

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tina ŠUTAR

**PRIMERJAVA TUMORSKIH MATIČNIH CELIC
GLIOMOV Z NORMALNIMI
NEVROEPITELJISKIMI MATIČNIMI CELICAMI
NA RAVNI INFORMACIJSKE RNA (mRNA)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tina ŠUTAR

**PRIMERJAVA TUMORSKIH MATIČNIH CELIC GLIOMOV Z
NORMALNIMI NEVROEPITELJISKIMI MATIČNIMI CELICAMI
NA RAVNI INFORMACIJSKE RNA (mRNA)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON BETWEEN GLIOMAS TUMOR STEM CELLS AND
NEUROEPITHELIUM STEM CELLS ON A MESSENGER RNA
(mRNA) BASIS**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je nastalo kot zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalno delo je bilo opravljeno v laboratoriju Oddelka za genetsko toksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za biologijo.

Študijska komisija študija biotehnologije je na seji dne 30. novembra 2009 za mentorja potrdila doc. dr. Miomirja Kneževića, za somentorja dr. Uroša Rajčevića in za recenzenta izr. prof. dr. Marka Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Miomir KNEŽEVIC
Zavod RS za transfuzijsko medicino

Član: dr. Uroš RAJČEVIĆ
Nacionalni inštitut za biologijo

Član: izr. prof. dr. Marko KREFT
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo

Datum zagovora: 20. avgust 2010

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Izjavljam, da je naloga, oddana v elektronski verziji, identična tiskani verziji.

Tina ŠUTAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 602.9 : 611.018 : 616-006 : 577.2 (043.2)
KG matične celice / nevroepitelijske matične celice / tumorske matične celice / gliomi / glioblastomi / molekularne tehnike / mRNA / PCR v realnem času / molekularni označevalci / CD133 (prominin 1) / Sox2 / nestin / GFAP / β -III-tubulin
AV ŠUTAR, Tina
SA KNEŽEVIĆ, Miomir (mentor) / RAJČEVIĆ, Uroš (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2010
IN PRIMERJAVA TUMORSKIH MATIČNIH CELIC GLIOMOV Z NORMALNIMI NEVROEPITELJISKIMI MATIČNIMI CELICAMI NA RAVNI INFORMACIJSKE RNA (mRNA)
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIV, 57 str., 15 pregl., 18 sl., 2 pril., 89 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Gliomi so primarni tumorji centralnega živčnega sistema, ki izvirajo iz podpornih celic – glije. Najbolj maligna oblika gliomov je glioblastom. V tumorjih obstaja le majhna populacija celic, ki je sposobna tvoriti tumorje *de novo* in ima določene lastnosti matičnih celic. Te celice imenujemo tumorske matične celice. Zaradi same narave glioblastom dandanes ni ozdravljiv, zato se iščejo novi načini zdravljenja. Nevroepitelijske matične celice veljajo za potencialne nosilce terapevtskih cDNA produktov neposredno v žarišče možganskih tumorjev. Da pa bi jih lahko uporabili pri zdravljenju glioblastomov, bi morali podrobnejše poznati razlike in podobnosti med njimi in tumorskimi matičnimi celicami glioblastomov. Cilj diplomske naloge je bil primerjati izražanje molekularnih označevalcev za matične celice in molekularnih označevalcev diferenciacije in proliferacije ter ugotoviti bistvene razlike med izražanjem pri nevroepitelijskih in tumorskih matičnih celicah z uporabo metode PCR v realnem času. Izražanje označevalcev matičnih celic smo določali pri vzorcih glioblastomov, patoloških vzorcih subventrikularnega predela možganov, primarnih celičnih linijah gliomov ter nevroepitelijski celični liniji HNSC.100. Vzgojili smo sferoide in nevrosfere, izolirali RNA, jo prepisali z reverzno transkriptazo v cDNA, preamplificirali cDNA in z metodo PCR v realnem času preverili izražanje označevalcev matičnih celic (CD133, Sox2, nestin) in diferenciacije (GFAP, β -III-tubulin). Pridobljeni rezultati kažejo, da se izražanje molekularnih označevalcev na ravni mRNA na gliomskeih tumorskih sferoidih razlikuje od izražanja označevalcev na normalnih nevroepitelijskih nevrosferah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 602.9 : 611.018 : 616-006 : 577.2 (043.2)
CX stem cells / neuroepithelium stem cells / tumor stem cells / gliomas / glioblastoms / molecular techniques / mRNA / real-time PCR / molecular markers / CD133 (Prominin-1) / Sox2 / nestin / GFAP / β -III-tubulin
AU ŠUTAR, Tina
AA KNEŽEVIĆ, Miomir (supervisor) / RAJČEVIĆ, Uroš (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Program in Biotechnology
PY 2010
TI COMPARISON BETWEEN GLIOMAS TUMOR STEM CELLS AND NEUROEPITHELIUM STEM CELLS ON A MESSENGER RNA (mRNA) BASIS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIV, 57 p., 15 tab., 18 fig., 2 ann., 89 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Gliomas are primary central nervous system tumors which arise from glia or their precursors. Glioblastomas are the most aggressive type of gliomas. Most cancers contain tumor cells that could arise tumor *de novo* and display stem cells-like characteristics. These are so called tumor stem cells. Contemporary treatments of glioblastomas do not give positive curative results. Therefore scientists are looking for new therapeutic approaches. Neuroepithelium stem cells can be exploited for target delivery of therapeutic cDNA products to tumor foci. The use of this approach should be familiar with the similarities and differences between neuroepithelium stem cells and tumor stem cells. The purpose of this graduation thesis was to compare expression of molecular stem cell and differentiation markers and to discover main differences in their expression between neuroepithelium stem cells and gliomas tumor stem cells using real-time PCR. RNA was isolated from neurospheres and spheroids, cDNA synthesized and preamplified and the expression of stem cell markers (CD133, Sox2 and nestin) and differentiation markers (GFAP and β -III-tubulin) was verified using real-time PCR. Our results draw a distinction between expression of molecular markers on a mRNA basis in gliomas tumor stem cells and neuroepithelium stem cells.

KAZALO VSEBINE

Str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GLIOMI	3
2.1.1 Glioblastom	4
2.2 MATIČNE CELICE	8
2.2.1 Nevroepitelijske matične celice.....	8
2.2.1.1 Embrionalni razvoj centralnega živčnega sistema.....	8
2.2.1.2 Nevroepitelijske matične celice v centralnem živčnem sistemu odraslega ...	9
2.2.1.3 Izolacija živčnih progenitorskih celic post-mortem	10
2.2.1.4 Nevroepitelijska celična linija HNSC.100.....	11
2.2.2 Tumorske matične celice.....	11
2.2.2.1 Možganske tumorske matične celice.....	13
2.3 OZNAČEVALCI MATIČNIH IN TUMORSKIH MATIČNIH CELIC	14
2.3.1 CD133 (prominin 1).....	15
2.3.2 Sox2	17
2.3.3 Nestin	17
2.4 OZNAČEVALCI PREKURZORSKIH IN DIFERENCIRANIH CELIC	17

2.3.4 GFAP	17
2.3.5 β-III-tubulin	18
2.5 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	18
2.5.1 Merjenje kvalitete in koncentracije RNA	20
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 CELIČNI MATERIALI	21
3.1.1 Vzorci glioblastomov	21
3.1.2 Patološki vzorci možganov.....	21
3.1.3 Gliomske matične celice	21
3.1.4 Nevroepitelijska celična linija HNSC.100	21
3.2 MATERIALI	22
3.2.1 Kemikalije in plastični pripomočki.....	22
3.2.2 Pripomočki in aparature.....	23
3.2.3 Gojišča in dodatki gojiščem.....	23
3.2.4 Kompleti in označevalci	25
3.2.5 Priprava z agarjem prevlečenih plošč za gojenje tumorskih sferoidov v suspenziji.....	25
3.3 METODE	26
3.3.1 Manipulacija s celičnimi materiali.....	26
3.3.1.1 Manipulacija z vzorci glioblastomov	26
3.3.1.2 Manipulacija s patološkimi vzorci možganov	26
3.3.1.3 Manipulacija s gliomskimi matičnimi celicami.....	27
3.3.1.4 Manipulacija s celično linijo HNSC.100	27
3.3.1 Izolacija RNA.....	28
3.3.2 Reverzna transkripcija	29
3.3.3 Preamplifikacija genov z nizkim izražanjem.....	29
3.3.4 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času	30
3.3.5 Preverjanje kontaminacije RNA z agarozno gelsko elektroforezo	30
3.3.6 Statistična analiza rezultatov.....	30
4 REZULTATI.....	32
4.1 RAST IN MORFOLOGIJA CELIČNIH KULTUR.....	32

4.1.1 Vzorci glioblastomov	32
4.1.2 Patološki vzorci možganov.....	33
4.1.3 Gliomske matične celice	34
4.1.4 Celična linija HNSC.100	34
4.2 MERJENJE KONCENTRACIJE IN OCENA ČISTOSTI IZOLIRANE RNA.....	34
4.3 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA	35
4.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	36
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	45
5.1 RAZPRAVA.....	45
5.1.1 Nadaljnje delo	48
5.2 SKLEPI.....	48
6 POVZETEK.....	49
7 VIRI	50

KAZALO PREGLEDNIC

Str.

Preglednica 1: Glavne značilnosti razredov glioblastomov (Phillips in sod., 2006; Verhaak in sod., 2010)	7
Preglednica 2: Seznam uporabljenih kemikalij	22
Preglednica 3: Seznam uporabljenih plastičnih pripomočkov	22
Preglednica 4: Seznam uporabljenih pripomočkov in aparatur.....	23
Preglednica 5: Seznam uporabljenih osnovnih gojišč in dodatkov gojiščem.....	23
Preglednica 6: Sestavine gojišča Neurobasal™ z dodatki.....	24
Preglednica 7: Sestavine gojišča DMEM™ s serumom.....	24
Preglednica 8: Sestavine gojišča DMEM™ brez dodanega seruma	24
Preglednica 9: Sestavine gojišča za zamrzovanje.....	24
Preglednica 10: Sestavine gojišča DMEM™ za blokado tripsina.....	25
Preglednica 11: Sestavine gojišča Neurobasal™ za blokado tripsina	25
Preglednica 12: Uporabljeni kompleti in molekularni označevalci.....	25
Preglednica 13: Koncentracija in kvaliteta izolirane RNA	34
Preglednica 14: Pregled relativnih ravni izražanja označevalcev po vzorcih	36
Preglednica 15: Pregled relativnih nivojev izražanja molekularnih označevalcev po skupinah vzorcev	36

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Histološke rezine astrocitomov (Brat in sod., 2003).....	4
Slika 2: Glavne značilnosti glioblastomov (Smirniotopoulos in sod., 2007)	5
Slika 3: Prečni prerez možganov glodalca (Alvarez-Buylla in García-Verdugo, 2002)	10
Slika 4: Modela tumorske heterogenosti in propagacije (Visvader in Lindeman, 2008)....	13
Slika 5: Izvor gliomov (Glantz in sod., 2009).	14
Slika 6: Označevalci možganskih tumorskih matičnih celic (Rich, 2009).....	15
Slika 7: Hierarhija možganskih celic (Clarke, 2004)	16
Slika 8: Primer grafične predstavitev po končanem PCR v realnem času (Heid in sod., 1996).....	19
Slika 9: Pregled gojenih celičnih kultur pri 40x povečavi.....	32
Slika 10: Rast nevrosfer iz patoloških vzorcev možganov pri 40x povečavi.....	33
Slika 11: Slika gela po končani agarozni gelski elektroforezi.....	35
Slika 12: Relativno izražanje označevalca CD133 po skupinah vzorcev.....	37
Slika 13: Relativno izražanje označevalca Sox2 po skupinah vzorcev	38
Slika 14: Relativno izražanje označevalca nestin po skupinah vzorcev.....	39
Slika 15: Relativno izražanje označevalca GFAP po skupinah vzorcev	40
Slika 16: Relativno izražanje označevalca β -III-tubulin po skupinah vzorcev	41
Slika 17: Grafična predstavitev desetiških logaritmov relativnih nivojev izražanja molekularnih označevalcev po skupinah vzorcev	42
Slika 18: Matrika razsevnih diagramov za molekularne označevalce CD133, Sox2, nestin, GFAP in β -III-tubulin.....	43

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Mnenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko o načrtu raziskave malignih gliomov

PRILOGA B: Mnenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko o delu s patološkimi vzorci možganov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bFGF	osnovni fibroblastni rastni faktor
CD133⁺	CD133 pozitiven
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
CŽS	centralni živčni sistem
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
EGF	epidermalni rastni faktor
GFAP	angl. glial fibrillary acidic protein
GBM	glioblastom
HIF-1	hipoksijo-inducirajoči faktor 1
MC	matična celica
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
NMC	nevroepitelijska matična celica
NPC	nevroepitelijska progenitorska celica
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PTEN	homolog fosfataze in tenzina
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
PDGFR	angl. platelet-derived growth factor receptor
RNA	ribonukleinska kislina
RT	virusni encim reverzna transkriptaza
SVP	subventrikularni predel v možganih
TMC	tumorska matična celica
VP	ventrikularni predel v možganih

SLOVARČEK

anaplastičnost	izguba zmožnosti strukturne diferenciacije celice oziroma skupine celic, zaradi česar nekontrolirano rastejo
angiogeneza	proces nastajanja novih krvnih žil iz predhodnih in/ali zbiranja endotelijskih prekurzorskih celic
antiangiogeneza	proces zaviranja angiogeneze
astrocit	celica zvezdaste oblike, ki je pri sesalcih večinoma prisotna v centralnem živčnem sistemu, kjer tvori razmejitev možganov od možganske žilnice ter obdaja možganske žile; hkrati pa je eden izmed gradnikov krvno-možganske pregrade
benigen	nenevaren, neškodljiv
blastocista	zarodek sesalcev med ugnezdenjem v steno maternice
dediferenciacija	proses, pri katerem se diferencirane celice vrnejo v manj diferencirano stanje
diferenciacija	proses, v katerem nespecializirana celica pridobi lastnosti specializirane celice
<i>de novo</i>	od začetka
ekspanzija celic	rast celic
ektoderm	vrhnja embrionalna plast, iz katere se med drugim razvijejo možgani, hrbtenjača, živčevje in koža
endoderm	notranja embrionalna plast, iz katere se med drugim razvije prebavni sistem in pljuča
ependimalne celice	epitelijske celice, ki tvorijo ventrikle, napolnjene s cerebrospinalno tekočino, in glavni kanal hrbtenjače
epiblast	notranja masa blastociste
gastrulacija	obdobje embrionalnega razvoja po nastanku blastule; čas celične diferenciacije (začetek delovanja genetskih zasnov v celicah)

glija celica	podpora celica v centralnem živčnem sistemu
glioblast	celica nevroektodermalnega izvora, ki ima zmožnost se diferencirati v glija celico
herniacija v možganih	stanje, ko so možgani, cerebrospinalna tekočina in krvne žile potisnjeni ven iz običajnega mesta
hiperplazija	povečanje števila celic
hipoksija	stanje, ko celice in tkiva ne dobijo zadostne količine kisika
hišni gen	gen, ki je neprestano izražen in sodeluje pri osnovnih celičnih procesih
infiltracija celic	invazija celic v tkiva oziroma organe, kjer običajno niso prisotne
invaziven tumor	tumorske celice niso omejene samo na tumor, temveč tudi potujejo v okoliško, zdravo, tkivo
<i>in vivo</i>	v živem; izraz se v naravoslovju uporablja za procese, ki potekajo v živem organizmu
<i>in vitro</i>	izven živega; izraz se v naravoslovju uporablja za poskuse in procese, ki potekajo zunaj živega organizma
maligen	celica oziroma skupina celic izgubi zmožnost strukturne diferenciacije, postanejo invazivne in tvorijo metastaze
metastaza	skupek rakastih celic, ki se je razširil iz prvotnega žarišča na drugo mesto v telesu, kjer začne enako bolezen
mezoderm	embrionalna plast, ki leži med endodermom in eksodermom; iz nje se med drugim razvijejo kosti, mišice in krvožilje
mikrovaskularna proliferacija	brstenje kapilar
multipotentnost	sposobnost diferenciacije v več celičnih tipov istega kličnega lista oziroma osnovne plasti, a ne v vse

nekroza	patološko odmrte celic oziroma lokalno odmrte tkiv zaradi zunanjih dejavnikov (okužbe, poškodbe, toksini)
nevroblast	celica, ki se lahko razvije v živčno celico ali glija celico
nevrogeneza	proces nastajanja živčnih celic
oligodendrocyt	podpora celica živčnega sistema, ki tvori mielinski ovoj v centralnem živčnem sistemu
onkogeni	geni, ki lahko sprožijo nastanek rakave celice; pogosto so to mutirani protoonkogeni
pleomorfen (celica, jedro)	celica oziroma jedro različnih oblik
pluripotentnost	sposobnost diferenciacije v vse tri osnovne celične plasti – ektoderm, mezoderm in endoderm
post-mortem	po smrti
proliferacija	rast in razmnoževanje celic
PTEN gen	tumorski supresorski gen, ki je vključen v regulacijo celičega cikla preko preprečevanja rasti in prehitrih celičnih delitev
reverzna transkripcija	sinteza DNA na podlagi RNA ob prisotnosti encima reverzne transkriptaze
supresija (tumorskih) genov	utišanje (tumorskih) genov
totipotentnost	sposobnost diferenciacije v vse celične tipe, vključno s trofoblastom (spermiji in jajčeca)
transdeterminacija	proses, pri katerem progenitroske matične celice spremenijo usmeritev (npr. iz endodermalnih postanejo ektodermalne)
transdiferenciacija	proses, pri katerem se tkivne matične celice diferencirajo v specializirane celice drugega tkiva
unipotentnost	sposobnost diferenciacije v en celični tip

1 UVOD

Gliomi so primarni možganski tumorji, ki izvirajo iz podpornih celic centralnega živčnega sistema – glije. Po lestvici svetovne zdravstvene organizacije (angl. WHO) jih delimo na stopnje od I–IV. Stopnji III in IV sta maligni. Najbolj maligna oblika je stopnja IV, glioblastom (angl. GBM).

V tumorjih obstaja le majhna populacija rakavih celic, ki je sposobna tvorbe tumorjev *de novo* in imajo določene lastnosti matičnih celic. To so t. i. tumorske matične celice, ki izražajo več označevalcev matičnih celic. Tumorske matične celice imajo sposobnost samopomnoževanja in se asimetrično delijo (iz materinske celice nastaneta dve hčerinski celici, pri čemer ena ostane izvorna – enaka materinski, druga pa diferencira). So zelo tumorigene in odporne na zdravljenje (Singh in sod., 2004a).

Slaba prognoza bolnikov z GBM ter toksičnost in neučinkovitost zdravljenja so glavni motivi pri razvoju novih načinov zdravljenja gliomov. Ker so slednji pogosto infiltrirani v okoliško možganovino in ker je krvno možganska prepreka dodatna ovira pri dostavi kemoterapevtikov, bi morale biti nove oblike zdravljenja omejene le na tumor in tako selektivne za tumorske celice.

Kot potencialni nosilec tarčnih terapevtskih genov do cilja, tj. tumorskih celic oziroma metastaskih celic, veliko obetajo matične celice odraslega, predvsem nevroepitelijске matične celice, nevroepitelijске progenitorske celice ter mezenhimske matične celice, izolirane iz kostnega mozga oziroma tolše. Tem celicam je skupno, da v razmerah *in vivo* potujejo po izvornih tkivih, tudi v bližino tumorjev. Tako bi lahko bile nevroepitelijске matične celice uporabljene za dostavo terapevtskih cDNA produktov neposredno v žarišče možganskih tumorjev (Najbauer in sod., 2007).

Uporaba nevroepitelijskih matičnih in progenitorskih celic v terapevtske namene pri genskem zdravljenju GBM pa bi bila izvedljiva le ob natančnem poznavanju razlik med obema tipoma celic, za kar se uporablajo različni molekularni pristopi, od genomike preko transkriptomike do proteomike.

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) se uporablja za kvantitativno analizo DNA. Potrebna je hibridizacijska sonda, specifična za določen gen, ki je označena z dvema različnima fluorescentnima barviloma. Ko se tarčni fragment pomnoži, se hibridizacijska sonda razgradi ter odda fluorescentni signal, katerega intenzitet spremi senzor v cikličnem termostatu. Več kot je želene RNA v izhodnem vzorcu, več je cDNA in pomnožitev, posledično je signal, ki ga hibridizacijska sonda odda, večji. Hkrati pa se s tarčnim genom pomnožuje tudi hišni gen, ki nam omogoča normalizacijo rezultatov in primerjavo različnih vzorcev med seboj.

