

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Barbara JERIČ

**VSEBNOST CISTEINSKIH PROTEAZ KOT
POKAZATELJ INVAZIVNOSTI V HUMANIH
MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELICAH V
PRIMERJAVI Z GLIOBLASTOMSKIMI CELIČNIMI
LINIJAMI U87-MG, U373 IN U251**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Barbara JERIČ

**VSEBNOST CISTEINSKIH PROTEAZ KOT POKAZATELJ
INVAZIVNOSTI V HUMANIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH
CELICAH V PRIMERJAVI Z GLIOBLASTOMSKIMI CELIČNIMI
LINIJAMI U87-MG, U373 IN U251**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANALYSIS OF CYSTEIN PROTEASES CONTENT AS AN
INDICATOR OF INVASION IN HUMAN MESENCHYMAL STEM
CELLS COMPARED WITH GLIOBLASTOMA CELL LINES U87-
MG, U373 AND U251**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalno delo je bilo opravljeno v laboratorijih oddelka za gensko toksikologijo in biologijo raka, na Nacionalnem inštitut za biologijo v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 16.06.2010 za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miomirja Kneževića, za somentorja asist. dr. Heleno Motaln in za recenzenta prof. dr. Tamaro Lah Turnšek.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK, univ.dipl.inž.živil.tehnol.
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIĆ, univ. dipl. biol.
Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Član: asist. dr. Helena MOTALN, univ. dipl. biol.
Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

Član: prof. dr. Tamara LAH TURNŠEK, univ. dipl. inž. kem.
Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

Datum zagovora: 9. september, 2010

Izjavljam, da je delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje diplomske naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Barbara JERIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- SD Dn
- DK UDK 606:602.9:611.018:577.2 (043.2)
- KG Humane mezenhimske matične celice (MMC)/celična terapija z MMC/
glioblastomske celične linije (GBM)/U87- MG/ U373/U251/mutiformni
glioblastom/parakrina signalizacija/invazija/cisteinske proteaze/katepsin B/ katepsin
L
- AV JERIČ, Barbara
- SA KNEŽEVIĆ, Miomir (mentor)/ MOTALN, Helena (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
- LI 2010
- IN VSEBNOST CISTEINSKIH PROTEAZ KOT POKAZATELJ INVAZIVNOSTI V
HUMANIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELICAH V PRIMERJAVI Z
GLIOBLASTOMSKIMI CELIČNIMI LINIJAMI U87-MG, U373 IN U251
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XVI, 101 str., [10] str., 14 pregl., 32 sl., 3 pril., 229 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Glioblastomi so med najbolj malignimi oblikami primarnih možganskih tumorjev. Njihovo zdravljenje je zaradi visoke invazivnosti tumorskih celic v okoliško tkivo pogosto neučinkovito. Dokazano je, da mezenhimske matične celice (MMC) migrirajo k glioblastomom kot odgovor na kemokine, ki jih izločajo ti tumorji. Gensko spremenjene MMC bi bile zato zaradi njihove invazivne narave primerne za dostavo proti-tumorskih učinkovin do oddaljenih tumorskih celic. Namen diplomske naloge je bil ovrednotiti vpliv kondicioniranega medija treh različnih glioblastomskih celic (GBM) na tri različne klonove MMC in obratno, vpliv kondicioniranega medija treh različnih klonov MMC na tri različne linije GBM. Z metodami PCR v realnem času, ELISA in merjenjem aktivnosti smo spremljali vpliv kondicioniranega medija na izražanje, vsebnost in aktivnost cisteinskih katepsinov B in L, ki sodelujeta v procesu invazije. Dobljeni rezultati nakazujejo na razlike v sposobnosti za migracijo različnih klonov MMC k celicam GBM. MMC verjetno zmanjšajo invazijo in proliferacijsko sposobnost celic GBM preko vpliva na katepsin L. Celice GBM pa verjetno povečajo invazijo MMC preko vpliva na katepsin B. Linje GBM se med seboj razlikujejo v izražanju, vsebnosti in aktivnosti katepsinov B in L, zato smatramo da se razlikujejo tudi v malignosti in invaziji. Z nadaljnjimi raziskavami bi bilo potrebno ugotoviti kateri kemokini so odgovorni za spremembe v delovanju katepsinov B in L v celicah GBM in MMC po njihovi parakrini komunikaciji.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 606:602.9:611.018:577.2 (043.2)

CX Mesenchymal stem cells (MSC)/cell therapy with MSC/glioblastoma cell lines/
U87- MG/ U373/U251/glioblastoma multiforme/paracrine signaling/
invasion/cystein proteases/Cathepsin B/Cathepsin L

AU JERIČ, Barbara

AA KNEŽEVIĆ, Miomir (supervisor)/ MOTALN, Helena (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology

PY 2010

TI ANALYSIS OF CYSTEIN PROTEASES CONTENT AS AN INDICATOR OF
INVASION IN HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS COMPARED WITH
GLIOBLASTOMA CELL LINES U87-MG, U373 AND U251

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XVI, 101 p., [10] p., 14 tab., 32 fig., 3 ann., 229 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Glioblastomas are one of the most malignant type of primary brain tumors. The poor survival of patients with glioblastoma relates partly to the inability to deliver therapeutic agents to the remote invasive tumor cells. It has been proved that bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) actively migrate in response to chemokines that are secreted by gliomas. Because of their invasive nature, genetically modified MSC with therapeutic cytokines would be useful vehicles for antitumor reagents. The purpose of this work was to evaluate the impact of conditioned media of three different glioblastoma cells lines (GBM) on three different MSC clones and vice versa, the impact of conditioned media of three different MSC clones on three different GBM cell lines. The impact of conditioned media on expression, protein level and activity of cysteine cathepsins B and L, which participate in the process of invasion, was analysed with real-time PCR, ELISA test and measuring of their activity. The results indicate differences in the migration ability of different MSC clones to GBM cells. MSC are likely to reduce the invasion and proliferative capacity of GBM cells via the impact of cathepsin L. GBM cell are likely to increase invasion of MSC over the impact on cathepsin B. GBM cell lines differ in the expression, protein level and activity of cathepsins B and L, therefore we consider that they also differ in malignancy and invasion. Further research would be needed to determine which chemokines are responsible for changes in the functioning of cathepsins B and L in GBM and MSC cells after their paracrine communication.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORD DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VIII
	KAZALO SLIK	IX
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
	SLOVARČEK	XIII
1	UVOD	1
1.1	DELOVNE HIPOTEZE	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	SPLOŠNO O MATIČNIH CELICAH	3
2.2	MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE	5
2.2.1	Lastnosti mezenhimskih matičnih celic	5
2.2.2	Viri in izolacija mezenhimskih matičnih celic	6
2.2.3	Gojenje mezenhimskih matičnih celic <i>in vitro</i>	7
2.2.4	Komunikacija mezenhimskih matičnih celic z ostalimi celicami	7
2.2.5	Vloga mezenhimskih matičnih celic v telesu	11
2.2.6	Uporaba mezenhimskih matičnih celic v medicini	12
2.3	SPLOŠNE ZNAČILNOSTI RAKAVIH CELIC IN TUMORJEV	13
2.4	MOŽGANSKI TUMORJI	16
2.4.1	Multiformni glioblastom	17
2.4.2	Invazivnost glioblastomov	18
2.5	PROTEAZE	22
2.5.1	Delovanje proteaz	22
2.5.2	Vloga proteaz v invaziji	24
2.5.3	Povezava cisteinskih katepsinov B in L z glioblastomi	26
2.6	ZDRAVLJENJE GLIOBLASTOMOV	27
2.6.1	Uporaba MMC pri zdravljenju glioblastomov	28

3	MATERIAL IN METODE	31
3.1	MATERIAL.....	31
3.1.1	Reagenti.....	31
3.1.2	Laboratorijska oprema.....	32
3.1.3	Gojišča.....	33
3.1.3.1	Gojišče za gojenje MMC z 20% FBS (MMC gojišče).....	33
3.1.3.2	Gojišče za gojenje celic GBM z 10% FBS (GBM gojišče).....	33
3.1.3.3	Poskusno gojišče z 10% FBS (EKS gojišče).....	34
3.1.4	Ostale raztopine.....	34
3.1.4.1	Homogenizacijski pufer za izolacijo proteinov (pH 6.9).....	34
3.1.4.2	Pufer za aktivacijo CatL (pH 5.5).....	35
3.1.4.3	Reakcijski pufer za merjenje aktivnosti CatL in CatB (pH 6.0).....	35
3.1.4.4	Reagenti za PCR v realnem času.....	35
3.1.5	Celične linije.....	36
3.2	SPLOŠNI OPIS POTEKA DELA.....	38
3.3	METODE.....	41
3.3.1	Gojenje in vzdrževanje celičnih kultur do nastavitve poskusa.....	41
3.3.2	Priprava kondicioniranega medija.....	41
3.3.3	Nastavitev poskusa.....	41
3.3.4	Določanje izražanja mRNA katepsinov B in L.....	42
3.3.4.1	Izolacija RNA.....	42
3.3.4.2	Merjenje koncentracije in integritete RNA.....	42
3.3.4.3	Povratni prepis RNA v cDNA- reverzna transkripsija.....	43
3.3.4.4	PCR v realnem času.....	43
3.3.4.4.1	Princip metode TaqMan.....	43
3.3.4.4.2	Potek metode PCR v realnem času.....	44
3.3.4.4.3	Računanje izražanja mRNA v vzorcu z metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$	44
3.3.5	Določanje vsebnosti in aktivnosti katepsinov B in L.....	45
3.3.5.1	Izolacija proteinov.....	45
3.3.5.2	Merjenje vsebnosti celokupnih proteinov.....	45

3.3.5.3	ELISA	46
3.3.5.3.1	Princip metode ELISA	46
3.3.5.3.2	Potek testa ELISA.....	46
3.3.5.4	Merjenje aktivnosti katepsinov	47
3.3.5.4.1	Princip metode	47
3.3.5.4.2	Potek dela	48
3.3.6	Statistična obdelava podatkov	49
4	REZULTATI.....	50
4.1	CELIČNE LINIJE.....	50
4.1.1	Humane mezenhimske matične celice (MMC1, MMC2, MMC4).....	50
4.1.2	Glioblastomske celične linije (U373, U251, U87-MG).....	51
4.2	REZULTATI POSKUSOV	52
4.2.1	Določanje izražanja mRNA katepsinov B in L z metodo PCR v realnem času	53
4.2.1.1	Katepsin B	53
4.2.1.2	Katepsin L	56
4.2.2	Določanje vsebnosti katepsinov B in L s testi ELISA	60
4.2.2.1	Katepsin B	60
4.2.2.2	Katepsin L	63
4.2.3	Določanje aktivnosti katepsina B in L-podobnih katepsinov	66
4.2.3.1	Katepsin B	66
4.2.3.2	Katepsinu L- podobni katepsini.....	68
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	71
5.1	KATEPSIN B	72
5.2	KATEPSIN L	78
6	POVZETEK.....	81
7	VIRI.....	83

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Analiza prisotnosti proteinov v kondicioniranem mediju MMC	9
Preglednica 2: Klasifikacija astrocitnih tumorjev po WHO.....	16
Preglednica 3: Reagenti.....	31
Preglednica 4: Laboratorijska oprema	32
Preglednica 5: Reagenti za PCR v realnem času	35
Preglednica 6: Podrobnejši opis MMC	36
Preglednica 7: Podrobnejši opis celičnih linij GBM.....	37
Preglednica 8: Pregled poskusnih pogojev.....	38
Preglednica 9: Količine celokupnih proteinov, uporabljenih pri testu ELISA.....	46
Preglednica 10: Protitelesa za teste ELISA.....	47
Preglednica 11: Primerjava razlik v relativnem izražanju katepsina B.	55
Preglednica 12: Primerjava razlik v relativnem izražanju katepsina L.....	59
Preglednica 13: Primerjava razlik v vsebnosti katepsina B	62
Preglednica 14: Primerjava razlik v vsebnosti katepsina L.....	65

KAZALO SLIK

Slika 1: Stopnje v razvoju človeka, kjer lahko najdemo matične celice	4
Slika 2: Diferenciacijske sposobnosti MMC	5
Slika 3: Lastnosti malignih celic.....	14
Slika 4: Proces invazije po stopnjah.	19
Slika 5: Multififormni glioblastom.	21
Slika 6: Aktivacija proteaz v procesu razgradnje zunajceličnega matriksa	25
Slika 7: Shema poteka poskusa za določitev izražanja mRNA katepsinov	39
Slika 8: Shema poteka poskusov za določanje vsebnosti in aktivnosti katepsinov	40
Slika 9: MMC1, 100x povečava	50
Slika 10: MMC2, 100x povečava	50
Slika 11: MMC4, 100x povečava	50
Slika 12: U373, 100x povečava	51
Slika 13: U251, 100x povečava	51
Slika 14: U87, 100x povečava	51
Slika 15: Vpliv CM na izražanje katepsina B v klonih MMC in linijah GBM.	54
Slika 16: Vpliv CM na izražanje katepsina B v klonih MMC in linijah GBM.	54
Slika 17: Vpliv CM na izražanje katepsina B v klonih MMC in linijah GBM.	55
Slika 18: Vpliv CM na izražanje katepsina L v klonih MMC in linijah GBM	57
Slika 19: Vpliv CM na izražanje katepsina L v klonih MMC in linijah GBM	57
Slika 20: Vpliv CM na izražanje katepsina L v klonih MMC in linijah GBM.	58
Slika 21: Vpliv CM na vsebnost katepsina B v MMC in linijah GBM.	61
Slika 22: Vpliv CM na vsebnost katepsina B v MMC in linijah GBM	61
Slika 23: Vpliv CM na vsebnost katepsina B v MMC in linijah GBM.	62
Slika 24: Vpliv CM na vsebnost katepsina L v MMC in linijah GBM	63
Slika 25: Vpliv CM na vsebnost katepsina L v MMC in linijah GBM.	64
Slika 26: Vpliv CM na vsebnost katepsina L v MMC in linijah GBM.	64
Slika 27: Vpliv CM na aktivnost katepsina B v MMC in linijah GBM.	67
Slika 28: Vpliv CM na aktivnost katepsina B v MMC in linijah GBM	67

Slika 29: Vpliv CM na aktivnost katepsina B v MMC in linijah GBM	68
Slika 30: Vpliv CM na aktivnost L-podobnih katepsinov v MMC in linijah GBM.....	69
Slika 31: Vpliv CM na aktivnost L-podobnih katepsinov v MMC in linijah GBM.....	69
Slika 32: Vpliv CM na aktivnost L- podobnih katepsinov v MMC in linijah GBM.....	70

KAZALO PRILOG

Priloga A1: Vpliv CM na izražanje CatB v MMC in linijah GBM

Priloga A2: Vpliv CM na izražanje CatL v MMC in linijah GBM

Priloga B1: Vpliv CM na vsebnost CatB v MMC in linijah GBM

Priloga B2: Vpliv CM na vsebnost CatL v MMC in linijah GBM

Priloga C1: Vpliv CM na aktivnost CatB v MMC in linijah GBM

Priloga C2: Vpliv CM na aktivnost CatL- podobih katepsinov v MMC in linijah GBM

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

7-AMC - 7-amido-4-metilkuamarin

ATCC - Ameriška zbirka celičnih kultur (angl. American type culture collection)

BSA- goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)

CA074 - inhibitor katepsina B

CatB - katepsin B (angl. cathepsin B)

CatL - katepsin L (angl. cathepsin L)

CD - sistem za enotno označitev antigenov celične površine (angl. cluster of differentiation)

cDNA- komplementarna (angl. complementary) DNA

CDP/Cux - transkripcijski faktor (angl. CCAAT displacement protein/cut homeobox)

CXCL - kemokini

CXCR- kemokinski receptor

DEPC - vaskularni endotelijski rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor)

DMEM - osnovni medij za gojenje celičnih kultur (angl. Dulbecco's modified Eagles medium)

DNA- deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleotid acid)

dNTP – deoksiribonukleotid trifosfati

E64-c - L-3-karboksi-2,3-*trans*-epoksiopropionil-leucilamido (4-gvanidinobutan)

EDTA- etilendiamin tetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)

EGF - epidermalni rastni faktor (angl. epidermal growth factor)

EGFR - receptor epidermalnega rastnega faktorja (angl. epidermal growth factor receptor)

ELISA - encimsko imunska metoda (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)

E.U. - encimska enota (angl. enzyme unit)

EMT - prehoda fenotipa celic iz epitelialnega v mezenhimskega (angl. epithelial to mesenchymal transition)

FBS- serum govejih zarodkov (angl. foetal bovine serum)

GBM - glioblastomske celične linije (U373, U251, U87)

GBM CM - kondicioniran medij glioblastomskih celičnih linij

HIF-1- s hipoksijo inducirani faktor 1 (angl. hypoxia inducible factor-1)

IFN- γ - interferon γ

IgG - protitelo imunoglobulin G

IL - interleukin

miRNA - mikro RNA

MMC - mezenhimske matčne celice (MMC1, MMC2, MMC4)

MMC CM – kondicioniran medij mezenhimskih matičnih celic

MMP - matriksna metaloproteinaza

mRNA - informacijska (angl. messenger) RNA

NF- κ B - jedrni transkripcijski faktor κ B

PAI - plazminogen aktivator inhibitor

PBS- fosfatni pufer z NaCl (angl. phosphate buffered saline)

PCR- verižna reakcija DNA polimeraze (angl. DNA-polymerase chain reaction)

RNA - ribonukleinska kislina (angl. ribonucleotid acid)

RPM - vrtljaji na minuto (Revolutions per minute)

rRNA - ribosomalna ribonukleinska kislina (acid)

SDF-1 - angl. Stromal cell-derived factor-1

siRNA- mala interferenčna RNA (angl. small interfering RNA)

TGF- β - transformirajoči rastni dejavnik α (angl. transforming growth factor α)

TIMP - tkivni inhibitor metaloproteinaz (angl. tissue inhibitor of metalloproteinases)

TNF- α - dejavnik tumorske nekroze α (angl. tumor necrosis factor- α) TNF- β

uPA - urokinazni plazminogeni aktivator

uPAR - receptor urokinaznega plazminogenkega aktivatorja

VEGF - vaskularni endotelijski rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor)

WHO - Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)

Z-Phe-Arg-AMC - benziloksikarbonil-fenilalanin-arginin-AMC

SLOVARČEK

POJEM	RAZLAGA
(Proto) onkogen	Onkogeni so geni, ki lahko povzročijo ali pa prispevajo k razvoju raka. Večina celic je podvržena razvoju in programirani celični smrti – apoptozi. Če se onkogeni aktivirajo, lahko namesto apoptoze pride do proliferacije celic. Predpogoj je ponavadi mutacija sorodnih genov ali pa infekcija z virusi. Pomembno dejstvo je, da je se mutacija onkogenov ponavadi izrazi dominantno – dovolj je, da je prizadet samo en od dveh parnih kromosomov, zaradi česar pride do onkogene transformacije (za razliko od tega tumorski supresorski geni ponavadi potrebujejo mutacijo obeh alelov, da pride do tumorjev - recesivni način). Pomembno je poudariti, da onkogeni niso vedno povezani z rakom in imajo normalno funkcijo tudi v zdravih celicah. Ponavadi zdravo obliko onkogenega imenujemo protoonkogen. Protoonkogen je normalen gen, ki se lahko zaradi mutacije, povečanega izražanja (ekspresije) ali izgube ustrezne regulacije aktivira in postane onkogen. Protoonkogeni večinoma kodirajo beljakovine, ki urejujejo celično rast in diferenciacijo ter apoptozo. Pogosto so udeleženi v signalnih poteh mitogenih signalov. Ko se aktivirajo, začno inducirati tumorsko rast.
Angiogeneza	Angiogeneza je fiziološki proces rasti novih žil iz že obstoječih žil s pomočjo angiogenih faktorjev. Angiogene rastne faktorji (npr. vaskularni endotelijski rastni dejavnik - VEGF), sproščajo makrofagi, pa tudi nekatere druge celice, npr. MMC in tumorske celice. Aktivirane endotelijske celice žil potem sproščajo plazminogene aktivatorje in druge encime med katerimi so tudi matriks metaloproteaze, ki selektivno razgradijo zunajcelične proteine, kar dovoljuje endotelijskim celicam migracijo. Angiogeneza poteka tudi kot odgovor na tumorske celice in je pomembna terapevtska tarča pri zdravljenju malignih neoplazem.
Apoptoza	Apoptoza je eden od tipov programirane celične smrti. Ker gre za uravnavan proces, govorimo tudi o celičnem samomoru. V nasprotju z nekrozo- večinoma patološko obliko celične smrti, apoptoza ne privede do vnetnega odgovora. Proces apoptoze lahko sprožijo zunanji dejavniki (aktivatorji), ki se vežejo na membranske receptorje, ali pa znotrajcelični signali, ki delujejo na mitohondrije. Za večino celičnih učinkov je ključno delovanje proteinaz kaspaz, ki razgrajujejo celične komponente, pomembni regulatorji pa so pripadniki bcl-2 družine proteinov. Za normalno delovanje organizma je apoptoza nujno potrebna, saj se s tem odstranjujejo celice, ki so okužene, imajo poškodovano DNA, so rakasto spremenjene ali so odvečne (npr. pri razvoju organov pri zarodku). Odsotnost apoptoze pri odstranjevanju tovrstnih celic vodi v različna obolenja. Z apoptozo so povezani tudi nekateri cisteinski kathepsini (npr. CatB in CatL).
Celična linija	Definirana celična populacija, ki jo daljše časovno obdobje ohranjamo v kulturi <i>in vitro</i>. Po navadi pri teh celicah pride do spontane transformacije oz. dediferenciacije v bolj primitivno obliko, kar podaljša življenjsko dobo celic.
Celična terapija	Zdravljenje s presaditvijo različnih celičnih vrst. Če gre za matične celice te večinoma usmerimo v razvoj končno diferenciranih celic, ki jih potrebujemo, da z njimi »popravimo« okvarjene celice ali tkiva. Terapija s celicami je poleg genske terapije in tkivnega inženirstva tretja vrsta naprednega zdravljenja.

Citokin	Citokini so topni izločki celic, ki omogočajo medcelično komunikacijo, spodbudijo imunski odziv in razmnoževanje celic. Termin citokin se nanaša na heterogeno skupino topnih proteinov in peptidov, ki v nanomolarnih in pikomolarnih koncentracijah delujejo kot humoralni regulatorji in v normalnih ali patoloških razmerah urejajo delovanje tkiv in celic. Nekateri jih delijo v tri skupine, t.j. limfokine (izločajo jih limfociti), interleukine (v glavnem naj bi delovali na levkocite), in kemokine (ki naj bi posredovali kemotakso med celicami), vendar je ta razdelitev dandanes neustrezna, ker imajo mnogi citokini mešano delovanje vseh treh skupin.
Embrionalna matična celica	Pluripotentna linija matičnih celic, ki izhajajo iz zgodnjega zarodka (~5 dan), preden se tvorijo embrionalne plasti.
Gensko zdravljenje (genska terapija)	Gensko zdravljenje je vrsta naprednega zdravljenja. Z gensko terapijo umestimo zdrave in funkcionalne gene v celice osebe, ki ima te gene okvarjene zaradi določene bolezni. Funkcionalni gen pri tem nadomesti okvarjeni gen. Zdravi gen lahko prenesemo v spolne celice, pri čemer se sprememba prenaša na potomce, ali pa v somatske celice bolnika, pri čemer se ta sprememba ne deduje. Obstaja več načinov prenosa genov v celice (prenos z različnimi vektorji), pa tudi več načinov sprememb okvarjenega gena (naključna ali ciljana insercija zdravega gena v genom bolnika). Gene lahko z različnimi metodami tudi vključimo, izključimo ali utišamo. Uspeh genskega zdravljenja je odvisen od učinkovite vstavitve terapevtskega gena na ustrezno tarčno mesto v kromosomu, ne da bi pri tem povzročili neželjeno poškodbo celice, onkogeno mutacijo ali imunsko reakcijo.
Glioblastom	Najbolj maligna oblika gliomov, ki lahko nastane preko predhodno manj malignih vrst astrocitomov ali neposredno, posebno pri starejših bolnikih.
Domovanje MMC (angl. MSC homing)	Proces, pri katerem MMC kot odgovor na kemokine potujejo ven iz niš matičnih celic, migrirajo do mesta poškodbe, tam pa vdirajo v poškodovano tkivo
Invazija	Sposobnost širjenja, vdora (tumorskih) celic, v (normalno, zdravo) okoliško tkivo. Tudi splošen izraz za vdor, infiltracijo celic v tkivo. Celična invazija je na splošno pomemben dogodek v progresivni, nekontrolirani proliferaciji tumorskih celic, prav tako pa je to tudi pomemben proces na specifičnih stopnjah embriogeneze in razvoja osebka. Invazijo celic med drugim omogočajo proteolizni encimi, ki razgradijo zunajcelični matriks, s čimer naredijo prostor za ppremestitev celic v medceličnino. Invazija tumorjev je povezana tudi z lizosomalnimi proteazami, imenovanimi cisteinski katepsini in t.i. matriks metaloproteinazami. Invazija je večfazen proces, nanjo pa vplivajo avtokrini in parakrini dejavniki, zunajcelični matriks, medcelične interakcije, ter celice tumorske strome.
Katepsin	Katepsin je encim iz skupine peptidaz, za katerega je značilno, da ga v normalnih fizioloških pogojih v celici najdemo v lizosomu. V človeških celicah so jih našli že več kot 10 in so označeni s črkami. Največ katepsinov spada med peptidaze, ki imajo v aktivnem mestu aminokislino cistein (katepsini B, C, F, H, K, L, S, V, W, X), eden ima v aktivnem mestu serin (katepsin G) dva pa aspartat (asparaginsko kislino) (katepsina D in E). Glavna naloga katepsinov je razgradnja proteinov do krajših peptidov ali posameznih aminokislin. Po svoji aktivnosti so lahko ekso ali endo peptidaze. V celicah nastajajo v neaktivni obliki, po odcepu dela molekule pa preidejo v aktivno obliko. Izločajo se tudi ven iz celic. Potrebni so za normalni razvoj organov in tkiv, sodelujejo pa tudi v patoloških procesih. V večini rakavih

	celic je njihovo izražanje povišano. V rakavih celicah sodelujejo pri razgradnji zunajceličnega matriksa, invaziji, angiogenezi, apoptozi...
Kostni mozeg	Mehko tkivo, ki se nahaja zlasti v ploščatih kosteh, kot so medenica, prsnica, lobanja, rebra, hrbtenica in lopatica in v gobastem tkivu dolgih kosti (stegnenica, nadlahtnica). V kostnem mozgu poteka hematopoeza. Kostni mozeg vsebuje med različnimi odraslimi celicami tudi več vrst matičnih celic, npr. mezenhimske, krvotvorne in druge matične celice.
Matična celica (MC)	Matična celica (MC) je nediferencirana celica v živih bitjih, ki ima dve ključni lastnosti: lastnost samoobnavljanja in lastnost pluripotentnosti. MC se samoobnavlja z nesimetrično delitvijo, pri čemer nastane ena njej enaka in druga, bolj diferencirana hčerinska celica. Ta ima manjši razvojni potencial od prve, ker je bolj diferencirana. Samoobnavljanje omogoča vzdrževanje populacije matičnih celic v konstantnem številu. Najosnovnejša matična celica je embrionalna matična celica.
Mezenhimska matična celica (MMC)	Mezenhimske matične celice spadajo med stromalne celice kostnega mozga in imajo dvojno vlogo: a) predstavljajo izvor celic nekrvotvornih tkiv in b) so hkrati hranilne in podpirne celice za rast in diferenciacijo krvotvornih ali krvnih celic in ostalih tkiv, saj sintetizirajo različne komponente zunajceličnega matriksa in različne rastne dejavnike. So pluripotentne, diferencirajo se lahko v različne celice mezodermalnega tkiva, kot so celice kosti, hrustanca, mišic, kože, maščobne celice, del teh celic pa tudi v celice ekto- in endoderma, kamor spadajo npr. celice srčne mišice, živčne celice in hepatocite. Delujejo tudi imunomodulatorno na imunske celice - zmanjšujejo imunski odziv limfocitov B in T. So zelo uporabne za zdravljenje v regenerativni medicini, pa tudi za zdravljenje avtoimunskih bolezni. Nahajajo se tudi v kostnem mozgu, kjer se nahaja mnogo vrst matičnih celic. So izvor celic nekrvotvornih tkiv ter tvorijo različne rastne dejavnike, potrebne za rast in diferenciacijo krvnih celic in ostalih tkiv.
Neoplazma	Nenormalna, nova rast tkiva.
Niša matične celice	Celično mikrookolje, ki nudi podporo in dražljaje, ki so nujno potrebni za ohranjanje samoobnovitvenega potenciala matičnih celic (MC). Poznanih je več vrst niš matičnih celic, ki se med seboj razlikujejo po celičnem in biokemičnem okolju. Zane so različne niše, npr. niše mezenhimske MC, ter posebne vrste niš rakavih MC.
Pluripotentna matična celica	Celica, sposobna tvoriti vse telesne celice, vključno z germinalnimi celicami in nekaj ali vsa ekstraembrionalna tkiva. Takšne so npr. embrionalne in mezenhimske matične celice.
Potentnost	Obseg možnosti za končno diferenciacijo celic. Poznamo toti-, pluri-, multi- in unipotentne (matične) celice.
Rakava (tumorska) matična celica	Samoobnavljajoča se celica, ki je odgovorna za ohranjanje, rast in metastaziranje tumorja. Tumorske matične celice, ki jih je možno identificirati pri nekaterih levkemijah in čvrstih tumorjih, so potencialne terapevtske tarče pri zdravljenju raka, ker so najbolj odporne na terapijo.
Rastni dejavnik	Rastni dejavniki (faktorji) so molekule, ki delujejo preko specifičnih receptorjev na površini celice. Spadajo v skupino citokinov. Če se rastni dejavnik sprosti v kri, lahko deluje na oddaljene tarče (endokrini način delovanja), na sosednje celice (parakrini način delovanja) ali celo deluje tudi na samo celico, ki ga izloča (avtokrino delovanje). Delovanje rastnih dejavnikov je zelo pomembno pri celjenju poškodb in regeneraciji poškodovanih tkiv. Rastni dejavniki začnejo delovati preko poti prenosa signalov, spremenijo transkripcijske faktorje, ki nato sprožijo prepis genov, ki določijo usodo diferenciacije celic.
Tumorsupresorski geni	Geni, ki zaviralno regulirajo delitve celic in s tem potencialno tudi razvoj tumorja. Mutacije v teh genih večinoma povzročijo maligno transformacijo celic in njihovo

	nenadzorovano delitev.
Zunajcelični matriks (ECM)	Zunajcelični matriks je del medceličnine in predstavlja mikrookolje med celicami, ki jim nudi oporo, orientacijo in omogoča medcelične interakcije in nastanek vezivnega tkiva. Ponavadi ga sestavljata intersticijski matriks in bazalna membrana. Intersticijski matriks se nahaja med celicami, bazalna membrana pa predstavlja sloj na katerega so pripete epitelne in endotelne celice. ECM tako omogoča materialno oporo, sidrišče celicam, ločevanje tkiv enega od drugega in regulacijo medcelične komunikacije. V ECM se tudi lahko skladiščijo rastni faktorji, ki se sprostijo, ko se ECM razgradi s pomočjo proteaz. ECM sestavljajo glikozaminoglikani (proteoglikani) povezani s fibroznimi proteini (kolagen, elastin), hialuronska kislina, fibronektin in laminin.

1 UVOD

Glioblastomi (GBM) so najpogostejša in najbolj maligna oblika možganskih tumorjev. Kljub modernim diagnostičnim metodam in zdravljenju je stopnja preživetja bolnikov z GBM majhna, predvsem zaradi visoke invazivnosti tumorskih celic. Infiltracija glioblastomskih celic v okoliško možganovino poteka kot invazija posamičnih tumorskih celic v zdravo možganovino, kar onemogoča popolno operativno odstranitev tumorja, bolezen pa se zato velikokrat ponovi. Invazija tumorjev je povezana z lizosomalnimi proteazami, imenovanimi cisteinski katepsini, ki delujejo v kaskadi proteoliznih reakcij. Med kaskado proteoliznih reakcij prihaja do usmerjene hidrolize komponent zunajceličnega matriksa, kar omogoča invazijo celic. Katepsina B (CatB) in L (CatL) sodelujeta pri razvoju malignih tumorjev in njihovem metastaziranju. Oba se povezuje tudi z invazivnostjo gliomov, vendar predvsem vloga katepsina L v tem procesu ni dobro opredeljena. Raven izražanja cisteinskih katepsinov je v glioblastomih povečana. Kljub temu, da se katepsini koncentrirajo v lizosomu, se izločajo tudi v zunajcelični prostor, kjer razgrajujejo komponente zunajceličnega matriksa. Aktivnost cisteinskih katepsinov je regulirana s sintezo, znotrajcelično razporeditvijo, v končni fazi pa tudi z njihovimi endogeni inhibitorji iz družine cistatinov.

Nov, obetajoč pristop za zdravljenje glioblastomov, ki temelji na celični in genski terapiji je transplantacija progenitorskih celic, kot so humane mezenhimske matične celice (MMC). MMC so pluripotentne tkivne matične celice, ki se nahajajo v različnih tkivih in organih. Glioblastomi aktivno privlačijo MMC z izločanjem različnih kemokinov (parakrino signalizaijo), zato bi MMC lahko uporabili kot vektor za dostavo protitumorskih učinkovin k tumorskim celicam. Mehanizem migracije MMC k GBM, ki verjetno temelji na odgovoru MMC na poškodovana tkiva ali onkogene celice, še vedno ni povsem jasen. Prav tako še niso znani vsi vplivi MMC na tumorske celice. Nekatere raziskave potrjujejo, da MMC zavirajo rast in razvoj tumorja, obstajajo pa tudi rezultati raziskav ki kažejo, da lahko MMC v tumorskem okolju stimulirajo rast tumorja z izločanjem citokinov, rastnih in angiogenetskih faktorjev. Prisotnost, vsebnost in aktivnosti cisteinskih katepsinov B in L, njihova vloga v migraciji in invaziji MMC, pa tudi njihova vloga v komunikaciji s celicami GBM so še povsem novo in neraziskano področje.

Namen dela in cilj diplomske naloge je bil ovrednoti vpliv kondicioniranega medija humanih MMC na linije celic GBM in obratni vpliv, na ravni izražanja, vsebnosti in aktivnosti katepsinov B in L. Kondicioniran medij ponazarja parakrino komunikacijo med celicami. V raziskavi smo uporabili tri klonse mezenhimskih matičnih celic (MMC1, MMC2 in MMC4) in njihov kondicioniran medij ter tri različne glioblastomske celične linije (U373, U251 in U87-MG) in njih kondicioniran medij. Raven izražanja cisteinskih

katepsinov B in L smo določili z metodo PCR v realnem času, vsebnost katepsinov kot proteinov smo izmerili z metodo ELISA, aktivnosti katepsinov pa smo določili s pomočjo inhibitorjev E-64c in CA074.

Poznavanje vloge cisteinskih katepsinov v različnih celicah nam omogoča, da lahko sklepamo o njihovi vlogi v celičnih procesih in komunikaciji med različnimi celicami. Rezultati raziskave doprinašajo k boljšemu razumevanju parakrinega delovanja glioblastomskih celic na MMC in obratno, praktinega delovanja MMC na celice GBM.

1.1 DELOVNE HIPOTEZE

Upoštevač že objavljene raziskave vemo, da med MMC in celicami GBM obstaja parakrina komunikacija (Kidd in sod., 2009). To pomeni, da celice določene faktorje izločajo tudi v medij, ki jih obdaja, ter tako vplivajo na izražanje, vsebnost in aktivnost katepsinov B in L v drugih (sosednjih) celicah. Zato predvidevamo, da bomo z merjenjem spremembe izražanja, vsebnosti in aktivnosti cisteinskih katepsinov po medsebojni reakciji celic, lahko sklepali o njihovi vlogi v tej komunikaciji.

Ker po naših podatkih celice GBM povečajo invazijo MMC predvidevamo, da bo kondicioniran medij celic GBM vplival na raven izražanja, vsebnost in aktivnost katepsinov v MMC. MMC pa obratno zmanjšajo invazijo celic GBM, zato predvidevamo da bo imel tudi kondicioniran medij MMC vpliv na raven izražanja, vsebnost in aktivnost katepsinov v celicah GBM.

Nadalje vemo, da se MMC razlikujejo od celic GBM, zato predvidevamo, da se od njih razlikujejo tudi na ravni izražanja, vsebnosti in aktivnosti katepsinov B in L.

Nazadnje predvidevamo, da med samimi kloni MMC ne bo razlik, na ravni izražanja, vsebnosti in aktivnosti katepsinov, saj so si po osnovnih lastnostih zelo podobne. Glede na to, da linije GBM niso homogene pa predvidevamo, da bomo med njimi zaznali razlike v ravni izražanja, vsebnosti in aktivnosti katepsinov.

2 PREGLED OBJAV

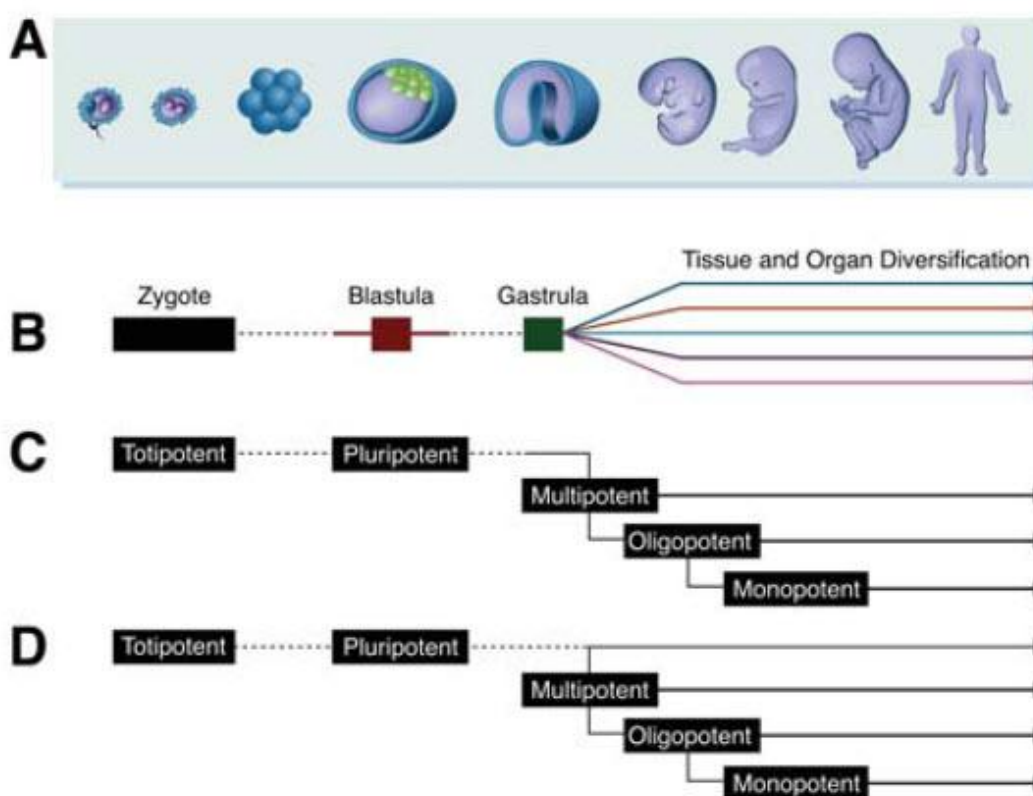
2.1 SPLOŠNO O MATIČNIH CELICAH

Matične celice so maloštevilna populacija nespecializiranih celic, ki jih najdemo v tkivu zarodka, pa tudi v tkivih odraslega človeka. So nedefinirane in sposobne dolgotrajnega asimetričnega deljenja, pri čemer v procesu samoobnavljanja tvorijo identične kopije celic, na drugi strani pa tvorijo nove linije bolj diferenciranih celic. Pomembna lastnost matičnih celic je tudi plastičnost. Plastičnost pomeni, da so se matične celice sposobne diferencirati v celice drugih tkiv in ne samo v celice tkiv iz katerega izhajajo. V določenih primerih so celo sposobne preskočiti iz ene somatske linije v drugo, npr. iz mezoderma v endoderm, kar imenujemo transdiferenciacija. Z matičnimi celicami lahko zdravimo določene degenerativne, presnovne, prirojene in rakave bolezni, še bolj pa so uporabne za zdravljenje mehanskih poškodb tkiv in organov (Strbad in Rožman, 2005; Zipori, 2005; Rožman in sod., 2007).

Poznamo več vrst matičnih celic, ki imajo različne razvojne potenciale. V grobem matične celice glede na njihov izvor lahko razdelimo na dve skupini: embrionalne matične celice, ki se nahajajo v blastocisti (zarodku) in matične celice odraslega, ki jih imenujemo tudi tkivno specifične matične celice in jih lahko izoliramo iz fetusa ali post natalno (Can, 2008). Po sposobnosti diferenciacije pa matične celice lahko razdelimo na toti-, pluri-, multi- in unipotentne (Slika 1). Totipotentne celice so se sposobne diferencirati v vse celične vrste in trofoblast. V odraslem človeku je tako več kot 200 različnih celičnih vrst, ki izvirajo iz ene same celice zigote oz. oplojenega jajčeca. Pluripotentne celice so se sposobne diferencirati v vse tri celične plasti (mezoderm, ektoderm in endoderm), ne pa v trofoblast. Take so npr. krvotvorne matične celice in mezenhimske matične celice. Multipotentne celice (tudi oligopotente) so se sposobne diferencirati v več celičnih vrst, vendar ne v vse. Take so npr. krvotvorne matične celice. Unipotentne matične celice pa so se sposobne diferencirati le v eno celično vrsto. Imenujemo jih tudi celice prednice (progenitorji). Take so npr. predniške epitelne matične celice (Rožman in sod., 2007). Pluripotentne matične celice odraslega lahko podrobneje razdelimo še na multipotentne prednice odraslega (MAPC, angl. multipotent adult progenitor cells), celice MIAMI (angl. marrow-isolated adult multilineage inducible cells), embrionalnim matičnim celicam podobne celice iz popkovnične krvi (CBE, angl. cord blood-derived embryonic-like stem cells), celice hMASC (angl. human multipotent adult stem cells), celice VSEL (angl. very small embryonic-like stem cells), embrionalne matične celice odraslega (ESC-A, angl. embryonic stem cell of adult (Jiang in sod., 2002; D'Ippolito in sod., 2004; McGruckin in sod., 2005; Beltrami in sod., 2007; Kucia in sod., 2006; Virant-Klun in sod., 2008)). V zadnjem času pa se vse več govori tudi o tumorskih matičnih celicah, ki se asimetrično

delijo v tumorsko progenitorsko celico, ta pa je vir različnih fenotipov malignih celic (Zhou in sod., 2009).

