




NATIONAL INSTITUTE OF BIOLOGY

Prof. dr. Tamara Lah Turnšek

Matične celice in rak: izvor dobrega ali zla?

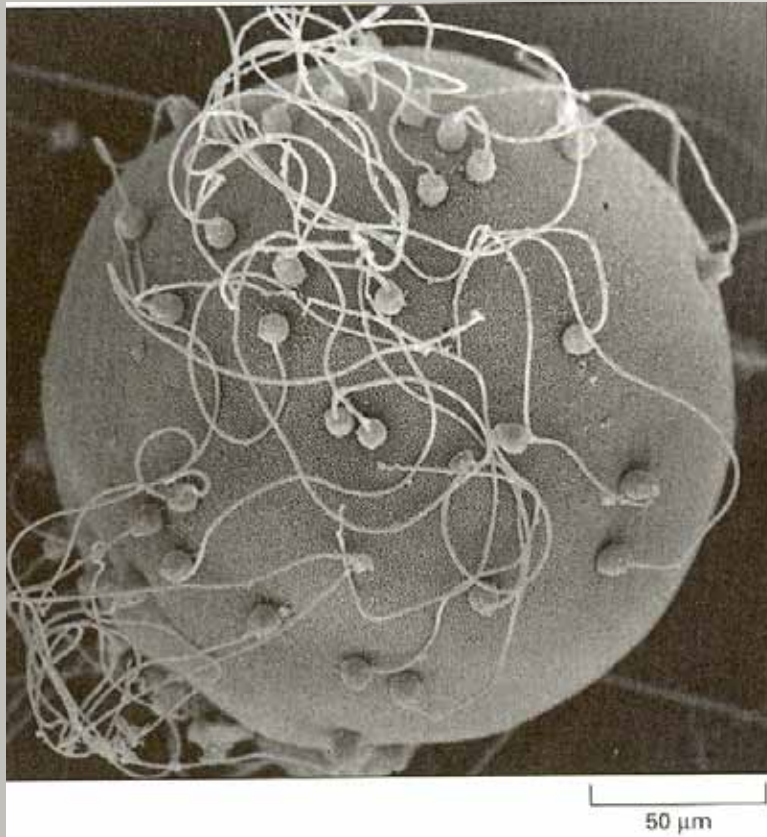
ZTM-Transfuzijska medicina, transplantacija in napredne celične terapije,
Nosilec doc.dr. Pimož Rožman, Ljubljana, 5.2.2009

- 
-
- **Matične celice**
 - **Odrasle matične celice – nastanek in evolucija**
 - **Tumorske/rakave matične celice**
 - **Gliomske matične celice – glioblastomi**
 - **Pomen matičnih celic za zdravljenje raka**

■ **Matične celice**

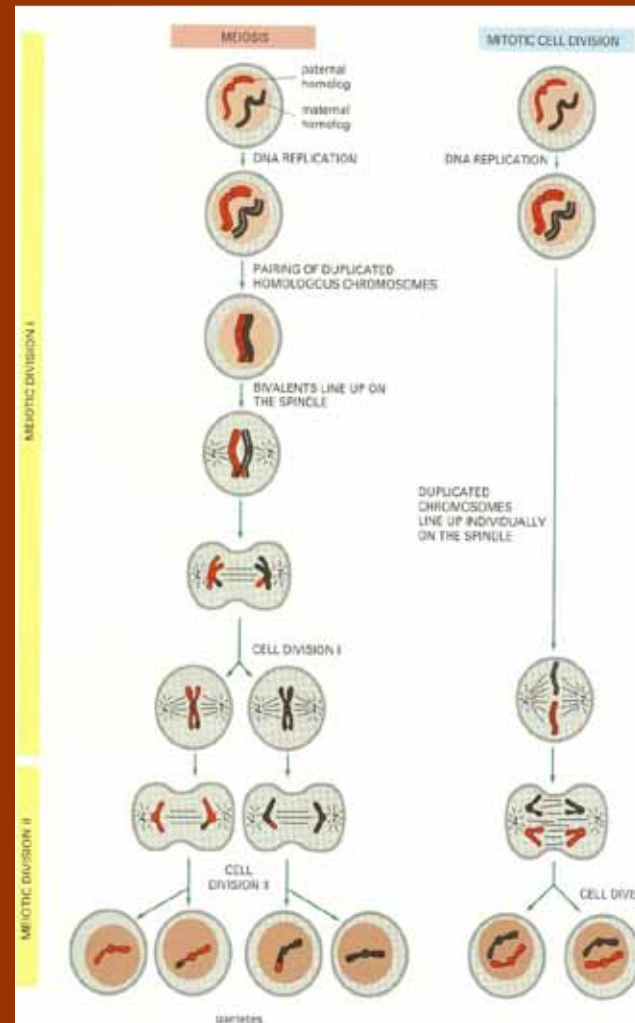
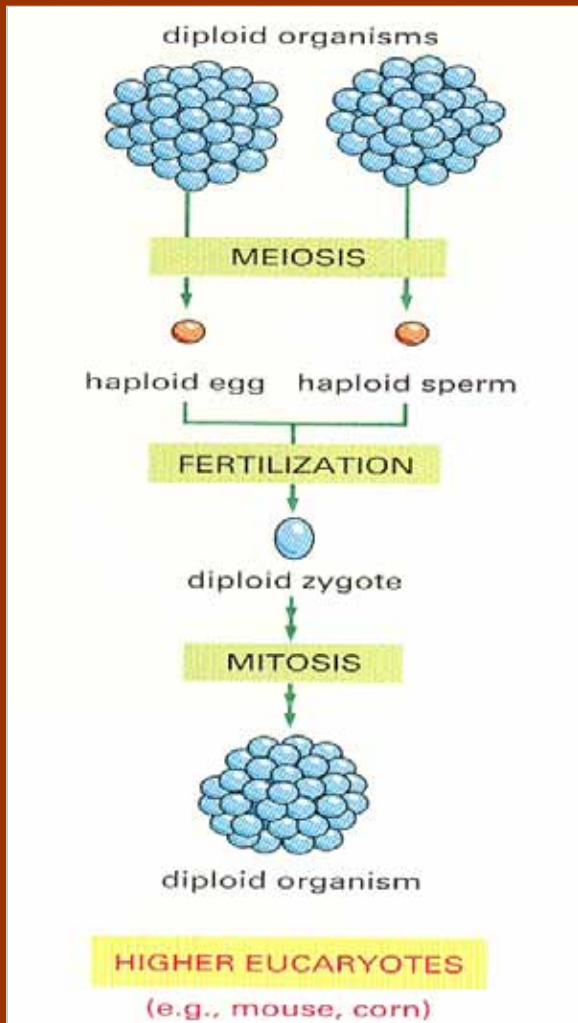
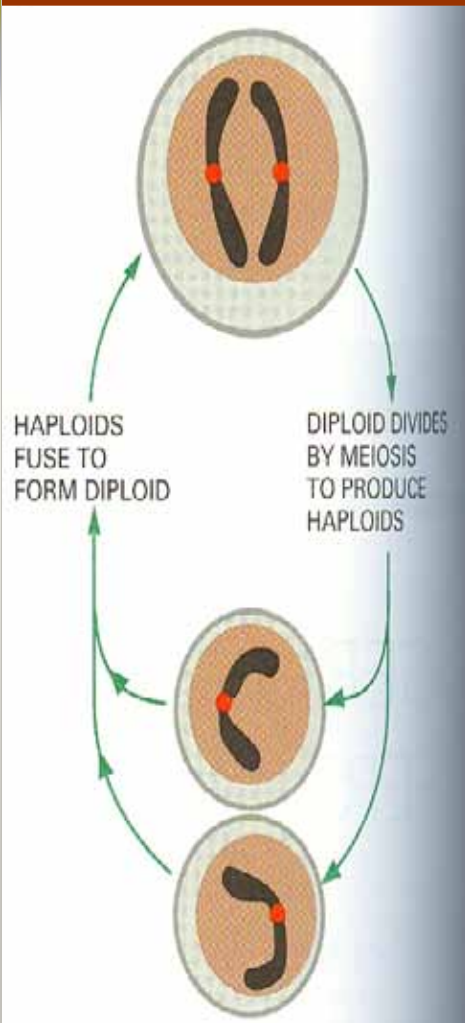
- Odrasle matične celice – nastanek in evolucija
- Tumorske/rakave matične celice
- Gliomske matične celice – glioblastomi
- Pomen matičnih celic za zdravljenje raka

Adam in Eva ...izvor dobrega ali zla?



- **Zarodne oz germinalne matične celice** (germ cells) , iz katerih izhajajo gamete: jajčece in spermiji.
- **Zigote** – so oplojena jajčeca, nastala ob združitvi s spermijem.
- **Embrionalne matične celice** –so matične celice, pridobljene iz embrijev, ki nastanejo iz zigote.
- **Odrasle (adult) - telesne (somatic) – tkivne oz matične celice** se nahajajo v vseh tkivih

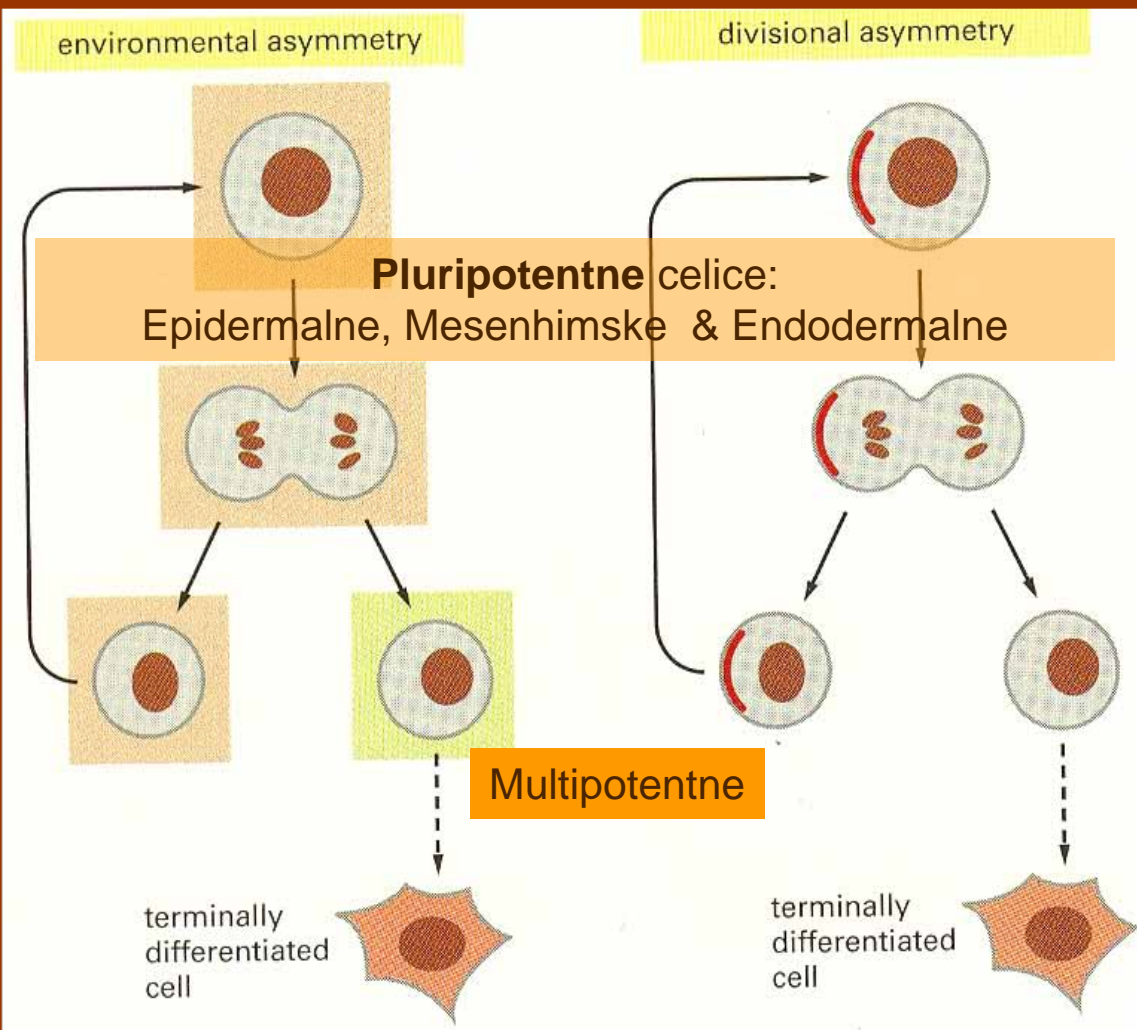
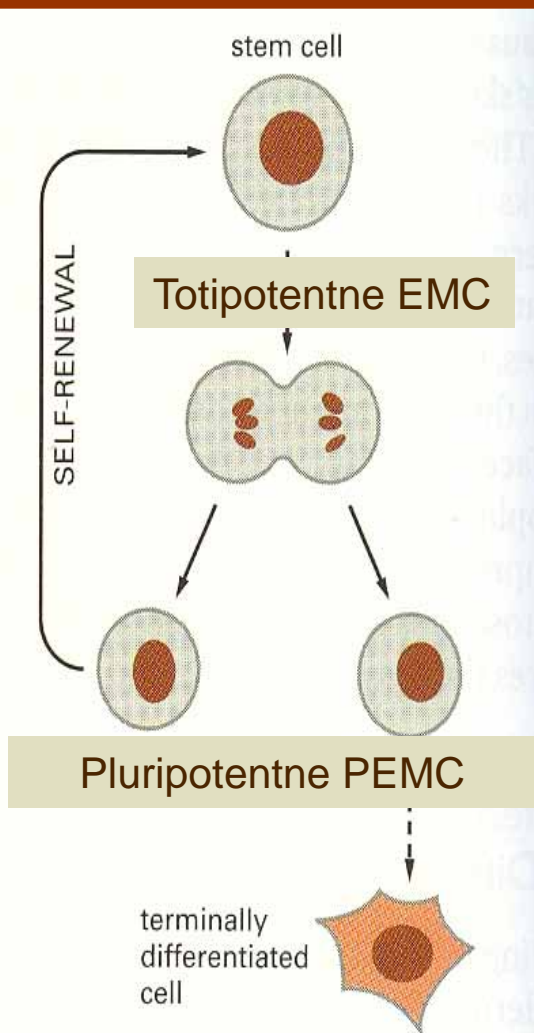
Adam in Eva ...in kaj zatem?



Kaj se dogaja z zigoto?

Simetrične delitve –
samopomnoževanje

Asimetrične delitve – diferenciacija



EMC – izražajo specifične proteine (markerje)

samopomnoževanja in totipotentnosti :

To so površinski proteini (antigeni) in proteini, ki specifično signalizirajo k neomejenem samopomnoževanju in ki preprečujejo celično diferenciacijo

Antigen	hESC	mESC	References
SSEA-1	-	+	[14,15,17]
SSEA-3	+	-	[1,2,14-16]
SSEA-4	+	-	[1,2,14,15]
TRA-1-60	+	-	[1,2,14,15]
TRA-1-81	+	-	[1,2,14,15]
TRA-2-49	+	-	[20]
TRA-2-54	+	-	[14,20]
GCTM-2	+	-	[2,198]
Alkaline phosphatase	+	+	[19,20]
Telomerase	+	+	[48,64]
TRF-1	+	+	[199]
TRF-2	+	+	[199]
Nanog	+	+	[21,22]
Oct3/4	+	+	[32,33]
Sox2	+	+	[34,39]
Rex1	+ (variable)	+	[200,201]
Foxd3	+ (variable)	+	[199,202,203]
Dppa5/Esg1	+	+	[204,205]
FGF4	+	+	[206]

Površinski markerji:

SSEA= stage specific embryonic antigen

TRA= tumour rejection antigen

GCTM = germ cell tumour marker

Vloga ?

Funkcionalni proteini:

Telomeraza – nukleoproteinski encimski kompleks: RNA/hTERT (reverzna transkriptaza se veže na konce DNA ob delitvah in ohranja enako dolžino kromosomov – povzroči “nesmrtnost” (tudi tumorskih) celic!

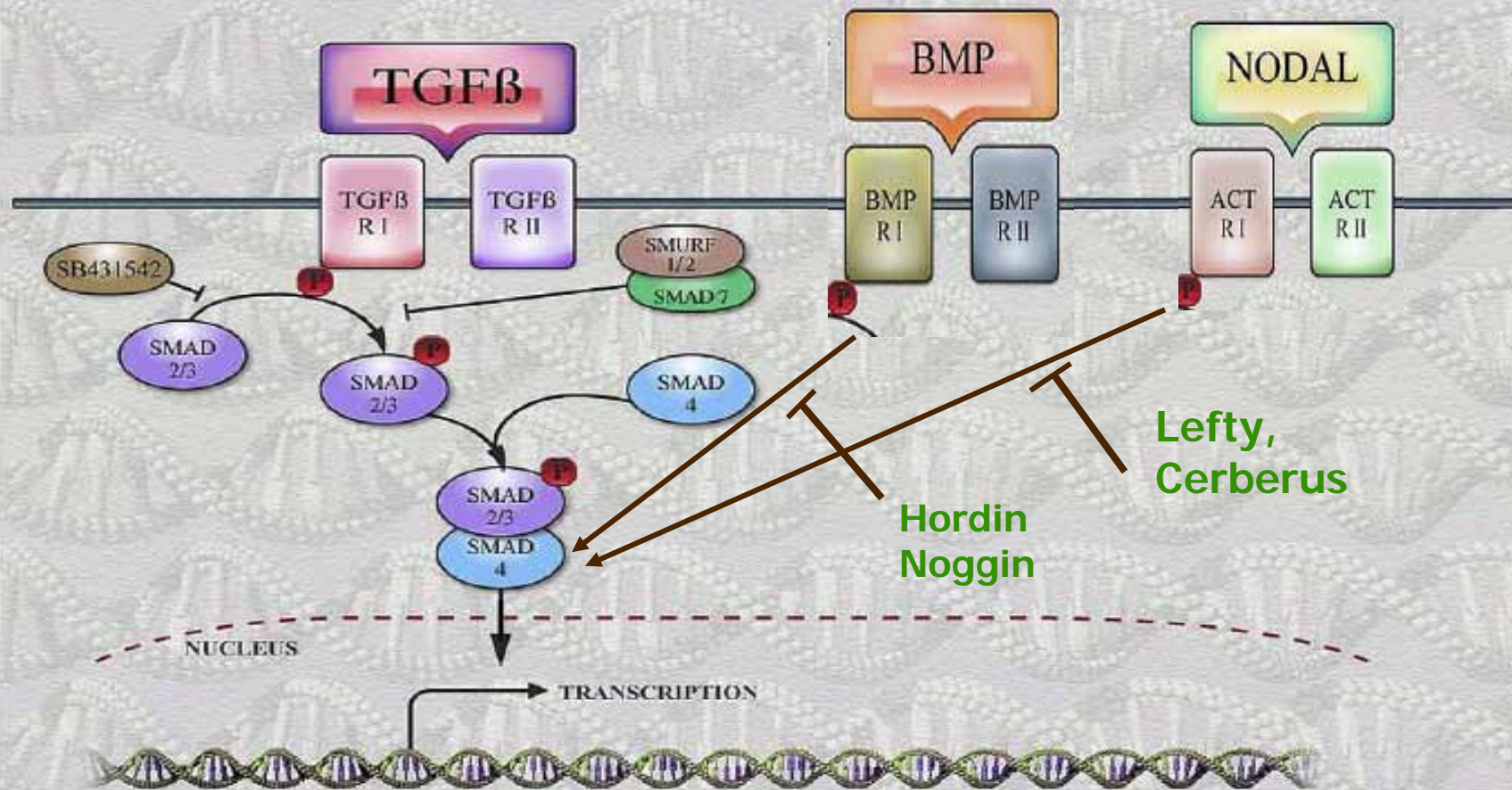
Nanog – transkripcijski faktor preprečuje celično diferenciacijo

