

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA KUŠAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITNI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA KUŠAR

RAZVOJ IMUNOHISTOKEMIČNE METODE ZA CELIČNI
OZNAČEVALEC CD204 NA CELICAH Z VISOKIM
IZRAŽANJEM LIPOPROTEINSKE LIPAZE V
NEDROBNOCELIČNEM PLJUČNEM RAKAVEM TKIVU

DEVELOPMENT OF THE IMMUNOHISTOCHEMICAL
METHOD FOR THE CELLULAR MARKER CD204 ON
CELLS WITH HIGH EXPRESSION OF LIPOPROTEIN
LIPASE IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER TISSUE

ENOVITNI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravila na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem., in somentorstvom asist. dr. Jasne Omersel, mag. farm. Mikroskopske preglede tkivnih rezin smo opravili v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo UKC Ljubljana.

Zahvale

Iskreno se zahvaljujem mentorici izr. prof. dr. Heleni Podgornik za vso strokovno pomoč pri mikroskopski analizi tkivnih rezin in interpretaciji rezultatov. Zahvaljujem se tudi somentorici asist. dr. Jasni Omersel za izdatno pomoč pri načrtovanju poskusov in nasvete pri praktični izvedbi poskusov. Najlepša hvala izr. prof. dr. Darku Černetu, ki je moje delo ves čas spremjal in mi s svojimi strokovnimi nasveti izredno veliko pomagal. Za pomoč pri izvedbi poskusov se zahvaljujem Majdi Sirk, dipl. inž. lab. biomed., in Manji Cedilnik, dipl. inž. lab. biomed.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Helene Podgornik, spec. med. biokem., in somentorstvom asist. dr. Jasne Omersel, mag. farm.

Ljubljana, 2016

VSEBINA

KAZALO PREGLEDNIC	iv
KAZALO SLIK	iv
POVZETEK.....	vi
ABSTRACT	vii
SEZNAM OKRAJŠAV	viii
1 UVOD	1
1.1 POLARIZACIJA MAKROFAGOV.....	2
1.1.1 Značilnosti fenotipa M1 in M2	3
1.1.2 Pomembni dejavniki polarizacije.....	4
1.1.3 Vloga metabolizma v polarizaciji makrofagov	7
1.1.4 M1 in M2 makrofagi ter njihova vloga v kancerogenezi	8
1.2 ANTIGEN CD204	8
1.2.1 CD204 v razvoju in napredovanju raka	11
1.2.2 CD204 kot terapevtska tarča	13
2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 PRIPRAVA HISTOLOŠKIH REZIN TKIV NEDROBNOCELIČNEGA PLJUČNEGA RAKA.....	16
3.2 IMUNOHISTOKEMIČNA ANALIZA RECEPTORJA CD204	17
3.2.1 Uporabljeni reagenti	17
3.2.2 Uporabljeni pripomočki in aparature	18
3.2.3 Postopek indirektne metode	19
3.2.4 Postopek direktne imunohistokemične metode.....	20
3.2.5 Postopek direktne imunohistokemične metode z utišanjem avtofluorescence tkiva	20
3.3 FLUORESCENČNA IN SITU HIBRIDIZACIJA (FISH).....	21
3.3.1 Čiščenje PCR-produkta	21
3.3.1.1 Uporabljeni reagenti	21
3.3.1.2 Uporabljeni pripomočki in aparature.....	22
3.3.1.3 Postopek čiščenja PCR-produkta	22
3.3.2 Pripenjanje DIG-dUTP repov na 3' koncu oligonukleotidov	23

3.3.2.1 Uporabljeni reagenti	23
3.3.2.2 Uporabljeni pripomočki in aparature.....	24
3.3.2.3 Postopek pripenjanja repov na 3' koncu oligonukleotidov	24
3.3.3 Analiza FISH na histoloških rezinah.....	24
3.3.3.1 Uporabljeni reagenti	25
3.3.3.2 Uporabljeni pripomočki in aparature.....	26
3.3.3.3 Postopek FISH-analize	27
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	28
4.1 OPTIMIZACIJA POSTOPKA IMUNOHISTOKEMIČNE ANALIZE NA TKIVNIH REZINAH.....	29
4.1.1 Priprava tkivnih rezin	30
4.1.2 Izbira protiteles za imunohistokemično analizo.....	30
4.1.3 Optimizacija indirektne imunohistokemične metode.....	31
4.1.3.1 Redčenje protiteles za indirektno imunohistokemično analizo	32
4.1.3.2 Spiranje protiteles	35
4.1.3.3 Zamenjava sekundarnega protitelesa.....	36
4.1.3.4 Temperatura inkubacije	36
4.1.3.5 Preprečevanje izsušitve tkivnih rezin	37
4.1.3.6 Negativne kontrole pri indirektni imunohistokemični metodi	38
4.1.4 Optimizacija direktnе imunohistokemične metode.....	40
4.1.4.1 Redčenje protiteles pri direktni imunohistokemični metodi	40
4.1.4.2 Zmanjševanje avtofluorescence tkiva.....	42
4.2 OPTIMIZACIJA POSTOPKA FISH.....	45
5 SKLEP	47
LITERATURA IN VIRI	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Sestava reakcijskih zmesi za izvedbo postopka pripajanja repov na 3' koncu oligonukleotidov.....	24
Preglednica II: Poskusi optimizacije redčitve primarnih in sekundarnih protiteles za indirektno imunohistokemijo ter rezultati po mikroskopiranju.....	34
Preglednica III: Načini spiranja tkivnih rezin pri imunohistokemični metodi CD204, ki smo jih preizkusili	36
Preglednica IV: Optimizacija redčenja protiteles za direktno imunohistokemijo in rezultati mikroskopiranja.....	40

KAZALO SLIK

Slika 1: Primerjava makrofagnih fenotipov M1 in M2 – fiziološke vloge, faktorji polarizacije, značilni celični produkti in prevladajoče metabolne poti.	3
Slika 2: Shematski prikaz indirektne imunohistokemične metode s protitelesi, ki smo jih uporabili pri delu.	17
Slika 3: Shematski prikaz principa označevanja oligonukleotidov in vizualizacije po hibridizaciji	23
Slika 4: Spremenljivke v protokolu indirektne imunohistokemične metode, ki smo jih spreminjali pri optimizaciji postopka.	29
Slika 5: Spremenljivke v protokolu direktne imunohistokemične metode, ki smo jih spreminjali pri optimizaciji postopka.	30
Slika 6: Tkivo (T5b), na katerem so vidne CD204 pozitivne celice (A) in negativna kontrola (B).....	33
Slika 7: Tkivo (T7b) z izrazitim rdečim ozadjem – nespecifični signali	34
Slika 8: Kontrola sekundarnega protitelesa tumorskega tkiva T7b z močno pozitivnim ozadjem (A) in kontrola sekundarnega protitelesa tkiva T7b s pričakovano negativnim ozadjem (B).....	39
Slika 9: Tkivo T4a, na katerem je bila izvedena direktna IHC-metoda – področje z manj autofluorescence	41
Slika 10: Tkivo T4a, na katerem je bila izvedena direktna IHC-analiza – področje z več autofluorescence	41

Slika 11: Tkive rezine T4a nedrobnoceličnega pljučnega raka pred (levo z oznako 1) in po barvanju z reagentom CBS (desno z oznako 2)	44
Slika 12: Tkivo T5a, na katerem je bila izvedena FISH-analiza	46
Slika 13: Negativna kontrola analize FISH na tkivu T5a – sonda brez repa.....	46

POVZETEK

Lipoproteinska lipaza je encim, ki celicam v tkivu zagotavlja energijske vire in celične gradnike. Aktivnost lipoproteinske lipaze v tumorju sovpada s slabšim potekom rakavih bolezni. V predhodnih raziskavah so pokazali, da lipoproteinsko lipazo prekomerno izraža subpopulacija makrofagov. Makrofagi lahko delujejo kot pozitivni ali negativni mediatorji imunskega sistema. V tkivu pridobijo pod vplivom okoljskih dejavnikov značilnosti različnih funkcionalnih fenotipov. Fenotip M2 izloča številne mediatorje metastaziranja in je vpletjen v remodelacijo tkiva in angiogenezo. Povečan delež makrofagov M2 je povezan s slabšim preživetjem rakavih bolnikov. CD204 je eden izmed znanih celičnih označevalcev, značilnih za fenotip M2, in sovpada z malignostnim potencialom tumorskih celic.

V magistrski nalogi smo na tkivnih rezinah nedrobnoceličnega pljučnega raka hoteli preveriti, ali CD204 pozitivne celice izražajo gen za lipoproteinsko lipazo. V delovnem načrtu smo si zastavili zaporedno izvesti imunohistokemično analizo za celični označevalec CD204 in fluorescenčno *in situ* hibridizacijo z oligonukleotidi, komplementarnimi mRNA lipoproteinske lipaze. Za antigen CD204 smo razvijali direktno in indirektno imunohistokemično analizo. Poglavitna težava, s katero smo se srečevali pri indirektni metodi, je bila močna obarvanost ozadja. Kot možne vzroke za nastanek fluorescence ozadja smo izključili neprimerno koncentracijo protiteles, nezadostno spiranje in nespecifično vezavo protiteles. Moteče ozadje je bilo najverjetnejše posledica neustreznosti parametrov v protokolu imunohistokemične analize, kot sta čas in temperatura inkubacije. Težave z motečim ozadjem nismo uspeli razrešiti kljub spremembam v protokolu in pripravi reagentov. Ključna težava pri direktni metodi je bila avtofluorescensa tkiva. Avtofluorescensa ima širok emisijski spekter in sveti v področju zelenega filtra, kjer so bili tudi signali našega protitelesa. Avtofluorescenco smo uspešno utišali z reagentom Chicago Sky Blue, vendar ta ni bil kompatibilen z raztopino za barvanje jeder in oligonukleotidi, označenimi z rodaminom. S fluorescenčno *in situ* hibridizacijo smo lokacijo mRNA lipoproteinske lipaze uspešno označili in ugotovili, da se celice, ki visoko izražajo lipoproteinsko lipazo, nahajajo v bližini žil. Zaradi težav pri optimizaciji analitske metode za CD204 kolokalizacije mRNA lipoproteinske lipaze in CD204 nismo uspeli preveriti.

Ključne besede: CD204, imunohistokemija, lipoproteinska lipaza, FISH.

ABSTRACT

Lipoprotein lipase is an enzyme, which provides cells in tissues with energy sources and cellular building blocks. The activity of lipoprotein lipase in a tumour coincides with worse prognosis. Previous studies have shown that lipoprotein lipase is overexpressed by a subpopulation of macrophages. Macrophages can act as positive or negative mediators of the immune system. In the tissue, under the influence of environmental factors, they obtain characteristics of different functional phenotypes. The M2 phenotype excretes numerous mediators of metastasis and is involved in tissue remodelation and angiogenesis. The increased proportion of M2 macrophages is connected with lower survival rates of cancer patients. CD204 is one of the cell markers, typical for the phenotype M2, and coincides with the malignancy potential of tumour cells.

In the master's thesis we wanted to check, whether CD204 positive cells express the gene for lipoprotein lipase in non-small lung cancer tissue. In this manner we intended to sequentially conduct the immunohistochemical analysis for the cell marker CD204 and fluorescent *in situ* hybridization with oligonucleotides, complementary to mRNA lipoprotein lipase. The main problem we faced with the indirect immunohistochemical method for CD204 was strong colouring of the background. As possible causes for the fluorescence of the backgrounds we excluded improper concentration of antibodies, insufficient rinsing and non-specific binding of antibodies. The background is probably the result of inadequate parameters in the protocol of the immunohistochemical analysis, like time and incubation temperature. We were not able to resolve the problem with the nonspecific background despite changes in the protocol and the preparation of reagents. The main problem in the direct method was the autofluorescence of the tissue. Autofluorescence has a broad emission spectrum and shines in the area of the green filter, where were also signals of our antibody. Autofluorescence was successfully silenced with the reagent Chicago Sky Blue, which was however not compatible with a solution for colouring of nuclei and oligonucleotides, marked with rhodamine. With fluorescent *in situ* hybridisation we successfully marked the location of mRNA lipoprotein lipase and found that cells, which highly express lipoprotein lipase, are close to vessels. Due to problems with the optimization of the analytic method we were not able to check the CD204 colocalisation of mRNA lipoprotein lipase and CD204.

Keywords: CD204, immunohistochemistry, lipoprotein lipase, FISH.

SEZNAM OKRAJŠAV

- AP – protein aktivator
- Arg – arginin
- ATLL – levkemija/limfom celic T pri odraslih
- bFGF – osnovni fibroblastni rastni dejavnik
- Cc – kemokin
- cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kislina
- CSB – Chicago Sky Blue
- DNA – deoksiribonukleinska kislina
- dNTP – deoksinukleotidi
- EL4 – celična linija mišjega limfoma
- FISH – fluorescenčna *in situ* hibridizacija
- GM-CSF – granulocitni makrofagni kolonijo stimulirajoči dejavnik
- HDL – lipoprotein visoke gostote
- HIF – s hipoksijo inducirani transkripcijski faktorji
- HPS – protein temperaturnega šoka
- IFN – interferon
- IHC – imunohistokemija
- IL – interlevkin
- iNOS – dušikov oksid sintetaza
- JAK – janus kinaza
- LDL – lipoprotein nizke gostote
- LPL – lipoproteinska lipaza
- LPS – lipopolisaharid
- MMP – matriksne metaloproteaze
- miRNA – mikroribonukleinska kislina
- mRNA – informacijska ribonukleinska kislina
- NF – faktor nekroze
- NK celice – celice ubijalke
- NADPH – nikotinamid dinukleotid fosfat
- PCR – verižna reakcija s polimerazo
- PFK – fosfofruktokinaza

PGC – aktivator peroksisomskega proliferatorja
PIGF – placentni rastni dejavnik
qPCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RNA – ribonukleinska kislina
STAT – angl. *signal transducer and activator of transcription*
TGF – transformacijski rastni dejavnik
TLR – angl. *toll-like receptor*
TNF – dejavnik tumorske nekroze
VCL – vaskularni levkociti
VEGF – vaskularni endotelijski rastni dejavnik

1 UVOD

Makrofagi so med bolj razširjenimi celicami imunskega sistema, ki imajo vlogo v primarnem odgovoru na patogene, vzdrževanju tkivne homeostaze, vnetju in imunosti. So dinamične celice, sposobne prilagoditi funkcionalne profile zunanjim dražljajem in se polarizirati v različne fenotipe (1). Delujejo lahko kot pozitivni ali negativni mediatorji imunskega sistema. Neravnovesje v regulatornih mehanizmih lahko privede do vpleteneosti makrofagov v patogenezo nekaterih bolezni. Tumorskega tkiva ne sestavljajo samo tumorske celice, ampak tudi številni drugi celični tipi in migratorne hematopoetske celice. Med slednjimi prevladujejo makrofagi, ki oblikujejo specifično okolje, v katerem se lažje izrazijo lastnosti neoplastičnih tumorskih celic (2). Tumorsko okolje, bogato z makrofagi, napoveduje slabši potek malignih bolezni (1). Mehanizmi, prek katerih makrofagi olajšujejo napredovanja tumorjev, so:

a) Spodbuda angiogeneze

Makrofagi se kopijo v hipoksičnih predelih tkiva (npr. tumorji) in izločajo transkripcijske dejavnike, ki spodbujajo razvoj novih žil. Izločajo veliko različnih rastnih dejavnikov, proteolitičnih encimov, citokinov in vnetnih mediatorjev, ki so ključni dejavniki v angiogenezi (2). Eden najpomembnejših dejavnikov razrasta novih žil, ki ga izločajo makrofagi, je vaskularni endoteljski rastni dejavnik A (VEGF-A). Izguba sposobnosti makrofagov za izločanje VEGF-A zmanjša nastanek novih žil (3). Makrofagi izločajo tudi placentni rastni dejavnik (PIGF), interlevkin 8 (IL-8) in osnovni fibroblastni rastni dejavnik (bFGF), ki prav tako spodbujajo angiogenezo (2).

b) Spodbujanje napredovanja in metastaziranja

Opazili so povezavo med številom makrofagov v tumorju in njihovim metastaznim potencialom. Migracijo tumorskih celic olajšajo makrofagi z izločanjem matriksnih metaloproteaz (MMP). Te presnavljajo proteine v zunajceličnem matriku in povečajo izločanje limfatičnega VEGF-C, kar priomore k metastaziranju (1).

c) Imunska supresija

Pomembna patološka vloga makrofagov je zmanjševanje učinkovitosti imunskega odgovora na tumorsko tkivo. Imunosupresivni produkti makrofagov so: transformacijski rastni dejavnik (TGF- β), interlevkin 10 (IL-10) in arginaza 1 (Arg-1). TGF inhibira citotoksično aktivnost celic NK, vodi diferenciacijo CD4+ celic T v fenotip Th2, zavira antitumorsko aktivnost CD8+ celic in ohranja diferenciacijo celic Treg. IL-10 ovira izločanje IL-12, citokina, ki spodbuja razrast in citotoksičnost celic NK in T. Dodatno

zavira tudi IFN- γ . Povečano izražanje Arg-1 spodbuja tumorsko rast po različnih mehanizmih, npr. prek zmanjšane tvorbe dušikovega oksida in s tem citotoksičnosti. Kemokini Ccl13,Ccl18, Ccl22 in Ccl17, ki jih izločajo makrofagi, so pomembni za kemotakso imunosupresornih celic (1).

d) Vnetje in remodelacija matriksa

Makrofagi ob kroničnem vnetju s produkcijo reaktivnih dušikovih in kisikovih zvrsti povečujejo možnost mutacij. S kopičenjem rastnih dejavnikov in citokinov pa omogočajo preživetje in proliferacijo mutiranih celic. S tem mehanizmom lahko pojasnimo tudi povečano tveganje za nastanek raka zaradi kroničnih infekcij ali iritacij (2).

e) Omogočanje rasti tumorjev

Študije na modelih z zmanjšanim številom makrofagov so pokazale, da je prisotnost makrofagov ključna za rast tumorskega tkiva (2). Pospešena rast celic, ki je značilna za tumorske celice, je energetsko zelo zahteven proces. Lipoproteinska lipaza (LPL) je encim, ki katalizira hidrolizo trigliceridov na hilomikronih in VLDL v cirkulaciji. Encim je udeležen tudi pri prevzemu prostih maščobnih kislin v tkiva in s tem pri zagotavljanju energetskih virov in celičnih gradnikov celicam v tkivu. Kenshi Sakayama je s sodelavci pokazal, da imajo humani sarkomi in karcinomi povečano aktivnost LPL (4). Aktivnost LPL je po tumorju razporejena neenakomerno; najvišja je na področjih aktivno delečih se celic. V splošnem aktivnost LPL korelira s tumorsko rastjo in slabšim potekom bolezni (5). Na modelu nedrobnoceličnega pljučnega raka so pokazali, da so celice, ki prekomerno izražajo LPL, subpopulacija makrofagov (6).