Matične celice lahko osamimo iz zarodka na stopnji morule in blastociste, lahko pa tudi iz popkovnične krvi novorojenca oziroma posteljice ali kostnega mozga odraslega človeka, nahajajo pa se tudi v drugih tkivih odraslega človeka (Slika 1, D) (Zipori 2005; Strbad in Rožman, 2005). Tako v vsakem organu obstaja mesto ali niša, ki je bogata s tkivnimi matičnimi celicami. Niša matičnih celic je celično mikrookolje, ki nudi podporo in dražljaje, ki so nujno potrebni za ohranjanje samoobnavljanja in sposobnosti diferenciacije matičnih celic, hkrati pa tudi uravnava njihovo aktivnost (Ho in Wagner, 2007). Matične celice zato lahko najdemo v epitelu, prebavilih, skeletnih mišicah, očeh, jetrih, dojki, zobni pulpi, koži, lasnih mešičkih, periferni krvi, maščobnem tkivu, testisih, prostati in v ovarijih (Zipori, 2005; Strbad in Rožman, 2005).

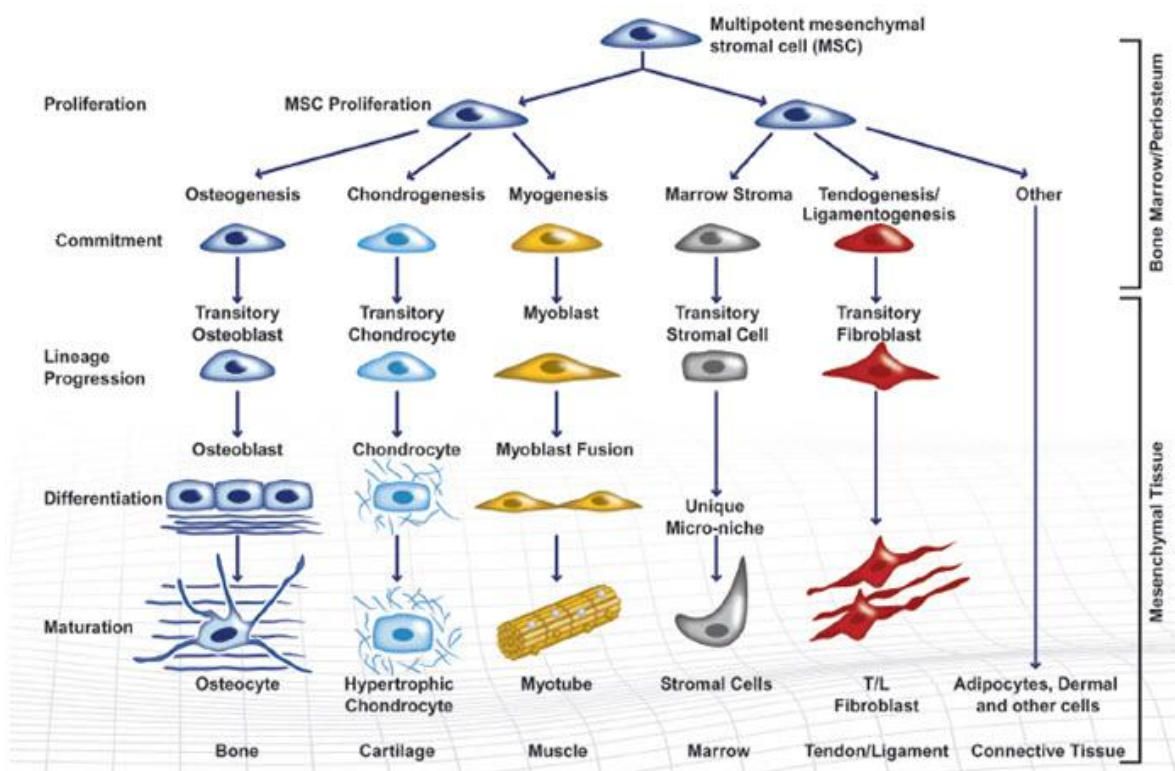


Slika 1: (A, B): Stopnje v razvoju človeka, kjer lahko najdemo matične celice z različnim razvojnim potencialom. (C): Korelacija ključnih razvojnih stopenj z razvojnim potencialom matičnih celic. (D): Nova odkritja dokazujejo, da pluripotentne matične celice obstajajo tudi v odraslem osebk. (Zipori, 2005)

2.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE

2.2.1 Lastnosti mezenhimskih matičnih celic

Humane mezenhimske matične celice (MMC, angl. mesenchymal stem cells, mesenchymal stromal cells) so definirane kot samo-obnavljajoče se, pluripotentne matične celice, ki se nahajajo v različnih tkivih in se lahko diferencirajo v več različnih tipov mezenhimskih tkiv (da Silva Meirelles in sod., 2008). MMC kažejo razvojni potencial za diferenciacijo v osteoblaste, hondroците, adipocyte in mišične celice (Slika 2). Zelo majhna populacija teh matičnih celic odraslega, imenovana MAPC (multipotentna prednica odraslega, angl. multipotent adult progenitor cell), ki so jih izolirali iz kostnega mozga in mora biti vzdrževana pod striktnimi pogoji gojenja, pa ima celo sposobnost diferenciacije v celične tipe z lastnostmi visceralnega mezoderma (miocyte), nevroektoderma (živčne celice) ali endoderma (hepatocyte) (Jiang in sod., 2002; Wagner in sod., 2005).



Slika 2: Diferenciacijske sposobnosti MMC (Hematopoietic and mesenchymal stromal cell pathway, 2010)

Komite za mezenhimske in tkivne matične celice mednarodnega združenja za celično terapijo (ISCT) je predlagal tri minimalne kriterije s pomočjo katerih lahko definiramo MMC: 1) sposobnost pritrditve na plastiko gojitvene posode; 2) >95% prisotnost izražanja za MMC specifičnih označevalcev in >95% odsotnost izražanja označevalcev, ki so specifični za hematopoetske ali endotelijske celice in 3) sposobnost diferenciacije *in vitro* v osteoblaste, adipocite in hondroblaste (Dominici in sod., 2006). Podrobneje so MMC negativne za tri hematopoetske označevalce: CD14, CD34, CD45 in antigene CD4, CD8, CD11a, CD15, CD16, CD25, CD31 (endotelijski označevalec), CD33, CD49b, CD49d, CD49f, CD50, CD62e, CD62l, CD62P, CD80, CD86, CD106, CD117, kadherin V, glikoforin A, poglavitni histokompatibilnostni kompleks HLA-DR in HLA razreda II. Obratno pa so MMC pozitivne za CD10, CD13, CD29 (β -integrin), CD44, CD49e ($\alpha 5$ -integrin), CD54 (ICAM-1), CD58, CD71, CD73 (SH3), CD90, CD105, CD146, CD166, CD271, vimentin, citokeratin 8 citokeratin 18, nestin, in von Willebrand faktor. Šibko izražajo HLA razreda I in CD123, ter so variabilne v izražanju FLK1 (KDR), CD133/1 in CD133/2. Stopnja izražanja površinskih antigenov je pri nižjih pasajah višja kot pri višjih pasajah MMC, kar kaže na to, da se v telesu verjetno nahaja heterogena populacija MMC (Gang in sod., 2004; Alviano in sod., 2007; Rubio in sod., 2005; Wang in sod., 2005; Kogler in sod., 2006).

2.2.2 Viri in izolacija mezenhimskih matičnih celic

Glavni in najbogatejši, čeprav ne edini vir MMC je kostni mozeg. MMC spadajo med stromalne celice kostnega mozga (Locatelli in sod., 2007) in so zelo redke, saj najdemo le eno na 10000–100000 drugih celic kostnega mozga (Strbad, 2004). MMC so tisti del populacije celic kostnega mozga, ki se pri gojenju v celični kulturi pritrdijo na dno gojitvenih posod in tvorijo kolonije celic vretenaste oblike, podobne fibroblastom. Prva, ki sta opisala MMC iz kostnega mozga sta bila Friedestein in Petrakova, leta 1996, Friedestein pa je prvi razvil tudi metode za njihovo izolacijo in gojenje (Jackson in sod., 2007). Poleg kostnega mozga pa se MMC nahajajo tudi v drugih tkivih človeškega telesa, kot so: maščobno tkivo, popkovnica, popkovnična kri, horionski vili placente, amnijska tekočina, periferna kri, pljuča idr. (Rožman in sod., 2007).

MMC, ki so izolirane iz različnih tkiv se med seboj razlikujejo glede na fenotip in razvojni potencial (Bianco in sod., 2008). Taka heterogenost je možna funkcija različnega mikrookolja, iz katerega so izolirane in lahko odseva tudi v funkcijskih razlikah med njimi (da Silva Meirelles in sod., 2008). Od načina gojenja in vira izolacije (donorja) pa je odvisna tudi hitrost rasti MMC. Prav tako obstajajo tudi razlike med kloni MMC, ki so izolirani iz istega vira. Te razlike se kažejo v proliferacijski zmogljivosti in *in vitro*

življenjski dobi celic. Na podlagi različne hitrosti rasti lahko klone MMC, izolirane iz kostnega mozga, razdelimo v hitro in počasi rastoče (Motaln in sod., 2010; Kogler in sod., 2004; Bernardo in sod., 2007; Wagner in sod., 2008).

Učinkovitost izolacije MMC je odvisna od načina izolacije, njihovega vira, shranjevanja vzorcev in transportnih pogojev. S 100% učinkovitostjo lahko izoliramo MMC iz kostnega mozga, maščobnega tkiva in popkovnice, izolacija iz sveže popkovnične krvi pa je le 30% do 63% učinkovita. Najmanj učinkovita je izolacija MMC iz vzorcev popkovnične krvi, shranjene z zamrzovanjem (krioprezervacijo) (Rebelatto in sod., 2008; Kern in sod., 2006; Bieback in sod., 2004).

2.2.3 Gojenje mezenhimskih matičnih celic *in vitro*

Z ustreznimi rastnimi dejavniki in citokini lahko te celice vzdržujemo v nediferenciranem stanju, v katerem lahko tudi po številnih pasažah ohranijo vse lastnosti, ali pa jih usmerimo v želen celični tip (Rožman in sod., 2007). Diferenciacijo MMC sicer lahko usmerjamo s spreminjanjem pogojev rasti kot so dodatek različnih rastnih faktorjev, hipoksija, rast na različnih ogrojdih, mehanski ali električni dražljaji (Bonora-Centralles in sod., 2009; Volkmer in sod., 2010; Myllymaa in sod., 2010; Rentsch in sod., 2009; Liedert in sod., 2009; Genovese in sod., 2009). Na razvojni potencial MMC oz. njihovo sposobnost diferenciacije vplivajo še vir iz katerega pridobimo celice, število pasaže in konfluenca ter način shranjevanja celic. Pri višjih pasažah ali konfluenci pride do delne izgube oz. spremembe v razvojnem potencialu MMC. Po 8-15 pasažah MMC namreč postanejo senescentne in se prenehajo deliti (Motaln in sod., 2010; Wagner in Ho, 2007).

2.2.4 Komunikacija mezenhimskih matičnih celic z ostalimi celicami

V nišah mezenhimskih matičnih celic v različnih tkivih se nahajajo tudi drugi celični tipi, kot so osteoklasti, stromalne in endotelijske celice ter zunajcelični matriks (Wilson in Trumpp, 2006; Forsberg in sod., 2005). MMC v nišah izločajo številne citokine in rastne faktorje, ki imajo tako parakrino kot avtokrino funkcijo (Caplan in Dennis, 2006). S pomočjo teh molekul potekata komunikacija in odziv MMC na druge celice. *In vitro* MMC izločajo številne citokine, interleukine (IL) in rastne faktorje kot so epitelijski kemotaktični dejavnik za nevtrofilce-78 (angl. epithelial neutrophil-activating peptide-78, ENA-78),

kolonije stimulirajoči faktor za granulocyte in makrofage (angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), rastnemu sorodni onkogeni proteini (angl. growth related oncogene), IL-1 β , IL-6, IL-8, kemoatraktantni protein 1 za monocite (angl. monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), onkostatin M (OSM), vaskularni endotelijski rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor, VEGF), fibroblastni rastni dejavnik FGF-4 (angl. human fibroblast growth factor), FGF-7, FGF-9, granulocitni kemotaktični protein-2 (angl. granulocyte chemotactic protein-2, GCP-2), vezavni protein za inzulinu podoben rastni dejavnik tipa 1 IGFBP-1 (angl. insulinlike growth factor-binding protein), IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, interferon inducibilni protein-10 (angl. interferon inducible protein-10, IP-10), makrofagni vnetni protein-3a (angl. macrophage inflammatory protein-3a, MIP-3a), makrofage zavirajoči faktor (angl. macrophage-inhibiting factor), osteoprotegerin, PARC (angl. pulmonary and activation regulated chemokin), PIGF (angl. phosphatidylinositol glycan class F), TGF- β 2, TGF- β 3, tkivni zaviralec metaloproteinaz TIMP-1 (angl. tissue inhibitor of metalloproteinase) in TIMP-2 (povzeto v Preglednici 1). Osnovni profil izločanja citokinov se med različnimi viri MMC celic ne razlikuje, spreminjajo se le koncentracije. Na raven izločanja citokinov vpliva morfolologija MMC; agregati MMC ali sferoidi izločajo do 20x višje koncentracije VEGF, FGF- β , angiogenina, prokatepsina B, IL-11 in kostnega morfogogenetskega proteina-1 (BMP-1) v primerjavi z monosloji (Liu in Hwang, 2005; Chen in sod., 2003; Kinnaird in sod., 2004a; Nagaya in sod., 2004; Tang in sod., 2005).

Preglednica 1: Analiza prisotnosti proteinov v kondicioniranem mediju MMC (Chen in sod., 2008)

IME PROTEINA	OKRAJŠAVA	INT. DETEK.
Epithelial-neutrophil activating peptide	ENA-78	+
Granulocyte colony-stimulating factor	G-CSF	+
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	GM-CSF	+/-
Growth-related oncogene	GRO	+
Growth-related oncogene α , CXCL1	GRO- α	+/-
CCL1	I-309	+
Interleukin-1 α	IL-1 α	++
Interleukin-1 β	IL-1 β	+
Interleukin-2	IL-2	+
Interleukin-3	IL-3	+
Interleukin-4	IL-4	+
Interleukin-5	IL-5	+/-
Interleukin-6	IL-6	+++
Interleukin-7	IL-7	+/-
Interleukin-8	IL-8	++
Interleukin-10	IL-10	+
Interleukin-12	IL-12	+
Interleukin-13	IL-13	+/-
Interleukin-15	IL-15	+/-
Interferon γ	IFN- γ	+/-
Monocyte chemoattractant protein-1, CCL2	MCP-1	++
Monocyte chemoattractant protein-2, CCL8	MCP-2	+/-
Monocyte chemoattractant protein-3, CCL7	MCP-3	+/-
Macrophage colony-stimulating factor	M-CSF	+
Macrophage derived chemokine	MDC	+
Monokine induced by IFN-Gamma, CXCL9	MIG	+/-
Macrophage inhibitory protein- 1 β , CCL4	MIP-1 β	++
Macrophage inhibitory protein- 1 δ	MIP-1 δ	+
Regulated on activation normal T cell-expressed and secreted, CCL5	RANTES	+
Stem cell factor	SCF	+
Stromal cell- derived factor 1	SDF-1	+
Thymus- and activation- related chemokine, CCL17	TARC	+/-
Transforming growth factor- β 1	TGF- β 1	+/-
Tumor necrosis factor- α	TNF- α	+
Tumor necrosis factor- β	TNF- β	+
Epidermal growth factor	EGF	+
Insulin-like growth factor-1	IGF-1	++
Angiopoietin	Ang	++++
Oncostatin M	OSM	++
Trombo poietin	TPO	++

se nadaljuje

nadaljevanje

IME PROTEINA	OKRAJŠAVA	INT. DETEK.
Vascular endothelial growth factor	VEGF	++++
Platelet derived growth factor-BB	PDGF-BB	+
Leptin	Leptin	+
Braine derived neurotrophic factor	BDNF	++
B lymphocyte chemoattractant, CXCL 13	BLC	+/-
CCL23	Ck β 8-1	+/-
Eotaxin	Eotaxin	+/-
Eotaxin-2	Eotaxin-2	+/-
Eotaxin-3	Eotaxin-3	+
Fibroblast growth factor-4	FGF-4	+
Fibroblast growth factor-6	FGF-6	+
Fibroblast growth factor-7	FGF-7	+
Fibroblast growth factor-9	FGF-9	++
FMS- related tyrosine kinase 3 ligand	Flt-3 ligand	+
Fractalkine	Fractalkine	++
Granulocyte kemotactic protein-2	GCP-2	+/-
Glial cell line- derived neurotrophic factor	GDNF	++
Hepatocyte growth factor	HGF	+++
IGF binding protein-1	IGFBP-1	+
IGF binding protein-2	IGFBP-2	++
IGF binding protein-3	IGFBP-3	++
IGF binding protein-4	IGFBP-4	++
Interleukin 16	IL-16	+/-
Interferon-inducible protein of 10 kDa, CXCL10	IP-10	+
Leukaemia inhibitory factor	LIF	++
Tumor necrosis factor (ligand) super family, member 14	LIGHT	+
CCL13	MCP-4	+/-
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	+/-
Macrophage inflammatory protein-3 α	MIP-3 α	+
Neutrophil-activating peptide-2	NAP-2	++
Neutrophin 3	NT-3	+
Neutrophin 4	NT-4	+
Osteoprotegrin	OPTGRN	++
CCL18	PARC	+
Placenta growth factor	PIGF	++
Transforming growth factor- β 2	TGF- β 2	+
Transforming growth factor- β 3	TGF- β 3	+
Metalloproteinase inhibitor-1	TIMP-1	++++
Metalloproteinase inhibitor-2	TIMP-2	++++

Legenda: intenziteta detekcije je označena z - nezaznavno; +/- šibko zaznavno; + ~ ++++ intenziteta pozitivne detekcije.

2.2.5 Vloga mezenhimskih matičnih celic v telesu

Povišana ali znižana produkcija citokinov *in vivo* lahko vpliva na interakcije med celicami. (Motaln in sod., 2010). MMC tako preko kemokinov delujejo imuno modulatorno, kar posledično privede do imunosupresije dendritičnih celic, limfocitov B in limfocitov T. MMC sodelujejo tudi pri razvoju limfocitov B in T ter podpirajo rast in diferenciacijo krvotvornih matičnih celic (Abdi in sod., 2008; Nair in sod., 2010). Za veliko faktorjev, ki podpirajo rast in razvoj krvotvornih matičnih celic je bilo nedavno dokazano, da tudi pospešijo regeneracijo in celjenje nehematopoetskega tkiva. Številne študije dokazujejo da MMC ali njihov kondicioniran medij spodbujajo obnovo tkiv in zmanjšujejo vnetja po kardiovaskularnih boleznih, srčnem in možganskem infarktu, poškodbah hrbtenjače, hrustanca in kosti, Kronovi bolezni, reakciji presadka proti gostitelju (angl. graft-versus-host disease) pri transplantacijah kostnega mozga ter izboljšajo celjenje ran pri diabetesu (Nauta in Fibbe, 2007; Martens in sod., 2006; Keating, 2006; Amado in sod., 2005; Li in sod., 2005). Poleg tega kondicioniran medij MMC, gojenih v hipoksičnih pogojih, ki posnema naravno okolje poškodovanega ali okvarjenega/tumorskega tkiva, stimulira migracijo in proliferacijo endotelijskih celic ter migracijo makrofagov. Čeprav je znano, da MMC izločajo citokine in molekule zunajceličnega matriksa, s čimer vplivajo na parenhimske celice in celjenje poškodovanih tkiv, točen mehanizem teh procesov še vedno ni poznan (Chen in sod., 2008).

Večstopenjski proces migracije MMC na mesta poškodovanih tkiv verjetno regulirajo spremembe v mikrookolju. Možno je, da v matičnih celicah pride do spremembe regulacije transkripcije, kot odgovor na signale iz okolja. Posledica tega so migracija, sprememba rasti in diferenciacije MMC (Korbling in Estrov, 2003; Wilson in Trumpp, 2006). Migracijo MMC na mesta poškodb omogočajo receptorji za kemokine, ki se sproščajo pri poškodbah tkiva (Wynn in sod., 2004; Sordi in sod., 2005; Son in sod., 2006; Birnbaum in sod., 2007). Tak proces, v katerem MMC kot odgovor na kemokine potujejo ven iz niš matičnih celic, migrirajo do mesta poškodbe, tam pa vdirajo v poškodovano tkivo z angleškim izrazom imenujemo »homing« (Motaln in sod., 2010; Neth in sod., 2006). Predvidevajo, da MMC nato na mesto poškodbe preko izločanja različnih faktorjev privlačijo še makrofage in endotelijske celice, s čimer pospešijo celjenje ran (Chen in sod., 2008). Dokazano je, da MMC ali njihov kondicioniran medij preko parakrinih mehanizmov (angiogenih citokinov in rastnih faktorjev) stimulirata perfuzijo ishemičnega tkiva in s pomočjo endotelijskih celic sproži nastanek cevastih struktur (Gruber in sod., 2005; Kinnaird in sod., 2004b). Poleg izločanja parakrinih faktorjev ki stimulirajo endogene popravilne mehanizme, k regeneraciji tkiva lahko prispevajo še drugi mehanizmi matičnih celic kot sta diferenciacija MMC v specifične celice tkiva in fuzija MMC z obstoječimi celicami tkiva (Mazhari in Hare, 2007; Grinnemo in sod., 2006).

2.2.6 Uporaba mezenhimskih matičnih celic v medicini

MMC so slabo imunogene, zato bi bile uporabne pri alogeni transplatacijah in bi zmanjšale potrebo po uporabi imunosupresivov. Njihova uporaba ni etično sporna, poleg tega pa imajo še visok potencial za diferenciacijo v različne tkivne celične tipe in jih je razmeroma preprosto izolirati ter namnožiti do zadostnega števila, potrebnega za klinično uporabo. Zaradi vseh naštetih razlogov, izražanja tropizma za poškodovana tkiva, močnih imunosupresivnih učinkov in spodbujanja angiogeneze imajo MMC ogromen potencial za uporabo tako v regenerativni medicini kot tudi za zdravljenje številnih bolezenskih stanj (Sasaki in sod., 2008; Zhang in sod., 2007; Toma in sod., 2002). Lahko jih uporabimo pri zdravljenju poškodb mezenhimskega tkiva, tj. pri zlomih kosti, osteoporozi, obrabi hrustanca ipd. Te celice so tudi sposobne transdiferenciacije iz mezoderma v ektoderm - iz njih namreč lahko nastanejo tako kardiomiociti kot tudi živčne celice, npr. astrociti in nevroni (Rožman in sod., 2007).

MMC pa so uporabne tudi v onkologiji, saj tumorji z izločanjem določenih citokinov ravno tako kot tkivne poškodbe stimulirajo migracijo MMC k tumorju. S posegom v sekretorne poti medsebojne komunikacije MMC in tumorskih celic bi tako lahko MMC uporabili za zdravljenje različnih tumorjev (Nakamura in sod., 2004; Motaln in sod., 2010).

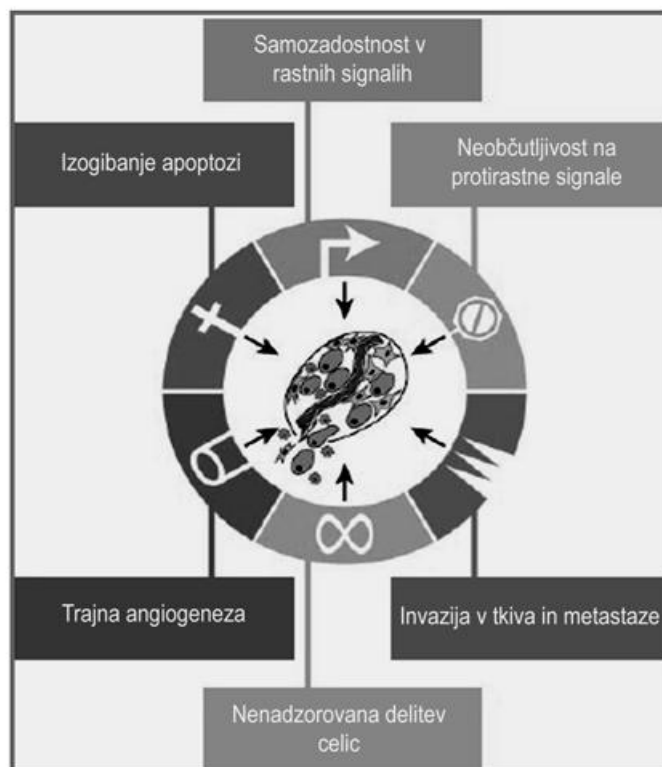
2.3 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI RAKAVIH CELIC IN TUMORJEV

V zdravem organizmu je delitev celic kontroliran proces, celice se za rast organov in njihovo obnavljanje delijo glede na potrebe določenega tkiva. Zato je delitev celic zavrtta ob zadostni količini celic in pospešena v primeru potrebe po novih celicah (Serša, 2009). Pri zdravih celicah so po vsaki delitvi končni segmenti kromosomov (telomere) krajše. Ko se po določenem številu povsem skrajšajo, se celica neha deliti. V tumorski celicah pa deluje telomeraza, ki je v večini zdravih celic ni. Ta encim pri vsaki delitvi prepreči, da bi se telomerni konci skrajšali. Ker se telomerni konci pri delitvi ne skrajšajo več kot v zdravih celicah, transformirana tumorska celica nima več omejenega števila delitvenih ciklov. Celica se zato začne nebrzdano deliti, postane nesmrtna (Alberts in sod., 2004: 726-728).

Maligno transformirane celice nastajajo pod vplivom karcinogenih dejavnikov, ki povzročajo mutacije v genih. Te mutacije niso smrtne za celico, ampak omogočajo nadaljnjo celično delitev teh mutiranih celic. Poleg tega lahko vplivajo na nastanek raka tudi dejavniki, kot so hormoni in drugi promocijski dejavniki, ki ne delujejo direktno na DNA molekulo, ampak spodbujajo celično delitev. Vedno več pa je znanih mutacij v naših celicah, ki so podedovane od naših staršev, to so t.i. dedne mutacije. Vsi ti dejavniki vplivajo na nastanek raka tako, da je potrebno več zaporednih, časovno ločenih dogodkov (mutacij) in signalov, da doseže neka zdrava celica v našem organizmu vse spremembe, ki so potrebne za njeno transformacijo v rakavo celico (Pecorino, 2008). Različni dejavniki tako postopoma spreminjajo lastnosti celic v smeri manjše odzivnosti na signale, ki regulirajo rast, smrt (apoptozo) in diferenciacijo celic. Tako signali za spodbujanje celične delitve vplivajo na gene v celici, ki spodbudijo celico da vstopi v celični cikel. V normalnih celicah so to protoonkogeni, ki so v malignih celicah mutirani v onkogene (npr. c-myc, N-myc). Ti geni pa so pod kontrolo genov, ki so sposobni zavreti celico v celični delitvi, torej so sposobni ustaviti celice v celičnem ciklusu, imenujemo jih tumor supresorski geni (npr. p53, Rb). V primeru mutacije protoonkogen ali tumorsupresorskih genov se izgubi kontrola nad celičnim ciklusom, zavrt pa je tudi proces apoptoze, ki v zdravem organizmu skrbi za celično smrt (Pecorino, 2008; Tannock in Hill 2007).

Maligno spremenjena celica je zaradi nakopičenih mutacij manj diferencirana kot normalna celica. Zato ima taka celica poleg sposobnosti neskončne celične delitve, tudi večjo mobilnost in invazivnost, da lahko potuje v bližnje bezgavke ali vstopa v žilje in v obeh primerih tvori oddaljene metastaze ali zasevke. Rakave celice imajo poleg tega še sposobnost izločanja angiogenih dejavnikov, ki spodbujajo rast žilja tumorjev (Slika 3) (Hanahan in Weinberg, 2000). V tako mutiranih celicah prihaja tudi do mutacij genov, ki skrbijo za popravljanje napak pri prepisovanju DNA in na splošno za prepoznavanje napak v genomu celice. V zadnjem času ugotavljajo, da k maligni transformaciji doprinesejo tudi

mutacije v regijah DNA molekule, ki kodirajo mikro RNA molekule (miRNA). Te miRNA uravnavajo izražanje proteinov na posttranslacijskem nivoju, na nivoju razgradnje sporočilne RNA (mRNA). Če je torej miRNA mutirana in je vpletena v kontrolo izražanja proto-onkogenega ali tumor supresorskega gena, lahko ta mutacija doprinese k maligni transformaciji celic (Pecorino, 2008; Tannock in Hill 2007; Serša, 2009).



Slika 3: Lastnosti malignih celic. Tumor je kompleksno tkivo sestavljena iz malignih in stromalnih celic, ki jih predstavljajo imunske celice, fibroblasti in endotelne celice žilja tumorja. Maligne celice imajo nekaj značilnih bioloških lastnosti, kot so izogibanje apoptozi, samozadostnost v rastnih signalih, neobčutljivost na protirastne signale, trajna angiogeneza, nenadzorovana celična delitev in invazija v sosednja tkiva in metastaziranje (Serša, 2009)

V tkivu tako nastane prva maligna celica, ki tvori z nadaljnjimi delitvami vse številčnejšo populacijo celic. Ob nadaljnjih delitvah se te celice nadalje spreminjajo zaradi genetske nestabilnosti in postajajo vse bolj agresivne. Tako v tumorju nastaja heterogena populacija celic, ki so si po genotipu in fenotipu različne. Do nekaj milimetrov velikosti tumorja se te celice prehranjujejo z difuzijo kisika in hraniv iz bližnjih žil. To fazo rasti tumorjev imenujemo avaskularna faza rasti, ki lahko traja tudi več let. Ko pa maligne celice pridobijo še lastnosti izločanja angiogenih dejavnikov, se v njih zgodi angiogeni preklap,

sproži se angiogeneza tumorjev. Novo nastalo žilje tumorja omogoči rakavim celicam intenzivno delitev (Tannock in Hill, 2007; Pecorino, 2008; Folkman, 2007).

Obstajajo trije glavni modeli nastanka tumorja: model klonalne evolucije raka, stohastičen model nastanka tumorja in hierarhičen model nastanka tumorja. Večina tumorjev nastane iz enega samega kлона celice, v katerem pride do maligne transformacije. Taka maligna celica naprej tvori številčnejšo populacijo tumorskih celic, ki tvorijo maso heterogenih tumorskih celic (Bjerkvig in sod., 2009). Leta 1976 je Nowell predstavil idejo, da rak nastane kot posledica številnih mutacij, ki vodijo v nastanek tumorja z akumulacijo genetskih sprememb (Nowell, 1976). V zadnjem desetletju so ta zelo star koncept nastanka tumorja preoblikovali na podlagi teorije o rakavih matičnih celicah (Bjerkvig in sod., 2009). Ta koncept razlaga nastanek tumorja iz abnormalnega podtipa matičnim celicam podobnih celic, ki v asimetričnih celičnih delitvah tvorijo matičnim celicam podobne celice in heterogeno populacijo tumorskih celic. Te tumorske celice so zato tudi genetsko enake. Ugotovili so, da imajo tumorske matične celice številne poti in gene enake tistim v normalnih matičnih celicah, ter da le-te igrajo esencialno vlogo v razvoju tumorja (Reya in sod., 2001; Tysness in Bjerkvig, 2007). Stohastičen model razlaga, da se v tumorju nahajajo različni celični tipi, ki imajo sposobnost tvorbe tumorja, odvisno od mikrookolja v katerem se nahajajo in njihovih interakcij z ostalimi celicami v niši. Variabilnost tumorski lastnosti je značilna tako za tumorje z enako diagnozo kot tudi v enakih tumorjih v različnih časovnih obdobjih. Tumor naj bi tako nastal iz somatskih celic, ki imajo zaradi določene mutacije selektivno prednost za proliferacijo (Bjerkvig in sod., 2009; Cahill in sod., 1999). Hierarhičen model temelji na rakavih matičnih celicah. Rakave matične celice so definirane kot rakave celice, ki so po lastnosti podobne normalnim matičnim celicam in so lahko vir vseh celičnih tipov, ki se nahajajo v določenem tumorju. V skladu s hierarhičnim modelom so rakave matične celice tumorigene celice, ki tvorijo tumor v procesih samo-obnavljanja in diferenciacije. Smatra se, da so rakave matične celice ločena populacija v tumorju in povzročajo ponovitve ter metastaziranje tumorjev. Rakave matične celice lahko izvirajo iz različnih populacij celic; nastanejo lahko iz normalnih matičnih celic, iz progenitorskih celic, diferenciranih normalnih celic ali pa diferenciranih tumorskih celic, ki se de-diferencirajo do matične celice (Bjerkvig in sod., 2009).

Kot že bilo že omenjeno so tumorji celično in molekularno zelo heterogeni, znotraj njih pa najdemo tudi rakave matične celice. Novejše raziskave kažejo na to, da rakave matične celice nastanejo delno kot posledica prehoda fenotipa stromalnih komponent tumorja iz epitelialnega v mezenhimskega (EMT, angl. epithelial to mesenchymal transitions) (Singh in Settleman, 2010). EMT je transdiferencijski program, ki je sicer potreben pri normalnem razvoju embrionalnega tkiva, vendar dokazano poteka tudi v tumorjih. Proces EMT lahko regulirajo različni citokini in rastni faktorji kot so TGF β . Prav aktivnost teh istih faktorjev pa je pri malignem napredovanju tumorjev precej spremenjena. Kot

posledica indukcije EMT rakave celice pridobijo invazivne lastnosti in metastazirajo. Vse več dokazov pa je tudi o tem, da EMT ne le povzroča večje metastaziranje, ampak pripomore tudi k odpornosti tumorja na različna zdravila (Singh in Settleman, 2010).

2.4 MOŽGANSKI TUMORJI

Možganski tumorji so zelo heterogena skupina, tako po vrsti celic iz katerih nastanejo, kot tudi po načinih in izidu zdravljenja (Levičar in sod., 2002). WHO (World Health Organization) deli tumorje centralnega živčevja glede na njihov izvor na tumorje nevroepitelnega tkiva, kranialnih in paraspinalnih živcev, možganskih ovojnic, sedelne regije, tumorje zarodnih celic, limfome in hematopoetske neoplazme ter metastaze iz drugih delov telesa. Tumorji nevroepitelnega tkiva so nadalje razdeljeni na astrocitne, oligodendrogialne, oligoastrocitne, ependimske, nevralne in mešane nevro-gialne, tumorje horoidnega plesusa, epifizne regije, embrionalne in druge nevroepitelne tumorje. Astrocitni tumorji se delijo tudi še naprej, tako glede na njihov (teoretični) celični izvor kot po stopnjah malignosti (Louis in sod., 2007). Histološka klasifikacija WHO deli astrocitome na štiri stopnje. Prva in druga stopnja so nizko maligni astrocitomi, tretja in četrta stopnja pa visoko maligni, vključno z anaplastičnim astrocitomom in multiformnim glioblastomom (Preglednica 2) (Kleinhaus in sod., 1993, cit. po Magdič in Sinkovič, 2003). Astrocitomi četrte stopnje po WHO so izredno agresivni, s hitrim pred- in po-operacijskim razvojem. Sodijo med najbolj smrtonosne tumorje nasploh, čeprav redko metastazirajo izven centralnega živčevja. Histološkim znakom malignosti se pridružijo nekroze, obsežna proliferacija žilja in difuzna infiltracija posamičnih celic v zdravo tkivo. Vse standardne terapije, ki se uporabljajo pri teh bolnikih imajo večinoma zgolj paliativni učinek (Maher in sod., 2001; Radner in sod., 2002; Ohgaki in Kleihues, 2005; Louis in sod., 2007).

Preglednica 2: Klasifikacija astrocitnih tumorjev po WHO (Louis in sod., 2007)

DELITEV GLEDE NA CELIČNI IZVOR	STOPNJA MALIGNOSTI PO WHO
pilocitni astrocitom subependimski velikocelični astrocitom	I
pilomiksoidni astrocitom pleomorfni ksantoastrocitom difuzni astrocitom	II
anaplastični astrocitom	III
mutiformni glioblastom velikocelični glioblastom gliosarkom	IV

Možganski tumorji so lahko primarni ali sekundarni. Najpogostejši so sekundarni ali metastatski tumorji, pri čemer gre za zasevke iz drugih primarnih rakov - dojke, pljuč, črevesa idr. Najpogostejši primarni možganski tumorji pa so gliomi (Društvo onkoloških bolnikov Slovenije). Gliomi zajemajo vse primarne tumorje centralnega živčnega sistema, ki so glialnega izvora (nastanejo iz opornih celic možgan tj. glialnih celic) (Rao, 2003). Glede na izvirno celico jih delimo v 2 skupini: astrocitome in oligodendrogliome. Pojavljajo se lahko v benigni obliki, v anaplastični obliki ali kot glioblastom. Hitrost rasti kot tudi preživetje sta odvisna od vrste (histološke slike) tumorja in njegove lege.

Zaenkrat edini potrjeni okoljski dejavnik tveganja za razvoj možganskih tumorjev je dolgotrajna izpostavljenost ionizirajočim sevanjem. Kljub nekaterim študijam trenutno ni jasne povezave med razvojem možganskih tumorjev in prehrano ali izpostavljenostjo elektromagnetnim sevanjem, npr. bivanjem v bližini električnih daljnovodov in uporabo prenosnih telefonov. (Ohgaki in Kleihues, 2005; Hardell in sod., 2007)

2.4.1 Multiformni glioblastom

Glioblastoma multiformae ali multiformni glioblastom je najbolj agresivna in najbolj invazivna oblika možganskih tumorjev, ki ima najslabšo prognozo od vseh oblik gliomov. Poleg običajne obstaja še nekaj posebnih histoloških različic glioblastomov (Preglednica 2), ki lahko poleg znakov glialnega izvora kažejo še znake drugačne, npr. mezenhimske diferenciacije, vendar so ti primeri redki (Louis in sod., 2007). Glede na nastanek bolezni ločimo primarne in sekundarne glioblastome. Primarni glioblastomi, ki predstavljajo večino, nastajajo »de novo«, brez predhodnih dokazov o bolezni, med tem ko se sekundarni glioblastomi razvijejo iz tumorjev II in III stopnje po WHO, najverjetneje z akumulacijo genetskih sprememb. Običajno se razvijejo pri mlajših bolnikih, 5-10 let po odstranitvi prvotnega tumorja in predstavljajo manj kot 5% vseh glioblastomov (Maher in sod., 2001; Ohgaki in Kleihues, 2007). Povprečna starost ob odkritju je 62 let, incidenca glioblastoma pa s starostjo narašča (Magdič in Sinkovič, 2003). Bolniki s to obliko gliomov preživijo do 15 mesecev (Hoelzniger in sod., 2007).

Genetske spremembe, ki spremljajo nastanek primarnih glioblastomov vključujejo podvajanje gena receptorja za epidermalni rastni faktor EGFR (angl. epidermal growth factor receptor) in izgubo kromosoma 10. Za celice primarnega glioblastoma (pa tudi rakave celice na splošno) je značilno izrazito povišano izražanje EGFR (Ichimura in sod., 1998; Von Deimling, 2000). EGFR je transmembranski protein (receptor), ki vsebuje zunajcelični del, ki predstavlja vezavno mesto za vezavo rastnih faktorjev kot sta

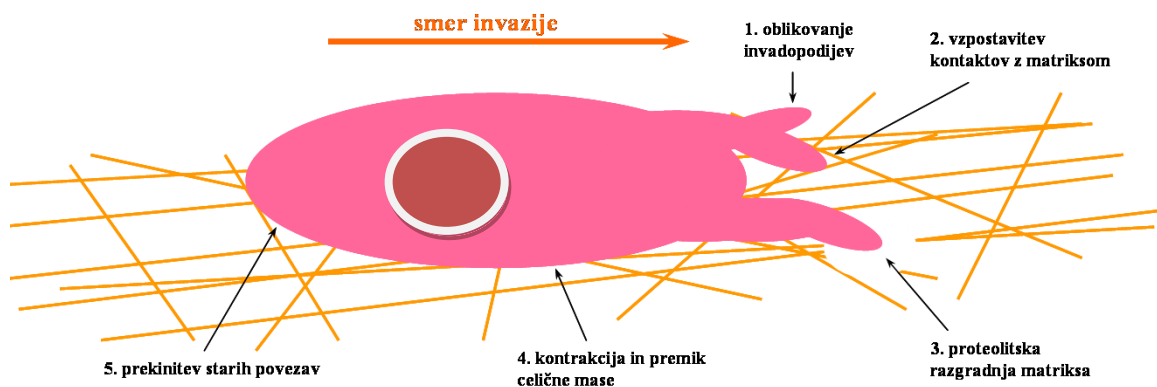
epidermalni rastni faktor EGF (angl. epidermal growth factor) in transformirajoči rastni faktor α TGF α (angl. transforming growth factor alpha). Drugi, znotrajcelični del EGFR ima tirozin kinazno aktivnost. Vezava liganda na EGFR povzroči dimerizacijo receptorjev, povezeta se lahko bodisi dva EGFR ali en EGFR in kateri drugi receptor iz družine ERBBR. Dimerizacija povzroči tirozin kinazno aktivnost v znotrajceličnem delu EGFR ter avtofosforilacijo proteina. Temu sledi iniciacija kaskadnih reakcij katerih posledica so: zmanjšana apoptoza, povečana invazivnost in metastaziranje, povečana angiogeneza in povečana celična proliferacija. EGFR lahko mutira tako, da je tirozinska kinaza stalno aktivna ali pa mutirajo geni za rastne faktorje, kar povzroči višjo koncentracijo rastnih faktorjev v tumorskih celicah (Baselga, 2002, cit. po Ocvirk 2008).

