UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EMANUELA SENJOR

MAGISTRSKA NALOGA

IZRAŽANJE CISTATINA F V TUMORSKIH CELICAH

EXPRESSION OF CYSTATIN F IN TUMOR CELLS

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala Inštitutu Jožef Stefan pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom dr. Milice Perišić Nanut. Imunohistokemijo sem opravila na Nacionalnem inštitutu za biologijo na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka ob pomoči dr. Barbare Breznik.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Janku Kosu nasvete pri delu ter pisanju in somentorici dr. Milici Perišić Nanut za potrpežljivost, nasvete in spodbudo.

Zahvaljujem se prof. dr. Romanu Bošnjaku, dr. med in Andreju Porčniku, dr. med. za posredovane podatke o pacientih z glioblastomom. Zahvaljujem se tudi dr. Clari Limbaeck-Stokin za pripravo histoloških rezin in dr. Barbari Breznik za uvajanje v postopke imunohistokemije. Članoma komisije prof. dr. Alešu Obrezi in doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar se zahvaljujem za pregled magistrske naloge.

Rada bi se zahvalila vsem, ki so mi delali družbo v ŠSSFD, DŠFS, ŠS FFA in ekipi RC 40. EPSA Letnega kongresa za najlepša študentska leta. Za vso podporo se zahvaljujem tudi svoji družini in tebi Marko.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Janka Kosa in somentorja dr. Milice Perišić Nanut.

Emanuela Senjor

Predsednik komisije: prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

1 Vsebina

1.1 Kazalo

1 Vsebina i
1.1 Kazalo i
1.2 Kazalo slik ii
1.3 Kazalo preglednic iii
2 Povzetek iv
3 Abstract v
4 Seznam okrajšav vi
5 Uvod 1
5.1 Cistatini 1
5.1.1 Cistatin F 1
5.1.2 Vloga cistatina F v imunskem sistemu 3
5.1.3 Vloga cistatina F pri raku 6
6 Načrt za delo ali delovna hipoteza 15
7 Materiali in metode 16
7.1 Materiali 16
7.1.1 Laboratorijska oprema 16
7.1.2 Kemikalije 16
7.1.3 Celične linije 18
7.1.4 Protitelesa 19
7.1.5 Vzorci GBM 20
7.2 Metode 20
7.2.1 Imunohistokemija 20
7.2.2 Gojenje sesalskih celičnih kultur 26
7.2.3 Izražanje cistatina F v kokulturah celičnih linij 27
7.2.4 Imunofluorescenčno označevanje cistatina F v kokulturah 34
7.2.5 Encimska kinetika 36
8 Rezultati 38
8.1 Cistatin F v vzorcih glioblastoma 38
8.1.1 Preverjanje specifičnosti protiteles 38
8.1.2 Izražanje cistatina F v rezinah glioblastoma 38
8.1.3 Kolokalizacija cistatina F z različnimi celičnimi označevalci 39
8.2 Cistatin F se privzema v tumorske celice v kokulturah z imunskimi celicami 42
8.3 Lokalizacija cistatina F v celicah 44
8.4 Aktivnost katepsina C v U251 MG 47
9 Razprava 48
10 Sklepi 53
11 Literatura 54

1.2 Kazalo slik

Slika 1: A: Shematsko predstavljena struktura monomerne oblike cistatina F. Vezani oligosaharidi so predstavljeni v zelenem. Cisteini, ki sodelujejo v disulfidni vezi so predstavljeni z rdečo barvo. B: Shematsko predstavljen dimerni cistatin F z vezanimi oligosaharidi (zeleno). Povzeto po (5). 2

Slika 2: Sinteza, lokalizacija in transport cistatina F. Povzeto po (7). 2

Slika 3: Vloga cistatina F v citotoksičnih celicah. 5

Slika 4: Shematsko predstavljene poglavitne značilnosti rakavih celic. Povzeto po (23). 6

Slika 5: Povzetek mehanizmov s katerimi rakave celice uidejo imunskemu sistemu. Povzeto po (25). 8

Slika 6: Tumorske celice lahko vplivajo na citotoksično aktivnost NK celic, direktno preko sproščanja cistatina F ali posredno preko monocitov in makrofagov, ki se nahajajo v tumorskem mikrookolju. 10

Slika 7: Encimske pretvorbe, ki jih katalizirata IDH in mutirani IDH. Povzeto po (32). 11

Slika 8: A: ($p<0,01$). B: GBM-oligodendrogliom/oligoastrocitom/astrocitom in astrocitom-oligodendrogliom: $p<0,001$ C: IV-II, IV-III, III-II: $p<0,001$. D: $p<0,01$. E: $p<0,001$. F: $p<0,001$ (47). 14

Slika 9: Shematski prikaz SDS-PAGE. Povzeto po (57). 30

Slika 10: Shematski prikaz metode prenosa western, povzeto po (58). 33

Slika 11: Shematičen prikaz delovanja fluorescenčnega invertnega konfokalnega mikroskopa. Povzeto po (60). 35

Slika 12: Prikaz meritve encimske reakcije. 37

Slika 13: A: Mišja vranica kot pozitivna kontrola. Rjavo obarvanje predstavlja cistatin F. B: Mišja vranica kot negativna kontrola (brez dodatka primarnih protiteles). Obarvana so le jedra in citoplazma celic s hematoksilinom. 38

Slika 14: Reprezentativne slike GBM rezin. Rjavo obarvanje predstavlja cistatin F. 39

Slika 15: A: Obarvano s protitelesi za CD68 B: Obarvano s protitelesi za GFAP C: Obarvano s protitelesi za cistatin F D: Kontrola brez primarnih protiteles. 40

Slika 16: Kolokalizacija cistatina F in CD68. Vidimo da se del cistatina F nahaja v mikrogliji/makrofagih, vendar je rdeče obarvanje prisotno tudi izven mikroglije/makrofagov. 41

Slika 17: Kolokalizacija GFAP in cistatina F. Rdeče obarvanje je prisotno tudi na mestih, kjer celični označevalec GFAP ni prisoten. 41

Slika 18: Kolokalizacija CD9 in cistatina F. Intenziteta obarvanja je različna na različnih delih tumorskih rezin. 41

Slika 19: GBM rezina inkubirana s protitelesi za CD133 in cistatin F. Modrega obarvanja nismo zaznali. 42
Slika 20: WB analiza celičnih lizatov na prisotnost cistatina F. Lise na višini 35 kDa predstavljajo dimerni cistatin F, na 15kDa pa monomerni cistatin F. Rezultati kokultur U-251 MG in U-937 celic po 3 (A), 5 (B) in 7 (C) dnevnem gojenju. Kokulture HeLa in U-937 (D) ter SH-SY5Y in U-937 (E) celic po 7 dnevnem gojenju. 43
Slika 21: Celice inkubirane samo s sekundarnimi protitelesi. Kokulture celičnih linij U-937 in A: U-251 MG, B: HeLa, C: SH-SY5Y. 44
Slika 22: Imunofluorescenčno označene kokulture U-251 MG in U-937 celic po 3 (A) in 7 (B) dneh inkubacije. 45
Slika 23: Imunofluorescenčno označene kokulture U-251 MG in U-937 celic stimuliranih s PMA po 3 (A) in 5 (B) dneh inkubacije. 45
Slika 24: Imunofluorescenčno označene kokulture HeLa in U-937 celic po 3 (A) in 7 (B) dneh inkubacije. 45
Slika 25: Imunofluorescenčno označene kokulture HeLa in U-937 celic stimuliranih s PMA po 3 (A) in 5 (B) dneh inkubacije. 46
Slika 26: Imunofluorescenčno označene kokulture SH-SY5Y in U-937 celic po 3 (A) in 7 (B) dneh inkubacije. 46
Slika 27: Imunofluorescenčno označene kokulture SH-SY5Y in U-937 celic stimuliranih s PMA po 3 (A) in 5 (B) dneh inkubacije. 46
Slika 28: Aktivnost katepsina C v lizatih kokultur U-251 MG in U-937. 47

1.3 Kazalo preglednic

Preglednica I: Seznam uporabljenih okrajšav vi
Preglednica II: Seznam uporabljene laboratorijske opreme 16
Preglednica III: Seznam uporabljenih kemikalij 16
Preglednica IV: Seznam uporabljenih protiteles 19
Preglednica V: Podatki o bolnikih z GBM 20

2 Povzetek

Cistatin F spada v skupino cistatinov tipa II, ki so inhibitorji cisteinskih peptidaz. Nahaja se v endosomih/lizosomih in se izloča iz celic kot dimer, povezan preko disulfidnih vezi. Za razliko od ostalih cistatinov tipa II znaten delež cistatina F ostane znotrajcelično. Po odcepitvi 15 aminokislin na N-koncu in pretvorbi v monomerno obliko postane cistatin F inhibitor katepsina C. Izločeni cistatin F se lahko privzema v okoliške celice, kar omogoča *in trans* nadzor proteolize. Tako na primer povišana zunajcelična koncentracija cistatina F vodi v zmanjšano aktivnost katepsina C v NK celicah in posledično do zmanjšane citotoksičnosti. V tumorskem mikrookolju so lahko vir cistatina F različne imunske celice (monociti, makrofagi, dendritične celice) ali pa tumorske celice. Namen magistrske naloge je bil preučiti, ali je cistatin F v glioblastomu in določiti tip celic, ki ga izražajo. Preverili smo tudi izražanje cistatina F v tumorskih celičnih linijah U-251 MG, HeLa in SH-SY5Y. Za določanje cistatina F smo pri glioblastomu uporabili parafinske tkivne rezine in imunohistokemijsko določanje, v celičnih linijah pa smo cistatin F določali s prenosom western. Pri tem smo U-251 MG celično linijo uporabili kot *in vitro* model glioblastoma, promonocitne U-937 celice pa kot vir cistatina F. Vpliv kokultivacije z U-937 na vsebnost cistatina F smo preučevali tudi v HeLa in SH-SY5Y linijah. Lokalizacijo cistatina F v kokulturah celic smo določali s fluorescenčno konfokalno mikroskopijo. V lizatih celic U-251 MG in U-937 smo določali tudi encimsko aktivnost katepsina C. Ugotovili smo, da je cistatin F prisoten v glioblastomu. Poleg makrofagov in mikroglije ga izražajo tudi tumorske celice. Dokazali smo, da U-251 MG celice že po tridnevnem gojenju z U-937 celicami privzamejo cistatin F, ki v endosomih/lizosomih preide v monomerno obliko. Kljub temu spremenjene aktivnosti katepsina C v U-251 MG nismo uspeli dokazati. HeLa in SH-SY5Y so privzele cistatin F šele po sedmih dneh skupnega gojenja, privzeti cistatin F pa je bil v teh celicah prisoten v neaktivni dimerni obliki. Rezultati našega dela kažejo, da so tudi tumorske celice lahko vir cistatina F, ki lahko po privzemu v citotoksične celice regulira njihovo delovanje.

Ključne besede: cistatin F, glioblastom, imunski pobeg tumorskih celic, katepsin C

3 Abstract

Cystatin F belongs to type II cystatins, inhibitors of cysteine proteases. It is localized in endosomes/lysosomes and secreted as inactive disulfide linked dimer. Unlike other type II cystatins, proportion of cystatin F is retained intracellularly. N-terminal truncation of 15 amino acids and monomerisation makes it a strong inhibitor of cathepsin C. Cystatin F can be taken up by neighboring cells which enables *in trans* regulation of proteolysis. Increased extracellular concentration of cystatin F leads to decreased activity of cathepsin C and consequently to decreased NK cell cytotoxicity. Thus, increased cystatin F concentration in tumor microenvironment can negatively impact antitumor immunity. The source of cystatin F in tumor microenvironment can either be different immune cells (monocytes, macrophages, dendritic cells) or tumor cells. The aim of this study was to examine the expression of cystatin F in cells of glioblastoma and define the type of cells expressing it. We also examined the expression of cystatin F in tumor cell lines U-251 MG, HeLa and SH-SY5Y. Formalin-fixed paraffin-embedded tissue of glioblastoma patients was used for immunohistochemical detection of cystatin F, western blot method was used for detection of cystatin F in cell lines. As *in vitro* glioblastoma model, we used U-251 MG cell line. U-937 cells were used as the source of cystatin F. Same experiments were also done with HeLa and SH-SY5Y cell lines. The localization of cystatin F was analyzed using fluorescent confocal microscopy. We have also tested the activity of cathepsin C in U-251 MG and U-937 cell lysates. Results show that cystatin F is present in the glioblastoma tissue. We have also shown, that cystatin F is expressed not only in macrophages and microglia cells but also in tumor cells. After co-cultivation with U-937 cells, U-251 MG contain cystatin F that is converted in endosomes/lysosomes to monomeric form, already after three days of co-cultivation. Nevertheless, we were not able to prove a change in cathepsin C activity. HeLa and SH-SY5Y cells also contain cystatin F but only after 7 days of co-cultivation with U-937 cells and only in the inactive dimeric form. Results of our work show, that tumor cells can also be a source of cystatin F, which can regulate cytotoxic cells activity after the uptake of cystatin F.

Key words: cystatin F, glioblastoma, cancer immune escape, cathepsin C

4 Seznam okrajšav

Preglednica I: Seznam uporabljenih okrajšav

Kratica/ simbol	Pomen
AK	Aminokislina
AP	Alkalna fosfataza
APC	Antigen predstavitvena celica
Asn	Asparagin
BCR	B celični receptor
BSA	Goveji serumski albumin
CD	Cluster of differentiation (celična površinska molekula)
CMAP	Cystatin-like metastasis associated protein
CTL	Citotoksični limfociti T
DAMP	Damage associated molecular pattern (s poškodbami povezan molekularni vzorec)
dH_2O	Destilirana voda
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
DTT	Ditiotreitol
FBS HI	Fetal bovine serum, heat inactivated (fetusni serum goveda, inaktiviran s toploto)
GAPDH	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GBM	Glioblastom
GFAP	Glialni fibrilarni kisli protein
Gly	Glicin
HRP	Hrenova peroksidaza
IDH	Izocitrat dehidrogenaza
Ig	Imunoglobulin
IL	Interlevkin
MGMT	Metilgvanin metiltransferaza
MHC	Poglavitni histokompatibilnostni kompleks
NK	Naravna celica ubijalka
PAMP	Pathogen associated molecular pattern (s patogeni povezan

	molekularni vzorec)
PBS	Fosfatni pufer
PFA	Paraformaldehid
PGE	Prostaglandin
Phe	Fenilalanin
PMA	Forbol 12-miristat 13-acetat
PRR	Pattern recognition receptor (receptorji za prepoznavanje vzorcev)
PVDF	Poliviniliden difluorid
SDS	Natrijev lavrilsulfat
SDS-PAGE	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata
T	Temperatura
TCR	T-celični receptor
TEMED	N',N'- tetrametiletilendiamin
TGF	Tumorski rastni dejavnik
TMZ	Temozolomid
TNF	Dejavnik tumorske nekroze
UL	Univerza v Ljubljani
VEGF	Vaskularni endotelijski rastni dejavnik
WB	Prenos western
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija

5 Uvod

5.1 Cistatini

Cistatini so reverzibilni zaviralci lizosomskih cisteinskih peptidaz. Razdelimo jih v tri skupine:

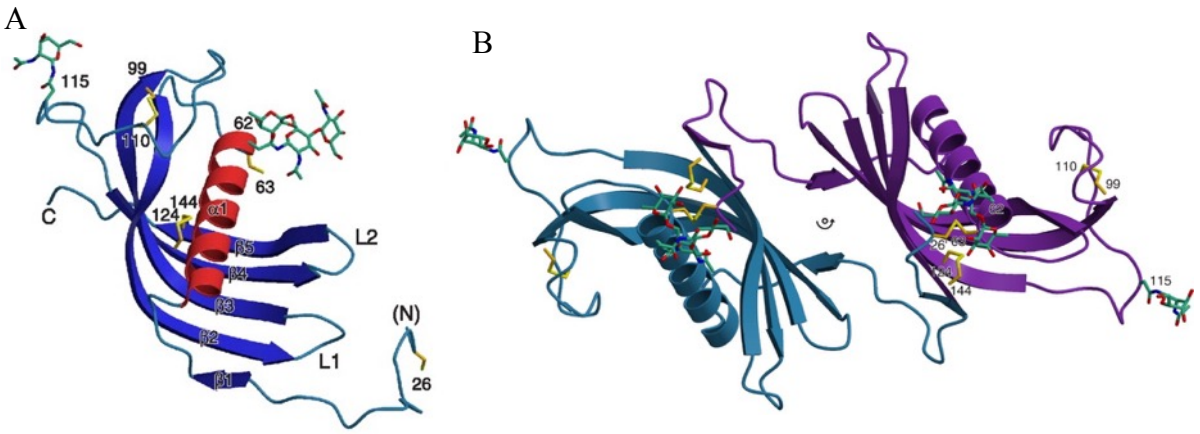
- Cistatini tipa I: stefini
    - Stefin A, stefin B
- Cistatini tipa II: cistatini
    - Cistatin C, D, E/M, F, S, SA
- Cistatini tipa III: kininogeni (1)

Stefini so citosolni proteini, ki vsebujejo približno 100 AK. Niso glikozilirani in ne vsebujejo disulfidnih vezi (2). Cistatini tipa II so zunajcelični proteini, so glikozilirani in vsebujejo večinoma dve disulfidni vezi. Njihova dolžina obsega približno 120 AK. Kininogeni so plazemski proteini, ki vsebujejo tri domene, ki so podobne cistatinom tipa II. Imajo 8 disulfidnih vezi in so glikozilirani. Splošna fiziološka vloga cistatinov v telesu je preprečevanje nenadzorovane proteolize in poškodb celic in tkiv zaradi delovanja peptidaz (3). Spremenjeno aktivnost cistatinov zaznamo v stanju bolezni, kot npr. rak in vnetna obolenja (revmatoidni artritis, periodontitis) (4).

5.1.1 Cistatin F

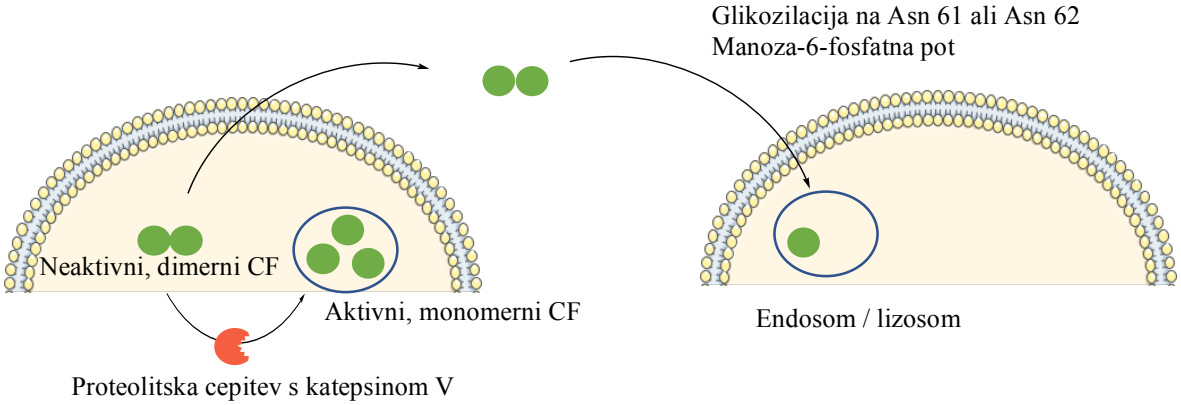
Cistatin F (tudi levkocistatin in CMAP (cystatine-like metastasis associated protein)) je 145 AK dolg protein iz družine cistatinov tipa II. Cistatin F je sintetiziran kot dimerna molekula, povezana preko disulfidne vezi. Za razliko od ostalih cistatinov tipa II, ki tvorijo intramolekularni disulfidni vezi med cisteini 124 in 144 ter 99 in 110, cistatin F lahko tvori dodatno intermolekularno disulfidno vez preko cisteinov 26 in 63 (5). Cistatin F v dimerni obliki ni aktiven za peptidaze klana CA, zato je za njegovo delovanje potrebna pretvorba v monomerno obliko. Pretvorba do monomerne oblike lahko poteče z redukcijo disulfidne vezi. V *in vitro* pogojih potrebujemo velike koncentracije reducentov za monomerizacijo, zato je bolj verjetno, da *in vivo* pretvorba v aktivno monomerno obliko poteka preko proteolitske cepitve, najverjetneje s katepsinom V (6). Njegova posebnost je v tem, da ne deluje zunajcelično, tako kot ostali cistatini tipa II (2). Kljub temu, da cistatin F v svoji strukturi vsebuje 19 AK dolg signalni peptid in se del molekul cistatina F izloča iz celic v

neaktivni dimerni obliki, je delež cistatina F preusmerjen znotrajcelično v endosomski retikulum in v lizosome (1). Cistatin F je glikoziliran na mestih Asn 62 in Asn 115. Ti oligosaharidi prispevajo k tvorbi vodikovih vezi v dimernem cistatinu F in preprečujejo enostavno redukcijo cistatina F v monomerno obliko (5). Prav tako je možna glikozilacija na Asn 61. Struktura monomerne in dimerne oblike cistatina F je predstavljena na sliki 1.



Slika 1: A: Shematsko predstavljena struktura monomerne oblike cistatina F. Vezani oligosaharidi so predstavljeni v zelenem. Cisteini, ki sodelujejo v disulfidni vezi so predstavljeni z rdečo barvo. B: Shematsko predstavljen dimerni cistatin F z vezanimi oligosaharidi (zeleno). Povzeto po (5).

Glikozilacija na Asn 61 ali na Asn 62 je nujna za znotrajcelično ciljanje cistatina F v endosome in lizosome. Glikozilacija na Asn 61 ali na Asn 62 in dimerna oblika cistatina F je potrebna tudi za internalizacijo cistatina F preko manoza-6-fosfatne poti v različne okoliške celice, kot je prikazano na sliki 2 (7).



Slika 2: Sinteza, lokalizacija in transport cistatina F. Povzeto po (7).

Aktivni monomerni cistatin F zavira delovanje katepsinov L, F, K, V in legumaina, šibko zaviralno deluje tudi na katepsin S in H, po odcepitvi 15 AK na N- terminalnem koncu pa

zavira tudi katepsin C (3,8). Cistatin F zavira legumain v dimerni in v monomerni obliki (9). Izločeni zunajcelični cistatin F lahko preko transporta v okoliške celice regulira proteolitsko aktivnost omenjenih encimov *in trans* (7,10). Cistatin F je v fizioloških pogojih izražen v celicah imunskega sistema, in sicer: citotoksičnih T limfocitih (CTL), NK celicah, monocitih in dendritičnih celicah (1). Te celice pogosto najdemo v tumorskem mikrookolju. Prav tako se cistatin F izraža v mikrogliji, v fazi akutne demielinizacije in remielinizacije (11).