1.1 CILJI

Cilji diplomske naloge so bili:

- vzgojiti sferoide iz svežih vzorcev glioblastomov, pridobljenih z nevrokirurškim posegom na bolnikih, obogatenih z matičnim celicam podobnimi celicami;
- vzgojiti nevrosfere iz subventrikularnega predela normalnih možganov pridobljenih po smrti ter nevrosfere iz celične linije HNSC.100;
- vzgojiti nevrosfere iz primarnih celičnih linij gliomov NCH 421k in NCH 644;
- primerjati izražanje molekularnih označevalcev za matične celice in diferenciacijo ter ugotoviti bistvene razlike med izražanjem pri nevroepitelijskih in tumorskih matičnih celicah.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Naši delovni hipotezi sta bili, da nevroepitelijske matične celice, pridobljene iz možganov *post-mortem*, rastejo v obliki nevrosfer, ter da se izražanje označevalcev matičnih celic na normalnih nevrosferah razlikuje od izražanja označevalcev na tumorskih sferoidih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GLIOMI

V grobem glijske tumorje delimo na tri načine:

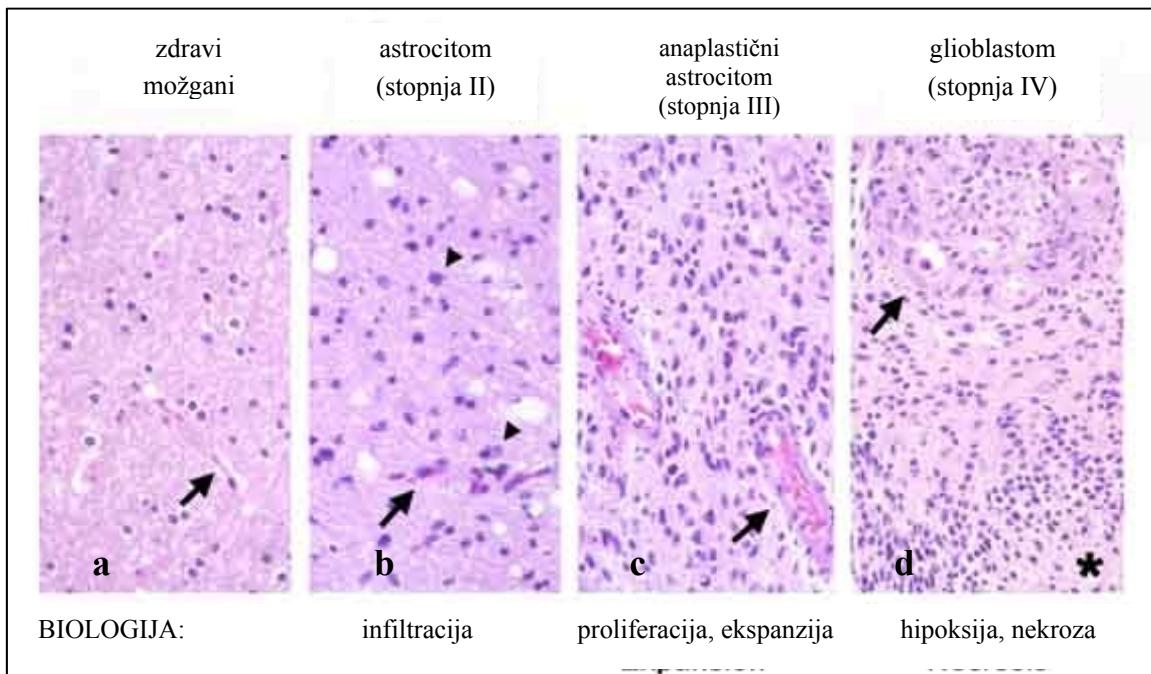
- a) glede na celični tip, ki prevladuje
 - **ependimomi** izvirajo iz ependimalnih celic
 - **oligodendrogliomi** izvirajo iz oligodendrocitov
 - **astrocitomi** izvirajo iz astrocitov
 - **mešani gliomi** (npr. oligoastrocitomi) so sestavljeni iz večih vrst celic glija
- b) na podlagi patološke ocene
 - gliomi **nizke stopnje** niso anaplastični, so benigni
 - gliomi **visoke stopnje** so anaplastični, pogosto infiltrirani v okoliško možganovino in so maligni
- c) glede na lokacijo v možganih
 - **supratentorialni** gliomi se nahajajo v velikih možganih, prizadenejo pa večinoma odrasle
 - **infratentorialni** gliomi se nahajajo v malih možganih, večinoma prizadenejo otroke

Astrocitome najpogosteje delimo dalje po lestvici Svetovne zdravstvene organizacije (ang. WHO) (Louis in sod., 2007):

- stopnja I: **pilocitni astrocitom** in **subependimom** (2 % vseh astrocitomov); sta počasi rastoča, benigna in pogojno ozdravljuva
- stopnja II: **astrocitom** (8 % vseh); počasi rastoč, invaziven, navadno benigen, lahko se razvije v maligno obliko ali napreduje v višjo stopnjo, najpogosteje prizadene otroke
- stopnja III: **anaplastični astrocitom** (20 % vseh); maligni, cilj zdravljenja je kirurška odstranitev čim večjega dela tumorja brez poškodb ključnih nevroloških funkcij
- stopnja IV: **glioblastom** (ali **glioblastom multiforme – GBM**); najpogostejši in najbolj maligni možganski tumor

Ključni proces pri napredovanju astrocitomov po lestvici Svetovne zdravstvene organizacije iz stopnje I do stopnje IV je angiogeneza (slika 1), ki jo spremišča nekroza najpogosteje okoli hipoksičnih regij. Prisotnost hipoksičnih regij in rast tumorja vodi v povečano izražanje proangiogenih faktorjev, preko povečane aktivnosti transkripcijskega kompleksa HIF-1, ki je (in)direktno uravnavan s spremembami v onkogenih oziroma

tumorskih supresorskih genih (npr. PTEN, EGFR, PDGFR). Genetske spremembe vplivajo tudi na proangiogene in antiangiogene faktorje (npr. bFGF) (Brat in sod., 2003).

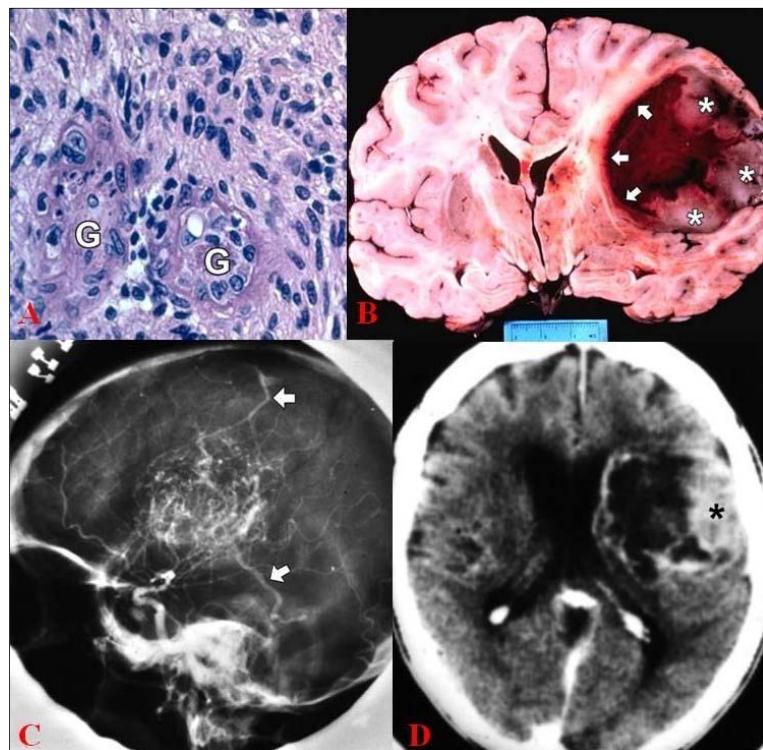


Slika 1: Histološke rezine astrocitomov. (a) S puščico je označena belina v zdravih možganih. (b) V astrocitomih (stopnja II) posamezne tumorske celice vdrejo v tkivo centralnega živčnega sistema (trikotniki), struktura beline je identična kot v zdravih možganih (puščica). (c) Število tumorskih celic se poveča, njihova oblika je nepravilna, opaziti je tudi mitozo. Angiogeneza je pospešena, stene kapilar so stanjšane (puščica). (d) V GBM je prisotna mikrovaskularna proliferacija (puščica), pogosto pa je opazna tudi mikrovaskularna hiperplazija okoli mest nekroz (*). (Brat in sod., 2003).

2.1.1 Glioblastom

Glioblastom (GBM) praviloma prizadene odrasle osebe in se nahaja v predelu velikih možganov (lat. *Cerebrum*), redkeje ga najdemo v možganskem deblu (lat. *Truncus cerebri*) in hrbitenjači (lat. *Medulla spinalis*). Navadno se hitro širi v druge dele možganov, izven možganov pa običajno ne zaseva (Bruce in Kennedy, 2009).

GBM so mikroskopsko raznoliki (od tod ime multiforme – več oblik). Na histoloških preparatih (slika 2) so opazne **nekroze** (primarni diagnostični znak GBM), **pleomorfne celice in celična jedra** ter **mikrovaskularna proliferacija (brstenje kapilar)** (Holland, 2000).



Slika 2: Glavne značilnosti glioblastomov. (A) Na histološkem preparatu je pod svetlobnim mikroskopom dobro vidna mikrovaskularna proliferacija (označeno s črko G), kapilare imajo tanke stene. (B) Na fotografiji patološkega vzorca možganov je viden GBM, ki ima na meji s skorjo možganov »skodran« rob (*), s puščicami pa so označene izsušene vene. (C) Lateralni angiogram razkriva hipervaskularno gmoto, dobro so vidne izsušene vene (označeno s puščicami). (D) Na lateralnem delu fazno kontrastne CT slike je viden skodran rob (*). (Smirniotopoulos in sod., 2007)

Glede na potek poznamo dve obliki GBM. Primarni GBM predstavljajo večino GBM, najpogosteje pa prizadenejo odrasle osebe, starejše od 50 let. Zrastejo *de novo*, kar pomeni, da ni dokazov, da je bila predhodno prisotna kakšna manj maligna spremembra. So izredno maligni, bolniki imajo v povprečju brez zdravljenja še tri mesece življenja. Sekundarni GBM pa so značilni za bolnike mlajše od 45 let. Razvijejo se iz astrocitomov ali anaplastičnih astrocitomov. Bolniki imajo boljšo prognozo in lahko z boleznjijo ob uspešnem zdravljenju živijo tudi več kot 10 let od prvega diagnosticiranja astrocitoma, v povprečju pa skoraj 8 mesecev (Ohgaki in sod., 2007; Scherer, 1940).

Genetsko ozadje GBM se razlikuje med primarnimi in sekundarnimi GBM. Pri obeh je najpogostejša izguba heterozigotnosti na ročici q, daljši ročici, desetega kromosoma. Ta mutacija je specifična za GBM in jo redko najdemo pri drugih tipih gliomov. Za primarne GBM sta značilni mutaciji še amplifikacija gena EGFR, ki je med drugim odgovoren za

nadzor celične proliferacije, in mutacija v PTEN, intracelularni fosfatazi, ki je ključen člen v signalni poti, ki omogoča supresijo tumorskih genov. Za sekundarne GBM pa sta značilni delecija in/ali zamenjava v p53 tumorskem supresorskem genu ter amplifikacija ali prekomerna ekspresija PDGF- α gena (Ohgaki in Kleihues, 2007; Ohgaki in Kleihues, 2005).

Ker je GBM infiltriran v okoliško možganovino, je zdravljenje bolnikov močno oteženo. Cilj zdravljenja je tako zagotoviti bolniku čim boljšo kvaliteto življenja. Terapija zajema kirurško odstranitev, ki zaradi same narave tumorjev ne more biti popolna, ter kombinacijo obsevanja in kemoterapije. Preživetje je odvisno od starosti bolnika (mlajši bolniki živijo dlje), ter od velikosti in tipa tumorja. Smrt bolnika je posledica velikosti tumorja, herniacije centralnega živčnega sistema in prekinitev ključnih elementov živčnega sistema, potrebnih za življenje (Bruce in Kennedy, 2009).

Dandanes pa se razvijajo novi, učinkovitejši in bolniku prijaznejši, načini zdravljenja GBM:

- imunološki pristop, ki je bil uspešen na laboratorijskih živalskih modelih, a prenos na človeka še ni bil povsem uspešen
- genska terapija, pri kateri bi s pomočjo (npr. retrovirusnega) prenosa vnesli letalne gene do tumorskih celic
- uporaba virusnih vektorjev, ki bi se na tarčnem mestu pomnoževali in posledično povzročili lizo tumorskih celic

Kljub temu, da GBM navzven kažejo enak histološki fenotip, biološki znaki (npr. rast in diferenciacija) nakazujejo razlike. Različni podtipi GBM so lahko posledica različnih izhodnih celic, iz katerih je zrasel. To hipotezo potrjuje odkritje, da gliomi izhajajo iz različnih celic (Fan in sod., 2007). Podtipa GBM sta sicer posledica različnih genskih mutacij, a so razlike tudi znotraj skupine primarnih in sekundarnih GBM zaradi molekularne heterogenosti znotraj in v okolini tumorja (Phillips in sod., 2006), kar so preverili tudi z cDNA mikromrežami (Godard in sod., 2003). Verhaak je s sodelavci (2010) v obsežni raziskavi razvrstil GBM na podlagi razlik v izražanju večih genov (med drugim EGFR, NF1 in PDGFRA/IDH1) v štiri razrede: pronevralni, nevralni, klasični in mezenhimski GBM (preglednica 1). Med njimi ima prav nevralni razred, ki izraža genski profil podoben diferenciranim možganskim celicam, najboljšo prognozo. Ugotovili so tudi, da je učinkovitost zdravljenja odvisna od razreda, v katerega je GBM uvrščen.

Preglednica 1: Glavne značilnosti razredov glioblastomov (Phillips in sod., 2006; Verhaak in sod., 2010)

	PRONEVRALNI	NEVRALNI	KLASIČNI*	MEZENHIMSKI
histološki razred	razred WHO III ali razred WHO IV z ali brez nekroz	razred WHO IV z ali brez nekroz	razred WHO IV z vidnimi nekrozami	razred WHO IV z vidnimi nekrozami
morfologija celic	astrocyti ali oligodendrocyti	astrocyti ali oligodendrocyti	astrocyti	astrocyti
oblika	primarni GBM, ki lahko napreduje v menzenhimski razred	primarni GBM, ki lahko napreduje v menzenhimski razred	primarni GBM, ki lahko napreduje v menzenhimski razred	primarni GBM ali preoblikovan pronevralski, nevralski ali klasični GBM
starost bolnikov	večina mlajših od 40 let	starejši od 50 let (povprečna starost nad 60 let)	starejši od 50 let (povprečna starost 55 let)	starejši od 50 let (povprečna starost 58 let)
prognoza	dobra (12 mesecev)	dobra (14 mesecev)	slaba (6 mesecev)	slaba (3 meseci)
histološki markerji	Olig2, DLL3, BCAN	Olig2, DLL3, TOP2A	PCNA, TOP2A	CHI3L1/YKL40, CD44, VEGF
tkivna podobnost	možgani odraslih in zarodkov	možgani odraslih	HMC, limfoblasti	kost, hrustanec, gladko mišičevje, endotelij, dendritične celice
biološki proces	nevrogeneza	nevrogeneza	proliferacija	angiogeneza
analogne možganska celica	nevroblasti	nevroblasti	NMC in/ali migrirajoče celice	NMC
kromosomske spremembe	brez sprememb	brez sprememb	podvojen 7. kromosom in izguba 10. oziroma q ročice 10. kromosoma	podvojen 7. kromosom, izgubljen 10. kromosom
PTEN lokus	nepoškodovan	nepoškodovan	izgubljen	izgubljen
EGFR lokus	normalen	normalen	povečan ali normalen	povečan ali normalen
signalna pot	aktivacija Notch signalne poti	aktivacija Notch signalne poti	aktivacija Akt signalne poti	aktivacija Akt signalne poti

* Phillips in sod. (2006) ta razred poimenujejo proliferativni GBM

2.2 MATIČNE CELICE

Matične celice (MC) so nespecializirane celice, ki imajo zmožnost samoobnavljanja, proliferacije in diferenciacije v vsaj en celični tip. Hkrati pa lahko pridobijo fenotip celic iz drugačnega tkiva, ali pa celo preskočijo iz ene somatske linije v drugo. To sposobnost imenujemo plastičnost, ki je mogoča zaradi mehanizmov dediferenciacije, transdeterminacije in transdiferenciacije. Glede na sposobnost diferenciacije jih delimo na totipotentne, pluripotentne, multipotentne ter unipotentne MC. Slednje imenujemo tudi progenitorske celice. MC glede izvor delimo na embrionalne matične celice in matične celice odraslega (Strbad in Rožman, 2005). MC odraslega so odgovorne za nastanek novih in zamenjavo poškodovanih celic zaradi poškodb in/ali bolezenskih stanj tekom razvoja in vzdrževanja homeostaze (Dor in Melton, 2004).

Pri ohranjanju matičnosti matičnih celic so ključne signalne poti (npr. Wnt, Notch, Hedgehog, BMI1 in TGF beta signalna pot), ki omogočajo selektivno aktivacijo genov, potrebnih za ohranjanje zmožnosti samopomnoževanja, in inhibicijo ekspresije genov, ki so odgovorni za diferenciacijo (Willaime – Morawek, 2008).

Mikrookolju, kjer najdemo MC v razmerah *in vivo* ter *in vitro*, rečemo niša. Temelj niše je plast homolognih celic, ki aktivno sodelujejo z matičnimi celicami. Pošiljajo jim signale, ki usmerjajo in nadzorujejo proliferacijo oziroma dediferenciacijo ter diferenciacijo matičnih celic (Scadden, 2006).

2.2.1 Nevroepitelijske matične celice

2.2.1.1 Embrionalni razvoj centralnega živčnega sistema

Centralni živčni sistem (CŽS) sestavlja različni tipi celic. Razvoj CŽS v zarodku se začne z oblikovanjem nevralne plošče iz epiblasta med gastrulacijo. Nevralna plošča nato tvori nevralno cev. Okoli lumna so urejene nevroepitelijske celice, ki se diferencirajo v nevroblaste in glioblaste. Postopoma pod steno nevralne cevi (ventrikularni predel) nastane nova zarodna plast, subventrikularni predel (SVP), iz katerega se razvijejo centralni kanal in možganski ventrikli. Pri odraslem človeku je preostanek SVP sestavljen iz aktivnih mitotičnih celic, ki so živčni prekurzorji (Vescovi in sod., 2002).

Ektoderm tvori tudi nevralni greben, populacijo prekurzorskih celic, ki potujejo po zarodku in tvorijo živčne celične tipe (med drugim senzorične ganglike in živčne celice v ušesu in nosu) in celične tipe, ki niso živčnega izvora (npr. koža). Ta proces je usmerjen s pomočjo interakcij med ektodermom in regijo imenovano organizator. Različna področja razvoja

zgodnjega živčnega sistema izražajo različne skupine genov, kar ima za posledico razvoj različnih delov možganov, vsako s svojo strukturo in funkcijo (Kintner in Koyano-Nakagawa, 2004).

2.2.1.2 Nevroepitelijiske matične celice v centralnem živčnem sistemu odraslega

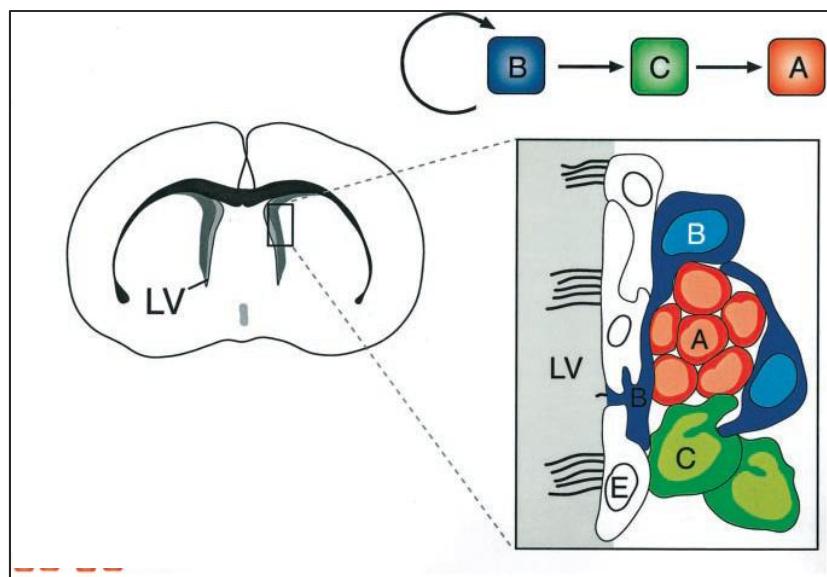
Tudi v možganih odraslega sesalca poteka nevrogeneza, kar je bilo prvič dokumentirano v šestdesetih letih prejšnjega stoletja. Od takrat dalje je bilo veliko objav, v katerih so dokazovali, da so v odraslih možganih prisotne celice, ki imajo potencial, da v celični kulturi in transplantirane v druge predele možganov, diferencirajo v živčne in glija celice (Mirescu in Gould, 2004). Nevroepitelijiske matične celice (NMC) pri odraslem človeku so skupina multipotentnih MC, ki imajo sposobnost samoobnavljanja. Diferencirajo lahko v nevrone, astrocite in oligodendrocyte (Taupin in Gage, 2002).

Tekom embriogeneze se MC, prisotne v nevroepiteliju, delijo simetrično, kasneje, v fazi nevrogeneze, pa poteka asimetrična delitev, s čimer pridobimo diferencirane celice potomke in hkrati ohranimo MC. Najprej so celice potomke živčne celice, nato pa MC ustvarijo glijske progenitorske celice, ki proliferirajo v SVP, regiji z največjim nevrogenetskim potencialom. Ob rojstvu so NMC že izoblikovane in imajo različne značilnosti, po katerih jih ločimo. Ena izmed takih značilnosti je odzivnost na rastne faktorje (Temple, 2001).

Če gojimo NMC v mediju brez seruma, potem imajo zmožnost samoobnove ter kažejo znake multipotentnosti in stabilne funkcionalne oblike tekom časa (Vescovi in sod., 2002). NMC, izolirane iz SVP, hrbtenjače, medmožganov in hipokampa, rastejo v razmerah *in vitro* kot nevrosfere v gojiščih z dodanimi rastnima faktorjem EGF in bFGF (Doetsch, 2003; Weiss in sod., 1996; Palmer in sod., 1995), ki pospešujejo proliferacijo, zmanjšujeta migracijo celic in usmerjata diferenciacijo v glija celice (Galli in sod., 2003). Sicer pa lahko NMC rastejo tudi kot enoslojna pritrjena kultura na ploščah s hrnilno plastjo (Uchida in sod., 2000). V kolikor NMC iz gojišča odstranimo rastne faktorje, lahko kmalu pričakujemo, da se bodo diferencirale v živčne in glija celice. Zaradi tega lahko sklepamo, da imata EGF in bFGF pomembno vlogo v niši NMC (Gritti in sod., 2002).

Odrasle NMC so bile najprej izolirane iz SVP (Galli in sod., 2003; Vescovi in sod., 2002), pomemben vir NMC je tudi hipokampus, presenetljivo pa so našli NMC v predelih, kjer nevrogeneza ne poteka (npr. hrbtenjači) (Temple, 2001).

Ependimalni predel SVP vsebuje vsaj štiri različne celične tipe glede na morfologijo, ultrastrukturo in molekularne markerje (slika 3). Mladi, migrirajoči nevroni (celice tipa A) tvorijo trdno sklenjene verige, obdane z astrociti (celice tipa B). Celice tipa C, ki so proliferajoči prekurzorji, tvorijo skupine, ki obdajajo verige migrirajočih celic tipa A. SVP je ločen od ventriklov s plastjo ependimalnih celic (celice tipa E). Celice tipa A se ne morejo obnavljati same, zato potrebujejo pomoč. Presenetljivo se je izkazalo, da so za ta proces odgovorne prav celice tipa B, vlogo prekurzorjev pa igrajo celice tipa C. Celice tipa B imajo očitno ključno funkcijo pri nastajanju novih živčnih celic, hkrati pa so sposobne oblikovati celice, ki rastejo v razmerah *in vitro* kot NMC (Alvarez-Buylla in García-Verdugo, 2002).