V 30% primerov glioblastoma pride tudi do delecije ali mutacije gena PTEN (imenovan tudi MMAC1 ali TEP1). V sekundarnih glioblastomih, ne pa tudi v primarnih, pogosto pride do mutacije gena p53 (Von Deimling, 1992; Von Deimling, 1993; Li, 1997). Nedavno so znanstveniki odkrili še dva gena, ki naj bi imela največji nadzor nad razvojem glioblastomov. To sta gena C/EBP β in Stat3, ki delujeta skupaj in kot transkripcijska faktorja aktivirata še stotine drugih genov za transformacijo možganske celice v zelo agresivno in migratorno tumorsko celico. Gena reprogramirata živčne matične celice v nenormalno mezenhimsko linijo. Mezenhimski fenotip pa je v multifornih glioblastomih znak agresivnega tumorja, ki ima zelo slabo prognozo (Carro in sod., 2010). Gena sta aktivna pri 60% bolnikov z diagnozo multifornega glioblastoma. Tarčno usmerjeno zdravljenje s supresijo obeh dveh genov hkrati bi bil lahko v kombinaciji z različnimi zdravili zelo učinkovit terapevtski pristop pri zdravljenju teh bolnikov (Paddock, 2009).

2.4.2 Invazivnost glioblastomov

Celična invazija je na splošno pomemben dogodek v progresivni, nekontrolirani proliferaciji celic, prav tako pa je to tudi pomemben proces na specifičnih stopnjah embriogeneze in razvoja osebka (Tysnes in Mahesparan, 2001). Infiltracija glioblastomskih celic iz glavne tumorske mase v okoliško možganovino poteka kot invazija posamičnih tumorskih celic, pri čemer pa prihaja do le minimalnih poškodb obstoječih struktur možganskega tkiva. Invazija je večfazen proces, nanjo pa vplivajo avtokrini in parakrini dejavniki, zunajcelični matriks, medcelične interakcije, ter celice tumorske strome (Giese in Westphal, 1996). Širjenje in invazivna rast glioblastomov nista tudi nujno povezana s stopnjo malignosti (Schiffer in sod., 1998).

Invazijo verjetno sprožijo signali, ki so povezani z razvojem zakisanega, hipoksičnega okolja v tumorju. Do tega pride ko tumor preseže velikost, ki omogoča normalno oskrbo celic v notranjosti s kisikom in hranili ter odstranjevanje metabolnih produktov. Najbolje proučen signal, ki sproži povišanje izražanja genov povezanih z invazijo, kot so proteaze in TGF α , je HIF-1 (angl. hypoxia inducible factor-1). Nadalnje vzdrževanje invazije pa je potem odvisno od tumorskih avtokrinih in parakrinih signalov, ki jih izločajo tako tumorske kot tudi okoliške celice (Hoelzinger in sod., 2007; Kaur in sod., 2005). Signali, ki sprožijo invazijo, hkrati določijo tudi njeno začetno smer. Delujejo kot kemorepelent, ki celice usmeri stran od slabih, hipoksičnih pogojev za življenje. Ko pa celice zapustijo tumorsko maso pridejo v okolju, kjer z normalno koncentracijo kisika (Werbowsky in sod., 2004). Ko vdirajoče glioblastomske celice prečkajo možganski parenhim, nanje vplivajo zunajcelični signali, ki usmerjajo invazijo, podobno kot se to dogaja pri migraciji živčnih prekursorskih celic tekom nevralnega razvoja. Nadaljevanje invazije in njena smer sta sedaj odvisni tako od interakcij in faktorjev, ki jih posredujejo okoliške ne-tumorske celice in zunajcelični matriks, kot tudi od avtokrinih zank, ki jih ustvarjajo vdirajoče celice same (Hoelzinger in sod., 2007, 2008).



Slika 4: Proces invazije po stopnjah. Na napredujočem koncu celice se oblikujejo invadopodiji (1), ki vzpostavijo kontakt z zunajceličnim matriksom (2). Sledi usmerjeno razgrajevanje matriksa (3), s čimer se ustvari prostor za premik glavne celične mase (4). Ob tem celica na svojem zadnjem koncu še prekine povezave z okoliškimi celicami in matriksom (5) (Gole, 2009).

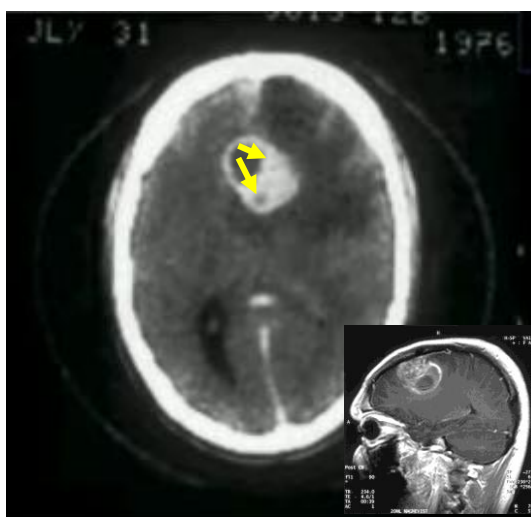
Med invazijo tumorskih celic prihaja do sprememb v adheziji celic, proteolitične razgradnje zunajceličnega matriksa in migracije, za kar pa so potrebne tudi strukturne spremembe zunajceličnega matriksa (Tysnes in Mahesparan, 2001). Na celičnem nivoju je invazija posamičnih celic večstopenjski proces (Slika 4). Prične se z oblikovanjem invadopodijev na napredujočem koncu celic, kjer filamenti citoskeleta potisnejo celično membrano naprej. Sledi vzpostavitev kontaktov med napredujočo celično membrano in okoliškim zunajceličnim matriksom s pomočjo integrinov in adhezija celice na novo mesto. Vzpostavitev kontaktov z zunajceličnim matriksom sproži signalne poti, ki na mesto napredovanja privlačijo površinske proteaze, ki nato v proteolitski kaskadi usmerjeno razgradijo zunajcelični matriks ter naredijo prostor za celico. Take proteolitične modifikacije komponent zunajceličnega matriksa, kot sta laminin in fibronektin še pospešijo širjenje tumorskih celic. S kontrakcijo zadnjega dela se naprej premakne še glavnina celične mase, ki mora ob tem na svojem zadnjem delu še prekiniti povezave z ostalimi celicami in okoliškim matriksom. S ponavljanjem cikla prekinjanja starih, vzpostavljanja novih povezav in razgradnje zunajceličnega matriksa se celica počasi premika v smeri invazije. Hitrost procesa je pogojena z močjo interakcij vdirajoče celice z drugimi celicami v tkivu, ki invazijo upočasnjujejo, in njeno sposobnostjo vzpostavljanja povezav z okoliškim matriksom, kar proces pospešuje. Izguba medceličnih povezav in velika sposobnost interakcij z zunajceličnim matriksom se tako odrazita v visoki invazivnosti, značilni za glioblastome (Bellail in sod., 2004, cit. po Gole, 2009; Sahai, 2005, cit. po Gole, 2009; Hegedüs in sod., 2006, cit. po Gole, 2009; Strojnik in sod., 2005).

Zunajcelični matriks prostorninsko predstavlja le 20% možganovine. Glavne sestavine normalnega zunajceličnega matriksa možganov so hialuronan, proteoglikani kot sta verzikan in agrekan, tenascin C, trombospondin in glikozaminoglikani- hialuronska kislina, hondroitin-sulfat, keratan-sulfat in heparan-sulfat. Ker ne vsebuje fibrilarnih proteinov kot so kolageni in fibronektin, ki bi mu dali trdnost, gre za zelo rahlo strukturo, ki pa je zaradi svoje kemijske sestave vseeno slabo prehodna za tumorske celice (Giese in Westphal, 1996; Bellail in sod., 2004). Transformirane glia celice zato pri invaziji preferenčno sledijo anatomskim strukturam kot so mielinizirani aksoni, bazalna lamina žil in subependima, pri čemer pa ne vdirajo v lumen žil (Maher in sod., 2001; Bellail in sod., 2004; Hoelzinger in sod., 2007). Zunajcelični matriks, ki obdaja prostor okrog žil predstavlja večino zunajceličnega matriksa v možganih odrasle osebe. Zaradi svoje drugačne sestave zunajcelični matriks, ki se nahaja okrog teh struktur omogoča lažjo invazijo tumorskih celic. Večinoma ga sestavljajo kolageni tipa IV in V, fibronektin, laminin, vitronektin, heparin-supat proteoglikani in glikozaminoglikani (Rao, 2003). Poleg tega tumorske celice aktivno spreminjajo sestavo zunajceličnega matriksa. Tumorski matriks, ki s tem nastaja, je dobro prehodan za glioblastomske celice. Večinoma gre za odebelitve in rahljanje bazalnih lamin žilja, tudi na novo nastajajoče tumorske mikrovaskulature. S tem se povečata tako skupna prostornina matriksa kot prostornina praznega prostora v njem. S kemijskega

stališča so v tumorskem matriksu povišane vsebnosti laminina, fibronektina in kolagenov (Giese in Westphal, 1996; Zámečník in sod., 2004; Liang in sod., 2005).

Na proces invazije vplivajo tudi ne-tumorske celice v tumorskem tkivu - t.i. stromalne celice, ki jih tumorske celice aktivno privlačijo, da sodelujejo v tumorskih procesih. Pri bolj invazivnih glioblastomih s slabšo prognozo preživetja je na primer opaziti višje izražanje genov, ki sodelujejo pri migraciji makrofagov na mesto. Makrofagi v gliomih in tudi drugih tumorjih spodbujajo invazijo preko vrste citokinov, ki posredujejo povišano produkcijo proteaz, potrebnih za razgradnjo zunajceličnega matriksa (Mueller in Fusenig, 2004; Sameni in sod., 2003; Pollard, 2004; Liang in sod., 2005).

Študije kažejo, da sposobnost tumorskih celic za razgradnjo zunajceličnega matriksa z izločanjem proteoliznih encimov korelira z njihovo invazivnostjo. Za večino primarnih možganskih tumorjev se sklepa, da njihova invazija vsaj delno poteka s pomočjo proteaz-serinskih, cisteinskih in metaloproteaz, ki se prehajajo skozi tkivno pregrado, vezivno tkivo, spodbudijo prestrukturiranje žil in uničijo normalno možgansko tkivo. Ker so imunohistološke analize pokazale prisotnost kolagena, fibronektina, laminina in kolagena tipa IV na meji med zdravim možganskim tkivom in gliomskimi celicami (Rao, 2003), lahko proteaze, ki te komponente zunajceličnega matriksa razgrajujejo povežemo z invazivnostjo tumorskih celic.



Slika 5: Multifomni glioblastom (Christaras, 2006). Rumene puščice prikazujejo invazijo tumorskih celic iz glavne tumorske mase v okoliško možganovino.

2.5 PROTEAZE

Proteaze, proteinaze oz. peptidaze, so encimi, ki katalizirajo razgradnjo beljakovin v manjše peptide oz. popolno razgradnjo do aminokislinskih preostankov. Proteaze so razvrščene v posamezne razrede in klane. Glede na katalitski mehanizem delimo proteaze na več razredov – serinske, aspartatne, cisteinske proteaze, matriksne metaloproteaze (MMP) in druge (Puente in sod., 2003, cit. po Vozelj in sod.; Rawlings in Barrett, 1993, cit. po Vozelj in sod., 2007).

Cisteinske proteaze so pogosto prisotne v telesu (od vseh 561 genov, ki kodirajo za proteaze, je 148 tistih, ki kodirajo za cisteinske proteaze). Najbolj poznane človeške cisteinske proteaze so katepsini, ki se v aktivirani obliki najpogosteje nahajajo v lizosomih. Pri cisteinskih proteazah poznamo 16 različnih družin. Cisteinski katepsini spadajo v klan CA (Turk in sod., 2001). V razred cisteinskih proteaz spadajo katepsini B, C, F, H, K, L, O, S, V, W in X (Premzl in sod. 2003). Najbolj splošna vloga cisteinskih katepsinov je lizosomska razgradnja proteinov kot del celičnega reciklažnega sistema. To se odraža tudi v vsenavzoči prisotnosti cisteinskih katepsinov v telesnih tkivih. Večina cisteinskih katepsinov ima tudi zelo specifične vloge in nekateri temu primerno razporeditev zgolj v določenih tkivih oz. organih, prisotni pa so lahko tudi v drugih celičnih razdelkih in ne le v lizosomih (Victor in Sloane, 2007; Vasiljeva in Turk, 2008).

2.5.1 Delovanje proteaz

Proteaze so selektivno delujoče, kajti posamezna proteaza razgradi polipeptidno verigo glede na specifično zaporedje aminokislin in pod določenimi pogoji okolja. Proteaze omogočajo znotrajcelično in zunajcelično razgradnjo proteinov, regulirajo aktivacijo pro-encimov in pro-hormonov, sodelujejo pri predstavitvi antigenov, preoblikovanju kostnega tkiva, razgradnji in preoblikovanju zunajceličnega matriksa, sodelujejo pri procesu razvoja embria, pri ovulaciji, zdravljenju ran, migraciji monocitov, kaskadi strjevanja krvi, imunskem odzivu in pri procesu programirane celične smrti ali apoptoze. Povečano delovanje proteaz so dokazali pri številnih tumorjih, vključno pri raku dojk, pljučnem raku, možganskih tumorjih, raku črevesja, raku glave in vratu ter melanomih. V malignih procesih imajo proteaze vlogo pri invaziji, metastaziranju, angiogenezi in tudi pri rasti tumorjev, hkrati pa tudi v procesih, ki lahko povzročijo remisijo maligne bolezni (apoptoza tumorskih celic, protitumorski imunski odziv). V medicini predstavljajo proteaze zaradi njihove regulatorne vloge ter udeležnosti pri patoloških procesih potencialne tarče za terapijo. Hkrati pa kažejo proteaze velik potencial kot diagnostični in/ali prognozični dejavniki pri rakavih obolenjih. (Rawling in sod., 2002, cit. po Vozelj in sod.; Mignatti in

Rifkin, 1993, cit. po Vozelj in sod.; Koblinski in sod., 2000, cit. po Vozelj in sod.; Nagase in Woessner, 1999, cit. po Vozelj in sod., 2007).

Kot povzemajo Mohamed in Sloane (2006), je mehanizmov zaradi katerih pride do (pre)visokega izražanja cisteinskih katepsinov v tumorskih tkivih več in se razlikujejo tako med različnimi katepsini kot med različnimi vrstami raka. Pomnožen je lahko gen za katepsin B, povišano izražanje nekaterih katepsinov pa je lahko posledica epigenetske regulacije z metilacijo dela promotorja. Alternativni promotorji in povezovanje vodijo v različice transkriptov katepsinov B in L, ki se razlikujejo po učinkovitosti prepisovanja in stabilnosti transkriptov.

Katepsini se sintetizirajo kot neaktivni prepro-proteini z N-terminalnim propeptidom, ki zakriva aktivno mesto in tako preprečuje dostop substratov do njega (Turk in sod., 2001). Med transportom v endoplazemski retikulum se pre-peptid odstrani, pro-peptid pa se usmeri v Golgijev aparat, kjer je glikoziliran, fosforiliran in se tvorijo disulfidni mostički. Pro-encimi se potem z drugimi proteazami ali proteolitično aktivirajo v poznem endosomu ali lizosomu (Kirschke in sod., 1995). Navadno se katepsini nahajajo v lizosomih, pod določenimi pogoji pa se lahko tudi izločajo iz celice v prekursorski in/ali aktivni obliki (Cavallo-Medved in Sloane, 2003).

Aktivnost cisteinskih katepsinov je regulirana na vseh ravneh njihove biosinteze. Ta vključuje transkripcijo, posttraslacijske modifikacije in potovanje v lizosome. V končnem je aktivnost regulirana tudi z njihovimi endogenimi inhibitorji, med katerimi so najbolj poznani stefini, cistatini, tiropini in inhibitor proteaz $\alpha 2$ -makroglobulin (Premzl in sod., 2003; Gole, 2009). Lizosomalni katepsinini se aktivirajo z nizkim pH, ki oslabi povezavo med pro-peptidom in katalitični delom molekule. Aktivacija in procesiranje katepsinov lahko poteka znotraj celično (v lizosomih), na plazemski membrani ali zunajcelično. Kadar se izločajo kot pro-peptidi se lahko z endocitozo vključijo nazaj v isto celico ali pa jih vključi sosednja, stromalna celica. Tako se lahko npr. katepsin B aktivira pri nizkem pH znotraj celice, nato pa se zunajcelično, pri fiziološkem pH pritrdi na velik proteinski substrat (Laurent in sod., 1998; Frosch in sod., 1999).

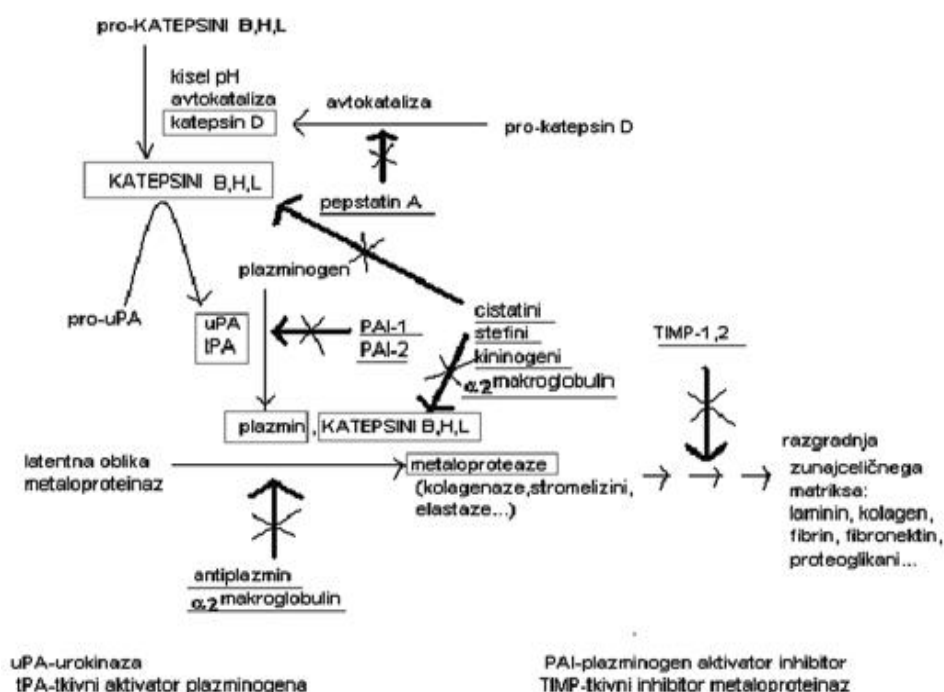
Cisteinski katepsini so vključeni v procese kot so proteinsko procesiranje, reprodukcija, MHC-II antigenska predstavitev, resorpcija kosti, apoptoza, diferenciacija keratinocitov. Hkrati sodelujejo v patoloških procesih kot so vnetje, nevrodegeneracija, ateroskleroza, artritis, pankreatitis, itn. Imajo tudi pomembne funkcije povezane z razvojem in napredovanjem rakavih obolenj. V programirani celični smrti- apoptozi imajo cisteinski katepsini dvojno vlogo. Po eni strani aktivno sodelujejo v procesu apoptoze, po drugi strani pa imajo zaščitno vlogo pred indukcijo apoptoze. Katepsin B deluje pro-apoptotsko, vloga

katepsina L pa je obratna, saj sta njegovo povišano izražanje in aktivnost povezana z povišano odpornostjo na indukcijo apoptoze. Povišano izražanje predvsem katepsina L je povezano s proliferacijo tumorskih celic in s tem z rastjo tumorja, ter s tumorigenostjo, tj. sposobnostjo vzpostavljanja tumorjev (Turk in sod., 2001; Berdowska, 2004; Palermo in Joyce, 2008; Kos in Lah, 1998; Premzl in sod., 2003).

2.5.2 Vloga proteaz v invaziji

Razgradnja zunajceličnega matriksa je ključen proces, ki skupaj s proteolizno prekinitvijo povezav celic z matriksom in drugimi celicami omogoča vdiranje in metastaziranje tumorskih celic (Gocheva in Joyce, 2007). V procesu invazije sodelujejo cisteinske proteaze (predvsem katepsina L in B), aspartatne proteaze (katepsin D), MMP, v veliki meri pa tudi serinske proteaze (uPA). Vse omenjene proteaze pripomorejo k razgradnji zunajceličnega matriksa in bazalne lamine bodisi preko direktne razgradnje (katepsina B in L) ali preko sodelovanja v proteolizi in aktiviranju drugih proteaz (MMP, elastaze). Katepsin L kaže močno afiniteto za kolagen tipa I in IV, elastin in fibronektin, katepsin B pa razgrajuje laminin, fibronektin in kolagene. V zdravih celicah obstaja ravnovesje med proteazami in njihovimi inhibitorji (npr.: uPA in PAI-1, MMP in TIMP1, katepsini in cistatini oz. stefini), pri tumorskih celicah pa je to ravnotežje porušeno. Možne so tudi druge interakcije med molekulami proteolitske kaskade (Mueller in sod., 1995, cit. po Vozelj in sod., 2007; Strojnik in sod., 2005).

Invazija je po bolj ali manj splošno sprejetem konceptu proces proteolitične kaskade, ki se lahko začne z aktivacijo katepsina D in cisteinskih katepsinov B in L. Ta dva nadalje aktivirata membransko vezano pro-urokinazo, kar privede do odcepitve plazmina iz plazminogena. Plazmin ima širok spekter specifičnosti, med drugim je sposoben aktivirati različne MMP, točneje MMP-2, MMP-9 in MMP-3, te pa so sposobne obširne razgradnje kolagena in drugih proteinov bazalne lamine (Slika 5). V kaskado, ki lahko poteka tako znotraj kot tudi zunajcelično, so lahko vključeni še drugi proteini (Schmitt in sod., 1992; Levičar in sod., 2002). Tako lahko npr. katepsin B poleg ostalih funkcij razgradi in s tem inaktivira inhibitorja MMP TIMP-1 in TIMP-2 in se tudi v tej zadnji efektorski fazi vključuje v razgradnjo zunajceličnega matriksa (Vozelj in sod., 2007). Prihaja tudi do redundance- posamezne proteaze imajo več različnih vlog in več različnih proteaz enake vloge. Z razgradnjo zunajceličnega matriksa se sproščajo tudi rastni faktorji, ki preko receptorjev na celični površini povratno vplivajo na transkripcijo proteaz v tumorskih celicah in celicah tumorske strome. Hipotetično bi lahko zgolj z inhibicijo začetka kaskade -katepsina B- popolnoma izničili celotno kaskado, vendar to v praksi zaradi redundance v kaskadi ni izvedljivo (Koblinski in sod., 2000; Levičar in sod., 2003; Lah in sod., 2006).



Slika 6: Aktivacija proteaz v procesu razgradnje zunajceličnega matriksa (Schmitt in sod., 1992, cit. po Vozelj in sod., 2007)

Drug proces, pri katerem je pomembna razgradnja zunajceličnega matriksa je tumorska angiogeneza- nastanek tumorskega žilja. Razgradnja matriksa ima tu dvojni pomen, saj poleg fizičnega zagotavljanja prostora za rast žil omogoča sproščanje angiogenih faktorjev, ki proces omogočajo, usmerjajo in nadzorujejo, z njim pa so povezani katepsin B, katepsin L in katepsin S (Gocheva in sod., 2006; Premzl in sod., 2006).

2.5.3 Povezava cisteinskih katepsinov B in L z glioblastomi

Vir cisteinskih katepsinov v tumorskih tkivih niso zgolj tumorske celice. Močan dodaten vir so tudi celice tumorske strome, predvsem fibroblasti in celice imunskega odziva (Koblinski in sod., 2000; Levičar in sod., 2003a; Lah in sod., 2006; Mohamed in Sloane, 2006).

Pozitivno korelacijo med izražanjem katepsina B na ravni mRNA in proteinov ter stopnjo malignosti gliomov so prvi opisali Rempel in sodelavci leta 1994. Kasneje so to potrdili z raziskavami na ravni mRNA, proteinov in aktivnosti tudi drugi avtorji (Mikkelsen in sod., 1995; Sivaparvathi in sod., 1995; Strojnik in sod., 1999 in 2005; Konduri in sod., 2001; Nakabayashi in sod., 2005). Izražanje katepsina B ima pri gliomih tudi napovedno vrednost, in sicer njegovo višje izražanje pomeni krajše preživetje bolnika po diagnozi (Strojnik in sod., 2005). Napovedno vrednost katepsina B povezujemo z njegovo vlogo v invazivnosti gliomov. *In vitro* poskusi so pokazali, da je invazivnost glioblastomskih celic možno zmanjšati tako s sintetičnimi inhibitorji aktivnosti katepsina B, kot z zmanjšanjem njegove mRNA ravni s tehnologijo protismiselne RNA ali utišanjem gena za katepsin B. Slednji genski tehnologiji sta se izkazali za učinkovitejši, v kolikor je bila poleg katepsina B tarča še druga proteaza- MMP9 ali uPA, kar potrjuje, da je katepsin B zgolj del medsebojno odvisnega proteoliznega sistema celic. Funkcionalne *in vitro* poskuse dopolnjujejo še *in vivo* podatki o histološki razporeditvi katepsina B v glioblastomskem tkivu. Imunohistokemijsko so prisotnost katepsina B na robovih gliomov (dejanskem mestu invazije) prvi potrdili Rempel in sodelavci, leta 1994. Nekatere kasnejše raziskave so pokazale celo, da je katepsina B na tumorskih robovih lahko več kot v notranjosti tumorja. Sodelovanje v invaziji tumorskih celic pa ni edina vloga katepsina B v gliomih. Zmanjšanje njegovega izražanja na mRNA ravni, ter s tem posledično zmanjšanje njegove aktivnosti, namreč pomeni tudi manj tumorske angiogeneze in počasnejšo rast tumorjev *in vitro* ter *in vivo*. Z vlogo v tumorski angiogenezi povezujemo tudi njegovo prisotnost v endotelijskih celicah v gliomih (Lah in sod., 2000; Konduri in sod., 2001; Mohanam in sod., 2001; Gondi in sod., 2004a, 2004b; Lakka in sod., 2004; Mikkelsen in sod., 1995; Demchik in sod., 1999; Strojnik in sod., 2000; Yanamandra in sod., 2004).

Izražanje in aktivnost katepsina L se ujema s povišano malignostjo glioma. Čeprav je koncentracija katepsina L v gliomih nižja od koncentracije katepsina B, je njegovo izražanje statistično značilno višje v malignih gliomih kot v benignih (Strojnik in sod., 2005). Glede vloge katepsina L v invaziji gliomskih celic si rezultati različnih študij nasprotujejo. Z inhibicijo aktivnosti katepsina L so Sivaparvathi in sod. (1996) znižali *in vitro* invazivnost glioblastomskih celic, tako kot tudi Levičar in sod. (2003) z uporabo tehnologije protismiselne RNA. Nasprotno pa so z uporabo enake genske tehnologije Zajc

in sod. (2006) pokazali, da katepsin L ne sodeluje v invaziji glioblastomov *in vitro*. Podobno so tudi Gole in sod. (2009) z uporabo specifičnih inhibitorjev in strategijami utišanja pokazali, da je v invazivnost glioblastomskih celic vključen samo katepsin B, ne pa tudi katepsin L. Katepsin L za razliko od katepsina B tudi nima napovedne vrednosti glede dobe preživetja bolnikov (Strojniki in sod., 2005). So pa tako Levičar in sod. (2003) kot Zajc in sod. (2006) pokazali, da povišano izražanje katepsina L ščiti gliomske celice pred indukcijo apoptoze. Katepsin L naj bi sodeloval tudi v tumorski angiogenezi, saj je podobno kot katepsin B prisoten v endotelijskih celicah v gliomih (Strojniki in sod., 2005), njegovo povišano izražanje na mRNA ravni v gliomskih celicah pa je možno inducirati z angiogenim faktorjem VEGF (Keerthivasan in sod., 2007).

2.6 ZDRAVLJENJE GLIOBLASTOMOV

V čvrstih tumorjih tako najdemo celo vrsto različnih celic: maligne, z različnimi mutacijami, imunske celice, fibroblaste in endotelne celice, ki tvorijo žilje tumorja. Ta kompleksnost omogoča usmerjeno zdravljenje raka, ki cilja različne tarčne celice v tumorju. Večina obstoječih načinov zdravljenja je usmerjena proti tumorskim celicam, kar pa je zahtevna naloga. Za uspešno zdravljenje so pomembne samo tiste, ki so sposobne celične delitve. Takih klonogenih ali matičnih tumorskih celic je lahko v tumorju do 20%. Za ozdravitev je potrebno odstraniti vse do zadnje, da ne bi prišlo do ponovne izrasti tumorja (Serša, 2009). Eden glavnih vzrokov za neuspešnost zdravljenja glioblastomov je v njihovi infiltrativni naravi. Invazija posamičnih tumorskih celic v zdravo možganovino onemogoča popolno kirurško odstranitev tumorja, dodatno pa so te celice še zelo odporne na kemo- in radio-terapijo, saj imajo povišano raven izražanja proti-apoptotskih genov oz. znižano raven pro-apoptotskih (Gole, 2009).

Zdravljenje glioblastomov je možno s kirurškim posegom, radioterapijo in kemoterapijo s temozolomidom (Norden in sod., 2008). Za zdravljenje bolnikov z GBM, ki se jim je bolezen po prvem zdravljenju ponovila oz. je napredovala, so možnosti nadaljnjega zdravljenja zelo omejene; primerni sta le paliativna radioterapija in kemoterapija. Ob napredovanju bolezni so pričakovani učinki zdravljenja slabši kot ob prvem zdravljenju, slabši je odgovor na zdravljenje in krajše je pričakovano srednje preživetje (Vredenburgh in sod., 2007). Ker je bolezen neozdravljiva, ima poleg podaljšanja življenja ključni pomen obdobje brez napredovanja bolezni. Ena izmed novih tarč za zdravljenja (angiogeneza) je zelo pomembna tudi pri glioblastomih, saj so to zelo ožiljeni tumorji. Boljše poznavanje molekularne patogeneze je vodilo v razvoj tarčnega zdravljenja. Primer takšnega

zdravljenja je uporaba monoklonskih protiteles (npr. Bevacizumab), ki zmanjšajo angiogenezo (Ocvirk, 2009).

Ena od možnosti zdravljenja pa je tudi genska terapija, ki je specifična vrsta zdravljenja raka. Osnovni princip genske terapije je z vnosom specifičnega gena v celice selektivno vplivati na tumorske celice. Z vnosom terapevtskega gena v tarčno tkivo se inducira ekspresijo tumor supresorskih genov, utiša ekspresijo dominantnih onkogenov, spodbudi imunski odziv oz. sproži imunogenost tarčnega tkiva, aktivira encime za nastanek citotoksičnih produktov, deluje antiangiogeno ali onkolitično (Pecorino in sod., 2008; Tannock in Hill., 2007; Štrukelj in Kos, 2007; Kosmodel in Spitz., 2003; Čemžar in Serša, 2007). Med terapevtske gene, ki so se izkazali za zelo učinkovite v predkliničnih raziskavah in so prešli v klinične raziskave, sodijo: tumor supresorski gen p53, anti-sense oligonukleotidi in siRNA-molekule, ki s specifično vezavo na tarčno mRNA onkogeno inhibirajo njegovo ekspresijo (npr. Her-2/neu, cyclin-E, c-myc), geni za interlevkine (IL-2, IL-4, IL-12), HLA-B7 in MHC, ki stimulirajo protirakavi imunski odgovor, gen timidin kinaze virusa Herpes simplex, ki v tarčnih celicah aktivira sistemsko vnesen ganciklovir (GCV), aktiven GCV pa vpliva na inhibicijo sinteze DNA v delečih se celicah ter najpogosteje študirana onkolitični adenovirus ONYX-015 in virus Herpes simplex G207, ki z delitvami samo v tumorskih celicah povzročita lizo celic, stimulirata imunski odziv na tumorske celice ali med delitvijo sprožita nastanek toksičnih produktov (Palmer in sod., 2006). Na ta način lahko lokalno v tumorju vplivamo na rast tumorskih celic, lahko pa delujemo tudi sistemsko v primeru, ko z gensko terapijo vnašamo v mišico ali kožo gene, ki izločajo imunostimulatorne molekule s protitumorskim delovanjem (Serša, 2009).

2.6.1 Uporaba MMC pri zdravljenju glioblastomov

Ker MMC dokazano migrirajo na mesta poškodb in mesta kjer se razvijajo tumorji, bi jih lahko uporabili kot dostavne sisteme za zdravljenje glioblastomov (Motaln in sod., 2010). MMC imajo zelo dobre migratorne sposobnosti in zato lahko dosežejo tudi tumorske celice, ki so iz glavne tumorske mase vdrle v okoliško tkivo, poleg tega pa imajo še inhibitorne efekte na proliferacijo glioma celic (Hamada in sod., 2005). Dokazali so, da MMC izolirane iz kostnega mozga *in vivo* učinkovito potujejo v tumor in gliomske ksenografte (Aboody in sod., 2000; Nakamizo in sod. 2006). Migracijo MMC k tumorjem povezujejo s povišanim izražanjem vnetnih dejavnikov kot so IL-6, IL-8 in MCP-1, ti pa naj bi delovali preko uPA in njegovega receptorjem uPAR na tumorskih celicah (Gutova in sod., 2008). Poleg teh naj bi v procesu migracije matičnih celic v normalnih in patoloških razmerah sodelovali še številni drugi citokini in njihovi receptorji. Med njimi so SDF-1/CXCR4, SCF/c-kit, HGF/c-Met, VEGF/VEGFR in MCP-1/CCR4 (Imitola in sod., 2004;

Kucia in sod., 2005; Erlandsson in sod., 2004; Heese in sod., 2005; Kendall in sod., 2008; Schmidt in sod., 2005; Widera in sod., 2004; Palumbo in sod., 2004; Palumbo in sod., 2007). Na žalost *in vitro* namnožene kulture MMC izražajo precej nižjo stopnjo tropizma za migracijo v kostni mozeg in poškodovana tkiva, zaradi izgube CXCR4 receptorja. Kljub vsemu pa se pri 3D gojenju MMC v sferoidih poveča signalizacija SDF-1 (CXCL12), ki obnovi izražanje CXCR4 in potencial za migracijo MMC v tumorsko ali poškodovano tkivo (Potapova in sod., 2008).

Motaln in sod. (2010) so pokazali, da celice GBM U251 ali njihov kondicioniran medij statistično značilno zvišata invazivnost MMC, obratno pa MMC ali njihov kondicioniran medij statistično značilno zniža invazivnost celic U251. Podobno so Schichor in sod. (2006) dokazali da VEGF-A, ki ga izločajo tudi glioblastomske celice povečajo invazivnost MMC. *In vivo* je potencial potovanja MMC v poškodovana ali tumorska tkiva reguliran z adhezijo MMC na endotelij, kar lahko dosežemo s predhodno »obdelavo« endotelijskih celic s pro-apoptotskimi dejavniki (Potapova in sod., 2009). Migracijo MMC pa pospešijo še nekateri drugi angiogeni in vnetni citokini ter rastni faktorji kot so IL-8, neurotropin-3, TGF β , IL-1 β , TNF α , EGF in SDF-1 (Nakamizo in sod, 2006; Ries in sod., 2007). Mnoge od teh izločajo tumorji, s čimer privlačijo MMC (Nakamito in sod., 2006). *In vivo* migracijo in/ali invazijo MMC spremljajo še MMP-2, MMP tipa 1, MMP-9 in njihovi inhibitorji TIMP-1 in TIMP-2, ki jih izločajo same MMC (Ries in sod., 2007). Tako bi *in vivo* proces migracije MMC do poškodovanih tkiv lahko optimizirali s kontroliranim koncentracijskim gradientom citokinov, ki privlačijo MMC na mesto poškodovanega tkiva, iz kostnega mozga preko perifernega krvnega obtoka. Tak koncentracijski gradient SDF-1, ki privlači MMC iz kostnega mozga se npr. vzpostavi pri poškodbi miokarda *in vivo* (Lee in sod., 2009).

Vsaditev MMC na mesto poškodbe ni vedno optimalno, vendar obstaja veliko možnosti za izboljšave. Tako npr. predhodna diferenciacija MMC v hondrocite *in vitro* očitno izboljša prijetje presadka pri zdravljenju hrustanca (Moioli in sod., 2006). Prijetje presadka celic lahko izboljšajo tudi določene genetske modifikacije ali (istočasno) vbrizganje MMC z rastnimi faktorji ali pa ko-transplantacija MMC z zdravimi deli tkiva (Moioli in sod., 2006; Denielyan in sod., 2009; Figliuzzi in sod, 2009).

Pred klinično uporabo MMC bi bila potrebna *in vitro* namnožitev teh celic, saj iz kostnega mozga izoliramo le majhno število MMC. Zaradi pojava senescence pri *in vitro* kultivaciji teh celic, ki po določenem številu pasaj ustavi njihovo rast in hipotez o možni maligni transformaciji MMC bi bilo potrebno MMC pred njihovo uporabo za zdravljenje tumorjev genetsko spremeniti (Motaln in sod., 2010). Omejeno življensko dobo MMC bi lahko podaljšali z virusno transdukcijo humane telomerazne reverzne transkriptaze (hTERT). Pri

MMC z lentivirusno transdukcijo ne prihaja do senscence ali maligne transformacije, prav tako pa tudi ne kaže endogene telomerazne aktivnosti. V teh celicah tudi izražanje tumor supresorskih genov Rb, p21, p53 ni znižano, zaradi česar lahko predvidevamo, da te celice rastejo normalno (Bocker in sod., 2008). Torej je lentivirusna transdukcija hTERT varen način za pripravo nesmrtnih nemalignih celic za nadaljnje genske spremembe in uporabo v terapiji (Stoff-Khalili in sod., 2007). Glavni namen strategij za inhibicijo rasti tumorja je, da bi MMC tako gensko spremenili, da bi delovale kot dostavni sistem za proti tumorske učinkovine, ki bi delovale citotoksično na tumorske (matične) celice in nepovratno ter poponoma odpravile tumor (Motaln in sod., 2010). Gensko spremenjene MMC s terapevtskimi citokini bi bile tako zelo uporabne tako pri zdravljenju poškodb možganskega tkiva (npr. pri možganskem infarktu), kot tudi malignih možganskih neoplazm (Hamada in sod., 2005).

Kljub spodbudnim rezultatom raziskav uporabe MMC v celični terapiji pa moramo biti pri njihovi uporabi zelo previdni. Po eni strani MMC zmanjšajo proliferacijo ter invazijo gliomskih celic (Motaln in sod., 2010), dokazano pa tudi inhibirajo rast in maligni fenotip hepatoma z znižanjem izražanja onkogenov (c-myc, jedrni antigen proliferajočih celic PCNA, survivin in β -katenin) in podaljšajo latentni čas tvorbe tumorja (Qiao in sod., 2008). Vplive MMC z vstavljenimi geni za IL-2, na zmanjšan volumen glioma so dokazali tudi Hamada in sod. (2005). Obstajajo tudi dokazi o pozitivnem vplivu na zaviranje raka v drugih celicah. Tako je bilo npr. dokazano, da MMC zavirajo maligni fenotip rakavih jetrnih celic tako *in vivo* kot tudi *in vitro* (Torsvik in sod., 2010). Na žalost pa so MMC tudi možni kandidati za izvor raka zaradi njihove sposobnosti samoobnavljanja, ki je zelo podobna tisti v rakavih celicah (Wang in sod., 2005). Kakorkoli, MMC in rakave celice se še vseeno močno razlikujejo v izražanju proliferacijskih genov, kar je dokaz proti hipotezi, da so MMC direktni prekursorji rakavih (matičnih) celic (Sawada in sod., 2007; Motaln in sod., 2010).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reagenti

Preglednica 3: Reagenti

REAGENT	PROIZVAJALEC
DMEM D5921, 1X	Sigma-Aldrich, Nemčija
FBS	PAA Laboratories, Avstrija
neesencialne aminokisline (NEAA)	PAA Laboratories, Avstrija
penicilin / streptomycin	PAA Laboratories, Avstrija
L-glutamin	PAA Laboratories, Avstrija
Na-piruvat, 100 mM	Gibco, Invitrogen, ZDA
PBS, 10X	PAA Laboratories, Avstrija
Trypsin-EDTA, 0,25%, 1X	Gibco, Invitrogen, ZDA
BSA	Sigma-Aldrich, Nemčija
Bio-Rad protein assay (Bradford reagent)	Bio-Rad Labs, Nemčija
destilirana H ₂ O	NIB, Slovenija
DEPC H ₂ O	NIB, Slovenija
TRIzol [®]	Gibco, Invitrogen, ZDA
glikogen	Sigma, Nemčija
kloroform	Fluka, Nemčija
izopropanol	Aldrich, Nemčija
etanol	Sigma-Aldrich, Nemčija
Tris pufer	Sigma-Aldrich, Nemčija
Brij 35	Sigma-Aldrich, Nemčija
ditiotreitol	Sigma-Aldrich, Nemčija
pepstatin A	Sigma-Aldrich, Nemčija
EDTA	Sigma-Aldrich, Nemčija
parametil sulfonil fluoridn (PMSF)	Sigma-Aldrich, Nemčija
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Nemčija
Na-acetat	Sigma-Aldrich, Nemčija
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, ZDA
Human 18S rRNA, VIC-MGB, 20x	Applied Biosystems, ZDA
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, ZDA
CatL primer (F, R)	Applied Biosystems, ZDA
CatL sonda	Applied Biosystems, ZDA
CatB primer (F, R)	Applied Biosystems, ZDA
CatB sonda	Applied Biosystems, ZDA
ELISA test	Krka d.d. in Jožef Stefan Inštitut
CA074	Bachem AG, Švica

se nadaljuje

nadaljevanje

REAGENT	PROIZVAJALEC
E-64c	Bachem AG, Švica
Z-FR-AMC	Bachem AG, Švica
7-AMC	Bachem AG, Švica
Jodoocetna kislina	Sigma-Aldrich, Nemčija

3.1.2 Laboratorijska oprema

Preglednica 4: Laboratorijska oprema

LABORATORIJSKA OPREMA	PROIZVAJALEC
Brezprašna komora	Iskra Pio, Slovenija
Centrifuga	Tehnica Železniki, Slovenija/ Sigma, Nemčija
Digestorij	Koetterman, Nemčija
Inkubator (5% CO ₂ atmosfera, 37°C)	Sanyo Electronic, Japonska
Vodna kopel (37°C)	Precision Scientific Inc
Tehnica	Tehnica Exacta, Slovenija
Stresalnik	IKA, Nemčija
Invertni mikroskop	Reichert-Jung, ZDA
Pipete (2,10, 20, 100, 200, 1000 µL)	Biohit, Finska
Stipete (5, 10,, 25, 50 mL)	Costar, ZDA
Pipetman	Integra Biosciences
Hladilnik (4°C)	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-20°C)	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80°C)	Angelantoni scientifica, Italija
Digitalni fotoaparati Coolpix 995	Nikon, Avstrija
GENios spektrofotometer	Tecan, Austria
ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, ZDA
Spektrofotometer NanoDrop NT-100	Thermo Fisher Scientific, ZDA
Inkubator (37°C)	Kambič, Slovenija
Termoblok	Kambič, Slovenija
pH meter	WTW, Nemčija
Bürker-Türk-ov hemocitometer	Brand, Nemčija
Plastenke s perforiranim zamaškom (T-25, T-75)	Corning, ZDA
Plošče za gojenje celic (6 vdolbin)	Falcon BD, Francija
Centrifugirke (15 mL, 50 mL)	Corning, ZDA
Nastavki za pipete	Costar, ZDA/ Biohit, Finska
Eruvete (250 µL, 1,5 mL)	Costar, ZDA
Plošče za PCR v realnem času, 384 vdolbin	Applied Biosystems, ZDA
Plošče 96 vdolbin, črna, ravno dno	Costar, ZDA

se nadaljuje

nadaljevanje

LABORATORIJSKA OPREMA	PROIZVAJALEC
Plošče 96 vdolbin, prozorna, ravno dno	Costar, ZDA
Filtri (0,2 µm)	Corning, Nemčija
Strgala za celice (cell scraper)	Corning, ZDA
Brizge (10mL, 20 mL)	BD Plastik, Kanada
Plastenke (250 mL)	Corning, ZDA
Čaše	Duran, Schott, Velika Britanija

3.1.3 Gojišča

3.1.3.1 Gojišče za gojenje MMC z 20% FBS (MMC gojišče)

Za 100 ml gojišča smo uporabili:

- 76 mL osnovnega DMEM medija
- 20 mL toplotno inaktiviranega FBS
- 1 mL 100x raztopine neesencialnih aminokislin (NEAA)
- 1 mL 100x raztopine L-glutamin
- 1 mL 100x raztopine penicilin/streptomycin
- 1 mL 100 mM raztopine Na-piruvata

3.1.3.2 Gojišče za gojenje GBM celic z 10% FBS (GBM gojišče)

Za 100 ml gojišča smo uporabili:

- 86 mL osnovnega DMEM medija
- 10 mL toplotno inaktiviranega FBS
- 1 mL 100x raztopine neesencialnih aminokislin (NEAA)
- 1 mL 100x raztopine L-glutamin
- 1 mL 100x raztopine penicilin/streptomycin
- 1 mL 100 mM raztopine Na-piruvata

3.1.3.3 Poskusno gojišče z 10% FBS (EKS gojišče)

Za 100 ml gojišča smo uporabili:

- 88 mL osnovnega DMEM medija
- 10 mL toplotno inaktiviranega FBS
- 1 mL 100x raztopine L-glutamin
- 1 mL 100x raztopine penicilin/streptomycin

Vsa gojišča so bila pripravljena v aseptičnih pogojih, v brezprašni komori. Toplotno inaktiviran FBS smo vedno filtrirani skozi filter s porami velikosti 0.2 μm , da se je odstranil drobir, ki bi bil lahko toksičen za celice. Pred uporabo je bilo gojišče vedno ogreto na 37°C v vodni kopeli. Vsa gojišča so bila hranjena v hladilniku na 4°C, ne več kot 1 teden.

