

Imię i nazwisko autora rozprawy: Marcin Serocki  
Dyscyplina naukowa: nauki chemiczne – biotechnologia

## ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Charakterystyka mechanizmów molekularnych regulujących wzrost i różnicowanie komórek pierwotnych nowotworu w warunkach hodowli *in vitro*

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Characteristics of the molecular mechanisms regulating growth and differentiation of primary tumour cells in *in vitro* cultures

Promotor	Drugi promotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
prof. dr hab. inż. Andrzej Składanowski	
Promotor pomocniczy	Kopromotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>

## Spis treści

---

Indeks skrótów .....	3
Streszczenie .....	4
Abstract.....	5
Cel pracy.....	6
Wstęp.....	7
Charakterystyka CSC .....	9
Pochodzenie CSC .....	12
Markery CSC .....	15
CSC w układzie krwiotwórczym .....	15
CSC w nowotworach litych .....	16
CSC a perspektywy w leczeniu raka.....	18
Rola szlaku Akt/mTOR w przejściu epitelialno-mezenchymalnym oraz w utrzymaniu fenotypu komórek macierzystych nowotworu .....	20
Kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3Ks).....	21
Kinazy Akt i mTOR .....	22
Wyniki .....	27
Określenie heterogeniczności badanych linii .....	27
Określenie wrażliwości badanych linii na wybrane cytostatyki .....	29
Określenie stopnia przejścia epitelialno-mezenchymalnego w badanym układzie .....	32
Określenie stopnia pierwotności komórek w badanym układzie.....	34
Oznaczenie poziomu ekspresji transportera ABCG2.....	34
Oznaczenie zdolności wzrostu komórek w podłożu półpłynnym.....	36
Oznaczenie zdolności wzrostu komórek w zawieszynie.....	38
Oznaczenie poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych Sox2 i Nanog.....	41
Zdolność badanych komórek do indukcji guzów <i>in vivo</i> .....	42
Aktywacja szlaku Akt/mTOR w badanych liniach komórkowych .....	46
Niekanoniczna aktywacja kinazy Akt .....	48
Dyskusja, wnioski, perspektywy .....	52
Materiały i Metody .....	57
Linie komórkowe.....	57
A549 .....	57
ACaff.....	57
ACM.....	58
A549 K1.5 .....	58

Aparatura i sprzęt laboratoryjny .....	58
Odczynniki i roztwory.....	59
Pożywki i bufony stosowane podczas hodowli komórek i czynności związanych z komórkami.....	59
Roztwory stosowane w teście kolonii .....	60
Przeciwciała i roztwory stosowane podczas oznaczenia ekspresji transportera ABCG2.....	60
Pożywki stosowane podczas oznaczenia wzrostu komórek na podłożu półpłynnym ...	60
Pożywki i suplementy stosowane podczas oznaczenia wzrostu komórek w zawiesinie .....	61
Szczep myszy oraz materiały użyte podczas oznaczenia tumorogenności badanych komórek.....	61
Bufory i przeciwciała stosowane podczas oznaczenia ekspresji białek techniką Western Blot .....	61
Metody .....	62
Prowadzenie hodowli, pasażowanie i liczenie komórek.....	62
Test kolonii.....	63
Oznaczenie wrażliwości komórek na wybrane cytostatyki za pomocą testu MTT .....	63
Oznaczenie tempa migracji badanych komórek w teście „ <i>wound healing assay</i> ” .....	63
Oznaczenie poziomu ekspresji cytokin i czynników wzrostu przez badane linie komórkowe .....	64
Oznaczenie zdolności wzrostu komórek w zawiesinie .....	64
Określenie zdolności do wzrostu w warunkach nieróżnicujących .....	65
Oznaczenie zdolności wzrostu komórek w podłożu półpłynnym.....	65
Oznaczenie ekspresji białek techniką Western Blot .....	66
Oznaczenie ekspresji białek błonowych techniką Western Blot.....	67
Oznaczenie ekspresji transportera ABCG2 .....	67
Oznaczenie dystrybucji komórek w cyklu komórkowym .....	67
Oznaczenie tumorogenności badanych komórek .....	68
Izolacja białka z komórek i guzów – 2D elektroforeza .....	69
Rozdział w gradiencie pH – pierwszy wymiar .....	69
SDS-PAGE – drugi wymiar .....	70
Western Blott – 2D elektroforeza .....	71
Koimmunoprecypitacja.....	71
Literatura.....	73
Suplement.....	80

## Indeks skrótów

---

- **ABC transportery** – (*ATP-binding cassette transporters*) transportery posiadające kasetę wiążącą ATP
- **ALDH1** – (*aldehyde dehydrogenase isoform 1*) izoforma 1 dehydrogenazy aldehydowej
- **AML** – (*acute myeloid leukemia*) ostra białaczka szpikowa
- **bFGF** – (*basic fibroblast growth factor*) zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
- **CSC** – (*cancer stem cell*) komórka macierzysta nowotworu
- **EC** – (*embryonal carcinoma*) rak zarodkowy
- **EGF** – (*epidermal growth factor*) – epidermalny czynnik wzrostu
- **EMT** – (*epithelial-mesenchymal transition*) przejście epitelialno-mezenchymalne
- **ESC** – (*embryonic stem cell*) embrionalne komórki macierzyste
- **FACS** – (*fluorescent activated cell sorting*) sortowanie wyznaczonych fluorochromami komórek w polu elektrycznym
- **FGF** – (*fibroblast growth factor*) czynnik wzrostu fibroblastów
- **GSK3 $\beta$**  – (*glycogen synthase kinase 3  $\beta$* ) kinaza 3 $\beta$  syntazy glikogenowej
- **HGF** – (*hepatocyte growth factor*) czynnik wzrostu hepatocytów
- **HSC** – (*hematopoietic stem cell*) krwiotwórcze komórki macierzyste
- **LIC** – (*leukaemia initiating cell*) komórki inicjujące białaczkę
- **LSC** – (*leukaemia stem cell*) białaczkowe komórki macierzyste
- **MDR** – (*multidrug resistance*) oporność wielolekowa
- **MET** – (*mesenchymal-epithelial transition*) przejście mezenchymalno-epitelialne
- **MLL** – (*mixed-lineage leukemia*) białaczka mieszana
- **mTOR** – (*mammalian target of rapamycin kinase*) ssaczy cel molekularny rapamycyny
- **NOD/SCID mouse** – (*non-obese diabetic/severe-combined immunodeficient*) mysz nieotyła z cukrzycą w połączeniu z ciężkim niedoborem odporności
- **NSC** – (*neural stem cell*) nerwowe komórki macierzyste
- **PI3K** – kinaza 3-fosfoinozytolu
- **PTEN** – (*phosphatase and tensin homolog*) homolog fosfatazy i tensyny
- **Raptor** – (*regulatory associated protein of mTOR*) białko związane z regulacją mTOR
- **Rictor** – (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) niewrażliwe na rapamycynę białko związane z mTOR
- **TCC** – (*tumorigenic cancer cell*) guzotwórcza komórka nowotworowa
- **TGF- $\beta$**  – (*transforming growth factor  $\beta$* ) transformujący czynnik wzrostu  $\beta$
- **TIC** – (*tumour-initiating cell*) komórka inicjująca nowotwór

## Streszczenie

---

Istnienie specjalnego rodzaju komórek, odpowiedzialnych za powstawanie nowotworu postulowano już w połowie XIX wieku, jednak dopiero badania z przełomu XXI wykazały obecność niewielkiej frakcji komórek w heterogenicznej populacji nowotworu, o znacznie zwiększonej zdolności do tworzenia guzów *in vivo*. Komórki te zostały nazwane komórkami macierzystymi nowotworu – **CSC** (*cancer stem cells*). Zdolność do tworzenia guzów wtórnych, w odległych miejscach od guza pierwotnego, odkrycia ostatnich lat wiążą z procesem tranzycji epitelialno-mezenchymalnej – **EMT** (*epithelial-mesenchymal transition*) w którym to nieruchliwe komórki epitelialne zdolne są do zmiany w inwazyjne, zdolne do ruchu komórki mezenchymalne. Intensywne badania samych CSC jak i procesów EMT (oraz odwrotnego **MET** *mesenchymal-epithelial transition*) pozwoliły na zgromadzenie dużej wiedzy na te tematy. Wciąż jednak brak pełnego obrazu powiązań pomiędzy szlakami regulującymi te procesy.

W przedstawionej dysertacji scharakteryzowałem wpływ kofeiny na komórki niedrobnokomórkowego raka płuca posiadające cechy CSC. Wykorzystując układ trzech linii ludzkich komórek nowotworowych, składający się z rodzicielskiej linii A549, oraz dwóch linii potomnych ACaff (hodowanej w obecności kofeiny) i ACM wykazałem, że kofeina indukowała EMT w komórkach linii ACaff i ACM, czemu towarzyszyła redukcja frakcji komórek posiadających cechy nowotworowych komórek macierzystych. Komórki linii ACaff i ACM charakteryzowały się zmniejszoną ekspresją transportera ABCG2, czynnika transkrypcyjnego Sox2 oraz traciły zdolność do wzrostu w warunkach niezależnych od podłoża. Wyniki badań zebrane w dysertacji pokazują, że eradykacja komórek o pewnych właściwościach nowotworowych komórek macierzystych w liniach ACaff i ACM, nie przekładała się na zmniejszenie zdolności badanych linii komórkowych do indukcji guzów *in vivo* przez te linie. Przeciwnie, proces EMT indukowany przez kofeinę spowodował znaczny wzrost inwazyjności komórek linii ACM *in vivo* u myszy. Zdolność do zwiększonej proliferacji komórek guza linii ACM nie wiązała się jednak z obecnością w tej linii CSC. Fosforylacja kinazy Akt na C-końcowej reszcie seryny 477 i treoniny 479 przez kompleks cykliny A2/Cdk2, w linii ACM, powodowała hiperproliferaację tych komórek, co skutkowało indukcją dużych guzów w każdym przypadku już po 15 dniach od momentu wszczepienia.

Dotychczas wykazano, że aktywność kinazy Akt jest kluczowa dla wielu procesów zachodzących zarówno w zdrowych, jak i w nowotworowych komórkach. Wyniki zebrane w tej pracy potwierdzają kluczowe znaczenie tej kinazy zarówno dla utrzymania fenotypu komórek macierzystych nowotworu jak i przebiegu procesu tranzycji epitelialno-mezenchymalnej. Zdefiniowanie niekanonicznej aktywacji kinazy Akt jako przyczyny hiperproliferaacji komórek linii ACM *in vivo* poszerza obecną wiedzę na temat roli Akt w procesie nowotworzeni, oraz dla mnie osobiście jest inspiracją do dalszego zgłębiania jej roli w regulacji procesów komórkowych.

## Abstract

---

The idea that a special type of cells is responsible for tumour formation, comes from the mid-nineteenth century. The research conducted in the '90s and early 2000s showed a relationship between presence of a small fraction of cells in a heterogeneous population of tumour cells and the greatly increased ability to form tumours *in vivo*. Those cells were classified as *cancer stem cells* or *cancer stem-like cells* (**CSC**). The ability to create secondary tumours in distant locations in the body is associated with a process called *epithelial-mesenchymal transition* (**EMT**), in which the immobile epithelial cells are able to transform into the mobile and invasive mesenchymal cells. Intensive research on cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition (as well as reverse **MET** *mesenchymal-epithelial transition*) enable us to gather a large amount of knowledge on these topics. However, we still do not have a full picture of connections existing between existence of CSC and EMT – MET processes.

In this dissertation I have characterized the effects of caffeine on human lung cancer cells carrying features of the CSC. Using a system of three cell lines: parental A549 cell line, two derivative cell lines ACaff ACM, I have shown that caffeine induces EMT transition in ACM and ACaff cells. Caffeine induced EMT was associated with a reduction of cells with the characteristics of cancer stem cells. Cells, when cultured in the presence of caffeine, downregulate expression of the ABCG2 transporter and a transcription factor Sox2 and as well they lose the ability to grow in the anchorage independent conditions. Results of the dissertation reveal that caffeine induced EMT is associated with eradication of cancer stem-like cells, but it is not necessarily correlated with a reduction in their ability to induce tumours *in vivo*. On the contrary, caffeine induced EMT accelerates proliferation of these ACM cells *in vivo*, resulting in large tumours induction, in each case after 15 days from the implantation. Non-canonical Akt kinase activation after inoculating the ACM cells into SCID mice was main force responsible for this process. The Akt kinase phosphorylation at the C-terminal serine 477 and threonine 479 residues by cyclin A2/Cdk2 complex in ACM tumour cells, accelerated proliferation of these cells.

The kinase activity of Akt is known to be essential for a number of processes taking place both in normal and in tumour cells. Research conducted in this study confirmed the role of Akt kinase in both, maintaining cancer stem-like cell phenotype, and the epithelial-mesenchymal transition process. The canonical activation of Akt kinase is crucial in both processes. The provided evidence of a link between the non-canonical activation of the Akt kinase and accelerated proliferation of ACM cells *in vivo* contributes to the current knowledge of the role of Akt kinase in the process of carcinogenesis and also personally it is an inspiration for me to further exploration of this kinase role in the regulation of cellular processes.

## Cel pracy

---

Wcześniejsze badania naszego zespołu badawczego wykazały wpływ kofeiny na różnicowanie i proliferację komórek posiadających cechy CSC (*cancer stem cells*). Kofeina, poprzez hamowanie aktywności kinazy Akt w komórkach, powodowała początkowo drastyczny wzrost frakcji resztkowej SP (*side population*) przy jednocześnie niezmienionej frakcji komórek CSC charakteryzowanych ekspresją onkogenu c-Kit<sup>+</sup> (CD177)<sup>1</sup>. Otrzymanie pod wpływem presji selekcyjnej w krótkim czasie komórek zdolnych do normalnego wzrostu w obecności kofeiny, charakteryzujących się obniżoną frakcją resztkową SP oraz zmienioną odpowiedzią na działanie niektórych grup chemoterapeutyków postawiło wiele pytań na temat wpływu kofeiny na utrzymanie fenotypu CSC przez komórki niedrobnokomórkowego raka płuca. (**Supl. Rysunek 1**). Obserwacja hamującego wpływu kofeiny na fosforylację kinazy Akt na serynie 473 była punktem wyjścia dla określenia wpływu kofeiny na komórki posiadające cechy komórek macierzystych nowotworu. **Celem tej pracy było zdefiniowanie molekularnych szlaków regulujących wzrost i różnicowanie komórek nowotworowych w badanym układzie ludzkich linii niedrobnokomórkowego raka płuca.**

Określenie mechanizmów regulujących wzrost i różnicowanie, mogłoby być pomocne dla ustalenia celów molekularnych dla leków przeciwnowotworowych, które uwzględniałyby istnienie komórek pierwotnych nowotworu. Obecnie stosowane konwencjonalne metody terapii takie jak chemio- czy radioterapia nie uwzględniają bowiem istnienia tych komórek (albo nie są w stanie na nie efektywnie oddziaływać), co może się przekładać na zmniejszoną skuteczność tych terapii. Określenie celu molekularnego specyficznego dla CSC mogłoby się przyczynić do odkrycia leku, który poprzez swoje działanie eliminowałby te komórki, bądź też powodował ich różnicowanie tak aby te mogły być wyeliminowane na drodze konwencjonalnej terapii.

## Wstęp

---

Tradycyjny model rozwoju nowotworów opiera się na założeniu, że nowotwory powstają na skutek nagromadzenia się kolejnych mutacji DNA, powodujących przekształcenie zdrowej komórki w komórkę nowotworową. Model ten zakłada więc, że potrzebny jest długi okres od pojawienia się pierwszej mutacji w komórce do skumulowania kolejnych mutacji prowadzących do transformacji komórki zdrowej w komórkę nowotworową. Jednak w wielu tkankach, w których powstają nowotwory (np. przewodu pokarmowego, nabłonka, skóry i krwi), dojrzałe komórki mają krótki okres życia i ograniczone możliwości nagromadzenia wielu mutacji niezbędnych do rozwoju nowotworu. Model tradycyjny nie uwzględnia więc, a prawdopodobieństwo poszczególnych komórek do nagromadzenia niezbędnych mutacji podczas procesu karcinogenezy jest niewielkie.

Alternatywnego wyjaśnienia procesu nowotworzenia, dostarcza model uwzględniający komórki macierzyste. Zgodnie z tym modelem, nowotwory wywodzą się z długożyjących tkankowych komórek macierzystych lub komórek progenitorowych, z których poprzez deregulację, naturalnie ściśle kontrolowanego procesu samoodnowy (*self-renewal*), powstają nowotworowe komórki macierzyste (*cancer stem cells* - CSC). Komórki CSC są również nazywane *tumour-initiating cells* (TIC) lub *tumourigenic cancer cells* (TCC). Hipotezę, że CSC mają podobne właściwości jak komórki macierzyste po raz pierwszy postawili Rudolf Virchow i Julius Conheim w XIX wieku. Hipoteza Virchowa zakładała, że nowotwory powstają poprzez aktywację uspionych komórek będących pozostałością komórek embrionalnych w dojrzałych tkankach. Ta hipoteza opiera się na fakcie, że obserwuje się pewne podobieństwa w zdolności do proliferacji i różnicowania pomiędzy rozwojem komórek embrionalnych i niektórymi komórkami nowotworowymi<sup>2, 3</sup>.

Według modelu uwzględniającego CSC i na podstawie doświadczeń, w których ludzkie komórki nowotworowe zostały przeszczepione do myszy *Non-Obese Diabetic/Severe-Combined Immunodeficient* (NOD/SCID), okazało się, że tylko niewielka subpopulacja komórek nowotworowych posiada zdolność do inicjacji i progresji nowotworu. Ksenotransplantacja nowotworów na modelach zwierzęcych poprawiła możliwości badania w oparciu o hipotezy uwzględniające CSC, jednak lokalne i globalne oddziaływanie mikrośrodowiska nowotworu komplikują interpretację wyników takich badań. Niską częstotliwość indukowania nowotworów, np. ludzkiej ostrej białaczki szpikowej (*Acute Myeloid Leukemia* – AML) u myszy NOD/SCID można tłumaczyć faktem, że tylko nieliczne komórki nowotworowe są w stanie zaadaptować się do obcego środowiska i rozpocząć proliferację powodując rozwój nowotworu<sup>4</sup>. W zmodyfikowanych modelach ksenotransplantacyjnych wykazano, że o wiele więcej ludzkich komórek ma potencjał



nowotworzenia w porównaniu z wynikami uzyskanymi na myszach NOD/SCID. Na przykład, Quintana i współpracownicy wykazali, że choć komórki inicjujące czerniaka rzadko indukują rozwój nowotworu u myszy NOD/SCID, to indukcja rozwoju nowotworu zachodzi zdecydowanie częściej gdy myszy NOD/SCID pozbawiono receptorów interleukiny-2 gamma (NSG, *NOD gamma SCID*), co wiąże się z brakiem aktywności komórek NK u myszy NSG<sup>5</sup>. Dlatego zdecydowanie mniej komórek inicjujących potrzebnych jest do indukcji nowotworu u myszy NSG, charakteryzujących się większym niedoborem odporności niż u myszy NOD/SCID. Dodatkowe modyfikacje testów ksenotransplantacji, takie jak wspólne wstrzyknięcie komórek nowotworowych wraz z *matrigel* (żelowe medium zawierające czynniki wzrostu i składniki odżywcze, mogące zwiększyć przeżywalność komórek) oraz wydłużenie czasu obserwacji procesu nowotworzenia, wykazało znaczące zwiększenie występowania CSC w tego typu ksenotransplantach<sup>5</sup>. Dane te wskazują, że niektóre nowotwory, których ksenotransplantacje rzadko indukują nowotwory u myszy NOD/SCID, *de facto* mają większą zdolność do indukowania nowotworów w innych modelach, co może oznaczać, że prawdziwa częstotliwość występowania CSC została znacznie niedoszacowana dla większości ludzkich nowotworów. Niemniej jednak, niektóre nowotwory charakteryzują się minimalną zdolnością do indukowania nowotworów podczas ksenotransplantacji, nawet wtedy, gdy ksenotransplantacja przeprowadzana jest w optymalnych warunkach<sup>6</sup>. Na przykład, Ishizawa i współpracownicy porównali zdolność do wzrostu ludzkiego gruczolakoraka trzustki, gruczolakoraka płuc, płaskonabłonkowego raka płuc i płaskonabłonkowych komórek nowotworowych głowy/szyi u myszy NOD/SCID i NSG. Wykazali oni, że częstotliwość występowania TIC u obu szczepów myszy nie różniła się istotnie dla raka trzustki i płaskonabłonkowego raka głowy/szyi. Jednakże obserwowana częstotliwość CSC była dziesięciokrotnie wyższa u myszy NSG dla niektórych nowotworów (gruczolakoraka płuc i raka płaskonabłonkowego płuc), chociaż wartość ta była relatywnie niska we wszystkich przypadkach<sup>6</sup>.

Istnienie nowotworowych komórek macierzystych wykazano po raz pierwszy w białaczkach typu AML. AML może być postrzegana jako nieprawidłowa tkanka krwiotwórcza zainicjowana przez złośliwe białaczkowe komórki macierzyste<sup>7</sup>. Co więcej obecność CSC obserwowano również w guzach litych, takich jak rak piersi, mózgu, płuc, prostaty, jajnika, jelita grubego, skóry, wątroby i raka trzustki. Za hipotezę, że komórki macierzyste są początkiem nowotworzenia przemawia istnienie potworniaków, będących podtypem guzów zarodkowych. Potworniaki to nowotwory złośliwe, które zawierają komórki pochodzące ze wszystkich trzech listków zarodkowych oraz komórki raka zarodkowego (*embryonal carcinoma* – EC). W tych nowotworach komórki EC są pluripotencjalnymi komórkami macierzystymi, posiadającymi możliwość samoodnowy oraz zdolność różnicowania do

różnych typów komórek. Dlatego komórki EC zdolne są do rekonstrukcji całego nowotworu, wraz z jego zróżnicowanymi komórkami jeśli wszczepione zostaną do dorosłych myszy, lub też mogą one powrócić do swojego „normalnego” funkcjonowania jeśli zostaną wszczepione do mysiej blastocysty<sup>8, 9</sup>. EC są pierwszymi komórkami, dzięki którym pokazano właściwości nowotworowych komórek macierzystych, rozpoczynając tym samym wieloletnie i intensywne badania nad CSC, trwające już od kilku dekad.

Postawiono hipotezę, że CSC utrzymują się w guzach jako odrębna populacja komórek, mogąca powodować nawroty i przerzuty, prowadząc do powstania nowych guzów. Istnienie CSC może również wyjaśniać, dlaczego standardowe metody leczenia onkologicznego są czasami nieskuteczne. Rozwój metod terapeutycznych, które można ukierunkować na eliminację CSC, wydaje się więc być obiecującym kierunkiem badań i daje możliwość poprawy przeżywalności oraz jakości życia chorych na raka, zwłaszcza tych pacjentów u których stwierdzono przerzuty.

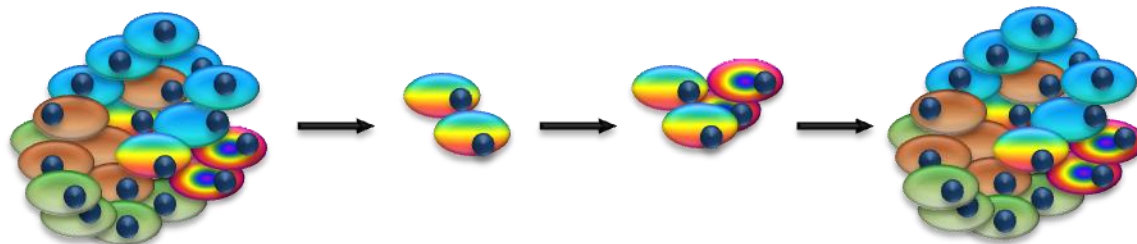
## Charakterystyka CSC

CSC i normalne komórki macierzyste (dorośle komórki macierzyste) mają wiele wspólnych właściwości, wynikających z angażowania podobnych szlaków komórkowych, których funkcje w CSC są jednak zaburzone. CSC mają zdolność do samoodnowy tj. asymetrycznego podziału, gdzie jedna z komórek potomnych zachowuje właściwości CSC, a druga komórka proliferuje do czasu częściowego lub całkowitego zróżnicowania<sup>3</sup>. Podobne zjawisko obserwuje się podczas fizjologicznej odnowy tkanek. Jednak najważniejszą różnicą pomiędzy rozwojem nowotworu, a odnową tkanek jest fakt, że podczas gdy normalne komórki proliferują, różnicują się i zazwyczaj umierają, to proliferujące komórki nowotworowe nie różnicują się normalnie, natomiast zaczynają gromadzić się w różnych stadiach swojego rozwoju powodując zwiększenie masy nowotworu. Dlatego, choć szlaki regulujące samoodnawianie są ściśle kontrolowane w normalnych komórkach macierzystych, to mogą one być konstytutywnie aktywowane lub nieprawidłowo regulowane (poprzez genetyczne i/lub epigenetyczne zmiany) w CSC, co prowadzi do niekontrolowanego ich wzrostu<sup>10</sup>. Ponadto komórki EC, które można uznać za archetyp CSC, w przeciwieństwie do embrionalnych komórek macierzystych (ESC), często wykazują ograniczoną zdolność do różnicowania się. Dlatego też, nawet niewielki wzrost prawdopodobieństwa wystąpienia samoodnowy zamiast zróżnicowania może dawać komórkom znaczącą selektywną przewagę, co może sprzyjać procesowi rozwoju nowotworu<sup>9</sup>.

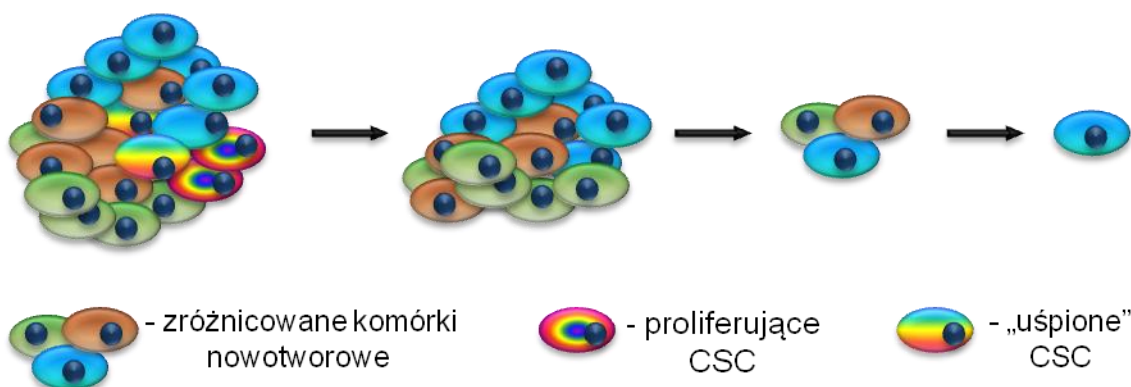
Oprócz zdolności do samoodnowy i różnicowania, wykazano inne podobieństwa pomiędzy normalnymi i nowotworowymi komórkami macierzystymi. CSC istnieją jako

„uśpione” komórki lub jako komórki będące w aktywnej fazie proliferacyjnej. Uśpione CSC, podobnie jak normalne komórki macierzyste, są w stanie spoczynku (fazie  $G_0$ ), dlatego też mogą być bardziej odporne na cytostatyki, głównie działające na komórki proliferujące, tym samym po zaprzestaniu działania cytostatyków, CSC proliferują i odpowiadają za ponowne zwiększenie masy guza (**Rysunek 1**).

**A** - standardowa chemioterapia



**B** - terapia eliminująca CSC



**Rysunek 1** – Model działania cytostatyków. **A** – standardowa terapia eliminuje jedynie komórki proliferujące (zróżnicowane komórki nowotworowe, proliferujące CSC); „uśpione” CSC są odporne na chemoterapeutyki i po zakończeniu terapii, zaczynają proliferować oraz różnicować się, powodując reemisję nowotworu. **B** – terapia eliminująca CSC, powoduje zabicie zarówno proliferujących jak i „uśpionych” CSC, co skutkuje stopniowym zmniejszaniem ilości komórek nowotworowych oraz daje możliwość ich eliminacji standardowymi chemoterapeutykami.

Na przykład w AML przynajmniej część populacji białaczkowych komórek macierzystych (*Leukaemia Stem Cells* - LSCs)/ komórek inicjujących białaczkę (*Leukaemia Initiating Cells* - LIC) znajduje się w fazie  $G_0$  cyklu komórkowego i te komórki, podobnie jak normalne komórki macierzyste, są odporne na działanie 5-fluorouracylu, który niszczy aktywnie dzielące się komórki. Ponadto, oba te typy komórek macierzystych charakteryzują się silną ekspresją telomerazy i długim czasem życia (nieograniczony potencjał replikacyjny)<sup>4, 11</sup>. Ogólnie rzecz biorąc, skracanie telomerów i aktywacja telomerazy wydają się mieć podwójną rolę w tworzeniu nowotworu. Z jednej strony, skracanie telomerów jest związane z rozwojem niestabilności chromosomów i inicjacją nowotworu. Z drugiej strony,

aktywacja telomerazy w nowotworach jest niezbędna dla stabilizacji telomerów i zapobiegania niestabilności chromosomalnych, która ostatecznie prowadzi do progresji nowotworu <sup>12, 13</sup>.

Kolejnym podobieństwem pomiędzy normalnymi i nowotworowymi komórkami macierzystymi jest przebieg ekspresji OCT4. Białko Oct4, członek rodziny domeny-POU czynników transkrypcyjnych, ulega ekspresji w pluripotencjalnych embrionalnych komórkach macierzystych i w komórkach płciowych. mRNA genu OCT4 jest obecne w totipotencjalnych i pluripotencjalnych komórkach macierzystych embrionu w fazie pregastrulacji. Ekspresja OCT4 jest konieczna do zachowania niezróżnicowanego stanu, ludzkiego EC i komórek ES. W przypadku wyciszenia OCT4 komórki różnicują się do komórek trofoektodermi <sup>14</sup>. Obecność Oct4 wykazano w komórkach macierzystych ludzkiego raka piersi, sugerując, że jego ekspresja może być powiązana z samoodnową i nowotworzeniem poprzez aktywację genów związanych ze ścieżkami sygnalizacyjnymi <sup>15 16</sup>. Jedno z badań nad rakiem płuc wykazało, że ekspresja OCT4 odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu samoodnowy i właściwości CSC w komórkach CD133<sup>+</sup> raka płuc, jak również regulowana ekspresja OCT4 w CSC może przyczynić się do rozwoju chemoradiooporności u pacjentów z rakiem płuc <sup>17</sup>. W innym badaniu, Schoenhals i współpracownicy wykazali, że przynajmniej jeden z genów kodujących czynniki pluripotencji: OCT4, SOX2, KLF4, NANOG i c-MYC ulega nadekspresji w wielu typach nowotworów a ekspresja tych genów związana jest z progresją guza lub złym rokowaniem. W rzeczywistości, w zróżnicowanych komórkach aktywacja szlaków naturalnie aktywnych w komórkach ES może prowadzić do patologicznej samoodnowy cechującej CSC <sup>18</sup>.

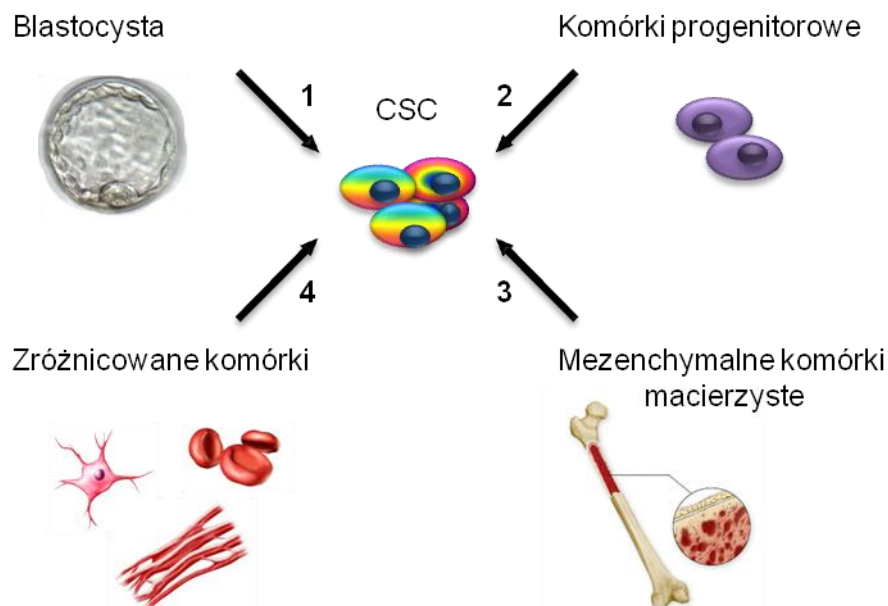
Transportery związane z fenotypem oporności wielolekowej (MDR), będące ATP-zależnymi pompami są zdolne do usuwania chemoterapeutyków z komórek nowotworowych. MDR są więc odpowiedzialne za oporność nowotworów na wiele obecnie stosowanych w leczeniu raka terapeutyków. Jedną z właściwości normalnych komórek macierzystych tkanek i CSC jest zdolność do samoobrony poprzez konstytutywną ekspresję transporterów MDR. CSC posiadają również pewne właściwości, które powodują oporność na radioterapię i uleganie apoptozie <sup>19, 20</sup>. Ostatecznie, CSC są w stanie zainicjować rozwój guza u myszy z niedoborem oporności. Wspólne cechy normalnych i nowotworowych komórek macierzystych podsumowano poniżej:

- Długość życia
- Długie telomery – wysoka aktywność telomerazy
- Wysoka ekspresja transporterów ABC
- Oporność na działanie cytostatyków
- Oporność ulegania apoptozie
- Nadekspresja genów OCT4; KLF4, NANOG, c-MYC, SOX2

- Zdolność do samoodnowy (wysoce regulowany proces w normalnych komórkach macierzystych, zmieniona regulacja w CSC)
- Zdolność do różnicowania (normalne komórki macierzyste różnicują się do dojrzałych komórek budujących tkanki, CSC tworzą nowotwór)

## Pochodzenie CSC

Pochodzenie CSC nie zostało jeszcze do końca poznane i postulowano kilka hipotez na ten temat. **Rysunek 2** przedstawia możliwe scenariusze powstawania CSC w tkankach.



