



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Mechanizmy oporności krwiotwórczych i białaczkowych komórek macierzystych

Author: Agnieszka Ciomber, Iwona Mitrus

Citation style: Ciomber Agnieszka, Mitrus Iwona. (2014). Mechanizmy oporności krwiotwórczych i białaczkowych komórek macierzystych. "Hematologia" (2014, nr 1, s. 30-39).



Uznanie autorstwa - Użycie niekomercyjne - Bez utworów zależnych Polska - Licencja ta zezwala na rozpowszechnianie, przedstawianie i wykonywanie utworu jedynie w celach niekomercyjnych oraz pod warunkiem zachowania go w oryginalnej postaci (nie tworzenia utworów zależnych).



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Mechanizmy oporności krwiotwórczych i białaczkowych komórek macierzystych

Resistance mechanisms of hematopoietic and leukemic stem cells

Agnieszka Ciomber^{1, 2}, Iwona Mitrus¹

¹Klinika Transplantacji Szpiku i Onkohematologii, Centrum Onkologii
 — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, Gliwice

²Katedra Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
 Uniwersytet Śląski, Katowice

Streszczenie

Krwiotwórcze komórki macierzyste (HSC) są szczególnym typem somatycznych komórek macierzystych. Cechuje je zdolność do nieograniczonej liczby podziałów oraz różnicowania we wszystkie typy komórek krwi. Pula HSC musi wystarczyć na cały okres życia organizmu. Wszystkie zmiany genetyczne w komórce macierzystej zostają utrwalone w komórkach potomnych i mogą prowadzić do zaburzeń hematopoezy. Istnieje wiele mechanizmów chroniących somatyczne HSC. Część HSC pozostaje w stanie spoczynku, czyli fazie G0 cyklu komórkowego, co obniża ryzyko pojawienia się mutacji. Komórki te cechują się podwyższoną ekspresją białek związanych z opornością na apoptozę, naprawą uszkodzeń DNA oraz usuwaniem toksyn. Inne białka zapobiegają ich zniszczeniu przez komórki swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Mikrośrodowisko szpiku kostnego zapewnia również ochronę HSC. Podobne mechanizmy wpływają na oporność tak zwanych białaczkowych komórek macierzystych (LSC). Na oporność LSC wpływają również mutacje pojawiające się w procesie nowotworzenia. Istnienie nowotworowych komórek macierzystych (CSC) uważa się za jedną z głównych przyczyn niepowodzeń terapeutycznych — chemio- i radioterapia zmniejszają liczbę komórek białaczkowych w organizmie, ale pozostające po zakończeniu leczenia CSC powodują wznowę. Poznanie mechanizmów ochronnych HSC ma istotne znaczenie, gdyż pozwala na zrozumienie podłoża niektórych chorób hematologicznych oraz poszukiwanie nowych rozwiązań terapeutycznych.

Słowa kluczowe: krwiotwórcze komórki macierzyste, białaczkowe komórki macierzyste, mechanizmy oporności

Hematologia 2014; 5, 1: 30–39

Abstract

Hematopoietic stem cells (HSC) are a special type of somatic stem cells. They are characterized by the ability to divide an unlimited number of times and to differentiate into all types of blood cells. The pool of HSC must therefore be sufficient for the whole life of an organism. All genetic alterations of a stem cell will be retained by its daughter cells and they may lead to disturbances of

Adres do korespondencji: Agnieszka Ciomber, Klinika Transplantacji Szpiku i Onkohematologii, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach, ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44–101 Gliwice, tel.: 32 278 96 98, faks: 32 278 91 49, e-mail: agnieszka.ciomber@gmail.com

hematopoiesis. There are several mechanisms that protect somatic HSC. Part of HSC remain in quiescent state, the G0 phase of the cell cycle, which reduces the risk of mutations. These cells are also characterized by increased expression of proteins associated with apoptosis resistance, DNA repair and toxin removal. Other surface proteins provide protection against attack by specific and/or nonspecific immune system cells. Also, HSC are protected by bone marrow microenvironment. Similar mechanisms affect the resistance of the so-called leukemic stem cells (LSC). Resistance of these cells is also influenced by mutations that occur during carcinogenesis. Presence of cancer stem cells (CSC) is considered to be a major cause of treatment failure: chemo- and radiotherapy both reduce the number of leukemic cells in the body, but CSC which remain after treatment may cause recurrence of the disease. Understanding resistance mechanisms of HSC might exert a significant impact on further developments in medicine. Foremost, such knowledge would permit understanding the background and fine details of some hematologic disorders as well as developing novel therapeutic strategies.

Key words: hematopoietic stem cells, leukemic stem cells, resistance mechanisms

Hematologia 2014; 5, 1: 30–39

Wprowadzenie

Krwiotwórcze komórki macierzyste (HSC, *hematopoietic stem cells*) są przykładem somatycznych, zwanych też dorosłymi (ASC, *adult stem cells*), komórek macierzystych. Komórki takie wykryto w różnych miejscach organizmu, między innymi w sercu, skórze czy szpiku. Cechą definiującą komórki macierzyste jest ich zdolność do nieograniczonej liczby podziałów oraz różnicowania. W odróżnieniu od komórki embrionalnej, która jest totipotencjalna (może wytworzyć wszystkie komórki organizmu), ASC różnicują do określonej liczby linii komórkowych; w przypadku HSC są to wszystkie komórki krwi [1].

Somatyczne komórki macierzyste zapewniają odnowę tkanek, a ich pula musi wystarczyć na cały okres życia organizmu. Z tego powodu organizm chroni je przed śmiercią lub powstaniem mutacji. Wszelkie zmiany genetyczne, które powstają w komórce macierzystej, zostają utrwalone w komórkach potomnych. W procesie ewolucji powstało wiele różnych mechanizmów ochronnych. W niniejszym artykule omówiono wybrane zagadnienia związane z opornością HSC.

