

VLOGA MATIČNIH CELIC PRI NASTANKU RAKA MLEČNE ŽLEZE

Rok KEBER¹

Delo je prispelo 18. julija 2009, sprejeto 20. aprila 2010
Received July 18, 2009; accepted April 20, 2010

Vloga matičnih celic pri nastanku raka mlečne žleze

Rak mlečne žleze je najpogostejša oblika raka pri ženskah, zelo pogost pa je tudi pri nekaterih vrstah domačih živali (psi, mačke). Vse najnovejše raziskave s področja biologije mlečne žleze podpirajo hipotezo rakave matične celice, po kateri naj bi tumor izviral iz matične celice mlečne žleze ali njenih zgodnjih potomk. Tumorji nastanejo zaradi napake v uravnavanju sicer natančno kontroliranega procesa samoobnavljanja matičnih celic, kar je njihova temeljna lastnost. Tak tumor vsebuje subpopulacijo celic z lastnostmi matičnih celic, ki omogočajo razvoj in diferenciacijo tumorja ter prispevajo k celični heterogenosti. Vlogo rakavih matičnih celic v rakavem tkivu lahko primerjamo z vlogo normalnih matičnih celic v zdravem tkivu. Njihov obstoj je bil sprva dokazan pri krvnem raku, kasneje pa še pri malignih spremembah kompaktnih tkiv: možgan, prostate, debelega črevesa, trebušne slinavke in mlečne žleze. Identifikacija matičnih celic v zdravem in tumorskem tkivu mlečne žleze je razkrila vzroke za molekularno kompleksnost raka mlečne žleze pri ljudeh in živalih. Hipoteza rakave matične celice ima pomembno vlogo pri zgodnjem odkrivanju in zdravljenju dedne in sporadične oblike raka dojke pri ženskah. Matične celice z okvarjenim mehanizmom samoobnavljanja so odporne na obsevanje in kemoterapijo in zato predstavljajo osrednjo tarčo pri razvoju novih zdravil in strategij za zdravljenje raka dojke.

Ključne besede: mlečna žleza / matične celice / rak / medicina

The role of breast cancer stem cells in development of breast cancer

Breast cancer is the most common type of cancer in women worldwide but also very common in domestic cats and dogs. Recent research in mammary gland biology has provided support for the cancer stem cell-hypothesis. The main focus of this hypothesis is that tumor originates from mammary stem or progenitor cells as a result of deregulation of the normally precise regulated process of self-renewal, which is their main characteristics. As a result, tumors contain and are driven by a cellular subcomponent that retains key stem-cell properties and enable development and differentiation of the tumor tissue, which results in extensive cellular heterogeneity. The role of cancer stem cells in cancer tissues resembles the role of normal stem cells in healthy tissue. Cancer stem cells have been first discovered in hematopoietic and later in solid cancers like brain, prostate, colon, pancreas and breast cancer. Identification of these cells in healthy and tumor breast tissue has helped to elucidate the origin of molecular complexity of breast cancer in humans and animals. The cancer stem-cell hypothesis has important implications for early detection and prevention of hereditary and sporadic form of breast cancer in humans. Aberrant stem cells with deregulated self-renewal mechanism are highly resistant to radiation and chemotherapy and therefore represent a central target in development of more effective drugs and therapies for breast cancer treatment.

Key words: mammary gland / stem cells / cancer / medicine

1 MLEČNA ŽLEZA

Mlečna žleza v življenju samic sesalcev prehaja preko več razvojnih stopenj in sprememb, ki jih uravnavajo številni geni in hormoni. Ob rojstvu je sestavljena iz

manjšega števila mlečnih vodov, ki ležijo v maščobnem vezivnem tkivu in se končajo s terminalnimi brsti. Ti sestojijo iz celic z veliko proliferacijsko aktivnostjo. Nekatere od teh celic imajo lastnosti matičnih celic. Do pubertete mlečna žleza raste sorazmerno z ostalim telesom,

¹ Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, e-pošta: rok.keber@bf.uni-lj.si

z začetkom estričnih ciklov pa sistem mlečnih vodov pod vplivom hormonov postane bolj kompleksen. Višek kompleksnosti pomeni laktacija, ki jo žleza doseže takoj po rojstvu potomcev. Razvoj mlečne žleze poteka pod vplivom hormonov. Estrogen povzroči podaljševanje mlečnih vodov, progesteron pa dodatno razvejanje. Terminalni brsti se pretvorijo v alveolarne tvorbe, ki se pod vplivom prolaktina močno razvijejo in izločajo mleko. Razporeditev alveol na mlečnih kanalčkih je med vrstami različna in igra pomembno vlogo pri izoblikovanju končne strukture mlečne žleze. Histološko je zrela žleza sestavljena iz bazalnega in luminalnega sloja celic. Spodnji-bazalni sloj tvorijo na bazalni membrani ležeče mioepitelne celice, ki se pod vplivom hormona oksitocina krčijo in so odgovorne za praznjenje mlečne žleze. Na njih leži luminalni epitelni sloj celic, ki v času laktacije proizvaja mleko. Ko je laktacija končana, sledi involucija, v kateri se z apoptozo in fagocitozo odstranijo odvečne epitelne strukture. Stopnja diferenciranosti mlečne žleze je po nosečnosti večja kot pred njo. Zaradi cikličnega značaja in visoke stopnje proliferacije celic, je mlečna žleza bolj podvržena morebitnim kancerogenim spremembam kot končno diferencirane strukture.