Slika 3: Prečni prerez možganov glodalca. Na levi strani je prečen prerez možganov glodalca, na katerem je označen lateralni ventrikel (LV). Na desni strani je v povečavi prikazana celična struktura in organizacija SVP. Verige mladih živčnih celic, celic A, so obdane s celicami B, ki imajo lastnosti astrocitov in ki tvorijo strukture podobne cevem. Skupine intenzivno proliferajočih celic C so povezane s celicami A. Ependimalne celice (E) tvorijo plast celic, ki ločujejo SVP od LV. Shema desno zgoraj predstavlja samoobnavljajoče se celice B, ki tvorijo prehodne, progenitorske, celice C, le-te pa tvorijo celice A. (Alvarez-Buylla in García-Verdugo, 2002)

2.2.1.3 Izolacija živčnih progenitorskih celic post-mortem

Možgansko tkivo *post-mortem* predstavlja velik potencialni vir nevroepitelijskih progenitorskih celic (NPC) za uporabo v raziskavah in terapevtskih aplikacijah kot alternativo predvsem etično vprašljivim pluripotentnim NMC, izoliranim iz zarodkov.

Raziskave so pokazale, da lahko NPC izolirane *post-mortem*, diferencirajo v živčne celice in glija celice centralnega živčnega sistema (Schwartz in sod., 2003). Najdaljši post-mortem interval, ki ga NPC še preživijo, je okoli dvajset ur. Dokazano vsebujejo tkiva mlajših donorjev več NPC, ki imajo tudi boljše sposobnosti proliferacije (Palmer in sod., 2001).

2.2.1.4 Nevroepitelijska celična linija HNSC.100

Celična linija HNSC.100 je stabilna, monoklonska celična linija, pozitivna na označevalce nestin, izpeljana iz človeških embrionalnih možganov. Celice se delijo približno na vsakih štirideset ur in zahtevajo prisotnost bFGF in EGF v gojišču. Če v gojišču ni prisotnih rastnih faktorjev, pride do spontane diferenciacije in povečanega izražanja označevalcev treh ključnih celičnih tipov v CŽS (živčne celice, astrociti, oligodendrocyti). Celične linije, pridobljene iz človeških NMC, so zaradi načina razmnoževanja, homogenosti in hitrejših delitev primernejše za celične in molekularne raziskave (Villa in sod., 2000).

2.2.2 Tumorske matične celice

Desetletja je veljalo prepričanje, da so tumorji posledica večstopenjskega procesa. Zaradi kopičenja genetskih napak se normalne, zdrave, človeške celice spremenijo v izredno maligne tvorbe. Dandanes pa vemo, da večina tumorjev izhaja iz ene same celice, ki je bila pod vplivom pogostih genetskih mutacij ali zaradi aneoplodij spremenjena v tumorsko matično celico (TMC) (Bjerkvig in sod., 2005). TMC predstavljajo izredno majhno populacijo celic, ki skupaj s progenitorskimi celicami izražajo podobne molekularne označevalce kot izvorna tkiva.

TMC je tumorska celica, ki ima sposobnost samoobnavljanja in se deli asimetrično. Ena hčerinska celica je maligna MC, druga pa je tumorska progenitorska celica, ki prispeva k fenotipski raznolikosti tumorja. Tekom napredovanja tumorjev se povečuje njihova genetska nestabilnost, zato so močno izpostavljene novim poškodbam (Reya in sod., 2001). Izvor TMC ni poznan, nastanejo pa lahko s fuzijo, horizontalnim prenosom genov ali fagocitozo. *In vitro* študije so pokazale, da TMC po transplantaciji tvorijo tumorje, ki vsebujejo TMC, ki je zmožna ustvariti heterogeno populacijo diferenciranih tumorskih celic (Bjerkvig in sod., 2005).

Rast tumorja je mogoča tudi zaradi interakcij TMC z mikrookoljem – nišo. Normalna niša vsebuje MC, progenitorske celice in podporne celice. Zaradi genetskih in epigenetskih

sprememb v MC se tvori TMC, kar vodi v ekspanzijo celic izven niše. Intenzivne delitve TMC prisilijo nišo, da sprejme prisotnost TMC v njej in dovoli spremembe v strukturi. Po rezultatih dosedanjih raziskav TMC nima lastne niše.

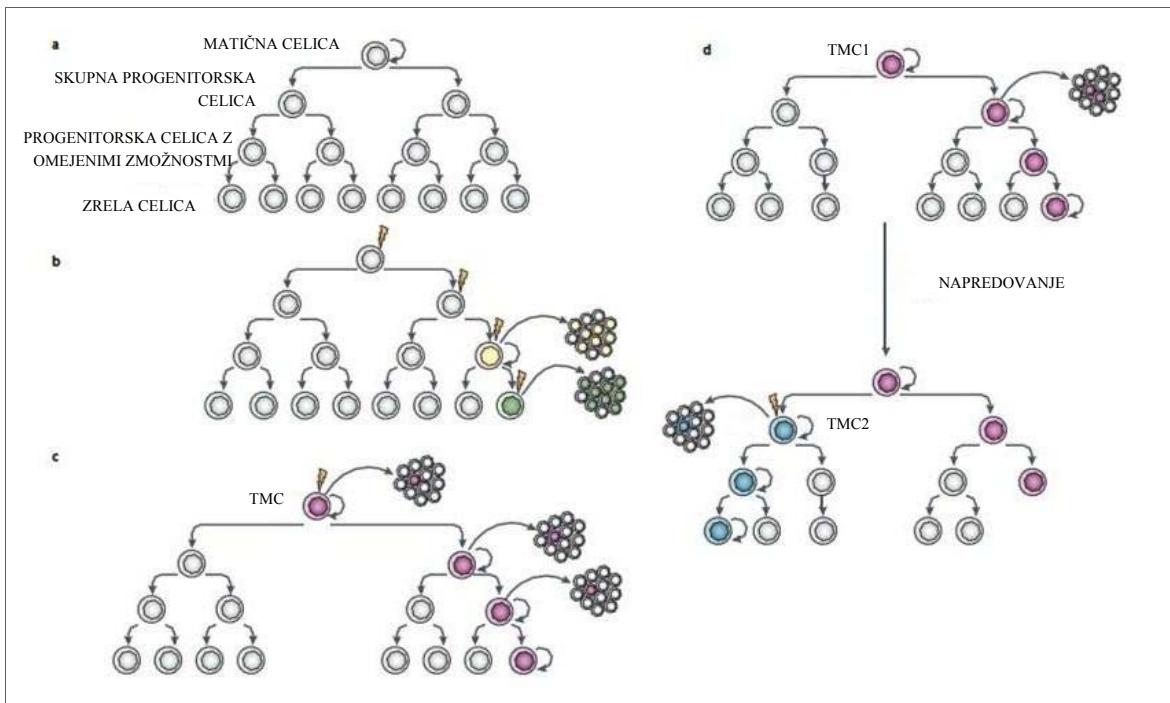
TMC so praviloma prisotne v izvornih tkivih. Tekom napredovanja tumorja lahko zaradi genetskih in epigenetskih mehanizmov nastane metastatska TMC, ki nato preide v krvni obtok in tvori sekundarne tumorje v oddaljenih organih. Metastatske TMC izražajo različne celične površinske označevalce (Visvader in Lindeman, 2008).

Med TMC in MC lahko potegnemo več vzporednic. Obe imata velik proliferacijski potencial in sposobnost tvorbe novih tkiv, ki so sestavljena iz različnih heterolognih celic, ki se razlikujejo v fenotipskih značilnostih in imajo različne sposobnosti proliferacije. Zadnje raziskave kažejo, da so TMC podvržene procesom, ki so podobni samoobnavljanju in diferenciaciji zdravih MC, saj so potomke TMC fenotipsko različne in imajo različne sposobnosti proliferacije (Reya in sod., 2001).

Signalne poti pri TMC še niso popolnoma pojasnjene. Dokazano pa je, da pri samoobnavljanju in proliferaciji TMC sodelujejo iste signalne poti kot pri istih procesih v MC: Wnt, Notch, Hedgehog in BMI1 signalne poti (Visvader in Lindeman, 2008).

Kot je vidno na spodnji sliki (slika 4), sta v veljavi dva modela, s katerima lahko razložimo heterogenost tumorjev in njihovo propagacijo. Sholastični model predpostavlja, da so tumorske celice heterogene, kljub temu pa bi lahko teoretično čisto vse bile osnova za nastanek tumorja. Na drugi strani hierarhični model zagovarja trditev, da obstaja majhna populacija celic, t. i. TMC, ki lahko intenzivno proliferirajo in vzdržujejo rast in napredovanje nove tvorbe (Vescovi in sod., 2006). Z vidika hierarhičnega modela lahko na tumor gledamo kot na celično gmoto, ki se začne z eno samo TMC, ki neomejeno proliferira, hkrati pa je podvržena stalnim mutacijam.

Najverjetnejša razloga razlik med sholastičnem in hierarhičnem modelom je, da tekom sholastičnega razvoja klonov tumorskih celic nekaj tumorskih celic razvije lastnosti podobne MC, vključno s samoobnavljanjem in multipotentnostjo. Medtem ko večina tumorskih klonov prezivi le v specializiranih nišah, matičnim celicam podobne celice rastejo v vseh nišah brez izjem, kjer se razvijajo po hierarhičnem modelu in glede na nišo izražajo oziroma ne izražajo markerjev, značilnih za matične celice (Bjerkvig in sod., 2009).

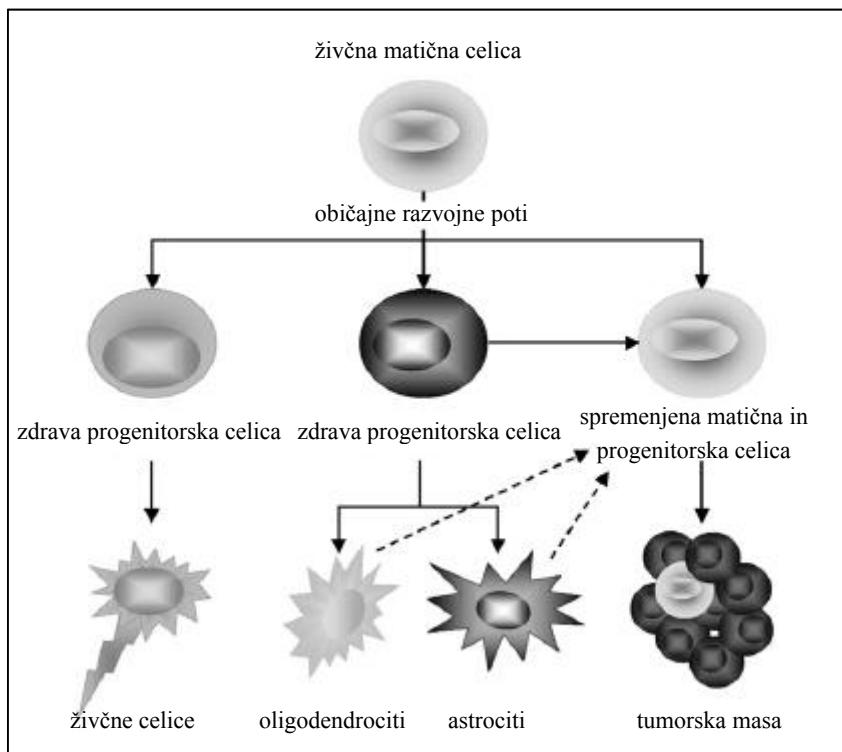


Slika 4: Modela tumorske heterogenosti in propagacije. (a) Normalna celična hierarhija. MC postopoma ustvari skupno progenitorsko celico z omejenimi zmožnostmi, ki so odgovorne za tvorbo vseh zrelih celic, ki se pojavijo v določenem tkivu. (b) Zagovorniki sholastičnega modela trdijo, da je vsaka nediferencirana celica zmožna ustvariti tumor. (c) Pri hierarhičnem modelu ima samo TMC zmožnost ustvariti tumor. (d) Oba modela sta osnova tumorogeneze. Rast tumorja vodi specifična TMC (TMC1). Tekom napredovanja tumorja se iz TMC1 zaradi dodatnih mutacij ali epigenetskih sprememb klonalno razvije TMC2, ki postane dominantna celica v tumorju in usmerja rast tumorja. (Visvader in Lindeman, 2008)

2.2.2.1 Možganske tumorske matične celice

Prvi dokazi, da so v možganskih tumorjih prisotne matične celice podobne celice, so bili objavljeni leta 2002 (Ignatova in sod., 2002). Kasneje so potrdili: da različni možganski tumorji vsebujejo transformirane, nediferencirane, živčne prekurzorje, ki se odzovejo na iste rastne faktorje kot NMC; tumorskim matičnim celicam podobne celice imajo nekatere molekularne značilnosti iste kot NMC; in da se lahko celični označevalec CD133 uporablja za obogatitev tumorskih matičnih celic podobnih celic (Singh in sod., 2003).

Izvor možganskih TMC ni popolnoma poznan. Najverjetnejne izhajajo možganske TMC iz transformiranih nediferenciranih prekurzorskih celic, katere sicer najdemo v vseh predelih možganov, kjer poteka nevrogeneza (Vescovi in sod., 2006). MC, ki so odgovorne za tvorbo malignih gliomov (slika 5), izvirajo iz preoblikovanih NMC ali pa NPC (Glantz in sod., 2009).



Slika 5: Izvor gliomov. Maligni gliomi izvirajo iz transformiranih NMC ali NPC, lahko pa sledijo temu procesu tudi oligodendroci in astrociti (Glantz in sod., 2009).

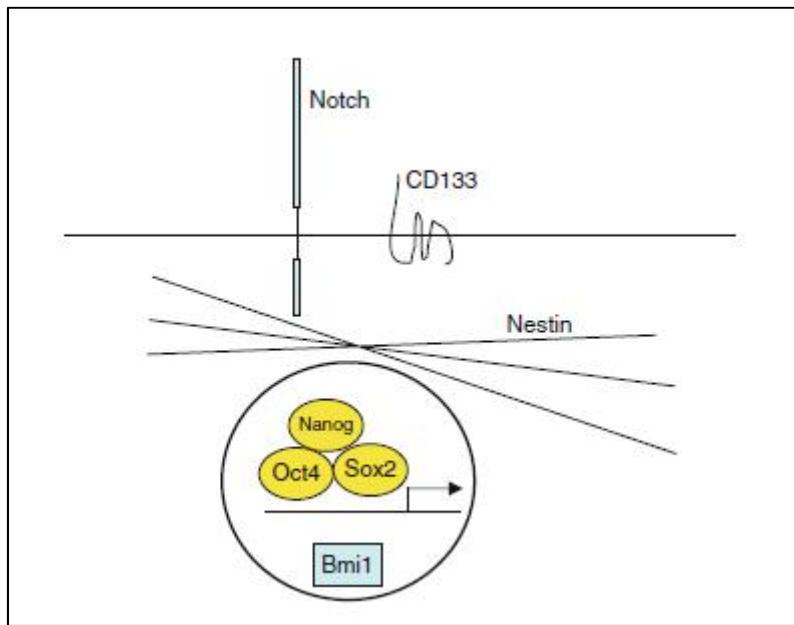
Pri bolnikih z gliomi je pogosto mesto nastanka glioma različno od mesta, kjer se tumor dejansko razvije. To lahko potrdimo s hipotezo, da se iz možganske TMC tekom asimetričnih delitev razvije še ena možganska TMC, ki ostane v SVP (Singh in sod., 2004b).

2.3 OZNAČEVALCI MATIČNIH IN TUMORSKIH MATIČNIH CELIC

Določevanje TMC je trenutno eden izmed največjih izzivov v razvoju selektivnih terapevtskih pristopov v zdravljenju tumorjev. Do sedaj so se največkrat uporabljali enaki pristopi kot pri določanju NMC, kar pa se je izkazalo kot neprimeren pristop, v kolikor bi že zeli primerjati TMC z NMC.

Preučujeta se dve skupini označevalcev. **Površinski celični označevalci** so uporabni predvsem za ločbo in obogatitev celične populacije tumorjev s pretočno citometrijo ali na magnetni koloni. Kot najobetavnejši površinski celični označevalci TMC veljajo Notch

receptorji (slika 6). **Znotrajcelični označevalci** pa se uporabljajo pri genetskih modelih, imunohistokemijskih raziskavah in nekaterih funkcionalnih/encimatskih raziskavah (Rich, 2009).



Slika 6: Označevalci možganskih tumorskih matičnih celic. CD133 je površinski celični označevalci, medtem ko so nestin, nanog, Oct4, Sox2 in Bmi1 znotrajcelični označevalci (Rich, 2009).

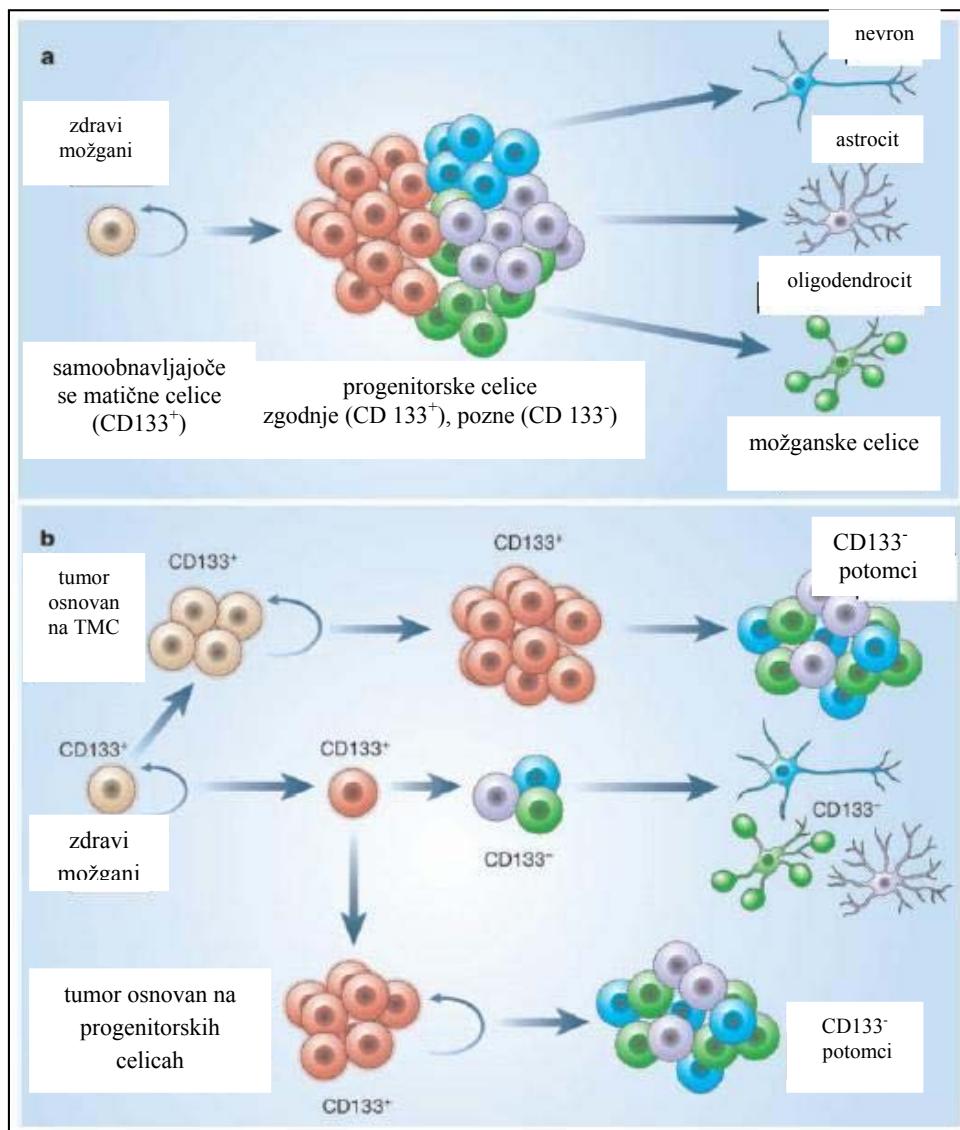
2.3.1 CD133 (prominin 1)

CD133 (prominin 1) je transmembranski glikoprotein, ki ga najdemo znotraj celične membrane med lipidnimi mikrodomenami. Velja za najbolj razvitega označevalca TMC, ki je izražen tudi na površini embrionalnih NMC, ependimalnih celicah odraslega in NMC odraslega (Rich, 2009). CD133 naj bi imel pomembno vlogo pri razvoju CŽS, sodeluje namreč pri angiogenezi (Wang in sod., 2007).

Kot je razvidno iz slike 7, v zdravih možganih NMC in zgodnje progenitorske celice izražajo CD133. Ravno tako so v možganskih tumorjih subpopulacije celic, ki izražajo CD133 (Clarke, 2004).

Vloga CD133 kot označevalca možganskih tumorskih matičnih celic je sporna (Wang in sod., 2007; Beier in sod., 2007). Ugotovljeno je bilo namreč, da tudi celice, negativne na CD133 lahko inducirajo rast tumorjev *in vivo* (Wang in sod., 2007). Hkrati pa CD133⁺

celice nimajo nujno zmožnosti samopodvojevanja in ne morejo tvoriti tumorjev *de novo* (Wa in sod., 2008).



Slika 7: Hierarhija možganskih celic (a) V zdravih možganih so MC CD133 pozitivne, njihove potomke so pa lahko CD133 pozitivne (zgodnje progenitorske celice) ali pa CD133 negativne (pozne progenitorske celice). Potomke slednjih so zrele možganske celice, ki so CD133 negativne. (b) Tumorji so lahko potomke ali CD133 pozitivnih možganskih MC ali mutiranih CD133 pozitivnih progenitorskih MC. Oba tipa TMC lahko oblikujeta CD133 negativne potomce, ki se ne morejo samoobnavljati in ne morejo tvoriti novega tumorja. (Clarke, 2004)

2.3.2 Sox2

Sox2 je transkripcijski faktor, član družine SRY-related-HMG-box. Vključen je v regulacijo embrionalnega razvoja in oblikovanju celične usode (Ellis in sod., 2004). Skupaj z Oct4 in Nanog tvori v MC transkripcijski kompleks, ki uravnava njihovo proliferacijo (Rich, 2009). Sox2 se izraža v embrionalnih MC in nevroepitelijskih celicah tekom razvoja (Suh in sod., 2007). Izraža se lahko pri vseh možganskih tumorjih nevroektodermalnega izvora, a najbolj je informativen za tumorje glijskega izvora (Phi in sod., 2008). Potrebno pa je upoštevati, da je število na označevalce pozitivnih celic znotraj tumorja variabilno, na Sox2 je tako pozitivnih med 6 % in 80 % celic (Gangemi in sod., 2009). Raven izražanja tega označevalca je premosorazmerna z malignostjo. Bolj kot je tumor maligen, večje je izražanje (Ma in sod., 2008). Pri GBM je pogosto hkratno izražanje Sox2 in označevalcev diferenciacije, kar je posledica načina razvoja GBM (Phi in sod., 2008).