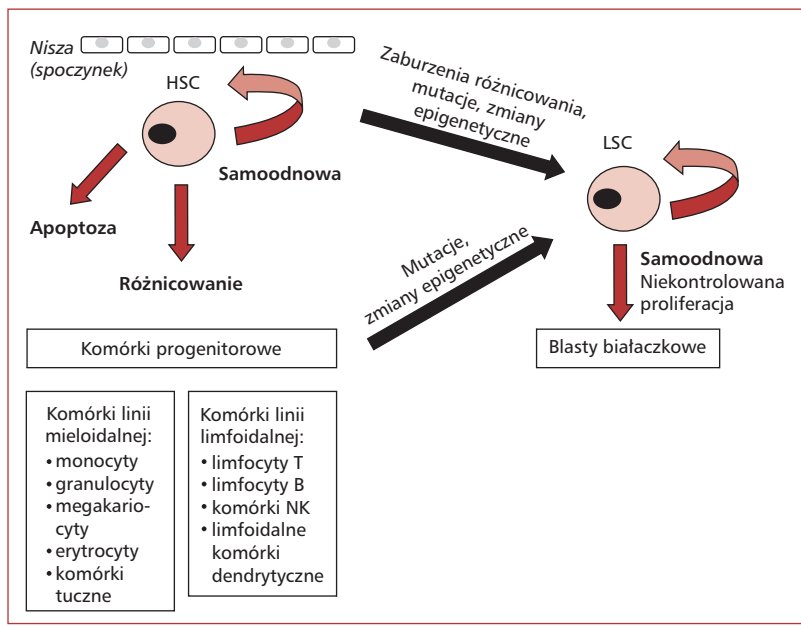
Charakterystyka HSC

Krwiotwórcze komórki macierzyste, podobnie jak inne komórki macierzyste, mają zdolność przeprowadzania niesymetrycznych podziałów. W wyniku takiego podziału jedna z komórek potomnych pozostaje komórką macierzystą, druga zaś rozpoczyna proces różnicowania. Umożliwia to zachowanie zapasowej puli ASC z jednoczesnym powstaniem

komórek progenitorowych (ukierunkowanych) [2, 3]. W wyniku kolejnych podziałów oraz procesów różnicowania i dojrzewania komórki progenitorowe wytwarzają komórki zróżnicowane [4]. W przypadku HSC proces ten jest dobrze opisany. Krwiotwórcza komórka macierzysta, pod wpływem cytokin oraz czynników wzrostu, różnicuje w komórkę mieloidalną lub limfoidalną. Z komórek progenitorowych linii mieloidalnej powstają monocyty, granulocyty, megakariocyty oraz erytrocyty i komórki tuczne, a komórki limfoidalne różnicują się do limfocytów B i T, komórek naturalnej cytotoksyczności (NK, *natural killers*) oraz limfoidalnych komórek dendrytycznych [5]. Uproszczony cykl życiowy HSC przedstawiono na rycinie 1.

Równowaga między samoodnową, różnicowaniem, apoptozą czy migracją jest zapewniana przez sygnały pochodzące z otoczenia komórek, czyli z tak zwanej niszy [6–8]. Nisza HSC to zlokalizowane w szpiku kostnym wyspecjalizowane mikrośrodowisko o ściśle zdefiniowanej budowie anatomicznej [2, 6]. Składa się z części komórkowej, tworzonej między innymi przez osteoblasty, makrofagi, komórki mezenchymalne czy komórki śródbłonka, oraz macierzy pozakomórkowej [9–11]. Funkcjonowanie komórek macierzystych jest regulowane przez białka adhezyjne, ligandy, cytokiny oraz stężenie tlenu i jonów wapnia obecnych w niszy [9–13].

Wiele danych sugeruje istnienie dwóch oddzielnych rodzajów niszy HSC. Pierwsza, określana jako osteoblastyczna, znajduje się w pobliżu okostnej wewnętrznej jamy szpikowej. Utrzymuje HSC w stanie spoczynku. Jej główne składniki to komórki linii osteoblastycznej, adipocyty, fibroblasty



Rycina 1. Porównanie cyklu życiowego krwiotwórczych (HSC) oraz białaczkowych komórek macierzystych (LSC). Krwiotwórcze komórki macierzyste ulegają zrównoważonym procesom samoodnowy, apoptozy i różnicowania, co prowadzi do powstania poszczególnych komórek krwi. W wyniku zaburzeń różnicowania, nagromadzenia mutacji lub zmian epigenetycznych prawidłowe komórki macierzyste mogą się przekształcić w LSC; NK — naturalna cytotoxicność

Figure 1. Comparison of hematopoietic (HSC) and leukemic stem cells (LSC) cell cycles. Hematopoietic stem cells are in a balanced ongoing process of self-renewal, apoptosis and differentiation. This leads to the formation of the cellular components of blood. In the effect of disturbances in the process of differentiation, accumulation of mutation or epigenetic changes the HSC can be converted into LSC; NK — natural killers