Signalni proteinski kompleksi spodbujajo celično samopomnoževanje in ohranjanje nediferencirano stanje

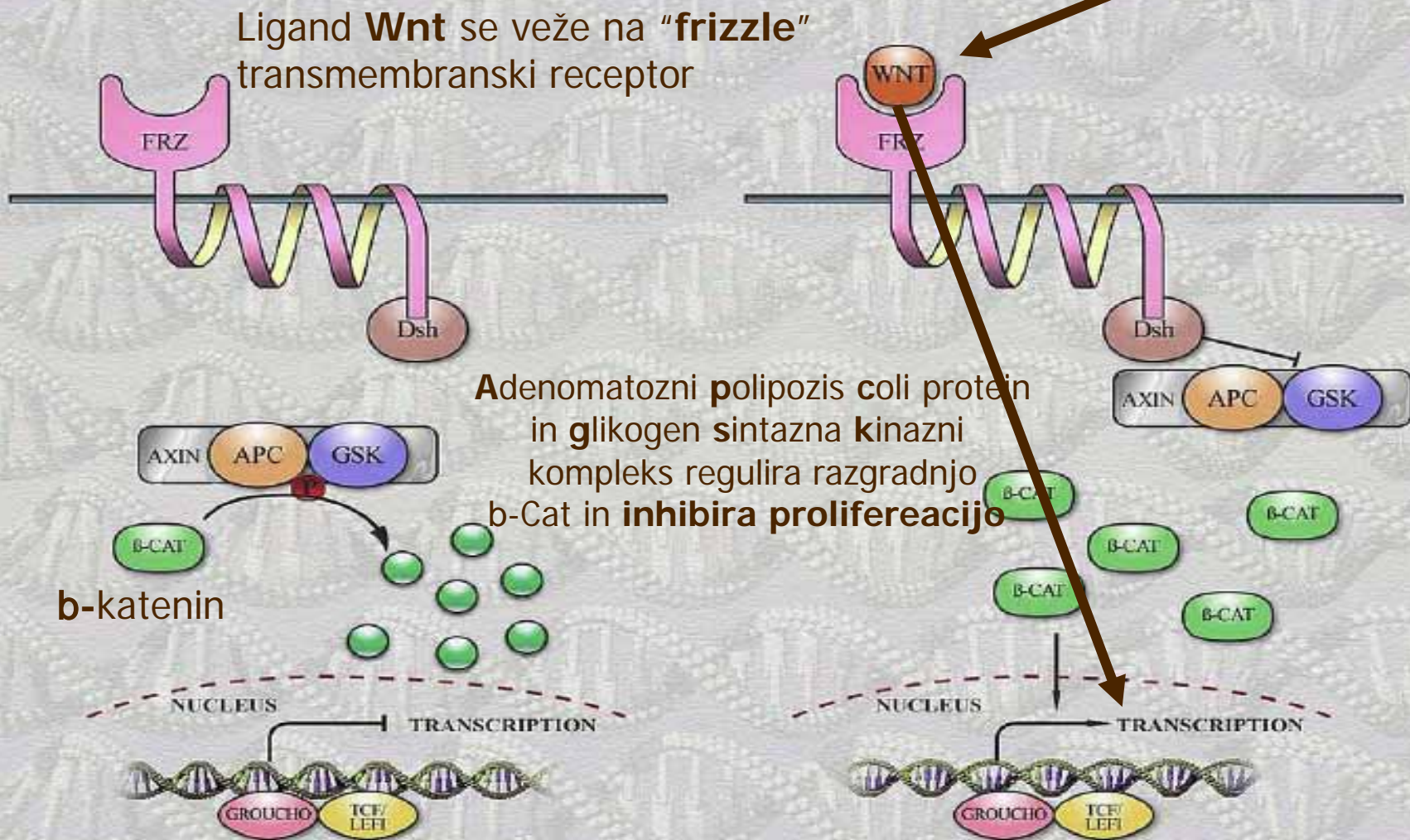
Tumorski rastni faktor -beta

Kostni morfogenetski protein

Nodal protein



Signalni proteinski kompleksi spodbujajo celično samopomnoževanje in ohranjajo nediferencirano stanje



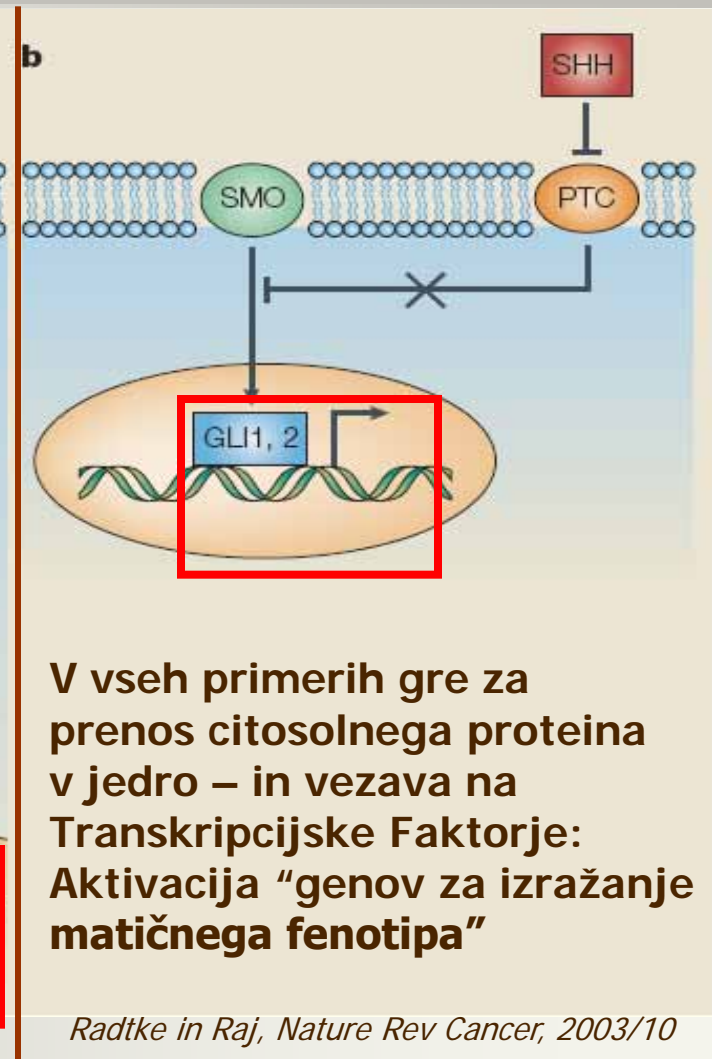
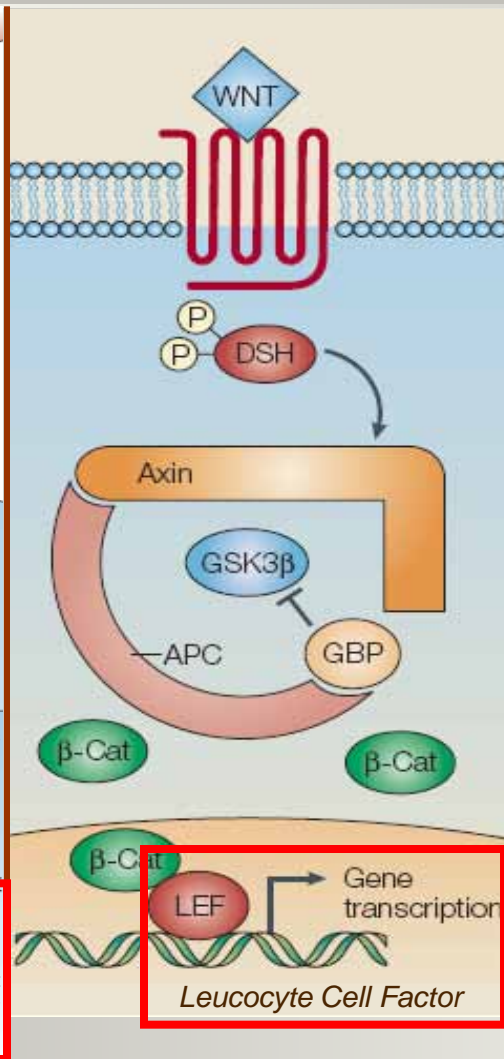
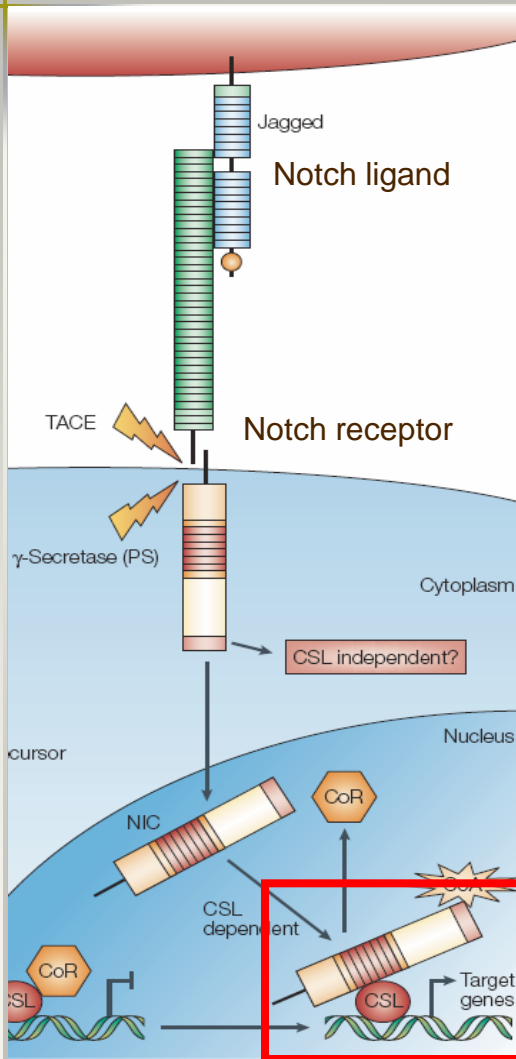
Mehanizmi in signaliziranje samopomnoževanja in zadrževane diferenciacije so podobni v:

- embrionalnih MC**
- somatskih MC**
- rakavih celicah**

Od tu prva ideja o sorodnosti med rakavo in matično celico, ki je vodila v preverjanje hipoteze o rakavi matični celici (RMC)

- Matične celice
- **Odrasle matične celice – nastanek in evolucija**
- Tumorske/rakave matične celice
- Gliomske matične celice – glioblastomi
- Pomen matičnih celic za zdravljenje raka

Signalni mehanizmi potekajo preko Notch, Wnt, Shh (Hedghog/Bim-1), itd. in omogočajo selektivno aktivacijo genov matičnosti – samopomnoževanje in inhibicijo ekspresije genov, ki omogočajo diferenciacijo = zadrževanje diferenciacije. Odstotnsot liganda blokira diferenciacijo



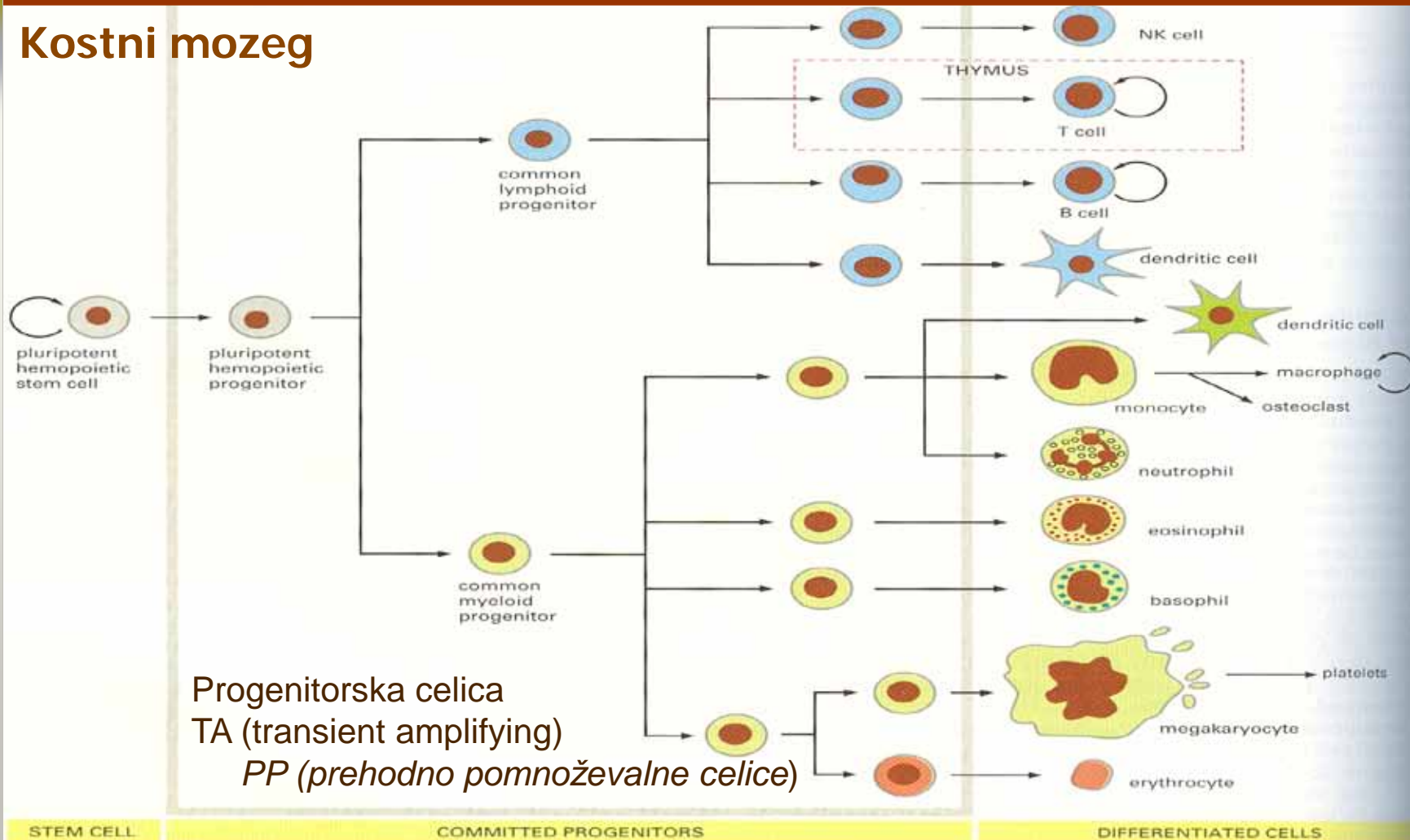
V vseh primerih gre za prenos citosolnega proteina v jedro – in vezava na Transkripcijske Faktorje: Aktivacija “genov za izražanje matičnega fenotipa”

Inhibitorni mehanizmi diferenciacije

- **Mrežno signaliziranje** v jedro (PI3K/GSH, FGFi, proteini matriksa /ECM/MEPK/ERK kinaze
- Uravnavanje signala sosednjih (stromalnih) celic in **vpliv mikrookolja**
- **Epigenetske spremembe:**
 - Metilacija DNA (CpG otočki), Acetilacija histonov, itd
 - Modifikacije kromatinske strukture – vezave polikomb proteinskih kompleksov, ki stabilno represirajo transkripcijo preko modifikacije kromatina (**Bmi1**, Mel-18)

Hematopoetske (krvotvorne) matične celice – KMC

Kostni mozeg

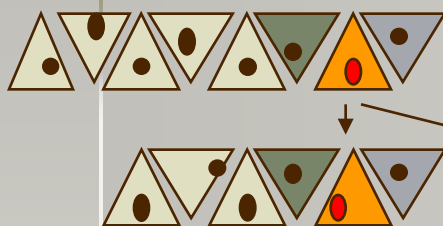


Diferenciacija odraslih matičnih celic je odvisna od tkivne niše – stromalnih celic

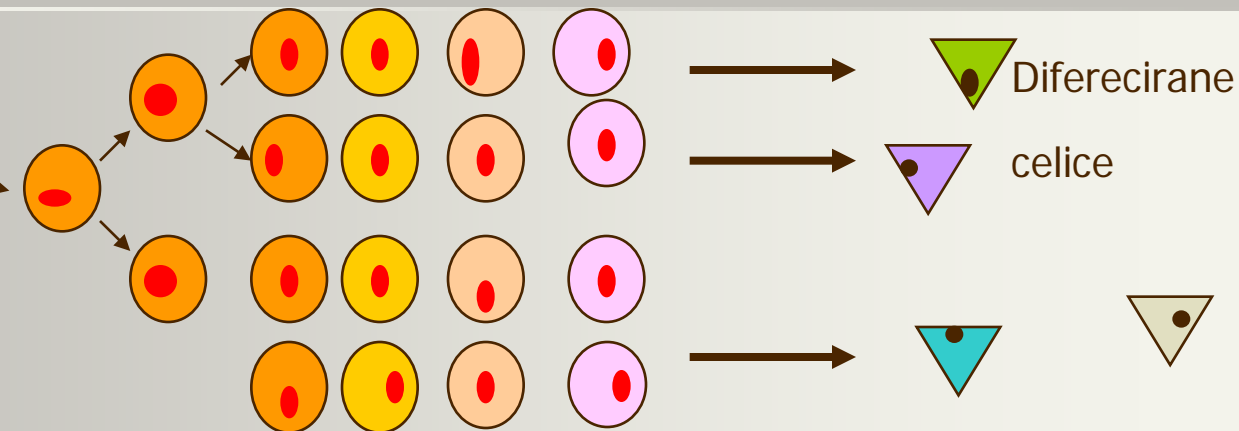
Simetrične delitve

– asimetrične delitve

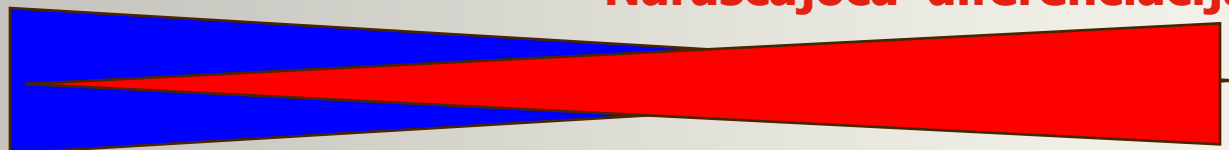
Niša



Specifične tkivne niše



Naraščajoča diferenciacija



Programirano zmanjševanje samopomnoževalne sposobnosti



Matčna celica
MC



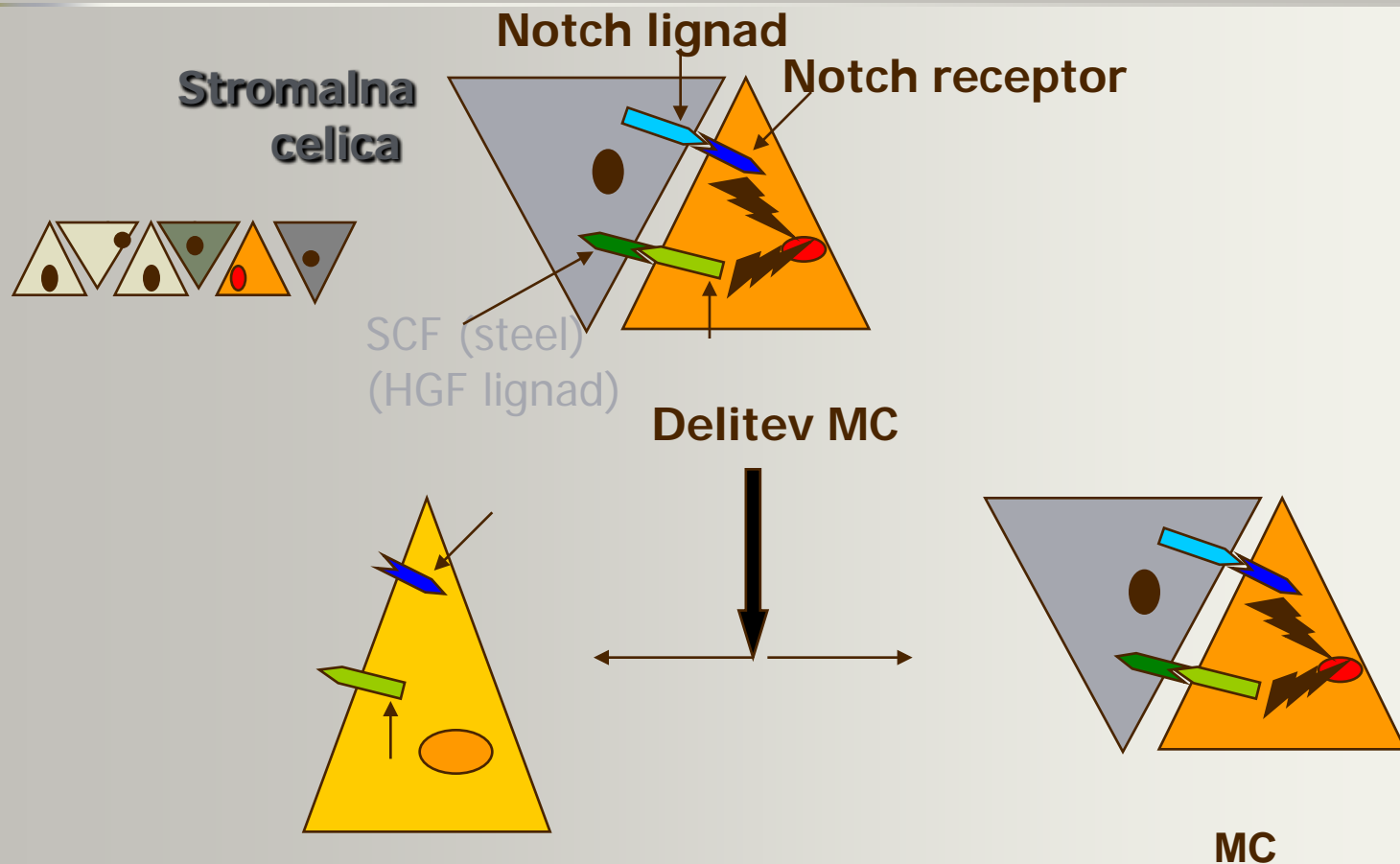
Zgodnja prehodna pomnoževalna = progenitorska celica – ZPP
Early transient self renewal cells (T1-T2)



