

Tumor-Stammzellforschung – Basis und Herausforderung für Diagnostik und Therapie

Heidrun Karlic¹, Harald Herrmann¹, Axel Schulenburg¹, Thomas W. Grunt^{1,2}, Sylvia Laffer¹, Irina Mirkina¹, Rainer Hubmann¹, Medhat Shehata¹, Brigitte Marian^{1,3}, Edgar Selzer⁴, Michael Pfeilstöcker^{1,5}, Elisabeth Pittermann^{1,5}, Ulrich Jäger^{1,2}, Hubert Pehamberger^{1,6}, Christoph Zielinski^{1,2}, Peter Valent^{1,7}

¹Ludwig Boltzmann Cluster Oncology, Vienna, Austria

²Department of Medicine 1 and Cancer Centre, Clinical Division of Oncology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

³Department of Medicine I, Institute for Cancer Research; Medical University of Vienna, Vienna, Austria

⁴Department of Radiation Therapy, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

⁵3rd Medical Department, Hanusch Hospital, Vienna, Austria

⁶Department of Dermatology, Medical University Vienna, Vienna, Austria

⁷Department of Medicine I, Division of Hematology & Hemostaseology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Erhalten am 29. Jänner 2010, angenommen nach Revision am 10. Juni 2010, online veröffentlicht am 22. Juli 2010

Tumor stem cell research – basis and challenge for diagnosis and therapy

Summary. Biological features of tumor cells relevant to progression, metastasis, and prognosis in cancer patients have been investigated for many years. During the past few years, the concept of tumor stem cells has gained widespread acceptance. The cancer stem cell (CSC) model is based on the observation that continuous growth of tumors depends on a small population of immature neoplastic cells with unlimited proliferative potential. In contrast to these CSC, more mature clonal cells in the same neoplasm undergo apoptosis and die after a variable number of cell divisions. The self-renewal capacity of CSC plays a central role in this scenario and enables permanent tumor cell repopulation *in vivo* in patients as well as in experimental animals, e.g., immunodeficient mice. Based on the stem cell concept, it is clear that the success of an anti-neoplastic approach depends on efficient targeting and elimination of CSC. An important aspect of CSC is their intrinsic resistance against conventional drugs. Therefore, a major focus in current research is molecular targets and their expression in CSC, with the goal to use targeted drugs for CSC elimination. It is the hope for the future that therapeutic approaches involving CSC-targeting concepts will lead to sustained remission and thus improvement of prognosis in leukemia and cancer patients.

Key words: Cancer stem cells, leukemias, solid cancers, target structures for diagnosis and therapy.

Korrespondenz: Prof. Dr. Heidrun Karlic, Ludwig Boltzmann Cluster Oncology (LBI for Leukemia Research), Hanusch Hospital, Heinrich Collinstraße 30, 1140 Wien, Österreich,
 E-mail: heidrun.karlic@meduniwien.ac.at

Zusammenfassung. Seit vielen Jahren wird die Biologie der Tumorzellen und ihre Bedeutung für Tumorprogression, Metastasierung und Prognose der Tumorpatienten erforscht. In den letzten Jahren gewinnt dabei das Konzept der sogenannten Tumor-Stammzellen immer mehr an Bedeutung. Dieses Modell basiert auf der Beobachtung, dass das kontinuierliche Wachstum von Tumoren und Leukämien von einer kleinen Population sehr unreifer neoplastischer Zellen, den Tumorstammzellen abhängt, während die reiferen Zellen der Neoplasie nach einer variablen Anzahl von Zellteilungen über Apoptose absterben. Die Selbsterneuerungsfähigkeit der Tumorstammzellen spielt dabei eine zentrale Rolle und ermöglicht eine dauerhafte Repopulation *in vivo* im Patienten und in experimentellen Modellen wie z.B. in immunsupprimierten Mäusen. Somit ist auch klar, dass antineoplastische Therapien nur dann ein kuratives Potential haben, wenn die Tumorstammzellen getroffen werden. Ein wichtiger Aspekt ist deren intrinsische Resistenz gegenüber konventionellen Medikamenten. Daher versucht man, molekulare Targets und Target-Expressionsprofile in neoplastischen Stammzellen zu erkennen und in therapeutischen Ansätzen zu nutzen. Es ist zu erhoffen, dass die Anwendung der Tumorstammzell-Konzepte zu einer nachhaltigen Verbesserung der Therapie von Leukämien und Tumorerkrankungen führen wird.

Schlüsselwörter: Tumor Stammzellen, Leukämien, solide Tumoren, Targetstrukturen für Diagnose und Therapie.

Einleitung

Tumor-Stammzellen (cancer stem cells = CSC) können als Keimzellen von Malignomen angesehen werden. Das CSC Modell zielt auf die Möglichkeit ab, maligne Erkrankungen

in Zukunft nachhaltiger (an der Wurzel der Erkrankung) therapeutisch beeinflussen zu können [1–4]. Definiert werden die CSC durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Nachbildung von relevanten Tumoranteilen, was sich experimentell am besten durch eine dauerhafte Repopulation der entsprechenden Neoplasie in immunsupprimierten Mäusen darstellen lässt [1–4]. Der Ursprung der CSC ist derzeit noch nicht ganz klar. Diskutiert werden sowohl die Herkunft aus einer normalen Stammzelle als auch die Übernahme von Stammzellfunktionen in reiferen Gewebszellen im Rahmen der malignen Transformation [1–4] (Abb. 1). Die Fähigkeit von (potentiellen) CSC, eine Neoplasie *in vivo* dauerhaft nachzubilden, hängt von zusätzlichen Faktoren wie der Interaktion mit der Primärumgebung (Microenvironment) und dem Immunsystem des Organismus (Immunüberwachung) ab [1–4].

Die Behandlung eines Tumors oder einer Leukämie mit herkömmlichen zytostatischen Medikamenten oder neuen zielgerichteten Medikamenten (targeted drugs) geht in der Regel nicht mit einer kompletten Vernichtung aller Tumorstammzellen einher, ein Problem, das besonders bei den soliden Tumoren und bei bestimmten Leukämien zum Tragen kommt [1–4]. Vielmehr findet sich

nach einer solchen Therapie zumeist eine (zunächst oft minimale) Resterkrankung, aus der in der Folge ein Relaps entstehen kann [1–4]. Dies beruht darauf, dass die Tumorstammzellen (Leukämiestammzellen) in der Regel nur sehr schwer medikamentös zu beeinflussen sind [1–4]. Derzeit versucht man daher, neue wirksamere Medikamente und Medikamenten-Kombinationen zu entwickeln, welche auch die Tumorstammzellen treffen können [1–4]. Für die Identifikation, Separation und funktionelle Analyse der CSC ist die Charakterisierung ihres Phänotyps von entscheidender Bedeutung, sowohl auf der Ebene der Oberflächen-Proteine als auch auf der Ebene der Signalübertragung und der (epi)genetischen Mechanismen [5–7]. Als funktionelles Testsystem hat sich neben den *in vitro* Kulturansätzen vor allem das Xenotransplant-Tiermodell (immunsupprimierte Mäuse) bewährt [8, 9]. Es ist zu erwarten, dass die Ergebnisse der CSC-Forschung in der Zukunft zu einer Verbesserung von spezifischen Therapien in bestimmten Neoplasien führen werden.

Was ist die Tumor-Stammzelle (Cancer Stem Cell = CSC)

Die CSC ist eine Zelle, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und dauerhaften Nachbildung der relevanten Tumoranteile hat [1–4]. Mechanistisch weisen CSC drei wichtige Eigenschaften auf: 1. die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Proliferation ohne Ausreifung bzw. ohne Verlust der proliferativen Kapazität), 2. Selbstregulation der Anzahl der Stammzellen durch Erhaltung eines Gleichgewichts von differenzierenden und „nur proliferierenden“ Tochterzellen, und 3. die Fähigkeit zur Differenzierung und Ausreifung, um die Rekonstitution und das Langzeitüberleben von allen relevanten funktionellen Elementen eines Zellverbandes zu gewährleisten [1–4]. Ein optimaler Labor-Ansatz, der diese Funktionen experimentell untersuchen kann, existiert nicht, da systemische Aspekte der Primärumgebung (Patientengewebe) und oft auch die Zeitspanne (chronische Neoplasien) nicht simuliert werden können. Das derzeit beste „Nährungs-Modell“ zum Nachweis und zur Erforschung der Biologie und Funktion der CSC ist die Xenotransplantation der Tumorzellen (Leukämiezellen) in der immundefizienten Maus [8, 9]. Obwohl dieses Modell generell als das derzeit beste Stammzellmodell akzeptiert wird, muss auf die spezifischen Limitationen hingewiesen werden. Zunächst fehlt in der Regel die tumorspezifische Primärumgebung, welche in manchen Neoplasien möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf die Biologie der CSC hat. Außerdem ist die Entwicklungsphase der Neoplasie und ihrer CSC oft ein jahrelanger Prozess, der die Lebenserwartung der Versuchstiere überschreiten kann. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das Fehlen eines funktionstüchtigen Immunsystems in der Versuchsmaus. Dies ist einerseits wichtig, um eine Abstoßung der Neoplasie zu verhindern. Andererseits fehlt damit auch die natürliche Immunabwehr, und es bleibt unklar, ob alle CSC-artigen Zellen, die in der immundefekten Maus wachsen, auch in einem immunkompetenten Organismus CSC-Funktion aufweisen. Vor kurzem wurde am Beispiel des Melanoms gezeigt, dass