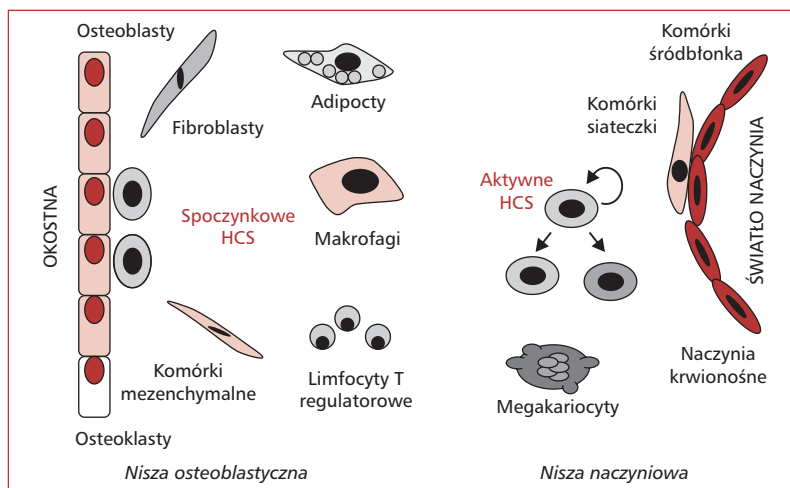
oraz makrofagi, a także substancja pozakomórkowa — osteopontyna, kolagen i cytokiny [10, 14]. Drugi rodzaj, nisza naczyńniowa, jest zlokalizowana w pobliżu sieci cienkościennych naczyń sinusoidalnych. Większość komórek krwiotwórczych znajdujących się w niszy okołonaczyńniowej pozostaje w tak zwanym stanie aktywacji, przechodząc procesy samoodnowy oraz różnicowania w komórki ukierunkowane i ostatecznie w dojrzałe komórki krwi [7, 9, 14]. Schemat obrazujący uproszczoną budowę niszy przedstawiono na rycinie 2. Nie jest do końca wyjaśnione, czy w szpiku kostnym rzeczywiście istnieją dwa rodzaje niszy HSC. Niewykluczone, że nisza szpikowa stanowi jedną, kompleksową strukturę tworzoną przez różne komórki, nadające całości specyficzne właściwości, a HSC mogą się przemieszczać w jej obrębie. Możliwe jest również, że HSC o różnym stopniu dojrzałości znajdują się w różnych miejscach anatomicznych niszy [10, 12, 15].

Mechanizmy oporności krwiotwórczych komórek macierzystych

Stan spoczynku HSC

Jak wspomniano, mimo nieograniczonego potencjału proliferacyjnego część HSC przez większość czasu pozostaje w tak zwanym stanie spoczynku (uśpienia), czyli w fazie G0 cyklu komórkowego [16, 17]. Komórki te rezydują głównie w niszy osteoblastycznej, w pobliżu okostnej. Stanowią one około 40% populacji HSC [2, 16, 17].

W eksperymentach przeprowadzanych na myszach udowodniono, że uśpione HSC dzielą się średnio co 145 dni, co odpowiada 5 podziałom komórkowym w ciągu życia zwierzęcia (brakuje podobnych danych dotyczących człowieka) [18]. Stosunkowo mało jest informacji na temat czynników wywołujących w komórkach stan uśpienia, znacznie lepiej są natomiast opisane sygnały pobudzające proliferację lub mobilizację HSC. Uważa się, że



Rycina 2. Uproszczony schemat budowy niszy krwiotwórczych komórek macierzystych (HSC). Tak zwana nisza osteoblastyczna, znajdująca się w pobliżu okostnej, utrzymuje HSC w stanie spoczynku. Nisza naczyniowa jest zlokalizowana w pobliżu sieci naczyń krwionośnych. Większość znajdujących się w niej komórek pozostaje w stanie aktywacji, przechodzą procesy samoodnowy oraz różnicowania w komórki ukierunkowane i ostatecznie w dojrzałe komórki krwi. Poszczególne komórki budujące niszę wpływają na funkcję HSC przez bezpośredni kontakt lub też wydzielane czynniki

Figure 2. Simplified scheme of hematopoietic stem cell (HSC) niche. The osteoblastic niche located near the endosteum maintains HSC in quiescence state. Vascular niche is situated near blood vessels. Most cells contained therein are in the so-called activation state, a process of self-renewal and differentiation into mature blood cells. Different cells forming the niche regulate the behavior of HSC by direct contact or secreted factors

na stan uśpienia wpływają ścieżka transkrypcyjna *P53*, obecne w mikrośrodowisku białka i cytokiny, jak na przykład transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β , *transforming growth factor β*), białko angiopoetyna 1, oraz oddziaływanie z innymi komórkami za pośrednictwem integrzyn i adhezyz [19, 20].

Stan spoczynku prawdopodobnie pełni funkcję ochrony komórek przed spontanicznymi mutacjami, które mogą się pojawiać w trakcie podziałów, a także starzeniem się komórek [1, 18]. Sprzyja również uzyskaniu przez komórki macierzyste oporności, między innymi na chemioterapeutyki, często działające jedynie na komórki w określonej fazie podziału [18, 21, 22].

Krwiotwórcze komórki macierzyste mogą zakończyć fazę spoczynku i rozpocząć szybką proliferację w odpowiedzi na czynniki stresowe lub gwałtowną utratę krwi. Celem jest przywrócenie stanu homeostazy organizmu [19]. Zaburzenia w mechanizmach regulujących cykl komórkowy HSC, a tym samym warunkujących ich stan spoczynku, mogą doprowadzić do utraty zdolności do samoodnowy lub też do przedwczesnego wyczerpania puli HSC, co prowadzi do zaburzeń hematologicznych, między innymi do mielodysplazji szpiku czy ostrej białaczki szpikowej [16, 21].

Zmieniona ekspresja białek ochronnych

Komórki organizmu wykazują zróżnicowaną wrażliwość na działanie szkodliwych czynników. Różnice te wynikają z odmiennej ekspresji genów. Zwiększona oporność jest związana z podwyższoną ekspresją genów kodujących białka ochronne, między innymi związanych z przebiegiem apoptozy, naprawą uszkodzeń DNA oraz białek transporterowych ABC (*ATP-binding cassette*) usuwających toksyny.

Białka ABC należą do białek błonowych — uważa się je za „pompy” usuwające z komórki związki chemiczne, na przykład: witaminy, peptydy, hormony. Zapobiegają także akumulacji w komórce związków toksycznych. Do tej pory wykryto około 50 białek należących do tej rodziny [23]. Ich podwyższoną ekspresję opisano między innymi w nerkach, wątrobie, łożysku i mózgu, czyli narządach najbardziej narażonych na toksyny lub szczególnie chronionych przed uszkodzeniem. Najdokładniej zbadanym transporterem z tej rodziny jest białko P (P-glikoproteina [P-gp], ABCB1, MDR1 [*multidrug resistance protein 1*]). Jego zwiększoną ekspresję wykryto w wielu rodzajach nowotworów; uważa się to za przyczynę oporności wielolekowej, ponieważ białko P usuwa do przestrzeni pozakomórkowej wiele chemioterapeutyków [23, 24].