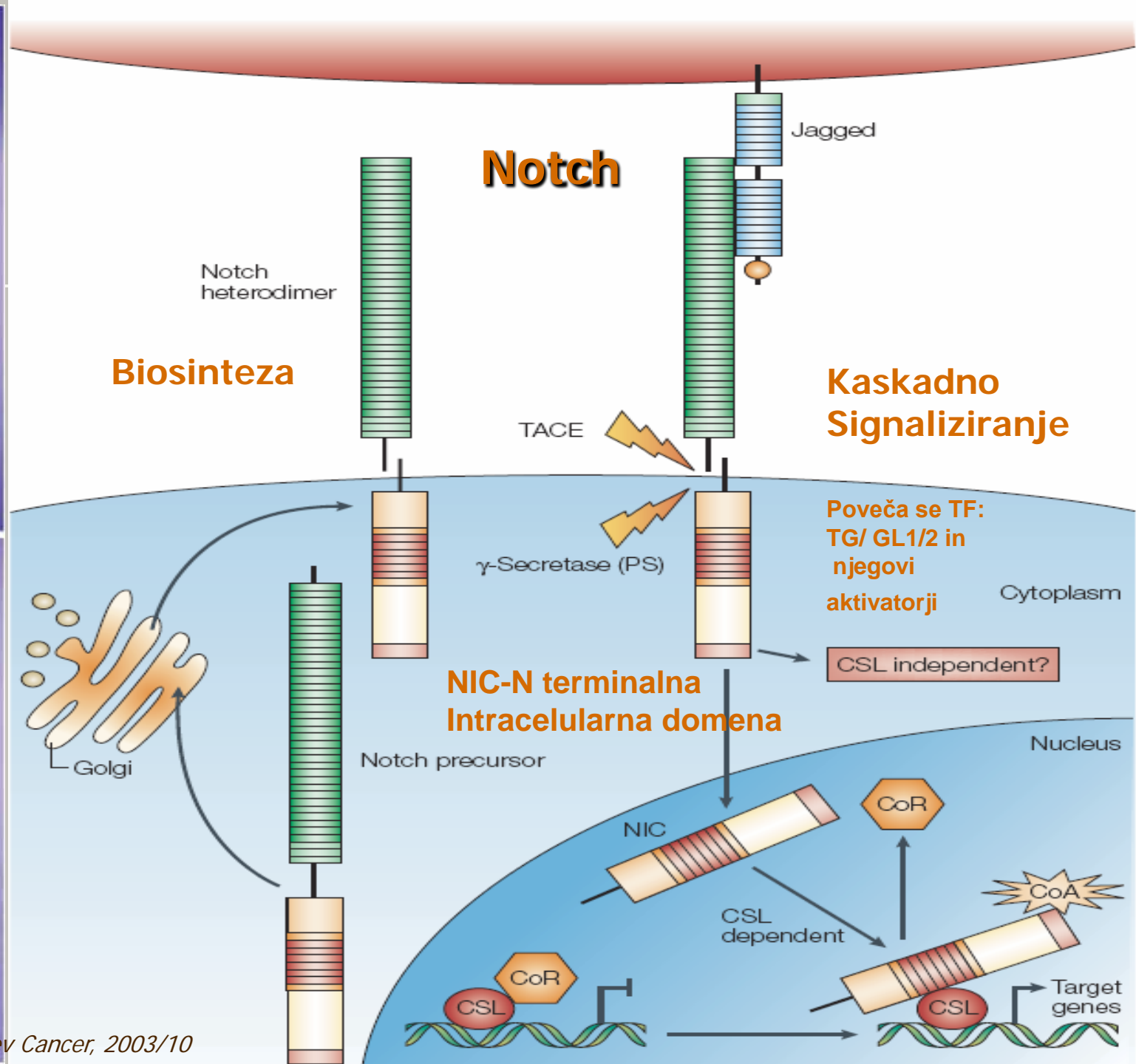
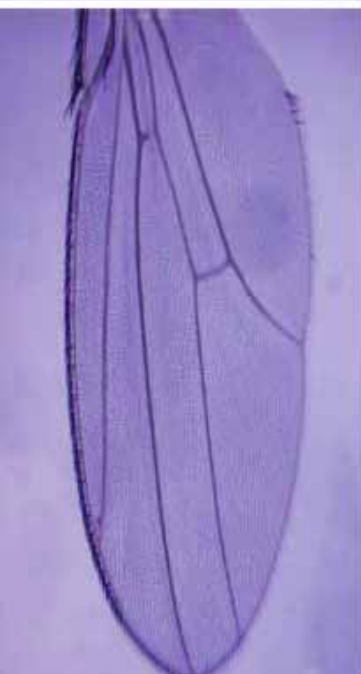
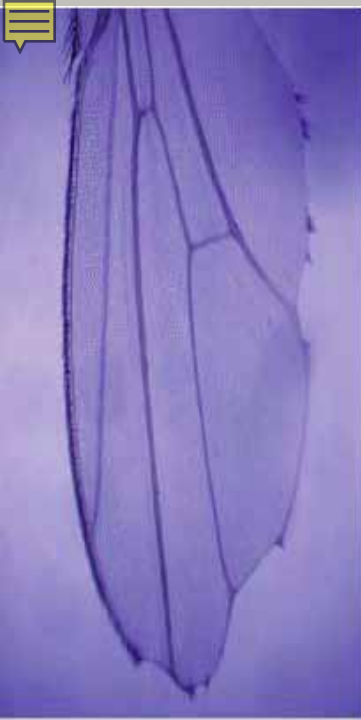
Pozne prehodne pomnoževalne = celice – PPP) –
Late (slow) self renewal cells (T3-T4)


Kaj se dogaja v niši?

Signaliziranje preko Notch in kit-kinaze pogojuje matičnost – nediferenciranost MC



Progenitorska prehodna promnoževalna (PP)
– na poti v diferenciacijo ali apoptozo



- 
-
- Matične celice
 - Odrasle matične celice – nastanek in evolucija
 - **Tumorske/rakave matične celice**
 - Gliomske matične celice – glioblastomi
 - Pomen matičnih celic za zdravljenje raka

Pogled v zgodovino...



Hipokrates:

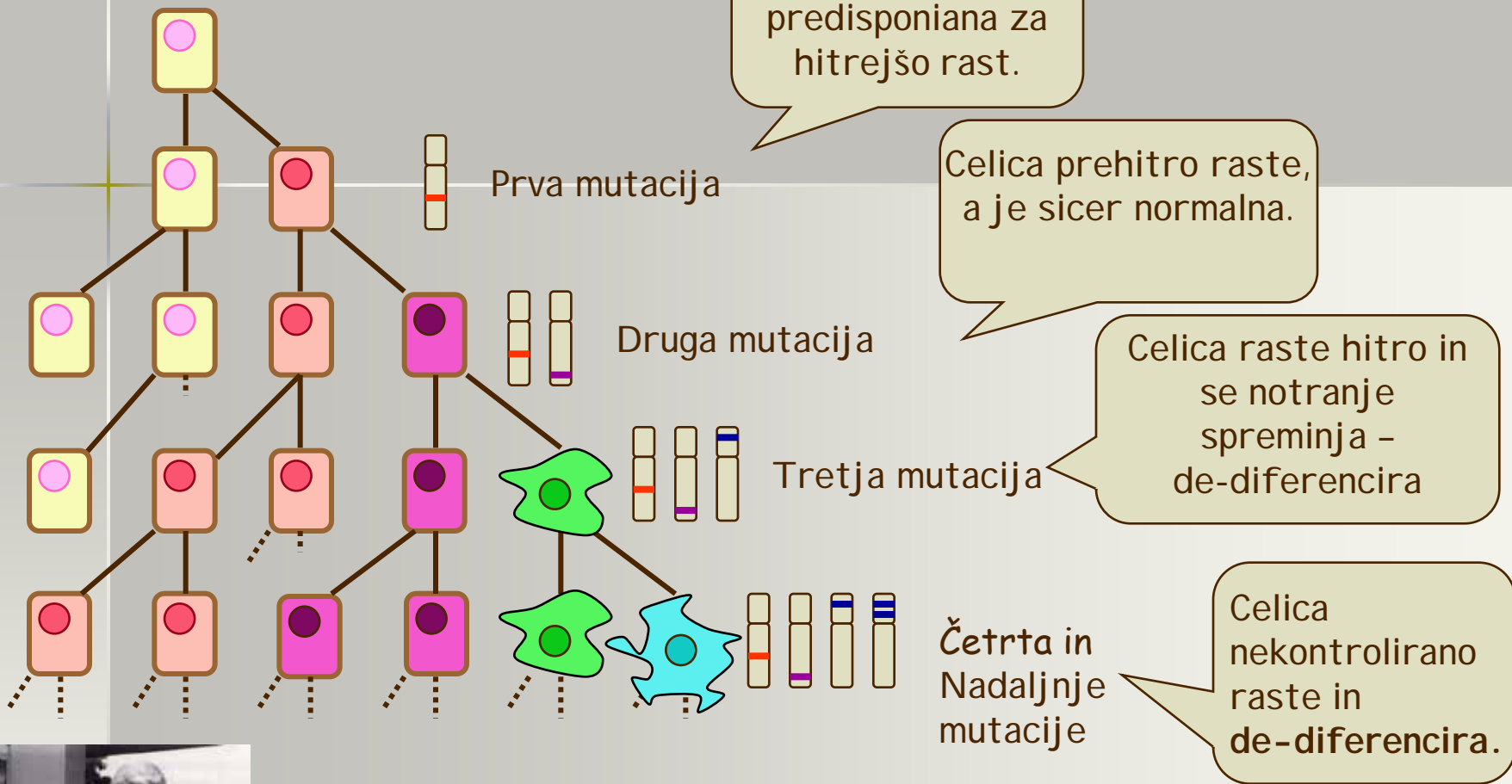
Karcinom – rak (kar kinomā)

*.....rak nastane zaradi
ne-ravnotezja med
temnimi in svetlimi
telesnimi tekocinami –*

“naravni izvor” te bolezni

...430 BC

RAK je bolezen gena

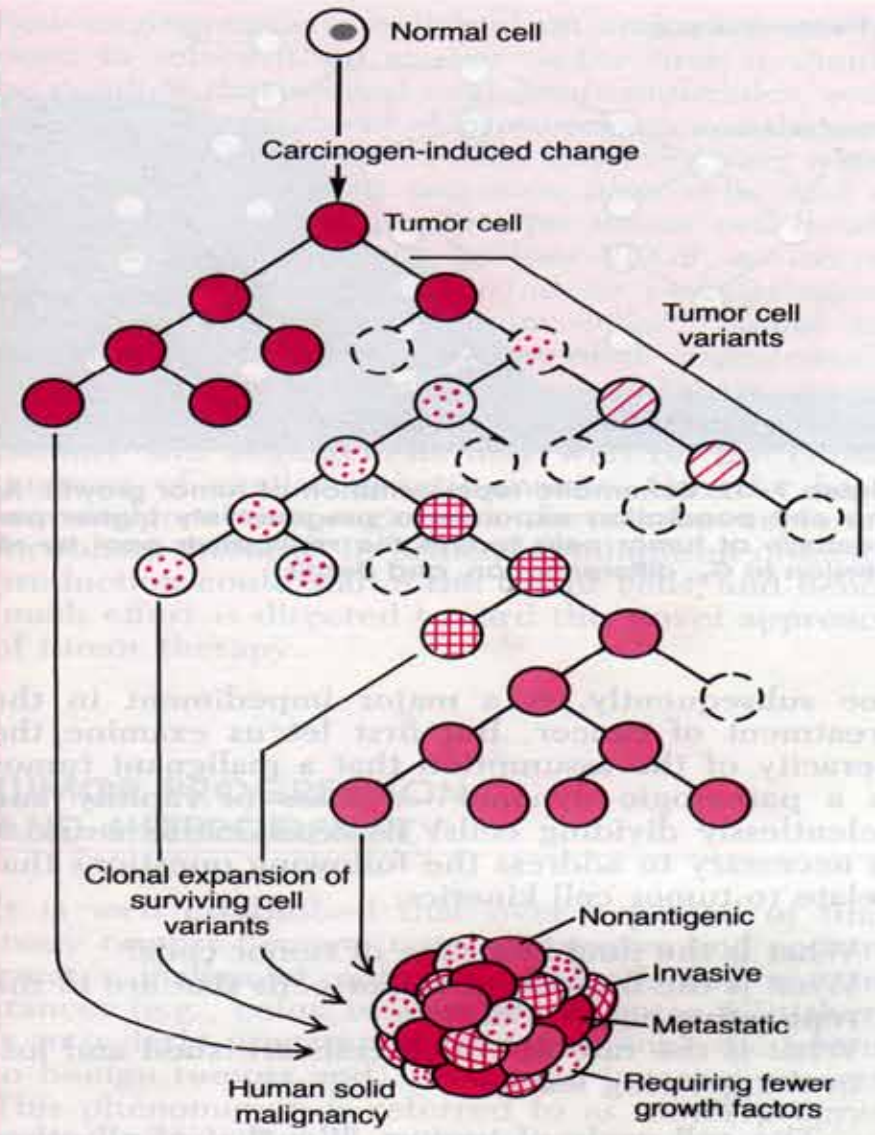
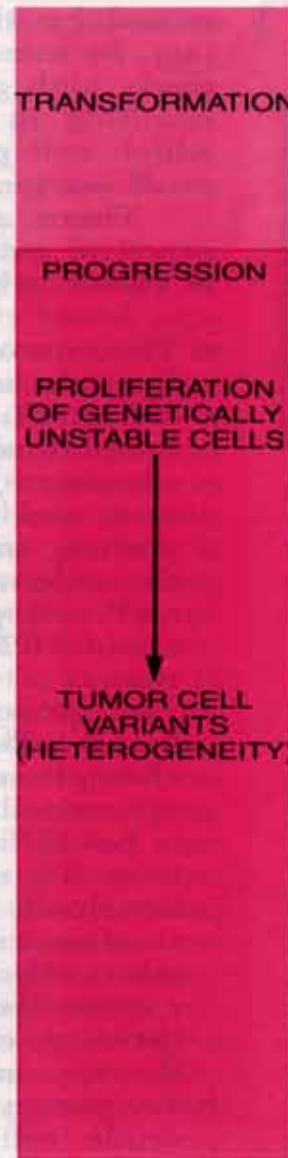
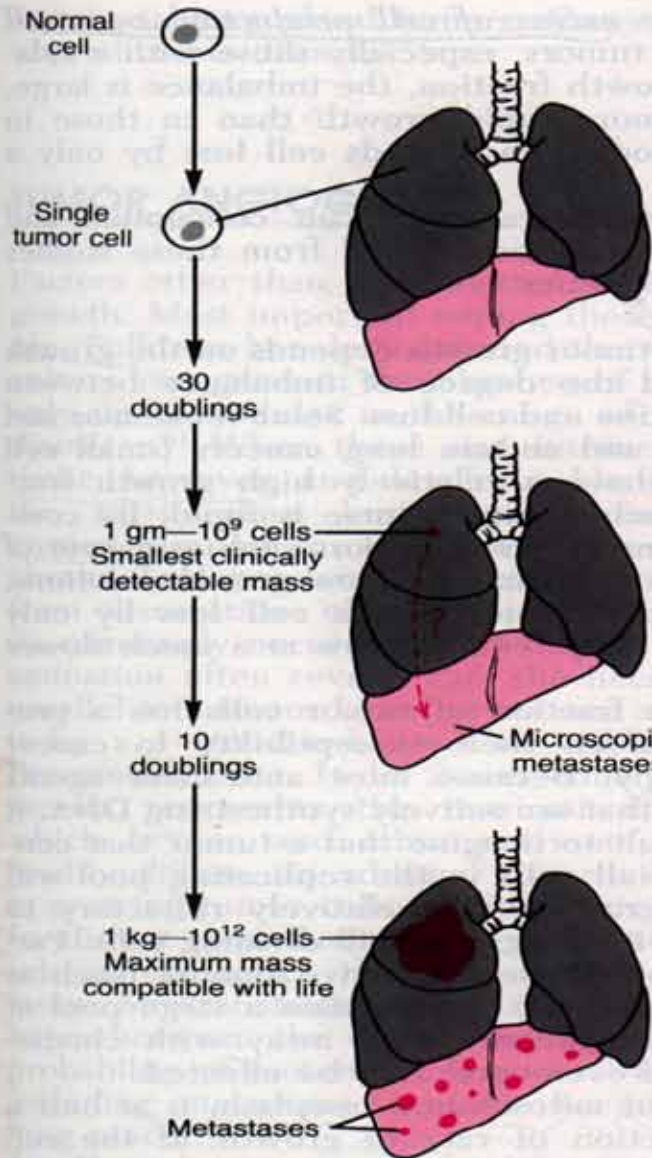