2.3.3 Nestin

Nestin je tip VI intermediatnih filamentov. Vključen je v proces organizacije citoskeleta, vlogo ima pa tudi pri celičnem signaliziranju, organogenezi in celičnem metabolizmu (Strojnik in sod., 2007). Izražen je tekom razvoja CŽS, predvsem v nevralni cevi. Z višanjem diferenciacije se raven izražanja nestina niža, saj je zamenjan z živčnimi filamenti (Sugawara in sod., 2002). Sprva je veljal kot označevalec NMC, kmalu pa so potrdili tudi njegovo povečano izražanje v možganskih TMC. Genetski modeli dokazujejo, da je izražanje onkogenov pod nadzorom promotorja nestina. Med aktivacijo Notch signalne poti je raven nestina močno povečana. Tudi izražanje tega označevalca zelo variira tekom razvoja in diferenciacije MC, a več neodvisnih raziskav je pokazalo, da je povezano z malignostjo tumorja in posledično tudi stopnjo preživetja (Rich, 2009).

2.4 OZNAČEVALCI PREKURZORSKIH IN DIFERENCIRANIH CELIC

2.3.4 GFAP

GFAP kodira enega izmed najpomembnejših intermediatnih filamentnih proteinov v zrelih astrocitah. Uporablja se kot označevalec za ločevanje astrocitov od drugih glija celic tekom razvoja. GFAP sicer sodeluje pri citoskeletalni reorganizaciji, vzdrževanju mielizacije, celični adheziji in v signalnih poteh (Rutka in sod., 1997). Zmanjšano izražanje GFAP pri astrocitomih bi lahko bil le korak pri razvoju tumorja, a poskusi na modelnih organizmih

tega ne potrjujejo. Izražanje GFAP pri GBM variira, zato se domneva, da izražanje tega označevalca nima vpliva na napredovanje astrocitomov iz stopnje I v stopnjo IV. Presenetljivo pa GFAP pozitivne celice astrocitomov proliferirajo hitreje od GFAP negativnih celic. Kljub temu pa odstotnost GFAP ne pomeni hitrejšega napredovanja astrocitoma v razmerah *in vivo*. Tako lahko sklepamo, da izguba izražanja GFAP v astrocitomih ne vpliva na napredovanje tumorja, verjetneje je namreč, da vpliva na nediferencirane celice (Wilhelmsson in sod., 2003).

2.3.5 β -III-tubulin

β -III-tubulin je gen, ki kodira globularni protein. Je element mikrotubulov, ki skrbi za znotrajcelično organizacijo, transport veziklov in sodeluje pri delitvi celic. Izražen pa je v odraslih živčnih celicah centralnega in perifernega živčnega sistema (Katsetos in sod., 2009).

β -III-tubulin je izražen tudi v tumorskih celicah CŽS. Njegovo izražanje v gliomih narašča z malignostjo in posledično s stopnjo proliferacije, hkrati pa je odvisno od diferenciacije. V GBM in celičnih linijah GBM je β -III-tubulin povečano izražen. Vzrok za to je lahko posledica slabo diferenciranih, anaplastičnih celic, ki spominjajo na glijske prekurzorske celice in NMC, ali pa posledica tumorske ishemične nekroze. Domneva se, da je povečano izražanje β -III-tubulina v GBM povezano s tumorsko hipoksijo in oksidativnim stresom (Katsetos in sod., 2009).

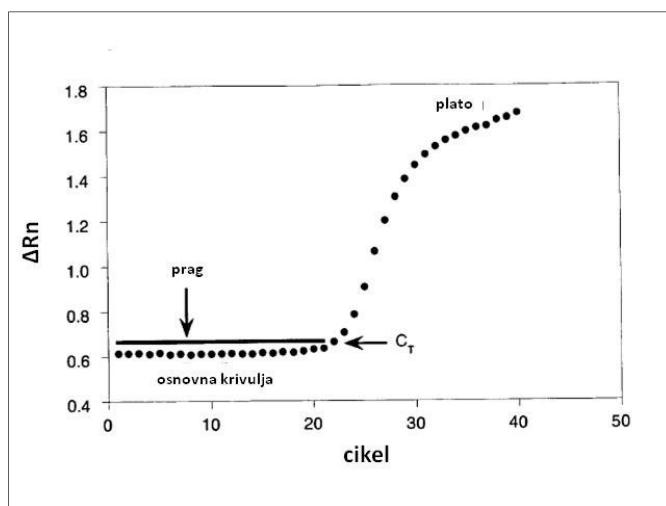
Ker je izražanje β -III-tubulina povečano v populacijah nevroplastičnih celic in ne v diferenciranih glijah celicah in ker je prisoten v vseh celicah, bi se lahko uporabil kot molekularna tarča pri zdravljenju GBM v prihodnosti (Katsetos in sod., 2003). V GBM so namreč prisotne spremembe v strukturi mikroskeleta.

2.5 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR) je nadgrajena klasična PCR reakcija, ki se uporablja za kvantitativno analizo DNA. Za kvantifikacijo DNA v vzorcu je potrebna hibridizacijska sonda, specifična za določen gen, ki je označena z dvema različnima fluorescentnima barviloma. Prvo služi kot reporter (FAM, tj. 6-karbksifluorescin), drugo, TAMRA (tj. 6-karboksi-tetrametilrodamin), pa kot inhibitor (Stratagene, 2004). Ko se tarčni fragment pomnoži, se hibridizacijska sonda razgradi ter odda fluorescentni signal, katerega intenzitetu spremlja senzor v cikličnem termostatu za PCR v realnem času. Več

kot je želene RNA v izhodnem vzorcu, več je cDNA in pomnožitev, posledično je signal, ki ga hibridizacijska sonda odda, večji. Hkrati pa se s tarčnim genom pomnožuje tudi hišni gen, ki nam omogoča normalizacijo rezultatov in primerjavo različnih vzorcev med seboj (Nolan in sod., 2006).

Program po končanem pomnoževanju izračuna vrednost ΔRn , ki je definirana kot razlika med Rn^+ (razmerje med intenziteto reporterja in intenziteto inhibitorja v vsakem trenutku reakcije) in Rn^- (razmerje med intenziteto reporterja in intenziteto inhibitorja v trenutku, ko poteka PCR amplifikacija). Na grafu, ki se izriše (slika 8), je ΔRn postavljen na ordinatno os, na abcisi pa je čas, ki je predstavljen kot število ciklov. Na začetku PCR amplifikacije so vrednosti ΔRn na osnovni krivulji. Hibridizacijska sonda se nato razgrajuje, intenziteta signala se povečuje, vrednosti ΔRn eksponentno rastejo, vse dokler ne dosežejo platoja. Med eksponentno fazo se teoretično količina DNA z vsakim cikлом podvoji. Ker vsi oligonukleotidni začetniki ne delujejo enako učinkovito, je potrebno za vsak tarčni in hišni gen ročno določiti prazni cikel, mesto, kjer lahko še predstavimo akumulacijo produkta z logaritemsko krivuljo. Mesto, kjer akumulacijska krivulja seka prag, je definirano kot C_t , vrednost, ki je obratno sorazmerna s količino tarče v izhodnem vzorcu (Heid in sod., 1996).



Slika 8: Primer grafične predstavitve po končanem PCR v realnem času. Mesto, kjer akumulacijska krivulja seka prag je definirano kot C_t . (Heid in sod., 1996)

Količino cDNA v vzorcih se nato določi s primerjavo vzorcev s standardno redčitveno vrsto. Tako imenovana absolutna kvantifikacija nam pove natančno število tarčnih molekul v vzorcu v primerjavi s standardom (Stratagene, 2004).

Da lahko primerjamo posamezne vzorce med seboj, moramo vrednosti še normalizirati, kar pomeni, da smo odšteli vrednost C_T hišnega gena od vrednosti C_T tarčnega gena v istem vzorcu. S tem pa hkrati izločimo napako zaradi različne količine in kvalitete izhodne RNA v različnih vzorcih (Stratagene, 2004).

2.5.1 Merjenje kvalitete in koncentracije RNA

Ker je RNA v primerjavi z DNA zelo nestabilna, je ocena kakovosti in količine nerazgrajene RNA v vzorcih zelo pomemben korak pri študijah genskega izražanja. Kvaliteto in količino RNA lahko določimo na več načinov. V preteklosti se je uporabljala predvsem denaturirajoča agarozna gelska elektroforeza, dandanes pa so v uporabi t. i. »lab-on-chip« metode, ki so hitrejše, natančnejše in zmogljivejše. Pri našem delu smo uporabili spektrofotometer Nanodrop z ustrezno programsko opremo.

Optična gostota vsakega vzorca je izmerjena pri dveh valovnih dolžinah: 260 nm in 280 nm. Po končanih meritvah program izračuna absorbanco vzorca (optično gostoto vzorca) pri določeni valovni dolžini po naslednji enačbi:

$$\text{absorbanca} = -\log \left(\frac{\text{intenziteta}_{\text{vzorec}}}{\text{intenziteta}_{\text{slepi vzorec}}} \right) \quad \dots(1)$$

Koncentracijo RNA v vzorcu je izračunana po Beer-Lambertovi enačbi:

$$c = \frac{A \cdot \varepsilon}{b} \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \right] \quad \dots(2)$$

Pri čemer predstavlja parameter c v enačbi 2 iskano koncentracijo, A absorbanco vzorca, ε ekstincijski koeficient (za RNA je vrednost 40 ng·cm/ μL), parameter b pa dolžino poti v centimetrih (običajna vrednost je 10 cm).

Program izračuna razmerje 260/280, ki je razmerje med absorbancama pri 260 nm in 280 nm, ki predstavlja oceno čistosti RNA. Pri čistih vzorcih RNA je ta vrednost približno 2,0. Nižja vrednost lahko pomeni prisotnost proteinov, fenolov in drugih kontaminantov, ki se bolje absorbirajo pri valovni dolžini 280 nm.

Čistost RNA se preverja tudi z razmerjem 260/230, ki je razmerje med absorbancama pri valovnih dolžinah 260 nm in 230 nm. Vrednost tega razmerja je pri čisti RNA praviloma višja kot vrednost razmerja 260/280. Običajno se vrednosti gibljejo med 1,8 in 2,2. Če je vrednost veliko nižja lahko to pomeni prisotnost drugih kontaminantov, ki se niso sprali med izolacijo RNA (Thermo Scientific, 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 CELIČNI MATERIALI

3.1.1 Vzorci glioblastomov

Vzorce glioblastomov smo pridobili z dovoljenjem bolnikov s Kliničnega oddelka za nevrokirurgijo UKC Ljubljana (akademik prof. dr. Vinko V. Dolenc, dr. med., višji svetnik in Seyed Yousef Ardebili, dr. med. spec. nevrokirurg). Za zbiranje vzorcev in študije na njih je bilo pridobljeno pozitivno mnenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. dovoljenja: 156/07/09, priloga A)

3.1.2 Patološki vzorci možganov

Vzorce subventrikularnih delov možganov, pridobljene po patološki raztelesbi, je prispevala prim. as. Jasna Šinkovec, dr. med. iz Službe za patomorfološko in citološko diagnostiko, Ginekološke klinike, UKC Ljubljana.

Za zbiranje vzorcev in študije na njih je bilo pridobljeno pozitivno mnenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. dovoljenja: 109, 204-6/10/07, priloga B)

3.1.3 Gliomske matične celice

CD133 pozitivne, ločene, matičnim celicam podobne celice, ki rastejo v obliki nevrosfer, je prispevala dr. Christel Claudia Herold – Mende z nevrokirurške klinike Univerzitetne klinike v Heidelbergu, Nemčija (Universitätsklinikum Heidelberg, Neurochirurgische Universität-Klinik).

3.1.4 Nevroepitelijska celična linija HNSC.100

Nevroepitelijsko celično linijo HNSC.100 smo pridobili s pomočjo NorLux Laboratories in Univerze v Bergnu, Norveška (prof. dr. Rolf Bjerkvig).

3.2 MATERIALI

3.2.1 Kemikalije in plastični pripomočki

Preglednica 2: Seznam uporabljenih kemikalij

KEMIKALIJA	PROIZVAJALEC	KATALOŠKA ŠTEVILKA
dimetyl sulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich	D2650
Trizol™	Gibco-Invitrogen	10296-028
kloroform	Sigma-Aldrich	C2432
etanol	Sigma-Aldrich	E7023
dietil pirokarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich	40718
tris pufer	Sigma-Aldrich	77-86-1
EDTA	Sigma-Aldrich	E7889
tripan blue	Sigma-Aldrich	93595
izopropanol	Sigma-Aldrich	I9516
PBS	PAA	37354

Preglednica 3: Seznam uporabljenih plastičnih pripomočkov

IME	PROIZVAJALEC
petrijevke premera 60 mm	Indigo
centrifugirke (15 mL, 50 mL)	Corning
plastične pipete (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL)	Corning
skalpeli	Indigo
TCT plošče (T25, T75)	Corning
plošče za neurosfere (T25)	Sarstedt
plošče za agarska gojišča (T75)	Sarstedt
plošče z 96 vdolbinicami za QPCR reakcijo	Nunc
mikrocentrifugirke	Eppendorf
najlonske membrane	BD
krio mikrocentrifugirke	Eppendorf
brizge	BD

3.2.2 Pripomočki in aparature

Preglednica 4: Seznam uporabljenih pripomočkov in aparatur

PRIPOMOČEK / APARATURA	PROIZVAJALEC
centrifuga	Eppendorf
brezprašna komora	Kambič
stresalnik	Vorteks
inkubator	Kambič
avtomatske pipete (0,5-10µL, 10-200µL, 100-1000µL)	Eppendorf
Pipetboy	Eppendorf
ciklični termostat za PCR	Applied Biosystems
ciklični termostat za PCR v realnem času ABI Prism® 7900Ht sequence detection system	Applied Biosystems
pH meter	Mettler Toledo
invertni svetlobni mikroskop	Olympus
elektroforeza	Uvi-tech
spektrofotometer	Nanodrop

3.2.3 Gojišča in dodatki gojiščem

Preglednica 5: Seznam uporabljenih osnovnih gojišč in dodatkov gojiščem

GOJIŠČE / DODATEK	PROIZVAJALEC	KATALOŠKA ŠTEVILKA	OPIS
DMEM™ high glucose	PAA	E15-883	DMEM™ high glucose je z D-glukozo (koncentracija 4,5 mg/L) obogateno DMEM™ gojišče, ki se uporablja za gojenje različnih sesalčjih celičnih linij. Sestavljen je iz aminokislin, vitaminov, anorganskih soli in barvila fenol rdeče.
Neurobasal™	Gibco-Invitrogen	21103-049	Neurobasal™ gojišče je prilagojeno gojenju nevronov CŽS. Celice ne potrebujejo astrocitnega hraničnega gojišča.
L-glutamine (Glu)	PAA	M11-004	L-glutamin, esencialna aminokislina, je dodatek gojiščem. Ker je temperaturno neobstojna, se jo dodaja gojiščem tik pred uporabo.
Penicillin/Streptomycin (PS)	PAA	P11-010	PS je dodatek gojiščem, ki učinkuje proti gram pozitivnim in gram negativnim bakterijam. Penicilin vpliva na sintezo celične stene, streptomycin pa inhibira biosintezo proteinov.
B27	Gibco-Invitrogen	0080085-SA	B27 je dodatek gojiščem, ki se uporablja za rast in ekspanzijo živčnih celic.
bFGF	Gibco-Invitrogen	PHG0266	bFGF je bioaktivni protein, ki se uporablja kot dodatek gojiščem. Vključen je v številne biološke procese, med drugim sodeluje tudi pri embrionalnem razvoju in diferenciaciji matičnih celic, pri diferenciaciji živčnih celic, preživetju in proliferaciji celic mezodermalnega ter nevroekto-, nevroendo- in nevromezodermalnega izvora.
EGF	Gibco-Invitrogen	PHG0315	EGF je dodatek gojiščem, ki vpliva na diferenciacijo celic, predvsem celic ektodermalnega in mezodermalnega izvora.
heparin	Sigma Aldrich	H3393-1MU	Heparin se v gojiščin uporablja kot antikoagulant.
Fetal bovine serum (FBS)	PAA	A11-501	Fetusni serum goveda je dodatek gojiščem, ki zagotavlja stabilnost rastnih faktorjev.
Non-essential amino acid solution (NEAA)	Sigma Aldrich	M7145	NEAA vsebuje 12 neesencialnih aminokislin.
Noble™ agar	Difco	214220	Noble™ agar je agar visoke čistosti (prisotnost nečistoč je manjša kot 2%).

Preglednica 6: Sestavine gojišča Neurobasal™ z dodatki

KOMPONENTA	ZALOŽNA KONCENTRACIJA	KONČNA KONCENTRACIJA	KONČNI VOLUMEN
Neurobasal™	1 x		48 mL
Glu I	2 mM	20 µM	500 µL
PS	100 x	1 x	500 µL
B27	50 x	1 x	1 mL
bFGF	25 µg/mL	20 ng/mL	40 µL
EGF	200 µg/mL	20 ng/mL	5 µL
Heparin	10 kU/mL	1 U/mL	5 µL
		skupni volumen	50 mL

Preglednica 7: Sestavine gojišča DMEM™ s serumom

KOMPONENTA	ZALOŽNA KONCENTRACIJA	KONČNA KONCENTRACIJA	KONČNI VOLUMEN
DMEM™ high glucose medium	1 x		45 mL
FBS	10 x	1 x	5 mL
PS	100 x	1 x	500 µL
Glu I	2 mM	20 µM	500 µL
NEAA	10 mM	400 µM	2 mL
		skupni volumen	53 mL

Preglednica 8: Sestavine gojišča DMEM™ brez dodanega serauma

KOMPONENTA	ZALOŽNA KONCENTRACIJA	KONČNA KONCENTRACIJA	KONČNI VOLUMEN
DMEM™ high glucose medium	1 x		48 mL
PS	100 x	1 x	480 µL
Glu I	2 mM	20 µM	480 µL
NEAA	10 mM	400 µM	1920 µL
		skupni volumen	50,88 mL

Preglednica 9: Sestavine gojišča za zamrzovanje

KOMPONENTA	KONČNA KONCENTRACIJA	KONČNI VOLUMEN
DMEM™ high glucose medium		35 mL
FBS	20%	10 mL
DMSO	10%	5 mL
	skupni volumen	50 mL

Preglednica 10: Sestavine gojišča DMEM™ za blokado tripsina

KOMPONENTA	KONČNA KONCENTRACIJA	KONČNI VOLUMEN
DMEM™ high glucose medium		9 mL
FBS	10%	1 mL
	skupni volumen	10 mL

Preglednica 11: Sestavine gojišča Neurobasal™ za blokado tripsina

KOMPONENTA	KONČNA KONCENTRACIJA	KONČNI VOLUMEN
Neurobasal™		9 mL
FBS	10%	1 mL
	skupni volumen	10 mL

3.2.4 Kompleti in označevalci

Preglednica 12: Uporabljeni kompleti in molekularni označevalci

KOMPLET / OZNAČEVALEC	PROIZVAJALEC	KATALOŠKA ŠTEVILKA
komplet za reverzno transkripcijo	Applied Biosystems	4368814
komplet za preamplifikacijo	Applied Biosystems	4384266
komplet za PCR v realnem času	Applied Biosystems	4304437
komplet za inaktivacijo DNaz	Promega	M610A
GADPH	Applied Biosystems	4310884E
SOX2	Applied Biosystems	HS01053049S1
TUBB3	Applied Biosystems	HS00801390S1
NESTIN	Applied Biosystems	HS00707120S1
CD133 / PROMININ	Applied Biosystems	HS00195682M1
GFAP	Applied Biosystems	HS00157674M1

3.2.5 Priprava z agarjem prevlečenih plošč za gojenje tumorskih sferoidov v suspenziji

Natehtali smo 1,8 g Noble™ agarja in ga prenesli v sterilno steklovino. Dodali smo 60 mL sterilne vode in ga raztopili v mikrovalovni pečici. V vodni kopeli smo ga počasi ohladili do 42 °C, nato pa dodali 150 mL gojišča DMEM™ z ali brez seruma. V vsako T75 ploščo smo dali po 20 mL agarja in ohladili v brezprašni komori. Tako pripravljene plošče smo do uporabe zaprte hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.3 METODE

3.3.1 Manipulacija s celičnimi materiali

3.3.1.1 Manipulacija z vzorci glioblastomov

Vzorec biopsije smo v brezprašni komori sterilno prenesli v petrijevko in razrezali s skalpelom na čim manjše koščke. Sproti smo po kapljicah dodajali gojišče, da se vzorec ni izsušil. Tako pripravljen vzorec smo resuspendirali v 5 mL gojišča za sferoide. Tkivno suspenzijo smo prenesli v centrifugirko in centrifugirali 3 minute pri 1200 obratov na minuto (RPM). Odstranili smo supernatant, resuspendirali pelet v gojišču DMEM™ z ali brez seruma in nasadili na z agarjem prevlečene plošče za gojenje sferoidov v suspenziji.

Po približno 8 dneh (odločali smo se glede na velikost sferoidov – želeni povprečni premer sferoidov v suspenziji je bil med 100 in 150 µm) smo prenesli suspenzijo s sferoidi v centrifugirko in počakali, da so se sferoidi posedli. Odstranili smo supernatant ter sferoide resuspendirali v svežem DMEM™ gojišču in nasadili na novo z agarjem prevlečeno ploščo.

Po približno dveh tednih smo prenesli sferoide v centrifugirko, počakali, da so se posedli in nato odstranili supernatant. Resuspendirali smo jih v 1 mL medija za zamrzovanje, jih prenesli v krio mikrocentrifugirko in zamrznili pri -80 °C do nadaljnje uporabe.

3.3.1.2 Manipulacija s patološkimi vzorci možganov

Tkivo smo najprej mehansko razgradili, tako da smo ga razrezali na čim manjše koščke. Nato smo izvedli encimsko razgradnjo z raztopino 0,025 % tripsin-EDTA (400 µL tripsin-EDTA in 7600 µL dH₂O). Celično suspenzijo smo centrifugirali in odstranili supernatant. Dodali smo tripsin in premešali z 10 mL pipeto. Celično suspenzijo smo prenesli v petrijevko premera 60 mm, jo zlepili s parafilmom in stresali 15 minut na stresalku v inkubatorju na 37 °C. Encimsko razgradnjo smo ustavili z dodatkom 8 mL gojišča DMEM™ z 12 % FBS (7920 µL DMEM™ in 80 µL FBS). Dodali smo tudi 10 µL DNase in nato filtrirali preko najlonske membrane (premer por je bil 25µm). Suspenzijo smo centrifugirali 10 minut pri 300 g, odstranili supernatant in resuspendirali pelet v 1 mL gojišča Neurobasal™ z dodatki, celice pa nasadili na ploščo in jih gojili v inkubatorju na 37 °C in 5 % CO₂.