3.1.4 Ostale raztopine

3.1.4.1 Homogenizacijski pufer za izolacijo proteinov (pH 6.9)

- 50 mM Tris
- 0.05% Brij 35
- 0.5 mM DTT (ditiotreitol)
- 5.0 mM EDTA

Tik pred uporabo je potrebno dodati še:

- 0.5 mM PMSF v acetonu (parametil sulfonil fluorid)
- 1 μM Pepstatin A v DMSO

3.1.4.2 Pufer za aktivacijo CatL (pH 5.5)

- 0.34 M Na-acetat
- 4 mM EDTA

Tik pred uporabo je potrebnododati še:

- 2 mM DTT

3.1.4.3 Reakcijski pufer za merjenje aktivnosti CatL in CatB (pH 6.0)

- 0.34 M Na-acetat
- 4 mM EDTA
- 0.1 % Brij 35

Tik pred uporabo je potrebno dodati še:

- 4 mM DTT

3.1.4.4 Reagenti za PCR v realnem času

Preglednica 5: Reagenti za PCR v realnem času

mRNA	1. ZAČETNI OLIGONUKLEOTID	2. ZAČETNI OLIGONUKLEOTID	SONDA
CatL	5'-TCA GGA ATA CAG GGA AGG GAA A-3'	5'-TCC TGG GCT TAC GGT TTT GA-3'	5'-CAC TGG TCA TGT CTC CAA AGG CGT TCA T-3'
CatB	5'-CTC TATG AAT CCC ATG TAG GGT GC-3'	5'-CCT GTT TGT AGG TCG GGC TG-3'	5'-CCC TGT GAG CAC CAC GTC AAC GG-3'

3.1.5 Celične linije

V raziskovalnem delu smo uporabljali tri klone humanih mezenhimskih matičnih celic (MMC1, MMC2, MMC4), ki so bili izolirani iz kostnega mozga zdravih darovalcev (Lonza) in tri različne glioblastomske celične linije (U373, U251, U87-MG), izolirane iz primarnih humanih tumorjev glioblastoma multiforme (ATCC).

Preglednica 6: Podrobnejši opis MMC

OZNAKA	KATALOŠKA ŠT.	DONOR	OPRAVLJENI TESTI
MMC1	Lonza 7F3458	moški, 36 let (črna rasa)	donorji testirani na viruse (HIV, HBV, HCV), mikoplazme, bakterije, kvasovke, glive; 90% celic pozitivnih na površinske antigene CD105, CD166, CD29, CD44; negativne na hematopoetske markerje CD14, CD34, CD45; sposobnost diferenciacije celic v osteogene, hondrogene in adipogene linije
MMC2	Lonza 6F4393	moški, 19 let	donorji testirani na viruse (HIV, HBV, HCV), mikoplazme, bakterije, kvasovke, glive; 90% celic pozitivnih na površinske antigene CD105, CD166, CD29, CD44; negativne na hematopoetske markerje CD14, CD34, CD45; sposobnost diferenciacije celic v osteogene, hondrogene in adipogene linije
MMC4	Lonza 6F4085	moški, 33 let (črna rasa)	donorji testirani na viruse (HIV, HBV, HCV), mikoplazme, bakterije, kvasovke, glive; 90% celic pozitivnih na površinske antigene CD105, CD166, CD29, CD44; negativne na hematopoetske markerje CD14, CD34, CD45; sposobnost diferenciacije celic v osteogene, hondrogene in adipogene linije

MMC so rasle v monosloju, pritrjene na podlago in so tvorile podolgovato vretenasto obliko, podobno fibroblastom. Klona MMC2 in MMC4 sta hitro rastoča, klon MMC1 pa je počasi rastoč (Motaln in sod., 2010).

Preglednica 7: Podrobnejši opis GBM celičnih linij

OZNAKA	DONOR	LASTNOSTI
U373	moški, 61 let (bela rasa)	izolirane iz humanega tumorja glioblastoma multiforme, pleomorfna/ astrocoidna morfologija, rastejo pritrjene na podlago, v monosloju, so tumorigene
U251	ATCC, humane celice	izolirane iz humanega tumorja glioblastoma multiforme, pleomorfna/ astrocoidna morfologija, rastejo pritrjene na podlago, v monosloju, so tumorigene
U87-MG	ženska, 44 let (bela rasa)	izolirane iz humanega tumorja glioblastoma multiforme, epiteljska morfologija, rastejo pritrjene na podlago, so tumorigene

Nedavno so v ATCC odkrili in dokazali, da imata U373 in U251 linija enak izvor (Torsvik in sod., 2010), kljub temu pa ti dve celični liniji v naši raziskavi kažeta drugačne lastnosti. Celice U373 in U251, ki so bile uporabljene v naši raziskavi so bile okarakterizirane z DNA fingerprinting analizo v laboratoriju Univerze v Bergnu, Norveška (Torsvik in sod., 2010).

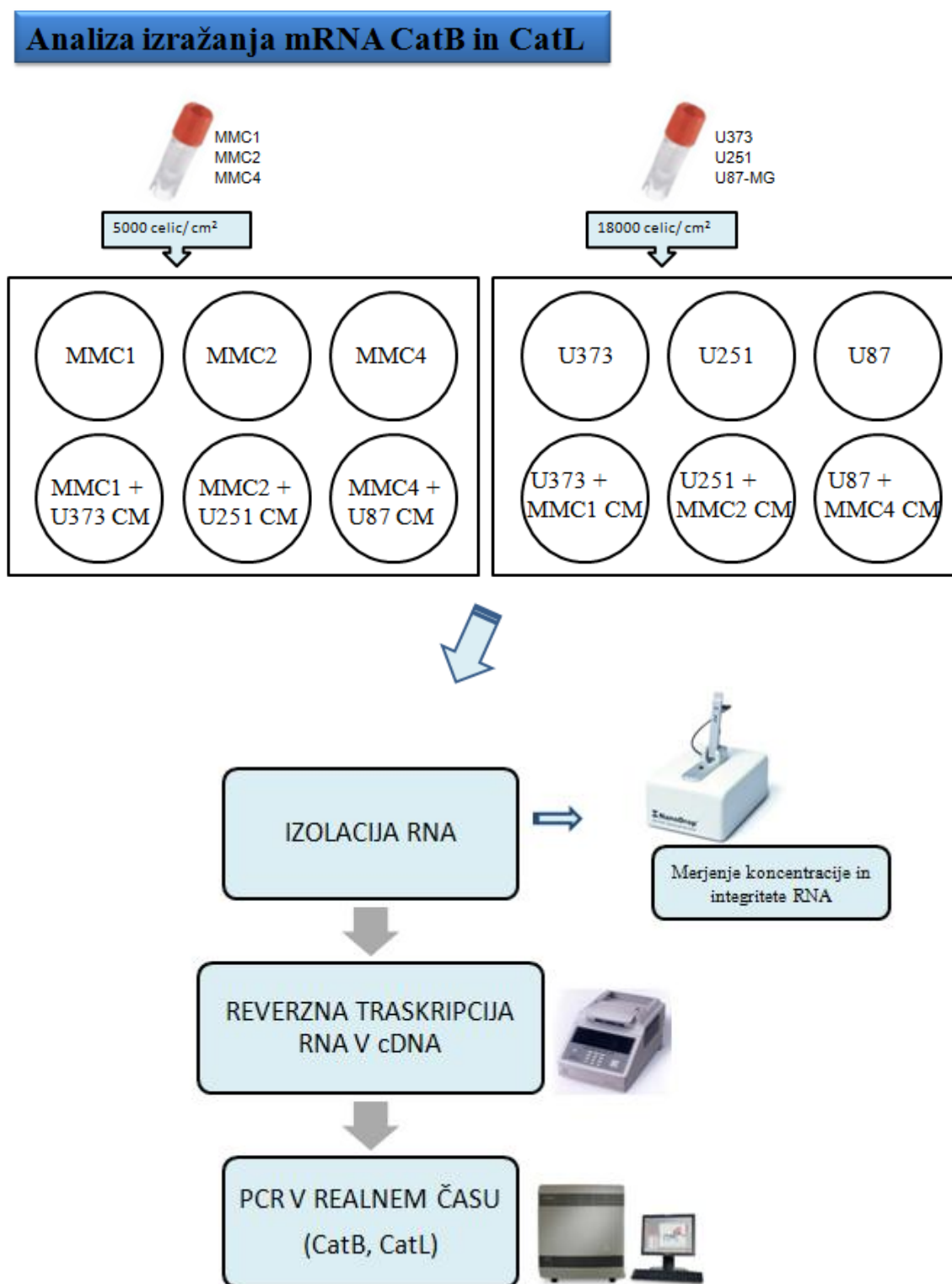
3.2 SPLOŠNI OPIS POTEKA DELA

Raziskovalno delo je potekalo v dveh sklopih poskusov- prvi sklop je potekal na ravni RNA, drugi pa na ravni proteinov. Za pridobitev vzorcev RNA smo celice gojili na ploščah s 6 vdolbinami, za pridobitev proteinskih vzorcev pa smo celice gojili v plastenkah s perforiranim zamaškom s površino 75 cm² (T-75). Vse celice so bile gojene v ustrezno formuliranem gojišču, v inkubatorju s 5% CO₂ atmosfero in 37°C.

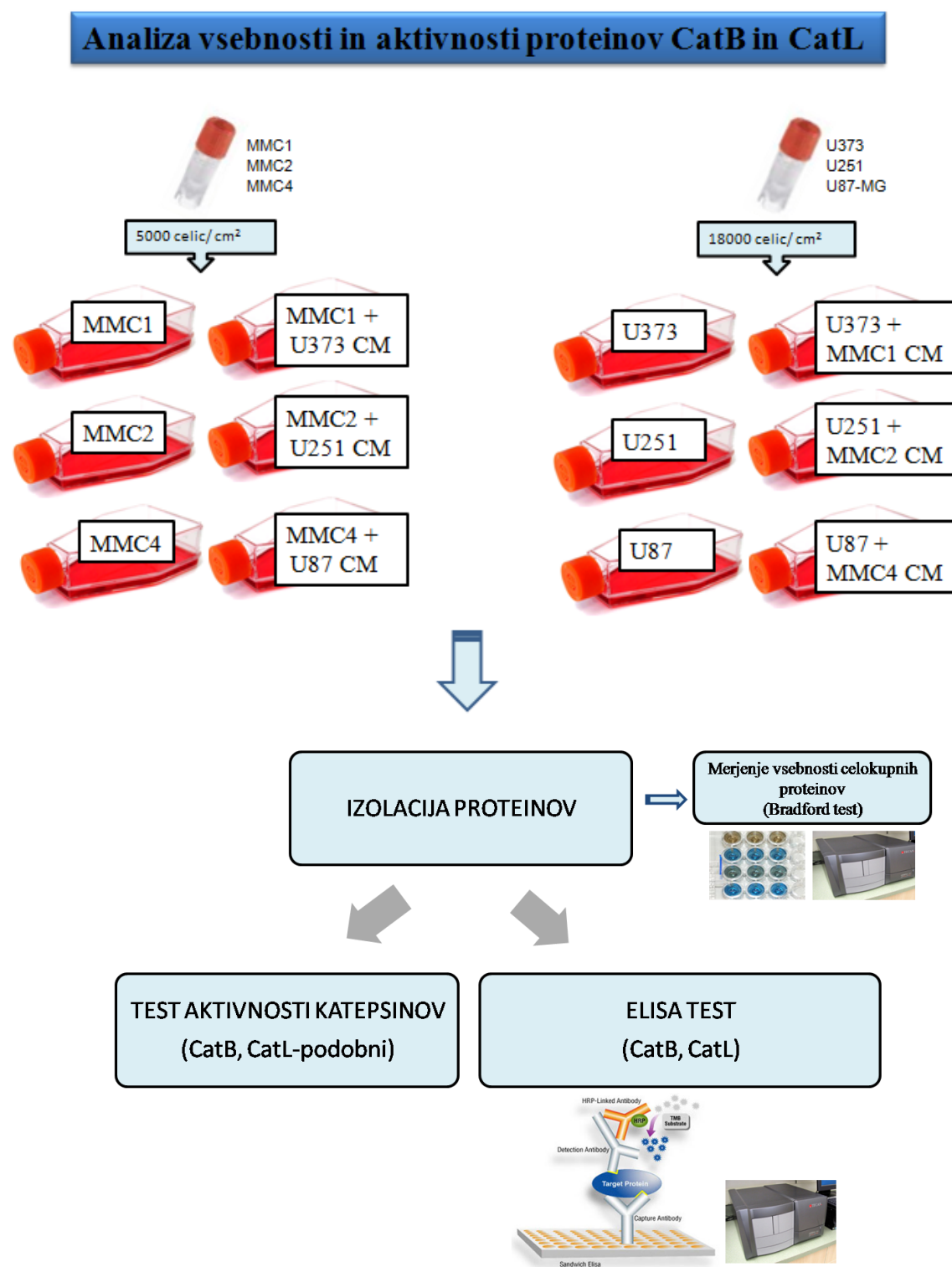
Preglednica 8: Pregled poskusnih pogojev

CELICE	DODAN KONDICIONIRAN MEDIJ
MMC1	kondicioniran medij celic U373 (U373 CM)
MMC2	kondicioniran medij celic U251 (U251 CM)
MMC4	kondicioniran medij celic U87-MG (U87 CM)
U373	kondicioniran medij celic MMC1 (MMC1 CM)
U251	kondicioniran medij celic MMC2 (MMC2 CM)
U87-MG	kondicioniran medij celic MMC4 (MMC4 CM)

Vsak poskus je vseboval kontrolo (celice z gojiščem) in celice izpostavljene kondicioniranemu mediju. MMC celice smo izpostavili kondicioniranemu mediju celic GBM, celice GBM pa smo izpostavili kondicioniranemu mediju MMC. En poskus pomeni eno pasažo celic, vsak poskus smo tako na RNA, kot tudi na proteinski ravni ponovili trikrat (tri biološke ponovitve). Za vsak poskus sta bili izvedeni dve (tehnični) ponovitvi pri PCR-ju v realnem času, ELISA testu in testu aktivnosti katepsinov.



Slika 7: Shema poteka poskusa za določitev izražanja mRNA katepsinov B in L v MMC in celicah GBM



Slika 8: Shema poteka poskusov za določanje vsebnosti in aktivnosti katepsinov B in L v MMC in celicah GBM

3.3 METODE

3.3.1 Gojenje in vzdrževanje celičnih kultur do nastavitve poskusa

Tako MMC kot GBM celične linije smo gojili na ploščah za gojenje celičnih kultur s 6 vdolbinami, za poskuse na RNA ravni ter v T-75 platenkah, za poskuse na proteinskem ravni. MMC so bile gojene v MMC gojišču, celične linije GBM pa v GBM gojišču, oboje v standardnih pogojih gojenja: temperaturi 37°C, 5% CO₂ atmosferi in >95% relativni vlažnosti. Gojišče smo menjali vsaka 2-3 dni, kulture pa presajali ob 70-75% gostoti celic. Celicam v ploščah s 6 vdolbinami smo vedno dodali 3 mL gojišča, celicam v T-75 platenkah pa 12 mL gojišča.

Za presajanje smo kulturo sprali z 1×PBS ter odlepili od podlage s 0.25% Trypsin-EDTA reagentom. Trypsin smo nato inaktivirali z dodatkom gojišča in ga odstranili s 5 minutnim centrifugiranjem na 1000 RPM, nastali celični pelet pa resuspendirali v svežem gojišču. Resuspendirane celice smo nacepili na novo ploščo ali platenko pri gostoti 5000 celic/cm² v primeru MMC ali 18000 celic/cm² v primeru celičnih linij GBM.

3.3.2 Priprava kondicioniranega medija

Kondicioniran medij je bil pridobljen tako, da smo poskusno gojišče (DMEM; 10% FBS; penicilin/streptomycin; L-glutamin) dodali celicam MMC, pri 70% konfluenci in celicam GBM pri 60% konfluenci. Po 24 urah smo medij odstranili iz celic in ga centrifugirali 5 minut na 1000 RPM. Supernatant kondicioniranega medija smo shranili do uporabe v zamrzovalniku na -80°C. Kondicioniran medij, ki smo ga uporabili za poskus, smo vedno odmrznili in pred nanosom na celice redčili v razmerju 1:1 z eksperimentalnim gojiščem.

3.3.3 Nastavitev poskusa

Celice smo gojili v standardnih pogojih do 70% konfluente v primeru MMC in 60% konfluente v primeru celic GBM. Na tej stopnji smo kontrolnim celicam dodali eksperimentalno gojišče, ostale celice pa smo izpostavili kondicioniranemu mediju, rečenemu z eksperimentalnim gojiščem v razmerju 1:1, kot je opisano v Preglednici 6. Poskus (čas v katerem so rasle celice v kondicioniranem mediju) je trajal 3 dni, pri standardni pogojih za rast celic.

3.3.4 Določanje izražanja mRNA katepsinov B in L

3.3.4.1 Izolacija RNA

RNA smo izolirali po protokolu za izolacijo RNA s Trizol reagentom, ki so ga razvili na oddelku za gensko toksikologijo in biologijo raka, na Nacionalnem inštitut za biologijo, z manjšimi spremembami. Po končanem poskusu smo celicam za izolacijo RNA odstranili gojišče in dodali 1mL Trizol reagenta. Tako dobljen homogenat smo shranili do nadaljnje izolacije RNA na -80°C . Vzorce RNA v TRIzol reagentu, smo odtajali v digestoriju. TRIzol je monofazična raztopina fenola in gvanidin izotiocianata, ki smo jo dodali direktno na celice. Med homogenizacijo razbije celice in razgradi celične komponente, medtem ko RNA ostane intaktna. Odtajanim vzorcem smo dodali 200 μL kloroforma, vzorce centrifugirali 15 minut na $12000\times g$ in 4°C in prenesli zgornjo brezbarvno, vodno fazo z RNA v čisto epruveto, s čimer smo ločili organsko fazo od vodne v kateri se nahaja celokupna RNA. Nato smo dodali glikogen v končni koncentraciji 2 mg/mL, ki precipitira skupaj z RNA in omogoči lažjo izolacijo. Po dodatku 500 μL izopropanola smo vzorce s precipitirano RNA inkubirali na -20°C za 2 uri. Nato smo vzorce RNA cetrifugirali 20 minut na $12000\times g$, pri 4°C in odstranili supernatant. Z dodatkom 1mL 75% etanola, ponovnim centrifugiranjem 5-10 minut na $7500\times g$ in 4°C smo RNA še dodatno očistili nečistoč. Na koncu smo etanol, odstranili in pelet RNA posušili na zraku. Izolirano in očiščeno RNA smo raztopili v 30 μL vode brez RNAz in DNAz (DEPC H_2O). RNA smo popolnoma raztopili z 10 minutno inkubacijo na 65°C , ter shranili na -80°C .

3.3.4.2 Merjenje koncentracije in integritete RNA

Količino RNA v pobranem vzorcu smo določili s spektrofotometrom NanoDrop NT-1000, ki uporablja tehnologijo mikrovolumske spektrofotometrije. Spektrofotometer NanoDrop NT-1000 na osnovi absorbance pri 260 nm avtomatsko izračuna vsebnost RNA. Z razmerjem absorbanc pri 260 nm in 280 nm določi onesnaženost RNA s proteini, z razmerjem absorbanc pri 260 nm in 230 nm pa določi onesnaženost RNA z organskimi topili; če je razmerje v območju od 1.8 do 2.0, je čistost RNA visoka. Pri tem porabimo minimalno količino vzorca (1.0 μL)

3.3.4.3 Povratni prepis RNA v cDNA- reverzna transkripsija

Po 1.0 µg RNA iz vsakega vzorca smo povratno prepisali v cDNA z uporabo kompleta High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, po navodilih proizvajalca. Komplet vsebuje naključne začetne oligonukleotide, ki povežejo z RNA (10 min, 25°C), nato pa poteka prepisovanje v cDNA z dodajanjem deoksiribonukleotidov (dNTP) z encimom reverzna transkriptaza (2h, 27°C). Komplet vsebuje še RNAzni inhibitor in RT pufer. 50 µL reakcijska mešanica je tako vsebovala 25 µL RNA raztopljene v DEPC H₂O in 25 µL RT miksa (5 µL 10x RT pufara; 2 µL 25x dNTP; 5 µL 10x naključnih začetnih oligonukleotidov; 2.5 µL RNAznega inhibitorja; 2.5 µL encima reverzna transkriptaza; 8 µL DEPC H₂O). Reakcija je potekala v PCR aparatu Gene AMP PCR System 9700, vzorce cDNA pa smo shranili na -20°C.

3.3.4.4 PCR v realnem času

3.3.4.4.1 Princip metode TaqMan

Kvantitativna verižna reakcija z DNA polimerazo (QPCR) v realnem času omogoča določanje relativne količine tarčne mRNA v vzorcu, s čimer merimo izražanje genov na ravni transkripcije. V principu gre za verižno reakcijo z DNA polimerazo, ki ciklično prepisuje cDNA v vzorcu. Specifičnost reakcije za določen gen zagotavlja par začetnih oligonukleotidov, ki se prilega specifičnima mestoma v tem genu, polimeraza pa pomnožuje (prepisuje) zaporedje mRNA med tema dvema oligonukleotidoma. Da zagotovimo pomnoževanje zgolj mRNA, ne pa tudi genomske DNA, je eden od začetnih oligonukleotidov izbran tako, da sega čez stičišče dveh eksonov v genu. Eksonska zaporedja v genovski DNA so namreč ločena z introni, ki jih v mRNA ni, zato se začetni oligonukleotid ne prilega na genomsko DNA in se ta ne more podvajati v PCR reakciji.

Pri TaqMan metodi dodamo reakciji še dodatno komponento- sondo, ki se veže na del nukleotidnega zaporedja med obema začetnima oligonukleotidoma. Sonda ima na svojem 5' koncu vezano fluorescentno barvilo (angl. reporter), na svojem 3' koncu pa zaviralec signala (angl. quencher), ki pobira svetlobo sevajočo z barvila. Ko PCR polimeraza pri prepisovanju cDNA naleti na vezano sondo jo s svojo eksonukleazno aktivnostjo razgradi. S tem se zaviralec signala oddalji od vezanega fluorescentnega barvila, ki zato lahko seva svetlobo, ta signal pa zazna laserski merilec svetlobe v PCR aparatu. Količina izsevane svetlobe je sorazmerna količini PCR produkta, ki nastane v vsakem ciklu. Število ciklov v katerem jakost signala doseže določen prag zaznavanja (Ct vrednost) je sorazmerno

količini tarčne cDNA na začetku in hkrati merilo za relativno količino tarčne mRNA v vzorcu.

3.3.4.4.2 Potek metode PCR v realnem času

Za izvedbo QPCR reakcije smo uporabili aparat ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System. V reakcijo smo poleg cDNA, ki smo jo pridobili iz 1 µg RNA, dodali še univerzalno mešanico za PCR- TaqMan Universal PCR Master Mix, začetna oligonukleotida in sondo označeno s 5'-FAM (fluorescentno barvilo) 3'-TAMRA (zaviralec). Za gene CatB, CatL, smo uporabili začetne oligonukleotide in sonde, ki so jih skonstruirali na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka (zaporedja so navedena v Preglednici 3). Kot notranjo kontrolo za normalizacijo izražanja genov smo uporabili humano 18S rRNA. Takšna normalizacija prepreči napako zaradi morebitne različne vsebnosti cDNA v začetnem vzorcu. Reakcije smo pripravili tako, da smo tarčni gen in notranjo kontrolo zaznavali v isti jamici, za vsak vzorec pa smo pripravili duplikat reakcij. V vsako jamico smo dodali po 1 µL vzorca in 9 µL reakcijske mešanice. Reakcijska zmes za en vzorec je tako vsebovala: 5 µL Master Mix; 0.5 µL sonde za gen; 0.5 µL sode za interni standard; 0.2 µL 1. začetnega oligonukleotida (angl. F primer); 0.2 µL 2. začetnega oligonukleotida (angl. R primer) in 2.6 µL DEPC H₂O. Reakcija je potekala po sledečem programu: 2 min pri temperaturi 50°C, 10 min pri 95°C (aktivacija DNA polimeraze), 40× ponovitev 15 s pri 95°C (denaturacija), 1 min 60°C (prileganje začetnih oligonukleotidov, podvajanje cDNA).

3.3.4.4.3 Računanje izražanja mRNA v vzorcu z metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Relativno izražanje genov smo izračunali z metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, ki poda izražanje gena relativno glede na kontrolo. Izračun temelji na razlikah v Ct vrednostih vzorca ter kontrole, ki so poselidica različne vsebnosti specifične (tarčne) cDNA.

Najprej za vsak vzorec izračunamo ΔCt tretiranega vzorca ($\Delta Ct = Ct_{\text{tarčni gen}} - Ct_{\text{notranja kontrola}}$), ter ΔCt kontrolnega vzorca ($\Delta Ct = Ct_{\text{tarčni gen}} - Ct_{\text{notranja kontrola}}$), nato pa $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ tretiranega vzorca – ΔCt kontrolnega vzorca. Nato izračunamo še vrednosti $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Če so te vrednosti večje od 1.0 pomenijo višje izražanje, če pa so manjše od 1.0 pa nižje izražanje tarčnega gena v tretiranem vzorcu, kot je izražanje tarčnega gena v kontrolnem vzorcu. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ lahko neposredno primerjamo med različnimi merjenimi vzorci.

3.3.5 Določanje vsebnosti in aktivnosti katepsinov B in L

Priprovo pufrov za izolacijo proteinov, izolacijo proteinov in merjenje aktivnosti katepsinov B in L smo izvedli po navodilih postopka za Merjenje aktivnosti katepsinov B in L, ki so ga razvili na oddelku za gensko toksikologijo in biologijo raka, na Nacionalnem inštitut za biologijo.

3.3.5.1 Izolacija proteinov

Celice, ki so bile namenjene za izolacijo proteinov smo vzorčili pri temperaturi 4°C, da bi preprečili razgradnjo proteinov. Celice v plastenki smo sprali z 12 mL ledeno hladnega 1x PBS, dodali 6 mL ledeno hladnega 1x PBS in celice postrgali z dna plastenke s pomočjo strgala za celice. Vzorce smo prenesli v ohlajene centrifugirke in jih hranili na ledu do centrifugiranja, v plastenko pa smo še enkrat dodali 6 mL ledeno mrzlega PBS in postrgali še preostanek celic. Po tem, ko smo postrgali vse celice smo jih centrifugirali 5 minut na 1000 RPM, odstranili supernatant, razbili pelet in dodali novih 6 mL ledeno hladnega PBS. Vzorce smo ponovno centrifugirali 5 minut na 1000 RPM, odstranili supernatant in pelet celic zamrznili na -80°C, do izolacije proteinov.

Pri izolaciji proteinov smo še zmrznjene celične pelete resuspendirali v 100 do 200 µL mrzlega homogenizacijskega pufru (50 mM Tris pH 6.9; 0.05% Brij 35; 0.5 mM DTT; 5 mM EDTA; s sveže dodanima inhibitorjema 0.5 mM PMSF in 10 µM pepstatin A). Celične lizate smo pripravili tako, da smo celice v homogenizacijskem pufru tri do petkrat zaporedno zamrznili (-160°C) in odtajali (37°C). Dobljen homogenat smo centrifugirali 30 minut na 12000 RPM, pri 4°C. Supernatante celičnih lizatov smo razdelili na alikvote, ki smo jih shranili na -80°C.

3.3.5.2 Merjenje vsebnosti celokupnih proteinov

Koncentracijo celokupnih proteinov v vzorcih smo izmerili po Bradfordovi metodi. 5× razredčenemu proteinskemu vzorcu smo dodali reagent 5× redčen reagent Bio-Rad protein assay, ki v stiku s proteini spremeni barvo v odvisnosti od vsebnosti proteinov v vzorcu. Po 15 min inkubacije na sobni temperaturi, na stersalniku smo s spektrofotometrom GENios spektrofluorometer pomeril absorbanco pri 595 nm in na podlagi umeritvene krivulje pripravljene z redčitvami BSA izračunali vsebnost proteinov v vzorcih.

3.3.5.3 ELISA

3.3.5.3.1 Princip metode ELISA

Osnova sendvič testa ELISA so imobilizirana lovilna protitelesa na katera se vežejo tarčni proteini. V drugi stopnji smo dodali detekcijska protitelesa konjugirana s hrenovo peroksidazo, tako da je nastalo »sendvič« lovilno protitelo – tarčni protein – detekcijsko protitelo-peroksidaza. Na koncu smo dodali še detekcijski substrat, ki ga peroksidaza razgradi, s čimer smo dobili barvno reakcijo katere intenzivnost je linearno sorazmerna s količino tarčnega proteina v vzorcu v določenem koncentracijskem območju. Koncentracijo tarčnega proteina smo določili na podlagi umeritvene krivulje iz rekombinantnih proteinov, ki so priloženi ELISA testu. Uporabljeni testi ELISA zaznajo prekursorsko in aktivno obliko katepsinov L in B, kot tudi komplekse katepsinov z endogenimi inhibitorji. Celoten test je bil izveden po navodilih proizvajalca, z manjšimi spremembami.

3.3.5.3.2 Potek testa ELISA

Uporabili smo sendvič teste ELISA za človeška CatB in CatL. Celične lizate smo razredčili do ustrezne, prej optimizirane koncentracije celokupnih proteinov v vzorcu. Količine proteina za posamezen katepsin in posamezne celice so povzeti v Preglednici 9. Lovilna in detekcijska protitelesa pa so navedena v Preglednici 10.

Preglednica 9: Količine celokupnih proteinov uporabljenih pri testu ELISA za posamezen katepsin

CELICE	CatB	CatL
MMC1	10 µg skup. proteina/ mL	60 µg skup. proteina/ mL
MMC2	5 µg skup. proteina/ mL	60 µg skup. proteina/ mL
MMC4	10 µg skup. proteina/ mL	80 µg skup. proteina/ mL
U373	10 µg skup. proteina/ mL	60 µg skup. proteina/ mL
U251	5 µg skup. proteina/ mL	60 µg skup. proteina/ mL
U87-MG	15 µg skup. proteina/ mL	80 µg skup. proteina/ mL

Preglednica 10: Protitelesa za teste ELISA

KATEPSIN	LOVILNO PROTITELO	DETEKCIJSKO PROTITELO
CatB	zajčje proti-hCatB IgG	ovčje proti-hCatB IgG-HRP
CatL	ovčje proti-hCatL IgG	ovčje proti-hCatL IgG-HRP

Kot standarde za umeritvene krivulje smo uporabili rekombinantne CatB in CatL. Spodnja meja detekcije uporabljenih testov je 0.03 nmol/L za CatB, 0.06 nmol/L za CatL. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca. 100 μ L kontrole, kalibratorja za umeritveno krivuljo ali vzorca smo nanegli v izbrano vdolbinico na plošči. Za slepi vzorec smo uporabili 100 μ L redčitvenega pufra Dilution buffer. Ploščo z nanešenimi vzorci smo pokrili s parafilmom in inkubirali 2 uri na 37°C. Nato smo odlili vsebino iz vdolbinic, vsako trikrat zaporedoma sprali s 400 μ L delovne raztopine za spiranje, odstranili raztopino za spiranje in nanegli 100 μ L raztopine konjugata. Ploščo smo zopet pokrili ter inkubirali na 37°C. Po dveh urah inkubacije smo odlili vsebino iz vdolbinic, vsako trikrat zaporedoma sprali s 400 μ L delovne raztopine za spiranje, odstranili raztopino za spiranje in v vsako vdolbino nanegli 200 μ L delovne raztopine TMB. Po 15 minutah inkubacije plošče na sobni temperaturi v temi, smo reakcijo ustavili z dodatkom 50 μ L raztopine za prekinitev reakcije. Absorbanco kromogenega produkta hrenove peroksidaze vezane na detekcijsko protiteleso smo odčitali pri valovni dolžini 450 nm na GENios spektrofotometru in rezultate podali kot pmol katepsina/mg celokupnih proteinov. Vsi potrebni reagenti so že vsebovani v kompletu, skupaj s ploščo s t.i. »stripi« z vdolbinami in rekombinantnimi kalibratorji za umeritveno krivuljo. Vsak vzorec smo nanegli v dveh ponovitvah.

3.3.5.4 Merjenje aktivnosti katepsinov

3.3.5.4.1 Princip metode

Metodo sta prva opisala Barrett in Kirschke, leta 1981 in je bila prilagojena ter optimizirana za delo v laboratoriju Nacionalnega inštituta za biologijo (Bervar in sod., 2003). Aktivnost CatB in CatL smo določali hkrati pri vsakem eksperimentu. V poskusu smo spremljali hidrolizo sintetičnega substrata Z-Phe-Arg-AMC, pri čemer smo merili fluorescenco sproščenega AMC pri valovni dolžini vzbujaanja 370 nm in sevanja 460 nm. Tako CatB kot CatL cepita omenjeni substrat, vendar lahko z uporabo dveh različno specifičnih inhibitorjev ločimo med obema aktivnostima. E-64c inhibira tako CatB kot CatL, CA074 pa v uporabljeni koncentraciji specifično inhibira samo CatB. Skupna aktivnost vseh cisteinskih katepsinov je bila izmerjena brez dodatka inhibitorja, aktivnost CatL ob dodatku CA074 (60 μ M koncentracija v testni raztopini), ozadje pa so sestavljali

vzorci z dodatkom E-64c (100 μ M koncentracija v testni raztopini). Ker nismo uporabili specifičnega inhibitorja za CatL, lahko k izračunani njegove aktivnosti do določene mere prispevajo tudi drugi cisteinski katepsini. Zato smo to aktivnost poimenovali kot aktivnost L-podobnih katepsinov.

Koncentracijo sproščenega AMC smo določili iz standardne umeritvene krivulje, kjer smo kot standard uporabili AMC. Aktivnost katepsinov smo izrazili kot količino sproščenega produkta na časovno enoto in na količino celokupnih proteinov v vzorcu ($\text{pmol}_{\text{sproščenega AMC}}/\text{mg}_{\text{celokupnih proteinov}} \cdot \text{min}$). Formula za izračun specifične aktivnosti je: $A_s = (r \times \Delta F \times V_r) / (t \times c \times k \times V_v)$, pri čemer je r koeficient redčenja vzorca, odčitana fluorescenca, V_r prostornina reakcijske mešanice, t čas poteka reakcije, c koncentracija celokupnih proteinov v vzorcu celičnega lizata, k naklon umeritvene krivulje in V_v prostornina v reakcijo dodanega vzorca. Dobljene vrednosti smo pretvorili v specifično encimsko aktivnost (enote encimske aktivnosti na miligram skupnih proteinov). Ena encimska enota (E.U.) predstavlja količino encima, ki sprosti 1 nmol produkta na minuto pri 37°C in optimalnem pH.

3.3.5.4.2 Potek dela

Aktivnosti smo merili na črni mikrotiterski plošči s 96 vdolbinicami. Vedno smo opravili dve ponovitvi meritev za vsak vzorec. Kot slepi vzorec smo uporabili destilirano vodo.

Za vsak vzorec je potrebno pripraviti dvakrat po 3 vdolbinice- 2 paralelke za kontrolo in z enim ali drugim inhibitorjem. K 10 μ L ustrezno redčenega vzorca (oz. 10 μ L destilirane vode pri slepih vzorcih) smo dodali 40 μ L pufra za aktivacijo CatL-like (pH 5.5; 0.34 M Na-acetat; 4mM EDTA; tik pred uporabo pa smo dodali še 2 mM DTT). Aktivacija je potekala 30 minut pri 37°C (ploščo pokrijemo s pokrovom ali parafilmom, da se prepreči izhlapevanje). Nato smo vzorcem, katerim smo merili skupno aktivnost CatB in CatL-podobnih katepsinov, dodali 20 μ L destilirane vode, vzorcem za merjenje aktivnosti CatL-podobni 20 μ L 60 μ M CA074 in kontrolam 20 μ L 100 μ M E-64c (založne raztopine so v DMSO, iz njih pripravimo ustrezno koncentracijo v vodi). Vsem smo dodali še 20 μ L reakcijskega pufra (pH 6.0; 0.34 M Na-acetat; 4mM EDTA; 0.1% Brij 35; tik pred uporabo dodaj še 4 mM DTT) in inkubirali 5 minut pri 37°C. Nato smo dodali 20 μ L 100 μ M substrata Z-Phe-Arg-AMC ter inkubirali 1.5 ure, pri 37°C. Reakcijo smo prekinili z dodatkom 80 μ L 1 mM jodoocetne kisline. Na spektrofleurimetru smo izmerili $F_{370/460}$ (gain 50), ki predstavlja količino sproščenega fluorescentnega 7-AMC ter izračunali aktivnost katepsinov kot razliko v sproščenem 7-AMC v prisotnosti in odsotnosti inhibitorjev.

3.3.6 Statistična obdelava podatkov

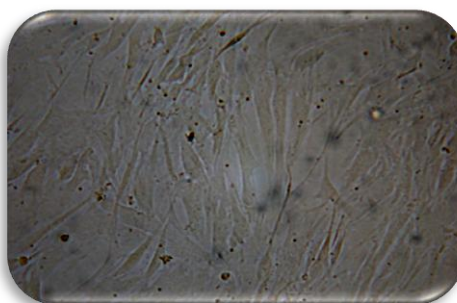
Statistične analize in izračuni so bili opravljeni s programom Microsoft Office Excel 2007. Povprečne vrednosti so bile izračunane kot aritmetična sredina posameznih vrednosti. Za prikaz razpršenosti podatkov okoli povprečne vrednosti smo uporabili standardno napako. Statistično značilne razlike smo računali s standardnim Studentovim T-testom ob predpostavki dvostranske porazdelitve vrednosti in neenake variance ter izrazili kot p vrednost. Za vzorce smo uporabili zgornjo mejo tveganja $p < 0.05$, tako, da lahko z več kot 95% verjetnostjo trdimo, da se povprečji obeh vzorcev statistično značilno razlikujeta.

4 REZULTATI

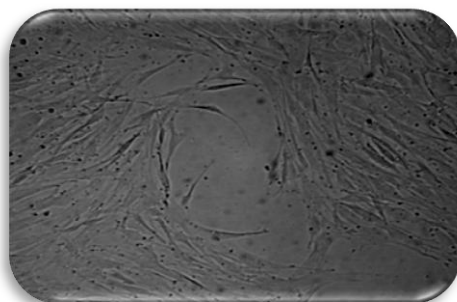
4.1 CELIČNE LINIJE

4.1.1 Humane mezenhimske matične celice (MMC1, MMC2, MMC4)

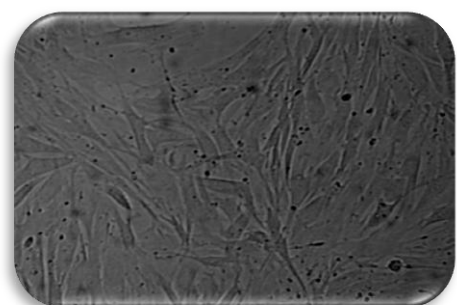
Humane mezenhimske matične celice, izolirane iz kostnega mozga smo gojili po priporočilih prodajalca (Lonza). Klon MMC1 je počasi rastoč, klon MMC2 in MMC4 pa sta hitro rastoča (Motaln in sod., 2010). Vsi trije kloni so morfološko podobni fibroblastom. Vedno smo celice nacepili pri gostoti 5000 celic/cm². Ko so celice dosegle 70% konfluenco smo kontrolnim celicam dodali eksperimentalno gojišče, ostale celice pa smo izpostavili kondicioniranemu mediju celic GBM, redčenim s poskusnim gojiščem v razmerju 1:1; takšnim poskusnim pogojem so bile celice izpostavljene 3 dni.