5.1.2 Vloga cistatina F v imunskem sistemu

5.1.2.1 Imunski sistem

Imunski sistem predstavlja način obrambe telesa pred tujki. Najpomembnejše lastnosti imunskega sistema so, da deluje znotraj celotnega telesa, ima sposobnost razlikovanja med telesu lastnimi dejavniki in tujimi dejavniki, v okviru pridobljene imunosti pa deluje specifično in ohranja imunski spomin. Sestavljajo ga mehanske in kemijske bariere, limfatični organi in tkiva, celice imunskega sistema in topni dejavniki, kot so protitelesa, citokini, interferoni, receptorji. Delovanje imunskega sistema razdelimo na dva večja mehanizma- prirojeno oz. naravno imunost in pridobljeno imunost. Naravna imunost predstavlja prvo linijo obrambe pred patogeni. Sestavljajo jo mehanske (koža, sluznice), kemijske (pH, prebavni encimi, žolčne kisline) in mikrobiološke ovire (produkti nepatogenih komensalnih bakterij). Celice, ki sodelujejo pri prirojeni imunosti, so mieloidnega izvora – monociti, makrofagi, nevtrofilci, eozinofilci, mastociti in dendritične celice in limfoidnega izvora – NK celice. Prirojeni imunski odziv deluje takoj. Če patogenemu dejavniku uspe prodreti v tkiva, ga prepoznajo, fagocitirajo in uničujejo fagociti in sproži se vnetni odziv, aktivira se tudi komplement. Po nekaj dneh se aktivira tudi pridobljena imunost. Antigen predstavitvene celice (APC) preidejo iz tkiv v sekundarne limfatične organe in predstavijo antigene na svoji površini preko MHC molekul T-celičnemu receptorju (TCR) na limfocitih T. Antigene vežejo tudi BCR na limfocitih B. Naivni B in T limfociti, ki ustrezno prepoznajo antigene, se diferencirajo v efektorske celice. Limfociti B po pretvorbi v plazmatke proizvajajo protitelesa, ki so nosilci humoralne imunosti. Protitelesa omogočajo nevtralizacijo toksinov, opsonizirajo antigen in tako olajšajo fagocitozo, aktivirajo komplement, sprožijo od protiteles odvisno celično citotoksičnost NK celic. Predstavitev antigenov preko MHC I molekul aktivira

citotoksične limfocite T, preko MHC II pa T celice pomagalke. T celice pomagalke omogočajo sproščanje citokinov, ki sprožijo aktivacijo makrofagov, vnetje, aktivacijo limfocitov B in tudi aktivacijo citotoksičnih limfocitov T. Slednji preko citotoksičnih mediatorjev neposredno odstranjujejo tarčne celice (12).

- ***Citotoksične celice imunskega sistema***

Glavne citotoksične celice imunskega sistema, ki delujejo na tumorske celice, so CTL, ki so del pridobljene imunosti in NK celice, ki so del prirojene imunosti. Tarče NK celic so z virusi okužene celice, celice spremenjene zaradi maligne transformacije in senescenčne celice. NK celice nastajajo v kostnem mozgu in dozorevajo v sekundarnih limfatičnih organih. Za aktivacijo citotoksičnega delovanja NK celic je pomembno ravnovesje aktivirajočih in zaviralnih signalov (3). NK celice imajo pomembno vlogo pri imunskem nadzoru raka (9) in lahko odstranjujejo tudi tumorske matične celice (13). CTL nastajajo v timusu in dozorijo po stiku z antigenom. Antigen zaznajo TCR, ki zazna antigen, vezan na MHC I molekuli na APC, npr. dendritični celici. Poleg predstavitve antigena je pomemben tudi koaktivacijski signal in mikrookolje, ki ga ustvarja APC. Po aktivaciji CTL se sproži celična delitev (klonska ekspanzija) in razvoj citotoksičnih granul (3). Mehanizem citotoksičnosti NK celic in CTL je enak, vendar pa prepoznava tarčne celice poteka preko različnih receptorjev, kar je primer redundantnosti imunskega sistema. Glavna mehanizma citotoksičnosti pri obeh vrstah celic potekata preko TNF-α receptorjev (Fas) ali preko delovanja citotoksičnih granul. V obeh primerih se v tarčnih celicah aktivirajo kaspaze, ki povzročijo apoptozo (14). Citotoksične granule vsebujejo perforin, grancime in peptidaze, kot so katepsin C, L in H. Perforin je encim, ki tvori ireverzibilne pore v membrani tarčne celice, skozi katere grancimi prodrejo v celico. Njegovo delovanje je odvisno od proteolitske cepitve prekurzorja z katepsinom L, od kalcijevih ionov in pH (9). Pri nizkem pH perforin ne more vezati kalcijevih ionov in ne more polimerizirati. S shranjevanjem perforina v lizosomskih granulah se tako citotoksične celice zaščitijo pred toksičnimi učinki perforina in grancimov (15). Grancimi so serinske peptidaze, ki se sintetizirajo v obliki proencima. Po proteolitični cepitvi dipeptida na N-terminalnem koncu se pretvorijo v aktivno obliko. To proteolitično cepitev katalizirata katepsina C in H (3).

- ***Monociti, makrofagi in vnetje***

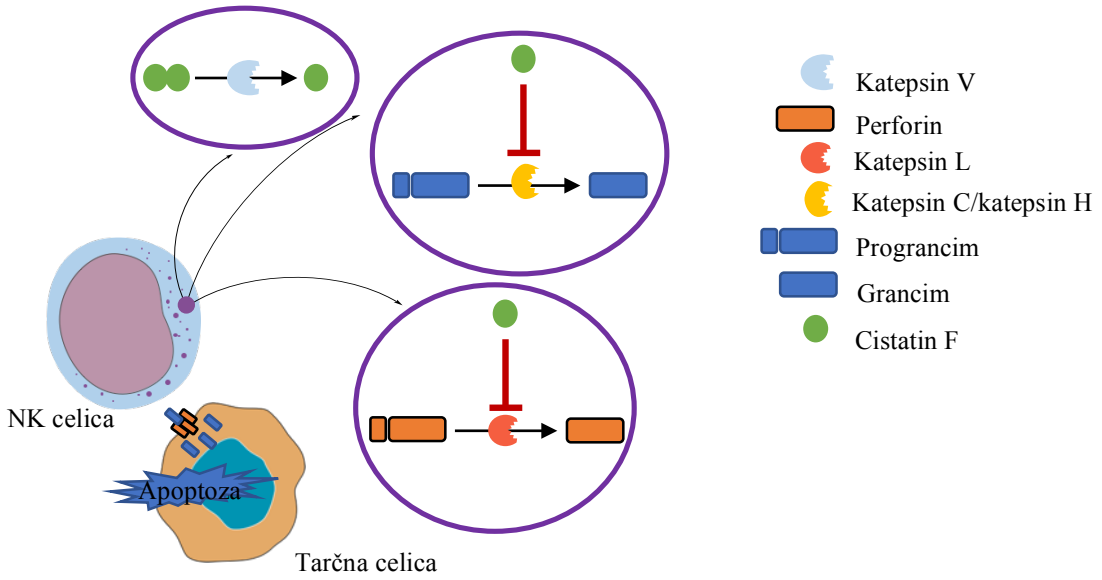
Monociti so glavne mononuklearne celice v krvnem obtoku, ki nastajajo v kostnem mozgu. Ob prisotnosti vnetja migrirajo v tkiva, kjer diferencirajo v makrofage ali dendritične

celice. Vloga makrofagov je fagocitoza tujkov in izločanje citokinov, reaktivnih kisikovih spojin, prostaglandinov pa tudi predstavljati antigene limfocitom T (12)... Vnetje predstavlja mehanizem za uspešno regeneracijo tkiv in odstranitev patogenov. V kolikor pa vnetje postane kronično pa ima lahko tudi negativne posledice. Povečano sproščanje peptidaz, povečana proliferacija celic in kopičenje imunosupresivnih celic na mestu vnetja lahko povzroči napredovanje tumorja (16).

V *in vitro* pogojih za preučevanje monocitov največkrat uporabljajo promonocitno U-937 celično linijo. U-937 celice izražajo cistatin F. Iz celic se izloča v dimerni N-glikozilirani obliki, znotrajcelično pa najdemo tako neaktivni dimer (predvsem v endoplazemskem retikulumu in Golgijevem aparatu) kot aktivno monomerno, na N-koncu skrajšano obliko cistatina F (v endosomskih in lizosomskih veziklih) (17,18).

5.1.2.2 Cistatin F v imunskem sistemu

V procesu dozorevanja dendritičnih celic je cistatin F povišano izražen (19) in kolokalizira s katepsinom L. Z zaviranjem katepsina L lahko cistatin F zavira dozorevanje dendritičnih celic, saj katepsin L sodeluje pri pretvarjanju prokatepsina X v katepsin X, ki je potreben za celično adhezijo (20). Cistatin F je pomemben tudi pri razvoju eozinofilcev, saj je vpleten v tvorbo granul (21). Kot prikazano na sliki 3, je cistatin F pomemben regulator CTL in NK celic, saj regulira pretvorbo prograncimov v grancime preko delovanja na katepsina C in H (3) ter proteolitsko aktivacijo perforina (9). Povečano izražanje cistatina F in zaradi tega znižana aktivnost katepsinov C in H lahko v NK celicah povzroči anergijo in zmanjšano citotoksičnost NK celic (22).

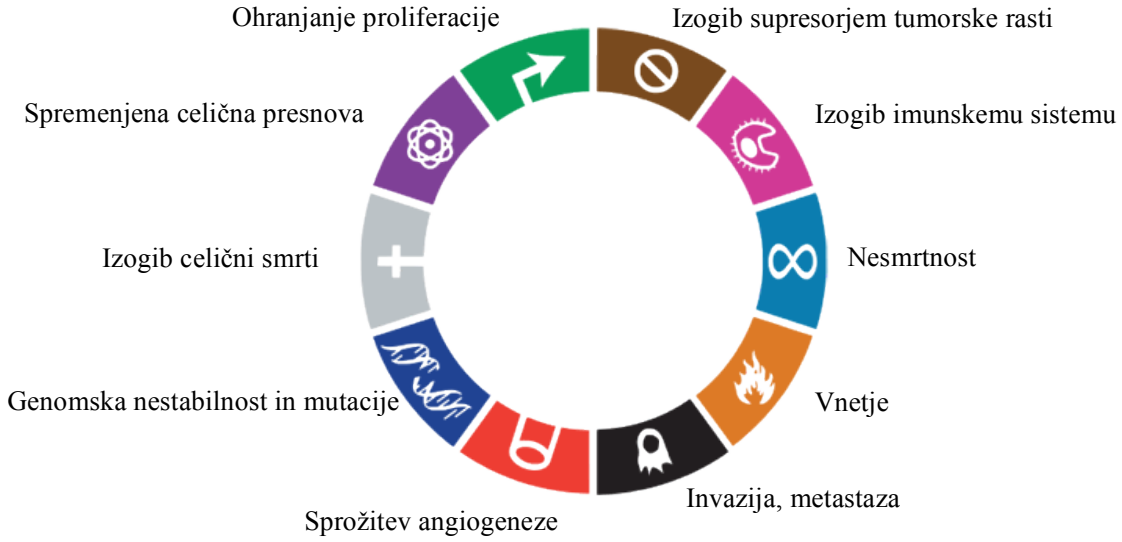


Slika 3: Vloga cistatina F v citotoksičnih celicah.

5.1.3 *Vloga cistatina F pri raku*

5.1.3.1 *Rak*

Rakave celice v svojem razvoju pridobijo številne lastnosti, ki jim omogočijo preživetje in proliferacijo. Poglavitne lastnosti rakavih celic so povzete na sliki 4.



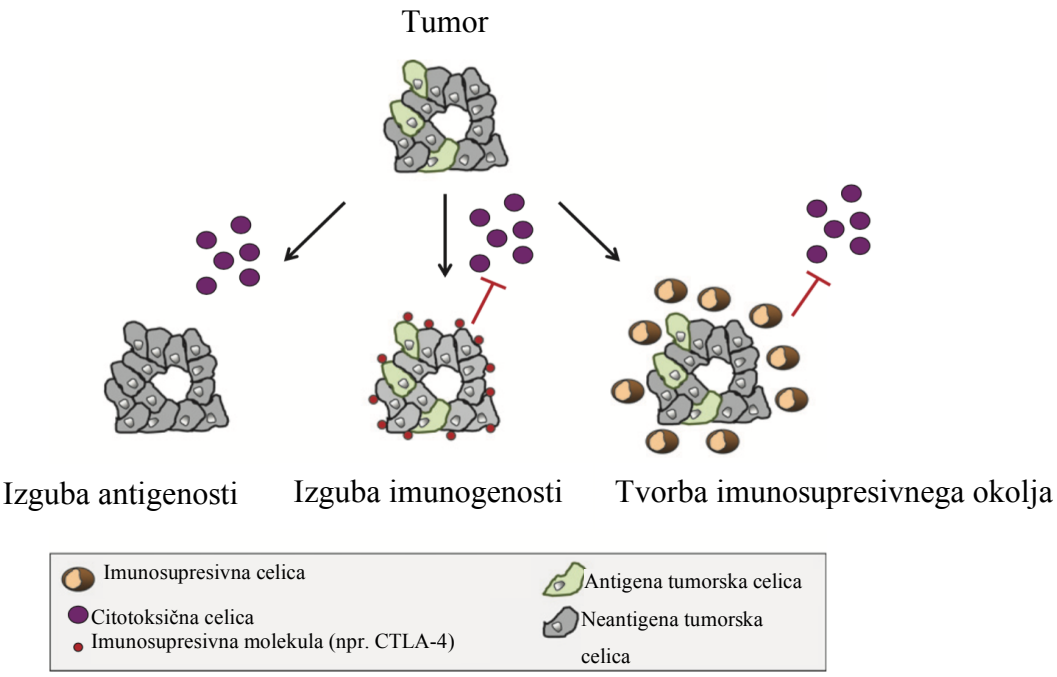
Slika 4: Shematsko predstavljene poglavitne značilnosti rakavih celic. Povzeto po (23).

Rakave celice ohranjajo konstantno aktivacijo proliferacije, tako da začnejo izražati rastne dejavnike, oz. stimulirajo okoliške celice k njihovemu izražanju, povečano izražajo receptorje za rastne dejavnike ali konstitutivno aktivirajo signalne poti. Rakave celice prav tako izgubijo kontaktno inhibicijo, ki je značilna za normalne celice. Te ob tesnem stiku z drugimi celicami prenehajo proliferirati. Prav tako se morajo rakave celice izogniti supresorskim dejavnikom, ki zavirajo celično rast. Ti so predvsem odvisni od delovanja tumor supresorskih genov, ki regulirajo celični cikel. Primer sta gena RB, ki kodira protein Rb in TP53, ki kodira protein p53. Rb na podlagi znotraj in zunajceličnih signalov odloča ali naj celica preide v naslednjo fazo celičnega cikla, p53 pa lahko celični cikel ustavi, ko zazna nepravilnosti v genomu. Če se nepravilnosti odpravijo, celica lahko nadaljuje celični cikel, če pa so napake prevelike, p53 sproži apoptozo. Zato p53 imenujemo tudi varuh genoma. Poškodbe v popravljalnih mehanizmih DNA povzročijo genomsko nestabilnost in kopičenje mutacij, ki omogočajo prednost za progresijo posameznih celic in njihovo prevlado v lokalnem tkivu. Rakave celice postanejo nesmrtne. Začnejo izražati encim telomerazo, ki omogoča podaljševanje telomer. Celični smrti se izognejo tudi tako, da

začnejo povečano izražati protiapoptotične dejavnike in zmanjšano izražati proapoptotične dejavnike. Rakave celice, tako kot normalne celice, potrebujejo za svoje delovanje hranila in kisik, prav tako pa morajo izločati presnovke in CO_2. Rakave celice se večkrat znajdejo v okolju z manj razpoložljivega kisika (npr. znotraj tumorske mase). Takrat spremenijo svojo energijsko presnovo, tako da večino energije dobijo preko pretvorbe piruvata v laktat, ne pa s Krebsovim ciklom. Ta način, ki je energetsko manj učinkovit, se ohrani tudi, ko se spet vzpostavijo aerobni pogoji. Temu učinku rečemo tudi Warburgov efekt. Rakave celice povečajo učinkovitost takšnega pridobivanja energije, tako da na površini celice izražajo več GLUT1 glukoznih transporterjev in tako povečajo privzem glukoze. Da se poveča preskrba tumorskega tkiva, so potrebne nove žile, ki bodo oskrbovale tumorsko tkivo. Zgodi se angiogeni preklop, ki omogoča nastajanje novih žil. Te so krhke in prepustne, kar v nadaljnjem razvoju olajša prehod tumorskih celic v krvni obtok in nastanek metastaz. Nekatere tumorske celice pridobijo sposobnost invazije v lokalno tkivo, kar jim omogoča tvorbo zasevkov oziroma metastaz. Proces se začne z invazijo v lokalno tkivo, sledi intravazacija v bližnje žile in potovanje po krvnem in limfnem obtoku do drugih tkiv. Po ekstravazaciji iz žil se najprej tvorijo mikrometastaze, ki po prilagoditvi na novo mikrookolje kolonizirajo v novem tkivu in tvorijo metastaze. Pomembno vlogo pri invaziji igrajo okoliške celice v tumorskem mikrookolju. V tumorjih najdemo celice naravne in pridobljene imunosti. Te imajo v progresiji raka dvojno vlogo. Po eni strani zaradi povzročanja vnetja delujejo protumorigeno. Sproščajo namreč rastne dejavnike, proangiogene dejavnike, encime, ki razgrajujejo zunajcelični matriks ter omogočajo invazijo in metastaziranje. Prav tako sproščajo reaktivne kisikove spojine, ki lahko delujejo mutageno. Po drugi strani pa celice imunskega sistema delujejo protitumorsko (23). Rakave celice so v interakciji s celicami imunskega sistema v procesu imunskega urejanja. V prvi fazi pride do uničenja tumorskih celic. Imunski nadzor omogoča zaznavanje visokoimunogenih klonov rakavih celic in jih uničuje. Ostanejo pa nizkoimunogeni kloni rakavih celic. Ti preidejo v fazo ravnovesja z imunskim sistemom. Dokler celice ne pridobijo dodatnih značilnosti, ki jim omogočijo izogib imunskemu sistemu, se njihovo število ne spreminja. Po pridobitvi novih lastnosti pa rakave celice lahko uidejo imunskemu sistemu, lahko rastejo in tvorijo tumor (24). Pri odstranjevanju rakavih celic so pomembne predvsem NK celice, CTL in CD4+ Th1 celice pomagalke (23). Mehanizme, s katerimi rakave celice uidejo imunskemu sistemu, lahko povzamemo s tremi glavnimi

značilnostmi, ki so povzete na sliki 5. Rakave celice lahko izgubijo svojo antigenost, imunogenost ali pa tvorijo imunosupresivno okolje.

- Mehanizmi izogiba tumorjev imunskemu sistemu



Slika 5: Povzetek mehanizmov s katerimi rakave celice uidejo imunskemu sistemu. Povzeto po (25).

- **Izguba antigenosti**

- **Spremembe tumorskih antigenov**

Tumorske celice izhajajo iz naših lastnih celic. Tako imajo na svoji površini večinoma telesu lastne antigene, na katere so limfociti T v svojem razvoju razvili toleranco (24). Antigeni, povezani s tumorji, lahko izhajajo iz virusnih proteinov ali mutacij naših lastnih antigenov (25). Tumorske celice svoje antigene lahko začasno ali trajno umaknejo iz površine celic z endocitozo oziroma jih spremenijo preko mutagenih učinkov (24). Prav tako pa imunski sistem preko imunskega urejanja omogoča preživetje rakavih celic z manj imunogenimi tumorskimi antigeni (25).

- **Spremembe v signalnih poteh, ki vodijo do apoptoze**

Rakave celice lahko sproščajo citokine, kot so IL-4, IL-10, PGE2, TGF-β. Ti povečajo izražanje antiapoptotičnih molekul (npr. Bcl-L). Prav tako celice lahko zmanjšajo ekspresijo smrtnega receptorja Fas. Z zmanjšanjem izražanja MHC I molekul na svoji površini se rakave celice lahko izognejo CTL. Nekatere rakave celice (npr. v multiplem

melanomu) pa na svoji površini začnejo povečano izražati MHC I in se tako izognejo delovanju NK celicam. Učinkom citotoksičnih celic se rakave celice lahko izognejo tudi z izražanjem zaviralcev signalne poti perforina in grancima (24). Enega izmed mehanizmov izogiba učinkom citotoksičnih celic bomo preučevali v tej magistrski nalogi.

- **Sprememba v matičnim celicam podobne rakave celice**

Matične celice na svoji površini izražajo manj MHC I molekul kot normalne celice in skoraj nič MHC II molekul, zato so manj imunogene (26). Rakave celice lahko preidejo v stanje podobno matičnim celicam in se na ta način izognejo delovanju imunskega sistema, čeprav jih še vedno lahko prepoznajo in odstranijo NK celice (13).

- **Izguba imunogenosti**

- **Metabolne spremembe**

Warburgov efekt povzroča povečano izločanje laktata, ki zniža pH v tumorskem mikrookolju. Znižan pH je povezan z generalizirano supresijo CTL, zmanjšano produkcijo citokinov in manjšo aktivacijo perforina (24).

- **Genetske in epigenetske spremembe**

Rakave celice lahko spreminjajo izražanje receptorskih molekul na svoji površini. Zmanjšajo lahko izražanje CD28 receptorja, ki je potreben za aktivacijo TCR ali povečajo izražanje B7-H1, CTLA-4, PD-L1, ki zavirajo aktivacijo TCR in povzročijo anergijo limfocitov T (24).

