

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA MALAVAŠIČ

**PRIKAZ MAKROFAGNO SPECIFIČNIH MEMBRANSKIH
OZNAČEVALCEV NA CELICAH Z VISOKIM IZRAŽANJEM mRNA
LPL V NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM RAKAVEM TKIVU**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



TINA MALAVAŠIČ

**PRIKAZ MAKROFAGNO SPECIFIČNIH MEMBRANSKIH
OZNAČEVALCEV NA CELICAH Z VISOKIM IZRAŽANJEM mRNA
LPL V NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM RAKAVEM TKIVU**

**DISPLAY OF MACROPHAGE SPECIFIC MEMBRANE MARKERS
IN mRNA *LPL* OVEREXPRESSING CELLS IN NON-SMALL CELL
LUNG CANCER**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom doc. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem.

Tkivo je bilo odvzeto v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana pod vodstvom prof. dr. Mihe Soka. Pripravo rezin in fiksacijo so opravili na Inštitutu za anatomijo Medicinske fakultete v Ljubljani pod vodstvom asist. dr. Vike Smerdu, dr. vet. med. Fluorescenčno *in situ* hibridizacijo sem izvedla v Specializiranem hematološkem laboratoriju, KO za hematologijo, UKC Ljubljana.

Zahvale

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Darku Černetu in somentorici doc. dr. Heleni Podgornik za strokovno pomoč in dragocene nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Posebna zahvala velja Specializiranemu hematološkemu laboratoriju UKC Ljubljana za pomoč kljub obsežnemu rutinskemu delu. Hvala tudi družini in prijateljem.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Darka Černeta, mag. farm., spec. med. biokem, in somentorice doc. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem.

Ljubljana, 2014

VSEBINSKO KAZALO

VSEBINSKO KAZALO	I
POVZETEK	II
ABSTRACT	III
SEZNAM OKRAJŠAV	IV
SEZNAM SLIK.....	VI
SEZNAM PREGLEDNIC.....	VII
1 UVOD	2
1.1 NEDROBNOCELIČNI PLJUČNI RAK	2
1.1.1 Alveolarni in s tumorjem povezani makrofagi (TAM).....	3
1.1.1.1 CD14.....	5
1.2 LIPOPROTEINSKA LIPAZA (LPL)	6
1.3 IMUNOFLUORESCENCA	10
1.4 FLUORESCENČNA IN SITU HIBRIDIZACIJA (FISH).....	13
2 NAMEN DELA.....	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 PRIPRAVA VZORCEV	18
3.2 SINTEZA SOND ZA PRIKAZ MRNA LPL.....	18
3.3 ZAPOREDNA ANALIZA IMUNOFLUORESCENCE IN FISH.....	19
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	24
4.1 PROUČEVANJE CELIC, KI SINTETIZIRAJO MRNA LPL V TKIVU NSCLC.....	25
4.1.1 Kolokalizacija mRNA LPL in CD14.....	27
5 SKLEP.....	33
6 LITERATURA.....	34
7 PRILOGA.....	39

POVZETEK

Zaradi nespecifičnih znakov in poznega odkritja ter tudi po smrtnosti je nedrobnocelični pljučni rak med najnevarnejšimi rakavimi obolenji. Njegova burna rast potrebuje predvsem veliko energije in celičnih gradnikov, ki jih lahko pridobi tudi iz lipidov in lipoproteinov. Pri tem ima pomembno vlogo lipoproteinska lipaza (LPL), ki omogoča cepitev s trigliceridi bogatih lipoproteinov. Preliminarne raziskave so že pokazale skoraj dvakrat višjo aktivnost v nedrobnoceličnem rakavem tkivu pljuč v primerjavi z zdravim pljučnim tkivom – kar je bilo povezano s krajšim preživetjem preiskovancev. S tem raziskovalnim delom smo želeli opredeliti celice, ki sintetizirajo LPL. Preliminarno je bilo namreč ugotovljeno, da v celotnem pljučnem tkivu izražanje *LPL* korelira z izražanjem genov, ki so povezani z makrofagi. Želeli smo potrditi hipotezo, da LPL sintetizirajo makrofagi.

Da bi lahko potrdili hipotezo, smo uporabili kombinacijo dveh metod: direktne imunofluorescence in fluorescenčne *in situ* hibridizacije. Prvo metodo smo uporabili za označitev CD14 pozitivnih makrofagnih epitopov s fluorescenčno označenimi monoklonskimi protitelesi. S pomočjo fluorescenčne *in situ* hibridizacije pa smo lahko prikazali mRNA *LPL*. Fluorescenčno sondo, ki je vsebovala zapis za *LPL*, smo sintetizirali že v preliminarnih raziskavah. Ker metodi ni bilo možni izvesti vzporedno, smo ju izvedli zaporedno. Hipotezo smo želeli potrditi na rakavih in zdravih pljučnih tkivih petih različnih bolnikov. Iz pridobljenega tkiva smo pripravili zamrznjene rezine, na katerih smo zaporedno izvedli že prej omenjeni metodi imunofluorescence in fluorescenčne *in situ* hibridizacije.

S pomočjo kolokalizacije smo potrdili postavljeno hipotezo. Celice, ki sintetizirajo LPL v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu, so CD14 pozitivni makrofagi. LPL niso sintetizirali vsi makrofagi, temveč le del populacije.

Ker LPL sintetizira subpopulacija makrofagov, so potrebne dodatne raziskave, s katerimi bi natančneje opredelili podvrsto, povezano s krajšim preživetjem bolnikov z nedrobnoceličnim pljučnim rakavim tkivom.

ABSTRACT

Due to non-specific signs and late discovery, as well as the mortality, non-small cell lung cancer is at the forefront of cancers. Its vigorous growth above all requires a great deal of energy and cellular components. Maximum energy can be obtained from lipids and lipoproteins. In this mechanism lipoprotein lipase (LPL) has an important role, since it allows cleavage of triglyceride-rich lipoproteins. Preliminary studies have already demonstrated almost twice as high activity in non-small cell lung cancer tissue compared to healthy lung tissue - which has been associated with shorter patient survival rates. This research wanted to identify the cells that synthesise LPL. It had been found preliminarily, that in the whole lung tissue LPL expression correlates with the expression of genes, which are related to macrophages. We wanted to confirm the hypothesis, that LPL is synthesized in macrophages.

In order to confirm the hypothesis, we used a combination of two methods: direct immunofluorescence and fluorescent *in situ* hybridisation. The first method was used to characterise CD14 positive macrophage epitopes with fluorescence-labelled monoclonal antibodies. By using fluorescent *in situ* hybridisation, we could display the mRNA *LPL*. The fluorescent probe containing the gene sequence for LPL was already synthesised in preliminary research. Since the two methods cannot be implemented in parallel, we have to use them sequentially. We wanted to confirm the hypothesis on tissue samples of five different patients with non-small cell lung cancer. From the obtained tissues we prepared frozen slices, on which we conducted one after the other the previously mentioned methods, these are immunofluorescence and fluorescence *in situ* hybridisation.

With the help of colocalization we confirmed the hypothesis. Cells which synthesise LPL in non-small cell lung cancer tissue, are CD14 positive macrophages. The LPL enzyme was not synthesised in all of the macrophages, but only in a part of the population.

Because LPL synthesized subpopulation of macrophages, further research is needed to define more precisely what subtype is associated with shorter survival of patients with non-small cell lung cancer tissue.

SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Razlaga/pomen okrajšave
Apo E	apolipoprotein E
CCL	CC-kemokinski ligand 2
cDNA	komplementarna DNA
CEA	karcinoembrionalni antigen
celice NK	celice naravne ubijalke
CTAP III/NAP	povezujoči tkivno-aktivirajoči peptid III/nevtrofilni aktivirajoči protein 2
CYFRA 21-1	fragment citokeratina 19
DAPI	diamino-fenilindol, fluorescenčno barvilo za obarvanje jeder celic
DEPC	dietilpirokarbonat
EGF	epidermalni rastni dejavnik
FAD⁺	flavin-adenin-dinukleotid, oksidirana oblika
FADH₂	flavin-adenin-dinukleotid, reducirana oblika
FISH	fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija
FITC	fluorescein-izotiocianat
FMN	flavin-mononukleotid
FOLR2	folatni receptor 2
GFP	zeleni fluorescenčni protein
HDL	lipoprotein visoke gostote
HIF1	s hipoksijo induciran transkripcijski dejavnik 1
HIF2	s hipoksijo induciran transkripcijski dejavnik 2
HLA	humani levkocitni antigen
IDL	lipoprotein srednje gostote
IFN-γ	interferon γ
LBP	lipopolisaharid vezoči protein
LDL	lipoprotein nizke gostote
LDLR	receptor za LDL
LPL	lipoproteinska lipaza
LPS	lipopolisaharid
Makrofagi M1	klasično aktivirani makrofagi, protitumorogeno delovanje

Makrofagi M2	alternativno aktivirani makrofagi, protumorogeno delovanje
MMP	matriks metaloproteaze
MSR1	makrofagni »scavenger« receptor 1
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NSCLC	nedrobnocelično pljučno rakavo tkivo (angl. Non-small cell lung cancer)
NSE	nevron-specifična endolaza
PBS	fosfatni pufer
PBT	posthibridizacijski spiralni pufer
PDGF	trombocitni rastni dejavnik
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo
RNAze	ribonukleaze
SCCA	ploščatocelični karcinomski antigen
sCD14	topna oblika CD14
SREBF1	sterol regulatorni element vezavni transkripcijski dejavnik 1
SREBF2	sterol regulatorni element vezavni transkripcijski dejavnik 2
SSC	standardni natrijev citrat
Stat3	spreminjevalec signala in aktivator transkripcije 3
TAE	pufer, ki vsebuje tris baze, očetno kislino in EDTA
TAM	s tumorjem povezani makrofagi (angl. Tumor-associated macrophages)
TGF-β	transformirajoči rastni dejavnik
TLR	Toll-u podoben receptor (angl. Toll like receptor)
TNF-α	Dejavnik tumorske nekroze
TRITC	tetrametil-rodamin-izotiocianat
VEGF	vaskularni endotelijski rastni dejavnik
VLDL	lipoprotein zelo nizke gostote

SEZNAM SLIK

Slika 1: Pojavnost in smrtnost posameznih vrst raka v Evropi za leto 2012 pri moških (a) in ženskah (b). Pljučni rak po pojavnosti in smrtnosti spada med pogostejše oblike raka, predvsem pri moških (2).	2
Slika 2: Makrofagi M1 in M2 (12)	4
Slika 3: Kristalna struktura CD14	6
Slika 4: Delež trigliceridov, fosfolipidov, holesterola in proteinov v posamezni vrsti lipoproteinov (18). Največ trigliceridov najdemo v hilomikronih in VLDL.	7
Slika 5: Molekulski model dimerne strukture LPL v pogledu s strani (A) in z vrha (B). N-terminalno vezno mesto heparina (aminokislinski ostanki od 279 do 282) je obarvano rumeno, osnovno aminokislinsko ogrodje C-terminalnega dela pa je obarvano zeleno. Katalitično mesto LPL je povečano, jasno je ponazorjena disulfidna vez med Cys239 in Cys216 s črno barvo. Površinska zanka, poklopec, ki omogoča uravnavanje aktivnosti encima, je obarvan rdeče (21).....	9
Slika 6: Shematski prikaz direktne in indirektne imunofluorescence (33).....	11
Slika 7: Shematski prikaz raziskovalnega dela po posameznih korakih (37).....	13
Slika 8: Slike normalnega pljučnega tkiva pri uporabi različnih barvnih filtrov mikroskopa – 1000-kratna povečava: levo zgoraj: DAPI, desno zgoraj: FITC, levo spodaj: TRITC, desno spodaj: sestavljena večbarvna slika.....	15
Slika 9: Celice, pri katerih je močno izražanje mRNA LPL zaznano s FISH – 1000-kratna povečava, NSCLC tkivo (28)	24
Slika 10: Obarvanje celic z anti-CD14-FITC – 1000-kratna povečava: leva slika: normalno tkivo pljuč, desna slika: NSCLC tkivo	26
Slika 11: Vzporedna postopka RNA FISH in direktne imunofluorescence na normalnem pljučnem tkivu – 1000-kratna povečava	27
Slika 12: Leva slika prikazuje celice, ki so se obarvale z anti-CD14. Področja celic CD14 smo označili in po FISH poiskali iste celice, ki sintetizirajo tudi mRNA LPL.	28
Slika 13: Imunohistokemijsko obarvanje makrofagov v tkivu NSCLC – (A) 100-kratna povečava in (B) 1000-kratna povečava	29
Slika 14: Nukleotidno zaporedje treh različnih odsekov za LPL: posamezni eksoni so označeni z različnimi barvami, podčrtani deli pa označujejo posamezne oligonukleotide, ki smo jih sintetizirali.	39