Slika 9: MMC1, 100x povečava



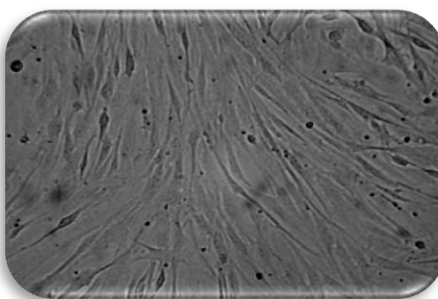
Slika 10: MMC2, 100x povečava



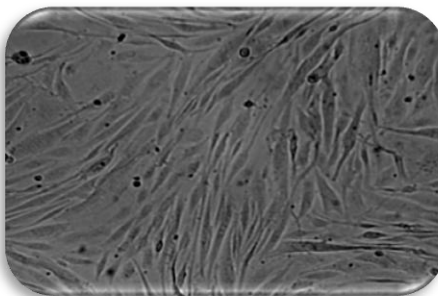
Slika 11: MMC4, 100x povečava

4.1.2 Glioblastomske celične linije (U373, U251, U87-MG)

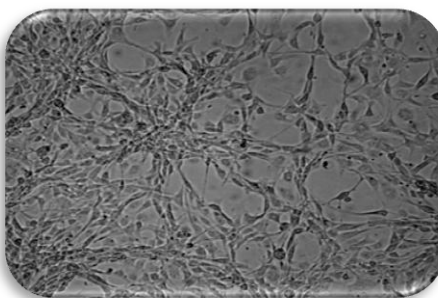
Celice GBM, ki so izolirane iz primarnih humanih tumorjev glioblastoma multiforme, so pridobljene iz zbirke ATCC. Morfološko so vse tri podobne živčnim celicam. U373 in U251 sta si po morfologiji bolj podobni, U87 pa tvori značilno mrežo in okrogle skupke kot astrociti. Pri poskusu smo vedno nacepili celice pri gostoti 18000 celic/cm^2 . Ko so celice dosegle 60% konfluenco smo kontrolnim celicam dodali eksperimentalno gojišče, ostale celice pa smo izpostavili kondicioniranemu mediju celic MMC, redčenim s poskusnim gojiščem v razmerju 1:1; takšnim poskusnim pogojem so bile celice izpostavljene 3 dni.



Slika 12: U373, 100x povečava



Slika 13: U251, 100x povečava



Slika 14: U87, 100x povečava

4.2 REZULTATI POSKUSOV

Proces invazije tumorjev je povezan s cisteinskimi katepsini, skupino proteaz, ki se pretežno nahaja v lizosomih. Zaradi sposobnosti razgradnje zunajceličnega matriksa v tumorskih in drugih celicah z invazivnostjo glioblastomov povezujemo predvsem katepsine B in L (Tysnes in Mahesparan, 2001). Delovanje cisteinskih katepsinov je regulirano tako na nivoju mRNA kot proteinov, odvisno pa je tudi od izražanja njihovih endogenih inhibitorjev (Levičar in sod. 2002).

Pri raziskovalnem delu smo spremljali vpliv kondicioniranega medija celic GBM (U373-CM, U251-CM, U87-CM) na MMC (MMC1, MMC2, MMC4) in vpliv kondicioniranega medija MMC (MMC1-CM, MMC2-CM, MMC4-CM) na celice GBM (U373, U251, U87). Zanimal nas je vpliv kondicioniranega medija na izražanje, vsebnost in aktivnost katepsinov B, L in S. Vsak poskus je bil sestavljen iz kontrolnih celic, ki so v času poskusa (tri dni) rastle v EKS gojišču in celic, ki smo jih izpostavili kondicioniranemu mediju. Vsak poskus smo izvedli v treh bioloških ponovitvah, ki smo jih zagotovili s tremi zaporednimi pasažami celic in dveh tehničnih ponovitvah v sklopu molekularnih metod PCR v realnem času, ELISA in merjenje aktivnosti).

Rezultate smo za vsak katepsin posebej vedno predstavili na treh grafih. Prvi graf predstavlja vrednosti za posamezne klone in linije, pridobljene z izračuni iz primarnih podatkov. Da bi zmanjšali razlike med samimi poskusi smo te vrednosti normalizirali na kontrole znotraj poskusa in rezultate za posamezne klone MMC in linje GBM predstavili na drugem grafu. Za splošen pregled smo združili ločeno izračunana povprečja vseh treh klonov MMC ter povprečja vseh treh linij GBM. Ti rezultati so predstavljeni na tretjem grafu. Statistično značilne razlike smo na grafih predstavili z eno zvezdico (*) v primeru $p < 0.05$, z dvema zvezdicama (**) v primeru $p < 0.005$ in s tremi zvezdicami (***) v primeru $p < 0.0005$. Izračuni podatkov, ki so predstavljeni na grafih so podrobneje predstavljeni v Prilogah.

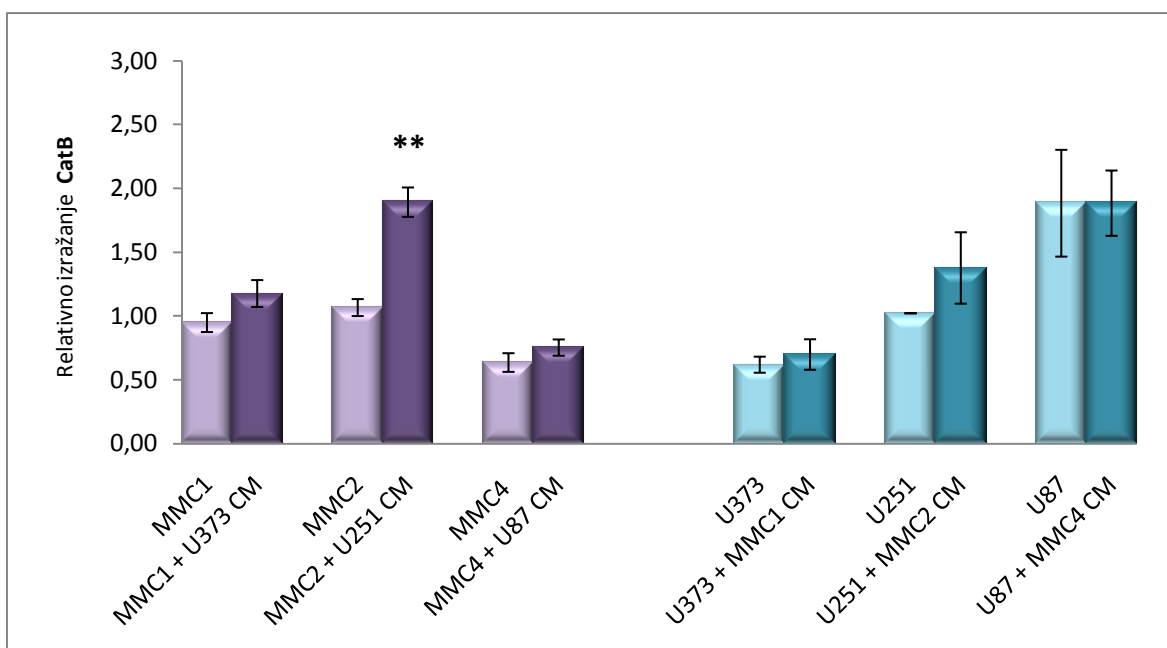
4.2.1 Določanje izražanja mRNA katepsinov B in L z metodo PCR v realnem času

Z metodo PCR v realnem času smo določili spremembo izražanja mRNA katepsinov B, L in S v celicah, ki so bile izpostavljene kondicioniranemu mediju, v primerjavi s kontrolnimi celicami. Po treh dneh izpostavitve celic kondicioniranemu mediju smo iz vzorcev izolirali RNA in jo povratno prepisali v cDNA. Ta nam je služila kot matrica za ciklično prepisovanje DNA v verižni reakciji z DNA polimerazo, začetnimi oligonukleotidi in fluorescenčno označeno sondo. Število cikla v katerem jakost signala izsevane svetlobe (ta nastane pri ločitvi fluorescenčnega barvila in zaviralca ob razgradnji sonde pri prepisovanju DNA) doseže določen prag zaznavanja (C_t vrednost) je sorazmerno količini tarčne cDNA na začetku. Količina začetne tarčne cDNA je hkrati merilo za relativno količino tarčne mRNA v vzorcu, s čimer pa izmerimo tudi izražanje genov na ravni transkripcije. Relativno izražanje genov smo izračunali z metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, ki poda izražanje gena relativno glede na kontrolo.

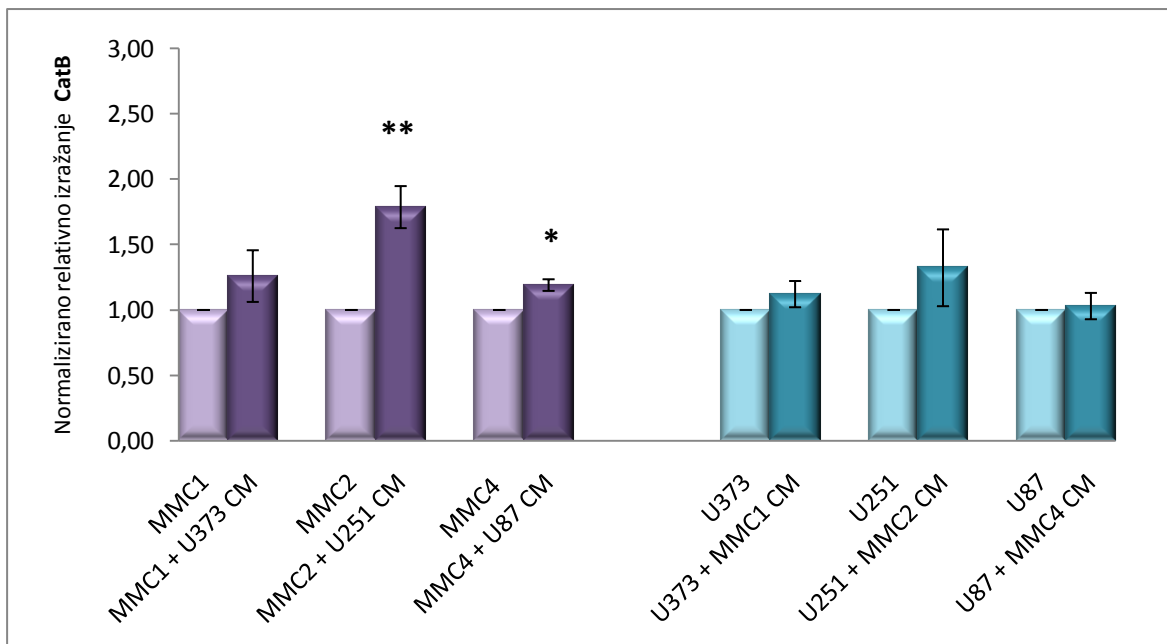
4.2.1.1 Katepsin B

Glavni namen našega raziskovalnega dela je bil ugotoviti vpliv kondicioniranega medija na izražanje, vsebnost in aktivnost katepsinov B in L. Največji in tudi statistično značilen vpliv kondicioniranega medija celic GBM na MMC smo opazili pri klonu MMC2, trend povišanja relativnega izražanja pa je opazen pri vseh treh klonih MMC (Slika 15). Kondicioniran medij celic MMC nasprotno nima statistično značilnega vpliva na izražanje katepsina B v celičnih linijah GBM; opazimo lahko le rahlo povišanje izražanja katepsina B v linijah U373 in U251.

Po normalizaciji podatkov na kontrole znotraj posameznega poskusa smo dodatno dobili statistično značilen vpliv kondicioniranega medija linij U251 CM in U87 CM na izražanje katepsina B pri klonih MMC2 in MMC4 (Slika 16). Pri MMC2 se izražanje poviša za 79%, pri MMC4 pa za 19%. Pri ostalih celicah zaradi velike standardne deviacije ne moremo govoriti o statistično značilnih spremembah.

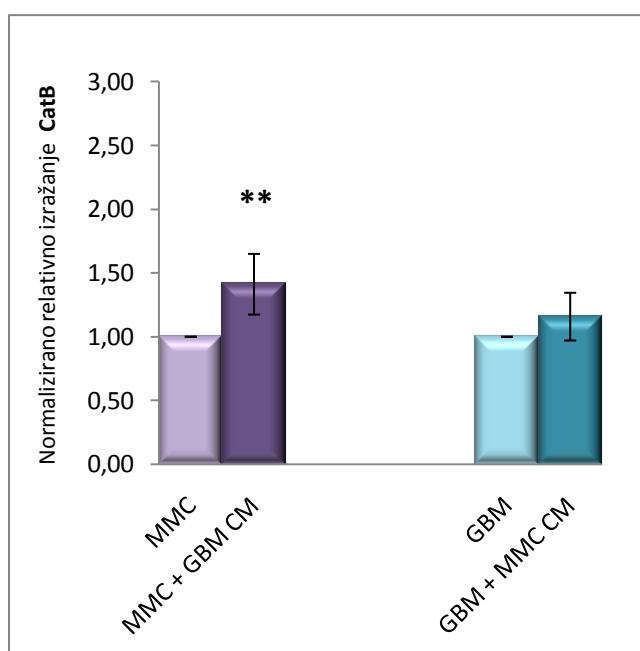


Slika 15: Vpliv CM na izražanje **katepsina B** v klonih MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Vsak poskus je narej v treh bioloških ponovitvah. Analiza relativnega izražanja CatB je bila narejena z metodo PCR v realnem času, v duplikatih za vse poskusne pogoje. Izračuni so narejeni po metodi $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Opazimo lahko trend povišanja izražanja CatB pri MMC, izpostavljenih CM celic GBM.



Slika 16: Vpliv CM na izražanje **katepsina B** v klonih MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Analiza je narejena z metodo PCR v realnem času. Podatki so normalizirani na kontrole. CM celic GBM statistično značilno poviša izražanje CatB pri klonih MMC1 in MMC2.

Po združitvi podatkov za MMC in linije GBM pa lahko povzamemo, da kondicioniran medij glioblastomskih celičnih linij za 41% poveča izražanje katepsina B v MMC ($p < 0.005$), kondicioniran medij MMC pa nima statistično značilnega vpliva na transkripcijo katepsina B v celičnih linijah GBM (Slika 17).



Slika 17: Vpliv CM na izražanje **katepsina B** v klonih MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Analiza je narejena z metodo PCR v realnem času. Podatki so normalizirani na kontrole. Prikazane so povprečne vrednosti vseh treh klonov MMC in linij GBM. CM celic GBM statistično značilno poveča izražanje CatB v MMC.

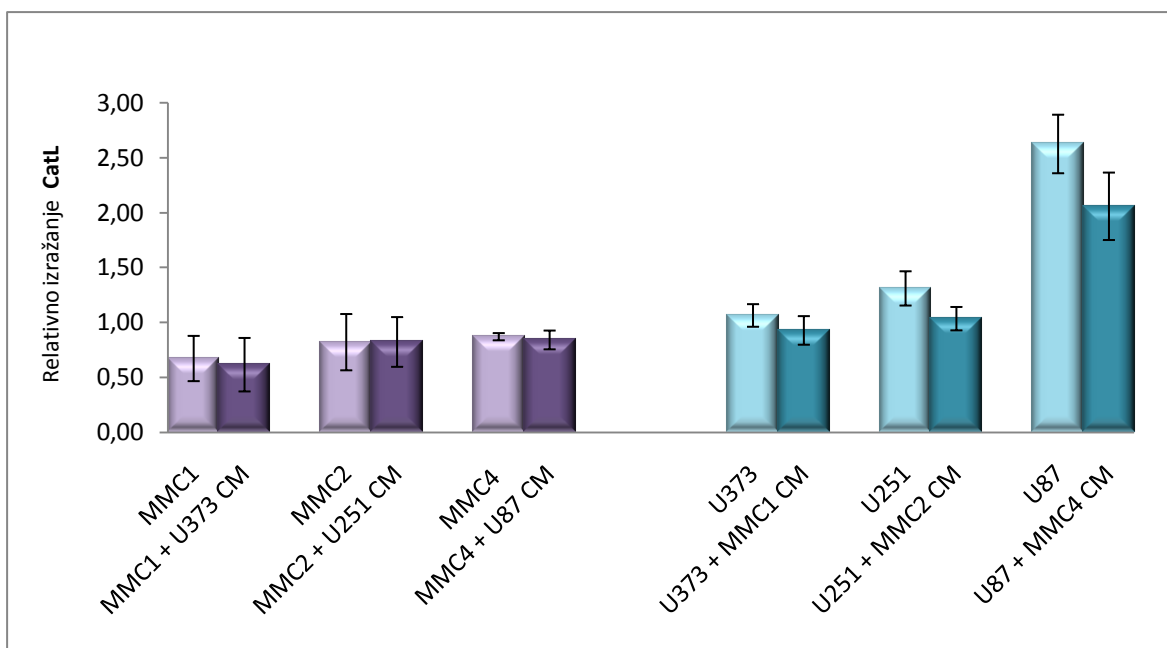
Preglednica 11: Primerjava razlik v relativnem izražanju **katepsina B** znotraj klonov MMC in linij GBM ter med posameznimi kloni MMC in linijami GBM. Analiza izražanja je bila narejena s PCR v realnem času. Razlike med kontrolnimi celicami so testirane s Studentovim T-testom. Statistično značilne razlike ($p < 0.05$) v izražanju CatB so tako med kloni MMC kot znotraj linij GBM, prav tako pa tudi med MMC ter linijami GBM.

T-test	MMC1	MMC2	MMC4	U373	U251	U87
MMC1		0,2215	0,0211	0,0142	0,2938	0,0543
MMC2	0,2215		0,0059	0,0039	0,4582	0,0773
MMC4	0,0211	0,0059		0,8391	0,0029	0,0228
U373	0,0142	0,0039	0,8391		0,0014	0,0215
U251	0,2938	0,4582	0,0029	0,0014		0,0651
U87	0,0543	0,0773	0,0228	0,0215	0,0651	

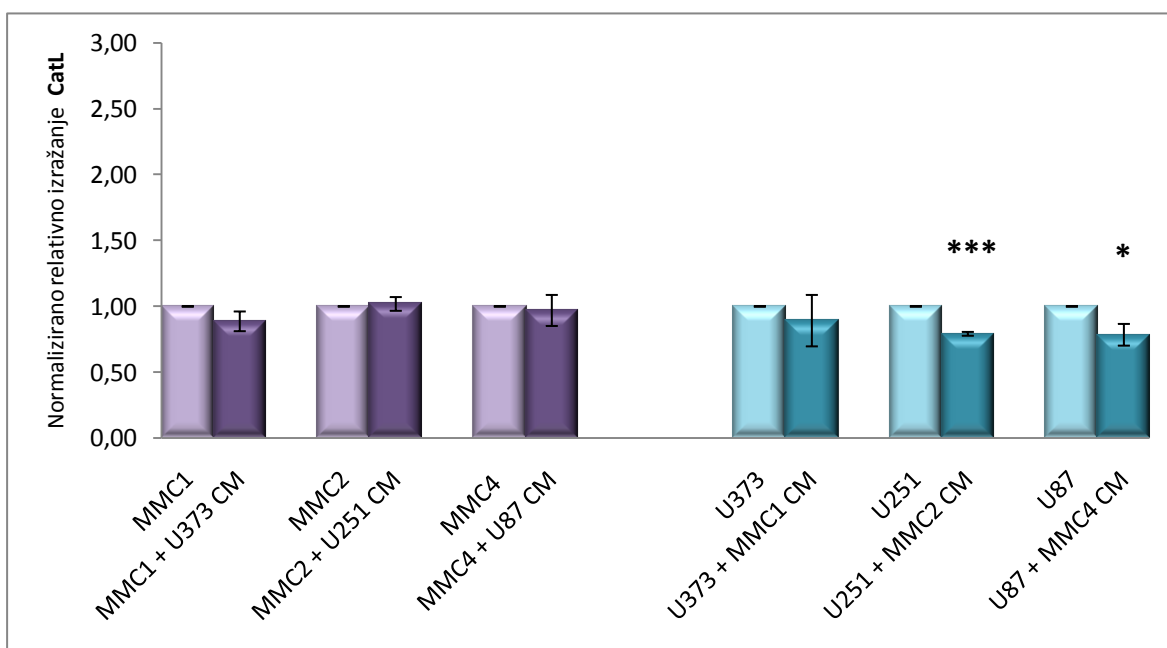
Poleg vpliva kondicioniranega medija pa v naših rezultatih lahko primerjamo tudi razlike v relativnem izražanju katepsina B znotraj samih klonov MMC in celičnih linij GBM, ter razlike med uporabljenimi kloni MMC in linijami celic GBM. Relativno izražanje katepsina B je najvišje v celicah U87, nižje v U251, najnižje relativno izražanje katepsina B pa imajo celice U373 (Slika 15). Pri MMC ima najvišje relativno izražanje katepsina B MMC2, sledi mu MMC1, najnižje izražanje pa se je pokazalo pri MMC4 (Slika 15). Presenetljivo obstajajo razlike tudi znotraj samih klonov MMC. Ugotovili smo, da se klona MMC1 in MMC2 v izražanju katepsina B statistično značilno razlikujeta od klona MMC4 (Preglednica 11). Med seboj se v skladu z našimi hipotezami in pričakovanji statistično značilno razlikujejo tudi linije GBM. U373 celična linija se statistično značilno razlikuje od linij U251 in U87 (in obratno). Presenetljivo je, da je relativno izražanje katepsina B v nekaterih klonih MMC višje, v nekaterih klonih pa nižje od relativnega izražanja katepsina B v linijah GBM. Klona MMC1 in MMC2 imata statistično značilno višje relativno izražanje katepsina B kot linija U373, klon MMC4 pa ima statistično značilno nižje izražanje od linij U251 in U87 (Slika 15 in Preglednica 11).

4.2.1.2 Katepsin L

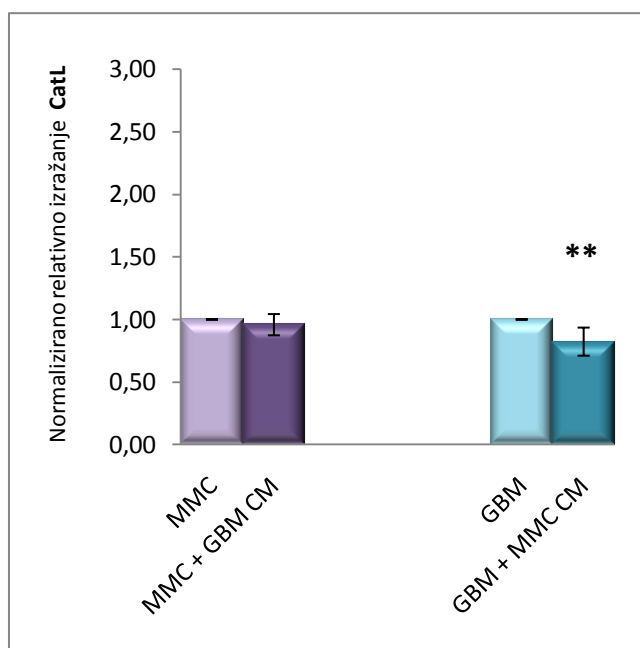
Kondicioniran medij glioblastomskih celičnih linij nima vpliva na izražanje katepsina L v MMC (Slika 17). Nasprotno pa se v linijah GBM kaže trend zniževanja izražanja katepsina L po izpostavitvi kondicioniranemu mediju MMC. V primeru linije U251 se njegovo relativno izražanje zniža za 21%, v primeru linije U87 pa za 22 % (Slika 18). Ko smo podatke normalizirali na kontrole pri posameznih poskusih smo statistično značilno razliko potrdili tudi s Studentovim T-testom (Slika 18). Po analizi vpliva kondicioniranega medija MMC na izražanje katepsina L v linijah GBM, smo prav tako lahko potrdili statistično značilno znižanje za 18% ($p < 0.005$) (Slika 19).



Slika 18: Vpliv CM na izražanje **katepsina L** v klonih MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Vsak poskus je narej v treh bioloških ponovitvah. Analiza relativnega izražanja CatB je bila narejena z metodo PCR v realnem času, v duplikatih za vse poskusne pogoje. Izračuni so narejeni po metodi $2^{-\Delta\Delta C_t}$. CM glioblastomskih celičnih linij nima vpliva na izražanje katepsina L v MMC, nasprotno pa se v linijah GBM kaže trend zniževanja izražanja katepsina L po izpostavitvi CM celic MMC.



Slika 19: Vpliv CM na izražanje **katepsina L** v klonih MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Analiza je narejena z metodo PCR v realnem času. Podatki so normalizirani na kontrole. CM celic MMC statistično značilno zniža izražanje CatL v celicah U251 in U87.



Slika 20: Vpliv CM na izražanje **katepsina L** v klonih MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Analiza je narejena z metodo PCR v realnem času. Podatki so normalizirani na kontrole. Prikazane so povprečne vrednosti vseh treh klonov MMC in linij GBM. CM celic MMC statistično značilno zniža izražanje CatL v linijah GBM.

Pri analizi razlik ravni transkripcije katepsina L med posameznimi kloni MMC smo ugotovili, da je njegovo izražanje med različnimi kloni MMC veliko bolj homogeno kot pri katepsinu B. V skladu z našimi predvidevanji ni prišlo do razlik med kloni MMC, so pa opazne razlike med MMC in linijami GBM ter znotraj celičnih linij GBM. Izražanje katepsina L je višje v glioblastomskih celičnih linijah kot v MMC. CatL se najmočneje izraža v celicah U87, manj v U251 in najmanj v celicah U373 (Slika 18). Pri MMC najvišje relativno izražanje katepsina L dobimo pri klonu MMC4, nižje pri MMC2, najnižje pa pri MMC1. Statistično značilne razlike v izražanju CatL dobimo med kloni MMC1 in linijama U251 ter U87, med MMC2 in U87 ter med klonom MMC4 in linijama U251 in U87 (Preglednica 12). Celice U87 se v ravni transkripcije katepsina L statistično najbolj razlikujejo od vseh ostalih uporabljenih celic.

Preglednica 12: Primerjava razlik v relativnem izražanju **katepsina L** znotraj klonov MMC in linij GBM ter med posameznimi kloni MMC in linijami GBM. Analiza izražanja je bila narejena s PCR v realnem času. Razlike med kontrolnimi celicami so testirane s Studentovim T-testom. Statistično značilne razlike ($p < 0.05$) v izražanju CatL so med kloni MMC in linijami GBM, prav tako pa tudi znotraj samih linij GBM.

T-test	MMC1	MMC2	MMC4	U373	U251	U87
MMC1		0,6084	0,3080	0,1054	0,0389	0,0021
MMC2	0,6084		0,8251	0,3417	0,1164	0,0039
MMC4	0,3080	0,8251		0,0936	0,0278	0,0013
U373	0,1054	0,3417	0,0936		0,1819	0,0026
U251	0,0389	0,1164	0,0278	0,1819		0,0064
U87	0,0021	0,0039	0,0013	0,0026	0,0064	

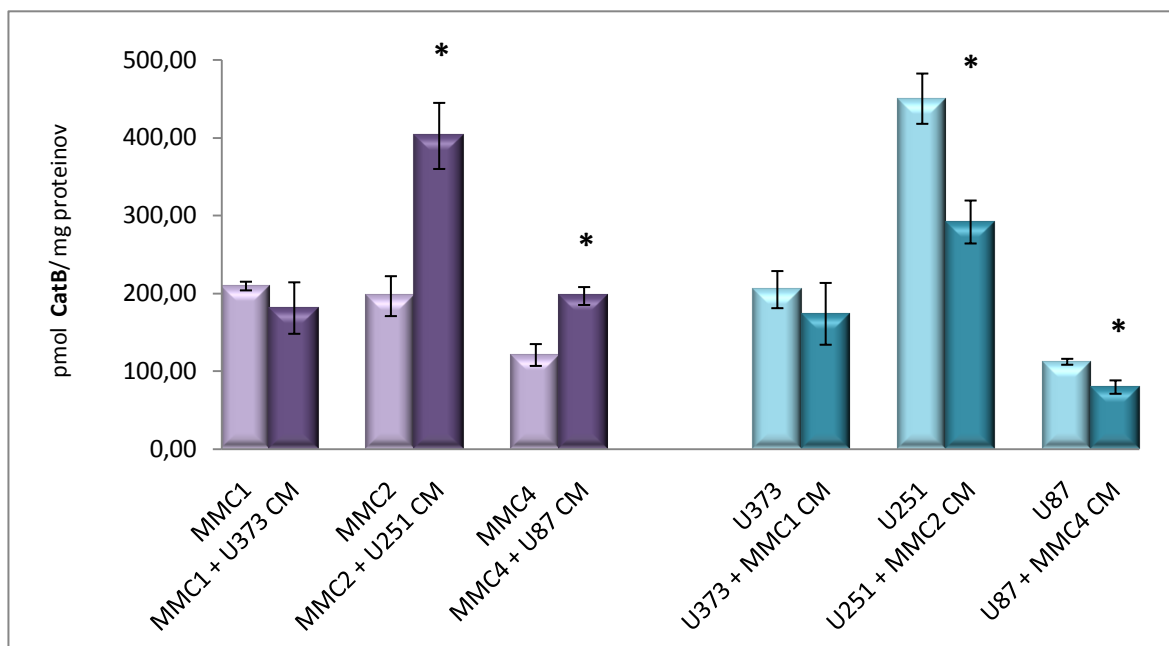
4.2.2 Določanje vsebnosti katepsinov B in L s testi ELISA

Vsebnost katepsinov B in L v kontrolnih celicah in celicah, ki so bile izpostavljene kondicioniranemu mediju smo določili s testi ELISA. Po treh dneh izpostavitve celic kondicioniranemu mediju smo iz vzorcev z razbitjem celične stene pripravili celične lizate v katerih so se nahajali proteini. S pomočjo imobiliziranih lovilnih protiteles, na katere se vežejo tarčni proteini in detekcijskih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo je na ELISA ploščah nastal kompleks (»sendvič«) lovilno protitelo – tarčni protein – detekcijsko protitelo-peroksidaza. Ko peroksidaza razgradi detekcijski substrat, ki ga dodamo na koncu, dobimo barvno reakcijo, katere intenzivnost je linearno sorazmerna s količino tarčnega proteina v vzorcu. Količino proteina določimo iz umeritvene krivulje, ki jo naredimo s pomočjo rekombinantnih katepsinov. Redčitve proteinskih vzorcev, ki smo jih nanesti in uporabljena protitelesa so navedeni v Preglednicah 7 in 8. S testi smo zaznali tako prekuzorsko kot tudi aktivno obliko katepsinov, pa tudi komplekse katepsinov z endogenimi inhibitorji. Da smo rezultate med različnimi pasažami in različnimi celicami lahko primerjali med seboj smo dobljene rezultate izrazili kot pmol katepsina/mg skupnih proteinov.

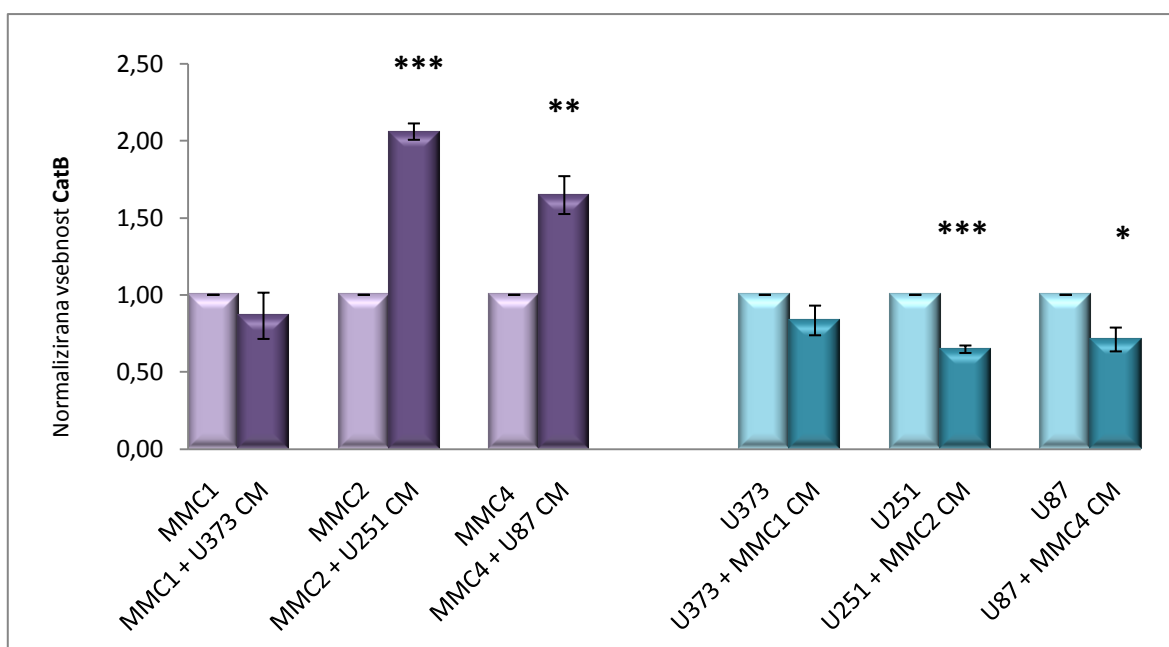
4.2.2.1 Katepsin B

Vsebnost katepsina B se tako kot raven izražanja v MMC po izpostavitvi kondicioniranemu mediju celic GBM v povprečju poviša in sicer za 52% ($p < 0.05$) (Slika 23). Od tega odstopa le klon MMC1, vendar odstopanje ni statistično značilno (Slika 21). Glede na to, da pri obeh hitro rastočih klonih (MMC2 in MMC4) prihaja do statistično značilnega povišanja (106 % in 65%) vsebnosti katepsina B po izpostavitvi kondicioniranemu mediju celic GBM, pri počasi rastočem klonu MMC1 pa do majhnega znižanja (14%) bi lahko tu govorili o različnem vplivu kondicioniranega medija na hitro in počasi rastoče klone MMC (Slika 21).

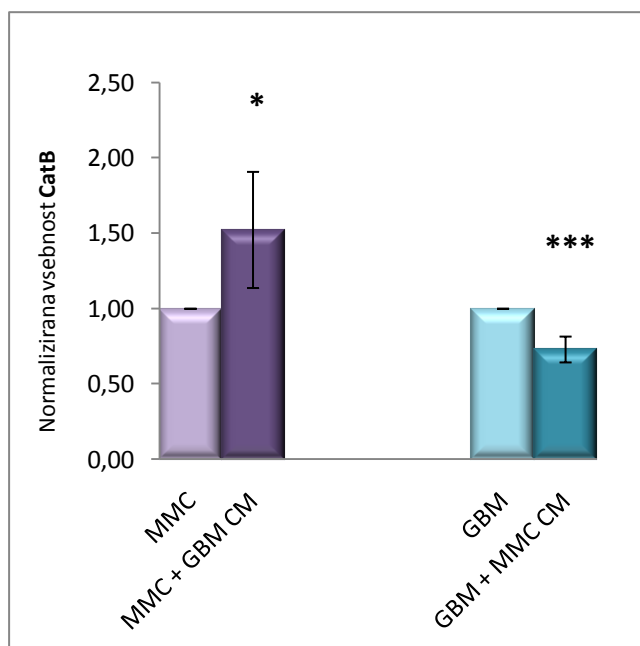
Vsebnost katepsina B v celicah GBM nasprotno ne kaže korelacije z njegovim izražanjem, saj se raven transkripcije rahlo poviša, vsebnost proteina v celicah GBM po izpostavitvi kondicioniranemu mediju MMC pa statistično značilno zniža za 27% ($p < 0.00005$) (Slika 23). Največji vpliv na znižanje vsebnosti katepsina B v linijah GBM ima kondicioniran medij celic MMC2, manjšega kondicioniran medij MMC4, najmanjši vpliv pa ima kondicioniran medij MMC1 (Slika 22).



Slika 21: Vpliv CM na vsebnost **katepsina B** v MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Vsak poskus je narej v treh bioloških ponovitvah. Analiza je bila narejena s testi ELISA, v duplikatih za vsak poskusni pogoj. Opazno je statistično značilno zvišanje vsebnosti CatB v MMC in trend znižanja vsebnosti CatB v celicah GBM.



Slika 22: Vpliv CM na vsebnost **katepsina B** v MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Analiza vsebnosti je narejena s testi ELISA. Podatki so normalizirani na kontrole. CM celic GBM statistično značilno zviša vsebnost CatB v MMC1 in MMC2. Pri linijah GBM U251 in U87 lahko opazimo statistično značilno znižanje vsebnosti CatB po izpostavitvi CM celic MMC.



Slika 23: Vpliv CM na vsebnost **katepsina B** v MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Analiza vsebnosti je narejena s testi ELISA. Podatki so normalizirani na kontrole. Prikazane so povprečne vrednosti vseh treh klonov MMC in linij GBM. CM celic GBM statistično značilno poveča vsebnost CatB v MMC, CM celic MMC statistično značilno zniža vsebnost CatB v celicah GBM.

Tako kot pri izražanju CatB tudi pri vsebnosti proteina CatB prihaja do razlik znotraj klonov MMC, med kloni MMC in linijami GBM ter znotraj linij GBM. Celice MMC4 imajo statistično značilno nižjo vsebnost katepsina B od MMC2 in MMC1 (Slika 21 in Preglednica 13). Zanimivo je, da ima linija U87 nižjo vsebnost katepsina B, kot je najnižja vsebnost tega proteina v MMC. Prav tako ima linija U373 rahlo nižjo vsebnost katepsina B kot MMC1. Najvišjo vsebnost katepsina B med linijami GBM imajo celice U251. Zaradi visoke vsebnosti proteina se linija U251 tudi statistično značilno razlikuje od vseh ostalih uporabljenih celic (Preglednica 13).

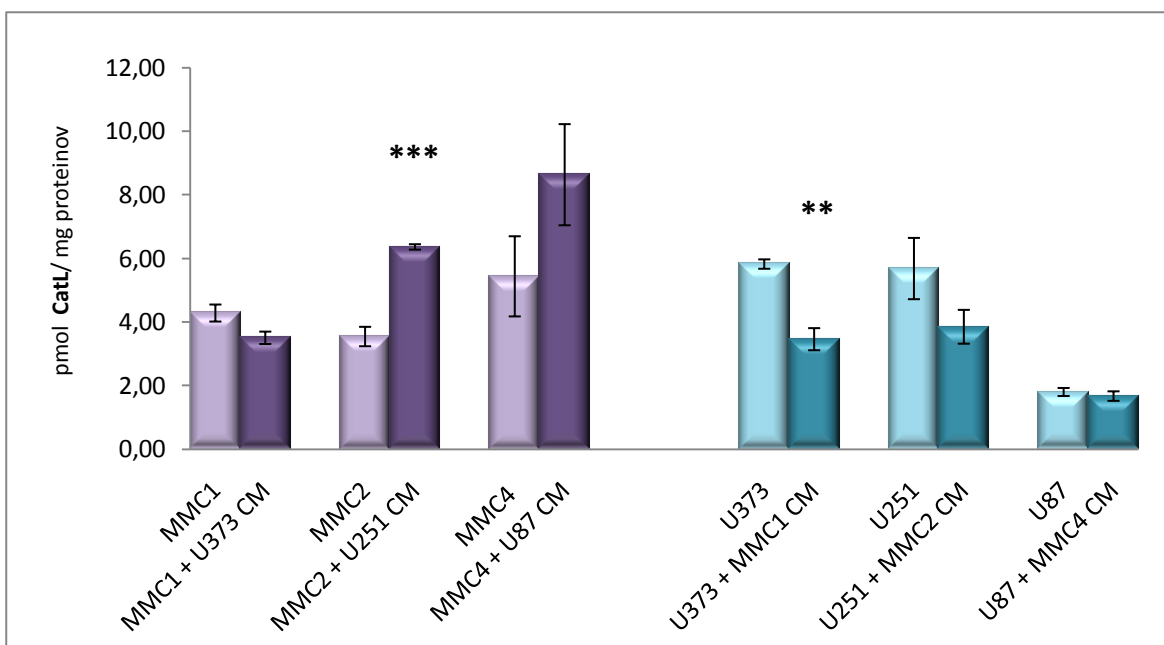
Preglednica 13: Primerjava razlik v vsebnosti **katepsina B** znotraj klonov MMC in linij GBM ter med posameznimi kloni MMC in linijami GBM. Analiza izražanja je bila narejena s testi ELISA. Razlike med kontrolnimi celicami so testirane s Studentovim T-testom. Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) v vsebnosti CatB so med kloni MMC, znotraj samih linij GBM, prav tako pa tudi med MMC in linijami GBM.

