

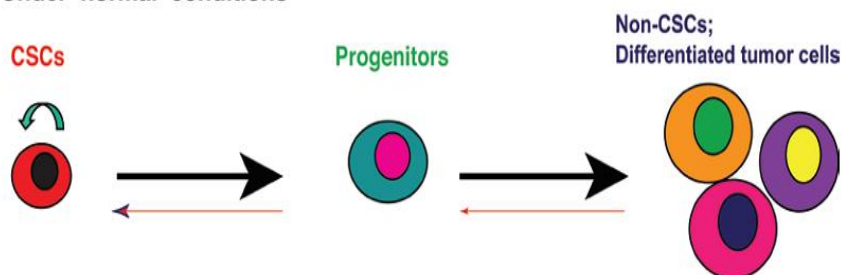
Multicelulāro sfēru testi uz vēža cilmes šūnām mērķētu zāļu vielu skrīningam

Edgars Endzeliņš

RĪGA 2013

VCŠ plasticitāte

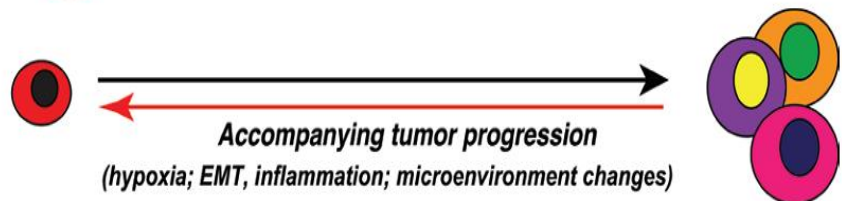
A) Early stages of tumor development Under 'normal' conditions



B) 'Intrinsic' plasticities in undifferentiated tumor cells and CSCs



C) Accompanying tumor progression (hypoxia; EMT, inflammation; microenvironment changes)



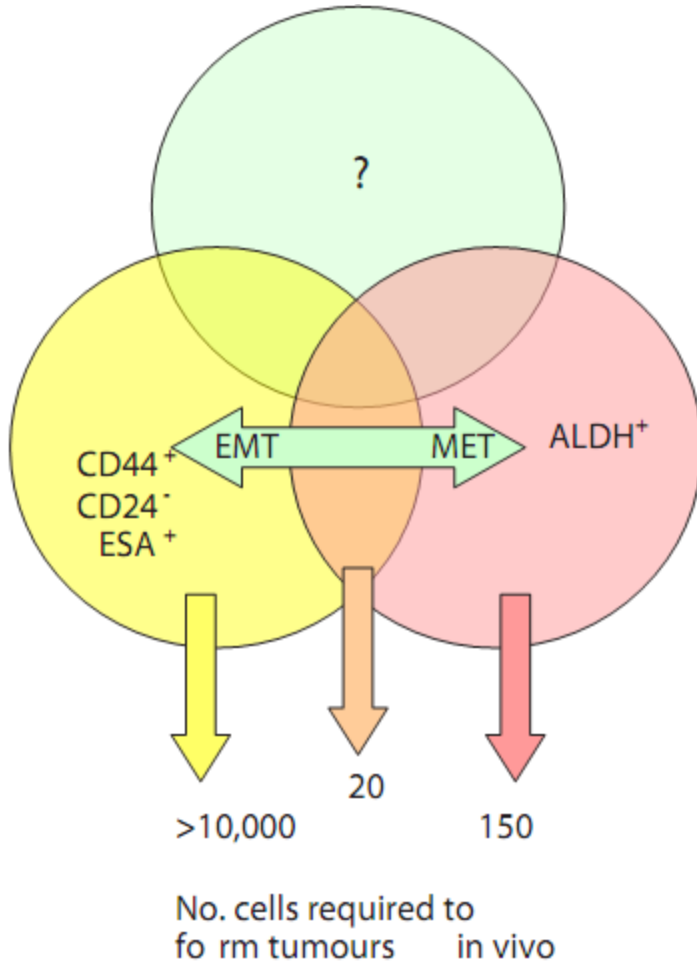
D) Experimental manipulations/treatment; therapies



Vēl nesenā pagātnē VCŠ tika uztvertas kā definēta subpopulācija. Virkne jaunu pētījumu būtiski mainījuši šos priekšstatus, sniedzot liecības, ka diferenciācijas-diferenciācijas procesu rezultātā VSC un ne-VCŠ stāvokļi var savstarpēji mīties, kā arī VCŠ ir spējīgas transdiferencēties dažādos šūnu tipos, kas stimulē audzēja augšanu.