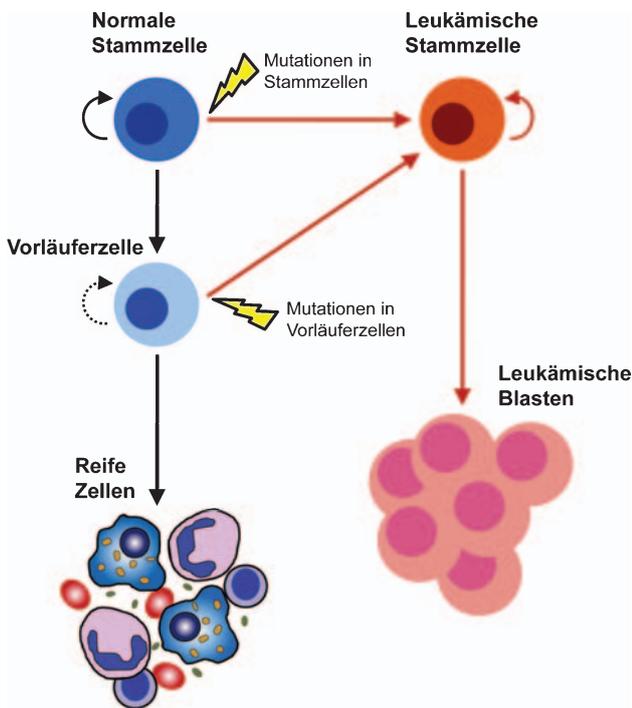


Abb. 1. Hypothesen zur Entwicklung neoplastischer Stammzellen aus normalen Zellen. Prinzipiell werden 2 unterschiedliche Konzepte diskutiert: Die neoplastischen Stammzellen entwickeln sich direkt aus den normalen Stammzellen und 'übernehmen' ganz einfach viele prinzipielle Stammzellfunktionen inklusive Selbsterneuerung, asymmetrische Differenzierung oder Stammzellhoming. Eine zweite Hypothese besagt, dass die neoplastischen Stammzellen aus einer reiferen Zellform hervorgehen und im Rahmen der malignen Evolution Stammzell-Funktionen frisch übernehmen. Die in vielen Fällen darstellbare phänotypische Ähnlichkeit zwischen normalen Stammzellen und neoplastischen Stammzellen (z.B. in der Myelopoese – siehe Abb. 2) würde die erste Hypothese unterstützen

der Grad der Immunsuppression in der Maus mit der Fähigkeit der Tumorstammzellen korreliert, die entsprechende Neoplasie nachzubilden. Während im herkömmlichen NOD/SCID System nur eine kleine Anzahl an Melanomzellen Tumore nachbilden können, entstehen in der komplett immunsupprimierten NOD/SCID+IL-2-Rgamma-null Maus aus jeder dritten Melanomzelle Tumore [10]. Ein ähnlicher Einfluss des Restimmunsystems in der NOD/SCID Maus auf die repopulierende Funktion der CSC findet sich auch bei Leukämien und bei soliden Tumoren. Im Falle der Akuten Myeloischen Leukämie (AML), in welcher der Phänotyp CD34+/CD38- traditionellerweise als CSC-Phänotyp gilt, hat man vor kurzem nachgewiesen, dass die CD38-negative Fraktion vor allem deshalb einen Wachstumsvorteil in der NOD/SCID Maus hat, weil das residuale Immunsystem dieser Maus die mit dem für die Anreicherung notwendigen anti-CD38 Antikörper beladenen Zellen erkennen und dann eliminieren kann [11]. Wird das residuale Immunsystem der NOD/SCID Maus ausgeschaltet, so kann auch aus einem Teil der CD38+ Zellen eine AML hervorgehen [11]. Im Falle der Brustkrebs-Stammzellen könnte eine andere Beobachtung dazu beitragen, dass der Phänotyp der CSC (CD44+/CD24-) in Zukunft revidiert werden muss. Hier ist beschrieben worden, dass bestimmte gegen CD24 gerichtete Antikörper zum programmierten Zelltod (Apoptose) in den Brustkrebszellen beitragen können [12]. Es ist nicht klar, ob die fehlende Stammzellfunktion der CD24+ Zellen in diesen Tumoren darauf beruht, dass der Antikörper, der zur Anreicherung dieser Zellen verwendet worden ist, diese selbst (zumindest zum Teil) eliminiert, bevor sie in der Maus Tumore nachbilden können.

Aufgrund all dieser Daten ist man derzeit bemüht, weitere neue (bessere) Stammzellmarker und Markerkombinationen zu identifizieren, um den Phänotyp der CSC in den diversen Leukämien und soliden Tumoren näher beschreiben zu können [1–4]. Eine weitere Serie von Forschungsprojekten zielt darauf ab, die Wachstumsbedingungen für CSC in den immunsupprimierten Mäusen durch Schaffung einer künstlichen oder autologen ko-transplantierten Stroma-Nische oder durch die zusätzliche Verabreichung von Zytokinen zu verbessern [13].

Dabei gewinnt die Plastizität der Tumorstammzellen zunehmende Beachtung: Dieses Konzept besagt, dass die Biologie, die molekularen Signaturen, und der Phänotyp der CSC keinem einheitlichen Muster folgen. Vielmehr muss man davon ausgehen, dass bereits in einem frühen Stadium der Tumor(stammzell)entwicklung viele Subklone mit Stammzellpotenz angelegt werden. Ein Beweis für diese Hypothese ist die Tatsache, dass klinisch relevante (stabil messbare) Subklone im Laufe der Entwicklung einer Neoplasie nachweisbar werden, wobei in vielen Fällen Kofaktoren oder ein Selektionsdruck (Therapie mit spezifischen Medikamenten) diese Entwicklung fördern oder die Manifestation der Subklone unterstützen, welche in der Regel CSC enthalten. Ein wichtiges Beispiel ist das „Auftreten“ (die Ausselektion) von resistenten BCR/ABL Mutanten in der chronisch myeloischen Leukämie (CML) unter einer Therapie mit dem gegen das BCR/ABL-Onko-

protein gerichteten Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib [14]. Sowohl bei CML als auch in der Philadelphia-Chromosom positiven ALL (= akute lymphoblastische Leukämie) finden sich die BCR/ABL Mutationen in zunächst kleinen definierten (und fast immer in separat angelegten) Subklonen bereits vor dem Start der Imatinib-Therapie [15].

Eine entscheidende Frage in der stammzellorientierten Therapie von Tumoren und Leukämien ist, welche Rolle normale Stammzellen in der Krebsentstehung spielen, und welche Gemeinsamkeiten zwischen normalen Stammzellen und Tumor-Stammzellen bestehen. Das ist insofern von Bedeutung, als die stammzellorientierten Therapiekonzepte logischerweise auf die komplette Eradikation aller Stammzellsubklone ausgerichtet sein müssen, wobei dann die Frage zu stellen ist, inwieweit auch die gesamte Masse der normalen Stammzellen durch diese Therapien eliminiert wird.

Gemeinsamkeiten zwischen CSC und normalen Stammzellen

Normale Stammzellen und CSC dienen beide als entscheidende permanente Quelle für neu-gebildete ausdifferenzierende Zellen. Die Differenzierungsfähigkeit der CSC ist jedoch in den meisten Fällen im Vergleich zu den normalen Gewebsstammzellen sehr eingeschränkt. Für beide Fälle gilt allerdings die Hypothese, dass die reiferen Zellen in der Regel nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen automatisch über Apoptose eliminiert werden, was für die Stammzellen hingegen nicht oder nur in sehr eingeschränktem Maße gilt. Die Mechanismen, über welche die Stammzellen sich selbst dauerhaft am Leben halten, gehen aber über die Selbsterneuerung und Proliferation hinaus. So nimmt man an, dass die Stammzellen (normale und CSC) über Mechanismen verfügen, welche das Eindringen und Verbleiben von bestimmten Toxinen verhindern [16]. Dies ist wahrscheinlich ein allgemeines biologisches Konzept, welches (im Falle von z.B. Toxin-Exposition) verhindert, dass der Stammzellpool akut auf eine sehr geringe Anzahl von Stammzellen absinkt. Die molekularen Mechanismen, welche dieser Schutzfunktion zugrunde liegen sind nur zum Teil bekannt. Ein wichtiger Bestandteil des Schutzsystems dürften die Ionen-Pump-Kanäle der Zellmembran darstellen. So konnte gezeigt werden, dass Toxine über diese Ionen-Pumpen rasch wieder aus den Zellen hinausgepumpt werden [14]. Leider gilt dies auch für viele Medikamente, so dass auf Stammzellebene oft eine primäre Resistenz gegen diverse Medikamente besteht [14, 17]. Überdies fehlen in den Tumorstammzellen häufig Medikamenten-Transporter (ebenfalls oft Ionen-Kanäle), über welche diese Zellen die entsprechenden Medikamente aufnehmen können. Ein spezielles Beispiel dafür ist die CML Stammzelle, welche im Gegensatz zu ihren reiferen Tochterzellen kaum oder kein OCT1 jedoch sehr viel MDR1 (multi drug resistance gene) exprimiert [2, 17] (Abb. 2). Da das derzeit wichtigste zielgerichtete Medikament, der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib, hauptsächlich über OCT1 in die CML-Zellen aufgenommen wird und dann über MDR1 wieder ausgeschleust wird [18], ist klar, dass die intrazellulären Konzentrationen von Imatinib

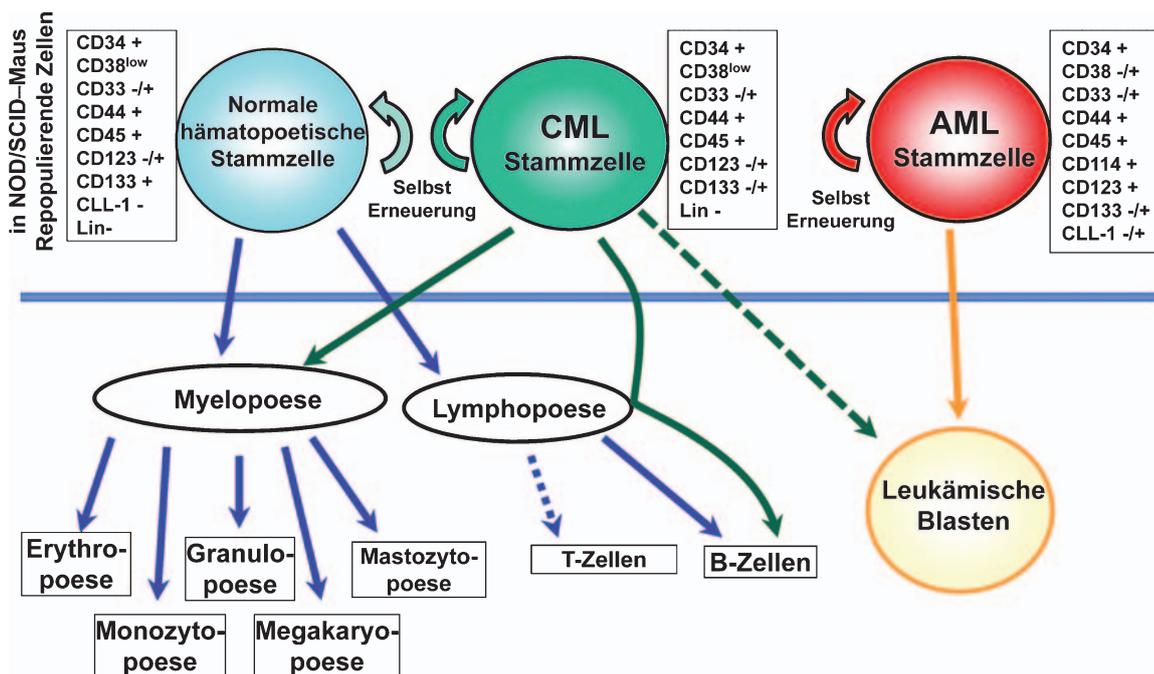


Abb. 2. Phänotyp und Target-Expressionsmuster in myeloischen Stammzellen. Die normale Stammzelle der Myelopoese ist Lineage-negativ (ohne Differenzierungsmarker) und koexprimiert CD34 und andere Oberflächen-Antigene. Im Gegensatz zur neoplastischen myeloischen Stammzelle kann der IL-3 Rezeptor (alpha-Kette) auf normalen myeloischen Stammzellen kaum oder gar nicht nachgewiesen werden. Unter den vielen Oberflächen-Targets soll vor allem CD33 und CD44 erwähnt werden