1.1 POLARIZACIJA MAKROFAGOV

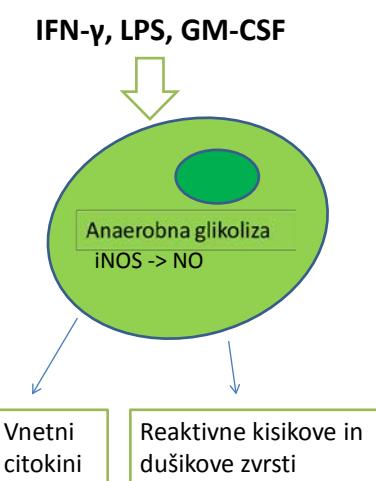
Za celice v monocitni-makrofagni liniji sta značilni raznolikost in plastičnost. V tkivu pridobijo pod vplivom mikrobnih produktov, poškodovanih celic ali aktiviranih limfocitov značilnosti različnih funkcionalnih fenotipov (7). Makrofagi v telesu opravljajo številne in raznolike funkcije, zato ne preseneča, da lahko razvijejo raznovrstne fenotipe (8). Kot odgovor na okoljske signale se lahko makrofagi aktivirajo po klasični ali alternativni poti. Fenotip, ki nastane po klasični poti aktivacije, imenujemo M1, po alternativni poti pa nastane fenotip M2. V regulacijo polarizacije makrofagov je vključenih veliko signalnih poti, transkripcijskih dejavnikov in epigenetskih regulacijskih sistemov (7).

1.1.1 Značilnosti fenotipa M1 in M2

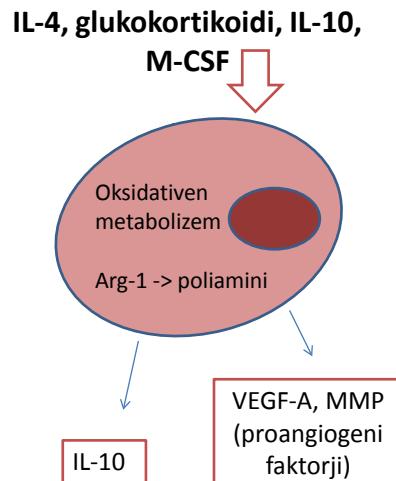
Za fenotip M1 je značilno visoko izražanje vnetnih citokinov, reaktivnih dušikovih in kisikovih intermediatov ter vzpodbujanje odgovora Th1. Rezultat naštetega sta protimikrobnog in protitumorno delovanje celic M1. Makrofagi M1 in M2 se razlikujejo v profilu izražanja citokinov.

Celice M2 so udeležene v odgovoru imunskega sistema na okužbe s paraziti, vzpodbujajo remodelacijo tkiva in imajo imunoregulatorno funkcijo (7). Vlogo imajo tudi v napredovanju tumorjev, pri njihovi invaziji in metastaziranju, saj izločajo številne mediatorje teh procesov (9). Določeni signali, kot so IL-10, glukokortikoidni hormoni, molekule, ki jih izražajo apoptočne celice in imunski kompleksi, močno vplivajo na funkcijo makrofagov in inducirajo fenotip, ki je delno podoben celicam M2. Takšne celice imenujemo celice podobne M2 in se od fenotipa M2 razlikujejo po vrsti kemokinov, ki jih izločajo (7).

M1: KLASIČNA AKTIVACIJA
protibakterijsko, protivirusno,
protitumorno delovanje



M2: ALTERNATIVNA AKTIVACIJA
imunosupresivno, tumorpromotorsko,
protipatazitozno delovanje



Legenda; Arg- arginin, GM-CSF = granulocitni makrofagni kolonije stumulirajoči dejavnik, IFN- γ = interferon gama, IL – interlevkin, iNOS = dušikov oksid sintetaza, LPS = lipopolisaharid, MMP = matriksne metaloproteaze, M-SCF= makrofagni kolonije stumulirajoči dejavnik, VEGF-A = vaskularni endotelijski dejavnik A.

Slika 1: Primerjava makrofagnih fenotipov M1 in M2 – fiziološke vloge, faktorji polarizacije, značilni celični produkti in prevladujoče metabolne poti

V procesu aktivacije makrofagov ti podležejo številnim metabolnim spremembam. Obstaja tesna povezava med metabolnim stanjem makrofagov in njihovim fenotipom. Makrofagi, aktivirani po klasični poti, pridobivajo energijo v procesu anaerobne glikolize, alternativno aktivirani pa uporabljajo oksidativen metabolizem maščobnih kislin. M1 imajo povečan privzem glukoze in pretvorbo piruvata v laktat, dihalna veriga pa je oslabljena, kar omogoča nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti. Tudi pentoza-fosfatna pot je inducirana v klasični aktivaciji, saj je ključna za nastanek kisikovih reaktivnih zvrsti in dušikovega oksida prek produkije NADPH z NADPH oksidazo. M2 makrofagi pridobijo večino energije z oksidacijo maščobnih kislin in aerobno glikolizo, ki zagotavlja dolgotrajnejšo oskrbo z energijo, kar je ustreznejše za delovanje celic M2 (10).

Glavna metabolna razlika med M1 in M2 se kaže v metabolizmu arginina. Glede na tip aktivacije se arginin v makrofagih presnavlja z različnimi encimi. V M1 je povišano izražanje iNOS (dušikov oksid sintetaza), zato katabolizem arginina poteče do dušikovega oksida in citrulina. Nastali dušikov oksid ima pomembno vlogo v ubijanju patogenov. V M2 pri metabolizmu arginina nastanejo sečnina, poliamini in ornitin, ki sodelujejo pri celjenju ran. Metabolizem arginina je eden izmed najbolj zanesljivih razlikovalnih faktorjev med M1 in M2 makrofagi (10).

Do določene mere je mogoče fenotip polariziranih makrofagov M1 ali M2 v *in vitro* pogojih obrniti. Tudi *in vivo* lahko pride do dinamičnih sprememb v aktivaciji makrofagov. Patologija nekaterih bolezni je povezana z dinamičnimi spremembami fenotipov makrofagov (7).

1.1.2 Pomembni dejavniki polarizacije

Dražljaji M1 so tisti, ki izzovejo vnetni odgovor in vnetne markerje. Njihov izvor, vloga, receptorji in signalne poti se med seboj bistveno razlikujejo. Glavni dražljaji M1 so IFN- γ , LPS in GM-CSF. Ostali dejavniki, ki polarizacijo makrofagov usmerijo v klasično aktivacijo, so celice T, bakterijski produkti in nekateri citokini.

IFN- γ je glavni citokin, povezan s polarizacijo makrofagov v fenotip M1. Je eden glavnih produktov celic Th1, izdelujejo pa ga lahko tudi celice ubijalke in makrofagi sami. Po aktivaciji receptorja IFN- γ se prek JAK1 in JAK2 aktivirajo STAT1 in faktorji za regulacijo interferonov (npr. IFR-1 in IFR-8). IFN- γ nadzoruje programe genske ekspresije, ki vključujejo citokinske receptorje, označevalce celične aktivacije in številne adhezijske molekule. Miši s pomanjkanjem IFN- γ ali njegovega receptorja so normalno

aktivne in njihovo število makrofagov se ne razlikuje od normalnega. Te živali so bolj dovzetne za okužbe, saj njihovi makrofagi izkazujejo zmanjšano tvorbo antimikrobnih produktov. Tudi pri ljudeh mutacije, odgovorne za pomanjkljivo izražanje IFN- γ receptorja, privedejo do resne imunske pomanjkljivosti (11).

Aktivacija, ki jo sprožijo bakterije, usmerja makrofage v fenotip M1 in je del prirojenega imunskega odgovora. Bakterije sprožijo genski program, podoben tistemu, ki ga izzove TLR (angl. *toll-like receptor*). LPS je najbolje proučen signal M1, ki ga prepozna TLR4. Aktivacija TLR4 vodi do močnega vnetnega citokinskega profila (IFN- β , IL-12, TNF, IL-6, IL-1 β), izločanja kemokinov in antigena predstavitev molekul (MHC). Genski profil kontrolirajo NF- κ B, AP-1, IRF, STAT1 in EGR. Mnogi od naštetih faktorjev sodelujejo tudi v interferonskem odgovoru. Živali z izbitim genom za TLR so normalne, vendar zaradi prizadete aktivnosti makrofagov bolj občutljive na okužbe. Genske mutacije v družini TLR povzročijo pri ljudeh večjo dovzetnost za okužbe z mikobakterijami, pnevmokoki in malarijo (11).

Granulocitni makrofagni kolonijo-stimulajoči dejavnik (GM-CSF) izdelujejo številne celice, tudi makrofagi in parenhimske celice. Glavne funkcije GM-CSF so regulacija proliferacije in diferenciacije hematopoetskih celic in modulacija funkcije zrelih hematopoetskih celic. Receptor GM-CSF prek JAK2 aktivira STAT5, ERK in Akt. GM-CSF izboljša zmožnost fagocitoze, mikrobicidno sposobnost, levkocitno kemotaksco in adhezijo. Pod vplivom GM-CSF makrofagi in monociti povečajo izločanje IL-6, IL-8, G-CSF, M-CSF, TNF in IL-1 β . Živali z izbitim genom za GM-CSF imajo običajno število makrofagov, vendar ti v alveolih ne zorijo normalno. Tudi pri ljudeh mutacije receptorja za GM-CSF povzročajo napake v delovanju makrofagov v alveolih, povezujejo pa jih tudi z malignimi novotvorbami (11).

Za dražljaje M2 je značilna sposobnost antagonizma vnetnemu odgovoru. Podobno kot pri dražljajih M1 so njihov izvor, vloga, receptorji in signalne poti heterogeni. IL-4 izzove fuzijo makrofagov in upočasni fagocitozo. Izdelujejo ga celice Th2, eozinofilci, bazofilci in makrofagi. Po vezavi IL-4 na receptor se aktivirata JAK1 in JAK3, kar vodi do translokacije in aktivacije STAT6. Dodatna transkripcijska faktorja, ki sodelujeta v tem procesu, sta c-Myc in IRF4. Transkriptom IL-4 zajema transglutaminazo 2 (TGM2), manozni receptor (MRC1), holesterol hidroksilazo CH25H, prostaglandin-endoperoksid sintetazo PTGS1, transkripcijski faktor IRF4, Krüppel-like faktor in signalne modulatorje CISH in SOCS1. Učinki IL-13 so podobni IL-4, vendar se ne prekrivajo popolnoma. Živali

z izbitim genom IL-4 imajo normalno število makrofagov in njihovo zorenje ni prizadeto. Nepravilnosti v imunskem odgovoru se pojavijo pri nekaterih virusnih okužbah in parazitozah. Polimorfizmi IL-4 pri ljudeh so povezani z razvojem astme in atopij. Dodatni faktorji, povezani z alternativno aktivacijo makrofagov, so imunoglobulinski kompleksi. IgG-je prepozna družina receptorjev Fc γ .

Glukokortikoidi vplivajo na adherenco monocitov, fagocitozo in apoptozo. Glukokortikoidne hormone izločata nadledvični žlezi, metabolizirajo pa makrofagi s svojimi encimi. Zaradi lipofilne narave lahko glukokortikoidi prehajajo skozi membrano v celično notranjost, kjer se vežejo na glukokortikoidne receptorje in tvorijo glukokortikoidni kompleks. V jedru se ta kompleks lahko veže na DNA in neposredno vpliva na izražanje genov ali pa na izražanje vpliva posredno prek interakcij s transkripcijskimi faktorji (npr. NF- κ B, AP-1). Z glikokortikoidi stimulirani monociti izražajo komponento komplementa 1 (C1QA), TSC22, DS1PI, MRC1, trombospodin 1, IL-10, IL1R2 in CD163. Dolgotrajna izpostavljenost glukokortikoidom privede do drugačnega izraženja genov, saj pride do interakcij s signalnimi potmi prek LPS in IFN- γ . Polimorfizmi glukokortikoidnih receptorjev so pleiotropni in udeleženi v nekaterih vnetnih, malignih in avtoimunskeih boleznih.

IL-10 je produkt celic Th2. Vezava na receptor aktivira STAT3 in inhibira izražanje vnetnih citokinov. Transkriptom makrofagov, stimuliran z IL-10, zajema nekatere Fc receptorje, kemoatraktanta CXCL13 in CXCL14, TLR1, TLR8 in MARCO (receptor makrofagov s kolagensko domeno). Defekti citokinskih receptorjev povzročajo kolitis in poslabšajo vnetja. Miši s pomanjkanjem IL-10 se prekomerno odzovejo na parazite.

Transkripcijski odgovor na M-CSF zajema povečano izražanje genov celičnega cikla (npr. ciklin A2, B1, D1 in E1) in zmanjšano ekspresijo skupine humanih levkocitnih antigenov (HLA), TLR7 in podenot komplementa C1QA/B/C. Miši z mutacijo na M-CSF imajo zmanjšano število monocitov in določenih makrofagov in razvijejo osteopetrozo. Mutacija receptorja M-CSF pri ljudeh vodi do mileodisplastičnega sindroma ali akutne mieloične levkemije (11).

Epigenetske spremembe in nekodirajoča RNA so prev tako udeležene v usmerjanju polarizacije makrofagov. Na mišjem modelu je pokazano, da IL-4 inducira povečano izražanje histonske demetylaze JMJD3, kar povzroči remodelacijo kromatina in posledično promovira gene, povezane s fenotipom M2. miRNA posttranslacijsko regulirajo izražanje genov. miRNA-155 se veže na podenoto IL-13R α 1, zato zmanjšuje profil genov M2 (7).

1.1.3 Vloga metabolizma v polarizaciji makrofagov

Znano je, da se fenotipa izredno razlikujeta v metabolnih poteh in da je metabolizem ključen dejavnik polarizacije makrofagov. Blokiranje oksidativnega metabolizma požene polarizacijo makrofagov v fenotip M1. Podobno indukcija oksidativnega metabolizma favorizira alternativno aktivacijo in s tem nastanek celic M2. Dražljaji, ki so odgovorni za razlike v metabolizmu, še niso povsem pojasnjeni na molekularni ravni. Prav tako še ni poznan mehanizem, kako celični metabolni status usmerja polarizacijo makrofagov.

Pri klasični aktivaciji pride do prehoda fosfofruktokinaze 2 (PFK2) iz ledvične oblike v aktivnejšo obliko uPFK2 in akumulacije fruktoza-2,6-bisfosfata. Zmanjša se izražanje intermediata carbohydrate kinase-like protein (CARKL) v pentoza fosfatni poti. Povišana ekspresija CARKL zavre klasično aktivacijo makrofagov in zmanjša produkcijo vnetnih citokinov, kar sovpada z obliko M2. Aktivacija makrofagov z LPS je povezana z višjo koncentracijo intermediatov Krebsovega cikla, kot so citrat, malat in sukcinat. Sukcinat je odgovoren za proizvodnjo IL-1 β . Ta primer je dokaz, da metabolizem makrofagov ni samo nabor reakcij za pridobivanje energije, temveč je tudi direktno vpletен v transkripcijsko regulacijo imunskega odgovora.

Alternativna pot aktivacije povzroči večje izražanje gena *PFKB1*, večji delež jetrne izoforme PFK2 in nižjo raven fruktoze-2,6-disfosfata. Povečana sta oksidativna fosforilacija in mitohondrijsko dihanje. IL-4 povzroči aktivacijo STAT6, ki inducira ključni dejavnik pri usmerjanju metabolizma, značilnega za makrofage M2 – PGC-1 β . Zaviranje PGC-1 β ne spremeni samo metabolnega stanja makrofagov, pač pa tudi zavre funkcijo M2 (10).

Makrofagi se tako kot druge celice imunskega sistema nahajajo v bližini vnetih mest z nizko koncentracijo kisika. S hipoksijo inducirani transkripcijski faktor (HIF) je eden glavnih mediatorjev prilagoditve makrofagov na hipoksične razmere. HIF je sestavljen iz dveh podenot: α in β . Izoforma podenote alfa HIF1 α je povezana s klasično aktivacijo, izoforma HIF2 α pa z alternativno aktivacijo makrofagov. Ekspresijo HIF1 α vzpodbujujo različni aktivatorji klasične poti polarizacije prek NF- κ B in produkcije vnetnih citokinov ter drugih mediatorjev fenotipa M1. Glavni označevalec M1, ki ga regulira HIF1 α , je iNOS. Kljub temu pa ni vsa aktivacija M1 pod vplivom HIF1a, kar nakazuje na obstoj drugega, še neidentificiranega markerja, ki metabolizem usmerja v fenotip M1. Potencialna vloga HIF2 α v alternativni aktivaciji makrofagov ostaja nejasna. Za HIF2 α so dokazali, da

regulira transkripcijo markerja M2 – *Agr1*. Obstajajo pa tudi dokazi, da *HIF2α* spodbuja nastanek *IL1β*, značilnega za fenotip M1 (10).

1.1.4 M1 in M2 makrofagi ter njihova vloga v kancerogenezi

M1 makrofagi imajo antitumorno aktivnost in lahko izzovejo motnje v tumorskem tkivu. Na nekaterih mišjih modelih karcinomov so raziskovalci pokazali, da je napredovanje tumorjev povezano s spremembami fenotipa makrofagov iz M1 v M2. V kasnejših fazah napredovanja raka imajo makrofagi večinoma celicam M2 podoben fenotip z nizkim izražanjem IL-12 in visokim izražanjem IL-10. Sposobnost antitumorskega delovanja teh makrofagov je nizka, pospešujejo pa remodelacijo zunajceličnega matriksa in angiogenezo. Povezani so s slabšim potekom rakavih bolezni. Številne signalne poti vplivajo na protumorsko funkcijo makrofagov. Te lahko izvirajo tako iz okoljskega tkiva kot tumorjev samih in se razlikujejo glede na to, kateri organ je prizadet. Limfociti so glavni akterji pri usmerjanju polarizacije makrofagov. Produkti tumorskih celic, kot so komponente zunajceličnega matriksa, IL-10, CFS-1 in kemokini (CCL2, CCL18, CCL17, CXCL4), usmerijo polarizacijo v fenotip M2, povezan z napredovanjem raka. Makrofagi lahko interagirajo s tumorskimi matičnimi celicami prek izražanja MFG-E8, kar pripomore k tumorogenezi. Pri ishemični bolezni srca pride podobno do povečanega deleža celic M2. To lahko nakazuje na funkcionalno povezavo med pomanjkanjem kisika, kar je značilno tudi za tumorsko okolje, in porastom fenotipa M2. *In vivo* se v tumorskem tkivu pojavljajo številni funkcionalno različni fenotipi, med katerimi obstajajo dinamične spremembe pod vplivom številnih molekul (7).

