

# Funkční testy pro detekci nádorových kmenových buněk

## Functional Assays for Detection of Cancer Stem Cells

Škoda J.<sup>1,2</sup>, Neradil J.<sup>1,3</sup>, Veselská R.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoř nádorové biologie, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

<sup>2</sup> Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

<sup>3</sup> Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

Nádorové kmenové buňky (cancer stem cells – CSCs) jsou považovány za populaci buněk, která odpovídá za iniciaci a progresi nádoru, účastní se procesu metastazování a je možnou příčinou získané lékové rezistence a rekurence nádorů. CSCs disponují schopností sebeobnovy a mají tumorigenní potenciál. Funkční testy, které umožňují detekovat zmiňované vlastnosti, jsou hlavním nástrojem pro identifikaci nádorových kmenových buněk. Tento článek přináší ucelený přehled *in vivo* a *in vitro* metod využívaných pro průkaz CSCs s důrazem na recentně zaváděné techniky detekce CSCs. Mezi nejčastěji prováděné funkční testy patří test tumorigenicity *in vivo*, testy tvorby sfér (sphere formation assay) a kolonií (colony-forming unit assay) a rovněž detekce tzv. vedlejší populace (side population). Dále jsou popsány metody zadržování detekční značky (label-retention assay) a test aktivity aldehyddehydrogenázy.

### Klíčová slova

nádorové kmenové buňky – funkční testy – tumorigenicita – nádorové sféry – tvorba kolonií – vedlejší populace buněk – aldehyddehydrogenáza

### Summary

Cancer stem cells (CSCs) are considered to be a population of tumor cells, which are responsible for tumor initiation and progression. They are also involved in metastasizing and may be a possible cause of multidrug resistance and tumor recurrence. CSCs possess the ability to self-renew and show a tumorigenic potential. Functional assays, which enable the detection of these properties, represent the main tool for identification of CSCs. This article summarizes both *in vitro* and *in vivo* methods used to identify the CSCs with emphasis on recently employed techniques of CSCs detection. *In vivo* tumorigenicity assay, sphere formation assay and colony-forming unit assay belong to the most commonly used functional assays. Further, label-retention assay and aldehyde dehydrogenase activity assay are described in this article.

### Key words

cancer stem cells – functional assays – tumorigenicity – tumor spheres – colony-forming unit assay – side population cells – aldehyde dehydrogenase

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NT13443-4 a Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101 a projektem CEB, OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0183.

The study was supported by grant of Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health No. NT13443-4 and by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101 and by the project CEB, OP VK CZ.1.07/2.3.00/20.0183.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Jan Škoda

Laboratoř nádorové biologie  
Ústav experimentální biologie  
Přírodovědecká fakulta MU  
Kotlářská 2  
611 37 Brno  
e-mail: janskoda@sci.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 16. 1. 2014

Přijato/Accepted: 4. 4. 2014

## Úvod

Nádorové kmenové buňky (cancer stem cells – CSCs) jsou definovány jako subpopulace buněk nádoru, které jsou schopny sebeobnovy a mají potenciál diferencovat do všech typů nádorových buněk tvořících masu daného nádoru [1]. Dle tohoto modelu odpovídají CSCs za iniciaci a kontinuální růst nádoru a jsou také příčinou vysoké buněčné heterogenity, se kterou se u mnoha typů nádorů setkáváme [2]. Navíc již v řadě studií bylo prokázáno, že CSCs (podobně jako jiné druhy kmenových buněk) disponují zvýšenou odolností proti chemoterapii a radioterapii [3–5]. Z toho lze usuzovat, že právě CSCs by mohly být příčinou často se vyskytující získané lékové rezistence a rekurence nádorů, které představují v současnosti největší problém v léčbě nádorových onemocnění. Zatímco dosavadní léčba nádorů se zaměřuje především na redukci celkové masy nádoru, limitem v dlouhodo-

bém vyléčení nemoci mohou být právě rezistentní CSCs, jež v určitém čase po terapii dají vzniknout nové populaci nádorových buněk – často již rezistentních k původní léčbě. Zejména v posledním desetiletí proto CSCs představují významnou oblast výzkumu nádorových onemocnění a recentní studie přinášejí slibné výsledky, kdy kombinovaná léčba zaměřující se mj. na CSCs vede k lepší léčebné odpovědi [3].