in den CML Stammzellen viel geringer sind als in den reiferen Zellen, und dass Imatinib daher zwar die Masse der reifen CML Zellen, jedoch nicht die CML Stammzellen eliminieren kann [2, 14, 17]. Aus klinischer Sicht bedeutet das, dass alle CML Patienten Imatinib dauerhaft (wahrscheinlich lebenslang) einnehmen müssen, da ein Absetzen dazu führt, dass aus den wenigen verbliebenen (residualen) CML Stammzellen die gesamte CML rasch wieder nachgebildet werden kann [14, 19]. Ebenso bedeutet dies, dass im Stammzellpool der CML auch unter der Imatinib-Therapie weitere Mutationen akkumuliert werden können und dass daher Imatinib ein Rezidiv, ausgehend von einem noch weiter transformierten Stammzellsubklon, nicht verhindern kann [14], abgesehen von der Möglichkeit, dass sich die CML-Stammzellen auch durch die „Flucht“ in das schützende Stroma vor einem Imatinib-Angriff schützen können [20]. Weiters wurde kürzlich die Möglichkeit einer Reversion der Multi-Drug-Resistance auf epigenetischer Ebene mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren postuliert [21]. Auch in Bezug auf die Oberflächenmarker bestehen augenscheinliche Parallelen und Gemeinsamkeiten zwischen CSC und gesunden Stammzellen (Abb. 2). Zum Beispiel tragen normale und neoplastische Stammzellen der Myelopoese die Oberflächenmarker CD34 und CD44 [22–25]. Auch andere Targetstrukturen werden in beiden Zellarten zur Expression gebracht. Es gibt allerdings einige interessante Unterschiede im Phänotyp der Stammzellen, wenn man die AML oder CML mit der normalen Myelopoese vergleicht (Abb. 2). So exprimieren normale myeloische Stammzellen kaum CD33 und CD123, während AML- und CML Stamm-

zellen für beide Marker zumeist eindeutig (stark) positiv sind [22–25]. Einen spezifischen Stammzellmarker gibt es allerdings weder für die AML oder CML, noch für CSC in anderen Tumoren oder Geweben. Da die Komplexität der Cancerogenese auch in einem systemischen Zusammenhang betrachtet werden muss [26, 27], ist es wichtig, immer mehrere Marker-Kombinationen zu analysieren, um stammzellspezifische Muster aufzuzeigen [1–4].

In manchen Fällen handelt es sich bei den Oberflächenmarkern um Rezeptoren für bestimmte Wachstumsfaktoren (Zytokine), wie beispielsweise die alpha Kette des Interleukin 3 Rezeptors CD123 [27]. Interessanterweise steuern die entsprechenden Zytokine tatsächlich das Wachstum, das Überleben und wahrscheinlich auch die Differenzierung der myeloischen Tumorstammzellen, und zwar in ähnlicher Weise wie auch das Wachstum der normalen myeloischen Stammzellen. So sind also die Botenstoffe (Zytokine), über welche AML- und CML Stammzellen und die normalen Stammzellen der Myelopoese reguliert werden, vielfach ident [28]. Das bedeutet auch, dass die Regulation des Wachstums der Tumorzellen nicht nur durch Onkogene gesteuert wird, sondern auch durch extrazelluläre Botenstoffe und physiologische Faktoren (Hormone, Zytokine, Stoffwechselprodukte in der Primärumgebung). Es bestehen hier also vielfältige funktionelle Wechselwirkungen auf molekularer und zellulärer Ebene, die auf Gemeinsamkeiten von normalen Stammzellen und CSC hindeuten [14]. Ebenso auffällig ist, dass sich CSC und normale Stammzellen ähnlicher (zytokin-abhängiger und -unabhängiger) Signalwege bedienen [29, 30]. Auch im Genprodukt-Expressionsmuster (mRNA

Muster, Proteom-Muster) und in Bezug auf epigenetische Regulationsmuster von Stammzellen und CSC zeigen sich deutliche Ähnlichkeiten [31].

Diese und weitere Parallelen werden von mehreren Forschern dahingehend interpretiert, dass Tumor-Stammzellen in der Regel aus gesunden Stammzellen entstehen und zumindest in frühen Krankheitsphasen einer ähnlichen Regulation durch (primär) physiologische Faktoren unterworfen sind. Für den klinischen Gebrauch von stammzellaktiven Zytokinen und bestimmten Medikamenten in Tumorpatienten (Gefahr der Mobilisierung von CSC) ist dies eine wichtige Erkenntnis.

Wichtige Moleküle, die im Zusammenhang mit Wachstum oder Überleben von CSC diskutiert worden sind

Regulatoren von Zellzyklus und Apoptose

Aufgrund von zahlreichen Studien nimmt man an, dass eine große Anzahl von Regulatoren des Zellzyklus und der Apoptose im Wachstum, in der Proliferation und im Überleben der CSC eine Rolle spielen [32]. Etliche Moleküle wie beispielsweise die Gruppe der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren, P53 aber auch zahlreiche mitochondriale Gene steuern extrinsische und intrinsische Signalwege des regulierten Zelltodes [33]. Abbildung 3 illustriert die zentrale Rolle der Regulatoren des Zellzyklus, vor allem des Cyclin-CDK-Komplexes. Diese Moleküle bilden eine Schaltstelle für die Inhibitoren der cip/kip-Familie P21, P27 und P57, die Tumorsuppressorgene der INK4a(ARF-Familie zu denen die P15 (= CDKN2B), und P16 (= CDKN2A), und den „Checkpoint-Regulator“ P53. Weitere wichtige Regulatoren für das Überleben der Tumorzellen (Verhinderung der Apoptose) sind Mitglieder der Bcl-2 Familie, die sowohl antiapoptotische (Bcl-2, Bcl-xL) als auch proapoptotische Moleküle (Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, Bik, Bim, Bid) inkludiert,

und diverse Hitzeschock Proteine. Ebenfalls von Bedeutung ist das Bmi-1 Protein, welches auch eine gewisse Rolle im Selbsterneuerungsprozess von normalen Stammzellen und CSC spielen dürfte. So ist das Bmi-1 Proto-Onkogen beispielsweise für die Erhaltung der Selbsterneuerungskapazität von Stammzellen wichtig [34]. Unter normalen Bedingungen hemmt Bmi-1 die Transkription von P16 (CDKN2A). Ein Fehlen von P16 (CDKN2A) in Kombination mit einer abnormalen Bmi-1-Funktion fördert die Zellproliferation, indem das Selbsterneuerungspotential stimuliert wird und hemmt die Expression von proapoptotischen Genen [35]. Die Expression von P16 (CDKN2A) in normalen hämatopoietischen Stammzellen bedingt eine Hemmung Proliferation und induziert sowohl Seneszenz als auch den P53-induzierten Apoptoseweg, wohingegen die – meist epigenetische Inaktivierung von P16 (CDKN2A) und/oder P15 (CDKN2B) in leukämischen Zellen das Gegenteil (also Apoptose-Hemmung und Proliferations-Stimulierung) bewirken kann [36, 37]. Eine ähnlich komplexe Rolle spielen die RUNX-Proteine, welche durch verschiedenste genetische und epigenetische Mechanismen gesteuert werden und sowohl als Onkogene als auch als Tumorsuppressorgene agieren können [38–40]. Weitere Moleküle und Signalwege, die in der Selbsterneuerung der Stammzellen eine Rolle spielen dürften sind der Wnt und β -Catenin Pathway und der Sonic Hedgehog Pathway [41].

Signalübertragende Proteine

Signaltransduktionswege spielen als Effektoren der Regulation von Wachstumsfaktoren und damit auch für Selbsterneuerung, und ‘Survival’ von CSC eine Rolle. Abgesehen von den bereits erwähnten Apoptose-Regulationswegen betreffen die wichtigsten dieser Signalwege den 1. Phosphoinositide (PI)3-Kinase–mTOR Signalübertragungsweg,

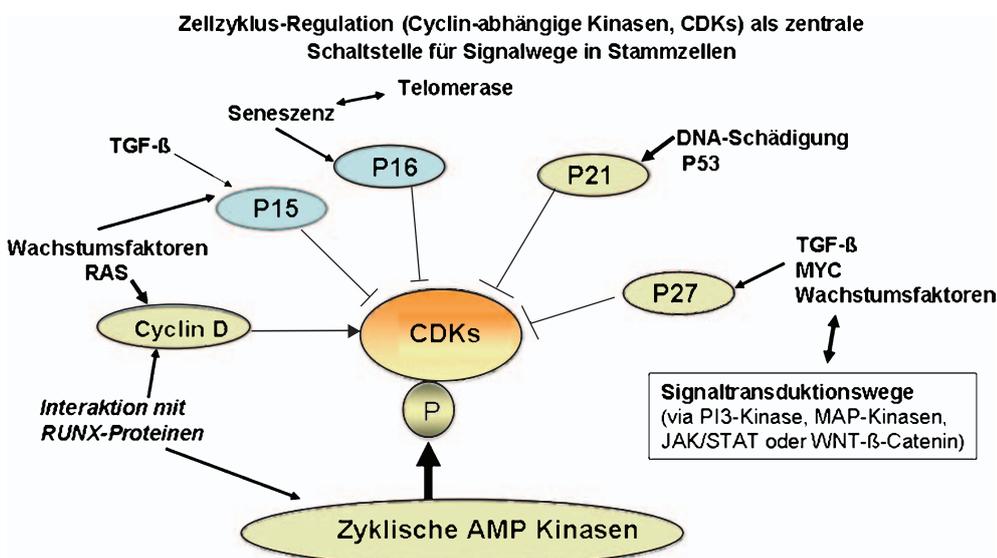


Abb. 3

2. den MAPK/RAS/RAF/MEK/ERK Signalübertragungsweg, 3. den JAK/STAT – Signalübertragungsweg sowie 4. den Wnt/ β -Catenin – Signalübertragungsweg.