Alfred Knudsen (1977) – "two hit hypothesis"

Iniciacija → **Promocija** → **Malignost**
napredovanje v metastatski tumor

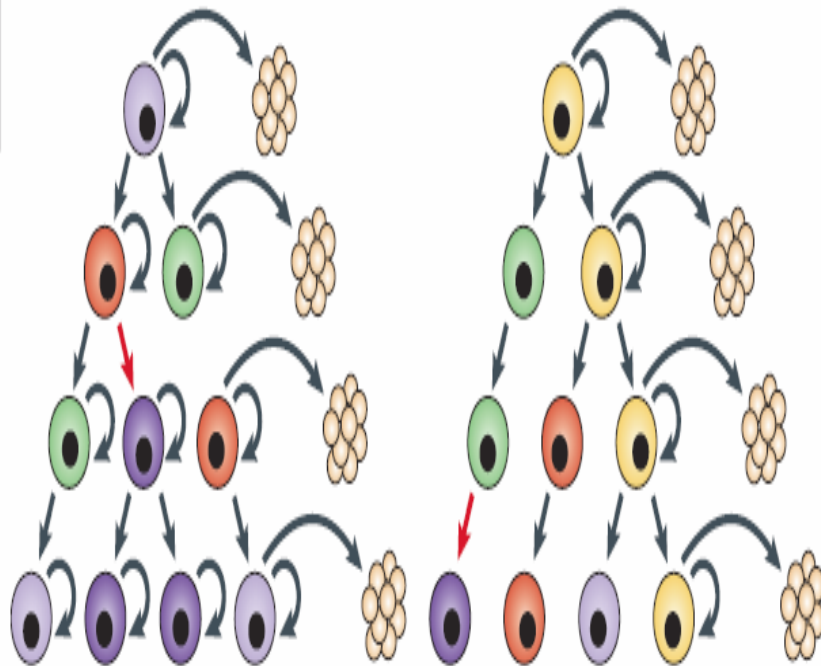
Rast tumorjev

Klonalnost, selekcija in heterogenost tumorjev

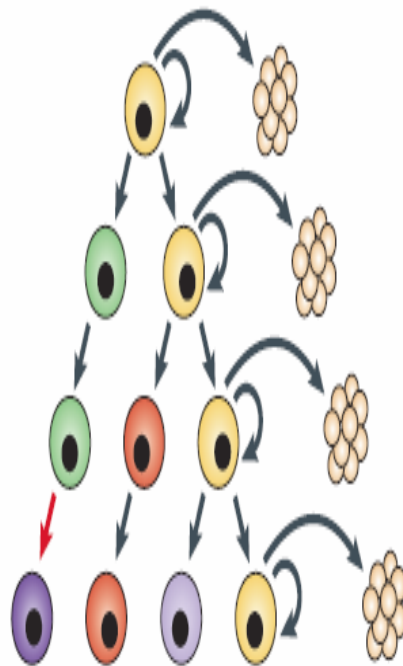


Nov koncept razvoja tumorjev podpira hierarhični model in tumorsko matično celico kot specifično genetsko definirano celico

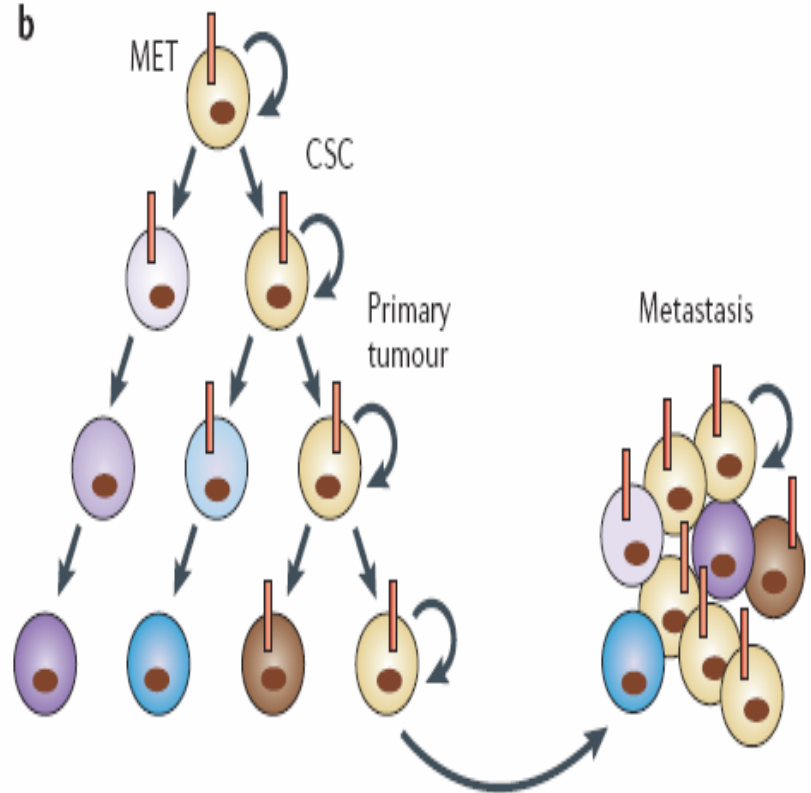
a Stochastic model



b Hierarchical model



b

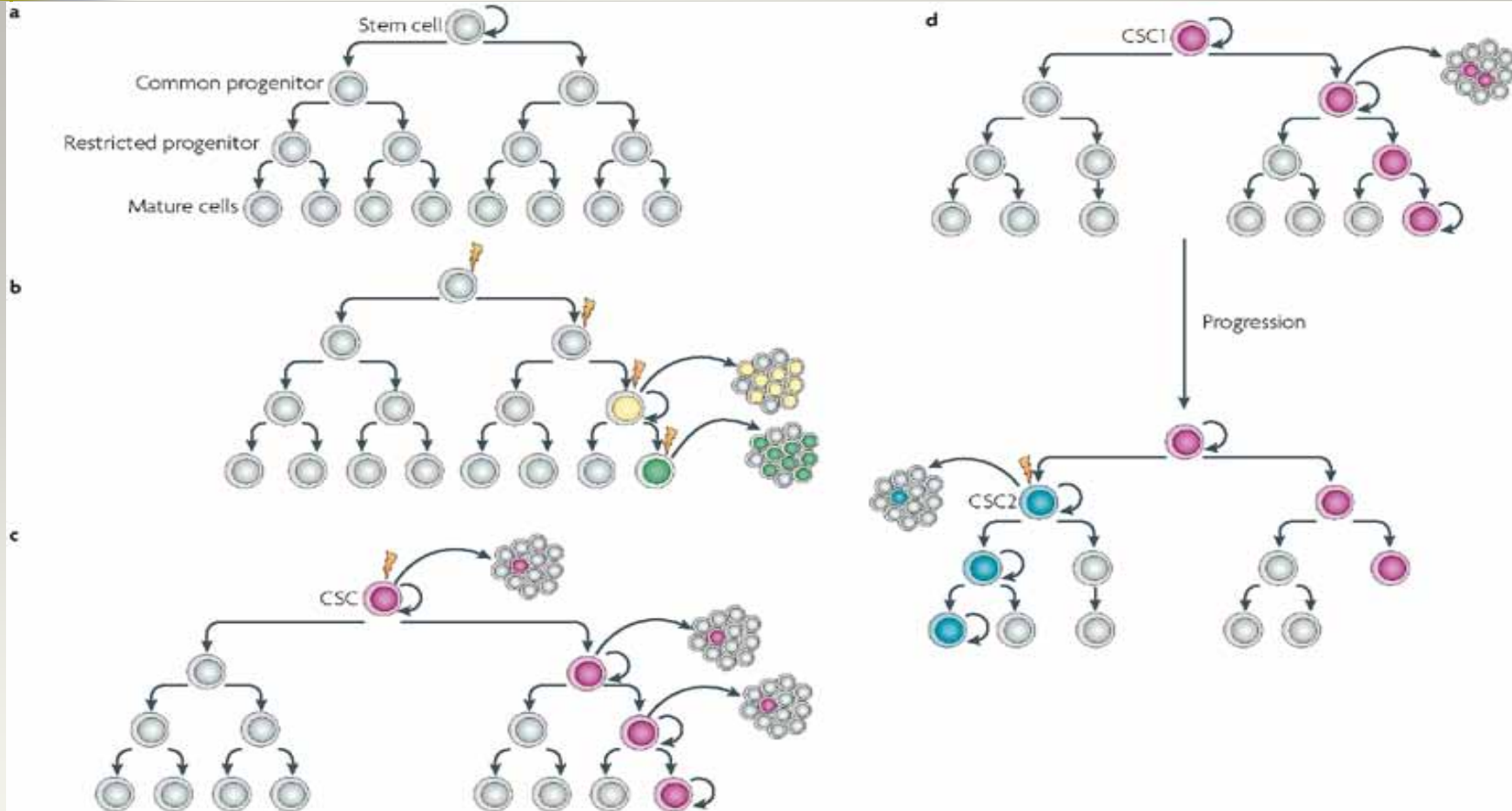


Tumorska matična celica

- Tumorska MC je tista tumorska celica, ki ima sposobnost samopomnoževanja in se asimetrično deli v tumorsko progenitorsko celico, ki je vir različnih fenotipov malignih celic.
- Tekom progresije tumorjev se povečuje **genetska nestabilnost** teh celic, zato so boljše tarče nadaljnjih poškodb v primerjavi z normalno celico v procesu njene diferenciacije.

Nov model nastanka in razvoja tumorskih matičnih celic

Visvader and Lindeman
Nature Rev Cancer 8, 2008





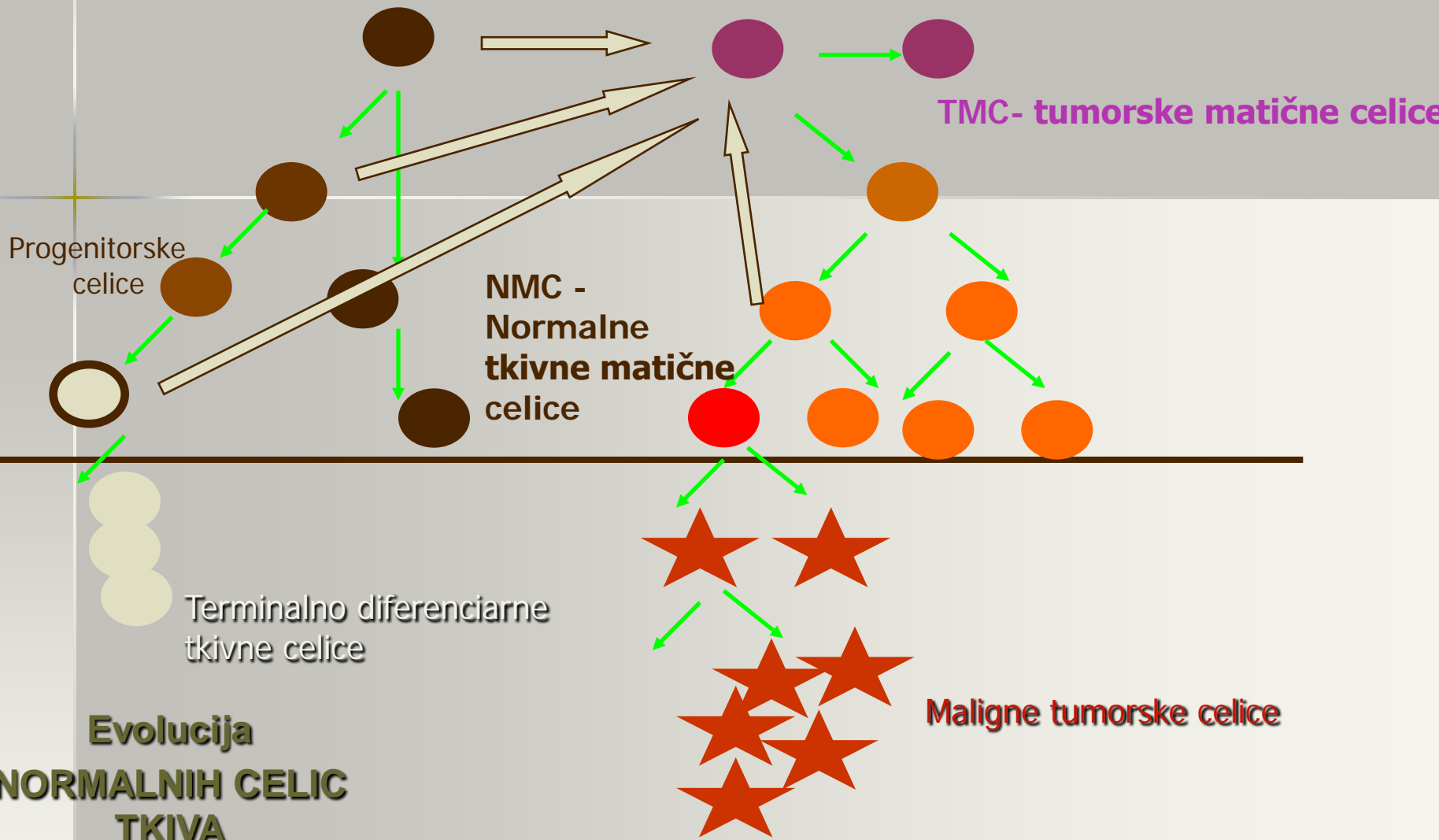
IZVOR

Tumorske matične celice

- Izvor prvotne tumorske celice?
 - Normalna odrasla **matična** celica?
 - **Progenitorska** celica ?
 - **Diferencirana normalna** tkivna celica ?
 - **Diferencirana tumorska** celica, ki se de-diferencira do tumorske matične celice ?

Normalne celice

Genetsko nestabilna tumorska celica



TMC - tumorske matične celice

Progenitorske celice

NMC - Normalne tkivne matične celice

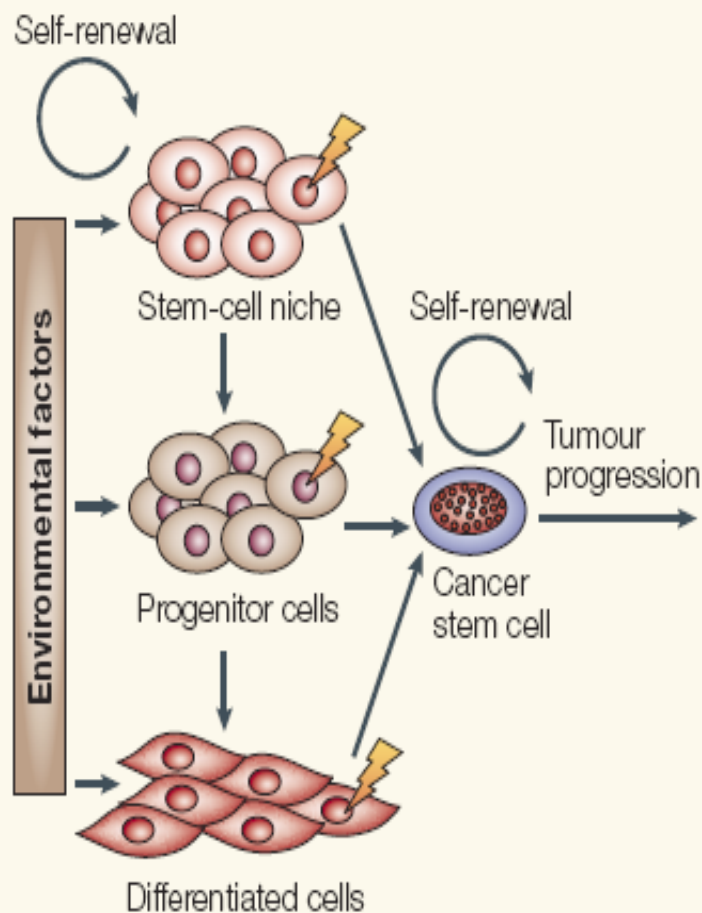
Terminalno diferenciarne tkivne celice

Maligne tumorske celice

Evolucija
NORMALNIH CELIC
TKIVA

Evolucija - razvoj TUMORSKIH MATIČNIH CELIC

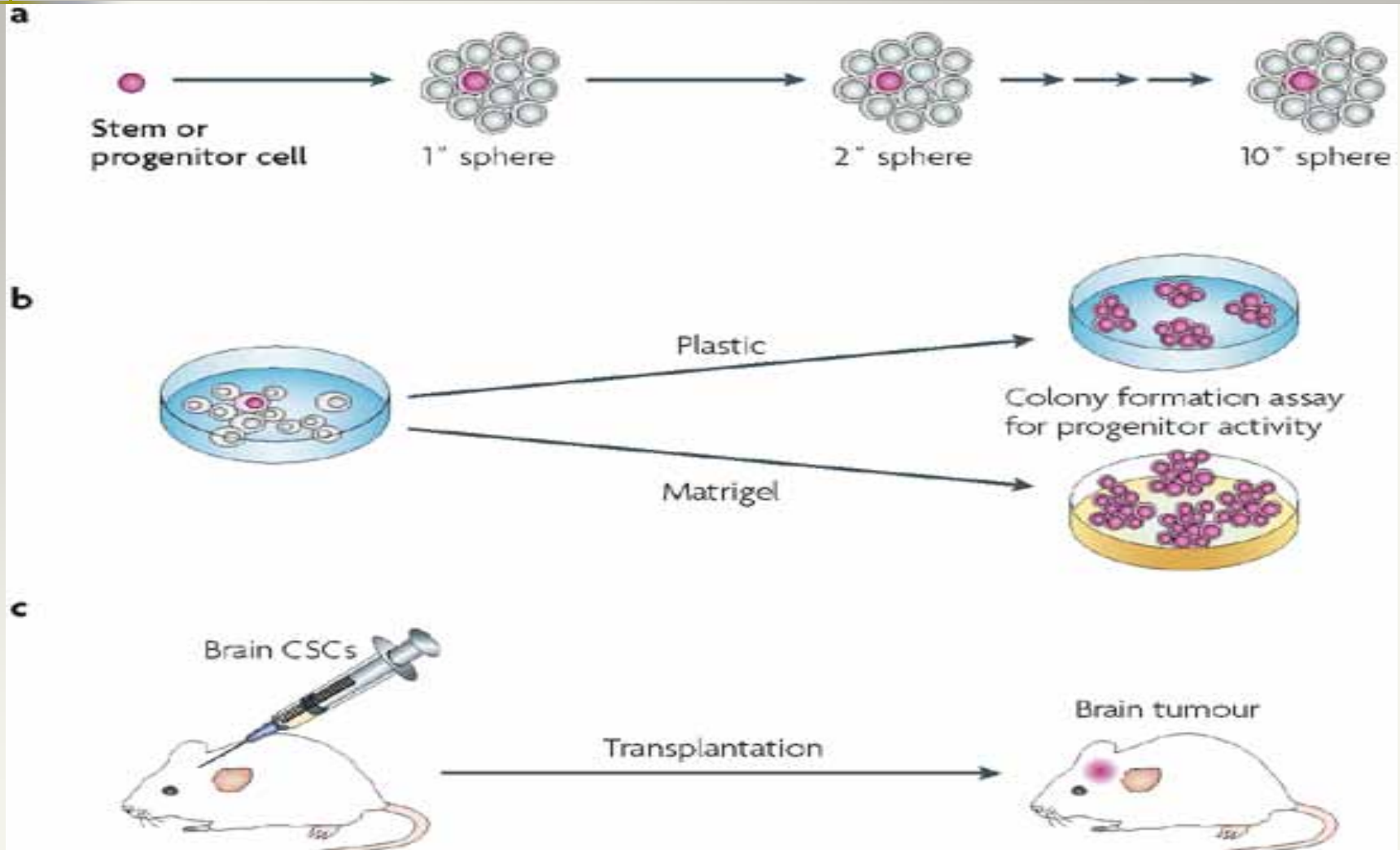
Tumorske matične celice – nastanek in lastnosti



- n Ni jasno, ali **TMC** izvirajo iz tkivnih MC ali iz MC kostnega mozga (n.pr. mezenhimskih MC) ali iz diferenciranih celic preko de- ali trans-diferenciacije?
- n Ključna lastnost **TMC** je, da pri transplantaciji tvorijo tumorje, ki zopet vsebujejo **TMC** in enako heterogeno populacijo diferenciranih tumorskih celic (tumorsko heirarhijo) in ta postopek lahko ponavljamo v več zaporednih serijah na živalih. Pomembna je ortotopska transplantacija – niša?
- n Ali imamo različne subpopulacije **TMC**?
- n Molekularni markerji **TMC**?