Zwiększona ekspresja białek ABC została również stwierdzona w wielu rodzajach ASC. Do tej pory jedną z technik laboratoryjnych umożliwiających identyfikację komórek macierzystych w populacji jest zastosowanie określonych barwników — zazwyczaj odczynnika Hoechst 33342 lub rodaminu 123. Komórki z nadekspresją białek ABC są zdolne do usunięcia tych związków (określa się je mianem *side population*), w pozostałych komórkach barwniki ulegają akumulacji. Oczywiście, analiza taka nie wystarcza do uznania komórek za macierzyste, lecz jest to szybka i tania metoda pozwalająca na poszukiwanie ASC, w odniesieniu do których nie opisano jeszcze konkretnych markerów powierzchniowych [25].

W przypadku HSC stwierdzono podwyższoną ekspresję genów *ABCG1*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCD4* i *ABCB2* w komórkach CD34+CD38– w porównaniu z komórkami CD34+CD38+ [26, 27]. Oznacza to, że stężenie białek transporterowych obniża się w trakcie różnicowania komórek macierzystych w ukierunkowane, które nie muszą już być intensywnie chronione.

Kolejnym białkiem o działaniu ochronnym jest P53. Jest to czynnik transkrypcyjny zaangażowany w regulację wielu procesów komórkowych, a w szczególności aktywacji mechanizmów naprawy DNA lub indukcji apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Zależnie od stopnia nasilenia sygnałów stresowych, takich jak działanie wolnych rodników czy związków genotoksycznych, białko P53 może indukować różne rodzaje odpowiedzi komórkowej. W warunkach fizjologicznych, gdy białko P53 ulega ekspresji na niskim poziomie, umożliwia ono utrzymanie stanu homeostazy HSC — utrzymuje komórki macierzyste w stanie spoczynku oraz reguluje transkrypcję genów naprawy DNA [28]. Pojawienie się sygnałów stresowych zwiększa ekspresję P53, co indukuje apoptozę, a tym samym eliminuje uszkodzone HSC mogące przekazać nabyte mutacje komórkom zróżnicowanym [29]. Zahamowanie ekspresji białka P53 prowadzi więc do oporności HSC na apoptozę [28].

W porównaniu z komórkami zróżnicowanymi HSC wykazują także sprawniejsze mechanizmy naprawy DNA, co chroni ich genom przed nabywaniem spontanicznych mutacji. Komórki macierzyste cechują się wyższą ekspresją genów odpowiedzialnych za usuwanie adduktów DNA i naprawianie podwójnych pęknięć nici DNA niż komórki dojrzałe oraz progenitorowe. W trakcie różnicowania HSC działanie systemów naprawczych ulega więc osłabieniu [30–32].

Oddziaływanie HSC z innymi komórkami układu odpornościowego

Zbyt silna odpowiedź układu odpornościowego może doprowadzić do zniszczenia nie tylko patogenu, ale także prawidłowych komórek organizmu. Krwiotwórcze komórki macierzyste są zdolne do oddziaływania z komórkami układu odpornościowego za pośrednictwem białek powierzchniowych [33–35].

Za mechanizm chroniący HSC przed działaniem układu odpornościowego uważa się obniżoną ekspresję białek głównego układu zgodności tkankowej (HLA, *human leukocyte antigen*). Są to białka odpowiedzialne za prezentację antygenów limfocytom T [34]. Cząsteczki HLA klasy I (HLA-I) prezentują antygeny limfocytom cytotoksycznym, z kolei HLA klasy II (HLA-II) prezentują antygeny limfocytom pomocniczym. Drukker i wsp. [36] wykazali, że komórki nie zróżnicowane, w tym HSC, cechują się bardzo niską ekspresją HLA-I i w ogóle nie wykazują ekspresji HLA-II. W trakcie różnicowania HSC wzrasta zarówno ekspresja HLA-I, jak i HLA-II. Obniżona ekspresja białek HLA wydaje się mechanizmem chroniącym jedynie nie zróżnicowane komórki macierzyste.

W licznych doniesieniach wskazuje się na rolę ligandu dla Fas (FasL) w oporności HSC. Jest on transbłonowym białkiem sygnałowym, które ulega ekspresji między innymi na komórkach miejsc uprzywilejowanych immunologicznie. Połączenie FasL z receptorem Fas indukuje apoptozę limfocytów T oraz hamuje ich proliferację, co stanowi jeden z mechanizmów indukowania oraz utrzymania tolerancji immunologicznej. Pearl-Yafe i wsp. [37] wykazali, że bezpośrednio po allogenicznym przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HSCT, *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*) HSC pochodzące od dawcy wykazują podwyższoną ekspresję FasL, co sugeruje, że szlak ten odgrywa rolę w ochronie komórek dawcy w szpiku biorcy, obniżając ryzyko odrzucenia przeszczepu.

Za białka chroniące HSC przed atakiem układu odpornościowego uważa się także CD47 oraz CD274 [38]. Białko CD47 (*integrin-associated protein*) zapobiega niszczeniu przez makrofagi różnych komórek organizmu (m.in. erytrocytów). Białko to łączy się z receptorem SIRP- α na powierzchni makrofagów, inicjując kaskadę sygnałową hamującą proces fagocytozy [39]. Wykazano, że świeżo wyizolowane ze szpiku HSC charakteryzują się niską ekspresją białka CD47. Podczas działania sygnałów prozapalnych oraz wskutek mobilizacji HSC ekspresja CD47 na ich powierzchni gwałtownie

wzrasta. Wysoką ekspresję tego białka stwierdzono także na komórkach nowotworowych w różnych typach nowotworów krwi [39, 40].

