

METODY IZOLACJI KOMÓREK MACIERZYSTYCH RAKA NERKI

ISOLATION OF RENAL CANCER STEM CELLS

Igor HELBRECHT^{1,2&}, Łukasz SZYMANSKI^{1,2&}, Michał FIEDOROWICZ^{3*},
Damian MATAK^{1,4}, Ewa BARTNIK^{2,5}, Paweł GOLIK^{2,5},
Cezary SZCZYLIK^{1,4}, Anna M. CZARNECKA¹

¹Klinika Onkologii, Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa

²Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,
Warszawa

³Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN,
Warszawa

⁴Studium Medycyny Molekularnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
Warszawa

⁵ Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk, Warszawa

Streszczenie: Nowotworowe komórki macierzyste (CSCs) definiuje się jako frakcję komórek nowotworowych posiadającą zdolność klonogenną, wyrażających czynniki transkrypcyjne macierzystości takie jak Nanog, Nestin, Oct4 i Pax2. Nowotworowe komórki macierzyste, po raz pierwszy zidentyfikowane w białaczce, opisano w ostatnich latach także w raku nerki (RCC). Komórki te potrafią formować sfery, *in vitro* różnicować się w komórki endotelialne i epitelialne, a co najważniejsze indukują guzy w myszach SCID. Techniki izolacji i badania CSCs wykorzystują właściwości specyficzne tych komórek, aby wydzielić je z masy guza nowotworowego lub hodowli komórkowej. Dziś znane są metody izolacji RCC CSCs oparte na powinowactwie do antygeny powierzchniowego CD105 (endoglina). Podobnie komórki CD133+ w RCC są najprawdopodobniej populacją komórek CSC, a także komórki CXCR4. Podobnie do izolacji CSC wykorzystywana jest ocena ekspresji markerów wewnątrzkomórkowych w tym białka ALDH1, DNAJB8 oraz PIK3R1. Opisane metody izolacji pozwalają uzyskać komórki CSC z hodowli pierwotnych i ustabilizowanych linii komórkowych, a także hodowli komórek po izolacji z ksenograftów i w obecności leków. Dodatkową metodą izolacji CSC jest izolacja komórek tzw. populacji bocznej (SP) z wykorzystaniem barwnika Hoechst 33342 lub rodaminy (Rh123). Komórki o fenotypie SP wykazują ponadto wysoką aktywność enzymu ALDH1. Fenotyp macierzystości może być także indukowany poprzez manipu-

lowanie składem pożywki do hodowli komórek. Podobnie stosowanie hodowli sfer komórkowych 3D pozwala na uzyskanie warunków jeszcze bardziej zbliżonych do *in vivo* i wzrostu CSC. Analogiczne właściwości ma hodowla komórkowa 2D przy obniżonym stężeniu czynników wzrostu. Odkrycie charakterystyki komórek o cechach macierzystości oraz metody ich pozyskiwania z linii komórkowych unikatową metodą badawczą jest zaledwie wstępem do dalszych badań. Ogromne zróżnicowanie markerów i metod izolacji RCC-CSC przyczynia się do trudności w określeniu optymalnej metody izolacji i wymaga dalszej optymalizacji.

Słowa kluczowe: nowotworzenie, ccRCC, nowotworowe komórki macierzyste

Summary: Cancer stem cells (CSCs) are defined as a fraction of tumor cells having a clonogenic ability, expressing stemness transcriptional factors such as Nanog, Nestin, Oct4 and Pax2. CSCs for the first time identified in leukemia, have also been recently described in renal cancer (RCC). These cells can form 3D spheres, that differentiate *in vitro* into endothelial and epithelial cells, and induce tumors in SCID mice. Isolation techniques and CSCs studies use the specific properties of these cells to separate them from tumor mass or cell culture. Today, methods for the isolation of RCC CSCs that are based on affinity to the surface antigen CD105 (endoglin) are known. Similarly, CD133(+) cells in RCC are most likely CSCs as well as CXCR-4 cells. Similarly to the CSC isolation, the expression of intracellular markers is used, including ALDH1, DNAJB8 and PIK3R1. These isolation methods allow CSCs to be harvested from primary and stabilized cell line cultures as well as cell culture after isolation from xenografts and in the presence of drugs. An additional method of CSC isolation is the isolation of cells called side population (SP) with the use of Hoechst 33342 dye or rhodamine (Rh123). SP cells display high ALDH1 activity. The parent phenotype can also be induced by manipulating the composition of the cell culture medium. Similarly, the cultivation of 3D cell spheres are conditions even closer to *in vivo* and promote CSC growth. The 2D cell culture with reduced concentration of growth factors has similar properties. The huge diversity of markers and methods of RCC-CSC insulation contributes to difficulties in determining the optimal method of isolation and requires further optimization.

Keywords: carcinogenesis, ccRCC, cancer stem cells

Wykaz stosowanych skrótów: **ALDH1** – dehydrogenaza aldehydowa 1 (ang. *Aldehyde Dehydrogenase 1*); **CAIX** – anhydraza węglanowa IX (ang. *Carbonic Anhydrase IX*); **ccRCC** – rak jasnokomórkowy nerki (ang. *clear cell Renal Cell Cancer*); **CTC** – krążące komórki nowotworowe (ang. *Circulating Tumor Cells*); **CXCR4** – receptor chemokiny typu 4 (ang. *C-X-C chemokine Receptor type 4*); **EMT** – przemiana epithelialno mezenchymalna (ang. *epithelial-mesenchymal transition*); **HIF** – czynnik indukowany hipoksją (ang. *Hypoxia-Inducible Factor*); **IL-2** – interleukina 2 (ang. *Interleukin 2*); **INF** – interferon (ang. *Interferon*); **MET** – przemiana mezenchymalna epithelialna (ang. *Mesenchymal-Epithelial Transition*); **mTOR** – kinaza mTOR (ang. *mammalian Target Of Rapamycin*); **NCAM** – cząsteczka adhezji komórek neuronowych (ang. *Neural Cell Adhesion Molecule*); **ORR** – poziom obiektywnych odpowiedzi (ang. *Objective Response Rate*); **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *Platelet-Derived Growth Factor*); **PFS** – czas przeżycia wolnego od progresji (ang. *Progression-Free Survival*); **RCC** – rak nerki (ang. *Renal Cell Cancer*); **TGF-1** – transformujący czynnik wzrostu 1 (ang. *Transforming Growth Factor beta 1*); **TIC** – komórki inicjujące guza (ang. *Tumor Initiating Cells*); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*); **VHL** – gen Hippela-Lindau (ang. *Von Hippel-Lindau gene*).

WSTĘP

Obecnie nowotworowe komórki macierzyste definiuje się jako małą frakcję komórek nowotworowych posiadającą zdolność klonogenną, wyrażającą obecność markerów macierzystości takich jak Nanog oraz Oct4, przy braku ekspresji markerów endotelialnych i epitelialnych. Ponadto, komórki te cechują się dużą plastycznością, czyli mogą różnicować się w różne linie komórkowe, potrafią rosnąć w sferycznych koloniach w warunkach nieadhezyjnych, oraz indukują *in vivo* nowotwory posiadające zróżnicowane i niezróżnicowane komórki podczas seryjnych przeszczepów ksengenicznych. Właściwości kancerogenne komórek są sprawdzane poprzez ich zdolność do tworzenia nowotworów po podaniu zwierzętom o upośledzonej odporności, np. myszom SCID [1].

Nowotworowe komórki macierzyste mogą dzielić się w sposób asymetryczny, wówczas powstaje jedna nowotworowa komórka macierzysta oraz jedna nowotworowa komórka progenitorowa jak również w sposób symetryczny, w którym powstają dwie identyczne nowotworowe komórki macierzyste. Podejrzewa się, że nowotworowe komórki macierzyste mogą również dzielić się symetrycznie na dwie komórki progenitorowe, tym samym zmniejszając populację nowotworowych komórek macierzystych w guzie. Nowotworowe komórki progenitorowe, analogicznie do zdrowych komórek progenitorowych, są wczesnym stadium zróżnicowania nowotworowych komórek macierzystych, z ograniczonym potencjałem samoodnowy oraz różnicowania [2].

CSC zostały po raz pierwszy zidentyfikowane w białaczkę [3], a następnie w wielu guzach litych takich jak glejak, rak piersi, gruczołu krokowego, trzustki, jelita grubego, wątroby, płuc, jajnika [4], a także rak nerki [5]. Ważnym czynnikiem w rozwoju nowotworu i powstawaniu CSC jest niedobór tlenu. Hipoksja indukuje w komórkach nowotworowych cechy macierzystości lub wręcz stymuluje je do uzyskania takiego fenotypu, zwiększając ich oporność na leki i ograniczając wrażliwość na apoptozę [6]. Dodatkowo brak tlenu aktywuje czynnik HIF-1, co indukuje syntezę czynników wzrostu potrzebnych do unaczynienia nowotworu, a unaczynienie ułatwia migracje i przerzutowanie nowotworu [7, 8]. W proces wzrostu CSC i angiogenezy tkanki raka zaangażowane są także komórki CAF (ang. *Cancer Associated Fibroblasts*) będące częścią zrębu guza. Ponad 40% CAF powstaje w procesie EMT [9-11].

