

IDENTYFIKACJA I MOLEKULARNE CECHY KOMÓREK MACIERZYSTYCH GRUCZOŁU SUTKOWEGO*

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MAMMARY GLAND STEM CELLS

Marcin KOZŁOWSKI, Małgorzata GAJEWSKA, Tomasz MOTYL

Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Streszczenie: Komórki macierzyste to komórki mające możliwość samoodnowy i różnicowania we wszystkie typy komórek budujących w pełni funkcjonalny narząd. Prawidłowe funkcjonowanie komórek macierzystych i progenitorowych jest podstawą wzrostu, różnicowania i regeneracji nabłonka wydzielniczego podczas powtarzających się cykli ciąży, laktacji i involucji. Izolacja i charakterystyka komórek macierzystych gruczołu sutkowego jest kluczowym elementem zrozumienia procesów rozwoju, prawidłowego funkcjonowania, jak również powstawania nowotworów sutka. Opracowano kilka metod identyfikacji i charakterystyki komórek macierzystych i progenitorowych. Występowanie komórek macierzystych w gruczole sutkowym potwierdzono wykorzystując zarówno metody analizy ultrastrukturalnej *in situ*, jak i powszechnie stosowane systemy funkcjonalnej charakterystyki *in vitro* i *in vivo*. Najczęściej wykorzystywanymi wskaźnikami komórek macierzystych gruczołu sutkowego są białka powierzchniowe, takie jak: receptory integrynowe, Sca-1, CD24 i brak receptorów hormonów steroidowych. Niestety dotychczas nie udało się zidentyfikować markera charakterystycznego tylko i wyłącznie dla komórek macierzystych. Identyfikacja specyficznych białek wskaźnikowych pozwoli na sporządzenie molekularnego portretu transkryptomycznego komórek macierzystych gruczołu sutkowego i ustalenie kluczowych genów zaangażowanych w proces jego prawidłowego rozwoju.

Słowa kluczowe: gruczoł sutkowy, komórki macierzyste, rozwój, różnicowanie.

Summary: Stem cells are cells with a capacity to self-renew and to generate daughter cells that can differentiate into different cell lineages to form all the cell types that are found in the mature tissue. The activity of mammary stem cells and their mitotic progeny is fundamental to normal mammary growth, differentiation and regeneration in successive cycles of pregnancy, lactation and involution. The isolation and characterization of mammary stem cells is fundamental to understanding mammary gland development and tissue homeostasis as well as breast oncogenesis. Several complementary approaches have been employed to isolate, identify and enrich mammary epithelial cells that maintain stem/progenitor cell characteristics. *In situ* studies of mammary tissue identified potential mammary stem and progenitor cells at the ultrastructural and light microscopy levels at all stages of mammary development. Evidence for the

*Badania finansowane były ze środków projektu badawczego MNiSW nr: N311 2556 33.

existence of mammary stem and progenitor cells has also been provided by *in vitro* and *in vivo* studies. The most useful markers for isolating stem/progenitor cells are the combination of integrin receptors, stem cell antigen-1 (Sca-1), CD24 and lack of steroid hormone receptors, but neither of them are exclusive markers of mammary gland stem cells. The challenge now is to identify new markers, so that these cells can be purified in such a way that meaningful gene expression profiles can be obtained.

Key words: mammary gland, stem cells, development, differentiation.

WPROWADZENIE

Obecność somatycznych komórek macierzystych, charakteryzujących się możliwością samoodnowy, jak również różnicowania w inne typy komórek budujących dany narząd została potwierdzona w wielu tkankach m.in. mięśniach szkieletowych [36], tkance nerwowej [2] i gruczole sutkowym [48].

Gruczoł sutkowy zaczyna się różnicować z ektodermy już we wczesnych stadiach życia embrionalnego, przy czym dalszy proces jego rozwoju wykazuje pewne różnice gatunkowe [8]. Pełnemu rozwojowi ulega dopiero pod wpływem działania hormonów steroidowych w okresie ciąży, po której nastaje okres laktacji. Następujące po sobie wielokrotnie podczas życia cykle ciąży, laktacji i involucji sugerują, iż w gruczole sutkowym istnieje populacja nieodróżnionych komórek macierzystych. Pozwalają one na wzrost gruczołu w czasie dorastania, silny rozwój i przebudowę w okresie ciąży, laktacji i regeneracyjnej involucji, a także biorą udział w procesie odnowy uszkodzonych tkanek [27].

Pierwsze dowody na istnienie komórek macierzystych w gruczole sutkowym dostarczyły badania z lat 50. ub. wieku, kiedy to DeOme i współpracownicy [19] zaobserwowali, iż fragmenty tkanki nabłonkowej pobrane z dowolnego regionu gruczołu sutkowego myszy dawcy, przeszczepione do poduszczek tłuszczowych myszy biorcy, pozbawionej jej własnej tkanki nabłonkowej, rozwijają się w normalny, zawierający przewody, pęcherzyki i komórki mięśniowo-nabłonkowe gruczoł sutkowy. Kolejne doświadczenia z użyciem techniki przeszczepienia wykazały, iż komórki macierzyste są obecne w gruczole sutkowym na każdym etapie jego rozwoju i przez całą długość życia myszy [41]. Kordon i Smith [28] przy użyciu komórek nabłonka gruczołu sutkowego znakowanych wirusem MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*) potwierdzili, iż pojedyncza komórka macierzysta przeszczepiona do beznabłonkowych poduszczek tłuszczowych myszy biorcy jest zdolna do wytworzenia kompletnego, funkcjonalnego gruczołu sutkowego.

Długi okres życia, a tym samym zwiększona ekspozycja na czynniki kancerogenne, połączone z ogromnym potencjałem proliferacyjnym zdecydowały, iż komórki macierzyste postrzegane są jako potencjalne miejsce początku transformacji nowotworowej [1, 22, 49]. Ogromna wartość poznawcza dla biologii rozwoju i patologii gruczołu sutkowego kobiet spowodowały, że izolacja i charakterystyka komórek macierzystych stały się głównym celem prac wielu badaczy. Ponadto identyfikacja komórek macierzystych w gruczole sutkowym zwierząt gospodarskich, takich jak bydło mleczne, uczyniły z nich potencjalne narzędzie do sterowania rozwojem tego narządu w kierunku zwiększenia wydajności produkcji, a tym samym rozwoju przemysłu związanego z przetwórstwem mleka.