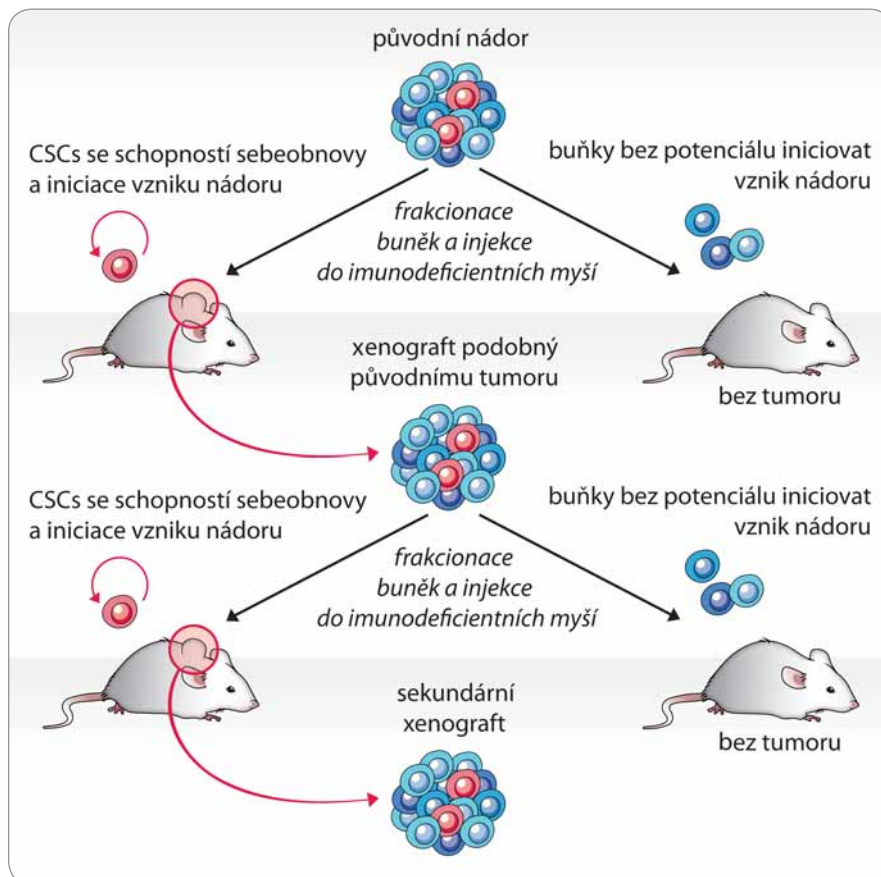
Základ modelu CSCs lze dohledat již v roce 1855, kdy Rudolf Virchow představil teorii, podle které nádory vznikají z nezralých buněk [6]. Termín „nádorové kmenové buňky“ byl však použit až v roce 1959 pro popis nepočtené populace buněk, jež byly rezistentní k chemoterapii a nacházely se u nich odlišné chromozomální změny v porovnání s ostatními buňkami nádoru [7]. Následné transplantační experimenty *in vivo* a klonogenní testy *in vitro* provedené v 70. letech minulého století potvr-

dily, že nádory mohou vznikat ze vzácně se vyskytujících buněk, které mají schopnost sebeobnovy a jsou schopny rekapitulovat buněčnou heterogenitu původního nádoru. S rozvojem technik průtokové cytometrie a s přispěním poznatků o biologii kmenových buněk bylo možné izolovat CSCs z nádorové tkáně na základě specifických povrchových markerů, často shodných s těmi, které se využívají pro identifikaci adultních kmenových buněk. Tímto přístupem byly CSCs nejprve identifikovány u hematologických malignit [8], později u karcinomu prsu [9] a poté u celé řady dalších solidních nádorů [10]. V současné době je sortování buněk na základě povrchových markerů obecně uplatňovaným přístupem při výzkumu CSCs. Specifita markerů CSCs se však může mezi jednotlivými typy nádorů lišit a je nezbytné ověřit, zda izolovaná populace buněk disponuje základními vlastnostmi CSCs – schopností sebeobnovy a tumorigeneze. Pro tyto účely se využívají funkční testy, které lze dle metodického přístupu rozdělit na testy *in vivo* a *in vitro*. V následujících kapitolách bude podán přehled těchto metod.