2 MATIČNE CELICE V MLEČNI ŽLEZI

Obstoj matičnih celic je bil dokazan v številnih organih in tkivih. Tudi za ciklični razvoj in obnavljanje funkcionalne mlečne žleze po vsaki gravidnosti je nujna prisotnost multipotentnih matičnih celic. Njihov obstoj je že leta 1959 prvi dokazal DeOme s sodelavci. Ugotovil je, da majhni delci tkiva ali terminalni brsti mlečne žleze miši po presaditvi v izpraznjeno prsno maščobno blazinico druge miši, lahko tvorijo novo funkcionalno mlečno žlezo. Študije z metodo inaktivacije X-kromosoma so potrdile obstoj celic, ki lahko tvorijo mioepitelne, kot tudi epitelne celice mlečne žleze pri človeku. Smith s sodelavci je matične celice v mlečni žlezi morfološko identificiral kot nediferencirane, manjše svetle celice, ki ležijo v bazalnem sloju celic (Ponti in sod., 2006). Sledili so poskusi izolacije in gojenja matičnih celic. Welm in sodelavci (2002) so ugotovili, da določene celice mlečne žleze, ki so preko posebnih ABC transporterjev sposobne izločati fluorescentno barvilo Hoechst 33342, lahko po presaditvi v očiščeno prsno maščobno blazinico regenerirajo celotno žlezo. To populacijo celic so imenovali »*stranska populacija*«. (po vzoru SP celic v kostnem mozgu). Sposobnost regeneracije mlečne žleze po presaditvi v NOD/SCID miš je še vedno osnova vseh tehnik izolacije matičnih celic, s katero se učinkovito preveri njihov multipotentni potencial. Alternativna *in vitro* metoda je tridimenzionalni gel, sestavljen iz ustreznih komponent ekstracelularnega

matriksa, obogaten z lamininom in kolagenom. Na takih gelih, ki skušajo posnemati naravne pogoje v žlezi, lahko opazujemo sposobnost diferenciacije domnevnih matičnih celic v različne potomke in tvorbo zametkov terminalnih brstov (LaBarge, 2007). Za izolacijo matičnih celic iz tkiva mlečne žleze se danes uporablja pretežno citometrijo in fluorescentne označevalce (ang.: »FACS - fluorescent activated cell sorting«). Ta metoda temelji na specifičnih površinskih označevalcih, ki jih prepoznajo fluorescentno označena protitelesa in tako omogočijo ločevanje željene populacije celic od drugih celic in na poskusih serijskih presaditev, s katerimi testiramo njihovo multipotentnost. Kombinacija označevalcev, s katerimi so prišli do populacije z ustreznimi lastnostmi je Lin⁻CD29^{hi}CD24⁺ ali Lin⁻CD49^{hi}CD24⁺, kjer Lin⁻ zajema več označevalcev, ki so značilni za epitelne in krvne celice, ki v tej populaciji niso zaželeni. Za nekatere celice v Lin⁻CD29^{hi}CD24⁺ ali Lin⁻CD49^{hi}CD24⁺ populaciji so v poskusu večkratnih presaditev dokazali lastnosti matičnih celic (Stingl in sod. 2006). Pomemben cilj raziskav je najti označevalec, značilen samo za matične celice. Za gojenje nediferenciranih matičnih celic in prekursorjskih celic v *in vitro* pogojih danes uporabljamo kulturo »*mamifer*«, ki so v gojišču prosto plavajoči kroglasti skupki celic (Vaillant in sod., 2007).

Matične celice mlečne žleze se nahajajo v bazalnem sloju celic. V zgodnjem razvoju so skoncentrirane predvsem v terminalnih brstih, pri zreli žlezi pa so enakomerno razporejene v steni terminanih kanalčkov. Celična zgradba mlečne žleze je predvsem v času intenzivne delitve celic med gravidnostjo zelo heterogena. Razvojna hierarhija teh celic - od matične celice, preko bipotentnih predniških celic in linijsko determiniranih prednic do končno diferenciranih celic - postaja jasna vzporedno z značilnimi markerji, ki so potrebni za njihovo identifikacijo. Med takimi markerji prevladujejo celično specifični keratini. Določitev hierarhičnosti je zanimiva z vidika izvora rakave celice in se zgleduje po celicah krvnega sistema, pri katerih je znano, da se začetna mutacija zgodi v matični celici, nadaljne pa v njenih multipotentnih potomkah. Zelo pomemben dejavnik, ki vpliva na matične celice je tudi njihova niša. To je mikrookolje, ki določa in uravnava njihov razvoj (LaBarge, 2007, Huang in sod., 2006 in Stingl&Caldas, 2007).

3 RAK MLEČNE ŽLEZE

Rak mlečne žleze prizadane kar 10-odstotkov žensk, predvsem iz starejše populacije. Pojavnost te oblike raka med živalskimi vrstami močno variira. Posebno pogost je pri domačih psih in mačkah, medtem ko ga pri parkljarjih in kopitarjih skoraj ni. To je kompleksna bolezen,

pri kateri sodelujejo genetski in okoljski dejavniki. Med 10 in 25-odstotki raka pri ženskah je dedno pogojenega, drugi primeri so sporadični. Poleg etnične pripadnosti je najbolj očitni faktor, ki vpliva na tveganje za razvoj raka mlečne žleze, nosečnost. Tveganje se pri ženskah, ki niso imele nobenega otroka, v primerjavi s tistimi, ki so imele prvega pred dvajsetim letom starosti zviša kar za polovico. Vsi ostali dejavniki, ki povečajo ali zmanjšajo tveganje za nastanek raka (izspostavljenost mutagenom, radiacija, prehrana, itd.) imajo največji učinek v času pubertete (Szpirer in Szpirer 2007).

Histološko je rak izjemno heterogen, najbolj invazivna oblika pri ljudeh metastazira v kosti, jetra, pljuča in mehko tkivo. Celične in biokemijske karakteristike, ki so pri raku mlečne žleze pomembne in so močno povezane s prognozo, so prisotnost receptorjev za estrogen in progesteron ($ER^{+/-}$, $PR^{+/-}$), bazalni ali luminalni fenotip, ter profil izražanja genov. Najslabša prognoza je pri raku z bazalnim fenotipom, ki nima receptorjev za steroidne hormone. Antiestrogenska terapija pri tej vrsti raka ni učinkovita. To je manj pogosta oblika raka, ki se pojavi pri 15 do 21-odstotkih žensk (Kumar in sod. 2007 in Stingl in Caldas, 2007).

Glavna in edina očitna skupna značilnost raka mlečne žleze pri ljudeh in pri različnih živalskih vrstah je njegova heterogenost. Prav ta heterogenost je številne znanstvenike, ki iščejo vzrok za nastanek raka mlečne žleze, pripeljala do hipoteze rakave matične celice. Dokazi v prid tej hipotezi se v zadnjem času intenzivno kopičijo. Ena izmed značilnosti raka mlečne žleze je tudi njegova ponovljivost. Rak se v visokem odstotku več let po končanem zdravljenju s kemoterapijo ponovno razvije. Nekateri od rakavih celic, ki so bolj odporne proti sevanju in kemoterapevtikom, preživijo in se kasneje ponovno razmnožijo (Dontu in sod., 2005). Eden izmed načinov klasifikacije raka je tudi profil izražanja genov z mikromrežami. Na ta način so identificirali 5 tipov raka pri ženskah, ki se značilno razlikujejo tudi po prognozi. Mikromreže zato postajajo splošna praksa pri diagnostiki raka na dojki.