WSKAŹNIKI ZRÓŻNICOWANIA KOMÓREK NABŁONKA GRUCZOŁU SUTKOWEGO

Gruczoł sutkowy u dorosłych osobników ma budowę zrazikowo-pęcherzykową, na którą składa się silnie rozgałęziona sieć przewodów mlekonosnych zakończonych pęcherzykami wydzielniczymi. Światło przewodów i pęcherzyków wysłane jest warstwą komórek nabłonkowych, te z kolei otoczone są komórkami mięśniowo-nabłonkowymi, mającymi kontakt z błoną podstawną [51].

Nabłonek gruczołu sutkowego człowieka został zbadany pod kątem ekspresji wielu białek. Wykazano, iż SMA (ang. *smooth muscle actin*), keratyna 14 (K14), CD10 (CALLA), CD49f (integryna- α 6), CD44v6 i wimentyna są zlokalizowane głównie w komórkach mięśniowo-nabłonkowych [45]. Wyjątkiem jest K14, której niski poziom ekspresji mogą wykazywać również komórki wyściełające światło dużych przewodów mlekonosnych i wimentyna, zlokalizowana w fibroblastach tkanki zrębowej. Markerami służącymi do wykrycia komórek nabłonkowych wyściełających światło przewodów mlekonosnych są keratyny: K18 i K19, CD24 [25], CD133 [18, 39] i MUC1 [47]. Ponadto stwierdzono występowanie białka EpCAM (ang. *epithelial cell adhesion molecule*) znanego również jako ESA (ang. *Epithelial Specific Antigen*) jako charakterystyczne dla komórek nabłonkowych światła przewodów, podczas gdy brak jego ekspresji w komórkach mioepitelialnych.

U myszy identyfikacja komórek mioepitelialnych i nabłonkowych światła przewodów odbywa się głównie za pomocą charakterystyki ekspresji odpowiednio K14 i K18. Zespół Sleemana [38] opracował bardzo prostą metodę separacji komórek nabłonkowych światła kanalików, komórek mioepitelialnych i komórek niemających pochodzenia nabłonkowego na podstawie ekspresji CD24. W gruczole sutkowym myszy zidentyfikowano 3 populacje komórek różniących się poziomem CD24. Dalsza analiza z wykorzystaniem przeciwciał specyficznych dla K8/18 i K14 wykazała, iż: komórki o wysokim poziomie ekspresji CD24 (CD24^{high}) mają charakter nabłonka wyściełającego światło kanalików, komórki z niskim poziomem CD24 (CD24^{low}) to komórki mioepitelialne, natomiast brak ekspresji CD24 jest typowy dla komórek niemających charakteru nabłonkowego.

IDENTYFIKACJA KOMÓREK MACIERZYSTYCH W GRUCZOLE SUTKOWYM

Morfologiczne cechy komórek macierzystych

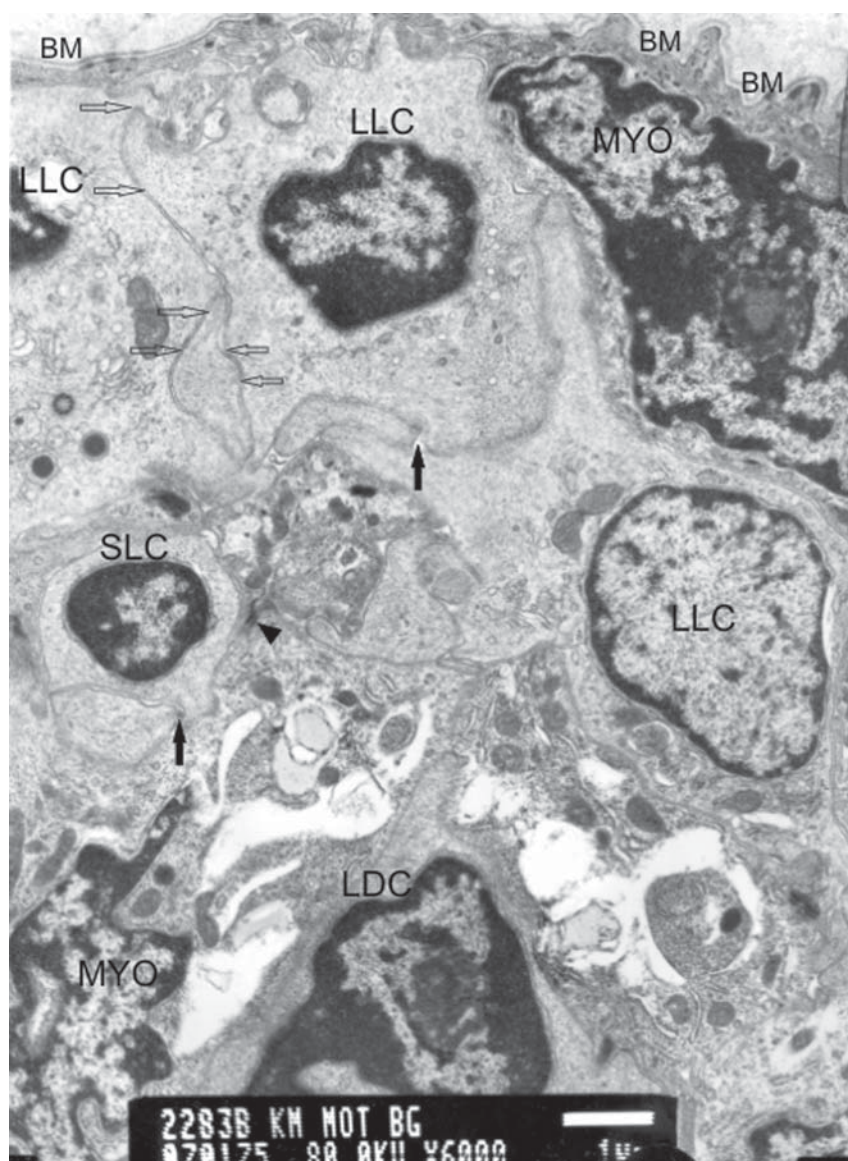
Poszukiwanie komórek macierzystych w gruczole sutkowym rozpoczęto od analizy morfologicznej tkanki nabłonkowej na różnych etapach rozwoju [12, 13]. Na podstawie analizy ultrastrukturalnej gruczołu sutkowego myszy i szczurów zaproponowano, iż komórki małe, o jasno wybarwionej cytoplazmie – SLC (*small light cell*) niewykazujące cech specjalizacji, mające duży stosunek wielkości jądra komórko-