**Rysunek 2** – Różne możliwości pochodzenia nowotworowych komórek macierzystych. **1** – CSC mogą pochodzić z komórek o właściwościach embrjonalnych komórek macierzystych, pozostałych nieprawidłowo w tkankach podczas procesu ontogenezy. **2** – CSC mogą pochodzić z bardziej zróżnicowanych przejściowo namnażających się komórek progenitorowych. **3** – CSC mogą wywodzić się z obecnych w wielu tkankach somatycznych komórek multipotencjalnych. **4** – Mutacje zróżnicowanych komórek somatycznych mogą doprowadzić do ich transformacji do CSC.

Większość tkanek w organizmach dorosłych osobników jest odnawiana podczas całego życia poprzez normalne komórki macierzyste, które przechodzą rozwój i różnicowanie, dostarczają elementy funkcjonalne narządu. Genetycznie ograniczona samoodnowa oraz zahamowana ekspansja komórek macierzystych w tkankach pozwala na zachowanie homeostazy. Zaburzenia tej równowagi są prawdopodobnie kluczowym elementem w rozwoju nowotworu. Świadczy za tym fakt, że niektóre ze szlaków zaangażowanych w karcinogenezę odgrywają również rolę w regulacji samoodnowy normalnych komórek macierzystych <sup>21</sup>. Co więcej istnieje uderzający związek między deregulacją funkcji komórek macierzystych a karcinogenezą – wiele genów odpowiedzialnych za samoodnowę to onkogeny jak i niektóre z genów hamujących

samoodnowę to geny supresorowe nowotworów. Przemawia to za hipotezą, że nowotwory wywodzą się z multipotencjalnych komórek somatycznych. Idea ta, jest wspierana przez liczne obserwacje:

- komórki niezróżnicowane zidentyfikowano w wielu tkankach, z których nowotwory często rozprzestrzeniają się, takich jak krew, mózg, płuca i prostata;
- mutacje wielu genów są wymagane, aby normalna komórka stała się komórką nowotworową, komórki macierzyste mogą żyć dłużej niż komórki zróżnicowane, dzięki czemu są 'lepszymi' kandydatami do kumulacji mutacji i przekształcenia się w komórkę nowotworową <sup>22</sup>;
- nowotwory charakteryzują się klonalnością i różnorodnością fenotypową, zawierają komórki na różnych stadiach zróżnicowania, w tym nie dzielące się komórki mogące pochodzić od samoodnawialnych komórek multipotencjalnych i/lub komórek wolno-dzielących się (*slow-cycling cells*);
- normalne komórki macierzyste i komórki nowotworowe posiadają wiele wspólnych właściwości, w tym: zdolność indukcji angiogenezy, niewrażliwość ulegania apoptozie, zdolność migracji i nabyte cechy prowadzące do oporności na leki, co daje możliwość nowotworowym komórkom macierzystym inicjacji nowotworów i przerzutów;
- ponieważ w normalnych komórkach macierzystych, aktywne są szlaki potrzebne do samoodnowy, zachowanie tej aktywacji może być prostsze niż jej indukcja *de novo* w bardziej zróżnicowanych komórkach podczas karcinogenezy <sup>23</sup>.

Druga z hipotez zakłada, że CSC mogą pochodzić z populacji komórek bardziej zróżnicowanych - przejściowo namnażających się komórek progenitorowych. Komórki progenitorowe dzielą się przez znacznie krótszy czas do czasu zróżnicowania. Te z komórek, które nabędą zdolność samoodnowy jak komórki macierzyste, mają możliwość gromadzenia dodatkowych mutacji, które doprowadzą do ich transformacji. Istnieją dowody potwierdzające możliwość przekształcenia komórek progenitorowych, poprzez transformacje onkogenów, w komórki nowotworowe. Na przykład, jednoczesna ekspresja białek Bcl-2 i Bcr/Abl (białko fuzyjne stwierdzone u 90% pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową) w komórkach progenitorowych szpiku inicjuje rozwoju białaczki u myszy, przy czym ekspresja tylko jednego z tych białek jest niewystarczająca do zainicjowania rozwoju białaczki <sup>24</sup>. Badania rozwoju guza mózgu wskazują również, że niektóre z nerwowych komórek progenitorowych są bardziej podatne na mutacje prowadzące do nowotworzeni <sup>25</sup>. Te zmutowane komórki progenitorowe mogą nabyć cechy uznawane za charakterystyczne dla komórek macierzystych i podlegać nieograniczonemu wzrostowi jak komórki nowotworowe. Wyniki ostatnich badań przeprowadzonych przez Molyneux i współpracowników wskazują,

że większość ludzkich BRCA1 zależnych i sporadycznych nowotworów sutka powstaje z komórek progenitorowych (*luminal progenitors*), a nie z pierwotnych komórek macierzystych<sup>26</sup>. W rezultacie normalne komórki macierzyste gruczołu sutkowego, nie ulegają w piersi transformacji nowotworowej zaś komórki progenitorowe prawdopodobnie najczęściej odpowiadają za inicjację rozwoju raka piersi. Natomiast Persson i współpracownicy porównywali nerwowe komórki macierzyste (*Neural Stem Cells* - NSC) i progenitorowe komórki oligodendrocytów (*Oligodendrocyte Progenitor Cells* - OPC), jako potencjalne komórki powodujące skąpodrzewiaka mózgu u myszy i ludzi<sup>27</sup>. Ich wyniki wskazują, że w złośliwych skąpodrzewiakach mózgu, zawarte w guzie komórki wykazują cechy OPC, i że to raczej komórki progenitorowe, a nie macierzyste odpowiedzialne są za powstanie nowotworu. Źródłem wielu dyskusji jest rodzaj komórek z których powstają białaczki. Podobieństwo komórek inicjujących AML i normalnych komórek odpowiedzialnych za repopulację (tj. o fenotypie CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>) skłoniły niektórych autorów do postawienia hipotezy, że AML pochodzi z krwiotwórczych komórek macierzystych (*Hematopoietic Stem Cells* - HSC). Hipoteza, że CSC pochodzą z bardziej zróżnicowanych komórek progenitorowych wspiera hipotezę, że białaczki wywodzą się z komórek HSC, ponieważ ich czas życia jest na tyle długi, aby doprowadzić do mutacji powodujących transformację nowotworową. Dodatkowo, w oparciu o ich fizjologiczne zdolności do samodzielnego odnowienia, HSC wymaga mniej genetycznych zmian aby przekształcić się w LSC niż inne komórki krwiotwórcze, które wprawdzie musiałyby uzyskać zdolność samoodnowy. Niemniej jednak, inni badacze twierdzą, że cechy, które określają zróżnicowanie szpikowej AML, wskazują na jej progenitorowe pochodzenie<sup>28</sup>. Na poparcie tego, wykazano, że przejściowe komórki progenitorowe odbudowujące populację mogą zainicjować białaczkę szpikową w odpowiedzi na aktywację onkogenu MLL (*Mixed-Lineage Leukaemia* – MLL). Dlatego mutacje występujące w białaczkach, mogą dawać zdolność do samoodnowy wczesnym komórkom progenitorowym.

Trzecia możliwość pochodzenia CSC zakłada że niektóre nowotwory, takie jak potworniaki lub niektóre mięsaki dziecięce (np. guz Wilmsa) mogą powstawać z komórek posiadających właściwości embrionalnych komórek macierzystych, które są nieprawidłowo rozmieszczone w tkankach i stanowią pozostałość po procesie ontogenezy<sup>29</sup>.

Kolejną prawdopodobną hipotezą pochodzenia CSC, są mutacje inicjujące nowotworzenie, mogące wystąpić w dojrzałych komórkach progenitorowych lub w komórkach całkowicie zróżnicowanych. Komórki te następnie stają się niestabilne fenotypowo i w pewnych warunkach mogą ponownie zróżnicować się przekształcając się tym samym do CSC<sup>30</sup>. Bez względu na pochodzenie CSC, transformacja komórek pierwotnych do CSC wymaga zmian zarówno genetycznych jak i epigenetycznych.

## Markery CSC

Kluczowym dla terapii opartej na CSC i dalszego rozwoju badań jest opracowanie testów fenotypowych, które można wykorzystać w celu rzetelnego rozpoznania CSC. Najszerzej stosowana metoda identyfikacji tych komórek polega na detekcji specjalnych markerów białkowych na powierzchni komórki. Niektóre z tych markerów są wspólne dla CSC pochodzących ze złośliwych tkanek i odpowiadających im normalnych komórek macierzystych. Istnieją dwa możliwe wyjaśnienia dla tego zjawiska. Pierwszym powodem jest to, że CSC pochodzą bezpośrednio od normalnych komórek macierzystych w ten sposób, markery powierzchniowe eksprymowane przez normalne komórki macierzyste, znajdują się również na CSC<sup>31</sup>. Drugie wyjaśnienie zakłada, że CSC powstają z komórek, u których ekspresja markerów powierzchniowych jest zbliżona do poziomu w komórkach macierzystych. Dalszy rozwój identyfikacji profilu ekspresji genów w CSC (np. upowszechnienie całogenomowego sekwencjonowania następnej generacji pojedynczych komórek), umożliwi doprecyzowanie markerów powierzchniowych, które są bardziej charakterystyczne dla CSC a tym samym umożliwi rozwój bardziej ukierunkowanych terapii uwzględniających te komórki<sup>32</sup>

## CSC w układzie krwiotwórczym

Myszy z niedoborem odporności są coraz częściej wykorzystywane do badania ludzkich hematopoetycznych komórek progenitorowych oraz LSC. Jedną z metod powszechnie używanych do izolowania tych rzadkich komórek jest selekcja komórek wyznaczonych przeciwciałami skoniugowanymi z fluorochromami na frakcje z użyciem sortowania komórek w polu elektrycznym (*Fluorescent Activated Cell Sorting* – FACS), a następnie inplantacja poszczególnych frakcji komórek do myszy o obniżonej odporności, w celu sprawdzenia ich zdolności do odbudowy populacji. Wyróżnienie markerów powierzchniowych komórki, które pozwalają na ewentualną izolację normalnych mysich HSC z zastosowaniem FACS zostało opisane w latach '80 i na początku '90 XX wieku<sup>33</sup>. Eksperymenty na ludziach wykazały również, że normalne ludzkie HSC są wzbogacone we frakcje CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>. Badania w modelu myszy NOD/SCID o zmniejszonej odpowiedzi immunologicznej wykazały, że frakcja komórek CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> posiada również pewną zdolność repopulacji. Jednakże, komórki CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> mają tylko krótkoterminową zdolność repopulacji w SCID, podczas gdy długoterminowa zdolność repopulacji ograniczona jest jedynie do frakcji komórek CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>. Należy też wspomnieć, że w wielu badaniach charakteryzujących rzadką repopulację frakcji w SCID obserwowano komórki CD34<sup>-</sup>/Lin<sup>-</sup>.



Komórki te, podobnie jak komórki CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>, posiadają długoterminową zdolność repopulacji<sup>34, 35</sup>.

Oprócz markerów HSC, naukowcy rozpoznali markery powierzchniowe komórek LSC. Dick i współpracownicy dostarczyli jednego z pierwszych dowodów na istnienie LSC gdy używając FACS wyizolowali komórki z ludzkiej AML zdolne do indukcji białaczki u myszy NOD/SCID<sup>7</sup>. Wskazali oni, że frakcja komórek wzbogacona w komórki CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> inicjowała rozwój białaczki po ich wszczepieniu do myszy, podczas gdy zarówno frakcja zawierająca komórki CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> jak i CD34<sup>-</sup> nie była zdolna do zainicjowania rozwoju białaczki. Ponadto wszczepiona białaczka mogła być seryjnie przeszczepiona do nowych myszy co świadczy o zdolności samoodnowy komórek CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup><sup>7</sup>. Jednakże, ostatnie badania wykazały, że w LSC jest obecna także frakcja CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>. Pokazano mianowicie, że znacząca część komórek AML, stanowi frakcję CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>, która jest zdolna do indukcji i utrzymania rozwoju białaczki po wszczepieniu do myszy NOD/SCID<sup>36</sup>. Rozbieżność między tymi obserwacjami i wcześniejsze badania pokazały, że przeciwciała monoklonalne anty-CD38 używane do badań i frakcjonowania komórek ma istotny negatywny wpływ na indukcję AML i repopulację komórek w myszach NOD/SCID<sup>37</sup>. Według najnowszych badań, w większości przypadków AML frakcja LIC nie zawiera komórek CD34<sup>-</sup>. Badania te zostały oparte na analizie LIC u dużej grupy pacjentów, mających mutację w nukleofosminie B23 z użyciem myszy SCID z najwyższym możliwym niedoborem oporności. Te AML są klasyfikowane jako odrębny podmiot i charakteryzują się niską ekspresją CD34. W połowie przypadków tych AML, frakcja CD34<sup>-</sup> zawiera LIC, podczas gdy frakcja CD34<sup>+</sup> prowadzi do normalnej wieloliniowej hematopoezy. U pozostałej połowy pacjentów, LIC są obserwowane zarówno wśród CD34<sup>+</sup> jak i CD34<sup>-</sup> komórek AML<sup>38</sup>. Obserwacje te wzmacniają pogląd, że fenotyp błonowy LIC jest heterogenny w zależności od pochodzenia AML.

## CSC w nowotworach litych

Do chwili obecnej określono wiele markerów dla różnych rodzajów nowotworów litych. Receptory CD44 i CD133 zostały uznane jako markery powierzchniowe komórek CSC w kilku typach nowotworów litych. Białko CD133 zostało uznane za istotny marker subpopulacji CSC w rakach prostaty, wątroby i płuc<sup>39</sup>. Wykazano również, że CD133 jest markerem CSC w drobnokomórkowym, ale nie w niedrobnokomórkowym raku płuca. Komórki CD44<sup>+</sup> niedrobnokomórkowego raka płuca są wzbogacone we frakcję CSC zdolną do indukcji guzów u myszy, natomiast komórki CD44<sup>-</sup> takich właściwości nie posiadają<sup>40</sup>. W raku trzustki, komórki CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>/ESA<sup>+</sup> (nazywane trzustkowymi CSC) również posiadają zdolność indukcji guza, natomiast CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>-</sup>/ESA<sup>-</sup> nie mają tej zdolności<sup>41</sup>

Niektóre typy CSC zostały zidentyfikowane w różnych, czasem nie pokrywających się subpopulacjach, takich jak ludzkie CSC raka piersi i jajnika. Badania wykazały, że CD44/CD24 oraz CD133 również można uznać za markery CSC raka jajnika. Al-Hajj i współpracownicy za pomocą FACS odseparowali frakcję komórek zdolnych do indukcji nowotworu z ludzkiego raka piersi<sup>42</sup>. Komórki te frakcjonowano na podstawie ekspresji CD44 i CD24 a ekspresja tych dwóch markerów okazała się heterogenna wśród komórek nowotworowych. Frakcjonowane próbki wszczepiano do piersi myszy SCID i wykazano, że tylko komórki ludzkiego raka piersi z ekspresją CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> są w stanie indukować rozwój nowotworu, podczas gdy implantacja stukrotnie większej liczby komórek CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> lub CD24<sup>-</sup> nie powoduje rozwoju guza. Guzy wszczepienne wykazywały morfologię i heterogenny immunofenotyp podobny do pierwotnych komórek CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> jak również CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> i komórek CD24<sup>-</sup><sup>43</sup>. Wszczepienny nowotwór, mógł być seryjnie przeszczepiany, co stanowi dowód pokazujący zdolność samoodnowy. Aktywność izoformy 1 dehydrogenazy aldehydowej (ALDH1), która może być określona w teście ALDE-FLUOR, również stanowi ogólny funkcjonalny marker prawidłowych i nowotworowych macierzystych komórek ludzkiego raka piersi, okrężnicy i komórek nadnerczy. W przypadku raka piersi, komórki o wysokiej aktywności ALDH zdolne są do samoodnowy i indukowania guzów w ksenotransplantach, o heterogenności populacji zbliżonej do guzów wyjściowych. Faktycznie komórki CD24<sup>-</sup>/CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>+</sup> są uważane za najbardziej zdolne do indukcji rozwoju raka piersi<sup>44</sup>. Ponadto immunohistochemiczne analizy ALDH1 z wykorzystaniem ludzkich próbek raka piersi wykazały, że wysoka ekspresja ALDH1 jest znacznie skorelowana ze skróceniem czasu przeżycia chorych na raka piersi<sup>45</sup>. Frakcja TIC raka pęcherza moczowego, jest również wzbogacona w komórki ALDH1<sup>+</sup>, co wiąże się ze złym rokowaniem i progresją nowotworu pęcherza<sup>46</sup>. Natomiast Penumatsa i współpracownicy wykazali, że ekspresja ALDH1 w raku jajnika jest silnie obniżona w nowotworach złośliwych w porównaniu do normalnych komórek jajnika i guzów łagodnych, tym samym ekspresja ALDH1 nie jest skorelowana z ekspresją markerów CD44 i CD133<sup>47</sup>. Tak więc, ekspresja ALDH1 w komórkach jajnika nie jest podobna do ekspresji ALDH1 w komórkach piersi i raka jelita grubego, co sugeruje istnienie funkcjonalnych różnic między komórkami tych nowotworów.

Wiarygodność wielu z dotychczas odkrytych markerów CSC jest jednak ostatnio kwestionowana. Wykazano między innymi, że białko CD133, które wcześniej uważano za najważniejszy marker komórek guza pnia mózgu, nie pozwala rozróżnić komórek indukujących nowotwór od komórek, które nie mogą indukować nowotworu. Co więcej populacja komórek CD133<sup>-</sup>, wbrew temu co sądzono wcześniej, również posiada zdolność indukcji nowotworu<sup>48</sup>. CD133 był również używany jako fenotypowy marker CSC raka jelita

grubego, jednak również w tym typie nowotworu, zarówno komórki CD133<sup>-</sup> jak i CD133<sup>+</sup> posiadają zdolność indukcji guza w modelu *in vivo* <sup>49</sup>. Ponadto, zarówno frakcje CD133<sup>+</sup> i CD133<sup>-</sup> czerniaka wykazują bardzo wysoką częstotliwość indukcji guzów. Nie udało się do tej pory zidentyfikować fenotypowych różnic pomiędzy komórkami czerniaka zdolnymi do indukcji nowotworu a tymi, które tej zdolności nie posiadają <sup>5</sup>.

Jedną z powszechniejszych metod analizy frakcji CD133<sup>+</sup> jest ich wysortowanie z użyciem fluorescencyjnie skoniugowanych przeciwciał. I tak na przykład Tirino i współpracownicy używając mysich przeciwciał anti-human CD133 PE oznaczyli zawartość frakcji CD133<sup>+</sup> na ok. 4% a następnie przy pomocy sortera wzbogacili dziesięciokrotnie linię A549 w frakcję CD133<sup>+</sup> (do 40%). Pozwoliło im to na pokazanie, że zarówno komórki CD133<sup>+</sup> jak i CD133<sup>-</sup> ulegają tranzycji epithelialno mezenchymalnej <sup>50</sup>. Podobnie Meng i współpracownicy wyizolowali populację CD133<sup>+</sup> i CD133<sup>-</sup> z dwóch różnych linii nowotworowych (A549 i H446) i odkryli, że populacje te posiadają podobną zdolność do tworzenia koloni, samoodnowy, proliferacji, różnicowania, inwazji a także obie populacje po sortowaniu wykazują oporność na chemoterapeutyki. Tym samym doszli do wniosku, że CD133 nie może służyć jako marker komórek macierzystych nowotworu <sup>51</sup>.

Podsumowując, CSC posiadające zdolność samoodnowy i różnicowania, mogą prezentować specyficzne markery powierzchniowe. Być może istnieją jeszcze nie odkryte markery, mogące pomóc specyficznie rozróżnić między populacją CSC a nie CSC. Chociaż określenie markerów powierzchniowych CSC jest niezwykle ważne, to jednak samo jest niewystarczającym aby określić zdolność danych komórek do samoodnowy. Koniecznym jest przeprowadzenie testów funkcjonalnych CSC, które ocenią zdolność komórek do samoodnowy i propagacji nowotworu. Test, który najlepiej wpasowuje się w te kryteria, to test seryjnej ksenotransplantacji na zwierzętach, który mimo licznych ograniczeń, obecnie uważany jest za tzw. złoty standard.

## CSC a perspektywy w leczeniu raka

Konwencjonalne metody leczenia przeciwnowotworowego (np. chemioterapia i radioterapia) często jedynie przejściowo powodują zmniejszenie guzów poprzez eliminację większości zróżnicowanych proliferujących komórek guza. Tym samym nie prowadzą one do eliminacji CSC, co skutkuje niepowodzeniem terapii, a w konsekwencji wznową choroby. Niektóre właściwości CSC utrudniają ich skuteczną eliminację na drodze terapii konwencjonalnej: CSC posiadają umiejętność autoprotekcji dzięki aktywacji wielu transporterów oporności wielolekowej takich jak ABCB1 (glikoproteina P) i/lub ABCG2 (*Breast Cancer Resistance Protein-1* BCRP). Aktywacja tych transporterów, które

wypompowują leki z wnętrza komórki, znacząco obniża efektywność i stężenie leku *in situ*, powodując relatywną oporność na działanie chemioterapii<sup>52</sup>. Ponadto, CSC proliferują znacznie wolniej, co pozwala im „uciec” od tradycyjnych radio- i chemioterapii ukierunkowanych na szybko dzielące się komórki. CSC posiadają również pewne właściwości nadające im oporność na apoptozę indukowaną przez radioterapię i chemioterapię: nadekspresja anty-apoptotycznych białek takich jak Bcl-2 i surwiwiny, a także dużą zdolność do naprawy DNA. Wiele leków przeciwnowotworowych, takich jak związki platyny i leki alkilujące (np. nitrozomocznik) powodują bezpośrednie uszkodzenie struktury DNA, tym samym oporność CSC na te związki wynika bezpośrednio z aktywacji systemów naprawczych DNA<sup>53, 54</sup>. Badania komórek macierzystych CD133<sup>+</sup> glejaka wielopostaciowego (agresywny nowotwór mózgu) zdolnych do inicjowania nowotworu, wykazało oporność tych komórek na działanie promieniowania gamma poprzez preferencyjną aktywację systemów naprawczych uszkodzeń DNA, związanych z powstaniem dsDNA pęknięć<sup>55</sup>. Ponadto, ostatnio wykazano, że białko z grupy *polycomb* – Bmi1 przyczynia się do radiooporności normalnych i nowotworowych nerwowych komórek macierzystych, poprzez aktywację systemów naprawczych DNA<sup>56</sup>. Bao i współpracownicy donieśli również, że białka punktów kontrolnych odgrywają istotną rolę w oporności CSC na radioterapię i uszkodzenia DNA<sup>54</sup>. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA, białka punktów kontrolnych są aktywowane i ich ekspresja zwiększa się. Badanie komórek glejaka CD133<sup>+</sup>, które są uznawane za CSC, wykazało, że radiooporność CSC CD133<sup>+</sup>, może zostać zniesiona specyficznymi inhibitorami kinaz Chk1 i Chk2 punktów kontrolnych. Białka Chk1 i Chk2 regulują punkty kontrolne, opóźniając lub zatrzymując cykl komórkowy do czasu naprawy uszkodzonego DNA. Ponadto, hamowanie cyklu komórkowego poprzez ekspresję inhibitora kinaz cyklinozależnych 1A (CDKN1A, znany również jako p21) ogranicza uszkodzenia DNA i utrzymuje zdolność samoodnowy LIC<sup>58</sup>. Dotychczasowe badania podkreślają istotność inhibicji odpowiedzi na uszkodzenia DNA w oporności TIC na terapię. Również, ekspresja genów związanych ze stresem oksydacyjnym w komórkach CSC, może przyczyniać się, przynajmniej w części, do ich oporności na terapię przeciwnowotworową<sup>57</sup>.

Do skutecznej walki z nowotworem, należy opracować terapię selektywnie eliminującą CSC i nieszkodliwą dla normalnych komórek macierzystych. Naukowcy poszukują specyficznych markerów powierzchniowych oraz funkcjonalnych różnic w sygnalizacji lub strukturze białek, które pozwoliłyby na rozróżnienie pomiędzy CSC a normalnymi komórkami macierzystymi. Porównywanie profili ekspresji genów komórek macierzystych, normalnych komórek, komórek nowotworu i CSC, może prowadzić do opracowania metod terapeutycznych, które preferencyjnie eliminowałyby CSC. Możliwe są

także terapie zmierzające do stymulacji różnicowania tych komórek co prowadzi do zahamowania wzrostu CSC<sup>59</sup>.

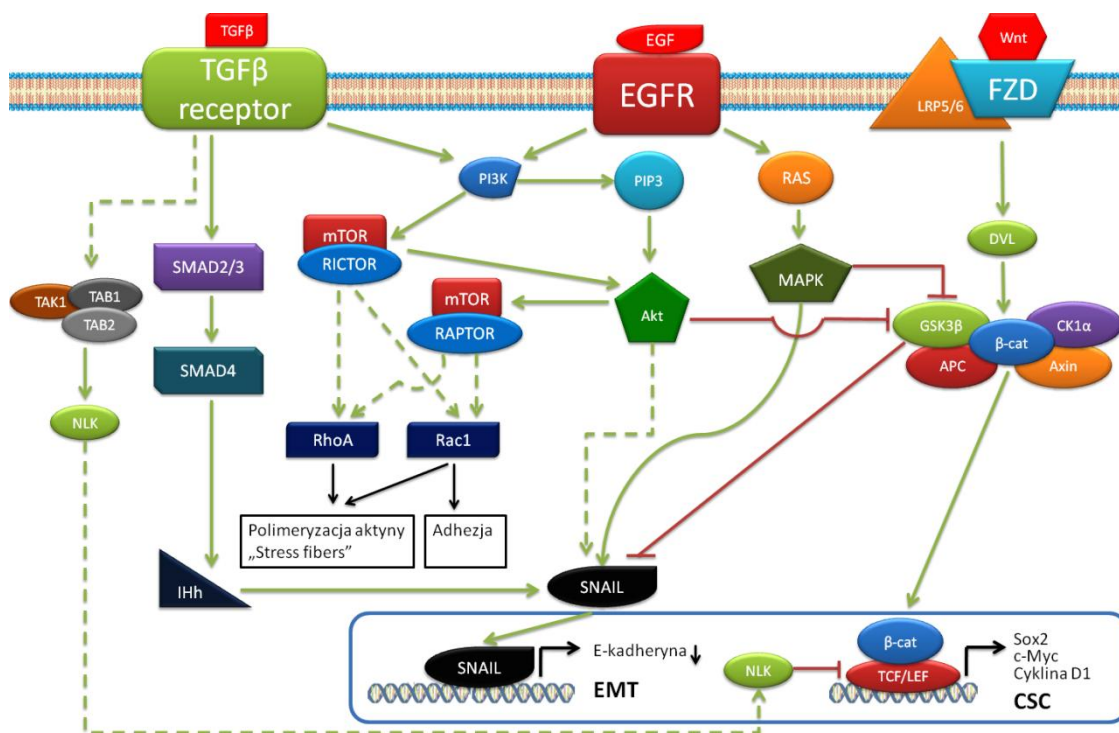
## **Rola szlaku Akt/mTOR w przejściu epitelialno-mezenchymalnym oraz w utrzymaniu fenotypu komórek macierzystych nowotworu**

Przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT) wiąże się z nabyciem przez komórki nowotworowe inwazyjnego charakteru poprzez utratę kontaktu/połączeń pomiędzy komórkami, ich polaryzację oraz nabycie zdolności migracyjnych. Przejście EMT niekiedy dzielone jest na trzy różne typy w zależności od procesów w jakie jest ono zaangażowane. Typ 1 EMT wraz z odwrotnym procesem przejściem mezenchymalno-epitelialnym (MET), jest zjawiskiem naturalnie występującym podczas rozwoju embrionalnego<sup>60</sup>. Typ 2 EMT związany jest z gojeniem się ran i rekompozycją tkanek<sup>61</sup>. Z punktu widzenia niniejszej pracy najbardziej istotnym typem EMT jest Typ 3, biorący udział w uzłośliwieniu komórek nowotworowych<sup>62</sup>.

Istnieje wiele badań prowadzonych *in vitro* oraz *in vivo* potwierdzających rolę procesu EMT w zwiększeniu inwazyjności komórek nowotworowych oraz nabyciu przez nie zdolności przerzutowania. Obecnie uważa się, że proces EMT obserwowany w komórkach nowotworowych ko-regulowany jest przez te same szlaki jak w przypadku procesu EMT obserwowanego podczas rozwoju embrionalnego. Tranzycja EMT wymaga udziału wielu czynników transkrypcyjnych, które w odpowiedzi na bodziec, np. związanie białka TGF- $\beta$  z jego receptorem, ulegają translokacji do jądra komórkowego a następnie zmieniają ekspresję białek. Główne czynniki transkrypcyjne biorące udział w procesie EMT to białka z motywem helisa-pętla-helisa Twist i E47, białka z motywem palca cynkowego Snail i Slug, białka z motywem palca cynkowego i homodomeną Zeb1 i Zeb2 oraz Foxc2<sup>63</sup>. Czynniki te hamują ekspresję E-kadheryny i jednocześnie zwiększają ekspresję genów kodujących białka odpowiadające za fenotyp mezenchymalny, takich jak wimentyna i N-kadheryna. Zahamowanie ekspresji E-kadheryny jest powszechnie uważane za kluczowy etap tranzycji EMT, ponieważ białko to jest niezbędnym składnikiem połączeń międzykomórkowych<sup>64</sup>.

Wiele szlaków może doprowadzić do indukcji przejścia epitelialno-mezenchymalnego w tym te aktywowane przez TGF- $\beta$ <sup>65</sup>, FGF<sup>66</sup>, EGF<sup>67</sup>, HGF<sup>68</sup>, Wnt/ $\beta$ -katenina<sup>69</sup> i Notch<sup>70</sup>. Hipoksja oraz szlaki związane z naprawą uszkodzeń DNA również mogą indukować EMT<sup>71 72</sup>. Wiele z wyżej wymienionych szlaków uczestniczy również w regulacji proliferacji i jak zostało już wspomniane, w utrzymaniu pluripotentnych właściwości komórek embrionalnych i komórek macierzystych nowotworu.

Komórkowe szlaki przekazywania sygnału często oddziałują ze sobą modulując swoje działanie. **Rysunek 3** przedstawia potencjalne interakcje między szlakami TGF- $\beta$  – Wnt/ $\beta$ -katenina – EGF – Akt/mTOR.



**Rysunek 3** – Możliwe interakcje pomiędzy szlakami odpowiedzialnymi za przejście EMT i utrzymanie fenotypu CSC.

Indukcja przejścia epitelialno-mesenchymalnego jest bezpośrednio związana z aktywacją szlaku PI3K/Akt, udowodniono że aktywacja kinazy Akt stabilizuje czynnik transkrypcyjny Snail będący rep resorem E-kadheryny, prowadząc do zahamowania ekspresji tego genu<sup>73</sup>.

## Kinazy 3-fosfatydoinozytolu (PI3Ks)

Kinazy 3-fosfatydoinozytolu (PI3Ks) zostały odkryte w 1985 roku przez Lewis'a Cantley'a i jego współpracowników<sup>74</sup>. W kolejnych latach wykazano, że białka PI3K to enzymy odpowiedzialne za przekazywanie sygnału poprzez fosforylację grupy hydroksylowej w pozycji 3' pierścienia inozytolu, fosfatydoinozytolu i fosfoinozytydów. Szlaki sygnałowe, w których zaangażowana jest rodzina kinaz PI3K uczestniczą między innymi w regulacji wzrostu, różnicowania, wewnątrzkomórkowego transportu oraz zdolności do ruchu komórek. Z powyższych powodów enzymy te są zaangażowane w przemiany komórek nowotworowych niezłośliwych w komórki złośliwe.

Szlak sygnalizacyjny PI3K może być aktywowany przez wiele sygnałów zewnątrzkomórkowych. W stymulację szlaku PI3K zaangażowane są m.in. receptory wzrostu

posiadające wewnątrzkomórkową domenę kinazy tyrozynowej, receptory związane z białkiem-G (GPCR), białka odpowiedzialne za adhezję komórek (np. integryny) oraz onkogeny, takie jak Ras. Kinazy 3-fosfatydyloinozytolu należą do rodziny kinaz lipidowych i możemy podzielić je na trzy klasy w zależności od rodzaju źródła ich stymulacji. Izoformy klasy IA aktywowane są poprzez receptory kinaz tyrozynowych lub Ras; izoformy klasy IB aktywowane są poprzez heterotrimery białek G lub Ras; izoformy klasy II aktywowane są poprzez receptory insulinowe, receptory wiążące czynniki wzrostu i integryny natomiast klasa III izoenzymów, jest konstytutywnie aktywna <sup>75</sup>.

Dla aktywacji szlaku Akt/mTOR kluczowa jest klasa IA enzymów PI3K, ponieważ katalizuje tworzenie 3,4,5-trifosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP3) z 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2). Aktywacja PI3K odbywa się poprzez bezpośrednią interakcję i zaangażowanie domen homologów 2 Src (SH<sub>2</sub>) z resztami fosfotyrozynowymi na aktywowanych receptorach wzrostu lub też poprzez bezpośrednią interakcję z aktywowanym białkiem Ras <sup>76, 77</sup>.

