

**Dominika Pszczółkowska**

**Rola osteopontyny/Spp1 i laktadheryny/Mfg-E8  
w modulacji funkcji komórek układu  
odpornościowego w szczurzym glejaku C6**

Praca doktorska wykonana w Pracowni  
Neurobiologii Molekularnej  
Instytutu Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:  
prof. dr hab. Bożena Kamińska-Kaczmarek

Warszawa, 2023

*Pragnę serdecznie podziękować:*

*Pani prof. dr hab. Bożenie Kamińskiej-Kaczmarek za umożliwienie mi wykonania projektu doktorskiego w Pracowni Neurobiologii Molekularnej, stworzenie warunków do rozwoju naukowego i wszelką udzieloną pomoc w trakcie realizacji pracy,*

*dr Aleksandrze Ellert-Miklaszewskiej, dr Annie Gieryng, dr Magdalenie Kijewskiej, dr Michałowi Kłossowi, dr Jakubowi Mieczkowskiemu i dr Karolinie Stępniać za owocną i miłą współpracę,*

*Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Pracowni Neurobiologii Molekularnej za stworzenie miłej atmosfery pracy każdego dnia,*

*Wszystkim pracownikom i doktorantom Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, którzy przyczynili się do powstania tej rozprawy,*

*Dziękuję także za nieustające wsparcie i wiarę moim najbliższym, a zwłaszcza mojemu Mężowi, Synowi, Rodzicom i Teściom, którym dedykuję tę pracę.*

Badania, których wyniki zostały zawarte w niniejszej rozprawie finansowane były przez:

- Narodowe Centrum Nauki: projekt 2012/04/A/NZ3/00630
- Fundację Nauki Polskiej: projekt POMOST/2012-5/4

## SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI .....	9
1. STRESZCZENIE.....	16
2. SUMMARY.....	19
3. WSTĘP .....	21
3.1 Glejaki – ogólna charakterystyka i etiologia .....	21
3.2 Molekularne mechanizmy rozwoju <i>glioblastoma</i> .....	23
3.3 Rola mikrośrodowiska w patogenezie glejaków złośliwych .....	25
3.4 Komórki układu odpornościowego infiltrujące nowotwory .....	26
3.4.1 Limfocyty T regulatorowe .....	26
3.4.2 Limfocyty T cytotoksyczne i pomocnicze.....	28
3.4.3 Mieloidalne komórki supresorowe .....	30
3.4.4 Komórki mieloidalne w ośrodkowym układzie nerwowym .....	32
3.4.4.1 Mikroglej – pochodzenie i funkcje w ośrodkowym układzie nerwowym .....	32
3.4.4.2 Polaryzacja funkcjonalna mikrogleju .....	34
3.4.4.3 Odróżnianie populacji mikrogleju i makrofagów pochodzących ze szpiku .....	36
3.4.4.4 Mikroglej, monocyty i makrofagi infiltrujące nowotwory.....	37
3.4.4.5 Wpływ mikrogleju na inwazyjność komórek glejaka.....	39
3.4.4.6 Wpływ mikrogleju i makrofagów na angiogenezę .....	40
3.5 Czynniki odpowiedzialne za nagromadzenie się i polaryzację GAMs w mikrośrodowisku glejaków .....	41
3.5.1 Czynniki zaangażowane w nagromadzenie się GAMs.....	41
3.5.2 Ligandy receptorów integrynowych jako białka zaangażowane w polaryzację GAMs w glejakach.....	42
3.5.2.1 Struktura i funkcje osteopontyny/SPP1 .....	43
3.5.2.2 Osteopontyna/SPP1 w glejakach.....	45
3.5.2.3 Struktura i funkcje laktadheryny/MFG-E8 .....	47
3.5.2.4 Funkcje biologiczne laktadheryny/MFG-E8.....	48
3.5.2.5 Rola laktadheryny/MFG-E8 w nowotworach .....	50
3.5.2.6 Funkcje periostyny/POSTN.....	52
4. CEL PRACY.....	54
5. MATERIAŁY I METODY .....	55
5.1 Komórki glejaka – charakterystyka i hodowla.....	55
5.2 Uzyskanie komórek linii glejaka C6 ze stabilnie wyciszoną ekspresją Mfg-E8 (shMfg-E8) oraz kontrolnych (shNeg).....	56

5.3 Uzyskanie komórek linii glejaka C6 ze stabilnie wyciszoną ekspresją Spp1 (shSpp1) oraz kontrolnych (shNeg) .....	57
5.4 Testy komórkowe.....	58
5.4.1 Oznaczanie proliferacji komórek – test inkorporacji BrdU.....	58
5.4.2 Ocena żywotności komórek – test metabolizmu MTT.....	58
5.4.3 Pomiar stężenia Spp1 metodą ELISA.....	59
5.5 Analiza poziomu ekspresji genów.....	59
5.5.1 Pozyskiwanie RNA z komórek.....	59
5.5.2 Pozyskiwanie RNA z tkanek.....	59
5.5.3 Synteza cDNA .....	60
5.5.4 Hybrydyzacja do mikromacierzy .....	60
5.5.5 Analiza bioinformatyczna profili ekspresji genów.....	61
5.5.6 PCR w czasie rzeczywistym .....	61
5.6 Implantacja komórek C6 do prążkowiec mózgu szczura .....	62
5.7 Pobranie i przygotowanie tkanek do izolacji RNA.....	63
5.8 Pobranie i przygotowanie materiału do barwień immunohistochemicznych .	64
5.9 Wyznaczanie objętości guzów .....	64
5.10 Barwienia immunohistochemiczne .....	65
5.10.1 Ocena liczby GAMs infiltrujących guzy oraz ekspresji IL-1 $\beta$ w guzie	65
5.10.2 Identyfikacja komórek z wybranymi markerami związanymi z fenotypem pronowotworowym, prozapalnym oraz angiogenezą.....	67
5.11 Sortowanie komórek CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>niski</sup> (mikrogleju) z glejaków C6 .....	69
5.12 Oznaczanie populacji komórek układu odpornościowego w krwi obwodowej szczurów w glejaku .....	70
5.13 Przygotowanie ekstraktów białkowych z tkanek.....	71
5.14 Oznaczanie zawartości białka w ekstraktach białkowych metodą Bradford .....	71
5.15 Oznaczanie aktywności arginazy-1 w ekstraktach białkowych z półkul z guzem shNeg, guzem shSpp1 oraz w półkuli kontralateralnej .....	72
5.16 Przygotowanie konstrukcyjnych kodujących prawidłową lub zmodyfikowaną Spp1 .....	73
5.17 Barwienie komórek glejaka stransfekowanych plazmidami kodującymi różne warianty Spp1 .....	74
5.18 Ocena wpływu peptydu RGD na wzrost guza <i>in vivo</i> .....	74
5.18.1 Implantacja komórek C6 <sup>GFP+LUC+</sup> z peptydem TQRGDIF lub z peptydem kontrolnym (DQIGFRT) do mózgu szczura.....	75
5.18.2 Przyżyciowe obrazowanie guzów u zwierząt .....	75
6. WYNIKI.....	76
6.1 Charakterystyka szczurzego glejaka C6.....	76

6.1.1	Dynamika wzrostu guza oraz obraz histologiczny szczurzego glejaka C6 .....	76
6.1.2	Ilościowa i morfologiczna ocena komórek komórek mieloidalnych Iba-1 <sup>+</sup> infiltrujących glejaki C6 .....	77
6.1.3	Ilościowa ocena komórek mieloidalnych o cechach fenotypu wspierającego nowotwór w glejakiach C6 .....	78
6.1.4	Charakterystyka globalnej odpowiedzi transkrypcyjnej w półkulach z glejakiem C6 .....	80
6.1.5	Analiza profilu ekspresji genów w mikrogleju (CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>niski</sup> ) izolowanego z mózgow kontrolnych lub z glejakiem C6 .....	82
6.1.6	Porównanie profili ekspresji genów glejaka C6 do sygnatur charakterystycznych dla podtypów ludzkich GBM .....	84
6.2	Ocena roli laktadheryny (Mfg-E8) we wzroście guza i modulowaniu TME w szczurzym glejaku C6 .....	85
6.2.1	Ocena wyciszenia ekspresji <i>Mfg-E8</i> w kontrolnych i pozbawionych Mfg-E8 komórkach glejaka C6 .....	85
6.2.2	Wyciszenie ekspresji <i>Mfg-E8</i> nie wpływa na proliferację i żywotność komórek glejaka C6 .....	85
6.2.3	Wyciszenie ekspresji <i>Mfg-E8</i> hamuje wzrost guza <i>in vivo</i> .....	87
6.2.4	Wyciszenie ekspresji <i>Mfg-E8</i> hamuje migrację komórek glejaka <i>in vivo</i> ..	88
6.2.5	Ilościowa i morfologiczna ocena Iba-1 <sup>+</sup> komórek mieloidalnych naciekających guzy kontrolne i z wyciszoną ekspresją <i>Mfg-E8</i> .....	90
6.2.6	Wyciszenia ekspresji <i>Mfg-E8</i> w komórkach glejaka wpływa na polaryzację GAMs.....	91
6.2.7	Wyciszenie <i>Mfg-E8</i> w komórkach glejaka indukuje napływ limfocytów (CD3 <sup>+</sup> ) do guza .....	95
6.2.8	Wyciszenia <i>Mfg-E8</i> w komórkach glejaka nie wpływa na napływ komórek CD8 <sup>+</sup> do guza .....	96
6.2.9	Wyciszenie ekspresji <i>Mfg-E8</i> w komórkach glejaka nie wpływa na powstawanie nowych naczyń krwionośnych w guzie .....	97
6.3	Ocena roli osteopontyny (Spp1) we wzroście guza i modulowaniu mikrośrodowiska nowotworu w szczurzym modelu glejaka .....	99
6.3.1	Ocena poziomu ekspresji <i>Spp1</i> w klonach komórek glejaka C6 .....	99
6.3.2	Wyciszenie ekspresji <i>Spp1</i> w komórkach glejaka C6 nie wpływa na ich proliferację i żywotność.....	100
6.3.3	Wyciszenie ekspresji <i>Spp1</i> w komórkach glejaka C6 hamuje wzrost guza <i>in vivo</i> .....	101
6.3.4	Wyciszenie ekspresji <i>Spp1</i> nie wpływa na migrację komórek glejaka <i>in vivo</i> .....	102
6.3.5	Wyciszenie ekspresji <i>Spp1</i> w komórkach glejaka wpływa na polaryzację GAMs .....	103

6.3.6	Wpływ wyciszenia <i>Spp1</i> na aktywność arginazy-1 w pólkach z guzem .	106
6.3.7	Wyciszenie <i>Spp1</i> w komórkach glejaka wpływa na produkcję indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNos) przez GAMs	106
6.3.8	Wyciszenie <i>Spp1</i> w komórkach glejaka zwiększa ekspresję interleukiny 1 $\beta$ w guzie	108
6.3.9	Wyciszenie <i>Spp1</i> w komórkach glejaka nie wpływa na ekspresję Trem2 w GAMs	109
6.3.10	Ocena nacieku komórek z ekspresją Trem2 i Arignazy-1 w różnych obszarach guza	111
6.3.11	Wyciszenie <i>Spp1</i> w komórkach glejaka nie wpływa na napływ limfocytów (CD3 <sup>+</sup> ) do guza	112
6.3.12	Wyciszenie <i>Spp1</i> w komórkach glejaka nie wpływa na napływ komórek CD8 <sup>+</sup> do guza	113
6.3.13	Wpływ wyciszenia <i>Spp1</i> w komórkach glejaka na obecność subpopulacji komórek układu odpornościowego w krwi obwodowej szczurów z guzem	114
6.4	Wpływ przywrócenia ekspresji prawidłowej <i>Spp1</i> lub jej wariantów w komórkach sh <i>Spp1</i> na wzrost guza <i>in vivo</i>	116
6.5	Wpływ peptydu RGD na wzrost guza i modulowanie TME w szczurzych glejakach <i>in vivo</i>	119
6.5.1	Podanie peptydu RGD z komórkami glejaka nie wpływa na wzrost guza <i>in vivo</i>	119
6.1.1	Peptyd RGD nie wpływa na napływ GAMs do guza oraz funkcjonalny fenotyp tych komórek	121
7.	DYSKUSJA	123
7.1	Glejak C6 jest wiarygodnym modelem zwierzęcym w badaniach nad patobiologią GBM	123
7.2	Laktadheryna i osteopontyny jako czynniki kształtujące mikrośrodowisko glejaków	129
7.2.1	Udział Mfg-E8 w regulacji proliferacji i przeżywalności komórek glejaka ..	129
7.2.2	Wpływ Mfg-E8 na inwazyjność glejaka.	131
7.2.3	Mfg-E8 jako immunomodulator mikrośrodowiska guza	133
7.2.4	Udział Mfg-E8 w regulacji angiogenezy w glejakach	136
7.3	Rola wydzielanej przez glejaka osteopontyny/ <i>Spp1</i> we wzroście i modulacji mikrośrodowiska guza	137
7.3.1	Wpływ <i>Spp1</i> na wzrost guza i inwazyjność	137
7.3.2	Rola <i>Spp1</i> w kształtowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej	139
7.3.2.1	Heterogenność komórek mieloidalnych naciekających glejaki ...	142
7.3.2.2	Udział <i>Spp1</i> w regulacji nacieku wybranych populacji limfocytów w glejaku	144

7.3.3	Wpływu różnych form Spp1 na wzrost guza <i>in vivo</i> .....	146
7.3.4	Wpływ peptydu RGD na napływ i aktywację GAMs .....	149
8.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....	152
9.	LISTA PUBLIKACJI Z UDZIAŁEM AUTORA .....	154
10.	PIŚMIENNICTWO .....	155



## WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

APC (ang. *antigen presenting cells*) – komórki prezentujące antygen

Arg-1 (ang. *arginase-1*) – arginaza 1

AS (ang. *Adenosarcoma*) – gruczolakomięsak

ATM (ang. *ataxia telangiectasia mutated*) – kinaza serynowo-treoninowa aktywowana przez przerwania obu nici DNA

ATRX (ang. *ATP-dependent chromatin-remodeling complex*) – zależny od ATP kompleks przebudowujący chromatynę

BAMs (ang. *CNS border-associated macrophages*) – makrofagi okołonaczyniowe

bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*) – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów

BM-MΦ (ang. *bone marrow-derived macrophages*) – makrofagi pochodzące ze szpiku

BrdU – bromodeoksyurydyna

BSA (ang. *bovine serum albumin*) – surowicza albumina bydlęca

CAR-T (ang. *chimeric antigen T cells receptors*) – komórki T z receptorem antygeny chimerowego

CCR2 (ang. *C-C motif receptor 2*) – receptor chemokin typu CC 2

CD (ang. *cluster of differentiation*) – antygen różnicowania komórkowego

CDKs (ang. *cyclin-dependent kinases*) – kinazy cyklinozależne

cDNA (ang. *complementary DNA*) – komplementarny DNA

CITE-seq (ang. *Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing*) – scRNA-seq z jednoczesnym oznaczeniem panelu białek powierzchniowych

COX2 (ang. *cyclooxygenase-2*) – cyklooksygenaza 2

CSF-1R (ang. *colony stimulating factor 1 receptor*) – receptor czynnika stymulującego kolonie makrofagów

CSF-2R (ang. *colony stimulating factor 2 receptor*) – receptor czynnika stymulującego kolonie granulocytów i makrofagów

CT (ang. *threshold cycle*) – cykl progowy

CTLA-4 (ang. *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) – Antygen 4 cytotoksycznych limfocytów T

CytoTOF (ang. *cytometry by time of flight*) – cytometria masowa

DAB – 3,3'-diaminobenzzydina

DAPI – 4',6-diamidyno-2-fenyloindol

DC (ang. *dendritic cells*) – komórki dendrytyczne

DDR (ang. *DNA Damage Response*) – ścieżka odpowiedzi na uszkodzenia DNA

DEPC – pirowęglanu dietylu

DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) – pożywka Eagle'a w modyfikacji Dulbecco

DMF – N,N-dimetyloformamid

DMSO – dimetylosulfotlenek

dNTP – deoksynukleotydy (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)

EAE (ang. *experimental autoimmune encephalomyelitis*) – autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia

ECM (ang. *extracellular matrix*) – macierz zewnątrzkomórkowa

EDTA – kwas wersenowy

EGF (ang. *epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu

EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*) – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu

EGTA – kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'-tetraoctowy

EMT (ang. *epithelial-mesenchymal transition*) – przejście epitelialno-mezenchymalne

ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinases*) – kinaza regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe

ETA1 (ang. *Early T Lymphocyte Activation Protein 1*) – białko wczesnej aktywacji limfocytów T

FAK (ang. *focal adhesion kinase*) – kinaza płytek przylegania

FasL – ligand Fas

FITC (ang. *fluorescein isothiocyanate*) – izocyjanian fluoresceiny

FIZZ1 (ang. *Resistin-like molecule α* lub *found In inflammatory zone 1*) – białko podobne do rezystyny