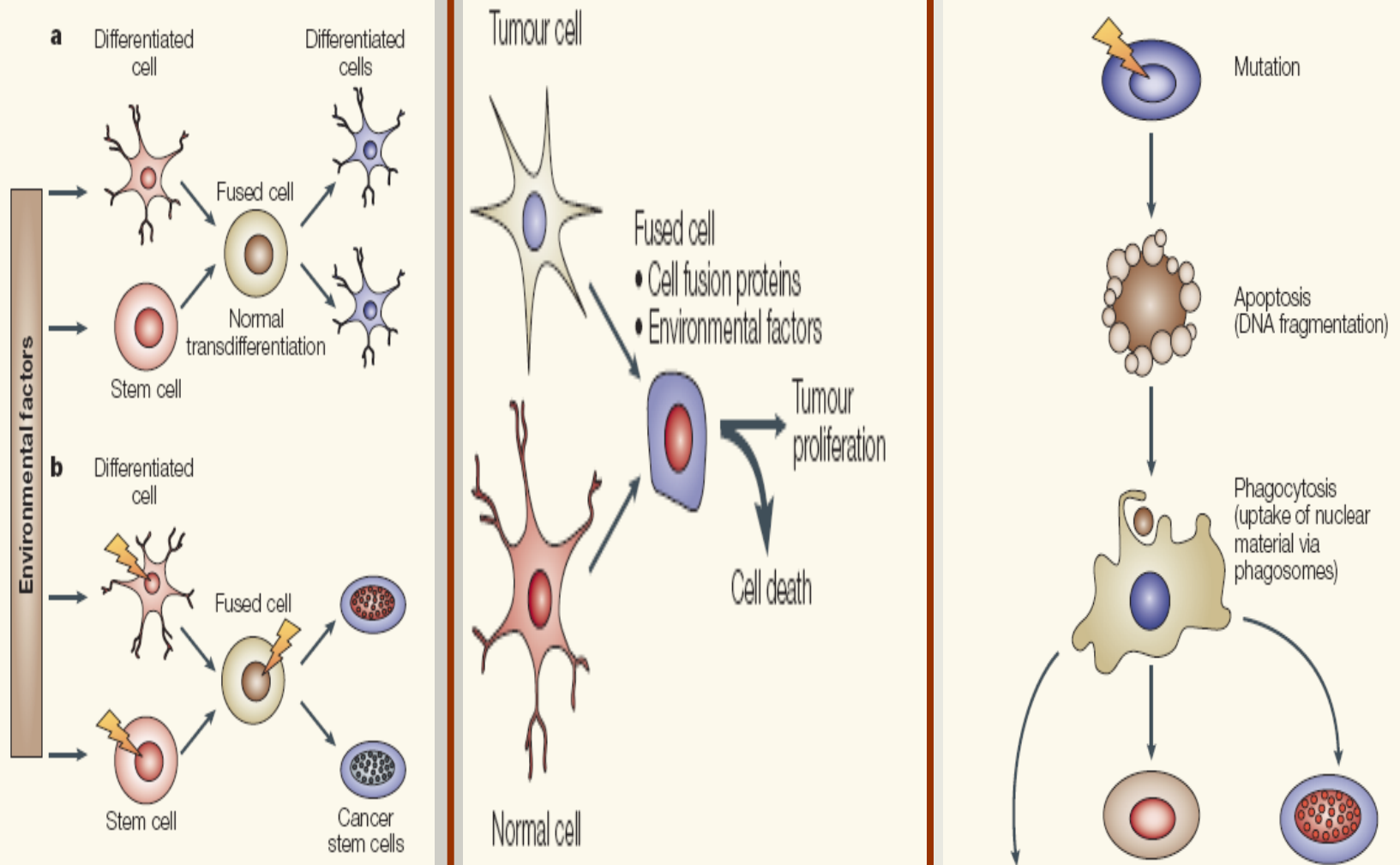
Ex vivo in vivo testi tumorskih matičnih celic

Visvader and Lindeman
Nature Rev Cancer 8, 2008



Tumorske matične celice – nastanek: fuzija, prenos genoma in fagocitoza

Horizontalni transfer gena



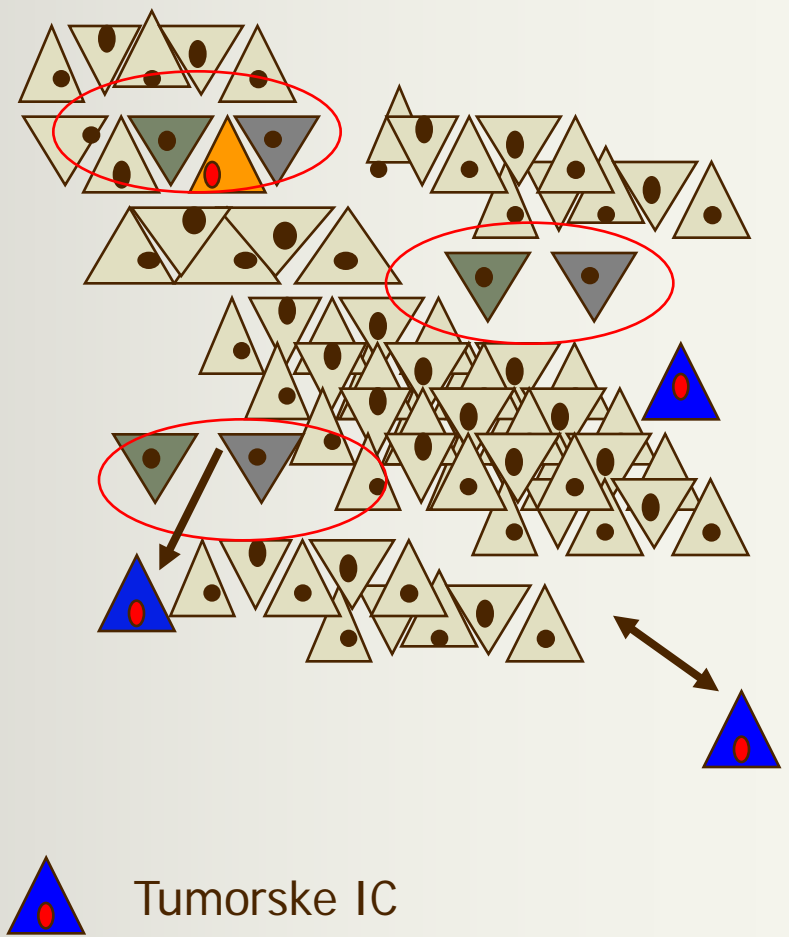
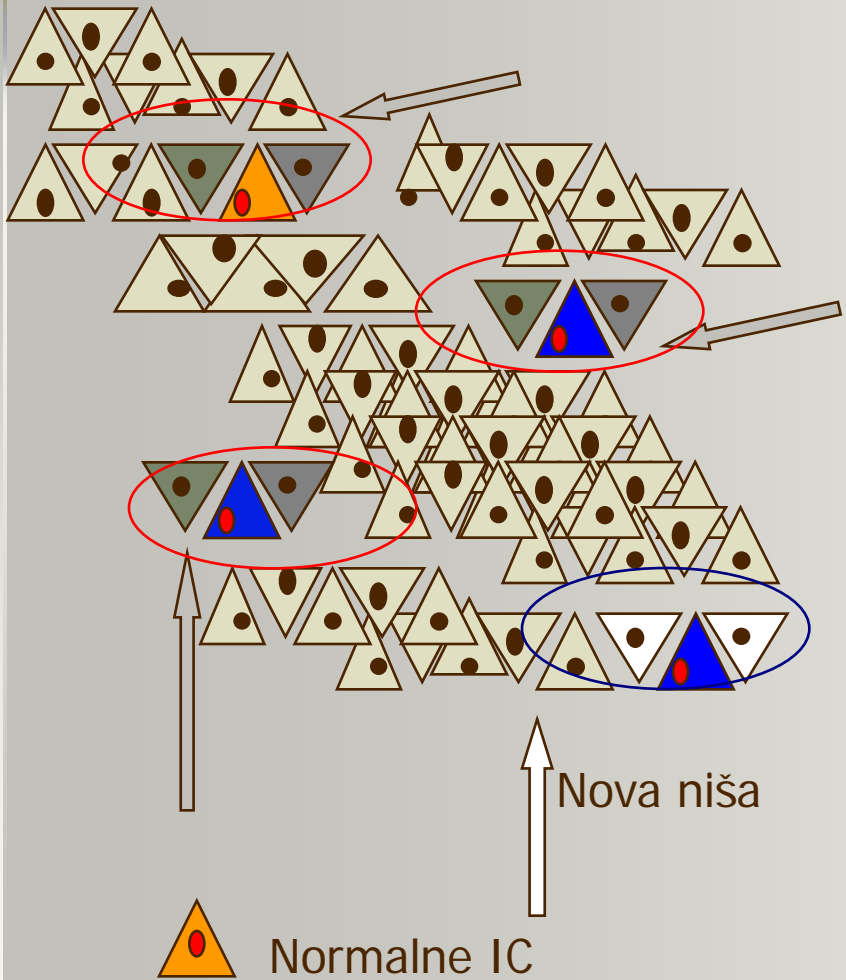
Podobnosti med normalno tkivno in tumorsko matično celico



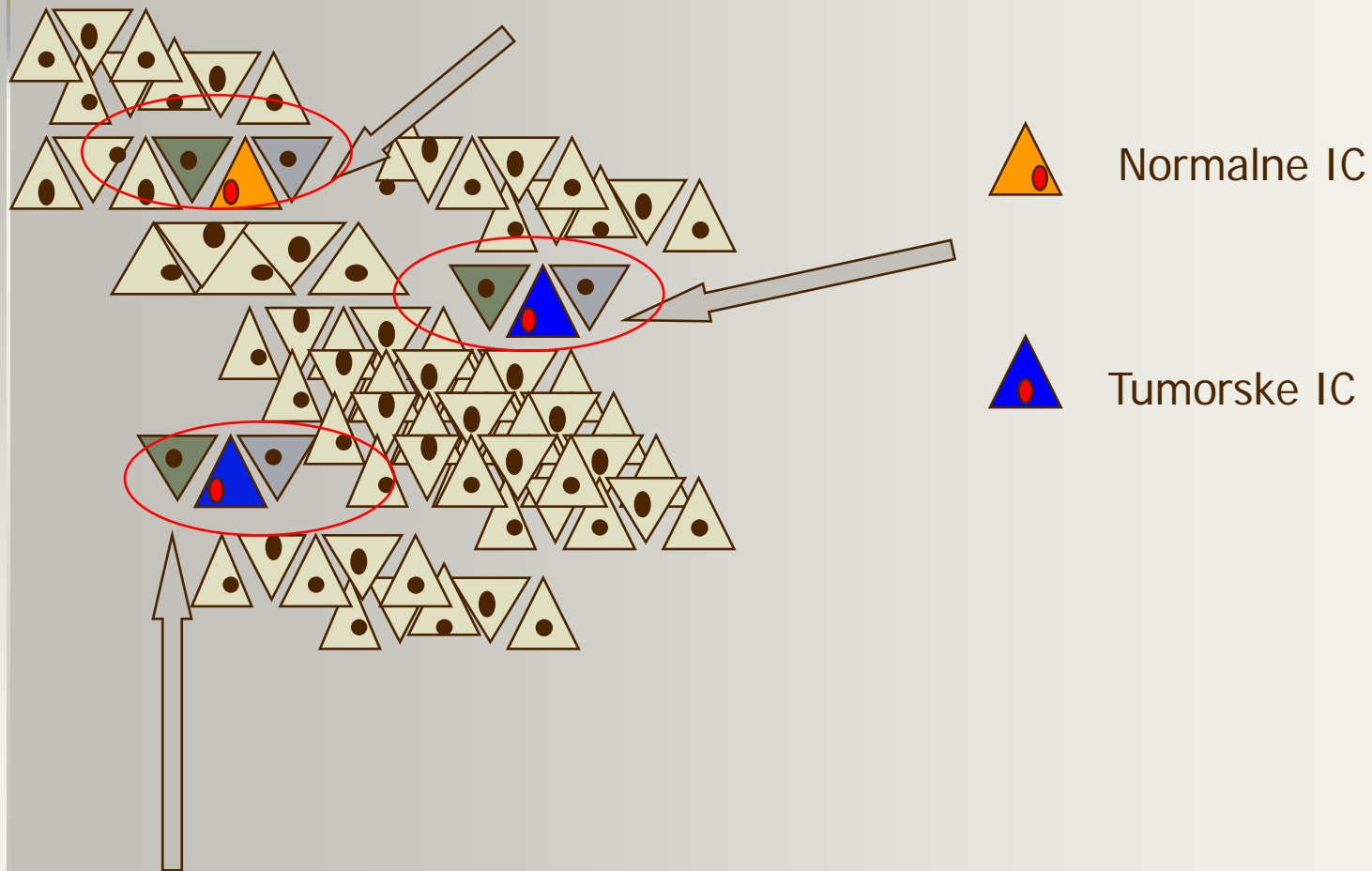
- Le majhna frakcija celic (NMC) v tkivu ima neomejeno samo-pomnoževalno sposobnost.
- Le majhna frakcija tumorskih celic (TMC) je sposobna regenerirati tumor ob presaditvi.
- Diferenciacija v progenitorske - PP celice je podobna dediferenciaciji tumorjev!
- Organizacija v specifično hierarhijo in morebitna lokalizacija v določene predele tkiva = tumorja (niše)!
- Sposobnost celične migracije (? MC ali PP: M-TMC).
- Velika odpornost proti apoptozi (terapija tumorjev!).

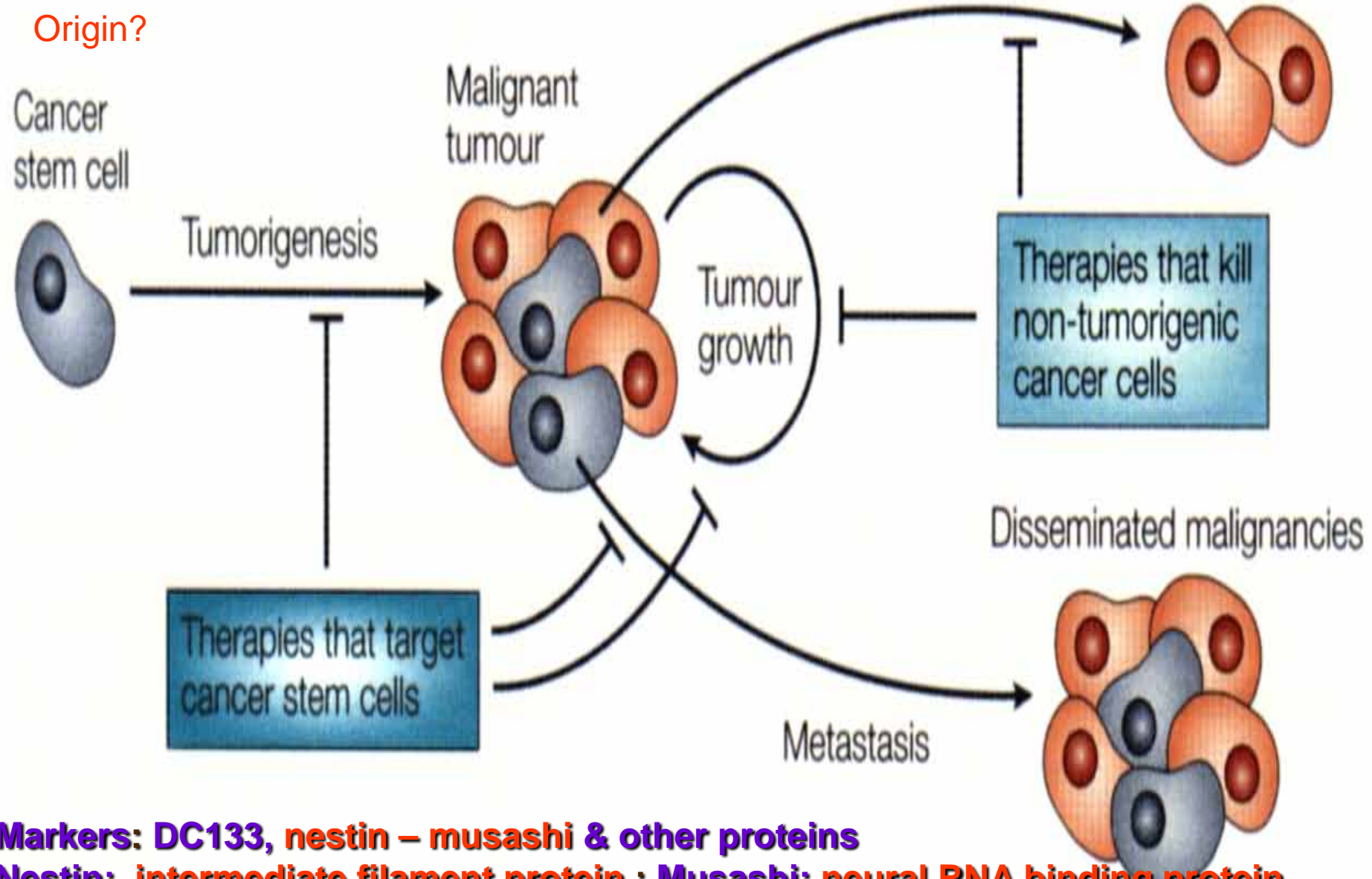
Nastanek novih normalnih ali tumorsko specifičnih niš?

TMC ne rabijo niš ?