T-test	MMC1	MMC2	MMC4	U373	U251	U87
MMC1		0,5777	0,0020	0,8300	0,0008	0,0001
MMC2	0,5777		0,0339	0,7838	0,0017	0,0163
MMC4	0,0020	0,0339		0,0205	0,0003	0,5034
U373	0,8300	0,7838	0,0205		0,0017	0,0093
U251	0,0008	0,0017	0,0003	0,0017		0,0002
U87	0,0001	0,0163	0,5034	0,0093	0,0002	

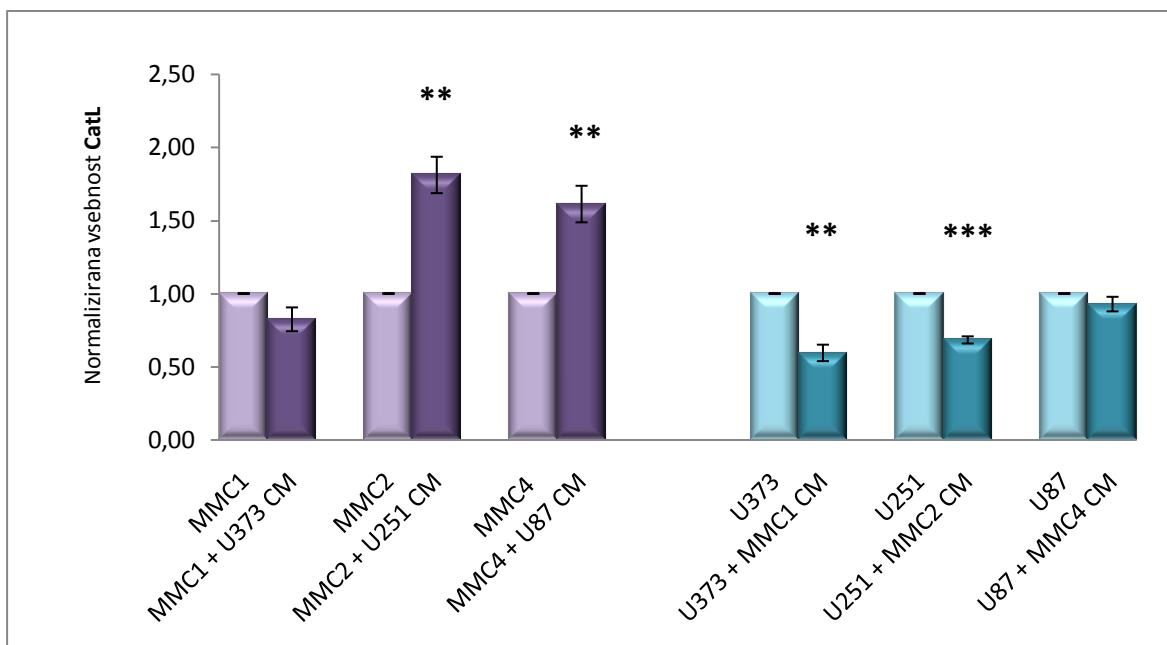
4.2.2.2 Katepsin L

Vsebnost katepsina L je približno 40x manjša od vsebnosti katepsina B. Po izpostavitvi MMC kondicioniranemu mediju linij GBM prihaja do sprememb v vsebnosti katepsina L na proteinski ravni, čeprav na ravni izražanja nismo zaznali sprememb. Pri CatL opazimo različen vpliv kondicioniranega medija linij GBM na počasi (MMC1) in hitro rastoče (MMC2, MMC4) klon MMC (Slika 24, Slika 25). Pri MMC1 se vsebnost katepsina L zmanjša, vendar ne statistično značilno, medtem ko se pri MMC2 in MMC4 statistično značilno poveča (Slika 25). Skupno bi lahko rekli, da se povprečno vsebnost katepsina L pri MMC, po tri dnevni izpostavitvi kondicioniranemu mediju linij GBM statistično značilno zviša ($p < 0,05$) (Graf 26).

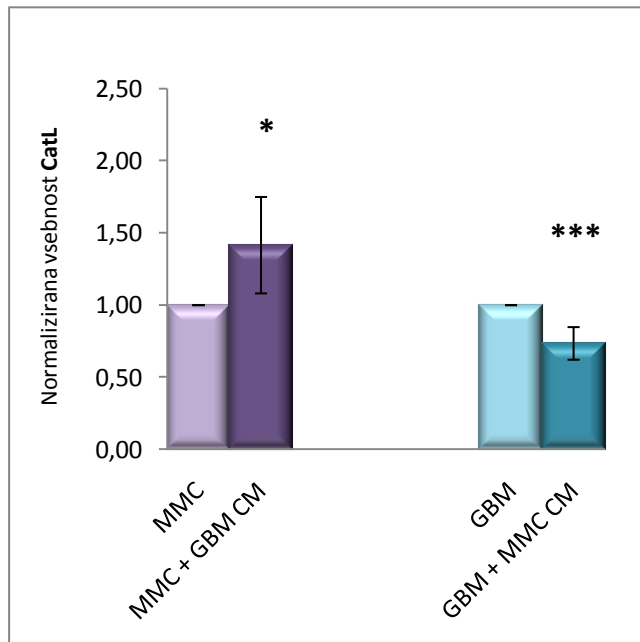
Med linijami GBM prihaja do enotnega vpliva kondicioniranega medija MMC na spremembo vsebnosti katepsina L (Slika 24 in Slika 25). Rezultati so tudi v skladu z izražanjem CatL v celicah GBM. Pri vseh treh uporabljenih linijah GBM se kaže trend znižanja vsebnosti proteina ($p < 0.0005$). Največji vpliv ima MMC1 CM na U373 (stistično značilno znižanje), nekoliko manjši MMC2 CM na U251 celice (Statistično značilno znižanje), najmanjši pa MMC4 CM na celice U87 (Slika 25).



Slika 24: Vpliv CM na vsebnost **katepsina L** v MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Vsak poskus je narej v treh bioloških ponovitvah. Analiza je bila narejena s testi ELISA, v duplikatih za vsak poskusni pogoj. Opazimo lahko zvišanje vsebnosti CatL v MMC in znižanje vsebnosti CatL v celicah GBM.



Slika 25: Vpliv CM na vsebnost **katepsina L** v MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Analiza vsebnosti je narejena s testi ELISA. Podatki so normalizirani na kontrole. Statistično značilen vpliv CM celic GBM na zvišanje vsebnosti CatL v MMC2 in MMC4. CM celic MMC statistično značilno zniža vsebnost CatL v celicah U373 in U251.



Slika 26: Vpliv CM na vsebnost **katepsina L** v MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Analiza vsebnosti je narejena s testi ELISA. Podatki so normalizirani na kontrole. Prikazane so povprečne vrednosti vseh treh klonov MMC in linij GBM. Statistično značilno zvišanje vsebnosti CatL v MMC in statistično značilno znižanje vsebnosti CatL v celicah GBM.

Preglednica 14: Primerjava razlik v vsebnosti **katepsina L** znotraj klonov MMC in linij GBM ter med posameznimi kloni MMC in linijami GBM. Analiza izražanja je bila narejena s testi ELISA. Razlike med kontrolnimi celicami so testirane s Studentovim T-testom. Statistično značilne razlike ($p < 0.05$) v vsebnosti CatB so med kloni MMC in linijami GBM, prav tako pa tudi znotraj samih linij GBM.

T-test	MMC1	MMC2	MMC4	U373	U251	U87
MMC1		0,0897	0,3343	0,0035	0,1618	0,0005
MMC2	0,0897		0,1483	0,0012	0,0606	0,0029
MMC4	0,3343	0,1483		0,7285	0,8594	0,0245
U373	0,0035	0,0012	0,7285		0,8677	1,438E-05
U251	0,1618	0,0606	0,8594	0,8677		0,0081
U87	0,0005	0,0029	0,0245	1,438E-05	0,0081	

Med kloni MMC ne prihaja do večjih razlik v vsebnosti katepsina L (Preglednica 14). Zanimivo imajo celice U87 statistično značilno nižjo vsebnost katepsina L od vseh ostalih uporabljenih celic (Slika 24, Preglednica 14). Celice U373 in U251 pa so si v vsebnosti katepsina L med seboj podobni (Slika 24), statistično značilno pa se razlikujejo od MMC1 in MMC2 (Preglednica 14).

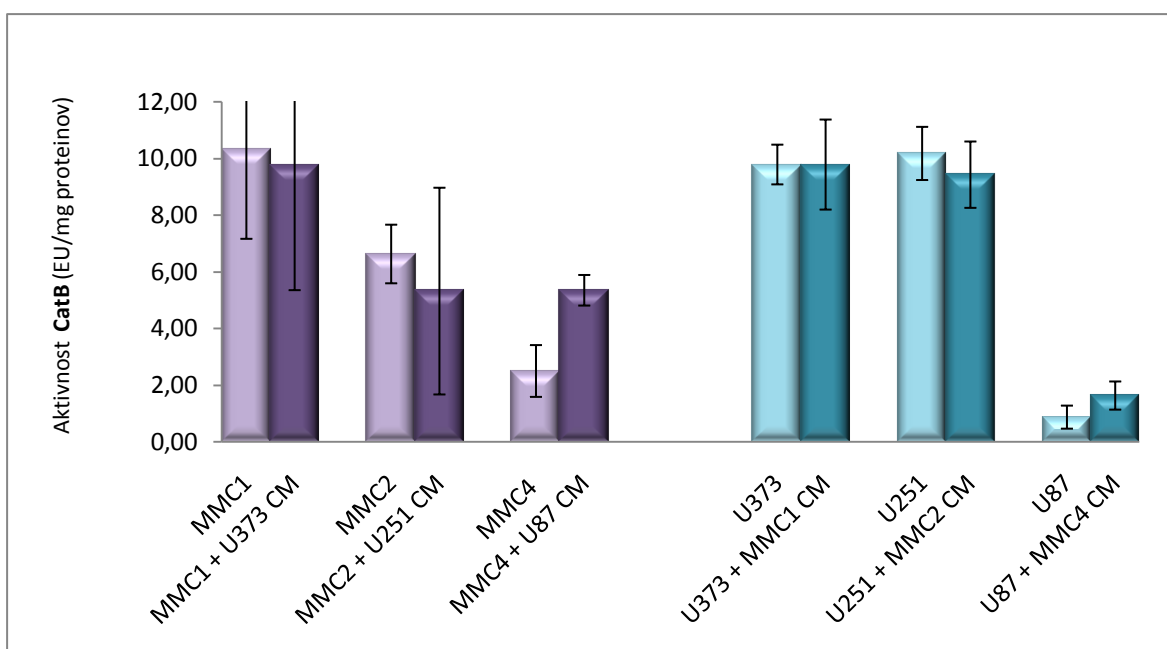
4.2.3 Določanje aktivnosti katepsina B in L-podobnih katepsinov

Aktivnost katepsina B in L-podobnih katepsinov smo določili s spremljanjem hidrolize sintetičnega substrata Z-Phe-Arg-AMC, ki ga cepita tako katepsin B, kot tudi katepsin L. Med aktivnostjo CatB in CatL ločimo z dodatkom inhibitorjev E64-c, ki inhibira tako katepsin B kot katepsin L in CA074, ki v uporabljeni koncentraciji specifično inhibira samo katepsin B. Aktivnost katepsinov smo izrazili kot količino sproščenega produkta na časovno enoto in na količino celokupnih proteinov v vzorcu ($\text{pmol}_{\text{sproščenega AMC}}/\text{mg}_{\text{celokupnih proteinov}} \cdot \text{min}$). Dobljene vrednosti smo pretvorili v specifično encimsko aktivnost; ena encimska enota (E.U.) predstavlja količino encima, ki sprosti 1 nmol produkta na minuto.

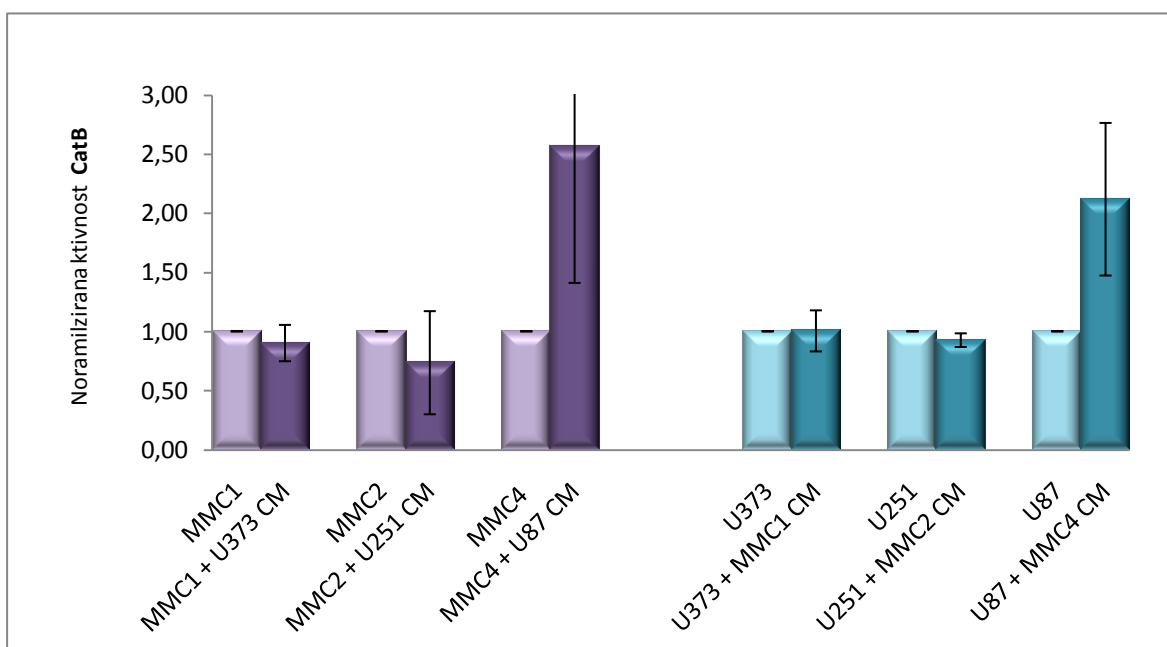
Aktivnost cisteinskih katepsinov smo izračunali tako da smo od skupne aktivnosti vseh katepsinov, ki smo jo izmerili brez dodatka inhibitorja odšteli aktivnost, ki smo jo dobili pri dodatku E-64c. Aktivnost katepsina B smo izračunali tako, da smo od aktivnosti vseh cisteinskih katepsinov odšteli vrednost, ki smo jo dobili pri dodatku CA074. Aktivnost L-podobnih katepsinov pa smo dobili z izračunom razlike med aktivnostjo cisteinskih katepsinov in katepsina B. Ker nismo uporabili specifičnega inhibitorja za CatL, lahko k izračunani njegove aktivnosti minimalno prispevajo tudi drugi cisteinski katepsini. Zato smo to aktivnost poimenovali kot aktivnost L-podobnih katepsinov.

4.2.3.1 Katepsin B

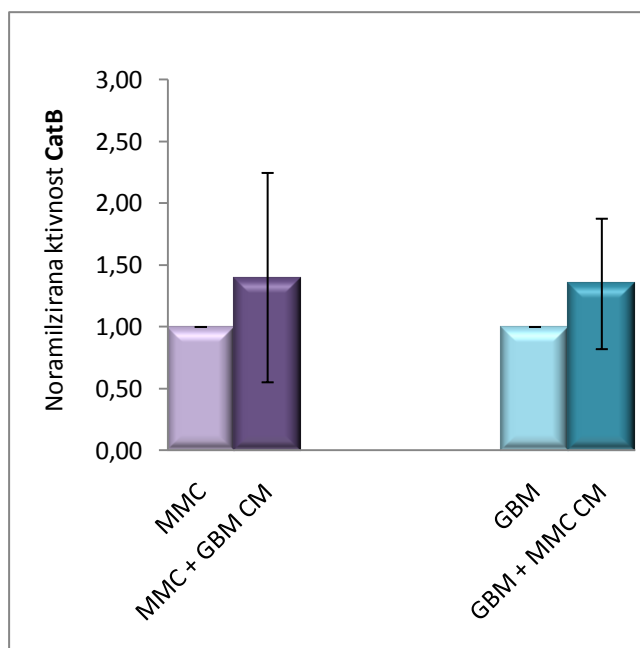
Rezultati merjenja spremembe aktivnosti katepsina B po izpostavitvi celic GBM in MMC kondicioniranemu mediju so pokazali mnoge razlike. Vendar niti pri MMC niti pri linijah GBM ni enotnega trenda povišanja ali znižanja aktivnosti CatB (Slika 27). Pri klonih MMC1 in MMC2 sicer dobimo znižanje aktivnosti po izpostavitvi celic kondicioniranemu mediju linij GBM, vendar zaradi velike standardne deviacije težko govorimo o spremembi aktivnosti (Slika 28). Enako velja za liniji U373 in U251. Pri klonu MMC4 nasprotno pride do povečanja aktivnosti katepsina B po izpostavitvi U87 CM, prav tako pa tudi pri liniji U87, po izpostavitvi MMC4 CM (Slika 27, Slika 28). Vendar v obeh primerih povišanje zaradi velike standardne deviacije nista statistično značilni. Ravno tako na njun račun tudi skupna aktivnost CatB pri MMC kot tudi pri linijah GBM kaže povišanje aktivnosti katepsina B, ki pa ni statistično značilno (Slika 29).



Slika 27: Vpliv CM na aktivnost **katepsina B** v MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Vsak poskus je narej v treh bioloških ponovitvah. Analiza je bila narejena s testom aktivnosti cisteinskih katepsinov, v duplikatih za vsak poskusni pogoj. Ni statistično značilnih sprememb aktivnosti.



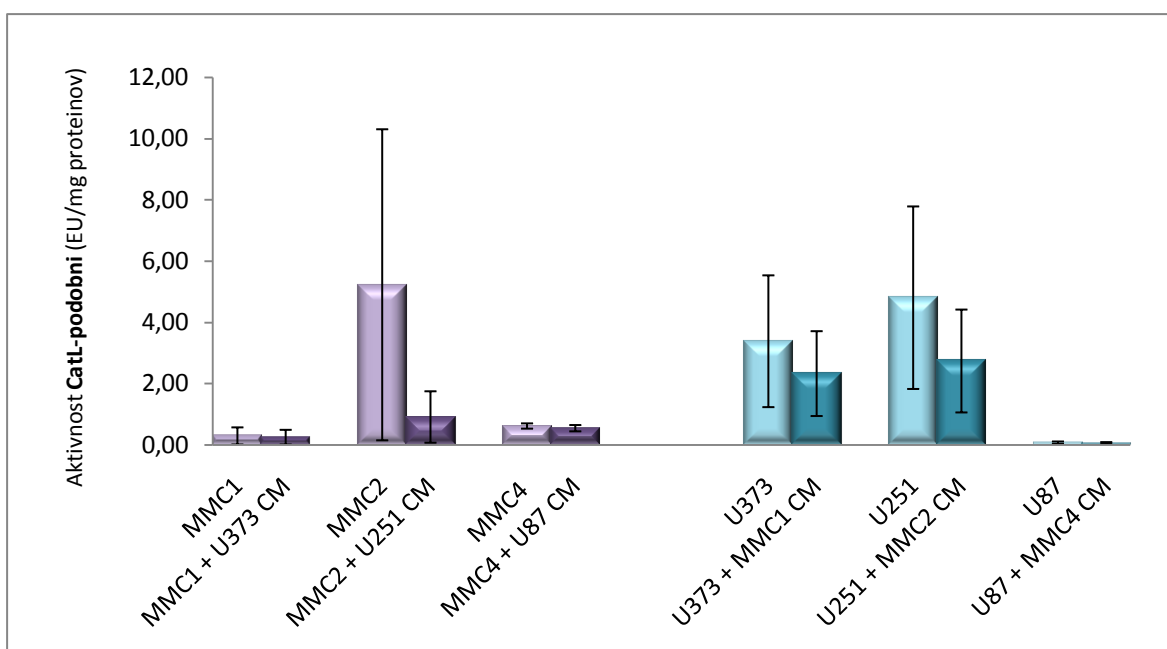
Slika 28: Vpliv CM na aktivnost **katepsina B** v MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Analiza je bila narejena s testom aktivnosti cisteinskih katepsinov. Podatki so normalizirani na kontrole. Veliko, a ne statističnoo značilno povišanje aktivnosti CatB v MMC4 + U87 CM in U87 + MMC4 CM.



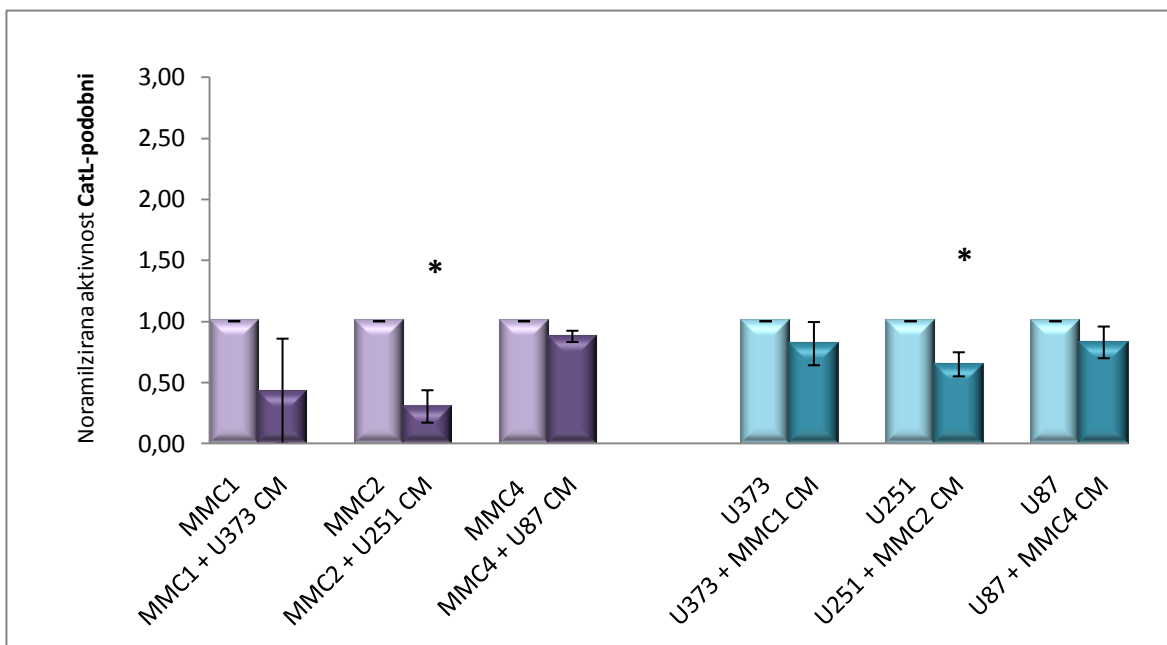
Slika 29: Vpliv CM na aktivnost **katepsina B** v MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Analiza je bila narejena s testom aktivnosti cisteinskih katepsinov. Podatki so normalizirani na kontrole. Prikazane so povprečne vrednosti vseh treh klonov MMC in linij GBM. Statistično neznačilno povišanje aktivnosti CatB v celicah MMC in GBM po izpostavitvi kondicioniranemu mediju.

4.2.3.2 Katepsinu L- podobni katepsini

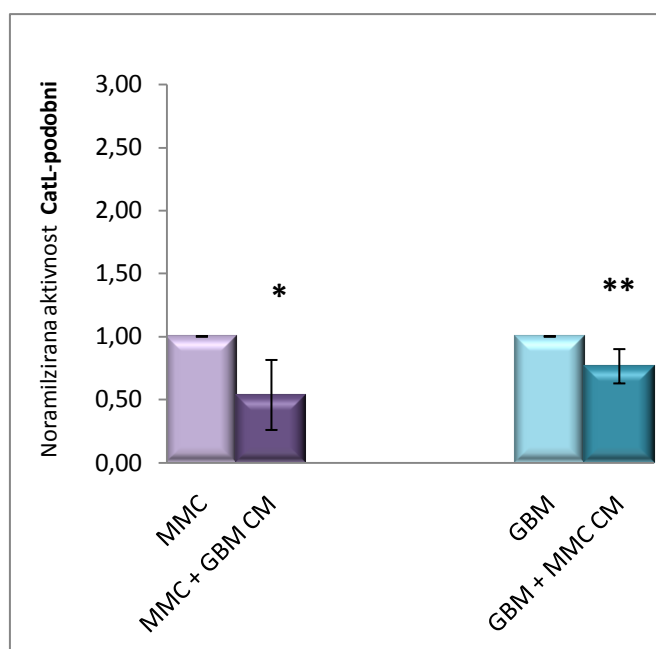
Tako MMC po izpostavitvi kondicioniranemu mediju celic GBM kot linije GBM po izpostavitvi kondicioniranemu mediju MMC kažejo trend zniževanja aktivnosti L-podobnih katepsinov. Aktivnost L-podobnih katepsinov se zniža za v vseh treh klonih MMC (Slika 30 in Slika 31). V primeru MMC2 je znižanje aktivnosti tudi statistično značilno (Slika 31). Prav tako se aktivnost L-podobnih katepsinov zniža tudi v vseh treh linijah GBM, pri celicah U251 pa je to znižanje tudi statistično značilno (Slika 31). Znižanje aktivnosti L-podobnih katepsinov pri MMC in linijah GBM je tudi v skupnem statistično značilno ($p < 0.05$) (Slika 32).



Slika 30: Vpliv CM na aktivnost **L-podobnih katepsinov** v MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Vsak poskus je narej v treh bioloških ponovitvah. Analiza je bila narejena s testom aktivnosti cisteinskih katepsinov, v duplikatih za vsak poskusni pogoj.



Slika 31: Vpliv CM na aktivnost **L-podobnih katepsinov** v MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Analiza je bila narejena s testom aktivnosti cisteinskih katepsinov. Podatki so normalizirani na kontrole. Statistično značilno znižanje aktivnosti **L-podobnih katepsinov** pri MMC2 + U87 CM in U251 + MMC2 CM.



Slika 32: Vpliv CM na aktivnost **L- podobnih Katepsinov** v MMC in linijah GBM, ki so bile izpostavljene CM tri dni. Analiza je bila narejena s testom aktivnosti cisteinskih Katepsinov. Podatki so normalizirani na kontrole. Prikazane so povprečne vrednosti vseh treh klonov MMC in linij GBM. Statistično značilno znižanje aktivnost L-podobnih Katepsinov v MMC + GBM CM in GBM + MMC CM.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Osnovi namen diplomske naloge je bil ovrednotiti vpliv kondicioniranega medija humanih mezenhimskih matičnih celic (MMC) treh različnih donorjev na tri različne glioblastomske celične linije (GBM) in obrtno, vpliv kondicioniranega medija treh različnih linij GBM na MMC. Želeli smo opredeliti vpliv kondicioniranega medija na izražanje, vsebnost in aktivnost cisteinskih katepsinov B in L (CatB in CatL). Pri tem pa smo se osredotočili predvsem na proces invazije celic, kot posledice komunikacije med celicami preko kondicioniranega medija.

Glioblastomi izločajo kemokine, ki omogočajo parakrino signalizacijo med tumorjem in MMC. MMC kot odgovor na te kemokine aktivno migrirajo na mesta, kjer se tumor razvija in tam vdirajo v tumorsko tkivo (Kidd in sod., 2009). Podobno so Nakamura in sod., (2004) dokazali, da MMC tudi *in vitro*, migrirajo k celicam GBM, Motaln in sod. (2010) pa so dokazali, da celice GBM povečajo invazijo MMC. Zaradi teh lastnosti bi bile MMC zelo uporabne v celični terapiji, kot dostavni sistem za različne proti-tumorske učinkovine (Nakamura in sod., 2004). Preden bi MMC lahko začeli uporabljati v celični in genski terapiji za zdravljenje multifomnih glioblastomov pa je potrebno natančno razjasniti njihov medsebojni vpliv. Na podlagi rezultatov naših raziskav smo želeli ovrednotiti vlogo katepsinov B in L v parakrini komunikaciji med celicami GBM in MMC.

Glede na že objavljeno literaturo o medsebojnem vplivu celic GBM in MMC preko kemokinov (Birnbbaum in sod., 2007) smo želeli potrditi hipotezo, da se bo raven izražanja, vsebnost in aktivnost katepsinov B in L v celicah GBM in MMC po njihovi komunikaciji preko kondicioniranega medija spremenila. Ker vemo, da se MMC v izražanju genov razlikujejo od rakavih celic (Sawada in sod., 2006) smo postavili hipotezo, da bodo razlike v izražanju, vsebnosti in aktivnosti CatB in CatL tudi med MMC in celicami GBM. Glede na to, da so si različnimi kloni MMC, izolirani iz kostnega mozga po osnovnih lastnostih podobni (Motaln in sod., 2010), smo predvidevali da med njimi ne bo večjih razlik v izražanju, vsebnosti in aktivnosti proučevanih katepsinov. Nasprotno pa smo predvidevali da bodo razlike v izražanju, vsebnosti in aktivnosti CatB in CatL med celicami GBM, saj si linije GBM med seboj niso enotne v lastnostih (Stea in sod., 2002).

Pri poskusih smo uporabili tri klone humanih mezenhimskih matičnih celic (MMC1, MMC2 in MMC4) in njihov kondicioniran medij ter tri različne glioblastomske celične linije (U373, U251, U87) in njihov kondicioniran medij. MMC smo za tri dni izpostavili kondicioniranemu mediju celic GBM, celice GBM pa kondicioniranemu mediju MMC. Spremembe v izražanju, vsebnosti in aktivnosti CaB in CatL smo v obeh primerih primerjali glede na kontrolne celice.

Z metodo PCR v realnem času smo določili spremembo izražanja mRNA katepsinov B in L. S pomočjo vrednosti Ct smo določili relativno količino tarčne mRNA v vzorcu, s čimer pa smo izmerili tudi izražanje genov CatB in CatL, na ravni transkripcije. Relativno izražanje genov smo izračunali z metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, ki poda izražanje gena relativno glede na kontrolo. S testi ELISA smo določili spremembo vsebnosti katepsinov B in L. Zaznali smo tako prekursorsko kot aktivno obliko katepsinov B in L, poleg tega pa tudi njihove komplekse z endogenimi inhibitorji. Spremembo aktivnosti katepsina B in L-podobnih katepsinov pa smo določili s pomočjo specifičnih inhibitorjev. Uporabili smo inhibitor cisteinskih katepsinov E64-c in specifični inhibitor katepsina B, CA074 ter spremljali hidrolizo sintetičnega substrata Z-Phe-Arg-AMC, ki ga cepita tako CatB kot CatL-podobni katepsini. Ker nismo uporabili specifičnega inhibitorja za CatL, lahko k izračunu njegove aktivnosti minimalno prispevajo tudi drugi cisteinski katepsini. Zato smo to aktivnost poimenovali kot aktivnost L-podobnih katepsinov.

Za pravilno sklepanje o vlogi katepsinov v fizioloških in patoloških procesih je namreč potrebno analizirati vsa področja na katerih poteka regulacija njihovega delovanja. Aktivnost cisteinskih katepsinov regulirajo pH, njihova sinteza, znotrajcelična razporeditev in v končni fazi njihovi endogeni inhibitorji iz družine cistatinov, predvsem stefina A in B ter cistatin C (Levičar in sod., 2002, Gole, 2009). Vsi katepsini so sintetizirani kot neaktivni prekursorji, aktivirajo pa se z avtokatalitično ali s pomočjo drugih katepsinov, pri kislem pH v lizosomu ali izven celice (Turk in sod., 2001). Sama analiza izražanja nam tako še ne pove veliko, saj so transkripti lahko različno stabilni in se različno učinkovito prevajajo v proteine. Podobno so tudi same analize vsebnosti proteinov s testi ELISA lahko zavajajoči. Dobimo lahko lažno pozitivne rezultate o vlogi katepsinov, saj lahko v nekem primeru zaznamo visoko vsebnost proteina, ki pa je še v prekursorski obliki, še neaktiven ali pa je neaktiven ker je vezan z inhibitorjem.

5.1 KATEPSIN B

MMC kot odgovor na kemokine, ki jih izločajo tumorji potujejo ven iz niš matičnih celic, po krvnem obtoku migrirajo do tumorja, tam pa vdirajo v poškodovano tkivo (Neth in sod., 2006). MMC morajo torej prečkati endotelij (Karp in Teo, 2009), ki ga obdaja zunajcelični matriks. Predvidevamo, da si MMC pri njihovi ustvarjanju prostora za invazijo skozi zunajcelični matriks endotelijskih celic (bazalno lamino) lahko pomagajo s katepsinom B, ki proteolitično razgrajuje komponente zunajceličnega matriksa. Katepsin B je povezan tako z normalnim razvojem osebka (sodeluje v znotrajceličnem procesiranju proteinov), kot tudi z mnogimi patogenimi procesi. Ker je katepsin B esencialnega pomena za normalni razvoj celic in organov in ga smatrajo kot hišni gen (angl. housekeeping gene)

(Strojniki in sod., 2005), ga navadno izražajo tudi MMC. Izražanje katepsina B v MMC je bilo v preteklosti že dokazano (Tremain in sod., 2001; Li in sod., 2009).

Rezultati naših raziskav kažejo, da kondicioniran medij celic GBM statistično značilno ($p < 0.005$) poveča izražanje katepsina B v MMC (Slika 17). Skladno s povišanim relativnim izražanjem CatB v MMC po izpostavitvi kondicioniranemu mediju celic GBM se statistično značilno ($p < 0.05$) poveča tudi vsebnost CatB (Slika 23). Prav tako pa se poveča tudi aktivnost CatB (Slika 29), vendar tu spremembe zaradi velikih standardnih deviacij niso statistično značilne. Kljub temu, da sprememba aktivnosti ni statistično značilna, glede na znano vlogo CatB (Gole in sod., 2009) v invaziji tumorskih celic verjamemo, da je to realen rezultat. Naši rezultati torej potrjujejo, da se delovanje CatB poveča pri MMC, ki so izpostavljene celicam GBM, torej bi CatB lahko imel vlogo v migraciji in invaziji MMC. *In vivo* namreč MMC migrirajo k glioblastomom (Birnbau in sod., 2007), dokazano pa je tudi, da kondicioniran medij celic GBM (enako kot ko-kulture celic GBM in MMC) poveča invazijo MMC (Motaln in sod., 2010). Vlogo katepsina B v migraciji MMC, ki so jih izolirali iz kostnega mozga pa so dokazali tudi Li in sod. (2009). Da bi ugotovili kateri faktorji, ki jih izločajo celice GBM (Hoelzinger in sod., 2007) vplivajo na povišano izražanje CatB v MMC, bi morali naše raziskave še nadgraditi. Te faktorje bi lahko analizirali v koncentriranem kondicioniranem mediju celic GBM s testi ELISA ali z mrežami s protitelesi (membransko vezana protitelesa). Lahko pa bi tudi analizirali stopnjo migracije MMC k različnim kemokinom s pomočjo insertov in rekombinantnih kemokinov. Za tiste, ki se izločajo v povišanih koncentracijah ali povzročijo večjo migracijo MMC bi lahko potem nadalje ugotavljali kateri od njih vpliva na povišano izražanje CatB v uporabljenih MMC s pomočjo metode PCR v realnem času. Vemo že, da invazijo MMC stimulirajo različni faktorji, ki jih izločajo tumorji. Med njimi so TGF- β 1, IL-1 β , TNF- α , SDF-1 α , IL-6, IL-8 in MCP-1, VEGF-A in NT-3 (Ries in sod., 2007; Ho in sod., 2009; Birnbau in sod., 2007). Dokazano je, da nekateri od teh faktorjev vplivajo na izražanje matriks metaloproteaz-1 (Ho in sod., 2009). Metaloproteaze razgrajujejo zunajcelični matriks in lahko delujejo samostojno ali pa v sklopu različnih proteoliznih reakcij. Nekateri faktorji, kot je npr. TGF- β , ki ga izločajo celice GBM (pa tudi MMC) in predvidoma preko Smad poti sam ali pa v povezavi z β -kateninom (preko Wnt signalne poti) vpliva na izražanje metaloproteaz v MMC (Jian in sod., 2006). Možno bi bilo, da se v to predvideno pot v MMC vključuje tudi katepsin B, saj bi lahko preko uPA, ki dokazano sodeluje v migraciji MMC k tumorjem (Gutova in sod., 2008) in plazmina, ki aktivira različne matriks metaloproteaze (Schmitt in sod., 1992) vplival na izražanje metaloproteaz v MMC. Katepsin B namreč aktivira Pro-uPA v uPA, ta pretvori plazminogen v aktiven plazmin, ta pa lahko sam ali pa preko aktivacije matriks metaloproteaz razgrajuje zunajcelični matriks (Andreasen in sod., 1997). Realnost naše hipoteze o povezavi poti v kateri TGF- β vpliva na izražanje metaloproteaz preko β -katenina s kaskadno potjo CatB preko uPA podpirajo dokazi Mann in sod. (1999), ki so pokazali, da povišano izražanje β -

katena posredno vpliva na izražanje uPAR (receptorja uPA), v celicah raka črevesja. Prav tako je znano, da CatB aktivira TGF- β (Somnna in sod. 2002).

Trend povišanja relativnega izražanja CatB se kaže pri vseh treh klonih MMC (MMC1, MMC2 in MMC4), pri klonih MMC2 in MMC4 pa je statistično značilno povišanje potrjeno tudi s Studetovim T-testom (Slika 16). Kondicioniran medij celic GBM statistično značilno poviša vsebnost CatB v MMC2 in MMC4, v MMC1 pa zniža njegovo vsebnost, vendar ne statistično značilno (Slika 22). Pri merjenju aktivnosti CatB žal nismo dobili enotnega trenda povišanja ali znižanja (Slika 28). Klona MMC1 in MMC2 po izpostavitvi kondicioniranemu mediju celic GBM tako kažeta znižanje aktivnosti CatB, medtem ko se pri klonu MMC4 aktivnost poviša. Glede na veliko zvišanje aktivnosti CatB v MMC4 po izpostavitvi kondicioniranemu mediju celic U87, MMC tudi na skupnem grafu kažejo povišanje aktivnosti, ki pa ni statistično značilno (Slika 29). Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da prihaja do razlik med hitro (MMC2 in MMC4) ter počasi (MMC1) rastočimi kloni MMC, katere so dokazali tudi Motaln in sod. (2010). To bi lahko pomenilo, da različna vsebnost CatB v MMC morda vpliva na različne sposobnosti MMC za migracijo k glioblastomom. Razlike v migraciji klonov MMC, ki so bili izolirani iz različnih donorjev kostnega mozga, h gliomskim celicam so opazili tudi Ho in sod., (2009). Predvidevajo, da so za razlike v migraciji MMC odgovorni citokini, ki kažejo različen tropizem za tumorje, pri tem pa naj bi sodelovale tudi matriks metaloproteaze. Kot možne dejavnike, ki bi lahko vplivali na razlike v aktivnosti med kloni MMC ne moremo izključiti ne optimalnega delovanja reagentov in morebno premajhnega števila ponovitev pri izvedbi merjenja aktivnosti. Poskusov nismo mogli izvesti v večjem številu ponovitev zaradi omejene količine materiala, ki smo ga dobili iz celic v enem poskusu.

Ugotovili smo tudi, da se klon MMC4 v izražanju in količini katepsina B statistično značilno razlikuje od klonov MMC1 in MMC2 (Preglednica 11 in Preglednica 13). Možno je, da pride do sprememb fenotipa MMC med njihovim *in vitro* gojenjem. Spremembe fenotipa MMC, ki nastanejo pri gojenju celic in vplivajo na njihovo sposobnost migracije so omenili tudi Kemp in sod. (2005; cit. po Potapova in sod., 2008). Mogoče pa je tudi, da gre za razlike v izražanju CatB med kloni MMC, saj so kloni MMC1, MMC2 in MMC4 izolirani iz različnih darovalcev kostnega mozga.

Kondicioniran medij MMC nasprotno nima statistično značilnega vpliva na izražanje CatB v celicah GBM; opazimo lahko le rahlo povišanje izražanja CatB (Slika 16). Obratno se vsebnost katepsina B v celicah GBM, po njihovi izpostavitvi MMC statistično značilno zniža ($p < 0.00005$) (Slika 23). Trend znižanja vsebnosti CatB se kaže pri vseh treh linijah GBM (Slika 22). Največji vpliv pa ima kondicioniran medij MMC2, manjšega kondicioniran medij MMC4, najmanjšega pa kondicioniran medij MMC1 (Slika 23).

Meritve aktivnosti so pokazale, da se aktivnost katepsina B v celicah GBM po izpostavitvi kondicioniranemu mediju MMC sicer poveča, vendar ne statistično značilno (Slika 29). Rezultati merjenja aktivnosti se ne skladajo z njegovo znižano vsebnostjo v celici. S testi ELISA smo izmerili vsebnost katepsina B, ki se nahaja v celicah. Za njegovo vlogo v invaziji celic GBM in razgradnji zunajceličnega matriksa, pa je pomemben tudi tisti del katepsinov B, ki se izločajo iz celice (McCormick, 1993). Zato, bi bilo za bolj pravilno sklepanje o vlogi CatB v invaziji celic GBM po izpostavitvi MMC, potrebno pomeriti še količino in aktivnost CatB, ki se izloča iz celice. V regulacijo delovanja zunajceličnega CatB, ki ga izločajo celice GBM so poleg tega vpleteni še mnogi drugi faktorji kot so stopnja aktivacije, destabilizacija z nevtralnim pH in prisotnost njegovih inhibitorjev (McCormick, 1993). Glede na naše rezultate, ki kažejo, da se vsebnost CatB v celicah GBM po izpostavitvi MMC, statistično značilno zniža, se morda večina katepsina B iz celic GBM translocira na površino celice ali pa v izloča v izvencelični prostor. To bi pomenilo, da MMC morda vplivajo na celice GBM tako, da povečajo izločanje CatB iz celice. S tem bi lahko razložili tudi rezultate, da je vsebnost CatB statistično značilno znižana v GBM, njegovo izražanje in aktivnost pa sta le rahlo povišana, vendar ne statistično značilno. Povišano izražanje in izločanje CatB je značilno za mnoge tumorje in je tudi v korelaciji z njihovim invazivnim in metastatskim potencialom (Frosch in sod., 1999). Delno podobne rezultate so dobili Gole in sod. (2009), ki so v aktivno vdirajočih celicah U87 izmerili le povišano aktivnost katepsina B, ne pa tudi povišan CatB na ravni transkripcije ali translacije. Lemaire in sod. (1997) pa so dokazali, da citokina TNF- α in IFN- γ povečata izločanje CatB iz sinovialnih fibroblastom podobnih celic. Ta dva citokina izločajo tudi MMC, zato bi bilo popolnoma mogoče, da povečata izločanje CatB iz celic GBM. Hamer in sod. (2009) pa so nedavno dokazali, da jedrni transkripcijski faktor kapaB (NF κ B), ki se v celicah aktivira v stresu kot je hipoksija (značilno za tumorsko okolje) (Crisostomo in sod., 2008), poveča izražanje in izločanje CatB iz celic osteosarkoma. Enako bi se morda lahko zgodilo tudi v celicah GBM po njihovi izpostavitvi MMC.