METODY IZOLACJI CSC

Techniki izolacji i badania CSCs wykorzystują właściwości specyficzne tych komórek, aby wydzielić je z masy guza nowotworowego lub hodowli komórko-

wej. Cechą wyróżniającą CSC wykorzystywaną do izolacji jest zarówno ekspresja białek–markerów powierzchniowych (przeгляд w tab. 1), tworzenia kolonii, czy oporność na barwienie znacznikami fluorescencyjnymi. Techniki izolacji CSCs można podzielić na opierające się na parametrach fizycznych (takich jak wielkość, czy gęstość) lub na powinowactwie (chemiczne, magnetyczne, elektryczne [12]. Techniki oparte na powinowactwie są obecnie częściej stosowane ze względu na ich większą precyzję [13]:

- FACS (ang. *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) – metoda oparta na cytometrii przepływowej. Do sortowanych komórek przyłączają się przeciwciała połączone ze znacznikiem fluorescencyjnym, co pozwala na izolowanie subpopulacji komórek o wysokiej lub niskiej ekspresji określonych antygenów;

- MACS (ang. *Magnetic Activated Cell Sorting*) – wykorzystuje przeciwciała połączone z superparamagnetycznymi nanocząstkami (o średnicy rzędu 100 nm), co pozwala na rozdzielenie subpopulacji komórek w gradiencie pola magnetycznego.

OCENA EKSPRESJI MARKERÓW POWIERZCHNIOWYCH

Izolacja komórek CD105+

Metodę MACS wykorzystano w oznaczaniu antygeny powierzchniowego CD-105, będącego potencjalnym markerem macierzystości. Komórki zostały wyznakowane przeciwciałami monoklonalnymi (mAb) z magnetycznymi kulkami. Inkubacja trwała 20 min. po czym komórki zostały przepłukane dwukrotnie i zawieszono w buforze MACS (PBS pozbawione Ca^{2+} i Mg^{2+} wzbogacone o 1% BSA i 5mM EDTA) w stężeniu 2×10^7 komórek/80 μl . Po płukaniu komórki zostały rozdzielone przy pomocy kolumny magnetycznej zgodnie z zaleceniami producenta [5].

W raku nerkowokomórkowym Bussolati *et al.* zidentyfikowali małą (mniej niż 10%) populację komórek, wyrażających marker CD105, charakteryzujących się właściwościami komórek propagujących guzy [5]. Komórki CD105+ charakteryzują się obecnością markerów mezenchymalnych takich jak CD44, CD90, CD146 i CD29, jak również markerów komórek macierzystych takich jak Nanog, Nestin, Oct4 i Pax2. Co więcej, mają właściwości klonogenne, potrafią formować sfery, *in vitro* różnicować się w komórki endotelialne i epitelialne, a co najważniejsze ze 100% częstością indukują guzy w myszach SCID [5]. Należy jednak zaznaczyć, że w tych badaniach przy hodowli komórek CD105+ użyto surowicy oraz deksametazonu, które znane są z indukowania różnicowania się wielu rodzajów komórek pluripotencjalnych [14, 15].

Populacja komórek nowotworowych eksprymująca CD105 jest potencjalną populacją TIC. Zbadano wpływ hipoksji na angiogenezę oraz jej rolę w komórkach CD105 pozytywnych. Do tych celów pozyskano linię komórkową HDMEC

pochodzącą z ludzkich skórnych komórek śródbłonkowych naczyń włosowatych (ang. *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*, HDMEC). Warunki hipoksji uzyskano przez mieszaninę gazów: 0,2% tlenu, 5% dwutlenku węgla oraz 94,8% azotu. Ekspozycja była prowadzona przy temperaturze 37°C. Hodowle kontrolne o tej samej konfluencji były prowadzone w warunkach normoksji (20% tlenu, 5% dwutlenku węgla i 75% azotu). Badania wykazały, że hipoksja powoduje wzrost ekspresji genu CD105. Co więcej, komórki o podwyższonej ekspresji CD105 w warunkach hipoksji były mniej podatne na apoptozę, co sugeruje fenotyp CSC [6]. Zbadano też komórki raka pobrane z nerek pacjentów po radykalnej nefrektomii. Udało się otrzymać 3 histotypy i 2 linie jasnokomórkowe. Komórki z podwyższoną ekspresją CD105 wykazywały znacznie silniejsze cechy macierzystości od komórek nieekspozujących tego białka [5]. Przebadano również komórki złośliwego oponiaka. Badanie prowadzono nie tylko po to żeby stwierdzić, czy są one komórkami macierzystymi, ale także, aby zdefiniować tkanki, w których komórki te mogą różnicować. W badaniu użyto komórek wyizolowanych z pierwotnej linii RM (ang. *Rhabdoid Meningioma*). Wyprowadzono z nich również komórki CD105 pozytywne i przebadano. Do izolacji komórek CD105 pozytywnych użyto systemu MACS. Zbadano też formowanie sfer przez te komórki i porównano ilość sfer formowanych przez obie populacje. Wyniki pokazały, że populacja komórek RM CD105 pozytywnych może być utrzymywana przez 50 generacji i charakteryzuje się efektywniejszą proliferacją i formowaniem sfer niż komórki CD105 negatywne. Eksperymenty *in vivo* wykazały, że komórki CD105 pozytywne mają znacznie wyższy potencjał odtwarzania kompletnych tkanek nowotworowych w myszach bezgranicznych niż CD105 negatywne. Odkryto później, iż komórki CD105 pozytywne mogą różnicować w adipocyty i osteocyty [16]. Subpopulację komórek CD105 pozytywnych zidentyfikowano także w ksenograftach RCC oraz guzach pobranych od pacjentów. Komórki te charakteryzowały się zdolnością tworzenia sfer *in vitro* oraz guzów u myszy. Guzy u myszy z komórek CD105 pozytywnych powstawały także przy niskiej podanej liczbie komórek.

Wyciszenie genu CD105 przez shRNA (ang. *short hairpin RNA*) i CRISPR/cas9 zmniejszało ekspresję markerów macierzystości oraz zdolność do tworzenia sfer, a nasilało starzenie komórek. Ponadto wyciszenie ekspresji CD105 zmniejszało zdolność tworzenia guzów u myszy oraz oporność komórek na chemioterapię gemcytabiną. Fenotyp macierzystości zależny od ekspresji CD105 był wyrażany przez regulację genów CDA, MYC i NANOG, a CDA było demetylazą MYC i NANOG [17]. Nokaut transglutaminazy TG2 w przerzutowych komórkach Caki-1 zmniejszał ekspresję CD44, CD73 oraz CD105 [18]. Z kolei izoforma mb-IL-15 o krótkim czasie półtrwania (tmb-IL-15) chroniła komórki macierzyste CD105+ przed śmiercią komórkową wywołaną deprivacją serum [19].

TABELA 1. Potencjalne markery komórek macierzystych raka nerki
TABLE 1. Potential markers of renal cancer stem cells

Potencjalny marker	Weryfikacja fenotypu CSC	Metoda selekcji	Badane linie komórkowe	Literatura
ALDH1/SP	Hoechst 33342, ALDEFLUOR	Cytometria przepływowa	Nerkowe: ACHN, KRC/Y	[39]
ALDH1	ALDEFLUOR	MACS	Jajnikowe: AMOC-2, HUOA, OVCAR-3, ES-2, RMG-1, TOV-21G	[38]
SP	Hoechst 33342	Cytometria przepływowa	Nerkowe: 769P, 786-O, OS-RC-2, SN12C, SKRC39	[44]
DNAJB8/SP	Hoechst 33342	Cytometria przepływowa	Nerkowe: ACHN, CAKI-1, SMKT-R2 i SMKT-R3; nerkowe (mysz): RenCa	[40]
Stężenie rodaminy	Rodamina 123	Cytometria przepływowa	Nerkowe: 786-O	[43]
CD105	hipoksja/normoksja	Immunocytochemia	Naczyniowe: HDMEC	[6]
CD105	Formowanie sfer	MACS	Nerkowe linie pierwotne	[5]
CD105	Formowanie sfer	MACS	Linie pierwotne oponiaka	[16]
CD133	Angiogeneza	MACS	Nerkowe linie pierwotne	[20]
CD133	Różnicowanie w osteoblasty i adipocyty	MACS	Nerkowe linie pierwotne	[22]
CXCR4	Formowanie sfer	Cytometria przepływowa	Nerkowe: RCC-26, RCC-53	[28]
CXCR4	Formowanie sfer	Cytometria przepływowa	Nerkowe Caki-1, Caki-2, 789-O, 769-P	[29]
Oct-4	Hodowla w kapsule	Oporność na docetaksel	Nerkowe (mysz): RENCA	[53]
ALDH1	ALDEFLUOR	Cytometria przepływowa	Nerkowe: ACHN, CAKI-2	[45]
Niska ekspresja PIK3R1	Formowanie sfer	Knock-out metodą CRISPR/Cas9	Nerkowe: HK-2, 786-O, A-704 oraz linie pierwotne	[41]
ALDH1	Formowanie Sfer, ALDEFLUOR	Immunocytochemia	Nerkowe SN12C	[46]
CTR2	Ekspresja CD133+ i CD24+	Cytometria przepływowa	Nerkowe linie pierwotne	[24]