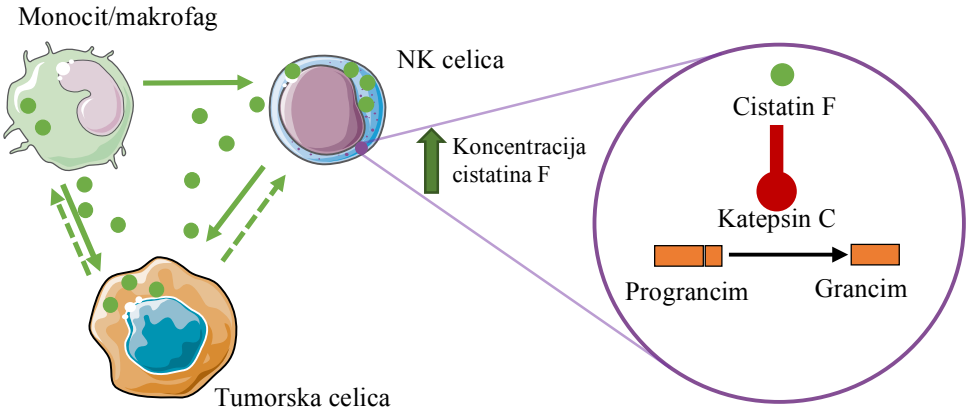
- **Tvorba imunosupresivnega okolja**

- **Vpliv na celice imunskega sistema**

Rakave celice lahko vplivajo na dendritične celice, katerih naloga je predstavljanje zunajceličnih antigenov preko MHC II kompleksa. Rakave celice lahko sprožijo nepravilnosti v diferenciaciji, aktivaciji, zorenju dendritičnih celic. V tumorskem mikrookolju se tako kopičijo nezrele dendritične celice, ki delujejo imunosupresivno in sproščajo TGF-β in IL-10, ki spodbujata imunosupresijo in imajo manjšo sposobnost predstavljanja antigenov. Rakave celice v svoje tumorsko mikrookolje pritegnejo tudi mieloidne imunosupresorske celice in regulatorne limfocite T, ki sproščajo imunosupresivne citokine. Stanje hipoksije prav tako privede do imunosupresije (24).

5.1.3.2 Cistatin F in rak

Povišano izražanje cistatina F je bilo zaznano v kolorektalnih tumorjih in je bilo povezano z večjo možnostjo za metastaziranje v jetra. Pokazano je bilo tudi, da imajo pacienti s kolorektalnim rakom z višjim izražanjem cistatina F nižje možnosti 5-letnega preživetja (27). Prav tako se cistatin F izraža v nekaterih tumorskih celičnih linijah, npr. HL-60 (akutna promielocitna levkemija), COLO 201 (kolorektalni adenokarcinom), G361 (maligni melanom) in T98G (maligni glioblastom) (28). Cistatin F je lahko povišan v samih tumorskih celicah ali pa k temu prispevajo celice v tumorskem mikrookolju (9). Če tumorske celice pridobijo sposobnost izražanja in izločanja cistatina F, lahko zavirajo citotoksično aktivnost NK celic v tumorskem mikrookolju in se na tak način izognejo delovanju imunskega sistema. Prav tako lahko tumorske celice z izločanjem vnetnih dejavnikov pritegnejo večje število imunskih celic v tumorsko mikrookolje in na tak način povečajo koncentracijo cistatina F v tumorskem mikrookolju, kot je shematsko predstavljeno na sliki 6 (9). Izločanje cistatina F lahko zmanjša negativen vpliv peptidaz na razvoj raka preko *in trans* nadzora nad proteolitsko razgradnjo zunajceličnega matriksa (10).

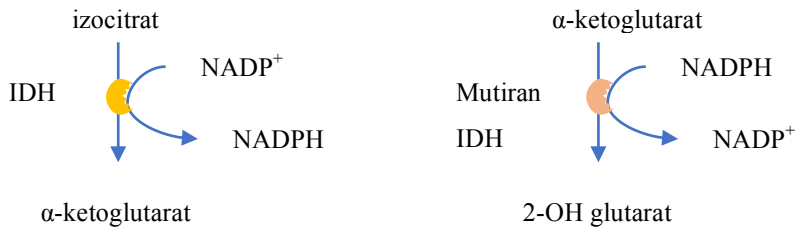


Slika 6: Tumorske celice lahko vplivajo na citotoksično aktivnost NK celic, direktno preko sproščanja cistatina F ali posredno preko monocitov in makrofagov, ki se nahajajo v tumorskem mikrookolju.

5.1.3.3 Glioblastom

Gliom je splošni pojem, ki opisuje primarne možganske tumorje makroglije, kot so astrociti, oligodendrociti in ependimske celice (29). Maligni gliomi so najpogostejši tumorji v možganih odraslih (30). WHO klasifikacija razdeli gliome glede na njihovo histologijo (diferenciacija, anaplazija, agresivnost) in molekularne parametre v 4 skupine

(31). Maligni gliomi spadajo v III (anaplastični astrocitomi, oligoastrocitomi in oligodendrogliomi) in IV skupino (glioblastom (GBM)). IV skupina predstavlja najagresivnejšo obliko glioma z visoko stopnjo dediferenciacije in invazivnosti (29). GBM razdelimo dodatno v dve skupini na podlagi prisotnosti mutacije encima IDH (31). IDH je encim Krebsovega cikla, ki pretvarja izocitrat v α-ketoglutarat. Pri tem nastaja NADPH iz $NADP^+$, ki regenerira glutation in sodeluje pri varovanju celic pred reaktivnimi kisikovimi spojinami. Mutacija v IDH povzroči pretvorbo α-ketoglutarata v 2-hidroksiglutarat, pri čemer se NADPH porablja (32).



Slika 7: Encimske pretvorbe, ki jih katalizirata IDH in mutirani IDH. Povzeto po (32).

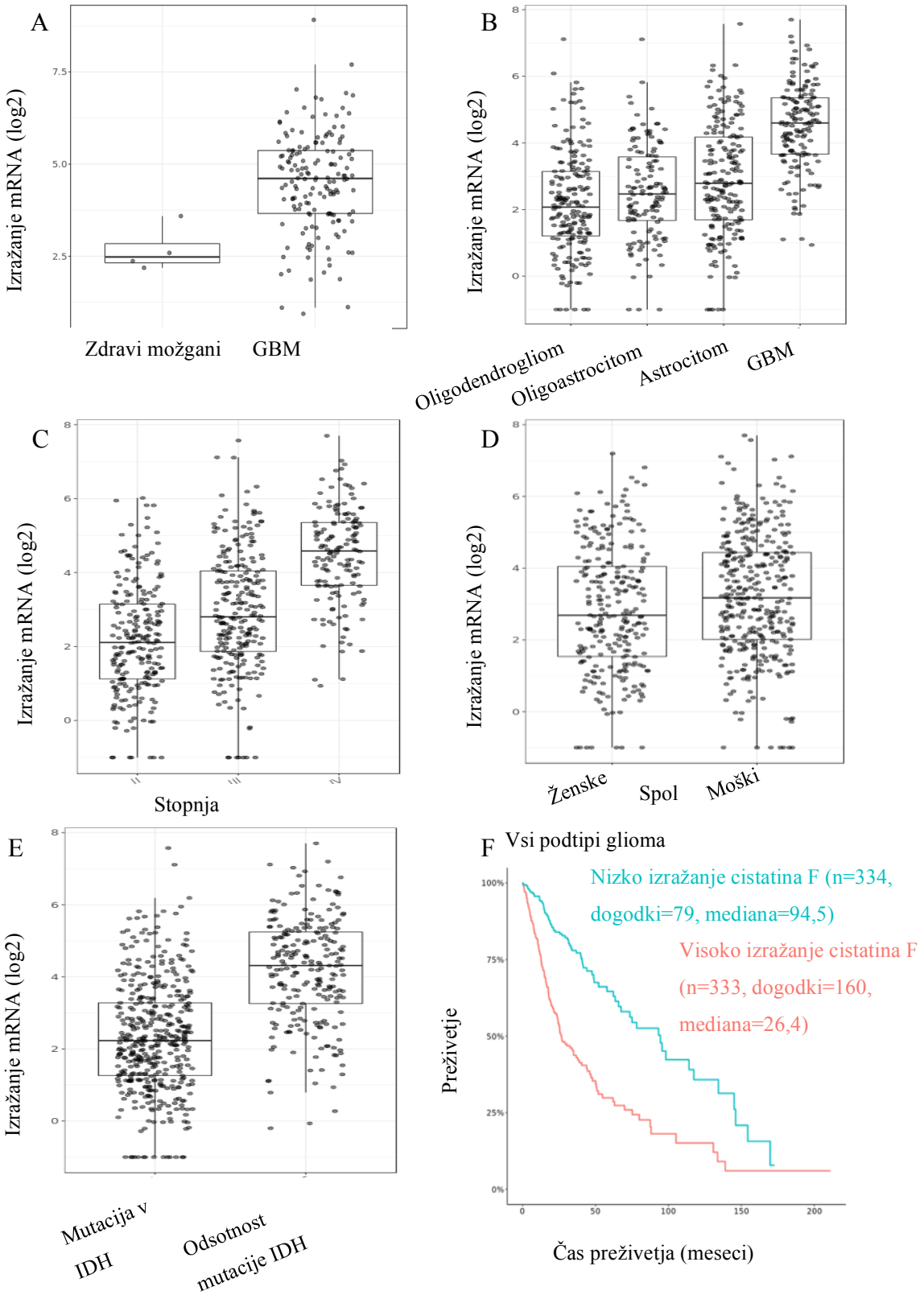
Tako je na voljo manj glutationa in celice so bolj izpostavljene reaktivnim kisikovim spojinam. 2-hidroksiglutarat je onkometabolit, ki povzroči večjo neoplastično transformacijo matičnih celic. Poveča se proliferacija, zmanjša diferenciacija celic in zmanjša se genetska stabilnost, saj pride do povečane metilacije DNA. Vse to prispeva k razvoju tumorja (33). Kljub temu pa zmanjšana zaščita pred oksidativnim stresom poveča uspeh radioterapije. Tako mutacija v IDH napoveduje boljšo prognozo za paciente (34). Povprečna starost pacientov ob diagnozi GBM je 64 let, pogosteje se pojavlja pri moških kot pri ženskah. Potrjeni dejavnik tveganja za nastanek GBM je ionizirajoče sevanje. GBM klinično razdelimo na dva podtipa- primarni in sekundarni GBM. Primarni je najpogostejši, nastane *de novo* v kratkem obdobju (3-6 mesecev) in se pojavlja pri starejših pacientih, najpogosteje nimajo prisotne mutacije v IDH. Sekundarni GBM nastane počasi (10-15 let) iz že obstoječih astrocitomov in se pojavlja predvsem pri mlajših pacientih (35). 10% bolnikov s sekundarnim GBM ima prisotno mutacijo v IDH (31). GBM je značilen po heterogenosti celic in njihovi hitri proliferaciji. V tkivu GBM najdemo poleg tumorskih celic tudi tumorske matične celice, ki izražajo CD133 in mikroglijo/makrofage (CD68) (36,37). Monociti preidejo krvno-možgansko bariero zaradi prisotnega vnetja v možganih in nato diferencirajo v makrofage (38). Mikroglija ima hematopoetski izvor in opravlja vlogo prirojenega imunskega sistema v centralnem živčnem sistemu. Njena naloga je

podobna makrofagom, saj opravlja fagocitozo, izloča encime, citokine in rastne dejavnike. Na svoji površini imajo celice mikroglije receptorje, ki prepoznavajo molekule povezane s patogeni ali s poškodbami (PRR, PAMP, DAMP), prav tako pa lahko predstavljajo antigene limfocitom (39). Tako makrofagi, kot aktivirana mikroglija pod vplivom dejavnikov, ki jih sproščajo GBM celice, postanejo protumorigene – omogočajo razgradnjo zunajceličnega matriksa, spodbujajo tumorsko rast (sproščanje citokinov, kot so TGF-β, IL-10), ter omogočajo angiogenezo in invazijo (40). GBM je značilen tudi po obsežni nekrozi, dobri ožiljenosti in difuzni širitvi. Prav ta onemogoča uspešno kirurško odstranitev tumorja (41). GBM redko metastazira. Za GBM so značilna tudi območja demielinizacije, kar še dodatno otežuje diagnozo bolezni (42,43). Z napredovanjem bolezni pride tudi do motenj v krvno-možganski barieri (30). Točen mehanizem, kako pride do tega, ni znan, pojavijo pa se fenestracije in spremembe v tesnih stikih med celicami endotelija (44). Znaki in simptomi pacientov z GBM so nespecifični. Pojavljajo se glavoboli, slabost, izguba ravnotežja, zmedenost, izguba spomina, spremembe osebnostnih lastnosti, omrtvičenost okončin, oslabljena zmožnost govora, motnje v vidnem polju, pri nekaterih tudi epileptični napadi (45). Diagnoza poteka preko slikanja možganov z uporabo magnetne resonance ter histološke analize biopsije. Terapija poteka v treh stopnjah. Najprej kirurgi poskušajo odstraniti tumor v največji možni meri. Pri tem se vzame tudi biopsija tkiva, ter postavi dokončna diagnoza. Sledi radioterapija in adjuvantna kemoterapija. Zdravilo izbora je alkilirajoči citostatik temozolomid (29). Kemoterapijo otežujejo mutacije, ki popravljajo alkilirano DNA, npr. mutacija v MGMT (metilgvanin metiltransferaza) in težave s prehodom zdravila preko krvno-možganske bariere. Pacienti lahko dobivajo tudi podporno terapijo za lajšanje simptomov (npr. antiepileptiki). Pri ponovljenem GBM se lahko uporabi tudi biološko zdravilo bevacizumab, ki veže vaskularni endotelijski rastni faktor in tako zavira angiogenezo (46). Kljub obsežni terapiji, se pri večini pacientov bolezen vrne. Povprečna doba preživetja je 12 do 15 mesecev (35).

5.1.3.4 Cistatin F kot prognostični označevalec pri GBM

V bazi podatkov GlioVis, ki združuje podatke o ekspresiji različnih genov v možganskih tumorjih, smo analizirali dostopne podatke o izražanju cistatina F (47). Kot vidimo na sliki 8, ima cistatin F pomembno vlogo pri GBM, saj se povišano izraža v GBM v primerjavi z zdravimi možgani. Njegova ekspresija je višja prav pri GBM v primerjavi z ostalimi gliomi ter višja pri stopnji IV. Manjše izražanje cistatina F sovpada z mutacijo v IDH, ki

pomeni boljšo prognozo za paciente. Na podlagi Kaplan-Meyerjeve krivulje preživetja se tudi kaže, da povišano izražanje cistatina F predstavlja slabšo prognozo za paciente. Poleg zaviranja citotoksičnih mehanizmov imunskega sistema ima cistatin F v GBM morda vlogo tudi v procesu demielinizacije. Ugotovljeno je bilo, da se cistatin F začne izražati v celicah mikroglije v fazi akutne demielinizacije in remielinizacije. Ko demielinizacija postane kronična, cistatin F ni več izražen (11). Razgradnja mielinske ovojnice predstavlja patološko stanje, ki ga zaznajo celice mikroglije. Posledično se mikroglija aktivira, fagocitira ostanke mielina, in inducira se izražanje genov (48). Katepsin C pomembno vpliva na proces demielinizacije, saj aktivira serinske proteaze, ki so pomembne za nastajanje TNF-α. Ta je toksičen za oligodendrocite, ki sodelujejo pri procesu mielinizacije. Na mišjem modelu je bilo pokazano, da se v času akutne demielinizacije in remielinizacije cistatin F začne izražati prej ter v večji meri kot katepsin C. Cistatin F z zaviranjem delovanja katepsina C omogoča regeneracijo mielina. Kasneje, ko pa pride do kronične demielinizacije, katepsin C prevladuje nad cistatinom F. Remielinizacija je tako otežena (49).



Slika 8: A: (p<0,01). B: GBM-oligodendrogliom/oligoastrocitom/astrocitom in astrocitom-oligodendrogliom: p<0,001 C: IV-II, IV-III, III-II: p<0,001. D: p<0,01. E: p<0,001. F: p<0,001 (47).

6 Načrt za delo ali delovna hipoteza

Tumorske celice so pod nadzorom imunskega sistema, ki lahko preko delovanja citotoksičnih celic odstranjuje visokoimunogene tumorske celice. Kljub temu pa tumorske celice lahko pridobijo značilnosti, ki jim omogočijo, da se izognejo delovanju imunskega sistema. Cistatin F, ki je v imunskih celicah, preko zaviranja katepsina C preprečuje citotoksične učinke NK celic in CTL. Če tumorske celice pridobijo sposobnost izražanja cistatina F, oziroma povečajo njegovo koncentracijo v tumorskem mikrookolju, s tem da pritegnejo imunske celice, se tumorske celice lahko izognejo apoptozi, povzročeni s citotoksičnimi celicami.

V magistrski nalogi bomo preverili, ali se cistatin F izraža v tkivnih rezinah glioblastoma. Vzorce smo dobili z Inštituta za patologijo, Medicinske fakulete UL, študija pa je bila potrjena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (številka dovoljenja 92/06/13). Preverili bomo, ali morebitni izraženi cistatin F izvira iz imunskih ali tumorskih celic. Nato bomo pripravili kokulture različnih tumorskih celičnih linij z imunsko celično linijo in preverili izražanje v tumorskih celicah. Določili bomo tudi subcelično lokalizacijo cistatina F in vpliv na encimsko aktivnost katepsina C.

7 Materiali in metode

7.1 Materiali

7.1.1 Laboratorijska oprema

Preglednica II: Seznam uporabljene laboratorijske opreme

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
ChemiDoc ML Imaging System	BioRad (ZDA)
Bralec mikrotitrskih plošč Infinite M1000	Tecan (Švica)
Powerpac Basic	BioRad (ZDA)
Inkubator za celice (37 °C, 5% CO_2)	Binder (Nemčija)
Komora z laminarnim pretokom zraka Herasafe KS	Thermo Scientific (Nemčija)
Kamera Nikon DS-U2/L2	Nikon (Japonska)
Konfokalni mikroskop LSM 710	Carl Zeiss (Nemčija)
Fluorescenčni invertni mikroskop Nikon Eclipse Ti-E	Nikon (Japonska)

7.1.2 Kemikalije

Preglednica III: Seznam uporabljenih kemikalij

Kemikalija	Proizvajalec
2-(N-morfolino)etansulfonska kislina monohidrat (MES)	Sigma-Aldrich (ZDA)
Absolutni etanol	Sigma-Aldrich (ZDA)
Akrilamid/bisakrilamid (40%), (37,5 : 1)	Sigma-Aldrich (ZDA)
Amonijev persulfat	Sigma-Aldrich (ZDA)
Bromfenolno modro	Kemika (Hrvaška)
BSA	Sigma (ZDA)
Citronska kislina	Serva (Nemčija)
Complete ULTRA Rablets, Mini, EDTA-free, EASYpack, Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (Švica)

Coomassie Brilliant Blue	Sigma-Aldrich (ZDA)
DAB substrate kit (ab 64238)	Abcam (VB)
DAKO pen	Dako Denmark (Danska)
DC test za določanje koncentracije proteinov	BioRad (ZDA)
Ditiotreitol (DTT)	Sigma (ZDA)
Dimetilsulfoksid (DMSO)	ThermoFisher Scientific (ZDA)
DoubleStain IHC Kit: M&R on human tissue (ab210061)	Abcam (VB)
FBS HI	Gibco ThermoFisher Scientific (ZDA)
Glicerol	Carlo Erba (Italija)
Glicin	Serva (Nemčija)
Gly-Phe-AMC	Bachem (Švica)
HCl	Sigma-Aldrich (ZDA)
Hematoksilin, modificiran po Harrisu (Harris Modified Hematoxylin (without acetic acid, mercury free) –Pierce ®)	Thermo Scientific (ZDA)
KCl	Sigma (ZDA)
KH_2PO_4	Sigma (ZDA)
Kozji serum	Sigma-Aldrich (ZDA)
Ksilen	Sigma-Aldrich (ZDA)
Levamisol	Sigma-Aldrich (ZDA)
LumiLight Plus Western Blotting Substrate	Roche (Švica)
Metanol	Sigma-Aldrich (ZDA)
n-butanol	Merck (ZDA)
Na_2HPO_4 x $2H_2O$	Serva (Nemčija)
NaCl	Fisher chemical (ZDA)
Natrijev deoksiholat monohidrat	Sigma-Aldrich (ZDA)
Natrijev dodecilsulfat (10%)	Fisher BioReagents (ZDA)
Ocetna kislina	VWR (ZDA)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDA CAT: 26619	Thermo Fisher Scientific (ZDA)
PBS	Gibco, Thermo Fisher Scientific (ZDA)
Pen Strep	Gibco, ThermoFisher Scientific (ZDA)

Pertex medij za pokrivanje s krovnimi stekli	CellPath (VB)
PMA	Sigma-Aldrich (ZDA)
Poli-L-lizin (0,01%)	Sigma-Aldrich (ZDA)
Ponceau S	Fluka (Švica)
Posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne (Slovenija)
ProLong GOLD Antifade reagent with DAPI	Invitrogen (ZDA)
RPMI 1640 with HEPES and L-Glutamine	Lonza, (Belgija)
TEMED	Serva (Nemčija)
Trinatrijev citrat, brezvodni	Merck (ZDA)
TripanBlue	Sigma-Aldrich (ZDA)
TRIS	Serva (Nemčija)
Triton X-100	Serva (Nemčija)
Trizma base	Sigma (ZDA)
TrypLE Select	Gibco, ThermoFisher Scientific (ZDA)
Tween 20	Merck (ZDA)
Voda za gojenje celičnih kultur	Corning (ZDA)
Vodikov peroksid 30%	Sigma-Aldrich (ZDA)
Vodna raztopina paraformaldehida (16%)	Electron Microscopy Sciences, ZDA

7.1.3 Celične linije

- U-937 (ECACC, 85011440)
    - Suspenzijske celice difuznega histiocističnega limfoma. Imajo značilnosti monocitov, po stimulaciji s PMA diferencirajo v makrofagni fenotip. Gojimo jih v RPMI 1640 gojišču z dodatkom 10% FBS HI in 1% penicilinom/streptomicinom pri 37°C in 5% CO_2 (50).
- HeLa (DSMZ, ACC 57)
    - Adherentne celice adenokarcinoma materničnega vratu (51). Gojili smo jih v RPMI 1640 gojišču z 10% FBS HI in 1% penicilinom/streptomicinom pri 37°C in 5% CO_2.
- SH-SY5Y
    - Izolirane iz metastaze nevroblastoma iz kostnega mozga, del celic je adherentnih, del pa suspenzijskih (52). Gojili smo jih v RPMI 1640 gojišču z 10% FBS HI in 1% penicilinom/streptomicinom pri 37°C in 5% CO_2.