FoxP3 (ang. *forkhead box P3*) –czynnik transkrypcyjny

Gal-3 – galektyna 3

GAMs (ang. *glioma associated myeloid cells*) – komórki mieloidalne towarzyszące glejakom

GBM (łac. *Glioblastoma*) – glejak wielopostaciowy

GCM (ang. *glioma conditioned medium*) – pożywka znad komórek glejaka

G-CSF/CSF-3 (ang. *Granulocyte colony-stimulating factor/ colony stimulating factor 3*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów

GDNF (ang. *glial-derived neurotrophic factor*) – czynnik troficzny pochodzenia glejowego

GFP (ang. *green fluorescent protein*) – białko zielonej fluorescencji

GITR (ang. *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor (TNF) receptor*) – receptor czynnika martwicy nowotworu indukowany glukokortykoidami

GM-CSF/CSF-2 (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/colony stimulating factor 2*) – czynnik tworzenia kolonii granulocytów i makrofagów

G-MDSCs (ang. *granulocytic-MDSCs*) – granulocytarne mieloidalne komórki supresorowe

GSC (ang. *glioma stem-like cells*) – komórki macierzyste glejaka

HBSS (ang. *Hanks' balanced salt solution*) – zbalansowany roztwór soli Hanka

HGF/SF (ang. *hepatocyte growth factor/scatter factor*) – czynnik wzrostu hepatocytów/czynnik rozproszony

HLA (ang. *human leukocyte antigens*) – ludzkie antygeny leukocytarne

HPLC (ang. *high-performance liquid chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa

Iba-1 (ang. *ionized calcium binding adaptor molecule 1*) – antygen specyficzny dla komórek mieloidalnych

ICAM (ang. *intercellular adhesion molecule*) – międzykomórkowa molekula adhezyjna

IDH 1 (ang. *isocitrate dehydrogenase 1*) – dehydrogenaza izocytrynianowa 1

IDH2 (ang. *isocitrate dehydrogenase 2*) – dehydrogenaza izocytrynianowa 2

IFN- $\gamma$  – interferon  $\gamma$

Ig – immunoglobulina

IL (ang. *interleukin*) – interleukina

IL-1RA (ang. *interleukin-1 receptor antagonist*) – antagonist receptor IL-1

IL-2R $\alpha$ /CD25 (ang. *membrane-resident interleukin-2 receptor  $\alpha$* ) – receptor dla interleukiny 2, podjednostka  $\alpha$  (CD25)

IMCs (ang. *immature myeloid cells*) – niedojrzałe komórki mieloidalne

INK4a (ang. *inhibitor of CDK4*) – inhibitor kinaz cyklinozależnych 4a

iNOS (ang. *inducible nitric oxide synthase*) – indukowana syntaza tlenu azotu

IRF8 (ang. *Interferon Regulatory Factor 8*) – czynnik regulacyjny interferonu 8

ITGAM – integryna  $\alpha$ M

LAP (ang. *latency-associated peptide*) – peptyd związany z latencją

LOX1 (ang. *lectin-type oxidized LDL receptor 1*) – lektyno-podobny receptor 1 utlenionych LDL

LPS – lipopolisacharyd

LTR (ang. *long terminal repeat*) – długie powtórzenia końcowe

Ly-6 (ang. *lymphocyte antigen-6*) – antygen 6 limfocytów

MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*) – kinaza białkowa aktywowana mitogenami

MCPs (ang. *monocyte chemotactic proteins*) – białka chemotaktyczne monocytów

M-CSF/CSF-1 (ang. *macrophage colony-stimulating factor/ Colony stimulating factor 1*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów

MDSCs (ang. *myeloid-derived suppressor cells*) – mieloidalne komórki supresorowe

Mes-GBM (ang. *mesenchymal glioblastoma*) – podtyp mezenchymalny glejaka wielopostaciowego

MFG-E8 (ang. *milk fat globule-epidermal growth factor 8*) – laktadheryna

MHC (ang. *major histocompatibility complex class*) – główny kompleks zgodności tkankowej

MIP-1 (ang. *macrophage inflammatory protein-1*) – białko zapalne makrofagów

M-MDSCs (ang. *monocytic-MDSCs*) – monocytarne mieloidalne komórki supresorowe

MMPs (ang. *matrix metalloproteinases*) – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej

MR (ang. *mannose receptor*) – receptor mannozowy

MT1-MMP (ang. *membrane type 1 matrix metalloproteinase*) – związana z błoną metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 1

mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin kinase*) – kinaza tzw. ssaczy cel rapamycyny

MTT – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu

NCS (ang. *newborn calf serum*) – surowica cielęca

NF1 (ang. *neurofibromin 1*) – neurofibromina 1

NF $\kappa$ B (ang. *nuclear factor kappa Light chain enhancer of activated B cells*) – czynnik transkrypcyjny, czynnik jądrowy  $\kappa$ B

OPN – osteopontyna

OSF-2 (ang. *osteoblast-specific factor 2*) – czynnik specyficzny dla osteoblastów

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PBS (ang. *phosphate buffered saline*) – buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PD1 (ang. *programmed cell death protein*) – białko programowanej śmierci komórkowej

PDGF (ang. *platelet-derived growth factor*) – płytkopochodny czynnik wzrostu

PDGFR $\alpha$  (ang. *platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$* ) – receptor czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego  $\alpha$

PD-L1 (ang. *PD-ligand 1*) – ligand białka PD

PE (ang. *phosphatidylethanolamin*) – fosfatydyloetanolamina

PFA – paraformaldehyd

PGE2 – prostaglandyna E2

PI3K (ang. *phosphoinositide 3-kinase*) – 3-kinaza fosfoinozytydu

PMN-MDSCs (ang. *polymorphonuclear-MDSCs*) – wielojądrowe mieloidalne komórki supresorowe

PMP (ang. *platelet microparticles*) – mikropęcherzyki

PMSF (ang. *phenylmethylsulfonyl fluoride*) – fluorek fenylometylosulfonylu

POSTN – periostyna

PRR (ang. *pattern recognition receptors*) – receptory rozpoznających wzorce

PS (ang. *phosphatidylserine*) – fosfatydyloseryna

PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) – białko supresorowe z aktywnością fosfatazy

qPCR (ang. *quantitative real-time PCR*) – ilościowy PCR w czasie rzeczywistym

Ras (ang. *Rat Sarcoma Virus*) – białko o aktywności GTPazy

Rb (ang. *Rb protein, retinoblastoma protein*) – białko retinoblastoma

RET (ang. *Rearranged during Transfection*) – protoonkogen rearanżowany podczas transfekcji, kinaza tyrozynowa

RRM2 (ang. *Ribonucleotide Reductase Regulatory Subunit M2*) – podjednostka reduktazy rybonukleotydowej M2

RNA (ang. *ribonucleic acid*) – kwasy rybonukleinowe

ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu

RRE (ang. *rev responsive element*) – miejsce przyłączania się wirusowego czynnika transkrypcyjnego

rRNA – rybosomalny RNA

RTK (ang. *receptor tyrosine kinase*) – receptorowe kinazy tyrozynowe

scRNAseq (ang. *Single cell RNA-Sequencing*) – sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek

SDS – dodecylosiarczan (VI) sodu

SEGA (ang. *subependymal giant cell astrocytoma*) – podwyściółkowe gwiazdziaki olbrzymiokomórkowe

shRNA (ang. *short hairpin RNA*) – krótkie fragment RNA o strukturze szpilki

SIBLINGS (ang. *small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins*) – rodzina małych N-glikozylowanych białek oddziałujących z integrynami

SPP1 (ang. *Secreted Phosphoprotein 1*) – wydzielane fosforylowane białko 1, osteopontyna

STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*) – przekaźniki sygnału i aktywatory transkrypcji, rodzina czynników transkrypcyjnych

TAMs (ang. *tumor associated macrophages*) – makrofagi towarzyszące nowotworom

Tc (ang. *T cytotoxic*) – limfocyty T cytotoksyczne

TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*) – repozytorium zawierające dane genomiczne nowotworów

TGF- $\beta$  (ang. *transforming growth factor  $\beta$* ) – transformujący czynnik wzrostu  $\beta$

Tgm2 – transglutaminaza 2

Th (ang. *T helper*) – limfocyty T pomocnicze

Tie-2 (ang. *endothelium-specific receptor tyrosine kinase 2*) – kinaza tyrozynowa specyficzna dla śródbłonka naczyń

TLR (ang. *toll-like receptors*) – receptory toll-podobne

TME (ang. *tumor microenvironment*) – mikrośrodowisko nowotworu

TNF (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu

TNF-R (ang. *tumor necrosis factor receptor*) – receptor czynnika martwicy nowotworu

Treg (ang. *T regulatory*) – limfocyty T regulatorowe

Trem2 (ang. *triggering receptor expressed on myeloid cells-2*) – receptor na komórkach mieloidalnych 2

uPA (ang. *urokinase plasminogen activator*) – urokinaza aktywatora plazminogenu

VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu śródbłonka naczyń

vWF – czynnik von Willebranda

WHO (ang. *World Health Organization*) – Światowa Organizacja Zdrowia

Wnt (ang. *wingless typed*) – szlak przekazywania sygnału zaangażowany w rozwój i nowotworzenie

WPRE (ang. *post-transcriptional regulatory element*) – potranskrypcyjny element regulatorowy

PRZYJĘTY SYSTEM ZAPISU NAZW GENÓW I BIAŁEK (na przykładzie MFG-E8, ale stosowany dla większości używanych w tekście genów i białek):

MFG-E8 – ludzkie białko (drukowane litery);

*MFG-E8* – ludzki gen (drukowane litery, kursywa);

Mfg-E8 – białko kręgowców z wykluczeniem człowieka (tylko pierwsza wielka litera);

*Mfg-E8* – gen kręgowców z wykluczeniem człowieka (tylko pierwsza wielka litera, kursywa).

## 1. STRESZCZENIE

Glejaki złośliwe to najczęściej występujące nowotwory ośrodkowego układu nerwowego, wśród których najbardziej agresywny jest glejak wielopostaciowy (GBM, łac. *glioblastoma*). Obecnie leczenie pacjentów z GBM obejmuje maksymalną resekcją guza oraz radio- i chemioterapię z wykorzystaniem temozolomidu. Jednakże z powodu dyfuzyjnego wzrostu całkowita chirurgiczna resekcja jest utrudniona, a bariera krew-mózg ogranicza penetrację niektórych leków. Sprawia to, że skuteczność terapii jest bardzo niska i średnia długość przeżycia pacjentów z GBM wynosi 15 miesięcy. Wielkoskalowa analiza ekspresji genów wykonana w oparciu o dane zgromadzone w bazie TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*) wykazała różnice w profilach ekspresji genów w GBM, dzięki którym wyodrębniono trzy podtypy molekularne GBM: proneuralny, mezenchymalny (Mes-GBM) i klasyczny. Mes-GBM jest najbardziej agresywny i charakteryzuje się silnym naciekiem komórek mieloidalnych tworzących specyficzne mikrośrodowisko guza (TME, ang. *tumor microenvironment*).

W glejakach komórki nienowotworowe w TME ulegają przeprogramowaniu i wspierają wzrost guza, angiogenezę i uczestniczą w tworzeniu immunosupresji. Szczególnie licznie w TME reprezentowane są komórki mieloidalne: mikrogleję i naciekające z obwodu monocyty/makrofagi (kolektywnie nazywane GAMs, ang. *Glioma-associated myeloid cells*), które w glejakach wspierają wzrost nowotworu. W Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN zidentyfikowano białka wydzielane przez glejaka C6: osteopontynę (Spp1) i laktadherynę (Mfg-E8) jako potencjalne czynniki zaangażowane w polaryzację GAMs. Spp1 i Mfg-E8 są ligandami integrzyn, a wzrost ich ekspresji obserwuje się w wielu typach nowotworów.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena roli obu białek w patogenezie glejaka złośliwego, ze szczególnym uwzględnieniem ich udziału w modulacji TME. Wykorzystano model szczurzego glejaka C6, który histopatologicznie wykazuje wiele podobieństw do ludzkich GBM. Aby określić stopień podobieństwa szczurzego glejaka do ludzkich GBM, przeanalizowano globalne zmiany ekspresji genów oraz porównano je do sygnatur charakterystycznych dla podtypów ludzkich GBM, wykazując największe podobieństwo glejaka C6 do Mes-GBM. Analiza genów ulegających ekspresji



w mikrogleju izolowanym z glejaka C6 potwierdziła immunosupresyjny i wspierający nowotwór fenotyp tych komórek.

Aby zweryfikować hipotezę o udziale Spp1 i Mfg-E8 w przeprogramowaniu i aktywacji GAMs, wykorzystano linie komórkowe glejaka C6 ze stabilnie wyciszoną ekspresją *Spp1* i *Mfg-E8*. Stwierdzono znaczne zahamowanie wzrostu guzów pozbawionych Spp1 i Mfg-E8 *in vivo*. W guzach pozbawionych Mfg-E8 obserwowano zmniejszenie migracji komórek glejaka. Przeprowadzana analiza fenotypu GAMs (poprzez immunocytochemiczną ocenę obecności specyficznych markerów) wykazała, że oba białka zaangażowane są w indukcję pronowotworowego, immunosupresyjnego fenotypu. Wyciszenie *Spp1* hamowało aktywację komórek mieloidalnych, co może wskazywać na przynajmniej ich częściowy powrót do stanu przypominającego „nadzorujący”. W przypadku guzów pozbawionych Mfg-E8 obserwowano ponadto wzrost odsetka komórek CD3<sup>+</sup> w guzie. W guzach pozbawionych Spp1 obserwowano wzrost odsetka komórek z ekspresją prozapalnej IL-1 $\beta$ , co może świadczyć o inicjacji odpowiedzi zapalnej. Analiza komórek Arg-1<sup>+</sup> i Trem2<sup>+</sup> w guzach kontrolnych wykazała, że markery są obecne w odrębnych populacjach komórek mieloidalnych występujących w różnych obszarach guza, co potwierdza heterogenność GAMs w glejaku.

Zidentyfikowano motyw w cząsteczce Spp1, który ma kluczowe znaczenie dla wzrostu guza. Przeprowadzono doświadczenia typu *rescue*, w których wykorzystano konstrukty kodujące różne warianty Spp1. Przywrócenie ekspresji prawidłowej Spp1 przywracało wzrost guza. Podobny wpływ miała transfekcja wariantów Spp1 z mutacją w miejscu cięcia przez trombinę bądź z delecją regionu C-końcowego. Z kolei przywrócenie ekspresji wariantu Spp1 z punktową mutacją w motywie RGD nie przywracało wzrostu guza, co potwierdza kluczową rolę motywu RGD w interakcjach z komórkami TME. Podanie peptydu z motywem RGD, który *in vitro* hamował aktywację mikrogleju przez glejaka działając jako kompetetywny inhibitor oddziaływania Spp1 i Mfg-E8 z integrzynami, nie wpłynęło na wielkość guza i aktywację mikrogleju *in vivo* w porównaniu do peptydu kontrolnego (SCR).

Podsumowując, wykazano, że produkowane przez glejaka Spp1 i Mfg-E8 są kluczowe dla wzrostu guza *in vivo* oraz modulacji TME, szczególnie dla aktywacji komórek mieloidalnych infiltrujących guzy. Choć różne regiony Spp1 są istotne w wielu aspektach rozwoju nowotworu (takich jak adhezja, migracja czy oddziaływanie z GSCs), to w badanym modelu kluczową rolę we wzroście guza *in*

*vivo* odgrywa motyw RGD Spp1 i jego oddziaływania z docelowymi receptorami integrynowymi.

## 2. SUMMARY

Malignant gliomas are the most common CNS tumors, among which the most aggressive is glioblastoma multiforme (GBM). Currently, the treatment of GBM includes maximal tumor resection combined with radio- and chemotherapy (temozolomide), however, diffuse growth makes surgical resection of the tumor difficult and the blood-brain barrier limits the penetration of some antitumor drugs. As a consequence, the effectiveness of therapy is very low and the average survival of GBM patients is 15 months. Large-scale analysis of gene expression based on data from TCGA database showed significant differences in transcriptional profiles in malignant gliomas. This led to identification of three molecular subtypes of GBM: proneural, mesenchymal and classical. Mes-GBM is characterized by the highest aggressiveness and the strongest infiltration of immune cells, which together with other stromal cells form the tumor microenvironment (TME).

Non-neoplastic components of TME play an important role in gliomas by influencing tumor growth, angiogenesis and immunosuppression. The largest immune population within the TME are GAMs (glioma-associated myeloid cells) which undergo reprogramming into tumor supportive cells. In the Laboratory of Molecular Neurobiology, IBD PAS, osteopontin (Spp1) and lactadherin (Mfg-E8) were identified as proteins potentially involved in this process. Both Spp1 and Mfg-E8 are ligands for integrins, and their expression is increased in many cancers.