Primerno velike sfere (premer med 100 in 150 µm) smo odpipetirali v centrifugirko, pustili 15 minut, da so se posedle, odstranili staro gojišče, dodali svežega in prenesli na novo ploščo.

Pritrjene sfere na dnu smo sprali z 10 % raztopino PBS in tripsinizirali 5 minut v inkubatorju na 37 °C. Nato smo dodali 5 mL gojišča Neurobasal™ brez dodatkov, prenesli celično suspenzijo v centrifugirko, centrifugirali, odstranili supernatant in resuspendirali v 1 mL medija. Celice smo prešteli in nasadili približno 800 000 celic v 15 mL gojišča Neurobasal™ z dodatki na T75 ploščo.

3.3.1.3 Manipulacija s gliomskimi matičnimi celicami

Vzorce smo odmrznili, dodali gojišče brez dodatkov, centrifugirali pri 300 g in 10 °C 10 minut. Supernatant smo odstranili, pelet pa sprali s PBS. Ponovno smo centrifugirali in nato resuspendirali pelet v gojišču DMEM™ z dodatki in nasadili celice na posebne, neprevlečene plošče T25.

Ko so bile nevrosfere dovolj velike, smo jih razsadili. Celično suspenzijo smo prenesli v centrifugirko, ploščo pa sprali z gojiščem brez dodatkov. Centrifugirali smo 5 minut pri 300 g in 10 °C, odstranili gojišče in dodali 1,5 mL tripsina. Po 3 minutah smo encimsko reakcijo ustavili z 1,5 mL gojišča DMEM™ z 10% FBS. Celično suspenzijo smo centrifugirali pri 300 g in 10 °C 5 minut. Supernatant smo odstranili, pelet pa resuspendirali v 1 mL gojišča DMEM™ brez dodatkov. Celice smo prešteli s pomočjo hemocitometra Buerker-Tuerk in nasadili v gojišču DMEM™ z dodatki na nove plošče.

3.3.1.4 Manipulacija s celično linijo HNSC.100

Celično linijo smo odmrznili med prsti. Nato smo prenesli suspenzijo v centrifugirko, dodali gojišče Neurobasal™ z dodatki, centrifugirali pri 300 g 5 minut. Supernatant smo odstranili, pelet pa sprali s PBS in nasadili celice na posebne, neprevlečene plošče T25.

Dovolj velike neurosfere smo razsadili. Celično suspenzijo smo prenesli v centrifugirko, ploščo pa sprali z gojiščem brez dodatkov. Centrifugirali smo 5 minut pri 300 g, odsesali medij in dodali 1,5 mL tripsina, ki smo ga po 3 minutah blokirali z 1,5 mL gojišča Neurobasal™ z 10 % FBS. Sledilo je centrifugiranje pri 300 g 5 minut. Supernatant smo odstranili, pelet pa resuspendirali v 1 mL gojišča Neurobasal™ brez dodatkov. Celice smo prešteli s pomočjo hemocitometra Buerker-Tuerk in nasadili v gojišču Neurobasal™ z dodatki na nove plošče, in sicer približno 1 000 000 celic na ploščo.

3.3.1 Izolacija RNA

Izolacijo RNA smo izvedli s Trizolom, ki omogoča izolacijo RNA visoke kvalitete, primerne za nadaljnjo uporabo tudi za qPCR.

Celično suspenzijo smo prenesli v centrifugirko, ploščo pa sprali z gojiščem brez dodatkov. Centrifugirali smo 2 minuti pri 300 g. Supernatant smo odstranili in peletu dodali 500 µL Trizola ter dobro resuspendirali. Mikrocentrifugirke z vzorci smo do nadaljnje obdelave shranili pri -80 °C.

Odmrznjenim vzorcem smo dodali kloroform (1/5 volumna Trizola) in 8 µL glikogena (založna koncentracija 2 mg/mL), dobro premešali in inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje 15 minut pri 12000 g in 4 °C. Vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko. Dodali smo ji 500 µL izopropanola, dobro premešali in shranili na -20 °C čez noč.

Kulture smo nato odmrznili in centrifugirali pri 4 °C in 12000 g 10 minut. Pelet smo večkrat sprali s 500 µL 75 % etanola. Med posameznimi spiranji smo centrifugirali 5 minut pri 7500 g in 4 °C. Pelet smo posušili na zraku in suhega resuspendirali v 15 µL DEPC vode. Dobro zaprte mikrocentrifugirke smo inkubirali pri 60 °C 30 minut oziroma, dokler niso bili več vidni ostanki peleta.

Da bi razgradili eno- in dvojerižno verigo DNA smo dodali encim DNazo, ki smo jo pripravili po navodilih proizvajalca (Promega). 8 µL RNA, raztopljene v vodi, smo dodali po 1 µL 10x reakcijskega pufra za DNazo brez RNaz in RQ1 DNazo ter 1 µL DEPC vode. Sledila je 30 minut inkubacija pri 37 °C. Z dodatkom 1 µL RQ1 DNase Stop Solution smo ustavili reakcijo. Nato smo inkubirali pri 65 °C 10 minut, da smo inaktivirali DNaze.

Količino in kvaliteto RNA smo preverili spektrofotometrično s spektrofotometrom Nanodrop pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm, pri tem pa smo porabili le 1 µL vzorca, kot slepi vzorec pa smo uporabili DEPC vodo.

Pred nadaljnjo uporabo smo vzorce RNA redčili z DEPC vodo. Želena koncentracija je bila 1 mg/µL.

3.3.2 Reverzna transkripcija

Za reverzno transkripcijo smo uporabili komplet za reverzno transkripcijo, proizvajalca Applied Biosystems, ki smo ga pripravili po priloženih navodilih. Najprej smo pripravili reakcijsko zmes: v mikrocentrifugirki smo zmešali 2,5 µL 10x RT Buffer, 1 µL 25x dNTP mixture, 2,5 µL 10x Random Primers, 1,25 µL Multi scribe RT (50 U/µL), 1,25 µL Rnase inhibitor (20 U/µL) in 4 µL DEPC vode. Nato smo reakcijski mešanici dodali 12,5 µL RNA. Vzorce smo dobro premešali, centrifugirali in dali v ciklični termostat in izvedli PCR po naslednjem programu:

- začetna denaturacija: 10 minut pri 25 °C
- pomnoževanje: 2 uri pri 37 °C
- hlajenje: ∞ pri 4 °C

3.3.3 Preamplifikacija genov z nizkim izražanjem

Preamplifikacijo genov z nizkim izražanjem smo izvedli s preamplifikacijskim kompletom (Applied Biosystems), ki se uporablja za povečanje količine specifične cDNA tarče za analizo izražanja genov.

V mikrocentrifugirki smo si najprej pripravili kombinacijo ekspresijskih sistemov: zmešali smo po 15 µL beta-III-tubulina, CD133, GFAP in nestina, ter dodali 675 µL 1x TE. Nato smo si pripravili preamplifikacijsko mešanico. V mikrocentrifugirki smo zmešali 12,5 µL PreAmp reakcijsko mešanico 2x, 7 µL kombinacije ekspresijskih sistemov in 3,5 µL DEPC vode. Mešanico smo dobro premešali in centrifugirali 15 sekund. V vsako mikrocentrifugirko smo dodali 2 µL cDNA, dobro premešali in centrifugirali. Klasični PCR je potekal na cikličnem termostatu po naslednjem programu:

- začetna denaturacija: 10 minut pri 95 °C
- pomnoževanje: 14 ciklov 95 °C, 15 sekund 60 °C
- hlajenje: ∞ pri 4 °C

Pred nadaljnjo uporabo smo preamplificirane vzorce redčili (4 µL preamplificirane cDNA smo dodali 10 µL DEPC vode).

3.3.4 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času

Najprej smo si pripravili reakcijsko mešanico po navodilih proizvajalca Applied Biosystems. V mikrocentrifugirki smo zmešali 5 µL reakcijske mešanice, 0,5 µL GeneExpAssay, 0,5 µL označevalca GAPDH in 3 µL DEPC vode ter centrifugirali. V vsako jamico plošče smo dali najprej 9 µL reakcijske mešanice, nato pa dodali 1 µL vzorca oziroma ustrezeno redčino standarda. Za slepe vzorce smo uporabili 1 µL DEPC vode. Ploščo smo pokrili s folijo, premešali in centrifugirali.

qPCR je potekal po naslednjem programu:

- 2 minuti pri 50 °C
- 10 minut pri 95 °C
- 46 ciklov po 1 minuto pri 60 °C

Po končanem qPCR smo s pomočjo programa obdelali rezultate.

3.3.5 Preverjanje kontaminacije RNA z agarozno gelsko elektroforezo

Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverili prisotnost DNA v vzorcih. Uporabili smo 1,6 % agar, ki smo ga pripravili tako, da smo raztopili 1,28 g agarja v 80 mL 1x TAE (Tris-acetat-EDTA) pufru, ter ga raztopili v mikrovalovni pečici. Prelili smo ga v kalup za elektroforezo in pustili, da se je strdil. Medtem smo pripravili vzorce. V mikrocentrifugirki smo zmešali 2 µL posameznega vzorca RNA, 1 µL inhibitorja RNaz in 2 µL 6x 'Loading RNA Solution'. 3 µL RNA standarda smo v mikrocentrifugirko dodali 2 µL 6x 'Loading RNA Solution'. Kot barvilo smo uporabili etidijev bromid, in sicer 1 µL za vsak vzorec/standard.

Po nanosu vzorcev v jamice gela smo v posodo nalili TAE pufer in priključili sistem na napetost, in sicer 5 V/cm gela. Agarozno gelsko elektroforezo smo prekinili po pol ure, gel obsvetlili z UV svetlobo ter naredili posnetek.

3.3.6 Statistična analiza rezultatov

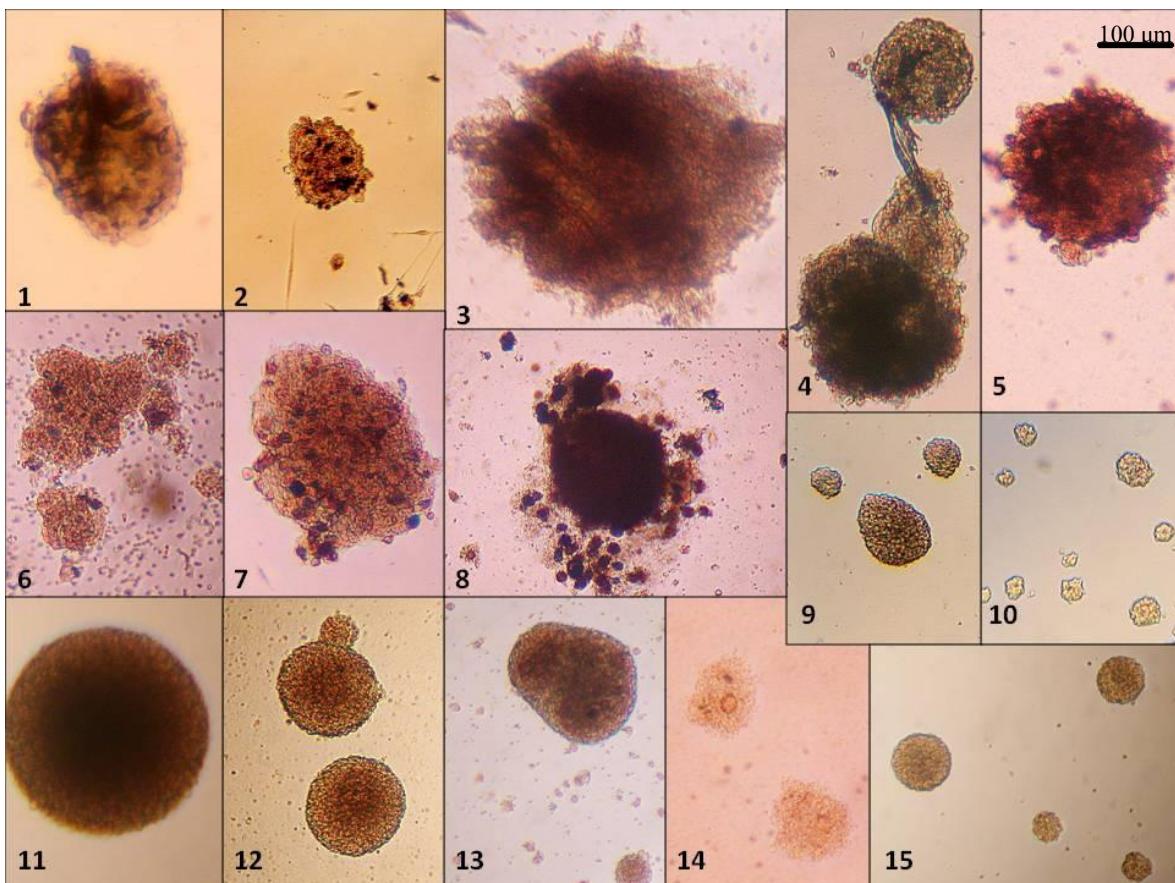
Rezultate qPCR smo najprej obdelali s programom Microsoft Office Excel 2007. Izračunali smo aritmetične sredine izražanja in standardni odklon. Statistično primerjavo ravni izražanja označevalcev med celično linijo HNSC.100 in posameznimi skupinami označevalcev (GBM brez serum, GBM s serumom, nevroepiteljske matične celice,

gliomske matične celice) smo izvedeli s Studentovim t-testom dveh neodvisnih vzorcev. Najprej smo postavili ničelno in alternativno domnevo. Ničelna domneva je bila, da je izražanje posameznega označevalca znotraj posameznih skupin vzorcev enako izražanju označevalca pri celični liniji HNSC.100. Alternativna domneva pa se je glasila, da izražanje posameznega označevalca znotraj posameznih skupin ni enako izražanju označevalca pri celični liniji HNSC.100. O statistično značilnih rezultatih govorimo takrat, ko je izračunana p-vrednost nižja od 0,05. Takrat zavrnemo ničelno domnevo v korist alternativne domneve ob predpostavki, da je porazdelitev sprejemljivke normalna. V našem primeru to pomeni, da se izražanje označevalca znotraj posameznih skupin razlikuje od izražanja označevalca pri celični liniji HNSC.100. Izračunane vrednosti smo preverili tudi s statističnim programoma Statistica 9.0 in R 2.10.1.

Za vse vzorce smo preverili tudi Pearsonov koeficient korelacije, ki je ocena mere povezanosti. Zanimalo nas je ali so sprejemljivke (v našem primeru so to označevalci) znotraj skupin vzorcev povezane. Najprej smo s pomočjo programa R 2.10.1 izrisali matriko razsevnih diagramov, ki prikazuje (ne)linearnost povezave med izražanjem dveh označevalcev. Nato smo postavili ničelno in alternativno domnevo. Ničelna domneva se je za vse označevalce glasila, da ni povezave med izražanjem posameznih označevalcev znotraj skupin vzorcev, alternativna pa, da obstaja povezava med izražanjem posameznih označevalcev.

4 REZULTATI

4.1 RAST IN MORFOLOGIJA CELIČNIH KULTUR



Slika 9: Pregled gojenih celičnih kultur pri 40x povečavi (1) GBM NIB51 brez seruma (2) GBM NIB51 (3) GBM NIB52 brez seruma (4) GBM NIB52 (5) GBM NIB53 (6) GBM NIB54 (7) GBM NIB55 (8) GBM NIB60 (9) gliomske matične celice NCH 421k (10) gliomske matične celice NCH 644 (11) nevroepitelijske matične celice US FB1 A1/1 (12) nevroepitelijske matične celice US FB4 (13) nevroepitelijske matične celice US FB6 (14) nevroepitelijske matične celice US F217 (15) nevroepitelijska celična linija HNSC.100

4.1.1 Vzorci glioblastomov

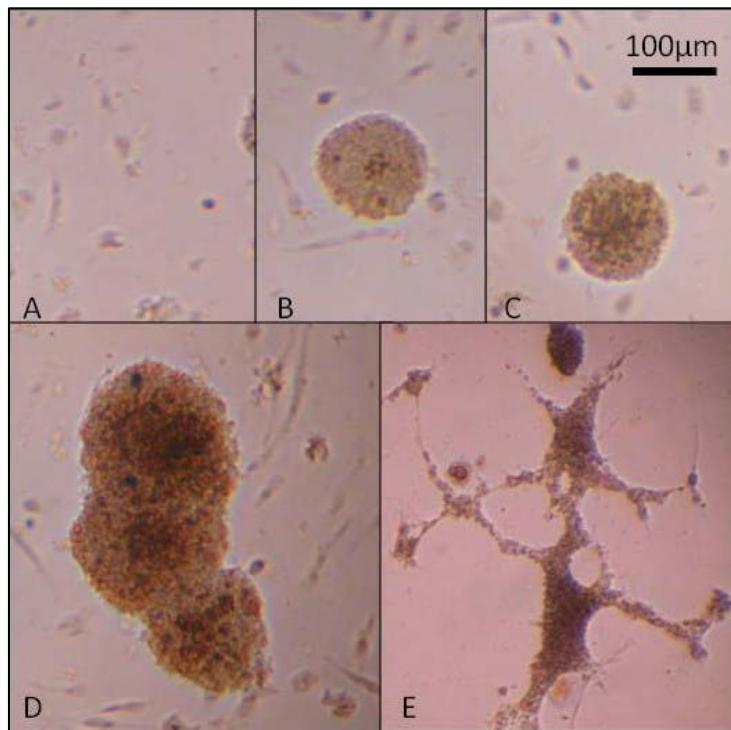
Posamezne vzorce glioblastomov smo gojili v gojišču z ali brez dodanega serumata (slika 9). V celični kulturi z gojiščem z dodanim serumom so se hitreje oblikovali sferoidi, njihova gostota je bila večja, ravno tako je bilo prisotnega več debrija. Sferoidi v gojiščih s serumom so bili številčnejši, pravilnejših oblik in večji. V celičnih kulturah v gojiščih brez serumata so pogosteje skupki celic prešli skozi agar in se pritrudili na dno plošč. Sferoidi v

gojišču brez seruma so bili v povprečju dovolj veliki za nadaljnjo uporabo od 10 do 14 dni kasneje v primerjavi s sferoidi, gojenimi v gojišču z dodanim serumom.

4.1.2 Patološki vzorci možganov

Iz pridobljenih celic patoloških vzorcev možganov so se različno hitro oblikovale nevrosfere (odvisno od količine izhodnega materiala in predela možganov) (slika 10), ki so se pri okoli 80 % konfluentnosti začele pritrjevati na dno plošče. Nevrosfere so se hitro odzivale na spremembe v gojišču, zato smo jim večkrat dodali oziroma zamenjali medij. V nasprotnem primeru so se nevrosfere ravno tako pritrdile na dno (slika 10E).

Tudi po encimatskem razbitju nevrosfer so si celice kmalu opomogle in v roku 96 ur začele oblikovati nove nevrosfere.



Slika 10: Rast nevrosfer iz patoloških vzorcev možganov pri 40x povečavi (A) Posamezne celice so se delile, dokler niso nastale večje nevrosfere s premerom okoli 100 µm, ki so postopoma od notranjosti proti zunanjemu robu postajale temnejše (B, C). V naslednji stopnji rasti so se pričele združevati nevrosfere med seboj (D), vse dokler se niso pritrdile na dno in »razlezle« (E).

4.1.3 Gliomske matične celice

Gliomske matične celice so rasle v obliki nevrosfer (slika 9). Gojišče smo osvežili vsakih 3–4 dni z 2 ml svežega gojišča. V kolikor so nevrosfere presegle konfluentnost, so se rezlezle po podlagi tudi posebnih plošč za nevrosfere. Po encimatskem razbitju so se v roku 48 ur začele tvoriti nove nevrosfere.

4.1.4 Celična linija HNSC.100

Celična linija HNSC.100 je rasla v obliki nevrosfer (slika 9), celice so dosegle konfluentnost v od dveh do treh dneh, v tem času so nevrosfere dosegle premer od 100 do 120 μm . Tudi na dno običajnih TCT plošč se niso pritrjevale v kolikor smo celični kulturi redno osveževali medij.

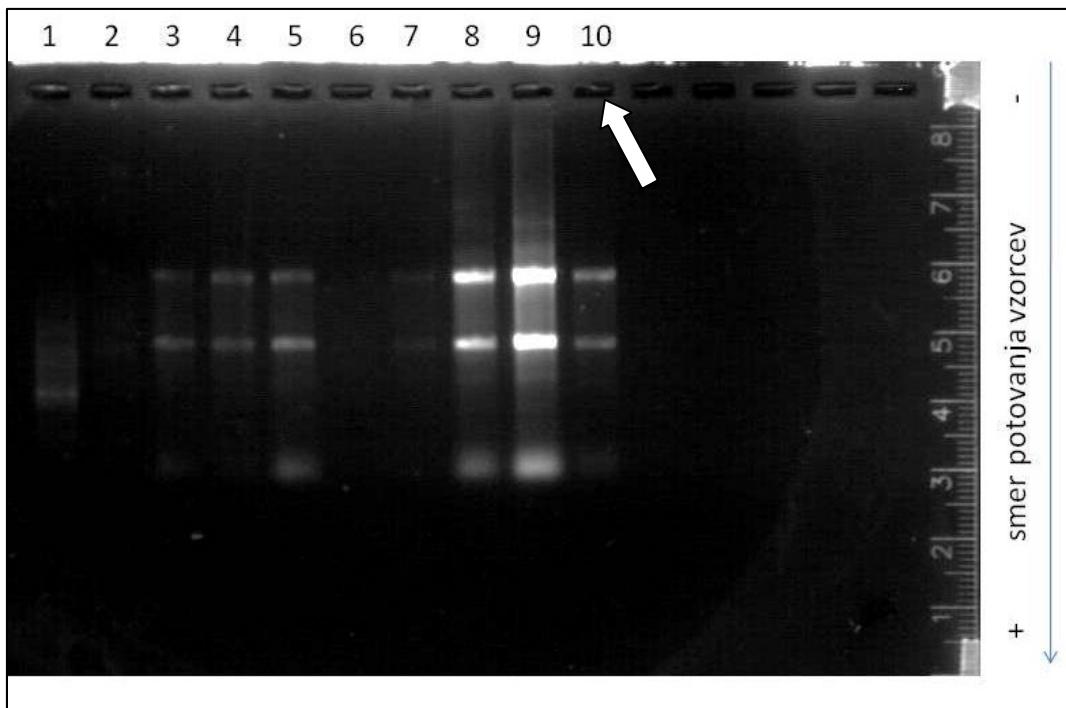
4.2 MERJENJE KONCENTRACIJE IN OCENA ČISTOSTI IZOLIRANE RNA

Preglednica 13: Koncentracija in kvaliteta izolirane RNA

SKUPINA	VZOREC	KONCENTRACIJA (ng/ μL)	A260	A280	260/280	260/230
celična linija HNSC	HNSC.100 p+1	885,78	22,14	11,52	1,92	2,11
celična linija HNSC	HNSC.100 p+4	308,6	7,72	4,17	1,85	2,14
GBM brez serumu	NIB51 brez serumu	229,47	5,74	3,16	1,82	1,41
GBM brez serumu	NIB52 brez serumu	91,51	2,29	1,29	1,78	1,19
GBM s serumom	NIB51	543,61	13,59	8,29	1,64	1,37
GBM s serumom	NIB52	120,07	3,00	1,66	1,81	1,32
GBM s serumom	NIB53	111,41	2,79	1,54	1,81	1,48
GBM s serumom	NIB54	84,43	2,11	1,11	1,90	1,57
GBM s serumom	NIB55	209,30	5,23	2,80	1,87	1,74
GBM s serumom	NIB60	124,02	3,10	1,60	1,93	1,42
nevroepitelijske matične celice	US FB1 A1/1 p2	141,89	3,55	2,20	1,61	1,27
nevroepitelijske matične celice	F217/09 BG1	28,33	0,71	0,43	1,65	1,13
nevroepitelijske matične celice	US FB4	297,20	7,43	3,58	2,08	1,60
nevroepitelijske matične celice	US FB6	281,98	7,05	3,446	2,05	1,34
gliomske matične celice	NCH 421K p+5	854,19	21,36	11,25	1,90	2,11
gliomske matične celice	NCH 421K p+6	800,73	20,02	10,48	1,91	2,02
gliomske matične celice	NCH 644 p+3	837,58	20,94	11,16	1,88	2,12
gliomske matične celice	NCH 644 p+5	2062,43	51,56	26,50	1,95	2,20

V preglednici 13 so osenčena razmerja 260/280 in 260/230, ki odstopajo od želene vrednosti 1,8.