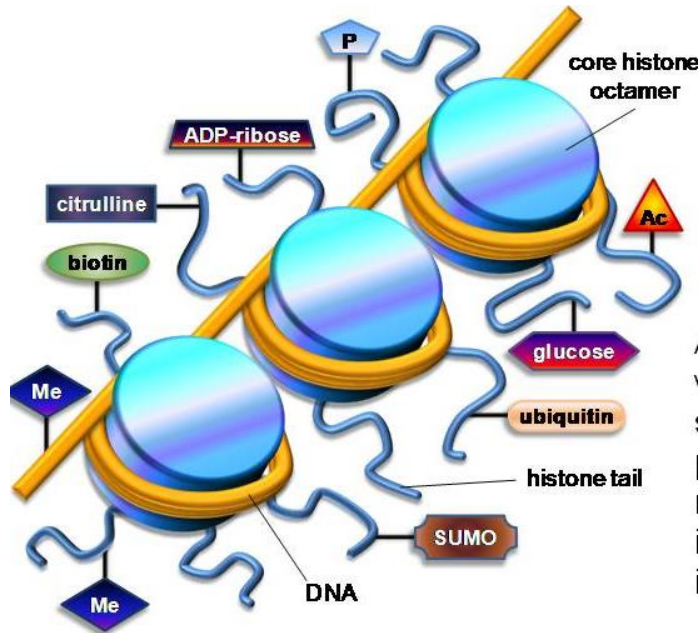
Šādu miju starp dažādiem vēža šūnu funkcionāliem stāvokļiem inducē galvenokārt mikrovides signāli un nozīmīga loma tās realizācijā epigēnētiskiem procesiem.

VCŠ plasticitāte



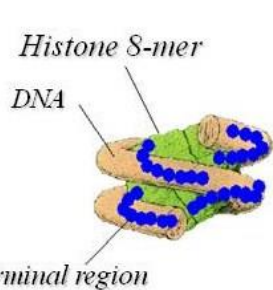
Krūts vēzis var saturēt divas vai vairākas atšķirīgas VCŠ populācijas, kuras ir spējīgas pāriet starp šiem stāvokļiem.

Epigenētika un histonu deacetilāzes



Epigenētisku procesu realizācijā nozīmīgu lomu ieņem histonu deacetilāzes (HDAC) - enzīmu saime, kuru galvenā funkcija ietver gēnu aktivitātes regulāciju caur histonu astes N-acetil-lizīnu deacetilāciju.

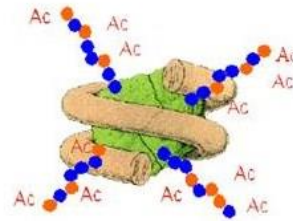
Deacetilētas histonu astes dēļ augstā lizīna un arginīna saturs ir pozitīvi lādētas, līdz ar to mijiedarbojas ar negatīvi lādētām DNS fosfāta grupām, savukārt acetilētā veidā šī mijiedarbība zūd un DNS kļūst pieejama RNS polimerāzei un transkripcijas faktoriem.















Histone acetyltransferase (HAT)



Histone deacetylase (HDAC)



Histonu deacetilāzes

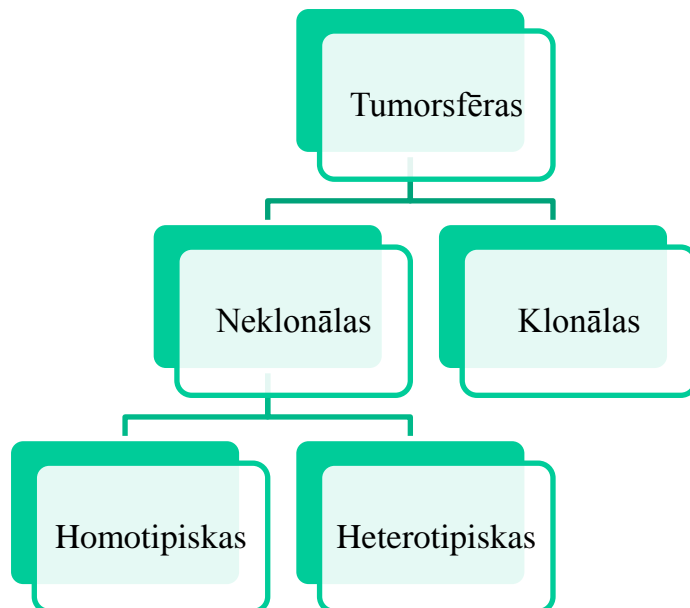
HDAC isoforms	Protein domains	Cellular distribution	Post-traslational Modifications	Implication in cancer
Class I (Zn ²⁺ depen)	HDAC1  482 aa	N	Ac, P, S, Ub	colon, lung, breast prostate, gastric, medulloblastoma
	HDAC2  488 aa	N	P, Ub	colon, gastric, medulloblastoma
	HDAC3  428 aa	N/C	P	lung and several solid tumors
	HDAC8  377 aa	N	P, S	promotes overgrowth in tumor cells
Class IIa (Zn ²⁺ depen)	HDAC4  1084 aa	N/C	P, S, Ub	N.D.
	HDAC5  1122 aa	N/C	P, Ub	N.D.
	HDAC7  912 aa	N/C	P	N.D.
	HDAC9  1609 aa	N/C	P, S	N.D.
Class IIb (Zn ²⁺ depen)	HDAC6  1215 aa	N/C	P, S, Ub	breast cancer
	HDAC10  669 aa	N/C	-	N.D.
Class IV (Zn ²⁺ depen)	HDAC11  347 aa	N	-	N.D.
Class III (NAD ⁺ depen)	Sirtuins (1-7)  747 aa	N/C Mit.	P, S	leukemia, skin, glioblastoma, prostate, colon