4 RAKAVA MATIČNA CELICA

Po vsesplošno sprejetem stohastičnem konceptu raka kompaktnega tkiva velja, da so rakave celice heterogene, večina teh celic se lahko deli in tvori rakavo tkivo. Po teoriji rakave matične celice pa so obsežne proliferacije in tvorbe novega rakavega tkiva sposobne le določene celice - rakave matične celice, ki imajo vse lastnosti normalnih matičnih celic, razen sposobnosti natančnega uravnavanja celičnih delitev. Zanesljiv dokaz v prid tej teoriji je dejstvo, da je le majhna količina celic iz tumorja

sposobnih tvoriti nove tumorje po presaditvi v NOD/SCID miši. Glavno vprašanje pri nastanku raka mlečne žleze je, kdaj in kje pride do usodne mutacije, oziroma katere celice so primarne tarče maligne transformacije. Teorija rakave matične celice trdi, da do začetne usodne mutacije pride pri matični celici ali njihovih zgodnjih potomkah. Argumenti v prid tej teoriji so številni; 1) matične celice so dolgožive in so v tkivu dovolj dolgo, da akumulirajo mutacije, ki lahko vodijo do malignih sprememb, 2) normalne in tumorske celice imajo mnogo skupnih fenotipskih lastnosti, kot so nediferencirano stanje, zmožnost samoobnavljanja (asimetrična delitev), večja aktivnost zaščitnih mehanizmov (transporterji za izčrpanje škodljivih snovi) ter zmožnost migracije, 3) dejavniki, ki povečajo ali zmanjšajo tveganje najmočnejše delujejo v času pubertete, ko so matične celice najbolj aktivne, 4) pri rakavih celicah so zelo pogosto našli okvare v genih signalnih poti, ki uravnavajo asimetrično delitev in nediferencirano stanje. Prav te signalne poti so odgovorne za pravilno delovanje matičnih celic in homeostazo tkiva, njihova vloga bo opisana v nadaljevanju (Ponti in sod., 2006).

Rakave matične celice imajo vse značilnosti normalnih matičnih celic, le da so te značilnosti pri rakavi celici posledica mutacij in so zato škodljive. Neposredna povezava med normalno in rakavo matično celico še ne obstaja, saj je slednja lahko posledica mutacije same matične celice, njenih multipotentnih potomk, ali celo diferenciranih celic, ki z mutacijo pridobijo lastnosti rakavih matičnih celic. Nekateri raziskovalci zagovarjajo možnost, da so primarne tarče transformacije prehodno deleče se multipotentne potomke matičnih celic, tako imenovane prednice. To je namreč populacija celic, ki se najbolj intenzivno deli, medtem ko so matične celice manj dinamične. Možno je tudi, da matične celice nosijo genetske napake, ki se fenotipsko izrazijo le pri celicah potomkah, ki se nato obnašajo kot rakave matične celice. Ker ima rakava matična celica nekatere markerje, ki so značilni za bazalne celice mlečne žleze, od koder izhajajo normalne matične celice, je kljub temu najverjetneje, da do maligne mutacije pride v matični celici ali eni od prednic. Ta nabor možnosti se lepo ujema s heterogenostjo rakavih sprememb v mlečni žlezi (Ponti in sod., 2006; Stingl in sod., 2006).

Prvi je rakavo matično celico skušal izolirati All-Hajj s sodelavci (2003), ki je z uporabo površinskih markerjev $EpCam^{+}CD44^{+}CD24^{-/nizko}$ izoliral populacijo celic, ki je po presaditvi v NOD/SCID miš tvorila rakave tvorbe. Le nekaj sto teh celic je bilo potrebnih za nastanek rakavih tvorb, medtem ko vse druge celice niti v velikih količinah niso tvorile tumorjev. Tumorje je tvorilo manj kot 1-odstotek celic v populaciji $EpCam^{+}CD44^{+}CD24^{-/nizko}$, kar pomeni, da matične rakave celice tvorijo

le izjemno majhen odstotek celotne mase rakavega tkiva. Brez markerja, ki bi bil značilen le za rakavo matično celico, je natančno količino teh v tkivu težko določiti, saj je možen vzrok za tako majhno ugotovljeno količino tudi neuspešna rast človeških celic po presaditvi v miš (Kelly in sod., 2007).

5 VLOGA NIŠE PRI NASTANKU RAKA

Pri raziskavah je zelo pomembno upoštevati dejstvo, da so v tkivu vse lastnosti matičnih celic in njihovih potomk močno odvisne od dejavnikov mikrookolja, ki tvorijo njihovo nišo. Celice, ki tvorijo nišo, imajo ključno vlogo pri pozicioniranju, proliferaciji in diferenciaciji matičnih celic, interakcije med različnimi celičnimi tipi pa so odločilne za pravilno homeostazo in funkcionalnost tkiv. Nekateri raziskovalci poudarjajo nišo matične celice kot najpomembnejši dejavnik pri nastanku raka mlečne žleze (Briskin&Duss 2007, in LaBarge, 2007). Dokazano je bilo, da potencialno tumorigene celice z resnimi genetskimi poškodbami lahko dolgo časa obstajajo v ugodnem mikrookolju, ko pa se to spremeni, se izrazi njihov tumorigeni potencial. Lep primer za to je študija pri ženskah, ki so bile v mladosti izpostavljene škodljivemu sevanju, v starosti pa so zbolele za rakom na dojki veliko pogosteje kot kontrolna skupina. Dokazano je bilo, da so nastanek raka sprožile spremembe v stromalnih celicah, ki tvorijo nišo. Vzrok za raka je lahko tudi lokalna sprememba v homeostazi tkiva zaradi kroničnega vnetja (Maffini in sod., 2004). Zelo prepričljiv dokaz za pomembnost niše v mlečni žlezi je bil poskus, v katerem so genetsko označene celice semenskih veziklov samčka miši skupaj z epiteljskimi celicami mlečne žleze presadili na očiščeno prsno maščobno blazinico. Celice semenskih veziklov so se v ustreznem mikrookolju reprogramirale in prispevale k vsem strukturam mlečne žleze (Boulangier in sod., 2007). Ko je celica vzeta iz konteksta svoje naravne niše, utegne spremeniti nekatere fenotipske značilnosti, vključno z izražanjem površinskih proteinov, kar lahko pogosto vodi v napačno interpretacijo rezultatov.

pomembno je dejstvo, da matične celice nimajo receptorjev za steroidne hormone, prav ti pa regulirajo razvoj mlečne žleze. Edina možna razlaga tega fenomena je kompleksna interakcija matičnih celic z okoljskimi stromalnimi celicami v niši. Slednje zaznavajo hormonalne signale, ki jih s pomočjo topnih faktorjev na parakrini način posredujejo matičnim celicam. Za številne od teh faktorjev (npr: Wnt, Notch, TGF- β ...) je bila vloga pri nastanku raka mlečne žleze že dokazana.