1. *Der Phosphoinositide (PI) 3-Kinase Signalübertragungsweg.* Normalerweise wird die Aktivität der PI3-Kinase (PI3K) von „übergeordneten“ Signalen, wie Rezeptoren an der Zellmembran gesteuert [42]. In der Neoplasie gehen die PI3K-stimulierenden Signale in der Regel von den krankheitsspezifischen Onkoproteinen aus. Ein wichtiger Gegenspieler der PI3K ist PTEN. Diese Phosphatase, hat das Potential, die katalytische Wirkung der PI3K aufzuheben. PTEN wirkt daher als wichtiger Tumorsuppressor. Der Verlust von PTEN kann in Stammzell-Populationen eine gesteigerte Selbsterneuerungsfähigkeit und Proliferation bewirken [43]. PI3 –Kinase aktiviert nachgeschaltete Proteine wie mTOR, welche entscheidend in das Wachstum der Tumorzellen eingreifen. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass der PI3K-mTOR Signalweg eine wichtige Rolle im Wachstum und im Überleben von leukämischen Stammzellen spielt [44]. Auch für anderen Neoplasien konnte gezeigt werden, dass die PI3K und/oder mTOR eine wichtige Rolle im Wachstum und in der Proliferation der CSC spielen [45].
2. *Der Signalweg der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPKs)* Dieser Signalweg reguliert die Zellproliferation und die Differenzierung und ist daher ein potentieller Angriffspunkt für antineoplastische Therapien [46, 47]. MAPKs werden im Zytoplasma aktiviert, und translokieren dann in den Zellkern, wo sie eine große Zahl von Proteinen phosphorylieren. Das membrangebundene RAS überträgt extrazelluläre Wachstumssignale (z.B. vom epidermalen Wachstumsfaktor, EGFR, der bei vielen Malignomen überexprimiert wird) an den MAPK Signalweg, in dem es zur Aktivierung von weiteren Signalmolekülen (Raf, MEK, ERK) kommt. Man nimmt an, dass der dysregulierte MAP Kinase Signalweg auch eine Rolle in der Regulation des Wachstum in den Stammzellen von akuten myeloischen Leukämien spielt [48]. Spezifische Inhibitoren, die gegen solche Signalmoleküle gerichtet sind, werden derzeit in klinischen Studien getestet [46, 47].
3. *Der JAK/STAT-Signalübertragungsweg* reguliert den Informationsfluss von verschiedensten Faktoren wie Erythropoetin (EPO), proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 6 [49] und Insulin-like Growth Factor (IGF) [50]. Die Gruppe der STAT (Signal transducer and activator of transcription) Moleküle wird von den JAK-Kinasen durch Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert. Dies bewirkt eine Dimerisierung, Einwanderung in den Zellkern und spezifische Aktivierung definierter Gene [51]. SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling-1) gilt als negativer Regulator der IL-6R/Janus-activated kinase (JAK)-mediated activation of STAT3 und wird epigenetisch durch Promoter-Methylierung reguliert [52]. Die SOCS-Proteine wirken als negative Regulatoren des JAK/STAT-Signalweges und gelten daher als Tumorsuppressorgene. Fusionsproteine der JH1-Domäne von JAK2 mit diversen onkogenen Partnern (TEL-JAK2,

BCR-JAK2) sowie somatische Punktmutationen in der JH2-Domäne von JAK2 JAK2 (JAK2^{V617F}) bewirken eine konstitutive Tyrosinphosphorylierung von JAK2 und spielen eine Rolle bei myeloproliferativen Erkrankungen [51]. Die Aktivierung von JAK2, JAK3 und TYK2 ist in Zelllinien und CSC mit einer Aktivierung von STAT5, ERK1-2 und AKT assoziiert [53]. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass vor allem ein durch Onkoprotein-Wirkung dauerhaft aktiviertes STAT5 das Wachstum und die Proliferation von unreifen neoplastischen Zellen fördern kann [54]. In den Tumorzellen und in Leukämiezellen ist STAT5 dabei nicht nur im Kern aktiv sondern erfüllt auch im Zytoplasma die Funktionen eines Signalmoleküls [54, 55]. Vor kurzem wurde dabei gezeigt, dass eine enge funktionelle Verknüpfung zwischen PI3 Kinase und STAT5 existiert, die möglicherweise auch die Stammzellfunktionen beeinflusst [56]. Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass STAT5 in Leukämiezellen oft als aktives Tetramer auftritt [57].

4. *Der Wnt/ β -Catenin Signalweg* spielt eine wichtige Rolle für die Balance zwischen den Stammzellen und der Regulation der Differenzierung [58] in verschiedenen Stammzellnischen wie den Haarfollikeln, der Haut und den Brustdrüsen. Mutationen in diesem Signalweg – wie zB onkogene beta Catenin-Mutationen, die eine konstitutive Wnt-Aktivierung bewirken, können die Genese von Tumoren induzieren. Nach einer derartigen Mutation findet sich eine nukleäre Anreicherung von beta Catenin nur in der invasiven Front des Tumors, der in das Stroma eindringt [58]. Die unterschiedlichen Intensitäten der Wnt-Signalübertragung illustrieren also die zellulären Aktivitäten eines Tumors wie Proliferation oder epithelial-mesenchymale Übergangsprozesse [59]. Verschiedene intrinsische (zellautonome oder autokrine) und extrinsische (parakrine aus der Primärumgebung des Tumors) Faktoren könnten die Heterogenität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges innerhalb eines Tumors und bei Leukämien erklären, bei denen dieser Stammzell-assoziierte Signalweg einen Hinweis auf die Progression der Erkrankung geben kann [58].

Es ist jedoch bei allen erwähnten Signalwegen zu berücksichtigen, dass es Gemeinsamkeiten zwischen den normalen Stammzellen und CSC gibt, welche die Proliferation und die Überlebensfähigkeit ebenso wie die Kontrolle der Selbsterneuerung regulieren [60]. Damit wird klar, dass entsprechende Inhibitoren, welche man als Therapeutika entwickeln will, potentiell auch normale Stammzellen hemmen können [61].

Telomerase

Der verstärkte Trend zur Selbsterneuerung in normalen Stammzellen wie auch in CSC hängt unter anderem mit der Aktivität der Telomerase zusammen, deren Bedeutung für die Immortalisierung von malignen Zellen seit vielen Jahren bekannt ist [62, 63]. Die natürliche Verkürzung der Telomere während der Alterungsprozesse oder im Rahmen von chronischen Erkrankungen bewirkt eine Destabilisierung der Chromosomen, was die Entstehung von

Malignomen begünstigen kann. Nach den „initialen hits“ müssen die (prä)malignen Stammzellsuklone die Telomerase re-aktivieren, um eine kontinuierliche Proliferation und Weiterentwicklung einer malignen Erkrankung zu gewährleisten [63].

Rolle der unmittelbaren Primärumgebung („Microenvironment“, bzw. Nische)

Es gibt derzeit bereits viele Beispiele dafür, dass die unmittelbare Umgebung einer CSC deren Funktionen inklusive Wachstum, Selbsterneuerung und Überleben beeinflussen kann. Somit spielt diese Stammzell-Nische auch eine entscheidende Rolle in der Krebsentstehung. Überdies dürfte die Nische und deren Effektorzellen auch die Plastizität der CSC beeinflussen [64]. Die exakte zelluläre und molekulare Zusammensetzung der CSC Nische in den einzelnen Neoplasien ist nicht bekannt. Es werden aber eine Reihe von Zellarten im Zusammenhang mit der CSC Nische diskutiert. Zu diesen gehören Makrophagen, Mastzellen und Fibroblasten, wobei vor allem sogenannte nutritive Stromazellen eine Rolle spielen. Diese Nischenzellen produzieren wahrscheinlich auch eine Reihe von CSC-regulierenden Molekülen inklusive Zytokine, Matrixproteine, Enzyme. In der Zellkultur kann das Microenvironment durch das Züchten von sogenannten Spheres simuliert werden [65].

Genetische Defekte in Stromazellen, die als Komponenten der SC Nische eine Rolle spielen, kommen möglicherweise als pathogenetische Faktoren in Betracht. So wird eine derartige Situation bei einigen erblichen Erkrankungen, die mit einer höheren Krebsinzidenz zusammenhängen, diskutiert [66, 67]. Die Tatsache, dass es Patienten gibt, die nach einer Knochenmarkstransplantation in den Spenderzellen wieder eine Leukämie entwickeln, unterstützt die mögliche Bedeutung systemischer (lokaler und/oder genetischer) Faktoren im Organismus des Patienten [68]. Die unmittelbare Umgebung kann also sowohl als Tumor-Promotor für prekanzeröse oder sogar normale Zellen als auch als Tumorsuppressor für prä-maligne Zellen betrachtet werden.

Neoplasien in welchen Tumorstammzellen charakterisiert worden sind

Wie in Tabelle 1 ersichtlich, sind CSC am längsten bei Leukämien bekannt und in diesen Erkrankungen daher auch am besten charakterisiert. Bereits in den 1970er Jahren wurde postuliert, dass hämatologische Erkrankungen durch klonale Expansion von wenigen Stammzell-ähnlichen Zellen hervorgehen [69]. Im Jahr 1994 wurde dann ein Leukämie-induzierender Zelltyp mit dem Oberflächenmarkerprofil CD34+/CD38- identifiziert [70].