The aim of this study was to assess their role in the pathogenesis of malignant gliomas, in particular in modulation of the TME. For this purpose, a rat C6 glioma model was used, in which intracranial tumors bear the histopathological similarities to human GBMs. To further determine a degree of similarity between the rat C6 gliomas and human GBMs, global changes in gene expression were analyzed and compared to signatures specific to human GBM subtypes, showing the greatest similarity between C6 glioma and Mes-GBM. Analysis of genes expressed in microglia isolated from C6 gliomas confirmed the tumor-supportive properties of these cells.

To verify the hypothesis about the participation of Spp1 and Mfg-E8 in the pro-tumoral activation of GAMs, C6 glioma cells with stably silenced expression of Spp1 and Mfg-E8 were used. Significant inhibition of the growth of Spp1 and Mfg-E8 depleted gliomas *in vivo* was observed. In Mfg-E8 depleted tumors, also the migration

of glioblastoma cells into brain parenchyma was restricted. The analysis of the GAMs phenotype showed that both proteins are involved in the induction of the pro-tumoral, immunosuppressive activation. Knockdown of Spp1 inhibited the activation of myeloid cells, suggesting at least a partial return to a surveying-like state. In Mfg-E8 depleted tumors, the percentage of CD3<sup>+</sup> cells increased. Although the activation of GAMs was inhibited in Spp1 depleted tumors, an increase in the percentage of cells expressing the pro-inflammatory interleukin 1 $\beta$  was observed, which may indicate the initiation of an efficient antitumor response. The analysis of Arg-1<sup>+</sup> and Trem2<sup>+</sup> cells in control tumors showed that the proteins are expressed in distinct populations of myeloid cells found in different tumor regions, confirming the heterogeneity of GAMs in glioblastoma.

The key motifs of Spp1 crucial for a tumor growth were identified. For this purpose, a rescue experiment was performed, in which constructs encoding different variants of Spp1 were used. Reestablishing expression of the wild type Spp1 in glioma cells depleted of Spp1 (shSpp1) restored tumor growth, confirming the key role of Spp1 in supporting glioma growth. Expression of the Spp1 variant with a point mutation in the RGD motif did not restore tumor growth. This phenomenon was not observed for variants with a mutation at the thrombin cleavage site or with a deletion of the C-terminal region, confirming the key role of the Spp1 RGD motif in tumor growth *in vivo*. However, the application of a short peptide containing the RGD motif, which could potentially act as a competitive inhibitor for Spp1 and Mfg-E8, did not affect tumor size and microglial activation *in vivo* compared to the control peptide (SCR).

Altogether, this study demonstrated that glioma-derived Spp1 and Mfg-E8 are crucial for *in vivo* tumor growth and reprogramming of the TME, especially for the activation of tumor-infiltrating myeloid cells. Although Spp1 in cancer shows a pleiotropic effect and different regions of the protein are important in many aspects of tumor development (such as adhesion, migration or interaction with GSCs), the RGD motif and its interactions with target integrins play the key role in tumor growth *in vivo*.

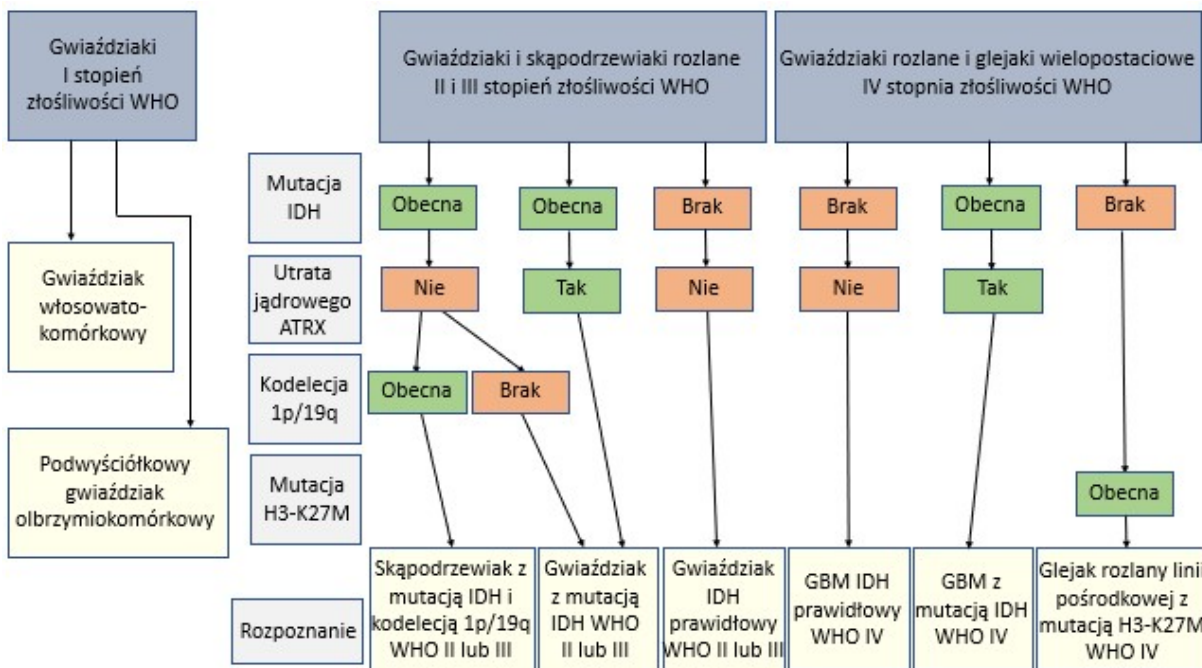
### 3. WSTĘP

#### 3.1 Glejaki – ogólna charakterystyka i etiologia

Glejaki (łac. *glioma*) to najczęściej występujące nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN) pochodzące ze zmienionych nowotworowo neuronalnych komórek macierzystych lub prekursorów komórek glejowych (Alcantara Llaguno i Parada, 2016; Alcantara Llaguno i wsp. 2015, Ilkanizadeh i wsp. 2014). Zgodnie z kryteriami przyjętymi przez Światową Organizację Zdrowia (WHO ang. *World Health Organization*), na podstawie przynależności do typu komórek glejowych oraz cech histopatologicznych, takich jak: indeks mitotyczny, stopień unaczynienia i morfologia komórek, wyróżnia się nowotwory gleju gwiaździstego – gwiaździaki (*astrocytoma*), gleju skąpowypustkowego – skąpodrzewiaki (*oligodendroglioma*) oraz gleju wyściełającego komory mózgu i kanału rdzenia kręgowego – wyściółczaki (*ependymoma*) (Louis i wsp. 2007). Większość, bo około 70% diagnozowanych glejaków, stanowią gwiaździaki. Klasyfikacja przyjęta przez WHO obejmuje także czterostopniowy podział glejaków ze względu na stopień złośliwości. Do łagodnych nowotworów o ograniczonym wzroście (I stopień złośliwości wg. WHO) należą: gwiaździaki włosowatokomórkowe (*pilocytic astrocytoma*) i podwyściółkowe gwiaździaki olbrzymiokomórkowe (*subependymal giant cell astrocytoma*, SEGA). Wśród glejaków II stopnia WHO wyróżnia się: gwiaździaki włosowatośluzakowate (*pilomyxoid astrocytoma*), gwiaździaki rozlane (*diffuse astrocytoma*) i żółtakogwiaździaki pleomorficzne (*pleomorphic xanthoastrocytoma*) wykazujące atypię cytologiczną. Gwiaździaki o wysokim stopniu złośliwości, o naciekającym charakterze, wykazujące anaplazję oraz wysoką aktywność mitotyczną zakwalifikowano do III stopnia WHO reprezentowanego przez gwiaździaki anaplastyczne (*anaplastic astrocytoma*) i IV stopnia WHO, do którego należą: glejaki wielopostaciowe (dawniej *glioblastoma multiforme*, GBM; obecnie *glioblastoma*), glejakomięsaki (*gliosarcoma*) i glejaki wielopostaciowe olbrzymiokomórkowe (*giant cell glioblastoma*) (Loius i wsp. 2007; Kordek 2010; Westphal i Lamszus, 2011).

W Polsce rocznie odnotowuje się około 1300 nowych przypadków glejaków, z czego 600 stanowią glejaki o wysokim stopniu złośliwości – glioblastoma (na podstawie danych Narodowego Funduszu Zdrowia). Glejaki IV stopnia WHO charakteryzują się zróżnicowaniem morfologicznym komórek i atypią jądra komórkowego, obecnością licznych ognisk nekrozy pseudopalisadowej, wysokim

indeksem mitotycznym oraz silnym unaczynieniem (obecne są licznie mikronaczynia i naczynia kłębuszkowate) (Louis i wsp. 2007; Wen i Kesari, 2008). Wśród nich najczęściej diagnozowana jest glioblastoma (GBM) – nowotwór, który stanowi 12-15% wszystkich nowotworów ośrodkowego układu nerwowego i 60-75% nowotworów pochodzenia astrocytarnego (Ohgaki i Kleihues 2007). Dane statystyczne wskazują na wyższą zachorowalność mężczyzn niż kobiet (1,6:1) (Yang i wsp. 2019a).



Ryc. 1. Schemat podsumowujący aktualne wytyczne Światowej Organizacji Zdrowia w diagnozowania glejaków (na podstawie Louis i wsp. 2016). Rozpoznanie opiera się na badaniu histopatologicznym wspomaganym badaniami markerów genetycznych takich jak mutacja w genie *IDH1/2*.

GBM jest najbardziej agresywnym nowotworem wśród glejaków, gdyż z powodu dyfuzyjnego wzrostu silnie infiltruje parenchymę mózgu, co utrudnia chirurgiczną resekcję guza. Obecnie terapia GBM poza maksymalną resekcją guza obejmuje radio- i chemioterapię z wykorzystaniem temozolomidu, jednak nie jest to leczenie skuteczne i średnia długość przeżycia pacjentów z GBM wynosi 15 miesięcy (Stupp i wsp. 2014; Vigneswaran i wsp. 2015). U 90% operowanych pacjentów następuje szybki nawrót choroby, zaś ponowna resekcja jest możliwa w zaledwie

25% przypadków (Bloch i wsp. 2012). Ponowny wzrost guza najczęściej obserwuje się w rejonie jego pierwotnej lokalizacji, ale również w miejscach odległych w stosunku do pierwotnego nowotworu, np. w kontralateralnej półkuli (Holland, 2000).

Próby zastosowania immunoterapii z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających białko programowanej śmierci komórkowej (PD1, ang. *programmed cell death protein*) oraz ligand białka PD1 (PD-L1, ang. *PD-ligand 1*) nie przyniosły obiecujących wyników w leczeniu GBM, mimo udokumentowanego działania w innych guzach litych (Wang i wsp. 2016, Daubon i wsp. 2020, Reardon i wsp. 2020). Terapię złośliwych guzów mózgu utrudnia również fakt, że ze względu na wysoką heterogenność na poziomie molekularnym i komórkowym pewna populacja komórek nowotworowych pozostaje oporna na stosowane chemioterapeutyki i odpowiada za wznowę choroby. Ponadto w początkowych stadiach choroby nowotwór często rozwija się bezobjawowo i nim wdrożone zostanie leczenie, guz osiąga duże rozmiary. Z tych powodów, mimo pewnych postępów w terapii glejaków, GBM nadal charakteryzuje się bardzo wysoką śmiertelnością sięgającą 95% w ciągu 5 lat od rozpoznania klinicznego (Preusser i wsp. 2011; Shir i wsp. 2011). Obecnie trwają badania kliniczne III fazy z wykorzystaniem przeciwciał anty-PD-L1 przy jednoczesnym blokowaniu białka CTLA4 (ang. *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*), co prowadzić ma do reaktywacji funkcji limfocytów T w guzie u pacjentów ze wznową GBM (na podstawie <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02017717>). Innym atrakcyjnym celem terapeutycznym są receptorowe kinazy tyrozynowe (RTK, ang. *receptor tyrosine kinase*), które regulują kluczowe dla komórki procesy, takie jak podział, różnicowanie, przeżywalność, migracja i metabolizm. W badaniach klinicznych testuje się obecnie inhibitory kinaz RTK oraz związanych z nimi ścieżek sygnałowych (Ras/MAPK/ERK oraz Ras/PI3K/AKT) (Alexandru i wsp. 2020).

### **3.2 Molekularne mechanizmy rozwoju glioblastoma**

Ze względu na różnice genetyczne i biologiczne wyróżnia się pierwotne GBM, które powstają *de novo* oraz wtórne GBM, rozwijające się z glejaków o niższym stopniu złośliwości (Furnari i wsp. 2007; Wen i Kesari, 2008). Typ pierwotny pojawia się najczęściej u pacjentów między 55 a 65 rokiem życia i dotyczy większości (ok. 95%) diagnozowanych przypadków. Charakteryzuje się krótkim czasem rozwoju objawów klinicznych i gorszymi rokowaniami dla pacjentów (Louis i wsp. 2007).

Z kolei wtórna postać GBM spotykana jest u młodszych pacjentów (poniżej 50 roku życia) i wiąże się z lepszą prognozą (mediana przeżycia dłuższa o 3 miesiące). Wtórne GBM rozwijają się najczęściej z gwiaździaków anaplastycznych, rzadziej w wyniku transformacji gwiaździaków rozlanych (gwiaździaka tucznomórkowego lub włóknistego). Średni czas transformacji w przypadku glejaków II stopnia złośliwości do GBM wynosi ok. 5 lat, zaś gwiaździaków anaplastycznych (III stopień WHO) około 18 miesięcy (Ohgaki i Kleihues, 2005). Około 70% gwiaździaków o niskim stopniu złośliwości może ulec transformacji do guzów złośliwych w 5-10 lat od postawienia diagnozy.

W obrazie histopatologicznym glejaki pierwotne i wtórne są nie do odróżnienia, jednak pod względem molekularnym stanowią odrębne jednostki chorobowe. Pierwotne GBM cechują zmiany molekularne, takie jak: amplifikacja genu *EGFR* kodującego receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*) (występująca w 36% przypadków), delecja genu supresorowego *p16<sup>INK4A</sup>* kontrolującego wzrost komórek przez inhibicję kinaz zależnych od cyklin CDK4 i CDK6 (w 31% przypadków) oraz mutacja genu supresorowego *PTEN* (w 25% przypadków). We wtórnych GBM stwierdza się obecność mutacji w genie *TP53* (60% przypadków), podwyższoną ekspresję genu *PDGFR $\alpha$*  kodującego receptor czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego PDGFR $\alpha$  (ang. *platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$* ) oraz mutacje w genach *IDH1* i *IDH2* kodujących dehydrogenazy izocytrynianowe 1 i 2 (ang. *isocitrate dehydrogenase*) (Tabatabai i wsp. 2010; Vigneswaran i wsp. 2015; Preusser i wsp. 2015). Pomimo różnic na poziomie molekularnym, GBM pierwotne i wtórne wykazują dość podobne odpowiedzi na konwencjonalne terapie (Fisher i wsp. 2007; Furnari i wsp. 2007; Wang i Jiang, 2013).

Wielkoskalowa analiza ekspresji genów wykonana w oparciu o dane zgromadzone w bazie TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*) wykazała różnice w profilach ekspresji genów skorelowane ze zmianami w genach *EGFR*, *NF1* (ang. *Neurofibromin 1*), *PDGFR $\alpha$*  i *IDH1/2* w glejakach złośliwych, co doprowadziło do wyodrębnienia czterech podtypów molekularnych GBM: proneuralnego, mezenchymalnego, klasycznego i neuralnego (Brennan, 2011; Phillips i wsp. 2006; Verhaak i wsp. 2010). Z wyróżniania podtypu neuralnego później zrezygnowano stwierdzając ekspresję grupy genów będących „sygnaturą” prawidłowych komórek mózgu. Podtypy na poziomie klinicznym różnią się agresywnością, tempem progresji



nowotworu i rokowaniami dla pacjentów. Podtyp mezenchymalny (Mes-GBM) związany jest z mutacjami genów *NF1*, *TP53*, *INK4a/ARF* i wysoką ekspresją białek zaangażowanych w angiogenezę. Stwierdzono zwiększoną wrażliwość Mes-GBM na działanie inhibitorów szlaków przekazywania z udziałem białek Ras, PI3K oraz inhibitorów angiogenezy. W podtypie klasycznym występują mutacje genów kodujących białka PTEN i INK4a/ARF, amplifikacja genu *EGFR* oraz większa wrażliwość na działanie klasycznych leków i radioterapię. Podtyp proneuralny charakteryzuje obecność mutacji w genach *IDH* i *TP53*, amplifikacja genów *PDGFRA*, *PDGFRB* i *MET* oraz wrażliwość na działanie inhibitorów szlaków angażujących HIF-1, PI3K i PDGFRA. Wśród wyróżnionych podtypów, Mes-GBM charakteryzuje się największą agresywnością i opornością na standardowe terapie przeciwnowotworowe (Verhaak i wsp. 2010). Z kolei Ceccarelli i wsp. (2016) zaproponowali kolejną klasyfikację glejaków, wyróżniającą 7 podtypów, wzbogaconą w analizę danych dotyczących metylacji DNA oraz niektórych mutacji (np. *IDH1*). Klasyfikacje oparte na kryteriach molekularnych mogą być użyteczne przy tworzeniu spersonalizowanych terapii dla pacjentów z GBM.