Krwiotwórcze komórki macierzyste są chronione przed zniszczeniem przez limfocyty cytotoksyczne dzięki podwyższonej ekspresji białka CD274 (nazywanego także B7-H1 lub PD-L1) [38]. Białko to pełni rolę ligandu dla receptora PD-1 obecnego na powierzchni limfocytów T. Obecność białka CD274 na HSC prowadzi do hamowania proliferacji limfocytów T. Ekspresja CD274 może być indukowana między innymi stanem zapalnym. Niewykluczone, że zwiększona ekspresja białek CD47 i CD274 chroni komórki krwiotwórcze dawcy przed zniszczeniem po allo-HSCT [38].

Rola niszy w ochronie HSC

Jak już wspomniano, podstawowym zadaniem niszy HSC jest utrzymanie równowagi między proliferacją, stanem spoczynku oraz apoptozą tych komórek. W ostatnim czasie pojawiły się jednak doniesienia wskazujące, że mikrośrodowisko szpiku kostnego zapewnia również ochronę HSC przed zniszczeniem przez komórki odpornościowe własnego organizmu [41, 42]. Wykazano to w doświadczeniach przeprowadzonych na myszach, którym przeszczepiano allogeniczne HSC. Mimo braku immunosupresji allogeniczne HSC przeżywały (co nie oznacza, że wytwarzały komórki krwi) w szpiku kostnym przez co najmniej 30 dni. Allogeniczne HSC uniknęły zniszczenia przez limfocyty cytotoksyczne dzięki swoistej ochronie, zapewnianej im przez limfocyty T regulatorowe (Treg). Limfocyty te chroniły jednak tylko HSC, nie chroniły natomiast komórek już ukierunkowanych [42].

Podobne zjawisko — brak odrzucania przeszczepionych tkanek — opisano wcześniej, między innymi w odniesieniu do rogówek oka, mózgu czy jąder. Obserwuje się je także w czasie ciąży, podczas której antygeny płodu różniące się od antygenów matki nie są niszczone przez układ odpornościowy matki. Wymienione narządy określa się jako obszary „uprzywilejowane immunologicznie” (*immune privilege*) i świadczą one o ewolucyjnym przystosowaniu chroniącym istotne części organizmu przed szkodliwym działaniem stanu zapalnego oraz chorobami autoimmunologicznymi [43–45]. Początkowo przypuszczano, że w obszarach tych nie dochodzi do rozpoznania obcego antygeny, rozważano na przykład rolę bariery krew–mózg w przypadku tego narządu. Obecnie wiadomo, że komórki układu odpornościowego biorcy dostrzegają obce antygeny, jednak przebieg odpowiedzi immunologicznej jest nietypowy i nie prowadzi

do zniszczenia obcych komórek. Do obszarów uprzywilejowanych immunologicznie napływają limfocyty regulatorowe, które wyciszają działanie innych komórek układu immunologicznego. Oznacza to, że *immune privilege* jest zjawiskiem czynnym, wynikającym ze swoistych „negocjacji” prowadzonych przez różne komórki układu odpornościowego. Profil cytokin prozapalnych oraz immunosupresyjnych jest również w tych obszarach odmienny niż w innych tkankach organizmu. Zwraca się uwagę na rolę podwyższonego stężenia cytokin immunosupresyjnych, takich jak TGF- β i interleukina 10 (IL-10) oraz obniżonego stężenia czynników prozapalnych, interferonu γ (IFN- γ) oraz IL-2 [46, 47]. Fujisaki i wsp. [42] udowodnili rolę immunosupresyjnej IL-10 w ochronie HSC. Jak do tej pory jednak, szpik kostny jako środowisko immunosupresyjne jest bardzo słabo zbadany.

Mechanizmy oporności białaczkowych komórek macierzystych

W publikacjach dotyczących przebiegu chorób nowotworowych często pojawia się określenie „nowotworowe komórki macierzyste” (CSC, *cancer stem cells*). Jest to subpopulacja komórek nowotworowych wyróżniająca się między innymi zwiększoną opornością na zastosowaną chemio- lub radioterapię oraz zdolnością do nieskończonej liczby podziałów. W warunkach laboratoryjnych za CSC uznaje się komórki zdolne do wytwarzania kolonii *in vitro* oraz guzów nowotworowych *in vivo* po ich wszczepieniu myszom z obniżoną opornością [48].

Niektórzy autorzy zamiast terminu „nowotworowe komórki macierzyste” stosują określenie „komórki inicjujące guzy” (*tumor initiating cells*) lub „podobne do macierzystych” (*stem-like cells*) [49]. Widoczne jest tu odmienne podejście do źródeł choroby nowotworowej. Według pierwszej hipotezy choroba nowotworowa rozpoczyna się od prawidłowej komórki macierzystej, w której mimo licznych mechanizmów ochronnych pojawiły się mutacje powodujące niekontrolowaną proliferację. Według drugiej hipotezy zakłada się, że nowotwór powstaje z komórek zróżnicowanych, które wskutek mutacji nabierają cech charakteryzujących komórki macierzyste (ulegają odróżnicowaniu). Bez względu na to, czy są to patologicznie zmienione komórki macierzyste czy zróżnicowane, istnienie CSC ma ogromne znaczenie dla przebiegu leczenia. Wielu autorów uważa, że to właśnie one odpowiadają za nawrót choroby oraz pojawianie się przerzutów [48–52].

Istnienie białaczkowych komórek macierzystych (LSC, *leukemic stem cells*) udowodniono w latach 90. ubiegłego wieku. Wykazano wówczas, że podanie myszom z cukrzycą niepowodującą otyłości, z ostrym, złożonym upośledzeniem odporności (NOD/SCID, *non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency*) ludzkich komórek o fenotypie CD34+CD38– wywołuje u nich powstanie nowotworu. Podanie komórek o fenotypie CD34+CD38+ oraz CD34– nie prowadziło do odtworzenia choroby u zwierząt. Komórki CD34+CD38– uznano za LSC [53]. Komórki o cechach komórek macierzystych stwierdzono również w przypadku szpiczaka plazmocytozy [54] oraz chłoniaków [55, 56].

