni nebo neoplastickém klonu) (Schulenburg A., 2006).

S tím souvisí další důležité vlastnosti jako schopnost exprimovat telomerázu, která umožňuje opakované dělení napojením odštěpeného telomeru při dělení buňky, dále schopnost aktivovat antiapoptózní dráhy, zvyšovat aktivitu membránových ABC-transportérů, které vypuzují z buňky škodlivé látky (protinádorové léky) a schopnost migrace a tvoření metastáz (Wicha M. S., 2006).

U nádorových kmenových buněk se potenciál samoobnovy realizuje patologickými mechanismy. Hovoří se o dysregulaci samoobnovy (self-renewal), excesivní proliferaci a aberantní diferenciaci

na různorodé potomstvo nádorových buněk, vyúsťující do intratumorové heterogenity. Ale i mezi nádorovými buňkami v tumoru určitého orgánu (tkáni) existuje další heterogenita charakterizovaná různým stupněm potenciálu samoobnovy (Nakagawa T., 2007). Byly také nalezeny různé histologické typy nádorových buněk v téměř orgánu. Stále ještě není zcela jasné, z kterých buněk se nádor rozvíjí. Zda to jsou maligně transformované reziduální kmenové buňky příslušné tkáni (orgánu), tedy nádorové kmenové buňky, nebo až jejich bezprostřední progenitory nebo dediferencované „zralé“ buňky. Rázi se proto termín tumor-iniciující buňky (Lee J. T., 2007) (obr. 5).

Abnormální vlastnosti nádorových kmenových buněk mohou narušit homeostázu lokálního mikroprostředí (dysregulation of stem cell-niche homeostasis). Ale také obráceně, dysregulace tumorového mikroprostředí včetně genetických a epigenetických alterací může ovlivňovat vlastnosti tumorových kmenových buněk a podporovat progresi nádoru. Není dosud jasné, zda všechny tumorové kmenové buňky nebo jen jejich specifická podskupina v daném nádorovém mikroprostředí je odpovědná za udržování (rozvoj) tumoru, jeho relaps nebo metastázy.

Fenotyp kmenových buněk, identifikace normálních a nádorových kmenových buněk

Dosud mnoho nevíme o fenotypu kmenových buněk, vyskytujících se v různých tkáních nebo orgánech za fyziologických a patologických stavů. Některé markery kmenových buněk se vyskytují v řadě tkání, jiné je možno detekovat pouze v určitém orgánu.

Příkladem široce rozšířených antigenů jsou markery *AC133*, *Bmi*, *Musashi-1 antigen* nebo *Oct-4*. Nejlépe byly fenotypově charakterizovány hematopoetické kmenové buňky jako *Lin-negativní/CD45-pozitivní/CD34-pozitivní/CD38-negativní* buňky.

Většina těchto antigenů je spojena s různými buněčnými funkcemi. V některých orgánech jsou i rozdíly mezi kmenovými buňkami a jejich progenitory; příkladem může být regulace kontaktu buňka-buňka. V několika orgánech jsou antigeny

odpovědné za charakter intercelulárního kontaktu pomocí těsných spojů (gap-junction) (=GJIC) nejvíce exprimovány ve zralých buňkách, ale chybí (jsou inaktivní) v buňkách maligně transformovaných

(Schulenburg A., 2006).

Tabulka uvádí (dosud identifikované) povrchové membránové markery u solidních tumorů (Tab. 1).

Množství nádorových kmenových bu-

něk v nádorové tkáni bývá velmi malé; u rozvinutých nádorů tvoří obvykle méně než 1 % (Lee J. T., 2007). Jejich průkaz není snadný.

Jsou uváděny tři možné metodologické postupy, které by mohly izolovat a identifikovat nádorové kmenové buňky: (a) využití markerů na povrchu buněčných membrán (b) kultivace buněk za určitých specifických podmínek (c) izolace (obohacení) velmi malé populace nádorových kmenových buněk (progenitorů) pomocí „fluorescence-activated cell sorting“ (FACS) s použitím specifických protilátek proti povrchovým antigenům (CD34, CD138, CD20, CD133, CD44) a vymývací techniky s Hoechstovým barvením (Mimeault M., 2007). „Zlatým standardem“ definujícím nádorové kmenové buňky jsou opakované transplantace na zvířecím modelu (Sakashita H., 2007).

(Podrobná literatura u autora: jaromasopust@seznam.cz)

Typ nádoru	Povrchový marker/ biomarker (s vlastnostmi kmenových buněk)
Hemoblastózy • AML • Myelom	CD34 ⁺ /CD38 ⁻ , Thy-1 ⁻ , KIT ⁻ CD138 ⁻
Prs	CD44 ⁺ , CD24 ^{low}
Ovarium (klon)	CD44 ⁺ , Oct-3/4, Nanog, EGFR Vinmentin, E-kadherin
Mozek • glioblastom, meduloblastom, astrocytom, ependymom • primární gangliogliom	CD133 ⁺ /nestin, neurosféry CD133 ⁺ /nestin, neurosféry
Melanom	CD20 ⁺ , melanoma-sferoidy
Kost (sarkom)	Scro-1 ⁺ , CD105 ⁺ , CD44 ⁺
Kolon a rektum	a: EpCAM ^{high} /CD44 ⁺ /CD166 ⁺ b: CD133 ⁺
Hlava a krk	CD44 ⁺ /Bmi-1 ⁺
Játra	CD133 ⁺
Plíce	Sca-1 ⁺ , CD45 ⁺ , PECAM ⁺ , CD34 ⁺
Melanom	CD20 ⁺
Pankreas	CD44 ⁺ , CD24 ⁺ , ESA ⁺
Prostata	CD44 ⁺ , $\alpha 2\beta 1^{high}$, CD133 ⁺

Tab. 1: Povrchové markery solidních tumorů

Soutěž Soutěž Soutěž Soutěž Soutěž Soutěž

Milé čtenářky, vážení čtenáři,

pro ty z vás, kteří rádi soutěží, jsme připravili několik otázek, které se týkají obsahu článků tohoto vydání Labor Aktuell. Tři vylosovaní výherci se mohou těšit na publikaci *Laboratorní diagnostika (T. Zima a kol., 2007)*. Hodně zábavy při hledání odpovědi přeje redakce Labor Aktuell.

Otázka č. 1:

Jak se jmenuje americká diagnostická společnost, kterou koupil Roche Holding AG v letošním roce?

Otázka č. 2:

Jaké bodové ohodnocení podle Glasgow Coma Scale (GCS) mají pacienti se středním traumatickým poškozením mozku?

Otázka č. 3:

Kdy byly přijata první Mezinárodní opiová dohoda, kterou podepsalo třináct zemí světa?

Otázka č. 4:

Na jaké webové adrese najdete plné znění dokumentu Mezinárodního panelu expertů ke klinickému využití NT-proBNP z letošního roku?

Otázka č. 5:

Vyjmenujte tři druhy kmenových buněk.

Odpovědi zasílejte, prosím, na e-mailovou adresu: prague.labor-aktuell@roche.com