Aktywowana PI3K ulega translokacji do błony komórkowej i katalizuje fosforylację PIP2 w wyniku czego powstaje PIP3. Proces ten jest negatywnie regulowany przez PTEN, który defosforyluje PIP3 do PIP2. Ponadto fosfataza 4-fosfoinozytolu typu II (INPP4B) przekształca PIP2 w monofosforan fosfatydyloinozytolu (PIP). Następnie PIP3 aktywuje kinazy serynowo-treoninowe: fosfoinozyto-zależną kinazę 1 (PDK1) i kinazę Akt (na treoninie 308) <sup>78</sup>.

## Kinazy Akt i mTOR

Białko Akt należy do rodziny kinaz serynowo/treoninowych i pełni kluczową rolę w regulacji proliferacji i wzrostu komórek. Konstytutywnie aktywna kinaza Akt znajdująca jest w wielu typach nowotworów i odpowiedzialna jest m.in. za antyapoptotyczne właściwości komórek nowotworowych <sup>79</sup>. Kinaza Akt występuje w postaci trzech izoform Akt1, Akt2 i Akt3, będących produktami trzech różnych genów. W warunkach fizjologicznych formy Akt1 i Akt2 ulegają ekspresji w większości komórek, zaś ekspresja formy Akt3 ograniczona jest między innymi do komórek prostaty, okrężnicy, płuc i piersi <sup>80</sup>. Irie i współpracownicy wykazali że izoformy Akt1 i Akt2 wpływają na tranzycję EMT w dwojaki sposób <sup>81</sup>. Jak pokazano wyciszenie ekspresji Akt1 prowadziło do indukcji EMT wywołanej białkiem IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-I*) w komórkach MCF-10A, natomiast wyciszenie ekspresji Akt1 i Akt2 jednocześnie hamowało zarówno przejście EMT jak i tempo proliferacji IGF-I traktowanych komórek <sup>81</sup>. Kinaza Akt działa bezpośrednio na dwie inne kluczowe dla przebiegu procesu EMT kinazy. Pierwszą z nich jest kinaza syntazy 3β glikogenowej (GSK3β) Akt hamuje

aktywność GSK3 $\beta$ . Jak zostało pokazane przez Bachelder i współpracowników, inhibicja GSK3 $\beta$  w MCF 10A powodowała indukcję EMT poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego Snail<sup>82</sup>.

Obecność aktywowanej (ufosforylowanej) formy Akt2 została wykazana w 43-90% przypadkach niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC) oraz do 50% przypadków drobnokomórkowego raka płuc (SCLC)<sup>83</sup>. Jednakże mutacje Akt1 stwierdzono jedynie w przypadku 1% wszystkich nowotworów płuc<sup>84</sup>. Dane opublikowane w 2013 roku pokazały obecność aktywnej formy Akt (bez wskazywania na konkretne izoformy) w 13 z 80 linii komórkowych NSCLC, w tym 12 z 13 tych linii dodatkowo posiadało mutacje w EGFR lub HER2, amplifikację PIK3CA lub utratę PTEN<sup>85</sup>. Aktywowana kinaza Akt pomaga w utrzymaniu złośliwego charakteru komórek na wiele sposobów. Najważniejszymi z nich są unikanie apoptozy poprzez inhibicję BAD i BAX, genów dwóch proapoptotycznych białek z rodziny Bcl2. Akt fosforyluje również Mdm2, powodując hamowanie apoptozy regulowanej przez p53, a także negatywnie reguluje czynniki transkrypcyjne Foxo, co hamuje ekspresję genów proapoptotycznych<sup>86</sup>.

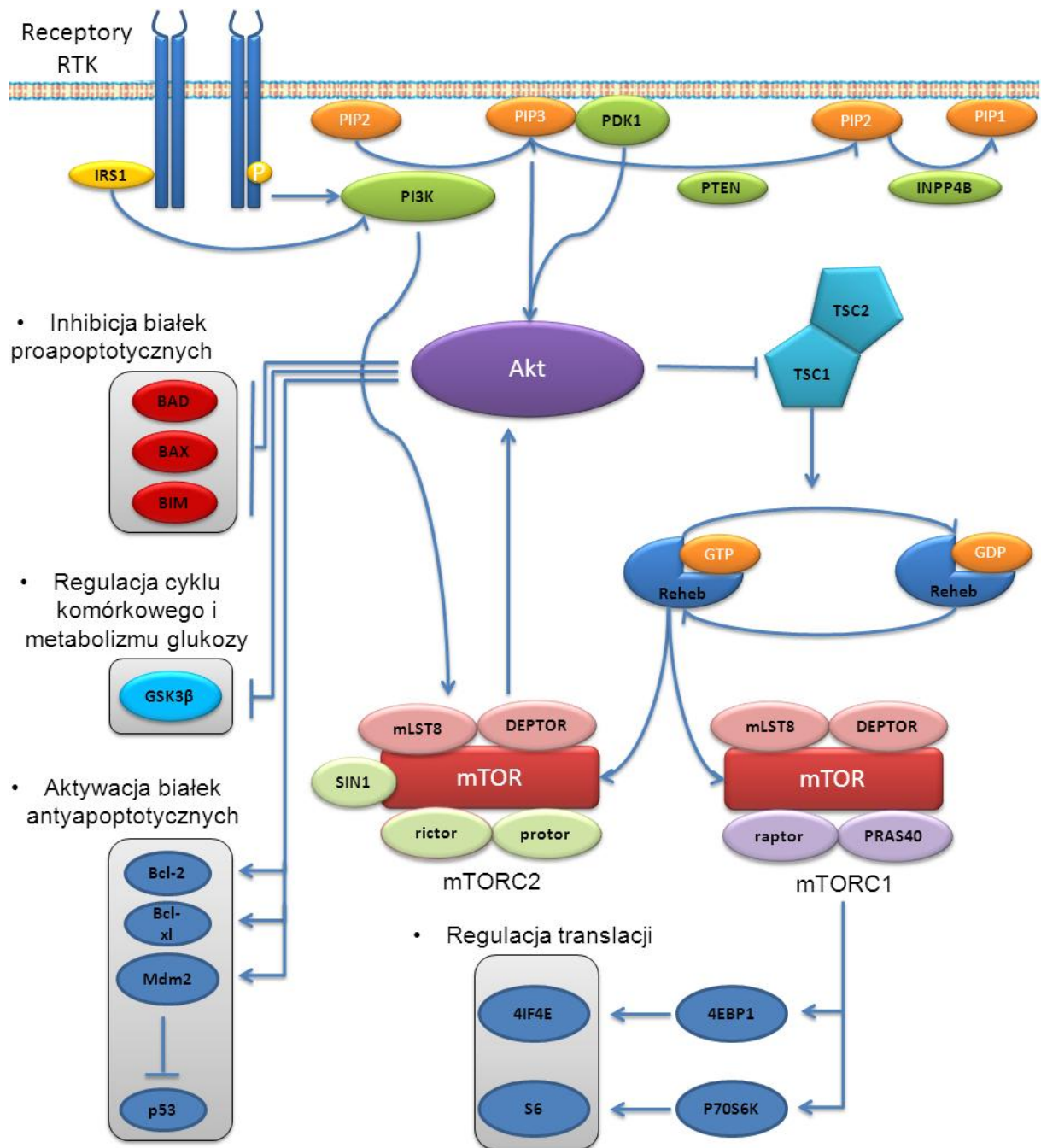
Drugą z omawianych kinaz, jest kinaza mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Kinaza mTOR jest składową dwóch typów kompleksów białkowych. Kompleks mTORC1 złożony jest z kinazy mTOR, Raptor, (*regulatory associated protein of mTOR*), mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8*) białek Pras40 i Deptor, a jego aktywność może być hamowana rapamycyną. Kompleks mTORC2 złożony jest zaś z kinazy mTOR, Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mLst8 i mSin1 (*mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*) i nie jest wrażliwy na rapamycynę<sup>87</sup>.

mTOR jest kinazą serynowo-treoninową, która po aktywacji bierze udział w kaskadzie szlaku PI3K/Akt/mTOR regulującej cykl komórkowy i apoptozę. mTOR promuje również proces nowotworzenia poprzez aktywację kompleksu eIF4 i inicjację translacji białek odpowiedzialnych m.in. za proliferację komórek. Aktywność mTOR pozytywnie koreluje z tworzeniem przerzutów nowotworów do węzłów chłonnych, wykazano także, że aktywność kinazy mTOR we wczesnych stadiach powstawania NCLC wiąże się ze złymi rokowaniami dla pacjenta<sup>88</sup>. Aż do 90% przypadków adenokarcinomy, 60% przypadków wielkokomórkowego raka płuc (LCC) oraz 40% przypadków drobnokomórkowego raka płuc charakteryzuje się obecnością aktywnej formy mTOR (p-mTOR)<sup>89</sup>.

Fosforylacja Akt na reszcie treoniny 308 jest niezbędna (fosforylacja Ser473 nie jest konieczna) do aktywacji kompleksu mTORC1 przez tę kinazę<sup>90</sup>. Aktywny kompleks mTORC1 aktywują syntezę białek poprzez białko S6K (*ribosomal protein S6 kinase beta-1*) oraz działa hamująco na kompleks mTORC2 poprzez zatrzymanie fosforylacji białka Rictor.



Proliferyjujące komórki wymagają aktywnego kompleksu mTORC1, jednakże przejście komórek przez fazę S cyklu komórkowego wymaga zahamowania mTORC1 i aktywacji mTORC2<sup>91</sup>.



**Rysunek 4** – Schemat szlaku PI3K/Akt/mTOR.

Aktywność obu kompleksów mTOR jest również wymagana do całkowitej tranzycji EMT indukowanej przez białko TGF-β, co udowodniły prace Lamouille i Derynck<sup>92, 93</sup>. Grant i współpracownicy doszli do podobnych wniosków prowadząc badania nad trofoblastami,

gdzie udowodnili oni, że do całkowitej tranzycji EMT wymagana jest aktywność obu kompleksów kinazy mTOR oraz aktywność kinazy Akt <sup>94</sup>.

Przejście epitelialno-mezenchymalne wywołuje ponadto zmiany w dystrybucji kluczowego regulatora szlaku Wnt -  $\beta$ -kateniny, która to ulega translokacji do jądra gdzie wiąże się z kompleksem Tcf/Lef i reguluje transkrypcję genów docelowych m.in. markerów komórek macierzystych takich jak CD44 lub Lgr5 <sup>95</sup> oraz czynników transkrypcyjnych kontrolujących pluripotentność takich jak np. c-Myc <sup>96</sup>. Jak wcześniej już wspomniano, szlak Wnt związany jest z regulacją samoodnowy i różnicowania embrionalnych komórek oraz komórek macierzystych nowotworu.

Wiele prac wykazało wzajemne interakcje pomiędzy szlakami zaangażowanymi w przejście EMT a szlakami odpowiedzialnymi za różnicowanie czy utrzymanie pluripotentnych właściwości komórek. Wykazano m.in. że czynniki transkrypcyjne takie jak Snail i Twist oraz cytokiny np. TGF- $\beta$  uczestniczące w procesie EMT biorą udział w zachowaniu fenotypu komórek macierzystych nowotworu <sup>97, 98, 99</sup>.

Podobne zależności istnieją również pomiędzy procesem odwrotnym MET i generowaniem komórek macierzystych przez transróżnicowanie, w wyniku którego otrzymujemy tak zwane indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSCs) z komórek somatycznych, takich jak fibroblasty. Procesy molekularne indukujące epitelialny fenotyp podczas tworzenia iPSCs kontrolowane są przez czynniki transkrypcyjne takie jak Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc. Czynniki te nie tylko powodują nabycie zdolności do samoodnowy i różnicowania przez komórki fibroblastów, ale także odpowiadają za ich epitelialny fenotyp. Klf4 indukuje ekspresję E-kadheryny zaś Oct4A i Sox2 hamują ekspresję Snail co w połączeniu z hamowaniem genu kodującego TGF- $\beta$  i receptora typu II TGF przez c-Myc prowadzi do nabycia epitelialnego charakteru przez iPSCs <sup>100</sup>.

Wcześniejsze badania naszego zespołu wykazały że nowotworowe komórki macierzyste mogą pod wpływem leków przejściowo zahamować swoją proliferację poprzez wejście w stan przedwczesnego starzenia komórkowego. W tych badaniach wykorzystaliśmy linię A549 niedrobnokomórkowego raka płuca. Traktowanie komórek A549 inhibitorami topoizomerazy II (ICRF-187 i m-AMSA) indukowało proces przedwczesnego starzenia tych komórek podczas 120h inkubacji z lekami. Proces ten był jednak odwracalny dla frakcji CSC i po ok. 7 dniach komórki te mogły wznowić proliferację. Traktowanie komórek A549 inhibitorami topoizomerazy II w połączeniu z kofeiną znacząco wydłużyło czas potrzebny do wznowienia proliferacji przez CSC, poprzez zatrzymanie aktywacji szlaków ATM/ATR indukowanych uszkodzeniami DNA. Równolegle zahamowana była fosforylacja kinazy Akt na reszcie seryny 473. Kofeina, poprzez hamowanie aktywności kinazy Akt oraz szlaków

ATM/ATR indukowanych lekami w komórkach A549, powodowała drastyczny wzrost frakcji resztkowej SP przy jednocześnie niezmienionej frakcji komórek CSC charakteryzowanych ekspresją onkogenu c-Kit<sup>+</sup> (CD177) <sup>1</sup>.

Traktowanie komórek A549 wzrastającymi stężeniami kofeiny w niedługim czasie pozwoliło na wyprowadzenie linii komórkowej zdolnej do normalnego wzrostu w ciągłej obecności 1mM kofeiny. Linia ACaff charakteryzowała się zmienioną wrażliwością na niektóre chemoterapeutyki oraz znacznie zredukowaną frakcją resztkową SP (**Supl. Rysunek 1**). Trwała zmiana morfologii komórek ACaff z epitelialnej w mezenchymalną po usunięciu kofeiny z medium pozwoliła na otrzymanie linii ACM. Linia ACM, pomimo mezenchymalnej morfologii, posiadała zredukowaną frakcję resztkową SP. W chwili obecnej uważa się, że tranzycja EMT w komórkach prowadzić może do nabycia cech charakterystycznych dla CSC. W badanym układzie komórkowym zaobserwowaliśmy tranzycję EMT połączoną z redukcją frakcji SP, co postawiło pytanie na temat roli CSC podczas tego procesu. Komórki linii ACaff hodowane w ciągłej obecności 1mM kofeiny charakteryzowały się zmniejszoną fosforylacją kinazy Akt na reszcie seryny 473. Dane literaturowe wykazały możliwy wpływ kofeiny zarówno na kompleks kinazy mTORC1 <sup>101</sup>, jak i na kinazy Akt i mTORC2 <sup>94</sup>. Ponadto pokazano, że kofeina może hamować zdolność migracyjną trofoblastów poprzez hamowanie kinazy Akt i kompleksu mTORC2. Zaangażowanie szlaku Akt/mTOR zarówno w proces EMT jak i utrzymanie fenotypu CSC jest obecnie przedmiotem intensywnych badań. Posiadanie układu komórkowego z stabilnymi różnicami w fosforylacji kinazy Akt na reszcie seryny 473 stwarza możliwość badania roli aktywacji tej kinazy na różne procesy. Układ linii komórkowych składający się z macierzystej linii A549 oraz linii potomnych ACaff i ACM różniących się stopniem przejścia EMT oraz frakcją CSC, stwarza możliwość śledzenia obu tych procesów równolegle i może pozwolić na uściślenie jaki udział w obu tych procesach ma sposób aktywacji kinazy Akt.

## Wyniki

### Określenie heterogeniczności badanych linii

Linia ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuca A549 charakteryzuje się heterogeniczną morfologią. Oznacza to, że podczas rutynowej hodowli, możemy wizualnie wyróżnić komórki różniące się cechami morfologicznymi takimi jak kształt i wielkość. W naszej grupie badawczej z komórek linii A549 wyprowadzone zostały trzy linie potomne, które różniły się między innymi morfologią od linii rodzicielskiej.

- Linię **ACaff** uzyskano poprzez adaptacyjną hodowlę komórek A549 w ciągłej obecności 1mM kofeiny (**Supl. Rysunek 1**)
- Usunięcie kofeiny z medium spowodowało zmiany morfologiczne w linii ACaff i jej transformację w stabilną linię potomną **ACM**
- Adaptacyjna hodowla linii A549 z triazoloakrydonem C-1305 doprowadziła do otrzymania linii **A549 K1.5** charakteryzującej się nadekspresją transportera ABCG2<sup>102</sup> oraz typowo epitelialną morfologią, dlatego też została włączona do dalszych badań.

Zmiany obserwowane w morfologii badanych linii wiązały się z obecnością w każdej z nich przynajmniej trzech odrębnych typów komórek, zdolnych do utworzenia trzech różnych rodzajów kolonii. Na **Rysunku 5** przedstawiłem morfologię tworzonych przez te komórki kolonii.

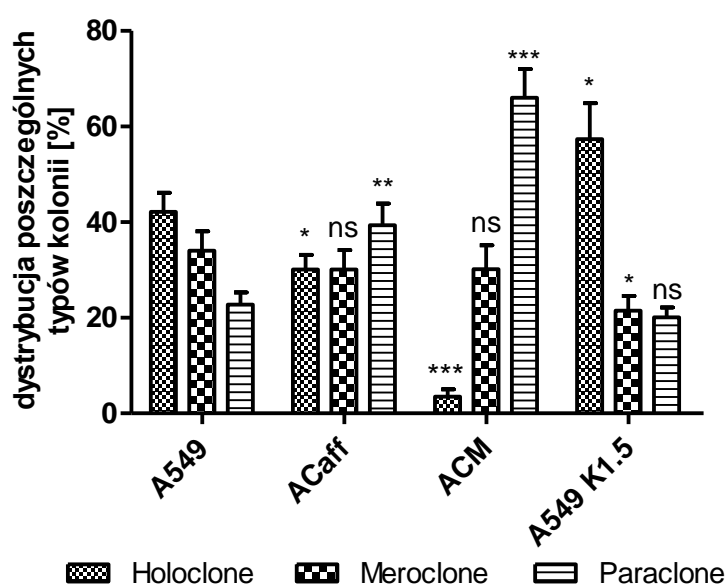


**Rysunek 5** – Morfologia kolonii tworzonych przez komórki badanych linii po 120h hodowli. Barwienie metodą Giemsy.

Nazwy poszczególnych subtypów zaczerpnąłem z jednego z pierwszych artykułów poruszających heterogeniczność linii komórkowych<sup>103</sup>. Zarówno w oryginalnym artykule jak i w późniejszych artykułach te trzy typy klonów wiązano z ich różnym potencjałem proliferacyjnym. Największy potencjał proliferacyjny wykazywały komórki tworzące kolonie

typu *Holoclone*, zaś najmniejszy potencjał proliferacyjny wykazywały komórki tworzące kolonie typu *Paraclone*<sup>104</sup>. Obecnie różny potencjał proliferacyjny poszczególnych klonów wiązany jest z obecnością nowotworowych komórek macierzystych. *Holoclone* i *Meroclone* posiadające duży potencjał proliferacyjny i zawierają frakcję nowotworowych komórek macierzystych, *Paraclone* zaś charakteryzujące się niskim potencjałem proliferacyjnym są pozbawione frakcji nowotworowych komórek macierzystych<sup>105</sup>. Zmiany w dystrybucji komórek tworzących poszczególne typy kolonii pomiędzy liniami A549, ACaff, ACM i A549 K1.5 sugerują występowanie różnic w proporcji frakcji CSC pomiędzy tymi liniami

**Wykres 1.**



**Wykres 1** – Różnice w dystrybucji poszczególnych subklonów w badanych liniach komórkowych. Nad słupkami zaznaczono odchylenie standardowe (+SD) oraz istotność zmian w dystrybucji subklonów w stosunku do rodzicielskiej linii A549 (\*\*\*) –  $P \leq 0.001$ , \*\* –  $P \leq 0.01$ , \* –  $P \leq 0.05$ , ns –  $P > 0.05$ , jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, z korekcją testem Tukey'a).

Na podstawie danych zawartych w literaturze i **Wykresu 1** założyłem, że linia A549 K1.5 charakteryzująca się zwiększoną frakcją komórek typu *Holoclone* w stosunku do linii A549 charakteryzować się będzie także zwiększoną frakcją CSC. Zaś linia ACM charakteryzująca się znacznie zmniejszoną frakcją komórek typu *Holoclone* i zwiększoną frakcją komórek typu *Paraclone* w stosunku do linii A549 charakteryzować się będzie zmniejszoną frakcją CSC<sup>103, 104, 105</sup>. W badanych liniach A549, ACaff, ACM i A549 K1.5 wszystkie trzy typy komórek tworzące odrębne morfologicznie subklony posiadały podobny potencjał proliferacyjny. O zachowaniu zdolności do proliferacji subklonów świadczy fakt, że udało mi się wyizolować poszczególne typy kolonii i rozekspandować je, uzyskując trzy

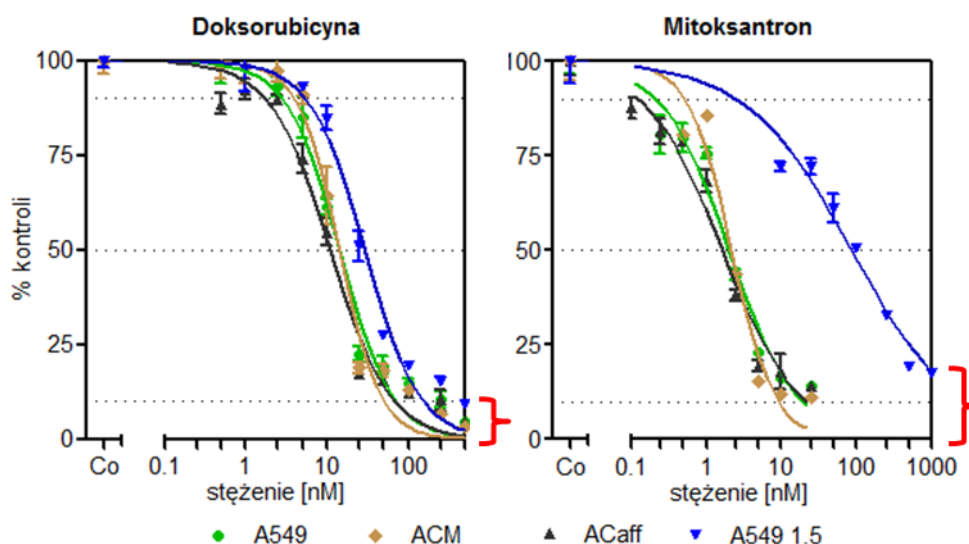
homogenne linie komórkowe składające się w większości z komórek tworzących kolonie typu *Holoclone*, *Meroclone* lub *Paraclone*. Homogenność tych linii podczas początkowych pasażu (1-10) wynosiła ponad 90%, jednak z biegiem czasu, następowała stopniowa utrata ich homogenności.

Widoczne różnice w morfologii pomiędzy badanymi liniami A549, ACaff, ACM i A549 K1.5 mogą również odpowiadać różnicom jakie obserwujemy w trakcie procesu tranzykcji epitelialno-mezenchymalnej, podczas której nieruchliwe komórki epitelialne przekształcają się w komórki mezenchymalne, które to komórki, nabywają zdolność do migracji.

Słuszność obowiązującej obecnie tezy w myśl której, komórki nowotworowe podczas procesu EMT nabywają cech charakterystycznych dla CSC i dzięki temu stają się bardziej odporne i inwazyjne, poparta jest licznymi dowodami eksperymentalnymi, jednak mimo to wciąż teza ta budzi wątpliwości <sup>98</sup>. Zastosowanie unikalnego układu potomnych linii komórkowych, które różnią się od linii rodzicielskiej stopniem przejścia EMT oraz wielkością frakcji komórek niosących cechy CSC umożliwia badanie obu tych procesów jednocześnie. W kolejnych akapitach dysertacji, scharakteryzowałem badane linie komórkowe pod kątem różnic w stopniu przejścia epitelialno-mezenchymalnego oraz różnic związanych z obecnością komórek posiadających cechy CSC co pozwoliło na lepsze zrozumienie mechanizmu regulującego tego procesy.

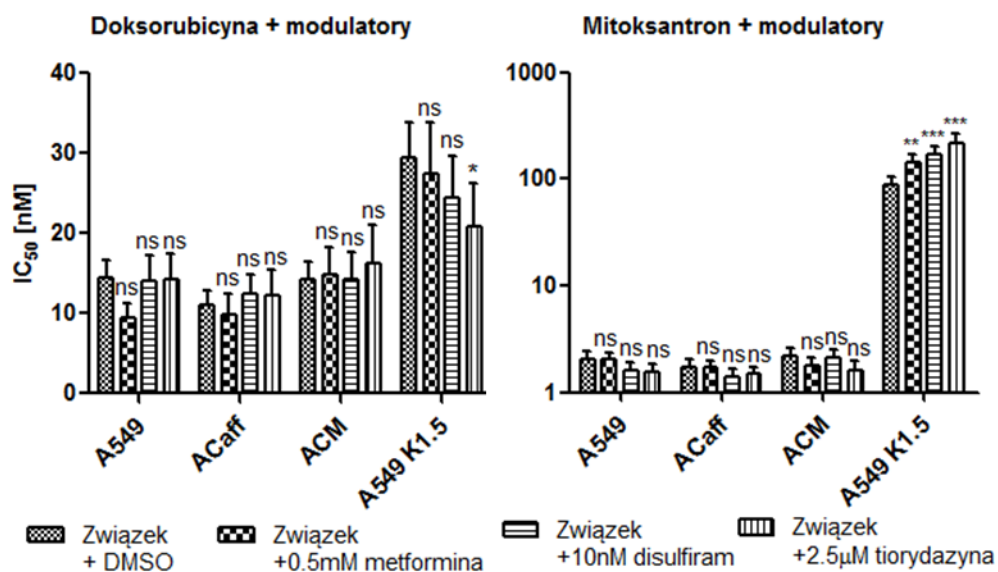
## Określenie wrażliwości badanych linii na wybrane cytostatyki

Linie A549, ACaff, ACM i A549 K1.5 zostały porównane pod kątem ich wrażliwości na działanie dwóch chemoterapeutyków należących do grupy antybiotyków antracyklinowych – mitoksantronu i doksorubicyny. Chemoterapeutyki te są stosowane w konwencjonalnej terapii przeciwnowotworowej. **Wykres 2** pokazuje, że oba chemoterapeutyki działają w nanomolowym zakresie stężeń. Natomiast w żadnym przypadku nie udało się osiągnąć rzeczywistego stężenia związku, które byłoby w stanie zabić więcej niż 99% komórek. Dla doksorubicyny obserwujemy 5-10% frakcję komórek, które zdolne są do przeżycia 120h inkubacji ze związkiem, dla mitoksantronu udział ten wynosi 10-20%. W przeciwieństwie do doksorubicyny mitoksantron jest bardzo dobrym substratem dla pompy ABCG2 stąd też linia A549 K1.5 nadekspresyjująca ten transporter jest dużo mniej wrażliwa na działanie tego chemoterapeutyku.



**Wykres 2** – Porównanie wrażliwości badanych linii komórkowych na działanie doksorubicyny i mitoksantronu. Na wykresie zaznaczono punkty ( $\pm$ SD) i przedstawiono aproksymowany przebieg krzywych po 120h inkubacji ze związkiem. Czerwonymi nawiasami zaznaczono frakcje komórek opornych na działanie chemoterapeutyków.

Frakcja komórek niewrażliwa na działanie chemoterapeutyków uważana jest za frakcję zawierającą/lub wzbogaconą w komórki macierzyste nowotworu, które to komórki są bardziej odporne na badane cytostatyki. Dane literaturowe sugerują, że związki takie jak metformina<sup>106</sup>, disulfiram<sup>107</sup> czy tiordazyna<sup>108</sup> są w stanie uwrażliwiać komórki macierzyste nowotworu i w ten sposób w kombinacji z tradycyjnymi chemoterapeutykami możliwa będzie ich eliminacja. **Wykres 3** porównuje wartości  $IC_{50}$  (*Inhibitory Concentration*) uzyskane poprzez traktowanie badanych linii komórkowych doksorubicyną/mitoksantronem lub w kombinacji z poszczególnymi modulatorami. Stężenia modulatorów odpowiadają stężeniom semitoksycznym ( $IC_{10}$ ). Szczegółowe przebiegi krzywych cytotoksyczności zostały przedstawiane na **Supl. Rysunek 2** w części **Suplement**.



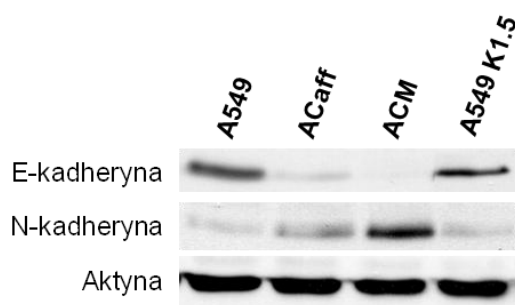
**Wykres 3** – Porównanie wartości  $IC_{50}$  cytotoksyczności dokсорubicyny/mitoksantronu w kombinacji z modulatorami. Nad słupkami zaznaczono odchylenie standardowe (+SD) oraz istotność zmian w wartości  $IC_{50}$  dla kombinacji w stosunku do  $IC_{50}$  dla samego związku (\*\*\*) –  $P \leq 0.001$ , \*\* –  $P \leq 0.01$ , \* –  $P \leq 0.05$ , ns –  $P > 0.05$ , jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, z korekcją testem Tukey'a).

**Wykres 3** pokazuje, że zastosowane modulatory, nie spowodowały uwrażliwienia badanych komórek w istotnie znaczący sposób. Co więcej w przypadku linii A549 K1.5 obserwujemy wzrost oporności na mitoksantron w kombinacji z modulatorami. Wynik ten może być wytłumaczony dodatkową indukcją ekspresji transportera ABCG2 przez same modulatory co w konsekwencji prowadzi do bardziej wydajnego usuwania mitoksantronu z komórek. Żadna z zastosowanych kombinacji nie zmniejszyła również frakcji komórek podatnych na działanie badanych chemoterapeutyków i po 120h koinkubacji wciąż można zaobserwować 5-20% frakcję żywych komórek. Uzyskany wynik nie dowodzi jednak, że 5-20% frakcja komórek pozostałych po 120h działania dokсорubicyny/mitoksantronu i zastosowanych modulatorów, nie zawiera komórek posiadających cechy komórek macierzystych nowotworu. Co najwyżej może sugerować, że mechanizmy związane z opornością tych komórek nie są związane ze szlakami, na które wpływają zastosowane modulatory: aktywacja AMPK w przypadku metforminy<sup>106</sup>, inhibicja dehydrogenazy alkoholowej w przypadku disulfiramu<sup>107</sup> czy też oddziaływanie z receptorami dopaminowymi w przypadku tiorydazyny<sup>108</sup>.



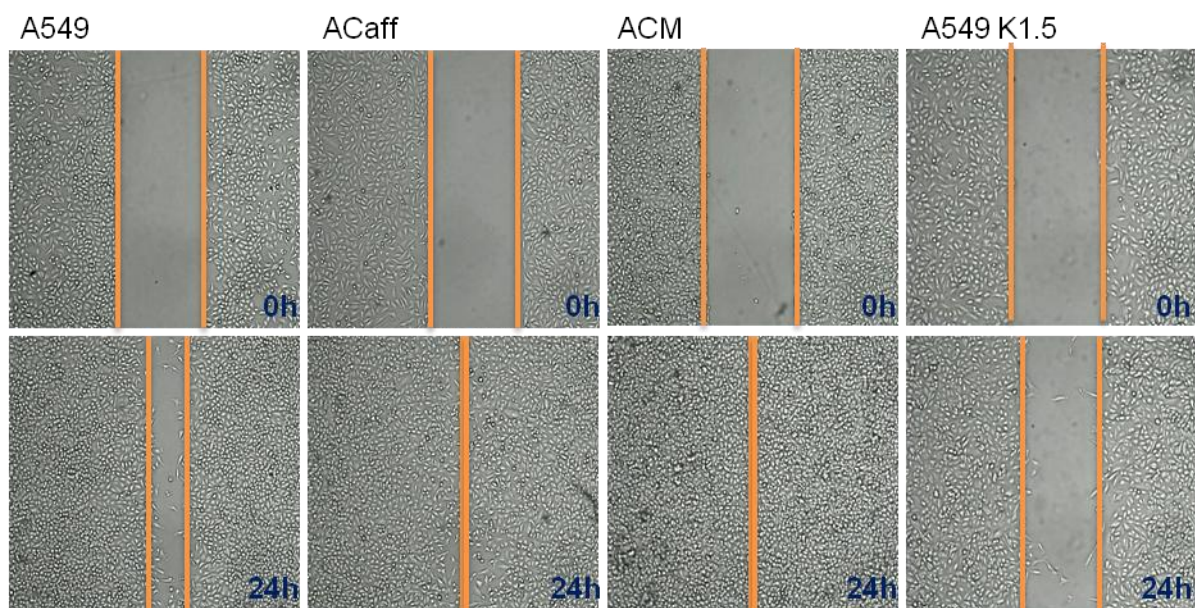
## Określenie stopnia przejścia epitelialno-mezenchymalnego w badanym układzie

Kluczowym momentem przejścia epitelialno-mezenchymalnego jest zanik ekspresji E-kadheryny, która m.in. razem z  $\beta$ -kateniną tworzy połączenia pomiędzy komórkami epitelialnymi. Rezultatem procesu EMT jest utrata połączeń komórka-komórka i nabyciem zdolności komórek do migracji. Przekształcenie komórek epitelialne w mezenchymalne wiąże się także z ekspresją białek charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych, takich jak N-kadheryna i wimentyna. Do oceny stopnia progresji w badanym modelu jako markery progresji wybrałem E- i N-kadheryny.