In soliden Tumoren ist die Situation komplexer, es werden aber in zunehmendem Maß auch bei Karzinomen CSC-artige Zellen charakterisiert. Im Jahr 2003 gelang es Al-Hajj et al. eine CD44+/CD24-/low Population aus Pleuraleffusionen von metastasierenden Mammakarzinomen zu isolieren und zu zeigen, dass diese Subpopulation in der Lage ist, den Tumor in NOD/SCID Mäusen nachzubil-

Tabelle 1. Nachweis von Tumor-Stammzellen in Malignomen

– Akute myeloische Leukämie (1994)	Dick, Lapidot, Hope, Bonnett, et al. [8, 70, 107, 108]
– Akute lymphoblastische Leukämie (1997)	Nishigaki, Wang, et al. [109, 110]
– Chronische myeloische Leukämie (1999)	Eaves, Holyoake, et al. [2, 111]
– Multiples Myelom (2003)	Asosingh, Zhang, et al. [112, 113]
– Brustkrebs (2003)	Al-Hajj, et al. [71]
– Hirntumoren (2003)	Hemmati, et al., Singh, et al. [79, 114]
– Prostata Tumoren (2005)	Collins, et al. [75]
– Magenkrebs (2004)	Houghton, et al. [76]
– Lungenkrebs (2005)	Kim, et al. [115]
– Bauchspeicheldrüsenkrebs (2007)	Li, et al. [116]
– Dickdarmkrebs (2007)	O'Brien, Ricci-Vitiani, Dalerba et al. [72–74, 117]
– Melanom (2005)	Quintana, Fang, Schatton et al. [10, 81, 118, 119]
– Hepatozelluläres Karzinom (2006)	Chiba, et al. [77]
– Ovarialkarzinom (2005)	Bapat, et al. [78]
– Ewingsarkom (2009)	Suva, et al. [80]

den [71]. In der Folge wurden CSC auch in anderen soliden Tumoren identifiziert. Zu diesen Neoplasien zählen das Colon-Karzinom [72–74], das Prostata-Karzinom [75], das Magen-Karzinom [76], das hepatozelluläre Karzinom (HCC) [77], das Ovarialkarzinom [78], sowie bestimmte Hirntumore [79]. Auch im Ewingsarkom [80] und im malignen Melanom [81] konnten NOD/SCID Maus-repopulierende CSC identifiziert werden. In vielen soliden Tumoren wurde das CD44 Antigen und das CD133 Antigen (Prominin-1) als potentielle Stammzellmarker charakterisiert. Im Melanom fanden sich unter anderem CD20 und ABCB5 als potentielle Stammzellmarker. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die bisher beschriebenen Stammzellmarker und deren Verteilung und Expression in den einzelnen Neoplasien.

Targetstrukturen und Nachweisverfahren

Diagnostische und therapeutische Verfahren können an drei Gruppen von Molekülen angreifen: (1) Oberflächenmoleküle, (2) spezifische Onkoproteine, (3) signalübertragende Moleküle und assoziierte Reaktionsketten. Eine Voraussetzung dafür ist die biologische und molekulare Charakterisierung dieser Targets.

Funktionelle Ansätze

In vitro Kulturansätze wie z.B. Kolonie-Ansätze oder Langzeitkulturen von Knochenmarkszellen auf Stroma-Feederlayern eignen sich für reifere Vorläuferzellen, reichen aber nicht für die Langzeitkultur echter Stammzellen aus [82].

Derzeit gilt das Xenotransplantationsmodell als der beste Ansatz für die funktionelle Charakterisierung der Repopulationskapazität von Stammzellen und CSC. Am

Tabelle 2. Stammzell-assoziierte Oberflächenmarker

Marker	Funktion und Expression in Tumorzellen
CD133	Das CD133 Antigen ist ein Transmembran-Molekül, das auf hämatopoetischen Stamm und Progenitorzellen, auf zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen, neuralen Stammzellen sowie Nieren- und Prostata-Stammzellen exprimiert wird.
CD33	CD33 ist ein Adhäsionsmolekül von myelomonozytären Zellen. Als Mitglied der SIGLEC Familie der Lektine, ist es durch die Eigenschaft charakterisiert, Sialinsäuren zu binden.
CD34	CD34 ist ein Adhäsionsmolekül, das auf hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, endothelialen Progenitorzellen sowie vaskulär-endothelialen Zellen vorkommt.
CD44	CD44 ist ein Zelladhäsionsrezeptor. Seine Liganden sind Hyaluronat und das Zytokin Osteopontin. CD44 wird in lymphatischen, myeloischen und erythroiden Zellen sowie mesenchymalen Stammzellen exprimiert und ist wahrscheinlich ein Indikator für Lymphknoten Metastasen.
CD29	CD29 ist ein beta1 Integrin, das eine Rolle bei der Zelladhäsion, der Embryogenese, Gewebereparatur, Immunantwort und der metastatischen Diffusion von Tumorzellen spielt. Es reagiert mit Thrombozyten, Monozyten sowie T- und B Lymphozyten und wird auch auf mesenchymalen Stammzellen exprimiert.
CD24	Das CD24 Antigen ist ein Glykosylphosphatidylinositol-bindendes Membran Sialoglykoprotein. CD24 kommt auf B- Zellen vom Prä-B bis zum reifen B Zell Stadium, aber nicht auf Plasmazellen vor. Es wird auf reifen Granulozyten und einer Vielzahl von epithelialen Zelltypen exprimiert.
CD166	Das CD166 Molekül, ist ein mesenchymaler Stammzellmarker der ein heterogenes Expressionsmuster auf epithelialen Zellen von kolorektalen Karzinomen (CRC) aufweist und dessen gesteigerte Expression mit einer schlechten Prognose von CRC Patienten in Verbindung gebracht wurde [74].
CD326	EpCAM ist ein pan-epitheliales Differenzierungs Antigen das auf der basolateralen Oberfläche von Karzinomen verschiedener Entwicklungsstufen exprimiert wird. Als homotypisches Zelladhäsions- Molekül, ist es eng mit den Cadherin-Catenin und WNT-Signaltransduktionswegen verbunden. Außerdem hat es das Potential, die Expression von Proto-Onkogenen wie c-MYC zu modulieren.
CD90	Thy-1 (CD90) wird auf vielen Zelltypen exprimiert, inklusive T-Zellen, Thymozyten, Neuronen, Endothelzellen und Fibroblasten. Die Aktivierung von Thy-1 kann T-Zellen aktivieren. Außerdem beeinflusst Thy-1 auch zahlreiche nicht-immunologische biologische Prozesse, inklusive der zellulären Adhäsion, des Auswachsens von Neuriten, des Wachstums von Tumoren und den Zelltod.
CD123	Die spezifische alpha Untereinheit des Interleukin-3 Rezeptors (IL-3R-alpha, CD123) wird auf hämatopoetischen Zellen, sowie Neutrophilen, Basophilen und Megakaryozyten aber nicht auf peripheren T-Zellen, Natural Killer Zellen, Thrombozyten und Erythrozyten exprimiert.
CD9	CD9 gehört zu einer Tetraspanin-Überfamilie und wird auf verschiedensten Blutzellen inklusive Prä-B Lymphozyten aber nicht auf hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) exprimiert. Außerdem kommt es auf vielen verschiedenen soliden Tumoren vor, und ist bei zahlreichen zellbiologischen Prozessen, wie der Zelladhäsion, Motilität, sowie der Signalübertragung aufgrund seiner Assoziation mit der Familie der Integrine involviert.
CD20	CD20 (human B-lymphocyte-restricted differentiation antigen, Bp35), ist ein hydrophobes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 35 kD. Es kommt auf Prä-B und reifen B Lymphozyten vor. Dieses Antigen findet sich auf den meisten B-Zell Non-Hodgkin's Lymphomen, aber nicht auf Stammzellen, pro-B- Zellen, normalen Plasmazellen oder anderen normalen Gewebszellen. Plasma-Blasten und stimulierte Plasmazellen können CD20 exprimieren. CD20 reguliert frühe Schritte des Aktivierungsprozesses bei der Initiierung des Zellzyklus und bei der Differenzierung und fungiert möglicherweise auch als Kalzium-Ionenkanal. CD20 bleibt immer an der Zelloberfläche und wird nicht nach Bindung an einen Antikörper internalisiert. Es gibt kein frei-zirkulierendes CD20 Antigen. Ein Medikament, das an CD20 andockt, wird daher nicht neutralisiert, bevor es die Zielzelle getroffen hat.
ABCB1(MDR1) und ABCG2	ABCB1 und ABCG2 gehören zu einer Familie von mindestens 48 menschlichen ABC Transportern, die bei verschiedensten zellulären Transportprozessen mitspielen. Sie sind Produkte der MDR Gene und bewirken die "Multidrug Resistance", indem sie Chemotherapeutika aus den Zellen herauspumpen, ebenso wie sie auch den Hoechst-Farbstoff oder Rhodamin aus den Zellen schleusen. Eine Reversion der MDR gelang in vitro mit Inhibitoren wie Verapamil .
ABCB5	ABCB5 Subfamilie B (MDR/TAP) ist ein neuer humaner ABC Transporter dessen Gen auf dem Chromosom 7p15.3 lokalisiert ist. Wie ABCB1 wirkt ABCB5 als energieabhängiger Transporter für den Drogen- Efflux sowie für den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamine-123.

häufigsten verwendet werden hierfür NOD/SCID Mäuse, die durch Kreuzung von Mäusen mit NOD (=non obese diabetes=Typ 1 Diabetes) und SCID Defekt (severe combined immune deficiency) entstehen [70]. Eine höhergradige Immundefizienz weisen jedoch NOD/SCID/beta2-microglobulin null und NOD/SCID/interleukin 2 receptor gamma chain null – Mäuse auf, in denen ein wesentlich höherer Prozentsatz von möglichen Tumorstammzellen anwachsen kann. Die NOD/LtSz-scid IL2Rgammac null (NSG) Mäuse gelten als kommendes Standardmodell in der CSC Forschung [9, 83].

Einschränkend gilt aber auch für diese neuen Xenotransplantationsmodelle, dass der Wert eines *in-vivo*-Mo-

dells, welches das Potential spezifischer Zellpopulationen zur Initiierung eines Tumors darstellen kann, auch seine Grenzen hat: (1) Malignome, die langsam wachsen (indolente oder niedrig-maligne Neoplasien bzw. Prä-Neoplasien) sind schwierig im Maus-Xenotransplantationsmodell zu analysieren, weil die Entwicklungszeit des Malignoms durchaus die Lebensdauer der Maus überschreiten kann. (2) Auch spezie-spezifische Eigenschaften der (tumorspezifischen) unmittelbaren zellulären Umgebung, welche die Proliferation der CSC beim Menschen unterstützen, können ein Problem darstellen. (3) Botenstoffe aus dem Gewebe der Maus interagieren nicht unbedingt mit den entsprechenden Rezeptoren auf

den menschlichen Tumorzellen. Deshalb werden NOD/SCID – Mäuse häufig mit menschlichen Zytokinen behandelt, oder es werden Zellen aus der Umgebung des Tumors ko-transplantiert.