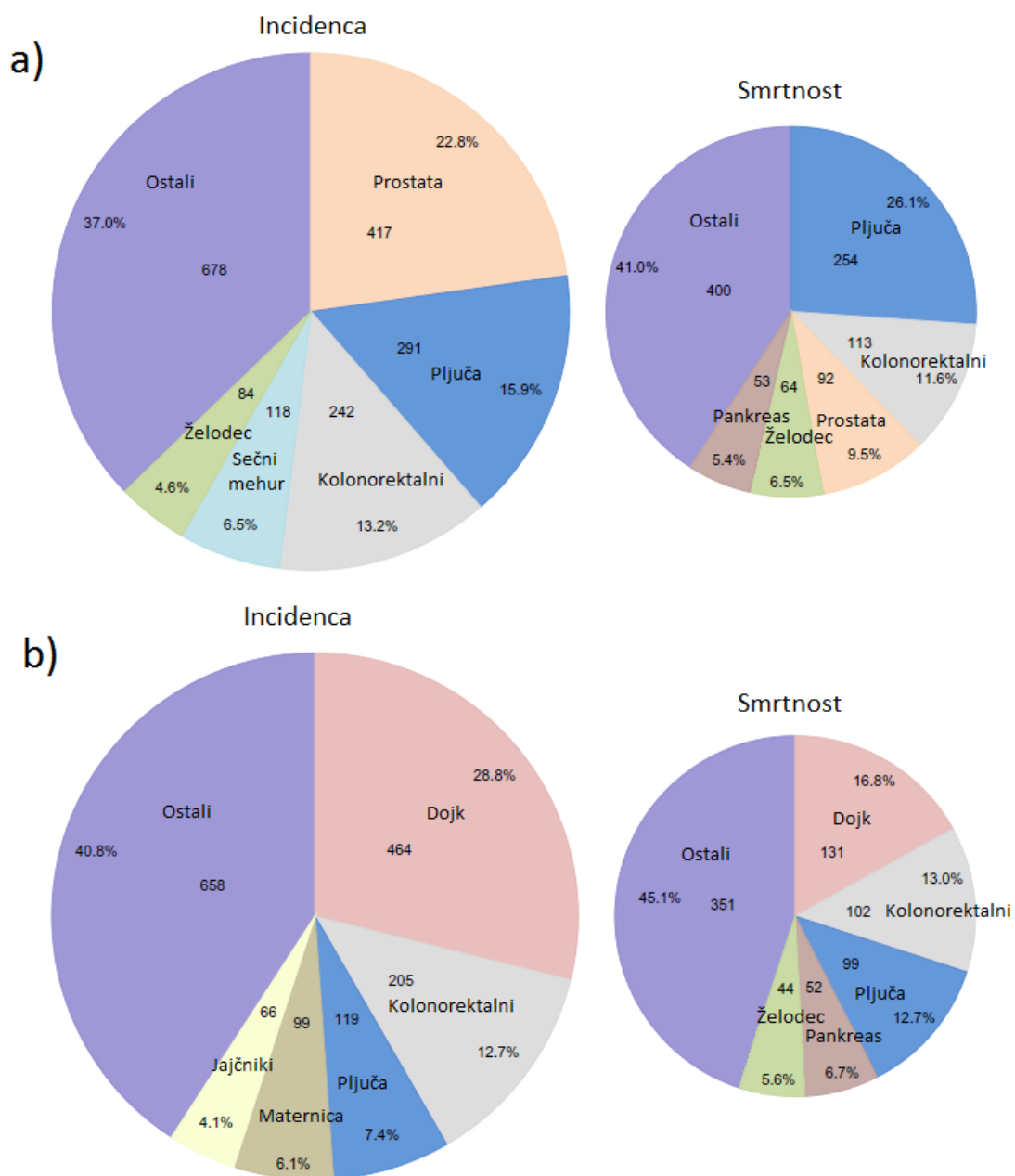
SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Prednosti in slabosti direktne in indirektne imunofluorescence	12
Preglednica II: Ekscitacijski in emisijski maksimumi izbranih endogenih fluoroforov (46).	16
Preglednica III: Klinične značilnosti bolnikov z NSCL, ki smo jih vključili v raziskavo.....	25

1 UVOD

1.1 Nedrobnocelični pljučni rak

Nedrobnocelični pljučni rak (angl. Non-small cell lung cancer – NSCLC) je najpogostejša oblika pljučnega raka (1). Ta je po pojavnosti in smrtnosti v samem vrhu v primerjavi z drugimi vrstami rakov (slika 1).



Slika 1: Pojavnost in smrtnost posameznih vrst raka v Evropi za leto 2012 pri moških (a) in ženskah (b). Pljučni rak po pojavnosti in smrtnosti spada med pogostejše oblike raka, predvsem pri moških (2).

Histološko ločimo različne vrste NSCLC:

- ploščatocelični karcinom ali karcinom skvamoznih celic (25–30 %);
- velikocelični karcinom ali makrocelularni karcinom (10–15 %);
- adenokarcinom ali žlezni karcinom (40 %).

Med druge (15–25 %) manj pogoste tipe NSCLC spadajo: pleomorfni karcinom, karcinoidni karcinom, NSCLC, ki je podoben karcinomu žlez slinavk, mešana histologija NSCLC in neklasificirani NSCLC.

Vzrok visoke pojavnosti in smrtnosti je predvsem v odkrivanju bolezni v poznejših, težje ozdravljivih stadijih bolezni. Pljučnega raka težko odkrijemo predvsem zaradi nespecifičnih znakov, med katere spadajo: kašelj, ki ne preneha, sledi krvi v sputumu, oteženo dihanje, hripavost, bolečina v prsnem košu, hujšanje in utrujenost (3).

Odkrili so številne tumorske označevalce, ki so bili povišani pri raku pljuč. Nekateri izmed njih so: NSE (nevron-specifična endolaza), CEA (karcinoembrionalni antigen), CYFRA 21-1 (fragment citokeratina 19), SCCA (ploščatocelični karcinomaški antigen), CTAP III/NAP (povezovalni tkivno-aktivirajoči peptid III/nevtrofilni aktivirajoči protein 2), haptoglobin itd. (4, 5). Problematična je predvsem njihova nizka specifičnost in občutljivost (4, 5). Trenutno ni označevalca ali skupine tumorskih označevalcev, ki bi jih lahko uporabili za presejalno testiranje v asimptomatski ali visokorizični populaciji (npr. kadilci) (4). Odkriti tumorski označevalci se uporabljajo za spremljanje zdravljenja (4).

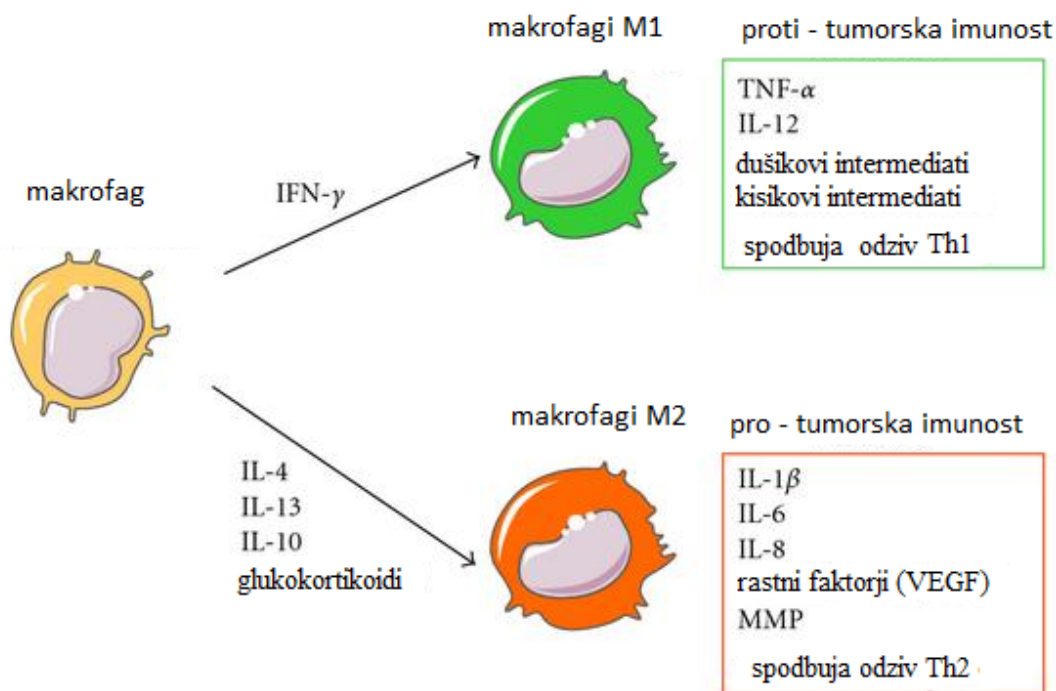
Preliminarne ugotovitve so pokazale, da je večja aktivnost LPL v tkivu NSCLC povezana s krajšim preživetjem bolnikov. S tem raziskovalnim delom smo želeli podrobneje razumeti ozadje teh ugotovitev. Želeli smo nedvoumno ugotoviti, katere celice sintetizirajo mRNA *LPL*, saj bi te lahko bile pomembna tarča za zdravljenje. Iz predhodnih objav smo predvidevali, da so celice, ki sintetizirajo LPL v NSCLC, alveolarni makrofagi.

1.1.1 Alveolarni in s tumorjem povezani makrofagi (TAM)

Alveolarni makrofagi so fagociti, ki igrajo pomembno vlogo v homeostazi, obrambi organizma, odgovoru na tujke in obnovi tkiva. So prilagodljive, mieloične celice nespecifičnega, prirojenega imunskega sistema. S tumorjem povezani makrofagi (TAM) so makrofagi, prisotni v tumorskem tkivu (6-9).

Izločajo številne pro- in protivnetne citokine ter delujejo kot fagociti in antigen predstavitvene celice (10). TAM povezujejo z napredovanjem in zmanjševanjem tumorja,

saj na tumorsko maso delujejo dvolično. Po eni strani omogočajo odstranjevanje tumorskih celic, po drugi strani pa prek izločanja PDGF, VEGF in IL-8 spodbujajo tvorbo strome, angiogenezo in s tem rast tumorja. Učinek je odvisen od deleža aktiviranih makrofagov v tumorju. Provnetni citokini, na primer TNF- α , IL-1 in IL-6, prispevajo k indukciji celic Th1, ki so pomembne pri protitumorski imunosti. Protivnetni citokini, na primer IL-10 in TGF- β , inducirajo celice Th2/Th1, ki zavrejo protitumorsko imunost in spodbudijo progresijo tumorja. Glede na izločene citokine tako ločimo makrofage M1 in M2. Makrofagi M1 prispevajo k odgovoru Th1, makrofagi M2 pa k odgovoru Th2, kot prikazuje slika 2. S tumorjem povezani makrofagi v NSCLC dokazano sintetizirajo manj IL-1, IL-6, TNF- α in TGF- β , imajo manjšo citotoksično aktivnost in s protitelesi posredovano celično citotoksičnost (9-11).



Slika 2: Makrofagi M1 in M2 (12)

Kajenje vpliva na zaščitno vlogo makrofagov. Pri nekadilcih so opazili metabolno aktivnejše alveolarne makrofage z značilno višjo sintezo superoksidnega radikala kot pri kadilcih. Medtem pa se protumorska aktivnost alveolarnih makrofagov med kadilci in nekadilci ni razlikovala (7, 8, 13).

Kar 90 % alveolarnih makrofagov na svoji celični površini predstavlja HLA-DR (HLA tipa II) in več kot 70 % HLA tipa I, prek katerih delujejo kot antigen predstavitvene

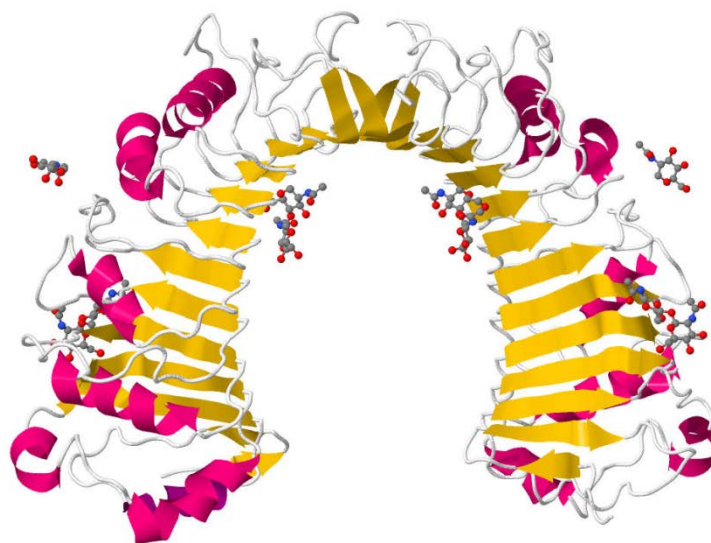
celice (10, 14). Poleg HLA I in HLA II najdemo na celični površini tudi druge specifične receptorje, s katerimi lahko prikažemo in opazujemo specifično celično vrsto. Na celični površini makrofagov najdemo CD115, receptor za Fc γ (CD16) in receptor za lipopolisaharid (CD14). Posamezne podvrste makrofagov vsebujejo še dodatne receptorje. Makrofagi M2 imajo na svoji površini receptorjev očiščevalcev CD163, CD204, CD301 in CD206. Za podvrsto M1 še niso identificirali edinstvenega specifičnega receptorja (15). Izmed vseh zgoraj naštetih smo pri dokazovanju naše hipoteze uporabili CD14, zato ga bomo podrobneje opisali.

1.1.1.1 CD14

CD14 so prvič opisali leta 1982. Prikazali so paleto 10 monoklonskih protiteles, ki izkazujejo visoko afiniteto za humane monocite iz periferne krvi (16).

Gen za protein CD14 najdemo na kromosomu 5, natančneje na področju 5q31.1. Gen se nahaja v kritični regiji, ki je pogosto podvržena deleciji pri določenih mieloidnih novotvorbah (11). Humani gen za *CD14* je sestavljen iz dveh eksonov, ki kodirata 356 AK s številnimi z levcinom bogatimi predeli (17). cDNA *CD14* miši in zajca je dokazano visoko homologna s cDNA *CD14* človeka (16). Aminokislinsko zaporedje proteina CD14 vsebuje številna glikoproteinska vezavna mesta. To vključuje 17 hidrofobnih in nevtralnih AK na C-terminalnem koncu ter 5 potencialnih mest za glikozilacijo (slika 3) (61). CD14 je 55 kDa velik glikoprotein, izražen na površini monocitov, makrofagov in nevtrofilcev. Ocenili so, da ima vsak makrofag iz periferne krvi na površini 50.000 molekul CD14, medtem ko jih imajo nevtrofilci desetkrat manj (16).

CD14 nima značilne transmembranske domene, ki bi omogočala prenos signala v celico, čeprav so dokazali, da CD14 sodeluje pri aktivaciji tirozin kinaze. S tem pa se pojavljajo vprašanja glede mehanizma prenosa signala v celico. CD14 je usidran v plazemsko membrano prek fosfatidilinozitolne povezave. To bi lahko bil možen mehanizem aktivacije celice z vezavo LPS na CD14 (16). Natančnejši mehanizem pa še ni dobro raziskan.