Zwraca uwagę podobieństwo markerów białaczkowych i prawidłowych komórek macierzystych (CD34+CD38–). Według wielu autorów jest to silna przesłanka sugerująca, że LSC wywodzą się z prawidłowych HSC, w których doszło do zaburzeń mechanizmów kontrolnych odpowiadających za stan uśpienia komórek, przeżycie oraz samoodnowę. Zaburzenia, takie jak mutacje lub zmiany epigenetyczne, mogą powstać w komórce lub jej otoczeniu. Dokładny mechanizm tych zaburzeń jest jednak do tej pory nieznany [57–59].

Proces nowotworzenia jest spowodowany pojawieniem się mutacji w materiale genetycznym. Proces ten często jest porównywany z ewolucją — mutacje powstają w sposób losowy w różnych genach, a większość z nich jest niekorzystna dla komórek. Jednak każda mutacja, która zwiększa oporność komórek nowotworowych, a tym samym ich szanse na przeżycie, zostaje utrwalona w potomnych komórkach. Proces ten prowadzi do wyłonienia najbardziej opornych, a zatem najtrudniejszych do zniszczenia w czasie terapii, klonów komórkowych [59, 60].

Uważa się, że LSC są bardziej odporne na chemioterapeutyki niż zróżnicowane komórki białaczkowe. Jako przyczynę ich oporności wymienia się między innymi: zwiększoną ekspresję białek z rodziny ABC, białek antyapoptotycznych, aktywację niektórych ścieżek sygnałowych, stan uśpienia komórek, sygnały otrzymywane z mikrośrodowiska [58]. Podstawowe mechanizmy warunkujące oporność białaczkowych komórek macierzystych na działanie chemioterapeutyków zestawiono w tabeli 1. Warto zwrócić uwagę na fakt, że niektóre z tych mechanizmów są znacznie lepiej zbadane w przypadku komórek nowotworowych niż prawidłowych. Nie jest to jednoznaczne z faktem, że mechanizmy te nie są aktywne w prawidłowych HSC. Hodowla komórek nowotworowych jest zdecydowanie łatwiejsza niż komórek prawidłowych ze względu na

Tabela 1. Przykładowe mechanizmy warunkujące oporność białaczkowych komórek macierzystych

Table 1. Exemplary resistance mechanisms of leukemic stem cells

Stan spoczynku
Zmiana ekspresji białek:
• podwyższona ekspresja białek ABC
• obniżona ekspresja białka P53
• podwyższone stężenie białek antyapoptotycznych
Zaburzenia genetyczne:
• chromosom <i>Philadelphia</i>
• spontaniczne mutacje
Mechanizmy immunosupresyjne:
• podwyższona ekspresja białek CD47 i CD274
• ochronne działanie niszy
Aktywacja wybranych szlaków sygnałowych:
• szlak Wnt
• szlak <i>Hedgehog</i>

ich większy potencjał proliferacyjny; z tego powodu więcej badań jest prowadzonych na komórkach nowotworowych niż prawidłowych.

Niektóre mechanizmy molekularne wywołujące oporność LSC zostały już omówione w rozdziale dotyczącym oporności prawidłowych HSC. Podobnie jak HSC, część LSC znajduje się w osteoblastycznej części niszy i pozostaje w stanie spoczynku, co nadaje im oporność na większość chemioterapeutyków [18]. W komórkach białaczkowych stwierdzono nadekspresję białek z rodziny ABC. Związana z tym oporność wielolekowa charakteryzuje nie tylko LSC, ale także zróżnicowane komórki białaczkowe [27, 58]. W przypadku komórek białaczkowych zmianie ulega także poziom ekspresji białek antyapoptotycznych oraz genu supresorowego *TP53*. Dowiedziono, że ekspresja *TP53* w większości komórek białaczkowych jest kilkakrotnie niższa niż w prawidłowych komórkach organizmu [28]. U części pacjentów z nowotworami hematologicznymi stwierdza się nawet całkowitą inaktywację genu *TP53* (chromosom 17p13.1) w wyniku jego mutacji bądź delecji. Z kolei ekspresja białek antyapoptotycznych ulega w tych komórkach znaczącemu zwiększeniu. Obie te cechy warunkują oporność komórek białaczkowych na apoptozę, co z kolei prowadzi do oporności na leczenie [61].

W komórkach białaczkowych aktywne są ścieżki sygnałowe, prowadzące z jednej strony do przyspieszenia proliferacji, a z drugiej do zwiększenia

oporności na apoptozę. Przykładem takich ścieżek są Wnt oraz *Hedgehog*. W warunkach fizjologicznych ścieżki te odgrywają rolę w rozwoju embrionalnym oraz regulują proliferację komórek w dorosłych organizmach. Nadmierną aktywność tych ścieżek wykazano w różnych typach nowotworów, między innymi w białaczkach [58].

Zaburzeniem genetycznym specyficznym dla przewlekłej białaczki szpikowej jest występowanie chromosomu Filadelfia (Ph, *Philadelphia*). Jest to hybryda, która powstaje wskutek translokacji fragmentów dwóch prawidłowych chromosomów 9 i 22. W efekcie dochodzi do połączenia się dwóch genów — *BCR* i *ABL1* oraz powstania jednego zmutowanego genu — *BCR-ABL1*. Produktem tego genu jest białko o aktywności kinazy tyrozynowej, które powoduje przyspieszoną proliferację komórek białaczkowych oraz zwiększa ich oporność na apoptozę [62].

Jak już wspomniano, szpik kostny stanowi obszar uprzywilejowany immunologicznie. Najprawdopodobniej te same czynniki, które chronią prawidłowe komórki macierzyste, wpływają na przeżycie LSC, do tej pory nie ma jednak żadnych danych doświadczalnych w tym zakresie. Wiadomo natomiast, że mikrośrodowisko wpływa na LSC w odmienny sposób poprzez mechanizmy związane z adhezją komórkową. Zwiększona adhezja LSC powoduje zwiększenie oporności na chemioterapię [57].