Virkne šo enzīmu ieņem nozīmīgu lomu ļaundabīgo audzēju bioloģijā, kas padara tos par pievilcīgiem potenciālajiem uz CSC plasticitātes ierobežošanu vērstu zāļu mērķiem.

Tumorsfēru kultūras

Klasiski par tumorsfērām tiek dēvētas blīvas, sfēriskas, brīvi peldošas šūnu kolonijas, kas veidojās vienas šūnas proliferācijas rezultātā klonālos, neadherentos apstākļos.

Tumorsfēras sniedz iespēju bagātināt kultūru ar vēža cilmes un priekšteč-šūnām, kā arī kalpo kā *in vitro* funkcionāls VCŠ tests, jo tiek uzskatīts, ka tikai šīs šūnas ir spējīgas izdzīvot (anoikis rezistence) un proliferēt attiecīgajos apstākļos.



Nereti ar vārdu «tumorsfēras» tiek saprastas arī organotipiskas 3D kultūru sistēmas, kas izmanto šūnu īpašību augstā kultūras blīvumā savākties lielās sfēriskās kolonijās.

Sfēru veidošanas tests

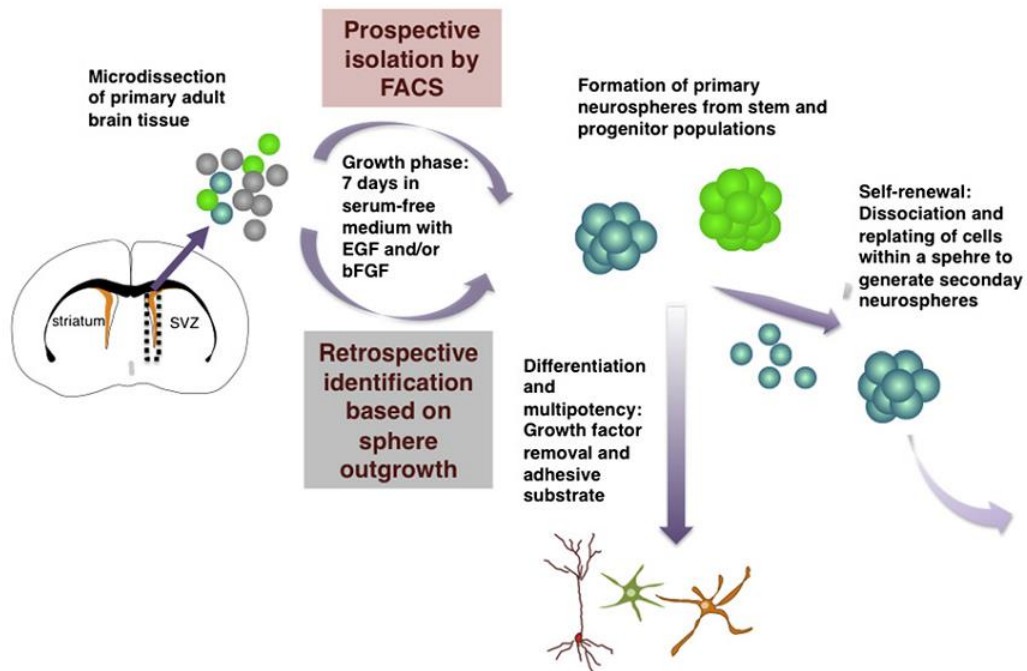


Table 2. Tissues in which Sphere-Forming Assays Have Been Used

Tissue	Isolation Markers	References
Breast	human bulk breast tissue; Lin (CD45/CD31/Ter119)/CD29/CD24	Dontu et al. (2003) Shackleton et al. (2006)