Slika 3: Kristalna struktura CD14

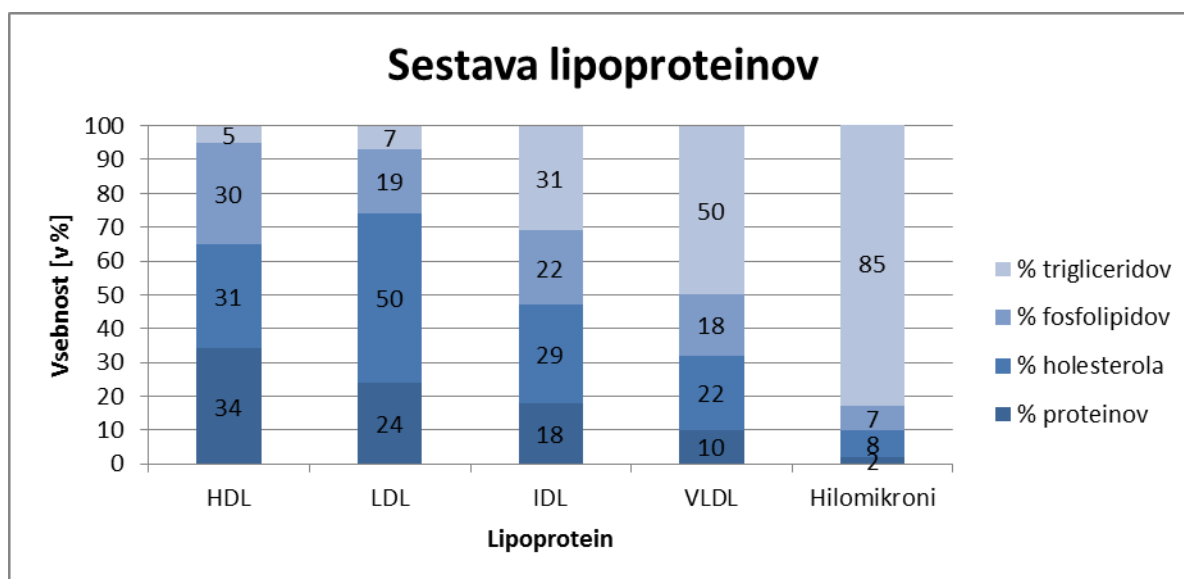
Funkcija CD14 je prepoznavanje lipopolisaharidov (LPS). Ta je del zunanje celične stene Gram-negativnih bakterij, ki *in vivo* povzročajo niz nespecifičnih kaskadnih reakcij. To privede do izločanja raznoterih citokinov in mediatorjev, ki jih večinoma proizvajajo makrofagi in monociti (16). LPS se v plazmi veže na LBP (lipopolisaharid vezoči protein), ki olajša vezavo nano/pikomolarnih količin na CD14. To privede do celične aktivacije, sinteze vnetnih citokinov, kot so: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, kisikovih radikalov, NO in tudi protivnetnih citokinov: IL-10, TGF- β (17).

Poleg zgoraj opisane membranske oblike CD14 so odkrili tudi topno obliko CD14 (sCD14; angl. soluble CD14) z molsko maso 50–53 kDa. Predpostavlja se, da topne oblike CD14 izvirajo iz membranskih oblik, ki jih cepijo specifične fosfolipaze ali proteaze. Serumska koncentracija topne oblike CD14 je bila ocenjena na 6 mg/L. Povišane koncentracije najdemo pri sepsi, aidsu, sistemskem lupusu eritematosusu, malariji in pri bolnikih po hemodializi. Ni še znano, ali je povišana vrednost sCD14 patofiziološko pomembna, ker tudi njena biološka funkcija še ni znana (16, 17).

1.2 Lipoproteinska lipaza (LPL)

Na lipoproteine smo se osredotočili zato, ker predstavljajo veliko energijsko zalogo in celične gradnike. Za vse rakave celice je namreč značilno, da zaradi svoje hitre rasti potrebujejo veliko energije. Za pridobivanje energije uporabljajo raznolike

mehanizme. Mednje spada tudi encim LPL. Ta vpliva na lipoproteine, bogate s trigliceridi. Kot prikazuje slika 4 so to VLDL in hilomikroni.



Slika 4: Delež trigliceridov, fosfolipidov, holesterola in proteinov v posamezni vrsti lipoproteinov (18). Največ trigliceridov najdemo v hilomikronih in VLDL.

LPL (EC 3.1.1.34) hidrolizira estrsko vez v trigliceridih hilomikromov in VLDL. Primarni produkt hidrolize je 2-monoacilglicerol. Ker lipidi spontano izomerizirajo, se pri tem tvori nekaj 1-monoacilglicerola, ki ponovno lahko služi kot substrat za LPL. Poleg 2-monoacilglicerola nastaneta tudi dve prosti višji maščobni kislini. S postopnim hidroliziranjem z LPL bogatih lipoproteinov se presežek površinskih fosfolipidov in holesterolov prenese na druge lipoproteinske delce, predvsem HDL (19). LPL omogoča pretvorbo hilomikronov v hilomikronske ostanke, VLDL pa v IDL (20). LPL ima tudi značilno fosfolipazno aktivnost, s katero tvori 2-lizofosfatide na površini fosfolipidov. Fosfolipazna A1-aktivnost je nujno potrebna za dostopanje v hidrofobno sredico lipoproteinskih delcev (21).

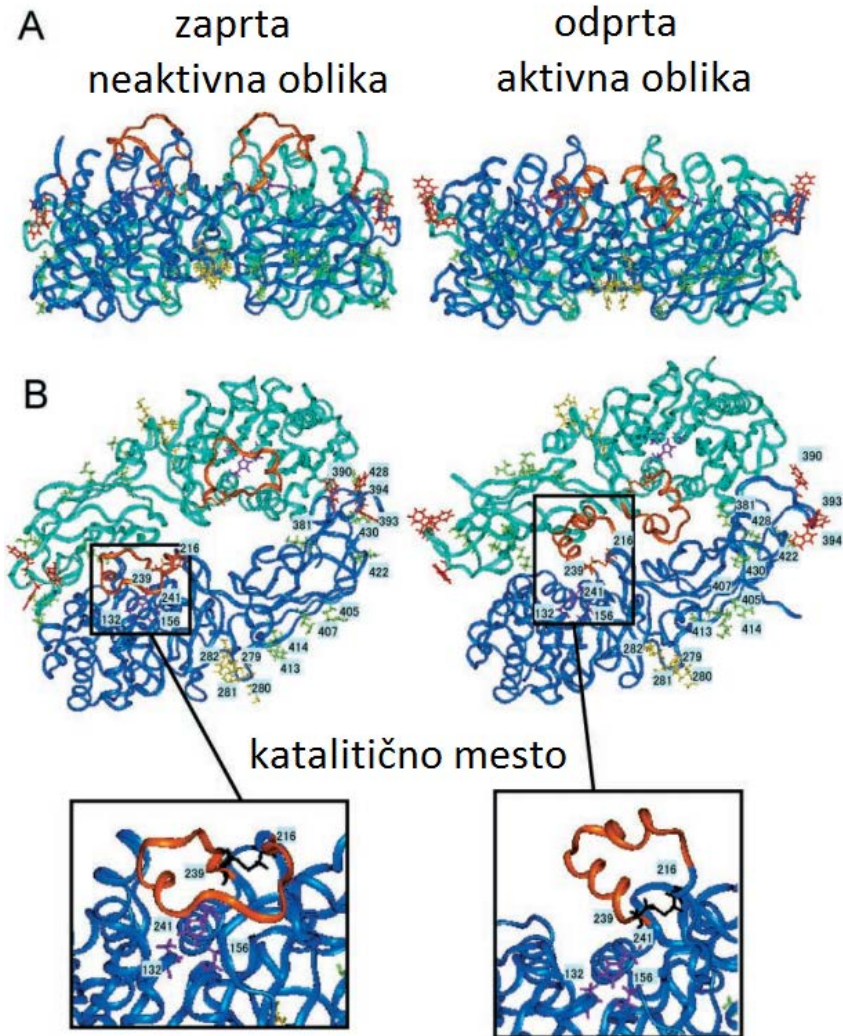
Gen za LPL najdemo na 8. kromosomu, natančneje na področju 8p22. Velik je približno 30 kb. Razdeljen je v 10 kodirajočih in 9 nekodirajočih predelov (13). mRNA *LPL* so našli v človeških adipocitih, miocitih, celicah skeletne miškulature, črevesnih celicah, celicah nadledvične žleze, ledvičnih celicah in v jetrnih celicah novorojenčkov. Humana mRNA *LPL* je visoko homologen z mRNA *LPL* miši, podgane in krave, kar pa nakazuje samo evolucijsko pomembnost gena (19, 22, 23). Pomanjkanje LPL je povezano s hipertrigliceridemijo in aterosklerozo (21).

Protein LPL se sintetizira v parenhimskih celicah miokarda, celicah skeletnih mišic ter belem in rjavem maščobnem tkivu. Našli so ga tudi v pljučnih celicah, možganskih celicah, celicah mlečnih žlez, ledvičnih celicah, makrofagih in celicah vranice. V tkivih z nizko aktivnostjo LPL (jetra, pljuča in vranica) encim sintetizirajo celice monocitne vrste, kot so makrofagi v pljučih in vranici ter Kupfferjeve celice v jetrih. LPL se izraža prehodno v jetrih zarodka, ne pa v jetrih odraslih. Po sintezi se LPL zasidra na površino endotelijskih celic z nekovalentno interakcijo s heparin-sulfat-proteoglikanom in/ali z glikozil-fosfatdilositolom (24).

Glikoprotein LPL vsebuje 448 AK. Aktivni encim je nekovalentni homodimer. Vsaka monomerna podenota ima molekulsko maso 60.000 Da. Aktivna nekovalentna homodimerna oblika je sestavljena iz dveh nekovalentno povezanih glikoziliranih podenot. Na vsako podenoto sta vezana dva oligosaharida (19, 23).

LPL sestavljata dve domeni: velika aminska terminalna domena (N-terminalna domena; 1–312 AK) in majhna karboksilna terminalna domena (C-terminalna domena; 313–448 AK) (12). Shematski prikaz strukture LPL predstavlja slika 5. Aktivno mesto na N-terminalni domeni ima dve konformacijski stanji, odprto aktivno in zaprto neaktivno obliko. Površinska zanka deluje kot zapora, s katero nadzorujemo interakcijo med lipoproteini in katalitičnim mestom encima. Na encimu imamo tudi visokoafinitetno vezavno mesto za heparina. Vezava heparina povzroči razpad dimerne oblike LPL v monomerne oblike in s tem inaktivacijo encima. C-terminalna domena je tudi pomembno mesto za vezavo heparina (12, 67).

Katalitično mesto LPL sestavljajo AK 239–394, saj omogočajo vezavo s trigliceridi bogatih substratov. LPL pretvori 10 trigliceridov na sekundo. Četudi lahko poteka hidroliza na več mestih istočasno s pomočjo več molekul LPL, je potrebnih za hidrolizo trigliceridov enega hilomikrona 10–15 minut, za VLDL pa več kot 30 minut (19).



Slika 5: Molekulski model dimerne strukture LPL v pogledu s strani (A) in z vrha (B). N-terminalno vezno mesto heparina (aminokislinski ostanki od 279 do 282) je obarvano rumeno, osnovno aminokislinsko ogrodje C-terminalnega dela pa je obarvano zeleno. Katalitično mesto LPL je povečano, jasno je ponazorjena disulfidna vez med Cys239 in Cys216 s črno barvo. Površinska zanka, poklopec, ki omogoča uravnavanje aktivnosti encima, je obarvan rdeče (21).

Študije so pokazale, da lipoliza hilomikronov in VLDL z LPL poteka kot del delipidacijske kaskade vzdolž stene endotelijskih celic (19). *In vitro* so dokazali, da je apo C2 aktivator LPL. To so eni izmed najmanjših proteinov, prisotnih na VLDL, hilomikronih in HDL (20, 21).

Preliminarne raziskave so pokazale:

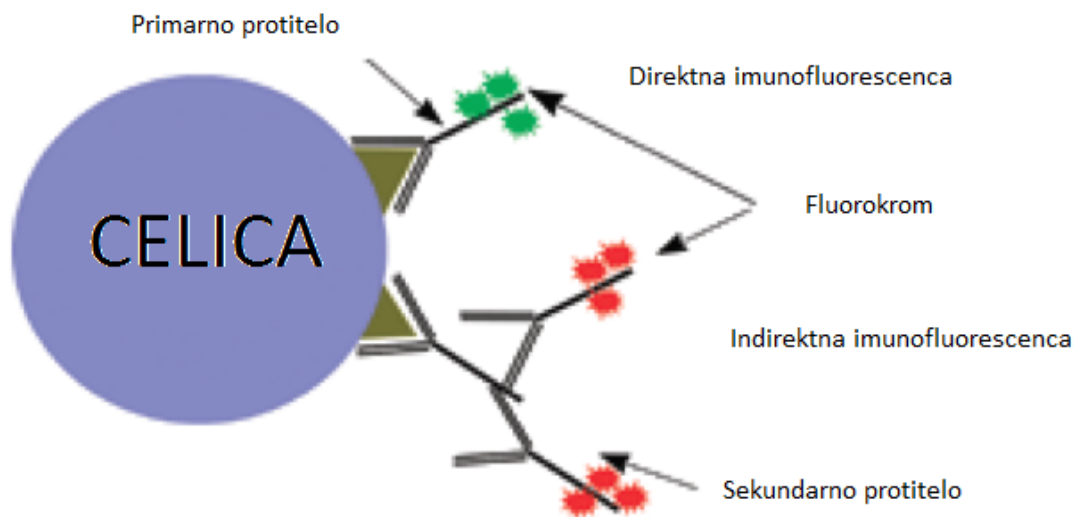
- aktivnost LPL je 1,9-krat višja v tkivu NSCLC kot v zdravem pljučnem tkivu ($p < 0,0001$). Povišane vrednosti so bile prisotne pri 32 bolnikih od 42 (76 %). Zvišana aktivnost LPL v rakavem tkivu pa napoveduje krajše preživetje bolnika. Aktivnost neposredno določa izražanje LPL v rakavem, vendar ne tudi v zdravem pljučnem tkivu (26, 27);
- izražanje gena *LPL* je 3,8-krat višje v pljučnem nerakavem tkivu kot v tkivu NSCLC ($p < 0,0001$). Izražanje gena je bilo višje v pljučnem nerakavem tkivu pri 38 od 42 bolnikov (90 %) (26, 27);
- stadij raka, histološki tip NSCLC, spol, starost, kadilski status, leta kajenja, izguba teže, indeks telesne mase in koncentracija lipidov ne korelirajo z izražanjem gena v tkivu NSCLC (26, 27);
- po razporeditvi in številu domnevamo, da mRNA *LPL* sintetizirajo makrofagi v NSCLC in zdravem pljučnem tkivu. Vse celice v rakavem in zdravem pljučnem tkivu izkazujejo šibko izražanje *LPL*. Vendar so samo v rakavem tkivu prisotne celice, ki močno izražajo mRNA *LPL* (28);
- v celotnem tkivu NSCLC izražanje *LPL* korelira z izražanjem *SRA1* ($p = 0,0001$), *apo E* ($p = 0,0026$), *CD163* ($p = 0,0064$) in *FOLR2* ($p = 0,0145$). Navedene gene preferenčno izražajo TAM. Razen tega pa izražanje gena *LPL* ne korelira z izražanjem *sintaze višjih maščobnih kislin*, *receptorja LDL*, *SREBP1*, *SREBP2*, *SPOT14* in *Angpt14*. Za navedene gene predvidevajo, da jih izražajo tumorske celice in ne makrofagi (29-32). Dodatne analize samo še potrjujejo našo hipotezo, da mRNA *LPL* v tkivu NSCLC sintetizirajo makrofagi.