Ekspanzija normalnih niš – omogoča rast in ekspanzijo novim tumorskim matičnim celicam (ki so nastale iz normalnih matičnih celic)

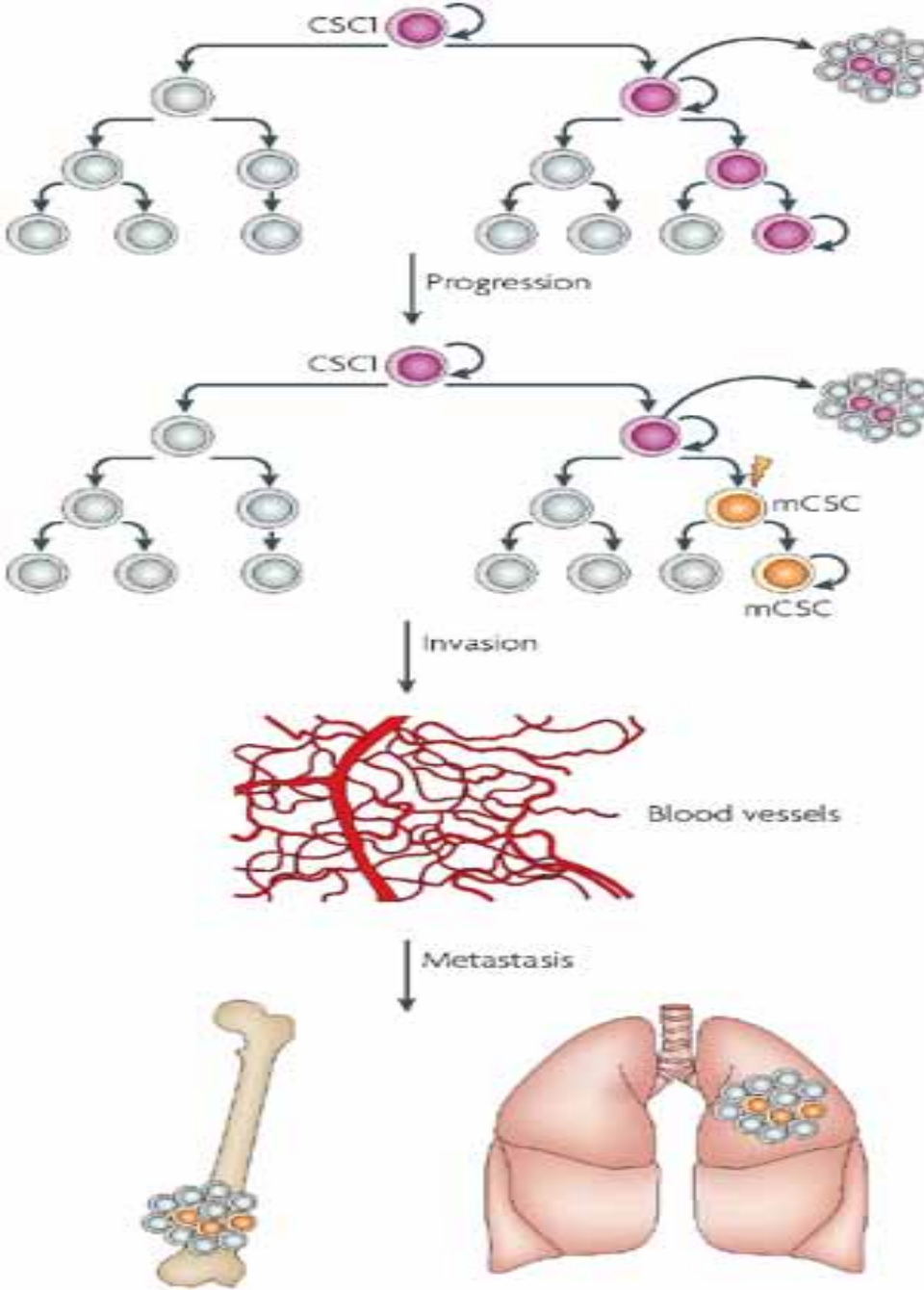




Origin?

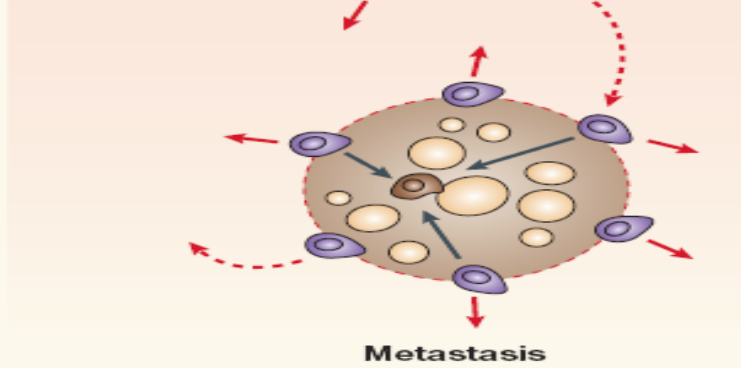
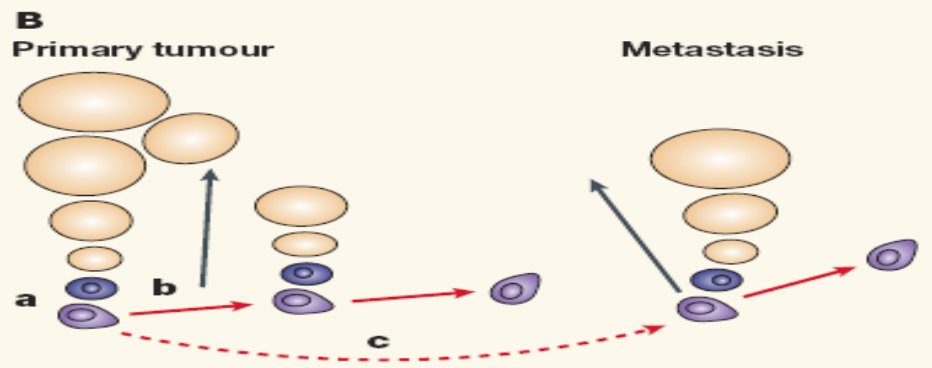
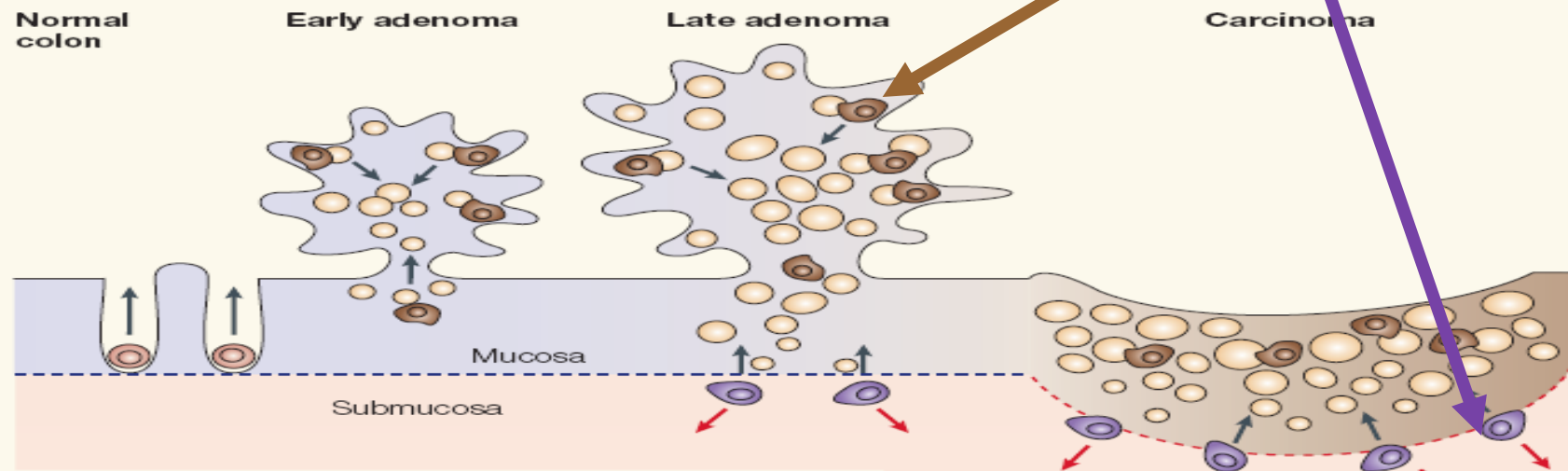
Markers: DC133, nestin – musashi & other proteins
Nestin; intermediate filament protein ; Musashi: neural RNA binding protein

Model metastaziranja – tumorskih matičnih celic - TMC



*Visvader and Lindeman
Nature Rev Cancer 8, 2008*

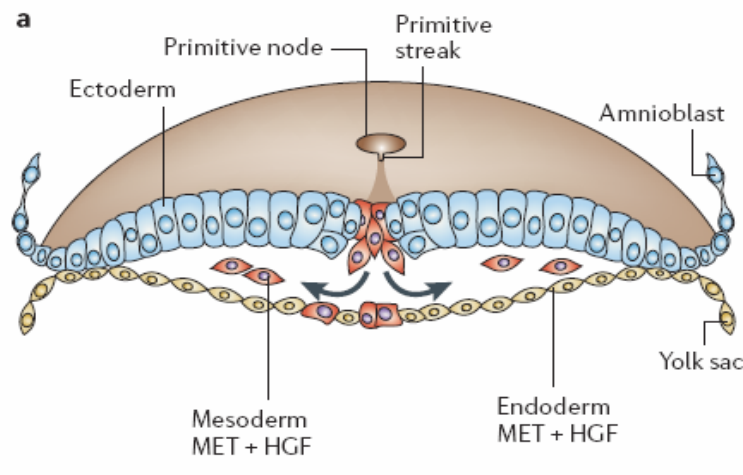
Migracija tumorskih matičnih celic (M-TIC) je posledica epitelijsko-mezenhimske tranzicije v stacionarni tumorski matični celici (S-TIC)



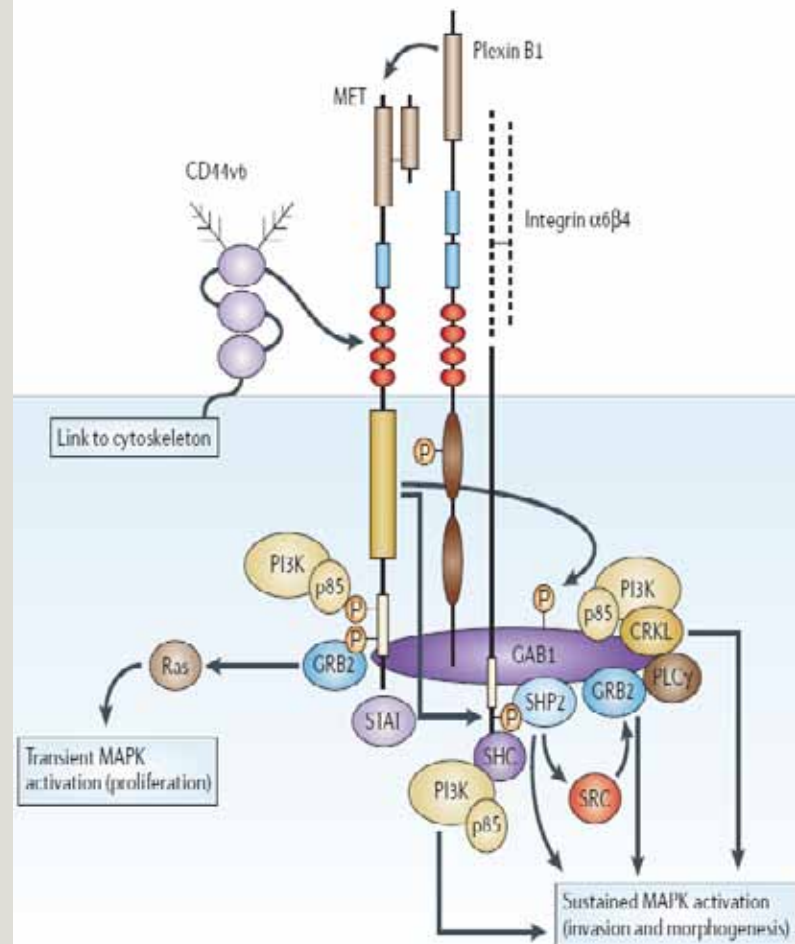
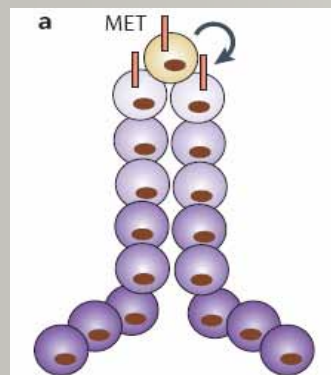
- | | | |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Normal stem cell | Direction of differentiation | Lamina muscularis mucosae |
| Stationary cancer stem cell | Direction of migration | Tumour host interface |
| Migrating cancer stem cell | Distant migration | Differentiated tumour areas |
| | | Differentiating daughter cell |

MET - kinazno signaliziranje preko HGF/S Fpoveča gibljivost in invazivnost MC in TMC – epitelijska-mezenhimska tranzicija (EMT)!!

V fizioloških pogojih izražajo MET samo MC in PPcelice , ki lahko rastejo invazivno, da generirajo nova tkiva

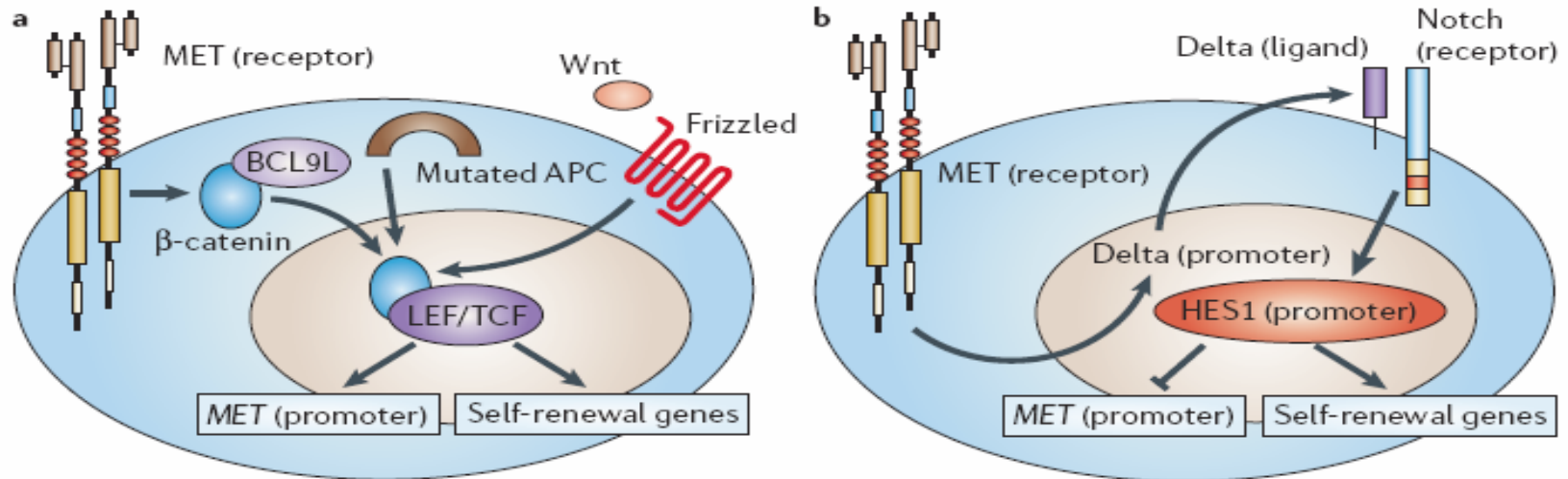


Met-receptor potrebuje ligand: HSF/HGF za aktivacijo prenosa signala



Povezanost med invazivnostjo in matičnostjo

– Met – Wnt - Notch križna signaliziranja: podobnost med TMC in MC?



a) MET kinaza in Wnt signaliziranje združuje **beta-katenin**, ki se preko BCL9L oziroma APC gena **ne** fosforilira in **ne** razgrajuje v citosolu, ampak se prenese v jedro, kjer signalizira "matičnost" in (v povratni zanki) zviša MET –kinazo

b) MET kinaza podobno aktivira transkripcijo **ligandov DL**, ki aktivirajo Notch posredno zatem TF HES-1, ki pa je spet promotor za MET-kinazo.

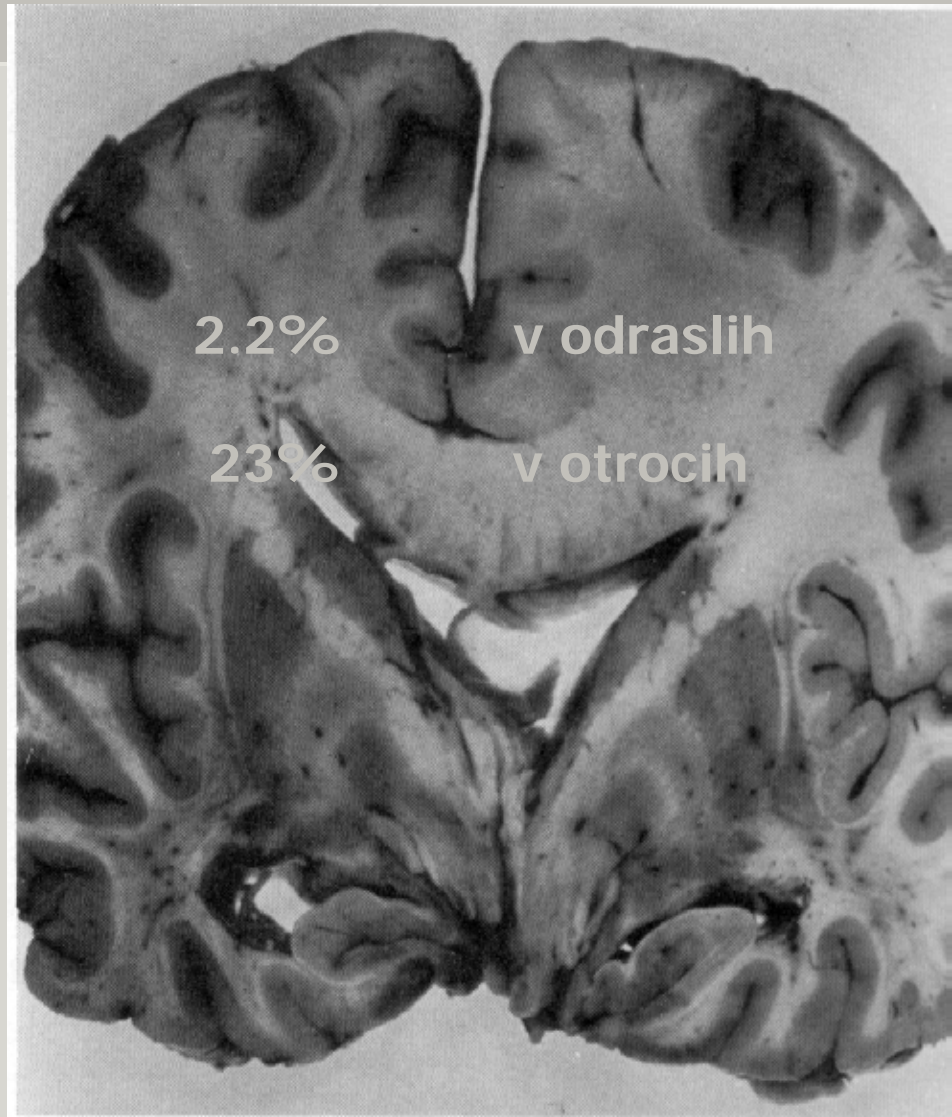
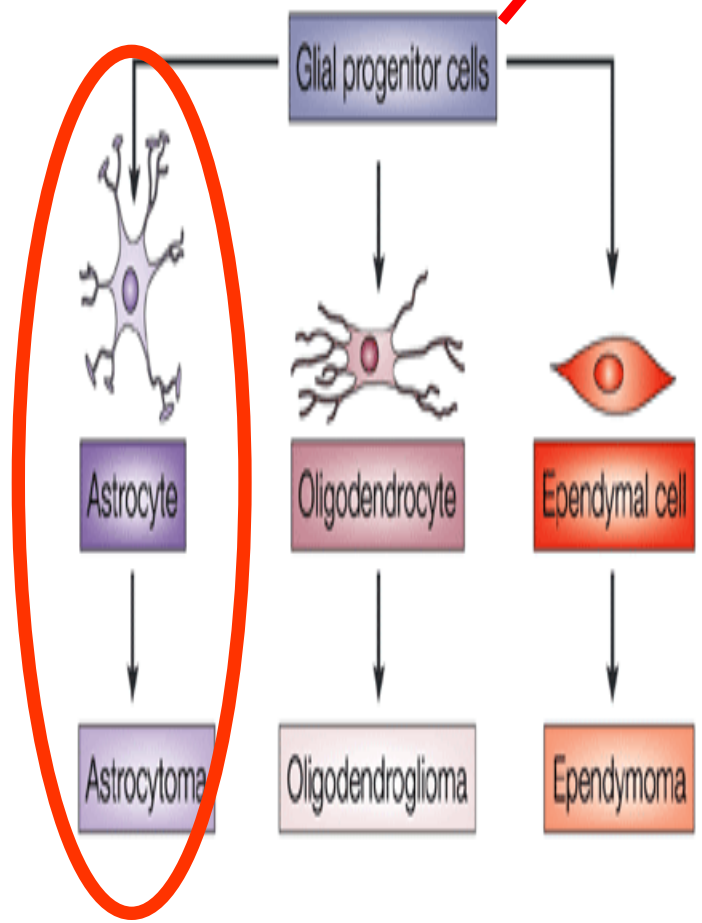
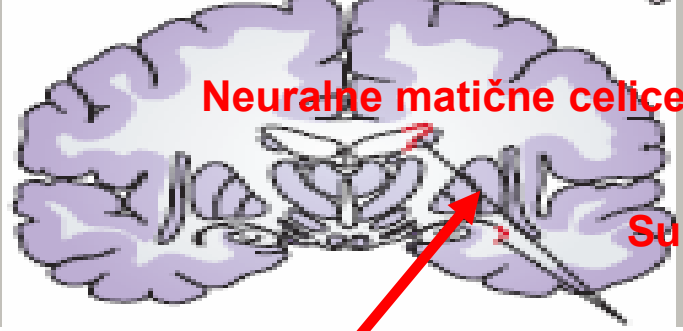
- Matične celice
- Odrasle matične celice – nastanek in evolucija
- Tumorske/rakave matične celice
- **Gliomske matične celice – glioblastomi**
- Pomen matičnih celic za zdravljenje raka