Oberflächenphänotyp

Der Phänotyp von Stammzellen in verschiedenen Geweben und Organen gesunder und kranker Personen ist noch weitgehend unerforscht. Das wichtigste analytische Verfahren hierfür ist die Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting). Obwohl die so genannten Stammzell-Marker oft gewebe-spezifisch oder organ-spezifisch sind, gibt es bislang keine spezifischen Stammzell-Antigene. Vielmehr können die Stammzellpopulationen nur durch den Einsatz mehrerer Marker und mittels Mehrfarben-FACS-Analyse dargestellt und isoliert werden. Beispiele für stammzell-assoziierte Marker sind HPCA-1 (CD34), AC133 (CD133), Pgp-1 (CD44), CD29, Bmi, das Musashi-1 Antigen, sowie Oct-4 [3]. Die meisten dieser Antigene haben auch definierte Funktionen. So fungieren einige der Stammzell-Antigene als Zytokin-Rezeptoren. Obwohl CSC sehr oft phänotypische Ähnlichkeiten mit normalen Stammzellen aufweisen, gibt es doch auch einige Unterschiede. So werden die Alphaketten des IL-3-Rezeptors (CD123) und auch Siglec-3 (CD33) nach dem derzeitigen Wissensstand vor allem auf den leukämischen Stammzellen zur Expression gebracht, während normale Stammzellen zumeist nur eine geringe Expression aufweisen. Allerdings gibt es auch Hinweise, dass diese Antigene oft nur in einer Subpopulation der neoplastischen Stammzellen exprimiert werden [22, 25, 84]. Bei Antigenen wie CD44 und CD45, die auch auf normalen Stammzellen vorkommen, muss besonders beachtet werden, dass eine gezielte Therapie ebenso die Mehrzahl der normalen Stammzellen trifft, und daher eine solche Antikörpertherapie mit einer Stammzell-Transplantation kombiniert werden muss [85]. Im Gegensatz dazu sind viele Antigene der lymphatischen Linie nicht auf hämatopoietischen Stammzellen nachweisbar [22, 25, 84]. Es ist daher durchaus sinnvoll, stammzell-orientierte Therapiekonzepte für lymphatische Leukämien (ALL) und Non Hodgkin Lymphome zu entwickeln, wobei unklar ist, ob Target-Antigene wie CD52 auch in repopulierenden Subfraktionen der NHL exprimiert werden können [86]. Der exakte Phänotyp der neoplastischen Stammzelle bei lymphatischen Malignomen ist allerdings bislang noch Gegenstand laufender Forschung.

Tumor-spezifische Onkoproteine

Es wird generell angenommen, dass typische onkogene Proteine eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Progression von Leukämien und soliden Tumoren spielen. Weiters wird angenommen, dass solche Onkoproteine bereits sehr früh in der Tumorentwicklung auftreten und daher in neoplastischen Stammzellen exprimiert werden. Ein wichtiger Aspekt ist dabei, dass in vielen Neoplasien oft mehrere Onkoproteine eine Rolle spielen, vor allem wenn die Neoplasie im Rahmen der Tumorevolution und oft

auch nach einer zunächst erfolgreichen Therapie relapsiert und fortschreitet. Derartige Beobachtungen sind als Hinweis auf ein komplexeres Modell der neoplastischen Stammzellen zu deuten, die das Potential haben, aufgrund ihrer Plastizität (Subklonentwicklung) eine Therapie unbeschadet zu überstehen. So können bei verschiedensten Tumoren neoplastische Stammzellen eine sehr heterogene Population von Zellen darstellen. Bei Tumoren, die das HER-2 Rezeptorprotein exprimieren, ist die Behandlung mit spezifischen Medikamenten, die über HER-2 angreifen, meistens nicht mit einer vollständigen Eliminierung des malignen Klon (aller Subklone) assoziiert [87–92]. Für die Zukunft müssen daher die optimalen therapeutischen Ansätze erarbeitet werden, um eine möglichst effiziente Vernichtung aller Subklone zu gewährleisten.

Möglichkeiten zur therapeutischen Eradikation von CSC

Die Evaluierung der therapeutischen Eradikation von CSC steht vor neuen Herausforderungen, die durch einen grundsätzlichen Paradigmenwechsel bedingt sind. Während „klassische“ Therapien auf die möglichst effiziente Vernichtung des Großteils der Tumormasse angelegt sind, macht das CSC-Paradigma auch spezifischere Ansätze notwendig, die die Stammzellen gezielt treffen sollen. Dies stellt eine besondere Herausforderung für die präklinische Entwicklung von Medikamenten dar.

Stammzelltransplantation

Bei der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen (HSZT) werden Blutstammzellen von einem Spender auf einen Empfänger übertragen. Wie bereits in zahlreichen Übersichtsartikeln erläutert (z.B. [93]) sollen sie im Empfängermechanismus dauerhaft biologische Funktionen ausführen. Sind Spender und Empfänger ein- und dasselbe Individuum, spricht man von einer autologen HSZT. Wenn Spender und Empfänger (der selben Spezies) hingegen genetisch verschieden sind (z.B. Geschwister oder Nichtverwandte) spricht man von einer allogenen HSZT. Die HSZT gilt weiterhin als die einzige etablierte Stammzelltherapie und auch als die effektivste Therapie zur Eradikation von neoplastischen hämatopoetischen Stammzellen. Daher ist die HSZT in den meisten myeloischen Neoplasien noch immer als integraler Bestandteil in den therapeutischen Algorithmen eingebaut.

Früher chirurgischer Eingriff

Ein wichtiger Aspekt ist, dass sich CSC im Frühstadium der Tumorentwicklung oft nur lokal (und auch dort oft nur langsam) vermehren. Daher besteht vor allem im Frühstadium der Krebsentstehung die Chance den Tumor chirurgisch komplett zu eradizieren.

Polychemotherapie

Eine interessante Erkenntnis der letzten Jahrzehnte ist, dass bestimmte Neoplasien, wie beispielsweise bestimmte Formen der akuten myeloischen Leukämie (AML) und

maligne Lymphome, mittels Chemotherapie komplett ausgeheilt werden können. Dabei muss allerdings betont werden, dass (i) dies nur für einen Teil der Patienten gilt, (ii) dass zumeist eine sehr intensive (risikoreiche) Polychemotherapie erforderlich ist, und dass (iii) in der Regel mehrere Zyklen der Chemotherapie verabreicht werden müssen. Man geht in diesen Fällen davon aus, dass in einer gegebenen Population maligner Zellen immer nur ein bestimmter Anteil, z. B. 90 % vernichtet werden kann, und dieser Anteil auch für die neoplastischen Stammzellen gilt. Mit fortschreitender Behandlung bleibt dieser Anteil je nach Neoplasie gleich, d. h. nach zwei Zyklen werden rechnerisch 99 % der Zellen vernichtet sein, nach drei Zyklen 99,9 % usw. Leider stellt sich dabei oft heraus, dass die Stammzellen weit weniger empfindlich sind als reifere klonale Zellen, so dass sich in der minimalen Resterkrankung diese Stammzellen oft anreichern und dann nach einer variablen Latenzzeit zu einem Rezidiv führen.

Die richtige Auswahl von Strategien zur Eradikation der minimalen Resterkrankung (MRD) und der entsprechenden Stammzellen ist daher ein sehr wichtiges Forschungsgebiet. Im Falle der Leukämien und auch bei malignen Lymphomen wird hier in der Hochrisikosituation (bezüglich eines Relapses) oft eine Stammzelltransplantation – als intensivste Form der Konsolidierung – in Erwägung gezogen. Eine andere Strategie ist die Erhaltungstherapie mit einer weniger intensiven Zytostatikatherapie. Keine dieser Therapieformen ist allerdings stammzell-spezifisch. In den letzten Jahren wird versucht, stammzell-spezifische Therapien in die klinische Praxis zu überführen (translational concepts). Die meisten Konzepte beruhen darauf, dass die Stammzellen gegenüber vielen konventionellen Zytostatika resistent sind. Hier wird also versucht, die Chemoresistenz der Stammzellen durch Zusatz spezifischer (zielgerichteter) Medikamente zu durchbrechen. Beispiele dafür sind Hemmstoffe der Multidrug-Protein-Pumpen, welche besonders in den Stammzellen hochreguliert sind, oder der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (oft als Antikörper-Konjugat) welche mehr oder weniger stammzell-assoziierte Oberflächenmoleküle erkennen. So kann das gegen CD33 gerichtete Antikörper-Konjugat Mylotarg nicht nur reifere AML Zellen vernichten, sondern interagiert auch mit den neoplastischen Stammzellen der AML [23, 25]. Eine andere Strategie besteht darin, die ruhenden Stammzellen (neoplastische Stammzellen befinden sich sehr oft in der Ruhephase des Zellzyklus) in eine chemosensitive Phase des Zellzyklus zu überführen, sodass dann diese Zellen vermehrt auf die entsprechenden Zytostatika ansprechen. Letztlich hat man auch Versuche unternommen, neoplastische Stammzellen mit Hilfe bestimmter Medikamente (z.B. All Trans Retinsäure, ATRA oder Vitamin D) komplett ausreifen zu lassen, so dass deren eigentliche Stammzellfunktion verloren geht.

Zielgerichtete (= „targeted“) Therapien

Antikörper-Therapien (Oberflächen CD Antigene)

Vielversprechende Ansätze bei der Anwendung von Antikörpern gibt es vor allem in der Behandlung der Lym-

phome und in der Therapie der AML. Im Falle der Lymphome können vor allem CD20 Antikörper und CD52 Antikörper dazu beitragen, dass mehr CSC eliminiert werden (bessere CR Raten). Wenn auch immer noch wenig über den exakten Phänotyp von CSC bekannt ist [94], so gibt es doch einige interessante Ansätze, welche die spezifische Vernichtung von CSC mit humanisierten Antikörper-Konjugaten möglich machen. Ein derartiges Konjugat ist Mylotarg, welches aus der hochpotenten zytotoxischen Droge Calicheamicin und einem humanisierten Anti-CD33 Antikörper (hP67.6) besteht, und bereits bei AML-Patienten eingesetzt wird [95–97]. Andere potentiell therapeutische Angriffspunkte in der AML sind CD44, CD117 und CD123 [22, 25]. Es gibt auch therapeutische Ansätze mit Diphtherie-Toxin-gekoppelte Rezeptor-Liganden wie GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor) [98].