4.3 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA



Slika 11: Slika gela po končani agarozni gelski elektroforezi. Gel je bil barvan z etidijevim bromidom. V žepek 1 je bil nanešen DNA standard, žepek 2 RNA standard, v žepke od 3 do 10 pa naključni vzorci RNA. S puščico je označen eden izmed praznih žepkov. Sodeč po praznih žepkih lahko sodimo, da naši vzorci niso bili kontaminirani s fragmenti genomske DNA.

4.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

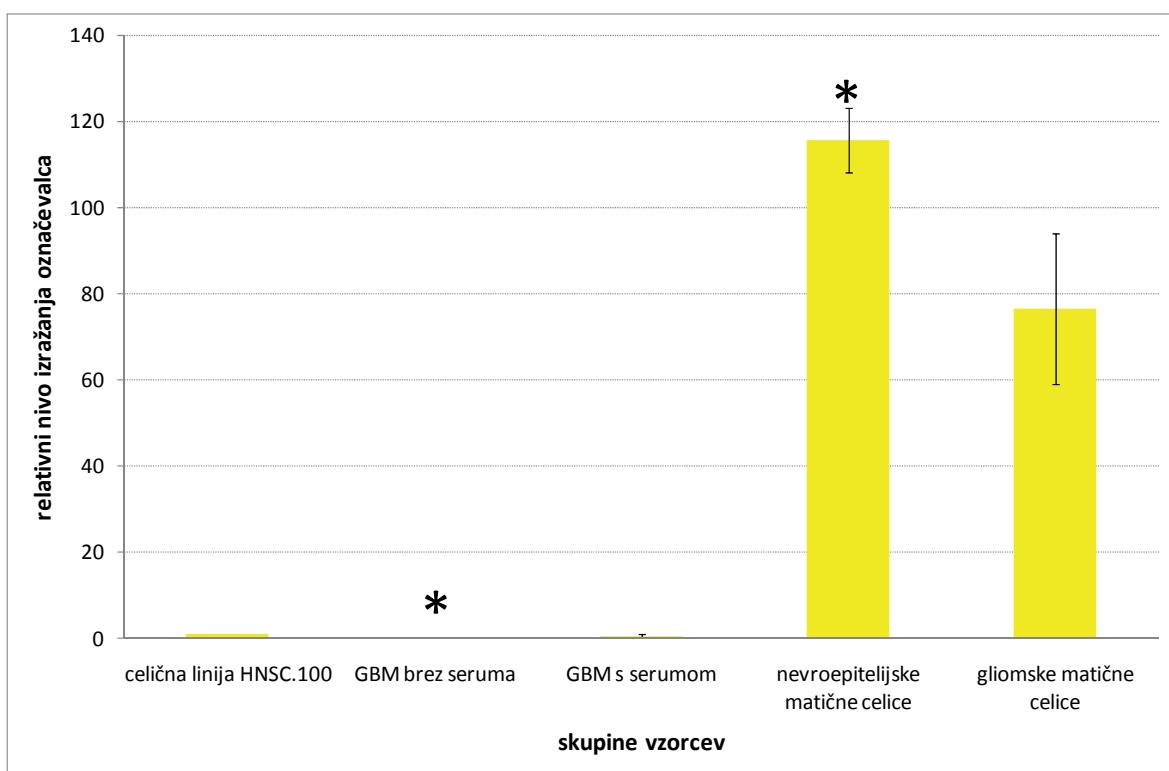
Preglednica 14: Pregled relativnih ravni izražanja označevalcev po vzorcih

SKUPINA	VZOREC	CD133	Sox2	nestin	GFAP	β -III-tubulin
celična linija HNSC	kontrola (HNSC.100)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
GBM brez serumu	GBM NIB51 brez serumu	0,005	0,486	912,488	1673,167	0,861
GBM brez serumu	GBM NIB52 brez serumu	0,049	0,248	0,061	10559,014	0,732
GBM s serumom	GBM NIB51	0,002	0,466	0,056	2487,113	0,514
GBM s serumom	GBM NIB52	1,189	0,232	0,081	5508,193	0,441
GBM s serumom	GBM NIB53	0,754	1,245	3733,742	N/A	0,569
GBM s serumom	GBM NIB54	0,000	0,037	0,007	71,640	0,227
GBM s serumom	GBM NIB55	467,358	3824,619	N/A	N/A	4,530
GBM s serumom	GBM NIB60	N/A	0,491	N/A	N/A	N/A
nevroepitelijske matične celice	US FB1 A1/1 p2	17,119	3,967	0,557	904,304	N/A
nevroepitelijske matične celice	US FB4	120,983	25,591	N/A	N/A	72543,388
nevroepitelijske matične celice	US FB6	110,292	13,087	62,393	N/A	128949,576
nevroepitelijske matične celice	F217/09 BG1	9,569	2,415	0,211	17138,848	2,282
gliomske matične celice	NCH 421k p+5	12,116	2,376	0,458	3,055	0,627
gliomske matične celice	NCH 421k p+6	88,937	1,325	42,185	8373,723	380335,347
gliomske matične celice	NCH 644 p+3	64,246	1,151	0,025	1330,855	66966,386
gliomske matične celice	NCH 644 p+5	2,664	1,422	0,008	527,830	0,240

V preglednici 14 so z N/A označeni vzorci, pri katerih se nista pomnoževala hišni oziroma tarčni gen.

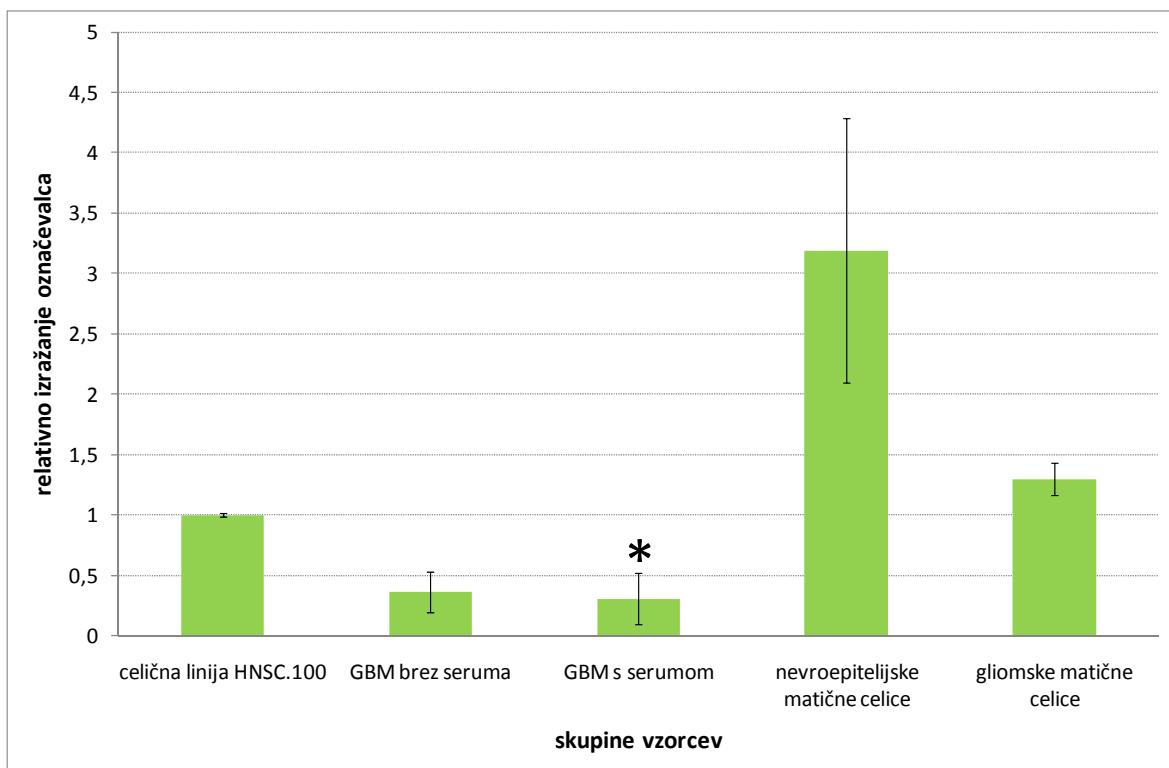
Preglednica 15: Pregled relativnih nivojev izražanja molekularnih označevalcev po skupinah vzorcev

vzorec	CD133	Sox2	nestin	GFAP	β -III-tubulin
celična linija HNSC.100	$1,000 \pm 0,011$	$1,000 \pm 0,014$	$1,000 \pm 0,022$	$1,003 \pm 0,118$	$1,000 \pm 0,006$
GBM brez serumu	$0,027 \pm 0,031$ (t-test: 0,006)	$0,367 \pm 0,168$ (t-test: 0,116)	$456,274 \pm 654,183$ (t-test: 0,501)	$6116,090 \pm 6283,243$ (t-test: 0,400)	$0,798 \pm 0,091$ (t-test: 0,185)
GBM s serumom	$0,486 \pm 0,588$ (t-test: 0,179)	$0,306 \pm 0,214$ (t-test: 0,007)	$0,048 \pm 0,038$ (t-test: 4,93E-05)	$3997,653 \pm 2136,336$ (t-test: 0,230)	$0,438 \pm 0,150$ (t-test: 0,004)
nevroepitelijske matične celice	$115,638 \pm 7,559$ (t-test: 0,030)	$3,191 \pm 1,098$ (t-test: 0,217)	$0,384 \pm 0,244$ (t-test: 0,172)	$9021,576 \pm 11479,560$ (t-test: 0,466)	$100746,5 \pm 39885,2$ (t-test: 0,174)
gliomske matične celice	$76,592 \pm 17,459$ (t-test: 0,103)	$1,300 \pm 0,013$ (t-test: 0,061)	$0,017 \pm 0,012$ (t-test: 0,002)	$929,3424 \pm 567,8243$ (t-test: 0,260)	$0,434 \pm 0,274$ (t-test: 0,210)



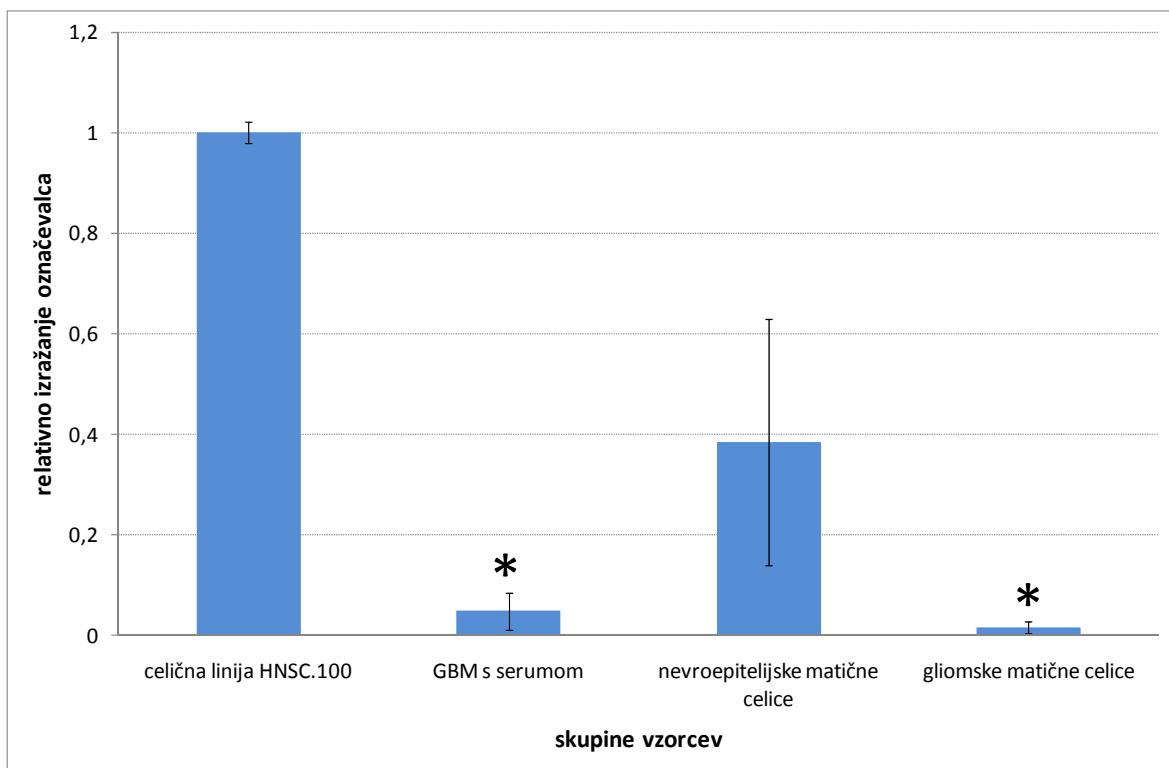
Slika 12: Relativno izražanje označevalca CD133 po skupinah vzorcev. Z (*) sta označeni skupini vzorcev, kjer je izražanje CD133 statistično značilno ($p \leq 0,05$), z vilicami pa so označeni standardni odkloni.

CD133 se glede na celično linijo HNSC.100 povečano izraža pri nevroepitelijskih matičnih celicah, znotraj te skupine je tudi statistično značilno ($p < 0,03$), pri gliomskih matičnih celicah je izražanje označevalca CD133 nekoliko nižje, a še vedno povečano. Izražanje je statistično značilno nižje pri GBM, gojenih brez serumu ($p < 0,006$), nižje pa je tudi pri skupini GBM, gojenih v serumu.



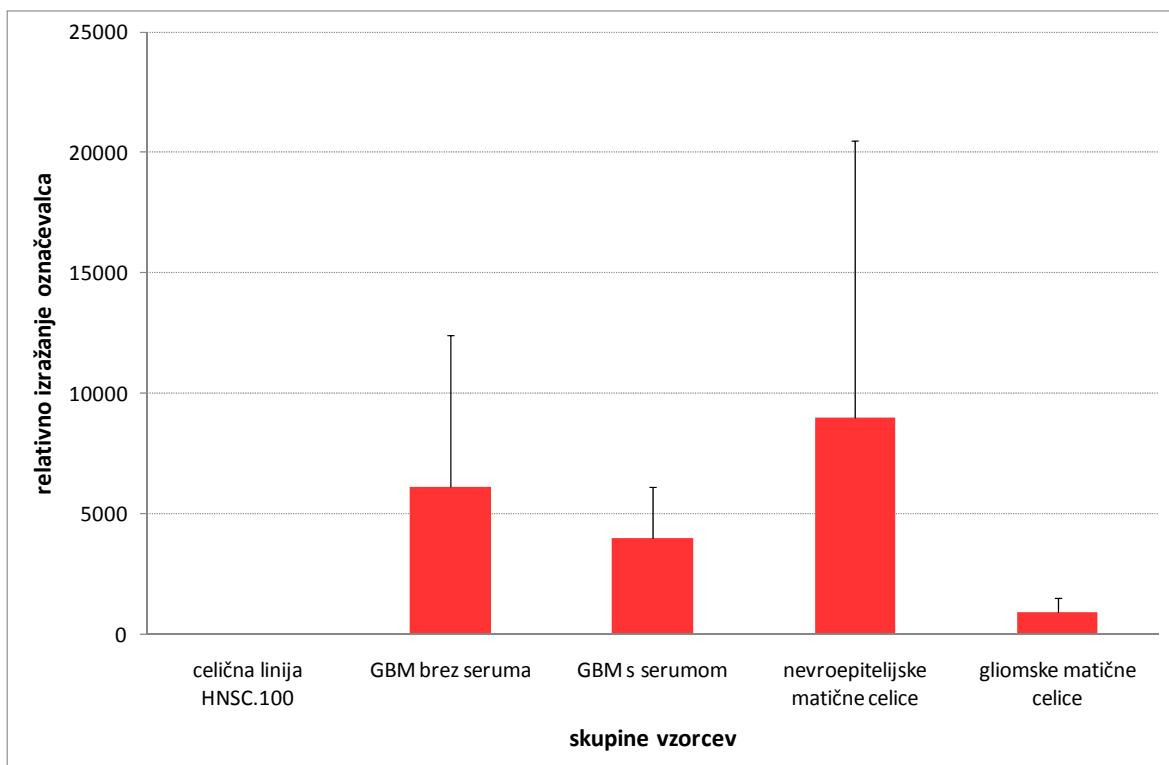
Slika 13: Relativno izražanje označevalca Sox2 po skupinah vzorcev. Z (*) je označena skupina vzorcev, pri kateri je izražanje Sox2 statistično značilno, z vilicami pa so označeni standardni odkloni.

Izražanje označevalca Sox2 je v primerjavi s celično linijo HNSC.100 pri vzorcih GBM, gojenih v gojišču brez serum, in pri vzorcih GBM, gojenih v serumu, nižje ($p < 0,007$), nekoliko je povečano pri gliomskih matičnih celicah, najbolj pa je povečano pri nevroepitelijskih matičnih celicah.



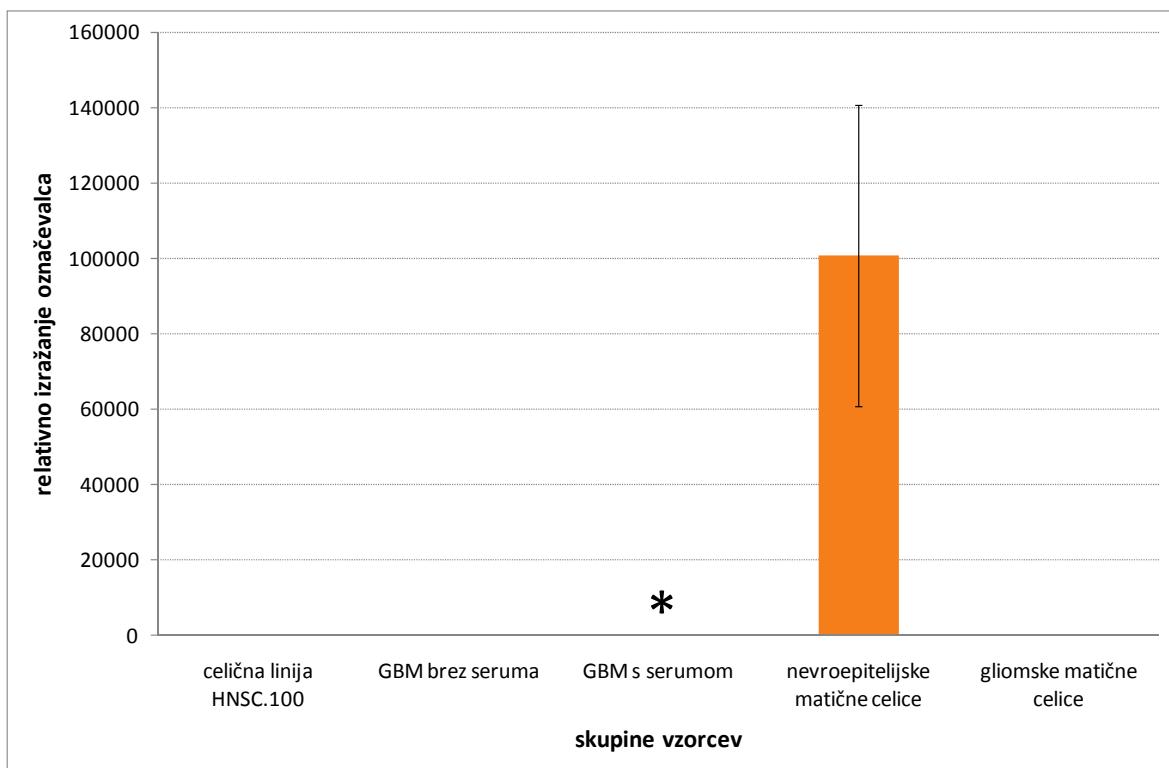
Slika 14: Relativno izražanje označevalca nestin po skupinah vzorcev. Skupina GBM brez seruma je bila zaradi premajhnega nabora vzorcev in prevelikih odstopanj pri analizi označevalca nestina izločena. Z (*) sta označeni skupini vzorcev, kjer je izražanje nestina statistično značilno, z vilicami pa so označeni standardni odkloni.

Izražanje nestina je pri vseh skupinah vzorcev v primerjavi s celično linijo HNSC.100 zmanjšano. Najmanj je zmanjšano pri nevroepitelijskih matičnih celicah, statistično značilno nizko pa je pri GBM gojenih v serumu ($p < 0,00005$), ter pri gliomskih matičnih celicah ($p < 0,002$).