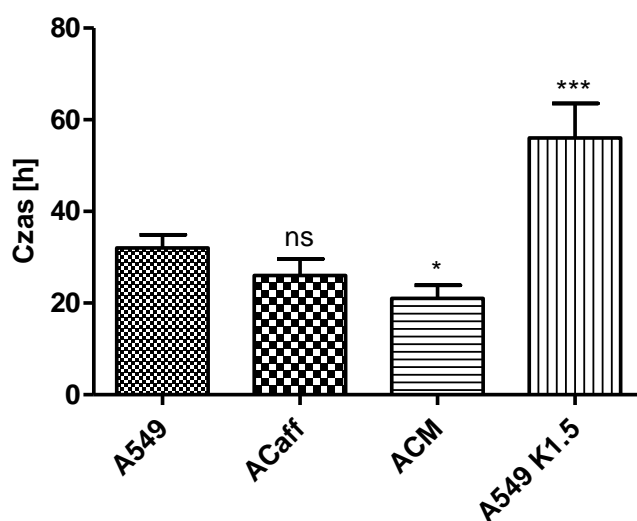


**Rysunek 6** – Oznaczenie ekspresji markerów EMT w badanych komórkach rosnących w postaci monowarstwy techniką Western Blot.

Tranzycja epitelialno-mezenchymalna prowadzi do nabycia zdolności do ruchu przez komórki, które ją przeszły. Zdolność do ruchu zmierzyłem w teście „*wound healing*”, którego wynik przedstawiłem w postaci **Wykresu 4** jako czas zarostania 500 $\mu$ m ( $\pm$ 50 $\mu$ m) przerwy oraz na **Rysunku 7** w postaci zdjęć w czasie rzeczywistym po 24h. Dla linii wyjściowej A549 doświadczenie przeprowadziłem używając różnych wyjściowych gęstości komórkowych 20tyś/0.22cm<sup>2</sup> bądź 25tyś/0.22cm<sup>2</sup> jednak uzyskane wyniki testu pomimo widocznego przegęszczenia komórek w drugim przypadku były do siebie zbliżone i wynosiły odpowiednio 32 i 33h, do pozostałych eksperymentów wybrałem stężenie 20tyś. kom/0.22cm<sup>2</sup>.



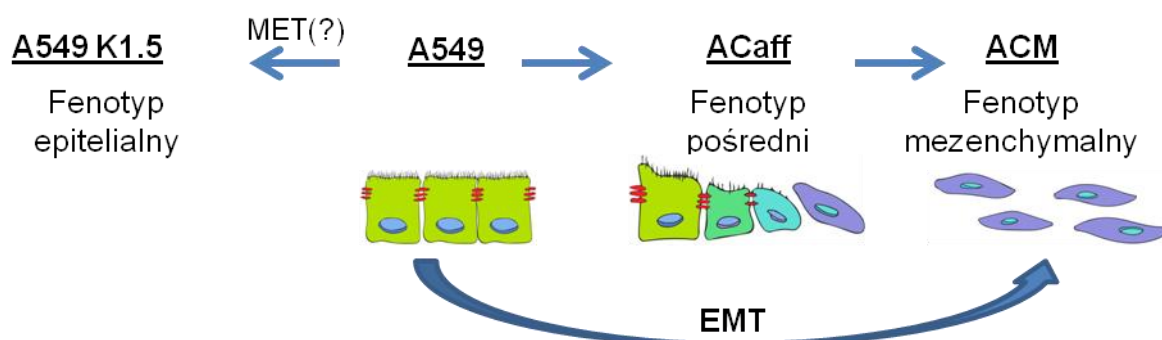
**Rysunek 7** – Test „wound healing”, porównanie stopnia zarośnięcia przerwy po 24h w badanym układzie komórkowym. Obiektywy 4X i powiększenie cyfrowe 10x.



**Wykres 4** – Czas potrzebny do zarośnięcia 500µm przerwy przez badane komórki. Nad słupkami zaznaczono odchylenie standardowe (+SD) oraz istotność zmian czasu zarastania przerwy dla poszczególnych linii w stosunku do rodzicielskiej linii A549 (\*\*\*) –  $P \leq 0.001$ , \*\* –  $P \leq 0.01$ , \* –  $P \leq 0.05$ , ns –  $P > 0.05$ , jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, z korekcją testem Tukey’a).

Na podstawie wyników analizy Western blot (**Rysunek 6**) oraz czasu migracji (**Rysunek 7** i **Wykres 4**) poszczególnych typów linii komórkowych określiłem, że linie A549 i A549 K1.5 posiadają fenotyp charakterystyczny dla komórek epitelialnych, zaś linia ACM

posiada fenotyp charakterystyczny dla komórek mezenchymalnych. Linia ACaff zaś charakteryzuje się fenotypem pośrednim. Schemat poniżej ilustruje przebieg procesu EMT zachodzącego w badanym układzie.



**Rys. 8** – Schemat procesu EMT zachodzącego w badanym układzie.

Zmiany w stopniu ruchliwości korelują z kompozycją poszczególnych typów klonów obecnych w badanych liniach. Najmniej ruchliwa linia A549 K1.5 zawierała ponad 50% frakcji komórek tworzących nieruchliwe kolonie typu *Holoclone*, natomiast linia ACM charakteryzująca się największą ruchliwością zawierała ponad 60% frakcji komórek tworzących ruchliwe kolonie typu *Paraclone*. Filmy przedstawiające ruchliwość komórek tworzących kolonie typu *Holoclone* i *Paraclone* zamieściłem na dysku DVD stanowiącym suplement tej pracy.

## Określenie stopnia pierwotności komórek w badanym układzie

Do określenia obecności i wielkości frakcji komórek macierzystych nowotworu powszechnie stosuje się fenotypowanie z użyciem takich markerów powierzchniowych jak CD133, CD117, CD44, oraz pomiar ekspresji czynników transkrypcyjnych takich jak OCT4A, SOX2, NANOG, KLF4, c-MYC, i pomiar ekspresji transportera ABCG2. Z uwagi na dane literaturowe w których komórki ekspresujące CD133 nie są tożsame z komórkami posiadającymi fenotyp CSC<sup>49, 109</sup>, oraz postulowane problemy związane z określeniem poziomu ekspresji niektórych czynników transkrypcyjnych w niniejszej pracy jako markery komórek macierzystych nowotworu wybrałem określenie poziomu ekspresji jednego z czynników transkrypcyjnych Sox2, transportera ABCG2 wsparte testami funkcjonalnymi jak zdolność do tworzenia sferoidów oraz zdolność do indukcji guzów u myszy *in vivo*.

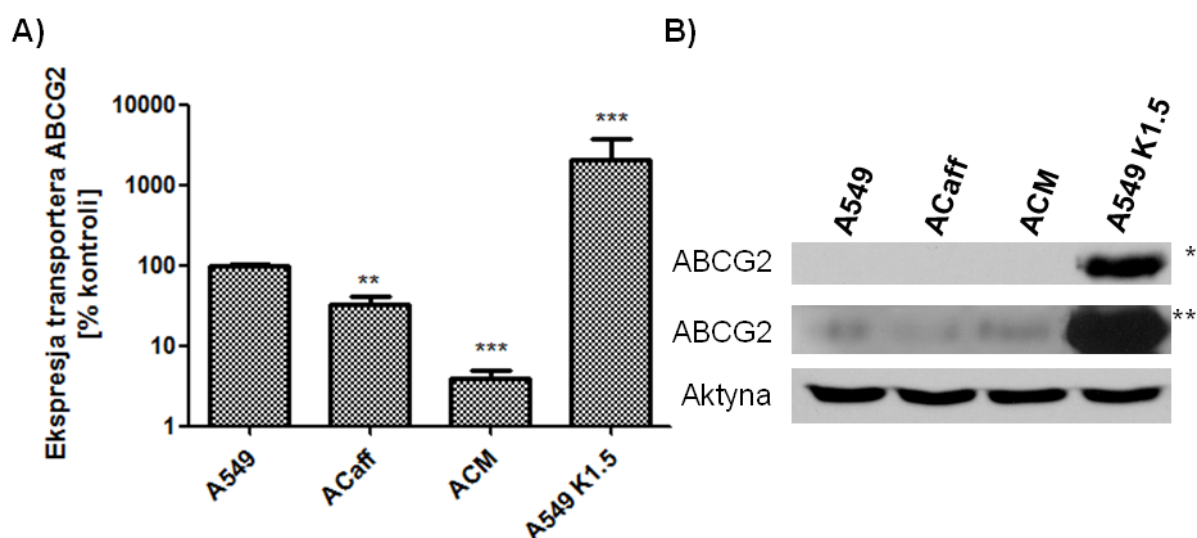
## Oznaczenie poziomu ekspresji transportera ABCG2

Transporter ABCG2 należy do superrodziny pomp ABC, którego głównym zadaniem w komórce jest usuwanie ksenobiotyków oraz produktów metabolizmu takich jak koniugaty

związków z glutationem <sup>110</sup>, <sup>111</sup>. Wiele prac pokazuje zwiększoną tumorigenność komórek eksprymujących transporter ABCG2 *in vivo* u myszy. Dzięki zdolności tej pompy do usuwania z wnętrza komórki barwnika Hoechst 33342 możliwe było opracowanie testu w którym można wysortować te komórki, wypompowują one bowiem barwnik Hoechst pozostając niezabarwione. Komórki takie nazwane zostały „*side population cells*” i charakteryzuje je znacząco zwiększona frakcją komórek CSC i tym samym zwiększoną tumorigenność *in vivo*.

Doświadczenie poniżej (**Rysunek 9**) przedstawia wyniki immunofenotypowania z użyciem przeciwciał (klon 5D3) rozpoznających zewnątrzkomórkową domenę transportera ABCG2 oraz wyniki analizy Western blot z użyciem przeciwciał (BX21) rozpoznających wewnątrzkomórkową domenę transportera ABCG2. Oba uzyskane wyniki są zbieżne i wykazują, że linia A549 K1.5 charakteryzuje się wielokrotnie większą ekspresją pompy ABCG2 w porównaniu z linią A549. Ostatnie doniesienia literaturowe pokazują możliwość działania pompy ABCG2 po jej translokacji do jądra jako regulatora ekspresji E-kadheryny <sup>112</sup> i być może podobną funkcję ten transporter przyjmuje w komórkach linii A549 K1.5. Natomiast linie ACaff i ACM charakteryzują się zmniejszoną ekspresją transportera w porównaniu do linii macierzystej A549. Zmniejszenie ekspresji transportera ABCG2 w liniach ACaff i ACM może być związane z działaniem kofeiny na te komórki. Hamowanie kinazy szlaku PI3K przez kofeinę w komórkach ACaff mogło przełożyć się na zmianę zarówno ekspresji jak i wewnątrzkomórkowej lokalizacji transportera ABCG2 <sup>113</sup>.

Dodatkowo porównałem w badanym układzie poziom ekspresji innych transporterów ABC, jednak nie zaobserwowałem istotnych różnic pomiędzy liniami (**Supl. Rysunek 3**).



**Rysunek 9** – Porównanie realtywnego poziomu ekspresji transportera ABCG2 w badanym układzie komórkowym **A)** Wyniki analizy cytometrycznej immunofenotypowania z

użyciem przeciwciał (klon 5D3) rozpoznających zewnątrzkomórkową domenę transportera ABCG2 oraz **B**) wyniki analizy Western blot z użyciem przeciwciał (BX21) rozpoznających wewnątrzkomórkową domenę transportera ABCG2; \* - 1 sekunda ekspozycji; \*\* - 3 minuty ekspozycji. Nad słupkami zaznaczono odchylenie standardowe (+SD) oraz istotność zmian w poziomie ekspresji pompy ABCG2 dla poszczególnych linii w stosunku do wzrostu linii rodzicielskiej A549 (\*\*\*) –  $P \leq 0.001$ , \*\* –  $P \leq 0.01$ , \* –  $P \leq 0.05$ , ns –  $P > 0.05$ , jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, z korekcją testem Tukey'a).

### Oznaczenie zdolności wzrostu komórek w podłożu półpłynnym

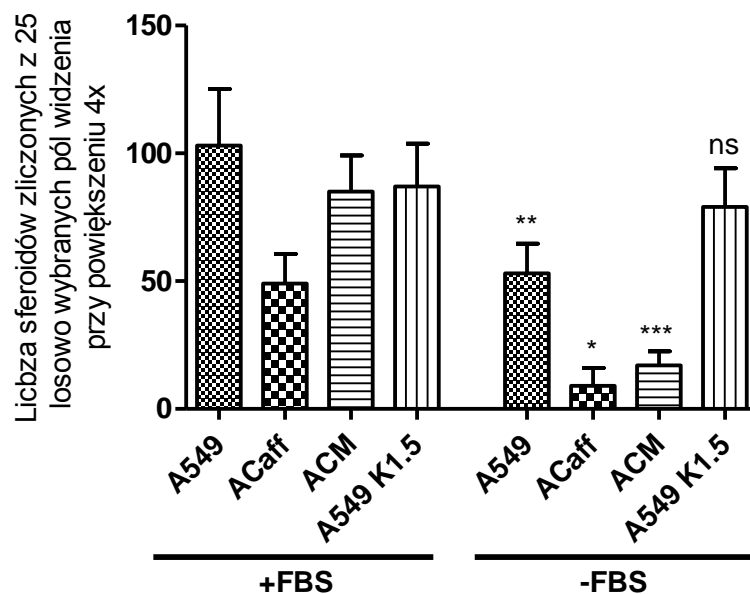
Dostępne doświadczalne dane literaturowe sugerują, że nowotworowe komórki adherentne zachowujące zdolność do wzrostu w podłożu półpłynnym są komórkami posiadającymi cechy nowotworowych komórek macierzystych<sup>114, 115, 116</sup>.

Pomiar wzrostu komórek w podłożu półpłynnym (*soft agar assay*) przeprowadziłem z zastosowaniem dwóch typów podłoży. Pierwszym było tzw. medium różnicujące zawierające w swoim składzie oprócz pożywki, NAA i L-glutaminy także bydlęcą surowicę płodową FBS (*fetal bovine serum*), która dostarcza niezbędnych czynników wzrostu stymulując zarówno zróżnicowane, jak i niezróżnicowane komórki do proliferacji. Drugim zaś było tzw. medium nieróżnicujące zawierające jedynie pożywkę, NAA i L-glutaminę, w którym zdolność do wzrostu powinny wykazywać jedynie komórki, których proliferacja nie jest zależna od zewnętrznych czynników wzrostu (zawartych w FBS) noszące znamiona nowotworowych komórek macierzystych.



**Rysunek 10** – Przykładowe zdjęcia kolonii (sferoidu) komórek A549 wyrosłej w podłożu półpłynnym zawierającym FBS (powiększenie 4X)

Zaobserwałem, że wszystkie badane linie komórkowe wykazują zdolność do wzrostu w podłożu półpłynnym zawierającym FBS, przy czym komórki ACaff charakteryzują się wyraźnie mniejszą zdolnością tworzenia kolonii. We wszystkich przypadkach po usunięciu z podłoża FBS liczba obserwowanych kolonii jest zdecydowanie mniejsza co ilustruje **Wykres 5**.



**Wykres 5** – Oznaczenie zdolności wzrostu komórek w podłożu półpłynnym – „soft agar assay” w obecności i przy braku FBS. Liczba sferoidów odpowiada liczbie zliczonej z 25 losowo zrobionych zdjęć przy powiększeniu 4X. Nad słupkami zaznaczono odchylenie standardowe (+SD) oraz istotność zmian we wzroście w medium bez FBS dla poszczególnych linii w stosunku do wzrostu w medium z FBS (\*\*\* –  $P \leq 0.001$ , \*\* –  $P \leq 0.01$ , \* –  $P \leq 0.05$ , ns –  $P > 0.05$ , jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, z korekcją testem Tukey’a).

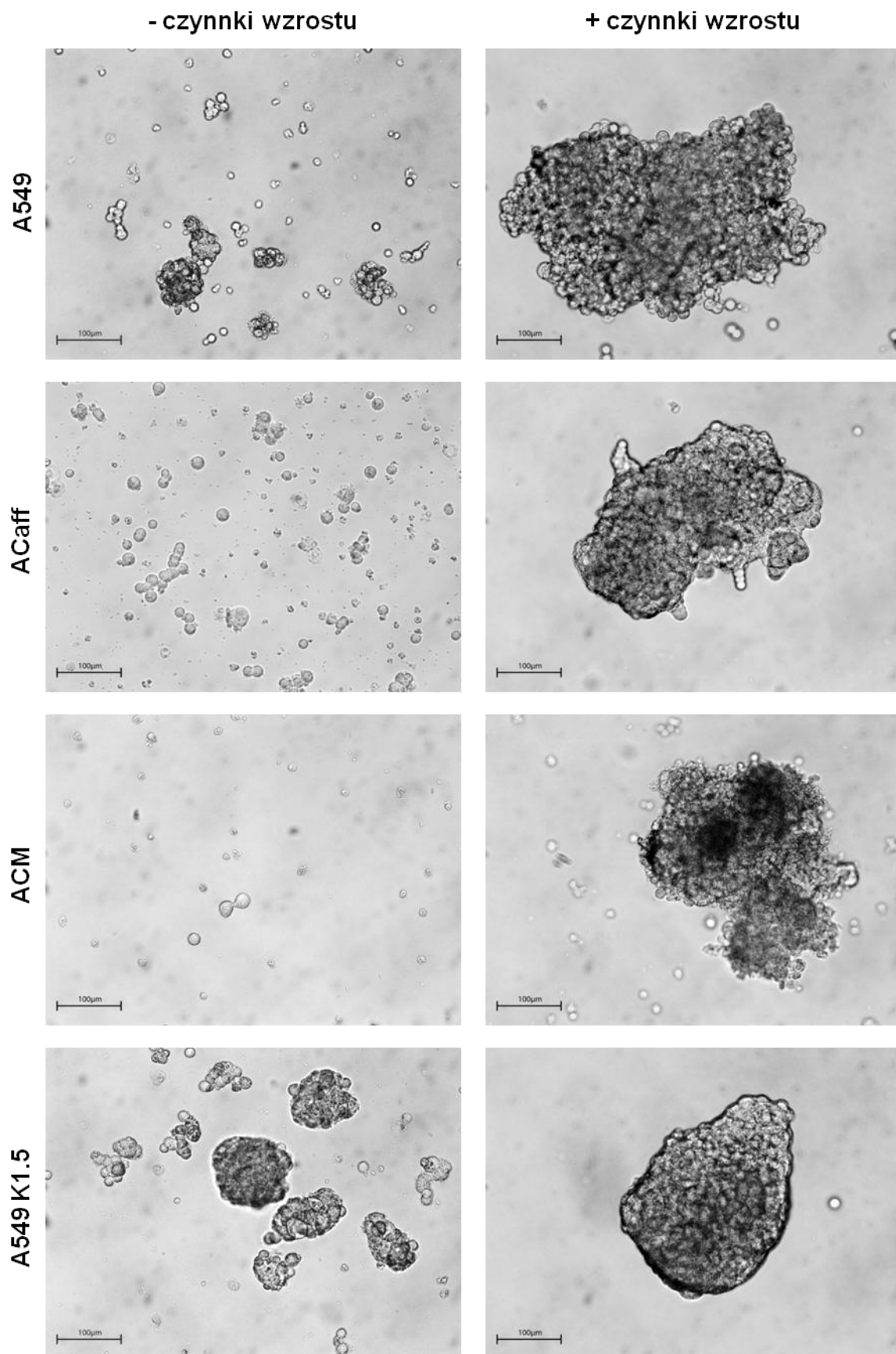
Komórki linii ACaff i ACM posiadają bardzo niewielką zdolność do wzrostu w warunkach bez FBS, co może sugerować zanik w tych liniach populacji komórek posiadających cechy macierzystych komórek nowotworu, zdolnych do autostymulacji własnej proliferacji. Na zdolność do utrzymania wzrostu w tych warunkach składać może się wiele czynników, jednak z punktu widzenia niniejszych badań istotne są dwie interpretacje otrzymanego wyniku. Możliwym jest, że wszystkie linie za wyjątkiem ACaff i ACM zawierają podobnej wielkości frakcję nowotworowych komórek macierzystych, bądź też wielkość frakcji komórek macierzystych w tych liniach jest różna, natomiast za zdolności proliferacji w tych warunkach odpowiadają autokrynne czynniki wzrostu wytwarzane przez badane komórki. Zdolność do sekrecji czynników wzrostu i cytokin została zbadana z użyciem zestawów RayBio® Human Growth Factor Antibody Array1 i RayBio® Human Cytokine Antibody Array5. Wszystkie z badanych linii wydzielają wiele różnych cytokin i czynników wzrostu. Poziom ekspresji wydzielanych cytokin i czynników wzrostu różni się pomiędzy liniami. Z uwagi na wielorakość interakcji oraz synergizm bądź antagonizm oddziaływać poszczególnych cytokin i czynników wzrostu na tym etapie pracy, prosta analiza przyczynowo skutkowa uzyskanych wyników nie była możliwa. Wyniki oznaczenia poziomu

ekspresji cytokin i czynników wzrostu przedstawiłem na wykresie **Supl. Rysunek 4** zamieszczonym w suplemencie.

### **Oznaczenie zdolności wzrostu komórek w zawieszynie**

W celu dokładniejszego zbadania zdolności komórek do wzrostu niezależnego od podłoża, a także uproszczenia modelu zdecydowałem się na ich hodowlę w układzie rotacyjnym w tzw. spinnerach z ciągłym mieszaniem z zastosowaniem dwóch rodzajów mediów. Pierwszym medium było medium niesuplementowane stanowiące pożywkę DMEM/F12K(1:1), drugim zaś było, medium suplementowane które oprócz pożywki zawierało czynniki EGF, bFGF oraz B-27® Supplement. Zastosowanie takiego układu umożliwiło mi zbadanie wpływu autostymulacji wzrostu przez czynniki wzrostowe wytwarzane przez badane komórki. Sposób hodowli umożliwił również łatwe zebranie próbek i przygotowanie z nich lizatów co w dalszej perspektywie umożliwiło porównanie w nich aktywacji szlaku Akt/mTOR.

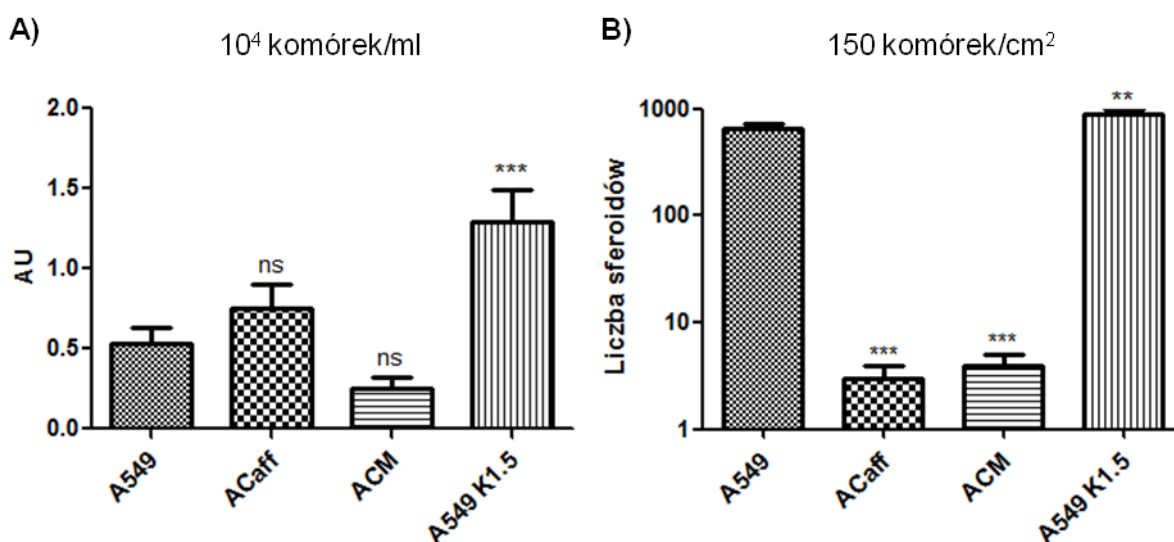
Zdjęcia zebrane na **Rysunku 11** przedstawiają wyrosłe po 120h hodowli sferoidy. W przypadku braku czynników wzrostu w medium komórki ACaff i ACM nie są w stanie utworzyć mikrosferoidów, obserwowałem jedynie zlepek kilku komórek, bądź obkurczone komórki apoptotyczne. Natomiast mikrosferoidy tworzone w tych warunkach przez komórki A549 i A549 K1.5 stanowią aglomerat żywych komórek co zostało pokazane na filmie poklatkowym (**Suplement DVD**). Zarejestrowano bowiem de-agregację mikrosferoidu i przyklejenie się komórek do podłoża z utworzeniem kolonii. Na potrzeby tego eksperymentu mikrosferoidy umieściłem w szalce Petriego zawierającej pożywkę suplementowaną 10% FBS. Zdjęcia wykonałem przy pomocy mikroskopu JuLi™ w czasie rzeczywistym.



**Rysunek 11** – Przykładowe zdjęcia mikrosferoidów tworzonych przez badane komórki w obecności i przy braku czynników wzrostu z FBS



Wyniki uzyskane w suplementowanym FBS (czynnikami wzrostu) medium były diametralnie odmienne, bowiem wszystkie badane linie komórkowe zdolne były do utworzenia mikrosferoidów. Uzyskane sferoidy różnią się jednak od siebie morfologicznie. I tak w przypadku komórek A549, ACaff i ACM sferoidy mają dość luźną nieregularną strukturę, w której można łatwo wyróżnić pojedyncze komórki na ich obrzeżach, podczas gdy komórki A549 K1.5 tworzą bardzo zwarte sferoidy o gładkich brzegach ze ściśle przylegającymi do siebie komórkami. Morfologia kolonii tworzonych przez badane linie przekłada się na morfologię tworzonych przez nie sferoidów. Linie komórkowe tworzące w przeważającej większości zwarte kolonie (A549 K1.5) tworzą również regularne sferoidy o zwartej strukturze, podczas gdy linie komórkowe tworzące luźno rosnące kolonie (A549, ACaff, ACM) tworzą także sferoidy o dość luźnej strukturze.



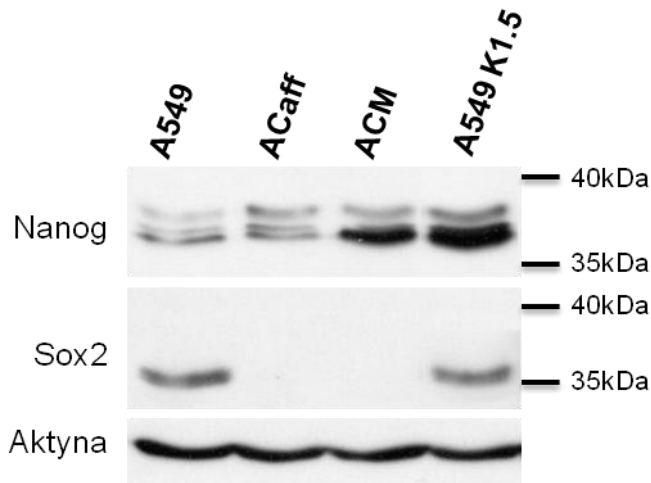
**Wykres 6** – Tworzenie sferoidów w warunkach nieróżnicujących **A)** Porównanie liczby wyrosłych kolonii z 1ml hodowli sferoidów (120h). Liczbę kolonii oznaczono porównując całkowitą zawartość białka metodą SRB. AU odpowiada absorbancji SRB zmierzonej przy długości fali 510nm. **B)** Porównanie liczby sferoidów wyrosłych z 5000 komórek ( $\approx 150$  komórek/studzienka co odpowiada  $\approx 150$  komórek/cm<sup>2</sup> powierzchni) po 7 dniach hodowli. Nad słupkami zaznaczono odchylenie standardowe (+SD) oraz istotność zmian we wzroście dla poszczególnych linii w stosunku do wzrostu linii rodzicielskiej A549 (\*\*\*) –  $P \leq 0.001$ , \*\* –  $P \leq 0.01$ , \* –  $P \leq 0.05$ , ns –  $P > 0.05$ , jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, z korekcją testem Tukey'a).

Wyniki przedstawione na powyższym wykresie pokazują, że linie A549 i A549 K1.5 zdolne są do wzrostu niezależnego od podłoża nawet w medium niezawierającym żadnych czynników wzrostu i jest to niezależne od początkowej gęstości komórkowej. Komórki linii ACaff i ACM nie wykazują praktycznie zdolności do wzrostu w warunkach niezależnych od podłoża w medium pozbawionym czynników wzrostu. Jednak zdolne są one do przeżycia 120h w tych warunkach. Wysoka liczba wyrosłych kolonii dla linii ACaff oraz ACM nie

świadczy o tym, że komórki te zdolne były do wytworzenia sferoidów, a jedynie o tym, że komórki które przeżyły 120h w tych warunkach zdolne były do utworzenia dużej liczby kolonii co przełożyło się na ilość białka oznaczonego przy pomocy sulforodaminy B. (**Rysunek 11 i Wykres 6A**). Mając na względzie omówioną niespecyficzną pomiaru opartego na ilości białka, **Wykres 6A** jest niemierną reprezentacją liczby sferoidów. Zdecydowałem się więc na 7 dniową hodowlę sferoidów w 96-dołkowych płytkach (o obniżonej przyczepialności) a następnie wizualne zliczenie sferoidów. Uzyskane wyniki, zebrane na **Wykresie 6B** wskazują, że w warunkach nieróżnicujących jedynie komórki A549 i A549 1.5 utrzymują zdolność tworzenia sferoidów.

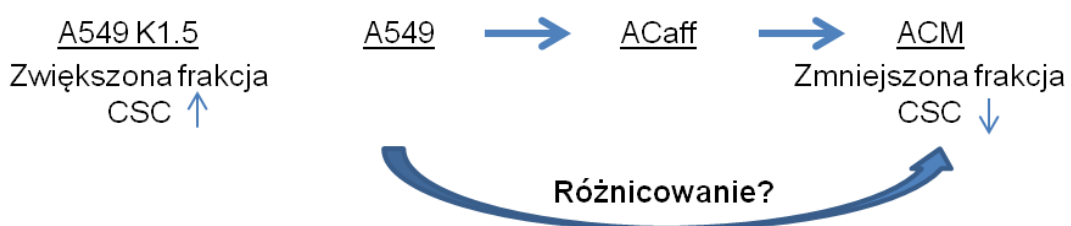
### **Oznaczenie poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych Sox2 i Nanog**

Problemy przy określaniu poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za utrzymanie stanu pluripotentnego komórek wiążą się z faktem, że czynniki te (Oct4A, Nanog, Klf4) posiadają kilka izoform będących efektem składowania i/lub towarzyszą im aktywne transkrypcyjnie formy pseudogenów (Nanog, Oct4A). Ponadto linia A549 charakteryzuje się amplifikacją genu kodującego czynnik transkrypcyjny c-Myc, który jest podobnie silnie ekspresjonowany we wszystkich badanych przeze mnie liniach. Wybór do dalszej analizy czynnika transkrypcyjnego Sox2 został po części podyktowany łatwiejszą interpretacją zmian w jego ekspresji. Gen SOX2 posiada tylko jeden ekson i nie posiada znanych pseudogenów. Przeciwnie jest natomiast wspomniany już gen NANOG, zawierający cztery eksony, kodujący dwie różne formy składowania mRNA i w konsekwencji dwie biologicznie aktywne izoformy białkowe. Ponadto znanych jest 11 pseudogenów genu NANOG z których część jest aktywna transkrypcyjnie tworząc niefunkcjonalne formy białka, które są jednak rozpoznawane przez komercyjnie dostępne przeciwciała<sup>117, 118</sup>. Wyniki Western blot pokazujące zmiany w ekspresji czynnika transkrypcyjnego Sox2 oraz prążki identyfikowane przez przeciwciała skierowane przeciw czynnikowi transkrypcyjnemu Nanog zamieściłem na **Rysunku 12**.



**Rysunek 12** - Oznaczenie poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych Sox2 i Nanog metodą Western blot.

Badania prowadzone w naszej grupie badawczej pokazały, że kofeina powodowała ciągle hamowanie aktywacji kinazy Akt w linii komórkowej ACaff (**Rysunki 16 i 17**) co jak pokazałem wiązało się wpierw z częściową tranzycją epithelialno-mezenchymalną w tej linii, a następnie po usunięciu kofeiny z pełną tranzycją w komórkach ACM. Podczas tego procesu komórki linii ACaff i ACM traciły zdolność do wzrostu w postaci sferoidów zarówno w półpłynnym agarze jak i w kulturze zawieszinowej. Ponadto w liniach ACM i ACaff obserwowałem spadek ekspresji białek takich jak Sox2 i ABCG2 przyjętych przeze mnie za markery CSC. Przedstawione do tej pory dane eksperymentalne pozwoliły mi na podzielenie badanych linii komórkowych na dwie grupy różniące się ilością komórek ekspresyjujących markery CSC **Rysunek 13**.