### **3.3 Rola mikrośrodowiska w patogenezie glejaków złośliwych**

Glejaki złośliwe są nowotworami bardzo heterogennymi, nie tylko na poziomie molekularnym, ale również na poziomie składu komórkowego. W guzie, poza komórkami nowotworowymi, licznie występują też inne typy komórek, takie jak komórki układu odpornościowego, komórki budujące naczynia krwionośne oraz astrocyty (Fecci i wsp. 2006; Lohr i wsp. 2011; Wainwright i wsp. 2013, de Vlaeminck, 2016), które wraz z macierzą zewnątrzkomórkową (ECM, ang. *extracellular matrix*) tworzą swoistą niszę nazywaną mikrośrodowiskiem nowotworu (TME, ang. *tumor microenvironment*). Silny naciek różnych komórek jest spowodowany wydzielaniem przez komórki glejaka szeregu czynników, takich jak cytokiny, chemokiny oraz czynniki wzrostu.

Liczne dane doświadczalne i kliniczne wskazują na istotną rolę mikrośrodowiska we wzroście guza, przerzutowaniu i odpowiedzi na terapię w wielu nowotworach (Mantovani i wsp. 2002, Lewis i wsp. 2006, Lewis i wsp. 2016). Pomimo iż naciekające komórki nie są stransformowane, w sąsiedztwie guza ulegają aktywacji i pełnią często funkcję odmienną niż w warunkach prawidłowych. Choć w początkowym etapie procesu nowotworzenia (a także w nowotworach

niezłśliwych) układ odpornościowy może kontrolować i hamować wzrost nowotworu, to w dalszych etapach niektóre z naciekających guz komórek wręcz sprzyjają dalszej progresji nowotworu wpływając na wzrost guza, angiogenezę i tworzenie stanu lokalnej immunosupresji poprzez wyciszenie zarówno swoistej, jak i nieswoistej odpowiedzi odpornościowej (Fricke i Gabrilovich, 2006; Okada i wsp., 2009, Gieryng i wsp. 2017).

Wśród molekularnych podtypów GBM, Mes-GBM wykazuje najsilniejszą infiltrację komórek układu odpornościowego, zwłaszcza komórek mieloidalnych określanych jako GAMs (ang. *Glioma-associated myeloid cells*), w porównaniu do podtypów proneuralnego i klasycznego (Behnan i wsp. 2019, Kaffes i wsp. 2019, Kaminska i wsp. 2021). Należy podkreślić, że glejaki są nowotworami heterogennymi, nie tylko ze względu na liczne rodzaje infiltrujących je komórek, ale również w populacjach komórek tego samego typu obserwuje się różnice w ekspresji genów. W związku z tym w badaniach nad mikrośrodowiskiem bardzo obiecująca jest strategia analizy transkryptomu na poziomie pojedynczej komórki (ang. *single-cell omics*) (Müller i wsp. 2017, Kaminska i wsp. 2021).

### **3.4 Komórki układu odpornościowego infiltrujące nowotwory**

Znaczenie nacieku limfocytarnego w guzach jako czynnika prognostycznego badano w wielu typach nowotworów, w tym w glejakach. Limfocyty T (CD3<sup>+</sup>) stanowią heterogenną populację o zróżnicowanym immunofenotypie i funkcjach. W mikrośrodowisku glejaka licznie występują różne subpopulacje tych komórek, w szczególności limfocyty T pomocnicze (Th; CD4<sup>+</sup>), limfocyty T cytotoksyczne (Tc, CD8<sup>+</sup>) i limfocyty T regulatorowe (Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) (Fecci i wsp. 2006; Hussain i wsp. 2006; Lohr 2011; Alexiou i wsp. 2013).

#### **3.4.1 Limfocyty T regulatorowe**

Naciek limfocytów T regulatorowych (Treg) charakteryzujących się obecnością markerów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> stwierdzono w wielu typach nowotworów, w tym w glejakach. Ich obecność jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym i koreluje ze stopniem złośliwości oraz opornością na chemio- i radioterapię (Wainwright i wsp. 2013). Według różnych doniesień Treg stanowią od 1% wszystkich limfocytów T (Lohr i wsp. 2011) do 14% wszystkich limfocytów CD4<sup>+</sup> w GBM (Jacobs i wsp. 2010). Limfocyty T infiltrujące glejaki mają głównie fenotyp

CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> oraz CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Kaminska i wsp. 2021, Hussain i wsp. 2006). Profilowanie ekspresji genów w próbkach ludzkich GBM wykazało zwiększoną ekspresję markerów uznawanych za związane z naciekiem limfocytów Treg, takich jak *FOXP3* (ang. *forkhead box P3*), *IL-2Rα/CD25* (ang. *membrane-resident interleukin-2 receptor α*), *CTLA-4* czy *GITR* (ang. *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor (TNF) receptor*) (Wainwright, i wsp. 2013).

Działanie pronowotworowe Treg w glejakach wynika z hamowania proliferacji i funkcji limfocytów T w mikrośrodku nowotworu (Schmidt i wsp. 2015, Tanaka i Sakaguchi, 2017), zarówno w wyniku bezpośrednich kontaktów międzykomórkowych, jak i dzięki wydzielanym czynnikom, takim jak transformujący czynnik wzrostu TGF-β (ang. *transforming growth factor β*), interleukina IL-10 czy IL-35, co prowadzi do wytworzenia stanu tolerancji na nowotwór (von Boehmer, 2005; Zou, 2006; Yamaguchi i Sakaguchi, 2006; Lohr i wsp. 2011). Z powodu obecności w mikrośrodku TGF-β (produkowanego między innymi przez komórki glejaka oraz GAMs) dochodzi do indukcji produkcji czynnika transkrypcyjnego FOXP3 w naiwnych limfocytach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> i ich dojrzewania w kierunku komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> o aktywności regulatorowej (Andersson i wsp. 2008). Prawdopodobnie dzięki obecności błonowej, latentnej formy TGF-β związanego z peptydem LAP (ang. *latency-associated peptide*) limfocyty Treg mogą indukować ekspresję *FOXP3* w sąsiadujących komórkach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, a co za tym idzie modulować ich właściwości supresyjne (Nakamura i wsp. 2001; Piccirillo i wsp. 2002). Komórki Treg wykorzystują wiązanie zakotwiczonego w błonie TGF-β do bezpośredniego blokowania funkcji efektorowych komórek NK (ang. *natural killer*) i blokowania receptorów NKG2D (ang. *Natural killer group 2D*) na powierzchni tych komórek (Ghiringhelli i wsp. 2005). Wykazano, że peptyd blokujący TGF-β zwiększa odpowiedź przeciwnowotworową przez blokowanie funkcji limfocytów Treg (Gil-Guerrero i wsp. 2008). Ponadto wykazano, że Treg mogą indukować produkcję TGF-β w innych limfoidalnych i nielimfoidalnych komórkach (Shevach i wsp. 2008). Limfocyty Treg hamują także wydzielanie IL-12 przez limfocyty efektorowe. Mogą także ograniczać proliferację prezentujących antygen limfocytów B, a także hamować w nich produkcję i zmianę klas przeciwciał (Lim i wsp. 2005; Zhao i wsp. 2006). Komórki Treg mogą także wykorzystywać cytotoksyczność z udziałem perforyn i granzymów jako mechanizm supresji. W mysich guzach granzym B był nieobecny w spoczynkowych komórkach Treg, natomiast był indukowany przez

lokalne czynniki w mikrośrodowisku guza (Cao i wsp. 2007). Szczególnie wrażliwe na lizę zależną od Treg są komórki CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, niedojrzałe komórki dendrytyczne i monocyty (Cao i wsp. 2007).

Ostatnie badania łączące testy funkcjonalne, sekwencjonowanie RNA i cytometrię masową (CyTOF, ang. *cytometry by time of flight*) pokazały, że populacja Treg nie jest jednorodna. U pacjentów z GBM, jak i u osób zdrowych, krążące Treg PD-1<sup>hi</sup> wykazywały zmniejszoną supresję limfocytów efektorowych CD4<sup>+</sup>, produkcję interferonu (IFN)- $\gamma$  i molekularne markery wyczerpania. Analiza krążących i naciekających guz Treg od pacjentów z GBM leczonych przeciwciałami blokującymi PD-1 za pomocą CyTOF wykazała, że leczenie zmienia profil krążących Treg w kierunku bardziej wyczerpanego fenotypu, dodatkowo zwiększając wytwarzanie IFN- $\gamma$  (Lowther i wsp. 2016). Przeciwciało agonistyczne ( $\alpha$ GITR) blokujące GITR (ang. *glucocorticoid-induced TNFR-related receptor*) na komórkach Treg promuje różnicowanie komórek Treg CD4<sup>+</sup> do efektorowych komórek T CD4<sup>+</sup>, zmniejsza supresję przeciwnowotworowej odpowiedzi odpornościowej za pośrednictwem Treg i indukuje silne działanie przeciwnowotworowe komórek efektorowych w mysim złośliwym glejaku. Przeprogramowane komórki Treg indukują geny odpowiedzi Th1, produkcję IFN $\gamma$  i nabywają aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych. Przeciwciała  $\alpha$ GITR i  $\alpha$ PD1 działają synergistycznie zwiększając przeżycie i indukując całkowitą eliminację nowotworu oraz pamięć immunologiczną u niektórych zwierząt. Co więcej,  $\alpha$ GITR i  $\alpha$ PD1 działają w synergii ze standardowym leczeniem nowodiagnozowanych GBM i zwiększają wskaźniki wyleczeń w modelach GBM (Amoozgar i wsp. 2021).

### **3.4.2 Limfocyty T cytotoksyczne i pomocnicze**

Limfocyty T cytotoksyczne (Tc, CD8<sup>+</sup>) wraz z komórkami NK odpowiadają za eliminację komórek nieprawidłowych na dwóch drogach: 1) poprzez indukcję apoptozy zależną od uwalniania perforyny, granzymów A i B oraz granulizyny z ziaren cytolitycznych; 2) przez oddziaływania TNF w błonie komórki efektorowej z receptorem (TNF-R) w błonie komórki docelowej (Smyth i wsp. 2006; Zhou, 2010).

Limfocyty T pomocnicze (Th; CD4<sup>+</sup>) są komórkami wspomagającymi odpowiedź typu humoralnego i komórkowego, zarówno poprzez bezpośredni kontakt, jak i wydzielane cytokiny. Rola limfocytów T pomocniczych zależy od rodzaju aktywacji. Limfocyty Th1 mogą wydzielać czynniki o właściwościach

przeciwnowotworowych, takie jak TNF i IFN $\gamma$ . Z kolei limfocyty Th2 produkują immunosupresyjne cytokiny, które hamują odpowiedź przeciwnowotworową gospodarza poprzez np. obniżanie cytotoxyczności limfocytów T CD8<sup>+</sup> (Zammaron i wsp. 2011). Limfocyty pomocnicze należące do subpopulacji Th17 i produkujące IL-17 o działaniu proangiogennym wykazują głównie działanie pronowotworowe (Bindea i wsp. 2011).

Limfocyty Th rozpoznają antygen prezentowany w połączeniu z głównym kompleksem zgodności tkankowej MHC II (ang. *major histocompatibility complex class II*) i działają pobudzająco na aktywację, proliferację i różnicowanie limfocytów B i prekursorów limfocytów T cytotoxycznych. Mają również zdolność do pobudzania makrofagów. Pod kątem wydzielanych cytokin komórki Th1 przypominają limfocyty T cytotoxyczne i wytwarzają między innymi IL-2, IL-12, i IL-18. Cytokiny te zaangażowane są we wzrost i różnicowanie limfocytów B i wspomagają syntezę przeciwciał IgA, IgE i IgG4. Poza udziałem w odpowiedzi humoralnej, limfocyty Th1 pełnią istotną rolę we wspomaganiu odpowiedzi typu komórkowego. Produkują IL-2 stymulującą między innymi cytotoxyczność limfocytów oraz TNF- $\beta$  i IFN- $\gamma$  działające pobudzająco na makrofagi. Poprzez IL-5 pobudzają także różnicowanie i aktywację eozynofili (Romagnani i wsp. 1994). Limfocyty Th2 poprzez produkcję IL-4, IL-5 i IL-10 mają działanie immunosupresyjne (Zammaron i wsp. 2011).

W glejakiach złośliwych stwierdzono mniejszy odsetek komórek CD8<sup>+</sup> w nacieku limfocytarnym, przy jednoczesnym wzroście liczby komórek CD4<sup>+</sup> w porównaniu do glejaków o niskim stopniu złośliwości (Yu i wsp. 2003; Kmiecik i wsp. 2013). Komórki T infiltrujące glejaki mają na powierzchni inhibitorowe receptory: PD-1, CTLA-4 i LAG-3 (ang. *lymphocyte activation gene-3*) (Woroniccka I wsp. 2018). Ponadto wykazano, że większość komórek CD4<sup>+</sup> infiltrujących GBM ma właściwości immunosupresyjne i hamuje odpowiedź komórkową (Waziri i wsp. 2008). Inne dane wskazują na silną infiltrację glejaków złośliwych zarówno przez limfocyty T pomocnicze (definiowane jako populacja CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) oraz T cytotoxyczne (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). Akumulacja obu typów komórek była korzystnym czynnikiem prognostycznym dla pacjentów, jednakże nie znaleziono takiego związku z poziomem infiltracji guza przez populację CD4<sup>+</sup> (Kmiecik i wsp. 2013).

Terapia komórkami T z chimerowym receptorem antygeny (CAR-T), która jest skuteczna w leczeniu hematologicznych nowotworów złośliwych, ma ograniczoną

skuteczność w guzach litych, takich jak GBM. Terapia z inhibitorami punktów kontrolnych także zawodzi w GBM z powodu braku funkcjonalnych limfocytów T w guzie. Jest mało prawdopodobne, aby podejścia z użyciem monoterapii zapewniły skuteczność przeciwnowotworową, co skłania do zastosowania skojarzonego podejścia terapeutycznego. Łącząc zarówno terapię CAR-T z blokadą punktów kontrolnych w GBM, obchodzi się pewne ograniczenia każdej z terapii i być może takie podejście będzie bardziej skuteczne (Shen i wsp. 2020).

### 3.4.3 Mieloidalne komórki supresorowe

Mieloidalne komórki supresorowe (MDSCs, ang. *myeloid-derived suppressor cells*) to heterogenna grupa niedojrzałych komórek mieloidalnych (IMCs, ang. *immature myeloid cells*), składająca się z niedojrzałych makrofagów, granulocytów, komórek dendrytycznych (DC, ang. *dendritic cells*) i innych komórek we wczesnych stadiach różnicowania, ale wykazujących silne działanie immunosupresyjne. W warunkach prawidłowych MDSCs powstają w szpiku kostnym i różnicują do dojrzałych makrofagów, komórek dendrytycznych i granulocytów. MDSCs wykazują ekspresję białek powierzchniowych charakterystycznych dla komórek linii mieloidalnej, takich jak CD33, CD15, CD11b i CD34 (Almand i wsp. 2001; Schmielau i Finn, 2001; Zea i wsp. 2005; Filipazzi i wsp. 2007; Hoechst i wsp. 2008), nie wykazując przy tym ekspresji CD14 i HLA-DR właściwych dla monocytów. U myszy populację tę identyfikuje się na podstawie ko-ekspresji dwóch markerów: CD11b i Gr-1 (Fujita i wsp. 2010). MDSCs można podzielić na dwie podgrupy w zależności od ekspresji cząsteczek Ly6C i Ly6G (obie reagują z przeciwciałem anti-Gr-1) (Hestdal i wsp. 1991; Youn i wsp. 2008). Komórki o fenotypie CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>high</sup> mają morfologię zbliżoną do monocytów i nazywane są monocytarnymi MDSCs (M-MDSCs, ang. *monocytic-MDSCs*). Komórki CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup> morfologicznie przypominają granulocyty i nazywane są granulocytarnymi MDSCs (G-MDSCs, ang. *granulocytic-MDSCs* lub wielojądrzaste MDSCs (PMN-MDSCs ang. *polymorphonuclear-MDSCs*). Obecnie u myszy nie ma dobrych markerów powierzchniowych, które pozwalają na oddzielenie klasycznych neutrofilów od PMN-MDSCs lub klasycznych monocytów od M-MDSCs. MDSCs u myszy rozróżnia się funkcjonalnie na podstawie ich zdolności do immunosupresji innych komórek odpornościowych. U ludzi, chociaż PMN-MDSC i neutrofile mają te same markery na powierzchni komórki, PMN-MDSC są oczyszczane w gradiencie o niższej gęstości

(1,077  $\mu\text{g/ml}$ ), podczas gdy neutrofile są oczyszczane w gradiencie o wyższej gęstości (1,1–1,2  $\mu\text{g/ml}$ ). W ostatnich latach za swoisty marker ludzkich PMN-MDSC, który można wykorzystać do identyfikacji tych komórek we krwi i guzach pacjentów z nowotworem, uważa się lektynopodobny receptor 1 utlenionych LDL (LOX1, ang. *lectin-type oxidized LDL receptor 1*). Z kolei M-MDSC można odróżnić od monocytów we krwi obwodowej przez wykrywanie ekspresji MHC klasy II (Veglia i wsp. 2021).