wego do cytoplazmy, mogą być multipotencjalnymi komórkami macierzystymi. Teza ta postawiona została na podstawie ich budowy cytologicznej (brak ziarnistości na terenie cytoplazmy), rozmieszczenia przestrzennego (brak kontaktu ze światłem przewodów) i częstości występowania względem zlokalizowanych w tkance mięszonej: a) niezróżnicowanych, dużych, jasnych komórek – LLC (*large light cell*) uważanych za komórki progenitorowe; b) dużych, ciemnych komórek – LDC (*large dark cell*) odpowiadających morfologicznie w pełni funkcjonalnym komórkom nabłonkowym światła przewodów; c) komórek mięśniowo-nabłonkowych [42]. Zaproponowano, iż SLC, jako najbardziej pierwotne dają początek komórkom progenitorowym – LLC, te z kolei w wyniku wielokrotnych podziałów i różnicowania przekształcają się w LDC lub komórki mięśniowo-nabłonkowe. Komórki SLC tworzą najmniejszą populację, stanowiącą ok. 3% wszystkich komórek nabłonkowych gruczołu sutkowego, podczas gdy liczba LLC i LDC jest większa i wynosi odpowiednio 5 i 70–75%. Ponadto SLC występują pojedynczo lub tworzą pary homogenne lub heterogenne z LLC. Występowanie zróżnicowanych par sugeruje, iż SLC mogą ulegać charakterystycznym dla komórek macierzystych dwóm typom podziałów. Symetrycznemu, podczas którego dochodzi do wytworzenia dwóch identycznych komórek macierzystych, oraz asymetrycznemu, w wyniku którego powstaje komórka macierzysta (SLC) i ulegająca dalszemu różnicowaniu komórka progenitorowa (LLC) [28]. Podobny wzór rozwoju ultrastruktury komórek nabłonkowych stwierdzono w gruczole sutkowym bydła mlecznego (ryc. 1). Analiza histologiczna nabłonka gruczołu sutkowego bydła wykazała, że podczas rozwoju dochodzi do spadku liczebności komórek jasnych i wzrostu liczebności zróżnicowanych komórek ciemnych. Podobny efekt wywołuje obecność hormonów laktogennych, co dodatkowo potwierdza pierwotny charakter SLC [14, 24].

LRC – komórki zachowujące znacznik

W celu identyfikacji komórek macierzystych gruczołu sutkowego, podjęto próby adaptacji metody opisanej w badaniach komórek macierzystych naskórka, jelita i komórek satelitowych mięśni [31, 32]. Opiera się ona na inkorporacji znakowej H3-tymidyny bądź jej analogu BrdU do nowosyntetyzowanego DNA, a następnie badaniu czasu utrzymywania wyznakowanej matrycy w komórce. W związku z tym, iż komórki macierzyste postrzegano jako wyciszone, znajdujące się poza cyklem komórkowym, wykazujące niską aktywność proliferacyjną w porównaniu z resztą komórek, wyznakowanie na wczesnych etapach rozwoju DNA powinno być w nich utrzymywane przez długi czas. Komórki wykazujące taką właściwość określono mianem LRC (ang. *label retaining cell*).

W gruczole sutkowym myszy w wieku 3–8 tygodni dochodzi do silnej proliferacji komórek, będącej podstawą procesu morfogenezy przewodów mlekośnych. Strefy silnego wzrostu zlokalizowane są na zakończeniach powstających przewodów –TEB (*terminal end buds*), a komórki je budujące dają początek komórkom nabłonkowym, jak i mięśniowo-nabłonkowym. Welm i współpracownicy [50] przeprowadzili eksperyment, w którym myszom w wieku 3 tygodni podawano przez okres 14 dni



RYCINA 1. Zdjęcie z mikroskopu elektronowego przedstawiające fragment tkanki gruczołu sutkowego dwuletniej jałowki. Wśród dużych, jasnych (LLC), dużych, ciemnych komórek (LDC) i komórek mięśniowo-nabłonkowych (MYO), wykazujących oznaki specjalizacji pojawiają się małe, jasne komórki (SLC). Ze względu na duże jądro komórkowe, słabo wykształcony aparat cytoplazmatyczny, nieliczne połączenia punktowe (strzałki pełne) i odcinkowe (strzałki puste) typu *gap junction* oraz występowanie w części przypodstawnej przewodów mlekoosnych, komórki te uważane są za niezróżnicowane komórki macierzyste/progenitorowe; BM wskazuje na lokalizację błony podstawnej

FIGURE 1. Electron microscopy image of 2 years old heifer's mammary tissue. Image represents: LLC – large light cell, LDC – large dark cell, MYO – myoepithelial cells, SLC – small light cell. Large nucleus, cytoplasm with no structural evidence of specialized functions, basal localization, occasional tight junctions (black arrows), and gap junctions (open arrows) suggest that SLC may represent undifferentiated population of stem/progenitor cells; BM indicates the localization of basement membrane

BrdU, a skuteczność inkorporacji monitorowana była przez kolejne 9 tygodni. W momencie zakończenia podawania znacznika ok. 70% komórek nabłonkowych wykazywało jego obecność, niemniej jednak na skutek dalszych podziałów wyznakowany materiał genetyczny ulegał „rozcieńczeniu”. 9 tygodni później, kiedy to proces morfogenezy był zakończony, tylko ok. 5% komórek utrzymywało wyznakowane DNA. Ze względu na niską aktywność proliferacyjną, wyciszony charakter i obecność na wszystkich etapach rozwoju gruczołu sutkowego uznano, iż populacja ta może zawierać niezróżnicowane komórki macierzyste.