1.2 ANTIGEN CD204

V številnih raziskavah so potrdili, da so makrofagi M2 tisti, ki pripomorejo k napredovanju tumorjev in slabšemu poteku malignih obolenj (12), zato je treba poiskati zanesljiv označevalec alternativno aktiviranih makrofagov. Kot potencialni marker je bil proučen CD68, vendar ni bil dovolj specifičen za fenotip M2 (13). Znani antigeni, tipični za fenotip M2, so CD163, CD204 in CD206. Subpopulacije makrofagov M2 se v izražanju antigenov razlikujejo (14). Ena izmed značilnosti agresivnih tumorogenih makrofagov M2 je povečana ekspresija CD204. Invazija CD204 pozitivnih makrofagov je povezana s tumorskim napredovanjem in slabšim potekom bolezni pri pacientih z glikomom, ovarijskimi epitelijskimi tumorji in rakom trebušne slinavke (13).

CD204 oz. receptor čistilec A1 (angl. *scavenger receptor A*) je večfunkcijski membranski receptor, ki prepozna veliko tipov negativno nabitih makromolekul (13). Izražajo ga celice, udeležene v prirojenem imunskejem odgovoru – makrofagi in dendritične celice (15). Je večdomenska molekula, sestavljena iz treh enakih proteinskih verig. Za vezavo ligandov je bistven klaster štirih lizinov na C-terminalnem delu receptorskega vezavnega mesta, ki tvorijo pozitivno nabit žep. Receptor prepozna veliko število ligandov, vključno s kemijsko spremenjenimi molekulami, še posebej lipoproteini. Nekatere izmed teh lipoproteinov so povezani z nastankom bolezni vaskularnega sistema. Med pomembnejše ligande CD204 spadajo oksidiran LDL, acetiliran LDL, oksidiran HDL, metiliran goveji serumski albumin, dekstran sulfat, lipopolisaharid, fukoidan, sestavine Gram pozitivnih in negativnih bakterij ter apoptoznih celic. Vsi znani ligandi CD204 so polianioni, vendar vse negativno nabite makromolekule niso primerne za vezavo (16).

Nabor ligandov, ki vključujejo bakterijske komponente (npr. LPS), in dejstvo, da ga izražajo makrofagi, nakazujejo na fiziološko vlogo CD204 v prirojenem imunskejem odgovoru. Miši s pomanjkanjem CD204 imajo slabšo zaščito proti okužbam z *Listerio monocytogenes*, virusom Herpes simplex, *Staphilococcus aureusom* in *Neisserio meningitidis*. Zaščitni mehanizem CD204 pred patogeni še ni pojasnjen (16).

Nekontrolirana celična aktivacija je nevaren učinek razširjene okužbe. Hkrati so za razvoj sepse in toksičnega šoka nevarne bakterijske komponente in toksini. CD204 ima vlogo v detoksifikaciji plazme, zato miši s pomanjkanjem CD204 hitreje podležejo smrti zaradi prekomerne ekspresije TNF- α in IL-6 (16). CD204 lovi ligande receptorja TLR 4 in s tem zavre produkcijo vnetnih citokinov (14). Privzem LPS s strani CD204 zavre citokinski odziv na bakterijske komponente (16).

Proučevali so tudi vlogo CD204 v pridobljenem imunskejem odgovoru. Regulatorna vloga CD204 v imunskejem odgovoru T-celic in tumorski imunosti se je nakazala z odkritjem receptorjev za proteine toplotnega šoka (HPS, angl. *heat shock proteins*) na antigen predstavljalajočih celic, kot so dendritične celice (17). Xiang-Yang Wang je s sodelavci pokazal, da CD204 ni nujen za antitumorno delovanje cepiva, ki temelji na HPS. V nasprotju s pričakovanji so dokazali, da je pri miših z izbitim genom za CD204 izboljšan protitumorni učinek cepiva (15). Pomanjkanje CD204 je sovpadalo s povečanim antigen-specifičnim odzivom CD8+ T-celic in fagocitov. Razlike v odgovoru citotoksičnih T limfocitov so lahko delno pripisali s CD204 spremenjeni imunostimulatorni aktivnosti

dendritičnih celic ob aktivaciji TLR4 (17). Dendritične celice z zmanjšanim izražanjem CD204 so bile bolj odzivne na vnetne dejavnike in so imele učinkovitejšo antigenpredstavitevno sposobnost (15). Odsotnost CD204 je povrnila imunsko prepoznavnost mnogim slabo imunogenim tumorjem miši in izboljšala učinkovitost cepiv. Povečana imunogenost tumorjev zaradi pomanjkanja CD204 se je pokazala tudi pri cepivu, ki je vpleteno v signalno pot TLR4 z uporabo monofosforil lipida A (agonista TLR4) (17). CD204 je torej imunosupresorski receptor, ki sodeluje v vzdrževanju homeostaze imunskega sistema (15). Zmožen je zaviranja aktivnosti adjuvansov v cepivih. Mehanizem, prek katerega deluje CD204 supresorno na vnetni odziv dendritičnih celic, je ligacija na TLR4. Vpleta se v nabiranje TRAF6 in njegovo trimerizacijo ter ubikvitinacijo, ki ju sproži LPS. To sproži slabljenje TLR4-MyD88-TRAF6-NF κ B signalne kaskade. Pot TLR4-NF κ B je nujna za normalno delovanje dendritičnih celic in igra osrednjo vlogo v navzkrižni prezentaciji antigenov tumorskih celic v terapiji raka. Inhibicija ali blokada CD204 povzroči aktivacijo dendritičnih celic in njihov odgovor na molekule, kot so LPS, HPS in celični lizati. To pripomore k burnejšemu odzivu citotoksičnih T-limfocitov in protitumornemu delovanju cepiva. CD204 zavira zmogljivost CD4+ T-celic tudi v odsotnosti vnetnih dražljajev, kar nakazuje na vlogo CD204 kot intrinzičnega regulatorja omejevanja aktivnosti dendritičnih celic (17).

CD204 sodeluje v adheziji makrofagov, ki je pomembna za zadrževanje makrofagov na mestu infekcije in vnetja. Adhezija, ki jo posreduje CD204, bi lahko imela vlogo v nekaterih patoloških stanjih. Nepravilno modificirane molekule, ki postanejo ligandi za receptor CD204, lahko vodijo do neželenega zadrževanja celic (16).

Dodatna fiziološka vloga CD204, izraženih na makrofagih, je zagotavljanje primerne fagocitoze apoptoznih celic (16). Makrofagi v priželjcu miši s pomanjkanjem CD204 so izkazovali 50% zmanjšanje fagocitoze apoptoznih celic *in vitro*. V podobnem poskusu *in vivo* ni bilo vidnih razlik (18).

Povezano CD204 z razvojem ateroskleroze so raziskovalci proučevali na miših s pomanjkanjem receptorja CD204. Izolirani makrofagi teh živali so izkazovali zmanjšanje celične razgradnje acetiliranega in oksidiranega LDL. To je bilo v skladu s prejšnjimi ugotovitvami *in vitro*, da CD204 na makrofagih posreduje privzem modificiranih lipoproteinov, kar vodi do tvorbe lipidnih penastih celic. Kljub tem raziskavam ostaja vplettenost CD204 v razvoj ateroskleroze vprašljiva. V nekaterih študijah so prišli do

nasprotnih rezultatov, kar nakazuje na bolj zapleten odnos med boleznijo in receptorjem (16).

1.2.1 CD204 v razvoju in napredovanju raka

CD204 je udeležen v interakcijah med makrofagi in rakavimi celicami. Imunohistološke študije na glikomih, raku trebušne slinavke, raku ledvic in pljučnem raku so pokazale, da je izražanje CD204 v tumorju v tesni povezavi z makrofagi, udeleženimi v tumorogenezi, in da visoko izražanje CD204 sovpada z malignostnim potencialom tumorskih celic (14). Korelациjo med številom CD204 pozitivnih makrofagov in agresivnostjo tumorjev so proučili tudi na primeru pljučnega adenokarcinoma. Ugotovili so, da izražanje CD204 močno sovpada s slabšim preživetjem. Pri pacientih z večjim številom CD204 pozitivnih makrofagov je bilo povečano tudi izražanje IL-10 in MCP-1, ki sta vpletena v polarizacijo makrofagov v fenotip M2. Ti rezultati kažejo, da so CD204 pozitivni makrofagi tumor spodbujajoči makrofagi (fenotip M2) in so vpleteni v napredovanje pljučnega adenokarcinoma. IL-10 in MCP-1 lahko izvirata iz makrofagov ali tumorskih celic. MCP-1, ki izvira iz makrofagov, je znan kot dejavnik, ki priomore k nabiranju makrofagov pri raku dojk. Predpostavljen je mehanizem spodbujanja kopiranja makrofagov prek interakcij med tumorskimi celicami in makrofagi. Povečano izražanje IL-10 kaže na napredovanje bolezni in napoveduje slabši potek in izid zdravljenja. IL-10 in MCP-1, ki izvirata iz tumorskega tkiva, sprožita diferenciacijo, kopiranje in migracijo makrofagov M2, ki priomorejo k akumulaciji novih CD204 pozitivnih makrofagov v rakavem tkivu. Izkazalo se je tudi, da CD204 predstavlja boljši prognostični marker kot CD68. S CD204 so lahko bolje opisali agresivno subpopulacijo makrofagov M2, ki služi kot pokazatelj slabšega izida bolezni. Ker infiltracija CD204 pozitivnih makrofagov sovpada s številnimi faktorji lokalne invazije (limfatična permeabilnost, invaziranje kapilar in plevre), je verjetno, da CD204 pozitivni makrofagi sodelujejo v lokalni invaziji rakavih celic. Makrofagi lahko priomorejo k napredovanju bolezni prek izločanja rastnih dejavnikov, kot sta fibroblastni rastni faktor in epidermalni rastni faktor. Ti faktorji stimulirajo rast in mobilnost tumorskih celic. Tumorske celice se na EGF odzovejo s kemotakso in invaziranjem. CD204 pozitivni makrofagi prisrbijo kemotaktično signalno pot, ki zgosti tumorske celice v krvnih žilah in pospeši njihov vstop v vaskulaturo (13). Visoko število CD204 pozitivnih celic je neodvisen napovedni dejavnik metastaziranja pljučnega adenokarcinoma v bezgavke. Ker CD204 lahko izražajo tako makrofagi kot

dendritične celice, so testirali CD204 pozitivne celice tudi za antigen CD163, ki je značilen za makrofage. Visoko ujemanje med CD204 in CD163 pozitivnimi celicami kaže, da so celice, ki sodelujejo pri metastaziranju, makrofagi. CD204 pozitivni makrofagi imajo tumorpromotorsko funkcijo zaradi izločanja matriksnih metaloproteaz, vaskularnega rastnega dejavnika in transformatorskega rastnega dejavnika (TGF) β . V začetek procesa metastaziranja so makrofagi vpleteni zaradi spodbujanja remodelacije zunajceličnega matriksa in angiogeneze (19).

Pri proučevanju označevalcev pripadnosti malignih celic bolnikov z levkemijo in limfom celic T pri odraslih (ATLL) so prišli do naslednjih zaključkov. CD204 je bila močno izražena na makrofagih, vpletenih v tumorogenezo. Število CD204 pozitivnih makrofagov in razmerje CD204+/CD68+ sta bila povisana v vzorcih z večjim izražanjem Ki-67LI, ki je pokazatelj proliferacije celic limfoma, kar nakazuje na vpletost CD204 pozitivnih celic v napredovanju raka. Kljub temu pa v raziskavi niso potrdili povezave med povečanim izražanjem CD204 in slabšim kliničnim izidom (14).

Dodaten dokaz za pomembno vlogo v alternativni aktivaciji makrofagov in razrastu tumorskega tkiva je ugotovitev, da je pri pomanjkanju CD204 inhibiran razvoj tumorjev na modelu raka trebušne slinavke (16). Da bi raziskali funkcijo CD204 na makrofagih, so običajnim mišim in mišim z izbitim genom za CD204 subkutano vsadili celice limfoma EL4 in spremljali tumorsko rast. Čeprav se skupini miši nista razlikovali v številu infiltriranih makrofagov in limfocitov ter vaskularizaciji tumorja, je bila rast tumorja pri miših z izbitim CD204 upočasnjena. Število celic v mitozi je bilo pri miših s pomanjkanjem CD204 manjše, povečana pa je bila sinteza dušikovega oksida in IFN- γ . Prav sinteza teh dveh faktorjev je predpostavljen mehanizem inhibicije proliferacije. Ob prisotnosti CD204, ki zavira vnetne odgovore, so miši manj zaščitene proti invaziji rakavih celic. CD204 negativni makrofagi spodbujajo izražanje IFN- β in IFN- γ , kar je značilno za fenotip M1, zato je verjetno, da je CD204 sam dejavnik, ki pripomore k vzdrževanju fenotipa M2. Tudi v *in vitro* poskusu je bila proliferacija rakavih celic upočasnjena ob kultivaciji s CD204 negativnimi makrofagi. Rezultati te raziskave kažejo, da je antitumorna aktivnost makrofagov v miših s pomanjkanjem CD204 povisana zaradi večjega izločanja NO in IFN- γ . CD204 ima vlogo v regulaciji funkcije makrofagov z inhibicijo signalne poti receptorja TLR (18).

1.2.2 CD204 kot terapevtska tarča

Poleg prognostične vrednosti predstavljajo CD204 pozitivni makrofagi potencialno terapevtsko tarčo. Ciljanje celotne populacije makrofagov ne bi bil optimalen pristop, ker bi z njim prizadeli populacijo obeh fenotipov makrofagov, tudi protitumorne makrofage M1. Obstaja več strategij ciljanja makrofagov M2, npr. inhibicija kopičenja makrofagov M2 v tumorskem tkivu, zmanjševanje števila M2 makrofagov in blokiranje tumorogene aktivnosti makrofagov M2. Perspektiven pristop je tudi repolarizacija makrofagov M2 v fenotip M1, kar bi spremenilo razmerje med tumorogenimi in protitumornimi makrofagi v prid slednih. Ena izmed možnosti za dosego repolarizacije bi lahko bila infuzija protiteles proti CD204, ki bi stimulirala migracijo makrofagov iz sekundarnih bezgavk v tumorsko tkivo z IFN- γ aktivnostjo in inducirala reprogramiranje makrofagov M2 v IL-12 producirajoče celice M1. Podobno bi lahko dosegli tudi s ciljanjem NF- κ B signalne poti (glavne signalne poti M2 aktivacije) ali s kombinacijo liganda receptorja TLR 9 CpG-oligonukleotid (ODN) in protiteles proti IL-10 (12).

Pri razvoju terapije raka, ki deluje na ravni levkocitov, je treba razviti klinično uporabno metodo, ki je dovolj specifična in učinkovita. Nekatere levkocitne populacije povezujejo s spodbujanjem tumorske rasti. Miši s pomanjkanjem posameznih zvrsti levkocitov imajo omejeno rast tumorjev in metastaziranje. Pri humanem in mišjem ovarijskem raku so dominantna vrsta levkocitov vaskularni levkociti (VLC), ki predstavljajo več kot 30% celic v peritonealnem ascitesu. Izražajo površinske markerje endotelijskih in dendritičnih celic, med drugimi tudi CD204. Spodbujajo nastanek neovaskularizacije in vzdržujejo imunosupresivno okolje. S. Peter Bak je s sodelavci preizkusil učinkovitost imunotoksina proti CD204 pri zaviranju napredovanja ovarijskega raka. Na modelu mišjega ovarijskega raka ID8 so kot potencialno terapijo preizkušali odstranitev VCL. Tedenska aplikacija imunotoksina proti CD204 mišim s peritonealnim ID8 tumorjem je odstranila VLC in opazno zmanjšala breme tumorja ter akumulacijo ascitesa. Ker tumorske celice ID8 ne izražajo CD204, je izboljšanje, povzročeno z imunotoksinom, izključno posledica zaviranja CD204 pozitivnih levkocitov. Imunotoksin proti CD204 se je tako izkazal za učinkovitega pri selektivnem zaviranju peritonealnih levkocitov. Na učinkovitost zdravljenja vplivajo tip tumorja, njegova lokacija in pot terapije. Interperitonealna injekcija toksina je pri peritonealnem ovarijskem raku bolj učinkovita kot intravaskularna aplikacija. Prednosti tega pristopa pred trenutnimi imunoterapijami, usmerjenimi v T-celice, je v tem, da ni potrebe po pacientu specifičnih komponentah. Eliminacija levkocitov pa je lahko tudi

dopolnilo terapevtskim pristopom, ki so usmerjeni neposredno proti tumorskim celicam (20).

CD204 je obetavna tarča za imunoterapijo raka tudi zaradi supresornega delovanja na dendritične celice. Genetsko modificirane dendritične celice z utišanim CD204 imajo boljšo sposobnost imobiliziranja citotoksičnih T-celic, ki prepoznajo antigene tumorskih celic, kar pripomore k učinkovitejši terapiji melanoma. Hkrati se ob zaviranju CD204 izboljša infiltracija tumorja s CD8+ T-celicami in celicami ubijalkami (17). Negativno reguliranje antigen specifične antitumorne imunosti CD204 je pomembno upoštevati pri razvoju cepiv proti raku. S selektivno odstranitvijo ali z blokado CD204 bi povečali učinkovitost imunoterapije raka (18).

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Predhodne raziskave so pokazale, da je napredovanje tumorjev povezano s spremembo fenotipa makrofagov iz M1 v M2. Subpopulacije makrofagov se razlikujejo v izražanju antigenov. Invazija makrofagov, ki izražajo CD204, pri nekaterih oblikah raka korelira s tumorskim napredovanjem in s krajšim preživetjem. Preliminarne raziskave so dokazale, da povečana aktivnost LPL sovpada s slabšim potekom bolezni pri pacientih z nedrobnoceličnim pljučnim rakom.

V magistrski nalogi bomo razvili postopek dokazovanja antiga CD204 na celicah z visokim izražanjem *LPL* na histoloških rezinah nedrobnoceličnega pljučnega rakavega tkiva. Z razvitim postopkom bomo preverili naslednjo hipotezo: celice, ki visoko izražajo *LPL* v tkivu nedrobnoceličnega pljučnega raka, imajo površinski antigen CD204.

Razvili bomo zaporedni postopek imunohistokemije in fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH). Na histološke rezine nedrobnoceličnega pljučnega raka bomo vezali protitelesa proti CD204 in omogočili vizualizacijo lokacije tega antiga. Nato bomo z oligonukleotidi komplementarnimi mRNA LPL, označenimi s fluorescenčnim barvilom, določili lokacije v tkivu, kjer se izraža gen za LPL. Z opazovanjem pod fluorescenčnim mikroskopom bomo primerjali kolokalizacijo celic, ki izražajo LPL, in celic, ki imajo površinski antigen CD204.