Cornea	bulk microdissected human corneal epithelium	Yokoo et al. (2005)
Dermis	bulk skin tissue	Toma et al. (2001)
Heart	side population	Tomita et al. (2005)
Pancreas	bulk microdissected pancreatic islets and ductal tissue; ALDH1/ E-cadherin	Seaberg et al. (2004) Rovira et al. (2010)
Pituitary gland	side population	Chen et al. (2005)
Prostate	Lin (CD45/CD31/Ter119)/Sca1/CD49f	Lawson et al. (2007)
Retina	bulk microdissected ciliary margin of outer retinal pigmented epithelium	Tropepe et al. (2000)
Trachea	KRT5-GFP; human bronchi: Itga6/NGFR	Rock et al. (2009)

Eksistē dažādas variācijas, kas balstītas uz neurosfēru testa un plaši lietotas cilmes šūnu bioloģijā, ļaujot teorētiski spriest par pašatjaunošanos un diferenciaciju individuālas šūnas līmenī.

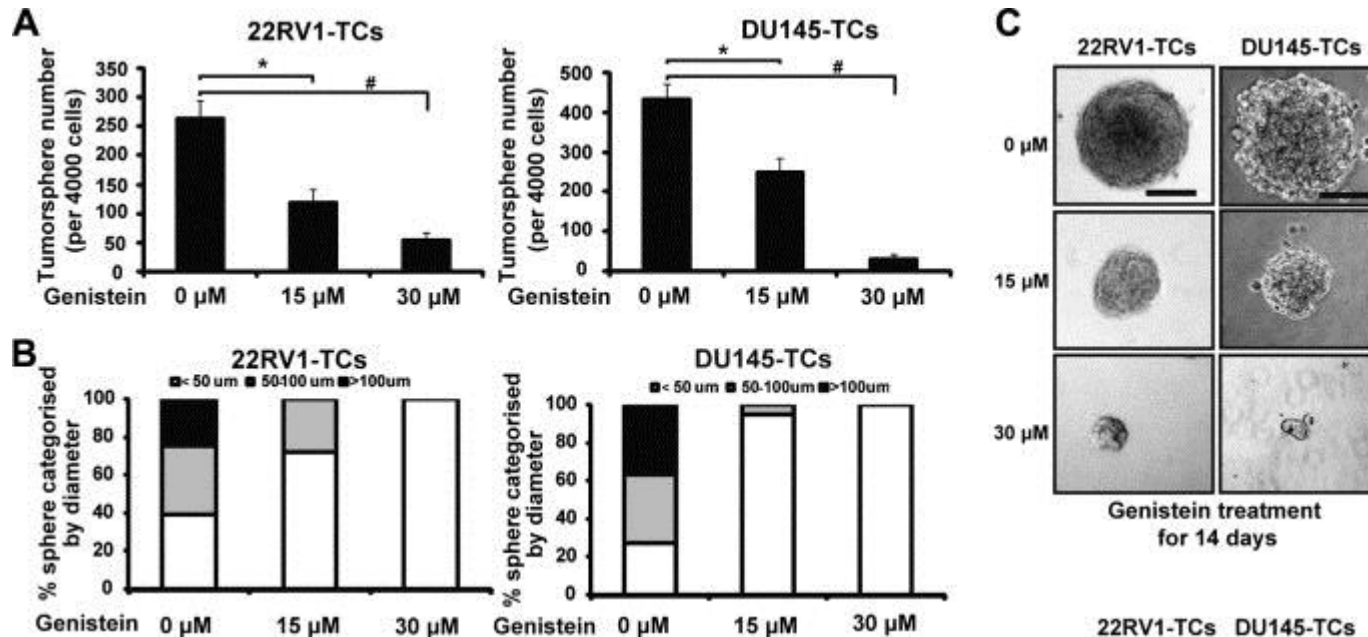
Šūnu blīvums tiek uzskatīts par svarīgāko parametru, jo tam ir kritiska ieteme uz sfēru klonalitāti. Par, tā saucamo, klonālo blīvumu tiek pieņemts 0,2-20 šūnas/ μ l.

Testējamie parametri: sfēru skaits, izmērs, sekundāro sfēru veidot spēja.