Pogostnost pojavljanja možganskih tumorjev

prirejeno po Davis in Preston-Martin, 1999

Vrsta tumorja	Delež med primarnimi intrakranialnimi tumorji (%)
Glioblastoma multiforme	21,7 – Maligni – 100% - 1 leto preživetja
Anaplastični astrocitom	16,6 – Potencialno maligni – nekaj let ?
Oligodendrogliomi	3,1
Ependimomi	2,3
Astroцитomi nizke malignosti	1,8
Meningiomi, ostali mezenhimalni tumorji	26,7 – Benigni > 90% - preživetje 30-40 let
Hipofizni tumorji	9,7
Tumorji mielinskih ovojnic (schwanomi)	7,3
Limfomi CŽS	3,5
Meduloblastomi	1,7
Neuronalni tumorji	1,0
Kraniofaringeomi	1,0
Tumorji zarodnih celic	0,5
Tumorji horoidnega pleksusa	0,3
Ostali tumorji	2,7

GLIOBLASTOM



Astrociti – glialne - podporne mezenhimske celice

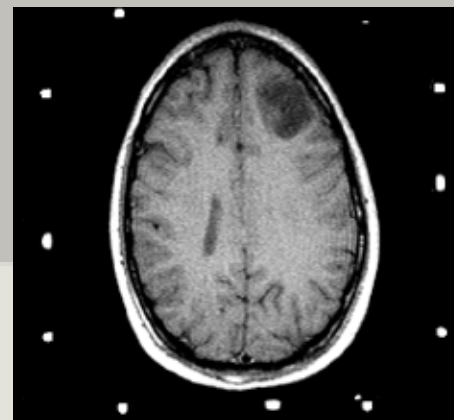
Astrocitom

(WHO grade II)

Mutacije p53

Izguba 17p in 22 q roke kromosoma

Povečano izražanje PDGF in PDGFR



Anaplastični astrocitom

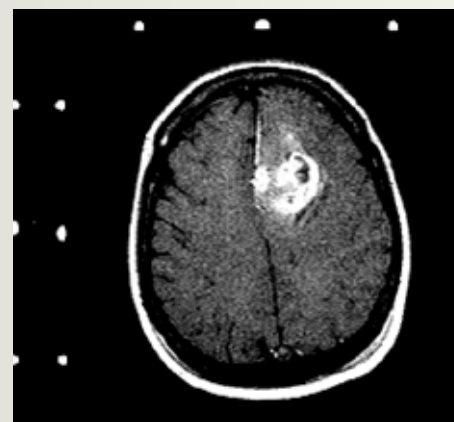
(WHO grade III)

P16 deregulacija

Rb mutacija

Izguba: 9p, 13q in 16 q

Povečana ekspresija PDGFR (!)

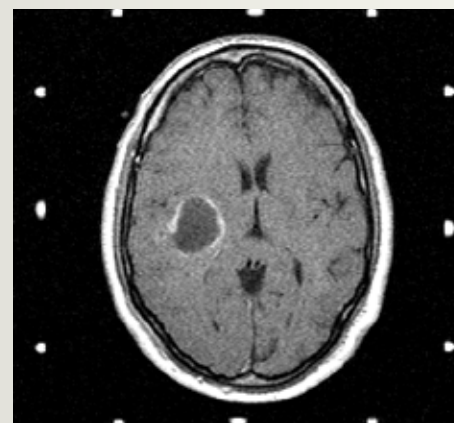


Glioblastoma multiforme

(WHO grade IV)

Izguba: 10p in 10 q

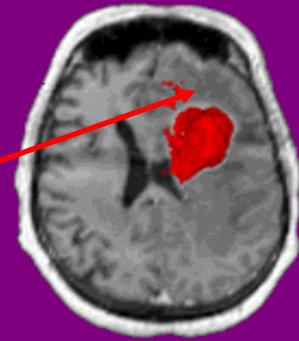
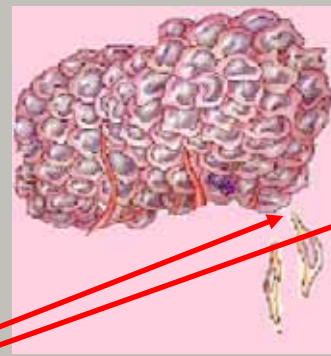
Povečana ekspresija EGFR (!)



*De novo
(stari
bolniki)*

*Stopnje:
Mladi
bolniki*

Glioblastomi klinične izkušnje

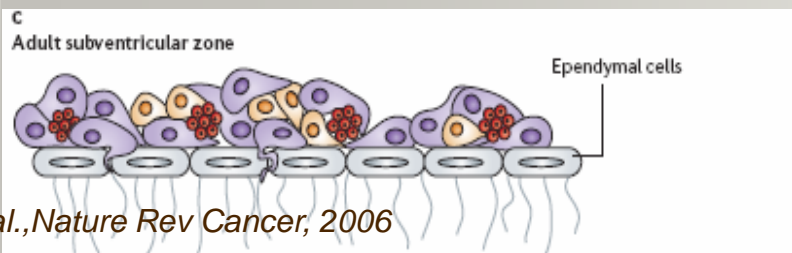
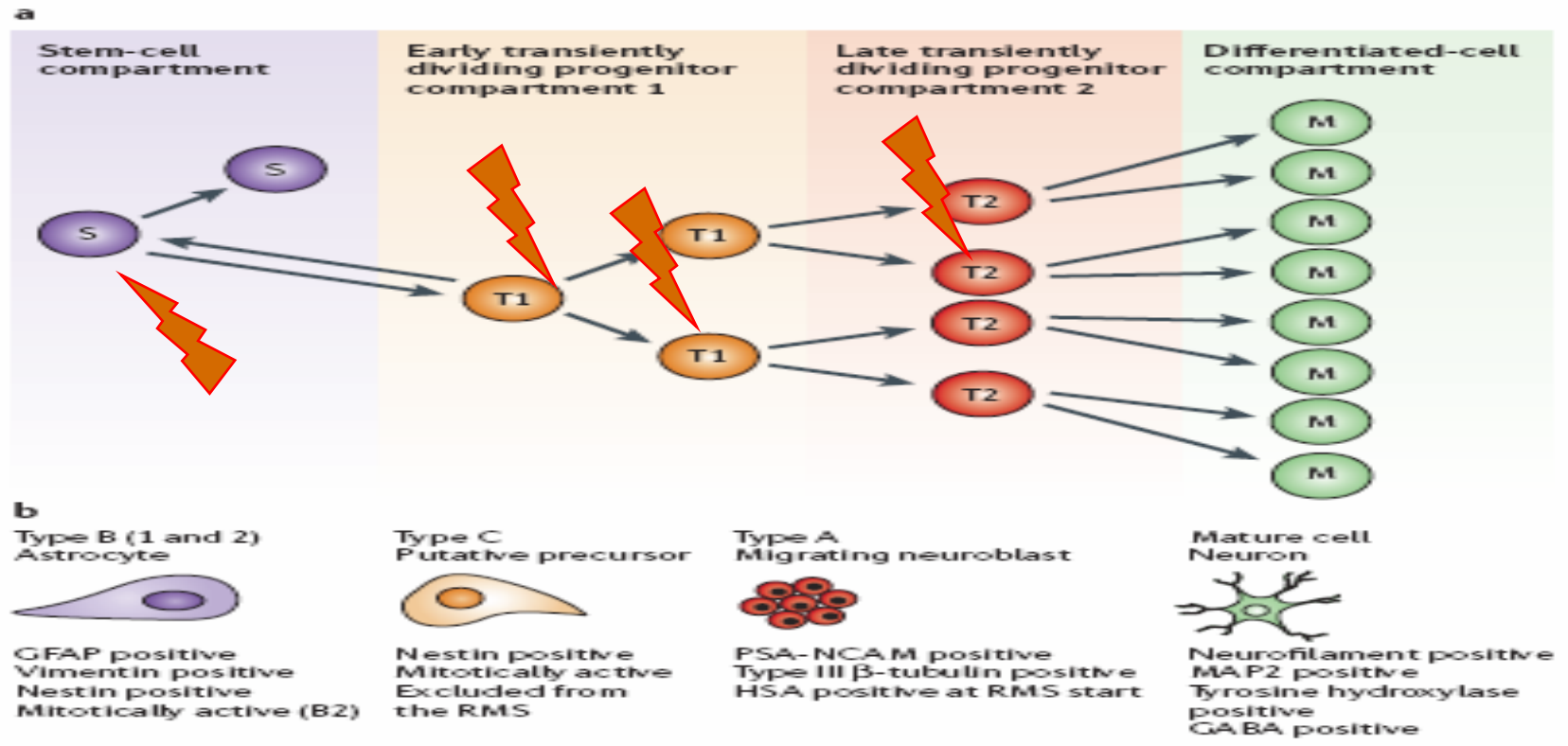


Glioblastomi so **lokalno invazivni tumorji** z nizko stopnjo in časom preživetja. Neuspešnost zdravljenja: kirurgija (nepopolna odstanitev), obsevanje (nespecifično) in kemoterapija (nedostopnost in tkivna neusmerjenost) so slabo učinkovite. Zato si nevroonkologi želijo:

- a) Zanesljive **prognostične** in predikcijske faktorje za napoved preživetja oz. za sledenje odziva na zdravljenje.
- b) Nove načine zdravljenja, usmerjene v boljše:
 - **nano-medicinska orodja**
 - **molekularne tarče**
 - **invazivne gliomske celice**
 - **v možganske izvirne tumorske celice (BTSC)**

NORMALNI razvoj – diferenciacija **N**evralnih **M**atičnih **C**elic –**NMC**, ki imajo sposobnost tvoriti **neurosfero**. Podtipi progenitorskih celic (B,C, A) so označeni z izražanjem specifičnih genov in diferencirajo v hierarhiji , ki je v strogo lokaliziranem možganskem predelu – subventrikularni coni.

Normalni diferencirajo v nevrone – v tumorjih pa v “BrainTumorStemCells



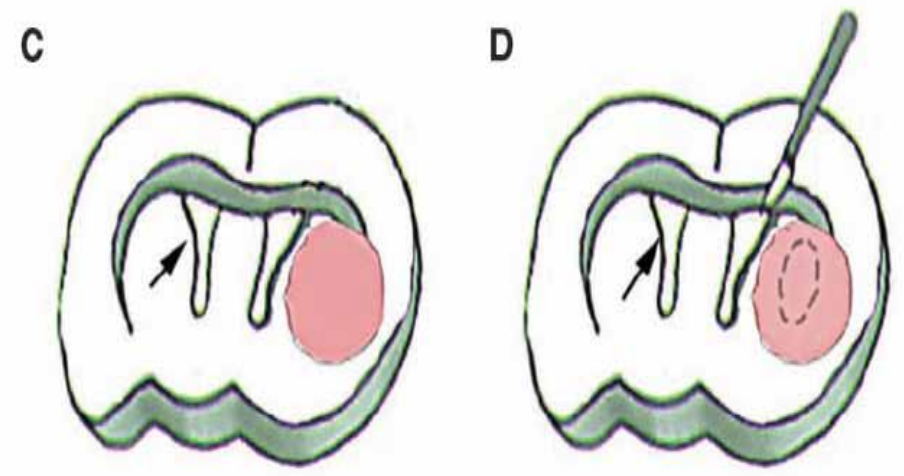
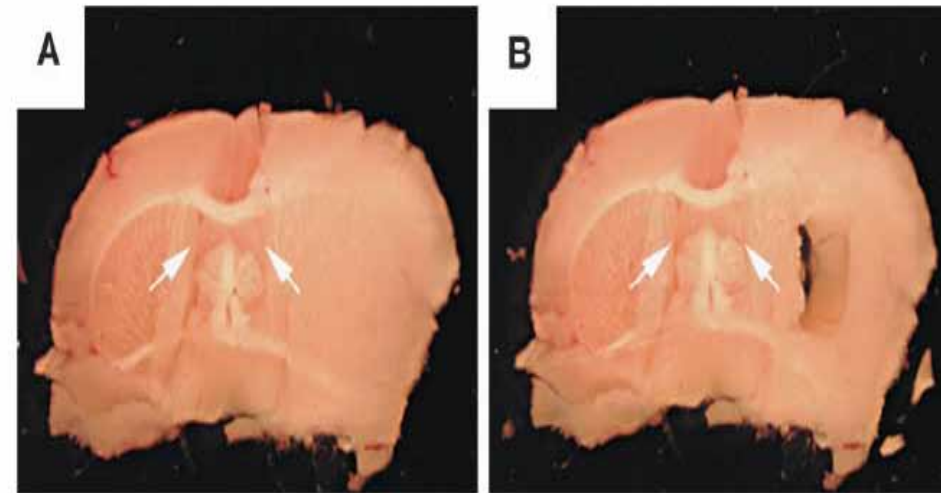
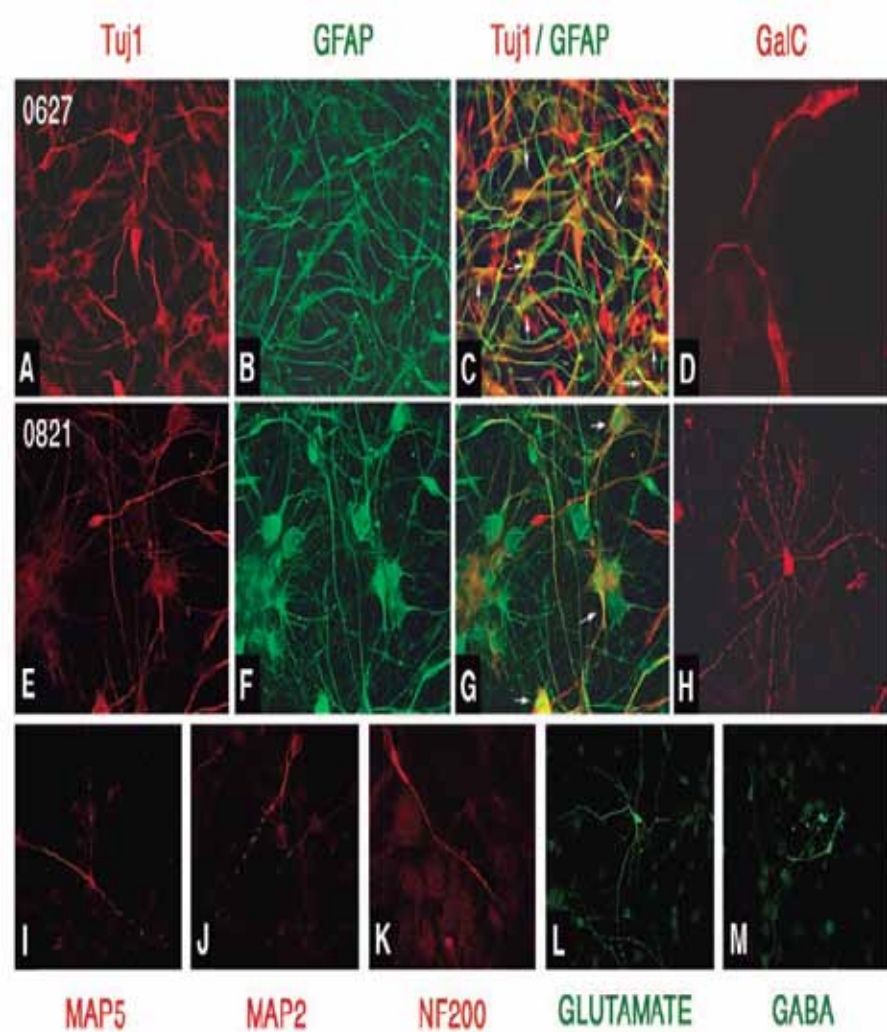
Subventrikularna cona

Vescovi et al., Nature Rev Cancer, 2006

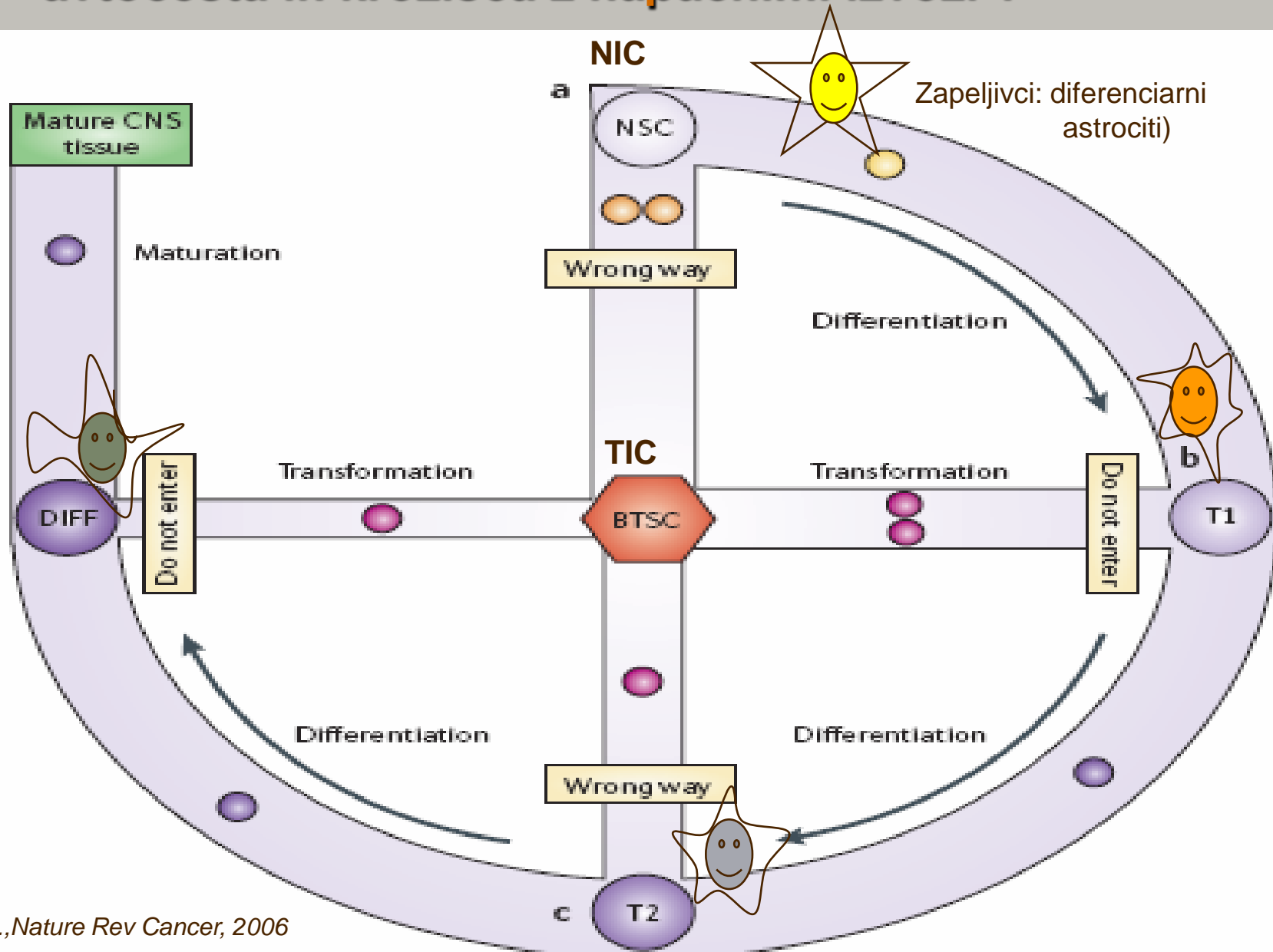
Najbolj prepričljiv dokaz obstoja in tumorigenih lastnosti BTSC

Galli et al., *Cancer Research*, 64, 7011, 2004

Transformirane celice iz človeških tumorjev so izražale nekatere značilne markerje NMC in so po serijskih transplantacijah v miših tvorile unipotente astroglialne tumorje in vivo. **Markerji BTSC: CD 133, Nestin, BM1, Sox2, Notch, (Wnt, Shh), Musashi, MDR-1-Pgp** diferenciacijski markerji n.pr. **GFAP** (glial fibrilar acidic protein)? itd. Zakaj?