Za dokaz hipoteze bomo uporabili metodi imunofluorescence in mRNA FISH. Imunofluorescenca nam omogoča označitev celic CD14+, z metodo FISH pa bomo poskušali dokazati mesto sinteze mRNA *LPL*.

1.3 Imunofluorescenca

Imunofluorescenca je način, ki omogoča imunofenotipizacijo celic *in situ* (9). Temelji na pionirskem delu Coonsa in Kaplana ter kasneje Mary Osborne (33). Začetki segajo v leto 1942, ko so Coons in kolegi označili protitelo proti pnevmokokom (34). Pri tej tehniki so protitelesa kemijsko konjugirana s fluorescenčnimi barvili, kot je

fluorescein-izotiocianat (FITC) ali tetrametil-rodamin-izotiocianat (TRITC). Ta označena protitelesa se vežejo posredno ali neposredno na tarčni antigen. Zaznamo ga lahko z uporabo pretočnega citometra, čitalca in fluorescenčnega ali konfokalnega mikroskopa (33). Princip temelji na imunokemijski reakciji med antigenom in protitelesom (34). Ločimo direktno in indirektno imunofluorescenco. Direktna metoda se uporablja manj pogosto. Protiserum proti molekuli, ki jo iščemo, je kemijsko konjugiran s fluorescenčnim barvilom. Pri indirektni imunofluorescenci pa imamo dve protitelesi. Primarno protitelo proti molekuli, ki jo iščemo. Sekundarno protitelo pa je fluorescenčno označeno in se veže na primarno protitelo (33).



Slika 6: Shematski prikaz direktna in indirektna imunofluorescence (33)

Vsaka izmed tehnik ima svoje prednosti in slabosti. Povzete so v preglednici 1.

Preglednica I: Prednosti in slabosti direktne in indirektne imunofluorescence

	Prednosti	Slabosti
Direktna imunofluorescenca	krajši čas, manjši volumni reagentov, enostavnejše označevanje	šibkejši signal, višja cena, manjša fleksibilnost, problematična komercialna dostopnost protiteles, ni ojačenja signala, lahko imamo zmanjšano imunoreaktivnost zaradi vezave fluorofora na protitelo
Indirektna imunofluorescenca	višja občutljivost zaradi hkratne vezave več sekundarnih protiteles, cenejša, lažje dostopna v več barvah, lahko kontroliramo kakovost, različno označena sekundarna protitelesa za isto primarno protitelo	Navzkrižna reaktivnost, daljši čas

Uporabili smo direktno imunofluorescenco. Z enim primarnim protitelesom smo zaznali celice CD14+.

Kot vse druge metode ima tudi imunofluorescenca določene omejitve (33):

- fotobledenje: kot pri drugih fluorescenčnih tehnikah sta tudi pri imunofluorescenci značilna problema fotobledenje in fototoksičnost. Fotobledenje je fotokemijski razpad fluorofora kot posledica tvorbe reaktivnih kisikovih spojin v vzorcu. Nastanejo kot stranski produkt fluorescenčne ekscitacije. Čeprav je natančen mehanizem fotobledenja še neznan, domnevajo, da je primarni vzrok singletni kisik. Fotobledenje lahko zmanjšamo z zmanjšanjem intenzivnosti in časa obsevanja ekscitacijske svetlobe ter zmanjšanjem ravni singletnega kisika z dodajanjem lovilcev;
- avtofluorescenca: biološka fluorescenca v celicah sesalcev. Pripisujejo jo koencimom flavina (FAD in FMN) in reduciranim nukleotidom piridina (NADH). Fiksacija z aldehidi, predvsem glutaraldehidom, lahko povzroči močno

avtofluorescenco. Problem avtofluorescence lahko zmanjšamo z uporabo sond in optičnih filtrov, ki relativno povečajo fluorescenčni signal v primerjavi z avtofluorescenco;

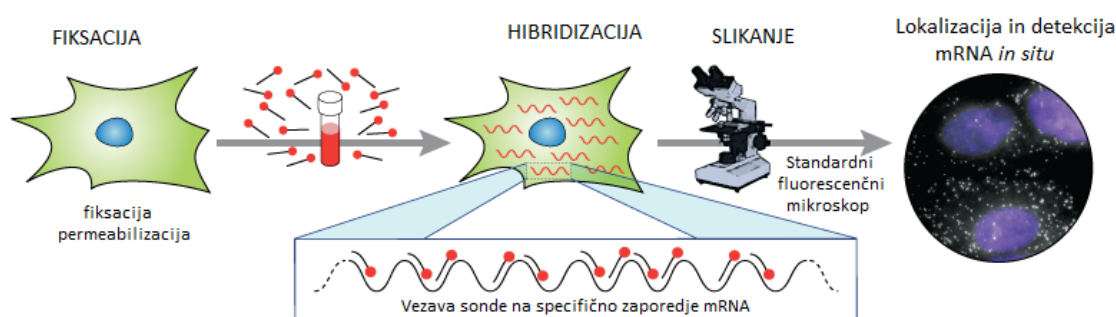
- prekrivanje, sovpadanje fluorescence: je eden izmed problemov, s katerim se soočimo, ko merimo raven fluorescence več kot enega fluorofora. Pride do prekrivanja emisijskih signalov. Eden izmed primerov je uporaba FITC in fikobiliproteinov.

Imunofluorescenca se široko uporablja tako v raziskovalne kot tudi v diagnostične namene. Uporablja se lahko za analizo antigenov v svežih, zmrznjenih ali fiksiranih tkivih. Zaznamo in lokaliziramo prisotnosti ali odsotnosti specifičnih DNA-zaporedij na kromosomih. Najširše se indirektno imunofluorescenca uporablja v patologiji (33).

Pri vrednotenju moramo ovrednotiti: specifično in nespecifično fluorescenco ter avtofluorescenco. Specifična fluorescenca nastane zaradi reakcije med substratom in označenim proteinom. Nespecifična fluorescenca nastane, ko se obarva tkivo s prostim fluorescenčnim barvilom, avtofluorescenca pa zaradi naravno prisotne fluorescence tkiva po izpostavljenosti ekscitacijski svetlobi (34).

1.4 Fluorescenčna *in situ* hibridizacija (FISH)

Fluorescenčna *in situ* hibridizacija (FISH) je citogenetska tehnika za zaznavo in lokalizacijo prisotnosti ali odsotnosti specifičnih nukleotidnih zaporedij na kromosomih (35). Omogoča zanesljivo raziskovanje genetske strukture celic tako v metafazi kot tudi v interfazi (36). FISH se lahko uporablja tudi za zaznavo in lokalizacijo specifičnih RNA molekul (mRNA, dolga nekodirajoča RNA in mikroRNA) v celicah in tkivih (35). mRNA nameravamo lokalizirati z metodo FISH. Shematski prikaz dela prikazuje slika 7.



Slika 7: Shematski prikaz raziskovalnega dela po posameznih korakih (37)

Hibridizacija je parjenje dveh enoverižnih nukleinskih kislin po principu komplementarnosti (38). Tehnike hibridizacije nukleinskih kislin so značilno prispevale k

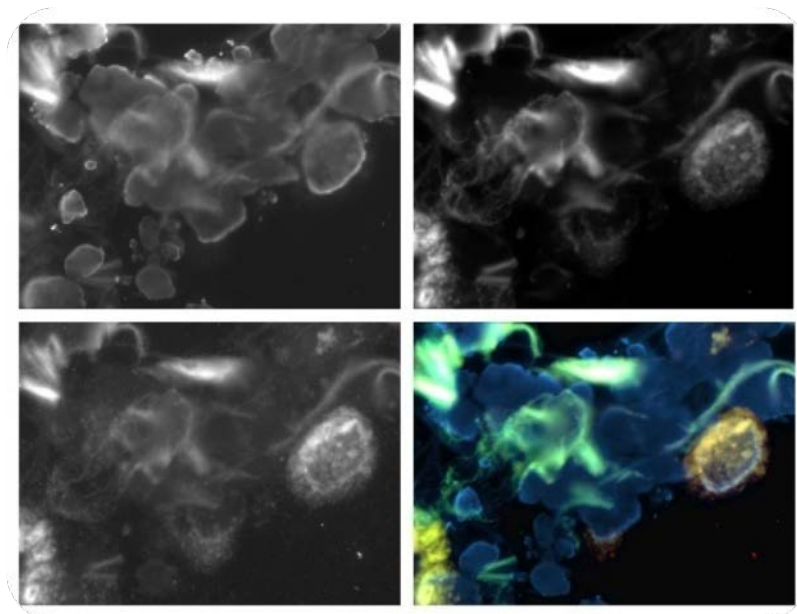
razumevanju organiziranosti, regulacije in izražanja genov (39). V tem kontekstu nam omogoča prostorsko in časovno definirati vzorce izražanja genov znotraj celic in tkiv (35). Zveza *in situ* izvira iz latinščine in pomeni prvotno mesto (39).

Zametki tehnike segajo v leto 1969, ko sta Gall in Pardue razvila tehniko *in situ* hibridizacije (ISH) (40, 41). Takrat je bila ta tehnika omejena na uporabo radioaktivno označenih sond, ki so jih prikazali z avtoradiografijo. V 80. letih 20. stoletja so fluorescenčno označene sonde nadomestile škodljive radioaktivno označene sonde in s tem omogočile širšo uporabo na različnih področjih. Šele pred kratkim so tehniko uporabili na fiksiranih parafinskih tkivih in celicah (41). Danes je tehnika dosegla visoko občutljivost (zaznamo lahko posamezne gene) in mnogoterost (hkratna uporaba več sond) (36).

ISH predstavlja edinstven sklop problemov, saj je lahko nukleotidno zaporedje v nizki koncentraciji zastrto s proteini in zaščiteno znotraj celic ali celičnih struktur. Zaradi tega moramo povečati prepustnost celic in dostopnost nukleotidnega zaporedja. Pri tem pa moramo paziti, da ne uničimo strukturne integritete celic in tkiv. Sonde so lahko majhne (20–40 bp) ali velike tudi do 1000 bp (39).

FISH se v medicini uporablja prenatalno in postnatalno za ugotavljanje morebitnih vzrokov otrokovega zaostanka v razvoju, kot na primer: Downov sindrom, sindrom Prader-Willi, Angelmanov sindrom, sindrom delecije 22q13 itd. Pri raku se FISH rutinsko uporablja za postavitve diagnoze, napoved poteka bolezni in vrednotenje remisije bolezni (39, 42). Njena uporaba je najbolj razširjena v hematologiji. FISH pogosto uporabljajo v kliničnih študijah, lahko pa se uporabi tudi direktno za zaznavo prisotnosti nukleinske kisline določenega patogena na majhnem delu tkiva pacienta. Kljub invazivnosti je metoda uporabna pri zahtevnih in počasi rastočih mikroorganizmih. FISH se lahko uporablja za primerjavo genoma dveh bioloških vrst. S tem nato določijo evlucijsko razmerje (35).

Pri dokumentiranju rezultatov FISH so večbarvne slike sestavljene iz enobarvnih, kot prikazuje slika 8 (43, 44). Slike, prikazane v tej magistrski nalogi, so posnete z digitalno kamero, ki posname črno-belo sliko. Nato s pomočjo programske opreme svetlinam določimo barvo (ki običajno ustreza barvilu vezanega fluorokroma).



Slika 8: Slike normalnega pljučnega tkiva pri uporabi različnih barvnih filtrov mikroskopa – 1000-kratna povečava: levo zgoraj: DAPI, desno zgoraj: FITC, levo spodaj: TRITC, desno spodaj: sestavljena večbarvna slika

Z barvilom DAPI smo označili jedra celice modra, z zeleno pa izrazito avtofluorescenco. Rdeča barva nam omogoča lokalizacijo mRNA *LPL*.

Pri opazovanju tkiv nas omejuje avtofluorescenca, ki izvira iz endogenih fluoroforov (45, 46). Endogeni fluorofori se razlikujejo od eksogenih fluoroforov (npr. FITC, GFP, PE). Običajno imajo endogeni fluorofori močnejšo ekscitacijo pri krajši valovni dolžini in krajšo valovno dolžino emisije (46). Intracelularno endogeno avtofluorescenco najpogosteje pripisujemo reduciranim nukleotidom piridina (NAD(P)H), oksidiranim flavinom (FMN, FAD), porfirinu, piridoksinu, triptofanu, tirozinu, folni kislini, kolagenu, riboflavinu, lipofuksinu, elastinu in v rastlinah klorofilu (45-48). V preglednici 2 so zbrani določeni endogeni fluorofori z ekscitacijskimi in emisijskimi maksimumi.

Avtofluorescenca je omejena na manjše organele, razporejene blizu jedra (49). Avtofluorescenca mitohondrijskega NADH lahko direktno uporabljamo za indikator celičnega dihanja (46). Privzem vodika na mesto 4' planarne strukture piridinskega obroča je odgovoren za značilno spremembo spektra med oksidirano in reducirano obliko piridinskih nukleotidov (49). Ker samo reducirana oblika fluorescira, lahko hipoksijo detektiramo zaradi povečane mitohondrijske avtofluorescence. Pride namreč do povečanega razmerja NADH/NAD⁺ (46). Fluorescenca triptofana, NAD(P)H in FAD je

že bila opredeljena v normalnem in malignem tkivu dojke. Vse maligne celice imajo značilno zmanjšano avtofluorescenco triptofana glede na normalne celice. Pri NAD(P)H in FAD ni opaziti značilne razlike med normalnimi in malignimi celicami (50). Izvor vse avtofluorescence ni iz mitohondrija. Domnevajo, da so pri tem vpleteni tudi lizosomi (49).

Lipofuksin izvira iz malonaldehida. Malonaldehid je pomemben produkt lipidne peroksidacije. Reagira s primarnimi aminskimi skupinami aminokislin in proteinov. Proizvaja Schiffovo bazo, ki fluorescira (46).

Preglednica II: Ekscitacijski in emisijski maksimumi izbranih endogenih fluoroforov (46)

Endogeni fluorofor	Ekscitacijski maksimum [nm]	Emisijski maksimum [nm]
NAD(P)H	340–360	450
FAD	360 in 450	520
Triptofan	295	300–350
Schiffova baza	360	420–470
Porfirin	530–560	580
Piridoksin	340	460–480
Tirozin	270	300
Riboflavin	450	540

Uporaba določenih fiksativov pri pripravi tkiva lahko povzroči avtofluorescenco. Mednje spadajo tudi aldehydni fiksativi, ki reagirajo z amini fluorescenčnih molekul. Glutaraldehid daje slabše rezultate kot formaldehid. Avtofluorescenca se poslabšuje z daljšim časom inkubacije v fiksativu in z zviševanjem temperature (47).