Izolacja komórek CD133+

Bruno i wsp. [20] zbadali implikacje obecności komórek CD-133 pozytywnych w raku nerki. Przebadano 30 przypadków raka nerki. Należały do nich 23 komórki linie jasnokomórkowe, 4 papilarne, jedna chromofobowa i dwa nieokreślone raki nerki. Do izolacji komórek posłużono się metodą MACS. Badania wykazały, że CD133 pozytywne są zdolne do formowania naczyń krwionośnych po wszczępieniu myszom SCID. TIC ekspresyjące CD133 zostały wykryte również w innych typach nowotworów takich jak rdzeniaki czy glejaki. Komórki pochodzenia nabłonkowego reprezentują ten sam fenotyp z wysoką ekspresją CD133 [21]. Podobne badania na różnych liniach pierwotnych raka nerki przeprowadzili Abassi i wsp. [22] i stwierdzili, że komórki CD133+ w raku nerki są najprawdopodobniej populacją komórek CSC. Guzy ccRCC zawierają zwiększoną liczbę komórek CD133+, które ekspresyjają marker komórek macierzystych oraz charakteryzują się powolną proliferacją. Komórki te nie były zdolne do indukowania guzów po transplantacji, ale sprzyjały formowaniu guzów przez zróżnicowane komórki nowotworowe [23].

Komórki CD133 wyizolowano także z linii pierwotnych. Okazało się, że wszystkie linie je posiadały, co więcej 85% z nich miało też marker CD24. Komórki CD133+ CD24+ posiadały duże stężenie białka powierzchniowego CTR2, pełniące go ważną rolę w lekooporności. CTR2 uznano za dobry marker macierzystości. W opozycji do wyników innych grup, Gallagginte i wsp. nie zaobserwowali w badanych komórkach obecności białka CD105. Subpopulacja komórek CD133+/CD24+/CTR2+ ccRCC posiadała pewne cechy macierzystości, w tym zdolność do różnicowania *in vitro* oraz indukowania angiogenezy *in vivo* [24]. W ksenograftach większa liczba komórek koekspresyjujących CD133 i CXCR4 była obecna w obszarach guza przylegających do nekrozy niż w obszarach unaczynionych. Ich liczba także znacząco wzrastała w wyniku leczenia sunitynibem w obszarach otaczających nekrozę. Sutynitynib indukował także oporność na swoje własne działanie terapeutyczne poprzez indukowanie hipoksji w obszarach otaczających nekrozę, gdzie obserwowano większą liczbę komórek macierzystych [8].

W linii komórkowej 786-O ekspresja jądrowego HIF-1 α korelowała z ekspresją CD133. Ekspresja CD133 była też indukowana chlorkiem kobaltu, co sugeruje, że hipoksja wpływa na ekspresję CD133 [25].

Komórki CD133+/CD24+ charakteryzują się zwiększoną ekspresją markerów macierzystości CTR2, BCL-2, MDR1, OCT-4, KLF4 niż komórki populacji ogólnej, a także większą zdolnością do samoodnowy i zwiększoną opornością na cisplatynę i sorafenib. Mają też większą zdolność do przerzutowania i indukowania guzów *in vivo*. Komórki CD133+/CD24+ ekspresyjają na wysokim poziomie Notch1, Notch2, Jagged1, Jagged2, DLL1 and DLL4. Farmakologiczna inhibicja Notch1 lub Notch2 za pomocą MRK-003 lub endogennego inhibitora Numb powodowała utratę cech komórek macierzystych. Nadekspresja Notch1 powodo-

wała zwiększony poziom CXCR4 i hamowała chemotaksję indukowaną SDF-1 w komórkach CSC RCC *in vitro*. Traktowanie inhibitorem CXCR4 odwracało ten efekt. Sugeruje to, że szlak sygnałowy Notch odpowiada za promowanie chemotaksji RCC za pośrednictwem osi sygnałowej SDF-1/CXCR4 [26].

Przeżywalność TNF za pośrednictwem TNFR2, zwiększona ekspresja TNFR2 promowała wchodzenie w cykl komórkowy komórek RCC CD133+, w komórkach tej subpopulacji większa była indukcja śmierci komórkowej przez cyklofosfamid niż w populacji ogólnej. Selektywne zaangażowanie receptora TNFR2 przez TNF może indukować proliferację komórek CD133+ i zwiększać podatność na cytotoksyczność [23].

Izolacja komórek CXCR4+

W 2005 r. odkryto, że po utracie aktywności białka VHL, rośnie aktywność receptora chemokin CXCR4 [27]. Uznano go przez to za potencjalny marker macierzystości. Przebadano linie komórkowe raka nerki, m. in. pochodzącą od pacjenta w I stadium choroby oraz pochodzącą od pacjenta w IV stadium choroby, które znacząco różniły się zdolnością tworzenia sfer. Podejrzewano, że mogą być za to odpowiedzialne komórki CSC. Odkryto, że tylko komórki linii pochodzącej od pacjenta w IV stadium choroby zawierają marker CXCR4. Co więcej, komórki CXCR4+ stanowiły większość komórek w uformowanych sferach i wykazywały podwyższoną ekspresję genów powiązanych z macierzystością oraz odpornością na inhibitory kinaz: sunitynib, sorafenib lub pazopanib. Blokowanie ścieżki sygnałowej powiązanej z CXCR4 skutkowało podwyższeniem wrażliwości komórek na te leki [28]. Podobne wyniki otrzymała grupa Micucci i wsp. podczas badań nad liniami RCC: Caki1, Caki2, 786-O i 769-P. W trakcie eksperymentu polegającego na formowaniu sfer komórkowych, okazało się, że ekspresyjny marker CXCR4 są dominującą populacją wśród otrzymanych sfer. Inhibicja szlaku CXCR4-zależnego powodowała zahamowanie rozwoju sfer [29]. CSC za pośrednictwem pęcherzyków pozakomórkowych potrafią indukować w zdrowych komórkach fenotyp z wysoką ekspresją CXCR4 [30].

Ekspresja CXCR4 jest regulowana poprzez szlak sygnałowy β -kateniny (kodowanej przez gen *CTNNB1*). Nokaut *CTNNB1* powoduje obniżenie ekspresji ICAM-1, VCAM-1, CXCR4 oraz CCL18, a nadekspresja *CTNNB1* zwiększa też ekspresję ICAM-1, VCAM-1, CXCR4 i CCL18. Nokaut *CTNNB1* powoduje zahamowanie proliferacji, migracji, zdolności do inwazji, a także powoduje indukcję apoptozy [31].

Ekspresja CXCR4 jest też regulowana przez szlak sygnałowy wersykanu (VCAN). Nokaut VCAN hamował proliferację i indukował apoptozę w komórkach Caki-2 oraz 786-O, co było związane ze zmianami ekspresji genów związanych ze szlakiem sygnałowym TNF: *TNF α* , *BID* i *BAK*. Brak ekspresji VCAN

znacząco obniżył też zdolność komórek do migracji i inwazji, co korelowało z obniżeniem ekspresji MMP7 i CXCR4 [32].

Ekspresję CXCR4 reguluje także galektyna-1, białko z grupy lektyn. Nokaut galektyny-1 zmniejszał ekspresję CXCR4 w komórkach RCC, a przywrócenie ekspresji CXCR4 przywracało zdolność klonogenną, EMT oraz zdolność do indukowania angiogenezy [33].

Izolacja komórek NCAM+

Subpopulacja komórek NCAM+ guza Wilmsa (*nephroblastoma*) była wysoce klonogenna i nadekspymowała geny-markery macierzystości oraz topoizomerazę 2A (*TOP2A*) – niekorzystny marker prognostyczny dla tego nowotworu. Traktowanie komórek inhibitorami topoizomerazy powodowało nie tylko zmniejszenie ekspresji TOP2A, ale też NCAM i WT1. NCAM może być więc markerem komórek macierzystych guza Wilmsa [34]. Kluczowa wydaje się jednak negatywna selekcja pod względem CD133. Komórki NCAM1+/CD133- przejawiały fenotyp macierzystości, w przeciwieństwie do komórek NCAM1+/CD133+ oraz NCAM1-/CD133-, które miały ograniczoną zdolność samoodnowy i inicjowania guzów [35].