Razlike v vplivu kondicioniranega medija klonov MMC na aktivnost CatB v celicah GBM (Slika 28) bi lahko utemeljili s tem, da različni kloni MMC izločajo različne koncentracije citokinov (Potapova in sod., 2007), ki sodelujejo v parakrini komunikacijo med celicami GBM in MMC. Enako lahko sklepamo tudi za vpliv kondicioniranega medija celic GBM na aktivnost CatB v MMC, ki prav tako ni enoten. Različen vpliv kondicioniranega medija različnih klonov MMC ali linij GBM na invazijo so dobili tudi Motaln in sod. (2010).

Kljub temu, da naši rezultati o povišanem izražanju in aktivnosti niso statistično značilni in niso skladni z dokazi o zmanjšanju invazije celic GBM po njihovi izpostavitvi MMC, ki so jih predstavili Motaln in sod. (2010), verjamemo, da imajo MMC vseeno zelo pomembno vlogo v invaziji celic GBM preko vpliva na CatB. Naše rezultate bi lahko povezali z dokazi Nakamura in sod. (2004), ki so pokazali, da se MMC, injicirane v glioblastom

podgane prerazporedijo na mejne cone med tumorjem in normalno parenhimo možgan (Nakamura in sod., 2004). Glede na to, da se MMC razporedijo na ta področja in da je to tudi mesto od koder celice GBM iz glavne tumorske mase vdirajo v okoliško zdravo tkivo, pri čemer ima pomembno vlogo prav CatB, bi lahko postavili hipotezo, da MMC preko CatB vplivajo na povečano invazijo celic GBM. Vpliv MMC na povišano invazijo celic GBM bi lahko razložili z enako signalno potjo, kot smo jo predpostavili v primeru vpliva kondicioniranega medija celic GBM na celice MMC, saj MMC prav tako dokazano izražajo TGF- β . Teorijo možnih signalnih poti preko katerih pride do povišanega izražanja katepsina B zaradi povišanega izločanja TGF- β ali pa katerega drugega topnega faktorja, ki ga izločata tako MMC kot tudi celice GBM nam potrjujeta kar dva primera v naših rezultatih. Opazimo lahko, da pride do povišane aktivnosti CatB tako v primerih, ko smo celice MMC4 izpostavili kondicioniranemu medij celic U87, kot tudi v primeru, ko smo celice U87 izpostavili kondicioniranemu mediju MMC.

Če primerjamo razlike v relativnem izražanju CatB med celicami GBM in MMC vidimo, da je relativno izražanje CatB v povprečju višje v linijah GBM kot v MMC (Slika 15). Rezultat je smiseln, saj so že Rempel in sod. (1994) dokazali, da je količina mRNA CatB višja v bolj malignih celicah/gliomih kot v normalnem (možganskem) tkivu. Celice GBM imajo v povprečju tudi višjo vsebnost in aktivnost CatB kot MMC (Slika 21 in Slika 27). Visoko izražanje katepsinov v rakavih celicah je lahko posledica podvajanja genov, povišane transkripcije, delovanje alternativnih promotorjev ali pa alternativnega povezovanja. Ti dogodki lahko vodijo tudi v njihovo znotrajcelično prerazporeditev in izločanje iz celice (Yan in Sloane, 2003, cit. po Lah in sod.; Hazen in sod., 2000; cit. po Lah in sod., 2006). Velike razlike v aktivnosti CatB med linijami GBM bi lahko povezali z možnim različnim izražanjem inhibitorjev (kot so stefin A, stefin B in cistatin C) ali različno stopnjo aktivacije proteaz. Aktivnost in funkcija katepsinov se prav tako spreminjata z mestom njihovega nahajanja v ali izven celice (Mohamed in Sloane, 2006).

Najvišjo vsebnost in aktivnost katepsina B imajo celice U251, manjšo U373, precej manjšo pa celice U87 (Slika 21 in Slika 27). Ker raven katepsina B sovpada s kliničnimi dokazi za invazijo in je tudi prognostični tumorski kazalec za preživetje bolnikov z multiformnim glioblastomom (Strojnjak in sod., 1999; Strojnjak in sod., 2005) bi lahko njegovo različno raven izražanja v celicah GBM povezali z njihovimi invazijskimi sposobnostmi. Motaln in sod. (2009) so dokazali, da imajo celice U251 dokazano najvišjo invazijo, celice U373 nekoliko nižjo, U87 pa najnižjo. Naši rezultati merjenja količine in aktivnosti CatB se ujemajo s stopnjo invazivnosti teh celic, zato bi lahko sklepali, da CatB verjetno vpliva na invazivnost teh celic. Rezultati merjenja vsebnosti in aktivnosti CatB niso popolnoma skladni z izražanjem CatB v teh celicah, saj imajo U87 najvišje izražanje, U251 in U373 pa nekoliko manjše. Neujemanje vsebnosti in aktivnosti CatB z izmerjenim izražanjem CatB v celicah U87 bi lahko utemeljili s posttranskripcijskimi in posttranslacijskimi

modifikacijami ter alternativnim združevanjem (Berquin in sod., 1995), kar lahko vodi v različno učinkovito translacijo, vpliva pa tudi na stabilnost mRNA katepsina B ter na njegovo lokalizacijo v gliomskih celicah (Elliott in Sloane, 1996). Linije GBM se torej v skladu z našimi hipotezami in pričakovanji med seboj razlikujejo v izražanju, vsebnosti in aktivnosti CatB (Preglednica 11, Preglednica 13, Slika 27).

Če primerjamo raven izražanja katepsina B v različnih linijah GBM z vplivom njihovega kondicioniranega medija na MMC lahko opazimo pozitivno povezavo. Kondicioniran medij celic U87, ki so v primerjavi z U251 in U373 najmanj invazivne, imajo tudi najmanjši učinek na izražanje CatB v MMC (Slika 16). Podobno iz rezultatov lahko vidimo tudi, da je vpliv kondicioniranega medija MMC na izražanje CatB najmanjši na celice U87. Ugibamo lahko, da se celice GBM razlikujejo tako v izločanju citokinov kot tudi odzivnosti nanje. Za potrditev hipoteze bi morali nadalje analizirati kako se različne celice GBM (ali MMC) razlikujejo v izražanju citokinov. Glede na to kateri citokini bi se izločali v najvišjih koncentracijah in glede na vpliv le teh na izražanje CatB v celicah GBM (MMC) bi lahko sklepali o možnih kandidatih, ki vplivajo na spremembe izražanja CatB. Seveda bi morali analize dopolniti še s fiziološkimi poskusi, kjer bi blokirali izražanje ali delovanje kandidatnega citokina npr. s protismiselno cDNA ali protitelesi in opazovali, če še vedno prihaja do sprememb v izražanju CatB.

Naši rezultati temeljijo na poskusih *in vitro*. Glede na to, da sta invazija MMC k glioblastomom (Nakamura in sod., 2004) in vloga CatB v invaziji celic GBM (Rempel in sod., 1994) dokazana tudi *in vivo*, bi verjetno enake rezultate dobili tudi *in vivo*. Torej lahko pričakujemo, da ima katepsin B vlogo tudi v migraciji in invaziji celic MMC v tumorsko tkivo multiformnega glioblastoma. Vloga CatB v migraciji in invaziji celic MMC k glioblastomom sicer do sedaj še ni bila dokazana. Naše previdevanje dopolnjujejo raziskave Nakamiza in sod. (2005), ki so dokazali, da MMC izolirane iz kostnega mozga vdirajo v tumorsko maso U87 in U251 ksenograftov v miškah. Glede na naše rezultate domnevamo, da je pri tem procesu udeležen CatB. To bi lahko dokazali z dodatimi eksperimenti kjer bi MMC npr. fluorescentno označili za vizualizacijo njihovega vdora v ksenografte GBM. Vlogo CatB pri tem pa bi poskušali dokazati npr. z izbitjem gena CatB v MMC ali pa z utišanjem gena s protismiselno RNA.

5.2 KATEPSIN L

Dokazano je, da povišana aktivnost katepsina L v zunajceličnem prostoru omogoča večjo migracijo in poveča razgradnjo zunajceličnega matriksa (Gocheva in Joyce, 2007; Jedeszko in Sloane, 2004). CatL povezujejo še z mnogimi drugimi procesi, kot je regulacija celičnega cikla, zmanjšana ali povečana apoptoza tumorskih celic, angiogeneza in metastaziranje (Brix in sod., 2008; Gocheva in sod., 2006; Lankelma in sod., 2010; Stoka in sod., 2001).

Kondicioniran medij linij GBM nima vpliva na izražanje katepsina L v celicah MMC (Slika 19). Vsebnost CatL se v MMC po izpostavitvi kondicioniranemu mediju celic GBM statistično značilno ($p < 0.05$) zviša (Slika 26), nasprotno pa se aktivnost L- podobnih katepsinov statistično značilno ($p < 0.05$) zniža (Slika 32). Glede na neujemanje med vsebnostjo in aktivnostjo CatL v MMC po njihovi komunikaciji s celicami GBM bi lahko sklepali, da smo s testi ELISA zaznali neaktivno obliko CatL. Na podlagi meritev izražanja, vsebnosti in aktivnosti CatL v MMC po njihovi komunikaciji s celicami GBM težko sklepamo o vlogi CatL v invaziji MMC. Da bi celice GBM znižale invazijo MMC preko CatL je bolj malo verjetno, saj je bilo že velikokrat dokazano, da glioblastomi privlačijo MMC in povišajo njihovo migracijo (Nakamizo in sod., 2005), prav ta pa so tudi dokazali, da zvišajo tudi invazivnost in proliferacijo MMC (Motaln in sod., 2010). Na podlagi naših rezultatov torej predvidevamo, da CatL ni povezan z zvišano invazivnostjo ali proliferacijo MMC po njihovi komunikaciji s celicami GBM. Podobno so tudi Strojnik in sod. (2005) pokazali, da CatL nima prognozične vrednosti za preživetje bolnikov z GBM; sklepali so, da verjetno zaradi manjše vloge v invazivnosti tumorjev.

Nasprotno pa se pri celicah GBM, ki so bile izpostavljene kondicioniranemu mediju MMC kaže trend znižanega relativnega izražanja CatL (Slika 19). V primeru celic U251 in U87 je to znižanje tudi statistično značilno ($p < 0.0005$ in $p < 0.05$). Enako kondicioniran medij MMC v linijah GBM statistično značilno ($p < 0.0005$) zmanjša vsebnost katepsina L (Slika 26) ter statistično značilno zniža ($p < 0.005$) katepsinu L- podobno encimsko aktivnost (Slika 32). Glede na rezultate lahko sklepamo, da MMC izločajo faktorje, ki vplivajo na spremembo izražanja CatL v celicah GBM. Znižanje izražanja, vsebnosti in aktivnosti CatL v celicah GBM po izpostavitvi kondicioniranemu mediju MMC se ujema z zmanjšano proliferacijo celic GBM po komunikaciji z MMC (Motaln in sod., 2010). Podobno so Goulet in sod. (2004) v fibroblastnih celicah NIH3T3 dokazali, da CatL morebiti vpliva na celični cikel z razgradnjo jedrnega transkripcijskega faktorja CDP/Cux in tako zmanjša proliferacijo celic. Tudi Gocheva in sod. (2006) so dokazali, da izbitje gena za CatL zmanjša proliferacijo in rast tumorja.

Povišano izražanje CatL v gliomskih celicah inducira angiogeni faktor VEGF (Keerthivasan in sod., 2007). Na podlagi naših rezultatov znižanja izražanja, vsebnosti in aktivnosti CatL v celicah GBM po izpostavitvi kondicioniranemu mediju MMC bi tako lahko sklepali, da lahko MMC zmanjšajo angiogenezo preko vpliva na zmanjšanje vsebnosti CatL. Možno bi bilo, da MMC zmanjšajo izražanje/aktivnost/izločanje VEGF v celicah GBM. Po drugi strani pa je znano, da MMC same izražajo VEGF (Chen in sod., 2008) in bi z izločanjem VEGF lahko tudi pripomogle k angiogenezi. Naši rezultati tako v večini govorijo v prid uporabe MMC v zdravljenju glioblastomov.

Doslej v literaturi še ni bilo objav o izražanju katepsina L v MMC. Kloni MMC imajo v poprečju nižje izražanje, vsebnost in aktivnost katepsina L kot linije GBM (Slika 18), razlike so tudi statistično značilne (Preglednica 12 in Preglednica 14). Ker raven izražanja katepsina L korelira s stopnjo malignosti (Skrzydłewska in sod., 2005) je rezultat smiseln. V skadu z našimi pričakovanji med različnimi kloni MMC ni razlik v izražanju, vsebnosti in aktivnosti katepsina L (Slika 18, Slika 24 in Slika 30).

Po naših pričakovanjih se med kloni GBM kaže razlika v izražanju, vsebnosti in aktivnosti CatL (Slika 18, Slika 24 in Slika 30). Zopet lahko opazimo pojav, ki smo ga opazili že pri katepsinu B, da je raven izražanja CatL najvišja v celicah U87, hkrati pa sta njegova vsebnost in aktivnost pa najnižja v teh celicah (Slika 24). Pojav si zopet lahko razlagamo na več načinov. Možno bi bilo, da se protein izloča v zunajcelični prostor, kar je značilno za tumorske celice (Frosch in sod., 1999), zaradi česar pa v celici ne zaznamo visoke količine proteina ali njegove aktivnosti. Te hipoteze bi morali potrdi z merjenjem količine in aktivnosti CatL, ki se izloči iz celic v kondicioniran medij. Možno pa je tudi, da prihaja do posttranskripcijskih modifikacij, ki vplivajo na različno učinkovitost translacije in aktivnost CatL (Arora in sod., 2002). Razlike v aktivnosti L-podobnih katepsinov med celimi GBM se ujema z njihovo invazijsko sposobnostjo. Kot je že bilo omenjeno so Motaln in sod. (2009) pokazali, da so celice U251 najbolj invazivne, manj celice U373, najmanj pa U87. Vlogo CatL v invaziji celic GBM so dokazali Zajc in sod. (2006), kar potrjujejo tudi naši rezultati. Nasprotno rezultate Goleta in sod. (2009), dobljene v 3D sferoidnem modelu invazije lahko razložimo z drugačnim obnašanjem celic GBM v monosloju in 2D modelu invazije. Sklepamo, da CatL vendarle lahko sodeluje v invaziji celic GBM v dvodimenzionalnem modelu.

Levičar in sod. (2003) ter Zajc in sod. (2006) so pokazali, da povišano izražanje katepsina L ščiti gliomske celice pred indukcijo apoptoze. Za varovanje tumorskih celic pred apoptozo je pomembnejši katepsin L, ki se nahaja v celici, natančneje v lizosomu, endoplazemskem retikulumu ali mitohondriju (Lankelma in sod., 2010). V primeru, da se CatL prenese iz lizosoma v citosol lahko deluje obratno in sproži apoptozo celic (Van

Nierop in sod., 2006). Enako velja, da je za vpliv CatL na proliferacijo pomembna izoforma CatL, ki se nahaja v jedru, kjer pospešijo vstop celice v S fazo s proteotiličnim procesiranjem CDP/Cux (Goulet in sod., 2007). Glede na dokaj visoko raven izražanja ter visoko vsebnost ter aktivnost CatL v celicah U251 in U373, v primerjavi s celicami U87 so morda celice U251 in U373 tudi bolj proliferacijsko aktivne in odpornejše na apoptozo od celic U87. To je tudi v skladu s pozitivno korelacijo med izražanjem, vsebnostjo in aktivnostjo CatL in stopnjo malignosti (Levičar in sod., 2002). Če to drži, potem lahko sklepamo, da ima CatL morda različno vlogo v različnih linijah GBM. Odvisnost vloge katepsina L od tipa tkiva in njegovega mikro-okolja omenjajo tudi Lankelma in sod. (2010). Razlike med uporabljenimi linijami GBM so tako lahko tudi posledica biološke variabilnosti, saj so celice GBM izolirane iz različnih darovalcev z glioblastomom.

6 POVZETEK

Mezenhimske matične celice (MMC) potujejo k glioblastomom. Z dokazi o njihovi sposobnosti migracije se je porodila tudi ideja o njihovi uporabi v zdravljenju glioblastomov s celično terapijo. MMC je razmeroma preprosto izolirati ter namnožiti do zadostnega števila, potrebnega za klinično uporabo, imajo visok potencial za diferenciacijo v različne tkivne celične tipe, niso imunogene, poleg tega pa njihova uporaba ni etično sporna. Zaradi njihove invazivne narave, bi bile gensko spremenjene MMC primerne za dostavo proti-tumorskih učinkovin do oddaljenih tumorskih celic, po infiltraciji in metastaziranju glioblastomskih celic (GBM).

Obstaja vse več dokazov o vlogi MMC v zmanjšanju proliferacije in invazije glioblastomskih celic. Iz že objavljenih raziskav vemo, da med glioblastomskimi celicami (GBM) in MMC obstaja parakrina komunikacija preko kemokinov, angiogenih citokinov in drugih faktorjev, da celice GBM ali njihov kondicioniran medij povečajo invazivnost MMC, MMC ali njihov kondicioniran medij pa zmanjšajo invazivnost celic GBM. Znano je tudi, da so invazija, proliferacija in apoptoza celic GBM deloma odvisne od cisteinskih katepsinov B in L, ki se v celicah GBM izražajo v povišanih količinah. V do sedaj objavljeni literaturi pa skoraj ni mogoče najti podatkov o vsebnosti katepsinov v MMC in njihovi morebitni vlogi pri invaziji/migraciji MMC k glioblastomom. Prav tako še ni natančno raziskano na kakšen način MMC znižajo invazijo celic GBM.

V diplomski nalogi smo želeli opredeliti vpliv kondicioniranega medija celic GBM na MMC in vpliva kondicioniranega medija MMC na celice GBM. Pri tem so nas zanimali vplivi na izražanje, vsebnost in aktivnost cisteinskih katepsinov B in L, na podlagi česar smo želeli sklepati predvsem o njihovi vlogi v invaziji. Pri raziskovalnem delu smo uporabili metode PCR v realnem času, ELISA in merjenje aktivnosti katepsinov s specifičnimi inhibitorji. Z omenjenimi testi smo dokazali, da kondicioniran medij celic GBM vpliva na izražanje, vsebnost in aktivnost katepsinov B in L v MMC. Enako velja za vpliv kondicioniranega medija MMC na celice GBM. Potrdili smo tudi razlike v izražanju, vsebnosti in aktivnosti katepsinov B in L med uporabljenimi linijami celic GBM in celicami GBM ter MMC. V primeru CatB smo ovrgli hipotezo, da med kloni MMC ni razlik v izražanju, vsebnosti in aktivnosti katepsinov, v primeru CatL pa smo to hipotezo potrdili.

Pri našem raziskovalnem delu smo prišli do naslednjih sklepov:

- Katepsina B in L se izražata v MMC. Vidne so razlike v izražanju, vsebnosti in aktivnosti katepsina B in L med različnimi kloni MMC.

- Zaradi različnega vpliva kondicioniranega medija celic GBM na izražanje katepsinov B in L v MMC, imajo različni kloni MMC verjetno tudi različne sposobnosti migracije k celicam GBM.
- Celice GBM verjetno povišajo invazijo MMC preko vpliva na povišano izražanje, vsebnost in aktivnost katepsina B.
- Zanjšana invazija in proliferacijska sposobnost celic GBM na katero vplivajo MMC je povezana z znižanim izražanim izražanjem, vsebnostjo in aktivnostjo katepsina L. Zmanjšano delovanje katepsina L v celicah GBM bi lahko vplivalo tudi na povišano apoptozo teh celic in zmanjšano angiogenezo.
- Celice U251, U373 in U87 se med seboj razlikujejo v izražanju, vsebnosti in aktivnosti katepsinov B in L. Med njimi najvišjo raven izražanja katepsina B in L kažejo celice U251, ki bi jih zato lahko smatrali za bolj maligne in invazivne od celic U373 in U87.

Raziskovalno delo kaže na nekatera nova dejstva, ki bi lahko podpirala uporabo mezenhimskih matičnih celic v zdravljenju multiformnih glioblastomov. Hkrati pa smo postavili temelje za mnoge nadaljnje raziskave, ki bodo lahko še bolje razjasnile medsebojni vpliv glioblastomskih in mezenhimskih matičnih celic. Potrebno bi bilo natančno opredeliti kakšna je količina in aktivnost proteinov, ki se izločajo iz celic kot posledica parakrine komunikacije med MMC in celicami GBM, kateri so ti faktorji, ki jih izločajo MMC ali celice GBM in vplivajo na spremembe izražanja in delovanja katepsinov, kako ti faktorji posamezno ali skupaj vplivajo na izločanje/ aktivnost/ posttranskripcijske/ posttranslacijske modifikacije katepsinov. Za dokončno sklepanje o vlogi katepsinov B in L v procesu invazije MMC in celic GBM, kot posledice njune parakrine komunikacije pa bi bilo seveda potrebno narediti tudi funkcijske študije ter *in vivo* teste. Zelo pomembno je tudi, da še pred tem natančno razjasnimo lastnosti celic kot takih in mehanizmov, ki so v teh celicah vpleteni v regulacijo nastanka ali razvoja tumorja.

7 VIRI

- Abdi R., Fiorina P., Adra C. Atkinson M., Sayegh M. 2008. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes*, 57, 7: 1759-67
- Aboody KS., Brown A., Rainov NG., Bower KA., Liu S, Yang W., Small JE., Herrlinger U., Ourednik V., Black PM., Breakefield XO., Snyder EY. 2000. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 23: 12846-12851
- Alberts B., Bray D., Alviano F., Fossati V., Marchionni C., Franchina M., Lanzoni G., Cantoni S., Cavallini C., Bianchi F., Tazzari PL., Pasquinelli G., Foroni L., Ventura C., Grossi A., Bagnara GP. 2007. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Developmental Biology*, 7: 11
- Amado LC., Saliaris AP., Schuleri KH., St John M., Xie JS., Cattaneo S., Durand DJ., Fitton T., Kuang JQ., Stewart G., Lehrke S., Baumgartner WW., Martin BJ., Heldman AW., Hare JM. 2005. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 32: 11474-11479
- Andreasen PA., Kjoller L., Christensen L., Duffy MJ. 1997. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *International Journal of Cancer*, 72,1: 1–22.
- Arora S., Chauhan SS. 2002. Identification and characterization of a novel human cathepsin L splice variant.. *Gene*, 293, 1-2: 123-31
- Barrett AJ., Kirschke H. 1981. Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods in Enzymology*, 80: 535-561
- Beltrami AP., Cesselli D., Bergamin N., Marcon P., Rigo S., Puppato E., D'Aurizio F., Verardo R., Piazza S., Pignatelli A., Poz A., Baccarani U., Damiani D., Fanin R., Mariuzzi L., Finato N., Masolini P., Burelli S., Belluzzi O., Schneider C., Beltrami CA. 2007. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood*, 110, 9: 3438-3446
- Berdowska I. 2004. Cysteine proteases as disease markers. *Clinica Chimica Acta*, 342, 1-2: 41-69
- Bernardo ME., Zaffaroni N., Novara F., Cometa AM., Avanzini MA., Moretta A., Montagna D., Maccario R., Villa R., Daidone MG., Zuffardi O., Locatelli F. 2007. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Research*, 67, 19: 9142-9

- Berquin IM., Cao L., Fong D., Sloane BF. 1995. Identification of two new exons and multiple transcription start points in the 5'-untranslated region of the human cathepsin-B-encoding gene. *Gene*, 159, 2: 143-149
- Bervar A., Zajc I., Sever N., Katunuma N., Sloane BF., Lah TT. 2003. Invasiveness of transformed human breast epithelial cell lines is related to cathepsin B and inhibited by cysteine proteinase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003 384, 3: 447-455
- Bianco P., Robey PG., Simmons PJ. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2, 4: 313-319
- Bieback K., Kern S., Kluter H., Eichler H. 2004. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22, 4: 625-634.
- Birnbaum T., Roider J., Schankin C., Padovan C., Schochor C., Goldbrunner R., Straube A. 2007. Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *Journal of Neuro-oncology*, 83, 3: 241-247
- Bjerkvig R., Johansson M., Miletic H., Niclou SP. 2009. Cancer stem cells and angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19, 279-284
- Bocker W., Yin Z., Drosse I., Rossmann O., Wierer M., Popov C., Locher M., Mutschler W., Docheva D., Schieker M. 2008. Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12, 4: 1347-1359
- Bonora-Centelles A., Jover R., Mirabet V., Lahoz A., Carbonell F., Castell JV., Gómez-Lechón MJ. 2009. Sequential hepatogenic transdifferentiation of adipose tissue-derived stem cells: relevance of different extracellular signaling molecules, transcription factors involved, and expression of new key marker genes. *Cell Transplantation*, 18, 12: 1319-1340
- Brix K., Dunkhorst A., Mayer K., Jordans S. 2008. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie*, 90, 2, 194-207
- Burns JS., Abdallah BM., Guldberg P., Rygaard J., Schroder HD., Kassem M. 2005. Tumorigenic heterogeneity in cancer stem cells evolved from long-term cultures of telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Cancer Research*, 65, 8: 3126-3135
- Cahill DP., Kinzler KW., Vogelstein B., Lengauer C. 1999. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends in Cell Biology*, 9: M57-M60
- Can A. 2008. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turkish Journal of Hematology*, 25: 57-59
- Caplan AI. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9: 641-650

- Caplan AI., Dennis JE. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98, 5: 1076-84
- Carro MS., Lim WK., Alvarez MJ., Bollo RJ., Zhao X., Snyder EY., Sulman EP., Anne SL., Doetsch F., Colman H., Lasorella A., Aldape K., Califano A., Iavarone A. 2010. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature*, 463, 7279: 318-325
- Cavallo-Medved D., Sloane BF. 2003. Cell-surface cathepsin B: understanding its functional significance. *Current Topics in Developmental Biology*, 54: 313-41
- Chen J., Li Y., Katakowski M., Chen X., Wang L., Lu D., Lu M., Gautam SC., Chopp M. 2003. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *Journal of Neuroscience Research*, 73, 6: 778-86
- Chen L., Tredget EE., Wu PY., Wu Y. 2008. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*, 3, 4: e1886
- Chrastaras A. Glioblastoma multiforme. 2006. Wikimedia Foundation, Inc. (26.08.2010) http://en.wikipedia.org/wiki/File:Glioblastoma_-_MR_sagittal_with_contrast.jpg (25. 08. 2010)
- Crisostomo PR., Wang Y., Markel TA., Wang M., Lahm T., Meldrum DR. 2008. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappaB- but not JNK-dependent mechanism. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 294: 675-682
- Čemažar M., Serša G. 2007. Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues. *Curr Opin Mol Ther*, 9: 554-562
- da Silva Meirelles L., Caplan AI., Nardi NB. 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26, 9: 2287-2299
- Demchik LL, Sameni M, Nelson K, Mikkelsen T, Sloane BF. 1999. Cathepsin B and glioma invasion. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 17, 5-6: 483-494
- Denielyan L., Schafer T., Schulz A, Ladewig T., Lourhmati A., Buadze M., Schmitt AL., Verleysdonk S., Kabisch D., Koeppen K., Siegel G., Proksch B., Kluba T., Eckert A., Köhle C., Schöneberg T., Northoff H., Schwab M., Gleiter CH. 2009. Survival, neuronlike differentiation and functionality of mesenchymal stem cells in neurotoxic environment: the critical role of Erythropoietin. *Cell death and differentiation*, 16, 12: 1599-1614
- D'Ippolito G., Howard GA., Roos BA., Schiller PC. 2006. Isolation and characterization of marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells. *Experimental Hematology*, 34, 11: 1608-1610

- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 4: 315-7
- Elliott E., Sloane B. 1996. The cysteine protease cathepsin B in cancer. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 6, 1: 12-32
- Erlandsson A., Larsson J., Forsberg-Nilsson K. 2004. Stem cell factor is a chemoattractant and a survival factor for CNS stem cells. *Experimental Cell Research*, 301, 2: 201–210
- Figliuzzi M., Cornolti R., Perico N., Rota C., Morigi M., Remuzzi G., Remuzzi A., Benigni A. 2009. Bone marrowderived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats. *Transplantation Proceedings*, 41, 5: 1797-1800
- Folkman J. 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery. *Nature Reviews*, 6: 273-286
- Forsberg EC., Prohaska SS., Katzman S., Heffner GC., Stuart JM., Weissman IL. 2005. Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS Genet*, 1, 3: e28
- Frosch BA., Berquin I., Emmert-Buck MR., Moin K., Sloane BF. 1999. Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B. *APMIS*, 107, 1: 28-37
- Frosch B., Berquin I., Emmert-Buck M., Moin K, Sloane B. 1999. Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B. *APMIS*, 107, 1: 28-37
- Gang EJ., Jeong JA., Hong SH., Hwang SH., Kim SW., Yang IH., Ahn C., Han H., Kim H. 2004. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22, 4: 617-624
- Genovese JA., Spadaccio C., Rivello HG., Toyoda Y., Patel AN. 2009. Electrostimulated bone marrow human mesenchymal stem cells produce follistatin. *Cytotherapy*, 11, 4: 448-56
- Giese A., Westphal M. 1996. Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery*, 39, 2: 235-250
- Gocheva V., Joyce JA. 2007. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle*, 6, 1: 60–64
- Gocheva V., Zeng W., Ke D., Klimstra D., Reinheckel T., Peters C., Hanahan D., Joyce JA. 2006. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes & Development*, 20, 5: 543–556

- Gole B. 2009. Izražanje cisteinskih kathepsinov in njihovih endogenih inhibitorjev v glioblastomih in njihovih izvornih celicah: doktorsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 147 str.
- Gole B., Duran Alonso MB., Dolenc V., Lah T. 2009. Post-Translational regulation of Cathepsin B, but not of Other Cysteine Cathepsins, Contributes to Increased Glioblastoma Cell Invasiveness In Vitro. *Pathology and Oncology Research*, 15: 711-723
- Gondi CS., Lakka SS., Dinh DH., Olivero WC., Gujrati M., Rao JS. 2004a. RNAi-mediated inhibition of cathepsin B and uPAR leads to decreased cell invasion, angiogenesis and tumor growth in gliomas. *Oncogene*, 23, 52: 8486-96
- Gondi CS., Lakka SS., Yanamandra N., Olivero WC., Dinh DH., Gujrati M., Tung CH., Weissleder R., Rao JS. 2004b. Adenovirus-mediated expression of antisense urokinase plasminogen activator receptor and antisense cathepsin B inhibits tumor growth, invasion, and angiogenesis in gliomas. *Cancer Research*, 64, 12: 4069-4077
- Goulet B., Baruch A., Moon NS., Poirier M., Sansregret LL., Erickson A., Bogyo M., Nepveu A. 2004. A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Molecular Cell*, 14, 2: 207-219
- Goulet B., Sansregret L., Leduy L., Bogyo M., Weber E., Chauhan SS., Nepveu A. 2007. Increased expression and activity of nuclear cathepsin L in cancer cells suggests a novel mechanism of cell transformation. *Molecular Cancer Research*, 5,9: 899-907
- Grinnemo KH., Månsson-Broberg A., Leblanc K., Corbascio M., Wårdell E., Siddiqui AJ., Hao X., Sylvén C., Dellgren G. 2006. Human mesenchymal stem cells do not differentiate into cardiomyocytes in a cardiac ischemic xenomodel. *Annals of Internal Medicine*, 38, 2: 144-53
- Gruber R., Kandler B., Holzmann P., Vögele-Kadletz M., Losert U., Fischer MB., Watzek G. 2005. Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. *Tissue Engineering*, 11, 5-6: 896-903
- Gutova M., Najbauer J., Frank RT., Kendall SE., Gevorgyan A., Metz MZ., Guevorkian, M., Edmiston M., Shao D., Glackin DA., Kim S.U., Aboody KS. 2008. Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor mediate human stem cell tropism to malignant solid tumors. *Stem Cells* 26, 6: 1406-1413
- Hamada H., Kobune M., Nakamura K., Kawano Y., Kato K., Honmou O., Houkin K., Matsunaga T., Niitsu Y. 2005. Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer Science*, 96, 3: 149-156
- Hanahan D., Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70

- Hardell L., Carlberg M., Söderqvist F., Mild KH, Morgan LL. 2007. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for > or =10 years. *Occupational and Environmental Medicine*, 64, 9: 626-632
- Heese O., Disko A., Zirkel D., Westphal M., Lamszus K. 2005. Neural stem cell migration toward gliomas in vitro. *Neuro-oncology*, 7, 4: 476–484
- Hematopoietic and mesenchymal stromal cell pathway. Abcam. 2010.
<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11815> (25.08.2010)
- Ho IA., Chan KY., Ng WH., Guo CM., Hui KM., Cheang P., Lam PY. 2009. Matrix metalloproteinase 1 is necessary for the migration of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward human glioma. *Stem Cells*, 27, 6: 1366-75
- Ho, AD., Wagner W. 2007. The beauty of asymmetry—asymmetric divisions and self-renewal in the hematopoietic system. *Current Opinion in Hematology*, 14, 4: 330–336
- Hoelzinger DB., Demuth T., Berens ME. 2007. Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *Journal of the Natl Cancer Institute* 99, 21: 1583-93
- Hoelzinger DB., Nakada M., Demuth T., Rosensteel T., Reavie LB., Berens ME. 2008. Autotaxin: a secreted autocrine/paracrine factor that promotes glioma invasion. *Journal of Neurooncology*, 86, 3: 297-309
- Hopkin K., Johnson A., Lewis J.
<http://www.medicalnewstoday.com/articles/174884.php> (15.08.2010)
- Ichimura K., Schmidt EE., Miyakawa A., Goike HM., Collins VP. 1998. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades. *Genes Chromosomes Cancer*, 22, 1: 9-15
- Imitola J., Raddassi K., Park KI., Mueller FJ., Nieto M., Teng YD., Frenkel D., Li J., Sidman RL., Walsh CA., Snyder EY., Khoury SJ. 2004. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101, 52: 18117–18122
- Jackson L., Jones DR. Scotting P., Sottile V. 2007. Adult mesenchymal stem cells: differential potential and therapeutic applications. *Journal of Postgraduate Medicine*, 53, 2: 121-127
- Jedeszko C., Sloane BF. 2004. Cysteine cathepsins in human cancer. *Biological Chemistry*, 385, 11: 1017–1027
- Jian H., Shen X., Liu I., Semenov M., He X., Wang XF. 2006. Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone

- marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes and Development*, 20, 6: 666-674
- Jiang Y., Jahagirdar BN., Reinhardt RL., Schwartz RE., Keene CD., Ortiz-Gonzalez XR., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low WC., Largaespada DA., Verfaillie CM. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 6893: 41-49
- Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T. 2001. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*, 104, 9: 1046-52
- Karp JM., Leng Teo GS. 2009. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 4, 3: 206-216.
- Kaur B., Khwaja FW., Severson EA., Matheny SL., Brat DJ., Van Meir EG. 2005. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncology* 7: 134 – 53
- Keating A. 2006. Mesenchymal stromal cells. *Current Opinian in Hematol*, 13, 6: 419–425
- Keerthivasan S., Keerthivasan G., Mittal S., Chauhan SS. 2007. Transcriptional upregulation of human cathepsin L by VEGF in glioblastoma cells. *Gene*, 399, 2: 129-36
- Kendall SE., Najbauer J., Johnston HF., Metz M., Li S., Bowers M., Garcia E., Kim S., Barish M., Aboody KS., Glackin K. 2008. Neural stem cell targeting of glioma is dependent on PI3K signaling. *Stem Cells*, 26, 6: 1575–1586
- Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H., Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24, 5: 1294-1301
- Kidd S., Spaeth E., Dembinski JL., Dietrich M., Watson K., Klopp A., Battula VL., Weil M., Andreeff M., Marini FC. 2009. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescence imaging. *Stem Cells*, 27, 10: 2614-2623
- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. 2004b. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*, 109, 12: 1543-9
- Kinnaird T., Stabile E., Burnett MS., Lee CW., Barr S., Fuchs S., Epstein SE. 2004a. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation Research*, 94, 5: 678-85

- Kirschke H., Barrett AJ., Rawlings ND. 1995. Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile*, 2, 14: 1581-643
- Kogler G., Radke FT., Lefort A., Sensken S., Fischer J., Sorg RV., Wernet P. 2005. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Experimental Hematology*, 33, 5: 573- 583
- Kögler G., Sensken S., Airey JA., Trapp T., Müschen M, Feldhahn N., Liedtke S., Sorg RV., Fischer J., Rosenbaum C., Greschat S., Knipper A., Bender J., Degistirici O., Gao J, Caplan AI., Colletti EJ., Almeida-Porada G., Müller HW., Zanjani E., Wernet P. 2004. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *Journal of Experimental Medicine*, 200, 2: 123-35
- Kögler G., Sensken S., Airey JA., Trapp T., Müschen M., Feldhahn N., Liedtke S, Sorg RV., Fischer J., Rosenbaum C., Greschat S., Knipper A., Bender J., Degistirici O., Gao J., Caplan AI., Colletti EJ., Almeida-Porada G., Müller HW., Zanjani E., Wernet P. 2004. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *Journal of Experimental Medicine*: 123-35
- Kogler g., Sensken S., Wernet P. 2006. Comparative generation and characterisation of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Experimental Hematology*, 34, 11: 1589-1595
- Konduri S., Lakka SS., Tasiou A., Yanamandra N., Gondi CS., Dinh DH., Olivero WC., Gujrati M., Rao JS. 2001. Elevated levels of cathepsin B in human glioblastoma cell lines. *Int J Oncol*, 19, 3: 519-524
- Korbling M., Estrov Z. 2003. Adult stem cells for tissue repair—A new therapeutic concept? *The New England Journal of Medicine*, 349, 6: 570 –582
- Kos J., Lah TT. 1998. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer. *Oncology Reports*, 5, 6:1349-1361
- Kosmodel SB., Spitz FR. 2003. Gene therapy for cancer and metastatic disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5: 1-18
- Kucerova L., Matuskova M., Hlubinova K., Altanerova V., Altaner C. 2010. *Molecular Cancer*, 9: 129
- Kucia M., Reca R., Miekus k., Wanzeck J., Wojakowski W., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J., Ratajczak MZ. 2005. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: Pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells*, 23, 7: 879–894
- Kucia M., Zuba-Surma E., Wysoczynski M., Dobrowolska H., Reca R., Ratajczak J., Ratajczak MZ. 2006. Physiological and pathological consequences of identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in adult bone marrow. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 57, Suppl 5: 5-18

- Lah TT., Durán Alonso MB., Van Noorden CJ. 2006. Antiprotease therapy in cancer: hot or not? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 6, 3: 257–279
- Lah TT., Strojnik T., Levicar N., Bervar A., Zajc I., Pilkington G., Kos J. 2000. Clinical and experimental studies of cysteine cathepsins and their inhibitors in human brain tumors. *The International Journal of Biological Markers*, 15, 1: 90-93
- Lakka SS., Gondi CS., Yanamandra N., Olivero WC., Dinh DH., Gujrati M., Rao JS. 2004. Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene*, 23, 27: 4681-4689
- Lankelma JM., Voorend DM., Barwari T., Koetsveld J., Van der Spek AH., De Porto AP., Van Rooijen G., Van Noorden CJ. 2010. Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sciences*, 86, 7-8: 225-233
- Laurent V., Farnoud MR., Lucas A., Rougeot C., Garcia M., Rochefort H. 1998. Endocytosis of pro-cathepsin D into breast cancer cells is mostly independent of mannose-6-phosphate receptors. *Journal of Cell Science*, 111, 17: 2539-2549
- Lee BC., Hsu HC., Tseng WY., Chen CY., Lin HJ., Ho YL., Su MJ., Chen MF. 2009. Cell therapy generates a favourable chemokine gradient for stem cell recruitment into the infarcted heart in rabbits. *The European Journal of Heart Failure*, 11, 3: 238-45
- Lemaire R., Huet G., Zerimech F., Grard G., Fontaine C., Duquesnoy B., Flipo RM. 1997. Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *British journal of rheumatology*, 36, 7: 735-43
- Levicar N., Nuttall RK., Lah TT. 2003. Proteases in brain tumour progression. *Acta Neurochir*, 145, 9: 825-838
- Levicar N., Strojnik T., Kos J., Dewey RA., Pilkington GJ., Lah TT. 2002. Lysosomal enzymes, cathepsins in brain tumour invasion. *Journal of Neurooncology*, 58, 1: 21-32
- Levičar N., Dewey RA., Daley E., Bates TE., Davies D., Kos J., Pilkington GJ., Lah TT. 2003. Selective suppression of cathepsin L by antisense cDNA impairs human brain tumor cell invasion in vitro and promotes apoptosis. *Cancer Gene Therapy*, 10, 2: 141-51
- Li G., Zhang XA., Wang H., Wang X., Meng CL., Chan CY., Yew DT., Tsang KS., Li K., Tsai SN., Ngai SM., Han ZC., Lin MC., He ML., Kung HF. 2009. Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta: implication in the migration. *Proteomics*, 9, 1: 20-30
- Li J., Yen C., Liaw D., Podsypanina K., Bose S., Wang SI., Puc J., Miliaresis C., Rodgers L., McCombie R., Bigner SH., Giovanella BC., Ittmann M., Tycko B., Hibshoosh H., Wigler MH., Parsons R. 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275, 5308: 1943-1947

- Li Y., Chen J., Zhang CL., Wang L., Lu D., Katakowski M., Gao Q., Shen LH., Zhang J., Lu M., Chopp M. 2005. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia*, 49, 3: 407-417
- Liang Y., Diehn M., Watson N., Bollen AW., Aldape KD., Nicholas MK., Lamborn KR., Berger MS., Botstein D., Brown PO., Israel MA. 2005. Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 16: 5814-5819
- Liedert A., Kassem M., Claes L., Ignatius A. 2009. Mechanosensitive promoter region in the human HB-GAM gene. *Biochemical and Biophysical Research Community*, 387, 2: 289-293
- Liu CH., Hwang SM. 2005. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine*, 32, 6: 270-279
- Locatelli F., Maccario R., Frassoni F. 2007. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders? *Haematologica*, 92, 7: 872-877
- Louis DN., Ohgaki H., Wiestler OD., Cavenee WK., Burger PC., Jouvet A., Scheithauer BW., Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114, 2: 97-109
- Magdič J., Sinkovič A. 2003. Nenadna kardiocirkularna odpoved pri primarnem možganskem tumorju- prikaz primera in pregled literature. *Zdravstveni vestnik*, 72: 213-216
- Maher EA., Furnari FB., Bachoo RM., Rowitch DH., Louis DN., Cavenee WK., DePinho RA. 2001. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes and Development*, 15, 11: 1311-1333
- Mann B., Gelos M., Siedow A., Hanski ML., Gratchev A., Ilyas M., Bodmer WF., Moyer MP., Riecken E., Buhr HJ., Hanski C. 1999. Target genes of b-catenin-T cell-factory lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96: 1603-1608
- Martens TP., See F., Schuster MD., Sondermeijer HP., Hefti MM., Zannettino A., Gronthos S., Seki T., Itescu S. 2006. Mesenchymal lineage precursor cells induce vascular network formation in ischemic myocardium. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 3, Suppl 1: S18-22
- Mazhari R., Hare JM. 2007. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: Potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 4, Suppl 1: S21-S26
- McCormick D. 1993. Secretion of cathepsin B by human gliomas *in vitro*. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 19, 2: 146-151