Smith [43] stosując metodę podwójnego znakowania komórek gruczołu sutkowego przy wykorzystaniu BrdU i H3T wykazał, iż wśród LRC są komórki proliferujące, a utrzymywanie znakowanej matrycy odbywa się nie tylko drogą wyjścia z cyklu komórkowego, ale również przez podział asymetryczny. Podczas tego procesu wyznakowane BrdU-DNA matrycowe utrzymywane jest w komórce, a nowo powstałe, znakowane H3T-DNA, przekazywane jest komórkom potomnym. Przyjmuje się, iż proces selektywnej segregacji materiału genetycznego ma chronić komórki macierzyste występujące w tkance od mutacji, zmniejszając w ten sposób ryzyko transformacji nowotworowej. Próby przeszczepienia komórek nabłonka gruczołu sutkowego wykazujących stałą ekspresję lacZ udowodniły, iż LRC zlokalizowane w odrastającej tkance ulegają zarówno asymetrycznym podziałom, jak i samoodnowie, co jest cechą przypisywaną komórkom macierzystym. Ostatnie badania wykazały, że komórki te są również obecne w gruczole sutkowym w okresie ciąży, kiedy to dochodzi do silnego rozwoju pęcherzyków wydzielniczych [5]. Część komórek LRC występujących w przestrzeni okołoprzewodowej i okołopęcherzykowej, nie ma białek charakterystycznych dla komórek endotelialnych (CD31), mezenchymalnych (SMA, desmina), jak również nabłonkowych (cytokeratyny, receptorów estrogenowych – ER lub progesteronowych – PR). Postuluje się, iż w miejscach występowania LRC, w okresie ciąży może dochodzić do rozgałęziania przewodów lub tworzenia nowych pęcherzyków wydzielniczych.

Pierwotny charakter LRC zidentyfikowanych w gruczole sutkowym człowieka potwierdza również zwiększona w porównaniu z resztą komórek nabłonkowych ekspresja domniemanych markerów komórek macierzystych CDKI p21^{WAF1/CIP1} i Msi 1 [14, 15, 16].

Przedstawione dane potwierdzają, iż w obrębie populacji LRC mogą znajdować się komórki wykazujące cechy komórek macierzystych/progenitorowych, niemniej jednak analiza wzoru ekspresji receptorów steroidowych [9, 17] i białek charakterystycznych dla komórek zróżnicowanych [50] wskazuje na jej niejednorodność.

FUNKCJONALNA CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Ultrastrukturalna analiza budowy gruczołu sutkowego wykazała obecność komórek morfologicznie niezróżnicowanych, natomiast występowanie LRC dowiodło istnienia populacji o niskiej aktywności podziałowej lub dzielącej się asymetrycznie.

Wykorzystanie opisanych metod nie pozwala jednak na przeprowadzenie funkcjonalnej charakterystyki wytypowanych populacji. Konieczne stało się opracowanie technik badawczych umożliwiających potwierdzenie, czy wskazane komórki mają podstawowe właściwości charakterystyczne dla komórek macierzystych, takie jak możliwość samoodnowy i przekształcania w różne typy komórek budujących gruczoł sutkowy. Rozwój technik cytometrycznych, połączonych z możliwością wysokorozdzielczej separacji poszczególnych populacji komórek na podstawie ekspresji wybranych markerów, znacznie usprawnił charakterystykę komórek macierzystych gruczołu sutkowego. Pierwotny charakter wyizolowanych grup komórek może zostać zweryfikowany przy wykorzystaniu metod hodowli *in vitro*, jak i systemów *in vivo*.

Metody identyfikacji komórek macierzystych *in vitro*

Jednym ze sposobów identyfikacji komórek macierzystych w gruczole sutkowym jest zbadanie zdolności pojedynczej komórki do tworzenia zróżnicowanych kolonii – CFC (*colony forming cell*). Zawiesina pojedynczych komórek, uzyskana za pomocą mechanicznej i enzymatycznej dysocjacji pobranej tkanki, wysiewana jest w małym zagęszczeniu umożliwiającym ich klonalny wzrost. Hodowle mają charakter adherentny, a naczynia hodowlane pokryte mogą być odżywczą warstwą fibroblastów poddanych działaniu promieniowania [17, 37], pokryte żelem kolagenowym [21] lub wyciągiem białek macierzy zewnątrzkomórkowej – Matrigel [37]. Uzyskane kolonie analizuje się metodą immunohistochemiczną wykorzystując ekspresję opisanych powyżej białek, co pozwala odróżnić poszczególne typy komórek budujących gruczoł. Powstawanie kolonii składających się z komórek o profilu nabłonkowym i mięśniowo-nabłonkowym potwierdza multipotencjalny charakter wyjściowej komórki.

Opierając się na badaniach komórek macierzystych układu nerwowego [7] Dontu i wsp. [21] opracowali inną metodę hodowli pozwalającą na funkcjonalną charakterystykę komórek nabłonka gruczołu sutkowego w warunkach laboratoryjnych. Większość komórek nabłonkowych utrzymywanych w hodowli uniemożliwiającej adhezję ulega wywołanej brakiem kontaktu z macierzą zewnątrzkomórkową apoptozie, określanej mianem *anoikis*. Wśród komórek wyizolowanych z gruczołu sutkowego człowieka wykazano obecność małej populacji komórek przeżywających, tworzących kuliste struktury zwane mammosferami. Enzymatyczna dysocjacja mammosfer i ponowna hodowla uzyskanych komórek w warunkach nieadherentnych wykazały utrzymywanie się potencjału do tworzenia mammosfer ze stałą wydajnością przez kolejne 5 powtórzeń eksperymentu. Ponadto część wytworzonych struktur zbudowana była z komórek nabłonkowych i mięśniowo-nabłonkowych. Obserwacje te potwierdzają zdolność komórek tworzących mammosfery do samoodnowy i różnicowania. Hodowla nieadherentna w warunkach umożliwiających wzrost klonalny potwierdziła istnienie pojedynczych komórek zdolnych do tworzenia mammosfer i wykluczyła udział reagregacji w procesie ich powstawania. O ile model ten z powodzeniem wykorzystywany może być do izolacji komórek macierzystych nabłonka gruczołu sutkowego człowieka, ostatnie prace potwierdzają, że u myszy większość mammosfer powstaje na skutek łączenia się pojedynczych komórek [29].