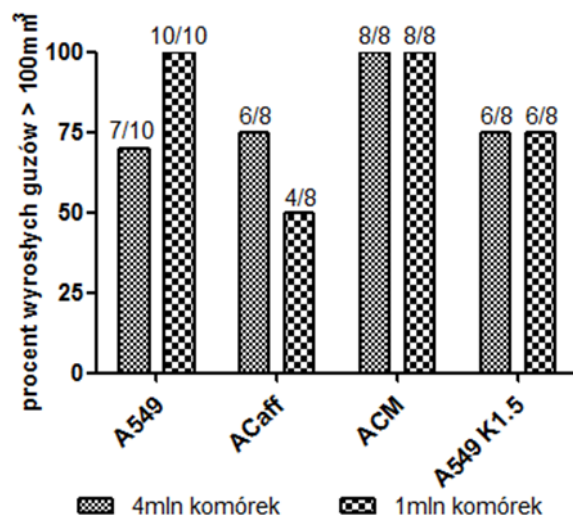


**Rys. 13** – Schemat procesu (stopnia) różnicowania komórek w badanych liniach

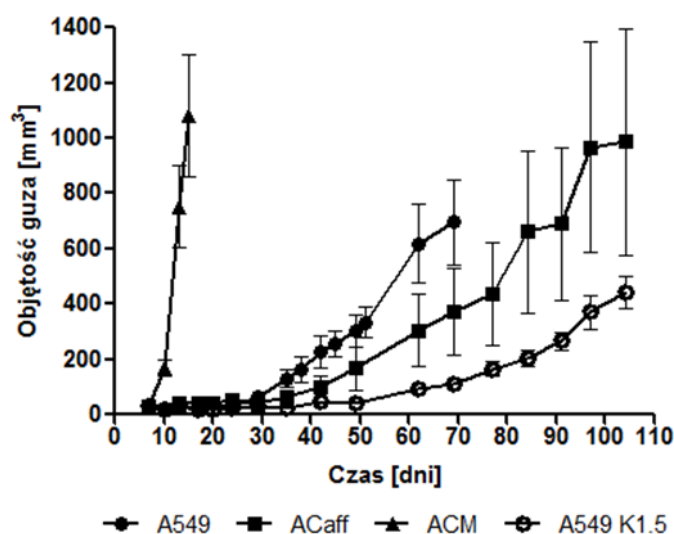
## Zdolność badanych komórek do indukcji guzów *in vivo*

Następnym etapem oceny wpływu procesu EMT i zmian w frakcji CSC obserwowanych w badanym układzie, było oznaczenie zdolności badanych linii do indukcji guzów *in vivo*. **Wykres 7** przedstawia procent przypadków wyindukowanych guzów, większych niż 100mm<sup>3</sup>, po wszczepieniu do myszy. Liczba wyindukowanych guzów nie korelowała z ilością wszczepionych komórek. W większości przypadków (za wyjątkiem Grupy

A – komórek A549) brak guza w jednym z boków wiązał się z brakiem guza po stronie przeciwnej, ponadto wyindukowane guzy u danej myszy były podobnych rozmiarów, niezależnie od liczby wszczepionych komórek, co może świadczyć o osobniczym wpływie danej myszy na wzrost guza (**Supl. Rysunek 5**).



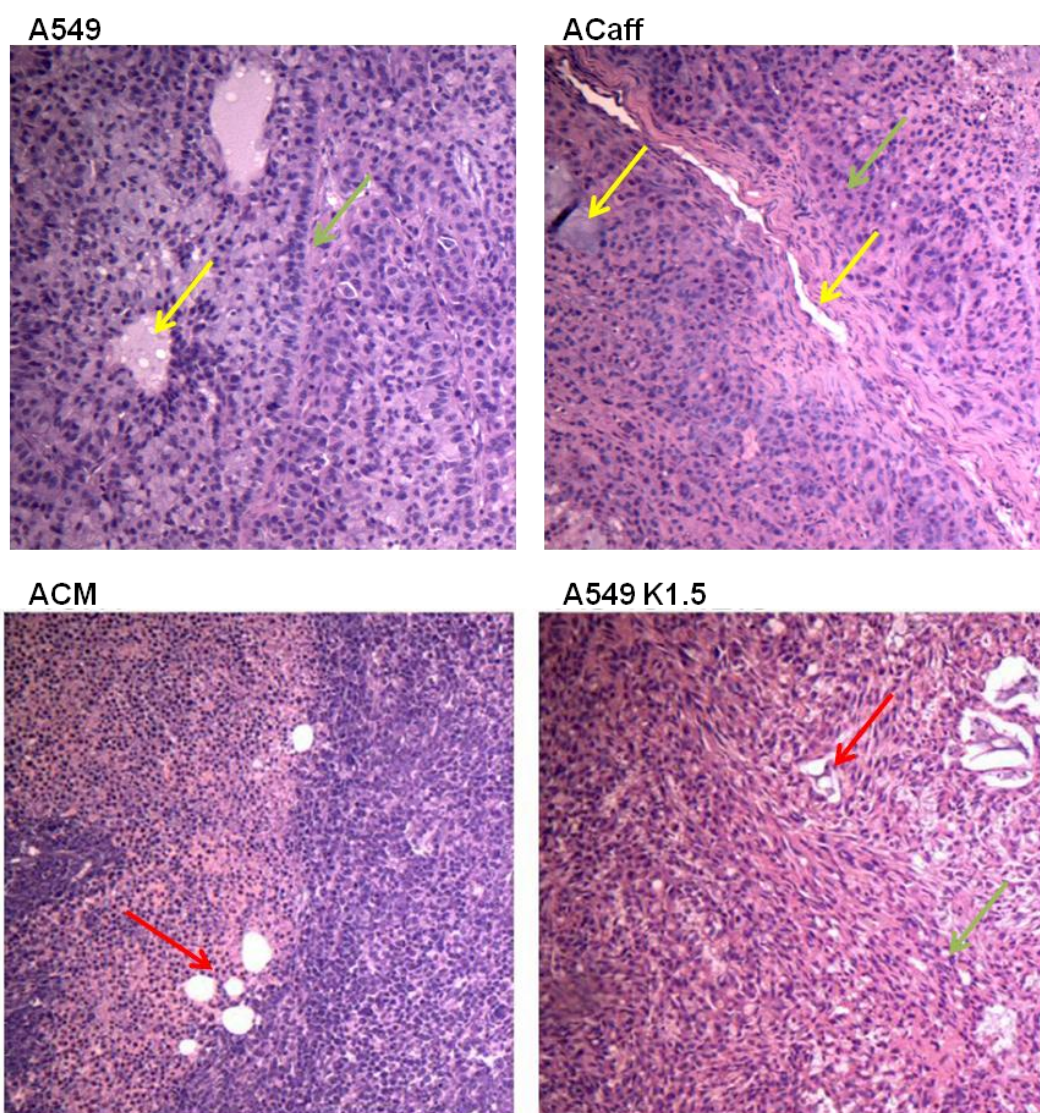
**Wykres 7** – Odsetek [%] wyindukowanych przypadków guzów przez badane linie komórkowe. Nad słupkami zaznaczono stosunek ilości wyindukowanych guzów do wielkości grup.



**Wykres 8** – Przebieg wzrostu guzów *in vivo* u myszy. Na wykresie zaznaczono punkty pomiarowe wraz z naniesionym standardowym błędem pomiaru ( $\pm$ SEM).

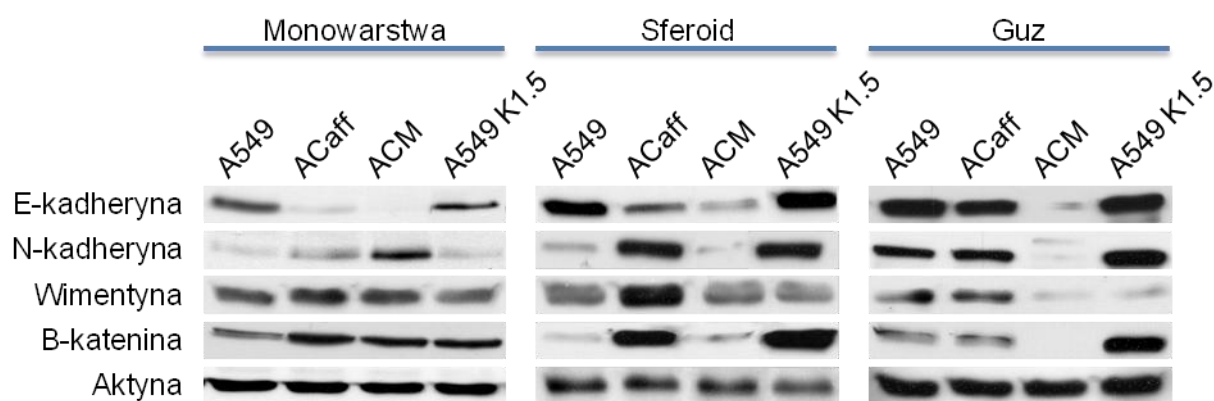
Z zależności przedstawionej na **Wykresie 8** możemy zauważyć, że najbardziej tumorigenną linią komórkową okazała się linia ACM. Guzy zostały wyindukowane u wszystkich zwierząt w grupie już po 10 dniach od zaszczepienia. Wzrost guzów był bardzo szybki, dlatego też myszy z tej grupy poddano eutanazji już po 15 dniach od wszczepienia komórek. Pozostałe badane komórki utworzyły guzy po ok. 30-50 dniach od momentu wszczepienia. Na podstawie obserwowanej dynamiki wzrostu guzów, możemy podzielić

badane linie komórkowe na trzy grupy. Do pierwszej grupy należą komórki ACM zdolne do bardzo szybkiej indukcji guzów, kolejną grupę tworzą komórki A549, i ACaff - guzy wyindukowane w tej grupie charakteryzują się podobną wielkością i zbliżoną dynamiką wzrostu. Guzy o najmniejszej objętości zostały wyidukowane w grupie trzeciej przez komórki A549 K1.5. Czas potrzebny do indukcji guza i jego wejścia w fazę logarytmicznego wzrostu był w tym przypadku najdłuższy i wynosił ok. 50 dni. Eksperyment w grupach dla komórek ACaff i A549 K1.5 zakończono po 105 dniach od wszczepienia komórek, ponieważ wyrosłe guzy były dostatecznie duże aby po wycięciu stanowić dogodny materiał do badań i bezcelowym było przedłużanie cierpienia zwierząt laboratoryjnych.



**Rysunek 14** – Analiza histopatologiczna oparta na barwieniu hematoksyliną i eozyną [HE], została wykonana na wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego dzięki uprzejmości dr Marceliny Malinowskiej, przez p. Karola Kuchnio. Spolaryzowane komórki zaznaczono zieloną strzałką →; miejsca nekrotyczne wewnątrz guzów zaznaczono żółtą strzałką →; struktury pęcherzykowe zaznaczone czerwoną strzałką →. Zdjęcia wykonałem przy pomocy mikroskopu świetlnego Leica DMIRE2 [powiększenie 200x]

Z analizy zebranych na **Rysunku 14** zdjęć wynika, że struktura guzów wyindukowanych przez komórki linii A549, ACaff i A549 K1.5 nie różni się zasadniczo od siebie. Komórki przylegają ściśle do siebie, nie różnią się od siebie wielkością, wyraźnie możemy rozróżnić jądro i cytoplazmę. Możemy zaobserwować ponadto spolaryzowane komórki (zaznaczone zieloną strzałką →), miejsca nekrotyczne wewnątrz guzów (zaznaczone żółtą strzałką →), oraz struktury przypominające pęcherzyki (zaznaczone czerwoną strzałką →). Obecność dużej liczby spolaryzowanych komórek w najbardziej epithelialnej linii A549 K1.5 może świadczyć o zachodzącym procesie EMT po wszczępieniu tych komórek do myszy. Możliwość zachodzenia procesu EMT w liniach A549, ACaff i A549 K1.5 dodatkowo potwierdzona została poprzez analizę ekspresji E- i N-kadheryn w tych komórkach (**Rysunek 15**). W przypadku linii ACM oprócz miejsc przypominających pęcherzyki pozostała część guza wypełniają bardzo małe komórki, posiadające niewielką ilość cytoplazmy. W polu widzenia obserwowano bardzo dużo komórek tworzących praktycznie jednorodną masę.



**Rysunek 15** – Porównanie ekspresji białek odpowiedzialnych za połączenia międzykomórkowe w badanym układzie techniką Western blot.

Oznaczenie ekspresji białek tworzących połączenia pomiędzy komórkami rosnącymi w postaci monowarstwy, sferoidu lub guza ujawniło znaczącą redukcję ich ekspresji w przypadku komórek linii ACM rosnących *in vivo*. W próbkach guzów dla komórek ACM wszystkie oznaczone białka są ekspresjonowane w bardzo niewielkim stopniu. Ten profil ekspresji odpowiada temu co zaobserwować można na skrawkach wybarwionych hematoksyliną i eozyną – dla linii A549, ACaff i A549 K1.5 obserwujemy fragmenty guza ze spolaryzowanymi komórkami, które są ze sobą połączone, zaś dla linii ACM obserwujemy dużo mniejsze gęsto upakowane komórki tworzące jednolitą masę guza.

Zmiany w ekspresji poziomu białek zachodzące w guzach linii ACM są podobne do tych jakie możemy zaobserwować hodując tą linię komórkową w postaci sferoidów. W obu przypadkach obserwujemy obniżenie ilości wszystkich omawianych białek. Dla pozostałych

linii profil ekspresji białek jest podobny dla próbek guzów, jednak obraz ten nie przekłada się tak jak w przypadku linii ACM na profile białkowe w sferoidach. Silna ekspresja  $\beta$ -kateniny w sferoidach ACaff i A549 K1.5 świadczyć może o zachodzącym zjawisku EMT w tych komórkach. Przypuszczenia te wspiera fakt, że dla sferoidów ACaff obserwujemy także zwiększenie ekspresji N-kadheryny i wimentyny oraz zmniejszenie ekspresji E-kadheryny. Sferoidy A549 K1.5 w porównaniu z sferoidami ACaff nie ekspresyjują tak silnie wimentyny oraz nie mają zmniejszonej ekspresji E-kadheryny, co może sugerować, że tranzycja EMT w tej linii i tych warunkach przebiegła częściowo lub też przebiegła całkowicie, ale tylko dla pewnej frakcji komórek.

Wyniki doświadczenia *in vivo* na myszach, w którym badano zdolność do indukcji guzów oraz tempo wzrostu guzów, okazały się być sprzeczne z wynikami otrzymanymi w badaniach *in vitro*. Linia ACM charakteryzująca się niską zdolnością samoodnowy, rozumianej przez zdolność do tworzenia sferoidów, zdolna była bowiem do bardzo szybkiej indukcji guzów u myszy. Dlatego w następnym etapie pracy zdecydowałem się zbadać aktywację szlaku Akt/mTOR, na który bezpośredni wpływ ma kofeina, a który to szlak jak opisałem we wstępie teoretycznym jest odpowiedzialny zarówno za tranzycję epitelialno-mezenchymalną, proliferację komórek jak i utrzymanie fenotypu w przypadku komórek posiadających cechy komórek macierzystych nowotworu.

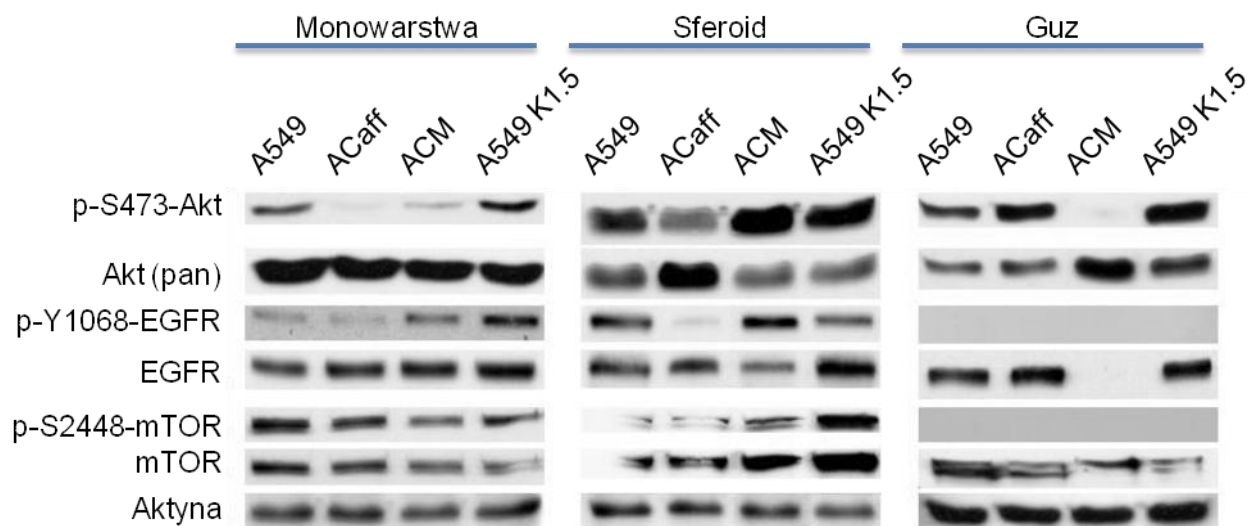
## Aktywacja szlaku Akt/mTOR w badanych liniach komórkowych

Kofeina jest pleotropowym inhibitorem kinaz i w zależności od stężenia może hamować wiele enzymów o tej aktywności w tym również kinazy uczestniczące w przekazywaniu sygnału w szlaku PI3K/Akt/mTOR<sup>119</sup>. Badania prowadzone w naszej katedrze przez dr inż. Michała Sabisza pokazały, że kofeina hamuje aktywację szlaków ATM/ATR wywołaną działaniem chemoterapeutyków w komórkach A549 co przekładało się na zmniejszoną fosforylację kinazy Akt (bez udziału roli mTORC1 w tym procesie) i w następstwie przejściowym zwiększeniem frakcji SP, równocześnie jednak nie wiązało się to znacząco ze zwiększeniem liczby komórek CD117<sup>+</sup>.

Linie ACaff i ACM zostały otrzymane poprzez ciągłą inkubację linii rodzicielskiej A549 z kofeiną. Ciągła obecność kofeiny w pożywce umożliwiła wyprowadzenie tych dwóch linii, które stały się odporne na jej działanie (**Supl. Rysunki 1 i 2**). W przypadku linii ACaff obecność kofeiny w pożywce powodowała nieustanne hamowanie fosforylacji (S473) kinazy Akt (**Rysunki 16 i 17**), jednak po usunięciu kofeiny w komórkach ACM możemy zaobserwować częściową fosforylację (S473) Akt, co świadczy o tym, że w badanym układzie nie zaszły zmiany genetyczne np. selekcja mutantów Akt niewrażliwych na działanie

kofeiny. Brak fosforylacji kinazy Akt na Ser473 mógł być wywołany bezpośrednim działaniem kofeiny na Akt, bądź też mógł wiązać się z hamowaniem, któregoś z kinaz dla której Akt jest substratem, np. kompleksu mTORC2. Dostępne dane literaturowe pokazują wpływ kofeiny na inhibicję kompleksu mTORC1 i możliwość powstania mutantów drożdży opornych na działanie kofeiny <sup>101</sup>. Informacje te oraz badania prowadzone w naszej grupie badawczej pokazują wpływ kofeiny na szlak PI3K/Akt/mTOR. Dlatego też w dalszej części scharakteryzowana została aktywacja tego szlaku w badanym układzie linii komórkowych hodowanych w różnych warunkach.

Szlak Akt/mTOR może być aktywowany przez wiele czynników zewnętrznych <sup>120</sup>. Podczas hodowli sferoidów głównym czynnikiem stymulującym wzrost był epidermalny czynnik wzrostu EGF (*epidermal growth factor*), dlatego też zdecydowałem się zbadać aktywację EGFR w badanym układzie komórkowym. Za marker aktywacji tego receptora wybrałem jego fosforylację na tyrozynie 1068 (Y1068), który to aminokwas jest głównym miejscem transfosforylacji. EGFR po związaniu EGF odpowiada między innymi za aktywację (fosforylację) kinazy Akt na S473 <sup>121, 122</sup>. Zastosowanie modelu o wzrastającym stopniu złożoności (monowarstwa-sferoid-guz) niestety nie ułatwiło analizy zależności pomiędzy aktywacją receptora EGFR, aktywacją kinaz Akt/mTOR a przebiegiem transycji EMT i utrzymaniem fenotypu CSC.



**Rysunek 16** – Porównanie fosforylacji receptora EGF, kinazy Akt i mTOR techniką Western blot w badanych liniach komórkowych hodowanych w postaci monowarstwy, sferoidów i guzów *in vivo*.

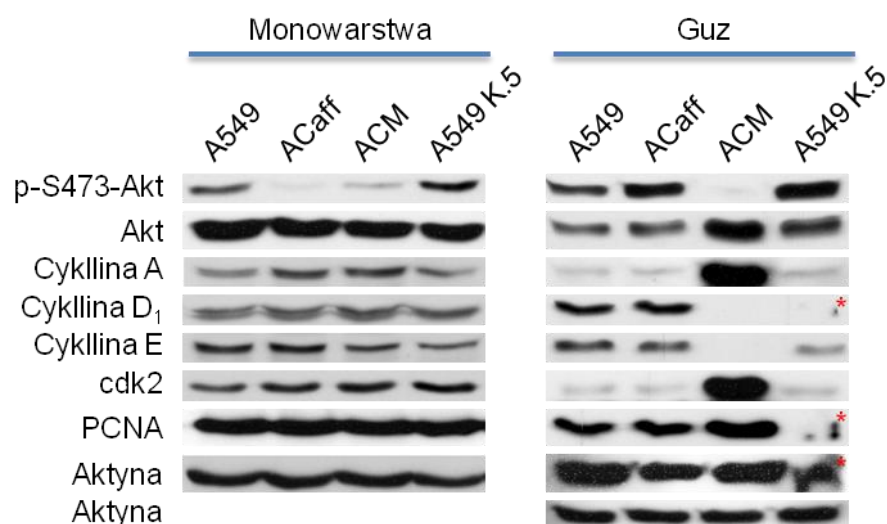
Brak fosforylacji receptora EGF w próbkach guzów nie powoduje zahamowania wzrostu guzów. Inhibicja EGFR za pomocą jego specyficznego chemicznego inhibitora erlotinibu pokazała, że zahamowanie aktywacji EGFR powoduje jedynie częściowe



zahamowanie proliferacji komórek w badanym układzie. Po 120h inkubacji komórek z erlotinibem obserwujemy 25-45% żywych komórek w porównaniu do kontroli nietraktowanej (Supl. Rysunek 2). Sugerować to może, że stymulacja wzrostu badanych komórek zachodzić może również na inne sposoby i/lub przez inne receptory.

## Niekanoniczna aktywacja kinazy Akt

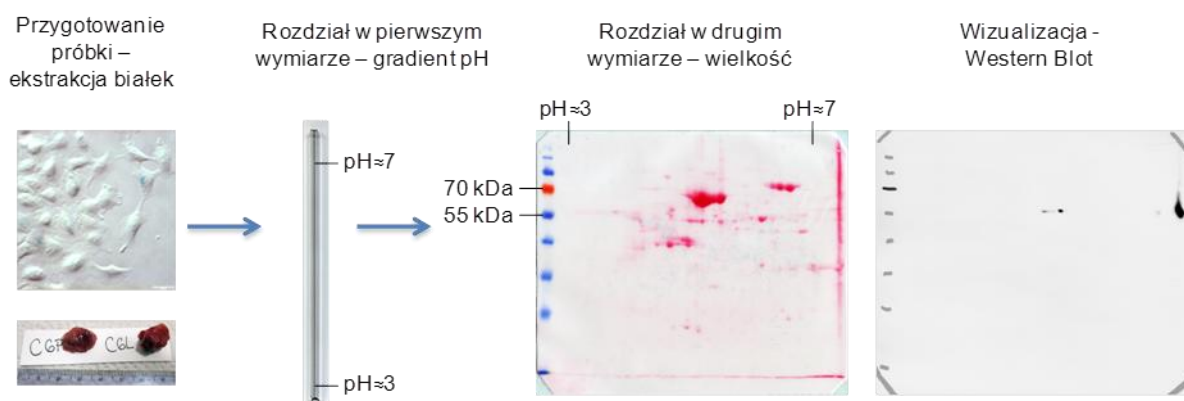
Zaskakującym wydaje się być fakt, że pomimo największego tempa wzrostu, oraz największej objętości guzów tworzonych z komórek linii ACM nie zaobserwowałem fosforylacji kluczowej kinazy regulującej wzrost komórek - kinazy Akt na reszcie seryny 473, mimo zwiększonej całkowitej ekspresji tego białka. Wyraźnie szybsze tempo wzrostu komórek ACM pokazane na **Wykresie 8** nie wynikało zarówno z aktywacji EGFR (brak fosforylacji EGFR) jak i z aktywacji innych receptorów, których sygnał przekazywany jest *via* kinazę Akt. Analiza białek związanych z progresją w cyklu komórkowym, ujawniło w guzach linii ACM bardzo dużą nadekspresję cykliny A i kinazy 2 zależnej od cykliny Cdk2 w porównaniu z resztą próbek – **Rysunek 17**. Dla porównania przedstawiłem ekspresję oznaczanych białek w monowarstwie. Widzimy jednak, że podczas hodowli badanych komórek w postaci monowarstwy nie obserwujemy znaczących różnic w ilości białek odpowiedzialnych za cykl komórkowy co przekłada się na porównywalną dystrybucję komórek w poszczególnych fazach cyklu w badanym układzie (Supl. Rysunek 6)



**Rysunek 17** – Porównanie poziomu ekspresji białek regulujących cykl komórkowy w badanych liniach komórkowych rosnących w postaci monowarstwy bądź guza techniką Western blot. \* - zaznaczono zaburzenia migracji białek podczas elektroforezy i/lub zaburzenia transferu białek na membranę.

Kompleks cykliny A/Cdk2 odpowiedzialny jest za przejście komórki przez fazę S cyklu komórkowego, jednakże wiele doniesień literaturowych łączy nadaktywność tego kompleksu z inwazyjnością komórek nowotworowych <sup>123, 124, 125</sup>. Najnowsze dane literaturowe wykazują również zależności łączące aktywność cykliny A z przejściem epithelialno-mezenchymalnym <sup>126</sup>. Co należy podkreślić, w 2014 roku udowodniono, że kinaza Akt może być aktywowana niekanonicznie, poprzez jednoczesną fosforylację jej C-końcowych reszt seryny 477 i treoniny 479 (S477/T479) <sup>127</sup>. Za fosforylację kinazy Akt w tych niekanonicznych miejscach odpowiada kompleks cykliny A2/Cdk2, co prowadzi do zachowania, bądź wzmocnienia aktywności kinazy Akt.

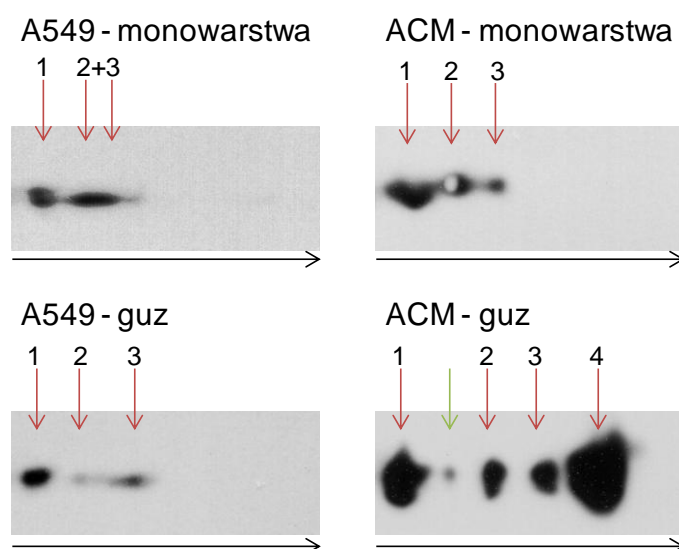
Niestety nie ma komercyjnie dostępnych przeciwciał skierowanych przeciwko epitopowi zawierającemu te dwa niekanoniczne miejsca fosforylacji, dlatego w celu zweryfikowania możliwości odmiennej aktywacji (fosforylacji) kinazy Akt, przeprowadziłem ogniskowanie izoelektryczne. Białka posiadają swoisty punkt izoelektryczny, dzięki czemu można rozdzielić je w zależności od wartości punktu izoelektrycznego (pI). Fosforylacja białek, zmienia ich ładunek wpływając na ich sumaryczną wartość pI i powodując przesunięcie migracji w stronę anody (niższego pH). W oparciu o wartość pI możliwym jest więc, nie tylko rozdzielania od siebie białek o różnej strukturze pierwszorzędowej, ale także rozdzielenie białek, różniących się od siebie jedynie ilością przyłączonych grup fosforanowych. Schemat doświadczenia został pokazany na rysie **Rysunku 18**.



**Rysunek 18** - Schemat doświadczenia ogniskowania izoelektrycznego.

Na **Rysunku 19** przedstawione zostały wyniki ogniskowania izoelektrycznego. Niestety na podstawie położenia plam nie jestem w stanie przypisać konkretnego miejsca fosforylacji (reszty aminokwasowej) do danej plamy a jedynie na podstawie ich ilości określić ilość przyłączonych grup fosforanowych. Próbki z guzów linii ACM charakteryzują się innym wzorem widocznych plam niż pozostałe próbki i to niezależnie od tego czy białko dla pozostałych próbek zostało wyizolowane z guzów czy komórek. Najbardziej widoczną różnicą jest ilość plam. Dla wszystkich próbek z za wyjątkiem próbek z guzów linii ACM,

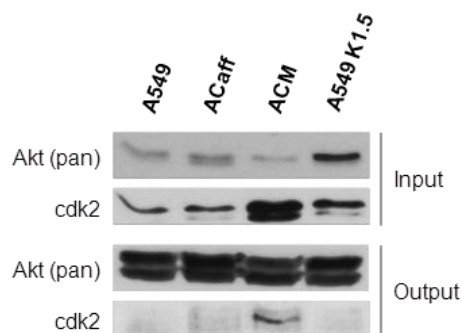
jestemy w stanie wyróżnić maksymalnie 3 plamy (zaznaczone czerwoną strzałką). Zaś dla próbek z guzów linii ACM wyraźnie widać 4 plamy (przy dłuższych czasach ekspozycji możemy dostrzec także piątą plamę zaznaczoną zieloną strzałką). W przeciwieństwie do innych próbek, w próbce z guzów linii ACM najbardziej intensywna plama znajduje się po stronie kwasowej (anodowej), co świadczy o silnej fosforylacji kinazy Akt. Z wyników Western blot przedstawionych na **Rysunku 17** wynika, że fosforylacja Akt na Ser 473 praktycznie nie zachodzi (słaby sygnał pojawia się po dłuższym czasie ekspozycji), więc plama nr 4 nie odpowiada temu miejscu fosforylacji. Jako że do tego doświadczenia użyto dziesięciokrotnie większą ilość białka niż w oznaczeniu Western Blot, plamy 2 i 3 dla guzów linii ACM mogą pochodzić od fosforylacji Akt na reszcie S473 i T308. Nie zmienia to jednak faktu, że bardzo intensywny sygnał najbardziej ufosforylowanej formy Akt (plama nr 4) nie tylko odróżnia tę próbkę od pozostałych, ale także stanowi pośrednie potwierdzenie założonej hipotezy o niekanonicznej aktywacji kinazy Akt za pośrednictwem kompleksu cykлина A/cdk2.



**Rysunek 19** – Wynik ogniskowania izoelektrycznego. Wyniki przedstawiono z zachowaniem skali. Czarne strzałki pokazują kierunek migracji od katody do anody (od strony zasadowej do strony kwasowej).

W celu przypisania przynajmniej niektórych z plam do znanych miejsc fosforylacji kinazy Akt (reszty Ser 473, Thr 308, Thr 450) podjęto próbę ich wizualizacji z użyciem komercyjnie dostępnych przeciwciał. Niestety strategia ta zawiodła, ponieważ dostępne komercyjnie przeciwciała są produkowane z użyciem sztucznych peptydów zawierających fosforylowane aminokwasy, co przekłada się na ich niską specyficzność. Modyfikacja postranslacyjna, jaką jest m.in. fosforylacja zachodzi zwykle w fragmentach białek o zakonserwowanej ewolucyjnie sekwencji. W warunkach użytych w doświadczeniu

przeciwciała anti-p-Ser473-Akt i anti-p-T308-Akt wykrywały bardzo wiele białek (**Supl. Rysunek 7**). Porównanie w bazie Protein BLAST sekwencji otaczającej te dwa aminokwasy potwierdziło przypuszczenia, że sekwencja aminokwasów otaczających te dwa miejsca fosforylacji jest zakonserwowana dla rodziny kinaz białkowych B (PKB) a także dla rodziny kinaz białkowych C (PKC), co może przekładać się na mniejszą specyficzność przeciwciał produkowanych z użyciem sztucznych fragmentów peptydów.



**Rysunek 20** – Wynik koimmunoprecypitacji z użyciem przeciwciała anti-Akt (pan). Czasy ekspozycji dla Input i Output są takie same dla danego epitopu. Input stanowi surowy lizat zawierający 25µg całkowitego białka. Output stanowi wynik koimmunoprecypitacji kinazy Akt i związanych z nią białek zawartych w 500µg całkowitego białka z użyciem króliczego przeciwciała monoklonalnego IgG wykrywającego ludzką kinazę Akt.

Na **Rysunku 20** przedstawiono rezultaty uzyskane w wyniku koimmunoprecypitacji z użyciem anti-Akt (pan). Dwa paski widoczne w próbie po koimmunoprecypitacji Akt (pan) są artefaktem wykonania eksperymentu. Górny z prążków odpowiada kinazie Akt (60kDa), a dolny zaś łańcuchowi ciężkiemu króliczego przeciwciała IgG (50kDa) użytego w doświadczeniu. W eksperymencie zastosowano bardzo łagodny rodzaj lizy, co uniemożliwia porównanie ilościowe pomiędzy próbkami (mogłoby być ono niemiernodajne, ponieważ białka związane np. z DNA mogły nie oddysocjować i zostały zwirowane razem z chromatyną). W wyniku koimmunoprecypitacji, próbka z guzów linii ACM jest jedyną próbką w której można było stwierdzić koimmunoprecypitację kinazy 2 zależnej od cykliny wraz z kinazą Akt.