## Funkční testy CSCs *in vivo*

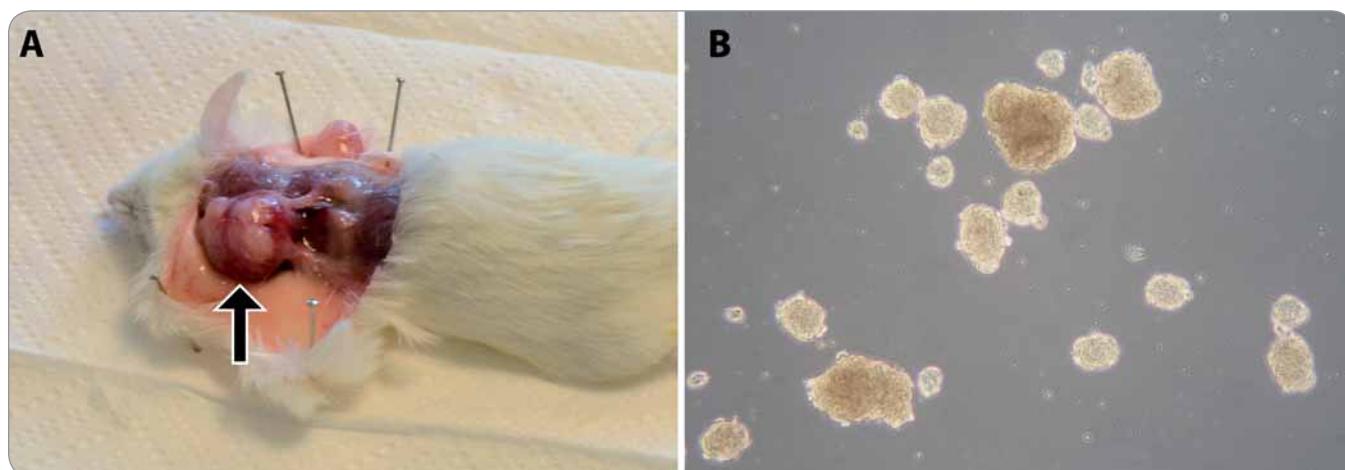
### Test tumorigenicity

Test tumorigenicity představuje dosud nejlepší funkční test fenotypu CSCs, kterým lze současně ověřit schopnost sebeobnovy i schopnost vytvořit nádor, jenž rekapituluje buněčnou heterogenitu nádoru původního, a to přímo v prostředí *in vivo*. Principem testu je opakovaná transplantace testovaných buněk do zvířecího modelu, nejčastěji myši imunodeficientního kmene – typicky NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency) (obr. 1) [1]. Dle původu a homogenity testované populace buněk bývá do vhodného místa myši injikována 100 až několik milionů buněk [9,11,12]. Injicace se obvykle provádí subkutánně, ale buňky lze transplantovat i do jednotlivých orgánů – mozku [11,13], svalů [12] či prsní žlázy [14]. Myši jsou poté průběžně kontrolovány a v případě nálezu nádoru nebo po uplynutí stanovené doby jsou usmrceny (obr. 2A). Schopnost tumorigeneze je hodnocena na základě



Obr. 1. Schéma testu tumorigenicity.

Průkaz fenotypu CSCs je proveden opakovanou transplantací izolovaných buněčných populací, které jsou schopny po injikaci do imunodeficientní myši vytvořit nádor.



**Obr. 2. Ukázky našich výsledků funkčních testů CSCs u rabdomyosarkomu a osteosarkomu.**

A. Xenografťový nádor u podkoží myši kmene NOD/SCID/IL2Ry<sub>null</sub> po injikaci rabdomyosarkomových buněk. Šipka označuje lokalizaci nádoru. B. Sarkosféry vytvořené z osteosarkomové linie OSA-02.

poměru počtu zvířat, u kterých se vyvíjel nádor, k počtu celkově injikovaných. Mezi další kritéria hodnocení pak patří velikost nádoru, doba do nálezu tumoru a počet injikovaných buněk. Schopnost sebeobnovy je však potřeba dále ověřit opakovanou izolací CSCs z xenografťového nádoru a jejich transplantací do dalšího zvířete (obr. 1) [1].