Sfēru veidošanas tests, piemēri

Zhang et. al. (2012)

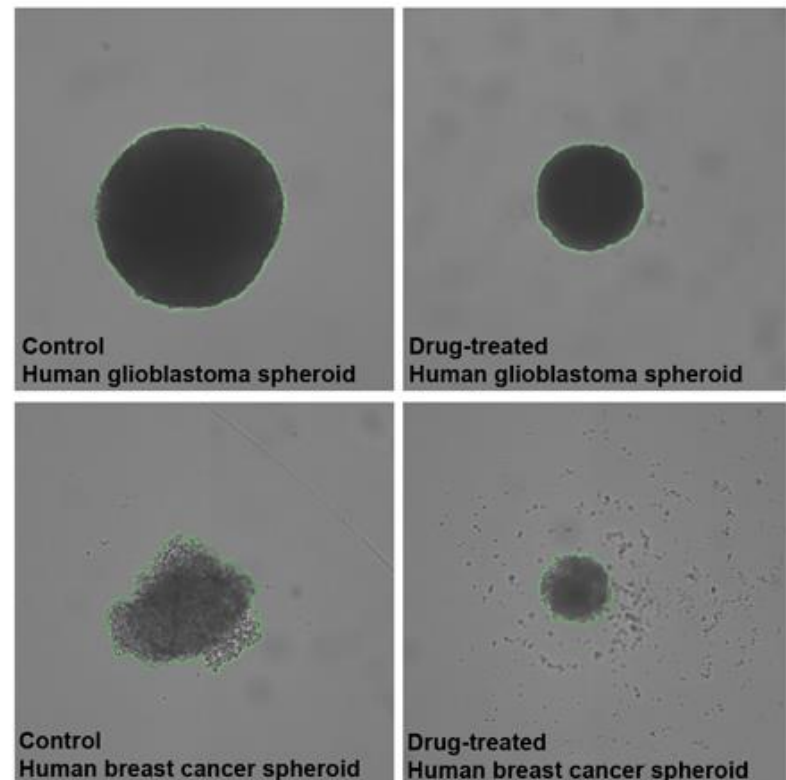
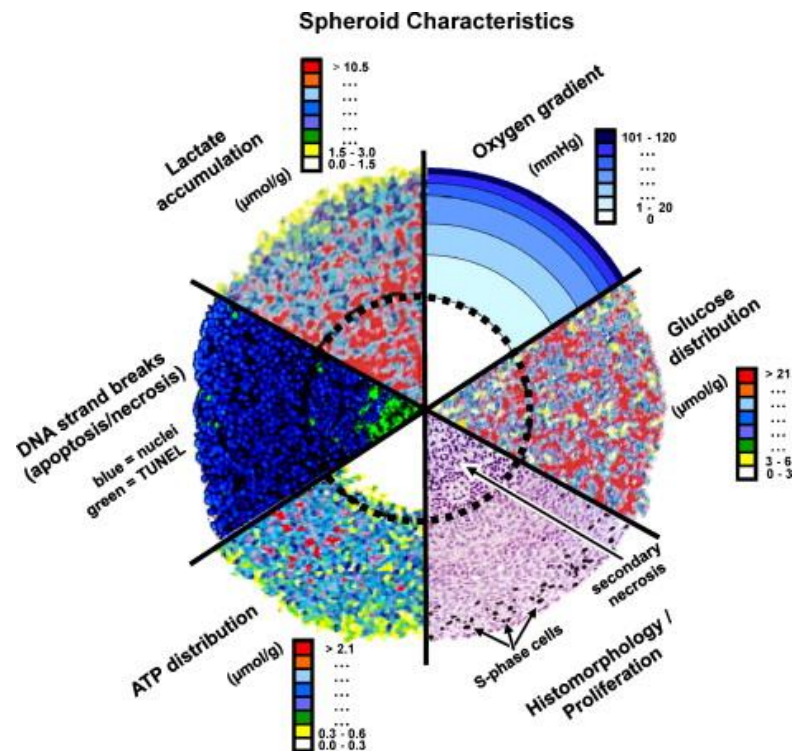
Genistein inhibē prostatas CSC īpašības: ietekme uz tumorsfēru frekvenci un izmēru.



Sferoīdu 3D kultūras

Šūnu tendence neadherentos augsta kultūras blīvuma apstākļos veidot agregātus tiek plaši izmantota organotipiskās sferoīdu 3D kultūras, kas mimikrē in vivo apstākļus, tādēļ tiek uzskatītas par piemērotāku modeli dažādām aplikācijām, tai skaitā zāļu testiem, nekā 2D kultūras.