Zaradi širokega ekscitacijskega in emisijskega spektra avtofluorescenca sovпада s spektrom pogostih fluoroforov (48). Za zmanjševanje ali odstranjevanje avtofluorescence so bile predlagane številne raztopine. Kemijsko lahko zmanjšamo avtofluorescenco z reagenti, kot so: natrijev borohidrid, glicin, toluidin modro. V večini primerov so ti neučinkoviti, saj ne odstranijo problema v celoti. Drugi način je uporaba spektralnega algoritma, s katerim odvezamo doprinos avtofluorescence. To je možno samo v primeru drage opreme (konfokalna optika, ustrezen program) (48).

2 NAMEN DELA

V magistrski nalogi nameravamo dokazati, da mRNA *LPL* izražajo makrofagi, natančneje s tumorjem povezani makrofagi – TAM. To hipotezo bomo poskušali potrditi s pomočjo kolokalizacije mRNA *LPL* in specifičnega površinskega antigena makrofagov CD14. Pri tem nam bosta v pomoč dve tehniki: direktna imunofluorescenca in FISH. Obe tehniki temeljita na zaznavi fluorescence, ki jo vrednotimo pod fluorescenčnim mikroskopom.

To nam bo omogočilo boljše razumevanje preskrbe pljučnega rakavega tkiva z lipoproteini. Nekatere raziskave na živalskih modelih so celo pokazale, da z napadom na makrofage lahko dosežejo zmanjšanje tumorske mase. Tudi sama uporaba kombinacije zgoraj omenjenih metod bi imela znaten doprinos k znanosti. Razvit in optimiziran postopek bi omogočil istočasno zaznavo citoplazemskih in membranskih molekul s pomočjo fluorescence. Metodi nista omejeni samo na zamrznjene rezine. Z uvedbo nekaj sprememb bi bilo možno metodi prilagoditi večini histoloških in citoloških vzorcev.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Priprava vzorcev

V raziskavi je sodelovalo 5 bolnikov z NSCLC. Študijo je potrdila nacionalna etična komisija. V UKC Ljubljana smo odvzeli rakavo in navidezno zdravo pljučno tkivo pri istem bolniku. Tkivo je bilo nato transportirano in shranjeno v tekočem dušiku. Iz tkiva smo pripravili zamrznjene rezine s pomočjo kriostata. Rezine debeline 10 μm smo nato fiksirali v 4-odstotnem paraformaldehidu, spirali v pufru in dehidrirali v raztopinah z naraščajočim deležem etanola. Dehidrirane zamrznjene rezine smo nato lahko shranili do analize. Podroben opis postopka je v diplomski nalogi (28).

3.2 Sinteza sond za prikaz mRNA *LPL*

Za prikaz mRNA *LPL* potrebujemo sondo. Ker sonda ni komercialno dostopna, smo jo morali sintetizirati. Začeli smo z izolacijo RNA iz pljučnega tkiva (RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Nemčija) in RNA prepisali v cDNA (SuperScript[®] VILO[™] cDNA Synthesis Kit, Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Nato smo s pomočjo qPCR pomnožili tri različne segmente, ki so komplementarni mRNA *LPL*. Eden izmed njih se je prilegal v 2/3, drugi v 5/6 in zadnji v 8/9 eksonu mRNA *LPL*. Velikost fragmentov je med 134 in 144 bp. Natančnejša nukleotidna struktura posameznih sintetiziranih komplementarnih oligonukleotidov je v prilogi. Z uporabo mešanice treh različnih komplementarnih oligonukleotidov smo želeli povečati občutljivost metode. Samo kakovost dosedanjih postopkov smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. S tem smo dobili podatke o intaktnosti in velikosti sintetiziranih oligonukleotidov. Količino sintetiziranih oligonukleotidov in stopnjo kontaminiranosti vzorca smo izmerili s pomočjo absorpcijske transmissijske spektrofotometrije. Stopnjo kontaminiranosti lahko dobimo iz dveh absorpcijskih razmerij, in sicer: $\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}}$ in $\frac{A_{260nm}}{A_{230nm}}$. V primeru, da absorpcijski razmerji padeta pod vrednost 1,8, to nakazuje na kontaminacijo s proteini, fenoli in drugimi snovmi.

Zaradi številnih primesi, ki bi lahko potencialno motile nadaljnjo analizo, smo sintetizirane oligonukleotide očistili (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA). Oligonukleotide smo nato še fluorescenčno označili (DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd Generation, Roche,

Mannheim, Nemčija). Na 3`-koncu smo sintetizirali rep, na katerega se je v postopku FISH vezalo fluorescenčno označeno protitelo in s tem omogočalo *in situ* lokazacijo mRNA *LPL*. Med sintezo komplementarnih oligonukleotidov smo se morali izogibati RNAz. Prav zato je delo običajno potekalo v predhodno UV-obsevanih, očiščenih komorah. Vse površine je bilo treba temeljito očistiti z odstranjevalcem RNAz, uporabiti reagente in vodo brez RNAz, sterilno steklovino in plastične epruvete. Treba je bilo tudi večkrat menjati rokavice. Podrobneje opisani postopki, uporabljeni reagenti, aparature in pribor so v diplomski nalogi (28).

Da bi nedvoumno dokazali, da makrofagi sintetizirajo mRNA *LPL*, smo uporabili zaporedno analizo imunofluorescence in FISH. Postopka smo želeli uporabiti vzporedno. Ker istočasna zaznava citoplazemskih in membranskih molekul ni bila uspešna, smo se odločili za zaporedno uporabo metod. Med postopkom FISH smo namreč razgradili epitope CD14, da smo omogočili večjo prepustnost celične membrane za RNA-sondo. Zato smo se odločili za zaporedna postopka FISH in imunofluorescence. Z imunofluorescenco smo prikazali celice, ki na svoji površini izražajo CD14, s FISH pa smo pri celicah CD14+ ugotavljali, ali sintetizirajo mRNA *LPL*.

3.3 Zaporedna analiza imunofluorescence in FISH

FISH omogoča zaznavo in lokalizacijo prisotnosti ali odsotnosti specifičnih nukleotidnih zaporedij. V našem primeru bomo s sondami prikazali mesto sinteze mRNA *LPL*.

Imunofluorescenca je serološka tehnika, s katero uporabljamo fluorescenčno označena protitelesa za prikaz specifičnih komponent celice. V našem primeru smo uporabili protitelesa proti CD14, konjugirana s FITC. Enako kot velja za FISH lahko tudi s postopkom imunofluorescence označimo različne predele celice z različnimi fluorofori. Pri tem se moramo izogibati prekrivanju emisijskih spektrov fluoroforov.

Potrebni reagenti:

- raztopine so bile sveže pripravljene na dan analize:
 - raztopine za rehidracijo tkiva (padajoče koncentracije raztopin etanolov v vodi brez RNAz);
 - raztopina za zmanjšanje avtofluorescence (0,2 mol/L HCl);
 - voda brez RNAz;

- spiralna raztopina 1 × PBS (137 mmol/L NaCl; 2,68 mmol/L KCl; 1,47 mmol/L KH₂PO₄);
 - spiralna raztopina 2 × SSC (0,3 mol/L NaCl; 0,3 mol/L Na₃C₆H₅O₇ × 2H₂O);
 - raztopina za pepsinizacijo (raztopina 20-odstotnega pepsina, Sigma – Aldrich, Nemčija);
 - raztopina za refiksacijo (raztopina 4-odstotnega paraformaldehida);
 - posthibridizacijska spiralna raztopina: NP-40 (detergent NP-40 v SSC in DEPC);
 - spiralna raztopina po hibridizaciji: PBT (BSA in Tween 20 v PBS);
 - raztopina za acetiliranje (trietanolamin z anhidridom očetne kisline v DEPC). Priprava posameznih reagentov je podrobno opisana v diplomskem delu (32);
- raztopina za modro obarvanje jeder DAPI II Counterstain (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, Illinois, ZDA);
 - fluorescenčno obarvano monoklonsko mišje protitelo proti CD14, označeno s FITC (Immunotech, Marseille, Francija);
 - fluorescenčno konjugirano monoklonsko mišje protitelo proti CD3, označeno s FITC (Immunotech, Marseille, Francija);
 - za prikaz mRNA *LPL*: anti-digoksigenin-rodamin, Fab fragmenti (Roche, Mannheim, Nemčija);
 - hibridizacijski pufer Vysis LSI/WCP (Abbott, Illinois, ZDA).

Potrebne aparature in pripomočki:

- sterilne kivete s pokrovom;
- sterilni merilni valj;
- sterilne bučke s pokrovom;
- čaša;
- pinceta;
- staničevina;
- pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- nastavki za pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);

- plošča za ogrevanje rezin na sobno temperaturo (Thermoproc, Črnuče, Slovenija)
- centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- stresalnik (Tehtnica, Železniki, Slovenija);
- tesnilo FixoGum (Marabo, Bietigheim-Bissingen, Nemčija);
- krovno stekelce;
- stojalo;
- hibridizator Molecular ThermoBrite™ StatSpin (Abbott, Abbott Park, Illinois, ZDA);
- fluorescenčni mikroskop (Olympus BX 41, Pennsylvanija, ZDA);
- vir svetlobe za ekscitacijo, Olympus U-RFL-T (Olympus, Pennsylvanija, ZDA).

Opis postopka:

- ogrevanje rezin na sobno temperaturo;
- rehidriracija rezin v padajočih koncentracijah etanolnih raztopin: 100-, 95-, 85-, 70-, 50- in 30-odstotni etanol, 2 minuti, sobna temperatura;
- inkubacija v raztopini za zmanjšanje avtofluorescence, 20 minut, sobna temperatura;
- spiranje v vodi DEPC, 3 minute, sobna temperatura;
- spiranje v 1 × PBS, 3 minute, sobna temperatura;
- inkubacija s protitelesi anti-CD14-FITC, razredčenimi v razmerju 1:5 v PBS-ju. Inkubiramo pri temperaturi 37 °C, 60–90 minut;
- spiranje v 1 × PBS, 3 minute, sobna temperatura;
- dodamo 10 µL DAPI II, ki obarva jedra modro;
- pokrijemo s krovnim steklom in pogledamo pod fluorescenčnim mikroskopom. Iščemo celice, ki na površini izražajo CD14 in se zaradi inkubacije s protitelesi obarvajo zeleno. Mesto celic CD14+ na stekelcu označimo;
- spiranje v 2 × SSC, 2 minuti, sobna temperatura;
- ponovno spiranje v 2 × SSC, 2 minuti, sobna temperatura;
- pepsinizacija v raztopini 20-odstotnega pepsina, 20 minut, pri temperaturi 37 °C: na vsako stekelce kanemo 10 µL raztopine, damo stekelce v vlažno komoro in vse skupaj v inkubator;
- spiranje v 2 × SSC, 2 minuti, sobna temperatura;
- ponovno spiranje v 2 × SSC, 2 minuti, sobna temperatura;
- refiksacija v 4-odstotnem paraformaldehidu, 2 minuti, sobna temperatura;
- spiranje v 2 × SSC, 2 minuti, sobna temperatura;

- ponovno spiranje v $2 \times \text{SSC}$, 2 minuti, sobna temperatura;
- acetilacija v raztopini TAE z anhidridom očetne kisline: TAE damo v kiveto, vanje damo stekelca. Damo jih na magnetno mešalo in dodamo anhidrid očetne kisline zaradi kratke razpolovne dobe tik pred uporabo;
- spiranje v $2 \times \text{SSC}$, 2 minuti, sobna temperatura;
- spiranje v $2 \times \text{SSC}$, 2 minuti, sobna temperatura;
- dehidracija v 70-, 90- in 100-odstotnem etanolu, 2 minuti, sobna temperatura;
- stekelca osušimo na sobni temperaturi;
- naneseemo komplementarne oligonukleotide RNA-sonde. Ker za hibridizacijo potrebujemo enoverižne oligonukleotide, jih moramo denaturirati. Sonde pred denaturacijo zmešamo s hibridizacijskim pufrom in vodo brez RNAz. Zmešamo 7 μL komplementarnih oligonukleotidov, 2 μL hibridizacijskega pufru in 1 μL vode brez RNAz. Sonde denaturiramo 10 minut pri 85 °C. Formamid, prisoten v hibridizacijskem pufri, zmanjša temperaturo tališča sintetiziranih oligonukleotidov;
- naneseemo 10 μL sonde na predhodno obdelane rezine pljučnega tkiva, pokrijemo s krovnim steklom in zatesnimo s tesnilom FixoGum. Tesnilo prepreči izsušitev preparatov;
- damo jih v hibridizator, ki regulira temperaturo hibridizacije, čez noč pri temperaturi 37 °C;
- spiranje v raztopini NP-40, 3 minute, pri temperaturi 73 °C;
- spiranje v raztopini PBT, 3 minute, sobna temperatura;
- nanos 10 μL neredčenega komercialnega protitelesa anti-digoksinin-rodamin. Inkubiramo pri temperaturi 37 °C, 60–90 minut. Pri tem moramo preprečiti dostop svetlobe do stekelc. Vidna svetloba lahko povzroči fotobledenje;
- spiranje v raztopini PBT, 3 minute, sobna temperatura;
- dodamo 10 μL DAPI II, ki obarva jedra modro;
- pokrijemo s krovnim steklom, pri čemer moramo preprečiti prisotnost mehurčkov;
- pregled preparatov s fluorescenčnim mikroskopom. Na mestu predhodno identificiranih celic CD14+ preverimo prisotnost signalov. Signali pripadajo molekulam mRNA *LPL*.

Pepsin je izoliran iz prašičje želodčne sluznice. Optimalna vrednost pH-delovanja je med 2,0 in 4,0. Stabilen je pri 60 °C in se ireverzibilno inaktivira pri pH 8,0–8,5. Med

uporabo smo komercialno uporabljen pepsin raztopili, ustrezen pH pa smo zagotovili z uporabo HCl.