OCENA EKSPRESJI MARKERÓW WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Izolacja komórek ALDH1+

Pomimo iż metoda określania stężenia czynnika ALDH1 (ang. *Aldehyde Dehydrogenase 1* – dehydrogenazy aldehydu octowego) w komórkach została już wcześniej opracowana [36, 37], to obecnie najczęściej stosowana jest metoda ALDEFLUOR firmy Stem Cell Technologies™. Zgodnie z zaleceniami producenta, komórki są zawieszane w buforze ALDEFLUOR (1mmol/l/1x10⁶ komórek) zawierającym substrat dla ALDH (ang. *Boron-dipyrrometheneaminoacetaldehyde*, BAAAA), a następnie inkubowane przez 50 min. w temperaturze 37°C. Do każdej próbki dodaje się specyficzny inhibitor ALDH (ang. *Diethylaminobenzaldehyde*, DEAB) (50 mmol/l). Wybarwione komórki mogą być potem dalej badane przy użyciu cytometrii przepływowej. W takim przypadku, komórki są wybarwiane dodatkowo jodkiem propidyny (ang. *Propidium Iodide*, PI, 1mg/ml) [38, 39].

Izolacja komórek DNAJB8+

Ekspresja genu *DNAJB8* (ang. *DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B8*) zachodzi w komórkach raka m.in. RCC i sprzyja zwiększeniu populacji komórek SP w stosunku do reszty komórek nowotworu, co wykazały badania na zarówno na mysiej (RenCa) jak i ludzkiej (ACHN) linii komórkowej raka nerki. Nie wszystkie jednak komórki z nadekspresją *DNAJB8* były komórkami SP [40].

PIK3R1

Lin i wsp. [41] zaproponowali niską ekspresję *PIK3R1* (ang. *Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1*) jako marker macierzystości. Przebadano linie komórkowe RCC ACHN, 786-O i A-704 oraz liczne linie pierwotne raka nerek. Zaobserwowano, że ekspresja *PIK3R1* jest tym niższa im bardziej zaawansowane jest stadium choroby. Po wyciszeniu ekspresji genu przy pomocy transformacji badane komórki wykazywały zwiększoną proliferację, migrację i EMT. Komórki z genem *PIK3R1* inaktywowanym metodą CRISPR/Cas9 były odporne na genetycyne (czynnik G418).

IZOLACJA KOMÓREK POPULACJI BOCZNEJ

Izolacja komórek tzw. populacji bocznej (ang. *Side Population*, SP) jest metodą izolacji komórek macierzystych opartą nie na obecności określonych antygenów, ale na różnicowaniu komórek w zależności od ich zdolności „wypompowywania” barwnika Hoechst 33342. Barwnika tego używa się najczęściej do odróżniania komórek żywych od martwych. Okazało się jednak, że w niektórych komórkach zawartość barwnika Hoechst 33342 jest znacznie mniejsza niż w innych komórkach, co wskazywało na zdolność aktywnego „wypompowywania” barwnika. Późniejsze badania wykazały, że ta populacja komórek ma także silne cechy macierzystości [42]. Metodą izolacji SP można izolować komórki z tkanek nowotworowych raka nerki [39]. Komórki o przynajmniej 80% konfluencji zostały odcięte od dna butelki do hodowli za pomocą akutazy i zawieszono w PBS w stężeniu $1 \times 10^6/\text{ml}$ z 2% FBS i inkubowane w 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342 w 37°C przez 60 min. Próbkę zostały wypłukane i zwirowane. Potem zawieszono je w 2 ml zimnego PBSu z 2% FBS. Następnie dodano jodek propidyny w stężeniu 1 mg/ml oraz przefiltrowano przez membranę o porach 40 μm .

Komórki propagujące guza zostały zidentyfikowane w raku nerki, również przy użyciu potencjału wykluczenia rodaminę 123 (ang. *Rhodamine 123 efflux assay*). Rh123 jest używana do wykrywania stanów obniżonej aktywności mitochondrialnej w komórkach spoczynkowych. Komórki posiadające duży potencjał wykluczający Rh123 w linii komórkowej 786-O mają właściwości komórek macierzystych, takie jak duża aktywność proliferacji, możliwość różnicowania się w różne rodzaje linii komórkowych oraz oporność na promieniowanie [43].

Metoda izolacji SP była wykorzystywana też przez inne grupy badawcze. Podczas przeprowadzania tej metody, często stosowane były pewne modyfikacje. Komórki mogą być mobilizowane trypsyną zamiast akutazy, a następnie zawieszono w ciepłym RPMI 1640 zawierającym 2% FBS i 10mmol/l HEPES. Standardowa inkubacja z 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342 może być wydłużona do 90 min w kąpielii wodnej z mieszaniem w trakcie. Takie modyfikacje można znaleźć w publikacji

Huang i wsp. z 2013 r. [44]. Dodatkowo po wirowaniu, komórki były tu zawieszane w zimnym HBSS zawierającym 2% FBS i HEPES w stężeniu 10mmol/l. Inną możliwością jest zawieszenie komórek w podgrzanym już RPMI z 5% FBS. Hoechst 33342 może zostać dodany w ostatecznym stężeniu 2,5 µg/ml [40].

Do barwienia SP wykorzystuje się też rodaminę. Na początku komórki zbierano z podłoża przy pomocy trypsyny (0.25%), dwukrotnie przepłukano PBSem i zawieszono w lodowatym RPMI z 5% FBS. Komórki rozcieńczono do gęstości 1×10^6 cells/ml. i inkubowano w 37°C przez 10 min. w 5% stężeniu CO₂. Następnie dodano fluorescencyjnego barwnika Rh123 w stężeniu 10 µg/ml. i inkubowano przez 20 min. w ciemności. Komórki płukano dwukrotnie PBSem i przechowywano w 4°C aż do przeprowadzenia cytometrii przepływowej przy użyciu FACS Calibur. Komórki zostały następnie rozdzielone na dwie grupy. Pierwsza to komórki o podwyższonym stężeniu rodaminy (Rh123high), a druga komórki o niskim stężeniu (RH123low) [43]. Pomimo podobieństw proceduralnych do barwienia Hoechst 33342, użycie rodaminy prowadzi potencjalnie do otrzymania innych wyników. Lu i wsp. [43] badali korelację pomiędzy zawartością rodaminy w komórkach RCC, a cechami macierzystości. Badania prowadzono na linii 786-O. Komórki wyizolowano przy pomocy barwnika rodaminy123. Komórki rozdzielone zostały na posiadające wysokie stężenie tego barwnika i te z niskim stężeniem. Co ciekawe Lu i wsp. uważają, że wyizolowana przez nich populacja komórek to komórki SP, mimo iż nie używali barwnika Hoechst 33342. Uważają, że tę populację można pozyskać albo przy pomocy barwnika Hoechst 33342 albo rodaminy 123. Efekty ich badań wykazały, że komórki o wysokim stężeniu rodaminy wykazują cechy CSC.

Komórki o fenotypie SP wydawały się być komórkami macierzystymi raka. Komórki te wykazują wysoką aktywność enzymu ALDH1. Ueda i wsp. [39] badali linie komórkowe raka nerki ACHN ze złośliwego przerzutu raka nerki oraz KRC/Y z guza pierwotnego pacjenta z RCC. Z tych linii odseparowano komórki SP, a następnie sprawdzono poziom ALDH1 w komórkach SP i NSP (ang. *Non-Side Population*). Aby odróżnić komórki o wysokiej aktywności ALDH1 od tych o niskiej, użyto techniki ALDEFLUOR [39, 42]. Wyniki badań zdawały się potwierdzać tezę o macierzystości SP, ponieważ dane komórki SP zgodnie z oczekiwaniami wykazywały wyższą oporność na antybiotyki, łatwiej formowały sfery komórkowe oraz częściej wywoływały nowotwory u myszy NOD/SCID niż komórki NSP. Fenotyp SP cechował się też wyższą aktywnością ALDH1, choć nie każda komórka SP wyrażała również tę cechę. Badacze doszli do wniosku, że badanie aktywności ALDH1 to lepsza metoda izolacji TIC niż izolacja populacji SP [39]. W 2013 badania na komórkach nabłonka jajnika potwierdziły te wyniki. Przebadano 6 linii gruczolakorakowych: 3 surowicze (AMOC-2, HUOA i OVCAR-3) i 3 pierwotne (ES-2, RMG-1 i TOV21G). Do izolacji komórek użyto techniki ALDEFLUOR do badania aktywności ALDH1. Komórki z dużą aktyw-

nością białka ALDH1 częściej formowały sfery, były bardziej inwazyjne i bardziej karcinogenne [38].