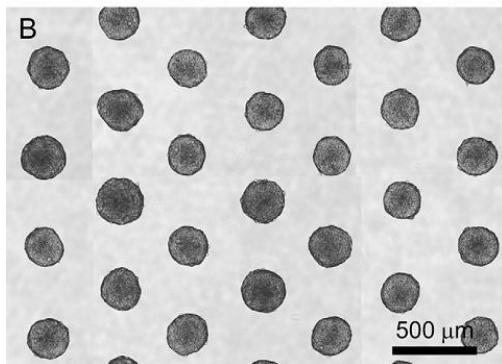
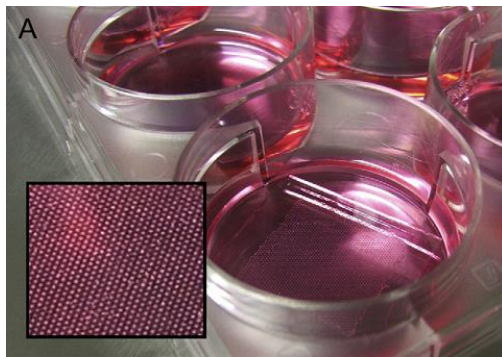
Šāds modelis ļauj veidot arī heterotipiskas kultūras specifisku in vivo apstākļu (piem., metastāzes nišas) simulēšanai.



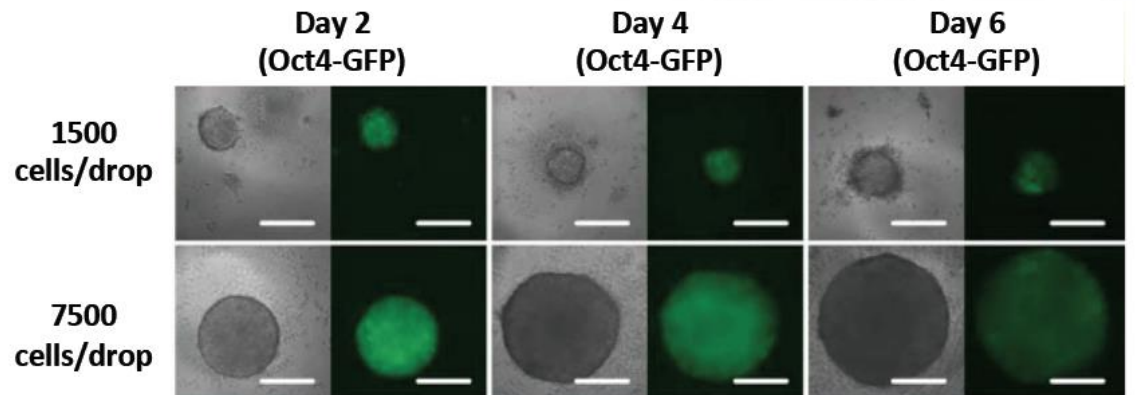
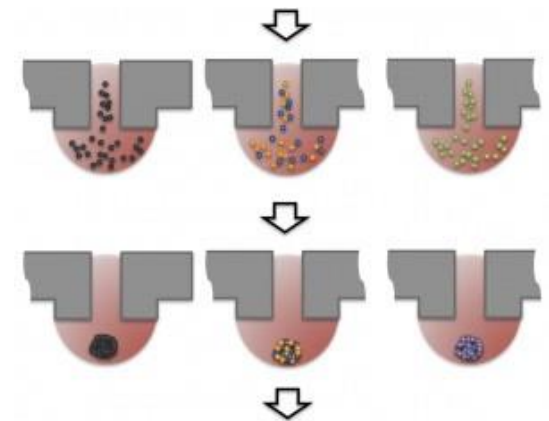
Sferoīdu 3D kultūras

Vienmērīga izmēra sferoīdu iegūšanai var tikt izmantotas dažādas agregāciju veicinošas metodes – mehāniska kratīšana, sedimentācija uz izliektas virsmas, mikrobedrīšu matricēs, «hanging drop» matricēs.