- U-251 MG
    - Adherentne celice, izolirane iz malignega glioblastoma (53). Gojili smo jih v RPMI 1640 gojišču z 10% FBS HI in 1% penicilinom/streptomicinom pri 37°C in 5% CO_2.

7.1.4 Protitelesa

Preglednica IV: Seznam uporabljenih protiteles

Protitelo	***Proizvajalec***
Kozje proti kunčje IgG sekundarno protitelo Alexa Fluor 488, *A11070*	ThermoFisher Scientific (ZDA)
Kozje proti kunčje sekundarno protitelo Dy-Light 650, *SA5-10034*	ThermoFisher Scientific (ZDA)
Kozje proti kunčje sekundarno protitelo označeno s HRP, *W401B*	Promega (ZDA)
Kunčje primarno protitelo proti cistatinu F	Davids Biotechnologie
Kunčje primarno protitelo proti cistatinu F, *HPA040442*	Sigma Life Science (ZDA)
Kunčje primarno protitelo proti GAPDH, *10494-1-AP*	Proteintech (ZDA)
Mišje primarno protitelo proti CD133, *W6B3C1*	Miltenyi Biotec (Nemčija)
Mišje primarno protitelo proti CD68, *ab955*	Abcam (VB)
Mišje primarno protitelo proti CD9, *ab2215*	Abcam (VB)
Mišje primarno protitelo proti GFAP, ab10062	Abcam (VB)

7.1.5 Vzorci GBM

Preglednica V: Podatki o bolnikih z GBM

Št. GBM rezine	Starost ob operacij in spol	Preživetje po operaciji (meseci)	Terapija
15-H-10314	53, M	12	Radio (60 Gy) in kemoterapija (TMZ), nato adjuvantna kemoterapija (TMZ)
16-H-17976	65, M	13	Radio (60 Gy) in kemoterapija (TMZ), nato adjuvantna kemoterapija (TMZ)
NB 3/15	67, Ž	3	Radioterapija (30 Gy)
NB 307/13	48, Ž	7	Radio (60 Gy) in kemoterapija (TMZ), nato adjuvantna kemoterapija (TMZ)
NB 156/14	54, M	3	Radio (60Gy) in kemoterapija (TMZ)
94/13	46, M	17	Radio (60 Gy) in kemoterapija (TMZ), nato adjuvantna kemoterapija (TMZ)

7.2 Metode

7.2.1 Imunohistokemija

7.2.1.1 Prisotnost cistatina F v GBM

Priprava parafinskih rezin

Parafinske rezine so pripravili na Inštitutu za patologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani po njihovem standardnem postopku.

Deparafinizacija in rehidracija

Tkivne rezine so na objektno steklo vgrajene v parafinu. Ta preprečuje dostop protiteles do epitopov, prav tako pa zaradi svoje hidrofobnosti odbija raztopine, s katerimi želimo obarvati tkivno rezino. Za raztapljanje parafina smo uporabili ksilen. V digestoriju smo izvedli naslednje inkubacije v steklenih kadičkah:

- Ksilen (3 min)
- Ksilen (3 min)
- Absolutni etanol (3 min)
- 96% etanol (3 min)
- 70% etanol (3 min)

- destilirana voda (3 min)

Od tega koraka naprej smo pazili, da so rezine vedno prekrite s tekočino in se ne posušijo. V primeru, da bi se rezine posušile, bi se povečala nespecifična vezava protiteles (54).

Vzpostavitev antigenov

Pri pripravi tkivnih rezin se uporablja formaldehid, ki povzroči nastanek metilenskih mostičkov med proteini. Te kovalentne povezave lahko preprečijo dostop protiteles do epitopov. Stekelca z rezinami smo potopili v čašo z 10 mM citratnim pufrom, pH= 6, in jih kuhali v mikrovalovni pečici 20 minut. Nato smo počakali 15 minut, da se je pufer ohladil na sobno temperaturo. Sledilo je 5-minutno stresanje stekelc v dH_2O.

10 mM citratni pufer (1 L):

- 2,94 g brezvodni trinatrijev citrat
- dH_2O 1000 mL
- uravnaj pH na 6,0 s HCl
- dodaj 0,5 mL Tween 20

  na sobni T stabilen 3 mesece

Blokiranje aktivnosti endogenih peroksidaz

Detekcija s sekundarnimi protitelesi temelji na encimski pretvorbi substrata s hrenovo peroksidazo, s katerim je označeno sekundarno protitelo. Zaradi tega moramo najprej blokirati aktivnost endogenih peroksidaz, ki se nahajajo v celicah. Stekelca smo inkubirali na stresalniku v 3% raztopini H_2O_2/metanol, 30 minut, pri sobni T. Sledilo je spiranje na stresalniku v PBS (2x 5 min, sobna T).

Blokiranje nespecifične vezave protiteles

Stekelca smo z brisačko obrisali okoli tkiva in tkivo obkrožili s hidrofobnim DAKO pisalom. Ta omogoča, da ne pride do razlivanja raztopin po celotnem stekelcu, ampak le te ostanejo lokalizirane na tkivnih rezinah. DAKO pisalo je lahko rakotvorno in lahko povzroča mutacije, zato delamo v digestoriju. Nato na rezine nanesemo 200 µL pufra za blokado in inkubiramo v komori za ohranjanje vlažnosti pri sobni T, eno uro. Pufer za blokado vsebuje serum enakega izvora kot sekundarno protitelo. Proteini iz seruma se vežejo na endogene tkivne imunoglobuline in tako zasedejo vezavna mesta, na katera bi se lahko vezala sekundarna protitelesa. Na ta način tudi zmanjšamo vezavo preko Fc

receptorja tako primarnih kot sekundarnih protiteles. BSA je pufru dodan za zmanjšanje nespecifične vezave zaradi hidrofobnih interakcij (54).

Pufer za blokado (5 mL)- 10% kozji serum in 1% BSA

- 500 µL kozji serum
- 0,05 g BSA
- 500 µL 10x PBS
- 4 mL dH_2O

shranjujemo v hladilniku, uporaben do 1 meseca

Inkubacija s primarnimi protitelesi

Iz stekelc stresemo stran pufer za blokado in jih obrišemo z brisačko. Zanima nas prisotnost cistatina F, zato smo uporabili kunčje primarno protitelo proti cistatinu F, Davids Biotechnologie, v redčitvi 1:20 v pufru za redčenje protiteles.

Pufer za redčenje protiteles (1% BSA) (500 mL):

- 50 mL 10x PBS
- 5,0 g BSA
- 450 mL dH_2O

Nanesli smo 200 µL raztopine na vsako rezino, razen na negativno kontrolo, na katero smo nanesli 200 µL pufra za redčenje protiteles. Inkubirali smo v komori za ohranjanje vlažnosti čez noč, pri 4°C. Naslednji dan smo stekelca spirali v pufru za redčenje protiteles, na stresalniku, 2x 5 min pri sobni T.

Inkubacija s sekundarnimi protitelesi

Sekundarno protitelo je kozje proti kunčje in konjugirano s hrenovo peroksidazo (Promega, W401B). Stekelca smo obrisali okoli tkiva z brisačko in dodali 200 µL sekundarnih protiteles, ki smo jih predhodno razredčili 1:200 v pufru za redčenje protiteles. Rezine smo inkubirali v komori za ohranjanje vlažnosti 1 uro pri sobni T. Sledilo je spiranje stekelc na stresalniku v PBS, 2x 5 min pri sobni T.

Barvanje rezin z DAB substratom

Pripravili smo raztopino DAB iz 1,5 ml DAB substrata in 30 µL DAB kromogena. DAB raztopina je substrat za hrenovo peroksidazo. Po encimski pretvorbi nastane rjav produkt, ki ga lahko opazimo pod mikroskopom. Stekelca smo obrisali okoli tkiva in nanesli 200

µL raztopine DAB na rezine. Po 10 minutah inkubacije pri sobni T smo stekelca spirali v dH_2O 2x 5 minut pri sobni T.

Barvanje jeder s hematoksilinom

Stekelca smo ponovno obrisali z brisačko in inkubirali v raztopini hematoksilina 30 sekund pri sobni T. Hematoksilin obarva jedra celic modro. Nato smo stekelca spirali z vodo iz pipe 5 minut, nato pa smo jih potopili v dH_2O za 10 minut.

Dehidracija in priprava stekelc za mikroskopsko analizo

Stekelca smo potopili v raztopine etanola in ksilena:

- 70% etanol (1 min)
- 96% etanol (1 min)
- absolutni etanol (1 min)
- ksilen (2 min)
- ksilen (2 min)

Stekelca smo obrisali okoli tkiva z brisačko in na objektno stekelce dali kapljico medija za pokrivanje Pertex in čez reagent položili krovno stekelce. Stekelca smo čez noč posušili v digestoriju in nato shranili pri sobni T. Preparate smo analizirali z invertnim mikroskopom Nikon Eclipse Ti-E s kamero Nikon DS-U2/L2.

7.2.1.2 Karakterizacija celic v tumorskem tkivu, ki izražajo cistatin F

Za karakterizacijo celic, ki izražajo cistatin F v tkivnih rezinah GBM, smo uporabili komercialni komplet (DoubleStain IHC Kit: M&R on human tissue (ab210061)) ter uporabili priloženi protokol (55). Komplet omogoča hkratno imunohistokemijsko določanje dveh različnih antigenov z uporabo mišjih in kunčjih primarnih protiteles. Sekundarna proti mišja protitelesa so označena s HRP in po reakciji s substratom dajo zelen produkt, sekundarna proti kunčja protitelesa pa so označena z AP in po encimski pretvorbi substrata zaznamo rdeč produkt. Analizirali smo kolokalizacijo signalov protiteles, ki označujejo cistatin F s protitelesi proti celičnim označevalcem za makrofage in mikroglijo (CD68), tumorskim glioblastomskim celicam, ki izvirajo iz astrocitov (GFAP- glialni fibrilarni kisli protein), protitelesi ki označujejo tumorske in matične GBM celice (CD9) in GBM tumorske matične celice (CD133).

Deparafinizacija

Za deparafinizacijo, smo tako kot je že opisano zgoraj, tkivne rezine inkubirali v ksilenu, padajočih koncentracijah etanola in v dH_2O.

Blokiranje aktivnosti endogenih peroksidaz in alkalnih fosfataz

Stekelca smo inkubirali v 0,3% raztopini H_2O_2 v metanolu 10 minut. Sledilo je spiranje v dH_2O (2x 2min). Nato smo stekelca 10 min inkubirali v 1mM raztopini levamisola in tako preprečili aktivnost endogenih alkalnih fosfataz. Sledilo je spiranje v dH_2O (2x 2 min).

Vzpostavitev antigenov

Tako kot je opisano zgoraj, smo stekelca kuhali 20 min v 10 mM citratnem pufru (pH = 6). Nato smo počakali, da se je pufer ohladil na sobno temperaturo. Sledilo je stresanje stekelc v TBS-T pufru (2x 2min).

10x TBS pufer (1L):

- 61 g Trizma base
- 90 g NaCl
- dH_2O do 1L

pH uravnamo na 7,6

TBS-T pufer (0,025% Triton X-100/TBS) (1L):

- 100 mL 10x TBS pufer
- 900 mL dH_2O
- 250 µL Triton X-100

Blokiranje nespecifične vezave protiteles

Stekelca smo z brisačko obrisali okoli tkiva in tkivo obkrožili s hidrofobnim DAKO pisalom. Nato smo na rezine nanesli 200 µL pufra za blokado in inkubirali v komori za ohranjanje vlažnosti pri sobni T 1h.

Inkubacija s primarnimi protitelesi

Iz stekelc smo stresli stran pufer za blokado in jih obrisali z brisačko. Ker nas je zanimala kolokalizacija cistatina F s specifičnimi celičnimi označevalci, smo pripravili kombinacije primarnih protiteles: kunčje primarno protitelo proti cistatinu F v redčitvi 1:20 (Davids Biotechnologie) oz. 1:100 ali 1:75 (Sigma Life Science, HPA040442) in mišje primarno

protitelo proti CD68 (1:100) ali proti GFAP (1:500) ali proti CD9 (1:100) ali proti CD133 (1:10) v pufru za redčenje protiteles. Nanesli smo 200 µL raztopine na vsako rezino, razen na negativno kontrolo, na katero smo nanesli 200 µL pufra za redčenje protiteles in inkubirali v komori za ohranjanje vlažnosti čez noč, pri 4°C. Naslednji dan smo stekelca spirali v TBS-T pufru, na stresalniku, 2x 2 min pri sobni T.

Inkubacija s sekundarnimi protitelesi

Pripravili smo mešanico sekundarnih protiteles (anti-mišja označena s HRP in anti- kunčja označena z AP v razmerju 1:1 in dodali 200 µL sekundarnih protiteles na posamezne rezine. Inkubacija v komori za ohranjanje vlažnosti je trajala 1h, pri sobni T. Sledilo je spiranje stekelc na stresalniku v TBS-T, 2x 2 min pri sobni T.

Barvanje rezin s substrati

Na rezine smo najprej dodali rdeč substrat, ki smo ga pripravili po navodilih komercialnega kompleta. Inkubacija je trajala 20 min pri sobni T, v komori za ohranjanje vlažnosti. Sledilo je spiranje v dH_2O, 2x 2 min in spiranje v TBS-T, 2x 2 min. Nato smo rezine barvali z zelenim substratom. Zeleni kromogen smo dodali na rezine in inkubirali 5 min pri sobni T, v komori za ohranjanje vlažnosti. Sledilo je 1 min spiranje pod vodo iz pipe in spiranje v dH_2O. Stekelca smo okoli tkiva obrisali z brisačko in počakali da so se posušila.

Dehidracija in priprava stekelc za mikroskopsko analizo

Stekelca smo potopili v raztopine etanola in ksilena:

- 85% etanol (20 s)
- 96% etanol (20 s)
- absolutni etanol (1 min)
- ksilen (20 s)

Nato smo stekelca obrisali okoli tkiva z brisačko. Na objektno stekelce smo dali kapljico medija za pokrivanje Pertex in čez reagent položili krovno stekelce. Stekelca smo čez noč posušili v digestoriju in nato shranili pri sobni T. Preparate smo analizirali z invertnim mikroskopom Nikon Eclipse Ti-E s kamero Nikon DS-U2/L2.

7.2.2 Gojenje sesalskih celičnih kultur

Gojenje celic

Celice smo gojili v plastenkah v ustreznem gojišču pri 37°C in v atmosferi, nasičeni z vlago in s 5% CO_2. Delo s celicami je vedno potekalo v sterilnih pogojih. Ko so celice prerasle približno 80% površine plastenke, smo jih s tripsinizacijo odlepili od podlage in redčili.

Odmrzovanje celic

Kriovialo izbranih celic smo hitro segreli v vodni kopeli. Celice smo prenesli v 15 ml centrifugirko ter jim počasi dodali ustrezno gojišče. Sledilo je centrifugiranje (5 min, 1200 rpm). Supernatant smo odsesali in peletko celic resuspendirali v mediju. Suspenzijo smo nato prenesli v posodo za gojenje celic.

Tripsinizacija in štetje celic

Ko so adhezijske celice prerasle približno 80% površine plastenke, smo jih s tripsinizacijo odlepili od podlage in redčili. Najprej smo odsesali gojišče in jih 5-10 minut inkubirali v 3 mL raztopine TrypLE Select pri 37°C. Ta je omogočila, da so se celice odlepile od dna posode. Dodali smo 7 mL gojišča in celično suspenzijo prenesli v centrifugirko. Ustrezen volumen celic smo prenesli nazaj v posodo za gojenje celic in dopolnili z gojiščem do 10 mL. Suspenzijske celice smo gojili do gostote 2 x 10^6 celic/ml. Suspenzijske celice smo rečili tako, da smo jih prenesli v centrifugirko in centrifugirali (5 min, 1200 rpm). Supernatant smo zavrgli, peletko celic pa resuspendirali v novem gojišču. Ustrezen volumen celic smo prenesli v posodo za gojenje celic in dopolnili z gojiščem do 10 mL.

Za štetje celic smo odpipetirali 60 µl celične suspenzije in ji dodali 60 µl raztopine Tripan modro. 10 µL pripravljene suspenzije smo nanesli na Neubauerjevo števno komoro (hemocitometer, citometer). Tripan modro ne prehaja celične membrane, zato se žive celice z nepoškodovano membrano ne obarvajo, prehaja pa v odmrle in poškodovane celice, ki nimajo selektivnega transporta na membrani, in jih obarva modro. Pod svetlobnim mikroskopom smo prešteli samo žive celice v 4 kvadratih. Koncentracijo celic smo izračunali po enačbi *1*:

$$koncentracija\ celic\ \left[{}^{\check{s}t.celic}/_{mL}\right] = \frac{\check{s}tevilo\ celic \times 10000}{\check{s}tevilo\ kvadratov \times redčitev}$$

Enačba 1

Zamrzovanje celic

Adherentne celice smo s TrypLE Select-om odlepili od dna posode, jih centrifugirali (5 min, 1200 rpm), ter jih resuspendirali v 1 mL ustreznega gojišča za zamrzovanje celic. Ta vsebuje 10% DMSO, ki deluje kot krioprotektant – preprečuje nastanek kristalov med zamrzovanjem, ki bi uničili celico. Krioviale smo prestavili v posebno posodo na -80°C, ki omogoča postopno zamrzovanje celic (približna hitrost ohlajanja je 1 °C/h). Po enem dnevu smo krioviale prestavili v tekoči dušik.

7.2.3 Izražanje cistatina F v kokulturah celičnih linij

Z namenom simulacije dogajanja v telesu smo pripravili kokulture tumorskih celic (HeLa, SH-SY5Y, U-251 MG) in imunskih celic (U-937).

V ploščo s šestimi vdolbinicami smo najprej nacepili adhezijske HeLa ali SH-SY5Y ali U-251 MG celice (0,2 x 10^6, 0,1 x 10^6 in 0,05 x 10^6 celic na vdolbnico). Po dveh dnevih, ko so se celice zagotovo pritrdile, smo dodali suspenzijo U-937 celic. Odločili smo se, da bomo naredili lizate v treh časovnih točkah- po 3, 5 in 7 dneh. Prav tako smo pripravili kokulture v različnih razmerjih, in sicer HeLa/SH-SY5Y/U-251 MG : U-937 = 2:1, 1:1 in 1:2. Pripravili smo dve paraleli. Po 3, 5 oz. 7 dneh je sledila liza celic.

Liza celic

Pripravili smo različne pufre za lizo celic:

<u>*RIPA pufer (pripravimo 2x koncentriranega) (25 mL):*</u>

- 50 mM Tris 302,75 mg
- 150 mM NaCl 438,3 mg
- uravnaj pH s HCl na pH=8
- 0,5% Natrijev deoksiholat monohidrat 0,25g
- 1% Triton X-100 0,05 mL
- 10% raztopina SDS 0,5 mL
- dopolnimo z dH_2O do 25 mL
- razdelimo na alikvote po 1 ml in shranimo na -20°C

RIPA pufru smo pred uporabo dodali komercialno mešanico zaviralcev proteaz.

Pripravili smo lizate U-937 in lizate HeLa, U-251 MG in SH-SY5Y:

- U-937 lizati:
  - Celično suspenzijo, ki vsebuje U-937 celice smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali (5 min, 1200 rpm).
  - 1 mL supernatanta smo shranili na -20 °C, ostalo smo zavrgli.
  - Peletko smo resuspendirali v PBS, centrifugirali (5 min, 1200 rpm).
  - Supernatant smo zavrgli.
  - Peletko smo raztopili v 50 µL (kokulture v razmerju 2:1), 75 µL (1:1), 100 µL (1:2) lizirnega pufra. Takoj smo prestavili na led, oziroma shranili pri -20°C.

- HeLa, U251 MG in SH-SY5Y lizati:
  - Pritrjene celice smo sprali s PBS, dodali 1 mL TrypLE select-a in inkubirali 5-10 min pri 37°C.
  - Celično suspenzijo smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali (5 min, 1200 rpm).
  - Supernatant smo zavrgli, peletko resuspendirali v PBS in ponovno centrifugirali (5 min, 1200 rpm).
  - Supernatant smo zavrgli in peletko raztopili v 75 µL lizirnega pufra.
  - Vzorce smo prestavili na led, oziroma shranili pri -20°C.

Lizate, ki smo jih pripravili v RIPA pufru, smo inkubirali 30 min na ledu, nato smo jih sonificirali. Natrijev deoksiholat prisoten v RIPA pufru prekine tudi jedrno membrano, zaradi katere se sprosti DNA. Za razbitje DNA je tako potrebna sonifikacija (3x 10s pri 80% amplitudi). Vzorce smo imeli med sonifikacijo ves čas na ledu. Nato smo lizate centrifugirali (20 min, 16000g, 4°C), supernatante alikvotirali in shranili na -20°C.

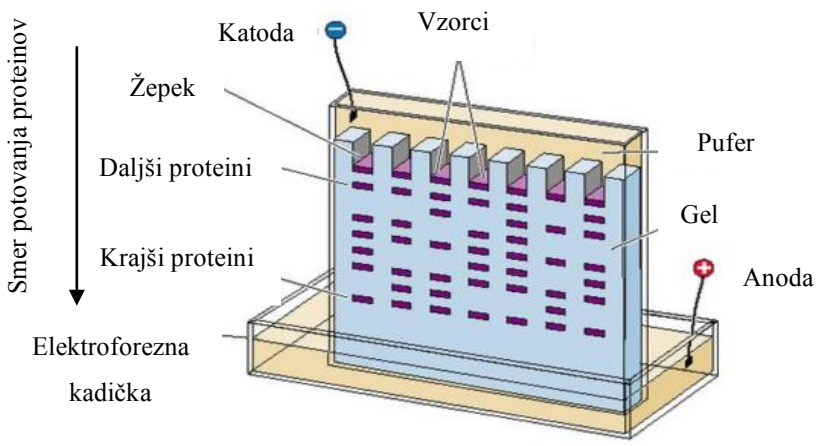
Meritev koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov smo merili z uporabo DC komercialnega testa na brezbarvni mikrotitrski plošči. Test temelji na kolorimetričnem Lowryjevem testu. Proteini reagirajo z bakrovim tartratom v alkalni raztopini (reagent A v komercialnem kompletu). Novonastali kompleks reducira Folinov reagent (reagent B), pri čemer nastane značilna modra barva. Ta se razvije do 90% intenzitete v roku 15 minut in je stabilna še eno uro (barva se v tem času lahko spremeni za največ 5%). Absorbanco merimo pri 750 nm (56).