Metoda ALDEFLUOR została również wykorzystana do pozyskania komórek z linii ACHN i CAKI-2 do dalszych badań nad wpływem BMP-2 na CSC RCC. Komórki poddane tej metodzie izolacji wykazywały cechy macierzystości takie jak wyższa ekspresja Oct3/4a, wyższy potencjał proliferacyjny oraz sferotwórczy czy wyższa ekspresja Nanog i Pax-2. Komórki o wysokim stężeniu ALDH1, poddane działaniu BMP-2, traciły cechy nowotworowe, a zyskiwały cechy osteoblastów [45]. W badaniach na nerkowej linii SN12C wyodrębniono z tej linii populację komórek tworzącą sfery i adherentnych komórek. Z wykorzystaniem metody ALDEFLUOR wykazano, że komórki tworzące sfery mają sześciokrotnie wyższą aktywność enzymu ALDH-1 [46, 47].

Sam fenotyp SP jest dla niektórych badaczy wystarczającym markerem macierzystości. W pięciu liniach komórkowych: 759P, 786-O, OS-RC-2, SN12C i SKR39 sprawdzono efektywność usuwania przez komórki barwnika Hoechst 33342. Metoda izolacji komórek SP miała jednak pewne modyfikacje. Komórki SP udało się wyizolować, ale nie wiadomo jaki byłby efekt przy użyciu standardowej procedury. Komórki pozyskane tą metodą ulegały częstym podziałom, łatwiej odtwarzały swoją populację. Zauważono też wyższą oporność na chemioterapię i radioterapię oraz formowanie nowotworów w myszach NOD/SCID. Szczególnie wysokie stężenie komórek SP zaobserwowano w linii 769-P [39, 43].

INDUKOWANIE FENOTYPU MACIERZYSTOŚCI

SFERY KOMÓRKOWE I HODOWLA KOMÓRKOWA 3D

Podczas poszukiwań markerów macierzystości ważnym jest, aby warunki hodowli komórek były jak najbliższe natywnym. Stąd zrodziła się idea **hodowli sfer komórkowych**. W takich hodowlach komórki mogą rosnąć warstwami, co może być unikatowym źródłem informacji o lokalizacji komórek macierzystych wewnątrz guza u pacjenta. Warunki hodowli trójwymiarowe powinny też sprawić, iż komórki będą rosły w sposób bliższy wzrostowi w warunkach natywnych, a co za tym idzie, badania na nich będą bardziej miarodajne. Aby otrzymać pływające i nie-adherentne sfery Bussolati i wsp. [5] wysiali komórki w zagęszczeniu 10^3 kom/ml w podłożu bez surowicy – DMEM-F12 wzbogacone o bFGF (ang. *basic Fibroblast Growth Factor*), 20ng/ml EGF, 5μg/ml insuliny oraz 0,4% BSA. Sfery były rozdzielane co 7-10 dni przez inkubację w roztworze do nieenzymatycznej dysocjacji przez 2 min. a następnie pasażowane w 37°C. Aby określić zdolność badanych komórek do formowania sfer, zostały one porozdzielane do płytki 96 – dołkowej. Do każdego dołka trafiła jedna sfera i 200μl pożywki. Co każde 5

dni dodawano 25 μ l medium do każdego dołka. Po 14 dniach komórki z każdego dołka zostały zliczone.

Stosowane są różne metody formowania sfer komórkowych. W jednej z nich kultury mogą być rozbijane na pojedyncze komórki, a te umieszczane w komorze 96 – dołkowej po 300 – 500 komórek na każdy dołek. Komórki są hodowane w medium pozbawionym surowicy (DMEM) wzbogaconym o heparynę (5g/ml), EGF (ang. *Epidermal Growth Factor*) i bFGF (obydwa 20ng/ml), insulinę (20ng/ml), B27, N2 (1:100) oraz hLIF (ag. *human Leukemia Inhibitory Factor*) (100ng/ml) [16] W procedurze Gassenmaier i wsp. [28] zastosowano jeszcze inne modyfikacje. Oprócz pożywki pozbawionej serum, EGF i bFGF znajdziemy też 2% B27 oraz 1% mieszaniny insuliny, transferryny, selenu i czynnika X. Stosowane są też metody z użyciem 10% bFGF [48] lub kombinacji 20ng/ml EGF i bFGF, 2% B27 i 1% N2 [41] oraz 20ng/ml bFGF, 20ng/ml EGF i B27, ale już bez insuliny, heparyny, czy innych suplementów [46].

Inna metoda izolacji komórek propagujących guza została wykorzystana przez Zhong *et al.*, zauważyli oni podobieństwa pomiędzy komórkami tworzącymi sfery (ang. *sphere-forming cells*) a komórkami propagującymi guza. Hodowla linii komórkowej SK-RC-42 w sferach 3D (ang. *3D sphere culture system*) bez surowicy oraz z suplementacją EGF oraz bFGF pozwoliła na wyizolowanie komórek posiadających właściwości samoodnowy oraz ekspresję genów charakterystycznych dla komórek macierzystych. Co więcej, wyizolowane komórki, w porównaniu do komórek hodowanych metodami 2D, tworzyły guzy oraz były odporne na chemioterapię oraz radioterapię [49].

Hodowla 3D pozwala na uzyskanie warunków jeszcze bardziej zbliżonych do *in vivo*. Metodę takiej hodowli zaproponowali Jain i wsp. [50] W 2011 roku kolejna grupa badawcza wykorzystwała tę technikę w badaniu komórek raka nerki. Komórki wysiano na płytkach 6-dołkowych w zagęszczeniu 15000 komórek na dołek i hodowano przez 5 dni w 4 ml. pożywki RPMI 1640 z 10% NCS na dołek, aż do 75%-85% konfluencji. Następne kroki były jak w publikacji z 1995 r. [50]. To znaczy, że 100 ml 0,8% agarozы rozpuszczono w MEM a następnie trzymano w temperaturze 51-53°C i zmieszano z $1,5 \times 10^5$ komórek. Zawiesina komórkowa została niezwłocznie przeniesiona do oleju mineralnego o temperaturze pokojowej przy użyciu sterylnej, plastikowej pipety. Ten krok służy wytworzeniu półpłynnego jądra kapsuły. Po odpłukaniu oleju mineralnego i całonocnej hodowli w 37°C i 5% CO₂ jądro zostało zwinięte przy pomocy plastikowej łyżeczki zawierającej około 1ml 4,5% roztwór agarozы w MEM o temperaturze 61-63°C. Ten krok posłużył do stworzenia agarozowego płaszcza jądra. Przed zakrzepnięciem kapsuła została przeniesiona do oleju mineralnego i przepłukana raz jeszcze RPMI. Następnie kapsuły inkubowano w 37°C, w 5% CO₂. W jądrach kapsuł znajdowało się od 100000 do 250000 komórek. Hodowano je w 90 milimetrych szalkach Petriego w stężeniu: 10 kapsuł/40ml RPMI z 10% NCS. Medium wymieniano co

tydzień. Aktywność metaboliczną określano przy pomocy procedury MTT. Aktywność metaboliczna rosła wraz z proliferacją komórek w kolonii. Stwierdzono również, że stare komórki są zastępowane nowymi [51].

HODOWLA KOMÓRKOWA 2D PRZY OBNIŻONYM STEŻENIU CZYNNIKÓW WZROSTU

Fenotyp macierzystości może być także indukowany poprzez manipulowanie składem pożywki [22]. Komórki raka nerki pierwotnie hodowane w odpowiednim dla nich medium, zostały podzielone na dwie grupy. W celu pozyskania osteocytów pierwszą grupę przeniesiono do medium DMEM z FBS, 10^{-7} M deksametazonu, 10mM β -glicerolu oraz 50 μ g/mL kwasu askorbinowego. Do pozyskania zaś adipocytów, w drugiej grupie zastosowano medium złożone z DMEM z wysoką zawartością glukozy, wzbogacone o 10%FBS, 1% L-glutaminy, 1% mieszaniny streptomycyny/penicyliny, 1 μ M deksametazonu, 1 μ l mindometacyny, 500 μ M 3-izobutylo-1-metyloksantyny oraz 10 μ g/ml ludzkiej rekombinowanej insuliny. Medium było zmieniane dwa razy w tygodniu a następnie zastosowano barwienie alizaryną i czerwień oleistą. Barwienie alizaryną uwidaczniało złogi wapnia w komórkach (osteocyty), a czerwień oleista lipidy (adipocyty). Tak przeprowadzone doświadczenie pozwoliło stwierdzić, że w badanym przypadku, komórki CD133⁺ są pluripotencjalne, a rezultaty innych przeprowadzonych przez grupę badań pozwoliły dojść do wniosku, że są to CSC.

KO-HODOWLA KOMÓRKOWA

Makrofagi stymulują nowotwór do przejścia w stan metastatyczny, a ich obecność w hodowli sprawia, że komórki RCC intensywniej ekspresują takie potencjalne markery macierzystości jak CD117, CD133, czy Nanog. Większa liczba komórek jest zdolna do formowania sfer niż w hodowli bez obecności makrofagów. Sugeruje to, że makrofagi indukują w RCC proces EMT. Początkowo komórki nowotworowe i makrofagi są hodowane oddzielnie w RPMI z 10% FBS. Komórki THP-1 są aktywowane do różnicowania w makrofagi przy pomocy PMA (ang. *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*). Po namnożeniu komórek, hodowle linii nowotworowych przenosi się do 6-dołkowej płytki, a w każdym dołku umieszcza się insert z makrofagami. Insert jest oddzielony od hodowli membraną z porami 4 μ m [52].