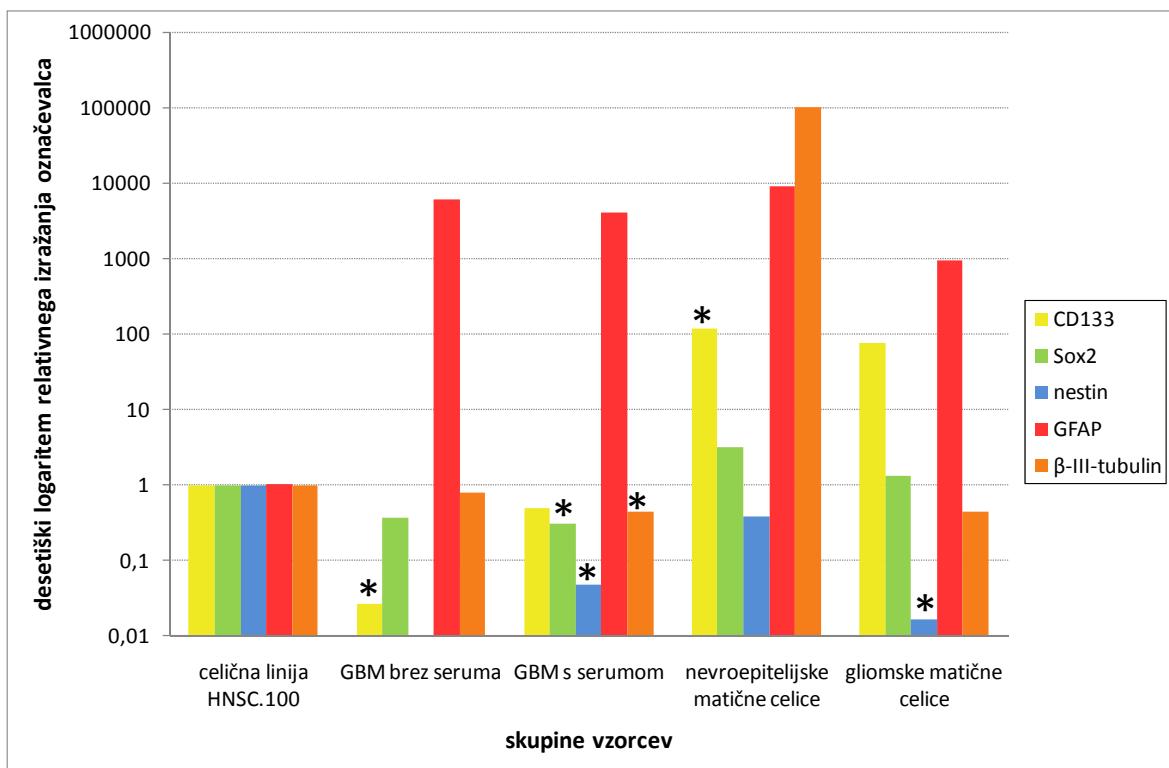
Slika 15: Relativno izražanje označevalca GFAP po skupinah vzorcev. Z vilicami so označeni standardni odkloni.

Izražanje označevalca GFAP je pri vseh skupinah vzorcev v primerjavi s celično linijo HNSC.100 povečano. Najmanj pri gliomskih matičnih celicah, sledijo vzorci GBM, gojeni v gojišču s serumom in brez serumuma, najbolj pa je povečano pri nevroepitelijskih matičnih celicah. Znotraj slednje skupine vzorcev je tudi največji standardni odklon.



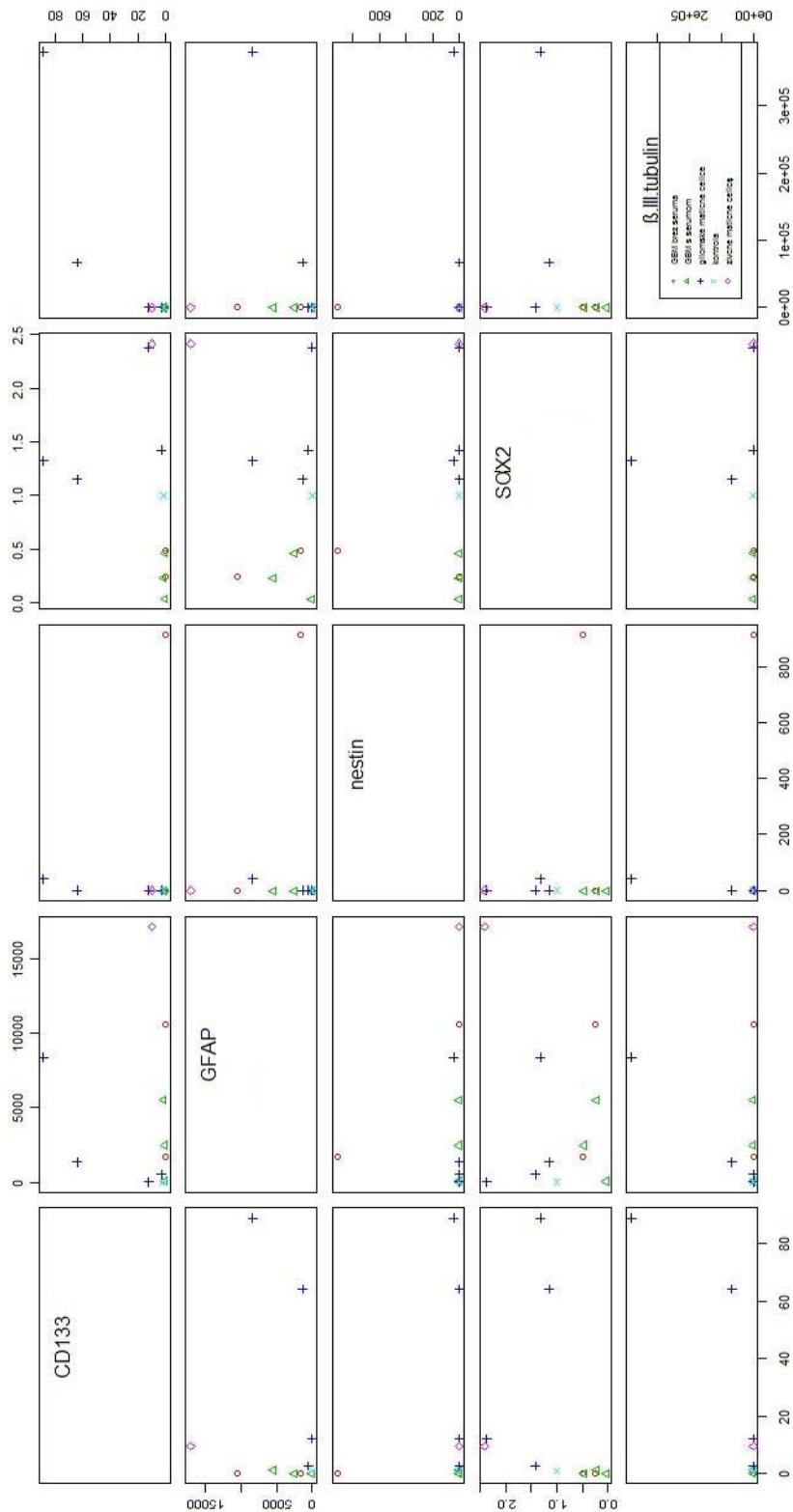
Slika 16: Relativno izražanje označevalca β -III-tubulin po skupinah vzorcev. Z (*) je označena skupina vzorcev, kjer je izražanje β -III-tubulina statistično značilno, z vilicami pa so označeni standardni odkloni.

Izražanje β -III-tubulina je, če primerjamo s celično linijo HNSC.100, izredno močno povečano pri nevroepiteljskih matičnih celicah. Pri vzorcih GBM, gojenih brez serumata, je izražanje nekoliko znižano, najbolj pa je znižano pri vzorcih GBM, gojenih v gojiščih s serumom (statistično značilno; $p < 0,004$) in pri gliomskih matičnih celicah.



Slika 17: Grafična predstavitev desetiških logaritmov relativnih nivojev izražanja molekularnih označevalcev po skupinah vzorcev. Z (*) so označene skupine vzorcev, kjer je izražanje posameznega označevalca statistično značilno.

Vse skupine vzorcev smo primerjali s celično linijo HNSC.100. Pri vzorcih GBM, gojenih v gojišču brez serum, je bilo povečano le izražanje označevalca GFAP. Izražanje vseh preostalih označevalcev (CD133 (statistično značilno; $p < 0,006$), Sox2 in β -III-tubulina) pa je bilo zmanjšano. Znotraj skupine vzorcev GBM, gojenih v serumu, smo zaznali povečano le izražanje označevalca GFAP, izražanje preostalih je bilo zmanjšano in statistično značilno (Sox2 ($p < 0,007$), nestin ($p < 0,00005$) in β -III-tubulinu ($p < 0,004$)). Izražanje označevalcev pri nevroepitelijskih matičnih celicah je bilo najbolj povečano pri označevalcu β -III-tubulinu, nekoliko manj pri GFAP, statistično značilno je bilo povečanje izražanja CD133 ($p < 0,03$), povečano izražanje pa je bilo tudi izražanje Sox2. Le izražanje nestina je bilo nižje. Pri gliomskih matičnih celicah je bilo izražanje CD133 in GFAP močno povečano, malo je bilo povečano tudi izražanje molekularnega označevalca Sox2, medtem ko je bilo izražanje β -III-tubulina in nestina manjše ($p < 0,002$).



Slika 18: Matrika razsevnih diagramov za molekularne označevalce CD133, Sox2, nestin, GFAP in β -III-tubulin

Pearsonov koeficient korelacji, ki je ocena mere povezanosti, temelji na matriki razsevnih diagramov. Zanimalo nas je, ali so spremenljivke (v našem primeru so to označevalci) znotraj skupin vzorcev povezane.

Za izračun Pearsonovega koeficiente korelaciije znotraj skupine GBM in nevroepitelijskih matičnih celic, gojenih v gojišču brez seruma, smo imeli premajhen nabor vzorcev, zato smo za ti dve skupini izrisali le razsevni diagram.

Znotraj skupine vzorcev GBM, gojenih v serumu, obstaja močna pozitivna linearna korelacija ($r_{izračunana} > r_{testna}$) med označevalcema CD133 in GFAP ($0,9 > 0,8114$) ter GFAP in nestinom ($0,97 > 0,8114$). To pomeni, da če se izražanje prvega označevalca poveča, potem se poveča tudi izražanje drugega označevalca.

V skupini gliomske matične celice pa so tri pozitivne linearne korelaciije, in sicer med označevalcema GFAP in nestinom ($0,98 > 0,95$), GFAP in β -III-tubulinom ($0,99 > 0,95$), ter med nestinom in β -III-tubulinom ($0,997 > 0,95$).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Poglavitna procesa pri izražanju genov sta dva: transkripcija oziroma prepisovanje genske informacije in translacija oziroma prevajanje. Izražanje genov lahko tako preučujemo na ravni transkriptoma ali pa proteoma. Vendar pa je potrebno previdno razlagati izražanje molekularnih označevalcev MC, saj mRNA označevalca pogosto ne pokaže dejanske ravni proteinov istega produkta, hkrati pa prisotnost antigena v pretočni citometriji zahteva dodatne posttranslacijske modifikacije (Rich, 2010). Pri našem delu smo se osredotočili na vmesni produkt procesa izražanja genov, mRNA. Izražanje molekularnih označevalcev v vzorcih smo preverili z metodo qPCR, za izvedbo katere je potrebna visokokvalitetna RNA zadostnih koncentracij. Iz preglednice 13 je razvidno, da pri nekaterih vzorcih vrednosti razmerja 260/230 odstopajo od želene vrednosti $\geq 1,8$. Ker na sliki gela po končani agarozni gelski elektroforezi (slika 11) v žepku in/ali na gelu ni dodatnih lis, ki bi bile prisotne zaradi fragmentov DNA, lahko sklepamo, da so nizke vrednosti razmerja A260/A230 posledica prisotnosti drugih kontaminantov (npr. etanola, ki se uporablja za spiranje peleta po izolaciji RNA s Trizolom, soli ipd.), ki se niso dobro sprali tekom izolacije RNA (Simms, 1993).

Raven izražanja CD133 je bila majhna, zato smo RNA v vzorcih preamplificirali in s tem povečali signal. Sočasno smo pomnožili vse ciljne in hišni gen. Pri uporabi označevalca GFAP pa se ta vseeno ni pomnoževal bodisi zaradi premajhne količine tarče v vzorcu bodisi zaradi RNA slabše kvalitete.

Za normalizacijo rezultatov smo izbrali nevropiteljsko celično linijo HNSC.100, ki je pozitivna na nestin. Pozitivna je tudi za označevalce nediferenciranih celic, ne izraža pa označevalcev diferenciranih celic (Villa in sod., 2000). Za njo smo se odločili, ker se je tekom eksperimentalnega dela izkazalo, da je stabilna in morfološko homogena. Hkrati pa smo med optimiranjem metode qPCR ugotovili, da se izražanje označevalcev bistveno ne spreminja glede na pasažo in pogoje.

Vzorci so bili fenotipsko in genotipsko raznoliki, nadaljnje so se nevrosfere oziroma sferoidi oblikovali različno hitro, pa tudi njihova morfologija in velikost (slika 9) sta bila različna. Zato ni presenetljivo (preglednica 14), da so bile znotraj skupin vzorcev razlike glede na izražanje posameznih označevalcev (tudi za faktor 150!). Izražanje označevalcev znotraj iste skupine tumorjev se razlikuje zaradi različnega razreda in stopnje (Rich, 2009). Dokazano pa so v tumorjih in tkivih odraslega prisotne MC v zelo majhnem deležu (Vescovi in sod., 2006, Chandran in Caldwell, 2004). Poleg tega pa so prisotni tudi drugi tipi celic (Glantz in sod., 2009; slika 5). Izražanje molekularnih označevalcev pa je odvisno

tudi od niše, iz katere MC izvirajo (Bjerkvig in sod., 2009). Phillips je s sodelavci (2006) pokazal, da se izražanje označevalcev proliferacije, angiogeneze in nevrogeneze pri GBM razlikuje glede na razred, v katerega je GBM uvrščen. Pri klasičnem (proliferativnem) GBM je izražanje označevalca CD133 glede na pronevralni, nevralni in mezenhimski razred povečan. Izražanje nestina je navišje pri mezenhimalnih GBM, nekoliko nižje pa znotraj pronevralnega, nevralnega in klasičnega razreda. Izražanje GFAP močno variira znotraj razredov. Najnižje je pri klasičnih GBM, med preostalimi razredi GBM pa ni dokazanih bistvenih razlik.

Yuan je s sodelavci (2004) ločil celice GBM sferoidov. V povprečju je v primarnih celičnih kulturah GBM manj kot 5 % celic CD133 pozitivnih, do 10 % je nestin in GFAP pozitivnih, do 25 % mielin pozitivnih, okoli 80 % pa jih izraža β-III-tubulin, hkrati pa je manj kot 5 % celic istočasno pozitivnih tako za GFAP kot tudi β-III-tubulin. Izražanje označevalcev diferenciacije je variabilna, kar pri tumorskih celicah nakazuje, da je heterogenost tumorjev rezultat nenavadnih diferenciacij tumorskih celic (Reya, 2001).

Naši rezultati kažejo (preglednica 15, slika 12), da je izražanje označevalca CD133 pri NMC visoko in statistično značilno ($p < 0,05$), pri gliomskih matičnih celicah, ki so ločene, CD133⁺ celice, nekoliko nižje, izražanje CD133 v GBM pa nizko (znotraj skupine vzorcev GBM brez seruma statistično značilno: $p < 0,006$). Znano je, da so tudi CD133⁻ gliomske celice lahko tumorigene, njihove potomke pa so celo CD133⁺ (Wang in sod., 2007). CD133 je bil na podlagi izražanja v NMC oziroma NPC predlagan kot označevalec možganskih TMC (Singh in sod., 2004a). Izraža pa se tudi pri drugih oblikah kompaktnega raka (Rich, 2009). Dokazano je, da pri nekaterih oblikah tumorjev, ki so maligni, prisotnost CD133⁺ celic ni signifikantna. Zanimivo pa je, da je v primarnih GMB veliko več CD133⁺ celic kot v sekundarnih GBM in drugih oblikah možganskih tumorjev (Beier in sod., 2007). Več raziskav je potrdilo, da raven izražanja označevalca CD133 vpliva na prognozo (Zeppernick in sod., 2008), a je potrebno vzeti v obzir, da je izražanje CD133 različno tekom celičnega cikla (Sun in sod., 2009). Uporaba CD133 kot označevalca možganskih TMC, tudi GBM, je omejena (Beier in sod., 2007; Wang in sod., 2007), a zdi se, da je njegovo izražanje v tumorjih informativno in zelo uporabno (Rich, 2010), saj CD133⁺ TMC vplivajo na zmožnost tumorja, da je odporen na kemoterapijo (Liu in sod., 2006).

Izražanje označevalca Sox2 je bilo znotraj skupine NMC znova visoko (preglednica 15, slika 13), kar ni presenečenje, saj NMC v odraslem na začetku razvoja izražajo velike količine Sox2 (Kim in sod., 2008). Izražanje tega označevalca pa je bilo pri gliomskih matičnih celicah in GBM nekoliko nižje in pri zadnji skupini statistično značilno.

Nestin, označevalec NMC in NPC v razvijajočem se CŽS, velja za zelo pomembnega označevalca, ki pa ni nujno specifičen za možganske TMC (Rich, 2009), a CD133⁺ celice

izražajo višje vrednosti nekaterih označevalcev, med drugim tudi nestina (Liu in sod., 2006). Izražanje nestina pri endotelijskih možganskih tumorskih celicah je visoko tudi v primeru, ko je pri možganskih TMC izražanje nizko (Sugawara in sod., 2002). Nestin je sicer lahko izražen tudi pri astrocitih CŽS kot odgovor na celični stres (Strojnik in sod., 2007). V našem primeru se je izkazalo, da je izražanje nestina (preglednica 15, slika 14) v GBM in gliomskih matičnih celicah statistično značilno nizko ($p < 0,05$), izražanje znotraj skupine NMC je višje, a še vedno za faktor 2,6 nižje napram nevroepitelijski celični liniji HNSC.100. Izražanje nestina med posameznimi GBM se signifikantno razlikuje (Strojnik in sod., 2007), kar potrjujejo tudi naši rezultati (preglednica 14).

V odraslih, diferenciranih celicah se izražanje Sox2 ter nestina močno zmanjša (Suh in sod., 2007; Graham in sod., 2003; Strojnik in sod., 2007), hkrati pa se poveča izražanje označevalcev diferenciacije, npr. GFAP in β -III-tubulina (slika 17), kar je primerljivo tudi s kliničnimi rezultati. NMC v razmerah *in vitro* diferencirajo v glija oziroma živčne celice (Fan in sod., 2007). Naši rezultati nakazujejo, da je izražanje GFAP in β -III-tubulina najvišje pri NMC (preglednica 15, sliki 15 in 16). Predvsem izražanje β -III-tubulina je, če primerjamo z vzorci GBM in gliomskimi matičnimi celicami, močno višje (250.000-krat!). To je zanimivo predvsem z vidika, da je znotraj iste skupine patoloških vzorcev možganov hkrati močno povečano (sliki 12 in 13) tudi izražanje označevalcev CD133 in Sox2, pa tudi nestina, če predpostavimo, da je pri nevroepitelijski celični liniji HNSC.100 izražanje nestina izredno visoko (Villa in sod., 2000). To samo potrjuje trditev, da so bili prejeti vzorci heterogeni. Ob tem se poraja vprašanje, če bi za identifikacijo razlik med možganskimi TMC in NMC lahko uporabili kombinacijo označevalcev matičnih celic (npr. CD133, Sox2, nestin) in diferenciranih celic (npr. GFAP in β -III-tubulin).

Visoke vrednosti GFAP v vzorcih NMC, GBM, pa tudi gliomskih matičnih celic, lahko opravičujemo z izvorom NMC iz celic tipa B SVP, ki imajo karakteristike astrocitov (Alvarez-Buylla in García-Verdugo, 2002; slika 3). Astrociti sicer sodelujejo v CŽS pri celični komunikaciji. Povečano izražanje GFAP v nevrosferah in sferoidih, bi lahko med drugim nakazovalo prisotnost astrocitov znotraj nevrosfer in sferoidov z nalogo celične komunikacije in posledično uravnavanjem matičnosti oziroma stopnje diferenciacije.

Iz slik 12–17, ter predvsem iz slike 18, je razvidno, da se izražanje označevalcev, z izjemo GFAP, ki nam je pri eksperimentalnem delu povzročal največ težav, na normalnih nevrosferah razlikuje od izražanja označevalcev na tumorskih sferoidih.

Za podrobnejšo statistično analizo podatkov, predvsem za analizo povezav med izražanjem označevalcev, bi potrebovali večji nabor vzorcev.

5.1.1 Nadaljnje delo

Pridobljeni rezultati bi lahko bili dobra osnova za nadaljnje delo iskanja razlik med GBM in NMC, da bi lahko slednje uporabili v diagnostične in terapevtske namene. Z večjim naborom vzorcev in z drugimi metodami merjenja izražanja genov, tako na transkriptomski ravni (na primer z imunohistokemijskim pristopom na tkivnih mikromrežah) kot tudi na nivoju proteoma, bi bilo potrebno pridobljene rezultate preveriti.

Velja pa tudi razmisiliti, da bi se v prihodnosti optimizirala metoda qPCR (menjava hišnega gena, izolacija RNA s kompleti ipd.) za vzorce GBM in patoloških vzorcev možganov, da bi bila metoda ponovljivejša in da bi se hišni in tarčni gen učinkoviteje pomnoževala.

5.2 SKLEPI

- Tumorske matične celice GBM rastejo v primarni celični kulturi v obliki sferoidov tako v prisotnosti kot tudi odsotnosti seruma, NMC, pridobljene *post-mortem*, pa rastejo v obliki nevrosfer.
- Izražanje označevalcev se razlikuje med vzorci znotraj skupin GBM, NMC in gliomskih matičnih celic.
- CD133, Sox2 in nestin se na ravni mRNA izraža tako pri možganskih TMC kot tudi NMC.
- Izražanje označevalcev matičnih celic na normalnih nevrosferah se razlikuje od izražanja označevalcev na tumorskih sferoidih.

6 POVZETEK

Gliomi so primarni tumorji centralnega živčnega sistema, ki izvirajo iz podpornih celic – glije. Najbolj maligna oblika gliomov je glioblastom, ki je, tudi zaradi infiltriranosti v okoliško možganovino in zaradi krvno—možganske prepreke, dandanes neozdravljiv.

V tumorjih obstaja le majhna populacija celic, ki se asimetrično delijo, imajo sposobnost samopomnoževanja in so sposobne tvoriti tumorje *de novo*. Te celice imenujemo tumorske matične celice.

Ena izmed možnosti zdravljenja glioblastoma v prihodnosti je tudi dostava tarčnih terapevtskih genov neposredno v žarišče tumorja, do tumorskih matičnih celic. Za to pa bi lahko uporabili nevroepitelijske matične celice, nevroepitelijske progenitorske celice in mezenhimske matične celice, ki dokazano v razmerah *in vivo* potujejo po izvornih tkivih in tudi v bližino tumorjev. To pa je izvedljivo le ob razlikovanju med tumorskimi matičnimi celicami ter matičnimi celicami odraslega.