Najprej smo pripravili reagent A', ki je potreben, ko imamo v naših vzorcih prisoten detergent (v RIPA pufru je prisoten Triton X-100, natrijev deoksiholat in SDS). Reagent A' smo pripravili tako, da smo za vsak mL potrebnega reagenta A dodali 20 µL reagenta S. Odpipetirali smo 5 µL vzorcev in standardov (raztopina BSA v koncentraciji 2; 1; 0,5; 0,25 in 0 µg/µL pripravljena v enakem pufru kot lizati) na mikrotitrsko ploščo v treh ponovitvah. Nato smo v vsako vdolbinico dodali 25 µL reagenta A', potem 200 µL reagenta B in inkubirali 15 min v temi. Pri pipetiranju smo pazili, da nismo ustvarjali mehurčkov, ki bi lahko vplivali na meritev absorbance. Nato smo pomerili absorbanco pri 750 nm na bralcu mikrotitrskih plošč Infinite M1000 (Tecan).

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (SDS-PAGE)

SDS-PAGE je separacijska metoda, ki omogoča ločevanje proteinov na podlagi dolžine polipeptidne verige. Dodatek detergenta natrijevega lavrilsulfata (SDS) povzroči, da imajo vsi proteini celokupno negativen naboj. Tako na elektroforezno mobilnost, ki je odvisna od razmerja med nabojem in maso delca, vpliva le masa proteina. Proteini se ločujejo v inertnem gelu, ki je zamrežen z verigami akrilamida in bisakrilamida. Reakcijo zamreženja kataliziramo z dodatkom amonijevega persulfata, vira radikalov in TEMED-om, ki jih stabilizira. Večja kot je koncentracija akrilamida, manjše bodo pore in počasneje bodo potovali proteini. Največkrat SDS-PAGE izvajamo v diskontinuiranem sistemu, kjer se proteini najprej skoncentrirajo v koncentrirnem gelu. Ta je manj zamrežen in ne ovira proteinov pri potovanju, kar omogoča, da proteini naenkrat vstopijo v ločevalni gel. Ločba poteka v ločevalnem gelu, ki vsebuje večjo koncentracijo akrilamida in je zato bolj zamrežen. Pred nanosom vzorcem dodamo pufer za vzorec, ki vsebuje SDS, ki je anionska površinsko aktivna snov in denaturira proteine. Glicerol v pufru poveča viskoznost vzorca in omogoča posedanje vzorca v žepke gela, bromfenolno modro pa je barvilo, ki nam pokaže, kako hitro potujejo proteini v gelu. Je negativno nabita molekula, ki potuje hitreje kot večina proteinov (46).



Slika 9: Shematski prikaz SDS-PAGE. Povzeto po (57).

Eksperimentalno delo

Pripravili smo 15% gele po naslednji recepturi:

Ločevalni gel:

- dH_2O 3585 µL
- 1,5 M Tris-HCl, pH = 8,8 2500 µL
- 10% SDS 100 µL
- 40% akrilamid/bisakrilamid (37,5 : 1) 3750 µL
- 10% amonijev persulfat 50 µL
- TEMED 15 µL

Pripravljen gel smo hitro vlili v model za vlivanje gela, debelina med stekelci je bila 1,5 mm. Na gladino smo dodali 500 µL vodne faze mešanice n-butanola in dH_2O, ki omogoči, da se gladina gela izravna. Po 20-30 minutah, ko se je ločevalni gel strdil, smo odlili n-butanol in gel sprali z destilirano vodo, ki jo smo jo nato posušili s filter papirjem. Sledila je priprava koncentrirnega gela.

Koncentrirni gel:

- dH_2O 3168 µL
- 0,5 M Tris-HCl, pH = 6,8 1250 µL
- 10% SDS 50 µL
- 40% akrilamid/bisakrilamid 500 µL
- 10% amonijev persulfat 25 µL
- TEMED 8 µL

Hitro smo dodali pripravljen koncentrirni gel do vrha in dodali glavniček z ustreznim številom žepkov. Počakali smo, da se je gel strdil (približno 20 min). Pripravljen gel smo

uporabili za SDS-PAGE ali pa ga shranili v foliji za živila, v navlaženih papirnatih brisačkah v hladilniku. Tako shranjen gel smo uporabili v desetih dneh.

Vzorce za nanos na elektroforezni gel smo pripravili tako, da smo pripravili raztopine s 40 µg proteinov ter jim dodali pufer za nanos vzorcev. Med pripravo smo imeli vzorce stalno na ledu.

Pufer za vzorce 5x koncentriran:

- Tris, pH 6,8 uravnan s HCl 150 mg
- SDS 1 g
- bromfenolno modro, konica spatule
- glicerol 5 mL
- dH_2O do 10 mL

  alikvotirano po 1 mL shranimo v hladilniku

Pripravljene vzorce smo kuhali 10 min na 100°C, nato pa centrifugirali 2 min pri 11000 g. Vmes smo sestavili elektroforezno kadičko. V katodni del smo vlili elektroforezni pufer in na tak način preverili, da tesnila držijo. Previdno smo odstranili glavniček iz koncentrirnega gela. V žepke smo nato dodali vzorce in označevalec velikosti proteinov (5 µL). Elektroforezni pufer smo dodali še v anodni del ter začeli elektroforezo pri konstantnem toku 30 mA/gel približno 1 uro, oziroma dokler modro barvilo ni pripotovalo do konca gela.

Elektroforezni pufer 10x koncentriran:

- Tris 30 g
- Glicin 144 g
- 10% SDS 100 ml
- dH_2O do 1L

Prenos western

Prenos western (WB) je imunološka metoda specifične detekcije proteinov, ki temelji na specifični interakciji med proteinom in protitelesom. Protitelesa zaradi svoje velikosti težko difundirajo v poliakrilamidni gel, zato je potreben prenos na nitrocelulozno ali PVDF membrano. Ta lahko poteka s pasivno difuzijo ali transverzalno elektroforezo oziroma elektroblotom. Vezava proteinov na membrano je nespecifična in poteka preko hidrofobnih interakcij. Naslednji korak je blokada preostalih vezavnih mest na membrani, kar lahko

storimo z raztopino BSA, mleka v prahu, Tweenom 20... S prekritjem nezasedenih mest na membrani preprečimo nespecifično vezavo protiteles na membrano preko hidrofobnih interakcij. Nato membrano inkubiramo v primarnih protitelesih, ki specifično zaznajo iskani protein. Poteče hibridizacija - vezava protiteles na iskani protein. Po spiranju membrano inkubiramo v sekundarnih protitelesih. Ta zaznajo primarno protitelo in se vežejo na njegovo Fc regijo. Sekundarna protitelesa nam omogočajo vizualizacijo vezave proteina na membrani. Lahko so označena radioaktivno ali pa imajo vezan encim, ki po dodatku substrata tvori netopen obarvan produkt. Substrat je lahko tudi kemiluminiscenčen - po kemijski pretvorbi oddaja svetlobo. Prav tako so sekundarna protitelesa lahko označena s fluoroforom (46).

Eksperimentalno delo

Med elektroforezo smo pripravili pufer za prenos western, izrezali 10 pravokotnikov filterskega papirja in nitrocelulozno membrano v velikosti elektroforeznega gela.

Pufer za prenos western 10x koncentriran (2,5 L):

- Tris 75 g
- Glicin 360 g
- dH_2O do 2,5 L

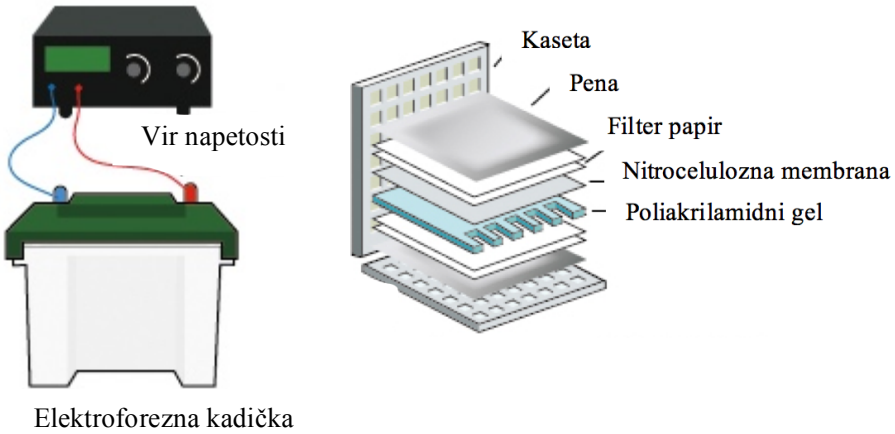
Pufer za prenos western:

- 10x pufer za prenos po Westernu 100 mL
- dH_2O 700 mL
- Metanol 200 mL
- 10% SDS 4 mL

pred uporabo ga ohladi v zamrzovalniku

Po končani elektroforezi smo gel inkubirali 10 min v pufru za prenos western. Nato smo pripravili sendvič za prenos. V večjo kadičko smo nalili pufer. Plastični nastavek smo razprli in ga s črno stranjo položili v kadičko. Na črno stran smo položili peno in 5 slojev filterskega papirja, ter vse omočili v pufru. Na filterski papir smo položili gel in nitrocelulozno membrano. Sledil je nanos 5 slojev filterskega papirja. Vse skupaj smo večkrat povaljali z epruveto, da smo odstranili zračne mehurčke, ki bi onemogočali prenos. Dodali smo peno in zaprli plastični nastavek. Tega smo prestavili v tank (črni del plastičnega nastavka ob črnem delu tanka). V kadičko smo dodali ledeni blok, in jo

napolnili do vrha s pufrom za prenos western. Kadičko smo prestavili v večji pladenj, v katerega smo nasuli led, da smo preprečili pretirano segrevanje pufra med prenosom. Kadičko smo priključili na električno napetost in začeli prenos pri konstantnem toku 200 mA, ki je trajal 1h30.



Slika 10: Shematski prikaz metode prenosa western, povzeto po (58).

Uspešnost prenosa smo preverili tako, da smo membrano 5 minut inkubirali v barvilu Ponceau S. Sledilo je spiranje v dH_2O 2x5 min. Vidne rdeče lise so nam pokazale, da so se proteini prenesli. Gel smo inkubirali v 40 mL raztopine barvila Coomassie Brilliant Blue in 20% ocetne kisline v razmerju 1:1, 1 uro na stresalniku (40 rpm). Nato smo 1 uro stresali v 30% razbarvalni raztopini (300 mL 96% EtOH, 100 mL CH_3COOH, 600 mL dH_2O) in čez noč stresali v 10% razbarvalni raztopini (100 mL 96% EtOH, 50 mL CH_3COOH, 850 mL dH_2O). Modre lise na gelu prikazujejo proteine, ki se niso prenesli na membrano. Membrano smo po barvanju s Ponceau S inkubirali pri sobni temperaturi v 5% raztopini mleka/PBS 1h in tako blokirali nespecifična vezavna mesta. Nato je sledila inkubacija v suspenziji primarnih protiteles (kunčja primarna protitelesa proti cistatinu F (Sigma Life Science, HPA040442) v mleku/PBS (1:375) čez noč pri 4°C. Naslednji dan smo membrano spirali v PBS (3x 10 min), nato pa smo inkubirali v sekundarnih protitelesih (kozja proti kunčja sekundarna protitelesa označena s HRP) (1:5000), 1h na sobni T. Sledil je dodatek kemiluminiscenčnega substrata Lumilight (Roche). Pripravili smo 400 µL raztopine reagenta A in reagenta B v razmerju 1:1, ter membrano inkubirali v tej raztopini eno minuto. Potem smo z napravo BioRad ChemiDoc MP Imaging System zaznali encimsko reakcijo. Po spiranju membrane s PBS je sledila inkubacija v primarnih kunčjih

protitelesih proti proteinu GAPDH (1:1000), čez noč pri 4°C. Naslednji dan smo membrano sprali v PBS, jo inkubirali s sekundarnimi protitelesi (kozja proti kunčja, označena z DyLight 650) (1:5000), 1h na sobni T v temi (zaradi fluorescence), spirali ponovno v PBS in očitali fluorescenco. GAPDH protein nam omogoča, da preverimo enakomernost nanosa proteinov, saj se protein enakomerno izraža v celicah.

Fosfatni pufer (PBS) 10x (1L)

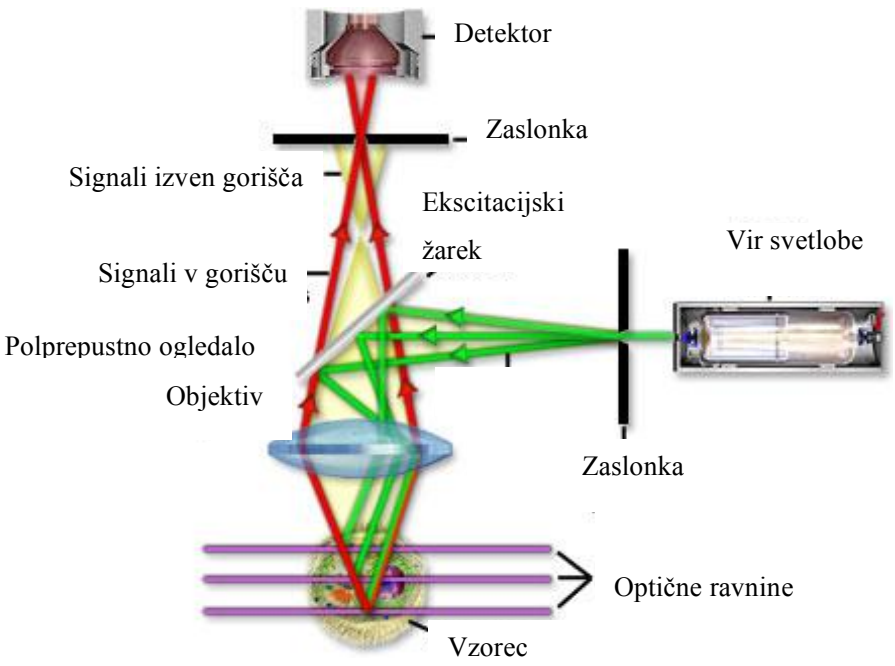
- NaCl 80,1 g
- KCl 2g
- Na_2HPO_4 x $2H_2O$ 17,8 g
- KH_2PO_4 2,7 g
- dH_2O do 1 L

7.2.4 Imunofluorescenčno označevanje cistatina F v kokulturah

Imunocitokemija

Imunocitokemija je postopek, s katerim preiskujemo prisotnost in lokalizacijo celičnih antigenov. Celice moramo najprej pritrditi na krovno steklo. S tem fiksiramo proteine in ohranimo njihovo strukturo. Nato celice permeabiliziramo, če se iskani protein nahaja znotrajcelično. Sledi blokiranje nespecifičnih vezavnih mest ter inkubacija v primarnih in sekundarnih protitelesih. Sekundarna protitelesa so označena s fluoroforom. Ta absorbira svetlobo krajše valovne dolžine in po ekscitaciji odda svetlobo daljše valovne dolžine, oz. fluorescenčno svetlobo.

S fluorescenčnim mikroskopom osvetljujemo celotni preparat naenkrat. Pri tem lahko dobimo neostro sliko zaradi zajema signalov iz celotnega preparata. Konfokalni mikroskop nam omogoča pregledovanje preparata v določeni optični ravnini. Izvorno svetlobo vodimo preko prve zaslonke do polprepustnega zrcala. Tam se odbije od preparata in vzbudi fluorofore. Prva zaslonka omogoča, da z laserskim žarkom vzbujamo fluorofore le v določeni točki. Fluorescenčna svetloba preide skozi polprepustno zrcalo. Druga zaslonka pred detektorjem omogoča prehod samo tistih signalov na detektor, ki prihajajo iz gorišča. To nam omogoča zajem ostre slike in določitev lokalizacije signala v preparatu (59).



Slika 11: Shematičen prikaz delovanja fluorescenčnega invertnega konfokalnega mikroskopa. Povzeto po (60).

7.2.4.1 Lokalizacija cistatina F v celicah

V ploščo s 24 vdolbinicami smo dali sterilna krovna stekelca. Nato smo dodali 1 mL celične suspenzije (HeLa (20 000 celic/vdolbinico), U-251 MG in SH-SY5Y v koncentraciji 25 000 celic/vdolbinico). Počakali smo 24 ur, da so se celice pritrdile. Nato smo odsesali gojišče in dodali U-937 celice, in sicer 40 000 celic/mL v vdolbinice s HeLa celicami in 50 000 celic/mL v vdolbinice z U-251 MG oz. SH-SY5Y. Kokulture smo gojili 3 ali 7 dni v inkubatorju. Enako smo ponovili s stimuliranimi U-937 s 100 nM PMA. Stimulacija s PMA povzroči diferenciacijo U-937 do makrofagnega fenotipa in znižanje izražanja cistatina F. Pred nanosom celic smo krovna stekelca 10 min inkubirali v 300 µL 0,01% raztopine poli-L-lizina, jih 2x sprali z vodo za gojenje celičnih kultur, ter počakali, da so se posušila.

Kokulture stimuliranih U-937 s HeLa, U-251 MG in SH-SY5Y, smo inkubirali 3 in 5 dni. Nacepili smo 0,1 x10^6 diferenciranih U-937 celic ter 0,02 (3 dni gojenja) oz. 0,01 (5 dni) x 10^6 HeLa in 0,05 oz. 0,02 x 10^6 U-251 MG in SH-SY5Y celic.

Po končani inkubaciji kokultur smo odsesali gojišče iz vdolbinic, potem je sledilo spiranje 2x 5 min s 400 µL PBS ob stresanju (50 rpm). Nato smo dodali 4% PFA/PBS (pH=7,4), inkubirali 20 minut in stresali. Po spiranju s PBS (3x 5 min, stresanje), je sledila

permeabilizacija celic z 0,1% raztopino Triton X-100/PBS, inkubacija je trajala 10 min. Nato smo blokirali nespecifična vezavna mesta s 3% BSA/PBS 1 uro (stresanje). Potem smo stekelca prestavili na parafilm v vlažni komori in dodali 50 µL suspenzije kunčjih primarnih protiteles proti cistatinu F v PBS in 1% BSA v redčitvi 1:120. Inkubacija je trajala 1,5 h pri sobni T. Stekelca, ki smo jih izbrali za negativno kontrolo, smo v tem času inkubirali v 3% BSA/PBS. Stekelca smo prestavili nazaj v ploščo in po spiranju s PBS (3x 5 min in stresanje) smo jim dodali 300 µL suspenzije sekundarnih protiteles v redčitvi 1:800 (kozja proti kunčja, označena z AlexaFluor 488) in zaščiteno pred svetlobo inkubirali 1h. Sledilo je ponovno spiranje s PBS 3x 5 min s stresanjem. Nato smo stekelca prestavili na objektno stekelce, na katerega smo predhodno dali kapljico ProLong GOLD Antifade reagenta z dodanim DAPI barvilom, ki obarva jedra celic. Inkubacija je potekala 24h v temi, da se je reagent posušil, nato pa smo stekelca prestavili v hladilnik. Pripravljene preparate smo analizirali s konfokalnim mikroskopom LSM 710. Uporabili smo argonski laser kot vir vzbujevalne svetlobe valovne dolžine 488 nm.

7.2.5 Encimska kinetika

Pri preučevanju encimske kinetike spremljamo hitrost razgradnje substrata, ki je specifičen za preučevani encim. Na hitrost encimske reakcije vplivajo koncentracija encima in substrata, pH, pufer, T, prisotnost zaviralcev ter ionska moč (61).

Pripravili smo kokulture U-251 MG in U-937 celic kot opisano v poglavju 7.2.3. Celične lizate smo pripravili v citratnem pufru, po enakem postopku kot opisano v 7.2.3. Lizate smo nato centrifugirali (20 min, 16 000 g, 4 °C), supernatante alikvotirali in shranili na -20°C.

50 mM citratni pufer pH= 6,2 (5 mL):

- 0,1 M citronska kislina 0,72 mL
- 0,1 M natrijev citrat 4,28 mL
- dH_2O 5 mL
- preveri pH
- 10x Triton X-100 0,1 mL
- razdelimo na alikvote po 1 ml in shranimo na -20°C

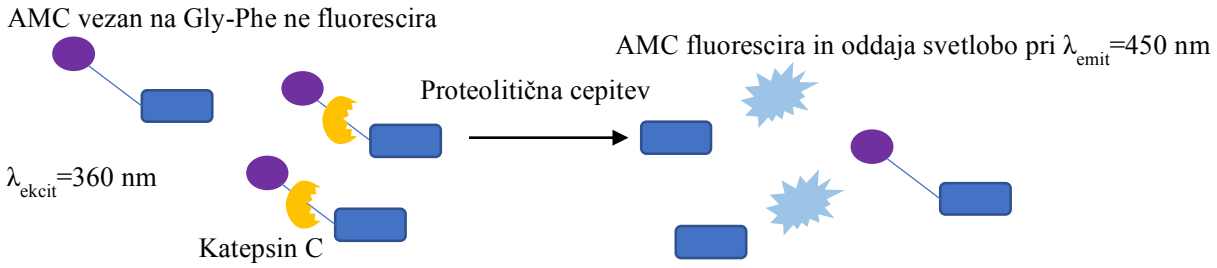
Nato smo izmerili koncentracijo proteinov v posameznem celičnem lizatu z uporabo DC komercialnega testa.

Zanimalo nas je, ali je aktivnost katepsina C, enega izmed glavnih tarč cistatina F, spremenjena v lizatih kokultur preučevanih celičnih linij. Pripravili smo aktivacijski pufer za katepsin C:

Aktivacijski pufer za katepsin C

- 25mM MES
- 50mM NaCl
- uravnaj pH=6,0
- 5mM DTT dodamo tik pred uporabo

V črno mikrotitrsko ploščo s 96-vdolbinicami (Nunclon™ Delta Surface, Nunc™ Thermo Scientific, ZDA) smo napipetirali volumen, ki je ustrezal 15 µg proteinov v posameznem lizatu U-251 MG ali U-937 celic, pripravljenih v citratnem pufru, v triplikatih in dveh bioloških ponovitvah. Nato smo dopolnili vsako vdolbinico do 60 µL z aktivacijskim pufrom za katepsin C. Po 15 minutni inkubaciji smo dodali 40 µL substrata Gly-Phe-AMC, pripravljenega v aktivacijskem pufru za katepsin C. Končna koncentracija substrata v vsaki vdolbinici je bila 70 µM. Za slepo kontrolo smo napipetirali 60 µL aktivacijskega pufra in 40 µl substrata v vsako vdolbinico. Po dodatku substrata smo takoj začeli meriti porast fluorescence pri 450 nm, ki je nastala zaradi sprostitve fluorofora AMC po proteolitični cepitvi substrata. Valovna dolžina vzbujanja je bila 360 nm.