Pharmakologische Inhibitoren

Spezifische Onkoproteine stellen geeignete Angriffspunkte für gezielte Therapien mit „small molecules“ dar. Wichtige Beispiele dafür sind HER-2/neu (90), AXL [99] das mutierte Ras [46], das mutierte KIT [100] oder BCR/ABL [100, 101], die mit spezifischen Agentien und neuen Tyrosinkinase-Inhibitoren erreicht werden können. Unerwarteter Weise führt die Behandlung der BCR/ABL+ CML mit Imatinib nicht unbedingt zu einer kompletten Eliminierung des leukämischen Klons, was als Hinweis auf entsprechende Resistenzmechanismen in den Stammzellen gedeutet wird [14]. Hier spielt vor allem die intrinsische Resistenz der CML Stammzellen ein Rolle, wobei besonders die abnormale Expression von MDR-1, OCT-1 und anderen Transportproteinen als molekulare Basis der Resistenz diskutiert wird [14].

Eine andere therapeutische Strategie zielt auf tumorspezifische Signalübertragungswege. So ein Ansatz ist weniger spezifisch, richtet sich aber – im Unterschied zu den Therapien, die auf Onkoproteine abzielen – auf verschiedene Subklone von Stammzellen.

Gene, die mit der Regulation der Selbsterneuerung normaler Stammzellen assoziiert sind inkludieren Bmi-1, Notch, Wnt, und Sonic-Hedgehog. Diese Gene haben auch eine Bedeutung für die Proliferation von CSC und stellen daher attraktive Angriffspunkte für Therapien dar [102, 103].

Ein weiterer potentiell interessanter Signalweg startet von einem Transkriptionsfaktor, dem nukleären FaktorB (NF-κB), der die Apoptose inhibiert und in AML-Stammzellen konstitutiv aktiviert sein kann [104]. Spezifische Proteasom-Inhibitoren können die Expression des NF-κB hemmen, ohne normale Stammzellen zu beeinflussen [105].

Ebenfalls von eminenter Bedeutung für die intrazelluläre Signalübertragung ist die bereits erwähnte Phosphoinositid-kinase (PI3K)/das sogenannte *mammalian target of Rapamycin* mTOR. In NOD/SCID-Mäusen wurde gezeigt, dass dieser Signalweg wichtig für die Lebensfähigkeit und die Proliferation von AML-Stammzellen ist [44]. Ob mTOR tatsächlich in der Mehrzahl der Stammzellen akti-

viert ist und wie spezifisch Inhibitoren (Rapamycin und seine Derivate) das Wachstum von leukämischen Stammzellen hemmen, ist Gegenstand der Forschung [106].

Letztlich muss man davon ausgehen, dass nur der Einsatz bestimmter Medikamenten-Kombinationen zu einer nachhaltigen Eliminierung der CSC in den diversen Neoplasien führen kann. Die Auswahl der optimalen Kombinationen ist derzeit Gegenstand von vielen intensiven Forschungsprogrammen weltweit.

Ausblick

Wenn auch noch wesentliche Fragen, die den Ursprung und die Funktion der Stammzellen betreffen, unbeantwortet sind, so kann doch zusammenfassend festgestellt werden, dass die Existenz der selbsterneuerungsfähigen CSC und ihre Funktion bei der Erhaltung des Wachstums und der Heterogenität von Tumoren in verschiedensten Malignomen eine weitgehend akzeptierte Hypothese ist. Es gibt eine zunehmende Menge von Daten, welche dieses Konzept unterstützen. Logisch erscheint auch, dass der Erfolg einer Therapie mit kurativem Ziel von einer möglichst vollständigen Eliminierung der CSC abhängt. Der Schwerpunkt der Tumor-Stammzellforschung zielt daher auf eine Optimierung hochsensitiver Detektionsverfahren ab, die eine genaue Definition der Angriffspunkte (Targets) für mögliche Therapien und somit eine Eradikation der CSC ermöglichen. Überdies werden Strategien entwickelt, welche die Heterogenität und Plastizität und die damit verbundene Therapieresistenz der CSC berücksichtigen. Bezogen auf das Bild von der Stammzelle als Wurzel bzw. Keimzelle der Erkrankung bedeutet dies: Wenn auch nur eine geringe Zahl von CSC eine Therapie überleben, können sie trotz einer sichtbaren Verkleinerung des Tumors –die Ausgangsbasis für einen weiteren Tumor bzw. für Metastasen darstellen. Für die komplette Eradikation eines Tumors ist daher die gezielte therapeutische Erfassung aller CSC und ihrer Subklone notwendig, wobei auch physiologische Faktoren in der Präphase der Neoplasie und sowie genetische und epigenetische Aspekte nicht außer acht gelassen werden sollen, um möglicherweise die Entwicklung von CSC in Zukunft verhindern zu können.

Interessenskonflikt

Es besteht kein Interessenskonflikt.

Literatur

- Dick JE (2008) Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112(13): 4793–807
- Eaves CJ (2008) Cancer stem cells: here, there, everywhere? *Nature* 456(7222): 581–2
- Schulenburg A, Ulrich-Pur H, Thurnher D, Erovic B, Florian S, Sperr WR, et al (2006) Neoplastic stem cells: a novel therapeutic target in clinical oncology. *Cancer* 107(10): 2512–20
- Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, Batra SK (2007) Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers. *J Cell Mol Med* 11(5): 981–1011
- Karlic H, Varga F (2009) Epigenetics and tumorigenesis. In: Haslberger AG (ed) *Epigenetics and human health: linking hereditary, environmental and nutritional aspects*. Wiley, Hoboken, NJ, USA, pp 179–94
- Karlic H, Varga J, Thaler R, Berger C, Spitzer S, Pfeilstöcker M, et al (2010) Effects of epigenetic drugs (Vorinostat, Decitabine) on metabolism-related pathway factors in leukemic cells. *Open Leuk J* 3: 34–42
- Schulenburg A, Bramswig K, Herrmann H, Karlic H, Mirkina I, Hubmann R, et al (2010) Neoplastic stem cells: current concepts and clinical perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol* (in press)
- Dick JE (1996) Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice. *Semin Immunol* 8(4): 197–206
- Agliano A, Martin-Padura I, Mancuso P, Marighetti P, Rabascio C, Pruneri G, et al (2008) Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *Int J Cancer* 123(9): 2222–7
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ (2008) Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456(7222): 593–8
- Taussig DC, Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, Pearce DJ, Allen K, Ridler C, et al (2008) Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* 112(3): 568–75
- Kim JB, Ko E, Han W, Lee JE, Lee KM, Shin I, et al (2008) CD24 cross-linking induces apoptosis in, and inhibits migration of, MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer* 8: 118
- Muehlberg FL, Song YH, Krohn A, Pinilla SP, Droll LH, Leng X, et al (2009) Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis* 30(4): 589–97
- Valent P, Deininger M (2008) Clinical perspectives of concepts on neoplastic stem cells and stem cell-resistance in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 49(4): 604–9
- Hofmann WK, Komor M, Wassmann B, Jones LC, Gschaidmeier H, Hoelzer D, et al (2003) Presence of the BCR-ABL mutation Glu255Lys prior to STI571 (imatinib) treatment in patients with Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 102(2): 659–61
- Dean M, Fojo T, Bates S (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5(4): 275–84
- Jiang X, Zhao Y, Smith C, Gasparetto M, Turhan A, Eaves A, et al (2007) Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia* 21(5): 926–35
- Hu S, Franke RM, Filipinski KK, Hu C, Orwick SJ, de Bruijn EA, et al (2008) Interaction of imatinib with human organic ion carriers. *Clin Cancer Res* 14(10): 3141–8
- Baccarani M, Rosti G, Castagnetti F, Haznedaroglu I, Porkka K, Abruzzese E, et al (2009) Comparison of imatinib 400 mg and 800 mg daily in the front-line treatment of high-risk, Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *Blood* 113(19): 4497–504
- Vianello F, Villanova F, Tisato V, Lymperi S, Ho KK, Gomes AR, et al (2010) Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica* 95: 1081–5
- Jiang ZP, Xu P, Wang GP, Zhao XL, Chen FP (2010) Hypothesizing that histone deacetylase inhibitors can be used to reverse multiple drug resistance. *Med Hypotheses* 74(1): 92–4
- Florian S, Sonneck K, Hauswirth AW, Krauth MT, Scherthaner GH, Sperr WR, et al (2006) Detection of molecular targets on the surface of CD34+/CD38- stem cells in various myeloid malignancies. *Leuk Lymphoma* 47(2): 207–22
- Sperr WR, Florian S, Hauswirth AW, Valent P (2005) CD 33 as a target of therapy in acute myeloid leukemia: current status and future perspectives. *Leuk Lymphoma* 46(8): 1115–20
- Sperr WR, Hauswirth AW, Florian S, Ohler L, Geissler K, Valent P (2004) Human leukaemic stem cells: a novel target of therapy. *Eur J Clin Invest* 34[Suppl 2]: 31–40
- Hauswirth AW, Florian S, Printz D, Sotlar K, Krauth MT, Fritsch G, et al (2007) Expression of the target receptor CD33 in CD34+/CD38-/CD123+ AML stem cells. *Eur J Clin Invest* 37(1): 73–82