6 ZAŠČITNA VLOGA NOSEČNOSTI

Že dolgo je znano povečano tveganje za nastanek raka pri ženskah, ki niso imele otrok, oziroma tistih, ki so imele prvega otroka po tridesetem letu starosti. Nosečnost torej močno zniža verjetnost za razvoj raka na dojki. Po nekaterih podatkih je ta po vsakem rojstvu za 11% manjša. Enako je pri miših, kjer opazimo zaščitni učinek tudi, če je brejost vmes prekinjena. Daljša je brejost, večji je njen zaščitni vpliv. Zaščitni učinek nosečnosti je povezan zgolj s primeri raka, ki imajo izražene estrogenske receptorje (ER+/PR+). Takih primerov je okrog 70-odstotkov in so povezani z boljšo prognozo, saj se za zdravljenje lahko uporablja antiestrogenska terapija kot npr, tamoxifen in inhibitorji aromataze (Britt in sod., 2007).

Navedeni podatki kažejo na pomembno vlogo hormonov pri nastanku raka. Na to kaže tudi statistika pojavnosti te oblike raka pri različnih živalskih vrstah. Najboljši primer so psi in mačke, pri katerih je, podobno kot pri ljudeh, večina tumorjev induciranih spontano, za razliko od miši kjer jih največkrat inducira virus. Pogostost te oblike raka je pri psih in mačkah še večja kot pri ljudeh, odstotek teh primerov pa se pri samicah z odstranjenimi jajčniki močno zmanjša. Na Norveškem, kjer pasjih samic skoraj nikoli ne sterilizirajo, do tumorskih sprememb pride pri več kot polovici samic. Verjetnost za pojav raka mlečne žleze je pri nesteriliziranih mačkah kar 7-krat večja kot pri steriliziranih. Po drugi strani pa je rak mlečne žleze pri divjih sorodnikih psov in mačk redek pojav (čeprav je treba dodati, da je pregled nad temi obolenji pri prosto živečih vrstah precej slabši). Enako velja tudi za vse rastlinojede živali, npr. domače kopitarje in parkljarje (govedo, koze, konji, ovce, prašiči), pri katerih se ta oblika raka skoraj ne pojavlja, ne glede na to ali gre za gojene ali prostoživeče živali. Različno pogostost med živalskimi vrstami lahko razložimo z različnimi reprodukcijskimi strategijami živali, ki pogojujejo količino in frekvenco vrhov steroidnih hormonov v krvi samic v teku življenja. Edini faktor, ki lahko pojasni razliko med divjimi živalmi in živalmi v ujetništvu ter se poleg tega ujema tudi s situacijo pri ženskah modernega sveta je število ovulacij, ki se ne končajo z gravidnostjo. Večina ovulacij pri divjih vrstah se namreč konča z brejostjo in laktacijo, domače nesterilizirane mačke in psi pa so vedno znova izpostavljeni ovarijskim steroidnim hormonom, ne da bi temu sledila laktacija. Osrednje vprašanje je, kateri hormon je za to odgovoren - estrogen, progesteron ali prolaktin. V preteklosti se je poudarjala vloga estrogena, danes pa podatki kažejo na večjo vlogo progesterona. Pri psih (imajo podaljšano lutealno fazo), se zdi bolj verjetna razlaga progesteron, pri mačkah (večinoma imajo inducirano ovulacijo) pa je verjetnejši vzrok za raka mlečne žleze estrogen. Pomemben je podatek, da

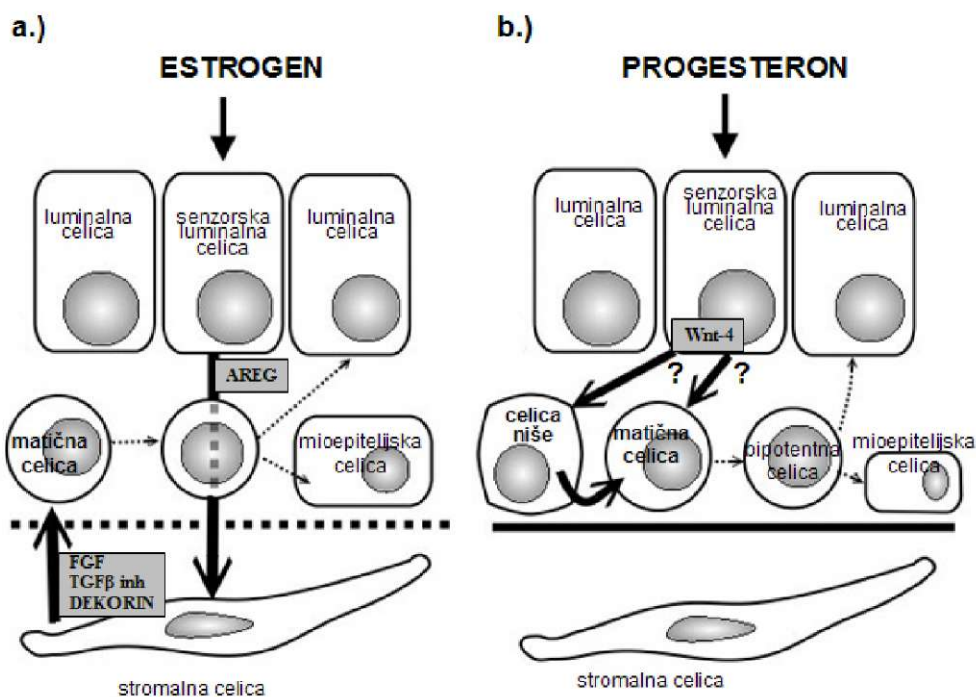
se je pri različnih vrstah velikih mačk v ujetništvu, ki so bile konstantno izpostavljene povišanim koncentracijam sintetičnega progesterona, rak mlečne žleze pojavil pri več kot 90-odstotkih živali (Munson in Moresco 2007).