- McGruckin CP, Forraz N., Baradez MO., Navran S., Zhao J., Urban R., Tilton R., Denner L. 2005. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Proliferation*, 38, 4: 245-255
- Mikkelsen T., Yan PS., Ho KL., Sameni M., Sloane BF., Rosenblum ML. 1995. Immunolocalization of cathepsin B in human glioma: implications for tumor invasion and angiogenesis. *Journal of Neurosurgery*, 83,2: 285-290
- Mohamed MM., Sloane BF. 2006. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6, 10: 764-775
- Mohanam S., Jasti SL., Kondraganti SR., Chandrasekar N., Lakka SS., Kin Y., Fuller GN., Yung AW., Kyritsis AP., Dinh DH., Olivero WC., Gujrati M., Ali-Osman F., Rao JS. 2001. Down-regulation of cathepsin B expression impairs the invasive and tumorigenic potential of human glioblastoma cells. *Oncogene*, 20, 28: 3665-3673
- Moioli EK., Hong L., Guardado J., Clark PA., Mao JJ. 2006. Sustained release of TGF β 3 from PLGA microspheres and its effect on early osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering* 12, 3: 537-546
- Motaln H. »Invazivnost glioblastomskih celičnih linij«. 2009. Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana (osebni vir, avgust 2010)
- Motaln H., Schichor C., Lah TT. 2010. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer*, 116, 11: 2519-30
- Možganski tumorji. Društvo onkoloških bolnikov Slovenije.
http://www.onkologija.org/sl/domov/o_raku/mozganski_tumorji/ (15.08.2010)
- Mueller MM., Fusenig NE. 2004. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4, 11: 839-849
- Myllymaa S., Kaivosoja E., Myllymaa K., Sillat T., Korhonen H., Lappalainen R., Kontinen YT. 2010. Adhesion, spreading and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on micropatterned amorphous diamond, titanium, tantalum and chromium coatings on silicon. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 1: 329-41
- Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S. 2004. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 287, 6: 2670-2676
- Nair R., Tolentino J., Hazlehurst L. 2010. The bone marrow microenvironment as a sanctuary for minimal residual disease in CML. *Biochemical Pharmacology*, 80, 5: 602–612

- Nakabayashi H., Hara M., Shimuzu K. 2005. Clinicopathologic significance of cystatin C expression in gliomas. *Human Pathology*, 36,9: 1008-1015
- Nakamizo A., Marini F., Amano T., Khan A., Studeny M., Gumin J., Chen J., Hentschel S., Vecil G., Dembinski J., Andreeff M., Lang FF. 2006. Human bone marrow- derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Research*, 65, 8: 3307-3318
- Nakamizo A., Marini F., Amano T., Khan A., Studeny M., Gumin J., Chen J., Hentschel S., Vecil G., Dembinski J., Andreeff M., Lang FF. 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Reserch*, 65, 8: 3307-18
- Nakamura K., Ito Y., Kawano Y., Kurozumi K., Kobune M., Tsuda H., Bizen A., Honmou O., Niitsu Y., Hamada H. 2004. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cell in rat glioma model. *Gene Therapy*, 11, 14: 1155-1164
- Nauta AJ., Fibbe WE. 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 110, 10: 3499-3506
- Neth P., Ciccarella M., Egea V., Hoelters J., Jochum M., Ries C. 2006. Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24, 8: 1892-903
- Norden AD., Young GS., Setayesh K., Muzikansky A., Klufas R., Ross GL., Ciampa AS., Ebbeling LG., Levy B., Drappatz J., Kesari S., Wen PY. 2008. Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology*, 70, 10: 779-87
- Nowell, PC. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194: 23–28
- Ocvirk J. 2008. Neželeni učinki zdravljenja z zaviralcem EGFR – cetuksimabom. *Onkologija*, 12, 1: 43-45
- Ocvirk J. 2009. Zaviralci angiogeneze v zdravljenju možganskih tumorjev. *Onkologija*, 13, 2: 127-129
- Ohgaki H, Kleihues P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *American Journal of Pathology*, 170, 5: 1445-1453
- Ohgaki H., Kleihues P. 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathologica*, 109, 1: 93-108
- Paddock C. 2009. Aggressive brain cancer driven by two collaborating genes, study. *Medical News Today* (2010).
<http://www.medicalnewstoday.com/articles/174884.php>
- Palermo C., Joyce JA. 2008. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29, 1: 22-28

- Palmer DH., Young LS., Mautner V. 2006. Cancer gene-therapy: clinical trials. *Trends in Biothechnology*, 24: 76-82
- Palumbo R., Bianchi ME. 2004. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochemical Pharmacology*, 68, 6: 1165–1170
- Palumbo R., Galvez BG., Pusterla T., De Marchis F., Cossu G., Marcu KB., Bianchi ME. 2007. Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation. *Journal of Cell Biology*, 179, 1: 33– 40
- Patterson DM, Rustin GJS. Vascular damaging agents. *Clinical Oncology* 2007; 19: 443–456.
- Pecorino L. 2008. *Molecular biology of Cancer. Mechanisms, targets, and therapeutics.* 2nd Edition. New York, Oxford University Press: 311 str.
- Pollard JW. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 4, 1:71-78
- Potapova IA., Brink PR., Cohen IS., Doronin SV. 2008. Culturing of human mesenchymal stem cells as 3-dimensional aggregates induces functional expression of CXCR4 that regulates adhesion to endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 19: 13100-13107
- Potapova IA., Cohen IS., Doronin SV. 2009. Apoptotic endothelial cells demonstrate increased adhesiveness for human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 219, 1: 23-30
- Potapova IA., Gaudette GR., Brink PR., Robinson RB., Rosen MR., Cohen IS, Doronin SV. 2007. Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 25, 7: 1761-1768
- Premzl A. Zavasnik-Berganz V., Turk V., Kos J. 2003. Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neo T cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Experimental Cell Research*, 283, 2: 206-214
- Premzl A., Turk V., Kos J. 2006. Intracellular proteolytic activity of cathepsin B is associated with capillary-like tube formation by endothelial cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97, 6: 1230-1240
- Qiao L., Xu Z., Zhao Z., Shi M., Zhao RC., Ye L., Zhang X. 2008. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Research*, 18, 4: 500-507
- Radner H., Blümcke I., Reifenberger G., Wiestler OD. 2002. Die neue WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems 2000. *Pathologe*, 23, 4: 260-283
- Raff M., Rao JS. 2003. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nature Reviews Cancer*, 3, 7: 489-501

- Rebelatto CK., Aguiar AM., Moretao MP., Senegaglia AC., Hansen P., Barchiki F., Oliveira J., Martins J., Kuligovski C., Mansur F., Christofis A., Amaral VF., Brofman PS., Goldenberg S., Nakao LS., Correa A. 2008. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and adipose tissue. *Experimental Biology and Med*, 233, 7: 901-913
- Rempel SA., Rosenblum ML., Mikkelsen T., Yan PS., Ellis KD., Golembieski WA., Sameni M., Rozhin J., Ziegler G., Sloane BF. 1994. CathepsinB expression and localization in glioma progression and invasion. *Cancer Research*, 54, 23: 6027–6031
- Reya T., Morrison SJ., Clarke MF., Weissman IL. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 6859, 105–111
- Ries C., Egea V., Karow M., Kolb H., Jochum M., Neth P. 2007. MMP-2, MT1-MMP and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*, 109, 9: 4055-4063
- Roberts K. Walter P. 2004. *Essential cell biology*. 2nd edition. New York and London, Garland Science: 740 str.
- Roche S., Delorme B., Oostendorp RA., Barbet R., Caton D., Noel D., Boumediene K., Papadakis HA., Cousin B., Crozet C., Milharet O., Casteilla L., Hatzfeld J., Jorgensen C., Charbord P., Lehmann S. 2009. Comparative proteomic analysis of human mesenchymal and embryonic stem cells: Towards the definition of a mesenchymal stem cell proteomic signature. *Proteomics*, 9, 223-232
- Rožman P., Strbad M., Knežević M. 2007. Uporaba matičnih celic v medicini. V: Genialna prihodnost - genetika, determinizem in svoboda: zbornik prispevkov. Mednarodni posvet Biološka znanost in družba, Ljubljana, 4-5 oktober. 2007. Strgulc-Krajšek S. (ur.), Popit T. (ur.) Vičar M. (ur). Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 202-212
- Rubio D., Garcia S., De la Cueva t., Paz MF., Lloyd AC., Bernad A., Garcia-Castro J. 2007. Human mesenchymal stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition. *Experimental Cell Research*, 314, 4: 691-698
- Rubio D., Garcia-Castro J., Martín MC., de la Fuente R., Cigudosa JC., Lloyd AC., Bernad A. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Research*, 65, 8: 3035-9
- Sameni M., Dosescu J., Moin K., Sloane BF. 2003. Functional imaging of proteolysis: stromal and inflammatory cells increase tumor proteolysis. *Molecular Imaging*, 2, 3: 159-175
- Sasaki M., Abe R., Fujita Y., Ando S., Inokuma D., Shimizu H. 2008. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of Immunology*, 180, 4: 2581-2587

- Sawada R., Ito T., Tsuchiya T. 2006. Changes in expression of genes related to cell proliferation in human mesenchymal stem cells during in vitro culture in comparison with cancer cells. *Journal of Artificial Organs*, 9, 3: 179-84
- Sawada R., Ito T., Tsuchiya T. 2007. Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells. *Yahugaku Zasshi*. 127, 5: 851-856
- Schichor C., Birnbaum T., Etminan N., Etminan N., Schnell O., Grau S., Miebach S., Aboody K., Padovan C., Straube A., Tonn JC., Goldbrunner R. 2006. Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Experimental Neurology*, 199, 2: 301-310
- Schiffer D., Cavalla P., Pikington GJ. 1998. Proliferative properties of malignant brain tumors. V: *Brain Tumor Invasion: Biological, clical and Therapeutic Considerations*. Mikkelsen t., Bjerkgig R., Laerum OD, Rosenbaum ML. (eds). New York, Wiley-Liss: 161-184
- Schmidt NO., Przylecki W., Yang W. Ziu M., Teng Y., Kim SU., Black PM., Aboody KS, Carroll RS. 2005. Brain tumor tropism of transplanted human neural stem cells is induced by vascular endothelial growth factor. *Neoplasia*, 7, 6: 623– 629
- Serša G. 2009. Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove taročne pri zdravljenju raka. *Farmacetski vestnik*, 60: 43-47
- Singh A., Settleman J. 2010. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29, 34: 4741-4751
- Sivaparvathi M., Sawaya R., Wang SW., Rayford A., Yamamoto M., Liotta LA., Nicolson GL., Rao JS. 1995. Overexpression and localization of cathepsin B during the progression of human gliomas. *Clinical and Experimental Metastasis*, 13, 1: 49-56
- Sivaparvathi M., Yamamoto M., Nicolson GL., Gokaslan Z.L, Fuller GN., Liotta LA., Sawaya R., Rao JS. 1996. Expression and immunohistochemical localization of cathepsin L during the progression of human gliomas. *Clinical and Experimental Metastasis*, 14, 1: 27-34
- Skrzydłewska E., Sulkowska M., Koda M., Sulkowski S. 2005. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 9: 1251–1266
- Somanna A., Mundodi V., Gedamu L. 2002. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 28: 25305-25312
- Son BR., Marquez-Curtis LA., Kucia M., Wysoczynski M., Turner AR., Ratajczak J., Ratajczak MZ., Janowska-Wieczorek A. 2006. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and

- hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells*, 24, 5:1254-1264
- Sordi V., Malosio ML., Marchesi F., Mercalli A., Melzi R., Giordano T., Belmonte N., Ferrari G., Leone BE., Bertuzzi F., Zerbini G., Allavena P., Bonifacio E., Piemonti L. 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*, 106, 2: 419-427
- Stea B., Falsey R., Kislin K., Patel Y., Glanzberg H., Carey S., Ambrad AA., Meuillet EJ., Martinez JD. 2002. Time and dose-dependent radiosensitization of the glioblastoma multiforme U251 cells by the EGF receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa'). *Cancer Letters*, 202: 43-51
- Stoff-Khalili MA., Rivera AA., Mathis JM., Banerjee NS., Moon AS., Hess A., Rocconi RP., Numnum TM., Everts M., Chow LT., Douglas JT., Siegal GP., Zhu ZB., Bender HG., Dall P., Stoff A., Pereboeva L., Curiel DT. 2007. Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted delivery of CRAds to lung metastases of breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, 105, 2: 157-167
- Stoka V., Turk B., Schendel SL., Kim TH., Cirman T., Snipas SJ., Ellerby LM., Bredesen D., Freeze H., Abrahamson M., Brömme D., Krajewski S., Reed JC., Yin XM., Turk V., Salvesen GS. Lysosomal protease pathways to apoptosis. 2001. Cleavage of bid, not procaspases, is the most likely route. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 5: 3149-3157
- Strbad M., Rožman P. 2005. Uporaba matičnih celic v medicini. *Proteus*, 67, 8: 340-348
- Strbad M. 2004. Osamitev in opredelitev človeških matičnih celic iz kostnega mozga: diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 77 str.
- Strojnik T., Kavalari R., Trinkaus M., Lah TT. 2005. Cathepsin L in glioma progression: comparison with cathepsin B. *Cancer Detection and Prevention*, 29, 5: 448-455
- Strojnik T., Kavalari R., Trinkaus M., Lah TT. 2005. Cathepsin L in glioma progression: comparison with cathepsin B. *Cancer Detection and Prevention*, 29, 5: 448-55
- Strojnik T., Kos J., Zidanik B., Golouh R., Lah T. 1999. Cathepsin B immunohistochemical staining in tumor and endothelial cells is a new prognostic factor for survival in patients with brain tumors. *Clinical Cancer Research*, 5, 3: 559-567
- Strojnik T., Zajc I., Bervar A., Zidanik B., Golouh R., Kos J., Dolenc V., Lah TT. 2000. Cathepsin B and its inhibitor stefin A in brain tumors. *Pflugers Archiv*, 439, Suppl 3: R122-123
- Štrukelj B., Kos J. 2007. Biološka zdravila. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 673 str.
- Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, Phillips MI. 2005. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular

- regeneration in rat model of myocardial infarction. *The Annals of Thoracic Surgery*, 80, 1: 229-236
- Tannock IF., Hill RP. 2007. *The basic science of oncology*. 3rd edition. New York, McGraw Hill: 511 str.
- Toma C., Pittenger MF., Cahill KS., Byrne BJ., Kessler PD. 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105, 1: 93-8
- Torsvik A., Røsland GV., Svendsen A., Molven A., Immervoll H., McCormack E., Lønning PE., Primon M., Sobala E., Tonn JC, Goldbrunner R., Schichor C., Mysliwicz J., Lah TT., Motaln H., Knappskog S., Bjerkvig R. 2010. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Research*, 70, 15: 6393-6396
- Tremain N., Korkko J., Ibberson D. Kopen GC., Digirolamo C. Phinney DG. 2001. MicroSAGE Analysis of 2,353 Expressed Genes in a Single Cell-Derived Colony of Undifferentiated Human Mesenchymal Stem Cells Reveals mRNAs of Multiple Cell Lineages. *Stem Cells*, 19: 408-418
- Turk V., Turk B., Turk D. 2001. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO Journal*, 20, 17: 4629-4633
- Tysnes BB, Mahesparan R. 2001. Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets. *Jornal of Neuro-Oncology*, 53, 2: 129-147
- Tysnes BB., Bjerkvig R. 2007. Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1775, 2: 283-297
- Van Nierop K., Muller FJ., Stap J., Van Noorden CJ., van Eijk M., de Groot C. 2006. Lysosomal destabilization contributes to apoptosis of germinal center B-lymphocytes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54, 12: 1425-35
- Vasiljeva O., Turk B. 2008. Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: apoptosis versus tumour invasion. *Biochimie*, 90, 2: 380-386
- Victor BC., Sloane BF. 2007. Cysteine cathepsin non-inhibitory binding partners: modulating intracellular trafficking and function. *Biological Chemistry*, 388, 11:1131-40
- Virant-Klun I., Zech N., Rozman P., Vogler A., Cvjeticanin B., Klemenc P., Malicev E., Meden-Vrtovec H. 2008. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation*, 76, 8: 843-856
- Volkmer E., Kallukalam BC., Maertz J., Otto S., Drosse I., Polzer H., Bocker W., Stengele M., Docheva D., Mutschler W., Schieker M. 2010. Hypoxic preconditioning of human mesenchymal stem cells overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation. *Tissue Engineering Part A*, 16, 1: 153-164

- Von Deimling A., Fimmers R., Schmidt MC., Bender B., Fassbender F., Nagel J., Jahnke R., Kaskel P., Duerr EM., Koopmann J., Maintz D., Steinbeck S., Wick W., Platten M., Müller DJ., Przkora R., Waha A., Blümcke B., Wellenreuther R., Meyer-Puttlitz B., Schmidt O., Mollenhauer J., Poustka A., Stangl AP., Lenartz D., von Ammon K. 2000. Comprehensive allelotype and genetic anaysis of 466 human nervous system tumors. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 59, 6: 544-58
- Von Deimling A., Louis DN., von Ammon K., Petersen I., Hoell T., Chung RY., Martuza RL., Schoenfeld DA., Yaşargil MG., Wiestler OD., Seizinger BR. 1992. Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *Journal of Neurosurgery*, 77, 2: 295-301
- Von Deimling A., von Ammon K., Schoenfeld D., Wiestler OD., Seizinger BR., Louis DN. 1993. Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathology*, 3, 1: 19-26
- Vozelj S., Obermajer N., Kos J. 2007. Proteaze in njihovi inhibitorji v telesnih tekočinah kot diagnostični in prognostični tumorski kazalci. *Farmacevtski vestnik*, 58: 133-138
- Vredenburgh JJ., Desjardins A., Herndon JE., Marcello J., Reardon DA., Quinn JA., Rich JN., Sathornsumetee S., Gururangan S., Sampson J., Wagner M., Bailey L., Bigner DD., Friedman AH., Friedman HS. 2007. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Clinial Oncology*, 25, 30: 4722-4729
- Wagner W., Ho A. 2007. Mesenchymal Stem Cell Preparations—Comparing Apples and Oranges. *Stem Cell Reviews*, 3: 239–248
- Wagner W., Horn P., Castoldi M., Diehlmann A., Bork S., Saffrich R., Benes V., Blake J., Pfister S., Eckstein V., Ho AD. 2008. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One*, 3, 5: e2213
- Wagner W., Wein F., Seckinger A., Frankhauser M., Wirkner U., Krause U., Blake J., Schwager C., Eckstein V., Ansorge W., Ho AD. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, 33, 11: 1402-16
- Wang Y., Huso DL., Harrington J., Kellner J., Jeong DK., Turney J., McNiece IK. 2005. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy*, 7, 6: 509-519
- Werbowetski T., Bjerkvig R., Del Maestro RF. 2004. Evidence for a secreted chemorepellent that directs glioma cell invasion. *Journal of Neurobiology*, 60, 1: 71-88
- Widera D., Holtkamp W., Entschladen F. Niggemann B., Zänker K., Kaltschmidt B., Kaltschmidt C. 2004. MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *European Journal of Cell Biology*, 83, 8: 381–387
- Wilson A., Trumpp A. 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunolonogy*, 6, 2: 93-106

- Wynn RF., Hart CA., Corradi-Perini C., O'Neill L., Evans CA., Wraith JE, Fairbairn LJ., Bellantuono I. 2004. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly express functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, 104, 9: 2643–2645
- Xu F., Zhu JH. 2007. Stem cell tropism for malignant gliomas. *Neuroscience Bulletin*, 23, 6: 363–369
- Yanamandra N, Gumidyala KV, Waldron KG, Gujrati M, Olivero WC, Dinh DH, Rao JS, Mohanam S. Blockade of cathepsin B expression in human glioblastoma cells is associated with suppression of angiogenesis. *Oncogene*. 2004 Mar 18; 23(12):2224–30
- Zajc I., Hreljac I., Lah TT. 2006. Cathepsin L affects apoptosis of glioblastoma cells: a potential implication in the design of cancer therapeutics. *Anticancer Research*, 26, 5A: 3357–64
- Zámecník J., Vargová L., Homola A., Kodet R., Syková E. 2004. Extracellular matrix glycoproteins and diffusion barriers in human astrocytic tumours. *Neuropathol and Applied Neurobiology*, 30, 4: 338–350
- Zhang M., Mal N., Kiedrowski M., Chacko M., Askari AT., Popovic ZB., Koc ON., Penn MS. 2007. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J*, 21, 12: 3197–207
- Zhou BB., Zhang H., Damelin M., Geles KG., Grindley JC., Dirks PB. 2009. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 10: 806–23
- Zipori D. 2005. The Stem State: Plasticity Is Essential, Whereas Self-Renewal and Hierarchy Are Optional. *Stem Cells*, 23: 719–726

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji somentorici asist. dr. Heleni Motaln za posredovanje znanja in nasvete tekom raziskovalnega dela. Najlepše se ji zahvaljujem tudi za neposredno pomoč pri izdelavi naloge ter hiter in strokoven pregled diplomske naloge, ki ga je opravljala tekom porodniškega dopusta.

Mentorju doc. dr. Miomirju Kneževiču se zahvaljujem za vse nasvete, podporo, pogovore in strokovni pregled diplomskega dela.

Recenzentki prof. dr. Tamari Lah Turnšek se zahvaljujem za strokovno vodenje, usmerjanje in pregled diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi Nacionalnemu inštitut za biologijo, ki mi je finančno omogočil izvedbo raziskovalnega dela. Vsem zaposlenim na oddelku za gensko toksikologijo in biologijo raka se zahvaljujem za velikodušno pomoč in mnoge nasvete, ki so mi jih posredovali.

Posebno hvaležna sem svojim staršema, ki sta mi omogočila celoten študij. Hvala za vso moralno in finančno podporo, ki sta mi jo nudila v času študija in izdelave diplomske naloge!

Najlepše se zahvaljujem Gašperju Kokelju, ki je ves čas študija in izdelave diplomske naloge verjel vame, me moralno podpiral, spodbujal, delil z menoj dobre in težke trenutke in mi dajal dragocene nasvete.

Na koncu se zahvaljujem tudi mojim prijateljem, ki so me podpirali ali mi kakorkoli drugače pomagali tekom študija.

PRILOGA A

Priloga A: Vpliv CM na izražanje CatB in Lv MMC in linijah GBM (PCR v relnem času)

Priloga A1: Vpliv CM na izražanje CatB v MMC in linijah GBM

- Izračuni k sliki 15

	p7	p8	p9
MMC1	1,00	1,01	0,83
MMC1 + U373 CM	1,01	1,23	1,29

	p6	p7	p9
MMC2	0,96	1,10	1,14
MMC2 + U251 CM	1,93	1,71	2,03

	p7	p8	p10
MMC4	0,62	0,54	0,74
MMC4 + U87 CM	0,77	0,65	0,83

	p41	p43	p44
U373	0,51	0,68	0,65
U373 + MMC1 CM	0,54	0,87	0,68

	p40	p43	p44
U251	1,02	1,02	1,02
U251 + MMC2 CM	1,14	1,15	1,83

	p11	p11(2)	p12
U87	2,44	1,94	1,26
U87 + MMC4 CM	2,22	1,93	1,50

	Average	StDev	StError
MMC1	0,95	0,10	0,07
MMC1 + U373 CM	1,17	0,15	0,11

	Average	StDev	StError
MMC2	1,06	0,09	0,07
MMC2 + U251 CM	1,89	0,16	0,12

	Average	StDev	StError
MMC4	0,63	0,10	0,07
MMC4 + U87 CM	0,75	0,09	0,06

	Average	StDev	StError
U373	0,62	0,09	0,06
U373 + MMC1 CM	0,70	0,17	0,12

	Average	StDev	StError
U251	1,02	0,00	0,00
U251 + MMC2 CM	1,37	0,40	0,28

	Average	StDev	StError
U87	1,88	0,59	0,42
U87 + MMC4 CM	1,88	0,36	0,26

	T-test
MMC1	0,0966
MMC2	0,0016
MMC4	0,2136
U373	0,5100
U251	0,1951
U87	0,9994

- Izračuni k sliki 16

	p7	p8	p9
MMC1	1,00	1,00	1,00
MMC1 + U373 CM	1,01	1,21	1,56

	p6	p7	p9
MMC2	1,00	1,00	1,00
MMC2 + U251 CM	2,02	1,56	1,78

	p7	p8	p10
MMC4	1,00	1,00	1,00
MMC4 + U87 CM	1,23	1,22	1,12

	p41	p43	p44
U373	1,00	1,00	1,00
U373 + MMC1 CM	1,04	1,28	1,03

	p40	p43	p44
U251	1,00	1,00	1,00
U251 + MMC2 CM	1,80	1,04	1,13

	p11	p11(2)	p12
U87	1,00	1,00	1,00
U87 + MMC4 CM	0,91	1,00	1,19

	Average	StDev	StError
MMC1	1,00	0,00	0,00
MMC1 + U373 CM	1,26	0,28	0,20

	Average	StDev	StError
MMC2	1,00	0,00	0,00
MMC2 + U251 CM	1,79	0,23	0,16

	Average	StDev	StError
MMC4	1,00	0,00	0,00
MMC4 + U87 CM	1,19	0,06	0,04

	Average	StDev	StError
U373	1,00	0,00	0,00
U373 + MMC1 CM	1,12	0,14	0,10

	Average	StDev	StError
U251	1,00	0,00	0,00
U251 + MMC2 CM	1,32	0,42	0,29

	Average	StDev	StError
U87	1,00	0,00	0,00
U87 + MMC4 CM	1,03	0,14	0,10

	T-test
MMC1	0,1835
MMC2	0,0039
MMC4	0,0062
U373	0,2128
U251	0,2496
U87	0,7353

- Izračuni k sliki 17

	MMC	MMC + GBM CM
MMC1p7	1,00	1,01
MMC1p8	1,00	1,21
MMC1p9	1,00	1,56
MMC2p6	1,00	2,02
MMC2p7	1,00	1,56
MMC2p9	1,00	1,78
MMC4p7	1,00	1,23
MMC4p8	1,00	1,22
MMC4p10	1,00	1,12

	Average	StDev	StError
MMC	1,00	0,00	0,00
MMC + GBM CM	1,41	0,34	0,24

GBM	1,00	0,00	0,00
GBM + MMC CM	1,16	0,26	0,19

	T-test
MMC + GBM CM	0,0021
GBM + MMC CM	0,0924

	GBM	GBM + MMC CM
U373p41	1,00	1,04
U373p43	1,00	1,28
U373p44	1,00	1,03
U251p40	1,00	1,80
U251p43	1,00	1,04
U251p44	1,00	1,13
U87p11	1,00	0,91
U87p11(2)	1,00	1,00
U87p12	1,00	1,19

Priloga A2: Vpliv CM na izražanje CatL v MMC in linijah GBM

-Izračuni k sliki 18

	p7	p8	p9
MMC1	1,00	0,56	0,45
MMC1 + U373 CM	1,01	0,46	0,37

	Average	StDev	StError
MMC1	0,67	0,29	0,21
MMC1 + U373 CM	0,61	0,34	0,24

	T-test
MMC1	0,8396
MMC2	0,9954
MMC4	0,7119
U373	0,3715
U251	0,1486
U87	0,1626

	p6	p7	p9
MMC2	1,23	0,69	0,54
MMC2 + U251 CM	1,19	0,68	0,59

MMC2	0,82	0,36	0,26
MMC2 + U251 CM	0,82	0,32	0,23

	p7	p8	p10
MMC4	0,92	0,85	0,84
MMC4 + U87 CM	0,81	0,74	0,97

MMC4	0,87	0,05	0,03
MMC4 + U87 CM	0,84	0,12	0,09

	p41	p43	p44
U373	0,91	1,07	1,20
U373 + MMC1 CM	1,10	0,73	0,94

U373	1,06	0,15	0,10
U373 + MMC1 CM	0,93	0,18	0,13

	p40	p43	p44
U251	1,50	1,07	1,36
U251 + MMC2 CM	1,15	0,86	1,08

U251	1,31	0,22	0,16
U251 + MMC2 CM	1,03	0,15	0,11

	p11	p11(2)	p12
U87	2,23	2,98	2,66
U87 + MMC4 CM	1,89	2,55	1,73

U87	2,62	0,38	0,27
U87 + MMC4 CM	2,06	0,43	0,31

- Izračuni k sliki 19

	p7	p8	p9
MMC1	1,00	1,00	1,00
MMC1 + U373 CM	1,01	0,82	0,83

	p6	p7	p9
MMC2	1,00	1,00	1,00
MMC2 + U251 CM	0,97	0,99	1,10

	p7	p8	p10
MMC4	1,00	1,00	1,00
MMC4 + U87 CM	0,88	0,87	1,16

	p41	p43	p44
U373	1,00	1,00	1,00
U373 + MMC1 CM	1,21	0,69	0,78

	p40	p43	p44
U251	1,00	1,00	1,00
U251 + MMC2 CM	0,77	0,81	0,79

	p11	p11(2)	p12
U87	1,00	1,00	1,00
U87 + MMC4 CM	0,85	0,86	0,65

	Average	StDev	StError
MMC1	1,00	0,00	0,00
MMC1 + U373 CM	0,89	0,11	0,07

MMC2	1,00	0,00	0,00
MMC2 + U251 CM	1,02	0,07	0,05

MMC4	1,00	0,00	0,00
MMC4 + U87 CM	0,97	0,17	0,12

U373	1,00	0,00	0,00
U373 + MMC1 CM	0,89	0,28	0,20

U251	1,00	0,00	0,00
U251 + MMC2 CM	0,79	0,02	0,01

U87	1,00	0,00	0,00
U87 + MMC4 CM	0,78	0,12	0,08

	T-test
MMC1	0,1376
MMC2	0,6829
MMC4	0,7656
U373	0,5345
U251	0,0001
U87	0,0329

- Izračunu k sliki 20

	MMC	MMC + GBM CM
MMC1p7	1,00	1,01
MMC1p8	1,00	0,82
MMC1p9	1,00	0,83
MMC2p6	1,00	0,97
MMC2p7	1,00	0,99
MMC2p9	1,00	1,10
MMC4p7	1,00	0,88
MMC4p8	1,00	0,87
MMC4p10	1,00	1,16

	Average	StDev	StError
MMC	1,00	0,00	0,00
MMC + GBM CM	0,96	0,12	0,09

GBM	1,00	0,00	0,00
GBM + MMC CM	0,82	0,16	0,11

	T-test
MMC + GBM CM	0,3129
GBM + MMC CM	0,0041

	GBM	GBM + MMC CM
U373p41	1,00	1,21
U373p43	1,00	0,69
U373p44	1,00	0,78
U251p40	1,00	0,77
U251p43	1,00	0,81
U251p44	1,00	0,79
U87p11	1,00	0,85
U87p11(2)	1,00	0,86
U87p12	1,00	0,65

- Izračuni k sliki 23

	MMC	MMC + GBM CM
MMC1p7	1,00	0,76
MMC1p8	1,00	0,73
MMC1p9	1,00	1,11
MMC2p6	1,00	2,13
MMC2p7	1,00	2,06
MMC2p9	1,00	1,98
MMC4p7	1,00	1,85
MMC4p8	1,00	1,55
MMC4p10	1,00	1,54

	Average	StDev	StError
MMC	1,00	0,00	0,00
MMC + GBM CM	1,52	0,54	0,39

GBM	1,00	0,00	0,00
GBM + MMC CM	0,73	0,12	0,09

	T-test
MMC + GBM CM	0,0109
GBM + MMC CM	5,222E-06

	GBM	GBM + MMC CM
U373p41	1,00	0,72
U373p43	1,00	0,98
U373p44	1,00	0,80
U251p40	1,00	0,61
U251p43	1,00	0,65
U251p44	1,00	0,68
U87p11	1,00	0,72
U87p11(2)	1,00	0,81
U87p12	1,00	0,60

Priloga B2: Vpliv CM na vsebnost CatL v MMC in linijah GBM

- Izračuni k sliki 24

	p7	p8	p9
MMC1	4,12	4,71	4,00
MMC1 + U373 CM	3,27	3,43	3,80

	p6	p7	p9
MMC2	3,27	3,31	4,04
MMC2 + U251 CM	6,25	6,33	6,49

	p7	p8	p10
MMC4	3,86	7,37	5,07
MMC4 + U87 CM	6,18	10,61	9,09

	p41	p43	p44
U373	5,96	5,58	5,92
U373 + MMC1 CM	3,10	3,24	4,02

	p40	p43	p44
U251	4,19	5,97	6,87
U251 + MMC2 CM	3,00	4,09	4,45

	p11	p11(2)	p12
U87	2,00	1,70	1,68
U87 + MMC4 CM	1,86	1,70	1,44

	Average	StDev	StError
MMC1	4,28	0,38	0,27
MMC1 + U373 CM	3,50	0,28	0,19

MMC2	3,54	0,43	0,31
MMC2 + U251 CM	6,36	0,12	0,09

MMC4	5,43	1,78	1,26
MMC4 + U87 CM	8,63	2,25	1,59

U373	5,82	0,21	0,15
U373 + MMC1 CM	3,45	0,49	0,35

U251	5,68	1,36	0,96
U251 + MMC2 CM	3,84	0,75	0,53

U87	1,79	0,18	0,13
U87 + MMC4 CM	1,67	0,21	0,15

	T-test
MSC1	0,0450
MSC2	0,0004
MSC4	0,1261
U373	0,0016
U251	0,1113
U87	0,4662

PRILOGA C

Priloga C: Vpliv CM na aktivnost CatB in CatL-podobnih katepsinov v MMC in linijah GBM (test aktivnosti cisteinskih katepsinov)

Priloga C1: Vpliv CM na aktivnost CatB v MMC in linijah GBM

- Izračuni k sliki 27

	p8	p9		Average	StDev	StError		T-test	
MMC1	13,4309	7,1592	MMC1	10,30	4,43	3,14	MSC1	0,9294	
MMC1 + U373 CM	14,1601	5,3475	MMC1 + U373 CM	9,75	6,23	4,41	MSC2	0,7628	
							MSC4	0,1153	
	p7	p9	MMC2	6,62	1,46	1,03	U373	0,9991	
MMC2	5,5900	7,6573	MMC2 + U251 CM	5,31	5,16	3,65	U251	0,5732	
MMC2 + U251 CM	1,6678	8,9616					U87	0,2200	
	p7	p8	MMC4	2,50	1,29	0,91			
MMC4	1,5821	3,4097	MMC4 + U87 CM	5,34	0,76	0,54			
MMC4 + U87 CM	5,8830	4,8040							
	p41	p43	p44	U373	9,78	0,99	0,70		
U373	9,1646	10,9238	9,2531	U373 + MMC1 CM	9,78	2,25	1,59		
U373 + MMC1 CM	11,6422	10,4106	7,2837						
	p40	p43	p44	U251	10,17	1,33	0,94		
U251	8,8774	11,5270	10,1119	U251 + MMC2 CM	9,42	1,66	1,17		
U251 + MMC2 CM	8,5261	11,3319	8,4074						
	p11	p11(2)	p12	U87	0,87	0,58	0,41		
U87	0,6464	1,5202	0,4355	U87 + MMC4 CM	1,63	0,70	0,50		
U87 + MMC4 CM	2,0198	2,0493	0,8177						

- Izračuni k sliki 28

	p8	p9	
MMC1	1,00	1,00	
MMC1 + U373 CM	1,05	0,75	
	p7	p9	
MMC2	1,00	1,00	
MMC2 + U251 CM	0,30	1,17	
	p7	p8	
MMC4	1,00	1,00	
MMC4 + U87 CM	3,72	1,41	
	p41	p43	p44
U373	1,00	1,00	1,00
U373 + MMC1 CM	1,27	0,95	0,79
	p40	p43	p44
U251	1,00	1,00	1,00
U251 + MMC2 CM	0,96	0,98	0,83
	p11	p11(2)	p12
U87	1,00	1,00	1,00
U87 + MMC4 CM	3,12	1,35	1,88

	Average	StDev	StError
MMC1	1,00	0,00	0,00
MMC1 + U373 CM	0,90	0,22	0,15
MMC2	1,00	0,00	0,00
MMC2 + U251 CM	0,73	0,62	0,44
MMC4	1,00	0,00	0,00
MMC4 + U87 CM	2,56	1,63	1,15
U373	1,00	0,00	0,00
U373 + MMC1 CM	1,00	0,25	0,17
U251	1,00	0,00	0,00
U251 + MMC2 CM	0,92	0,08	0,06
U87	1,00	0,00	0,00
U87 + MMC4 CM	2,12	0,91	0,65

	T-test
MSC1	0,5841
MSC2	0,6043
MSC4	0,3084
U373	0,9814
U251	0,1874
U87	0,1013

- Izračuni k sliki 29

	MMC	MMC + GBM CM
MMC1p8	1,00	1,05
MMC1p9	1,00	0,75
MMC2p7	1,00	0,30
MMC2p9	1,00	1,17
MMC4p7	1,00	3,72
MMC4p8	1,00	1,41

	Average	StDev	StError
MMC	1,00	0,00	0,00
MMC + GBM CM	1,40	1,20	0,85

GBM	1,00	0,00	0,00
GBM + MMC CM	1,35	0,75	0,53

	GBM	GBM + MMC CM
U373p41	1,00	1,27
U373p43	1,00	0,95
U373p44	1,00	0,79
U251p40	1,00	0,96
U251p43	1,00	0,98
U251p44	1,00	0,83
U87p11	1,00	3,12
U87p11(2)	1,00	1,35
U87p12	1,00	1,88

	T-test
MMC + GBM CM	0,4334
GBM + MMC CM	0,1807

Priloga C2: Vpliv CM na aktivnost CatL- podobih katepsinov v MMC in linijah GBM

- Izračuni k sliki 30

	p8	p9
MMC1	0,5600	0,0014
MMC1 + U373 CM	0,4801	0,0000

	Average	StDev	StError
MMC1	0,28	0,39	0,28
MMC1 + U373 CM	0,24	0,34	0,24

	T-test
MSC1	0,9222
MSC2	0,4900
MSC4	0,6478
U373	0,6398
U251	0,5003
U87	0,7784

	p7	p9
MMC2	10,2997	0,1375
MMC2 + U251 CM	1,7398	0,0597

MMC2	5,22	7,19	5,08
MMC2 + U251 CM	0,90	1,19	0,84

	p7	p8
MMC4	0,6910	0,5197
MMC4 + U87 CM	0,6370	0,4312

MMC4	0,61	0,12	0,09
MMC4 + U87 CM	0,53	0,15	0,10

	p41	p43	p44
U373	6,0629	3,9913	0,0684
U373 + MMC1 CM	3,2197	3,6638	0,0684

U373	3,37	3,04	2,15
U373 + MMC1 CM	2,32	1,96	1,39

	p40	p43	p44
U251	8,3253	5,9377	0,1274
U251 + MMC2 CM	4,7313	3,3514	0,1029

U251	4,80	4,22	2,98
U251 + MMC2 CM	2,73	2,38	1,68

	p11	p11(2)	p12
U87	0,1130	0,0633	0,0000
U87 + MMC4 CM	0,0950	0,0403	0,0029

U87	0,06	0,06	0,04
U87 + MMC4 CM	0,05	0,05	0,03

- Izračuni k sliki 31

	p8	p9
MMC1	1,00	1,00
MMC1 + U373 CM	0,86	0,00

	p7	p9
MMC2	1,00	1,00
MMC2 + U251 CM	0,17	0,43

	p7	p8
MMC4	1,00	1,00
MMC4 + U87 CM	0,92	0,83

	p41	p43	p44
U373	1,00	1,00	1,00
U373 + MMC1 CM	0,53	0,92	1,00

	p40	p43	p44
U251	1,00	1,00	1,00
U251 + MMC2 CM	0,57	0,56	0,81

	p11	p11(2)	p12
U87	1,00	1,00	1,00
U87 + MMC4 CM	0,84	0,64	1,00

	Average	StDev	StError
MMC1	1,00	0,00	0,00
MMC1 + U373 CM	0,43	0,61	0,43

	Average	StDev	StError
MMC2	1,00	0,00	0,00
MMC2 + U251 CM	0,30	0,19	0,13

	Average	StDev	StError
MMC4	1,00	0,00	0,00
MMC4 + U87 CM	0,88	0,07	0,05

	Average	StDev	StError
U373	1,00	0,00	0,00
U373 + MMC1 CM	0,82	0,25	0,18

	Average	StDev	StError
U251	1,00	0,00	0,00
U251 + MMC2 CM	0,65	0,14	0,10

	Average	StDev	StError
U87	1,00	0,00	0,00
U87 + MMC4 CM	0,83	0,18	0,13

	T-test
MSC1	0,3141
MSC2	0,0343
MSC4	0,1146
U373	0,2729
U251	0,0118
U87	0,1775

- Izračuni k sliki 32

	MMC	MMC + GBM CM
MMC1p8	1,00	0,86
MMC1p9	1,00	0,00
MMC2p7	1,00	0,17
MMC2p9	1,00	0,43
MMC4p7	1,00	0,92
MMC4p8	1,00	0,83

	GBM	GBM + MMC CM
U373p41	1,00	0,53
U373p43	1,00	0,92
U373p44	1,00	1,00
U251p40	1,00	0,57
U251p43	1,00	0,56
U251p44	1,00	0,81
U87p11	1,00	0,84
U87p11(2)	1,00	0,64
U87p12	1,00	1,00

	Average	StDev	StError
MMC	1,00	0,00	0,00
MMC + GBM CM	0,54	0,39	0,28

	Average	StDev	StError
GBM	1,00	0,00	0,00
GBM + MMC CM	0,76	0,19	0,14

	T-test
MMC + GBM CM	0,0159
GBM + MMC CM	0,0020