HODOWLA KOMÓREK PO IZOLACJI Z KSENOGRAFTÓW

Ksenografty guzów pobranych od pacjentów (ang. *Patient-Derived Xenografts*, PDX) są wszczepiane zwierzętom o obniżonej odporności. Po zaindukowaniu guza, materiał zazwyczaj pobiera się do dalszych badań. Okazuje się, że

przejście komórek przez „środowisko mysie” znacząco wpływa na fenotyp komórek. Przeprowadzono badania tą metodą na komórkach RCC, gdzie po pobraniu ksenograftów zbadano ich właściwości CSC, hodując je w medium selektywnym DMEM-LG (DMEM z niską zawartością glukozy). W takich samych warunkach umieszczono linię pierwotną, z której wyprowadzono uprzednio ksenografty. Okazało się, że linia pierwotna nie rośnie w takich warunkach w przeciwieństwie do linii PDX. Ponadto linie PDX ekspresywały markery macierzystości takie jak CD133, CD105, czy wysoki poziom ALDH. Formowały też sfery komórkowe. Mechanizmy procesów, które zaszły w badanej linii RCC nie zostały jeszcze poznane, niemniej wykorzystaniem PDX stanowi obiecującą metodę badania CSC w RCC. Liczba CSC w ksenograftach może wzrosnąć nawet 10-krotnie w wyniku dodania do mikrośrodowiska ksenograftu ludzkiego osocza oraz fibroblastów zaangażowanych w rozwój raka (ang. *Cancer-Associated Fibroblasts*, CAF). Bardziej wydajna, z punktu widzenia hodowli CSC, jest również iniekcja całych fragmentów tkanki, zamiast zawiesiny komórkowej. Taki sposób postępowania wydaje się również lepiej odwzorowywać warunki natywne nowotworu [47].

HODOWLA KOMÓRKOWA W OBECNOŚCI LEKÓW

Sprawdzano wpływ dwóch leków: pacitakselu i docetakselu na komórki RenCa. Obydwa leki mają negatywny wpływ na metabolizm i proliferację nowotworu, ale w linii RenCa występowała subpopulacja komórek opornych na docetaksel. Komórki te charakteryzowały się podwyższoną ekspresją genu *OCT4*, charakterystyczną dla komórek macierzystych. Subpopulacja komórek opornych na leki była zdolna do zaindukowania guza *in vivo* [53]. Hodowla komórek w obecności sunitynibu umożliwiła wyselekcjonowanie komórek CD133 i CXCR4 – pozytywnych. Cechowały się one wyższą tumorogেনnością [54].

DALSZE KIERUNKI ROZWOJU BADAŃ NAD KOMÓRKAMI MACIERZYSTYMI RAKA NERKI

Wyniki poszczególnych badań powinny być przydatne w praktycznym zastosowaniu metod i wykrywaniu markerów komórek macierzystych raka. W tym celu muszą być one porównywalne. Odkrycie charakterystyki komórek o cechach macierzystości oraz metody ich pozyskiwania z jednej lub paru linii unikatową metodą badawczą jest zaledwie wstępem do dalszych badań. Ogromne zróżnicowanie markerów i metod izolacji RCC-CSC przyczynia się do trudności w określeniu optymalnej metody badań.

Pierwsze niespójności znajdziemy w metodzie SP. Ueda i wsp. [39] stosują do zawieszania komórek zimny roztwór FBS i PBS, zaś grupa Huang i wsp. używa

ciepłego roztworu i dodatkowo znajduje się w nim HEPES. Czas inkubacji w barwniku Hoechst 33342 różni się półtorakrotnie. Publikacja Nishizawa i wsp. podaje zaś w swej procedurze dwukrotnie niższe stężenie Hoechst 33342 oraz dwuipółkrotnie wyższe stężenie FBS w roztworze zawieszającym. Mimo tych różnic wszystkie trzy grupy piszą, iż korzystały z tej samej metody. Wszystkie trzy publikacje dotyczą komórek nerki, jednak tylko jedna linia komórkowa ACHN powtarza się i to tylko w dwóch grupach – Nishizawa i wsp. [40] oraz Ueda i wsp. [39]. Grupy te badały dodatkowo dwa różne markery powierzchniowe: DNAJB8 i ALDH1. Populacja komórek z wysoką ekspresją DNAJB8 pokrywała się częściowo z komórkami SP, ale nie stanowią one tej samej populacji. ALDH1 zdaje się być lepszym wyznacznikiem macierzystości od SP. Podobne wyniki zaobserwowali Wang i wsp. Potwierdziły to też badania Kuroda i wsp. które były prowadzone na komórkach nabłonka jajnika, lecz z użyciem tej samej metody identyfikacji komórek o wysokiej zawartości ALDH1 [38-40, 44, 45]. Istotność tego markera została jednak odrzucona przez inną grupę badawczą, również pracującą na raku nerki. Uznano, że poziom ALDH1, przebadany tą samą metodą co w dwóch uprzednio przytoczonych publikacjach, jest zbyt zmienny, a przez to zupełnie niewiarygodny [28], czemu jednak przeczą badania Zhang i wsp., choć prowadzone były również na komórkach nerkowych [46].

Lu i wsp. [43] również twierdzą, że do rozróżnienia komórek macierzystych nowotworu stosowali metodę SP mimo iż używali rodaminę 123, a nie Hoechst 33342. Grupę zadziwiło, iż wyniki były zupełnie niespójne z rezultatami innych grup badawczych bazujących na Hoechst 33342. Grupa bazowała w swych założeniach m.in. na publikacji Huls i wsp. [55], w której stwierdzono, że transportery BCRP są odpowiedzialne za fenotyp SP ponieważ powodują niskie stężenie zarówno barwnika Hoechst 33342 jak i rodaminę 123. Dodają, że rodamina 123 może też być eksportowana z komórki przez transportery P-gp. Dane te pochodzą z trzech publikacji: Litman i wsp. [56]; Honjo i wsp. [57] oraz de Jonge-Peters i wsp. [58]. Dwie pierwsze traktują o mechanizmach lekooporności opartych na białkach eksportujących leki z komórki, w tym rodaminę 123. Nie znajduje się tam jednak żadna informacja o Hoechst 33342 [56, 57]. Ostatnia publikacja powtarza informację o komórkach SP identyfikowanych za pomocą tych dwóch barwników [58], jednakże opiera się na publikacji Goodell i wsp. [42]. W niej znajdziemy informacje, że rodamina 123 okazała się niezbyt użyteczna w badaniach w poszukiwaniu komórek macierzystych z uwagi na fakt, iż zbyt słabo odróżniała wybarwione komórki od innych. Badacze jedynie przewidują, że efekt odniesiony przy użyciu Hoechst 33342 powinien się powtórzyć przy rodaminie [42]. Zatem wyniki grupy badawczej Lu i wsp. najprawdopodobniej w ogóle nie dotyczą komórek SP.

Trzy z prezentowanych grup badawczych podjęły się przetestowania białka CD-105 jako markera macierzystości. Każda badała inną tkankę. Li i wsp. do weryfikacji swoich wyników zastosowali test wzrostu w hipoksji [6]. Dwie pozostałe grupy badawcze korzystały z metody opierającej się o formowanie sfer przez wyizolowane

komórki. Zadziwiają jednak różne wariacje komponentów mediów. Standardem jest używanie podłoża DMEM, 20ng/ml EGF oraz 20ng/ml bFGF. Jednakże Bussolatti i wsp. używają dodatkowo BSA i insuliny, a Hu i wsp. insulinę ale w 4 razy wyższym stężeniu oraz heparynę, a Gassenmeier i wsp. dodali B27 i mieszaniny insuliny, transferryny, seleniu i czynnika X (Invitrogen). Ten zespół badał komórki nerkowe jak Bussolatti i wsp., ale pod kątem białka CXCR4 oraz z użyciem BSA i insuliny. Podobne warunki jak u Gassenmeier i wsp. zachowali Hang i wsp. ale użyli dwukrotnie niższego stężenia bFGF oraz użyli suplementu N-2 (Invitrogen). Lin i wsp. stworzyli kombinację 20 ng/ml FGF i bFGF 2% B27 i 1%N-2, a Zhang i wsp. taką samą, ale bez N-2 [5, 16, 28, 41, 46, 48]. To głębokie zróżnicowanie sprawia poważny problem i wątpliwości w porównywaniu wyników badań poszczególnych grup, zwłaszcza, że celem formowania sfer nie było tu określenie optymalnego medium, a potwierdzenie, że populacja komórek ekspresyjujących dany marker może być uznana za macierzyste.