Potrditev hipoteze, bi omogočila uporabo zgolj imunohistokemičnega postopka za določanje prisotnosti agresivnega fenotipa makrofagov, s čimer bi se skrajšal čas preiskave. Če bi lahko celice, ki visoko izražajo gen za LPL, opisali z njihovimi značilnimi površinskimi antigeni (CD204), bi zmanjšali tudi zahtevnost postopka. To bi olajšalo

raziskovalno delo in omogočilo, da bi pristopili k obsežnejši imunohistološki študiji, povezani s sintezo LPL in pomenom LPL za krajše preživetje bolnikov.

3 MATERIALI IN METODE

Za primerjavo lokacije izražanja LPL in prisotnosti antiga CD204 je treba na histoloških rezinah tkiva nedrobnoceličnega pljučnega raka zaporedno izvesti imunohistokemično analizo s protitelesi proti CD204 in analizo FISH, s katero zaznamo mRNA LPL. Delo smo začeli s pripravo histoloških rezin. Z imunohistokemično metodo smo želeli prikazati lokalizacijo površinskega proteina CD204 v tkivu. Na nukleotidna zaporedja za LPL v vzorcu smo vezali s fluorescenčnim barvilm označene komplementarne oligonukleotide in omogočili vizualizacijo celic, ki visoko izražajo *LPL*. Histološke rezine smo po izvedbi analiz opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom in določali lokacijo izražanja gena za LPL in antiga CD204.

Pri delu smo izhajali iz že prepisane cDNA, ki smo jo očistili in komplementarne oligonukleotide fluorescenčno označili. Postopki izolacije mRNA iz rakavega pljučnega tkiva, prepisa v cDNA in verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR), ki so bili izvedeni pred našim delom, so opisani v predhodni diplomski nalogi (21). Če na kratko povzamemo, za izolacijo RNA iz pljučnega tkiva so uporabili RNesay Mini Kit (QIAGEN, Hiden, Nemčija). Tkivo so predhodno lizirali in homogenizirali v prisotnosti gvanin izotiocianata. Gvanin izotiocianat je imel vlogo inaktivatorja RNAAZ. RNA se je selektivno vezal na silikagelno membrano. Za optimalno vezavo RNA na membrano je bilo treba dodati etanol, primesi pa so odstranili s spiralnimi pufri. Za prepis RNA v cDNA so uporabili SuperScript VILOTM cDNA Synthesis Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Prepis iz RNA v cDNA je katalizirala reverzna transkriptaza. Pri sintezi oligonukleotidov, komplementarnih mRNA *LPL*, so uporabili oligonukleotidne začetnike (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornija, ZDA). Sintetizirali so tri različne segmente mRNA LPL, in sicer enega na 3' koncu, enega na 5' koncu in enega v sredini mRNA. Zmes treh oligonukleotidov so uporabili zaradi večje občutljivosti, saj se mRNA razgrajuje predvsem na 3' UTR regiji. Vse tri oligonukleotide so nato pomnožili s qPCR, pri čemer so uporabili FastStart Universal Probe Master (ROX, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, ZDA). Reakcijska mešanica je morala za uspešno izvedbo PCR vsebovati: dNTP, oligonukleotidne začetnike, Taq DNA polimerazo, Mg²⁺ ione (MgCl₂), pufer in cDNA, ki je služila kot matrica. Uspešnost pomnoževanja so

spremljali z merjenjem porasta fluorescence v qPCR. Kakovost sintetiziranih komplementarnih oligonukleotidov so preverili z agarozno gelsko elektroforezo. S tem so potrdili, da so dobili oligonukleotide pričakovane dolžine in da ni prišlo do fragmentiranosti oligonukleotidov. Iz razmerja absorbanc $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ so ugotovili, da so poleg oligonukleotidov prisotne tudi druge snovi in je zato potrebno čiščenje PCR produkta (21).

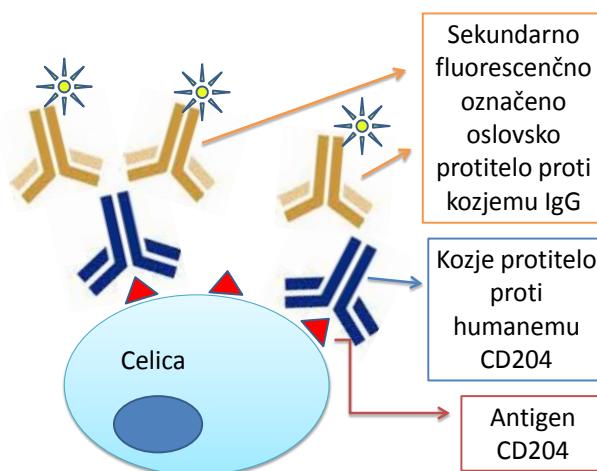
3.1 PRIPRAVA HISTOLOŠKIH REZIN TKIV NEDROBNOCELIČNEGA PLJUČNEGA RAKA

Prvi korak pri našem delu je bila priprava histoloških rezin, na katerih smo v nadaljevanju izvajali imunohistokemično metodo. Podoben postopek priprave rezin je uporabila tudi Tina Malavašič in ga opisala v diplomskem delu (21). Glavna sprememba glede na postopek priprave histoloških rezin, opisan v omenjenem diplomskem delu, je opustitev fiksacije v paraformaldehidu. Namesto fiksacije z uporabo paraformaldehida so rezine pritrdili na posebna objektna stekelca Superfrost R (Gerhard Menzel GMBH, Braunschweig, Nemčija). Na stekelca Superfrost R se tkivo pritrdi zaradi pozitivnega naboja, zato dodatna fiksacija ni potrebna. Fiksacija s paraformaldehidom je v predhodnih eksperimentih povzročala močno avtofluorescenco tkiva, ki je motila analizo s fluorescenčnim mikroskopom.

Tumorska tkiva so bila pacientom z nedrobnoceličnim pljučnim rakiom odvzeta med operativnim posegom v UKC Ljubljana. 15 minut po odvzemu so jih zmrznili v tekočem dušiku, kjer so ostala do nadaljnje priprave. Sledilo je rezanje histoloških rezin na Inštitutu za anatomijo. Tkiva so odstranili iz tekočega dušika in jih s pomočjo lepila Jung Tissue Freezing medium pritrdili na kovinsko držalo. Kovinsko držalo so vpeli v kriostat in začeli z rezanjem 10 μm debelih rezin (21). Pri tem so pazili, da se niso odtajala. Rezine tkiva so položili na Superfrost R objektna stekelca, kamor so se pritrdila zaradi elektrostatskega naboja. Sledila je dehidracija rezin tkiv v etanolnih raztopinah različnih koncentracij. Stekelca s histološkimi rezinami so za 2 minuti potopili v etanolne raztopine naraščajoče koncentracije. Vrstni red etanolnih raztopin je bil: 30%, 50%, 70%, 85%, 95% , 100% (21). Tako pripravljene rezine smo hranili v zamrzovalniku na -75 °C na Fakulteti za farmacijo do nadaljnje analize.

3.2 IMUNOHISTOKEMIČNA ANALIZA RECEPTORJA CD204

Imunohistokemija (IHC) je tehnika, s katero lahko prikažemo porazdelitev in lokacijo proteinov v intaktnem tkivu. Za prikaz specifičnih proteinov v celici ali na njeni površini lahko uporabimo fluorescenčno označena protitelesa. Pri našem delu smo uporabili kozje protitelo proti humanemu CD204 in sekundarno fluorescenčno označeno oslovsko protitelo proti kozjemu IgG ter zajče poliklonsko protitelo proti humanemu CD204 za direktno imunohistokemično tehniko.



Slika 2: Shematski prikaz indirektne imunohistokemične metode s protitelesi, ki smo jih uporabili pri delu

3.2.1 Uporabljeni reagenti

- DEPC voda (Sigma Aldrich, Nemčija) – voda brez RNAAZ;
- koncentriran etanol (Sigma Aldrich, Nemčija);
- etanolne raztopine za rehidracijo tkivnih rezin: pred uporabo smo jih pripravljali sveže. Naredili smo jih z mešanjem koncentriranega etanola in DEPC vode v ustreznem razmerju. Pri delu smo uporabljali naslednje koncentracije etanolnih raztopin: 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 30%;
- HCl – 37% klorovodikova kislina za analizo (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 1 M HCl; 8,32 g HCl razredčimo z DEPC vodo do 100 ml. Uporabimo za pripravo 0,2 M HCl;
- NaCl (Gram-Mol, Zagreb, Hrvaška);
- KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- KH₂PO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška);

- NaHPO₄.2H₂O (Kemika, Zagreb, Hrvaška);
- 10× PBS; natehtamo 80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH₂PO₄ in 14,41 g NaHPO₄.2H₂O in kemikalije raztopimo v DEPC vodi do skupnega volumna 1 L. pH uravnamo na vrednost 7,4 in raztopino prefiltriramo skozi 0,45 µm filter. Raztopina je obstojna 6 mesecev;
- 1× PBS; 10 × redčena raztopina 10× PBS: 100 mL 10× PBS zlijemo v 1000 mL bučko. Do oznake dolijemo DEPC vodo in pH uravnamo na 7,4;
- 0,2 M HCl ; raztopina za zmanjševanje avtofluorescence. Pripravili smo jo tako, da smo v 120 mL 1× PBS dolili 30 mL 1M HCl;
- protitelo proti CD204; Anti-macrophage scavenger receptor I antibody, kataloška št. ab6417 (Abcam, Cambridge, Velika Britanija);
- detekcijsko protitelo za CD204; Donkey anti-goat IgG H&L (Alexa Fluor 594), kataloška št. ab150132 (Abcam, Cambridge, Velika Britanija);
- alternativno detekcijsko protitelo za CD204; Alexa Fluor 555 donkey anti-goat IgG H+L (Life Technologies, Carlsbad, ZDA);
- protitelo za direktno imunohistokemično metodo; 1st Pt Bioss Alexa F. 488: Rabbit anti-MSR1 polyclonal antibody conjugated Alexa Fluor 488;
- DAPI (Life Technologies, Carlsbad, ZDA);
- reagent za barvanje jedra; priprava: 1,25 µL DAPI damo v 500 µL 1× PBS;
- Chichago Sky Blue 6B (Sigma Aldrich, Nemčija);
- raztopina za zmanjševanje avtofluorescence tkiva: natehtamo 0,5 g reagenta Chichago Sky Blue in ga raztopimo v 100 mL PBS. Raztopino prefiltriramo skozi Whatmannov filter papir.

3.2.2 Uporabljeni pripomočki in aparature

- plošča za rezine s pokrovom (Thermoproc, Črnuče, Slovenija);
- sterilne steklene kivete s pokrovom;
- diamantno rezilo (Kraus Winter, Hamburg, Nemčija);
- pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- inkubator Enviro- Genie (Scientific Industries, New York, ZDA);
- pH meter pH 700 (Eutech Industries, Landsmeer, Nizozemska);
- mini centrifuga Mini Spin (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- magnetno mešalo Rotamix 604MM (Tehnica, Železniki, Slovenija);

- filtrirni sistem Filter max TPP 99500 500 ml in 1000 ml (Sigma Aldrich, Nemčija);
- Whatmannov filter papir (Assistant, Sondheim, Nemčija);
- sterilna steklovina: čaše, bučke, merilni valji;
- krovna stekelca;
- tesnilo FixoGum (Marabo, Bietigheim- Bissingen, Nemčija);
- fluorescenčni mikroskop Olympus BX41 (Olympus, Pensylvania, ZDA).

3.2.3 Postopek indirektne metode

1. Rezine, ki smo jih hrаниli v zamrzovalniku na -75°C , ogrejemo na sobno temperaturo. Obrišemo stekelca in z diamantnim rezilom označimo lokacijo tkiva na njem.
2. Rehidriramo tkiva v padajočih koncentracijah etanolnih raztopin za rehidracijo tkiva: 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 30%. V vsaki raztopini pustimo stekelca 2 minuti pri sobni temperaturi.
3. Stekelca prenesemo v kiveto z 0,2 M HCl in jih namakamo 20 minut pri sobni temperaturi.
4. 3 minute spiramo v DEPC vodi pri sobni temperaturi.
5. 3 minute spiramo v 1× PBS pri sobni temperaturi.
6. Na stekelce nanesemo 10 μL raztopine protiteles proti CD204 in pokrijemo s parafilmom. 70 minut inkubiramo v vlažni komori pri 37°C .
7. 3 minute spiramo v 1× PBS pri sobni temperaturi.
8. Nanesemo 10 μL raztopine detekcijskih protiteles in pokrijemo s parafilmom. Prenesemo v vlažno komoro in zaščitimo pred svetlobo. Inkubiramo 60 minut pri 37°C .
9. 3 minute spiramo v 1× PBS pri sobni temperaturi.
10. Nanesemo 10 μL reagenta za barvanje jeder in inkubiramo 10 minut pri sobni temperaturi.
11. 3 minute spiramo v 1× PBS pri sobni temperaturi.
12. Dodamo 10 μL glicerola, pokrijemo s krovnim stekelcem. Robove zatesnimo s FixoGumom in zamrznemo na -75°C .

3.2.4 Postopek direktne imunohistokemične metode

1. Rezine, ki smo jih hrаниli v zamrzovalniku na -75°C , ogrejemo na sobno temperaturo. Obrišemo stekelca in z diamantnim rezilom označimo lokacijo tkiva na njem.
2. Rehidriramo tkiva v padajočih koncentracijah etanolnih raztopin za rehidracijo tkiva: 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 30%. V vsaki raztopini pustimo stekelca 2 minuti pri sobni temperaturi.
3. Stekelca prenesemo v kiveto z 0,2 M HCl in jih namakamo 20 minut pri sobni temperaturi.
4. 3 minute spiramo v DEPC vodi pri sobni temperaturi.
5. 3 minute spiramo v $1\times$ PBS pri sobni temperaturi.
6. Na stekelce nanesemo 10 μL raztopine protiteles za direktno imunohistokemično metodo in pokrijemo s parafilmom. 70 minut inkubiramo v vlažni komori pri 37°C .
7. 3 minute spiramo v $1\times$ PBS pri sobni temperaturi.
8. Nanesemo 10 μL reagenta za barvanje jeder in inkubiramo 10 minut pri sobni temperaturi.
9. 3 minute spiramo v $1\times$ PBS pri sobni temperaturi.
10. Dodamo 10 μL glicerola, pokrijemo s krovnim stekelcem. Robove zatesnimo s FixoGumom in zamrznemo na -75°C .

3.2.5 Postopek direktne imunohistokemične metode z utišanjem

avtofluorescence tkiva

1. Rezine ogrejemo na sobno temperaturo. Obrišemo stekelca in z diamantnim rezilom označimo lokacijo tkiva na njem.
2. Rehidriramo tkiva v padajočih koncentracijah etanolnih raztopin za rehidracijo tkiva: 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 30%. V vsaki raztopini pustimo stekelca 2 minuti pri sobni temperaturi.
3. Stekelca prenesemo v kiveto z 0,2M HCl in jih namakamo 20 minut pri sobni temperaturi.
4. 3 minute spiramo v DEPC vodi pri sobni temperaturi.
5. 3 minute spiramo v $1\times$ PBS pri sobni temperaturi.

6. Na stekelce nanesemo 10 µL raztopine protiteles za direktno imunohistokemično metodo in pokrijemo s parafilmom. 70 minut inkubiramo v vlažni komori pri 37 °C.
7. 3 minute spiramo v 1× PBS pri sobni temperaturi.
8. Nanesemo 10 µL reagenta za barvanje jeder in inkubiramo 10 minut pri sobni temperaturi.
9. 3 minute spiramo v 1× PBS pri sobni temperaturi.
10. Tkivno rezino potopimo v raztopino za zmanjšanje avtofluorescence tkiva za 10 minut.
11. 5 minut spiramo v 1× PBS.
12. Dodamo 10 µL glicerola, pokrijemo s krovnim stekelcem. Robove zatesnimo s FixoGumom in zamrznemo na -75 °C.

3.3 FLUORESCENČNA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA (FISH)

FISH je citogenetska tehnika, s katero lahko določamo lokacijo specifičnih nukleotidnih zaporedij v vzorcu. S fluorescenčnim barvilm označene oligonukleotide, komplementarne iskanemu zaporedju, inkubiramo s tkivnimi/celičnimi preparati in s fluorescenčnim mikroskopom detektiramo signal na preparatu, ki potrdi vezavo oligonukleotidnega zaporedja. Na ta način lahko vizualiziramo specifične odseke DNA ali RNA. Pri našem delu smo določali lokacijo mRNA LPL.

3.3.1 Čiščenje PCR–produkta

V našem diplomskem delu smo iz predhodno pripravljenega PCR–produkta očistili nepotrebne nečistote in oligonukleotidom pripeli oligonukleotidni rep, ki nam je kasneje omogočil vizualizacijo sond po hibrizaciji z mRNA za LPL v tkivu.

3.3.1.1 Uporabljeni reagenti

- Membrane Binding Solution (Promega, Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA);
- Membrane Wash Solution (Promega, Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA) in
- voda brez nukleaz (Promega, Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA).

3.3.1.2 Uporabljeni pripomočki in aparature

- pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- kolona (Promega, Corporation, Madison, Wisconsin, USA);
- zbiralna epruveta (Promega, Corporation, Madison, Wisconsin, USA) in
- centrifuga 5430 R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

3.3.1.3 Postopek čiščenja PCR-produkta

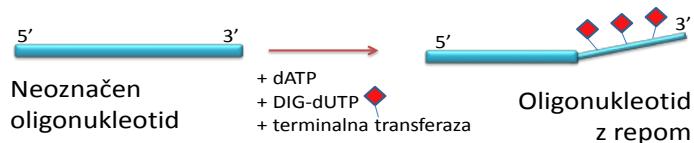
Iz PCR-prodakta najprej odstranimo neporabljene nukleotide in oligonukleotidne začetnike z uporabo sistema Wizard SV Gel and PSC Clean-Up System (Promega, Corporation, Madison, Wisconsin, ZDA). Ta sistem lahko uporabljamo za ekstrakcijo in čiščenje DNA iz agarognega gela ali za čiščenje PCR-produkta. Na membrano kolone se lahko veže do 40 µg DNA. DNA lahko očistimo s centrifugiranjem ali z uporabo vakuma. Pri našem delu smo uporabili centrifugiranje. Vezavo oligonukleotidov na silikagelno membrano omogočajo kaotropične soli. Ostale primesi v vzorcu s centrifugiranjem odstranimo, nato pa dodamo vodo brez nukleaz. Očiščeni oligonukleotidi se z vodo eluirajo iz kolone.