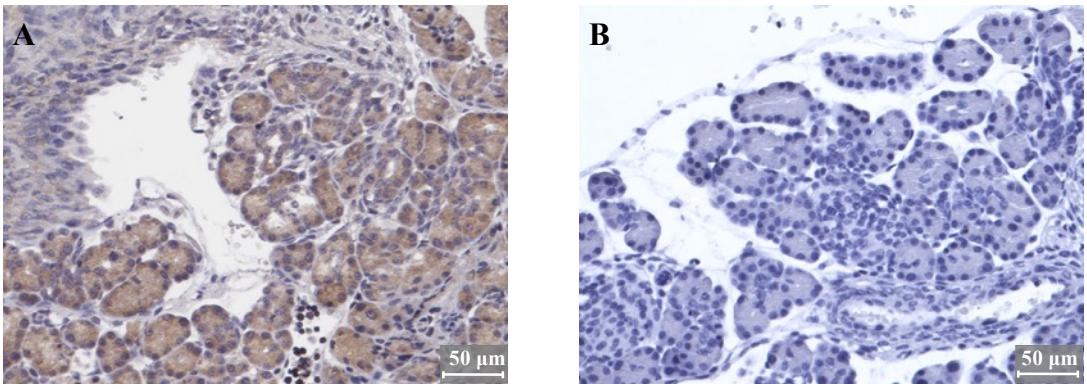
Slika 12: Prikaz meritve encimske reakcije.

8 Rezultati

8.1 Cistatin F v vzorcih glioblastoma

8.1.1 Preverjanje specifičnosti protiteles

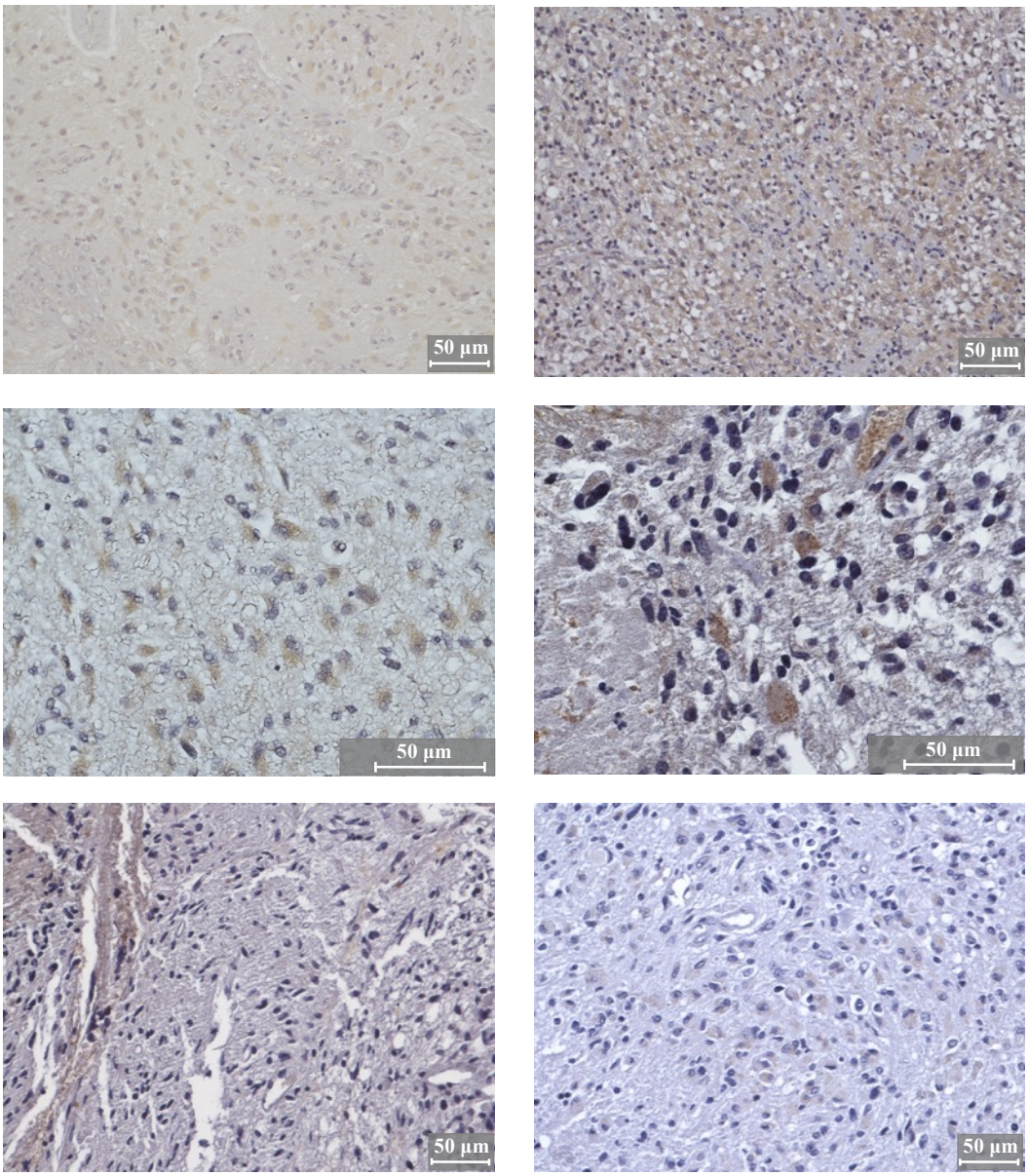
Pred barvanjem vzorcev glioblastoma smo najprej preverili delovanje protiteles na mišji vranici, kjer pričakujemo izražanje cistatina F, zaradi prisotnosti številnih imunskih celic. Specifičnost protiteles smo potrdili, saj smo opazili rjav produkt, ki je nastal po pretvorbi substrata s HRP v pozitivni kontroli. Prav tako smo preverili, da se sekundarna protitelesa ne vežejo nespecifično na antigene v rezini mišje vranice. Mišjo vranico smo inkubirali s sekundarnimi protitelesi v odsotnosti primarnih protiteles proti cistatinu F. Odsotnost pozitivnega signala potrjuje, da se sekundarna protitelesa specifično vežejo na primarna protitelesa.



Slika 13: A: Mišja vranica kot pozitivna kontrola. Rjavo obarvanje predstavlja cistatin F. B: Mišja vranica kot negativna kontrola (brez dodatka primarnih protiteles). Obarvana so le jedra in citoplazma celic s hematoksilinom.

8.1.2 Izražanje cistatina F v rezinah glioblastoma

Parafinske tkivne rezine pacientov z GBM smo obarvali na cistatin F. Izražanje cistatina F ni bilo enakomerno po celotni rezini, vendar smo opazili območja močnega obarvanja in območja, kjer obarvanja ni bilo mogoče zaznati. Razlike v izražanju smo opazili tudi med posameznimi tumorji.

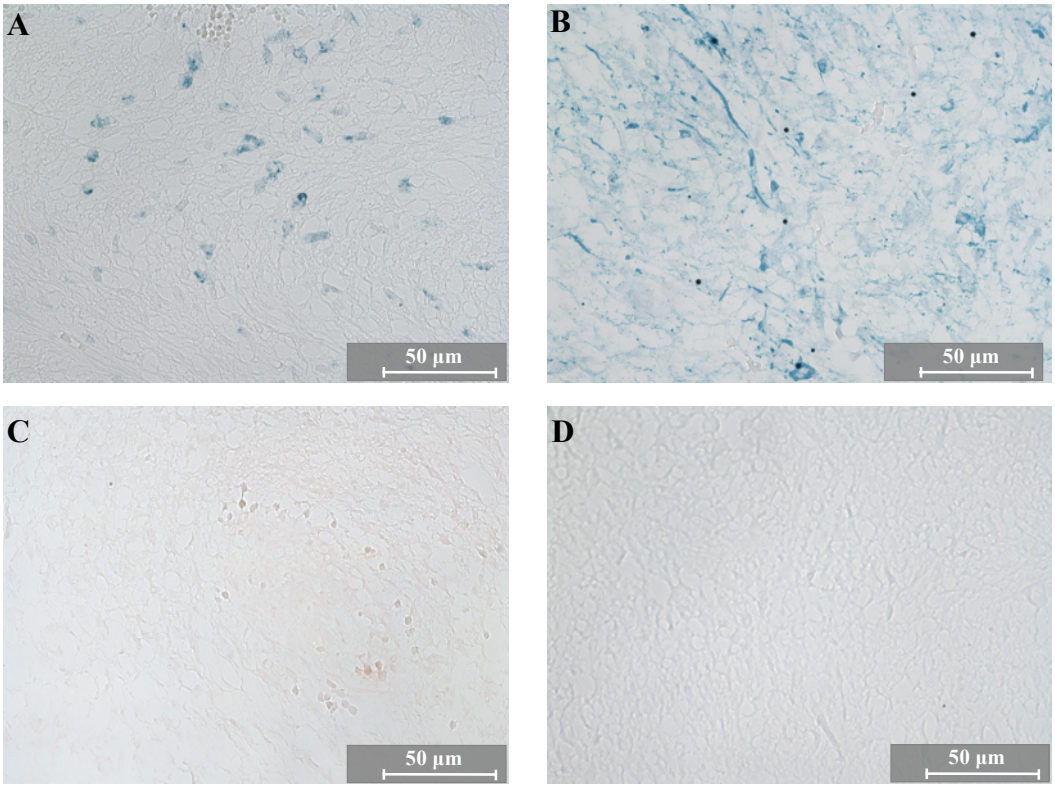


Slika 14: Reprezentativne slike GBM rezin. Rjavo obarvanje predstavlja cistatin F.

8.1.3 Kolokalizacija cistatina F z različnimi celičnimi označevalci

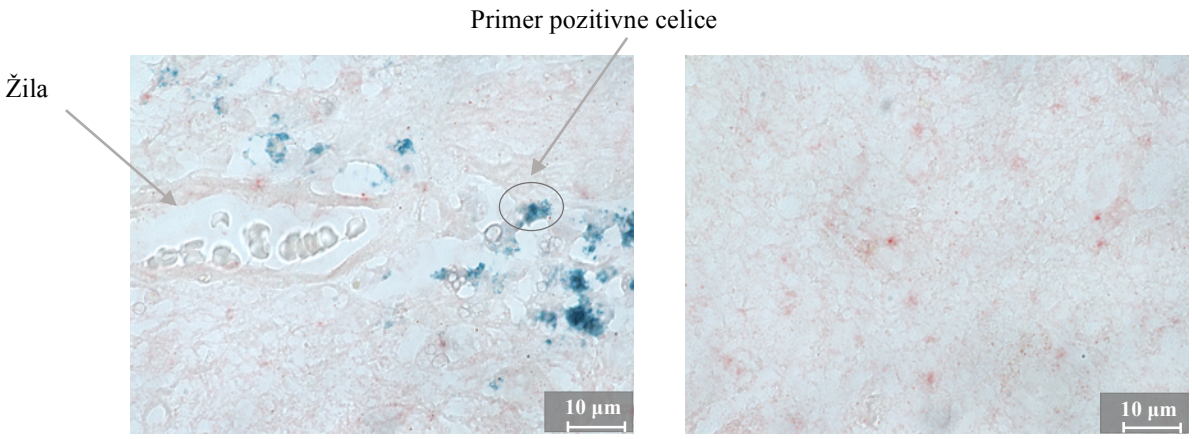
Zanimalo nas je, v katerih celicah v GBM tkivu se nahaja cistatin F, ali so vir cistatina F le imunske celice (mikroglija in infiltrirani makrofagi) ali pa se cistatin F nahaja tudi v drugih celicah. Izbrali smo CD68 kot celični označevalec mikroglije in makrofagov, GFAP kot tumorski astrocitni označevalec, CD9, ki označuje tako tumorske kot glioblastomske matične celice in CD133 kot označevalec glioblastomskih matičnih celic. Najprej smo preizkusili komercialni komplet (DoubleStain IHC Kit) in preverili, da ne pride do navzkrižne reakcije med primarnimi in sekundarnimi protitelesi. Odsotnost rdečega

obarvanja pri uporabi le mišjih primarnih protiteles in odsotnost modrega obarvanja pri uporabi le kunčjih primarnih protiteles pomeni, da ni prisotne navzkrižne reakcije. Prav tako smo preverili, da se sekundarna protitelesa ne vežejo nespecifično na prisotne antigene.

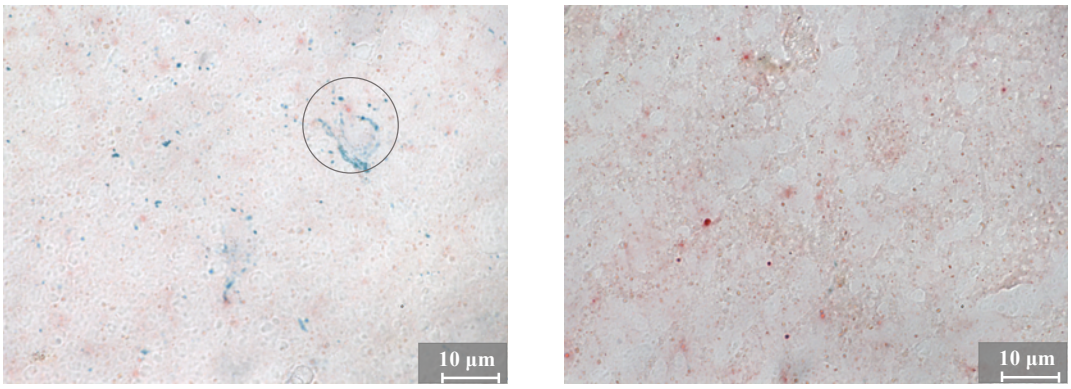


Slika 15: A: Obarvano s protitelesi za CD68 B: Obarvano s protitelesi za GFAP C: Obarvano s protitelesi za cistatin F D: Kontrola brez primarnih protiteles.

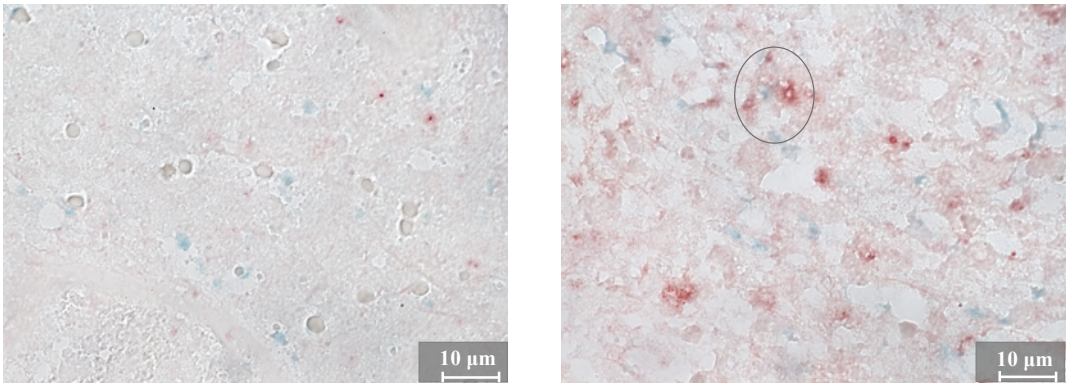
GBM rezine smo nato obarvali s protitelesi proti celičnim označevalcem. Na sliki 16 vidimo modro obarvano kolokalizacijo označevalca CD68 in cistatina F. Makrofage/mikroglijo smo opazili predvsem okoli žil. Kljub temu, da cistatin F močno kolokalizira z mikroglijo/makrofagi, pa vidimo tudi področja, močno obarvana za cistatin F, zunaj mikroglije/makrofagov. Tako lahko potrdimo, da vir cistatina F niso izključno imunske celice. Sliki 17 in 18 prikazujeta kolokalizacijo cistatina F z označevalcema tumorskih celic GFAP in CD9. Ponovno vidimo območja kolokalizacije z celičnima označevalcema ter območja kjer lahko opazimo samo signal za cistatin F.



Slika 16: Kolokalizacija cistatina F in CD68. Vidimo da se del cistatina F nahaja v mikrogliji/makrofagih, vendar je rdeče obarvanje prisotno tudi izven mikroglije/makrofagov.

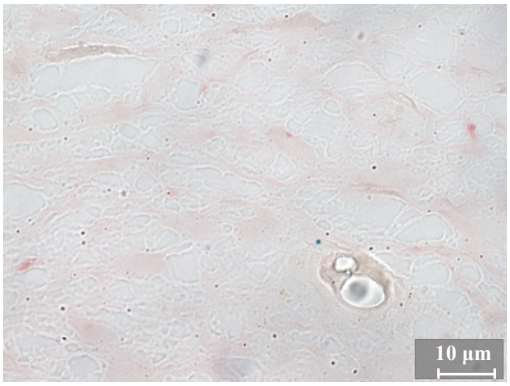


Slika 17: Kolokalizacija GFAP in cistatina F. Rdeče obarvanje je prisotno tudi na mestih, kjer celični označevalec GFAP ni prisoten.



Slika 18: Kolokalizacija CD9 in cistatina F. Intenziteta obarvanja je različna na različnih delih tumorskih rezin.

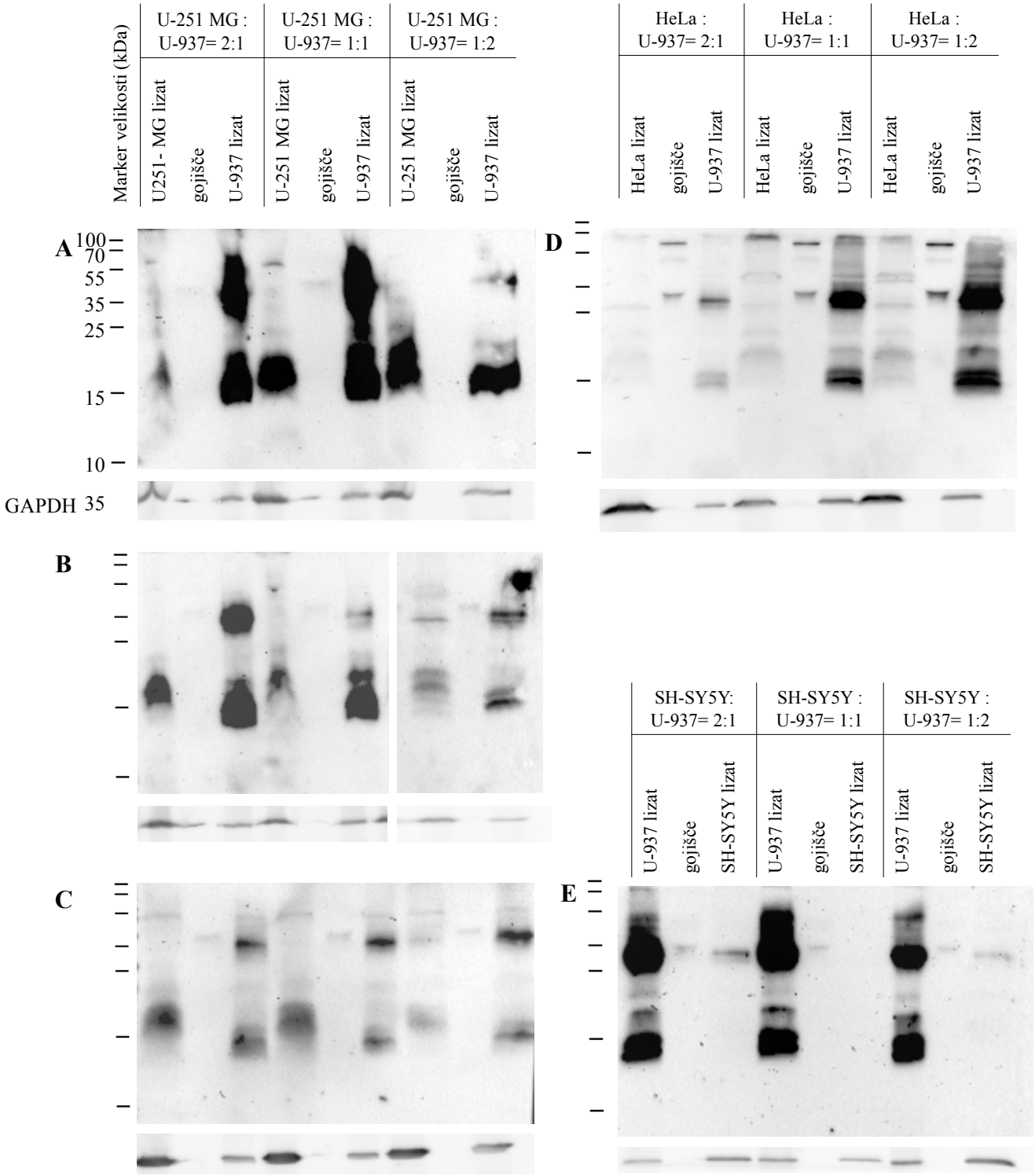
Pri označevanju rezin z označevalcem GBM matičnih celic CD133 nismo dobili zelenega/modrega obarvanja (slika 19). To je pričakovano, saj so matične celice redke v GBM tkivu. Prav tako tkivna rezina predstavlja le en del tumorskega tkiva, tako da ni pričakovano, da bomo na eni rezini zaznali vse možne celice, ki jih najdemo v tumorskem tkivu.



Slika 19: GBM rezina inkubirana s protitelesi za CD133 in cistatin F. Modrega obarvanja nismo zaznali.