## Dyskusja, wnioski, perspektywy

---

Idea komórek macierzystych nowotworu wywodzi się z połowy XIX wieku. Pomimo ogromnego wzrostu wiedzy na temat biologii komórki i mechanizmów regulujących ich proliferację, apoptozę czy różnicowanie nie udało się po dziś dzień określić szczegółowych powiązań pomiędzy szlakami odpowiedzialnych za wymienione procesy. Co prawda rozwój technik biologii molekularnej, a w szczególności techniki siRNA pozwoliły na zbadanie roli konkretnych białek w tychże procesach, jednak niewiele jest prac, które łączyłyby kluczowe kinazy czy czynniki transkrypcyjne w zawiłą sieć połączeń biochemicznych regulujących procesy wewnątrzkomórkowe. Odkrycia naukowe XX wieku pozwoliły na dość dokładne wytyczenie szlaków i kaskad sygnałowych wewnątrz komórek. Dokładnie poznano procesy metabolizmu cukrów, tłuszczów i białek, oraz szlaki odpowiedzialne za proliferację i apoptozę. Ponadto od odkrycia struktury DNA w latach 50' XX wieku naukowcom udało się poznać mechanizmy odpowiedzialne za procesy transkrypcji i translacji DNA. Mimo to globalna mapa połączeń reakcji zachodzących wewnątrz pojedynczej komórki nadal pozostaje tajemnicą.

Istnienie komórek macierzystych nowotworu zostało już potwierdzone doświadczalnie na podstawie selekcji pewnych typów komórek noszących znamiona komórek macierzystych. Pokazano w ten sposób, że w złożonej heterogenicznej strukturze nowotworu istnieje pewna mała populacja komórek zdolna do indukcji guzów *in vivo*. Mimo licznych prac eksperymentalnych, nadal nie mamy pewności czy użycie markerów selekcyjnych takich jak pompa ABCG2 (w przypadku *side populaion*) czy też markerów powierzchniowych jak CD44, CD133 czy CD117 prowadzi rzeczywiście do wyselekcjonowania komórek będących komórkami macierzystymi nowotworu. Czy też prowadzi raczej do izolacji komórek zdolnych do efektywnego wypompowywania leków (w przypadku ABCG2) lub takich, których oporność wiąże się ze zmianami epigenetycznymi, a te wtórnie prowadzą do ekspresji pewnych markerów błonowych jak np. CD133. Badania Tirino i Meng wykazały, że brak jest związku pomiędzy ekspresją markera CD133 a obecnością CSC w linii A549 i nie może on zatem służyć jako marker tych komórek<sup>51, 109</sup>.

Użycie markerów powierzchniowych (CD44, CD133) do oznaczenia nowotworowych komórek macierzystych wywodzi się z założenia, że te właśnie markery, których ekspresja dobrze koreluje z różnicowaniem komórek podczas hematopoezy będzie równie dobrze korelować z ekspresją w komórkach somatycznych nowotworów, które posiadają (bądź też nabyły) cechy macierzystych komórek nowotworu. Podejście takie początkowo wydawało się być słuszne, jednak w miarę wzrostu ilości badań okazało się być słuszne jedynie dla niektórych rodzajów linii komórek nowotworowych czy danych typów nowotworów. Zgodnie z

posiadaną przeze mnie wiedzą, użycie wspomnianych markerów w celu określenia stopnia różnicowania komórek sprawdza się dobrze w przypadku komórek białaczek i hematopoezy, jednak zawodzi jeśli chcemy w ten sposób charakteryzować komórki niosące znamiona komórek macierzystych nowotworów litych.

Kolejnym sposobem określenia pierwotności komórek, jest określenie poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za utrzymanie stanu pluripotentnego komórek. Prace prowadzone przez Shinya Yamanaka za które, wraz z John B. Gurdonem, otrzymał nagrodę Nobla w roku 2012 pokazały, że ekspresja kilku czynników transkrypcyjnych w somatycznej komórce, jest w stanie spowodować jej odróżnicowanie i utrzymanie stanu pluripotentnego <sup>128</sup>. Wkłonowanie i ekspresja jedynie czterech (Oct3/4, Sox2, c-Myc i Klf4) czynników transkrypcyjnych w komórce somatycznej spowodowała globalne zmiany ekspresji genów co w konsekwencji skutkowało odróżnicowaniem tych komórek. Uważam, że czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za pluripotencję, są lepszymi kandydatami na markery komórek macierzystych oraz komórek nowotworowych niosących cechy komórek macierzystych. Jednak badanie zmian w ich ekspresji wiąże się z pokonaniem wielu problemów. Wcześniej napisałem o mnogości wariantów (izoforn składania mRNA, istnienie aktywnych transkrypcyjnie pseudogenów) dla pojedynczego czynnika transkrypcyjnego. Niestety wiele z ukazujących się obecnie prac wydaje się nie zauważać tego problemu. Są jednak prace, które wyraźnie pokazują niuanse detekcji tych czynników z użyciem komercyjnie dostępnych przeciwciał czy też posługiwaniem się wynikami pomiarów poziomu mRNA za pomocą technik PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR), które to wyniki mogą być dalece zniekształcone w przypadku źle zaprojektowanych starterów (nie uwzględniających przede wszystkim istnienia aktywnych transkrypcyjnie pseudogenów) <sup>129, 130, 131</sup>.

Z powyższych powodów jako marker CSC w swoich badaniach obrałem oznaczanie poziomu ekspresji pompy ABCG2. Ekspresja ABCG2 koreluje z funkcjonalnym testem jakim jest oznaczenie frakcji SP, oraz z racji swojej naturalnej funkcji jaką pełni ta pompa w usuwaniu ksenobiotyków, stanowi jedną z przyczyn zjawiska wielkolekooporności. Oznaczony poziom ekspresji czynnika transkrypcyjnego Sox2 w tej pracy uważam za kolejny parametr charakterystyczny dla CSC. Ponadto jak wykazały badania prowadzone przez mgr inż. Majusa Misiaka, ekspresja czynnika Sox2 w komórkach A549 ogranicza się do jądra komórkowego, i co więcej podział komórki Sox2<sup>+</sup> prawdopodobnie odbywa się na oba sposoby: tj. symetryczny, gdzie obie komórki potomne pozostają Sox2<sup>+</sup>, (bądź obie stają się Sox2<sup>-</sup>) oraz asymetryczny gdzie jedna z komórek pozostaje Sox2<sup>+</sup> a druga staje się Sox2<sup>-</sup> (**Supl. Rysunek 8**). Nie udało mi się jednak jednoznacznie określić zmian ilości białka czynnika Oct4A w badanym układzie, co było spowodowane niską specyficznością

komercyjnie dostępnych przeciwciał. Planuję jednak określić zmiany w ekspresji OCT4A na poziomie mRNA stosując sondy TaqMan. Złożoność wzoru prążków jakie otrzymałem stosując przeciwciało anti-Nanog, sprawia że w tej pracy okazał się on nieodpowiednim markerem CSC. Jednak moje badania dostarczyły informacji, że w badanym układzie występuje więcej niż jedna forma tego białka. Przy pomocy technik PCR, klonowania i sekwencjonowania potwierdziłem ekspresję zarówno izoformy 1 Nanog, izoformy 2 Nanog oraz Nanog Pseudogenu 5 w badanym układzie komórkowym. Rola poszczególnych izoform białka Nanog w procesie samoodnowy wydaje się być różna (nie wywierają one jednakowego wpływu na samoodnowę) dlatego temat ten stanowi część moich planów badawczych. Doświadczenia jakie prowadziłem z hodowlą sferoidów pokazały, że zarówno sposób hodowli sferoidów jak i sposób ich kwantyfikacji oraz analiza wyników nie jest prosta. W przypadku braku suplementacji medium czynnikami wzrostu jedynie komórki A549 i A549 K1.5 zdolne były do utworzenia mikrosferoidów. Komórki ACaff i ACM otrzymane poprzez ich hodowlę z kofeiną zdolność tę traciły. Zastosowanie różnych warunków hodowli komórek niezależnych od podłoża (hodowla w płytkach o obniżonej przyczepialności, półpłynnym agarze oraz naczyniach typu spinner) a także oznaczenie poziomu ekspresji dwóch wcześniej wspomnianych czynników pozwoliło mi na pokazanie, że kofeina powodowała przedłużające się hamowanie aktywacji kinazy Akt i zmniejszenie frakcji komórek niosących znamiona komórek macierzystych nowotworu w komórkach ACaff oraz że zmiana ta była trwała w komórkach ACM po usunięciu kofeiny z medium. Zmniejszenie frakcji CSC w linii ACM jednak nie przełożyło się w ogóle na zdolność do indukcji guzów *in vivo* u myszy SCID. Komórki ACM okazały się być dużo bardziej inwazyjne niż pozostałe. Oznaczenie poziomu E- i N-kadheryn oraz określenie tempa migracji pozwoliło mi na potwierdzenie procesu EMT jaki zachodził w komórkach traktowanych kofeiną. Kofeina indukowała proces tranzycji epitelialno-mezenhymalnej który wiązał się jak pokazały dalsze badania z zwiększoną ekspresją i jądrową lokalizacją czynnika Snail1 (**Supl. Rysunek 9**).

Wpływ kofeiny na komórki A549 wiązał się nie tylko z eradykacją komórek eksprymujących ABCG2 i Sox2 ale przede wszystkim wiązał się z indukcją procesu EMT. Badania prowadzone przez Lamouille i współpracowników pokazały, że pełna aktywność kinaz Akt i mTOR jest niezbędna do całkowitego przebiegu tranzycji EMT i w wypadku zahamowania którejś z tej kinaz proces EMT nie przebiega całkowicie, ale zatrzymuje się w semi-stabilnych stanach, gdzie komórki charakteryzują się pośrednimi właściwościami pomiędzy komórkami epitelialnymi a mezenchymalnymi<sup>93, 92, 132</sup>. Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, że z podobnym przypadkiem mamy do czynienia w badanym układzie komórkowym. Kofeina indukuje tranzycję epitelialno-mezenchymalną, jednak nie przebiega ona do końca w komórkach ACaff. Zatrzymanie się procesu EMT na etapie pośrednim w

tych komórkach może wiązać się z hamowaniem przez kofeinę aktywacji szlaku PI3K/Akt. Dopiero usunięcie kofeiny z pożywki pozwoliło na dokończenie procesu EMT i wyprowadzenie linii ACM, której komórki posiadają cechy komórek mezenchymalnych. Komórki te okazały się być bardzo inwazyjne i były zdolne do szybkiej indukcji guzów. Oznaczenie ekspresji białek ujawniły znacząco zwiększoną ekspresję kinazy Akt przy jednoczesnym praktycznie kompletnym braku jej fosforylacji na reszcie Ser473. Dopiero oznaczenie ekspresji białek związanych z cyklem komórkowym i ujawnienie znacząco zwiększonej ekspresji cykliny A i kinazy Cdk2 rzuciło światło na przyczynę szybkiego wzrostów guzów ACM. Najnowsze doniesienia literaturowe pokazują związek pomiędzy fosforylacją kinazy Akt na jej C-końcu (S477/T479), a proliferacją komórek. Fosforylacja kinazy Akt w tym niekanonicznym miejscu przez kompleks cyklinyA2/Cdk2 skutkuje aktywacją Akt. Pomimo, że elektroforeza dwukierunkowa w tej dysertacji jest metodą użytą z konieczności, jednak uzyskane na jej podstawie wyniki w połączeniu z wynikami uzyskanymi w eksperymencie koiimmunoprecypitacji, pokazują jednoznacznie istnienie dodatkowego miejsca fosforylacji Akt oraz dowodzą że istnieją oddziaływania tej kinazy z Cdk2. Można więc uznać wyniki za dowód słuszności założonej hipotezy. Wykazanie zmian w sposobie aktywacji kinazy Akt opierało się w pracy na dowodach pośrednich i dlatego też planuję przeprowadzić analizy immunoprecypitowanej kinazy Akt za pomocą spektrometrii mas, co powinno umożliwić dokładne określenie reszt aminokwasowych, które ulegają fosforylacji.

Istnienie komórek macierzystych nowotworu wciąż jest kwestią dyskusyjną w świecie nauki. Ta dysertacja jak i wiele innych prac wskazuje istnienie pewnej grupy komórek nowotworowych zdolnych do ekspresji tych samych białek co embrionalne komórki macierzyste. Zatem jeśli rozumieć CSC jako komórki ekspresujące pewne markery komórek macierzystych, to jak najbardziej takie komórki są obecne w heterogennej populacji komórek nowotworowych. Jednak jeśli rozumieć CSC jako pojedyncze komórki zdolne do odtworzenia całej populacji guza to specyficzność ich identyfikacji jest wciąż kwestią dyskusyjną. Jakie markery i ile jednocześnie komórka nowotworowa musi ekspresywnować aby być uważana za komórkę CSC? – to pytanie wciąż jest otwarte. Większość badań opiera się na arbitralnym doborze markerów tych komórek i większości przypadków nie są to złe markery, są po prostu odpowiednie tylko dla danego modelu komórkowego.

Komórki macierzyste nowotworu odpowiadają jak się uważa za wtórny rozwój guza po latach remisji, jednak równie dużym problemem jest terapia szybko wzrastających guzów. W tej rozprawie pokazałem związek pomiędzy niekanoniczną aktywacją kinazy Akt a hiperproliferacją komórek ACM *in vivo*. Posłużyłem się modelem komórkowym, który został zaobserwowany podczas prac nad innym projektem, poprzez działanie kofeiny na komórki A549. Tak otrzymane modele komórkowe są odpowiednie do opisu obserwacji skutków



działania substancji (w tym przypadku kofeiny) na badane komórki, jednak ciężko z nich jest wyciągnąć wnioski uniwersalne, które można by ekstrapolować na inne układy komórkowe.

Nie zmienia to jednak faktu, że w badanym układzie linii komórkowych obserwujemy proces EMT indukowany kofeiną i proces ten wiąże się ze zmniejszeniem frakcji CSC. Intensywny wzrost guza linii ACM nie wiązał się więc z zwiększeniem populacji frakcji nowotworowych komórek macierzystych, a z aktywacją proliferacji tych komórek poprzez niekanoniczną fosforylację kinazy Akt na resztach Ser477 i Thr479.

Moje badania wykazują, że proces EMT nie zawsze wiąże się z nabyciem inwazyjnego charakteru komórek poprzez nabycie przez nie cech CSC. Dla inwazyjności komórek nowotworowych równie istotna jest aktywacja szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za proliferację. W tej pracy wykazałem, że aktywacja szlaku Akt poprzez kompleks cyklina A/Cdk2 może być główną przyczyną szybkiej proliferacji komórek guza *in vivo*. Możliwość spontanicznej aktywacji mechanizmu hiperprolifracji komórek nowotworowych po wszczepieniu ich do myszy SCID, poszerza obecny stan wiedzy, gdyż dotychczas mechanizm ten zbadano jedynie przy pomocy celowych genetycznych manipulacji.

Wyniki moje oraz innych badaczy<sup>24, 123, 125</sup> pokazują, że istnieją pewne odstępstwa od obecnie obowiązującego modelu<sup>98, 133</sup> w którym to, komórki CSC są uważane za główną przyczynę inwazyjności nowotworów. Obecnie istnieją inne równie ważne mechanizmy odpowiedzialne za proliferację komórek nowotworowych i indukcję guzów.

Rola kinazy Akt w proliferacji i rozwoju guzów jest, jak wskazują moje wyniki niebagatelna, dlatego też zdecydowałem się dalej eksplorować tę dziedzinę w przyszłości. W związku z tym planuję stworzenie bardziej jasnego układu genetycznego, który jak mam nadzieję, przyczyni się do wyjaśnienia *spiritus movens* odpowiedzialnego za przełączenie proliferacji regulowanej przez kanoniczną fosforylację Akt na hiperprolifrację regulowaną przez niekanonicznie fosforyzowaną kinazę Akt. W tym celu używając adenowirusów drugiej generacji wyprowadziłem stabilne linie komórkowe z wyciszonymi odpowiednio kompleksami mTORC1 (sh RNA Raptor) i mTORC2 (sh RNA Rictor). Indukując proces tranzycji EMT w tym układzie za pomocą TGF- $\beta$ , zbadam czy i w jakim stopniu zmieni się frakcja komórek posiadających cechy CSC a także mam zamiar określić czy brak fosforylacji Akt przez mTORC2 na S473 spowoduje przełączenie i aktywację tej kinazy przez kompleks cyklinaA/Cdk2.

## Materiały i Metody

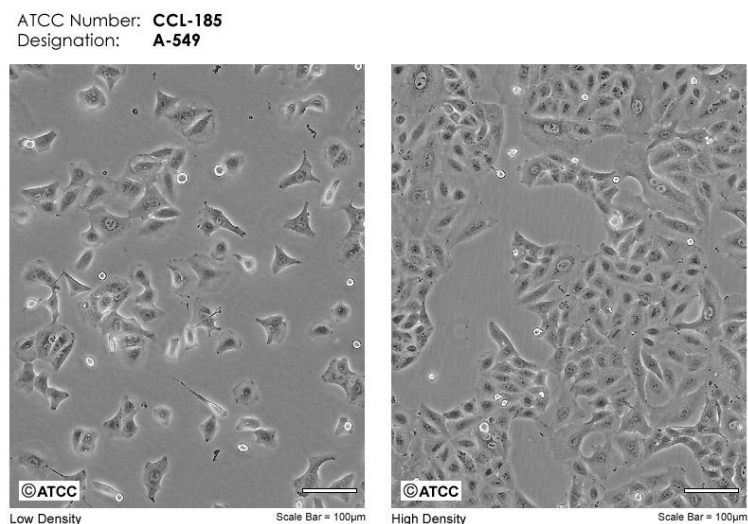
---

### Linie komórkowe

Wszystkie czynności wykonywane z użyciem komórek nowotworowych prowadziłem w warunkach sterylnych w komorze laminarnej klasy IIB firmy NuAire (USA).

#### A549

Linia komórkowa A549 (*human alveolar adenocarcinoma cells* – komórki ludzkiego gruczolaka pęcherzyków płucnych; niedrobnokomórkowy rak płuc; numer ATTC: CCL-185). Linia komórkowa A549 została wyprowadzona w 1972r. przez D.J. Giard i współpracowników poprzez usunięcie i hodowlę *in vitro* nowotworowej tkanki płuc od 58-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej (<http://www.lgcstandards-atcc.org>). Komórki A549 w hodowli *in vitro* rosną adherentnie w postaci monowarstwy (**Rysunek 21**).



**Rysunek 21** – Komórki A549 źródło: <http://www.lgcstandards-atcc.org>

#### ACaff

Linia komórkowa ACaff wywodzi się z linii komórkowej A549 i została otrzymana w naszym laboratorium. Hodowla komórek A549 w obecności wzrastających stężeń kofeiny, pozwoliła na uzyskanie stabilnej linii komórkowej ACaff zdolnej do normalnego wzrostu w obecności 1mM kofeiny i charakteryzującej się odmienną wrażliwością na cytostatyki niż wyjściowa linia A549.

## ACM

Linia komórkowa ACM wywodzi się z linii komórkowej ACaff i została otrzymana w naszym laboratorium, poprzez kultywację komórek ACaff w medium niezawierającym kofeiny.

## A549 K1.5

Linia komórkowa A549 K1.5 wywodzi się z linii komórkowej A549 i została otrzymana w naszym laboratorium w wyniku mutagenезy i selekcji w obecności związku C-1305<sup>102</sup>. Komórki te i charakteryzują się nadekspresją transportera ABCG2 i wykazują oporność na szereg związków i leków przecinowotworowych.

Hodowlę komórek A549, ACM oraz A549 K1.5 prowadziłem z użyciem standardowej pożywki RPMI 1640 (Sigma) suplementowanej 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS, Sigma) i 1% antybiotyków penicylina-streptomycyna (Sigma; stężenie końcowe: penicylina – 62,6µg/ml; streptomycyna - 40µg/ml).

Hodowlę komórek ACaff prowadziłem z użyciem standardowej pożywki RPMI 1640 (Sigma) suplementowanej 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS, Sigma), 1mM kofeiny (Sigma) i 1% antybiotyków penicylina-streptomycyna (Sigma; stężenie końcowe: penicylina – 62,6µg/ml; streptomycyna - 40µg/ml).

Podczas hodowli wszystkich z linii używałem naczyń hodowlanych typu T-flask (BD Falcon) o powierzchni 25cm<sup>2</sup> lub 75cm<sup>2</sup>. Linię komórkową pasażowałem przeciętnie dwa razy w tygodniu, gdy konfluencja wynosiła około 90%. Hodowlę prowadziłem w inkubatorze (NuAire) w 37°C, w atmosferze o wilgotności ok. 80% i składzie 5% CO<sub>2</sub> – 95% powietrza.

## Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- Cytometr przepływowy BD FACScan
- Czytnik mikroplątek (Tecan Infinite® M200)
- Czytnik mikroplątek (Victor<sup>3</sup>V Perkin Elmer)
- Inkubator do hodowli komórkowej (NuAire);
- Komora laminarna klasy IIB (NuAire);
- Licznik cząstek Z2 (Beckman – Coulter Counter);
- Mikroskop fluorescencyjny OLYMPUS BX60, lampa: OLYMPUS U-RFL-T (Olympus);
- Mikroskop JuLi™ Smart Fluorescent Cell Analyzer (Digital Bio)
- Mikroskop świetlny odwrócony TELAVAL 3 (Zeiss);

- Sonifikator – Branson 250W
- Waga analityczna – RADWAG WAX 60/220
- Waga laboratoryjna – RADWAG PS 600/C/2
- Wirówki – Eppendorf 5810R i Eppendorf 5417R
- Wywoływarka kliszy rentgenowskich CURIX (Agfa);
- Zestaw do ogniskowania izoelektrycznego – Model 175 Tube Cell (BioRad);
- Zestaw do SDS-PAGE - PROTEAN® II xi Cell (BioRad);
- Zestaw do transferu – Trans-Blot Cell (BioRad);

## Odczynniki i roztwory

### Pożywki i bufony stosowane podczas hodowli komórek i czynności związanych z komórkami

- RPMI 1640 (Sigma)
- Płodowa surowica bydlęca FBS (Sigma F7524)
- Antybiotyki: streptomycyna i penicylina (Sigma)
- L-glutaminian sodu (Sigma)
- Kofeina (Sigma C7731)
- 0.05% roztwór trypsyny (Sigma T4674) w Hank's Balanced Salt Solution (HBSS 1470)
- **HBSS 1470**
  - 5.33mM KCl (Stanlab) 0.4g/l
  - 0.44mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (POCH) 0.6g/l
  - 137.9mM NaCl (Stanlab) 8g/l
  - 4.17mM NaHCO<sub>3</sub> (Sigma) 0.35g/ml
  - 0.37mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (Stanlab) 0.122g/l
  - 5.55mM Glukoza (Polfa Kraków) 1g/l
  - Czerwień fenolowa (Sigma) 0.01g/l
  - 0.91mM EDTA (Gen-Apex) 1.06ml 0.5M r-u EDTA na litr
- **Izoton**
  - NaCl (Stanlab) 7.9g/l
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Stanlab) 4.76g/l
  - EDTA (Gen-Apex) 0.4g/l
  - KCl (Stanlab) 0.4g/l
  - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (POCH) 0.26g/l
  - NaF (Sigma) 0.3g/l

- **PBSx10 pH=6.8 (PBSx1 pH=7.4)**
  - 1.5M NaCl (Stanlab) 90g/l
  - 0.07M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Stanlab) 7.95g/l
  - 0.03M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (POCH) 1.44g/l

### **Roztwory stosowane w teście kolonii**

- NaCl 0.9%
- Barwnik Giemsa (Sigma)
- Etanol (Stanlab) 96%

### **Przeciwciała i roztwory stosowane podczas oznaczenia ekspresji transportera ABCG2**

- Mysie przeciwciało monoklonalne pierwszorzędowe - anti-Human CD338 (ABCG2), klon 5D3 (eBioscience Nr kat.: 14-8888)
- Mysie przeciwciało monoklonalne pierwszorzędowe - anti-Human CD338 (ABCG2), klon BXP-21 (Santa Cruz Nr kat.: sc-58222)
- Kontrolne mysie IgG (Santa Cruz Nr kat.: sc-2025)
- Przeciwciało drugorzędowe – Fluorescein (FITC)-conjugated anti-Mouse IgG (Jackson Nr kat.: 715-095-151)
- **HBSS 14025**
  - 1.26mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma) 0.14g/l
  - 0.49mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma) 0.1g/l
  - 0.41mM MgSO<sub>4</sub> (Serva) 0.1g/l
  - 5.33mM KCl (Sigma) 0.4g/l
  - 137.93mM NaCl (Stanlab) 4g/l
  - 4.17mM NaHCO<sub>3</sub> (Sigma) 0.3g/l
  - 0.34mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (Stanlab) 48mg/l
  - 0.44mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (POCH) 60mg/l
  - 5.56mM Glukoza (Polfa Kraków) 1g/l

### **Pożywki stosowane podczas oznaczenia wzrostu komórek na podłożu półpłynnym**

- Agar-Agar (BTL spółka ZO.O.)
- DMEM High Glucose (Sigma)
- Płodowa surowica bydlęca FBS (Gibco)

- Antybiotyki: streptomycyna i penicylina (Sigma)
- 100X Non-Essential Amino Acid (Gibco)
- 100X L-Glutamine (Gibco)

### **Pożywki i suplementy stosowane podczas oznaczenia wzrostu komórek w zawiesinie**

- DMEM F12K(1:1) (Sigma)
- EGF [20ng/ml] (Gibco)
- bFGF [10ng/ml] (Gibco)
- B27 (Invitrogen)
- Antybiotyki: streptomycyna i penicylina (Sigma)

### **Szczep myszy oraz materiały użyte podczas oznaczenia tumorigenności badanych komórek**

- SCID Hearless Outbred Mouse z Charles River (Niemcy)
- ECM gel, from Engelbreth Holm-Swarm mouse sarcoma [9.30mg protein/ml] (Sigma)

### **Bufory i przeciwciała stosowane podczas oznaczenia ekspresji białek techniką Western Blot**

- **Przeciwciała pierwszorzędowe:** anti-Akt (pan) #4691 (1:1000), anti-phospho (Ser473) Akt #9271 (1:1000), anti-phospho (Thr308) Akt #2965 (1:1000), anti-phospho (Tyr1068) EGFR #2234 (1:500), anti-EGFR #4267 (1:1000), anti-mTOR #2983 (1:1000), anti-phospho (Ser2448) mTOR #5536 (1:1000), anti-Sox2 #3579 (1:1000), anti-Nanog #4903 (1:1000) z anti-wimentyna #5741 (1:1000) z Cell Signalling, anti-Cdk2 sc-163 (1:100) anti-Aktyna sc-1616 (1:500), anti-cyklina A sc-596 (1:100), anti-cyklina D1 sc-246 (1:100), anti-cyklina E sc-247 (1:100), anti-PCNA sc-7907 (1:100) anti- $\beta$ -katenina sc-133240 (1:250) z Santa Cruz, anti-E-kadheryna 610181 (1:250), anti-N-kadheryna 610920 (1:250) z BD Transduction Laboratories. Wszystkie przeciwciała użyte w oznaczeniu ekspresji transporterów ABC pochodzą z kolekcji prof. Y.G. Assarafa (Technion, Haifa, Izrael), któremu zostały udostępnione przez prof. G.L. Scheffer
- **Przeciwciała drugorzędowe:** anti-mouse-HRP 715-035-150 (1:10000), anti-rabbit-HRP 711-035-152 (1:10000), anti-goat-HRP 705-036-147 (1:10000) z Jacson ImmunoResearch Labs, anti-mouse-HRP #7076 (1:1000), anti-rabbit-HRP #7074 (1:1000) z Cell Signaling

- **Bufor do elektroforezy SDS-PAGE**
  - Tris-zasada (Sigma) pH 8.3; 25mM
  - glicyna (Sigma) 192mM
  - SDS (Sigma) 0.1%
- **Bufor do transferu**
  - Tris-zasada (Sigma) 25mM
  - glicyna (Sigma) 192mM
  - metanol (POCh) 20%
- **TBST**
  - Tris-zasada (Sigma) 10mM
  - NaCl (Sigma) 150mM
  - Tween-20 (Sigma) 0.1%
- ECL - SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)
- Klisze rentgenowskie CP-G PLUS (Agfa)
- Ponceau S (Sigma)

## Metody

### Prowadzenie hodowli, pasażowanie i liczenie komórek.

Wszelkie czynności prowadziłem w warunkach sterylnych w komorze laminarnej stosując jednorazowe pipety, naczynia hodowlane, szalki Petriego etc. lub z zastosowaniem wysterylizowanych w autoklawie sprzętów – pipety Pasteura, butelki szklane itp.

#### Pasażowanie komórek adherentnych:

- Sterylną pożywkę w celu uniknięcia szoku cieplnego komórek podgrzewałem w łaźni wodnej do 37°C;
- Pożywkę z nad komórek odsysałem przy pomocy pipety Pasteura, następnie monowarstwę komórek przemywałem buforem PBS i dodawałem odpowiednio 0.5ml i 1.5ml 0.05% roztworu trypsyny dla flaszki o powierzchni 25cm<sup>2</sup> oraz flaszki o powierzchni 75cm<sup>2</sup>;
- Po 5min inkubacji odsetek komórek oderwanych od podłoża kontrolowałem poprzez obserwowanie powierzchni monowarstwy przy pomocy mikroskopu – odklejone komórki przyjmują kulisty kształt i unoszą się swobodnie w medium;
- Odklejone komórki zawieszałem w podgrzanej pożywce i określałem gęstość komórkową za pomocą hemocytometru lub automatycznego licznika komórek;

- Wszystkie badane linie przeszczepiałem do nowych flaszek w rozcieńczeniach 1:15 – 1:30. Hodowlę prowadziłem w inkubatorze w temperaturze 37°C, wilgotności powietrza 80% i składzie: 5% CO<sub>2</sub> – 95% powietrze.

### **Test kolonii**

- Na szalkę Petriego  $\varphi=100\text{mm}$  zaszczepiłem ok. 250 komórek dla każdej z linii i inkubowałem 168h, następnie wyrosłe kolonie przemyłem 0.9% NaCl i wysuszyłem na powietrzu po czym utrwaliłem 96% etanolem przez 10min;
- Komórki barwiłem przez 10min roztworem Giemsa, rozcieńczonym 1:20 wodą destylowaną. Niezwiązany barwnik odpłukałem wodą destylowaną. Zdjęcia kolonii zrobiłem używając odwróconego mikroskopu świetlnego przy powiększeniu pięciokrotnym.

### **Oznaczenie wrażliwości komórek na wybrane cytostatyki za pomocą testu MTT**

- Płytki 24-studzienkowe zaszczepiałem komórkami w ilości 4-5tyś komórek w 2ml medium na studzienkę, hodowałem komórki przez noc i do każdej ze studzienek dodałem 10 $\mu\text{l}$  200-krotnie stężonego związku rozpuszczonego w DMSO, tak aby uzyskać zadane stężenie końcowe w taki sposób, aby na każde stężenie badanego związku przypadły dwie studzienki. Do studzienek kontrolnych dodawałem 10 $\mu\text{l}$  DMSO. Płytki z badanymi związkami inkubowałem przez 4-5 podziałów komórkowych, to jest - 120h w 37°C i 5% CO<sub>2</sub>;
- Po 120h inkubacji do każdej z studzienek dodałem 200 $\mu\text{l}$  roztworu MTT (Sigma) w PBS [4mg/ml] i inkubowałem kolejne 3.5h w 37°C i 5% CO<sub>2</sub>;
- Pożywkę z nad powstałych kryształów formazanu odessałem używając pipety Pasteura i płytki zostawiłem do wyschnięcia przez noc. Kryształy formazanu rozpuściłem w 1ml DMSO (Merck);
- Absorbancję mierzyłem za pomocą czytnika płytek przy długości fali  $\lambda=540\text{nm}$ .

### **Oznaczenie tempa migracji badanych komórek w teście „wound healing assay”**

- Na dno szalki Petriego [ $\varphi=35\text{mm}$ ] przykleiłem silikonowy insert (Ibidi Culture-Insert 0.22cm<sup>2</sup> Ibidi) i obie komory insertu zaszczepiłem 20tyś. komórek zawieszonych w 70 $\mu\text{l}$  pożywki. Do szalki (poza insertem) dodałem 2.5ml pożywki i komórki inkubowałem przez noc;



- Insert delikatnie odczepiłem przy pomocy sterylnej pęsety, szalkę umieściłem na stoliku mikroskopu JuLi™ umieszczonego wewnątrz inkubatora i prowadziłem akwizycje przez 24-72h. Zdjęcia wykonywane były automatycznie co 10min, następnie zmontowane zostały one w film z użyciem oprogramowania dołączonego do mikroskopu.

### **Oznaczenie poziomu ekspresji cytokin i czynników wzrostu przez badane linie komórkowe**

- Na szalkę Petriego  $\varphi=100\text{mm}$  zaszczepiłem  $2 \times 10^6$  komórek i inkubowałem przez noc, następnie odessałem pożywkę i dodałem na szalkę 10ml pożywki RPMI 1640 nie suplementowanej FBS. Komórki inkubowałem dodatkowo 48h w pożywce pozbawionej FBS. Do oznaczenia ekspresji cytokin i czynników wzrostu użyłem 1ml kondycjonowanego medium;
- Procedurę oznaczenia przeprowadziłem zgodnie z opisem dołączonym przez producenta RayBio® Human Cytokine Antibody Array 5 lub RayBio® Human Growth Factor Antibody Array 1;
- Komórki oderwałem od podłoża za pomocą trypsyny i policzyłem, a następnie otrzymane wyniki znormalizowałem wyjściowo na kontrole pozytywne w obrębie testu a następnie na liczbę komórek.