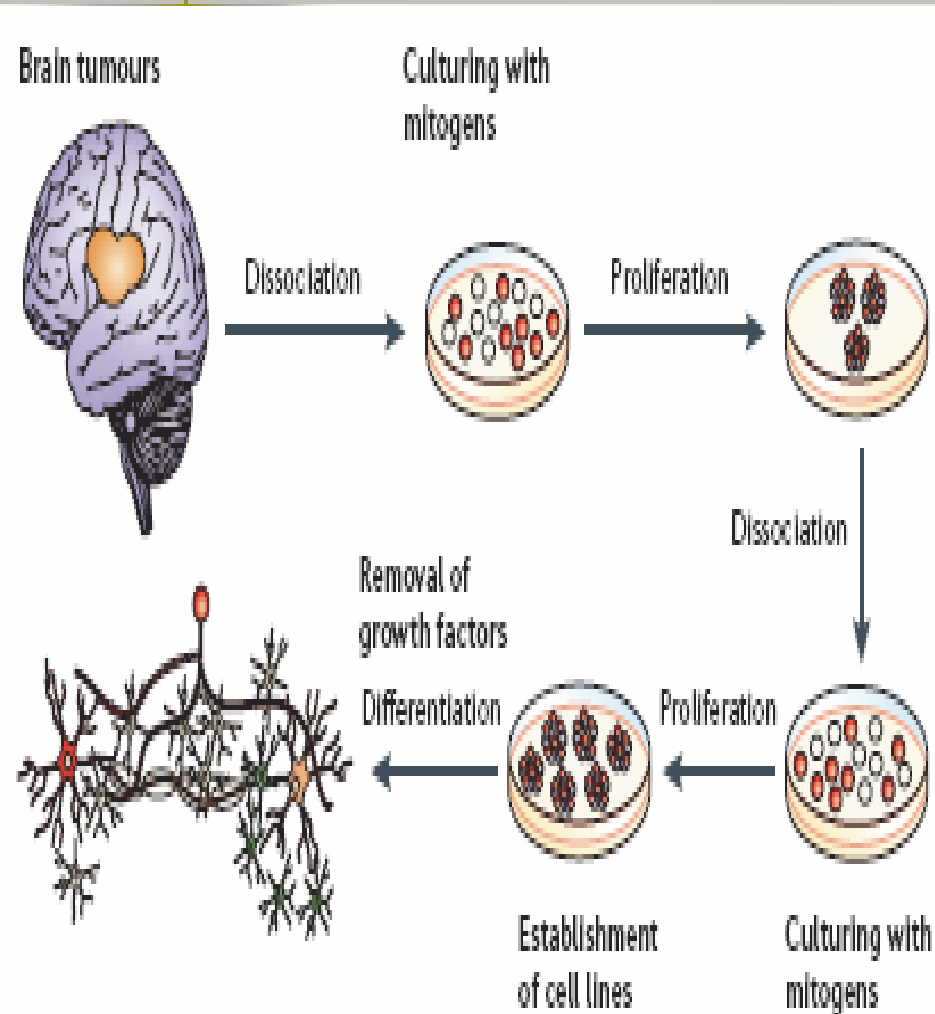
MTIC – BTSC: avtocesta in krožišča z napačnimi izvozi ?



Glioblastomske Matične Celice

- n **GBM nastajajo** iz normalnih NMC (nNSC) ali njihovih progenitorskih celic. Tumorji se razvijejo iz majhne populacije normalnih celic – **tumorskih matičnih celic** - z multipotentno diverzifikacijo (de-diferenciacijo). Tvorijo od 0.1- 20% celične mase tumorja, v katerem ostajajo latentni.
- n **Lastnosti:**
 - Neskončna sposobnost samo-pomnoževanja
 - Tumorigenost v enake vrste tumorjev in vitro
 - Invazivni- infiltracijski potencial v možganovino
 - **Večji angiogeni potential kot ga imajo ostale tumorske celice (?)**
 - **Resistenca za apoptozo in mirovanje (senescenco) z izražanjem MDR-1 genov in DNA popravljalnih mehanizmov:**
- n So odgovorne za **neodzivnost na terapijo in recidive**

Hipoteza o TMC je bila potrjena z izolacijo prvih Mmatičnih AML celic (akutna mieloidna levkemija), in drugih vrst levkemij, raka dojke, prostate, možgan..



Potrebne lastnosti možganskih TMC (BTSC):

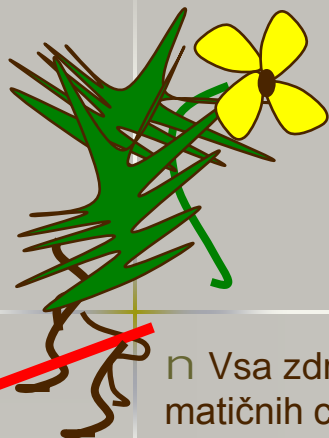
- Samopomnoževanje *ex vivo* (klonogenost in populacijska kinetika) ter *in vivo*:
- Tvorijo tumorje enake histologije pri presaditvi v žival na isto (ortotopno) mesto
- Enake kariotipske in genetske spremembe (genomika....)
- **Sposobnost diferenciacije v tumorske celice:**
 - enaka hierarhija tumorjev v serijskih presaditvah, ki se končajo z ne-tumorigenimi končnimi celicami.
 - multilinijska de-diferenciacija – razlika od normalnih neuralnih IC

- Matične celice
- Odrasle matične celice – nastanek in evolucija
- Tumorske/rakave matične celice
- Gliomske matične celice – glioblastomi
- **Pomen matičnih celic za zdravljenje raka**

Matične celice in zdravljenja raka

- Tumorske matične celice – nove **terapevtske tarče** ! Kako jih **doseči**?
- **Normalne izvorne celice** – orodja?!
 - **nNMC** – **naravna** (alogeno) eliminacija TIC
 - **mNMC** - **modificirane** za eliminacijo TIC
 - **dNMC** – kot **dostavljalni** sistem za droge
 - Kombinacije z klasičnim zdravljenjem v II klinični fazi

Fenomen regrata



n Vsa zdravila – kemoterapija – so učinkovita le, če so usmerjena ali potekajo ob znižanju odpornosti matičnih celic (Chronical Myeloid Leukemia – poskusne živali) (a)

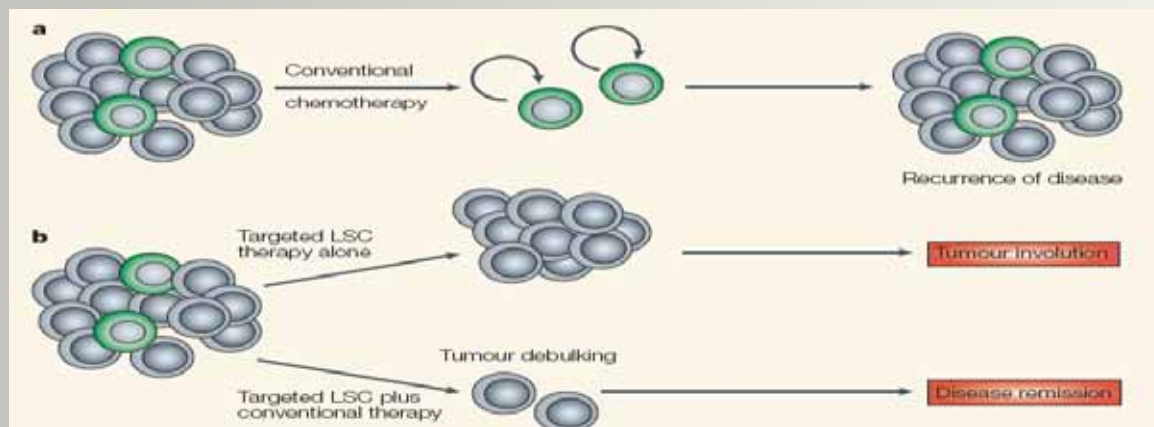
n Zato se uporabljajo novi molekularni pokazatelji zdravljenja (TMC markerji) in novi usmerjevalci drog k TMC (n.pr.monoklonska protitelesa za TMC markerje, itd.)

n Da so ti bolj učinkoviti, zdravimo v dveh stopnjah:

n uporabimo uničenje majhne populacije TMC;

n zmanjšanje tumorske mase s klasičnimi pristopi, ki ciljajo lastnosti - markerje zrele maligne celice!

■ **Eliminacijo TIC dosežemo n.pr. z inhibitorji signalnih poti “matičnosti” ali z reagenti, ki TMC prisilijo v terminalno diferenciacijo:**



Zdravljenje z normalnimi in modificiranimi, naloženimi normalnimi Nevralnimi matičnimi celicami - nNMC



19th century etching of the Trojan Horse,

n Izredna migratorna sposobnost nNMC in njihov naravni tropizem k intra-kranialnim patologijam – tumorjem- omogoča nove možnosti uporabe.

n Eksogene in endogene NMC se nameste ob tumorju in slede TC. V mladih miših je migracija večja kot v starih (*Aboody, 2000*).

nRazlaga: molekularni nivo: kemokinski par **CXCR4/SDF-1** se poveča v poškodovanih možganih in tumorjih. Alternativno tudi **VEGF/VEGFR** in **EGF/EGFR**

Terapija:

+ Možnost vgraditve suicidalnih in/ ali terapevtskih genov v nNMC !

+ Možnost uporabe mezenhimskih, kožnih, hematopoetskih MC – za glioblastome !

- Možnost transformacije nNMC v Tumorske Celice *in situ*.

Strategije uporabe nevralnih matičnih celic v terapiji možganskih tumorjev

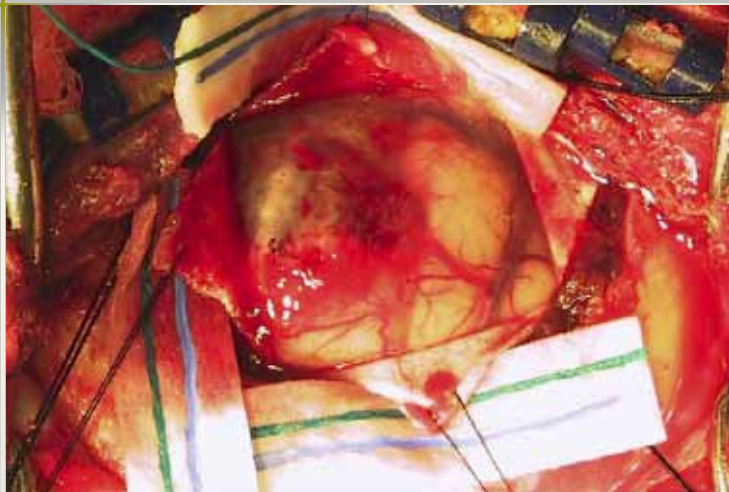
Naložene NMC – molekularne tarče

- **Imuno-modulacija:** NMC pospešijo tudi lokalni imunski odziv (IL-4, IL12)
- **Apoptotski** in rastni signali:
-IFN- TRAIL in TNF
- **Virusna terapija** – citolizni virusi –HSV-adenoma
- **Encimi za konverzijo pro-drog** v aktivno zdravilo: HSV-timidin kinaza in samomorilni geni
- **Biofizikalni agensi** – fotodinamsko zdravljenje - nanodelci
- **Vizualiziranje**- imaging za sledenje in diagnozo

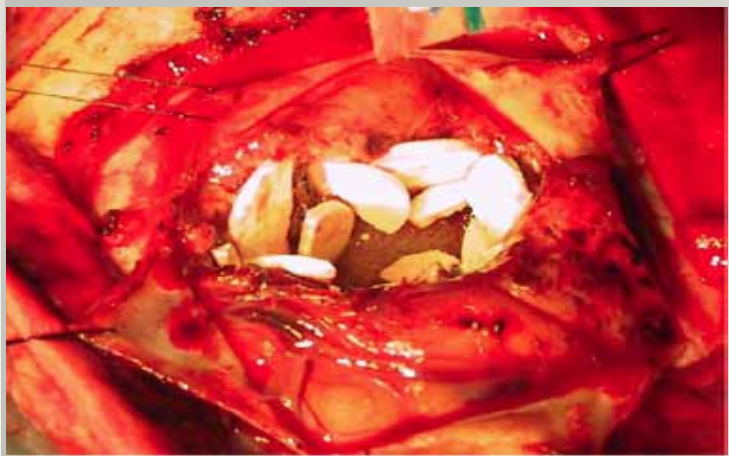
Nano – medicina in nevrnalne matične celice – NMC

Nanodelci za uporabo v medicini predstavljajo dostavljalne sisteme, s katerimi specifično zadenemo TMC

Glioblastoma ob operaciji



Vstavitev biopolimernih vložkov z kemoterapevtskih agensom – in NMC



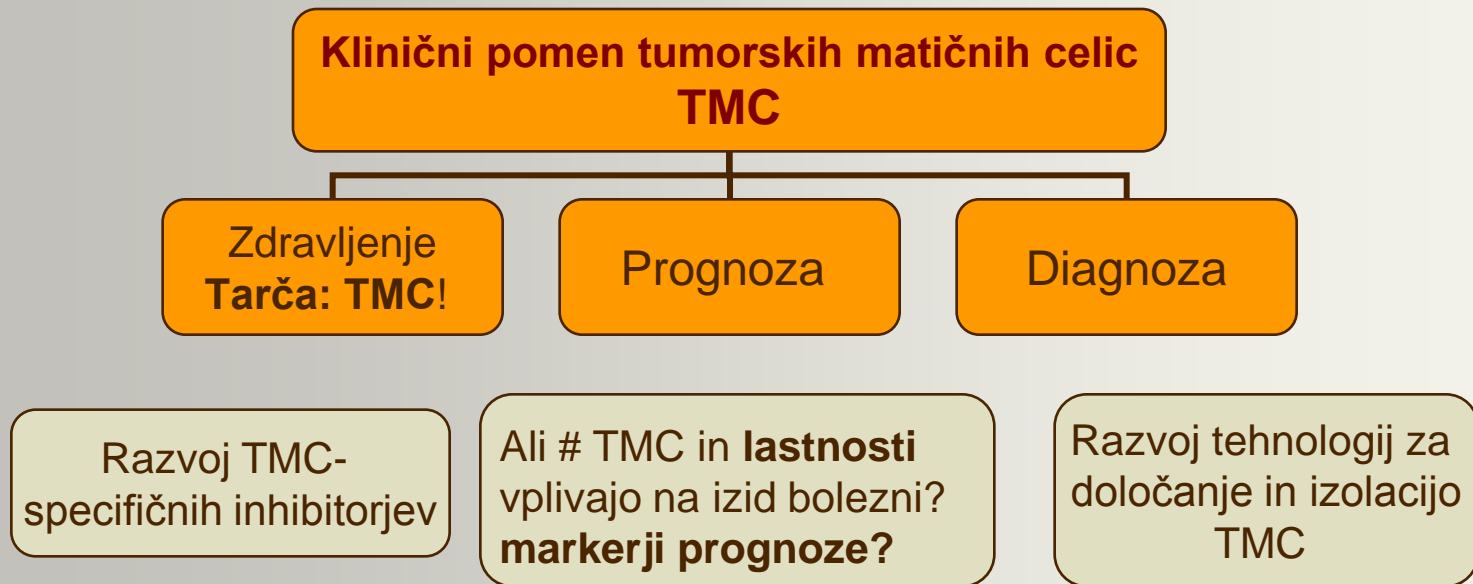
Celična terapija – tarča TMC

- Specifična interakcija z TMC markerji – **ne-kovalentni agregati** (liposomi, alginati, hialuronan)
- **Kovalentna vezava** med markerji TMC in nosilnim polimerom
- **Polimer z naloženimi NMC**, ki vsebuje – antiangiogene (endostatin, protitelesa, itd) za počasno sproščanje

Povzamemo ...

Tumorske **Matične celice -TMC** - imajo večino podobnih lastnosti in označevalcev kot normalne tkivne matične celice –**NMC** in nastanejo lahko na več (še neznanih) načinov. Lahko vsebujejo tudi markerje diferenciacije in so multipotentne – diferencirajo v ne-tumorigene maligne tumorske celice. Lokalizacija? Migracija? Plastičnost?

So odgovorne za odpornost proti terapiji in za dosedanji neuspeh zdravljenja raka !



Zdravljenje in sledenje

Klinična faza I: Začetna študija za določitev varne doze in znakov klinične aktivnosti

Klinična faza II: Določanje učinkovitosti v posameznih vrstah raka

Klinična faza III: Primerja nov način zdravljenja in njegove učinke s prejšnjimi!

Paradoks: odziv na zdravljenje merimo s serumskimi ali tkivnimi markerji oziroma vpliv na zmanjšanje/ tumorske/ mase – celic, ne pa na **preživetje!**

Vsa zdravila - kemoterapija – so učinkovita le, če so usmerjena na znižanje kemorezistence izvornih celic (Chronic Myeloid Leukemia – poskusne živali)

V svoji "Fiziologiji," je Hippocrates opisal življenjsko silo v cloveku, imenovano

"narava" (j usiz – jusiz), ki jo razlagajo kot notranjo gonilno moc vitalnih funkcij. Je najbolše zdravilo, ki ga mora zdravnik samo še krepiti.

Spominja na vizionarsko predvideni obstoj izvornih celic in zdravljenja z lastnimi izvornimi celicami – celicna terapija!



otok KOS -2006