Tretji hormon, ki je pomemben za ciklični razvoj mlečne žleze je prolaktin. Vir tega ni zgolj hipofiza, ampak nastaja tudi lokalno v tkivu mlečne žleze in sicer pod vplivom estrogena. Mnogo dokazov kaže na to, da avtokrino/parakrina prolaktinska zanka v tkivu mlečne žleze igra pomembno vlogo pri razvoju in napredovanju raka mlečne žleze. Sicer je povezava med rakom mlečne žleze in prolaktinom precej sporna, saj različni avtorji zastopajo dokaj različne trditve - nekateri trdijo, da je prolaktin sicer povezan s pojavnostjo benignih sprememb, pri malignih spremembah pa ni jasne povezave. Drugi avtorji celo omenjajo pozitivne učinke prolaktina (Goodman&Bercovich 2007; Duan in sod. 2007). Mehanizem zaščitnega vpliva nosečnosti na pojavnost raka

mlečne žleze ni znan, najbolj verjetno pa je posledica spremenjenega hormonskega stanja. Obstajajo modeli za razlage, ki temeljijo na kompleksni interakciji matičnih celic z okoljem niše.

7 MATIČNE CELICE, NJIHOVA NIŠA IN VLOGA HORMONOV PRI NASTANKU RAKA

Steroidna hormona estrogen in progesteron imata ključno vlogo pri razvoju mlečne žleze v puberteti in nosečnosti. Delujeta preko ustreznih receptorjev na luminalnih epitelijskih celicah. Njuna vezava sproži izražanje lokalnih topnih faktorjev, ki omogočijo vzpostavitev in delovanje niše. Različni poskusi so pokazali, da je za normalni razvoj mlečne žleze pod vplivom estrogena pomembna interakcija med senzorskimi celicami z



Slika 1: Hormonska regulacija matičnih celic v terminalnem brstu mlečne žleze. a.) V času pubertete se estrogen veže na receptorje senzorskih luminalnih celic, kar sproži izločanje amfipregulina. Ta deluje na stromalne celice pod bazalno membrano, ki je prekinjena. Stromalne celice izločajo faktorje, ki stimulirajo delitev matičnih celic. b.) Pri odrasli mlečni žlezi senzorske celice stimulira ovarijski progesteron, ki se izloča med estričnim ciklom ali gravidnostjo. Bazalna lamina je tu nepropustna, zato glavno vlogo v niši igrajo spremenjene mioepitelijske celice. Stimulirane senzorske celice izločajo faktor Wnt-4, ki stimulira matične celice k delitvi-bodisi direktno ali pa preko celic niše.

Figure 1: Hormonal regulation of stem cells in the terminal bud of the mammary gland. a.) During the puberty estrogen binds to receptors of the luminal sensory cells and causes secretion of amphiregulin, which acts on stroma cells under the ruptured basal membrane. Stroma cells excrete factors stimulating cell divisions of stem cells. b.) In the adult mammary gland the sensory cells are stimulated by progesterone, which is secreted during the oestric cycle or during pregnancy. The basal lamina is tight therefore the main role in the niche play modified myoepithelial cells. Stimulated sensory cells excrete the Wnt-4 factor, which stimulates cell division of the stem cells either directly or through the cells in the niche.

estrogenskim receptorjem (ER⁺) in matičnimi celicami, ki tega receptorja nimajo. Glavno vlogo pri komunikaciji igra epidermalni rastni faktor amfiregulin, ter celice z receptorjem za amfiregulin (ang.: »EGFR-epithelial growth factor receptor«).

Glavna aktivnost med podaljševanjem mlečnih kanalčkov poteka v terminalnih brstih, kjer je v nezreli žlezi največja koncentracija matičnih celic. V času intenzivnega podaljševanja kanalčkov je bazalna membrana prekinjena, kar omogoča komunikacijo med epitelijskimi celicami in stromalnimi celicami vezivnega tkiva pod bazalno membrano. Glede na številne podatke o sintezi proteinov ter *in vitro* poskusih je najverjetnejši naslenji model interakcije celic v niši: estrogen se veže na luminalne senzorske celice, ki v odgovor izločajo amfiregulin, ta se veže na ustrezne receptorje stromalnih celic, stromalne celice pa so tiste, ki s parakrino stimulacijo sprožijo proliferacijo nad njimi ležečih matičnih celic (direktno ali indirektno). Najverjetneje pri tem sodelujejo nekatere metaloproteinaze in fibroblastni rastni faktorji (FGF2 in FGF7) (slikala). FGF so hkrati tudi ključna komponenta medija za gojenje kulture mamosfer. Seveda je celoten mehanizem mnogo bolj kompleksen in še ni do konca razjasnjen.

Na koncu pubertete, ko je mlečna žleza do konca razvita, glavno vlogo pri razvoju in morfogenezi le-te prevzame progesteron. Koncentracija progesterona se poveča med estričnim ciklom in nosečnostjo. Žlezni kanalčki v tem stanju dosežejo konec maščobnega tkiva in ne rastejo več, zato je bazalna lamina neprekinjena. Ker ni komunikacije med spodaj ležečimi stromalnimi celicami, njihovo vlogo verjetno prevzamejo mišično-epitelne celice. Luminalne celice ob vezavi progesterona izločajo topni faktor Wnt-4 in RANKL. Signalizacija z Wnt je zelo pomembna komponenta, ki vpliva na razvoj matičnih celic, RANKL pa preko ciklina D sproži razmnoževanje sosednjih luminalnih celic (slikalb). Niši delovanja obeh hormonov se prekrivata - delita si iste hormonsko odzivne senzorske in matične celice, medtem ko so ostale celice niše različne (receptorje za steroidne hormone izraža več kot 30-odstotkov luminalnih celic žleze).