Ve většině prvotních prací prokazujících přítomnost nepočtené populace CSCs u různých typů nádorů byly pro test tumorigenicity využívány NOD/SCID myši. V posledních letech ale byly publikovány práce, které ukázaly, že tumorigenicita testovaných buněk (a tedy i senzitivita testu) může být výrazně zvýšena použitím více imunodeficientních transgenních myších kmenů NOD/SCID/IL2Ry<sub>null</sub>, NOD/ShiLtSz-scid/IL2Ry<sub>null</sub> (NSG) a NOD/ShiJic-scid/IL2Ry<sub>null</sub> (NOG), nesoucích mutaci v genu pro řetězec gama receptoru pro interleukin-2 [15]. Použitím NSG myši se u maligního melanomu zvýšilo vypočítané zastoupení CSCs z původně publikovaných 0,0001 % na 25 %, přičemž nádory u myši vznikaly již při injikaci jediné buňky [16]. Podobně došlo ke zvýšení tumorigenicity u leukemických kmenových buněk [17]. Ačkoliv u některých solidních nádorů, např. adenokarcinomu pankreatu, nebyla pozorována změna ve frekvenci výskytu CSCs [18], využití NSG myši obecně zkrátilo dobu do prvního nálezu nádoru. Právě časová náročnost testu tumorige-

nicity, kdy od injekce testovaných buněk do vytvoření nádoru uplyne často i několik měsíců, je jedna z nevýhod tohoto testu. CSCs mohou během této doby projít řadou genetických a epigenetických změn, což znesnadňuje interpretaci výsledků testu [1]. Využití více imunodeficientních kmenů myši, NSG a NOG, se proto jeví jako vhodná optimalizace testu.

Další limit testu tumorigenicity může představovat mikroprostředí v místě transplantace a způsob injikace buněk. Je známo, že kmenové buňky jsou do značné míry závislé na produkci signálů od okolního stromatu [19]. Při experimentech, kdy byly do myši injikovány smíšené populace nádorových buněk a fibroblastů asociovaných s nádorem (cancer-associated fibroblasts), došlo ke zvýšení agresivity a velikosti nádoru [20]. Kombinace nádorových buněk s normálními diploidními fibroblasty měla po transplantaci do myši efekt opačný. Výsledky některých studií ukazují, že i samotné nádorové stroma ovlivňuje okolní buňky a původně nenádorové buňky umístěné do jeho blízkosti se pravděpodobně v důsledku genetických či epigenetických změn stávají tumorigenními [21–24]. Míra tumorigenicity může být také zvýšena přidáním mitoticky inaktivovaných podpůrných buněk (feeder cells) nebo Matrigelu™, který obsahuje proteiny extracelulární matrix [1,16,25,26].

Potřeba sledovat interakce CSCs a mikroprostředí *in vivo* vedla v posledních letech k rozvoji specializovaných metod založených na intravitální mikroskopii a multifotonovém zobrazování [27]. Pomocí těchto metod je možné v čase a při rozlišení jednotlivých buněk pozorovat buňky exprimující fluorescenční protein přímo v myši bez nutnosti jejího usmrcení či narušení příslušné tkáně. To mimo jiné umožňuje sledování původu buněk (lineage tracing), což pomáhá lépe pochopit dynamiku tumorigeneze. V recentních studiích byly fluorescenčně značené nádorové buňky získány dvěma způsoby: 1. využitím transgenních kmenů myši, které spontánně vytvářejí nádory a zároveň v buňkách obsahují fluorescenční protein s regulovatelnou expresí [28–30], nebo 2. pomocí transdukcí izolovaných buněk příslušnou fluorescenční značkou a jejich xenotransplantací do imunodeficientní myši [31]. Právě tento druhý přístup, kdy je možné izolovanou populaci CSCs značit fluorescenčním proteinem, injikovat do myši (případně i společně s dalšími odlišně značenými populacemi buněk) a sledovat v čase, by se v budoucnu mohl stát optimálním rozšířením klasického testu CSCs *in vivo*.

#### **Funkční testy CSCs *in vitro***

Oproti metodám *in vivo* jsou *in vitro* testy fenotypu CSCs výhodné zejména z důvodu menší časové a finanční ná-

ročnosti. I přesto je nutné výsledky získané *in vitro* ověřit testem *in vivo*. Dobře navržený funkční test *in vitro* by měl mít dostatečnou specifitu a citlivost pro detekci níže zastoupené populace CSCs a zároveň by měl umožňovat kvantitativní hodnocení. Mezi nejčastěji využívané funkční testy *in vitro* patří: 1. test tvorby buněčných sfér (sphere formation assay), 2. test tvorby kolonií (colony-forming unit – CFU assay), označovaný též jako klonogenní test, 3. detekce vedlejší populace (side population – SP analysis), 4. test zadržování detekční značky v buňce (label-retention assay) a 5. test aktivity aldehyddehydrogenázy [1,32].