8.2 Cistatin F se privzema v tumorske celice v kokulturah z imunskimi celicami

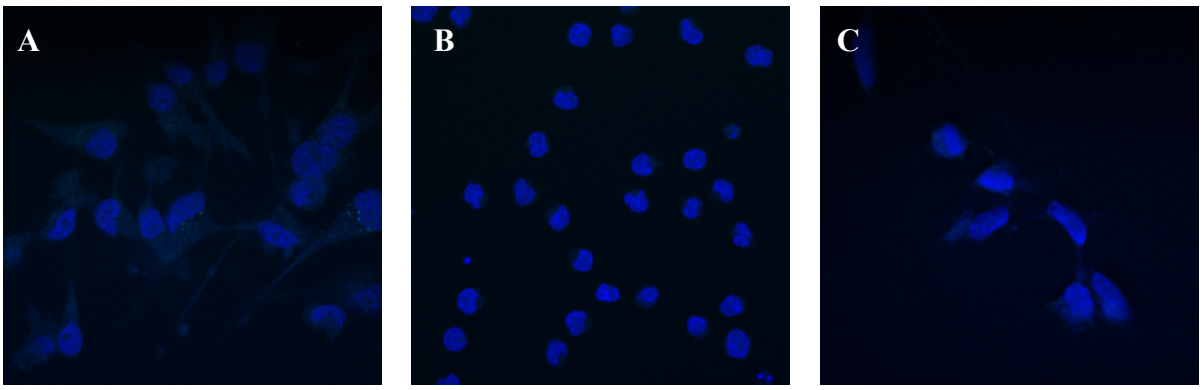
Na *in vitro* modelu smo želeli preveriti, ali se cistatin F lahko privzema v izbrane celične linije. Izbrali smo U-937 celice kot vir cistatina F, U-251 MG, kot *in vitro* model za GBM in SH-SY5Y ter HeLa celično linijo, za primerjavo razlik med posameznimi celičnimi linijami v interakciji z U-937 celicami. Tumorske celične linije smo gojili v kokulturah z U-937 celicami 3, 5 ali 7 dni v različnih razmerjih. Proteine iz pripravljenih celičnih lizatov smo ločili s SDS-PAGE in s prenosom western analizirali prisotnost cistatina F v posameznih celičnih lizatih. V vseh lizatih U-937 celic smo zaznali prisotnost cistatina F tako v dimerni obliki pri 35 kDa, kot v monomerni obliki pri 15 kDa. Prav tako so dobro vidne ločene lise okoli 15 kDa, ki predstavljajo različne glikozilacijske stopnje cistatina F. Ugotovili smo, da se je cistatin F v največji meri privzel v U-251 MG celično linijo. Zanimivo je tudi to, da je večina cistatina F v aktivni monomerni obliki. Pri HeLa in SH-SY5Y celični liniji smo lise za cistatin F opazili šele po 7 dnevni inkubaciji z U-937 celicami. Lise so šibke, iz česar lahko sklepamo, da je privzem manjši, prav tako pa je privzeti cistatin F v neaktivni dimerni obliki. Šibke lise pri 35 kDa so vidne tudi tam, kjer smo na membrano nanesli vse proteine iz gojišča kokultur.



Slika 20: WB analiza celičnih lizatov na prisotnost cistatina F. Lise na višini 35 kDa predstavljajo dimerni cistatin F, na 15kDa pa monomerni cistatin F. Rezultati kokultur U-251 MG in U-937 celic po 3 (A), 5 (B) in 7 (C) dnevnem gojenju. Kokulture HeLa in U-937 (D) ter SH-SY5Y in U-937 (E) celic po 7 dnevnem gojenju.

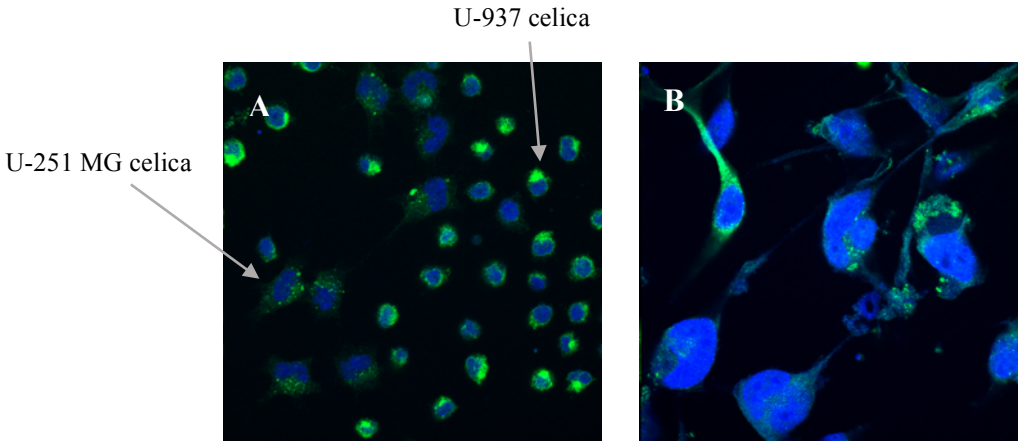
8.3 Lokalizacija cistatina F v celicah

S prenosom western smo potrdili, da se vsaj del cistatina F privzame v izbrane celične linije po inkubaciji z U-937 celično linjo. Nato nas je zanimalo, kje je cistatin F v celicah. Kokulture tumorskih celičnih linij z U-937 celicami smo gojili na krovnih stekelcih, tako da so tvorile celični monosloj. Po fiksaciji smo celice fluorescenčno označili za cistatin F in jih analizirali s fluorescenčnim konfokalnim mikroskopom. Najprej smo preverili, ali se sekundarna protitelesa nespecifično vežejo na celične komponente. Na sliki 21 ne opazimo zelenega signala, kar pomeni, da se sekundarna protitelesa specifično vežejo na primarna protitelesa.

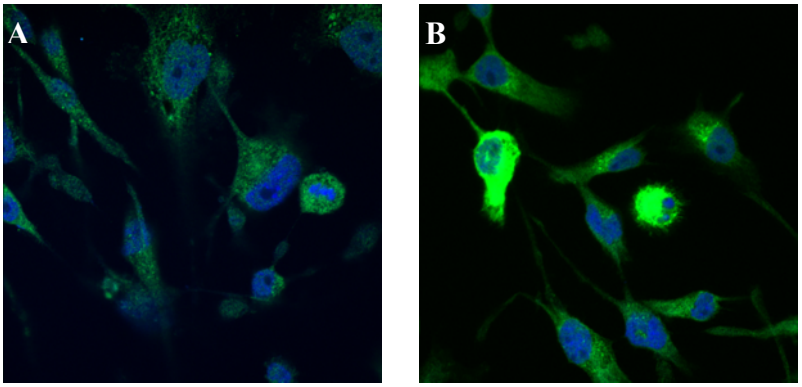


Slika 21: Celice inkubirane samo s sekundarnimi protitelesi. Kokulture celičnih linij U-937 in A: U-251 MG, B: HeLa, C: SH-SY5Y.

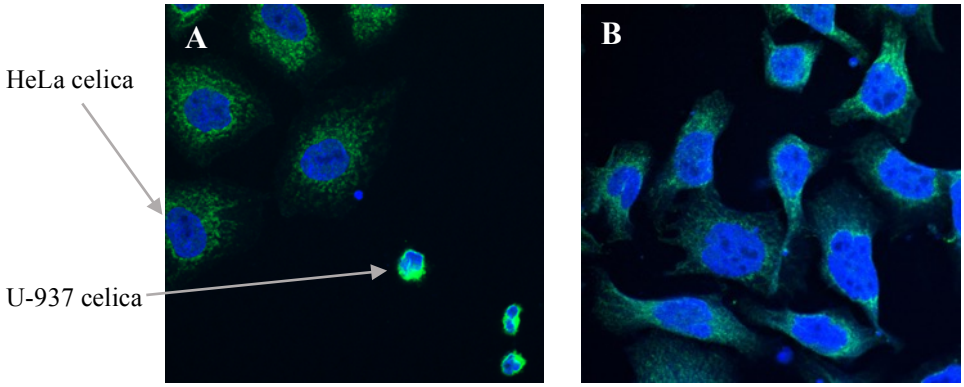
Po sami morfologiji celic lahko enostavno ločimo U-937 celice od ostalih celic v kokulturi. U-937 celice so majhne, okrogle in imajo močen signal za cistatin F. U-251 MG in SH-SY5Y so podolgovate celice z dolgimi izrastki, HeLa celice pa so nepravilnih oblik. Cistatin F je v vseh celicah prisoten v vezikularnih strukturah. Opazimo lahko tudi to, da se intenziteta zelenega signala, ki predstavlja prisotnost cistatina F, povečuje z daljšo inkubacijo celičnih kokultur. Enak eksperiment smo ponovili z diferenciranimi U-937 celicami do makrofagnega fenotipa. Diferenciacijo smo povzročili z dodatkom 100 nM PMA. Kljub temu, da diferencirane U-937 celice v manjši meri izražajo cistatin F, smo lahko opazili podobne rezultate. Pri analizi kokultur U-937 celic z SH-SY5Y celicami smo opazili težave pri pritrjevanju SH-SY5Y celic na krovna stekelca.



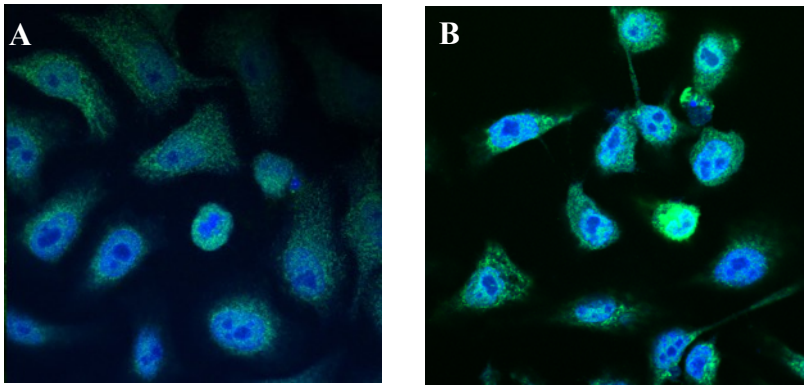
Slika 22: Imunofluorescenčno označene kokulture U-251 MG in U-937 celic po 3 (A) in 7 (B) dneh inkubacije.



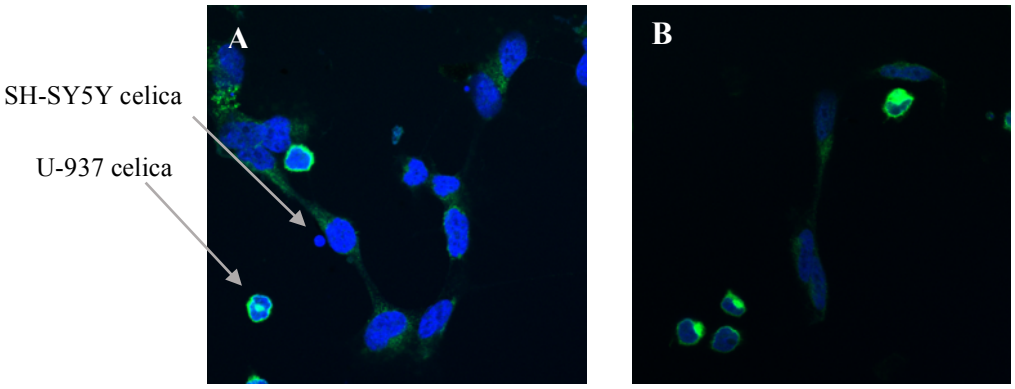
Slika 23: Imunofluorescenčno označene kokulture U-251 MG in U-937 celic stimuliranih s PMA po 3 (A) in 5 (B) dneh inkubacije.



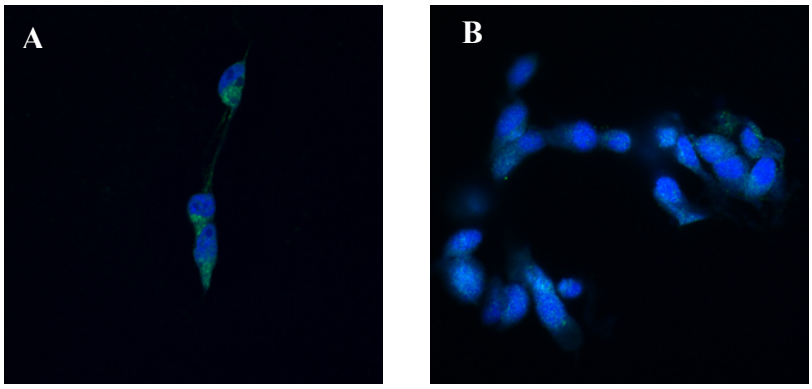
Slika 24: Imunofluorescenčno označene kokulture HeLa in U-937 celic po 3 (A) in 7 (B) dneh inkubacije.



Slika 25: Imunofluorescenčno označene kokulture HeLa in U-937 celic stimuliranih s PMA po 3 (A) in 5 (B) dneh inkubacije.



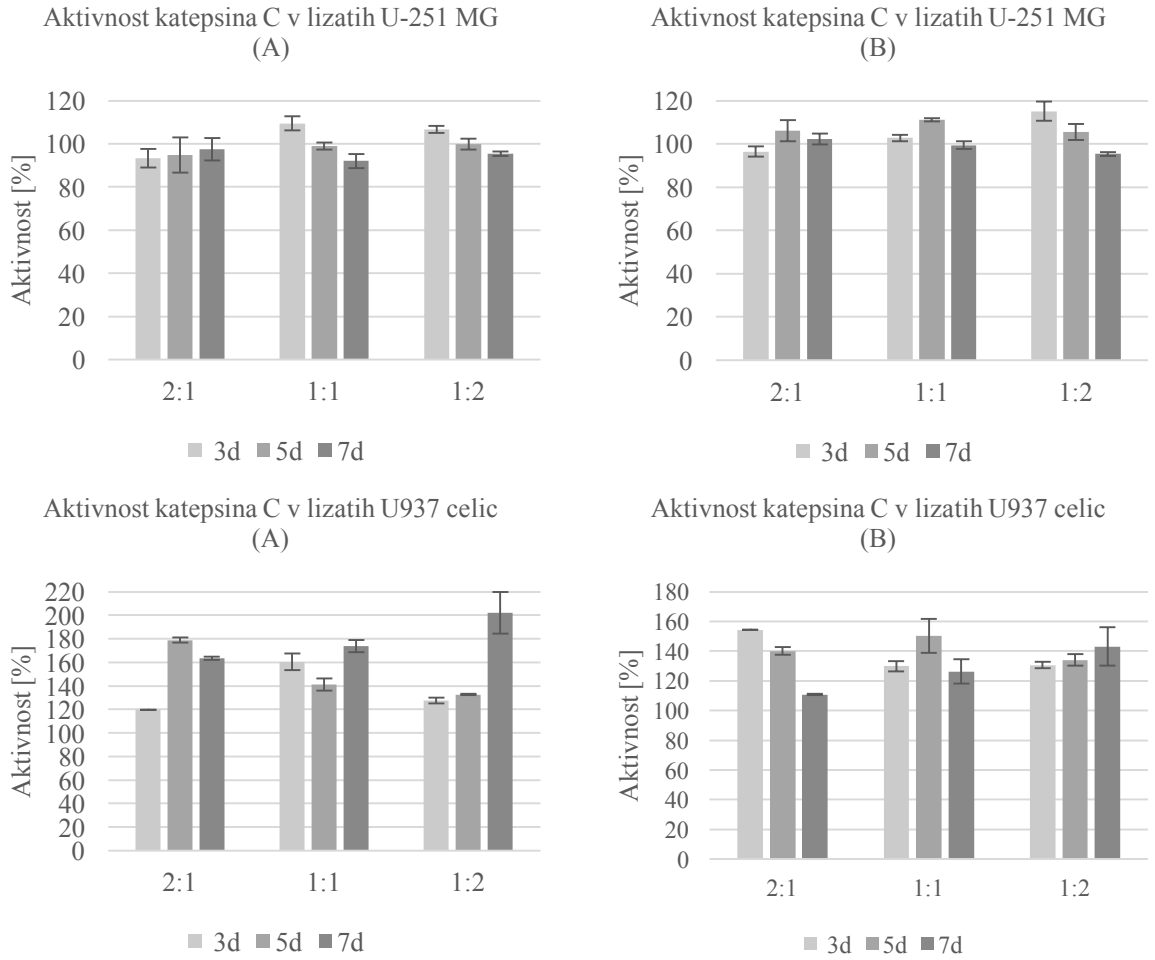
Slika 26: Imunofluorescenčno označene kokulture SH-SY5Y in U-937 celic po 3 (A) in 7 (B) dneh inkubacije.



Slika 27: Imunofluorescenčno označene kokulture SH-SY5Y in U-937 celic stimuliranih s PMA po 3 (A) in 5 (B) dneh inkubacije.

8.4 Aktivnost katepsina C v U251 MG

V zadnjem delu magistrske naloge nas je zanimalo, kakšen je vpliv privzetega cistatina F na aktivnost katepsina C, ki predstavlja eno izmed glavnih tarč cistatina F. Glede na rezultate prisotnosti cistatina F v celičnih lizatih tumorskih celičnih linij s prenosom western, smo se odločili, da aktivnost katepsina C preverimo samo v lizatih kokultur U-251 MG in U-937. V U-251 MG celičnih lizatih smo namreč zaznali tudi aktivno monomerno obliko cistatina F že po tridnevni inkubaciji kokultur, medtem ko smo pri HeLa in SH-SY5Y celičnih lizatih lise za neaktivni dimerni cistatin F opazili šele po sedemdnevni inkubaciji z U-937 celicami. Kljub temu, da smo zaznali močne lise za prisotnost aktivnega monomernega cistatina F v lizatih U-251 MG pa aktivnost katepsina C v teh celičnih lizatih ni zavirana tako kot bi pričakovali. Aktivnost katepsina C v lizatih U-251 MG po kokultivaciji z U-937 celicami je primerljiva z aktivnostjo katepsina C v kontolnih U-251 MG celicah. V lizatih U-937 celic, ki so bile v kokulturi z U-251 MG, pa opazimo povečano aktivnost katepsina C v primerjavi z aktivnostjo katepsina C v kontrolnih lizatih U-937 celic.



Slika 28: Aktivnost katepsina C v lizatih kokultur U-251 MG in U-937.

9 Razprava

Cistatin F spada v skupino cistatinov tipa II, vendar ima v primerjavi z ostalimi cistatini v tej družini kar nekaj posebnih značilnosti. Cistatin F nastane kot dimerna molekula, povezana preko disulfidnih vezi (1). Za njegovo encimsko aktivnost je potrebna pretvorba v monomerno obliko, ki se najverjetneje zgodi po proteolitski cepitvi N-končnega peptida s katepsinom V (6). Večina cistatinov deluje zunajcelično. Del cistatina F se sicer izloča iz celic v obliki dimera, večina pa je usmerjena znotrajcelično v lizosome. Cistatin F je glikoziliran, kar omogoča uporabo manoza-6-fosfatne poti bodisi za znotrajcelični transport v lizosome kot tudi za internalizacijo v okoliške celice. S privzemom v okoliške celice lahko cistatin F nadzoruje proteolitsko aktivnost *in trans* (2). Cistatin F v monomerni obliki zavira katepsine L, F, K,V, H. Katepsin C zavira le N-končno cepljena monomerna oblika (3). Cistatin F je v fizioloških pogojih izražen v imunskih celicah, kot so CTL, NK celice, monociti in dendritične celice. V citotoksičnih celicah preko nadzora delovanja katepsinov C in H preprečuje aktivacijo grancimov (1). Cistatin F vpliva tudi na delovanje perforina zaradi delovanja na katepsin L (9). Povečano izražanje cistatina F in prisotnost aktivne oblike v citotoksičnih granulah zmanjšata citotoksičnost NK celic in povzroči njihovo anergijo (22). To značilnost bi lahko izkoristile tudi rakave celice za izogib imunskemu sistemu. V procesu imunskega urejanja imunski nadzor zazna visokoimunogene tumorske celice ter jih odstranjuje s citotoksičnimi celicami. Ohranjajo pa se nizkoimunogeni kloni tumorskih celic. Njihovo število se v fazi ravnovesja z imunskim sistemom ne spreminja. Ko pa te tumorske celice pridobijo dodatne lastnosti, se izognejo delovanju imunskega sistema in tvorijo tumor. Ene od možnih dodatno pridobljenih lastnosti so spremembe v signalnih poteh apoptoze, ki povzročijo izgubo antigenosti tumorskih celic (24). Tumorske celice se lahko izognejo citotoksičnemu delovanju NK celic, pa tudi CTL s tem, da lokalno povečajo količino cistatina F. To lahko naredijo s povečanim izražanjem in izločanjem, ali pa s pritegnitvijo ostalih imunskih celic v tumorsko mikrookolje. Cistatin F se lahko privzame v citotoksične celice in preko zaviranja katepsina C v citotoksičnih celicah prepreči aktivacijo grancimov in s tem aktivacijo apoptoze tarčnih tumorskih celic.