Podwyższoną ekspresję omówionych wcześniej białek CD47 i CD274 stwierdzono na wielu komórkach białaczkowych. Podobnie jak w przypadku HSC, ekspresja CD47 na powierzchni komórek nowotworowych chroni je przed zniszczeniem na drodze fagocytozy, a CD274 hamuje działanie limfocytów cytotoksycznych. Białka te są więc prawdopodobnie częścią mechanizmów immunosupresyjnych, umożliwiając „ucieczkę” komórek białaczkowych lub LSC spod nadzoru immunologicznego. Jaiswal i wsp. [39] wykazali, że ekspresja białka CD47 na powierzchni LSC jest wyższa niż na prawidłowych komórkach krwiotwórczych. Zwiększoną ekspresję CD47 na blastach nowotworowych stwierdzono także w różnych typach białaczki szpikowej. Z kolei nadekspresję białka CD274 opisano dotychczas w przypadku niektórych chłoniaków oraz białacek wywodzących się z limfocytów T [63]. Białko to rzadziej stwierdza się na komórkach białacek wywodzących się z limfocytów B, jednak przyczyna tego stanu rzeczy pozostaje nieznana. Uważa się, że zablokowanie aktywności białek immunosupresyjnych na komórkach białaczkowych mogłoby być dobrą strategią terapeutyczną. Metoda

ta powinna aktywować niszczenie komórek nowotworowych przez układ odpornościowy, co z kolei spowolniłoby rozwój choroby [39].

Podsumowanie

Wiedza o mechanizmach oporności HSC ma znaczenie nie tylko czysto poznawcze, ale jest również istotna dla zrozumienia mechanizmów powstawania niektórych chorób, a także procesów związanych z odrzucaniem HSC po ich allogenicznym przeszczepieniu. Z jednej strony zaburzenia w funkcjonowaniu mechanizmów oporności mogą prowadzić do akumulacji w komórkach macierzystych mutacji i rozwoju chorób nowotworowych. Z drugiej strony obniżenie sprawności mechanizmów oporności HSC może skutkować ich zniszczeniem przez układ odpornościowy lub przedwczesną apoptozę. Zaburzenia w mechanizmach regulujących cykl komórkowy HSC mogą doprowadzić do utraty ich zdolności do samoodnowy, a co za tym idzie — do wyczerpania puli zdolnych do różnicowania HSC. Wykazano ponadto, że w indukowaniu oraz rozwoju niektórych nowotworów układu krwiotwórczego biorą udział nie tylko same komórki krwiotwórcze, ale także ich mikrośrodowisko.

Wiedza o biologii HSC jest konieczna do właściwego planowania nowych terapii. Istnienie CSC wyjaśnia wiele niepowodzeń terapeutycznych, mimo zniszczenia w trakcie chemioterapii szybko dzielących się komórek białaczkowych. Białaczkowe komórki macierzyste przeżywają i są przyczyną nawrotu choroby po uzyskanej remisji. Podejmowane są próby terapii ukierunkowanej, na przykład uaktywniania mechanizmów proliferacji uspionych LSC. Jednak LSC w dużej mierze podlegają regulacji tymi samymi szlakami molekularnymi, co prawidłowe HSC — jest to przyczyną trudności w zastosowaniu terapii celowanej skierowanej bezpośrednio na LSC. Konieczne są dalsze badania zmierzające do identyfikacji mechanizmów oporności LSC.

Piśmiennictwo

1. Gonzalez M.A., Bernad A. Characteristics of adult stem cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 741: 103–120.
2. Fuchs E., Tumber T., Guach G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004; 116: 769–778.
3. Molofsky A.V., Pardal R., Morrison S.J. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004; 16: 700–707.
4. Seita J., Weissman I.L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2010; 6: 640–653.