Paraformaldehid ali polioksimetilen je polimerizirana oblika formaldehida in predstavnik aldehydnih fiksativov. Fiksacija s paraformaldehidom je priporočljiva predvsem pri uporabi protiteles, ki so konjugirana s fluorofori. Princip fiksacije sloni na tvorbi kovalentnih vezi med topnimi znotrajceličnimi molekulami in citoskeletom. Med postopkom FISH namreč razgradimo membrano, da povečamo dostopnost sonde. S fiksacijo tako preprečimo izgubo topnih molekul, ki bi lahko prehajale v zunajcelični prostor med spiranjem ali inkubacijo. Fiksacija s paraformaldehidom omogoča ohranitev proteinov, encimov, lipidov. Nekateri izsledki raziskav pa navajajo, da naj bi paraformaldehid vplival na intaktnost DNA in mRNA.

Acetoanhidrid ali anhidrid očetne kisline je brezbarvna, hlapna, vnetljiva tekočina. Anhidrid očetne kisline omogoča acetilacijo oziroma po IUPAC-nomenklaturi etanolacijo. Gre za kemijsko reakcijo, pri kateri pride do pripenjanja acetilne funkcionalne skupine. Z acetilacijo izničimo pozitivno nabite aminske skupine proteinov tkiva in s tem preprečimo ali zmanjšamo vezavo sonde na tkivo. Ima omejeno stabilnost v raztopinah, saj hidrolizira do karboksilnih kislin. V našem primeru se tvori očetna kislina:



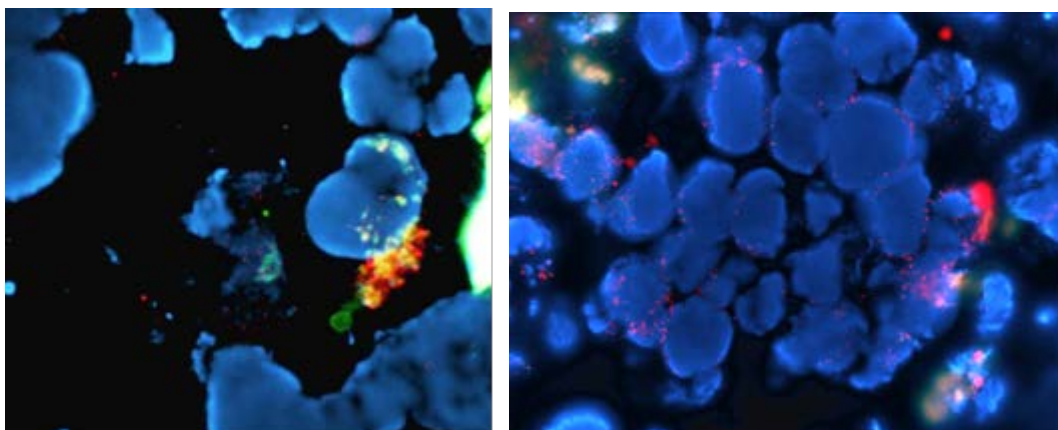
Eksperimentalno so dokazali, da ima naslednjo razpolovno dobo: $t_{1/2}(25^\circ C) = 4,4 \text{ min}$ in $t_{1/2}(15^\circ C) = 8,1 \text{ min}$.

Ker uporabljamo fluorescenčne sonde, moramo stekelca čim manj izpostavljati dnevni svetlobi. Vidna svetloba namreč povzroči fotobledenje sonde. Intenziteto fluorescence lahko tudi povečamo tako, da damo stekelca po postopku spiranja za nekaj minut v zamrzovalnik.

Ker moramo RNAzam preprečiti dostop do raztopin in s tem tudi celic, moramo RNAze predhodno odstraniti s površin, uporabljenih aparatov in pripomočkov. Ker so lahko RNAze prisotne tudi v pripravljenih reagentih, uporabimo vodo brez RNAz. Potrebno je tudi večkratno menjavanje rokavic.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Predhodne raziskave so pokazale, da je aktivnost LPL v celotnem tkivu NSCLC večja kot v normalnem pljučnem tkivu (nerakavem). Povečana aktivnost močno napoveduje krajše preživetje bolnikov (26). Celice, ki poskrbijo za pritek energije in celičnih gradnikov rakavemu tkivu, so lahko pomembna tarča protitumorske terapije. Zaradi tega je pomembno, da ugotovimo vrsto teh celic. Predhodno je bilo ugotovljeno, da so v tkivu NSCLC prisotne celice, ki sintetizirajo mRNA *LPL* (28, slika 9).



Slika 9: Celice, pri katerih je močno izražanje mRNA LPL zaznano s FISH – 1000-kratna povečava, NSCLC tkivo (28)

Slika 9 prikazuje modro obarvana jedra. V citoplazmi nekaterih celic opazimo izrazito zeleno-rumeno avtofluorescenco in drobne rdeče signale. Rdeče signale dajejo z rodaminom označeni komplementarni oligonukleotidi, s katerimi smo želeli prikazati mRNA *LPL*. Poleg tega smo tudi preverili specifičnost sintetiziranih sond, ki je bila v našem primeru zadostna. Poleg močno pozitivnih celic je bilo čez celotno tkivo prisotno blago izražanje mRNA *LPL*. Celic s prekomernim izražanjem mRNA *LPL* v zdravem pljučnem tkivu nismo opazili. Avtofluorescenca je bila izrazitejša v kontrolnem tkivu. Celice z močnim izražanjem mRNA *LPL* se običajno nahajajo v majhnih skupinah.

Preliminarne študije so proučevale tudi izražanje različnih genov v celotnem pljučnem tkivu in korelacije med njimi. Izsledki kažejo, da izražanje *LPL* korelira z izražanjem *MSR1* ($p = 0,0001$), *CD163* ($p = 0,0064$) in *FOLR2* ($p = 0,0145$). To so geni, ki se preferenčno izražajo v makrofagih. Medtem pa izražanje genov *FASN*, *LDLR* in *SREBF1* ni koreliralo z izražanjem *LPL*. Ti se preferenčno izražajo v tumorskih celicah (29-32). Iz zgornjih izsledkov smo zaključili, da so celice, ki izražajo mRNA *LPL* v tkivu NSCLC, najverjetneje makrofagi.

4.1 Proučevanje celic, ki sintetizirajo mRNA *LPL* v tkivu NSCLC

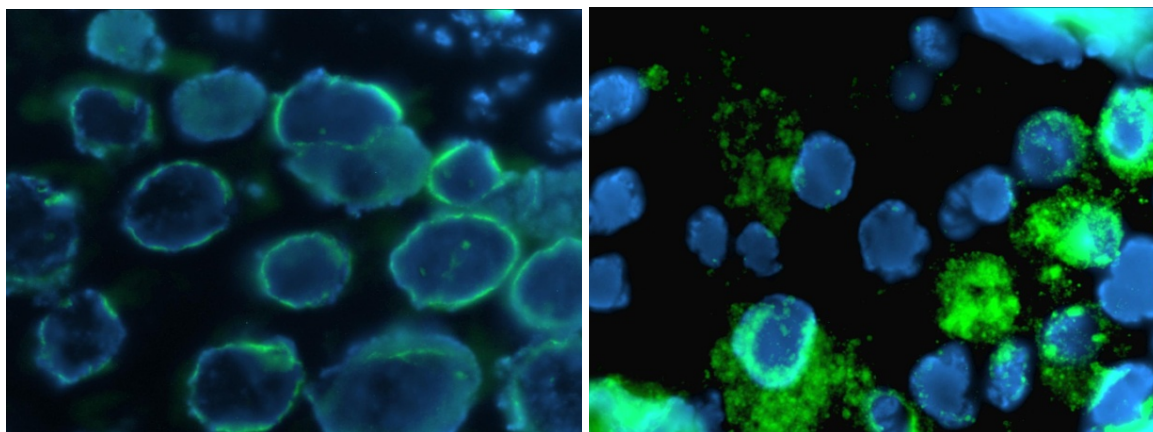
V raziskavo smo vključili 5 preiskovancev. Odvzeli smo jim parna vzorca pljučnih tkiv. Klinične značilnosti bolnikov so zbrane v preglednici III.

Preglednica III: Klinične značilnosti bolnikov z NSCL, ki smo jih vključili v raziskavo

Bolnik	Spol	Starost	Stadij NSCLC	Tip NSCLC
1	moški	55 let	I	ploščatocelični karcinom
2	moški	61 let	II	ploščatocelični karcinom
3	moški	56 let	III	adenokarcinom
4	moški	61 let	II	ploščatocelični karcinom
5	moški	67 let	II	adenokarcinom

Preiskovanci v raziskavi so moški s povprečno starostjo 60 let. Pri bolnikih so predhodno odkrili dva najpogostejša tipa NSCLC. Ploščatocelični karcinom je bil prisoten pri treh preiskovancih in adenokarcinom pri dveh preiskovancih. Zastopani so bili tudi vsi stadiji tumorja NSCLC, najpogosteje stadij II. Tkivo smo zamrznili in pripravili zmrznjene rezine. Tkivo se je razdelilo na dva dela. Del tkiva je bil uporabljen za imunokemijske preizkuse, del pa za FISH in imunofluorescenco.

Pred začetkom dela smo preverili, ali se celice označijo z uporabo protiteles proti CD14. Celice so med kancerogenezo podvržene številnim spremembam v nadzoru celičnega ciklusa, transkripcije, popravila DNA, apoptoze itd. Na celični površini makrofagov so pri kadilcih ugotovili številne spremembe. Primerjava populacij kadilcev in nekadilcev je pokazala številne morfološke, funkcijske in fiziološke razlike. Med spremenjenimi proteini se med drugimi navaja tudi receptorje za manozo (51). Sprememb v izražanju in sintezi membranskega proteina CD14 nismo pričakovali, zato smo ga uporabili za dokaz makrofagov v vzorcih. Prav tako smo morali preveriti vpliv fiksativa na nukleinske kisline.



Slika 10: Obarvanje celic z anti-CD14-FITC – 1000-kratna povečava: leva slika: normalno tkivo pljuč, desna slika: NSCLC tkivo

Na sliki 10 so modro z DAPI obarvana jedra celic, z zeleno pa CD14. DAPI ali 4',6'-diamino-2-fenilindol je fluorescenčno barvilo, ki se močno veže na z A-T bogata področja dvovertične DNA. Leva slika prikazuje normalno tkivo. Vidni so lepo oblikovana intaktna jedra, ohranjenost epitopov in s tem tudi lepo obarvanje CD14. Desna slika pa prikazuje makrofage v tumorskem tkivu, ki izkazujejo spremenjeno sestavo celične membrane. Tumorske celice imajo spremenjen citoskelet v primerjavi z normalnimi nerakavimi celicami. Tumorske celice namreč izgubijo povratni signal med jedrom in citoskeletom, pride do izgube ali modifikacije površinskih glikoproteinov in glikolipidov. Spremeni se tudi aktivnost nukleotid ciklaze v membrani, poveča se prenos pomembnih hranil in pojavijo se lahko spremembe v antigenih. S sliko 10 smo dokazali, da je možno obarvanje celic s CD14. Obema slikama je poleg uspešnega obarvanja s CD14 skupno tudi to, da porazdelitev celic ustreza preliminarnim ugotovitvam. Iz tega smo tudi zaključili, da je vpliv paraformaldehida ali formaldehida na kromatin zanemarljiv. Nekateri namreč menijo, da med fiksacijo v aldehidnih fiksativih pride do poškodbe DNA in mRNA.

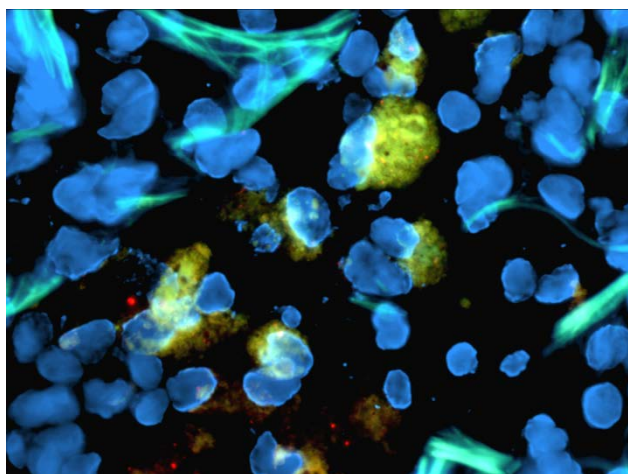
Pri prikazu makrofagov, ki so CD14+, smo uporabili tehniko direktne, neposredne imunofluorescence. Uporabili smo monoklonska mišja protitelesa proti CD14, konjugirana s FITC. Pri uporabi te tehnike smo omejeni zaradi fotobledenja, avtofluorescence, prekrivanja signalov in nespecifične fluorescence. Fotobledenje smo poskušali omejiti z uporabo ustreznih ukrepov med pripravo preparata. Izogibali smo ga vidni svetlobi. Vidna svetloba med drugim vsebuje UVA-žarke, ki lahko vplivajo na celični metabolizem. König je leta 1996 ugotovil, da neprekinjeno sevanje UVA-svetlobe moti celično delitev in poškoduje DNA (50). Med postopkom smo se trudili omejiti

dostop UVA-svetlobe do preparatov. Avtofluorescenci se ni mogoče izogniti, lahko pa jo omilimo. V našem primeru smo pred inkubacijo z anti-CD14-FITC uporabili raztopino za zmanjševanje avtofluorescence.

4.1.1 Kolokalizacija mRNA *LPL* in CD14

Predhodno smo morali razviti postopek prilagoditi. Postopek direktne imunofluorescence smo preizkušali pri različnih temperaturah inkubacije. Želeli smo odkriti razliko v hibridizaciji pri sobni temperaturi in pri 37 °C. Do pozitivnega obarvanja smo prišli v obeh primerih. Ker pa smo pri inkubaciji na 37 °C dobili lepše končne rezultate, smo se odločili za uporabo te temperature.