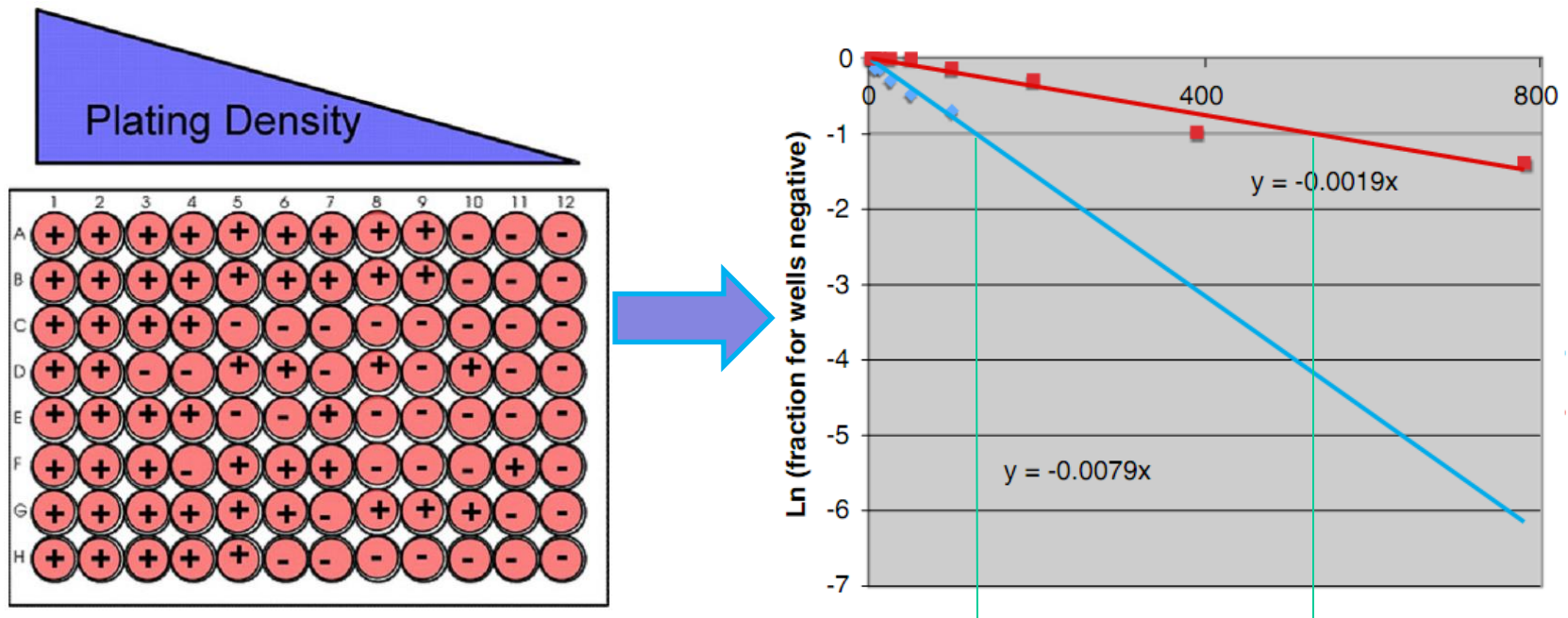
Mikrobedrīšu matricē



«Hanging drop» tehnoloģija



Sfēru limitējošo atšķaidījumu analīze (SLDA)

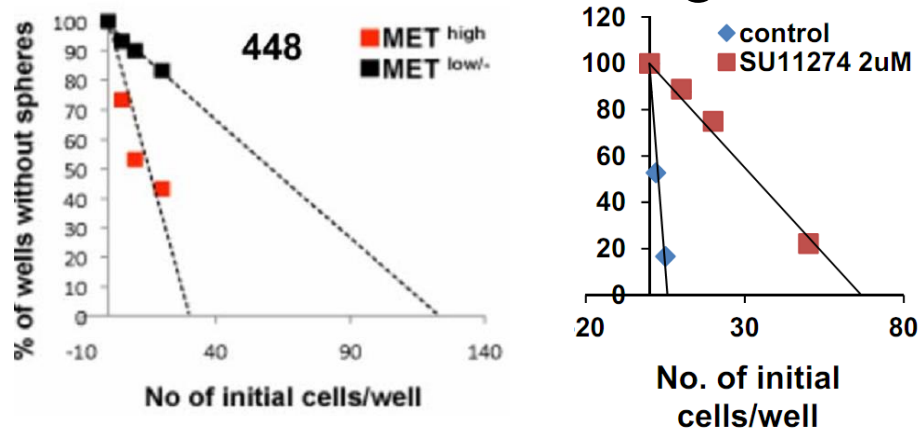


- **Ļauj izmērīt sfēru veidojošo šūnu frekvenci**
- Zemie sēšanas blīvumi būtiski samazina agregācijas ietekmi uz rezultātu
- Ļauj precīzi novērtēt sfēru izmēru
- Samazināta eksperimentētāja subjektīvā ietekme un atšķirības starp eksperimentiem