Delovanje estrogena preko EGFR in progesterona preko Wnt je podprto s številnimi dokazi. Kljub temu sta zgoraj opisana mehanizma le približen model, ki trenutno razlaga dogajanje med razvojem mlečne žleze, kot tudi povezavo med hormoni, topnimi parakrinimi faktorji (Wnt, Notch) in rakom mlečne žleze. Po številnih podatkih sta povišana izpostavljenost progesteronu zaradi hormonskih terapij, kot tudi povišano izražanje komponent Wnt signalizacije povezana z večjim tveganjem za nastanek raka mlečne žleze. Ob vsakem menstrualnem ciklu se s progesteronom preko Wnt stimulira delitev matičnih celic in nastanek večje količine prehodno de-

lečih se multipotentnih prednic, ki imajo velik proliferacijski potencial in so zato najbolj dovzetne za mutacije. Če temu ne sledi nosečnost in končna diferenciacija, se mutacije kopičijo, pri čemer se poveča možnost za maligno transformacijo, še posebej če imajo udeležene celice že akumulirane mutacije. To je ena izmed možnih razlag zaščitne vloge nosečnosti pred tveganjem za raka dojke (Briskin&Duss 2007; Wagner& Smith 2005).

8 OKVARA KONTROLNIH MEHANIZMOV MATIČNIH CELIC IN RAK

pri tumorskih tkivih so zelo pogosto prisotne napake v regulaciji mehanizmov, ki sodelujejo pri vzdrževanju tipičnih lastnosti (samobnavljanje, nediferenciarno stanje) matičnih celic v različnih tkivih. Najbolj preučene so Wnt, Notch, Hedgehog, HER-2 in PTEN poti signalizacije. Kot že omenjeno, je Wnt pomemben posrednik pri aktivaciji matičnih celic v odzivu na progesteron, uravnava pa tudi proliferacijo prehodno pomnožujočih se prednic med razvojem mlečne žleze. Pri človeških celičnih linijah mlečne žleze, ki so bile transformirane za povišano izražanje Wnt-1 pride do maligne transformacije. Konstitutivna aktivacija Wnt rezultira v nastanku raka zaradi napačnega uravnavanja delitve matičnih celic in prednic. Močna aktivacija Wnt poti je povezana z mnogimi rakavimi spremembami, čeprav je mehanizem aktivacije lahko različen. To je lahko točkasta mutacija v genih za »downstream« regulatorje, (kot sta (3-katenin in LRP5/6), ali pa povišana ekspresija Wnt, povzročena z onkogenim MMTV virusom (mouse mammary tumor virus), ki je pogosta pri miškah (Lindvall in sod., 2007).

V poskusih so opazili, da imajo transformirane celice s povišano ekspresijo Wnt tudi povišano aktivnost Notch signalizacije. Notch receptorska signalna pot omogoča medcelično komunikacijo, sodeluje pri apoptozi, določitvi usode celic in migraciji, ter omogoča asimetrično delitev matičnih celic. Povišana ekspresija Notch *in vitro* inhibira diferenciacijo normalnih celic epitelijske mlečne žleze, *in vivo* pa onemogoči razvoj mlečne žleze, ter povzroči nastanek rakavih tvorb. Napačna Notch regulacija onemogoči terminalno diferenciacijo epitelijskih celic mlečne žleze, ter pospeši njihovo proliferacijo, kar povzroči motnje v homeostazi tkiva (Farnie&Clarke 2007).

Notch signalizacija je tudi posrednik avtokrine regulacije rakavih matičnih celic z IL-6. IL-6 je multifunkcijski citokin, ki se sprošča pri vnetjih in uravnava proliferacijo, preživetje in metabolizem celic. Sprva so znanstveniki opazili povezavo med slabo prognozo raka na dojki in povišano koncentracijo IL-6 v krvi, kasneje pa so opazili še povišano ekspresijo IL-6 v tumorskem

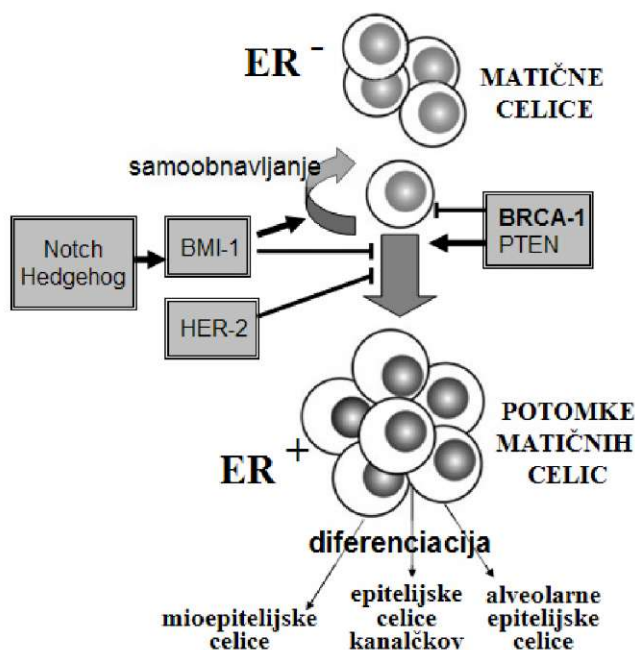
tkivu. Sansone s sodelavci (2007) je predlagal IL-6 kot potencialni regulator samoobnavitve pri normalnih in rakavih matičnih celicah. Maligna sprememba matične celice v mlečni žlezi sproži povišano izločanje IL-6, ki z avtokrinim delovanjem poviša izražanje liganda Jagged3. Ta se veže na Notch-3 receptor, kar sproži izražanje CA-IX, ki je karbonska anhidraza, ki naj bi omogočala celici, da preživi v hipoksičnem okolju rakavega tkiva. Avtokrina pozitivna povratna zanka tako pospeši in favorizira rast maligno spremenjenih celic (Schafer&Brugge, 2007).

Tudi Hengehog (Hh) je ligand, ki ga povezujejo z nastankom raka mlečne žleze. Visoka ekspresija Hh je značilna pri matičnih celicah, diferencirane celice pa ga skoraj ne izražajo. Hh preko regulacije »*polycomb*«
gena BM-1 omogoča proces samoobnavljanja normalnih in rakavih matičnih celic v mlečni žlezi. Geni, ki so vključeni v Hh signalizacijo sami ponavadi niso mutirani, temveč pride do okvar v njihovih regulacijskih poteh in tako do povišanega izražanja. Stimulacija Hh poti v mlečni žlezi sproži nastanek hiperplastičnih lezij, za nastanek rakavih sprememb pa so največkrat potrebne še druge mutacije. Hh ligand tudi pospeši napredovanje rakavih sprememb in njihov razsev. Inhibitor Hh, ciklopamin vse te učinke izniči. Povišana aktivacija Hh signalne poti je povezana tudi z veliko ponovljivostjo raka na dojki po kemoterapiji. Njena inhibicija bi verjetno lahko zmanjšala ali preprečila ponovljivost raka na dojki (Hatsell&Frost 2007).