### Test tvorby buněčných sfér

Průkaz schopnosti původně jednotlivých buněk dělit se a vytvářet sféry – tedy kulovité shluky buněk – umožňuje kvantifikovat aktivitu a sebeobnovu CSCs (obr. 2B) [33]. Test je prováděn v médiu s definovaným obsahem růstových faktorů, aby se minimalizovalo působení externích buněčných signálů, a za neadherentních podmínek kvůli ověření nezávislosti na adhezenci k substrátu. Pro ověření sebeobnovy CSCs je nutné sféry opakovaně pasážovat – sféry jsou enzymaticky převedeny na suspenzi jednotlivých buněk a opětovně kultivovány za definovaných podmínek [34,35]. Dle počtu zformovaných sfér v druhé a dalších generacích lze určit nejen schopnost sebeobnovy, ale také klonogenitu příslušných buněk.

Buněčné sféry byly odvozeny z celé řady nádorů a často bývají nazývány dle tkáňového původu nebo názvu nádoru (uvedeno v závorce): neuronální nádory (neurosféry) [13,36], karcinom prsu (mamosféry) [14], rabdomyosarkom (rabdosféry) [12], osteosarkom (sarkosféry) [37,38], karcinom tlustého střeva (kolonosféry) [39], karcinom prostaty (prostasféry) [40] a hepatom (hepatosféry) [41].

Nevýhodou počátečních experimentů prováděných v tekutém médiu byla skutečnost, že mohlo docházet k agregaci buněk, a sféry tak mohly vznikat z více než jedné buňky, přičemž tento aspekt je ale zásadním kritériem pro hodnocení testu. Uvedený problém lze překonat použitím semisolidního média, které

omezuje pohyb buněk a tím i jejich možnou agregaci [37,38].

Obdobu testu tvorby sfér představuje test tvorby kolonií z jednobuněčné suspenze v měkkém agaru (soft agar colony-forming assay), v němž je také ověřována schopnost sebeobnovy, tumorigenity a klonogenity CSCs [37,40]. Dělením jednotlivých buněk dochází v agaru ke vzniku trojrozměrných buněčných kolonií.

### Test tvorby kolonií

Princip této metody je podobný jako u předchozího testu. Suspenze jednotlivých buněk izolované populace se vyseje na kultivační misku a po určité době se vyhodnotí počet kolonií (obvykle musí být tvořeny více než 30–70 buňkami) [41–44]. Kultivace však probíhá za adherentních podmínek v médiu s přidávkem séra. Povrch kultivačních misek může být případně potažen Matrigelem™ [41].

V minulém roce byl publikován postup, který test tvorby kolonií do značné míry automatizuje [44]. Buňky byly tříděny metodou FACS (fluorescence-activated cell sorting, třídění buněk pomocí fluorescence) na základě exprese povrchových markerů CSCs a jednotlivě automaticky vysety do 96jamkových nebo 384jamkových mikrotitračních destiček. Tento přístup výrazně zkracuje časovou a manuální náročnost testu a díky použití vícejamkových destiček umožňuje velmi rychlé kvantitativní hodnocení, např. fluorescenčním skenovacím cytometrem [45].

### Detekce vedlejší populace

Vedlejší populace (side population – SP) je definována jako populace buněk, která je schopna z cytoplazmy vylučovat fluorescenční barvivo Hoechst 33342 [46]. Tento fluorochrom s emisním maximem 460 nm (modrá barva spektra) má schopnost vázat se na DNA a v tomto stavu lze navíc detekovat emisi i v červené části spektra. Toho se využívá při průtokové cytometrii, případně při FACS, kdy SP vykazuje výrazně nižší fluorescenci v červeném spektru oproti modrému spektru.

K vypuzování fluorescenčního barviva dochází aktivitou membráno-

vých proteinů spadajících do rodiny ABC (ATP-binding cassette) transportérů, které jsou mimo jiné odpovědné za transport xenobiotik [46,47]. V souvislosti s CSCs je z této skupiny nejčastěji zkoumaný protein ABCG2, jehož zvýšená exprese je považována za možnou příčinu rezistence CSCs k chemoterapeutikům [47,48]. Při detekci nebo izolaci CSCs na základě SP je proto nezbytné provést kontrolní experiment s využitím některého z inhibitorů ABCG2 proteinu – nejčastěji se používají verapamil [49] nebo fumitremorgin C [50].