Metody identyfikacji komórek macierzystych *in vivo*

U 3-tygodniowych myszy nabłonek gruczołowy skupiony jest w okolicy brodawki sutka, nie wykraczając swoim zasięgiem poza węzeł chłonny [34]. Traktując węzeł chłonny jako stały anatomiczny punkt odniesienia tkanka znajdująca się w obszarze między brodawką sutkową a węzłem chłonnym może zostać oczyszczona z komórek nabłonkowych. Tak przygotowane poduszeczki tłuszczowe są doskonałym modelem do przeprowadzania eksperymentów przeszczepieniowych. Wszczepienie świeżo wyizolowanych komórek nabłonkowych powoduje odbudowę sieci przewodów, budowanych zarówno przez komórki nabłonkowe wyściełające światło przewodu, jak i otaczającą je warstwę komórek mięśniowo-nabłonkowych. Podczas ciąży przeszczepione komórki tworzą struktury pęcherzykowate podobne do tych w warunkach naturalnych, a jedyną różnicą jest brak połączenia powstających struktur z brodawką sutkową. Zakłada się, iż wyselekcjonowana za pomocą różnych markerów populacja komórek, zawierająca potencjalne komórki macierzyste powinna regenerować tkankę ze znacznie większą wydajnością niż mieszanina niesegregowana. Ponadto powstawanie odrostów powinno zachodzić przy przeszczepieniu mniejszej liczby komórek. Najnowsze prace wykorzystujące metodę przeszczepiania udowadniają, że pojedyncza komórka wyselekcjonowana przy wykorzystaniu odpowiednich markerów jest zdolna do wytworzenia w pełni funkcjonalnego nabłonka wydzielniczego [37, 46].

MOLEKULARNE CECHY KOMÓREK MACIERZYSTYCH GRUCZOŁU SUTKOWEGO

Populacja boczna

Cechą charakterystyczną krwiotwórczych komórek macierzystych jest ich oporność na barwienie przy wykorzystaniu barwników fluorescencyjnych, takich jak Hoechst 33342 [10]. Hoechst 33342 jest barwnikiem wiążącym rejon DNA bogate w pary nukleotydów AT, mającym dwa szczyty emisji w zakresie światła czerwonego i niebieskiego. Cecha ta pozwala na identyfikację przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej populacji komórek, których poziom fluorescencji po barwieniu Hoechstem 33342 jest bardzo niski. Populacja ta w literaturze określania jest mianem populacji bocznej – SP (*Side Population*). Fenotyp SP komórki zawdzięczają obecności pomp transbłonowych, należących do rodziny białek wiążących ATP, takich jak MDR1 i BCRP1. Aktywność tych białek może być zablokowana przez specyficzne inhibitory, takie jak varapamil czy cyklosporyna A [20], których zastosowanie powoduje utratę fenotypu SP. Populacja komórek SP nie jest charakterystyczna wyłącznie dla macierzystych komórek krwiotwórczych, a jej obecność opisano w mięśniach szkieletowych, płucach, wątrobie, sercu, jądrach, nerkach, skórze, mózgu i gruczole sutkowym.

Komórki mające fenotyp SP stanowią od 0,5 do 2–3% wszystkich komórek budujących gruczoł sutkowy myszy [3, 16, 40, 50], podczas gdy u człowieka liczba

ta szacowana jest na 0,2–5% [3, 14, 16, 17, 21]. Badania naszego zespołu wykazały również obecność komórek SP w gruczole sutkowym bydła mlecznego na poziomie 0,48% (dane niepublikowane). Różnice w wielkości populacji wynikają m.in. z tego, iż znakowanie komórek Hoechstem jest procesem dynamicznym, a warunki inkubacji mogą znacząco wpływać na uzyskany wynik. Również metodyka stosowana przez badaczy nie jest jednolita. Badania, w których odnotowano największy procent komórek SP (5%), prowadzone były na populacji komórek wyselekcjonowanej na podstawie ekspresji specyficznego dla komórek nabłonkowych markera BER-EP4. Sugeruje to, iż komórki wykazujące niski poziom ekspresji tego markera mogły zostać pominięte w przeprowadzonej analizie, co zawiżyło uzyskany wynik. Z kolei wynik przedstawiony przez Alvi i wsp. [3] został zaniżony ze względu na obecność komórek krwiotwórczych, wykazujących ekspresję markera CD45. Stanowiły one odpowiednio 5% populacji SP i aż 40% populacji komórek niewykazujących fenotypu SP.

Populacja komórek SP została zbadana pod kątem obecności markerów charakterystycznych dla zróżnicowanych komórek przez dwie grupy badaczy [14, 17]. Ekspresje wybranych genów określono przy wykorzystaniu QRT-PCR, natomiast syntezę białek potwierdzono wykorzystując specyficzne przeciwciała. Prawie 70% komórek SP pochodzących z gruczołu sutkowego człowieka nie wykazuje ekspresji markerów zróżnicowania charakterystycznych dla nabłonkowych komórek wydzielniczych (EMA) i komórek mięśniowo-nabłonkowych – (CALLA), podczas gdy reszta komórek wykazywała obecność jednego bądź drugiego białka. Hodowla SP *in vitro* wykazała, iż mają one znacznie większy potencjał proliferacyjny niż reszta komórek. Ponadto pojedyncza komórka SP jest w stanie tworzyć kolonie, w skład których wchodzi komórki wykazujące ekspresję keratyn K14, K18 lub obu tych białek jednocześnie, podczas gdy komórki niewykazujące fenotypu SP dają początek głównie koloniom K14. Wyniki te potwierdzają występowanie w obrębie populacji SP komórek niezróżnicowanych, dających w hodowli początek innym typom komórek budujących gruczoł sutkowy. Potwierdzono również występowanie SP wśród komórek budujących mammosfery, niemniej jednak istnieją rozbieżności dotyczące liczebności tej populacji [20, 21].

Receptory integrynowe

Wskaźnikami najczęściej wykorzystywanymi w celu identyfikacji komórek macierzystych i progenitorowych gruczołu sutkowego myszy są: CD24, CD29 (integryna β 1), CD49f (integryna α 6), CD61 (integryna β 3). Niestety żadne z tych białek nie jest charakterystyczne wyłącznie dla populacji komórek pierwotnych, niemniej jednak zastosowanie wymienionych znaczników w różnych kombinacjach okazało się bardzo efektywne.