### **Oznaczenie zdolności wzrostu komórek w zawieszynie**

- Komórki zawiesiłem w pożywce [100tyś. komórek na ml pożywki] DMEM F12K(1:1) nie zawierającej dodatkowych suplementów – tzw. medium niesuplementowane bądź w pożywce DMEM F12K(1:1) suplementowanej czynnikami wzrostu EGF [20ng/ml], bFGF [10ng/ml] oraz B27 – tzw. medium suplementowane;
- Zawiesinę komórkową umieściłem w naczyniu typu spinner, hodowlę prowadziłem przez 120h w  $37^\circ$ ,  $5\% \text{CO}_2$ , ustawiając mieszanie na 60rpm;
- Akwizycję zdjęć przeprowadziłem przenosząc 2ml zawiesiny do szalki Petriego [ $\varphi=35\text{mm}$ ] i wykonując zdjęcia pod powiększeniem 10x przy użyciu mikroskopu świetlnego. 1ml zawiesiny przenieśliem do szalki Petriego [ $\varphi=100\text{mm}$ ] dodałem 14ml pożywki [RPMI 1640 suplementowanej 10% FBS, zawierającej antybiotyki], szalki umieściłem w inkubatorze [ $37^\circ$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ] na 120h po czym wybarwiłem wyrosłe kolonie metodą Giemsa. Pozostałą zawiesinę sferoidów zwirowałem [1000rpm,  $4^\circ \text{C}$ ], przepłukałem dwukrotnie 0.9% roztworem NaCl i poddałem lizie z użyciem 250 $\mu\text{l}$  buforu lizującego RIPA. Lizaty do czasu analizy przechowywałem w  $-80^\circ \text{C}$ .

## Określenie zdolności do wzrostu w warunkach nieróżnicujących

- Sferoidy hodowałem w naczyniach typu spinner w warunkach nieróżnicujących tj. medium niesuplementowanym tak jak napisałem w poprzednim punkcie. Po 120h 6-dołkową płytkę zaszczerpiłem po 1ml zawiesiny sferoidów i 1.5ml kompletnej pożywki RPMI 1640, inkubowałem przez noc po czym zmieniłem medium na świeże i inkubowałem dodatkowe 96h;
- Uzyskane kolonie utrwalilem dodając do pożywki 1ml 50% w/w TCA (kwas trichlorooctowy (Sigma)) przez noc w 4°C Każdą studzienkę płukałem wodą bieżącą i płytki wysuszyłem na powietrzu, następnie do każdej z studzienek dodałem 750μl 0,4% roztworu SRB rozpuszczonego 1% kwasie octowym i barwiłem przez 30 minut z mieszaniem orbitalnym. Niezwiązany barwnik odessałem a komórki płukałem 4 razy 1% kwasem octowym. Po wysuszeniu płytki związany barwnik rozpuściłem dodając do każdej studzienki 1500 μl 10mM Tris-zasada pH=10.5. 750ul z każdej studzienki przenieśliśmy odpowiednio do studzienek płytki 48-dołkowej. Absorbancję mierzyłem przy 510nm.
- Drugim ze sposobów kwantyfikacji była hodowla sferoidów przy małej gęstości komórkowej w płytkach 96-dołkowych o zmniejszonej przyczepności. Konfluentne hodowle komórkowe oderwałem przy pomocy trypsyny, komórki zawiesiłem w samej pożywce nie suplementowanej żadnymi czynnikami wzrostu (DMEM F12/K (1:1)), określiłem gęstość i rozcieńczyłem do średniej gęstości 250 komórek/ml co po zaszczerpieniu płytki 200μl zawiesiny na studzienkę dawało ≈50 komórek w jednej studzience i po przeliczeniu ≈150 komórek na cm<sup>2</sup>. Płytki inkubowałem 7dni w 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Następnie każdą ze studzienek przeanalizowałem odrębnie pod mikroskopem przy powiększeniu czterokrotnym.

## Oznaczenie zdolności wzrostu komórek w podłożu półpłynnym

- Wylałem na dno szalki Petriego [φ=35mm] 1.5ml pożywki DMEM/HG suplementowanej 10% FBS, L-glutaminą, NAA oraz zawierającej antybiotyki (penicylinę-streptomycynę) i 0.6% agaru – tzw. medium różnicujące bądź 1.5ml pożywki DMEM/HG suplementowanej, L-glutaminą, NAA oraz zawierającej ww. antybiotyki i 0.6% agaru – tzw. medium nieróżnicujące. Czekałem ok. 1h na zestalenie podłoża po czym zawiesiłem 1tyś. komórek w 1.5ml pożywki DMEM/HG suplementowanej 10% FBS, L-glutaminą, NAA oraz zawierającej antybiotyki (penicylinę-streptomycynę) i 0.4% agaru – tzw. medium różnicujące bądź 1.5ml pożywki DMEM/HG suplementowanej, L-glutaminą, NAA oraz zawierającej

antybiotyki ww. i 0.4% agaru – tzw. medium nieróżnicujące. Czekałem ok. 45min na zestalenie podłoża a następnie szalki umieściłem w inkubatorze (37°C, 5%CO<sub>2</sub>);

- Po upływie 14dni, kwantyfikowałem ilość wyrosłych kolonii poprzez zliczenie ich liczby z 25 losowo wybranych pól obserwowanych pod 4x powiększeniem przy użyciu mikroskopu świetlnego.

### **Oznaczenie ekspresji białek techniką Western Blot**

- Komórki na szalce Petriego [φ=100mm] kontrolne bądź traktowane przez określony czas przepłukiwałem dwukrotnie 0.9% roztworem NaCl, a następnie lizowałem *in situ* na szalce używając 200μl buforu RIPA<sub>x2</sub>. Lizat przenieśliem do Eppendorfa i po 30min inkubacji na lodzie lizaty odwirowałem [14000g, 15min, 4°C] i do czasu analizy przechowywałem w -20°C;
- Przy pomocy testu BCA oznaczyłem stężenie białka w lizatach. Odpowiednią ilość lizatu zawierającą 50μg białka zmieszałem z buforem Laemmli'ego zawierającym DTT jako czynnik redukujący i denaturowałem przez 5min w temp. 95°C;
- Zdenaturowane próbki po naniesieniu do studzienek żelu poliakrylamidowego o różnych stężeniach [8, 10 bądź 12%] rozdzielałem przez 15min przy napięciu 100V a następnie 40-60min przy napięciu 200V;
- Transfer białek z żelu poliakrylamidowego na błonę polifluorowinyłową [PVDF] prowadziłem na mokro przez 1-2h stosując chłodzenie lodem i stałe natężenie prądu wynoszące 250mA;
- Błonę PVDF blokowałem 1h w temperaturze pokojowej w 5% roztworze BSA/TBST [jeśli przeciwciała pierwszego rzędu skierowane były przeciwko fosforylowanym formom białek] bądź w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku/TBST;
- Inkubację z przeciwciałami pierwszego rzędu rozcieńczonymi w 5%BSA/TBST/0.05NaN<sub>3</sub> przeprowadzałem w 4°C przez noc, po czym membranę przepłukałem roztworem TBST – 3 razy po 10min;
- Inkubację z przeciwciałami drugiego rzędu [skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową], rozcieńczonymi w 5% odtłuszczonym mleku w proszku/TBST lub w samym TBST przeprowadzałem w RT przez 1h, po czym membranę przepłukałem roztworem TBST – 3 razy 10min;
- Do wizualizacji substratu użyłem ECL Pico firmy Thermo oraz klisz rentgenowskich firmy Agfa.

## Oznaczenie ekspresji białek błonowych techniką Western Blot

- Konfluentną hodowlę komórek na szalce Petriego ( $\varphi=100\text{mm}$ ) dwukrotnie przepłukałem chłodnym roztworem PBS. Lizę prowadziłem *in situ* na szalce dodając 150 $\mu\text{l}$  buforu ekstrakcyjnego (50mM Trisbase pH=7.5; 50mM  $\beta$ -merkaptotanol; 0.5% Triton X-100 oraz inhibitory proteaz ROCHE cocktail). Zawiesinę komórek w buforze przenieśliem do probówek typu Eppendorf i inkubowałem na lodzie przez 30min od czasu do czasu mieszając. Lizaty odwirowałem [14000g, 15min, 4°C] i do czasu analizy przechowywałem w -20°C;
- Oznaczenie białka przeprowadziłem stosując metodę Bradford. Odpowiednią ilość lizatu zawierającą 50 $\mu\text{g}$  białka zmieszałem z buforem Laemmli'ego zawierającym  $\beta$ -merkaptotanol jako czynnik redukujący (NIE denaturowałem w temp. 95°C) poddałem elektroforezie SDS-PAGE w żelu poliakrylamidowym 7.5% a następnie transferowi na mokro na błonę nitrocelulozową [1h; 100V];
- Pozostałe czynności przeprowadzałem podobnie jak oznaczenie innych białek techniką Western Blot, co zostało opisane w poprzednim punkcie.

## Oznaczenie ekspresji transportera ABCG2

- Komórki przemyłem PBS, oderwałem przy pomocy trypsyny i zliczyłem.  $6 \times 10^5$  komórek przepłukałem dwukrotnie w buforze HBSS14025 i następnie osad komórek zawiesiłem w 100 $\mu\text{l}$  przeciwciała pierwszorzędowego anti-Human CD338 (ABCG2) rozcieńczonego w stosunku 1:100 w HBSS14025, jako kontrolę ujemną inkubowałem komórki z rozcieńczonym w HBSS14025 mysim IgG. Inkubację prowadziłem przez 45min w 37°C, po czym komórki odwirowałem i przepłukałem dwukrotnie w HBSS14025 z 0.5% BSA;
- Pelet komórek zawiesiłem w 100 $\mu\text{l}$  przeciwciała drugorzędowego anti-mouse FITC rozcieńczonego w stosunku 1:200 w HBSS14025 i inkubowałem 30min w 37°C;
- Po odwirowaniu i odrzuceniu supernatantu z przeciwciałem drugorzędowym, komórki płukałem w HBSS14025 po czym pelet zawiesiłem w 500 $\mu\text{l}$  HBSS14025 i przenieśliem do probówek cytometrycznych;
- Fluorescencje mierzyłem w kanale FL1 (530nm) cytometru przepływowego. Wyniki opracowałem używając programu WinMIDI 2.9.

## Oznaczenie dystrybucji komórek w cyklu komórkowym

- Komórki oderwałem przy pomocy trypsyny, zliczyłem i przepłukałem dwukrotnie zimnym roztworem PBS . Osad komórek rozpipetowałem w ok. 100-200 $\mu\text{l}$  PBS, a

następnie dodałem zimny 80% roztwór etanolu i do czasu analizy przechowywałem w  $-20^{\circ}\text{C}$ ;

- Po utrwaleniu komórki zwirowałem, odrzuciłem etanol a osad komórkowy zawiesiłem w mieszaninie barwiącej [10 $\mu\text{g/ml}$  jodek propidyny, 50 $\mu\text{g/ml}$  RNaza A w PBS] i barwiłem 1h w ciemności;
- Analizę przeprowadziłem z użyciem cytometru przepływowego BD FACScan w kanale FL2 i wyniki analizowałem z użyciem programu MultiCycle AV DNA Analysis.

### **Oznaczenie tumorogenności badanych komórek**

- Oznaczenie tumorogenności badanych komórek zostało przeprowadzone w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej (TAZD), eksperyment prowadzony był przez lek. wet. Grażynę Peszyńską-Sularz;
- Po przybyciu myszy do TAZD w Gdańsku, myszy zostały zakolczykowane i poddane 12 dniowej kwarantannie w celu aklimatyzacji;
- 34 myszy SCID *Hearless Outbred Mouse*, zostało podzielone na 4 grupy: Grupa A 10 myszy – komórki A549, pozostałe grupy B,C,F po 8 myszy – komórki ACaff, ACM, i A549 K1.5 odpowiednio;
- Komórki oderwałem przy pomocy trypsyny, zliczyłem i sprawdziłem ich żywotność z użyciem jodku propidyny. Komórki charakteryzujące się żywotnością większą niż 90% przepłukałem dwukrotnie pożywką RPMI 1640 bez FBS, a następnie zwiesiłem w stosunku 1:3 w ECM żelu;
- 100 $\mu\text{l}$  zawiesiny zawierającej 4mln komórek w ECM żelu wszczepiono podskórną w prawy bok myszy;
- 100 $\mu\text{l}$  zawiesiny zawierającej 1mln komórek w ECM żelu wszczepiono podskórną w lewy bok myszy;
- Pomiarów objętości guza dokonywano 1-2 razy w tygodniu;
- Po osiągnięciu średniej objętości guza większej niż 500 $\text{mm}^3$  na grupę, myszy zostały poddane eutanazji poprzez przerwanie rdzenia kręgowego (grupy A i C) lub podanie fenobarbitalu (grupy B i F);
- Guzy zostały wycięte i utrwalone w 4% roztworze buforowanego formaldehydu bądź zamrożone na suchym lodzie i do czasu analizy przechowywane w  $-80^{\circ}\text{C}$

## Izolacja białka z komórek i guzów – 2D elektroforeza

- Konfluentną hodowlę komórek na szalce Petriego ( $\phi=100\text{mm}$ ) przepłukałem dwukrotnie chłodnym roztworem 0.9% NaCl i lizę prowadziłem *in situ* na szalce poprzez dodanie 1000 $\mu\text{l}$  TRI Reagent (Sigma);
- Próbki pobrane z trzech różnych guzów dla danego typu linii, rozdrobniłem nie rozmrażając na suchym lodzie, następnie do 50-75mg rozdrobnionej próbki guzów dodałem 1000 $\mu\text{l}$  TRI Reagent lizowałem w homogenizerze Dounce;
- Lizaty przeniosłem do Eppendorfa, inkubowałem 5min, dodałem 200 $\mu\text{l}$  chloroformu, intensywnie wymieszałem i inkubowałem 5min w RT. Wirowałem 15min/12000g/4°C a następnie przeniosłem górną wodną warstwę zawierającą RNA do nowego Eppendorfa i do dalszej analizy przechowywałem w -80°C;
- Do warstwy chloroformowej dodałem 300 $\mu\text{l}$  100% etanolu w celu precypitacji DNA po zwirowaniu 5min/2000g/4°C, pelet DNA zachowałem w -20°C a do supernatantu dodałem 3ml izopropanolu i inkubowałem 10min w celu precypitacji białek;
- Po wirowaniu 15min/12000g/4°C supernatant odrzuciłem a osad płukałem wpiętrzykrotnie po 20min w 3ml 0.3M chlorowodoru guanidyny w 95% etanolu, a następnie dwukrotnie po 20min w 100% etanolu;
- Po zwirowaniu 10min/7500g/4°C, etanol odrzuciłem a osad suszyłem ok. 5min w RT. Pelet białkowy zawiesiłem w 100 $\mu\text{l}$  (dla białka izolowanego z hodowli komórkowej) lub 200 $\mu\text{l}$  (dla białka izolowanego z guzów) w 4% buforze CHAPS zawierającym 1% DTT, 9M mocznik, 1.6% amfolity pH 5-7; 0.4% amfolity pH 3-10 (wszystkie odczynniki: Sigma). Sonifikowałem trzema impulsami, 1sec/40% mocy urządzenia a następnie inkubowałem w chłodzonej lodem ultradźwiękowej łaźni wodnej;
- Po zwirowaniu 10min/3200g/4°C; osad odrzuciłem; supernatant przeniosłem do nowego Eppendorfa i do czasu analizy przechowujemy w -20°C. Zawartość białka oznaczyłem z wykorzystaniem metody Bradford.

## Rozdział w gradiencie pH – pierwszy wymiar

- Na szklanych rurkach (L=160mm;  $\phi=2,4\text{mm}$ ) zaznaczyłem poziom markerem 13cm od końca, a koniec owinąłem Parafilmem i ustawiłem pionowo w statywie. Rurki wypełniłem do oznaczenia odgazowanym roztworem zawierającym: 1.5% CHAPS, 0.5% NP-40, 9.2M mocznik, 4.5% akrylamidu/bisakrylamidu (37.5:1), 1.6% amfolity pH 5-7, 0.4% amfolity pH 3-10, 0.1% TEMED; 0.02% APS (wszystkie odczynniki: Sigma). Następnie nawarstwiłem 30 $\mu\text{l}$  9.2M mocznika i polimeryzowałem 2h, po czym usunąłem mocznik znad żelu, nałożyłem próbki zawierające 500 $\mu\text{g}$ /30 $\mu\text{l}$  białka i nawarstwiłem 15 $\mu\text{l}$  buforu w którym rozpuszczałem białko;

- Dolną komorę wypełniłem 2.5l odgazowanego buforu anodowego – 10mM kwasu fosforowego (V). Wypełnione rurki umieściłem w urządzeniu, usunąłem bąble powietrza uwiecznione na dole rurek a korki i połączenia uszczelniłem glicerolem. Górną komorę wypełniłem 750ml odgazowanego buforu katodowego – 20mM NaOH;
- Ogniskowanie izoelektryczne prowadziłem przy następujących warunkach prądowych:
  - 200V przez 2h
  - 500V przez 2h
  - 800V przez 16h
- Po skończonym ogniskowaniu używając strzykawki wypełnionej wodą destylowaną wycisnąłem żel na Parafilm. Żel inkubowałem 20min z 200μl buforu zawierającego 71.4mM Tris-HCl pH=6.8, 2.85% SDS, 0.0028% bromofenolu. Do czasu analizy żel przechowywałem poziomo w szczelnie zamkniętych probówkach w -20°C

### **SDS-PAGE – drugi wymiar**

- Szyby (16x16cm) odtłuściłem acetonem, używając 3mm przekładek złożyłem zestaw do wylewania żeli i wylałem odgazowany roztwór rozdzielający o składzie: 0.375M Tris-base pH=8.3; 12% akrylamid/bisakrylamid (37.5:1); 0.25% SDS; 0.04% TEMED; 0.01% APS, nawarstwiłem nasyconym wodą butan-2-olem i polimeryzowałem 45min. Usunąłem butan-2-ol, przepłukałem wodą, resztki wody usunąłem przy pomocy bibuły i wylałem odgazowany roztwór zagęszczający o składzie: 62.5mM Tris-base pH=6.8; 4.5% akrylamid/bisakrylamid (37.5:1), 0.05% SDS; 0.1% TEMED; 0.01% APS. Grzebień umieściłem między szymbami (jedna studzienka referencyjna + jedna studzienka 14cm preparatywna) i polimeryzowałem 45min;
- Po wyciągnięciu grzebienia, studzienkę przepłukałem buforem elektrodowym, następnie umieściłem żel z pierwszego wymiaru w studzience preparatywnej i zalałem 1% agarozą w buforze elektrodowym, do studzienki referencyjnej nałożyłem marker;
- Obie komory napełniłem buforem elektrodowym o składzie: 25mM Tris-zasada pH=8.3, 192mM glicyna, 0.1% SDS. Rozdział prowadziłem przy następujących parametrach:
  - 50mA przez 1.5h
  - 70mA przez 5h
- Po zakończonej elektroforezie, usunąłem żel zagęszczający, a żel rozdzielający kondycjonowałem przez 15min w chłodnym buforze do transferu.

## Western Blott – 2D elektroforeza

- Membranę PVDF przyciąłem do odpowiednich rozmiarów, aktywowałem w metanolu a następnie inkubowałem w chłodnym buforze transferującym. Żel i membranę ułożyłem w kasecie, dociskając mocno mokrymi bibułami 3MM, kasetę umieściłem w komorze tak aby żel znajdował się po stronie katodowej (-) a membrana po stronie anodowej (+), komorę zalałem schłodzonym buforem transferującym o składzie: 25mM Tris-base, 192mM glicyny i 20% metanolu. Transfer prowadziłem przez 16h przy napięciu 30V z chłodzeniem obiegowym;
- Membranę po transferze zanurzyłem w metanolu a następnie barwiłem roztworem 0.1% Ponceau S w 5% kwasie octowym. Niezwiązane Ponceau S usunąłem przepłukując membranę wodą kranową, następnie membranę umieszczoną pomiędzy dwiema foliami zeskanowałem;
- Membranę blokowałem w 5%BSA w TBST przez 1h/RT, następnie inkubowałem z przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi w 5% BSA w TBST przez noc w 4°C z mieszaniem, po czym płukałem trzykrotnie w TBST przez 10min w RT z mieszaniem;
- Kolejno inkubowałem membranę z przeciwciałami drugorzędowymi koniugowanymi z peroksydazą chrzanową rozcieńczonymi w TBST przez 1h w RT z mieszaniem i płukałem trzykrotnie w TBST przez 10min w RT z mieszaniem;
- Do wizualizacji substratu użyłem ECL Pico firmy Thermo oraz klisz rentgenowskich firmy Agfa

## Koimmunoprecypitacja

- Do 50-75mg rozdrobnionej próbki guzów (próbka uśredniona z trzech różnych guzów dla danej linii) dodałem 1000μl buforu lizującego o następującym składzie: 20mM Tris pH=7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton x-100, 20mM NaF, 1mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>, 20mM β-glicerofosforan, 1xROCHE cocktail, dezintegrowałem na lodzie w homogenizerze Dounce. Otrzymaną zawiesinę inkubowałem 30min na lodzie, po czym wirowałem 10min/14000g/4°C, pelet odrzuciłem, zaś lizat do czasu analizy przechowywałem w -20°C. Stężenie białka oznaczyłem metodą BCA;
- Przygotowanie kulek magnetycznych: Pobrałem 55μl kulek magnetycznych skoniugowanych z białkiem G [Thermo] i dwukrotnie przepłukałem w 1ml buforu lizującego. Po odseparowaniu na magnesie czyste kulki zawiesiłem w 50μl buforu lizującego;
- Oczyszczenie lizatu: lizaty rozcieńczyłem buforem lizującym do stężenia 500μg/ml, pobrałem 1ml lizatu i dodałem 20μl oczyszczonych kulek magnetycznych.



inkubowałem 2h z kulkami w 4°C z mieszaniem. Kulki oddzieliłem na magnesie i odrzuciłem, oczyszczony lizat przenieśliem do nowego Eppendorfa;

- Tworzenie immunokompleksu: do oczyszczonego lizatu dodałem 6μl przeciwciała anti-Akt (pan) i inkubowałem przez noc w 4°C z mieszaniem;
- Koimmunoprecypitacja: do lizatu z utworzonym immunokompleksem dodałem 30μl oczyszczonych kulek magnetycznych i inkubowałem 30min w RT z mieszaniem. Immunokompleks związany z kulkami oddzieliłem na magnesie i przepłukiwałem trzykrotnie 1ml buforu lizującego. Oczyszczony immunokompleks związany z kulkami zawiesiłem w 50μl buforu Laemmli zawierającym 66.6mM DTT i inkubowałem 5min w 95°C. Kulki magnetyczne oddzieliłem na magnesie i odrzuciłem a próbkę zawierającą zdenaturowane przeciwciała anti-Akt (pan), sprecypitowaną kinazę Akt, oraz inne białka, które uległy koimmunoprecypitacji z kinazą Akt, rozdzieliłem w 12% żelu poliakrylamidowym, a następnie transferowałem białka z żelu na membranę PFDV i wizualizowałem jak to zostało opisane powyżej w opisie Western blot.

## Literatura

---

1. Sabisz, M. & Skladanowski, A. Cancer stem cells and escape from drug-induced premature senescence in human lung tumor cells Implications for drug resistance and in vitro drug screening models. *Cell Cycle* **8**, 3208–3217 (2009).
2. Virchow, R. Cellular-Pathologie. *Arch. für Pathol. Anat. und Physiol. und für Klin. Med.* **8**, 3–39 (1855).
3. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105–11 (2001).
4. Lapidot, T. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645–8 (1994).
5. Quintana, E. *et al.* Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* **456**, 593–8 (2008).
6. Ishizawa, K. *et al.* Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. *Cell Stem Cell* **7**, 279–282 (2010).
7. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730–7 (1997).
8. Mintz, B. & Illmensee, K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 3585–3589 (1975).
9. Andrews, P. W. *et al.* Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1526–1530 (2005).
10. Reya, T. & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**, 843–50 (2005).
11. Terpstra, W. *et al.* Fluorouracil selectively spares acute myeloid leukemia cells with long-term growth abilities in immunodeficient mice and in culture. *Blood* **88**, 1944–50 (1996).
12. Zheng, P. S. *et al.* Telomerase activation in in vitro and in vivo cervical carcinogenesis. *Gynecol. Oncol.* **66**, 222–6 (1997).
13. Ju, Z. & Rudolph, K. L. Telomeres and telomerase in stem cells during aging and disease. *Genome Dyn.* **1**, 84–103 (2006).
14. Pesce, M. & Schöler, H. R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* **19**, 271–8 (2001).
15. Cheng, L. *et al.* OCT4: a novel biomarker for dysgerminoma of the ovary. *Am. J. Surg. Pathol.* **28**, 1341–6 (2004).
16. Tai, M.-H. *et al.* Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* **26**, 495–502 (2005).
17. Chen, Y.-C. *et al.* Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One* **3**, e2637 (2008).
18. Schoenhals, M. *et al.* Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **383**, 157–162 (2009).
19. Rich, J. N. Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res.* **67**, 8980–4 (2007).
20. Shervington, A. & Lu, C. Expression of multidrug resistance genes in normal and cancer stem cells. *Cancer Invest.* **26**, 535–42 (2008).
21. Liu, S. *et al.* Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and

- malignant human mammary stem cells. *Cancer Res.* **66**, 6063–71 (2006).
22. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
  23. Reya, T. *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409–14 (2003).
  24. Jaiswal, S. *et al.* Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 10002–10007 (2003).
  25. Alcantara Llaguno, S. *et al.* Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell* **15**, 45–56 (2009).
  26. Molyneux, G. *et al.* BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 403–17 (2010).
  27. Persson, A. I. *et al.* Non-Stem Cell Origin for Oligodendroglioma. *Cancer Cell* **18**, 669–682 (2010).
  28. Daser, A. & Rabbitts, T. H. The versatile mixed lineage leukaemia gene MLL and its many associations in leukaemogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 175–88 (2005).
  29. Sell, S. & Pierce, G. B. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab. Invest.* **70**, 6–22 (1994).
  30. Ratajczak, M. Z. Cancer stem cells--normal stem cells 'Jedi' that went over to the 'dark side'. *Folia Histochem. Cytobiol.* **43**, 175–81 (2005).
  31. Tu, S.-M., Lin, S.-H. & Logothetis, C. J. Stem-cell origin of metastasis and heterogeneity in solid tumours. *Lancet Oncol.* **3**, 508–513 (2002).
  32. Islam, F., Gopalan, V., Smith, R. A. & Lam, A. K.-Y. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in Cancer recurrence and cancer treatment. *Exp. Cell Res.* **335**, 135–47 (2015).
  33. Spangrude, G. J., Heimfeld, S. & Weissman, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**, 58–62 (1988).
  34. Terstappen, L. W., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P. M. & Loken, M. R. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* **77**, 1218–27 (1991).
  35. Gallacher, L. *et al.* Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)-Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* **95**, 2813–20 (2000).
  36. Goardon, N. *et al.* Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* **19**, 138–52 (2011).
  37. Taussig, D. C. *et al.* Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* **112**, 568–575 (2008).
  38. Taussig, D. C. *et al.* Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. *Blood* **115**, 1976–84 (2010).
  39. Grosse-Gehling, P. *et al.* CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *J. Pathol.* **229**, 355–78 (2013).
  40. Leung, E. L.-H. *et al.* Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One* **5**, e14062 (2010).

41. Li, C. *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* **67**, 1030–7 (2007).
42. Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W. M., Clarke, M. F. & Wicha, M. S. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.* **36**, 59–72 (2003).
43. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3983–8 (2003).
44. Akalay, I. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis. *Cancer Res.* **73**, 2418–27 (2013).
45. Ginestier, C. *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **1**, 555–67 (2007).
46. Grivas, P. *et al.* Targeting cancer stem cell-like phenotype in bladder cancer (BC) cell lines. *ASCO Meet. Abstr.* **29**, e15102 (2011).
47. Penumatsa, K., Edassery, S. L., Barua, A., Bradaric, M. J. & Luborsky, J. L. Differential expression of aldehyde dehydrogenase 1a1 (ALDH1) in normal ovary and serous ovarian tumors. *J. Ovarian Res.* **3**, 28 (2010).
48. Beier, D. *et al.* CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* **67**, 4010–5 (2007).
49. Shmelkov, S. V *et al.* CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J. Clin. Invest.* **118**, 2111–20 (2008).
50. Tirino, V. *et al.* TGF- $\beta$ 1 exposure induces epithelial to mesenchymal transition both in CSCs and non-CSCs of the A549 cell line, leading to an increase of migration ability in the CD133+ A549 cell fraction. *Cell Death Dis.* **4**, e620 (2013).
51. Meng, X., Li, M., Wang, X., Wang, Y. & Ma, D. Both CD133+ and CD133- subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells. *Cancer Sci.* **100**, 1040–6 (2009).
52. Moitra, K., Lou, H. & Dean, M. Multidrug efflux pumps and cancer stem cells: insights into multidrug resistance and therapeutic development. *Clin. Pharmacol. Ther.* **89**, 491–502 (2011).
53. Domen, J., Cheshier, S. H. & Weissman, I. L. The Role of Apoptosis in the Regulation of Hematopoietic Stem Cells: Overexpression of BCL-2 Increases Both Their Number and Repopulation Potential. *J. Exp. Med.* **191**, 253–264 (2000).
54. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444**, 756–60 (2006).
55. Tamura, K. *et al.* Accumulation of CD133-positive glioma cells after high-dose irradiation by Gamma Knife surgery plus external beam radiation. *J. Neurosurg.* **113**, 310–318 (2010).
56. Facchino, S., Abdouh, M., Chatoo, W. & Bernier, G. BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J. Neurosci.* **30**, 10096–111 (2010).
57. Diehn, M. *et al.* Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* **458**, 780–3 (2009).
58. Viale, A. *et al.* Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells. *Nature* **457**, 51–6 (2009).

59. Azzi, S. *et al.* Differentiation therapy: targeting human renal cancer stem cells with interleukin 15. *J. Natl. Cancer Inst.* **103**, 1884–98 (2011).
60. Chen, J., Han, Q. & Pei, D. EMT and MET as paradigms for cell fate switching. *J. Mol. Cell Biol.* **4**, 66–9 (2012).
61. Kalluri, R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest.* **119**, 1417–9 (2009).
62. De Craene, B. & Berx, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 97–110 (2013).
63. Zavadil, J. & Böttlinger, E. P. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**, 5764–74 (2005).
64. Onder, T. T. *et al.* Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* **68**, 3645–54 (2008).
65. Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* **19**, 156–72 (2009).
66. Billottet, C. *et al.* Modulation of several waves of gene expression during FGF-1 induced epithelial-mesenchymal transition of carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* **104**, 826–839 (2008).
67. Gründe, M. *et al.* Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. *J. Cell Sci.* **115**, 4227–36 (2002).
68. Chang, H.-Y., Kao, M.-C., Way, T.-D., Ho, C.-T. & Fu, E. Diosgenin suppresses hepatocyte growth factor (HGF)-induced epithelial-mesenchymal transition by down-regulation of Mdm2 and vimentin. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 5357–63 (2011).
69. Kim, K., Lu, Z. & Hay, E. D. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol. Int.* **26**, 463–76 (2002).
70. Timmerman, L. A. *et al.* Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* **18**, 99–115 (2004).
71. Luo, Y. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha induces the epithelial-mesenchymal transition of human prostatecancer cells. *Chin. Med. J. (Engl.)* **119**, 713–8 (2006).
72. Yang, M.-H. *et al.* Overexpression of NBS1 induces epithelial–mesenchymal transition and co-expression of NBS1 and Snail predicts metastasis of head and neck cancer. *Oncogene* **26**, 1459–1467 (2006).
73. Cho, H. J., Baek, K. E., Saika, S., Jeong, M.-J. & Yoo, J. Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**, 337–43 (2007).
74. Faquin, W. C., Chahwala, S. B., Cantley, L. C. & Branton, D. Protein kinase C of human erythrocytes phosphorylates bands 4.1 and 4.9. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **887**, 142–149 (1986).
75. Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G. & Waterfield, M. D. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 267–72 (1997).
76. Vanhaesebroeck, B. & Waterfield, M. D. Signaling by Distinct Classes of Phosphoinositide 3-Kinases. *Exp. Cell Res.* **253**, 239–254 (1999).
77. Vanhaesebroeck, B. & Alessi, D. R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road

- to PKB. *Biochem. J.* **346 Pt 3**, 561–76 (2000).
78. Agoulnik, I. U., Hodgson, M. C., Bowden, W. A. & Ittmann, M. M. INPP4B: the new kid on the PI3K block. *Oncotarget* **2**, 321–8 (2011).
  79. Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A. & Sugimoto, C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* **22**, 8983–8998 (2003).
  80. Gonzalez, E. & McGraw, T. E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **8**, 2502–8 (2009).
  81. Irie, H. Y. *et al.* Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* **171**, 1023–34 (2005).
  82. Bachelder, R. E. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* **168**, 29–33 (2004).
  83. Balsara, B. R. *et al.* Frequent activation of AKT in non-small cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions. *Carcinogenesis* **25**, 2053–9 (2004).
  84. Do, H., Solomon, B., Mitchell, P. L., Fox, S. B. & Dobrovic, A. Detection of the transforming AKT1 mutation E17K in non-small cell lung cancer by high resolution melting. *BMC Res. Notes* **1**, 14 (2008).
  85. Guo, Y., Du, J. & Kwiatkowski, D. J. Molecular dissection of AKT activation in lung cancer cell lines. *Mol. Cancer Res.* **11**, 282–93 (2013).
  86. Cantley, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655–7 (2002).
  87. Sarbassov, D. D. *et al.* Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* **14**, 1296–302 (2004).
  88. Gately, K. *et al.* Overexpression of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and angiogenesis are poor prognostic factors in early stage NSCLC: a verification study. *Lung Cancer* **75**, 217–22 (2012).
  89. Kitano, H. *et al.* Profiling of phospho-AKT, phospho-mTOR, phospho-MAPK and EGFR in non-small cell lung cancer. *J. Histochem. Cytochem.* **62**, 335–46 (2014).
  90. Rodrik-Outmezguine, V. S. *et al.* mTOR Kinase Inhibition Causes Feedback-Dependent Biphasic Regulation of AKT Signaling. *Cancer Discov.* **1**, 248–259 (2011).
  91. Vadlakonda, L., Dash, A., Pasupuleti, M., Anil Kumar, K. & Reddanna, P. The Paradox of Akt-mTOR Interactions. *Front. Oncol.* **3**, 165 (2013).
  92. Lamouille, S., Connolly, E., Smyth, J. W., Akhurst, R. J. & Derynck, R. TGF- $\beta$ -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *J. Cell Sci.* **125**, 1259–73 (2012).
  93. Lamouille, S. & Derynck, R. Cell size and invasion in TGF- induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J. Cell Biol.* **178**, 437–451 (2007).
  94. Grant, I., Cartwright, J. E., Lumicisi, B., Wallace, A. E. & Whitley, G. S. Caffeine Inhibits EGF-Stimulated Trophoblast Cell Motility through the Inhibition of mTORC2 and Akt. *Endocrinology* **153**, 4502–4510 (2012).
  95. Schuijers, J. & Clevers, H. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *EMBO J.* **31**, 2685–96 (2012).
  96. Zhang, S. *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway upregulates c-Myc expression to promote cell proliferation of P19 teratocarcinoma cells. *Anat. Rec. (Hoboken)*. **295**, 2104–13 (2012).