PODZIĘKOWANIA

Praca została sfinansowana z funduszu Narodowego Centrum Nauki grant numer NCN 2011/01/B/NZ5/02822 oraz 2014/13/B/NZ1/04010.

LITERATURA

- [1] SHIOZAWA Y, NIE B, PIANTA KJ, MORGAN TM, TAICHMAN RS. Cancer stem cells and their role in metastasis. *Pharmacol Ther* 2013; **138**: 285-93.
- [2] MATAK D, SZYMANSKI L, SZCZYLIK C, SLEDZIEWSKI R, LIAN F, BARTNIK E, SOBOCINSKA A, CZARNECKA AM. Biology of renal tumour cancer stem cells applied in medicine. *Contemp Oncol (Pozn)* 2015; **19**: A44-51.
- [3] LAPIDOT T, SIRARD C, VORMOOR J, MURDOCH B, HOANG T, CACERES-CORTES J, MINDEN M, PATERSON B, CALIGIURI MA, DICK JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; **367**: 645-8.
- [4] QURESHI-BAIG K, ULLMANN P, HAAN S, LETELLIER E. Tumor-Initiating Cells: a criTICal review of isolation approaches and new challenges in targeting strategies. *Mol Cancer* 2017; **16**: 40.
- [5] BUSSOLATI B, BRUNO S, GRANGE C, FERRANDO U, CAMUSSI G. Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas. *Faseb j* 2008; **22**: 3696-705.
- [6] LI C, ISSA R, KUMAR P, HAMPSON I, LOPEZ-NOVOA J, BERNABEU C, KUMAR S. CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *Journal of Cell Science* 2003; **116**: 2677-85.
- [7] MYSZCZYSZYN A, CZARNECKA AM, MATAK D, SZYMANSKI L, LIAN F, KORNAKIEWICZ A, BARTNIK E, KUKWA W, KIEDA C, SZCZYLIK C. The Role of Hypoxia and Cancer Stem Cells in Renal Cell Carcinoma Pathogenesis. *Stem Cell Rev* 2015; **11**: 919-43.
- [8] VARNA M, GAPIHAN G, FEUGEAS JP, RATAJCZAK P, TAN S, FERREIRA I, LEBOEUF C, SETTERBLAD N, DUVAL A, VERINE J, GERMAIN S, MONGIAT-ARTUS P, JANIN A, BOUSQUET G. Stem cells increase in numbers in perinecrotic areas in human renal cancer. *Clin Cancer Res* 2015; **21**: 916-24.
- [9] MEDICI D, KALLURI R. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. *Semin Cancer Biol* 2012; **22**: 379-84.

- [10] MIMEAULT M , BATRA SK. New promising drug targets in cancer- and metastasis-initiating cells. *Drug Discov Today* 2010; **15**: 354-64.
- [11] KAMINSKA K, SZCZYLIK C, BIELECKA ZF, BARTNIK E, PORTA C, LIAN F, CZARNECKA AM. The role of the cell-cell interactions in cancer progression. *J Cell Mol Med* 2015; **19**: 283-96.
- [12] ZHU B , MURTHY SK. Stem Cell Separation Technologies. *Curr Opin Chem Eng* 2013; **2**: 3-7.
- [13] KHAN MI, CZARNECKA AM, HELBRECHT I, BARTNIK E, LIAN F, SZCZYLIK C. Current approaches in identification and isolation of human renal cell carcinoma cancer stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2015; **6**: 178.
- [14] YOKOYAMA M, MIWA H, MAEDA S, WAKITANI S, TAKAGI M. Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion. *J Biosci Bioeng* 2008; **106**: 46-50.
- [15] LANGENBACH F , HANDSCHEL J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther* 2013; **4**: 117.
- [16] HU D, WANG X, MAO Y, ZHOU L. Identification of CD105 (endoglin)-positive stem-like cells in rhabdoid meningioma. *J Neurooncol* 2012; **106**: 505-17.
- [17] HU J, GUAN W, LIU P, DAI J, TANG K, XIAO H, QIAN Y, SHARROW AC, YE Z, WU L, XU H. Endoglin Is Essential for the Maintenance of Self-Renewal and Chemoresistance in Renal Cancer Stem Cells. *Stem Cell Reports* 2017; **9**: 464-477.
- [18] BAGATUR Y, ILTER AKULKE AZ, BIHORAC A, ERDEM M, TELCI D. Tissue transglutaminase expression is necessary for adhesion, metastatic potential and cancer stemness of renal cell carcinoma. *Cell Adh Migr* 2018; **12**: 138-151.
- [19] AZZI S, GALLERNE C, ROMEI C, LE COZ V, GANGEMI R, KHAWAM K, DEVOCELLE A, GU Y, BRUNO S, FERRINI S, CHOUAIB S, EID P, AZZARONE B, GIRON-MICHEL J. Human Renal Normal, Tumoral, and Cancer Stem Cells Express Membrane-Bound Interleukin-15 Isoforms Displaying Different Functions. *Neoplasia* 2015; **17**: 509-17.
- [20] BRUNO S, BUSSOLATI B, GRANGE C, COLLINO F, GRAZIANO ME, FERRANDO U, CAMUSSI G. CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2006; **169**: 2223-35.
- [21] NEUZIL J, STANTIC M, ZOBALOVA R, CHLADOVA J, WANG X, PROCHAZKA L, DONG L, ANDERA L, RALPH SJ. Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: what's in the name? *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **355**: 855-9.
- [22] ABBASI MR, HEIDARI-KESHEL S, ZAHED R, BEHROUZI G, ROOZAFZON R, AGHAZADEH S, AGHAJANPOUR L, BASHTAR M, KHOSHZABAN A. Isolation and Characterization of CD133 Positive Stem Cell from Human Kidney with Renal Cell Carcinoma. *J Cell Sci Ther* 2015; **6**: 1-7.
- [23] AL-LAMKI RS, WANG J, YANG J, BURROWS N, MAXWELL PH, EISEN T, WARREN AY, VANHARANTA S, PACEY S, VANDENABEELE P, POBER JS, BRADLEY JR. Tumor necrosis factor receptor 2-signaling in CD133-expressing cells in renal clear cell carcinoma. *Oncotarget* 2016; **7**: 24111-24.
- [24] GALLEGGIANTE V, RUTIGLIANO M, SALLUSTIO F, RIBATTI D, DITONNO P, BETTOCCHI C, SELVAGGI FP, LUCARELLI G, BATTAGLIA M. CTR2 identifies a population of cancer cells with stem cell-like features in patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 2014; **192**: 1831-41.
- [25] SUN C, SONG H, ZHANG H, HOU C, ZHAI T, HUANG L, ZHANG L. CD133 expression in renal cell carcinoma (RCC) is correlated with nuclear hypoxia-inducing factor 1alpha (HIF-1alpha). *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; **138**: 1619-24.
- [26] XIAO W, GAO Z, DUAN Y, YUAN W, KE Y. Notch signaling plays a crucial role in cancer stem-like cells maintaining stemness and mediating chemotaxis in renal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; **36**: 41.
- [27] ZAGZAG D, KRISHNAMACHARY B, YEE H, OKUYAMA H, CHIRIBOGA L, ALI MA, MELAMED J, SEMENZA GL. Stromal cell-derived factor-1alpha and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma: von Hippel-Lindau loss-of-function induces expression of a ligand and its receptor. *Cancer Res* 2005; **65**: 6178-88.
- [28] GASSENMAIER M, CHEN D, BUCHNER A, HENKEL L, SCHIEMANN M, MACK B, SCHENDEL DJ, ZIMMERMANN W, POHLA H. CXC chemokine receptor 4 is essential for maintenance of renal cell carcinoma-initiating cells and predicts metastasis. *Stem Cells* 2013; **31**: 1467-76.