V magistrski nalogi smo kot primer rakave bolezni izbrali glioblastom. Po WHO klasifikaciji gliomov spada GBM v IV skupino (31). Je zelo agresivna bolezen s slabo prognozo, saj je povprečna doba preživetja okoli enega leta, kljub intenzivnim

terapevtskim naporom (35). Standardno zdravljenje GBM namreč poteka v treh stopnjah. Najprej se tumor odstrani v največji možni meri kirurško, nato sledi radioterapija in adjuvantna kemoterapija, kjer je kot zdravilo izbora uporabljen alkilirajoči citostatik temozolomid (29). V tkivu GBM najdemo invazivne dediferencirane celice heterogenega izvora. Tako so v GBM tkivu prisotne poleg tumorskih celic tudi tumorske matične celice, mikroglija, makrofagi, dendritične celice in druge (36,37). Na podlagi dostopnih podatkov o izražanju cistatina F v GBM iz baze GlioVis smo ugotovili, da ima cistatin F lahko pomembno vlogo pri GBM. Izražanje cistatina F je bilo namreč višje v bolj napredovanih stopnjah glioma, prav tako je bilo višje v tumorjih z nemutiranim IDH statusom, ki predstavlja slabšo prognozo za paciente. Tudi Kaplan-Meierjeve krivulje preživetja kažejo, da ima cistatin F pomembno povezavo s slabšo prognozo GBM (47). Ker vemo, da tumorsko tkivo GBM sestavljajo zelo heterogene celice, nas je zanimalo, v katerih celicah znotraj tumorja najdemo izraženi cistatin F. Sklepali smo, da bi bil lahko prisoten v infiltriranih makrofagih. Tumorske celice GBM namreč sproščajo dejavnike, ki povzročijo vnetje v možganih. To vnetje pritegne monocite, ki preidejo krvno-možgansko bariero in diferencirajo v makrofage (38). Cistatin F bi lahko bil prisoten tudi v celicah mikroglije, saj so v preteklih študijah ugotovili, da se cistatin F izraža v mikrogliji v procesu akutne demielinizacije in remielinizacije (11). Obstaja tudi možnost, da cistatin F izražajo kar same tumorske celice in tumorske matične celice. Najprej smo imunohistokemično analizirali tkivne rezine šestih različnih pacientov z GBM na prisotnost cistatina F. Ugotovili smo, da rjavo obarvanje, ki predstavlja prisotnost cistatina F, ni enako pri vseh tumorskih rezinah. Opazne so bile razlike v izraženem cistatinu F tako med različnimi pacienti, kot znotraj posameznih tumorjev (Slika 14). Razlog za to je, da tkivne rezine predstavljajo le majhen delež celotnega tumorskega tkiva. V naslednjem koraku smo želeli identificirati vrsto celic, ki izražajo cistatin F. Najprej smo kolokalizacijo celičnih označevalcev s cistatinom F izvedli z uporabo fluorescenčno označenih protiteles. Pri tej metodi smo naleteli na težave zaradi močne avtofluorescence tumorskega tkiva. Kljub inkubaciji tkivnih rezin v 10 mM bakrovem sulfatu in 30 mM amonijevem acetatu, ki znižujeta avtofluorescenco možganskega tkiva, je bila avtofluorescenca premočna, da bi z gotovostjo lahko potrdili prisotnost pozitivnih signalov. V nadaljevanju smo za kolokalizacijo uporabili komercialni komplet (DoubleStain IHC kit, ab210061, Abcam). Preizkusili smo kolokalizacijo cistatina F z označevalci za tumorske astrocite (GFAP), tumorske celice in glioblastomske matične celice (CD9), GBM matične celice (CD133) in

označevalcem za mikroglijo/makrofage (CD68). Pri določanju kolokalizacije celičnih označevalcev s cistatinom F smo naleteli na dodatno težavo. Zaradi vizualizacije iskanih antigenov z zeleno in rdečo barvo, ki ob kolokalizaciji spreminjata barvo od modre do vijolične, nismo mogli pobarvati celičnih jeder s hematoksilinom. Interpretacija rezultatov po uvedbi dodatne vijolične barve bi bila vsekakor težavna, zato smo se odločili izpustiti barvanje jeder. Pričakovano smo zaznali kolokalizacijo cistatina F z označevalcem CD68 (Slika 16), ki označuje mikroglijo in makrofage. Predvsem izrazito je bilo obarvanje ob žilah, kar lahko razložimo s tem, da so makrofagi vstopili v tumorsko tkivo preko žil. Presenetljivo pa je to, da smo na tkivnih rezinah zaznali obarvanje za cistatin F tudi na drugih območjih, kar pomeni, da cistatin F, izražen v tkivu GBM, verjetno ni izključno imunskega izvora. Potrdili smo kolokalizacijo cistatina F z označevalci GFAP (Slika 17) in CD9 (Slika 18), ki označujejo tumorske GBM celice. Pri označevanju tumorskih rezin za označevalec GBM matičnih celic CD133 (Slika 19) smo naleteli na težave, saj pozitivnega signala nismo mogli zaznati. GBM matične celice se redko pojavijo v GBM tkivu, prav tako pa tkivne rezine predstavljajo le del tumorja, zato odsotnost obarvanja ni nepričakovana. Na podlagi naših rezultatov lahko z gotovostjo potrdimo, da je cistatin F izražen v GBM in da izraženi cistatin F ne izvira izključno iz makrofagov in mikroglije, kjer je njegovo izražanje pričakovano. Dokazali smo, da je cistatin F izražen tudi v tumorskih celicah, kar je bil eden od glavnih namenov naše študije. V nadaljnjih preizkusih bi bilo dobro analizirati kolokalizacijo cistatina F v tkivnih GBM rezinah s še dodatnimi celičnimi označevalci, npr. za citotoksične NK in CTL celice, prisotnost razgradnje mielinske ovojnice in vnetja... Za kvantitativno ovrednotenje izraženega cistatina F v GBM tkivu pa bi bila potrebna qPCR analiza mRNA cistatina F, ekstrahirane iz celotnega tumorja. Ko bo poznana vloga cistatina F v GBM, bi ta lahko predstavljal dober prognostični kazalec, na podlagi katerega bi se sprejemale terapevtske odločitve.

V drugem delu magistrske naloge nas je zanimalo, ali lahko tudi tumorske celice *in vitro* privzamejo cistatin F. Kot vir cistatina F smo izbrali U-937 celično linijo. U-937 celice imajo značilnosti monocitov in izražajo cistatin F. Po stimulaciji s PMA jih lahko diferenciramo v makrofage (18,50). Kot *in vitro* model GBM smo izbrali U-251 MG celično linijo. Te adherentne celice so izolirane iz GBM. V naših eksperimentih smo dodatno uporabili tudi HeLa in SH-SY5Y celični liniji zato, da smo lahko opazovali razlike v interakciji z U-937 celicami med posameznimi celičnimi linijami. Pripravili smo

kokulture U-251 MG, HeLa oz. SH-SY5Y in U-937 celic v treh različnih razmerjih (2:1, 1:1 in 1:2), ter jih gojili 3, 5 oz. 7 dni. Nato smo pripravili celične lizate posameznih celičnih linij, proteine ločili s SDS-PAGE in opravili analizo za prisotnost cistatina F s prenosom western. Kot pričakovano smo zaznali močne lise za dimerni in monomerni cistatin F v vseh lizatih U-937 celic. Pri analizi lizatov kokultur HeLa in SH-SY5Y celic z U-937 smo opazili šibke lise za cistatin F v lizatih HeLa oz. SH-SY5Y šele po 7 dneh inkubacije (Slika 20). Pri obeh opazimo šibke lise okoli 35 kDa, kar predstavlja prisotnost dimerne, neaktivne oblike cistatina F. Vidne so tudi lise, ki predstavljajo dimerni cistatin F v gojišču kokultur, kar dokazuje, da se je cistatin F zagotovo izločal iz U-937 celic. Obstaja tudi možnost, da so vir izločenega cistatina F v gojišču tudi tumorske celice, vendar tega ne moremo zagotovo trditi. Drugačen rezultat smo dobili po analizi lizatov kokultur U-251 MG z U-937 celicami (Slika 20). Že po 3 dneh gojenja kokultur smo opazili močne lise za cistatin F v lizatih U-251 MG celic. Lise smo opazili predvsem okoli 15 kDa, kar pomeni prisotnost aktivnega monomernega cistatina F. Podoben rezultat smo dobili za lizate kokultur po 5 in 7 dneh skupnega gojenja. Prav tako smo zaznali šibke lise za prisotnost dimernega cistatina F v gojišču kokultur. Te so šibkejše kot pri kokulturah U-937 celic s HeLa ali SH-SY5Y, morda zato, ker se je več cistatina F privzelo v U-251 MG celice. Pokazali smo torej, da se cistatin F lahko privzame v tumorske celice, ki sicer ne izražajo cistatina F. Najbolj izražen učinek smo opazili pri U-251 MG celični liniji. Izvedli smo tudi poskus, s katerim smo želeli preveriti ali tumorske celice začnejo izražati cistatin F po končani kokultivaciji z U-937 celicami. Najprej smo tumorske celice gojili v kokulturi z U-937 7 dni. Nato smo odstranili U-937 celice in tumorskim celicam dodali novo gojišče. Po 3 dneh smo pripravili lizate tumorskih celic. Po ločbi proteinov s SDS-PAGE in analizi s prenosom western nismo zaznali signala za cistatin F v lizatih tumorskih celic ali v gojišču celic. Odprto ostaja vprašanje zakaj je večina privzetega cistatina F v U-251 MG celicah v monomerni obliki. Možen razlog je ta, da se poveča izražanje katepsina V, ki je najverjetneje odgovoren za proteolitsko pretvorbo dimernega cistatina F v monomerno obliko. Preveriti bi bilo treba tudi, ali se privzeti cistatin F lahko izloča iz tumorskih celic, saj samo izločeni cistatin F lahko vpliva na delovanje citotoksičnih celic.

V naslednjem koraku smo določili znotrajcelično lokalizacijo cistatina F. Ponovno smo pripravili celične kokulture U-251 MG, HeLa, SH-SY5Y in U-937, tokrat le v razmerju 1:2. Po 3 oz. 7 dneh gojenja kokultur smo celice pritrdili na krovna stekelca ter cistatin F analizirali s fluorescenčno označenimi protitelesi. Ugotovili smo, da je cistatin F v vseh

celicah prisoten v vezikularnih strukturah. Prav tako smo z daljšim gojenjem kokultur opazili povečano intenziteto signala za cistatin F (Slika 22, Slika 24, Slika 26). Eksperiment smo ponovili z diferenciranimi U-937 celicami, kjer pa smo opazili podobne rezultate kot pri nediferenciranih celicah (Slika 23, Slika 25, Slika 27). Pri obeh poskusih smo imeli težave s pritrjevanjem SH-SY5Y celic na krovna stekelca. SH-SY5Y celice rastejo kot mešanica adhezijskih in suspenzijskih celic, tako smo v prvem koraku imunocitokemičnega protokola s spiranjem krovnih stekelc odstranili vse suspenzijske SH-SY5Y celice. Da bi izboljšali pritrjevanje, smo krovna stekelca pred nanosom celic inkubirali v raztopini polimera poli-L-lizina, ki izboljša adherentne lastnosti. Kljub tej modifikaciji adhezija SH-SY5Y na krovna stekelca ni bila vidno boljša. Na adhezijske sposobnosti SH-SY5Y lahko vpliva tudi visoka pasaža uporabljenih celic.

V zadnjem delu magistrske naloge smo želeli preveriti kakšen je vpliv cistatina F na eno izmed njegovih glavnih tarč - katepsin C. Ker smo aktivno, monomerno obliko cistatina F zaznali le v lizatih U-251 MG celicah, smo aktivnost cistatina F preverili le v kokulturah U-251 MG z U-937 celicami. Kljub temu, da je cistatin F v U-251 MG prisoten v aktivni monomerni obliki, vpliva na aktivnost katepsina C nismo zaznali (Slika 28). Možen razlog za to je, da je katepsin C v prebitku in zato zaviranja nismo zaznali. V lizatih U-937 pa je bila aktivnost katepsina C relativno povečana glede na kontrolne U-937 celice (Slika 28). Sklepamo lahko, da je razlog za to zmanjšana koncentracija cistatina F, saj se je le ta izločil v gojišče in so ga privzele U-251 MG celice.

Cistatin F se je izkazal kot pomemben dejavnik, ki zmanjšuje protitumorski imunski odziv in s tem vpliva na napredovanje raka. S še boljšim razumevanjem njegove vloge bi ga lahko uporabili kot tarčo za načrtovanje novih protitumorskih zdravil. Ta zdravila bi lahko bile molekule, ki bi preprečevale glikozilacijo cistatina F in s tem internalizacijo in transport v endosome/lizosome, lahko bi preko regulacije transkripcijskih dejavnikov preprečevale njegovo izražanje ali pa zavirale delovanje aktivaze katepsina V in s tem monomerizacijo cistatina F.

10 Sklepi

- Cistatin F je izražen v tumorskem tkivu GBM.
- Izraženi cistatin F v tkivu GBM kolokalizira z označevalci za različne celice- CD68 (mikroglija, makrofagi), GFAP (tumorske celice), in CD 9 (tumorske in GBM matične celice).
- Cistatin F se lahko privzema v celične linije U-251 MG, HeLa in SH-SY5Y v kokulturi z U-937 celicami, kot virom cistatina F.
- V celični liniji U-251 MG v kokulturi z U-937 celicami je privzeti cistatin F večinoma v aktivni monomerni obliki.
- Privzeti cistatin F v U-251 MG, HeLa in SH-SY5Y je v vezikularnih strukturah.
- Aktivnost katepsina C v U-251 MG celicah ni spremenjena po kokultivaciji z U-937 celicami.

11 Literatura

1. Magister Š, Kos J. Cystatins in immune system. J Cancer. 2013.;4(1):45–56.
2. Prunk M, Perišić Nanut M, Sabotič J, Kos J. Cystatins, cysteine peptidase inhibitors, as regulators of immune cell cytotoxicity. Period Biol. 2016.;118(4):353–62.
3. Nanut MP, Sabotič J, Jewett A, Kos J. Cysteine cathepsins as regulators of the cytotoxicity of NK and T cells. Front Immunol. 2014.;5(DEC).
4. Ni J, Fernandez MA, Danielsson L, Chillakuru RA, Zhang J, Grubb A, idr. Cystatin F Is a Glycosylated Human Low Molecular Weight Cysteine Proteinase Inhibitor*.
5. Schüttelkopf AW, Hamilton G, Watts C, van Aalten DMF. Structural basis of reduction-dependent activation of human cystatin F. J Biol Chem. 16. junij 2006.;281(24):16570–5.
6. Maher K, Konjar S, Watts C, Turk B, Kopitar-Jerala N. Cystatin F regulates proteinase activity in IL-2-activated natural killer cells. Protein Pept Lett. 2014.;21(9):957–65.
7. Colbert JD, Plechanovová A, Watts C. Glycosylation Directs Targeting and Activation of Cystatin F from Intracellular and Extracellular Sources. Blackwell Munksgaard Traffic. 2009.;10:425–37.
8. Hamilton G, Colbert JD, Schuettelkopf AW, Watts C. Cystatin F is a cathepsin C-directed protease inhibitor regulated by proteolysis. EMBO J. 2008.;27:499–508.
9. Perišić Nanut M, Sabotič J, Švajger U, Jewett A, Kos J. Cystatin F Affects Natural Killer Cell Cytotoxicity. Front Immunol. 13. november 2017.;8:1459.
10. Colbert JD, Matthews SP, Kos J, Watts C. Internalization of Exogenous Cystatin F Supresses Cysteine Proteases and Induces the Accumulation of Single-chain Cathepsin L by Multiple Mechanisms. 2011.;
11. Ma J, Tanaka KF, Shimizu T, Bernard CCA, Kakita A, Takahashi H, idr. Microglial cystatin F expression is a sensitive indicator for ongoing demyelination with concurrent remyelination. J Neurosci Res. 1. maj 2011.;89(5):639–49.
12. Vozelj M, Kotnik V, Lunder J. Temelji imunologije. 1. izd., 1. natis. Ljubljana: DZS; 2000.
13. Pietra G, Manzini C, Vitale M, Balsamo M, Ognio E, Boitano M, idr. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells. Int Immunol. 1. julij 2009.;21(7):793–801.

14. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. Nat Rev Immunol. 1. oktober 2002.;2(10):735–47.
15. Bird PI, Trapani JA, Villadangos JA. Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity. Nat Rev Immunol. 1. december 2009.;9(12):871–82.
16. Wang D, DuBois RN. Immunosuppression associated with chronic inflammation in the tumor microenvironment. Carcinogenesis. oktober 2015.;36(10):1085–93.
17. Cappello F, Gatti E, Camossetto V, David A, Lelouard H, Pierre P. Cystatin F is secreted, but artificial modification of its C-terminus can induce its endocytic targeting. Exp Cell Res. 15. julij 2004.;297(2):607–18.
18. Langerholc T, Zavašnik-Bergant V, Turk B, Turk V, Abrahamson M, Kos J, idr. Inhibitory properties of cystatin F and its localization in U937 promonocyte cells. 3. marec 2005.;272(6):1535–45.
19. Hashimoto SI, Suzuki T, Nagai S, Yamashita T, Toyoda N, Matsushima K. Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression. Blood. 15. september 2000.;96(6):2206–14.
20. Magister Š, Obermajer N, Mirković B, Švajger U, Renko M, Softić A, idr. Regulation of cathepsins S and L by cystatin F during maturation of dendritic cells. Eur J Cell Biol. 2012.;91(5):391–401.
21. Matthews SP, McMillan SJ, Colbert JD, Lawrence RA, Watts C. Cystatin F Ensures Eosinophil Survival by Regulating Granule Biogenesis. Immunity. 19. april 2016.;44(4):795–806.
22. Magister Š, Tseng H-C, Bui VT, Kos J, Jewett A. Regulation of split anergy in natural killer cells by inhibition of cathepsins C and H and cystatin F. Oncotarget. 8. september 2015.;6(26):22310–27.
23. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011.;144:646–74.
24. Bhatia A, Kumar Y. Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: a comprehensive review. Expert Rev Clin Immunol. 10. januar 2014.;10(1):41–62.
25. Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. Clin Cancer Res. 15. februar 2015.;21(4):687–92.
26. Chidgey AP, Boyd RL. Immune Privilege for Stem Cells: Not as Simple as It Looked. Cell Stem Cell. 9. oktober 2008.;3(4):357–8.

27. Utsunomiya T, Hara Y, Kataoka A, Morita M, Arakawa H, Mori M, idr. Cystatin-like metastasis-associated protein mRNA expression in human colorectal cancer is associated with both liver metastasis and patient survival. Clin Cancer Res. avgust 2002.;8(8):2591–4.
28. Morita M, Yoshiuchi N, Arakawa H, Nishimura S. CMAP: A Novel Cystatin-like Gene Involved in Liver Metastasis. Cancer Res [CANCER Res. 1999.;59:151–8.
29. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee SU. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. Asian Pac J Cancer Prev. 2017.;18(1):3–9.
30. Gustavo Dubois L, Campanati L, Righy C, Cristina Leite de Sampaio Spohr T, Porto-Carreiro I, Maria Pereira C, idr. Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. Cell Neurosci. 2014.;
31. Neuropathol A, Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella‐branger D, idr. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary.
32. Turkalp Z, Karamchandani J, Das S. IDH Mutation in Glioma- New Insights and Promises for the Future. JAMA Neurol. 1. oktober 2014.;71(10):1319.
33. Cambruzzi E. The role of IDH1/2 mutations in the pathogenesis of secondary glioblastomas. J Bras Patol Med Lab. 2017.;53(5):338–44.
34. Labussiere M, Sanson M, Idbaih A, Delattre J-Y. IDH1 gene mutations: a new paradigm in glioma prognosis and therapy? Oncologist. 1. februar 2010.;15(2):196–9.
35. Alifieris C, Trafalis DT. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. Pharmacol Ther. avgust ;152:63–82.
36. Ray SK. Glioblastoma : Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies. 1. izd. Swapan K. Ray, urednik. Springer; 2010. 431 str.
37. Hussain SF, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger AB. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses1. Neuro Oncol. 1. julij 2006.;8(3):261–79.
38. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression.
39. Kopitar-Jerala N. Innate Immune Response in Brain, NF-Kappa B Signaling and Cystatins. Front Mol Neurosci. 2015.;8:73.

40. Roesch S, Rapp C, Dettling S, Herold-Mende C. When Immune Cells Turn Bad—Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. Int J Mol Sci. 1. februar 2018.;19(2):436.
41. Gole B, Huszthy PC, Popović M, Jeruc J, Ardebili YS, Bjerkvig R, idr. The regulation of cysteine cathepsins and cystatins in human gliomas. Int J Cancer. 15. oktober 2012.;131(8):1779–89.
42. Gupta K, Mehta S, Ahuja CK, Salunke P, Sharma N. Glioblastoma multiforme masquerading as a tumefactive demyelinating lesion: Lessons learned at autopsy. Neurol India. 2016.;64(4):737–41.
43. Abdoli M, Freedman MS. Neuro-oncology dilemma: Tumour or tumefactive demyelinating lesion. Mult Scler Relat Disord. 1. november 2015.;4(6):555–66.
44. Wolburg H, Noell S, Fallier-Becker P, Mack AF, Wolburg-Buchholz K. The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma. Mol Aspects Med. 2012.;33:579–89.
45. Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. JAMA. 6. november 2013.;310(17):1842.
46. Kos J, Štrukelj B. Biološka zdravila : od gena do učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo; 2007.
47. Bowman R, Wang Q, Carro A, Verhaak R SM. GlioVis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets [Internet]. [citirano 12. marec 2018.]. Dostopno: http://gliovis.bioinfo.cnio.es/
48. Liang J, Li N, Zhang Y, Hou C, Yang X, Shimizu T, idr. Disinhibition of Cathepsin C Caused by Cystatin F Deficiency Aggravates the Demyelination in a Cuprizone Model. Front Mol Neurosci. 21. december 2016.;9:152.
49. Shimizu T, Wisessmith W, Li J, Abe M, Sakimura K, Chetsawang B, idr. The balance between cathepsin C and cystatin F controls remyelination in the brain of *Plp1* -overexpressing mouse, a chronic demyelinating disease model. Glia. junij 2017.;65(6):917–30.
50. U-937 ATCC ® CRL-1593.2™ Homo sapiens Pleura/pleural effusio [Internet]. [citirano 23. marec 2018.]. Dostopno: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1593.2.aspx#generalinformation
51. HeLa ATCC® CCL-2™ [Internet]. [citirano 23. marec 2018.]. Dostopno: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-2.aspx

52. SH-SY5Y ATCC ® CRL-2266™ Homo sapiens bone marrow neuroblast [Internet]. [citirano 23. marec 2018.]. Dostopno: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2266.aspx#characteristics
53. ECACC General Cell Collection: U-251 MG (formerly known as U-373 MG) [Internet]. [citirano 23. marec 2018.]. Dostopno: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=09063001&collection=ecacc_gc
54. IHC-PARAFFIN PROTOCOL (IHC-P) [Internet]. [citirano 8. november 2017.]. Dostopno: http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/ihc_p.pdf
55. ab210061 DoubleStain IHC Kit: M&R on human tissue (HRP/Green & AP/Red) [Internet]. [citirano 27. februar 2018.]. Dostopno: http://www.abcam.com/ps/products/210/ab210061/documents/ab210061 DoubleStain IHC Kit MR on human tissue (HRPGreen APRed) v9b (website).pdf
56. DC Protein Assay Instruction Manual.
57. Protein Electrophoresis Methods | Applications & Technologies | Bio-Rad [Internet]. [citirano 11. januar 2018.]. Dostopno: http://www.bio-rad.com/en-uk/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods
58. The Basis of Western Blot - Creative Diagnostics [Internet]. [citirano 15. januar 2018.]. Dostopno: https://www.creative-diagnostics.com/The-Basis-of-Western-Blot.htm
59. Zavašnik-Bergant T. Mikroskopske tehnike - od gojenja celic za produkcijo protiteles do določanja fine strukture celičnih organelov. Novice IJS. 2006.;(št. 123):11–4.
60. Confocal [Internet]. [citirano 10. maj 2018.]. Dostopno: https://iie.fing.edu.uy/investigacion/grupos/gti/timag/trabajos/2007/proteus/confocal.html
61. Boyer RF, Abram V, Cigić B, Dolinar M, Drobnič-Košorok M, Gubenšek F, idr. Temelji biokemije. Študentska založba; 2005.