Ostatnie doniesienia Shackletona i wsp. [37] i Stingla i wsp. [46] udowadniają, że największy potencjał regeneracji tkanki w czasie transplantacji wykazują komórki mające wysoki poziom receptora integrynowego CD29, jak również obecność CD24 (CD24^{low}CD29^{high}). CD29 opisywany jest również jako wskaźnik komórek

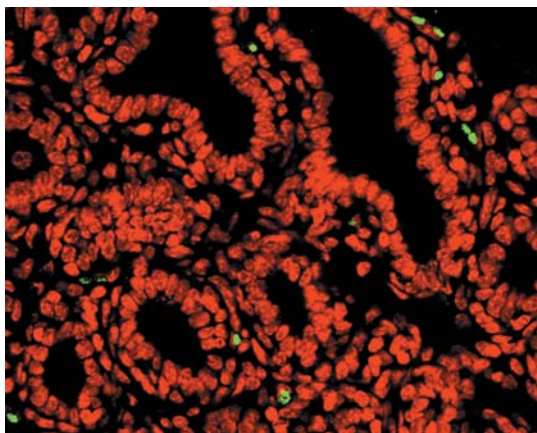
macierzystych skóry [26], podczas gdy CD24 wykorzystywano do izolacji tych komórek z tkanki nerwowej [35]. Duża populacja opisanych komórek wykazywała również wysoki poziom ekspresji CD49f, a obecność tego białka stwierdzono również na powierzchni komórek tworzących mammosfery [29]. Wysoki poziom ekspresji receptorów integrynowych, jak również niski poziom CD24 wskazują na przypodstawną lokalizację komórek w tkance, a więc miejsce występowania niezróżnicowanych morfologicznie komórek SLC.

Hodowle *in vitro* potwierdziły pierwotny charakter komórek CD24^{low}CD29^{high}. Miały one największy potencjał do tworzenia kolonii, a na Matrigelu dawały początek zarówno komórkom wykazującym nabłonkowy, jak i mioepitelialny charakter, podczas gdy komórki CD24^{low}CD29^{low} dawały początek tylko koloniom o profilu nabłonkowym. Dalsze badania potwierdziły występowanie w gruczole sutkowym co najmniej dwóch populacji komórek progenitorowych [4, 37, 39, 47]: CD24^{high}CD29^{low}CD49f⁺CD14⁺CD61⁺ – dających początek koloniom zbudowanym z luminalnych komórek nabłonkowych i CD24^{low}CD29^{high}CD49f^{high} – tworzących kolonie komórek mioepitelialnych. Komórki CD24^{high}CD29^{low}CD49f⁺CD14⁺CD61⁺ nie mają zdolności tworzenia kolonii *in vitro* [39, 46].

W gruczole sutkowym człowieka komórki macierzyste/progenitorowe identyfikuje się przy wykorzystaniu markerów EpCAM, MUC1 i CD49f. Największą efektywność transplantacji zaobserwowano podczas przeszczepienia komórek o fenotypie EpCAM^{low}CD49f^{high}MUC1⁻. W trakcie analizy wzrostu klonalnego grupa ta wykazuje bipotencjalny charakter, podczas gdy komórki EpCAM^{high}CD49f⁺MUC1⁺ dają początek wyłącznie komórkom nabłonkowym [23, 33, 45].

Sca-1

W gruczole sutkowym myszy zidentyfikowano populacje komórek mających na swojej powierzchni białko charakterystyczne dla macierzystych komórek krwiotwórczych Sca-1 (ang. *Stem cell antigen-1*) [3, 11]. Analiza immunohistochemiczna nabłonka gruczołu sutkowego wykazała, że największy poziom tego białka obserwuje się w zakończeniach rozwijających się przewodów mlekośnych. Jest to strefa silnego wzrostu, w której niezróżnicowane komórki przekształcają się zarówno w



RYCINA 2. Identyfikacja komórek wykazujących ekspresję Sca-1⁺ w gruczole sutkowym bydła. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający komórki Sca-1⁺ (kolor zielony) zlokalizowane w części przypodstawnej gruczołu, niemające kontaktu ze światłem przewodów mlekośnych; jądra wybarwiono 7-AAD (kolor czerwony)

FIGURE 2. Identification of Sca-1⁺ cells in bovine mammary gland. Confocal image of Sca-1⁺ cells (green fluorescence) localized in basal part of mammary tissue, without contact with ductal lumen; nuclei were stained with 7-AAD (red fluorescence)

komórki nabłonkowe, jak i mioepitelialne. W populacji komórek wykazujących ekspresję tego markera stwierdzono także występowanie komórek LRC, część z nich wykazuje fenotyp SP. Ponadto odseparowane przy wykorzystaniu cytometrii przepływowej komórki Sca-1⁺, dawały pozytywny wynik w eksperymentach przeszczepieniowych, czego nie zaobserwowano w przypadku populacji Sca-1⁻ [3, 50]. Obserwacji tych nie potwierdzają badania Shackletona [37], w których to komórki wykazujące ekspresję Sca-1, nie miały zdolności regeneracji tkanki nabłonkowej. Ponadto inna grupa badaczy wykazała obecność tego białka zarówno w części zróżnicowanych komórek nabłonkowych, jak i w populacji niewykazującej pochodzenia nabłonkowego [39].

Wzór ekspresji Sca-1 w gruczole sutkowym może wykazywać pewne różnice gatunkowe. U myszy ok. 20% komórek gruczolu sutkowego wykazuje ekspresję Sca-1 [50]. Zlokalizowane są one głównie w części komórek mających kontakt ze światłem przewodów [39]. Nasz zespół wykazał, iż w gruczole sutkowym bydła mlecznego tylko 0,5–3% komórek wykazuje ekspresję Sca-1. Ponadto zlokalizowane są one w okolicy błony podstawnej, nie mając kontaktu z światłem przewodów mlekoносnych (ryc. 2), a pierwsze wyniki analizy transkryptomicznej wskazują na to, iż wśród komórek Sca-1⁺ mogą znajdować się komórki macierzyste/progenitorowe.