97. Scheel, C. *et al.* Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* **145**, 926–40 (2011).
98. Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–15 (2008).
99. Morel, A.-P. *et al.* Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* **3**, e2888 (2008).
100. Li, R. *et al.* A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* **7**, 51–63 (2010).
101. Reinke, A., Chen, J. C.-Y., Aronova, S. & Powers, T. Caffeine targets TOR complex I and provides evidence for a regulatory link between the FRB and kinase domains of Tor1p. *J. Biol. Chem.* **281**, 31616–26 (2006).
102. Bram, E. E. *et al.* C421 allele-specific ABCG2 gene amplification confers resistance to the antitumor triazoloacridone C-1305 in human lung cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 41–53 (2007).
103. Barrandon, Y. & Green, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 2302–6 (1987).
104. Meng, X., Wang, X. & Wang, Y. More than 45% of A549 and H446 cells are cancer initiating cells: evidence from cloning and tumorigenic analyses. *Oncol. Rep.* **21**, 995–1000 (2009).
105. Beaver, C. M., Ahmed, A. & Masters, J. R. Clonogenicity: holoclones and meroclones contain stem cells. *PLoS One* **9**, e89834 (2014).
106. Hirsch, H. A., Iliopoulos, D., Tschlis, P. N. & Struhl, K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res.* **69**, 7507–11 (2009).
107. Liu, P. *et al.* Disulfiram targets cancer stem-like cells and reverses resistance and cross-resistance in acquired paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer cells. *Br. J. Cancer* **109**, 1876–85 (2013).
108. Sachlos, E. *et al.* Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell* **149**, 1284–97 (2012).
109. Rocco, A. *et al.* CD133 and CD44 cell surface markers do not identify cancer stem cells in primary human gastric tumors. *J. Cell. Physiol.* **227**, 2686–93 (2012).
110. Brechbuhl, H. M. *et al.* Glutathione transport is a unique function of the ATP-binding cassette protein ABCG2. *J. Biol. Chem.* **285**, 16582–7 (2010).
111. Vlaming, M. L. H., Lagas, J. S. & Schinkel, A. H. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 14–25 (2009).
112. Liang, S.-C., Yang, C.-Y. & Lin, C.-H. Abstract 5002: Modulation of E-cadherin transcription mediated by nuclear localization of ABCG2. *Cancer Res.* **74**, 5002–5002 (2014).
113. Goler-Baron, V., Sladkevich, I. & Assaraf, Y. G. Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway disrupts ABCG2-rich extracellular vesicles and overcomes multidrug resistance in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 1340–8 (2012).
114. Arzumanyan, A. *et al.* Does the hepatitis B antigen HBx promote the appearance of liver cancer stem cells? *Cancer Res.* **71**, 3701–8 (2011).
115. Golestaneh, A. F. *et al.* miRNAs expressed differently in cancer stem cells and cancer cells of human gastric cancer cell line MKN-45. *Cell Biochem. Funct.* **30**, 411–8

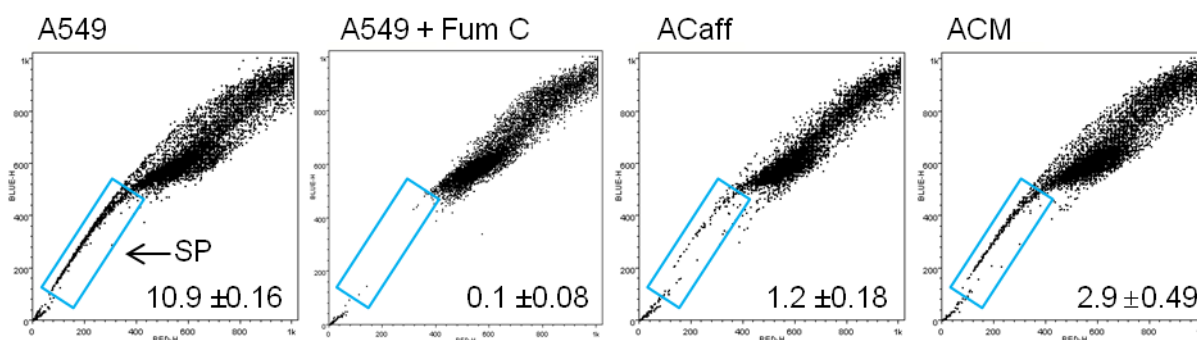
- (2012).
116. Omene, C. O., Wu, J. & Frenkel, K. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) derived from propolis, a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells. *Invest. New Drugs* **30**, 1279–88 (2012).
  117. Das, S., Jena, S. & Levasseur, D. N. Alternative Splicing Produces Nanog Protein Variants with Different Capacities for Self-renewal and Pluripotency in Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 42690–42703 (2011).
  118. Booth, H. A. F. & Holland, P. W. H. Eleven daughters of NANOG. *Genomics* **84**, 229–38 (2004).
  119. Foukas, L. C. *et al.* Direct effects of caffeine and theophylline on p110 delta and other phosphoinositide 3-kinases. Differential effects on lipid kinase and protein kinase activities. *J. Biol. Chem.* **277**, 37124–30 (2002).
  120. Song, G., Ouyang, G. & Bao, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 59–71
  121. Akca, H., Tani, M., Hishida, T., Matsumoto, S. & Yokota, J. Activation of the AKT and STAT3 pathways and prolonged survival by a mutant EGFR in human lung cancer cells. *Lung Cancer* **54**, 25–33 (2006).
  122. Sordella, R., Bell, D. W., Haber, D. A. & Settleman, J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* **305**, 1163–7 (2004).
  123. Huuhtanen, R. L. *et al.* A high proliferation rate measured by cyclin A predicts a favourable chemotherapy response in soft tissue sarcoma patients. *Br. J. Cancer* **81**, 1017–21 (1999).
  124. Kyushima, N. *et al.* Expression of cyclin A in endometrial adenocarcinoma and its correlation with proliferative activity and clinicopathological variables. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **128**, 307–12 (2002).
  125. Wegiel, B. *et al.* Multiple cellular mechanisms related to cyclin A1 in prostate cancer invasion and metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 1022–36 (2008).
  126. Bendris, N. *et al.* Cyclin A2, a novel regulator of EMT. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 4881–94 (2014).
  127. Liu, P. *et al.* Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. *Nature* **508**, 541–5 (2014).
  128. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–76 (2006).
  129. Wang, X. & Dai, J. Isoforms of OCT4 Contribute to the Confusing Diversity in Stem Cell Biology. *Stem Cells* **28**, N/A–N/A (2010).
  130. Jez, M. *et al.* Expression and Differentiation between OCT4A and Its Pseudogenes in Human ESCs and Differentiated Adult Somatic Cells. *PLoS One* **9**, e89546 (2014).
  131. Warthemann, R., Eildermann, K., Debowski, K. & Behr, R. False-positive antibody signals for the pluripotency factor OCT4A (POU5F1) in testis-derived cells may lead to erroneous data and misinterpretations. *Mol. Hum. Reprod.* **18**, 605–12 (2012).
  132. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–96 (2014).
  133. Polyak, K. & Weinberg, R. a. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 265–273 (2009).



## Suplement

**A)**

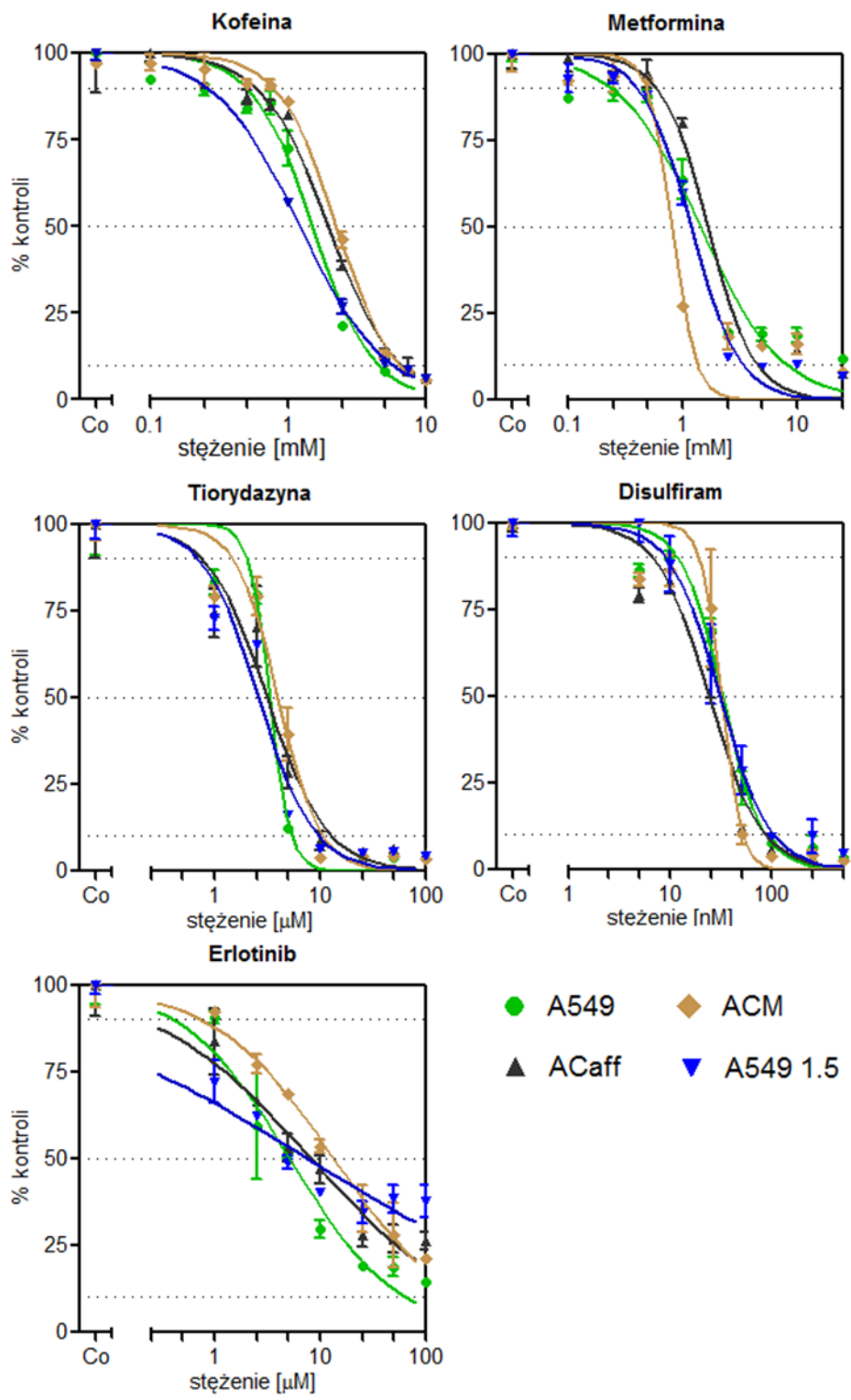
Linia komórkowa	Frakcja SP [% całości]	
	- Fumitremorgin C	+ Fumitremorgin C
A549	10.9 ± 0.17	0.1 ± 0.08
ACaff	1.2 ± 0.18	0.5 ± 0.11
ACM	2.9 ± 0.49	0.5 ± 0.21



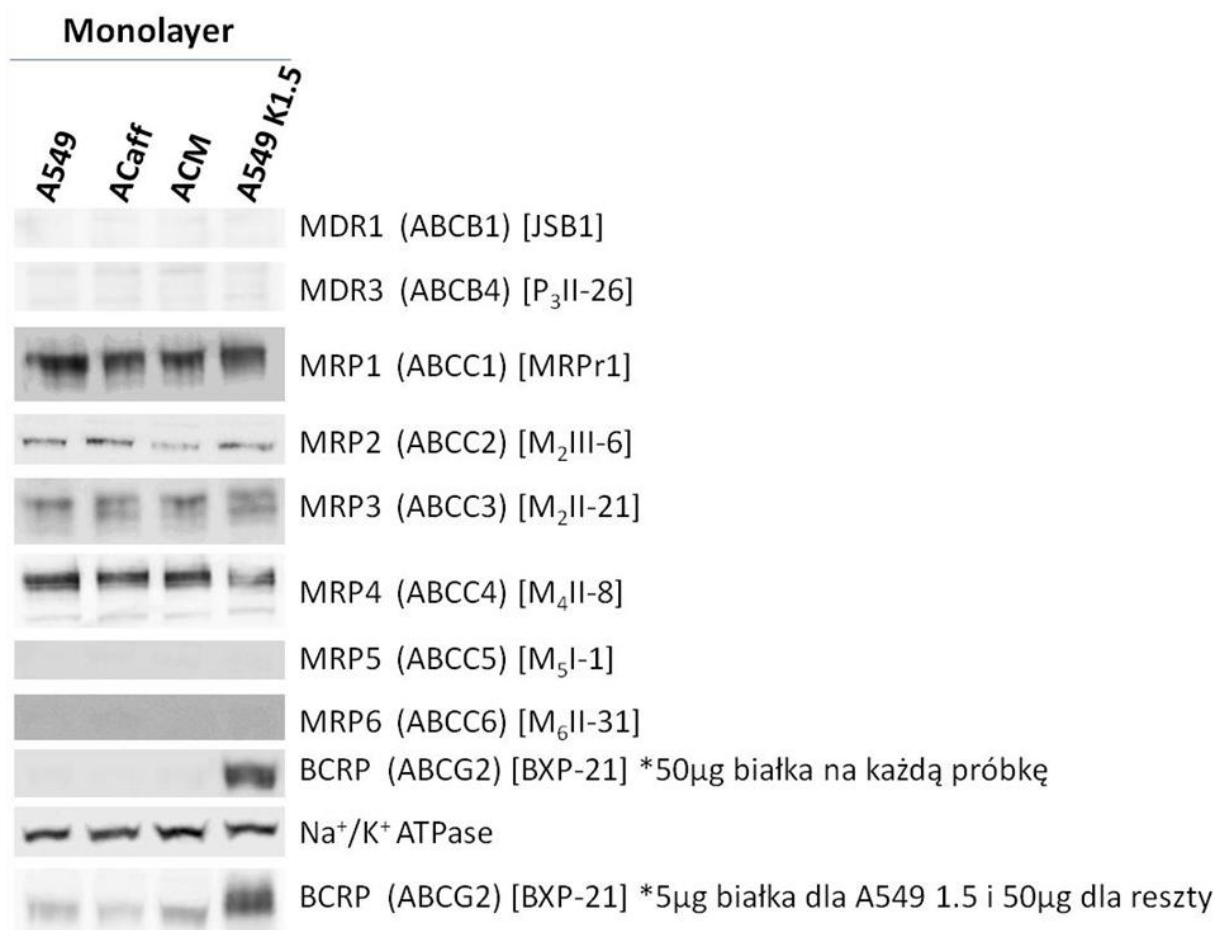
**B)**

związek	IC <sub>50</sub>		
	A549	ACaff	ACM
kofeina	1.01 ± 0.18	2.90 ± 0.15	1.91 ± 0.21
pentoksyfilina	1.23 ± 0.18	2.13 ± 0.18	1.23 ± 0.21
SN-38	0.015 ± 0.003	0.0041 ± 0.0006	0.008 ± 0.0006
ICRF-187	5.87 ± 0.045	13.18 ± 0.085	7.83 ± 0.10
cisplatyna	3.43 ± 0.51	1.22 ± 0.38	3.26 ± 0.46
etopozyd	0.33 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.24 ± 0.08
taksol	0.0082 ± 0.0005	0.0079 ± 0.008	0.0084 ± 0.007
winblastyna	0.0033 ± 0.0008	0.0027 ± 0.0007	0.0028 ± 0.0008

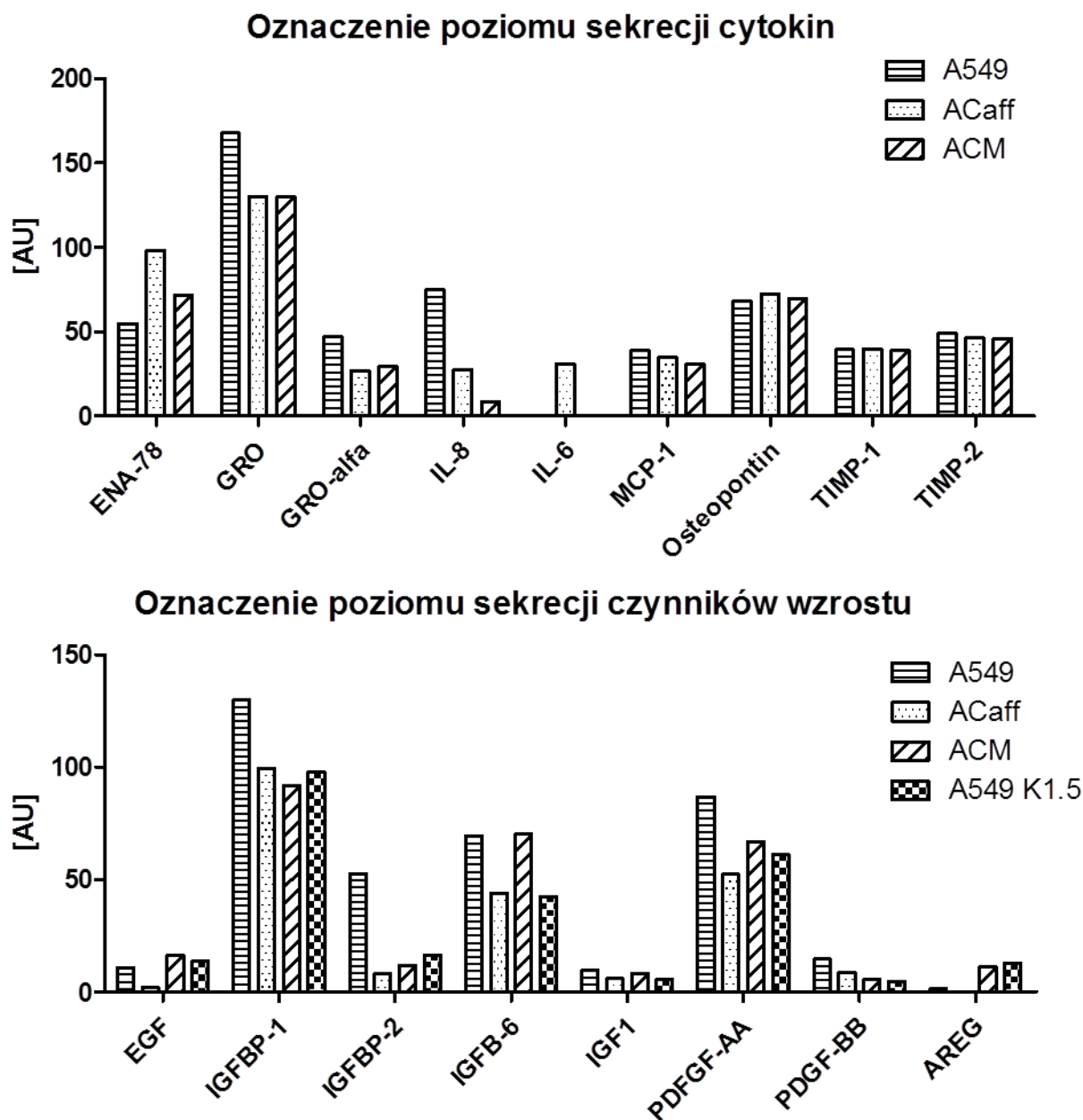
**Sup. Rysunek 1 – A)** Wyniki cytometrycznego oznaczenia frakcji SP mierzonego jako wielkość frakcji komórek o niskim wybarwieniu Hoechst 33342 **B)** Porównanie wartości IC<sub>50</sub> wybranych chemoterapeutyków. Na czerwono zaznaczono wartości IC<sub>50</sub> minimum 1.5x większe niż dla rodzicielskiej linii A549, na zielono zaś wartości IC<sub>50</sub> minimum 1.5x mniejsze. Dla kofeiny i pentoksyfiliny wartości IC<sub>50</sub> podane są w mM dla reszty związków w µM. Wszystkie wyniki umieszczone na tym rysunku uzyskane zostały przez dr inż. Michała Sabisza.



Supl. Rysunek 2 – Szczegółowe przebiegi krzywych cytotoksyczności



**Supl. Rysunek 3** – Porównanie poziomu ekspresji transporterów z rodziny ABC w badanym układzie komórkowym



**Supl. Rysunek 4** – Porównanie poziomu sekrecji cytokin i czynników wzrostu przez badane linie komórkowe. **ENA-78** (*epithelial neutrophil-activating protein 78*) C-X-C motif chemokine ligand 5 CXCL5; **GRO** (*growth-related oncogene*) CXCL1 + CXCL2; **GRO-alfa** CXCL1; **IL-8** (*interleukin 8*) CXCL8; **IL-6** (*interleukin 6*); **MCP-1** (*monocyte chemoattractant protein-1*) C-C motif chemokine ligand 2 CCL2; **Osteopontin** *secreted phosphoprotein 1* SPP1; **TIMP-1** (*tissue metalloproteinase inhibitor 1*); **TIMP-2** (*tissue metalloproteinase inhibitor 2*); **EGF** (*epidermal growth factor*); **IGFBP-1** (*insulin-like growth factor-binding protein 1*) placental protein 12 PP12; **IGFBP-2** (*insulin-like growth factor-binding protein 2*); **IGFBP-6** (*insulin-like growth factor-binding protein 6*); **IGF-1** (*insulin-like growth factor 1*) somatomedin C; **PDFGF-AA** (*platelet-derived growth factor AA*); **PDFGF-BB** (*platelet-derived growth factor BB*); **AREG** (*amphiregulin*)

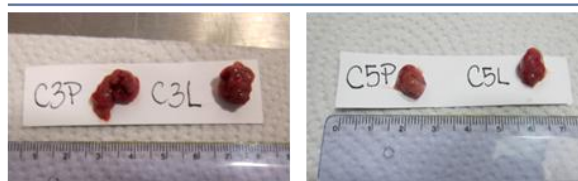
### A549



### ACaff



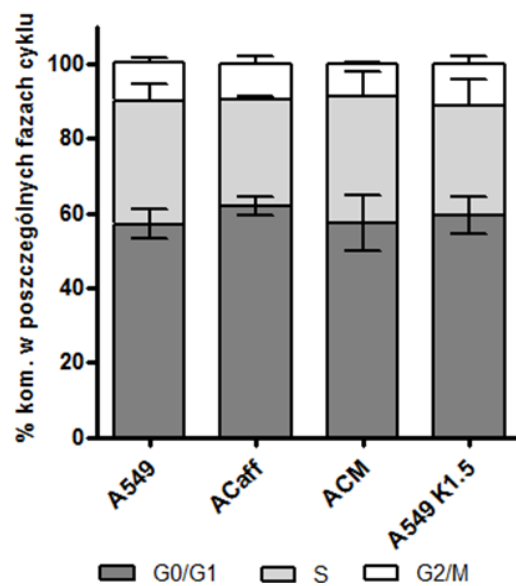
### ACM



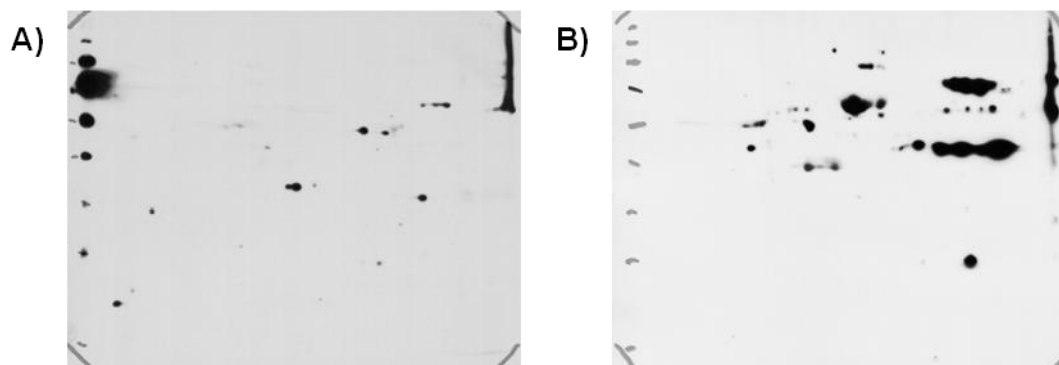
### A549 K1.5



**Supl. Rysunek 5** – Zdjęcia próbek guzów wyindukowanych przez badane komórki. Akwizycja zdjęć i próbek guzów linii A549 zrobiona została przez prof. Andrzeja Składanowskiego; Akwizycja zdjęć i próbek guzów linii ACaff, ACM oraz A549 K1.5 została wykonana przeze mnie.

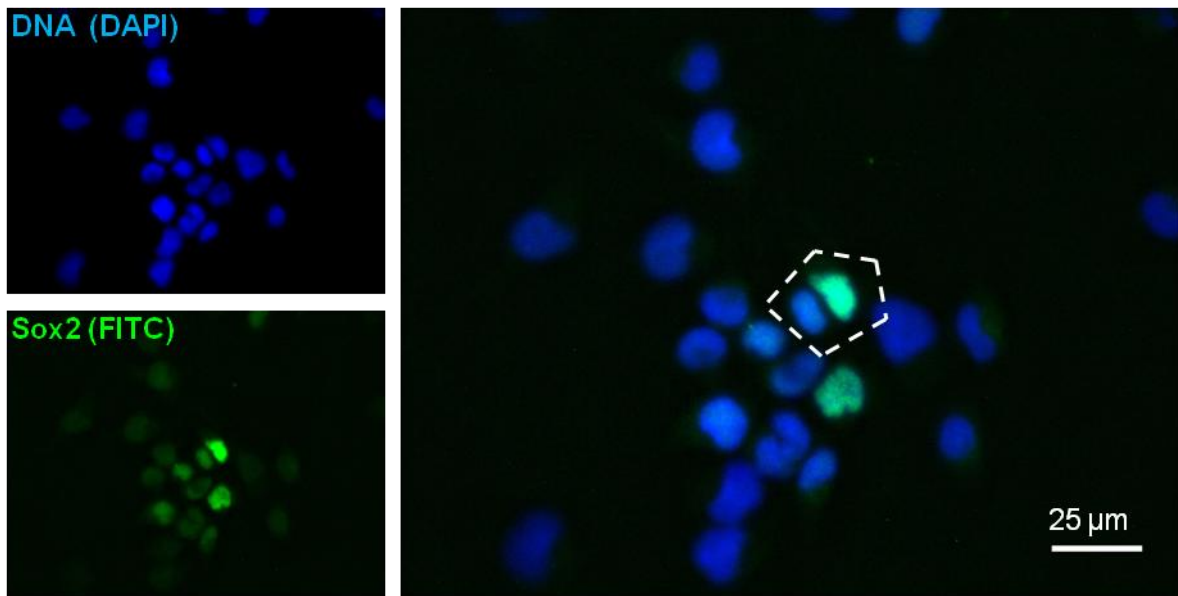


**Supl. Rysunek 6** – Dystrybucja komórek w cyklu komórkowym w badanych liniach

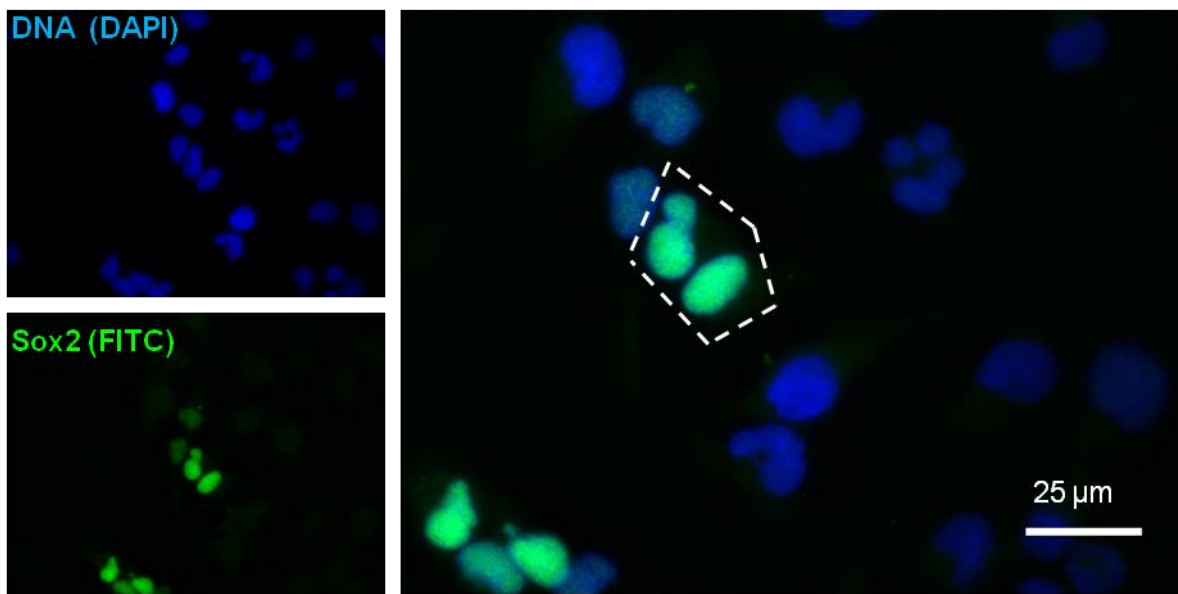


**Supl. Rysunek 7 – A)** detekcja p-Ser473-Akt z użyciem mysiego przeciwciała anti-p-S473-Akt, **B)** detekcja p-Thr308-Akt z użyciem króliczego przeciwciała anti-p-T308-Akt

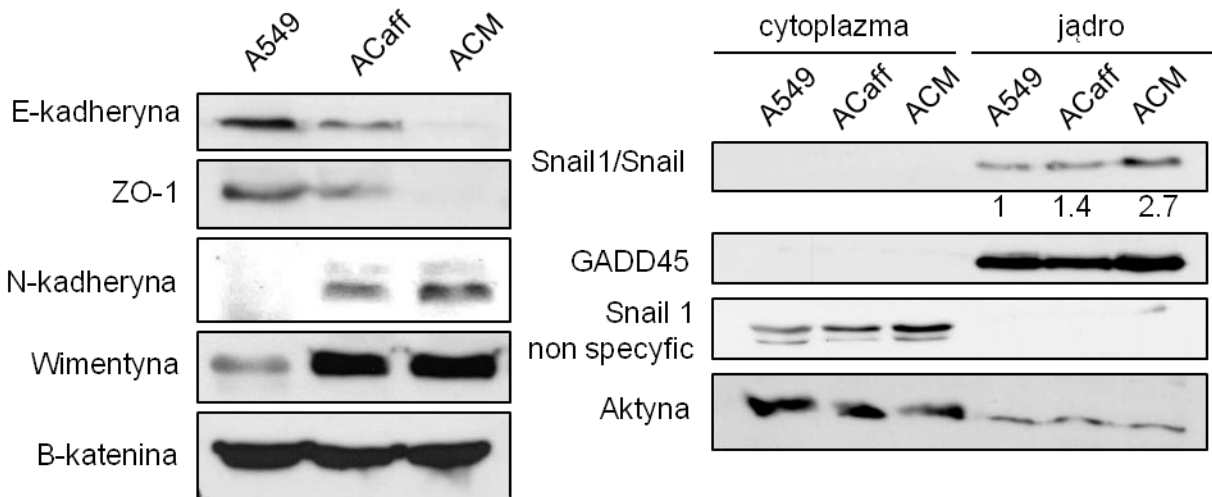
A) Ekspresja Sox2 w komórkach A549 po podziale niesymetrycznym



B) Ekspresja Sox2 w komórkach A549 po podziale symetrycznym



**Sup. Rysunek 8** – Symetryczny i niesymetryczny podział komórek A549 Sox2<sup>+</sup>. Wyniki uzyskane w całości przez mgr inż. Majusa Misiaka.



**Supl. Rysunek 9** - Oznaczenie ekspresji markerów tranzykcji epitelialno-mezenchymalnej w komórkach A549, ACaff i ACM. Wyniki uzyskane w całości przez mgr inż. Majusa Misiaka.



*Dziękuję Mojrom, za to że na mojej drodze postawiły  
życzliwych mi ludzi, którym w tym właśnie miejscu  
chcę serdecznie podziękować za wszystko co mi dali.*