1. 120 µL PCR produkta nanesemo na membrano kolone. Dodamo 120 µL reagenta za vezavo na membrano (Membrane Binding Solution).
2. Kolono vstavimo v zbiralno epruveto in inkubiramo 1 minuto pri sobni temperaturi.
3. Kolono z zbiralno epruveto centrifugiramo pri 16.000× g 1 minuto. Tekočino, ki se nabere v zbiralni epruveti, zavržemo.
4. Na kolono dodamo 700 µL reagenta za spiranje membrane, ki vsebuje etanol (Membrane Wash Solution). Centrifugiramo pri 16.000× g 1 minuto. Material iz zbiralne tubice zavržemo.
5. Dodamo 500 µL reagenta za spiranje membrane (Membrane Wash Solution). Centrifugiramo pri 16.000× g 5 minut.
6. Spraznimo zbiralno epruveto in ponovno centrifugiramo 1 minuto, da odstranimo ves preostali etanol.
7. Kolono prenesemo v čisto 1,5 mL epruveto. Dodamo 50 µL vode brez nukleaz in inkubiramo pri sobni temperaturi 1 minuto.
8. Centrifugiramo pri 16.000× g 1 minuto. Eluat zamrzemo za nadaljnjo uporabo.

3.3.2 Pripenjanje DIG-dUTP repov na 3' koncu oligonukleotidov

Pri delu smo uporabili DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd Generation (Roche). Vizualizacijo sond omogočimo s tvorbo DIG-dUTP repa na 3' koncu oligonukleotida (slika 3). V rep je vgrajen dUTP z digoksigeninom, ki ga lahko zaznamo s protitelesi anti-digoksigenin-rodamin (Anti-digoxigenin-rhodamine, Fab Fragments, kataloška št. 11207750910 (Roche Mannheim, Nemčija)), uporabljenimi v postopku FISH. Pri sintezi sond brez repa, ki nam služijo kot negativna kontrola, namesto encima terminalna transferaza dodamo enak volumen vode brez nukleaz.

Označevanje oligonukleotidov na 3' koncu:



Vizualizacija sond po hibridizaciji:



Slika 3: Shematski prikaz principa označevanja oligonukleotidov in vizualizacije po hibridizaciji

3.3.2.1 Uporabljeni reagenti

- DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd Generation (Roche, Mannheim, Nemčija);
 - voda brez nukleaz (Promega, Corporation, Madison, Wisconsin, USA);
 - reakcijski pufer – Reaction buffer (Roche, Mannheim, Nemčija);
 - raztopina CoCl_2 (Roche, Mannheim, Nemčija);
 - raztopina DIG-dUTP (Roche, Mannheim, Nemčija);
 - terminalna transferaza – 400 U Terminal transferase (Roche, Mannheim, Nemčija) in
 - EDTA (Roche, Mannheim, Nemčija).

3.3.2.2 Uporabljeni pripomočki in aparature

- pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- centrifuga 5430 R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) in
- inkubator Enviro-Genie (Scientific Industries, New York, ZDA).

3.3.2.3 Postopek pripenjanja repov na 3' koncu oligonukleotidov

1. Na ledu pripravimo reakcijski zmesi, kot je prikazano v Preglednici I.

Preglednica I: Sestava reakcijskih zmesi za izvedbo postopka pripajanja repov na 3' koncu oligonukleotidov

Reagent	Sonda z repom	Sonda brez repa (negativna kontrola)
Reakcijski pufer (Reaction buffer)	4 µL	4 µL
Raztopina CoCl ₂	4 µL	4 µL
Raztopina DIG-dUTP	1 µL	1 µL
Raztopina dATP	1 µL	1 µL
Terminalna transferaza (400 U Terminal transferase)	1 µL	0 µL
Voda brez nukleaz	0µL	1µL

2. Centrifugiramo, da se vsi reagenti posedejo na dno epice.
3. Dodamo 9 µL prečiščenega PCR-produkta.
4. 15 minut inkubiramo pri 37 °C.
5. Prestavimo na led in dodamo 2 µL 0,2 M EDTA, da ustavimo reakcijo.

3.3.3 Analiza FISH na histoloških rezinah

Oligonukleotide, ki smo jih v prejšnjih korakih očistili in jim pripeli rep, smo hibridizirali z mRNA za LPL v tkivu. Na ta način smo lokalizirali RNA za LPL na histoloških rezinah in omogočili njihovo vizualizacijo pod fluorescenčnim mikroskopom.

3.3.3.1 Uporabljeni reagenti

- DEPC voda (Sigma Aldrich, Nemčija) – voda brez RNaz;
- koncentriran etanol (Sigma Aldrich, Nemčija);
- etanolne raztopine za rehidracijo tkivnih rezin; pripravljali smo jih sveže iz koncentriranega etanola in DEPC vode v ustreznih volumskih razmerjih. Za rehidracijo tkivnih rezin smo uporabili etanolne raztopine 100%, 95%, 85%, 50%, 30% etanola;
- etanolne raztopine za dehidracijo tkivnih rezin; pripravljene na enak način kot etanolne raztopine za rehidracijo tkivnih rezin. Uporabili smo 70%, 90% in 100% etanolne raztopine;
- HCl – 37% klorovodikova kislina, p.a. (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- 1 M HCl ; 8,32 g HCl razredčimo z DEPC vodo do 100 ml. Uporabimo za izdelavo 0,2 M HCl;
- NaCl (Gram-Mol, Zagreb, Hrvaška);
- KCl (Merch, Darmstadt, Nemčija);
- KH₂PO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška);
- NaHPO₄·2H₂O (Kemika, Zagreb, Hrvaška);
- 10× PBS; natehtamo 80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH₂PO₄ in 14,41 g NaHPO₄·2H₂O in kemikalije raztopimo v DEPC vodi do skupnega volumna 1 L. pH uravnamo na vrednost 7,4 in raztopino prefiltriramo skozi 0,45 µm filter. Raztopina je obstojna 6 mesecev.
- 1× PBS; 100 mL 10× PBS nalijemo v 1000 mL bučko. Do oznake dolijemo DEPC vodo in pH naravnamo na 7,4;
- 0,2 M HCl – raztopina za zmanjševanje avtofluorescence; pripravimo tako, da 120 ml 1× PBS dodamo 30 mL 1 M HCl;
- Na₃C₆H₅O₇·2H₂O (Sigma-Aldrich, Nemčija);
- 20× SSC; natehtamo 175,3 g NaCl in 88,25g Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O. V 1000 mL bučko dolijemo DEPC vodo do oznake in naravnamo pH na 6,3;
- 2× SSC; 100 mL 20 x SSC razredčimo do skupnega volumna 1 L z DEPC vodo in naravnamo pH na 7;
- raztopina 20% pepsina (Sigma Life Science, Nemčija);
- 1 M MgCl₂ (Sigma Life Science, Nemčija);

- 37% formaldehid (Sigma- Aldrich, Nemčija);
- raztopina formaldehida za refiksacijo; raztopino pripravimo sveže na dan analize FISH. 5 mL 1 M MgCl₂ dodamo 2 ml 37% formaldehida in dopolnimo do skupnega volumna 100 mL z 2× SSC;
- raztopina TAE (Merch, Darmstadt, Nemčija);
- anhidrid acetne kisline (Sigma Aldrich, Nemčija);
- raztopina za acetiliranje; pripravljamo sveže na dan analize FISH. 2 mL raztopine TAE dopolnimo do 150 mL z DEPC vodo. Tik pred uporabo dodamo 750 µL anhidrida acetne kisline (kratek razpolovni čas);
- NP-40 (Igepal CA-630, Sigma);
- BSA (Sigma Aldrich, Nemčija); albumin iz govejega seruma;
- 7% BSA; 0,7 g BSA zaztopimo v 10 mL PBS;
- Tween 20 (Sigma, Aldrich, Nemčija);
- 1× PBT; v 100mL bučko pripravimo 4 mL 7% BSA in dodamo 1 mL Tween 20. Dopolnimo do oznake z 1 x PBS. Raztopino pustimo čez noč, da se ves Tween 20 raztopi. Prefiltriramo skozi 2µm filter in hranimo v hladilniku;
- protitelo anti-digoksigenin-rodamin - Anti-digoxigenin-rhodamine, Fab Fragments, 11207750910 (Roche, Mannheim, Nemčija);
- DAPI (Life Technologies, Carlsbad, USA) in
- reagent za barvanje jeder; 1,25 µL DAPI dodamo 500 µL 1× PBS.

3.3.3.2 Uporabljeni pripomočki in aparature

- vodna kopel: Water Bath-Termostat WB-4MS (Biosan, Riga, Latvija);
- pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- nastavki za pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- sterilne kivete s pokrovom;
- plošča za rezine s pokrovom (Thermoproc, Črnuče, Slovenija);
- inkubator: Enviro- Genie (Scientific Industries, New York, ZDA);
- magnetno mešalo: Rotamix 604MM (Tehtnica, Železniki, Slovenija);
- pH meter pH 700 (Eutech Industries, Landsmeer, Nizozemska);
- mini centrifuga Mini Spin (Eppendorf, Hamburg, Nemčija);
- filtrirni sistem Filter max TPP 99500 500 mL in 1000 mL;

- krovna stekelca;
- tesnilo FixoGum (Marabo, Bietigheim- Bissingen, Nemčija);
- sterilna steklovina: čaše, bučke, merilni valji in
- fluorescenčni mikroskop Olympus BX41 (Olympus, Pensylvania, ZDA).

3.3.3.3 Postopek FISH-analize

1. Tkivne rezine ogrejemo na sobno temperaturo. Obrišemo stekelca in z diamantnim rezilom označimo lokacijo tkiva na njem.
2. Rehidriramo tkiva v padajočih koncentracijah etanolnih raztopin za rehidracijo tkiva. V vsaki raztopini pustimo stekelca 2 minuti pri sobni temperaturi.
3. Stekelca prenesemo v kiveto z 0,2 M HCl. Pustimo 20 minut pri sobni temperaturi.
4. Spiramo v DEPC vodi 3 minute pri sobni temperaturi.
5. Spiramo v 1× PBS, 3 minute pri sobni temperaturi.
6. Spiramo v 2× SSC, 2 minuti pri sobni temperaturi.
7. Ponovno spiramo v 2× SSC 2 minuti pri sobni temperaturi.
8. Na vsa stekelca kanemo 10 µL raztopine 20% pepsina, damo v vlažno komoro in vse skupaj v inkubator. Pustimo 20 minut pri temperaturi 37 °C.
9. 2 minuti spiramo v 2× SSC pri sobni temperaturi.
10. Ponovno spiramo v 2× SSC 2 minuti pri sobni temperaturi.
11. Stekelca potopimo v formaldehid za refiksacijo in pustimo 10 minut pri sobni temperaturi.
12. Spiramo v 2× SSC 2 minuti pri sobni temperaturi.
13. Ponovno spiramo v 2× SSC 2 minuti pri sobni temperaturi.
14. Raztopino za acetiliranje pripravimo sveže v kiveti. Vanjo potopimo stekelca za 10 minut in raztopino ves čas mešamo z magnetnim mešalom.
15. Pripravimo sonde: zmešamo 1 µL sond in 11 µL celičnega hibridizacijskega pufra (CHP). Damo v plovček in vse skupaj v vodno kopel s temperaturo 80 °C za 10 minut, da sonde denaturirajo.
16. Stekelca spiramo v 2× SSC 2 minuti pri sobni temperaturi.
17. Ponovno spiramo v 2× SSC 2 minuti pri sobni temperaturi.
18. Dehidriramo tkivne rezine v 70%, 90% in 100% etanolnih raztopinah za dehidracijo. Stekelca pustimo v vsaki raztopini 2 minuti pri sobni temperaturi.
19. Stekelca osušimo na sobni temperaturi.

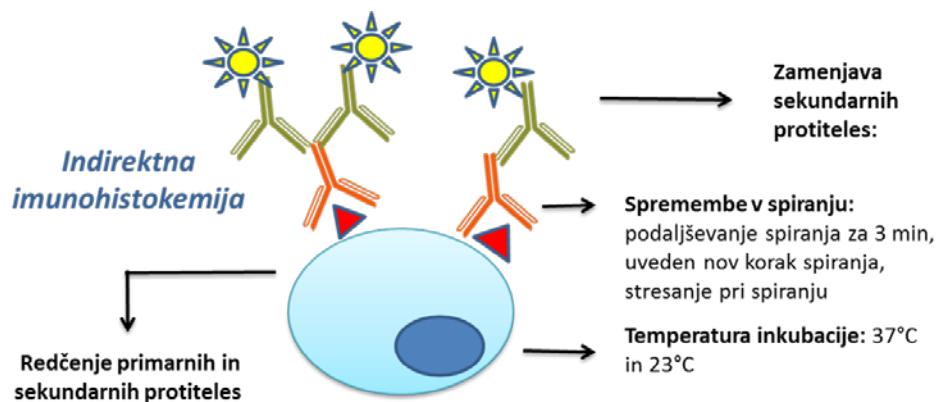
20. Na stekelca kanemo 10 µL označene denaturirane vroče sonde in pokrijemo s krovnim stekelcem ter zatesnimo s FixoGumom.
21. Hibridiziramo 16–18 ur pri 37 °C.
22. NP-40 segrejemo na 73 °C.
23. Odstranimo krovno stekelce in stekelca s tkivi potopimo v segret NP-40 za 4 minute.
24. Spiramo v 1× PBT 4 minute pri sobni temperaturi.
25. Ponovno spiramo v 1× PBT 4 minute pri sobni temperaturi.
26. Nanesemo 10 µL redčene raztopine protiteles anti-digoksigenin-rodamin (konc. 20 µg /mL).
27. 70 minut inkubiramo pri 37 °C v vlažni komori. Zaščitimo pred svetlobo.
28. 3 minute spiramo v 1× PBT pri sobni temperaturi.
29. Ponovno 3 minute spiramo v 1× PBT pri sobni temperaturi.
30. 10 µL raztopine za barvanje jeder nanesemo na stekelce in inkubiramo 10 minut pri sobni temperaturi.
31. 2 minuti spiramo v 1× PBS pri sobni temperaturi.
32. Ponovimo spiranje v 1× PBS 2 minuti pri sobni temperaturi.
33. Dodamo 10 mikro L glicerola, pokrijemo s krovnim stekelcem in zatesnimo robove s FixoGumom. Zmrznemo na – 75 °C.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Celični označevalec CD204 je eden izmed antigenov, značilnih za makrofage M2. V predhodnih raziskavah je bilo ugotovljeno, da številčnost CD204 pozitivnih makrofagov v tumorskem tkivu sovpada z malignim potencialom tumorjev (14). Na modelu nedrobnoceličnega pljučnega raka so dokazali, da so celice, ki prekomerno izražajo *LPL*, subpopulacija makrofagov (6). Prekomerno izražanje gena za encim *LPL* je povezano s slabšim potekom rakavih bolezni (5). V magistrski nalogi smo žeeli preveriti, ali imajo makrofagi z visokim izražanjem *LPL* površinski antigen CD204. Da bi preverili hipotezo, je bilo treba razviti postopek imunohistokemične analize CD204 in optimizirati postopek FISH za mRNA *LPL*.

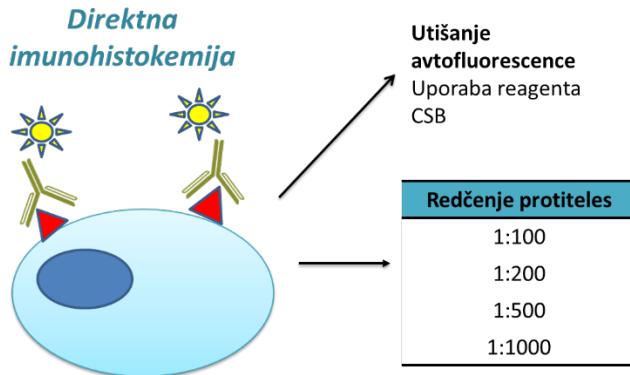
4.1 OPTIMIZACIJA POSTOPKA IMUNOHISTOKEMIČNE ANALIZE NA TKIVNIH REZINAH

Imunohistokemija je uveljavljen postopek, ki se pogosto uporablja v raziskovalne in diagnostične namene (21). Čeprav so temeljni koraki in njihovo zaporedje za uspešno izvedbo imunohistokemične analize v protokolu določeni, je v izvedbenem postopku mnogo korakov, za katere je potrebna dodatna optimizacija, da zagotovimo najboljšo možno vezavo uporabljenih protiteles in ustrezno vizualizacijo proučevanega proteina (22). Glavne spremenljivke v protokolu, s katerimi prilagajamo delo za detekcijo specifičnih proteinov na površini celic, so izbor protiteles, koncentracija protiteles, čas in način spiranja nevezanih protiteles, čas in temperatura inkubacije, dodajanje raztopin za preprečevanje nespecifične vezave ter način priprave tkivnih rezin. Standardizacija in optimizacija naštetih spremenljivk nam omogočata konstantnost in ponovljivost rezultatov. V protokolu direktne in indirektne imunohistokemične analize s protitelesi proti CD204 smo v poskusih optimizacije postopka spremnjali več spremenljivk, kar je shematsko prikazano na slikah 4 in 5.



Redčenje primarnih Pt	Redčenje sekundarnih Pt
1:1000	1:500
1:500	1:500
1:500	1:1000
1:1000	1:1000
1:750	1:750
1:750	1:1000

Slika 4: Spremenljivke v protokolu indirektne imunohistokemične metode, ki smo jih spremnjali pri optimizaciji postopka



Slika 5: Spremenljivke v protokolu direktne imunohistokemične metode, ki smo jih spremenjali pri optimizaciji postopka

4.1.1 Priprava tkivnih rezin

Imunohistokemično analizo lahko izvedemo na zamrznjenih ali fiksiranih tkivnih rezinah. Glavna prednost zamrznjenih tkivnih rezin je ta, da se ohrani konformacija tarčnega antiga. Rezine, fiksirane s formaldehidom, so obstojnejše in v tkivu se ne tvorijo kristali ledu, vendar lahko pride do denaturacije epitopa proučevanega proteina (22). Pri našem delu smo uporabili zmrznjene histološke rezine. Fiksacija tkiv s paraformaldehidom ali z raztopino metanola in acetona v razmerju 50:50 lahko vpliva na vezavo protiteles na tkiva (22). Proces fiksacije tkiva lahko vodi do križnega vezanja proteinov, kar lahko zamaskira epitope in zmanjša vezavo antiga s protitelesom (23). Pri našem delu smo se fiksaciji s paraformaldehidom izognili z uporabo Superfrost R-stekelc, ki omogočijo vezavo tkiv na stekelca zaradi elektrostatskega naboja. Na ta način smo iz protokola odstranili dejavnik, ki bi lahko pomembno vplival na vezavo protiteles in imel neposreden vpliv na dobljene rezultate.