Receptory hormonów steroidowych

Działanie hormonów steroidowych jest kluczowe dla prawidłowego rozwoju gruczolu sutkowego w okresie dojrzewania, jak również odgrywają one istotną rolę w procesie nowotworzenia [44, 52]. Tylko niewielka część komórek macierzystych/progenitorowych w rozwijającej się i dorosłej tkance mięszonej gruczolu sutkowego wykazuje ekspresję receptorów, a ich rola jest dyskusyjna. Niektórzy badacze twierdzą, iż część komórek macierzystych wykazuje ekspresję receptora estrogenowego i może być bezpośrednio stymulowana hormonalnie [6, 14]. Pojawiają się również prace sugerujące, iż komórki ER⁺ są zróżnicowane i mają możliwość regulacji potencjału proliferacyjnego komórek macierzystych w drodze parakrynej [30].

Wykorzystując metody analizy funkcjonalnej stwierdzono, iż komórki wykazujące ekspresję receptora (ER⁺) mają obniżoną zdolności tworzenia kolonii *in vitro* w porównaniu z komórkami ER⁻ [39]. Ponadto obecność tego białka wykazują komórki wyściełające światło przewodów, natomiast w zlokalizowanych w części przypodstawnej komórkach macierzystych gruczolu sutkowego myszy nie stwierdzono jego występowania [4]. Niemniej jednak część komórek LRC w gruczole sutkowym myszy, człowieka i bydła mlecznego [9] ma charakter ER⁺, co sugeruje, iż mogą to być komórki progenitorowe znajdujące się na późniejszych etapach rozwoju.

PODSUMOWANIE

Identyfikacja i charakterystyka komórek macierzystych gruczolu sutkowego jest istotnym elementem pełnego zrozumienia procesu rozwoju i prawidłowego funkcjonowania tego

narządu. Duży postęp w metodyce badań, pozwolił na wyselekcjonowanie zestawu potencjalnych markerów typowych dla komórek macierzystych i progenitorowych, niemniej jednak dotychczas nie udało się zidentyfikować jednego wskaźnika umożliwiającego selektywną izolację komórek najbardziej pierwotnych. W przyszłości opracowanie metody wybiórczej separacji komórek macierzystych/progenitorowych pozwoli na sporządzenie profilu transkryptomowego tych populacji. Opracowanie molekularnego portretu komórek na różnym etapie różnicowania ułatwi identyfikację kluczowych w rozwoju genów. W związku z tym, iż komórki macierzyste są potencjalnym miejscem transformacji nowotworowej, poznanie mechanizmów regulujących ich rozwój pozwoli na opracowanie nowych, skuteczniejszych strategii zapobiegania i leczenia tej choroby. Ponadto charakterystyka komórek macierzystych gruczołu sutkowego zwierząt użytkowych, takich jak bydło mleczne, ułatwi stworzenie narzędzi sterowania rozwojem i przebudową tkanki w kierunku zwiększenia wydajności produkcji.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy pracy pragną serdecznie podziękować prof. dr hab. Barbarze Gajkowskiej z Zakładu Ultrastruktury Komórki, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN i dr Joannie Bierle z Katedry Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW za wykonanie i udostępnienie zdjęć z mikroskopu elektronowego i konfokalnego. Badania finansowane były ze środków projektu badawczego MNiSW nr: N311 2556 33.

LITERATURA

- [1] AL-HAJJ M, WICHA MS, BENITO-HERNANDEZ A, MORRISON SJ, CLARKE MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 3983–3988.
- [2] ALVAREZ-BUYLLA A, SERI B, DOETSCH F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull* 2002; **57**(6): 751–758.
- [3] ALVIAJ, CLAYTON H, JOSHI C, ENVER T, ASHWORTH A, VIVANCO MM, DALE TC, SMALLEY MJ. Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast Cancer Res* 2003; **5**(1): R1–8.
- [4] ASSELIN-LABAT ML, SHACKLETON M, STINGL J, VAILLANT F, FORREST NC, EAVES CJ, VISVADER JE, LINDEMAN GJ. Steroid hormone receptor status of mouse mammary stem cells. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**(14): 948–951.
- [5] BOOTH BW, BOULANGER CA, SMITH GH. Selective segregation of DNA strands persists in long-label-retaining mammary cells during pregnancy. *Breast Cancer Res* 2008; **10**(5): R90.
- [6] BOOTH BW, SMITH GH. Estrogen receptor-alpha and progesterone receptor are expressed in label-retaining mammary epithelial cells that divide asymmetrically and retain their template DNA strands. *Breast Cancer Res* 2006; **8**(4): R49.
- [7] CALDWELL MA, HE X, WILKIE N, POLLACK S, MARSHALL G, WAFFORD KA, SVENDSEN CN. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol* 2001; **19**(5): 475–479.
- [8] CAPUCO AV, ELLIS S. Bovine mammary progenitor cells: current concepts and future directions. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; **10**(1): 5–15.
- [9] CAPUCO AV. Identification of putative bovine mammary epithelial stem cells by their retention of labeled DNA strands. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; **232** (10): 1381–1390.
- [10] CHALLEN GA, LITTLE MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 2006; **24**(1): 3–12.