5. Baldrige M.T., King K.Y., Goodell M.A. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol.* 2011; 32: 57–65.
6. Can A. Haematopoietic stem cells niches: interrelations between structure and function. *Transfus. Apher. Sci.* 2008; 38: 261–268.
7. Forsberg E.C., Smith-Berdan S. Parsing the niche code: the molecular mechanisms governing hematopoietic stem cell adhesion and differentiation. *Haematologica* 2009; 94: 1477–1481.
8. Wright D.E., Wagers A.J., Gulati A.P., Johnson F.L., Weissman I.L. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 2001; 294: 1933–1936.
9. Nakamura-Ishizu A., Suda T. Hematopoietic stem cell niche: an interplay among a repertoire of multiple functional niches cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2013; 2: 2404–2409.
10. Purton L.E., Scadden D.T. The hematopoietic stem cell niche. W: Melton D. (red.). *StemBook*. Harvard Stem Cell Institute, Cambridge 2008.
11. Porter R.L., Calvi L.M. Communications between bone cells and hematopoietic stem. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008; 473: 193–200.
12. Lo Celso C., Scadden D.T. The haematopoietic stem cell niche at a glance. *J. Cell Sci.* 2011; 124: 3529–3535.
13. Woodward J. Regulation of haematopoietic progenitor cell proliferation and survival. The involvement of the osteoblast. *Cell Adh. Migr.* 2010; 4: 4–6.
14. Kopeć-Szłęczak J. Krwiotwórcza komórka macierzysta w niszy szpikowej. *J. Transf. Med.* 2011; 3: 129–135.
15. Krause D.S., Scadden D.T., Preffer F.I. The hematopoietic stem cell niche — home for friend and foe? *Cytometry B Clin. Cytom.* 2013; 1: 7–20.
16. Arai F., Hirao A., Ohmura M. i wsp. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004; 118: 149–161.
17. Van der Wath R.C., Wilson A., Laurenti E., Trumpp A., Liò P. Estimating dormant and active hematopoietic stem cell kinetics through extensive modeling of bromodeoxyuridine label-retaining cell dynamics. *PLoS One* 2009; 4: 1–12.
18. Sottocornola R., Lo Celso C. Dormancy in the stem cell niche. *Stem Cell Res. Ther.* 2012; 19: 1–6.
19. Li L., Bhatia R. Stem cell quiescence. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17: 4936–4941.
20. Preston S.L., Alison M.R., Forbes S.J. i wsp. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol. Pathol.* 2003; 56: 86–96.
21. Kubota Y., Kimura S. Regulation of hematopoietic stem cell fate: self-renewal, quiescence and survival. W: Pelayo R. (red.). *Advances in hematopoietic stem cell research*. InTech 2012: 39–60.
22. Weissman I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157–168.
23. Huls M., Russel F.G., Masereeuw R. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009; 328: 3–9.
24. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* 2009; 14: 3–9.
25. Challen G.A., Little M.H. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 2006; 24: 3–12.
26. Tang L., Bergevoet S.M., Gilissen C. i wsp. Hematopoietic stem cells exhibit a specific ABC transporter gene expression profile clearly distinct from other stem cells. *BMC Pharmacol.* 2010; 10: 12.
27. de Jonge-Peters S.D., Kuipers F., de Vries E.G., Vellenga E. ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2007; 62: 214–226.
28. Liu Y., Elf S.E., Miyata Y. i wsp. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 37–48.
29. Asai T., Liu Y., Bae N., Nimer S.D. The p53 tumor suppressor protein regulates hematopoietic stem cell fate. *J. Cell. Physiol.* 2011; 226: 2215–2221.
30. Frosina G. The bright and the dark sides of DNA repair in stem cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 2010: 845396.
31. Niedernhofer L.I. DNA repair is crucial for maintaining hematopoietic stem cell function. *DNA Repair (Amst.)* 2008; 7: 523–529.
32. Wang J., Sun Q., Morita Y. i wsp. A differentiation checkpoint limits hematopoietic stem cell self-renewal in response to DNA damage. *Cell* 2012; 148: 1001–1014.
33. Zheng J., Song C., Zhang C.C. A new chapter: hematopoietic stem cells are direct players in immunity. *Cell Biosci.* 2011; 1: 33.
34. Zhao E., Xu H., Wang L. i wsp. Bone marrow and the control of immunity *Cell Mol. Immunol.* 2012; 9: 11–19.
35. Jaiswal S., Weissman I.L. Hematopoietic stem and progenitor cells and the inflammatory response. *Ann. NY Acad. Sci.* 2009; 1174: 118–121.
36. Drukker M. Immunological considerations for cell therapy using human embryonic stem cell derivatives. W: Melton D. (red.). *StemBook*. Harvard Stem Cell Institute, Cambridge 2008.
37. Pearl-Yafe M., Yolcu E.S., Stein J. i wsp. Fas ligand enhances hematopoietic cell engraftment through abrogation of alloimmune responses and nonimmunogenic interactions. *Stem Cells* 2007; 25: 1448–1455.
38. Zhang C.C. Hematopoietic stem cells: interplay with immunity. *Am. J. Blood Res.* 2012; 2: 219–227.
39. Jaiswal S., Jamieson C.H., Pang W.W. i wsp. CD47 is up-regulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis *Cell* 2009; 138: 271–285.
40. Majeti R., Chao M.P., Alizadeh A.A. i wsp. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 2009; 138: 286–299.
41. Atanackovic D., Cao Y., Luetkens T. i wsp. CD4+CD25+FOXP3+ T regulatory cells reconstitute and accumulate in the bone marrow of patients with multiple myeloma following allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2008; 93: 423–430.
42. Fujisaki J., Wu J., Carlson A.L. i wsp. In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature* 2011; 474: 216–219.
43. Niederkorn J.Y. High risk corneal allografts and why they lose their immune privilege. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 10: 493–497.
44. Cobbold S.P., Adams E., Graca L. i wsp. Immune privilege induced by regulatory T cells in transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 2006; 213: 239–255.
45. Galea I., Bechmann I., Perry V.H. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* 2007; 28: 12–18.
46. Niederkorn J.Y. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat. Immunol.* 2006; 7: 354–359.
47. Reya T. Illuminating immune privilege — a role for regulatory T cells in preventing rejection. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365: 956–957.
48. Rebutti M., Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 2013; 85: 1219–1226.
49. Neuzil J., Stantic M., Zobalova R. i wsp. Tumour-initiating cells vs. cancer “stem” cells and CD133: what’s in the name? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 355: 855–859.

50. Efferth T. Stem cells, cancer stem-like cells, and natural products. *Planta Med.* 2012; 78: 935–942.
51. Soltysowa A., Altanerova V., Altaner C. Cancer stem cells. *Neoplasma* 2005; 52: 435–440.
52. Jordan C.T., Guzman M.L., Noble M. Mechanisms of disease cancer stem cells. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 1253–1261.
53. Bhatia M., Wang J.C., Kapp U., Bonnet D., Dick J.E. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 5320–5325.
54. Brennan S.K., Matsui W. Cancer stem cells: controversies in multiple myeloma. *J. Mol. Med. (Berl.)* 2009; 87: 1079–1085.
55. Martinez-Climent J.A., Fontan L., Gascoyne R.D., Siebert R., Prosper F. Lymphoma stem cells: enough evidence to support their existence? *Haematologica* 2010; 95: 293–302.
56. Kim S.J. Lymphoma stem cells: a step toward a new therapeutic target. *Korean J. Hematol.* 2011; 46: 211–213.
57. Wong R.S., Cheong S.K. Leukemic stem cells: drug resistance, metastasis and therapeutic implications. *Malays. J. Pathol.* 2012; 34: 77–88.
58. Shaffer B.C., Gillet J.P., Patel C. i wsp. Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resist. Updat.* 2012; 15: 62–69.
59. Crews L.A., Jamieson C.H. Chronic myeloid leukemia stem cell biology. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2012; 7: 125–132.
60. Greaves M., Maley C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481: 306–313.
61. Malinowska I. Rola apoptozy w patogenezie i leczeniu nowotworów układu hematopoetycznego. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2004; 58: 548–559.
62. Kurzrock R., Kantarjian H.M., Druker B.J., Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann. Intern. Med.* 2003; 138: 819–830.
63. Andorsky D.J., Yamada R.E., Said J. i wsp. Programmed death ligand 1 is expressed by non-Hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17: 4232–4244.