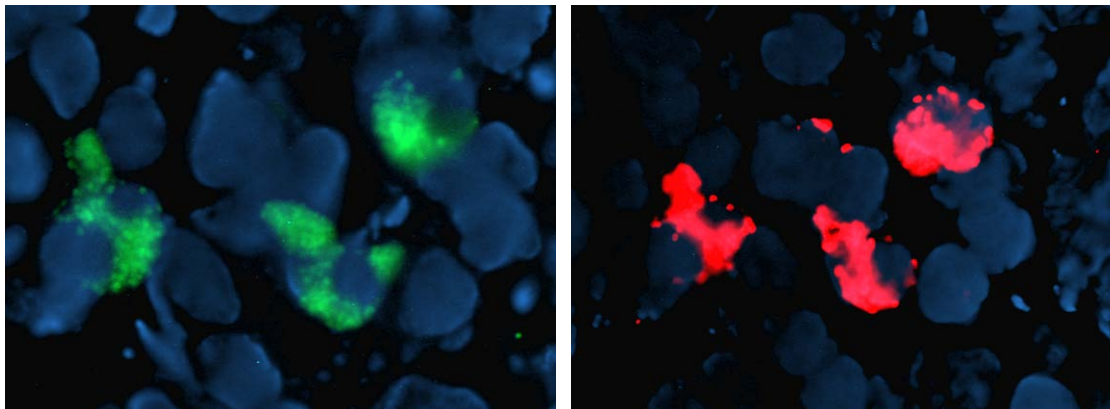
Z razvitim analiznim postopkom smo proučili mesto sinteze mRNA *LPL* v tkivu NSCLC. Želeli smo dokazati hipotezo, da mRNA *LPL* v tkivu NSCLC sintetizirajo makrofagi CD14+. Prvotno smo želeli postopka izvesti istočasno – v istem koraku obarvati mRNA *LPL* in CD14. S pepsinizacijo smo pri FISH povečali dostopnost sonde do mRNA. Pepsin je peptidaza skupine A1. Preferenčno cepi peptidno vez v bližini hidrofobnih in aromatskih aminokislin. S tem postopkom smo uničili epitope na celični membrani in s tem tudi CD14. Ko smo preverili rezultat pod fluorescenčnim mikroskopom, zelenih signalov, ki bi označevali CD14, nismo opazili (slika 11).



Slika 11: Vzporedna postopka RNA FISH in direktne imunofluorescence na normalnem pljučnem tkivu – 1000-kratna povečava

Na sliki 12 je vidna tudi izrazita avtofluorescenca, ki onemogoča nedvoumno potrditev prisotnosti celic CD14+. Poskušali smo skrajšati postopke pepsinizacije in zmanjšati koncentracijo pepsina. Vendar pa nato nismo zaznali signalov rodamina, ki bi označevali mRNA *LPL*.

Ker ni bila možna istočasna zaznava mRNA *LPL* s postopkom RNA FISH in makrofagov s protitelesom anti-CD14, smo s pristopom zaporedne imunofluorescence in RNA FISH poskušali označiti celice, ki so CD14⁺ in sintetizirajo mRNA *LPL*. Rezultat prikazuje slika 12.



Slika 12: Leva slika prikazuje celice, ki so se obarvale z anti-CD14. Področja celic CD14 smo označili in po FISH poiskali iste celice, ki sintetizirajo tudi mRNA *LPL*.

Jedra so se z DAPI obarvala modro. Na sliki 12 je vidno, da so jedra intaktna, niso razgrajena. S tem lahko optimiziran postopek uporabimo za določitev celic, ki sintetizirajo mRNA *LPL*. Zeleno smo prikazali CD14⁺, rdeči signali rodamina pa pripadajo mRNA *LPL*. Rezultati so bili identični pri vseh preiskovancih, ne glede na stadij ali histološki tip NSCLC.

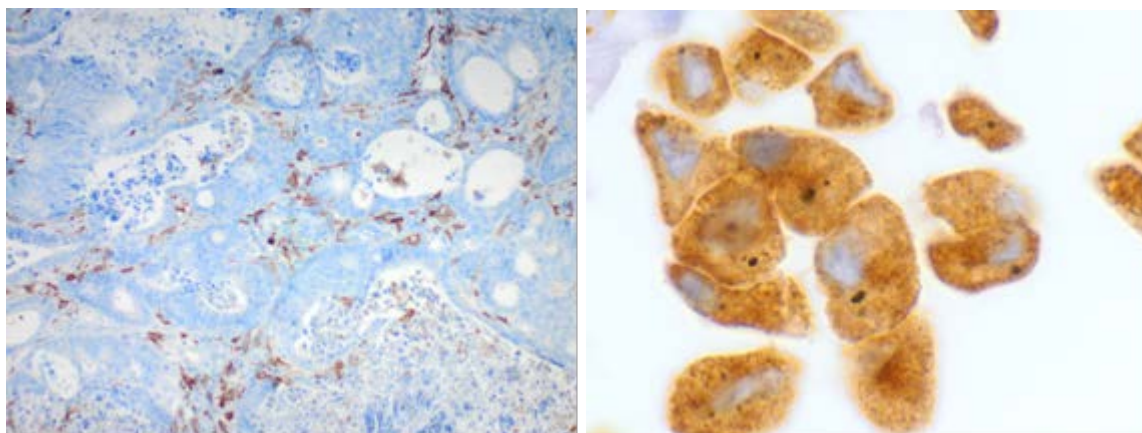
Prisotna je bila tudi blaga avtofluorescenca. Najpogosteje avtofluorescenca pripisujemo FAD in NADH. V našem primeru pa je lahko vzrok izrazite avtofluorescence prav v mRNA *LPL*⁺ celicah malonaldehid. Nastane pri lipidni peroksidaciji in se naprej pretvarja v Shiffovo bazo, ki fluorescira.

Po razporeditvi in številu z rodaminom označenih celic v preparatu v primerjavi z imunofluorescenčno obarvanimi preparati sklepamo, da celice z izrazitim izražanjem *LPL* ustrezajo celicam CD14⁺, torej makrofagom.

Naredili smo tudi negativno kontrolo, pri kateri smo celice označili s protitelesom anti-CD3⁺-FITC. Uporabili smo mišje antihumano protitelo proti CD3. Dobro so bili vidni okrogli limfociti T, brez signalov za mRNA *LPL*. S tem smo izključili, da bi bila zelena fluorescenca celic CD14⁺ lažno pozitivna zaradi nespecifične vezave FITC. Poleg že opisane negativne kontrole smo morali preveriti tudi specifičnost naših sintetiziranih sond in ocenitev avtofluorescenca ozadja. To smo naredili tako, da smo med postopkom

sinteze 3'-repa izpustili encim terminalno transferazo. S tem se ne more tvoriti 3' rep in protitelo nima mesta za vezavo. S tem smo izključiti nespecifične signale.

Na rezinah so bile opravljene tudi dodatne imunohistokemijske analize. Z uporabo mišjih monoklonskih protiteles anti-CD163 smo prikazali makrofage (slika 13).



Slika 13: Imunohistokemijsko obarvanje makrofagov v tkivu NSCLC – (A) 100-kratna povečava in (B) 1000-kratna povečava

Makrofage smo inkubirali z avidiranimi protitelesi CD163. V naslednjem inkubacijskem koraku smo dodali biotinizirana sekundarna protitelesa, konjugirana s peroksidazo. Po dodatku 3,3'-diaminobenzedina pa smo po encimsko katalizirani reakciji dobili rjavo obarvan kromogen. Slika 13 omogoča tudi oceno razporeditve in števila makrofagov, prisotnih v tkivu NSCLC. Makrofagi se nahajajo na mestih, kjer je njihova učinkovitost največja. Svojo funkcijo, to je fagocitiranje tujih delcev in iztrošenih celic, izvajajo na epiteliju alveolarnih mešičkov. Vzporedna imunohistokemijska analiza je pokazala infiltracijo makrofagov CD163+ v tumorski stromi. Prav tako pa so se v njej nahajale celice s prekomernim izražanjem mRNA *LPL*.

S tem raziskovalnim delom smo potrdili našo hipotezo, da makrofagi izražajo mRNA *LPL* v navidezno zdravem in tkivu NSCLC. S tem pa ne moremo trditi, da je višja tudi aktivnost encima *LPL*. Med izražanjem je protein podvržen številnim procesom preverjanja in se lahko razgradi. Nekateri predvidevajo, da se kar 50 % vseh sintetiziranih proteinov takoj razgradi. V primeru, da se sintetizira funkcionalen protein, pa je pri *LPL* aktivnost še vedno odvisna od strukture. Monomerna oblika encima je neaktivna. Aktivnost je pogojena tudi s konformacijskim stanjem N-terminalne podenote proteina *LPL*. Te trditve potrjujejo tudi preliminarne raziskave (26, 27). Rezultati glede *LPL* kažejo, da je aktivnost encima skoraj dvakrat večja v tkivu NSCLC kot v zdravem

pljučnem tkivu ($p < 0,0001$), medtem ko je izražanje gena skoraj štirikrat višje v navidezno zdravem tkivu kot pa v tkivu NSCLC ($p < 0,0001$). LPL paradoks razlagajo tako, da okoljsko nerakavo tkivo poveča izražanje LPL in s tem poveča doprinos lipidov do bližine tumorja. Povečano aktivnost encima LPL v NSCLC so dokazale že preliminarnе raziskave in jo povezale s krajšim preživetjem bolnikov (26, 27).

Preliminarno so ugotovili, da v celotnem pljučnem tkivu izražanje *LPL* korelira z izražanjem *SRA1* ($p = 0,0001$), *apo E* ($p = 0,0026$), *CD163* ($p = 0,0064$) in *FOLR2* ($p = 0,0145$). Navedene gene preferenčno izražajo TAM. Razen tega pa izražanje gena *LPL* ne korelira z izražanjem *sintaze višjih maščobnih kislin*, *receptorja LDL*, *SREBP1*, *SREBP2*, *SPOT14* in *Angpt14*. Slednji pa so geni, ki se sintetizirajo v tumorskih celicah (29-32).

Makrofagi so dvorezni, saj lahko izražajo tako pro- kot tudi protitumorsko aktivnost. Kot odgovor na različne signale makrofagi razvijejo polarizirano aktivacijo. Klasično aktivirani makrofagi (M1) se aktivirajo pod vplivom IFN- γ ali po mikrobnem stimulusu (LPS) in imajo protitumorsko aktivnost (52). Zanje je značilno tudi: citotoksična aktivnost proti fagocitiranim mikroorganizmom in neoplastičnim celicam, visoko izražanje reaktivnih kisikovih intermediatov, dobro predstavljanje antigenov. Makrofagi M2 spodbujajo odstranjevanje odmrlih celic, angiogenezo, remodeliranje in popravilo poškodovanega tkiva. Izguba ravnotežja med celicami M1 in M2 lahko vodi v številne patološke procese. Presežek M1 lahko inducira kronične vnetne bolezni, nekontroliran razrast makrofagov M2 pa lahko spodbudi supresijo imunskega sistema (52, 53). Pri večini, vendar ne pri vseh oblikah tumorjev, so TAM fenotipa M2 (52).

Makrofagi lahko h kancerogenezi prispevajo po mnogih poteh. Sintetizirajo molekule, ki vplivajo na direktno rast neoplastičnih celic (EGF), spodbujajo angiogenezo, zmanjšajo vnetne odgovore in prirojeno imunost. Druga značilnost TAM je njihova nagnjenost h kopičenju v nekrotičnih področjih tumorja, v katerih je malo kisika (53).

TAM spodbujajo angiogenezo, s katero omogočijo dobro prekrvavitev rakavega tkiva. Ker so makrofagi prisotni predvsem v hipoksičnih predelih rakavega tkiva, je to še eden izmed mehanizmov angiogeneze tumorske mase. TAM izločajo angiogenetično timidin fosforilazo, ki *in vitro* spodbuja migracijo endotelijskih celic. Sintetizirajo tudi številne encime, kot so MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12 in ciklooksigenaze-2. TAM so večinoma v hipoksičnem predelu tumorja. Hipoksija v TAM aktivira angiogenetični program. Nizka raven kisika spodbudi izražanje HIF-1 in HIF-2 ter prekomerno izražanje angiogenetičnih molekul. TAM so prisotni tudi pri limfoangiogenezi (53, 54). Proces je reguliran s številnimi dejavniki, med katerim so tudi VEGF-C, VEGF-D prek VEGFR3. S

tem posledično prispevajo k metastaziranju rakavih celic v bližnje in oddaljene bezgavke (54).

Dodatno pa lahko makrofagi prispevajo h kancerogenezi tudi prek lipoproteinov. To smo poskušali dokazati v tej magistrski nalogi. Ker imajo makrofagi povečano aktivnost encima LPL, privedejo do rakavega tkiva veliko trigliceridov. Ti pa so za celice pomemben vir energije in celičnih gradnikov. Oboje pa celice z močno proliferacijo, kakršne so rakave celice, potrebujejo. Dotok lipidov k tumorskemu tkivu lahko poveča tudi neželeno eikozanoidno sintezo, spremembe v fosforilaciji membrane (kar lahko vpliva na prepustnost in aktivnost receptorjev), neželen metabolizem hormonov in tvorbo prostih radikalov preko lipidne peroksidacije. Vsi zgoraj naštetih učinki prispevajo k napredovanju tumorja.

Analiza rezin rakavega in zdravega pljučnega tkiva je pokazala, da mRNA *LPL* blago izražajo vse celice rakavega in zdravega pljučnega tkiva. Med njimi pa smo opazili celice, ki so v izražanju mRNA *LPL* izstopale. Semikvantitativna ocena je pokazala, da celice s prekomernim izražanjem mRNA *LPL* predstavljajo le desetino makrofagne populacije. Subpopulacijo makrofagov je treba nadalje proučiti za boljše razumevanje neoplastične spremembe pljučnega tkiva in vpliva mRNA *LPL* na krajše preživetje preiskovancev.

Večja aktivnost encima LPL namreč omogoča večji doprinos lipidov do tumorskega tkiva. Te pa celica uporabi za izgradnjo novih celic in za energijo. Večji doprinos lipidov lahko povzroči tudi škodljivo eikozanoidno sintezo, spremembe v prepustnosti membrane in aktivnosti receptorjev ter spremenjen metabolizem hormonov in višjo sintezo reaktivnih radikalov. Vse zgoraj navedeno pripomore tudi k protumorigenemu delovanju makrofagov (32).

Že samo delovanje makrofagov je lahko protumorigeno z izločanjem različnih dejavnikov. Tvorbo tumorske mase omogoča preko tvorbe strome, angiogeneze in zavretja protitumorske imunosti.

Z vplivom na omenjene celice bi lahko omogočili ozdravitev raka, kar je že uspelo na živalskem raziskovalnem modelu (55). Pri tem preizkusu so uporabili imunotoksin anti-SR-A na miših z rakom jajčnikov. Z napadom na CD204+ makrofage M2 so omogočili nazadovanje tumorja. V primeru, da toksina niso usmerili v makrofage, ni prišlo do zmanjšanja tumorske mase. To kaže na pomembnost usmerjenosti toksina na CD204+ subpopulacijo makrofagov. Do podobnih rezultatov so prišli tudi pri različnih raziskavah na miših. Pri prvi so ugotovili prekinitev imunske tolerance proti rakavim

celicam prostate (56). To so dosegli z blokado SRA/CD204. Do izboljšane izida terapije raka prostate so prišli tudi z *in situ* aplikacijo celic z utišanim genom za CD204 (57). Spet v naslednji raziskavi so dokazali represijo tumorja pri melanomu. Z utišanjem gena za *CD204* so dokazali višjo raven protitumorske imunosti (58). Prišlo je namreč do aktivacije citotoksičnih T-celic, boljše infiltracije tumorskega tkiva s celicami CD8 in celicami NK. Pri raku dojk so z blokado kemotakse z Met-CCL dokazali manjšo infiltracijo makrofagov, kar je bilo povezano z značilnim zmanjšanjem tumorskega tkiva. Pri raku prostate pa so z uporabo protiteles proti CCL-2 povzročili regresijo tumorske mase.