Eden zgodnejših molekularnih vzrokov za razvoj sporadične oblike raka je pomnoževanje ali povišana

ekspresija gena HER-2, iz družine epidermalnih rastnih faktorjev. Raziskave kažejo pozitivno korelacijo med količino matičnih celic in izražanjem HER-2. Slednji ima verjetno pomembno vlogo pri regulaciji populacije matičnih celic. Vse zgoraj naštetih signalne poti so trenutno glavna tarča pri iskanju zdravil za raka na dojki.

V kontekstu rakavih sprememb mlečne žleze je potrebno omeniti tudi pojem genomske stabilnosti, ki omogoča pravilno replikacijo DNA med celično delitvijo. Če je genom nestabilen, pride do prenosa spontanega napak v replikaciji ali z zunanjimi faktorji sproženih mutacij v naslednjo generacijo in posledično do rakavih sprememb. To je še posebej pomembno pri matičnih celicah, ki so sposobne regenerirati celotno tkivo. Zato imajo te poseben zaščitni mehanizem pred poškodbami DNA. Ob poškobi se namreč namesto popravilnih mehanizmov preferenčno sproži apoptoza, ali pa prehod celice v mirujočo fazo. Taka matična celica se sicer ne deli, vendar pa ostane v tkivu in se stara. Pridobi lahko drugačno funkcijo in tako spremeni mikrookolje v tkivu, ter povzroči maligno transformacijo drugih celic. zato je vloga odziva na poškodbo DNA pri nastanku raka velika. Skoraj vsi do sedaj znani proteini, ki so povezani z genetsko predispozicijo za nastanek raka na dojki (BRCA1, BRCA2, PTEN, CHEK2...) imajo vlogo zaznavanja poškodb DNA v celici. Če poškodbe DNA matična celica ne zazna, to vodi k proliferaciji mutiranih celic in dodatni akumulaciji mutacij (Bartkova in sod., 2005). PTEN je lipidna fosfataza, ki je ključna za samoobnavljanje matičnih celic krvi in



Slika 2: Samoobnavljanje in diferenciacija pri matičnih celicah mlečne žleze. Dedna in sporadična oblika raka mlečne žleze izvirata iz matične celice ali njene zgodnje potomke. Začetni dogodek je napaka v regulaciji sicer natančno kontroliranega procesa samo-obnavljanja matičnih celic. Pri dedni obliki je najpogostejši vzrok izguba heterozigotnosti lokusa BRCA1, pri sporadični obliki pa mikrodelecija znotraj lokusa PTEN ali povišana aktivacija epidermalnega rastnega faktorja HER-2, ter Notch in Hedgehog signalne poti. Posledica tega je povečanje klonalnega razraščanja matičnih celic, kar pomeni nove tarče za nadaljne mutagene dogodke.

Figure 2: Self-renewal and differentiation of the mammary stem cells. Hereditary or spontaneous cancer in the mammary gland originates from stem cells or from their early progenitor cells. The initial event is a mistake in the regulation of precisely controlled process of self-renewal of the stem cells. For the hereditary form of cancer, the most common cause is the loss of heterozygosity at the BRCA1 locus and for the spontaneous form a microdeletion within the PTEN locus or elevated activation of the epidermal growth factor HER-2 and Notch and Hedgehog signal pathway. The consequence is increase of the clonal outgrowth of stem cells, resulting in new targets for further mutation events.

živčnega sistema. Mikrodelecija tega gena je prisotna kar pri polovici primerov raka na dojki in je največkrat posledica genomske nestabilnosti zaradi podedovane mutacije v *BRC1*. Liu in sodelavci (2008) so v svojih študijah dokazali, da izguba heterozigotosti na lokusu *BRC1*, ki je najpogostejši vzrok za dedno obliko raka na dojki, vodi v kopičenje genetsko nestabilnih matičnih celic. Te so podvržene dodatnim mutacijskim dogodkom, ki vodijo v razvoj raka.

Z razlago mehanizmov samoobnavljanja matičnih celic mlečne žleze se pokaže tudi konceptualna povezava med dedno in sporadično obliko karcinogeneze (slika 2).

9 RAZPRAVA

Zaradi pogostosti raka na dojki in njegove kompleksnosti se mnoge skupine znanstvenikov po svetu ukvarjajo z najrazličnejšimi vprašanji, povezanimi s to obliko raka. Internetna študija, v kateri so skušali postaviti prioritete pri raziskavah raka na dojki, je pokazala, da je iz sklopa 70 vprašanj, vprašanje vloge matičnih celic pri raku mlečne žleze na četrtem mestu. Zanimivo je, da neklinični raziskovalci to vprašanje smatrajo kot prioriteto (<http://breast-cancer-research.com/content/976/R81>). Na voljo je velika količina podatkov, vendar pa je včasih njihova interpretacija težavna, kar zmanjša tudi njihovo uporabno vrednost za klinične raziskave. To velja predvsem za podatke, pridobljene iz ekspresijskih analiz z mikromrežami, ki se uporabljajo tudi v diagnostične namene. Največja težava, ki predstavlja oviro pri tovrstnih raziskavah, je identifikacija ustreznih markerjev, s katerimi bi bilo mogoče iz mlečne žleze izolirati čisto kulturo matičnih celic. Trenutne metode namreč omogočajo le 5 % obogatitev kultur matičnih celic. Poznavanje specifičnih markerjev v hierarhiji celic mlečne žleze (od matičnih do diferenciranih celic) bi omogočilo učinkovite raziskave po vzoru raziskav vzrokov za nastanek raka krvnega sistema. Možno bi bilo ugotoviti natančno hierarhijo celic in linijsko diferenciacijo. Celice na različnih stopnjah diferenciacije bi lahko izolirali s tekočinsko citometrijo, določili njihov ekspresijski profil, jih *in vitro* genetsko spremenili ter nato ugotovili vpliv teh sprememb na delovanje v *in vitro* ter *in vivo* poskusih. Ekspresijski profil posameznih celic v hierarhiji bi omogočil tudi identifikacijo za določeno stopnjo specifičnih promotorjev in njihovo uporabo v transgenezi. Trenutno najpogosteje uporabljena promotorja (WAP in MMTV) močno omejujeta spekter možnosti.