Populacja MDSCs występuje w śledzionie, szpiku kostnym, krwi obwodowej oraz mikrośrodowisku guza, zwłaszcza u pacjentów z zaawansowanymi nowotworami (Srivastava i wsp. 2010). Podstawowymi mechanizmami immunosupresyjnego działania komórek MDSCs jest wyciszenie aktywności komórek NK, supresja czynności limfocytów T w sposób zależny i niezależny od antygeny oraz indukcja apoptozy subpopulacji limfocytów T (Marvel i Gabrilovich, 2015). MDSCs produkują IL-10, która hamuje aktywność przeciwnowotworową limfocytów Th1, limfocytów T cytotoksycznych, komórek dendrytycznych oraz komórek NK (Gabrilovich i Nagaraj, 2011; Condamine i Gabrilovich, 2011; Gabrilovich i wsp. 2012; Hoechst i wsp. 2009), jednocześnie pobudzając akumulację limfocytów Treg i Th2. Innym mechanizmem odpowiedzialnym za immunosupresyjne działanie MDSCs jest wysoka ekspresja arginazy-1 (Arg-1, ang. *Arginase-1*) i tlenu azotu w M-MDSCs oraz wysoki poziom reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) w G-MDSCs (Gabrilovich i Nagaraj, 2009; Condamine i Gabrilovich, 2011; Youn i wsp. 2008; Movahedi i wsp. 2008). Arginaza-1 może być wydzielana bezpośrednio do mikrośrodowiska i powodować deplecję L-argininy (Gabrilovich i wsp. 2010). Usuwanie L-argininy z mikrośrodowiska spowodowane jest również ekspresją na powierzchni MDSCs transportera aminokwasów CAT-2B, który transportuje L-argininę do wnętrza komórki czyniąc ją dostępną dla wewnątrzkomórkowej Arg-1 (Ochoa i wsp. 2007). Deplecja L-argininy z mikrośrodowiska hamuje proliferację limfocytów T cytotoksycznych i prowadzi do inhibicji łańcucha CD3- $\zeta$  i produkcji IL-2, a w konsekwencji do apoptozy tych komórek (Sica i Bronte, 2007; Youn i Gabrilovich, 2010). Postulowany jest także udział TGF- $\beta$  w tworzeniu stanu lokalnej immunosupresji przez MDSCs (Yang i wsp. 2008), deplecji cysteiny z mikrośrodowiska (Srivastava i wsp. 2010) czy wzmożonej ekspresji cyklooksigenazy 2 (Cox2) i prostaglandyny E2 (PGE2) w MDSCs (Rodriguez i wsp. 2005).

W mysich glejakach wykazano obecność populacji CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>, zarówno w guzach tworzonych *de novo* (Fujita i wsp. 2010), jak i w syngenicznym modelu GL261 (Zhu i wsp. 2011). Wykazano także, że deplecja tej populacji prowadzi do zahamowania wzrostu guza *in vivo*. U pacjentów z GBM stwierdzono zwiększony poziom krążących we krwi MDSCs (CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>) (Raychaudhuri i wsp. 2011). Obserwowano również wzrost odsetka M-MDSCs i G-MDSCs w krwi obwodowej u pacjentów z GBM w porównaniu do próbek kontrolnych, przy czym w masie guza identyfikowano głównie G-MDSCs (Gielen, i wsp. 2015). W surowicy pacjentów z GBM obserwowano także zwiększoną aktywność arginazy-1 i podwyższony poziom czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF, ang. *Granulocyte colony-stimulating factor*) (Raychaudhuri i wsp. 2011, Sippel i wsp. 2011). Farmakologiczne hamowanie arginazy-1, jak również suplementacja L-argininy prowadziła do całkowitego odblokowania funkcji limfocytów T (Sippel i wsp. 2011). Należy jednak podkreślić, że MDSCs nie są jedynym źródłem arginazy-1 w mikrośrodowisku guza.

### **3.4.4 Komórki mieloidalne w ośrodkowym układzie nerwowym**

#### **3.4.4.1 Mikroglej – pochodzenie i funkcje w ośrodkowym układzie nerwowym**

Mikroglej stanowi populację komórek mieloidalnych występującą w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). W warunkach prawidłowych w zależności od rejonu OUN stanowi około 10-20% wszystkich komórek (Perry i wsp. 1985; Lawson i wsp. 1992). Najwięcej mikrogleju u myszy występuje w rejonach hipokampa, kresomózgowia, zwojów podstawy mózgu oraz istoty czarnej (Kilic i wsp. 2008; Lehnardt, 2010). Komórki mikrogleju wraz z makrofagami okołonaczyniowymi i makrofagami opon mózgowych odpowiedzialne są za utrzymanie homeostazy w mózgu poprzez stałe monitorowanie mikrośrodowiska. Mikroglej pełni też szereg funkcji niezwiązanych z odpowiedzią odpornościową: uczestniczy w regulacji tworzenia nowych synaps i kontroluje liczbę komórek nerwowych w trakcie rozwoju OUN (Blank i Prinz, 2013), współdziała w modyfikacji połączeń synaptycznych w dojrzałym OUN (Tremblay i wsp. 2010), a także jest zaangażowany w kontrolę proliferacji i różnicowania komórek neuronalnych. Wielofunkcyjne działanie mikrogleju wskazuje na istotną rolę tych komórek w rozwoju i utrzymaniu homeostazy OUN.



Prekursory mikrogleju, które wywodzą się z niedojrzałych prekursorów erytromieloidalnych z woreczka żółtkowego, zasiedlają OUN w trakcie rozwoju embrionalnego (E9.5) dając początek mikroglejowi, którego populacja odnawia się w trakcie życia organizmu z istniejących komórek. Makrofagi okołonaczyniowe (BAMs, ang. *CNS border-associated macrophages*) także zasiedlają OUN we wczesnym rozwoju i różnicują niezależnie od mikrogleju (E10.5) (Kierdorf i wsp. 2013, Sacks i wsp. 2018). Pozostałe makrofagi specyficzne tkankowo wywodzą się z komórek szpiku kostnego – monocytów, które powstają z krwiotwórczych komórek macierzystych migrujących do wątroby płodowej i szpiku kostnego. Mikroglej wykazuje ekspresję specyficznych genów odróżniających te komórki od innych makrofagów tkankowych (Butovsky i wsp. 2014).

Prolifercja i różnicowanie mikrogleju kontrolowane jest przez kilka czynników. Podobnie jak w przypadku większości innych populacji makrofagów, zarówno BAMs, jak i mikroglej są zależne od przekazywania przez receptor czynnika stymulującego kolonie makrofagów (CSF-1R, ang. *Colony stimulating factor 1 receptor*) (Ginhoux i wsp. 2010, Mrdjen i wsp. 2018, Van Hove i wsp. 2019). Ponadto różnicowanie mikrogleju i BAMs regulowane jest przez czynniki transkrypcyjne PU.1 i IRF8 (Goldmann i wsp. 2016, Kierdorf i wsp. 2013, Van Hove i wsp. 2019). Także TGF- $\beta$  ma kluczowe znaczenie dla rozwoju mikrogleju, zwłaszcza w indukcji genów kanonicznych mikrogleju (Butovsky i wsp. 2014). Delecja *Tgfb2* w mikrogleju w okresie postnatalnym prowadzi do aktywacji tych komórek (Arnold i wsp., 2019, Buttgereit i wsp., 2016, Zöller i wsp., 2018).

W warunkach prawidłowych komórki mikrogleju mają charakterystyczną morfologię z licznymi, rozgałęzionymi wypustkami. Badania przyżyciowe myszy z mikroglejem wyznakowanym białkiem zielonej fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescent protein*) z wykorzystaniem mikroskopu 2-fotonowego wykazały, że „spoczynkowy” mikroglej aktywnie penetruje swoje sąsiedztwo przy użyciu licznych wypustek (Nimmerjahn i wsp. 2005). Dlatego zasugerowano zmianę nazwy „mikroglej spoczynkowy” (ang. *resting microglia*) na „mikroglej nadzorujący” (ang. *surveying microglia*), która lepiej odzwierciedla aktywny charakter tych komórek (Hanisch i Kettenmann, 2007). Aktywowany mikroglej zmienia swoją morfologię z rozgałęzionej na ameboidalną, co wiąże się ze znacznym powiększeniem ciała komórki i zanikiem wypustek cytoplazmatycznych.

#### 3.4.4.2 Polaryzacja funkcjonalna mikrogleju

Do aktywacji mikrogleju, podobnie jak makrofagów obwodowych, dochodzi w obecności patogenów, bodźców stresowych czy uszkodzenia tkanek. Ze względu na różnice w bodźcach aktywujących oraz sposób odpowiedzi, który moduluje funkcje układu odpornościowego, w dużym uproszczeniu wyróżnić można dwa główne typy aktywacji tych komórek: prozapalny M1 oraz cytoprotekcyjny M2. Podział ten oparty jest o analogię do polaryzacji makrofagów obwodowych i komórek NK – NK1 i NK2 (Murray i wsp. 2014).

Mikroglej aktywowany prozapalnie (typu M1) zaangażowany jest w odpowiedź na infekcje lub uszkodzenia komórek, co w warunkach doświadczalnych jest symulowane przez podanie lipopolisacharydu (LPS) czy cytokin takich jak IFN $\gamma$  (Van Ginderachter i wsp. 2006; Fairweather i Cihakova, 2009; Hamilton, 2002). Polaryzacja w kierunku komórek M1 zachodzi na drodze aktywacji ścieżek sygnałowych związanych z pobudzeniem receptorów TLR (ang. *Toll-like receptors*), które należą do receptorów rozpoznających wzorce (PRR, ang. *pattern recognition receptors*). Stymulacja TLR prowadzi do aktywacji szlaku kinaz MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*) i czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B (ang. *nuclear factor kappa Light chain enhancer of activated B cells*). Mikroglej M1 wykazuje zwiększoną produkcję mediatorów stanu zapalnego, takich jak reaktywne formy tlenu, tlenek azotu (NO), czynnik chemotaktyczny monocytów 1 (MCP-1, ang. *monocyte chemoattractant protein-1*), białko zapalne makrofagów (MIP-1, ang. *macrophage inflammatory protein-1*) czy cytokin prozapalnych, np. IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 i TNF $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) (MacMicking i wsp. 1997; Takami i wsp. 1997; Babcock i wsp. 2003; Verreck i wsp. 2004; Chen i wsp. 2004; Jack i wsp. 2005; Mantovani i wsp. 2006). Aktywowany zapalnie mikroglej charakteryzuje się podwyższoną ekspresją MHCII i ekspresją białek kostymulujących prezentację antygeny CD80 i CD86 (Boehm i wsp. 1997; Mantovani i Sica, 2010). Funkcjonalnie są to komórki prezentujące antygen (APC, ang. *antigen presenting cells*), które aktywują odpowiedź limfocytów Th1 i Th17 (Coffelt i wsp. 2009). Mikroglej M1 ma swojej powierzchni zwiększoną liczbę receptorów dla opsonin, np. CD16 (Fc $\gamma$ RIII), co ułatwia fagocytozę. Wykazuje także zdolność do pobierania jonów żelaza ze środowiska, co ogranicza ich dostępność dla patogenów (Nucera i wsp. 2011; Sindrilaru i wsp. 2011).

Aktywacja mikrogleju w kierunku komórek M2 obserwowana jest w procesach regeneracyjnych po zapaleniu, gojeniu ran, infekcjach pasożytniczych, chorobach nowotworowych. Komórki M2 wykazują dużą aktywność fagocytarną i zaangażowane są także w usuwanie komórek apoptotycznych (Murray i Wynn, 2011a; Murray i Wynn, 2011b; Ouchi i wsp. 2011). Mikroglej o fenotypie M2 produkuje cytokiny o charakterze przeciwzapalnym, na przykład IL-10 czy TGF $\beta$ 1, a także antagonistę receptora IL-1 (IL-1RA) oraz charakteryzuje się niską produkcją tlenu azotu i IL-12 (Kaminska i wsp. 2016). Ponadto mikroglej i makrofagi typu M2 wykazują zwiększoną ekspresję receptorów błonowych, takich jak CD23 (zwanego też Fc $\epsilon$ RII), receptora mannozowego (MR, ang. *mannose receptor*) CD206, CD14, CD209 i receptorów zmiataczy (ang. *scavenger receptors*) – CD163 i CD204 (Mantovani i wsp. 2004b, Van Genderachter i wsp. 2006, Martinez i wsp. 2006, Tiemessen i wsp. 2007). W mikrogleju i makrofagach M2 dochodzi do indukcji ekspresji arginazy-1, co związane jest ze zmianą metabolizmu L-argininy w kierunku produkcji ornityny i poliamin, co w konsekwencji zmniejsza aktywność indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS, ang. *inducible nitric oxide synthase*) i obniża ilość NO produkowanego przez komórki (Munder i wsp. 1998; Gordon, 2003). Arginaza-1 często uważana jest za marker fenotypu M2, jednak należy pamiętać, że ekspresja tego białka bywa wykrywana w tkankowo-specyficznych makrofagach M1, a także jest silnie indukowana po zakażeniu *Mycobacterium*. Aktywację komórek mieloidnych typu M2 można potwierdzić przy użyciu kilku markerów (Gieryng i wsp. 2017). Mikroglej i makrofagi o fenotypie podobnym do M2 wykazują ekspresję receptora IL-4 (IL-4R), białka FIZZ1 (ang. *found In inflammatory zone 1*), receptorów aktywacji proliferacji peroksysomów gamma i delta (PPAR $\gamma$  i  $\delta$ ) czy eozynofilowego białka Ym1/2 (Gabrusiewicz i wsp. 2011). Takie komórki wytwarzają szereg czynników, które sprzyjają reorganizacji macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak metaloproteinazy macierzy (MMPs, ang. *matrix metalloproteinases*) (Gieryng i wsp. 2017). Makrofagi o fenotypie M2, mimo że wykazują ekspresję MHCII, mają obniżoną lub zahamowaną zdolność do prezentacji antygeny innym komórkom układu odpornościowego (Munder i wsp. 1998; Gordon, 2003).

Należy podkreślić, że podział na stany aktywacji typu M1 i M2 jest bardzo uproszczony i obejmuje jedynie dwa skrajne typy aktywacji. W przypadku makrofagów obwodowych zaproponowano rozszerzenie klasyfikacji i podział na fenotypy M1, M2a, M2b i M2c w zależności od kombinacji czynników stanowiących

stymulatory (Mantovani i wsp. 2004a). Wyróżnia się także makrofagi M2d i makrofagi towarzyszące nowotworom (TAMs, ang. *tumor associated macrophages*) jako osobne podgrupy, choć ta ostatnia wykazuje wiele cech wspólnych z typem M2 (Murray i wsp. 2014). Coraz bardziej powszechne jest unikanie tego typu podziałów i stosowanie klasyfikacji opisowej, ze szczególnym uwzględnieniem źródła izolacji komórek, warunków hodowli, typu stymulacji oraz przeprowadzanej analizy (Martinem i wsp. 2014, Walentynowicz i wsp. 2018).

#### **3.4.4.3 Odróżnianie populacji mikrogleju i makrofagów pochodzących ze szpiku**

Wyniki badań wskazują, że mikroglej i makrofagi obwodowe (pochodzące ze szpiku) mają podobne białka powierzchniowe, takie jak integryna  $\alpha M$  (ITGAM) znana również jako CD11b (ang. *cluster of differentiation molecule 11b*), receptory TLR, glikoproteina CD68, glikoproteina F4/80, receptor komplementu 3 (CR3/MAC-1, ang. *complement receptor 3/macrophage 1 antigen*) (Masuda i wsp. 2020, Ochocka i Kaminska, 2021), zatem skierowane przeciwko nim przeciwciała nie rozróżniają tych komórek w badaniach immunocytochemicznych. Obecnie identyfikacji tych populacji dokonuje się metodą cytometrii przepływowej na podstawie analizy różnic ekspresji antygenu różnicowania komórkowego CD45. W warunkach fizjologicznych mikroglej charakteryzuje się niższą ekspresją antygenu CD45 w porównaniu do makrofagów obwodowych pochodzących ze szpiku kostnego (Sedgwick i wsp. 1991, Dick i wsp. 1995). Należy jednak pamiętać, że ekspresja CD45 w mikrogleju może wzrastać w warunkach patologicznych, co stanowi ograniczenie w użyteczności tego białka jako markera odróżniającego mikroglej od makrofagów (Müller i wsp. 2015). Dopiero połączenie badań śledzących pochodzenie komórek (ang. *lineage tracing*) oraz transkryptomiki pojedynczych komórek pozwoliło wyłonić kilka markerów użytecznych przy rozróżnianiu makrofagów i mikrogleju. Badania transkryptomiczne GAMs z mysiego glejaka metodą sekwencjonowania pojedynczych komórek (scRNAseq) wykazały, że genami, które ulegają różnicowej i silnej ekspresji są *Tmem119* w mikrogleju i *Lgals3* (kodujący białko galektyny 3, Gal-3) w monocytach/makrofagach obwodowych. Wskazuje to na możliwość użycia *Tmem119* i *Lgals3* lub kodowanych przez nie białek jako markerów pozwalających na odróżnienie mikrogleju od monocytów/makrofagów w guzie (Ochocka i wsp. 2021). Także *Itga4* i kodowane przez niego białko CD49D jest dobrym markerem

monocytów i makrofagów pochodzących ze szpiku (ang. *bone marrow-derived macrophages*, BM-MΦ) (Su i wsp. 2016).