4.1.2 Izbira protiteles za imunohistokemično analizo

Eden najpomembnejših korakov pri načrtovanju imunohistokemične metode je izbira primernih protiteles. Glavni dejavniki, ki vplivajo na odločitev o izbiri protiteles, so ekspresijski nivo proučevanega proteina in sočasno določanje drugih proteinov (22). V našem primeru smo določali le lokalizacijo CD204, zato slednje ni vplivalo na našo odločitev. Na tržišču so na voljo monoklonska in poliklonska protitelesa. Z uporabo poliklonskih protiteles lahko dobimo močnejše signale, zato so primerna za vzorce tkiv, za katere predvidevamo, da je v njih malo iskanega proteina. Monoklonska protitelesa nam

dajejo bolj specifične signale kot poliklonska (22). Na odločitev o izbiri protiteles vpliva tudi kromofor, s katerim je protitelo označeno – izberemo ga glede na prisotnost ustreznih filtrov na uporabljenem mikroskopu. Pri našem delu smo uporabili poliklonska protitelesa, označena s fluororori Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 in Alexa Fluor 555.

Z izbiro protiteles določimo tudi način detekcije. Glede na način detekcije ločimo direktno in indirektno tehniko. Direktna imunohistokemična tehnika je tista, pri kateri so protitelesa, ki se vežejo na epitop v tkivu, sama po sebi označena (npr. s kromoforom). Ta način detekcije je primeren za označevanje visoko izraženih antigenov. Prednosti takšnega pristopa sta skrajšan čas analize (namesto dveh inkubacijskih časov imamo samo enega) in večja fleksibilnost pri sočasnem označevanju drugih antigenov. Pri indirektni tehniki označevanja sta udeležena dva tipa protiteles: primarno in sekundarno. Primarno se veže na epitop v tkivu, vendar ni označeno, zato moramo nanj vezati sekundarno protitelo, ki nam omogoči vizualizacijo. S tem postopkom lahko ojačimo signal, saj lahko eno primarno protitelo nase veže več sekundarnih. Indirektna imunohistokemija je zato primerna tudi za označevanje manj izraženih antigenov. Pomembno je, da je sekundarno protitelo usmerjeno proti protitelesom živalske vrste, v kateri je bilo dobljeno primarno protitelo (23). Pri razvoju imunohistokemične metode CD204 smo uporabili oba načina detekcije. Pri indirektni metodi smo uporabili primarna protitelesa proti CD204 – Anti-macrophage scavenger receptor I antibody in dve vrsti detekcijskih protiteles – Donkey anti-goat IgG H&L označeno z Alexa Fluor 594 (emisija v rdečem delu spektra) ter Donkey anti-goat IgG H+L označeno z Alexa Fluor 555 (emisija v oranžno-rdečem delu spektra). Primarno protitelo je bilo kozje protitelo proti humanemu CD204, sekundarni pa fluorescenčno označeni oslovski protitelesi proti kozjemu IgG. Direktno imunohistokemično analizo smo izvedli z zajčjim protitelesom proti humanemu CD204: Rabbit anti-MSR1 polyclonal antibody označeno z Alexa Fluor 488 (emisija v zelenem delu spektra). Pri obeh načinu detekcije smo morali postopek prilagoditi.

4.1.3 Optimizacija indirektne imunohistokemične metode

V poskusih optimizacije indirektne analize površinskega označevalca CD204 smo spreminali koncentracije primarnih in sekundarnih protiteles, režime spiranja tkivnih rezin po inkubaciji s protitelesi in temperaturo, pri kateri smo inkubacijo izvedli. Med poskusi smo preizkusili dve različni sekundarni protitelesi. Pomemben vidik vseh poskusov so bili slepi vzorci, s katerimi smo preverjali, ali prihaja do nespecifične vezave protiteles.

Osnovna težava, s katero smo se srečali pri optimizaciji indirektne imunohistokemične metode, je bila močna obarvanost ozadja. Močno ozadje je pri imunohistokemiji največkrat posledica:

- prevelike koncentracije primarnih protiteles,
- prevelike koncentracije sekundarnih protiteles,
- nespecifičnega vezanja sekundarnih protiteles,
- nezadostnega spiranja tkivnih rezin,
- inkubacije pri previsoki temperaturi,
- predolg čas inkubacije ali
- izsušitve tkivnih rezin (24).

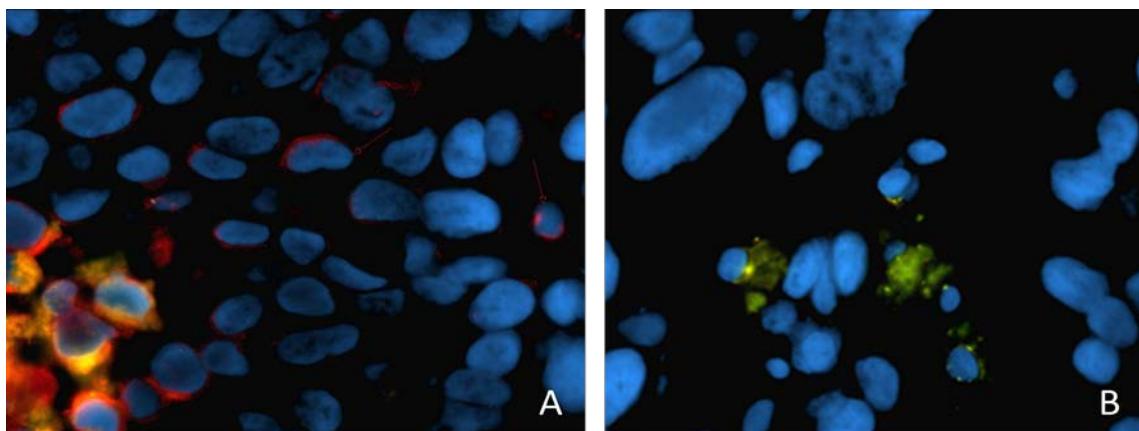
S spremembami v protokolu in pripravi reagentov smo preverili večino zgoraj naštetih možnih vzrokov. Kljub uvedenim spremembam nismo uspeli optimizirati metode, da bi bila primerna za sklopitev z analizo FISH in nadaljevanje proučevanja kolokalizacije celičnega označevalca CD204 in mRNA za LPL.

4.1.3.1 Redčenje protiteles za indirektno imunohistokemično analizo

Primerna koncentracija protiteles je za izvedbo imunohistokemične analize ključnega pomena. Pri prevelikem redčenju protiteles ne dobimo pozitivnih signalov, prevelika koncentracija pa privede do pojava nespecifičnega obarvanja zaradi zastajanja protiteles v vzorcu tkiv. Pri indirektni detekcijski metodi je treba prilagoditi redčenje primarnih in sekundarnih protiteles in ugotoviti optimalno kombinacijo za izvedbo analize. Koncentracijo oz. stopnjo redčenja protitelesa navadno okvirno določi proizvajalec. Kljub temu je treba prilagoditi koncentracijo protiteles, da je primerna za tkivo, na katerem izvajamo analizo, saj se vzorci razlikujejo glede na način priprave tkivnih rezin (zmrznjena, fiksirana) in vsebnosti iskanega proteina v tkivu (22). Priporočilo proizvajalca za redčenje sekundarnih protiteles, ki smo jih uporabili pri delu, je bilo od 1:200 do 1:1000. Za uporabo primarnih protiteles v indirektni imunohistokemični metodi proizvajalec ni podal predloga o redčenju. Primerno koncentracijo je treba eksperimentalno določiti in je odvisna od analitskega postopka. Za začetno redčenje primarnih protiteles smo izbrali 1:1000, sekundarna pa smo v skladu s priporočili proizvajalca redčili v razmerju 1:500. Dobili smo nekaj pozitivnih celic, ki so bolj fluorescirale od ozadja ob uporabi rdečega filtra (pojav avtofluorescence smo izključili), vendar so bila v preparatu

tudi področja z zelo močnim fluorescenčnim ozadjjem, kar je oteževalo določanje pozitivnih celic.

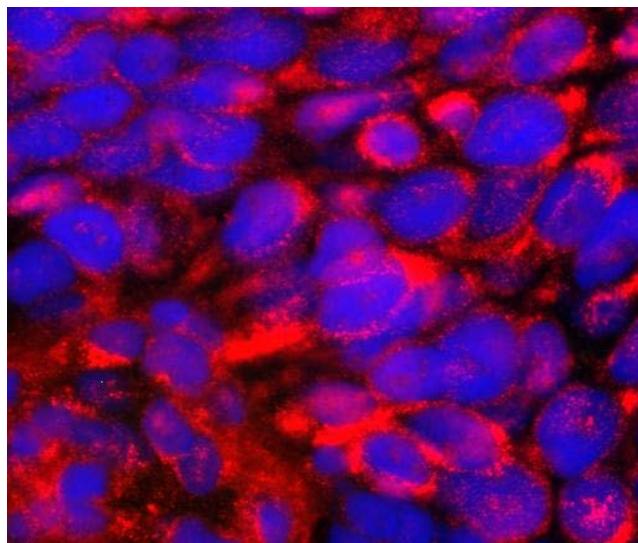
Slika 6-A prikazuje mikroskopsko sliko histološke rezine, ki smo jo obdelali s protitelesi proti CD204. Redčitev primarnih protiteles je bila 1:1000, sekundarnih pa 1:500. Z modro bravo so obarvana jedra. Vidi se, da se jedra med postopkom niso poškodovala. Rdeči signali predstavljajo lokacijo vezave sekundarnih oz. detekcijskih protiteles proti CD204. Slika 6-B prikazuje negativno kontrolo tega poskusa, kjer smo namesto protiteles nanesli samo pufer. Pričakovano na tej rezini nismo dobili rdečih signalov. Zeleni signali predstavljajo autofluorescenco tkiva. Autofluorescenco je prisotna tudi na sliki 6-A, kjer se zeleni signal autofluorescence delno prekriva s pozitivnimi rdečimi signali na celicah in otežuje določanje CD204+ celic.



Slika 6: Tkivo (T5b), na katerem so vidne CD204 pozitivne celice (A) in negativna kontrola (B)

Poskuse s kombinacijo redčitev primarnih protiteles v razmerju 1:1000 in sekundarnih protiteles 1:500 smo zaradi uspešno označenih posameznih celic ponovili, vendar so se težave z izrazitim ozadjem ponavljale. Poleg področij z autofluorescenco so bila prisotna tudi obsežna področja, kjer je ozadje svetilo izrazito rdeče, kot je prikazano na sliki 7. Zaradi močnega ozadja ni bilo mogoče oceniti, ali so na tkivni rezini prisotne pozitivne celice. Eden izmed možnih razlogov za pojav nespecifičnega ozadja je prevelika koncentracija protiteles. Ozadje lahko povzročijo premalo redčena sekundarna protitelesa, ki ostanejo v tkivu, ali premalo redčena primarna protitelesa, ki ostanejo v tkivu in se nato vežejo z detekcijskimi sekundarnimi protitelesi. Če je razlog nespecifičnega obarvanja prevelika koncentracija protiteles, se je temu možno izogniti z bolj razredčenimi

protitelesi. V nadaljevanju raziskovalnega dela smo preizkusili več možnih kombinacij redčitev primarnih in sekundarnih protiteles, da bi videli, ali je razlog nespecifične obarvanosti neprimerna koncentracija protiteles. Kombinacije redčitev, ki smo jih poskusili, in rezultati po mikroskopiranju so zbrani v preglednici II.



Slika 7: Tkivo (T7b) z izrazitim rdečim ozadjem – nespecifični signali

Preglednica II: Poskusi optimizacije redčitev primarnih in sekundarnih protiteles za indirektno imunohistokemijo ter rezultati po mikroskopiranju

Tkivo	Primarno protitelo	Sekundarno protitelo	Rezultati
T5b, T2a, T3a	1:1000	1:500	Posamezne pozitivne celice, rdeča fluorescenca ozadja
T4a	1:500	1:500	Intenzivno rdeče ozadje, pozitivnih celic zaradi ozadja ni mogoče določiti
T5b	1:500	1:1000	Intenzivno rdeče ozadje, pozitivnih celic zaradi ozadja ni mogoče določiti
T5b	1:1000	1:1000	Pozitivnih celic ni, ozadje ni obarvano
T3a	1:750	1:750	Intenzivno rdeče ozadje, pozitivnih celic zaradi ozadja ni mogoče določiti
T3a	1:750	1:1000	Manj izrazito rdeče ozadje, vendar kljub temu premočno, da bi lahko zanesljivo določali pozitivne celice

Redčitve primarnih protiteles, ki smo jih testirali, so bile 1:500, 1:750 in 1:1000. Največ ozadja je bilo pri tkivnih rezinah, kjer smo nanesli primarna protitelesa, redčena v razmerju 1:500. Pri vseh teh rezinah smo dobili močno rdeče obarvano ozadje ne glede na koncentracijo sekundarnih protiteles, ki smo jih uporabili za detekcijo. Ozadje je bilo intenzivno in je onemogočalo določevanje CD204 pozitivnih celic. Pri redčenju primarnih protiteles v razmerju 1:750 se je vpliv koncentracije sekundarnih protiteles bolj izrazil. V kombinaciji s sekundarnimi protitelesi, redčenimi v razmerju 1:1000, smo dobili manj intenzivno ozadje kot v kombinaciji s sekundarnimi protitelesi, redčenimi v razmerju 1:750. Kljub zmanjšani intenziteti ozadja je bilo tudi tu premočno za zanesljivo analizo. Popolno razbarvanje ozadja smo uspeli doseči le pri kombinaciji protiteles: primarna 1:1000 in sekundarna 1:1000, vendar na teh tkivnih rezinah nismo uspeli dobiti signalov pozitivnih celic.

Rezultati poskusov, pri katerih smo spremajali koncentracije protiteles, nakazujejo, da bi bilo lahko zastajanje primarnih protiteles v tkivu razlog za obarvanost ozadja. Popolno razbarvanje smo uspeli doseči samo pri koncentraciji primarnih protiteles 1:1000. Koncentracija sekundarnih protiteles ni občutneje vplivala na obarvanost ozadja, saj smo močna ozadja dobili tudi pri večjih redčitvah (1:1000) sekundarnih protiteles. Iz tega smo sklepali, da težava ni v zastajanju detekcijskih protiteles. Samo s spremembami v redčenju primarnih in sekundarnih protiteles nismo uspeli razrešiti problema nespecifičnega ozadja in hkrati ohraniti sposobnosti tehnike za označevanje pozitivnih celic.

4.1.3.2 Spiranje protiteles

V protokolu za imunohistokemično analizo lahko prilagajamo čas in število spiranja tkivnih rezin. Spiramo lahko tako, da stekelce s tkivno rezino za določen čas namočimo v raztopino za spiranje. V našem primeru je bil to pufer PBS, pH 7,4. Lahko pa kadičko z raztopino za spiranje v času spiranja rahlo stresamo, kar pospešuje izpiranje nevezanih protiteles iz tkiva. Glavni namen spiranja je prav zagotovitev odstranitve nevezanih protiteles, obenem pa spiranje ne sme biti preveč agresivno, da iz vzorca ne odstranimo specifično vezanih protiteles. Optimalen način spiranja smo zato določili eksperimentalno. Načini spiranja, ki smo jih preskusili v indirektni imunohistokemični metodi CD204, so zbrani v preglednici III.

Preglednica III: Načini spiranja tkivnih rezin pri imunohistokemični metodi CD204, ki smo jih preizkusili

<i>Spiranje po inkubaciji s primarnimi Pt</i>	<i>Spiranje po inkubaciji s sekundarnimi Pt</i>
3 min v PBS	3 min v PBS
3 min v PBS	2× 3 min v PBS
2× 3 min v PBS	2× 3 min v PBS
3 min v PBS s stresanjem kadičke	3 min v PBS s stresanjem kadičke

Dodatne korake spiranja smo uvajali zaradi rdečega obarvanja ozadja, ki bi lahko bilo posledica zaostajanja protiteles v tkivni rezini. Po inkubaciji s sekundarnimi protitelesi smo steklca s tkivi dvakrat potopili v svež PBS za 3 minute. Ker to ni zmanjšalo intenzivnosti obarvanega ozadja, smo dodaten korak spiranja uvedli tudi po inkubaciji s primarnimi protitelesi in se močnemu ozadju poskušali izogniti s stresanjem kadičke tekom spiranja. Navedene spremembe v načinih spiranja na rezultate niso vplivale. Težave z močnim ozadjem kljub agresivnejšemu spiranju nismo uspeli razrešiti.

4.1.3.3 Zamenjava sekundarnega protitelesa

Da bi preverili, ali prihaja do močnega ozadja zaradi zastajanja primarnih ali nespecifične vezave sekundarnih protiteles, smo izvedli poskus, pri katerem smo zamenjali sekundarno protitelo, primarnega pa ohranili enakega. Primarno protitelo smo redčili s pufrom v razmerju 1:1000. Testirali smo dve koncentraciji novega sekundarnega protitelesa: 5 µg/mL in 10 µg/mL. Koncentracija 10 µg/mL je bila previsoka, dobili smo nespecifično vezavo protiteles. Pri koncentraciji 5 µg/mL so bili rezultati primerljivi z rezultati, ki smo jih dobili z začetnim detekcijskim protitelesom redčenim v razmerju 1:500. Na določenih področji tkiva smo dobili pozitivne celice, vendar je bilo tudi veliko ozadja, ki je onemogočilo zanesljivo določanje pozitivnih signalov. Zaradi podobnosti rezultatov med imunohistokemičnima metodama izvedenima z različnimi detekcijskimi protitelesi, smo sklepali, da težava ni na nivoju sekundarnih protiteles.