Určitou nevýhodou detekce SP fluorochromem Hoechst 33342 je nutnost použití excitačního UV laseru (355 nm), který nebývá v základní konfiguraci obvykle používaných průtokových cytometrů. Jako alternativu k barvivo Hoechst 33342 lze použít rhodamin 123 (Rho123), který je vylučován stejným typem membránového transportéru a jeho excitace se provádí pomocí základního modrého laseru (488 nm) [38].

### Test zadržování detekční značky

Další *in vitro* metodou pro identifikaci CSCs izolovaných ze solidních nádorů je test schopnosti zadržování detekční značky v buňce (label-retention assay) [51–53]. V literatuře lze najít pod označením „label-retention assay“ dvě metody značení buněk.

Původní metoda vychází z hypotézy existence „nesmrtelného řetězce“ (immortal strand hypothesis) a jejím cílem je průkaz kmenových buněk pomocí značení mateřského řetězce DNA H3-thymidinem nebo bromdeoxyuridinem [51,54]. Testované buňky jsou nejprve označeny některým z těchto prekurzorů a po několika buněčných děleních je u nich detekována intenzita signálu. Během asymetrického dělení by měly kmenové buňky zadržovat značený mateřský („nesmrtelný“) řetězec a do dceřiné buňky by měl být předáván pouze nově vzniklý neznačený řetězec. Jiným vysvětlením pro zadržování detekční značky by mohl být prodloužený buněčný cyklus CSCs oproti ostatním buňkám nádoru. U buněk, které nemají vlastnosti CSCs, by mělo jejich dělením docházet k rozředění značených řetězců v populaci dceřiných buněk [55].



Druhá z metod označovaných jako „label-retention assay“ využívá stabilní značení buněk fluorochromy [52,56]. Při buněčném dělení dochází k rovnoměrnému rozdělení těchto fluorochromů do dceřiných buněk, a tedy ke snížení fluorescence jednotlivých buněk na polovinu. Po určitém počtu dělení (obvykle 8–10) dojde ke snížení intenzity fluorescence na úroveň neznačených buněk. Hodnocením fluorescence jednotlivých buněk lze potom určit míru proliferace dané populace buněk. Pro značení buněk je využíváno fluorescenční barvivo CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidylester), které volně prostupuje přes plazmatickou membránu a kovalentně se váže na proteiny v buňkách, nebo sondy PKH26 a Dil, jež se vážou na plazmatickou membránu. Na základě vysoké fluorescence v důsledku prodlouženého buněčného cyklu byla pomocí této metody detekována populace buněk, která vykazuje další znaky typické pro CSCs, jako je zvýšená schopnost tvorby kolonií, tumorigeneze *in vivo* a exprese markerů kmenových buněk [57].

### Test aktivity aldehyddehydrogenázy

Expres aldehyddehydrogenázy (ALDH) je specifická pro kmenové buňky, a je proto využívána jako jeden z jejich markerů [58]. Měření aktivity ALDH pomocí štěpení specifického substrátu patří mezi funkční testy fenotypu CSCs [59]. Substrát označovaný jako BAAA (BODIPY aminoacetaldehyde) proniká difúzí do buňky, kde je štěpen pomocí ALDH na BAA (BODIPY amino acetate) a dochází tak k emisi fluorescence, která může být kvantifikována pomocí průtokové cytometrie. Buňky s vysokou intenzitou fluorescence (a tedy vysokou aktivitou ALDH) jsou považovány za CSCs. V současnosti existuje komerčně dostupný systém pro detekci aktivity ALDH pod označením Aldefluor™.

### Závěr

Funkční testy pro detekci buněk s fenotypem CSCs představují nepostradatelnou součást aktuálního výzkumu nádorových onemocnění. Metodické přístupy, které byly pro účely detekce CSCs vyvinuty, jsou postupně využívány i pro výzkum léčiv cílených na CSCs

stejně jako pro vývoj protinádorových léčiv obecně. Nádorové sféry představují lepší model solidního nádoru v podmínkách *in vitro* než buňky pěstované jako monolayer. Automatizovaná příprava kolonií umožňuje vysoce efektivně testovat a kvantifikovat účinky léčiv. Sledování původu buněk u transgenních kmenů myši může v budoucnu ukázat, které populace buněk jsou v organizmu použitou léčbou ovlivněny. Lze očekávat, že při dalším vývoji funkčních testů CSCs bude snaha lépe postihnout i vliv nádorového mikroprostředí na funkci CSCs a testy budou rozšiřovány o metody sledování původu buněk, které pomohou charakterizovat interakce CSCs a ostatních buněk nádoru.