Wielkoskalowe badania transkryptomyczne z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania RNA i mikromacierzy ekspresyjnych wykazały istnienie pewnych różnic we wzorze ekspresji genów w mikrogleju i BM-MΦ. Spośród wszystkich zidentyfikowanych transkryptów około 30% wykazywało unikalną ekspresję, tj. wyłącznie w komórkach mikrogleju bądź wyłącznie w komórkach makrofagów. W odróżnieniu od BM-MΦ, mysji mikroglej charakteryzował się ekspresją genów *hexb*, *trem2*, *gpr34*, *tmem119*, *cx3cr1*, *siglech* oraz *p2ry12* i *p2ry13* (kodujących receptory purynergiczne). Z kolei BM-MΦ wyróżniała większa ekspresja genów takich jak *cxcr7*, *ifitm3*, *pilra* i *itgb2* (Hickman i wsp. 2016).

Kwestią otwartą pozostaje, czy w warunkach patologicznych unikalny wzór ekspresji tych genów w komórkach mikrogleju i BM-MΦ pozostaje zachowany. Wyniki badań przeprowadzonych w mysim modelu autoimmunizacyjnego zapalenia mózgu i rdzenia (EAE, ang. *experimental autoimmune encephalomyelitis*) z wykorzystaniem myszy chimerowych *Cx3cr1<sup>GFP/+</sup>* wykazały, że *p2ry12* nie ulega ekspresji w BM-MΦ infiltrujących OUN. Zaś analiza z wykorzystaniem mikromacierzy ekspresyjnych potwierdziła, że unikalny wzór ekspresji genów odróżniający mikroglej i BM-MΦ zostaje utrzymany nawet w warunkach stanu zapalnego OUN (Butovsky i wsp. 2014, Ochocka i Kaminska, 2021). Doświadczenia przeprowadzone na myszach chimerowych z przeszczepionym szpikiem, u których dzięki ochronie głowy podczas naświetlania nie doszło do naruszenia integralności bariery krew-mózg, wskazywały na ograniczony napływ komórek z obwodu (Lahmar i wsp. 2016). Wyniki badań śledzenia pochodzenia komórek wskazują, że mikroglej i BAMs stanowią osobne populacje niż BM-MΦ i ich funkcje mogą być modyfikowane w procesach patologicznych (Ochocka i Kaminska, 2021).

#### **3.4.4.4 Mikroglej, monocyty i makrofagi infiltrujące nowotwory**

Komórki mikrogleju i pochodzące ze szpiku monocyty/makrofagi stanowią najliczniejszą grupę wśród nienowotworowych komórek identyfikowanych w glejakach (Badie i Schartner, 2000; Graeber i wsp. 2002; Ghosh i Chaudhuri 2010; Gabrusiewicz i wsp. 2011). Wraz z naciekającymi BM-MΦ mogą stanowić do 30% masy guza (Charles i wsp. 2011). Ich liczba w nawracających guzach była mniejsza niż w pierwotnych GBM, podczas gdy stosunek pozostałych komórek układu

odpornościowego w mikrośrodowisku guzów był podobny (Fu i wsp. 2020). W innym badaniu obserwowano spadek monocytów i wzrost GAMs w nawracających GBM (Wang i wsp. 2017).

Profile ekspresji genów w GAMs izolowanych z ludzkich, mysich i szczurzych glejaków wykazują liczne różnice, zidentyfikowano tylko 2 geny wspólne dla analizowanych zestawów danych: *Tgm2* kodujący transglutaminazę 2 i *Gpnmb* kodujący transbłonową glikoproteinę NMB (Walentyłowicz i wsp. 2018). Prawdziwy przełom przyniosło zastosowanie scRNA-seq i CyTOF umożliwiające oznaczenie całych transkryptomów lub >30 białek powierzchniowych w poszczególnych komórkach. Obie metody zapewniają wysoką rozdzielczość i pozwoliły na szczegółową analizę komórek mieloidalnych w ludzkich i mysich glejakach (Kaminska i wsp. 2021).

Wyniki licznych badań wskazują, że komórki nowotworowe mogą wydzielać szereg czynników oraz przeciwzapalne cytokiny, takie jak TGF- $\beta$  (Gold, 1999; Kjellman i wsp. 2000; Platten i wsp. 2001), IL-4, IL-6 (Elgert i wsp. 1998, Ben-Baruch 2006), IL-10 (Suzumura i wsp. 1993, Gabrusiewicz i wsp. 2011, Rolle i wsp. 2012), prostoglandynę E2 (PGE2) (Cooper i wsp. 1984; Castelli i wsp. 1989, Paoletti i wsp. 1989), które modulują funkcje komórek układu odpornościowego i wywołują polaryzację komórek w kierunku poinwazyjnych, immunosupresyjnych komórek wspierających wzrost guza (GAMs).

GAMs mają osłabioną zdolność do prezentowania antygenu spowodowaną obniżoną ekspresją cząsteczek MHCII (Badie i wsp. 2002, Schartner i wsp. 2005, Kostianovsky i wsp. 2008) i obniżoną ekspresję cząsteczek kostymulujących CD40, CD80 i CD86 (Hussain i wsp. 2006, Kostianovsky i wsp. 2008), co zmniejsza ich zdolność do aktywacji limfocytów T i upośledza odpowiedź przeciwnowotworową organizmu (Flügel i wsp. 1999). Wysoka ekspresja liganda Fas (FasL) w GAMs może prowadzić do indukcji apoptozy w limfocytach T cytotoksycznych (Badie i wsp. 2001). Ponadto wydzielane przez glejaka IL-10, TGF- $\beta$ 1 i PGE2 hamują ekspresję IL-12 w GAMs, która stymuluje proliferację i cytotoksyczność komórek T i NK (Trinchieri i Gerosa 1996, Mitsuhashi i wsp. 2004).

Czynniki indukujące wspierający nowotwór fenotyp GAMs są słabo poznane. Dostępne dane wskazują na zaangażowanie ścieżki przekazywania sygnału zależnej od czynnika transkrypcyjnego STAT3 (ang. *signal transducer and activator of transcription 3*). W komórkach mikrogleju traktowanych pożywką z nadkomórek

glejaka (GCM, ang. *glioma conditioned medium*) dochodziło do wzrostu ekspresji STAT3 i indukcji ekspresji cytokin o charakterze przeciwzapalnym, takich jak IL-6 i IL-10 oraz spadku ekspresji prozapalnej cytokiny IL-1 $\beta$ . Wyciszenie ekspresji STAT3 w mysim glejaku prowadziło do wzrostu ekspresji TNF $\alpha$  w mikrogleju i zahamowaniu wzrostu guza *in vivo* (Zhang i wsp. 2009). Kolejnymi zidentyfikowanymi czynnikami wydzielanymi przez glejaka, oddziałującymi ze specyficznymi receptorami w mikrogleju i indukującymi jego polaryzację są osteopontyna (Ellert-Miklaszewska, Wiśniewski, Kijewska i wsp. 2016), wersikan (Hu i wsp. 2015) i periostyna (Zhou i wsp. 2015).

#### **3.4.4.5 Wpływ mikrogleju na inwazyjność komórek glejaka**

Komórki mikrogleju w glejaku są źródłem enzymów proteolitycznych, takich jak metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs, ang. *matrix metalloproteinases*), katepsyny czy urokinaza aktywatora plazminogenu (uPA, ang. *urokinase plasminogen activator*), które wydzielane do mikrośrodowiska trawią macierz zewnątrzkomórkową (ECM, ang. *extracellular matrix*), co umożliwia komórkom glejaka migrację i rozprzestrzenianie się w parenchymie mózgu. Zjawisko migracji komórek glejaka po raz pierwszy zostało zaobserwowane w latach 30. przez Hansa Scherera (Scherer, 1938). Odnosił on obecność odrywających się od głównej masy guza komórek, które następnie tworzyły skupiska na naczyniach krwionośnych i neuronach oddalonych od pierwotnej lokalizacji nowotworu.

Liczne doniesienia potwierdzają udział mikrogleju w inwazyjności glejaków. Bettinger i wsp. (2002) wykazali, że mikroglej indukuje migrację komórek glejaka w komorze Boydena *in vitro*. Usunięcie mikrogleju ze skrawków organotypowych za pomocą liposomów wypełnionych kłodronianem hamowało inwazyjność komórek mysiego glejaka EGFP-GL261, zaś jednoczesne podawanie komórek mikrogleju z komórkami glejaka do tych skrawków przywracało inwazyjność (Markovic i wsp. 2005). Badania prowadzone w Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN wykazały wzrost inwazyjności komórek szczurzego, mysiego i ludzkiego glejaka, które hodowano w obecności mikrogleju (Sliwa i wsp. 2007; Wesolowska i wsp. 2008; Wisniewski i wsp. 2010). Z kolei u myszy, u których farmakologicznie usunięto komórki mieloidalne z mikrośrodowiska glejaka stwierdzono mniejsze guzy w porównaniu do zwierząt kontrolnych i zwiększoną przeżywalność zwierząt (Gabrusiewicz i wsp. 2011, Zhai i wsp. 2011, Gabrusiewicz i wsp. 2015).

Jednym z zaproponowanych mechanizmów proinwazyjnego działania mikrogleju na komórki glejaka jest wzrost aktywności MT1-MMP (ang. *membrane type 1 MMP*, MMP14) w mikrogleju poprzez ścieżkę TLR/p38. MT1-MMP aktywuje produkowaną przez komórki nowotworowe metaloproteinazę MMP-2, która (wraz z MMP-9) rozcina proteolitycznie macierz zewnątrzkomórkową. U myszy pozbawionych Myd88, u których upośledzone jest przekaźnictwo sygnału przez ścieżkę TLR/Myd88, guzy były mniejsze i słabiej infiltrowane przez komórki mikrogleju. Obserwowano także niższą ekspresję MT1-MMP w guzie u myszy Myd88<sup>-/-</sup> (Markowicz i wsp. 2009). Z kolei Wesołowska i wsp. (2008) wykazali, że TGF-β1 produkowany przez mikroglej stanowi kluczowy czynnik wspierający migrację i inwazyjność komórek ludzkiego i szczurzego glejaka.

#### **3.4.4.6 Wpływ mikrogleju i makrofagów na angiogenezę**

Wzrost guza powyżej 1 mm<sup>3</sup> wymaga neoangiogenezy, czyli utworzenia sieci nowych naczyń krwionośnych. Makrofagi infiltrujące guzy są komórkami kluczowymi dla tego procesu. Wykazano, iż liczba GAMs pozytywnie koreluje z gęstością naczyń krwionośnych (Nishie i wsp. 1999; Gabrusiewicz i wsp. 2011). Genetyczne lub farmakologiczne usunięcie GAMs prowadzi do zahamowania angiogenezy oraz redukcji wielkości guza w glejakach (Gabrusiewicz i wsp. 2011, Gabrusiewicz i wsp. 2015). Wśród makrofagów infiltrujących guzy zidentyfikowano także populację charakteryzującą się ekspresją receptora angiopoetyny Tie-2 (ang. *endothelium-specific receptor tyrosine kinase 2*), występującą w pobliżu naczyń krwionośnych (Venneri i wsp. 2007) i wspierającą angiogenezę i progresję nowotworu (Harney i wsp. 2015).

W tworzenie nowych naczyń w guzie zaangażowanych jest wiele czynników wydzielanych przez makrofagi, takich jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) (Harney i wsp. 2015), metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12) (Lewis i Pollard 2006), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF, ang. *basic fibroblast growth factor*) (Wojtukiewicz i wsp. 2021), TNFα (Wei i wsp. 2021), IL-8 (Hong i wsp. 2009), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF, ang. *platelet-derived growth factor*) (Lamagna i wsp. 2006), czynnik wzrostu naskórka (EGF, ang. *epidermal growth factor*) (Dunn i wsp. 2000) oraz cyklooksygenaza 2 (COX-2, ang. *cyclooxygenase 2*) (Wang i wsp. 2019, Klimp i wsp. 2001). Innym mechanizmem, poprzez który



makrofagi mogą wspierać angiogenezę jest bezpośredni wpływ na naczynia krwionośne. Wydzielane przez makrofagi białko Wnt7b jest odpowiedzialne za stabilizację  $\beta$ -kateniny w nabłonku naczyń, co indukuje ich wejście w cykl komórkowy (Lobov i wsp. 2005; Ojalvo i wsp. 2010).

Nowe naczynia krwionośnych w guzie powstają szybko, często w sposób chaotyczny i nieprawidłowy. Naczynia takie nie są w stanie dostarczać komórkom nowotworowym wystarczającej ilości tlenu, co prowadzi do powstania obszarów hipoksji (niedotlenienia) (Baluk i wsp. 2005; Nagy i wsp. 2010). Hipoksja indukuje w komórkach makrofagów syntezę szeregu czynników, takich jak VEGF, TNF $\alpha$ , bFGF czy CXCL8, które sprzyjają powstawaniu nowych naczyń krwionośnych w guzie (Rosińska i Gavard, 2021).

### **3.5 Czynniki odpowiedzialne za nagromadzenie się i polaryzację GAMs w mikrośrodowisku glejaków**

#### **3.5.1 Czynniki zaangażowane w nagromadzenie się GAMs**

Gromadzenie się GAMs w glejakach oraz ich polaryzacja w kierunku komórek wspierających wzrost guza regulowana jest przez liczne białka wydzielane przez komórki nowotworowe. Chemokina CCL2/MCP-1 należąca do grupy białek chemotaktycznych monocytów (MCPs, ang. *monocyte chemotactic proteins*) była jedną z pierwszych opisanych chemoatraktantów GAMs. W warunkach stanu zapalnego lub uszkodzenia wiązanie MCP-1 do receptora CCR2 (ang. *C-C motif receptor 2*) stymuluje migrację komórek układu odpornościowego mikrogleju/makrofagów, monocytów, komórek NK i limfocytów T. Podwyższoną ekspresję *MCP-1* wykrywano w wielu nowotworach, w tym w glejakach złośliwych i łagodnych (Jung i wsp. 2018, Prat i wsp. 2000), zaś poziom tego białka pozytywnie korelował ze stopniem złośliwości i niekorzystnymi prognozami dla pacjentów (Platten i wsp. 2003). Komórki glejaka z wysoką ekspresją *Mcp-1* po implantacji do mózgow szczyrzych tworzą większe guzy, silniej infiltrowane przez GAMs i z większą liczbą naczyń krwionośnych niż komórki z wyciszoną ekspresją *Mcp-1* (Platten i wsp. 2003). Jednakże choć MCP-1 zaangażowane jest w indukcję proliferacji i migracji GAMs do guza, to indukuje w komórkach odpowiedź zapalną (Hinojosa i wsp. 2011). Rolę tego białka w patogenezie glejaków podważyły wyniki badań Okady i współautorów, które pokazały, że w ludzkich glejakach to MCP-3 (ang. *monocyte chemotactic protein- 3*), nie MCP-1 odgrywa rolę w pobudzaniu migracji GAMs

(Okada i wsp. 2009). Również w modelu mysim wyciszenie ekspresji MCP-1 nie hamowało napływu GAMs do guza (Kirk i wsp. 2008). Wspieranie wzrostu guza przez MCP-1 może być spowodowane autokrynnym działaniem tego białka na migrację komórek nowotworowych (Liang i wsp. 2008). MCP-3 poprzez wiązanie się do swoich receptorów CCR1, CCR2 i CCR3 (ang. *chemokine CC motif receptors*) stymuluje – podobnie jak MCP-1 – chemotaksję mikrogleju, makrofagów, monocytów, limfocytów T, komórek NK i DC (Menten i wsp. 2001).

Innym chemoatraktantem w glejakach jest czynnik wzrostu hepatocytów/czynnik rozproszony HGF/SF (ang. *hepatocyte growth factor/scatter factor*). Podwyższoną ekspresję tego białka wykrywano zarówno w komórkach glejaków, jak i GAMs izolowanych z guzów złośliwych (Wundergem i wsp. 2008, Kunkel i wsp. 2001), a jego poziom pozytywnie korelował ze stopniem złośliwości i śmiertelnością pacjentów (Kunkel i wsp. 2001; Koochekpour i wsp. 1997; Esencay i wsp. 2010; Arrieta i wsp. 2002). Poza parakrynnym wpływem na GAMs aktywacja ścieżek sygnałowych HGF/SF–c-Met stymulowała proliferację, migrację i inwazyjność komórek ludzkiego glejaka (Tu i wsp. 2009), a także wykazywała działanie proangiogenne i wspierające wzrost guza *in vivo* (Zhang i wsp. 2011, Lattera i wsp. 1997).