4.1.3.4 Temperatura inkubacije

Temperatura vpliva na hitrost poteka imunokemijskih reakcij. Reakcije sledijo Van't Hoffovemu pravilu termodinamike. Pri višjih temperaturah poteče vezava protiteles na epitop hitreje, zato je lahko čas inkubacije s protitelesi kraši. Pri tem temperature ne

smemo povišati preveč, saj se pri visokih temperaturah poruši terciarna in kvartatna struktura proteinov. Inkubacijo s protitelesi smo izvajali pri 37 °C, saj se je v predhodnih raziskavah ta temperatura pokazala kot primerna. Predhodnje raziskave so bile izvedene s protitelesi proti celičnemu označevalcu CD14 in so preizkušale razliko med inkubacijo pri sobni temperaturi in inkubacijo pri 37 °C. Pri obeh temperaturah inkubacije so dobili pozitivno obarvanje, vendar so bili signali lepši pri inkubaciji v vlažni komori pri 37 °C (21). Hoteli smo preizkusiti ali lahko z zmanjšanjem temperature inkubacije na sobno temperaturo zmanjšamo nespecifično ozadje, kar je predstavljalo največji problem optimizacije naše indirektne imunohistokemične metode za CD204. Vzporedno smo izvedli poskusa, kjer smo inkubirali pri 37 °C in pri sobni temperaturi (23 °C) z redčenjem primarnih in sekundarnih protiteles 1:1000. Na obeh tkivnih rezinah smo dobili enake rezultate. Pozitivnih celic nismo uspeli označiti, neobarvano je bilo tudi ozadje. S tem poskusom smo uspeli pokazati, da pod našimi pogoji izvedbe metode temperatura ni vplivala na intenziteto obarvanosti ozadja. Za zanesljivejšo oceno vpliva temperature na uspešnost specifične vezave protiteles, bi bili potrebni dodatni poskusi, na večjem številu tkivnih rezin. V prihodnje bi lahko preizkusili tudi nižje temperature inkubacije. V nekaterih literaturnih virih smo zasledili inkubacijo s protitelesi pri 4 °C čez noč, kar naj bi zmanjšalo nespecifično vezanje sekundarnih protiteles (24). S spremembami temperature inkubacije in inkubacijskega časa, bi morda lahko zmanjšali pojavnost nespecifičnega ozadja. Za določitev optimalne kombinacije inkubacijske temperature in časa je potrebno nadaljnje raziskovalno delo.

4.1.3.5 Preprečevanje izsušitve tkivnih rezin

Ozadje se lahko v imunohistokemičnih analizah pojavi tudi kot posledica izsušitve tkivnih rezin. Po rehidraciji rezin je izrednega pomena, da ne pride do izsušitve tkivnih rezin na stekelcu, saj to onemogoča uspešno detekcijo pozitivnih celic. Področja, ki se med analizo izsušijo, močno nespecifično flourescirajo, kar moti določitev prisotnosti iskanega proteina na tem področju. Najbolj tvegan korak v protokolu imunohistokemične analize za izsušitev rezine je inkubacija tkiva s protitelesi, saj je tkivo takrat za daljši čas (70 minut) izpostavljenovi površini temperaturi 37 °C. Izsušitev tkivnih rezin smo poskušali preprečiti na več načinov. V času inkubacije protiteles smo imeli stekelca s tkivnimi rezinami položena v vlažni komori, kar je preprečevalo hitro izhlapevanje kapljice reagenta s protitelesi na tkivni rezini. Področje tkivne rezine na stekelcu smo občrtali z diamantnim

pisalom. Nastala zareza je omejevala kapljice nanesenih reagentov na želeni površini. Preprečevanje razlitja reagentov po večji površini od želene je preprečevala površinska napetost tekočin. Dodatno smo izsušitev tkivnih rezin preprečevali s pokrivanjem rezin s Parafilmom v času inkubacije. Pri dosedanjih poskusih s CD14 in CD163 so navedeni ukrepi zadostovali pa preprečitev izsušitve (21, 25).

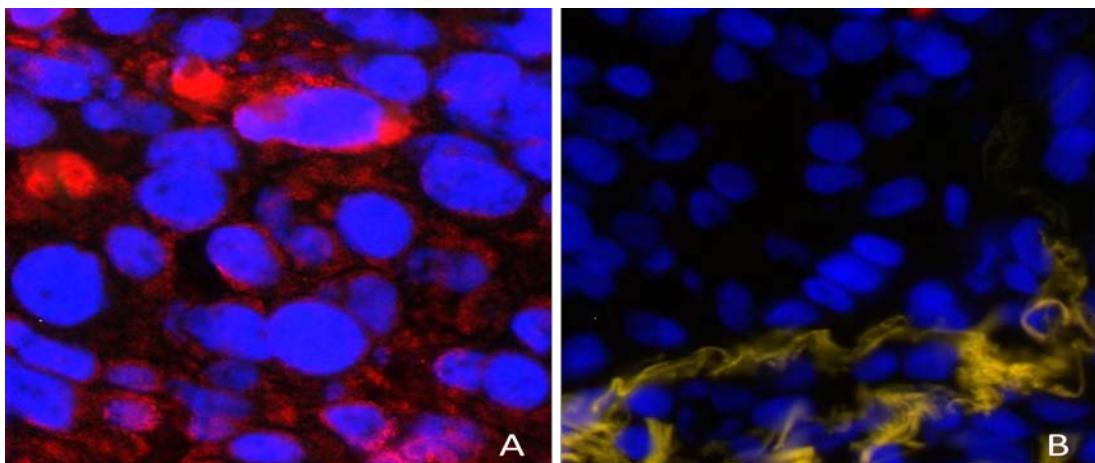
4.1.3.6 Negativne kontrole pri indirektni imunohistokemični metodi

Za zanesljivost rezultatov pridobljenih z imunohistokemično metodo je potrebno zagotoviti negativne kontrolne vzorce, s katerimi dokažemo, da so signali specifični. Protitelesa se lahko v kompleksnem okolju, kakršno je tkivo, nespecifično vežejo na tkivne komponente, ki niso predmet našega preučevanja (26). Pri našem delu smo izvedli tri tipe negativnih kontrol:

- negativna kontrola brez primarnih in sekundarnih protiteles
- negativna kontrola brez sekundarnega protitelesa
- negativna kontrola brez primarnega protitelesa oz. kontrola sekundarnega protitelesa

Z negativno kontrolo brez protiteles in negativno kontrolo brez sekundarnega protitelesa smo preverjali, kakšno je tkivo po izvedbi imunohistokemične analize. Pri obeh kontrolah so bili edini vidni signali z DAPI obarvana jedra in autofluorescensa tkiva. Ti kontroli smo izvedli samo na začetku eksperimentalnega dela, saj ni bilo potrebe po vzporednem izvajanju teh poskusov ob vsaki izvedbi analize.

S kontrolami sekundarnega protitelesa dokažemo, da so signali posledica vezanja sekundarnih protiteles na primarno protitelo in ne na kakšno drugo komponento v tkivu. Negativno kontrolo sekundarnega protitelesa smo izvedli tako, da na tkivno rezino nismo nanesli primarnih protiteles. Ker se vzorci tkiv med seboj razlikujejo, smo morali negativno kontrolo sekundarnih protiteles izvesti vzporedno ob vsaki analizi. Težavi, ki jih lahko zaznamo s tovrstno negativno kontrolo sta nespecifična vezava sekundarnih protiteles in vezanje sekundarnih protiteles na Fc receptorje (26). Rdeče ozadje, kakršno je bilo prisotno na naših vzorcih, se je pojavljalo tudi na vzorcih kontrol sekundarnega protitelesa. S tem smo dokazali, da ozadje ne nastaja kot posledica zastajanja primarnih protiteles v tkivu, kot bi bilo mogoče sklepati samo iz poskusov redčenja protiteles. Na sliki 8-B je negativna kontrola, kjer rdečega ozadja ni, na sliki 8-A pa negativna kontrola, kjer je ozadje prisotno.



Slika 8: Kontrola sekundarnega protitelesa tumorskega tkiva T7b z močno pozitivnim ozadjem (A) in kontrola sekundarnega protitelesa tkiva T7b s pričakovano negativnim ozadjem (B).

Do nespecifične vezave protiteles lahko pri fiksiranih tkivnih rezinah pride zaradi pozitivnega naboja na celicah, ki veže negativno nabite proteine, kot so protitelesa. Pozitiven nabolj na celicah je najpogosteje posledica aldehidov, ki se uporabijo pri fiksaciji, ali endogenih tkivnih komponent, kot so histoni (26). V literaturi v primeru problema nespecifične vezave protiteles priporočajo uporabo raztopin, ki delujejo tako, da se vežejo na nespecifična vezalna mesta v tkivu in preprečijo vezavo primarnih ali sekundarnih protiteles na nespecifične tkivne komponente. Najpogosteje se v te namene uporablja 3% raztopina BSA, lahko pa bi se uporabil tudi serumski albumini drugih vrst (22). Fc receptorje, ki lahko vežejo protitelesa, najdemo na celicah imunskega sistema, kot so makrofagi in NK celice. To vezavo lahko preprečimo z dodajanjem seruma živalske vrste, iz katere izhaja sekundarno protitelo (26).

Rdeče ozadje na negativnih kontrolah je bilo prisotno pri uporabi obeh detekcijskih protiteles. Zaradi tega je manj verjetno, da je nespecifična vezava sekundarnih protiteles razlog za fluorescenco ozadja. Da nespecifična vezava sekundarnih protiteles najverjetneje ni vzrok ozadja, smo zaključili tudi iz poskusov redčenja protiteles. V protokol metode zato nismo uvajali tretiranja tkiv s serumskim albuminom. Z negativnimi kontrolami smo kot možen razlog za ozadje izključili nespecifično vezavo primarnih protiteles. Ozadje je tako najverjetneje nastalo zaradi neustreznosti parametrov v protokolu imunohistokemične analize. Da bi preverili, ali se lahko s spremembami inkubacijskega časa, inkubacijske

temperature ali dodatnih ukrepov za preprečevanje izsušitve rezin, motečemu ozadju izognemo ali zmanjšamo njegovo intenziteto, so potrebni dodatni poskusi.

Na podlagi vsega lahko zaključimo, da moteče ozadje ni bilo posledica preveč koncentriranih raztopin protiteles, nezadostnega spiranja tkivnih rezin ali nespecifične vezave protiteles. Kljub uvedenim spremembam v protokolu, problema nespecifične fluorescence ozadja nismo uspeli razrešiti. Metode indirektne imunohistokemične analize za antigen CD204 nam ni uspelo razviti za nadaljevanje njegove sklopitev z analizo FISH.

4.1.4 Optimizacija direktno imunohistokemične metode

Pri protitelesih za direktno imunohistokemijo smo določali primerno koncentracijo protiteles in preiskusili več možnih redčitev. Eno izmed ključnih težav pri direktni metodi nam je predstavljala autofluorescensa tkiva, ki smo jo poskušali utišati z reagentom Chicago Sky Blue (CBS). Vzporedno z vsakim eksperimentom smo izvedli negativno kontrolo. Na tkivno rezino za negativno kontrolo smo namesto protiteles nanesli pufer PBS. Negativni vzorci so bili pri vseh poskusih negativni.

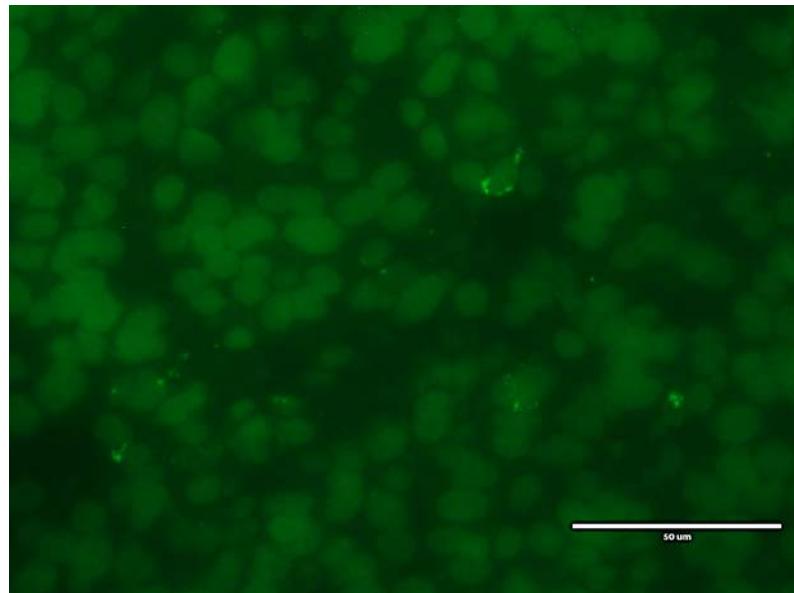
4.1.4.1 Redčenje protiteles pri direktni imunohistokemični metodi

V preglednici IV so zbrane redčitve protiteles za direktno imunohistokemično analizo, ki smo jih preiskusili in rezultati mikroskopiranja. Raztopine protiteles redčitev 1:100, 1:200 in 1:500 so bile preveč koncentrirane, zato označevanje s temi raztopinami ni bilo uspešno. Dobili smo nespecifične signale. Najprimernejša je bila redčitev 1:1000, pri kateri smo dobili nekatere pozitivne celice, vendar je težavo predstavljala autofluorescensa tkiva, predvsem v bližini žil.

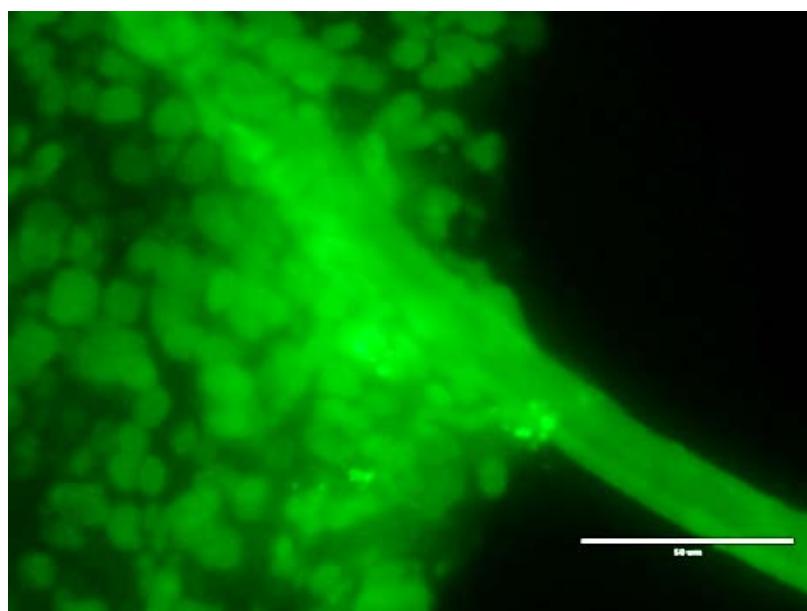
Preglednica IV: Optimizacija redčenja protiteles za direktno imunohistokemijo in rezultati mikroskopiranja

Redčitev protitelesa s PBT	Rezultat mikroskopiranja (tkivo T4a)
1:100	Nespecifično intenzivno zeleno ozadje
1:200	Nespecifično intenzivno zeleno ozadje
1:500	Nespecifično intenzivno zeleno ozadje
1:1000	Posamezne pozitivne celice, zaradi autofluorescence zanesljivo določanje ni mogoče

Avtofluorescencija ima širok emisijski spekter in daje intenzivne signale na področju zelenega filtra, kjer so signali našega protitelesa. Na slikah 9 in 10 vidimo preparat, na katerem smo izvedli direktno imunohistokemično metodo z redčitvijo protitelesa 1:1000. Na sliki 9 je tkivo v področju, kjer je bila avtofluorescencija manj intenzivna in lahko vidimo posamezne signale, ki bi lahko bili CD204 pozitivne celice. Na sliki 10 pa je področje z veliko avtofluorescenco, kjer je določanje pozitivnih celic onemogočeno.



Slika 9 : Tkivo T4a, na katerem je bila izvedena direktna IHC-metoda – področje z manj avtofluorescence



Slika 10: Tkivo T4a, na katerem je bila izvedena direktna IHC-analiza – področje z več avtofluorescence

Kot primerno redčitev protiteles za direktno metodo smo določili razmerje 1:1000, saj so bila protitelesa dovolj razredčena, da nismo dobili nespecifičnih signalov, in dovolj koncentrirana, da smo dobili pozitivne signale na celicah. Za uspešnost direktne imunohistokemične metode pa je bilo treba nasloviti problem avtofluorescence tkiva.

4.1.4.2 Zmanjševanje avtofluorescence tkiva

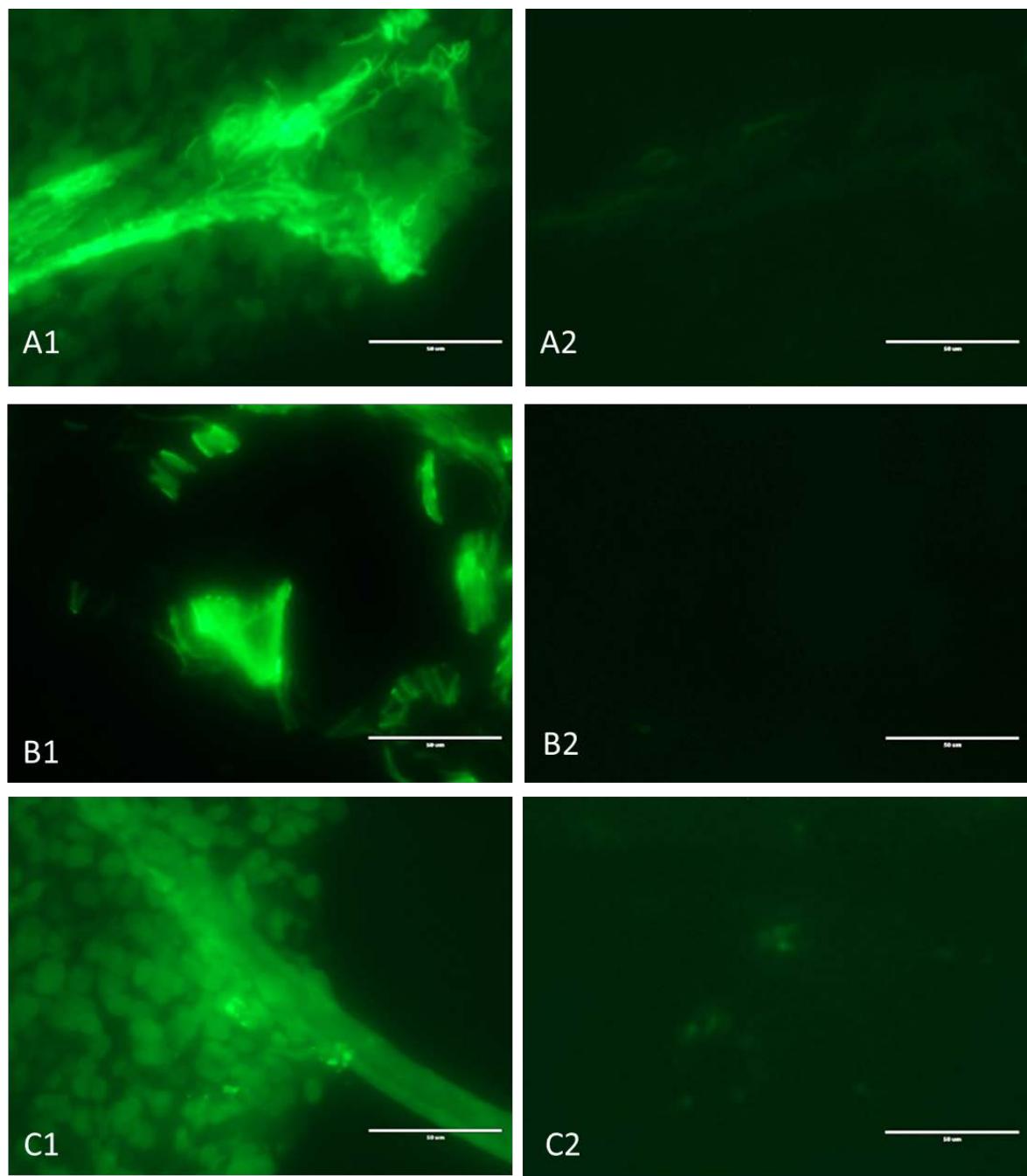
Poglavitna težava pri direktni imunohistokemiji je bila prisotnost močne avtofluorescence tkiva, vidna pod zelenim filtrom mikroskopa, ki je onemogočala zanesljivo določanje signalov. Avtofluoresanca je emisija svetlobe, ki se pojavlja zaradi struktur, naravno prisotnih v tkivu, ali sprememb v tkivu, do katerih pride v procesu priprave tkivnih rezin pred analizo, npr. pri fiksaciji v formalinu ali pri obdelavi s serumom (27). Preprečuje nam jasno vizualizacijo specifičnih izbranih signalov, zato se ji skušamo, kjer se le da, izogniti. Kjer to ni mogoče, jo skušamo utišati z uporabo filtrov na mikroskopu. Ločevanje želene fluorescence od avtofluorescence je lahko težavno, saj je emisijski spekter avtofluorescence veliko širši v primerjavi s spektrom kromoforov, s katerimi so označena protitelesa za imunohistokemično analizo. Dodatna možnost za reševanje težav z avtofluoresenco je kemijska modifikacija motečih struktur, vendar lahko reagenti za utišanje avtofluorescence utišajo ali ošibijo tudi fluorescenco testnega signala (28). Najpogosteje uporabljeni reagenti za zmanjševanje avtofluorescence so eriokrom črno T, Sudan črno B, natrijev borohidrid, tripansko modrilo, Chicago Sky Blue in amonijev klorid (27).