Tako matične celice odraslega kot tudi tumorske matične celice izražajo označevalce matičnih celic in označevalce diferenciacije. Pri našem delu smo iz izolirane RNA s pomočjo metode PCR v realnem času primerjali izražanje označevalcev matičnih celic (CD133, Sox2 in nestin) in označevalcev diferenciacije (GFAP, β -III-tubulin).

Izkazalo se je, da so označevalci matičnih celic CD133, Sox2 in nestin na ravni mRNA izražajo tako pri tumorskih matičnih celicah kot tudi pri nevroepitelijskih matičnih celicah. Hkrati pa dobljeni rezultati nakazujejo, da se izražanje molekularnih označevalcev na tumorskih matičnih celicah gliomov razlikuje od izražanja molekularnih označevalcev na nevroepitelijskih matičnih celicah.

V prihodnosti bo potrebnega še veliko dela, da bomo lahko razlikovali med nevroepitelijskimi matičnimi in progenitorskimi celicami ter tumorskimi matičnimi celicami. S tem bi se omogočilo boljše razumevanje GBM in izboljšalo zdravljenje.

7 VIRI

- Alvarez-Buylla A., García-Verdugo J. M. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *Journal of Neuroscience*, 22, 3: 629–634
- Beier D., Hau P., Proescholdt M., Lohmeier A., Wischhusen J., Oefner P. J., Aigner L., Brawanski A., Bogdahn U., Beier C. P. 2007. CD133⁺ and CD133⁻ glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Research*, 67, 9: 4010–4015
- Bjerkvig R., Tysnes B. B., Aboody K. S., Najbauer J., Terzis A. J. A. 2005. The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nature Reviews Cancer*, 5, 11: 899–904
- Bjerkvig R. Johansson M., Miletic H., Niclou S. 2009. Cancer stem cells and angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 17, 5: 279–284
- Brat D. J., Kaur B., van Meir E. G. 2003. Genetic modulation of hypoxia induced gene expression and angiogenesis: Relevance to brain tumors. *Frontiers in Bioscience*, 8: 100–116
- Bruce J. N., Kennedy B. 2009. Glioblastoma multiforme. Omaha, eMedicine Oncology: 42 str.
<http://emedicine.medscape.com/article/283252-print> (3. mar. 2010)
- Burns D. K. 1997. The nervous system. V: Basic pathology. 6th ed. Kumar V. (ed.). Philadelphia, W. B. Saunders: 713–744
- Capper D., Gaiser T., Hartmann C., Habel A., Mueller W., Herold-Mende C., von Deimling A., Siegelin M. D. 2009. Stem-cell-like glioma cells are resistant to TRAIL/Apo2L and exhibit down-regulation of caspase-8 by promoter methylation. *Acta Neuropathologica*, 117, 4: 445–456
- Chandran S., Caldwell M. A. 2004. Isolation and characterization of stem cells from the nervous system. V: Handbook of stem cells. Vol. 2. Lanza R. P. (ed.). Boston, MA, Elsevier Academic: 581–592
- Clarke M. F. 2004. At the root of brain cancer. *Nature*, 432, 7015: 281–282
- Clevers H. 2005. Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nature Genetics*, 37, 10: 1027–1029

- Dalerba P., Cho R. W., Clarke M. F. 2007. Cancer stem cells: models and concepts. *Annual Review of Medicine*, 58: 267–284
- Denham M., Conley B., Olsson F., Cole T. J., Mollard R. 2005. Stem cells: an overview. *Current Protocols in Cell Biology*, Supp. 28: 23.1.1–23.1.18
- Doetsch F. 2003. The glial identity of neural stem cells. *Nature Neuroscience*, 6, 11: 1127–1134
- Doetsch F., Caillé I., Lim D. A., García-Verdugo J. M., Alvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97, 6: 703–716
- Dor Y., Melton D. A. 2004. How important are adult stem cells for tissue maintenance? *Cell Cycle*, 3, 9: 1102–1104
- Ellis P., Fagan M. B., Magness S. T., Hutton S., Taranova O., Hayashi S., McMahon A., Rao M., Pevny L. 2004. SOX2, a persistent marker from multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Developmental Neuroscience*, 26, 2–4: 148–165
- Fan X., Salford L. G., Widegren B. 2007. Glioma stem cells: evidence and limitation. *Seminars in Cancer Biology*, 17, 3: 214–218
- Galli R., Gritti A., Bonfati L., Vescovi A. L. 2003. Neural stem cells: an overview. *Circulation Research*, 92: 598–606
- Gangemi R. M. R., Griffero F., Marubbi D., Perera M., Capra M. C., Malatesta P., Ravetti G. L., Zona G. L. 2009. Sox2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells*, 27, 1: 40–48
- Glantz M., Kesari S., Recht L., Fleischhack G., van Horn A. 2009. Understanding the origins of gliomas and developing novel therapies: cerebrospinal fluid and subventricular zone interplay. *Seminars in Oncology*, 36, 4, Supp. 2: S17–S24
- Godard S., Getz G., Delorenzi M., Farmer P., Kobayashi H., Desbaillets I., Nozaki M., Diserens A. C., Hamou M. F. Dietrich P. Y., Regli L., Janzer R. C., Bucher P., Stupp R., de Tribolet N., Domany E., Hegi M. E. 2003. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: A correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Research*, 63, 20: 6613–6625
- Graham V., Khudyakov J., Ellis P., Pevny L. 2003. SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, 39, 5: 749–765

- Gritti A., Vescovi A. L., Galli R. 2002. Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. *Journal of Physiology-Paris*, 96, 1–2: 81–90
- Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986–994.
- Holland E. C. 2000. Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97, 12: 6242–6244
- Ignatova T. N., Kukekov V. G., Laywell E. D., Suslov O. N., Vrionis F. D., Steindler D. A. 2002. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers *in vitro*. *Glia*, 39, 3: 193–206
- Johansson C. B., Momma S., Clarke D. L., Risling M., Lendahl U., Frisén J. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 96, 1: 25–34
- Katsetos C. D., Dráberová E., Legido A., Dumontet C., Dráber P. 2009. Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. I. Class III β -tubulin. *Journal of Cellular Physiology*, 221, 3: 505–513
- Katsetos C. D., Legido A., Perentes E., Mörk S. J. 2003. Class III β -tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *Journal of Child Neurology*, 18, 12: 851–866
- Kim J. B., Zaehres H., Wu G., Gentile L., Ko K., Sebastian V., Araúzo-Bravo M. J., Ruau D., Han D. W., Zenke M., Schöler H. R. 2008. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 454, 7204: 646–650
- Kintner C., Koyano-Nakagawa N. 2004. Neurogenesis in the vertebrate embryo. V: *Handbook of stem cells*. Vol. 2. Lanza R. P. (ed.). Boston, MA, Elsevier Academic: 191–204
- Lee J., Kotliarova S., Kotliarov Y., Li A., Si Q., Donin N. M., Pastorino S., Purow B. W., Christopher N., Zhang W., Park J. K., Fine H. A. 2006. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9, 5: 391–403
- Liu G., Yuan X., Zeng Z., Tunisi P., Ng H., Abdulkadir I. R., Lu L., Irvin D., Black K. L., Yu J. S. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular Cancer*, 5: 67, doi: 10.1186/1476-4598-5-67: 12 str.

- Liu Q., Nguyen D. H., Dong Q., Shitaku P., Chung K., Liu O. Y., Tso J. L., Liu T. Y., Konkankit V., Cloughesy T. F., Mischel P. S., Lane T. F., Liau L. M., Nelson S. F., Tso C.-L. 2009. Molecular properties of CD133⁺ glioblastoma stem cells derived from treatment-refractory recurrent brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, 94, 1: 1–19
- Louis D. N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. 2007. WHO Classification of tumours of the central nervous system. Lyon, IARC Press: 312 str.
- Marchenko S., Flanagan L. 2007. Passaging human neural stem cells. *Journal of Visualized Experiments*, 7, doi: 10.3791/263: 2 str.
- Marcovitch H. 2005. Black's medical dictionary. 41st ed. London, A & C Black: 814 str.
- Mirescu C., Gould E. 2004. Stem cells in the adult brain. V: Handbook of stem cells. Vol. 2. Lanza R. P. (ed.). Boston, MA, Elsevier Academic: 219–224
- Najbauer J., Danks M. K., Schmidt N.-O., Kim S. U., Aboody K. S. 2007. Neural stem cell-mediated therapy of primary and metastatic solid tumors. V: Autologous and cancer stem cell gene therapy. Bertolotti R., Ozawa K. (ed.). Singapore, New Jersey, London, Hong Kong, Taipei, Bangalore, World Scientific: 335–372
- Thermo Scientific. 2009. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. V1.0 User Manual. Delaware, Thermo Scientific: 97 str.
<http://www.nanodrop.com/Library/NanoDrop%202000%20User%20Manual.pdf> (29. apr. 2010)
- Nolan T., Hands R. E., Bustin S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1, 3: 1559–1582
- Ohgaki H., Kleihues P. 2005. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64, 6: 479–489
- Ohgaki H., Kleihues P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *American Journal of Pathology*, 170, 5: 1445–1453
- Pacey L., Stead S., Gleave J., Tomczyk K., Doering L. 2007. Neural stem cell culture: neurosphere generation, microscopical analysis and cryopreservation. *Nature Protocols*, 7, doi: 10.3791/263: 2 str.
- Palmer T. D., Ray J., Gage F. H. 1995. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Molecular Brain Neuroscience*, 6, 5: 474–486

- Palmer T. D., Schwartz P. H., Taupin P., Kaspar B., Stein S. A., Gage F. H. 2001. Cell culture: Progenitor cells from human brain after death. *Nature*, 411, 6833: 42–43
- Parsons X. H., Teng Y. D., Snyder E. Y. 2009. Important precautions when deriving patient-specific neural elements from pluripotent cells. *Cytotherapy*, 11, 4: 1–11
- Phi J. H., Park S.-H., Kim S.-K., Paek S. H., Kim J. H., Lee Y. J., Cho B.-K., Park C.-K., Lee D.-H., Wang K.-C. 2008. Sox2 expression in brain tumors: A reflection of the neuroglial differentiation pathway. *American Journal of Surgical Pathology*, 32, 1: 103–112
- Phillips H. S., Kharbanda S., Chen R., Forrest W. F., Soriano R. H., Wu T. D., Misra A., Nigro J. M., Colman H., Soroceanu L., Williams P. M., Modrusan Z., Feuerstein B. G., Aldape K. 2006. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 9, 3: 157–173
- Pocajt M., Širca A. 1996. Anatomija in fiziologija. 10. izd. Ljubljana, DZS: 357 str.
- Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 6859: 105–111
- Rich J. N. 2009. Brain tumor stem cell markers. V: CNS cancer: Models, markers, prognostic factors, targets and therapeutic approaches. van Mier E. G. (ed.). New York, Humana Press: 713–728
- Rutka J. T., Murakami M., Dirks P. B., Hubbard S. L., Becker L. E., Fukuyama K., Jung S., Tsuqu A., Matsuzawa K. 1997. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *Journal of Neurosurgery*, 87, 3: 420–430
- Sanai N., Alvarez-Buylla A., Berger M. S. 2005. Neural stem cells and the origin of gliomas. *New England Journal of Medicine*, 353, 8: 811–822
- Sakariassen P. Ø., Prestegarden L., Wang J., Skaftnesmo K.-O., Mahesparan R., Molthoff C., Sminia P., Sundlisæter E., Misra A., Tysnes B. B., Chekenya M., Peters H., Lende G., Kalland K. H., Øyan A. M., Petersen K., Jonassen I., van der Kogel A., Feuerstein B. G., Terzis A. J. A., Bjerkvig R., Enger P. Ø. 2006. Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 55: 16466–16471
- Scadden D. T. 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441, 7097: 1075–1079

- Scherer H. J. 1940. The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain*, 63, 1: 1–35
- Schmitz M., Temme A., Senner V., Ebner R., Schwind S., Stevanovic S., Wehner R., Schackert G., Schackert H. K., Fussel M., Bachmann M., Rieber E. P., Weigle B. 2007. Identification of Sox2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *British Journal of Cancer*, 96, 8: 1293–1301
- Schwartz P. H., Bryant P. J., Fuja T. J., Su H., O'Dowd D. K., Klassen H. 2003. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *Journal of Neuroscience Research*, 74, 6: 838–851
- Singh S. K., Clarke I. D., Hide T., Dirks P. B. 2004a. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 23, 43: 7267–7273
- Singh S. K., Clarke I. D., Terasaki M., Bonn V. E., Hawkins C., Squire J., Dirks P. B. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, 63, 18: 5821–5828
- Singh S. K., Hawkins C., Clarke I. D., Squire J. A., Bayani J., Hide T., Henkelman R. M., Crsimano M. D., Dirks P. B. 2004b. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432, 7015: 396–401
- Simms D., Cizdziel P. E., Chomczynski P. 1993. Trizol™: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*, 15, 4: 99–102
- Smirniotopoulos J. G., Murphy F. M., Rushing E. J., Rees J. H., Schroeder J. W. 2007. Patterns of contrast enhancement in the brain and meninges. *Radiographic Journal of Continuing Medical Education in Radiology*, 27: 525–551
- Stratagene. 2004. Introduction to quantitative PCR: Methods and application guide. La Jolla, Stratagene: 50 str.
http://sr.burnham.org/sr/homepage/microarray/PDFs_Excel/StrataQPCR_Guide.pdf (10. mar. 2010)
- Strbad M., Rožman P. 2005. Uporaba matičnih celic v medicini. *Proteus*, 67, 8: 340–348
- Strojnik T., Røsland G. V., Sakariassen P. O., Kavalar R., Lah T. 2007. Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surgical Neurology*, 68, 2: 133–144

- Sugawara K., Kurihara H., Negishi M., Saito N., Nakazato Y., Sasaki T., Takeuchi T. 2002. Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. *Laboratory Investigation*, 82, 3: 345–351
- Suh H., Consiglio A., Ray J., Sawai T., D'Amour K. A., Gage F. H. 2007. *In vivo* fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2⁺ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 1, 5: 515–528
- Sun Y., Kong W., Falk A., Hu J., Zhou L., Pollard S., Smith A. 2009. CD133 (prominin) negative human neural stem cells are colonogenic and tripotent. *PLoS ONE*, 4, 5: e5498, doi: 10.1371/journal.pone.0005498: 10 str.
- Širca A. 1995. Anatomija. Skripta za študente medicine. 2. del. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 155 str.
- Taupin P., Gage F. H. 2002. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *Journal of Neuroscience Research*, 69, 6: 745–749
- Temple S. 2001. The development of neural stem cells. *Nature*, 414, 6859: 112–117
- Uchida N., Buck D. W., He D., Reitsma M. J., Masek M., Phan T. V., Tsukamoto A. S., Gage F. H., Weissman I. L. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 26: 14720–14725
- Verhaak R. G. W. Hoadley K. A., Purdom E., Wang V., Qi Y., Wilkerson M. D., Miller R. C., Ding L., Golub T., Mesirov J. P., Alexe G., Lawrence M., O'Kelly M., Tamayo P., Weir B. A., Gabriel S., Winckler W., Gupta S., Jakkula L., Feiler H. S., Hodgson J. G., James C. D., Sarkaria J. N., Brennan C., Kahn A., Spellman P. T., Wilson R. K., Speed T. P., Gray J. W., Meyerson M., Getz G., Perou C. M., Hayes D. N., The cancer genome atlas research network. 2010. Integrated genomic analysis indentifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell*, 17, 1: 98–110
- Vescovi A. L., Galli R., Reynolds B. A. 2006. Brain tumour stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 6, 6: 425–436
- Vescovi A., Gritti A., Cossu G., Galli R. 2002. Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. *Cells Tissues Organs*, 171, 1: 64–76
- Villa A., Snyder E. Y., Vescovi A., Martínez-Serrano A. 2000. Establishment and properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from human CNS. *Experimental Neurology*, 161, 1: 67–84

- Visvader J. E., Lindeman G. J. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: Accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer*, 8, 10: 755–768
- Wa Y.-H., Mentlein R., Knerlich F., Kruse M.-L., Mehdorn H. M., Held-Feindt J. 2008. Expression of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *Journal of Neuro-Oncology*, 86, 1: 31–45
- Wagers A. J., Weissman I. L. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116, 5: 639–648
- Wang J., Sakariassen P. Ø., Tsinkalovsky O., Immervoll H., Bøe S. O., Svendsen A., Prestegarden L., Rosland G., Thorsen F., Stuhr L., Molven A., Bjerkvig R., Enger P. Ø. 2007. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *International Journal of Cancer*, 122, 4: 761–768
- Weiss S., Dunne C., Hewson J., Wohl C. Wheatley M. Peterson A. C., Reynolds B. A. 1996. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *Journal of Neuroscience*, 16, 23: 7599–7609
- Wilhelmsson U., Eliasson C., Bjerkvig R., Pekny M. 2003. Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. *Oncogene*, 29, 22: 3407–3411
- Willaime - Morawek S. 2008. Stem cell research overview. Southampton, University of Southampton: 32 str.
http://www.som.soton.ac.uk/gradschool/students/current/shared/training/timetable/WILLAIME_MORAWEK_Sandrine_Stem_Cell.pdf (18. jun. 2010)
- Yuan X., Curtin J., Xiong Y., Liu G., Waschsmann-Hogiu S., Farkas D. L., Black K. L., Yu J. S. 2004. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 23, 58: 9392–9400
- Zeppernick F., Ahmadi R., Campos B., Dictus C., Helmke B. M., Becker N., Lichter P., Unterberg A., Radlwimmer B., Herold-Mende C. C. 2008. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clinical Cancer Research*, 14, 1: 123–129
- Zhang Q. B., Ji X. Y., Huang Q., Zhu Y. D., Lan Q. 2006. Differentiation profile of brain tumor stem cells: a comparative study with neural stem cells. *Cell Research*, 16, 12: 909–91

ZAHVALA

V prvi vrsti gre iskrena zahvala mojemu somentorju, dr. Urošu Rajčeviću. Najlepša hvala za ponujeno priložnost, vse posredovano znanje, nasvete in potrpljenje.

Mentorju, doc. dr. Miomirju Kneževiću, se zahvaljujem za prevzem mentorstva in strokoven pregled diplome.

Recenzentu, izr. prof. dr. Marku Kreftu, gre zahvala za strokovni pregled diplomske naloge ter pomoč pri prevodih strokovnih izrazov.

Zahvalila bi se rada direktorici Nacionalnega inštituta za biologijo, prof. dr. Tamari Lah Turnšek in vodji Oddelka za genetsko toksikologijo in biologijo raka, prof. dr. Metki Filipič, ki sta mi omogočili izvedbo eksperimentalnega dela diplome. Vsem zaposlenim na oddelku pa se zahvaljujem za prijaznost in pomoč, ki so mi jo nudili.

Zahvaljujem se tudi prim. as. Jasni Šinkovec, dr. med., za vzorce subventrikularnih delov možganov, akademiku prof. dr. Vinku V. Dolencu, dr. med., višjemu svetniku in Seyedu Yousefu Ardebiliju, dr. med. spec. nevrokirurgije, za vzorce glioblastomov. Dr. Christel Claudii Herold – Mende gre zahvala za gliomske matične celice, NorLux Laboratories in Univerzi v Bergnu, Norveška, še posebej prof. dr. Rolfu Bjerkvigu, pa se zahvaljujem za nevroepitelijsko celično linijo HNSC.100.

Nenazadnje gre največja zahvala mojim staršem in sestrama. Hvala, ker ste mi omogočili študij, ter zagotovili prepotreben čas in mir, da sem to delo lahko pripeljala do konca. Hvala, ker brezpogojno verjamete vame.

Iskreno se zahvaljujem še vsem, ki ste mi kakorkoli pomagali pri izdelavi tega dela.

PRILOGE

PRILOGA A: Mnenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko o načrtu raziskave malignih gliomov



KOMISIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

Dr. Uroš Rajčević, dr. vet. med.
Nacionalni inštitut za biologijo
Večna pot 111, 1000 Ljubljana

NACIONALNI INSTITUT ZA BIOLOGIJO	
Datum:	28-09-2009
Številka:	4964
Opomba:	

Štev.: 156/07/09
Datum: 2. 9. 2009

Spoštovani gospod dr. Rajčević,

Komisiji za medicinsko etiko ste 10. 7. 2009 naslovili prošnjo za mnenje o načrtu raziskave z naslovom:

"Identifikacija površinskih označevalcev tumorigenih celic malignega glioma." "Surface marker identification on tumorigenic stem-like cells from malignant glioma."

Komisija je načrt Vaše raziskave ocenila kot etično sprejemljiv in Vam zanjo izdaja svoje soglasje.

S spoštovanjem in lepimi pozdravi,

prof. dr. Jože Trontelj
predsednik Komisije za medicinsko etiko

PRILOGA B: Mnenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko o delu s patološkimi vzorci možganov



KOMISIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

Prof. dr. Tamara Lah Turnšek
Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka
Nacionalni inštitut za biologijo
Večna pot 111, 1000 Ljubljana

NACIONALNI INSTITUT ZA BIOLOGIJO
Pr. 15 - 11- 2007
Dn. m. 1. Štev. 5453

Štev.: 109, 204-6/10/07
Datum obravnave: 23. 10. 2007
Datum dopisa: 2. 11. 2007

Spoštovana gospa prof. dr. Lah Turnšek,

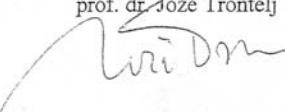
Komisiji za medicinsko etiko ste 17. 9. 2007 poslali prošnjo za oceno 4 raziskav z naslovimi:

"Izražanje cisteinskih katepsinov in njihovih endogenih inhibitorjev v glioblastomih in njihovih izvornih celicah," "Markerji tumorskih izvornih celic v bolnikih z glioblastomi," "Systems biology tools development for cell therapy and drug development" in "Vloga proteoliznih sistemov v malignosti možganskih tumorskih izvornih celic." V sodelovanju z KO za nevrokirurgijo, UKC Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana.

KME je ocenila, da so raziskave z etične strani neoporečne, in Vam s tem izdaja svoje soglasje.

Z lepimi pozdravi in dobrimi željami,

V imenu Komisije za medicinsko etiko:
prof. dr. Jože Trontelj



Naslov: Prof. dr. Jože Trontelj, Inštitut za klinično nevrotizilogijo, Klinični center Ljubljana
Zaloška 7, 1525 Ljubljana. Telefon 01/ 522 1500, telefax 01/ 522 1533, naslov za elektronsko pošto: joze.trontelj@kcl.si