26. Haslberger A, Varga F, Karlic H (2006) Recursive causality in evolution: a model for epigenetic mechanisms in cancer development. *Med Hypotheses* 67: 1448–54
27. Kozlov AP (2010) The possible evolutionary role of tumors in the origin of new cell types. *Med Hypotheses* 74(1): 177–85
28. Moore MA (2005) Converging pathways in leukemogenesis and stem cell self-renewal. *Exp Hematol* 33(7): 719–37
29. Moqattash S, Lutton JD (1998) Leukemia cells and the cytokine network. *Proc Soc Exp Biol Med* 219(1): 8–27
30. Bollag G, Clapp DW, Shih S, Adler F, Zhang YY, Thompson P, et al (1996) Loss of NF1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in haematopoietic cells. *Nat Genet* 12(2): 144–8
31. Bruns I, Czibere A, Fischer JC, Roels F, Cadeddu RP, Buest S, et al (2009) The hematopoietic stem cell in chronic phase CML is characterized by a transcriptional profile resembling normal myeloid progenitor cells and reflecting loss of quiescence. *Leukemia* 23(5): 892–9
32. Viale A, De Franco E, Orleth A, Cambiaghi V, Giuliani V, Bossi D, et al (2009) Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells. *Nature* 457(7225): 51–6
33. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8): 2013–26
34. Grinstein E, Mahotka C (2009) Stem cell divisions controlled by the proto-oncogene BMI-1. *J Stem Cells* 4(3): 141–6
35. Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, et al (2003) Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423(6937): 302–5
36. Drexler HG (1998) Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia* 12(6): 845–59
37. Aoki E, Uchida T, Ohashi H, Nagai H, Murase T, Ichikawa A, et al (2000) Methylation status of the p15INK4B gene in hematopoietic progenitors and peripheral blood cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 14(4): 586–93
38. Cameron ER, Blyth K, Hanlon L, Kilbey A, Mackay N, Stewart M, et al (2003) The Runx genes as dominant oncogenes. *Blood Cells Mol Dis* 30(2): 194–200
39. Kumano K, Kurokawa M (2010) The role of Runx1/AML1 and Evi-1 in the regulation of hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 222(2): 282–5
40. Bee T, Swiers G, Muroi S, Pozner A, Nottingham W, Santos AC, et al (2010) Nonredundant roles for Runx1 alternative promoters reflect their activity at discrete stages of developmental hematopoiesis. *Blood* 115(15): 3042–50
41. Fodde R, Brabletz T (2007) Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol* 19(2): 150–8
42. Bunney TD, Katan M (2010) Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. *Nat Rev Cancer* 10(5): 342–52
43. Hill R, Wu H (2009) PTEN, stem cells, and cancer stem cells. *J Biol Chem* 284(18): 11755–9
44. Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M (2003) Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* 102(3): 972–80
45. Easton JB, Houghton PJ (2006) mTOR and cancer therapy. *Oncogene* 25(48): 6436–46
46. Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 25(6): 511–8
47. Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26(22): 3291–310
48. Majeti R, Becker MW, Tian Q, Lee TL, Yan X, Liu R, et al (2009) Dysregulated gene expression networks in human acute myelogenous leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(9): 3396–401
49. Tao W, Wen F, Zhang H, Liu G (2009) The signal transduction mediated by erythropoietin and proinflammatory cytokines in the JAK/STAT pathway in the children with cerebral palsy. *Brain Dev* 31(3): 200–7
50. Himpe E, Kooijman R (2009) Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors* 35(1): 76–81
51. Valentino L, Pierre J (2006) JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol* 71(6): 713–21
52. Lee TL, Yeh J, Van Waes C, Chen Z (2006) Epigenetic modification of SOCS-1 differentially regulates STAT3 activation in response to interleukin-6 receptor and epidermal growth factor receptor signaling through JAK and/or MEK in head and neck squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Ther* 5(1): 8–19
53. Knoops L, Hornakova T, Royer Y, Constantinescu SN, Renaud JC (2008) JAK kinases overexpression promotes in vitro cell transformation. *Oncogene* 27(11): 1511–9
54. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19(21): 2474–88
55. Kato Y, Iwama A, Tadokoro Y, Shimoda K, Minoguchi M, Akira S, et al (2005) Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J Exp Med* 202(1): 169–79
56. Harir N, Pecquet C, Kerenyi M, Sonneck K, Kovacic B, Nyga R, et al (2007) Constitutive activation of STAT5 promotes its cytoplasmic localization and association with PI3-kinase in myeloid leukemias. *Blood* 109(4): 1678–86
57. Moriggl R, Sexl V, Kenner L, Duntsch C, Stangl K, Gingras S, et al (2005) STAT5 tetramer formation is associated with leukemogenesis. *Cancer Cell* 7(1): 87–99
58. Polakis P (2007) The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17(1): 45–51
59. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133(4): 704–15
60. Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, et al (2005) Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 23(7): 879–94
61. Jones RJ, Matsui WH, Smith BD (2004) Cancer stem cells: are we missing the target? *J Natl Cancer Inst* 96(8): 583–5
62. Shay JW, Bacchetti S (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33(5): 787–91
63. Deville L, Hillion J, Segal-Bendirdjian E (2009) Telomerase regulation in hematological cancers: a matter of stemness? *Biochim Biophys Acta* 1792(4): 229–39
64. Bissell MJ, Labarge MA (2005) Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell* 7(1): 17–23
65. Kumar HR, Zhong X, Hoelz DJ, Rescorla FJ, Hickey RJ, Malkas LH, et al (2008) Three-dimensional neuroblastoma cell culture: proteomic analysis between monolayer and multicellular tumor spheroids. *Pediatr Surg Int* 24(11): 1229–34
66. De Wever O, Mareel M (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 200(4): 429–47
67. Waite KA, Eng C (2003) From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet* 4(10): 763–73
68. Boyd CN, Ramberg RC, Thomas ED (1982) The incidence of recurrence of leukemia in donor cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Res* 6(6): 833–7
69. Minden MD, Buick RN, McCulloch EA (1979) Separation of blast cell and T-lymphocyte progenitors in the blood of patients with acute myeloblastic leukemia. *Blood* 54(1): 186–95
70. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367(6464): 645–8

71. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(7): 3983–8
72. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445(7123): 106–10
73. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445(7123): 111–5
74. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, et al (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(24): 10158–63
75. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65(23): 10946–51
76. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, et al (2004) Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306(5701): 1568–71
77. Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, et al (2006) Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 44(1): 240–51
78. Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, Kurrey NK (2005) Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 65(8): 3025–9
79. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al (2003) Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(25): 15178–83
80. Suva ML, Riggi N, Stehle JC, Baumer K, Tercier S, Joseph JM, et al (2009) Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 69(5): 1776–81
81. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al (2005) A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 65(20): 9328–37
82. Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ (1990) Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(9): 3584–8
83. Sanchez PV, Perry RL, Sarry JE, Perl AE, Murphy K, Swider CR, et al (2009) A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. *Leukemia* 23(11): 2109–17
84. Herrmann H, Baumgartner C, Sperr WR, Holmes S, Valent P (2008) Phenotypic and functional characterization of CD34+/CD38-/CD123+Leukemic Progenitor (Stem) cells in AML: a flow cytometric approach. *Blood* 112(11): 483
85. Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, Saleh M, Gordon L, LoBuglio AF, et al (1999) Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol* 17(1): 268–76
86. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, et al (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 16(8): 2825–33
87. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344(11): 783–92
88. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, et al (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353(16): 1673–84
89. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al (2005) Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353(16): 1659–72
90. Esteva FJ, Valero V, Booser D, Guerra LT, Murray JL, Pusztai L, et al (2002) Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20(7): 1800–8
91. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M, Tagliabue E, et al (2004) Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 10(17): 5650–5
92. Burstein HJ, Harris LN, Marcom PK, Lambert-Falls R, Havlin K, Overmoyer B, et al (2003) Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm. *J Clin Oncol* 21(15): 2889–95
93. Ottinger H, Müller C, Beelen DW, Ehninger G, Schmitz N, Zander A, et al (2006) Entwicklungen in der hämatopoetischen Stammzelltransplantation. *Deutsches Ärzteblatt* 103(37): 2781–6
94. Clarke MF, Fuller M (2006) Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 124(6): 1111–5
95. Sievers EL (2004) Native antibody and antibody-targeted chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Adv Pharmacol* 51: 169–83
96. Zein N, Sinha AM, McGahren WJ, Ellestad GA (1988) Calicheamicin gamma II: an antitumor antibiotic that cleaves double-stranded DNA site specifically. *Science* 240(4856): 1198–201
97. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peoppl AG, Wilkinson L, et al (2009) Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell* 5(1): 31–42
98. Hall PD, Willingham MC, Kreitman RJ, Frankel AE (1999) DT388-GM-CSF, a novel fusion toxin consisting of a truncated diphtheria toxin fused to human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, prolongs host survival in a SCID mouse model of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 13(4): 629–33
99. Zhang YX, Knyazev PG, Cheburkin YV, Sharma K, Knyazev YP, Orfi L, et al (2008) AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res* 68(6): 1905–15
100. Healy EF, Johnson S, Hauser CR, King PJ (2009) Tyrosine kinase inhibition: ligand binding and conformational change in c-Kit and c-Abl. *FEBS Lett* 583(17): 2899–906
101. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2(5): 561–6
102. Lessard J, Sauvageau G (2003) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423(6937): 255–60
103. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, et al (2003) A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423(6938): 409–14
104. Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, et al (2001) Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 98(8): 2301–7
105. Traenckner EB, Wilk S, Baeuerle PA (1994) A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *Embo J* 13(22): 5433–41
106. Recher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, Chicanne G, Dos Santos C, Mas VM, et al (2005) Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 105(6): 2527–34
107. Hope KJ, Jin L, Dick JE (2004) Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 5(7): 738–43
108. Bonnet D, Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3(7): 730–7

109. Nishigaki H, Ito C, Manabe A, Kumagai M, Coustan-Smith E, Yanishevski Y, et al (1997) Prevalence and growth characteristics of malignant stem cells in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 89(10): 3735–44
110. Wang L, O'Leary H, Fortney J, Gibson LF (2007) Ph⁺/VE-cadherin⁺ identifies a stem cell like population of acute lymphoblastic leukemia sustained by bone marrow niche cells. *Blood* 110(9): 3334–44
111. Holyoake T, Jiang X, Eaves C, Eaves A (1999) Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood* 94(6): 2056–64
112. Asosingh K, Willems A, Van Riet I, Van Camp B, Vanderkerken K (2003) Delayed in vivo disease progression is associated with high proportions of CD45⁺ myeloma cells in the 5T2MM murine model. *Cancer Res* 63(12): 3019–20
113. Zhang XG, Gaillard JP, Robillard N, Lu ZY, Gu ZJ, Jourdan M, et al (1994) Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood* 83(12): 3654–63
114. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63(18): 5821–8
115. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al (2005) Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121(6): 823–35
116. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67(3): 1030–7
117. Ricci-Vitiani L, Fabrizio E, Palio E, De Maria R (2009) Colon cancer stem cells. *J Mol Med* 87: 1097–104
118. Schatton T, Frank MH (2008) Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 21(1): 39–55
119. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, et al (2008) Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451(7176): 345–9