Najpogostejši vzroki avtofluorescence so endogeni elementi tkiva, kot so kolagen, lipofuscin, elastin, flavinoidi, NADPH in porfirini (28, 27). Flavini in porfirini se navadno ekstrahirajo s topili in ne predstavljajo večjega problema v fiksiranih dehidriranih preparatih. Lahko pa motijo vizualizacijo v zamrznjenih tkivnih rezinah, ki so med protokolom izpostavljeni različnim vodnim raztopinam. Elastin in kolagen sta pogosti komponenti zunajceličnega matriksa, ki močno fluorescirata. Oba imata širok spekter ekskcitacijskih valovnih dolžin. Elastin vsebuje številne fluorofore, med katerimi se nekateri križno vežejo s trikarboksilno aminokislino s piridinskim obročem. Podoben fluorofor najdemo tudi v kolagenu. Prisotnost elastina in kolagena v tkivu je navadno posledica prisotnosti žilja. Arterije vsebujejo notranjo lamino iz elastina, ki se nahaja med endotelijem in notranjo plastjo gladkih mišičnih celic. Tudi v večjih venah se nahaja elastin

v zunanji lamini, vendar je ta plast v primerjavi z elastičnimi plastmi arterij mnogo tanjša (28).

Protitelo, ki smo ga uporabili pri direktni imunohistokemični metodi, je označeno s fluoroforom, ki emitira svetlobo v zelenem delu spektra, kjer je bilo tudi močno ozadje zaradi avtofluorescence. Najmočnejša avtofluorescenco se je v naših vzorcih pojavljala v bližini žil, zato smo se osredotočili predvsem na utišanje avtofluorescence kolagena in elastina. Za zmanjševanje avtofluorescence s temo komponentama smo v literaturi zasledili tehniko utišanja z reagentom Chicago Sky Blue (CSB) (28). Kot je bilo priporočeno v literaturi, smo uporabili 0,5% raztopino CSB. CSB deluje tako, da premakne emisijsko zeleno avtofluorescenco v rdeči del spektra. Poročali so o uspešnem zmanjševanju avtofluorescence v zelenem spektru na modelu pljučnega tkiva in žilja. CBS fluorescira rdeče in deluje na principu energijskega prenosa, kar omejuje njegovo uporabo (24). Rezultati utišanja zelene avtofluorescence z reagentom CBS so prikazani na sliki 11.

Iz slike 11 je razvidno, da je CBS učinkovito zmanjšal avtofluorescenco v zelenem delu spektra, kot smo pričakovali. Kljub zmanjšanju avtofluorescence pa uporaba CSB pri našem delu ni predstavljala končne rešitve optimizacije direktne imunohistokemične analize površinskega označevalca CD204. CBS je imel vpliv na vizualizacijo tudi pod drugimi filteri. Interagiral je z DAPI-kanalom in onemogočal jasno vizualizacijo celičnih jeder. Vpliv reagenta CBS na zmanjšanje vidnosti struktur, označenih z DAPI, smo našli tudi v literturnih virih (27). Zaradi fluoresciranja CBS v rdečem delu spektra na rezinah, ki smo jih tretirali s CSB, ne bi mogli nadaljevati z analizo FISH z oligonukleotidi, označenimi z rodaminom. Edina možnost primerjave lokacije antiga CD204 in mRNA za LPL bi bila na zaporednih rezinah. Primerjava rezultatov imunohistokemične analize in analize FISH na zaporednih tkivnih rezinah je težavna, saj se tekom izvedbe tehnike FISH struktura tkiva tako spremeni, da je težko poiskati ista področja tkiva na zaporednih rezinah, podvrženih temu dvema postopkoma. Prepoznavanje istih celic na zaporednih rezinah bi bilo še bolj oteženo, če bi se zaradi uporabe reagenta CSB vidnost celičnih jeder zmanjšala.



Slika 11: Tkive rezine T4a nedrobnoceličnega pljučnega raka pred (levo z oznako 1) in po barvanju z reagentom CBS (desno z oznako 2)

Direktnega imunohistokemičnega označevanja s protitelesi proti CD204 nismo uspeli razviti do te mere, da bi bilo mogoče nadaljevanje sklopitve metode s FISH-metodo in preverjanje zastavljenje hipoteze. Makrofagi, ki jih označujemo s CD204, se pogosto nahajajo v bližini žilja, kjer je zelena avtofluorescencija močna. Z reagentom CBS smo sicer uspešno zmanjšali avtofluorescenco, vendar zaradi svojega načina delovanja ni bil

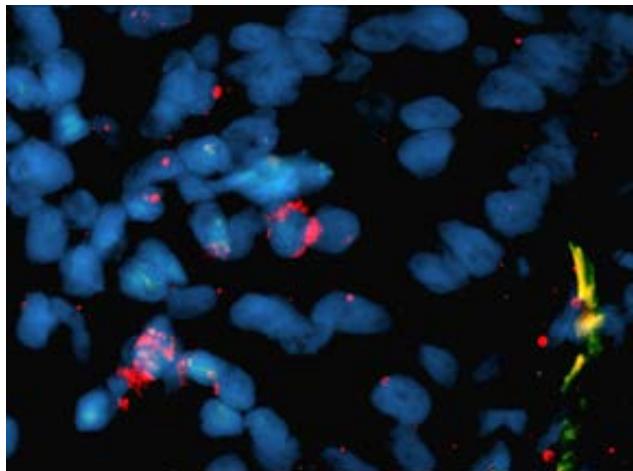
kompatibilen z DAPI in z rodaminom označenimi nukleotidi, ki jih uporabljam v postopku FISH. Z redčitvijo protiteles 1:1000 bi morda lahko označili površinski antigen CD204 na tkivnih rezinah z izrazito malo avtofluorescence ali celičnih kulturah makrofagov. Tumorsko tkivo nedrobnoceličnega pljučnega raka pa je heterogeno in vsebuje veliko žil, zaradi česar se je avtofluorescenci težko izogniti.

4.2 OPTIMIZACIJA POSTOPKA FISH

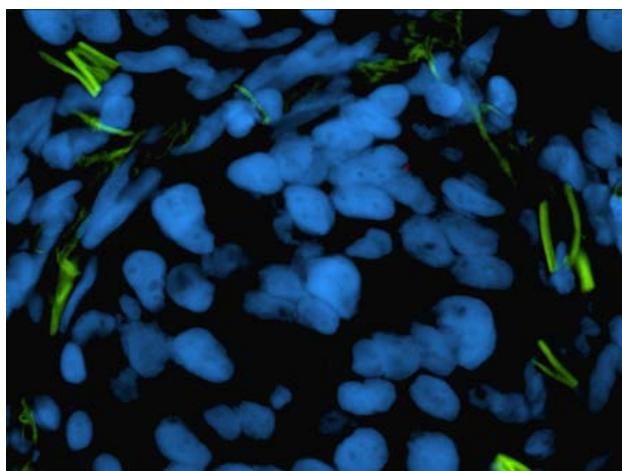
Protokol, ki smo ga uporabili kot izhodišče za izvedbo analize FISH, je utečen postopek, kakršnega uporablajo v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo v UKC Ljubljana (21). Bistvenih sprememb v protokol nismo uvajali, saj so vsi koraki izrednega pomena za uspešno izvedeno analizo FISH.

V nekaterih raziskavah navajajo, da ima paraformaldehid, ki se uporablja pri fiksaciji tkivnih rezin, vpliv na intaktnost nukleinskih kislin (mRNA) (21). Namesto fiksacije s paraformaldehidom smo pri pripravi preparatov uporabili Superfrost stekelca. Ta način priprave tkivnih rezin je zaradi eliminacije koraka, ki vpliva na obstojnost mRNA, najverjetneje bolj primeren za pripravo tkiv, ki so namenjena analizi FISH. Pri izvedbi analize FISH smo bili pozorni na primerno temperaturo reagenta NP-40. Nevezane sonde se ne sperejo dovolj dobro, če temperatura reagenta ne doseže 73 °C. Pri nižji temperaturi ne pride do razgradnje membran in sonde zastanejo v citoplazmi, kar daje lažno pozitivne signale. Tej napaki smo se izogibali z merjenjem temperature reagenta NP-40. Pazili smo tudi, da smo anhidrid acetne kisline dodali raztopini TAE tik pred uporabo. Anhidrid acetne kisline ima kratko razpolovno dobo, zato lahko le z uporabo sveže pripravljene raztopine za acetiliranje uspešno izvedemo acetilacijo.

S postopkom FISH smo lokacijo mRNA LPL uspešno označili, kot je prikazano na slikah 12 in 13. Z DAPI obarvana jedra so na slikah vidna v modri barvi. Razvidno je, da so med analitskim postopkom ostala intaktna. Rdeči signali so z rodaminom označeni komplementarni oligonukleotidi mRNA LPL. Na sliki 13 je negativna kontrola, na katero smo nanesli oligonukleotide brez repa. Kontrola je bila negativna, zeleni signali, ki so vidni na njej, so posledica avtofluorescence.



Slika 12: Tkivo T5a, na katerem je bila izvedena FISH-analiza



Slika 13: Negativna kontrola analize FISH na tkivu T5a – sonda brez repa

Ugotovili smo, da se celice, ki visoko izražajo gen za LPL, nahajajo v bližini žil. Številčno jih je bilo v primerjavi s CD163 pozitivnimi celicami približno 10-krat manj. CD163 je površinski označevalec, značilen za makrofage. Celice, ki so bile CD163 pozitivne, so se pojavljale po vsem tkivu, medtem ko so bile celice, ki izražajo *LPL*, zgoščene samo na določenih področjih (25). Iz tega je razvidno, da LPL izražajo morda le nekateri makrofagi. Kolokalizacije mRNA LPL in površinskega celičnega antigena CD204 nismo uspeli preveriti zaradi težav z optimizacijo imunohistokemične metode za določanje antiga CD204.

5 SKLEP

- Glavno težavo pri optimizaciji indirektne imunohistokemične metode za antigen CD204 je predstavljala nespecifična fluorescensa ozadja. Kot možne vzroke za nastanek motečega ozadja smo izključili nezadostno redčenje protiteles, nezadostno spiranje tkivnih rezin po inkubaciji s protitelesi in nespecifično vezavo primarnih ter sekundarnih protiteles.
- Potrebni so dodatni poskusi za ugotavljanje učinka sprememb temperature in časa inkubacije na intenzivnost nespecifičnega obarvanja ozadja.
- Za direktno imunohistokemično metodo smo določili primerno koncentracijo protiteles. Metoda ni primerna za označevanje CD204 pozitivnih celic na histoloških rezinah, ki imajo veliko avtofluorescence. Še posebej je moteča avtofluorescensa elastina in kolagena v področju žilja. Z metodo bi najverjetneje lahko označili celice z antigenom CD204 v celičnih kulturah makrofagov ali na histoloških preparatih z malo avtofluorescence.
- Z reagentom CSB smo avtofluoresenco tkiva uspešno utišali. Uporaba tega reagenta ni primerna za sklop imunohistokemične metode z analizo FISH, saj ima CBS učinek na vizualizacijo celičnih jader, obarvanih z DAPI, in onemogoča detekcijo mRNA s komplementarnimi nukleotidi, označenimi z rodaminom.
- S postopkom FISH smo uspešno označili mesta v tkivu, kjer se *LPL* visoko izraža. Večina celic, ki izražajo gen za LPL, se nahaja v bližini žil.
- Kolokalizacije mRNA LPL in površinskega celičnega antiga CD204 nismo uspeli preveriti zaradi neuspele optimizacije imunohistokemične metode celičnega označevalca CD204.

LITERATURA IN VIRI

- (1) Través P.G, Luque A, Hortelano S, Macrophages, inflammation, and tumor suppressors: ARF, a new player in the game. *Mediators Inflamm* 2012; 11: 1-11.
- (2) Ramanathan S, Jagannathan N, Tumor associated macrophage: a review on the phenotypes, traits and functions. *Iran J Cancer Prev* 2014; 7(1): 1-8.
- (3) Ruffell B, Affara NI, Coussens LM, Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* 2012; 33(3): 119-26.
- (4) Sakayama K, Masuno H, Miyazaki T, Okumura H, Shibata T, Okuda H, Existence of lipoprotein lipase in human sarcomas and carcinomas. *Jpn J Cancer Res.* 1994; 85(5): 515-21.
- (5) 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.
- (6) Podgornik H, Sok M, Kern I, Marc J, Černe D, Lipoprotein lipase in non-small cell lung cancer tissue is highly expressed in a subpopulation of tumor-associated macrophages. *Pathol Res Pract.* 2013; 209(8): 516-20.
- (7) Sica A, Mantovani A, Macrophage plasticity and polarization: *in vivo veritas*. *J Clin Invest.* 2012, 787-95.
- (8) Tugal D, Liao X, Jain MK, Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013, 1135-44.
- (9) 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; 122(3): 300-5.
- (10) Galván-Peña S, O'Neill LA, Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Frontiers in Immunology* 2014; 5: 1-6.
- (11) Martinez FO, Gordon S, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Reports* 2014; 6: 1-13.
- (12) Cornelissen R, Lievense LA, Maat AP, Hendriks RW, Hoogsteen HC, Bogers AJ, Hegmans JP, Aerts JG, Ratio of intratumoral macrophage phenotypes is a prognostic factor in epithelioid malignant pleural mesothelioma. *PLoS One* 2014; 9(9): 1-9.
- (13) Ohtaki Y, Ishii G, Nagai K, Ashimine S, Kuwata T, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Takeyoshi I, Ochiai A, Stromal macrophage expressing CD204 is

- associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2010; 5(10): 1507-15.
- (14) Saito Y, Komohara Y, Niino D, Horlad H, Ohnishi K, Takeya H, Kawaguchi H, Shimizu H, Ohshima K, Takeya M, Role of CD204-positive tumor-associated macrophages in adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Clin Exp Hematop.* 2014; 54(1): 59-65.
- (15) Wang XY, Facciponte J, Chen X, Subjeck JR, Repasky EA, Scavenger receptor-A negatively regulates antitumor immunity. *Cancer Res.* 2007; 5(10): 4996-5002.
- (16) Platt N, Gordon S, Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale. *J Clin Invest.* 2001; 108(5): 649-54.
- (17) Yu X, Wang XY, Antagonizing the innate pattern recognition receptor CD204 to improve dendritic cell-targeted cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2012; 1(5): 770-772.
- (18) Komohara Y, Takemura K, Lei XF, Sakashita N, Harada M, Suzuki H, Kodama T, Takeya M, Delayed growth of EL4 lymphoma in SR-A-deficient mice is due to upregulation of nitric oxide and interferon-gamma production by tumor-associated macrophages. *Cancer Sci.* 2009; 100(11): 2160-6.
- (19) Kirita K, Ishii G, Matsuwaki R, Matsumura Y, Umemura S, Matsumoto S, Yoh K, Niho S, Goto K, Ohmatsu H, Ohe Y, Nagai K, Ochiai A, Identification of biological properties of intralymphatic tumor related to the development of lymph node metastasis in lung adenocarcinoma. *PLoS One.* 2013; 8(12): 1-9.
- (20) 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; 67(10): 4783-9.
- (21) Malavašič T. Sinteza mRNA LPL v makrofagih nedrobnoceličnega pljučnega rakavega tkiva. Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2011.
- (22) A beginners guide to immunohistochemistry. <http://blog.ptglab.com/index.php/a-beginners-guide-to-immunohistochemistry-guest-post/>, dostopano 4. 7. 2015.
- (23) Hudson J. Antibody Optimization for Immunohistochemistry:
http://www.dako.com/28825_2007_conn10_antibody_optimization_immunohistoc hemistry_hudson.pdf, dostopano 4. 7. 2015.

- (24) Immunohistochemistry (ICH) guide and troubleshooting, Mdbiosciences:
http://www.mdbioproducts.com/sites/default/files/IHC%20Guide_2010.pdf,
dostopano 3. 10. 2015.
- (25) Po osebnem razgovoru s Tomažem Lokarjem.
- (26) Burry RW, Controls for immunocytochemistry: an update. *J Histochem Cytochem*. 2011; 59(1): 6-12
- (27) Davis AS, Richter A, Becker S, Moyer JE, Sandouk A, Skinner J, Taubenberger JK, Characterizing and Diminishing Autofluorescence in Formalin-fixed Paraffin-embedded Human Respiratory Tissue. *J Histochem Cytochem*. 2014; 62(6): 405-423 .
- (28) Autofluorescence: causes and cures
<http://www.uhnres.utoronto.ca/facilities/wcif/PDF/Autofluorescence.pdf>,
dostopano 12. 8. 2015.