Spontane maligne spremembe mlečne žleze miši kot model za karcinogenezo pri človeku niso najboljše, saj je, za razliko od človeka, pri miši vzrok rakave spremembe večinoma posledica prisotnosti onkogenega MMTV pro-

virusa. Tako nastale tvorbe imajo z rakavimi tvorbami pri ljudeh malo skupnih značilnosti. Za študije pri miših se zato uporablja PyMT MMTV miš. Tu se »*polioma middle T onkoprotein*« izraža pod kontrolo MMTV hormonsko odvisnega promotorja, ki se aktivira z estrogenom. Tako nastale rakave tvorbe so človeškim blizu po morfologiji in tudi po vzorcu izražanja genov in so dober model za raziskave. Vsekakor pa bi bil najboljši model študij kompleksnih, verjetno večstopenjskih dogodkov pri nastanku raka in vzpostavitev umetnega mikrookolja v mlečni žlezi. Ksenotransplantacijski postopki gojenja človeških tkiv mlečne žleze v miši so že znani, vendar so potrebne izboljšave modela (Proia&Kuperwasser 2006). Končni cilj je seveda določitev celičnih tarč različnih onkogenih mutacij in razkritje mehanizma nastanka rakave matične celice. Poznavanje teh mehanizmov bi olajšalo iskanje učinkovitejših zdravil in strategij za zdravljenje raka na dojki.

10 VIRI

- All-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 100: 3983-3988
- Bartkova J., Horejsi Z., Koed K., Kramer A., Tort F., Zieger K., Guldberg P., Sehested M., Nesland J.M., Lukas C., Orntoft T., Lukas J., Bartek J. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 464: 864-870
- Briskin C., Duss S. 2007. Stem cells and the stem cell niche in the breast: an integrated hormonal and developmental perspective. *Stem cell reviews*, 3: 147-156
- Britt K., Ashworth A., Smalley M. 2007. Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocrine-related cancer*, 14: 907-933
- Dontu G., Liu S., Wicha M.S. 2005. Stem cells in mammary development and carcinogenesis. *Stem cell reviews*, 1: 207-213.
- Duan R., Ginsburg E., Vonderhar B.K. 2007. Estrogen stimulates transcription from the human prolactin distal promoter through AP1 and estrogen responsive elements in T47D human breast cancer cell. *Molecular and cellular endocrinology*, 281: 9-18
- Farnie G., Clarke R.B. 2007. Mammary stem cells and breast cancer-role of notch signalling. *Stem cell reviews*, 3: 169-175
- Goodman G., Bercovich D. 2008. Prolactin does not cause breast cancer and may prevent it or be therapeutic in some conditions. *Medical hypotheses*, 70: 244-251
- Hatsell S., Frost A.R. 2007. Hedgehog signalling in mammary gland development and breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 12: 163-173
- Huang E.H., Heidt D.G., Chen-Wei L., Simeone D.M. 2007. Cancer stem cells: A new paradigm for understanding tumor progression and therapeutic resistance. *Surgery*, 141: 415-419

- Kelly P.N., Dakic A., Adams J.M., Nutt S.L., Strasser A. 2007. Tumor growth need to be driven by rare cancer stem cells. *Science*, 317: 337
- Kumar M.J.M., Ponvijay K.S., Nandhini R., Nagarajan R.S., Srinivas J.J.G., Nagarajn P., Venkatesan R., Kumar K., Singh S. 2007. A mouse model for luminal epithelial like ER positive subtype of human breast cancer. *BMC cancer*, 7: 180
- LaBarge M.A., Petersen O.W., Bissell M.J. 2007. Of microenvironments and Mammary stem cells. *Stem cell reviews*, 3: 137-146
- Lindwall C., Bu W., Williams B.O., Li Y. 2007. Wnt signalling, stem cells and the cellular origin of breast cancer. *Stem cell review*, 3: 157-168
- Liu S., Ginestier C., Charafe-Jauffret E. *et al.* 2008. BRCA1 regulates human mammary stem/progenitor cell fate. *Proceedings of National Academy of Science in USA*, 105: 1680-1685
- Maffini M.V., Soto A.M., Calabro J.M., Ucci A.A., Sonnenschein C. 2004. The stroma as a crucial target in mammary gland carcinogenesis. *Journal of cell science*, 117: 1287-1290
- Ponti D., Zaffaroni N., Capelli C., Daidone M.G. 2006. Breast cancer stem cells: an overview. *European Journal of Cancer*, 42: 1219-1224
- Proia D.A., Kuperwasser C. 2006. Reconstruction of human mammary tissues in a mouse model. *Nature protocols*, 1: 206-214
- Sansone P., Storci G., Tavolari S., Guarnieri T., Giovannini C., Taffurelli M., Ceccarelli C., Santini D., Paterini P., Marcu K.B., Chieco P., Bonafe M. 2007. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *The Journal of clinical investigation*, 117: 3988-4002
- Schafer Z.T., Brugge J.S. 2007. IL-6 involvement in epithelial cancers. *The journal of clinical investigation*, 117: 3660-3663
- Szspirer C., Szspirer J. 2007. Mammary cancer susceptibility: human genes and rodent models. *Mammary Genome*, 18: 817-831
- Stingl J., Caldas C. 2007. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nature reviews, cancer*, 7: 791-799
- Stingl J., Eirew P., Ricketson I., Shackleton M., Vaillant F., Choi D. 2006. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*, 439: 993-997
- Vaillant F., Asselin-Labat M.L., Shackleton M., Lindeman G.J., Visvader J.E. 2007. The emerging picture of the mouse mammary stem cell. *Stem cell reviews*, 3: 114-123
- Wagner K.U., Smith G.H. 2005. Pregnancy and stem cell behaviour. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 1: 25-36
- Welm B.E., Tepera S.B., Venezia T., Graubert T.A., Rosen J.M., Goodell M.A. 2002. Sca-1 cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Developmental biology*, 245: 42-56