- [11] CHEN CZ, LI L, LI M, LODISH HF. The endoglin(positive) sca-1(positive) rhodamine(low) phenotype defines a nearhomogeneous population of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Immunity* 2003; **19**: 525–533.
- [12] CHEPKO G, DICKSON RB. Ultrastructure of the putative stem cell niche in rat mammary epithelium. *Tissue Cell* 2003; **35**: 83–93.
- [13] CHEPKO G, SMITH GH. Three division-competent, structurally-distinct cell populations contribute to murine mammary epithelial renewal. *Tissue Cell* 1997; **29**: 239–253.
- [14] CLARKE RB, SPENCE K, ANDERSON E, HOWELL A, OKANO H, POTTEN CS. A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. *Dev Biol* 2005; **277**(2): 443–456.
- [15] CLARKE RB, ANDERSON E, HOWELL A, POTTEN CS. Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif* 2003; **36** Suppl 1: 45–58.
- [16] CLARKE RB. Isolation and characterization of human mammary stem cells. *Cell Prolif* 2005 **38**(6): 375–386.
- [17] CLAYTON H, TITLEY I, VIVANCO M. Growth and differentiation of progenitor/stem cells derived from the human mammary gland. *Exp Cell Res* 2004; **297**(2): 444–460.
- [18] CORBEIL D, RÖPER K, HELLWIG A, TAVIAN M, MIRAGLIA S, WATT SM, SIMMONS PJ, PEAULT B, BUCK DW, HUTTNER WB. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* 2000; **275**(8): 5512–5520.
- [19] DeOME KB, FAULKIN LJ JR, BERN HA, BLAIR PB. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res* 1959; **19**: 515–520.
- [20] DEY D, SAXENA M, PARANJAPE AN, KRISHNAN V, GIRADDI R, KUMAR MV, MUKHERJEE G, RANGARAJAN A. Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture. *PLoS One* 2009; **4**(4): e5329.
- [21] DONTU G, ABDALLAH WM, FOLEY JM, JACKSON KW, CLARKE MF, KAWAMURA MJ, WICHA MS. *In vitro* propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 2003; **17**(10): 1253–1270.
- [22] DONTU G, EL-ASHRY D, WICHA MS. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2004; **15**(5): 193–197.
- [23] EIREW P, STINGL J, RAOUF A, TURASHVILI G, APARICIO S, EMERMAN JT, EAVES CJ. A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with *in vivo* regenerative ability. *Nat Med* 2008; **14**(12):1384–1389.
- [24] ELLIS S, CAPUCO AV. Cell proliferation in bovine mammary epithelium: identification of the primary proliferative cell population. *Tissue Cell* 2002; **34** (3): 155–163.
- [25] JONES C, MACKAY A, GRIGORIADIS A, COSSU A, REIS-FILHO JS, FULFORD L, DEXTER T, DAVIES S, BULMER K, FORDE E, PARRY S, BUDRONI M, PALMIERI G, NEVILLE AM, O'HARE MJ, LAKHANI SR. Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res* 2004; **64**(9): 3037–3045.
- [26] JONES PH, HARPER S, WATT FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* 1995; **80**(1): 83–93.
- [27] KOLEK O, GAJKOWSKA B, MOTYL T. Morphological and molecular markers of stem and progenitor cells in the mammary gland. *Med Wet* 2008; **64**(2): 136–141.
- [28] KORDON EC, SMITH GH. An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development* 1998; **125**: 1921–1930.
- [29] LIAO MJ, ZHANG CC, ZHOU B, ZIMONJIC DB, MANI SA, KABA M, GIFFORD A, REINHARDT F, POPESCU NC, GUO W, EATON EN, LODISH HF, WEINBERG RA. Enrichment of a population of mammary gland cells that form mammospheres and have *in vivo* repopulating activity. *Cancer Res* 2007; **67**(17): 8131–8138.
- [30] MALLEPELL S, KRUST A, CHAMBON P, BRISKEN C. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**(7): 2196–2201.
- [31] POTTEN CS, LOEFFLER M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the krypt. *Development* 1990; **110**(4): 1001–1020.
- [32] POTTEN CS, MORRIS RJ. Epithelial stem cells *in vivo*. *J Cell Sci Suppl* 1988; **10**: 45–62.

- [33] RAOUFA, ZHAO Y, TO K, STINGL J, DELANEY A, BARBARA M, ISCOVE N, JONES S, MCKINNEY S, EMERMAN J, APARICIO S, MARRA M, EAVES C. Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process. *Cell Stem Cell* 2008; **3**(1): 109–118.
- [34] REGAN J, SMALLEY M. Prospective isolation and functional analysis of stem and differentiated cells from the mouse mammary gland. *Stem Cell Rev* 2007; **3**(2): 124–136.
- [35] RIETZE RL, VALCANIS H, BROOKER GF, THOMAS T, VOSS AK, BARTLETT PF. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 2001; **412**(6848): 736–739.
- [36] SCHABORT EJ, MYBURGH KH, WIEHE JM, TORZEWSKI J, NIESLER CU. Potential myogenic stem cell populations: sources, plasticity, and application for cardiac repair. *Stem Cells Dev* 2009; **18**(6): 813–830.
- [37] SHACKLETON M, VAILLANT F, SIMPSON KJ, STINGL J, SMYTH GK, ASSELIN-LABAT ML, WU L, LINDEMAN GJ, VISVADER JE. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 2006; **439**(7072): 84–88.
- [38] SLEEMAN KE, KENDRICK H, ASHWORTH A, ISACKE CM, SMALLEY MJ. CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res* 2006; **8**(1): R7.
- [39] SLEEMAN KE, KENDRICK H, ROBERTSON D, ISACKE CM, ASHWORTH A, SMALLEY MJ. Dissociation of estrogen receptor expression and *in vivo* stem cell activity in the mammary gland. *J Cell Biol* 2007; **176**(1): 19–26.
- [40] SMALLEY MJ, CLARKE RB. The mammary gland „side population”: a putative stem/progenitor cell marker? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; **10**(1): 37–47.
- [41] SMITH GH, MEDINA D. A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *J Cell Sci* 1988; **90** (Pt 1): 173–183.
- [42] SMITH GH, CHEPKO G. Mammary epithelial stem cells. *Microsc Res Tech* 2001; **52**(2): 190–203.
- [43] SMITH GH. Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands. *Development* 2005; **132**(4): 681–687.
- [44] STERNLICHT MD. Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res* 2006; **8**(1): 201.
- [45] STINGL J, EAVES CJ, ZANDIEH I, EMERMAN JT. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2001; **67**(2): 93–109.
- [46] STINGL J, EIREW P, RICKETSON I, SHACKLETON M, VAILLANT F, CHOI D, LI HI, EAVES CJ. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 2006; **439**(7079): 993–997.
- [47] STINGL J, RAOUFA, EMERMAN JT, EAVES CJ. Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; **10**(1): 49–59.
- [48] STINGL J. Detection and analysis of mammary gland stem cells. *J Pathol* 2009; **217**(2): 229–241.
- [49] VILLADSEN R. In search of a stem cell hierarchy in the human breast and its relevance to breast cancer evolution. *APMIS* 2005; **113**(11–12): 903–921.
- [50] WELM BE, TEPERA SB, VENEZIA T, GRAUBERT TA, ROSEN JM, GOODELL MA. Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev Biol* 2002; **245**(1): 42–56.
- [51] WOODWARD WA, CHEN MS, BEHBOD F, ROSEN JM. On mammary stem cells. *J Cell Sci* 2005; **118**(Pt 16): 3585–3594.
- [52] YAGER JD, DAVIDSON NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 2006; **354**(3): 270–282.

Prof. dr hab. Tomasz Motyl

Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

e-mail: tomasz_motyl@sggw.pl