Czynnik troficzny pochodzenia glejowego (GDNF, ang. *glial-derived neurotrophic factor*) jest czynnikiem wpływającym na przeżywalność i różnicowanie wielu populacji komórek w OUN. Wiązanie liganda do receptora GFR- $\alpha$ 1 prowadzi do aktywacji ścieżek sygnałowych zależnych od kinazy RET (Bonanomi i wsp. 2012). Wykazano, że GDNF jest zaangażowany w chemotaksję wielu rodzajów komórek, w tym mikrogleju (Cornejo i wsp. 2010; Dudanova i wsp. 2010; Ku i wsp. 2013), zaś jego podwyższoną ekspresję obserwowano zarówno w liniach komórkowych glejaków, jak i ludzkich glejakach o wysokim stopniu złośliwości (Wiesenhofer i wsp. 2000). Wyciszenie ekspresji GDNF w mysim modelu glejaka prowadziło do spadku liczby GAMs i hamowało wzrost guza *in vivo*. GDNF działa także autokrynnie na komórki glejaka zwiększając ich migrację (Lu i wsp. 2010; Wan i wsp. 2010).

### **3.5.2 Ligandy receptorów integrynowych jako białka zaangażowane w polaryzację GAMs w glejakach**

Dotychczas poznano jedynie kilka czynników (między innymi M-CSF, GM-CSF, TGF- $\beta$ , periostyna) zaangażowanych w aktywację GAMs w kierunku fenotypu

wspierającego nowotwór, a dokładny mechanizm ich polaryzacji nie został w pełni poznany. W celu identyfikacji białek zaangażowanych w proces polaryzacji GAMs, w Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN przeprowadzono proteomiczną analizę pożywki z nacieków komórek glejaka. Analiza sekretomu glejaka wykazała, że dwa białka osteopontyna (Spp1) i laktadheryna (Mfg-E8), będące ligandami dla receptorów integrynowych, są czynnikami zaangażowanymi powodując polaryzację mikrogleju w hodowli (Ellert-Miklaszewska, Wisniewski, Kijewska i wsp. 2016).

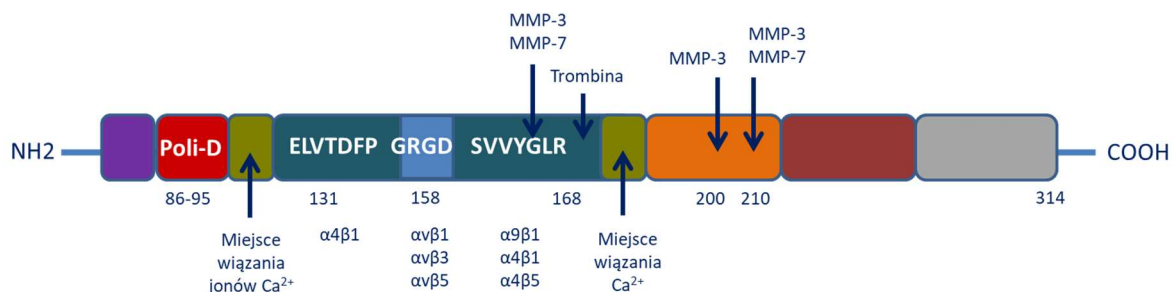
### 3.5.2.1 Struktura i funkcje osteopontyny/SPP1

Osteopontyna (OPN/SPP1, ang. *secreted phosphoprotein 1*) jest białkiem należącym do rodziny SIBLINGS (ang. *Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins*) – grupy niewielkich glikoprotein oddziałujących z receptorami integrynowymi. Składa się z 314 aminokwasów, a ze względu na liczne modyfikacje potranslacyjne, którym może ulegać, jej masa cząsteczkowa waha się w granicach 35-80 kDa. W wyniku alternatywnej obróbki mRNA *SPP1* powstają 3 warianty mRNA: *Spp1a* to wariant o pełnej długości, zawierający 7 eksonów; *SPP1b* pozbawiony eksonu 5, kodującego aminokwasy 58-71 oraz *SPP1c* pozbawiony eksonu 4, kodującego aminokwasy 31-57. W ludzkich komórkach wykrywa się 5 wariantów mRNA *SPP1*. Wariant *SPP1e* (poprzednio *SPP1a*) koduje pełną osteopontynę, a *SPP1d* koduje wariant pozbawiony eksonów 4, 5 i 6 (Kijewska i wsp. 2017).

Na N-końcu białka znajduje się miejsce wiązania jonów wapnia, a za nim sekwencja ELVTDFP, która umożliwia wiązanie SPP1 do integryn  $\alpha 4\beta 1$ . W cząsteczce SPP1 wyróżnić można motyw RGD (arginina-glicyna-kwas asparaginowy), który rozpoznawany jest przez integryny  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  i  $\alpha v\beta 5$  (Zheng i wsp. 2009). W sąsiedztwie motywu RGD znajduje się także miejsce cięcia dla proteaz, trombiny i plazminy. W wyniku proteolitycznego cięcia ludzkiej SPP1 uwalniany jest C-końcowy fragment białka, a ponadto wzmacnia się wiązanie N-końcowego fragmentu do integryn poprzez motyw RGD i odsłonięta zostaje sekwencja SVYYGLR, która ma zdolność do wiązania integryn  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$  i  $\alpha 4\beta 7$  odpowiedzialnych między innymi za adhezję komórek (Yamaguchi i wsp. 2013, Yokosaki i wsp. 1999). Receptory integrynowe  $\alpha 9\beta 1$ , obecne między innymi na makrofagach, neutrofilach, komórkach mięśni gładkich, fibroblastach i osteoklastach, rozpoznają SPP1 tylko gdy jest ona cięta przez trombinę. Z kolei integryny  $\alpha 4\beta 1$ , z racji tego że rozpoznawane są także przez fragment ELVTDFDLPAT ludzkiej SPP1, mają zdolność do wiązania także pełnej formy białka (Bayless i Davis 2001).

Receptory te występują między innymi na powierzchni makrofagów i limfocytów T (Ellert-Miklaszewska i wsp. 2020). Motyw SVVYGLR jest również rozpoznawany przez metaloproteinazy MMP-3 i MMP-7 (Agnihotri i wsp. 2001). W wyniku proteolitycznego cięcia tymi enzymami odsłonięty zostaje fragment SVVG, który jest rozpoznawany przez integryny  $\alpha 4\beta 1$ , ale nie integryny  $\alpha 9\beta 1$ . Wykazano, że fragment ten odpowiedzialny jest za regulację migracji i adhezji komórek (Ito i wsp. 2009). Uwolniony w wyniku cięcia przez trombinę C-końcowy fragment białka ma zdolność do wiązania się do izoform CD44v6 i CD44v7 w sposób niezależny od motywu RGD. Wykazano, że oddziaływanie SPP1 z receptorem CD44 na powierzchni komórek macierzystych glejaka prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego HIF (ang. *hypoxia inducible factor*) i utrzymaniu macierzystego fenotypu tych komórek (Pietras i wsp. 2014). C-końcowy fragment SPP1 zaangażowany jest w migrację komórek dendrytycznych (Shao i wsp. 2014). Fosforylacja konkretnych miejsc w cząsteczce SPP1 nie ma wpływu na interakcję z receptorem CD44 na powierzchni makrofagów, ale jest kluczowa dla ich aktywacji (Weber i wsp. 2002).

Schemat cząsteczki SPP1 z zaznaczonymi miejscami oddziaływań z poszczególnymi receptorami przedstawiono na rycinie 2.



Ryc. 2. Schemat budowy SPP1 z zaznaczonymi miejscami wiązania do receptorów integrynowych, miejscami cięcia przez enzymy proteolityczne oraz miejscami wiązania jonów wapnia. Opracowano na podstawie Bandopadhyay i wsp. 2014.

SPP1 produkowana jest przez komórki mięśni gładkich, śródbłonna, nabłonka, chondrocyty, osteoblasty i komórki układu odpornościowego (makrofagi, limfocyty T i B, neutrofile, komórki dendrytyczne i NK) i bierze udział w wielu procesach biologicznych. Wynika to ze struktury białka, która pozwala na oddziaływanie z wieloma receptorami obecnymi na powierzchni różnych komórek. Zaangażowana jest między innymi w mineralizację i resorpcję kości, regenerację tkanek, angiogenezę, regulację migracji i adhezji komórkowej (Denhardt i wsp. 2001).

Pierwsze doniesienia o jej roli w modulowaniu odpowiedzi układu odpornościowego wynikały z obserwacji indukcji SPP1 w odpowiedzi na infekcje bakteryjne w limfocytach T, dlatego nazywano ją białkiem wczesnej aktywacji limfocytów T (ETA1, ang. *Early T Lymphocyte Activation Protein 1*) (Patarca i wsp. 1989, Oldberg i wsp. 1986). Udokumentowany jest udział SPP1 w regulacji migracji, aktywacji i fagocytozy makrofagów (Zhu i wsp. 2004) oraz jako czynnika chemotaktycznego dla komórek układu odpornościowego, powodującego migrację leukocytów do miejsc występowania stanów zapalnych w organizmie (Mazzali i wsp. 2002; Gravallesse, 2003). SPP1 indukowała chemotaksję makrofagów w odpowiedzi na infekcje w sposób zależny od oddziaływania z motywem RGD, jak również wspierała chemotaksję i proliferację limfocytów T (Singh i wsp. 1990, O'Regan i wsp. 1999).

SPP1 uczestniczy w regulacji procesów zapalnych zarówno jako cytokina prozapalna, jak i białko zaangażowane w hamowanie odpowiedzi układu odpornościowego (Nau i wsp. 1997, Yu i wsp. 1998). Wykazano, że ufosforylowana Spp1 powoduje zwiększenie produkcji IL-12 w sposób zależny od integryny  $\beta 3$  i RGD, podczas gdy nieufosforylowane białko odpowiedzialne jest za hamowanie wydzielania przeciwzapalnej IL-10 w sposób zależny od interakcji z receptorem CD44 (Ashkar i wsp. 2000). Po stymulacji makrofagów LPS (Gao i wsp. 2004) oraz w odpowiedzi na czynniki prozapalne takie jak TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  czy IL2 (Patarca i wsp. 1993) zaobserwowano wzrost ekspresji *SPP1*. W modelu eksperymentalnego zapalenia mózgu (EAE) Spp1 nasilała reakcję zapalną poprzez indukcję ekspresji prozapalnych cytokin i zwiększenie przeżywalności aktywowanych limfocytów T poprzez hamowanie ich indukowanej śmierci (Hur i wsp. 2007). SPP1 produkowana przez makrofagi może hamować ekspresję iNOS prowadząc do zahamowania syntezy NO, ważnego mediatora odpowiedzi zapalnej (Rollo i wsp. 1996). SPP1 jest także jednym z czynników promujących akumulację makrofagów M2 w raku żołądka (Atai i wsp. 2011). Wszystko wskazuje na to, że odpowiedź regulowana przez SPP1 może zależeć od typu komórek, w jakich zachodzi jej ekspresja i modyfikacji, jakim białko może podlegać.

### **3.5.2.2 Osteopontyna/SPP1 w glejakach**

Wzrost poziomu osteopontyny/SPP1 stwierdzono w wielu typach nowotworów, w tym w glejakach, co potwierdzają wyniki analiz materiału klinicznego

pobranego od pacjentów. Saitoh i współautorzy (1995) pokazali, że poziom *SPP1* w glejakiach jest podwyższony i zasugerowali, że poziom ekspresji *SPP1* może korelować z rokowaniami klinicznymi i stopniem złośliwości nowotworu (Saitoh i wsp. 1995, Toy i wsp. 2009). Późniejsze doniesienia opisywały wysoki poziom *SPP1* w krwi obwodowej i surowicy pacjentów z glejakiem i wskazywały na wykorzystanie go jako markera korelującego ze złymi prognozami klinicznymi (Sreekanthreddy i wsp. 2010, Urbanavičiūtė i wsp. 2020). *SPP1* wykrywano w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z GBM (Kohata i wsp. 2020). Wiele doniesień dokumentuje także wysoki poziom ekspresji *SPP1* w ludzkich glejakiach, który pozytywnie koreluje ze stopniem złośliwości nowotworu oraz niekorzystnymi prognozami klinicznymi (Kijewska i wsp. 2017, Friedmann-Morvinski i wsp. 2015, Matusan-Ilijas i wsp. 2008, Zhao i wsp. 2015, Szulzewsky i wsp. 2015, Atai i wsp. 2011, Saitoh i wsp. 1995, Tsai i wsp. 2012). Wysoki poziom ekspresji *SPP1* negatywnie koreluje także z przeżywalnością pacjentów z glejakami (Kijewska i wsp., 2017; Chen i wsp. 2019). Analiza *in silico* danych z TCGA wykazała, że ekspresja *SPP1* jest silnie powiązana z podtypem mezenchymalnym GBM, charakteryzującym się wysokim poziomem infiltracji przez aktywowane mikroglej i makrofagi (Kijewska i wsp., 2017; Wei i wsp. 2019).

Liczne dane literaturowe potwierdzają rolę *SPP1* w modulacji inwazyjności glejaka. Wyciszenie ekspresji *SPP1* w komórkach ludzkiego glejaka U87 prowadziło do zahamowania wzrostu guza w modelu *in vivo* oraz hamowało zdolność do migracji i ruchliwość komórek *in vitro* (Lamour i wsp. 2010, Friedmann-Morvinski i wsp. 2016; Jan i wsp. 2010). Wyciszenie ekspresji *Spp1* w mysich guzach prowadziło do wydłużenia czasu przeżycia zwierząt (Friedmann-Morvinski i wsp. 2016). Wykazano także, że *SPP1* jest zaangażowana w regulację ekspresji MMPs, które pełnią istotną funkcję w regulacji inwazyjności komórek glejaka. Wyciszenie ekspresji *SPP1* w komórkach ludzkiego glejaka U87 prowadziło do spadku poziomu MMP2 i inwazyjności komórek. Komórki te tworzyły także mniejsze guzy *in vivo* w porównaniu do guzów powstałych z komórek kontrolnych (Jan i wsp. 2010). Z kolei wyciszenie ekspresji *SPP1* w komórkach ludzkiego glejaka U87 wzbogaconych w komórki macierzyste nowotworu (GSC, ang. *glioma stem-like cells*) obniżało zdolność tych komórek do formowania sfer. Miały one również ograniczone zdolności do tworzenia guzów *in vivo*. Podanie rekombinowanej *SPP1* odwracało ten efekt (Lamour i wsp. 2015). Autorzy postulowali autokryny wpływ *SPP1* na zdolność do

tworzenia sfer przez oddziaływanie białka z receptorem CD44 obecnym na powierzchni komórek glejaka. Zablokowanie receptora CD44 hamowało zdolność do formowania sfer, podczas gdy zablokowanie receptora integrynowego  $\alpha\beta 5$  nie wywoływało takiego efektu. Wykazano pozytywną korelację między ekspresją *SPP1* w próbkach ludzkich GBM i ekspresją genów uznawanych za markery komórek macierzystych (Polat i wsp. 2022). Wyciszenie ekspresji *SPP1* w komórkach ludzkiego glejaka wpływało na aktywację głównych białek ścieżki odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR, ang. *DNA Damage Response*) indukowaną przez radioterapię: zmniejszenia fosforylacji histonu H2AX, kinazy CHK-2 i białka ATM w porównaniu do komórek kontrolnych. Zjawiska te były odwracane przez dodanie rekombinowanej *SPP1*, co sugeruje, że *SPP1* pełni rolę w inicjacji naprawy DNA w odpowiedzi komórek glejaka na radiację, zwiększając oporność guza na radioterapię (Henry i wsp. 2016).

### 3.5.2.3 Struktura i funkcje laktadheryny/MFG-E8

Laktadheryna (MFG-E8, ang. *milk fat globule-epidermal growth factor 8*) to glikozylowane białko, które zidentyfikowano po raz pierwszy w zewnętrznej dwuwarstwie lipidowej kuleczek tłuszczowych mleka krowiego (Stubbs i wsp. 1990). MFG-E8 jest produkowana przez wiele tkanek i narządów (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140545-MFGE8>). Ludzka MFG-E8 występuje w postaci trzech izoform różniących się długością, z których najdłuższa składa się z 387 aminokwasów. U szczurów zidentyfikowano dwie izoformy białka, z których dłuższa zbudowana jest z 427 aminokwasów (Lin i wsp. 2007).