- [29] MICUCCI C, MATAcCHIONE G, VALLI D, ORCIARI S, CATALANO A. HIF2alpha is involved in the expansion of CXCR4-positive cancer stem-like cells in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2015; **113**: 1178-85.
- [30] LINDOSO RS, COLLINO F, CAMUSSI G. Extracellular vesicles derived from renal cancer stem cells induce a pro-tumorigenic phenotype in mesenchymal stromal cells. *Oncotarget* 2015; **6**: 7959-69.
- [31] YANG CM, Ji S, Li Y, Fu LY, JIANG T, MENG FD. beta-Catenin promotes cell proliferation, migration, and invasion but induces apoptosis in renal cell carcinoma. *Oncotargets Ther* 2017; **10**: 711-724.
- [32] MITSUI Y, SHIINA H, KATO T, MAEKAWA S, HASHIMOTO Y, SHIINA M, IMAI-SUMIDA M, KULKARNI P, DASGUPTA P, WONG RK, HIRAKI M, ARICHI N, FUKUHARA S, YAMAMURA S, MAJID S, SAINI S, DENG G, DAHIYA R, NAKAJIMA K, TANAKA Y. Versican Promotes Tumor Progression, Metastasis and Predicts Poor Prognosis in Renal Carcinoma. *Mol Cancer Res* 2017; **15**: 884-895.
- [33] HUANG CS, TANG SJ, CHUNG LY, YU CP, HO JY, CHA TL, HSIEH CC, WANG HH, SUN GH, SUN KH. Galectin-1 upregulates CXCR4 to promote tumor progression and poor outcome in kidney cancer. *J Am Soc Nephrol* 2014; **25**: 1486-95.
- [34] PODE-SHAKKED N, SHUKRUN R, MARK-DANIELI M, TSVETKOV P, BAHAR S, PRI-CHEN S, GOLDSTEIN RS, ROM-GROSS E, MOR Y, FRIDMAN E, MEIR K, SIMON A, MAGISTER M, KAMINSKI N, GOLDMACHER VS, HARARI-STEINBERG O, DEKEL B. The isolation and characterization of renal cancer initiating cells from human Wilms' tumour xenografts unveils new therapeutic targets. *EMBO Mol Med* 2013; **5**: 18-37.
- [35] PODE-SHAKKED N, PLENCEANU O, GERSHON R, SHUKRUN R, KANTER I, BUCRIS E, PODE-SHAKKED B, TAM G, TAM H, CASPI R, PRI-CHEN S, VAX E, KATZ G, OMER D, HARARI-STEINBERG O, KALISKY T, DEKEL B. Dissecting Stages of Human Kidney Development and Tumorigenesis with Surface Markers Affords Simple Prospective Purification of Nephron Stem Cells. *Sci Rep* 2016; **6**: 23562.
- [36] JONES RJ, BARBER JP, VALA MS, COLLECTOR MI, KAUFMANN SH, LUDEMAN SM, COLVIN OM, HILTON J. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* 1995; **85**: 2742-6.
- [37] STORMS RW, TRUJILLO AP, SPRINGER JB, SHAH L, COLVIN OM, LUDEMAN SM, SMITH C. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 9118-23.
- [38] KURODA T, HIROHASHI Y, TORIGOE T, YASUDA K, TAKAHASHI A, ASANUMA H, MORITA R, MARIYA T, ASANO T, MIZUUCHI M, SAITO T, SATO N. ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis. *PLoS One* 2013; **8**: e65158.
- [39] UEDA K, OGASAWARA S, AKIBA J, NAKAYAMA M, TODOROKI K, SANADA S, SUEKANE S, NOGUCHI M, MATSUOKA K, YANO H. Aldehyde dehydrogenase 1 identifies cells with cancer stem cell-like properties in a human renal cell carcinoma cell line. *PLoS One* 2013; **8**: e75463.
- [40] NISHIZAWA S, HIROHASHI Y, TORIGOE T, TAKAHASHI A, TAMURA Y, MORI T, KANASEKI T, KAMIGUCHI K, ASANUMA H, MORITA R, SOKOLOVSKAYA A, MATSUZAKI J, YAMADA R, FUJII R, KAMPINGA HH, KONDO T, HASEGAWA T, HARA I, SATO N. HSP DNAJB8 controls tumor-initiating ability in renal cancer stem-like cells. *Cancer Res* 2012; **72**: 2844-54.
- [41] LIN Y, YANG Z, XU A, DONG P, HUANG Y, LIU H, LI F, WANG H, XU Q, WANG Y, SUN D, ZOU Y, ZOU X, WANG Y, ZHANG D, LIU H, WU X, ZHANG M, FU Y, CAI Z, LIU C, WU S. PIK3R1 negatively regulates the epithelial-mesenchymal transition and stem-like phenotype of renal cancer cells through the AKT/GSK3beta/CTNBB1 signaling pathway. *Sci Rep* 2015; **5**: 8997.
- [42] GOODELL MA, BROSE K, PARADIS G, CONNER AS, MULLIGAN RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 1996; **183**: 1797-806.
- [43] LU J, CUI Y, ZHU J, HE J, ZHOU G, YUE Z. Biological characteristics of Rh123(high) stem-like cells in a side population of 786-O renal carcinoma cells. *Oncol Lett* 2013; **5**: 1903-1908.
- [44] HUANG B, HUANG YJ, YAO ZJ, CHEN X, GUO SJ, MAO XP, WANG DH, CHEN JX, QIU SP. Cancer stem cell-like side population cells in clear cell renal cell carcinoma cell line 769P. *PLoS. One* 2013; **8**: e68293.
- [45] WANG L, PARK P, LA MARCA F, THAN KD, LIN CY. BMP-2 inhibits tumor-initiating ability in human renal cancer stem cells and induces bone formation. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; **141**: 1013-24.

- [46] ZHANG Y, SUN B, ZHAO X, SUN H, CUI W, LIU Z, YAO X, DONG X. Spheres derived from the human SN12C renal cell carcinoma cell line are enriched in tumor initiating cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2016; **35**: 163.
- [47] HASMIM M, BRUNO S, AZZI S, GALLERNE C, MICHEL JG, CHIABOTTO G, LECOZ V, ROMEI C, SPAGGIARI GM, PEZZOLO A, PISTOIA V, ANGEVIN E, GAD S, FERLICOT S, MESSAI Y, KIEDA C, CLAY D, SABATINI F, ESCUDIER B, CAMUSSI G, EID P, AZZARONE B, CHOUAIB S. Isolation and characterization of renal cancer stem cells from patient-derived xenografts. *Oncotarget* 2016; **7**: 15507-24.
- [48] LINLIN Z, MIN J, KAIJIE W, LEI L, GUODONG Z, XINYANG W, DALIN H, DAPENG W. TNF- α induced epithelial mesenchymal transition increases stemness properties in renal cell carcinoma cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2014; **7**: 4951-8.
- [49] ZHONG Y, GUAN K, GUO S, ZHOU C, WANG D, MA W, ZHANG Y, LI C, ZHANG S. Spheres derived from the human SK-RC-42 renal cell carcinoma cell line are enriched in cancer stem cells. *Cancer Lett* 2010; **299**: 150-60.
- [50] JAIN K, YANG H, CAI BR, HAQUE B, HURVITZ AI, DIEHL C, MIYATA T, SMITH BH, STENZEL K, SUTHANTHIRAN M, ET AL. Retrievable, replaceable, macroencapsulated pancreatic islet xenografts. Long-term engraftment without immunosuppression. *Transplantation* 1995; **59**: 319-24.
- [51] SMITH BH, GAZDA LS, CONN BL, JAIN K, ASINA S, LEVINE DM, PARKER TS, LARAMORE MA, MARTIS PC, VINERAN HV, DAVID EM, QIU S, CORDON-CARDO C, HALL RD, GORDON BR, DIEHL CH, STENZEL KH, RUBIN AL. Three-dimensional culture of mouse renal carcinoma cells in agarose macrobeads selects for a subpopulation of cells with cancer stem cell or cancer progenitor properties. *Cancer Res* 2011; **71**: 716-24.
- [52] YANG Z, XIE H, HE D, LI L. Infiltrating macrophages increase RCC epithelial mesenchymal transition (EMT) and stem cell-like populations via AKT and mTOR signaling. *Oncotarget* 2016; **7**: 44478-44491.
- [53] GAZDA LS, MARTIS PC, LARAMORE MA, BAUTISTA MA, DUDLEY A, VINERAN HV, SMITH BH. Treatment of agarose-agarose RENCA macrobeads with docetaxel selects for OCT4(+) cells with tumor-initiating capability. *Cancer Biol Ther* 2013; **14**: 1147-57.
- [54] MARIANA V, GUILLAUME G, JEAN-PAUL F, PHILIPPE R, SOPHIE J, FERREIRA I, CRISTOPHE LEBOEUF, SETTERBLAD N, DUVAL A, VERINE J, GERMAIN S, MONGIAT-ARTUS P, JANIN A, BOUSQUET G. Stem cells increase in numbers in peri-necrotic areas in human. *Clinical cancer research* 2015.
- [55] HULS M, RUSSEL FG, MASEREEUW R. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; **328**: 3-9.
- [56] LITMAN T, BRANGI M, HUDSON E, FETSCH P, ABATI A, ROSS DD, MIYAKE K, RESAU JH, BATES SE. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* 2000; **113 (Pt 11)**: 2011-21.
- [57] HONJO Y, HRYCYNIA CA, YAN QW, MEDINA-PEREZ WY, ROBNEY RW, VAN DE LAAR A, LITMAN T, DEAN M, BATES SE. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res* 2001; **61**: 6635-9.
- [58] DE JONGE-PEETERS SD, KUIPERS F, DE VRIES EG, VELLENGA E. ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; **62**: 214-26.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 06.08.2018

Przyjęto: 23.08.2018

Michał Fiedorowicz

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa

tel.: +48 22 608 66 69

e-mail: mfiedorowicz@imdik.pan.pl