Makrofagi so tudi iz drugih razlogov pomembna tarča pri protitumorskem zdravljenju (59). Hipoksično okolje tumorja je namreč povezano s slabim prevzemom zdravil. Ker se makrofagi nahajajo v hipoksičnem okolju, bi lahko bili pomembne celice za prenos učinkovine v osrčje malignih celic – bodisi da bi omogočali prenos encimov, ki bi omogočali aktivacijo učinkovine, ali pa bi omogočali neposreden prenos citotoksičnih dejavnikov do tumorskega tkiva. Vplivali so že tudi na makrofagno proangiogenetično funkcijo: talidomid, lenalidomid, pentoksifilin, genisterin so inhibitorji infiltracije makrofagov in so zmanjšali velikost tumorja.

Občutljivo ravnotežje med makrofagi M1 in M2 je zelo pomembno pri protitumorski terapiji. Številne študije so pokazale, da aktivacija TLR stimulira polarizacijo makrofagov M1 in s tem omogoči protitumorsko delovanje makrofagov. Študije so že dokazali na živalskih modelih kot tudi s kliničnimi študijami. Raziskave so že opravili na različnih rakavih tkivih, med katerimi najdemo tudi: raka dojk, raka jajčnikov, raka pankreasa, raka prostate (53). Raziskave na raku pljuč še nismo zasledili.

Zaradi zgoraj navedenih razlogov je pomembno, da ugotovimo subpopulacijo makrofagov, ki sintetizirajo LPL v tkivu NSCLC. V primeru, da bi to lahko dokazali, bi morda lahko pridobili imunoterapevtsko zdravilo za različne vrste rakavih obolenj pri ljudeh.

5 SKLEP

- Za kolokalizacijo citoplazemskih in membranskih komponent celice smo združili dve metodi: RNA FISH (prikaz mRNA *LPL*) in direktno imunofluorescenco (prikaz CD14).
- Istočasna analiza zamrznjenih histoloških rezin pljučnega tkiva z metodama RNA FISH in direktne imunofluorescence ni bila mogoča. Med postopkom FISH so se epitopi za CD14 prekomerno razgradili in vezava ni bila možna. Če pa pepsinizacije nismo uporabili, sonda za prikaz mRNA *LPL* ni dostopala do citoplazemske mRNA *LPL*.
- Optimizirali smo postopek zaporedne uporabe postopkov RNA FISH in direktne imunohistokemije za zaznavo mRNA *LPL* in celic CD14+ v zamrznjenih histoloških rezinah pljučnega tkiva.
- Na vseh celicah smo opazili blago sintezo mRNA *LPL*, vendar so bile prisotne tudi celice s prekomernim izražanjem mRNA *LPL*.
- Potrdili smo našo hipotezo, da so celice z visokim izražanjem mRNA *LPL* v nedrobnoceličnem pljučnem rakavem tkivu makrofagi. Te celice predstavljajo samo desetino celotne populacije makrofagov CD14+, zato so potrebne nadalje raziskave za opredelitev subpopulacije makrofagov, ki intenzivno izražajo mRNA *LPL*.

6 LITERATURA

1. Debeljak A. Pljučni rak – da vas ne premaga. Pomoč za vsak dan 2007.
2. Ferlay J, Steliarova - Foucher E, Lortet - Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013; 49: 1374–403.
3. Non-Small Cell Lung Cancer (<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/>). Dostopano: 11. 12. 2010.
4. Stieber P, Hatz R, Holdenrieder S, Molina R, Nap M, von Pawel J, Schalhorn A, Schneider J, Yamaguchi K. National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Lung Cancer. http://www.aacc.org/SiteCollectionDocuments/NACB/LMPG/tumor/chp3p_lung.pdf. Dostopano: 26. 7. 2014
5. Duncan MW. Place for biochemical markers in early-stage lung cancer detection? *J Clin Oncol*. 2009 Jun 10;27(17):2749-50.
6. Makrofagi (http://en.wikipedia.org/wiki/Macrophage#cite_ref-New_5-0)
Dostopano:5.4.2013
7. Krombach F, Münzing S, Allmeling AM, Gerlach JT, Behr J, Dörger M. Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison. *Environ Health Perspect*. 1997 Sep;105 Suppl 5:1261-3.
8. Alveolar macrophage (http://en.wikipedia.org/wiki/Alveolar_macrophage).
Dostopano 8.4.2013
9. Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I (2007). *Immunology*, 7th ed. Mosby Elsevier Ltd, 2006
10. D S Pouniotis, M Plebanski, V Apostolopoulos and C F McDonald. Alveolar macrophage function is altered in patients with lung cancer. *Clin Exp Immunol*. 2006 February; 143(2): 363–372
11. Kawamura K, Komohara Y, Takaishi K, Katabuchi H, Takeya M. Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathol Int*. 2009 May;59(5):300-5.
12. M1 in M2 makrofagi: <http://www.hindawi.com/journals/jo/2010/201026/fig1/>
dostopano: 11.4.2013

13. Thomassen MJ, Barna BP, Wiedemann HP, Farmer M, Ahmad M. Human alveolar macrophage function: differences between smokers and nonsmokers. *J Leukoc Biol.* 1988 Nov;44(5):313-8.
14. McDonald CF, Hutchinson P, Atkins RC. Delineation of pulmonary alveolar macrophage subpopulations by flow cytometry in normal subjects and in patients with lung cancer. *Clin Exp Immunol.* 1993 Jan;91(1):126-30.
15. Quatromoni JG, Eruslanov E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lungcancer. *Am J Transl Res.* 2012;4(4):376-89.
16. Kielian TL, Blecha F. CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review. *Immunopharmacology.* 1995 Apr;29(3):187-205.
17. Schütt C. CD14. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 May;31(5):545-9.
18. Vance DE, Vance JE. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (5th edition). Madžarska, Elsevier Science, 2008; 498-519.
19. Vance JE, Vance DE. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.* Elsevier, 2008.
20. Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res.* 1996 Apr;37(4):693-707.
21. Kobayashi Y, Nakajima T, Inoue I. Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain. *Eur J Biochem.* 2002 Sep;269(18):4701-10.
22. Tsutsumi K. Lipoprotein Lipase and Atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2003; 170 (1): 1-9; 11-7.
23. Tsutsumi K. Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2003 ;1(1):11-7.
24. LPL (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/LPL>). Dostopano: 28-05-2011.
25. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med.* 2002; 80(12): 753-769.
26. Trost Z, Sok M, Marc J, Černe D. Increased lipoprotein lipase activity in non-small cell lung cancer tissue predicts shorter patient survival. *Arch Med Res.* 2009; 40(5): 364-368.
27. Cerne D, Melkic E, Trost Z, Sok M, Marc J. Lipoprotein lipase activity and gene expression in lung cancer and in adjacent noncancerlung tissue. *Exp Lung Res.* 2007 Jun-Jul;33(5):217-25.

28. Malavašič T. Sinteza mRNA *LPL* v makrofagih nedrobnoceličnega pljučnega rakavega tkiva, diplomska naloga. Ljubljana, 2011.
29. Puig-Kröger A, Sierra-Filardi E, Domínguez-Soto A. Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer Res.* 2009; 69(24):9395-9403.
30. Černe D, Žitnik IP, Sok M. Increased fatty acid synthase activity in non-small cell lung cancer tissue is a weaker predictor of shorter patient survival than increased lipoprotein lipase activity. *Arch Med Res.* 2010; 41(6):405-409.
31. Babaev VR, Patel MB, Semenkovich CF, Fazio S, Linton MF. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem.* 2000 Aug 25;275(34):26293-26299.
32. Podgornik H, Sok M, Kern I, Marc J, Cerne D. Lipoprotein lipase in non-small cell lung cancer tissue is highly expressed in a subpopulation of tumor-associated macrophages. *Pathol Res Pract.* 2013 Aug;209(8):516-20.
33. Kumar GL, Rudbeck L. Immunohistochemical staining methods 5th Ed. Education Guide. Dako, 2009.
34. Aoki V, Fukumori LMI, Freitas EL. Direct and indirect immunofluorescence. *An Bras Dermatol.* 2010;85(4):490-500.
35. Fluorescenca in situ hibridizacija:
http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_in_situ_hybridization (dostopano: 9.9.2013)
36. Kumar GL, Rudbeck L. Immunohistochemical (IHC) Staining Methods, Education Guide. Dako, 2009
37. RNA FISH:
<http://blog.biosearchtech.com/TheBiosearchTechBlog/?Tag=RNA%20FISH>
Dostopano: 9.9.2013.
38. Gruden K, Herzog B. Praktikum iz molekularne biologije - Teoretični del. Ljubljana, Študentska založba, 2000; 74-87.
39. Debnath M, Pradas GBKS, Bisen PS. Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities. Springer. London, 2010.
40. Andreeff M, Pinkel D. Introduction to Fluorescence In Situ Hybridization: Principles and Clinical Applications. Wiley – Liss, Inc., 1999.

41. Patel HRH, Arya M, Shergill IS. Basic Science Techniques in Clinical Practice. Springer. London, 2007.
42. Sieben VJ, Debes-Marun CS, Pilarski LM, Backhouse CJ. An integrated microfluidic chip for chromosome enumeration using fluorescence in situ hybridization. *Lab on a Chip* 2008; 8 (12): 2151–2156.
43. Le Moine C, Normand E. Use of non-radioactive probes for mRNA detection by in situ hybridization: interests and applications in the central nervous system. *Cellular and Molecular Biology* 1995; 41 (7): 917-923.
44. Spring KR, Davidson MW. Introduction to Fluorescence Microscopy, (<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>). Dostopano 10-03-2011.
45. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev.* 2005; 11: 227-256.
46. Alveolar macrophage (http://en.wikipedia.org/wiki/Alveolar_macrophage). Dostopano 8.4.2013
47. Kiernan JA. Autofluorescence: Causes and Cures. Billington and Knight, 2001; 4-8.
48. Buchwalow IB, Böcker W. Immunohistochemistry: Basics and Methods, Springer, 2010.
49. Andersson H, Baechi T, Hoechl M, Richter C. Autofluorescence of living cells. *J Microsc.* 1998 Jul;191(Pt 1):1-7.
50. Palmer GM, Keely PJ, Breslin TM, Ramanujam N. Autofluorescence spectroscopy of normal and malignant human breast cell lines. *Photochem Photobiol.* 2003 Nov;78(5):462-9.
51. Skubitz KM, Northfelt DW, McGowan SE, Hoidal JR. Changes in the cell surface protein composition of human alveolar macrophages induced by smoking. *Cancer Res.* 1987 Jun 15;47(12):3072-82.
52. Sica A. Role of tumour-associated macrophages in cancer-related inflammation. *Exp Oncol.* 2010 Sep;32(3):153-8.
53. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009 Nov;86(5):1065-73
54. Zhang B, Yao G, Zhang Y, Gao J, Yang B, Rao Z, Gao J. M2-polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerat

- edlymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(11):1879-86.
55. Bak SP, Walters JJ, Takeya M, Conejo-Garcia JR, Berwin BL. Scavenger receptor-A-targeted leukocyte depletion inhibits peritoneal ovarian tumor progression. *Cancer Res*. 2007 May 15;67(10):4783-9.
 56. Guo C, Yi H, Yu X, Hu F, Zuo D, Subjeck JR, Wang XY. Absence of scavenger receptor A promotes dendritic cell-mediated cross-presentation of cell-associated antigen and antitumor immune response. *Immunol Cell Biol*. 2012 Jan;90(1):101-8.
 57. Guo C, Yi H, Yu X, Zuo D, Qian J, Yang G, Foster BA, Subjeck JR, Sun X, Mikkelsen RB, Fisher PB, Wang XY. In situ vaccination with CD204 gene-silenced dendritic cell, not unmodified dendritic cell, enhances radiation therapy of prostate cancer. *Mol Cancer Ther*. 2012 Nov;11(11):2331-41.
 58. Yi H, Guo C, Yu X, Gao P, Qian J, Zuo D, Manjili MH, Fisher PB, Subjeck JR, Wang XY. Targeting the immunoregulator SRA/CD204 potentiates specific dendritic cell vaccine-induced T-cell response and antitumor immunity. *Cancer Res*. 2011 Nov 1;71(21):6611-20.
 59. Webb SD, Owen MR, Byrne HM, Murdoch C, Lewis CE. Macrophage-based anti-cancer therapy: modelling different modes of tumour targeting. *Bull Math Biol*. 2007 Jul;69(5):1747-76.

7 PRILOGA



Slika 14: Nukleotidno zaporedje treh različnih odsekov za LPL: posamezni eksoni so označeni z različnimi barvami, podčrtani deli pa označujejo posamezne oligonukleotide, ki smo jih sintetizirali.

Sestava komplementarnega oligonukleotida dolžine 143 bp, dobljenega z uporabo reagenta Hs01012567_m1 (2/3 ekson):

```
GTAGCAGAGTCCGTGGCTACCTGTCATTTCAATCACAGCAGCAAACCTTCAT
GGTGATCCATGGCTGGACGGTAACAGGAATGTATGAGAGTTGGGTGCCAAAA
CTTGTGGCCGCCCTGTACAAGAGAGAACCAGACTCCAA
```

Sestava komplementarnega oligonukleotida dolžine 134 bp, dobljenega z uporabo reagenta Hs01012569_m1 (5/6 ekson):

```
GGAGGTAATTTTCAGCCAGGATGTAACATTGGAGAAGCTATCCGCGTGATTGC
AGAGAGAGGACTTGGAGATGTGGACCAGCTAGTGAAGTGCTCCCACGAGCGC
TCCATTCATCTCTTCATCGACTCTC
```

Sestava komplementarnega oligonukleotida dolžine 144 bp, dobljenega z uporabo reagenta Hs01012571_m1 (8/9 ekson):

```
CTGGTCAGACTGGTGGAGCAGTCCCAGCTTCGCCATTGAGAAGATCAGAGTA
AAAGCAGGAGAGACTCAGAAAAAGGTGATCTTCTGTTCTAGGGAGAAAGTGT
CTCATTTGCAGAAAGGAAAGGCACCTGCGGTATTTGTGAA
```