SLDA, piemēri

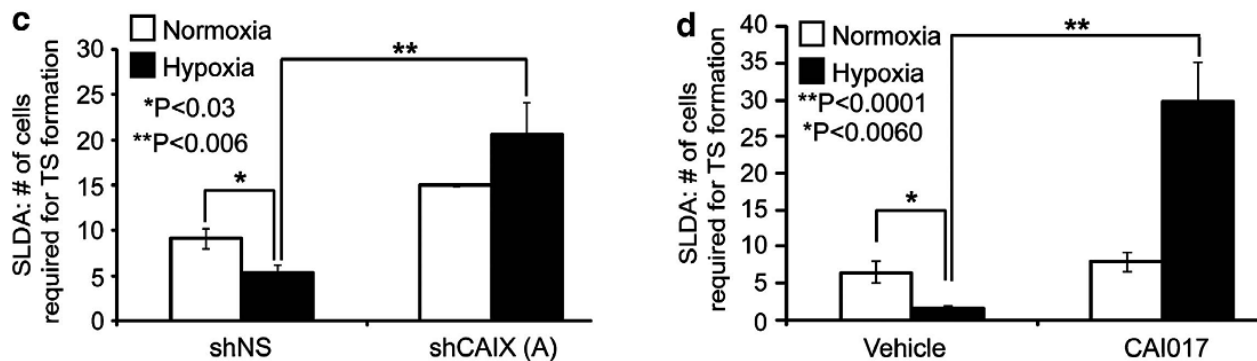
Joo et. al. (2012)

MET tirozīnkināzes ekspresijas līmeņa un tās inhibīcijas ietekme uz sfēru veidošanas frekvenci glioblastomas šūnās.



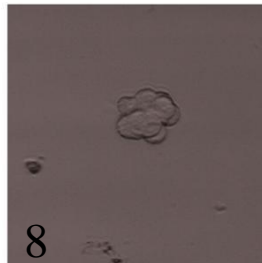
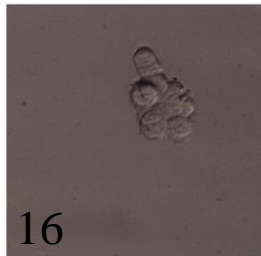
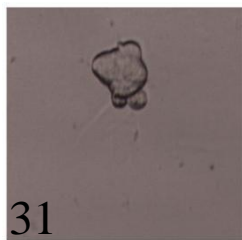
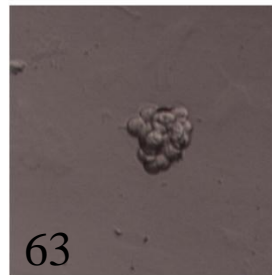
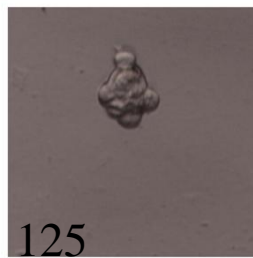
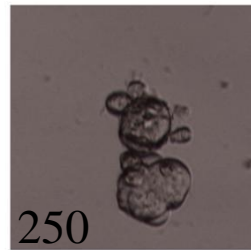
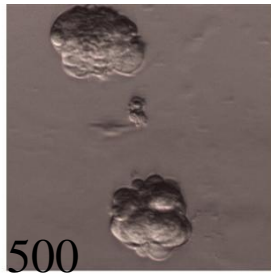
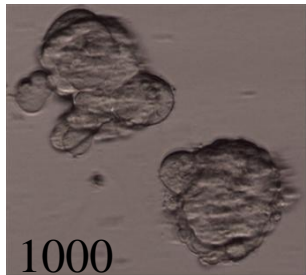
Lock et. al. (2012)

CAIX izslēgšanas un inhibīcijas ietekme uz sfēru veidošanas frekvenci krūts vēža šūnās hipoksiskos un normoksiskos apstākļos.

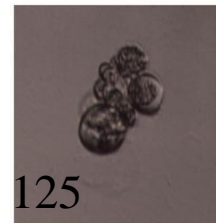
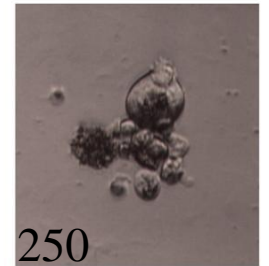
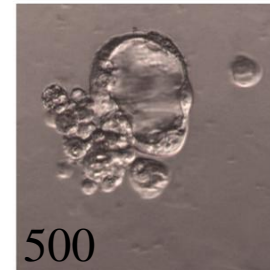
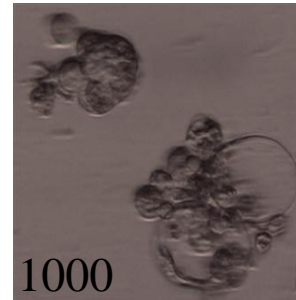


Belinostata ietekme uz MCF7 sfēru morfoloģiju

DMSO



1 μ M belinostat



Secinājumi

- SLDA metode ļauj novērtēt potenciālo zāļu vielu ietekmi sfēru veidošanas frekvenci.
- SLDA metode ļauj novērot sfēru morfoloģiskas izmaiņas potenciālo zāļu vielu ietekmē.
- Šī metode tālāk tiks izmantota jaunsintezētu HDAC inhibītoru aktivitātes testiem uz primāro krūts vēža kultūru paneļa.

Paldies par uzmanību!