### Literatura

1. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB et al. Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006; 66(19): 9339–9344.
2. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 2012; 21(3): 283–296. doi: 10.1016/j.ccr.2012.03.003.
3. Vidal SJ, Rodriguez-Bravo V, Galsky M et al. Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. *Oncogene* 2013; 10: 1–13. doi: 10.1038/ncr.2013.411.
4. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(7): 545–554. doi: 10.1038/nrc2419.
5. Hittelman WN, Liao Y, Wang L et al. Are cancer stem cells radioresistant? *Future Oncol* 2010; 6(10): 1563–1576. doi: 10.2217/fon.10.121.
6. Cogle CR. Cancer stem cells: historical perspectives and lessons from leukemia. In: Alison AL (ed.). *Cancer stem cells in solid tumors*. Springer 2011: 3–11.
7. Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR et al. Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? *Cell Commun Signal* 2010; 8(1): 6. doi: 10.1186/1478-811X-8-6.
8. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3(7): 730–737.
9. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(7): 3983–3988.
10. Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(10): 727–738. doi: 10.1038/nrc3597.
11. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432(7015): 396–401.
12. Walter D, Sathesha S, Albrecht P et al. CD133 positive embryonal rhabdomyosarcoma stem-like cell population is enriched in rhabdospheres. *PLoS One* 2011; 6(5): e19506. doi: 10.1371/journal.pone.0019506.
13. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(25): 15178–15183.
14. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N et al. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005; 65(13): 5506–5511.

15. McDermott SP, Eppert K, Lechman ER et al. Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains. *Blood* 2010; 116(2): 193–200. doi: 10.1182/blood-2010-02-271841.
16. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS et al. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008; 456(7222): 593–598. doi: 10.1038/nature07567.
17. Agliano A, Martin-Padura I, Mancuso P et al. Human acute leukemia cells injected in NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null mice generate a faster and more efficient disease compared to other NOD/scid-related strains. *Int J Cancer* 2008; 123(9): 2222–2227. doi: 10.1002/ijc.23772.
18. Ishizawa K, Rasheed ZA, Karisch R et al. Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. *Cell Stem Cell* 2010; 7(3): 279–282. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.009.
19. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 2006; 441: 1075–1079.
20. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121(3): 335–348.
21. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999; 59(19): 5002–5011.
22. Tzukerman M, Skorecki K. A novel experimental platform for investigating tumorigenesis and anti-cancer therapy in a human microenvironment derived from embryonic stem cells. *Discov Med* 2003; 3(19): 51–54.
23. Mücke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* 2004; 45 (Suppl 2): 163–175.
24. Fabris VT, Sahores A, Vanzulli SI et al. Inoculated mammary carcinoma-associated fibroblasts: contribution to hormone independent tumor growth. *BMC Cancer* 2010; 10: 293. doi: 10.1186/1471-2407-10-293.
25. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL et al. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(8): 3722–3727. doi: 10.1073/pnas.0915135107.
26. Di Fiore R, Guercio A, Puleio R et al. Modeling human osteosarcoma in mice through 3AB-OS cancer stem cell xenografts. *J Cell Biochem* 2012; 113(11): 3380–3392. doi: 10.1002/jcb.24214.
27. Wyckoff J, Gligorijevic B, Entenberg D et al. High-resolution multiphoton imaging of tumors *in vivo*. *Cold Spring Harb Protoc* 2011; 2011(10): 1167–1184. doi: 10.1101/pdb.top065904.
28. Chen J, Li Y, Yu TS et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 2012; 488(7412): 522–526. doi: 10.1038/nature11287.
29. Driessens G, Beck B, Caauwe A et al. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature* 2012; 488(7412): 527–530. doi: 10.1038/nature11344.
30. Zomer A, Ellenbroek SI, Ritsma L et al. Intravital imaging of cancer stem cell plasticity in mammary tumors. *Stem Cells* 2013; 31(3): 602–606. doi: 10.1002/stem.1296.
31. Lathia JD, Gallagher J, Myers JT et al. Direct *in vivo* evidence for tumor propagation by glioblastoma cancer stem cells. *PLoS One* 2011; 6(9): e24807. doi: 10.1371/journal.pone.0024807.
32. Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: problems for the therapy? *J Pathol* 2011; 223(2): 147–161. doi: 10.1002/path.2793.
33. Shaw FL, Harrison H, Spence K et al. A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2012; 17(2): 111–117. doi: 10.1007/s10911-012-9255-3.
34. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255(5052): 1707–1710.
35. Dontu G, Wicha MS. Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology

- and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 10(1): 75–86.
36. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63(18): 5821–5828.
37. Tirino V, Desiderio V, d'Aquino R et al. Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. *PLoS One* 2008; 3(10): e3469. doi: 10.1371/journal.pone.0003469.
38. Di Fiore R, Santulli A, Ferrante R et al. Identification and expansion of human osteosarcoma-cancer-stem cells by long-term 3-aminobenzamide treatment. *J Cell Physiol* 2009; 219(2): 301–313. doi: 10.1002/jcp.21667.
39. Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J et al. The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer* 2010; 9: 212. doi: 10.1186/1476-4598-9-212.
40. Lee EK, Cho H, Kim CW. Proteomic analysis of cancer stem cells in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 412(2): 279–285. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.083.
41. Cao L, Zhou Y, Zhai B et al. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 71. doi: 10.1186/1471-230X-11-71.
42. Ye J, Wu D, Shen J et al. Enrichment of colorectal cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition via CDH1 knockdown. *Mol Med Rep* 2012; 6(3): 507–512. doi: 10.3892/mmr.2012.938.
43. Yang M, Yan M, Zhang R et al. Side population cells isolated from human osteosarcoma are enriched with tumor-initiating cells. *Cancer Sci* 2011; 102(10): 1774–1781. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02028.x.
44. Fedr R, Pernicová Z, Slabáková E et al. Automatic cell cloning assay for determining the clonogenic capacity of cancer and cancer stem-like cells. *Cytometry A* 2013; 83(5): 472–482. doi: 10.1002/cyto.a.22273.
45. Wylie PG, Bowen WP. Determination of cell colony formation in a high-content screening assay. *Clin Lab Med* 2007; 27(1): 193–199.
46. Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* 2002; 20(1): 11–20.
47. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009; 14(1): 3–9. doi: 10.1007/s10911-009-9109-9.
48. Veselská R, Skoda J, Neradil J. Detection of cancer stem cell markers in sarcomas. *Klin Onkol* 2012; 25 (Suppl 2): 2S16–2S20.
49. Mayol JF, Loeuillet C, Hérodin F et al. Characterisation of normal and cancer stem cells: one experimental paradigm for two kinds of stem cells. *Bioessays* 2009; 31(9): 993–1001. doi: 10.1002/bies.200900041.
50. Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Side population in MDA-MB-231 human breast cancer cells exhibits cancer stem cell-like properties without higher bone-metastatic potential. *Oncol Rep* 2011; 25(1): 289–296.
51. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2008; 10(2): R25. doi: 10.1186/bcr1982.
52. Dembinski JL, Krauss S. Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26(7): 611–623. doi: 10.1007/s10585-009-9260-0.
53. Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC et al. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* 2010; 141(4): 583–594. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.020.
54. McDonald SA, Graham TA, Schier S et al. Stem cells and solid cancers. *Virchows Arch* 2009; 455(1): 1–13. doi: 10.1007/s00428-009-0783-1.
55. Lee JT, Herlyn M. Old disease, new culprit: tumor stem cells in cancer. *J Cell Physiol* 2007; 213(3): 603–609.
56. Deleyrolle LP, Harding A, Cato K et al. Evidence for label-retaining tumour-initiating cells in human glioblastoma. *Brain* 2011; 134(Pt 5): 1331–1343. doi: 10.1093/brain/awr081.
57. Willan PM, Farnie G. Application of stem cell assays for the characterization of cancer stem cells. In: Allan AL (ed.). *Cancer stem cells in solid tumors*. Springer 2011: 259–282.
58. Alison MR, Murphy G, Leedham S. Stem cells and cancer: a deadly mix. *Cell Tissue Res* 2008; 331(1): 109–124.
59. Storms RW, Trujillo AP, Springer JB et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(16): 9118–9123.