Na N-końcu białka występuje peptyd sygnałowy (w ludzkiej, szczurzej i mysiej laktadherynie składający się z 22 aminokwasów) umożliwiający sekrecję białka na zewnątrz komórki. Za tym peptydem w ludzkiej MFG-E8 znajduje się domena wykazująca homologię do czynnika wzrostu naskórka (EGF-like, ang. *epidermal growth factor-like domains*), w białku szczurzym i mysim zidentyfikowano dwie domeny tego typu (Deonarain i wsp. 2009, Shao i wsp. 2008). W obrębie tej domeny występuje motyw RGD (Arg-Gly-Asp), który odpowiada za rozpoznanie i wiązanie receptorów integrynowych typu  $\alpha\beta 3$   $\alpha\beta 5$  (Shao i wsp. 2008; Shi i wsp. 2006). Wykazano, że poprzez domenę EGF-like cząsteczki MFG-E8 mogą ulegać oligomeryzacji (Balzar i wsp. 2001). Na C-końcu białka zidentyfikowano dwie domeny C (C1 i C2) wykazujące wysoki stopień homologii do dyskoidyn (ang.

*discoidin-like domains*) (Stubbs i wsp. 1990, Ogura i wsp. 1996). Domena C występuje także w czynnikach krzepnięcia krwi V i VIII, gdzie odpowiada za ich wiązanie do obszarów błon komórkowych bogatych w aminofosfolipidy (Shao i wsp. 2008). W domenie C2 występuje obszar złożony z aminokwasów o właściwościach hydrofobowych (Trp26, Leu28, Phe31 i Phe81), który umożliwia kotwiczenie MFG-E8 w błonie fosfolipidowej (Macedo-Ribeiro i wsp. 1999, Pratt i wsp. 1999). MFG-E8 przyłączając się do błony komórkowej wiąże się głównie do fosfatydyloseryny (PS, ang. *phosphatidylserine*) oraz w mniejszym stopniu do fosfatydyloetanolaminy (PE, ang. *phosphatidylethanolamin*) (Waehrens i wsp. 2009). Dzięki swojej domenowej budowie umożliwiającą oddziaływanie z różnymi czynnikami, MFG-E8 może pełnić różnorodne funkcje biologiczne.

Schemat cząsteczki szurzej MFG-E8 z zaznaczonymi miejscami oddziaływań z poszczególnymi receptorami przedstawiono na rycinie 3.



Ryc. 3. Schemat budowy cząsteczki MFG-E8 z zaznaczonym motywem RGD wiążącym receptory integrynowe  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$  oraz miejscem wiązania fosfolipidów. Opracowano na podstawie Kaminska i wsp. 2018.

### 3.5.2.4 Funkcje biologiczne laktadheryny/MFG-E8

Laktadheryna, dzięki swojej zdolności do wiązania receptorów integrynowych obecnych na powierzchni fagocytów oraz fosfatydyloseryny na błonie komórek, które utraciły prawidłową asymetrię dwuwarstwy lipidowej, pełni ważną rolę w procesie fagocytozy komórek apoptotycznych (Mirnikjoo i wsp. 2009). W przypadku zakłócenia tego procesu dochodzi do akumulacji martwych komórek i ich fragmentów, co może prowadzić do indukcji stanu zapalnego.

Receptory powierzchniowe zaangażowane w fagocytozę dzieli się na takie, dla których ligandem jest fosfatydyloseryna oraz przyłączające ligandy pośredniczące między komórką a fagocytem. Do pierwszej grupy zaliczane są np. receptory zmiatacze (ang. *scavenger receptors*) czy białko CD14. Do drugiej kategorii zaliczane są receptory zdolne do przyłączenia ligandów pośrednich, takich



jak MFG-E8 czy  $\beta 2$  glikoproteina (Martin, 2008). MFG-E8 stanowi rodzaj „pomostu” wiążąc się domeną C2 do komórki eksponującej PS oraz motywem RGD do receptorów integrynowych  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha V\beta 5$  znajdujących się na powierzchni komórek prezentujących antygen: makrofagów oraz niedojrzałych komórek dendrytycznych, co ułatwia fagocytozę (Hanayama i wsp. 2002). Mutacja w motywie RGD, która prowadzi do zamiany kwasu asparaginowego na glutaminowy (RGD  $\rightarrow$  RGE) blokuje wiązanie komórki fagocytyzującej, ale nie wpływa na zdolność białka do wiązania komórek apoptotycznych. Potwierdza to udział domeny C2 laktadheryny w oddziaływaniu z fosfatydyloseryną, wykazano jednak, że aby zaszła internalizacja komórki niezbędne jest pobudzenie receptora innego typu (Andersen i wsp. 2000). Może to być receptorowa kinaza tyrozynowa Mer-TK aktywowana poprzez wiązanie swojego ligandu, białka Gas-6 (ang. *Growth arrest specific gene-6*), które łączy komórkę fagocytyzującą z komórką bądź cząsteczką fagocytowaną (Maree i wsp. 2007). Wykazano, że upośledzona produkcja MFG-E8 prowadzi do znacznego osłabienia procesu fagocytozy i akumulacji martwych komórek, czego konsekwencją jest występowanie licznych stanów patologicznych (Ait-Oufella i wsp. 2007; Ensslin i Shur, 2007). W mysim modelu miażdżycy u zwierząt *Mfg-E8<sup>-/-</sup>* wykazano szybszy rozwój choroby w porównaniu do zwierząt kontrolnych, zahamowanie produkcji IL-10 oraz zwiększoną produkcję IFN $\gamma$  w dotkniętych miażdżycą tętnicach (Ait-Oufella i wsp. 2007). U myszy *Mfg-E8<sup>-/-</sup>* obserwowano także nagromadzenie się martwych komórek i ich resztek w różnych narządach, jak również wzrost stężenia mikropęcherzyków (PMP, ang. *platelet microparticles*) mających na swojej powierzchni liczne cząsteczki PS, które pochodzą z płytek krwi i mogą stanowić dodatkową powierzchnię katalityczną dla czynników krzepnięcia krwi. Myszy *Mfg-E8<sup>-/-</sup>* poza zwiększonym stężeniem PMP w osoczu, miały także podwyższoną produkcję trombiny. Wskazuje to na istotną rolę *Mfg-E8* w zapobieganiu tworzenia się zakrzepów powstałych z nagromadzonych mikropęcherzyków (Dasgupta i wsp. 2009, Ensslin i Shur, 2007).

MFG-E8 pełni istotną funkcję w oczyszczaniu organizmu z patologicznie zmienionych komórek, których funkcja została zaburzona w wyniku starzenia się i choroby. Wykazano, że MFG-E8 zaangażowana jest w fagocytozę starzejących się erytrocytów (Fens i wsp. 2008). MFG-E8, dzięki zdolności do wiązania PS, przyłącza się do nieprawidłowych krwinek pacjentów cierpiących na anemię sierpowatą, co stymuluje ich fagocytozę i prowadzi do oczyszczania krwi z nieprawidłowych

komórek. Podanie abciksimabu, przeciwciała skierowanego przeciwko receptorowi integrynowemu  $\alpha V\beta 3$ , hamuje proces fagocytozy (Guchhait i wsp. 2007, Dasgupta i Thiagarajan, 2005).

Dzięki możliwości oddziaływania z receptorami obecnymi na powierzchni komórek układu odpornościowego, Mfg-E8 moduluje odpowiedź odpornościową. W makrofagach *in vitro* fagocytoza komórek apoptotycznych zależna od Mfg-E8 prowadzi do produkcji cytokin, które indukują odpowiedź Treg. W konsekwencji stymuluje to przeciwzapalną odpowiedź układu odpornościowego i wykształcenie tolerancji immunologicznej (Jinushi i wsp. 2007). Wyniki badań wskazują, że w niedokrwieniu mózgu MFG-E8 wykazuje działanie przeciwapoptotyczne i przeciwzapalne, a w krwotoku podpajęczynówkowym białko to hamuje stan zapalny poprzez indukcję polaryzacji mikrogleju w kierunku immunosupresyjnego fenotypu M2 poprzez ścieżkę sygnałową  $\beta 3$ /SOCS3/STAT3 (Gao i wsp. 2021).

MFG-E8 odgrywa także kluczową rolę w procesie angiogenezy i gojeniu się ran. Wykazano, że u myszy Mfg-E8<sup>-/-</sup> proces gojenia się ran jest poważnie upośledzony, a liczba powstających naczyń krwionośnych w obszarze uszkodzenia jest istotnie mniejsza w porównaniu do myszy kontrolnych (Uchiyama i wsp. 2014). MFG-E8 jest zaangażowana w angiogenezę poprzez interakcje z receptorami na powierzchni komórek nabłonka naczyń oraz perycytów i ich prekursorów (Motegi i wsp. 2011). Wykazano, że MFG-E8 wspiera tworzenie naczyń w sposób zależny od oddziaływania z integrynami  $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$  obecnymi na komórkach nabłonka na drodze indukowanej przez VEGF fosforylacji kinazy Akt (Silvestre i wsp. 2005). Uczestniczy też w adhezji komórek do innych komórek i komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej (Chang i wsp. 2016).

### **3.5.2.5 Rola laktadheryny/MFG-E8 w nowotworach**

Wzrost ekspresji *MFG-E8* stwierdzono w wielu nowotworach, w tym w czerniaku złośliwym, nowotworach piersi, tarczycy, trzustki, pęcherza i glejaku złośliwym (Shi i wsp. 2004; Packard i Libby, 2008; Sugano i wsp. 2011). Wykazano, że MFG-E8 zaangażowana jest w tworzenie nowych naczyń w czasie wzrostu guza w sposób zależny od oddziaływania z receptorami  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha V\beta 5$  (Serini i wsp. 2008). U myszy transgenicznych *Mfg-E8*<sup>-/-</sup> obserwowano spadek proliferacji komórek w regionach angiogenezy i wzrost liczby komórek apoptotycznych (Neutzner i wsp. 2007). Badania z użyciem angioliixu – humanizowanego, monoklonalnego

przeciwciała rozpoznającego domenę *EGF-like* laktadheryny wykazały zahamowanie jej interakcji z receptorami integrynowymi, a w konsekwencji ograniczenie rozwoju nowotworu i wzrost odsetka komórek apoptotycznych w guzie (Deonarain i wsp. 2009). Zastosowanie monoklonalnego przeciwciała anty-MFG-E8 prowadziło do zmniejszenia migracji, adhezji i przeżywalności komórek raka jajnika oraz potrójnie negatywnego raka piersi (Tibaldi i wsp. 2013). Wykazano, że MFG-E8 aktywnie wspiera rozwój guza w mysim modelu raka okrężnicy. Poziom ekspresji *MFG-E8* u pacjentów w zaawansowanym stadium raku jelita grubego był istotnie wyższy niż u pacjentów z gruczolakami lub na wczesnych stadiach choroby. Wykazano także pozytywną korelację między poziomem ekspresji *MFG-E8* a zdolnością nowotworu do tworzenia lokalnych i odległych przerzutów, jak również gorszą przeżywalnością pacjentów (Kusunoki i wsp. 2015, Zhao i wsp. 2017). W komórkach czerniaka MFG-E8 indukowała produkcję cytokin odpowiedzialnych za aktywację Treg, jak również prowadziła do wykształcenia oporności na chemioterapię przez aktywację ścieżki  $\beta 3$ /FAK/PI3K/AKT (Jinushi i wsp. 2009). Z kolei u pacjentów z rakiem odbytnicy poddanych uprzedniej radioterapii wysoka ekspresja *MFG-E8* korelowała z lepszą odpowiedzią na leczenie, jednak nie stwierdzono różnic w przeżywalności (Harada i wsp. 2021).

Jinushi i współautorzy wykazali, że ekspresja *MFG-E8* w makrofagach jest zależna od GM-CSF, a obniżenie jej poziomu prowadzi do zahamowania aktywności fagocytarnej makrofagów i wzrostu aktywacji limfocytów Th. Wykazano ponadto, że MFG-E8 odpowiada za wytworzenie stanu tolerancji immunologicznej poprzez indukcję produkcji cytokin w makrofagach, które odpowiedzialne są za aktywację Treg (Jinushi i wsp. 2007). Zjawisko to stwierdzono w wielu typach nowotworów (raku pęcherza, prostaty, jajnika, czerniaku złośliwym i w raku jelita grubego) (Tibaldi i wsp. 2013, Sugano i wsp. 2011, Soki i wsp. 2014, Oba i wsp. 2011, Zhao i wsp. 2017). W makrofagach infiltrujących przerzut czerniaka błony naczyniowej oka do wątroby mRNA *MFG-E8* było jednym z najsilniej indukowanym, a makrofagi wykazywały fenotyp wspierający nowotwór (Krishna i wsp. 2020). W raku płaskonabłonkowym przelyku wysoki poziom *MFG-E8* korelował z niskim stosunkiem limfocytów CD8<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> naciekających guza (Kanemura i wsp. 2018).

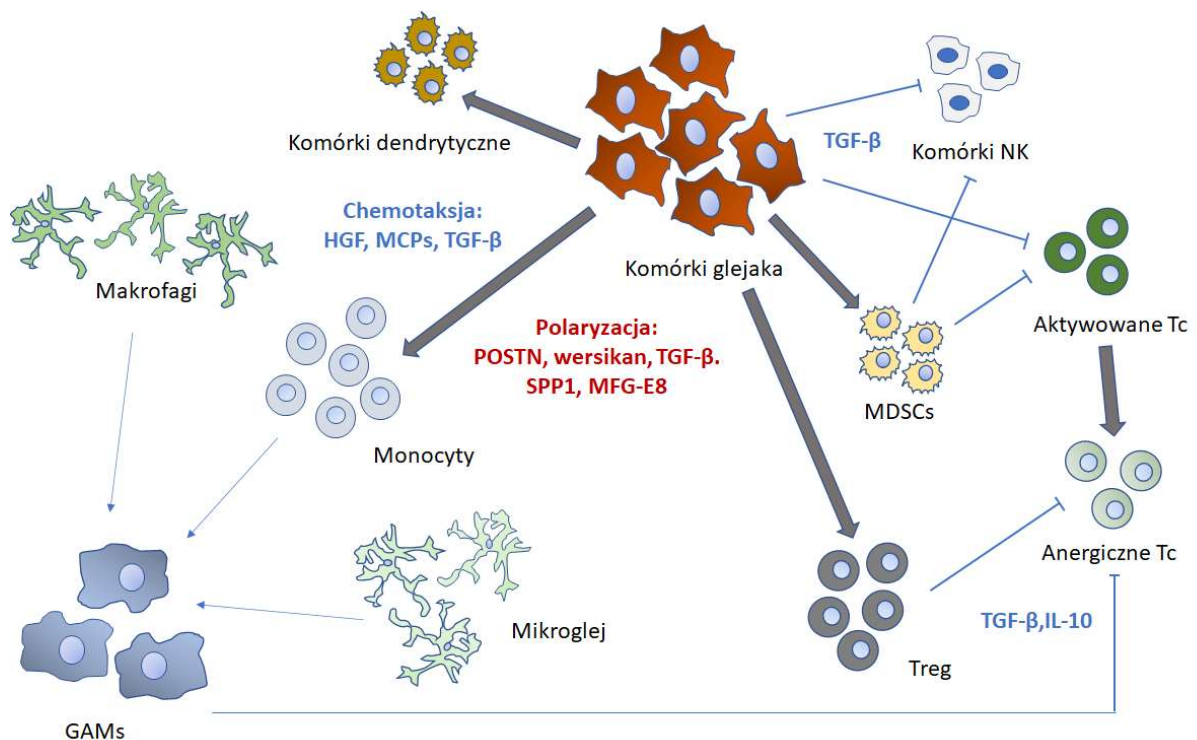
### 3.5.2.6 Funkcje periostyny/POSTN

Periostyna (POSTN), zwana także czynnikiem specyficznym dla osteoblastów (OSF-2, ang. *osteoblast-specific factor 2*), jest białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej występującym co najmniej w 8 izoformach (Takeshita i wsp. 1993; Morra i wsp. 2011). POSTN zaangażowana jest w wiele procesów, w tym także związanych z powstawaniem i progresją nowotworów, takich jak wzrost guza, inwazyjność, angiogeneza czy przerzutowanie (Bao i wsp. 2004; Malanchi i wsp. 2011, Michaylira i wsp. 2010). Periostyna może oddziaływać z wieloma typami komórek poprzez wiązanie się do receptorów integrynowych  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha6\beta4$  czy  $\alpha5\beta1$  (Ratajczak-Wielgomas i Dziegiel, 2015; Utispan i wsp. 2012), co prowadzi do aktywacji ścieżek sygnałowych PI-3K/Akt i szlaku przekazywania WNT (Malanchi i wsp. 2011; Baril i wsp. 2007).

Badania przeprowadzone przez Zhou i wsp. (2015) wykazały, że wydzielana przez komórki glejaka periostyna jest kluczowym białkiem zaangażowanym w polaryzację GAMs w glejakach. Zwiększoną ekspresję *POSTN* stwierdzono zwłaszcza w populacji komórek mniej zróżnicowanych, mających cechy komórek macierzystych – GSCs. Wyciszenie ekspresji periostyny w komórkach ludzkiego glejaka prowadziło do znacznego zahamowania wzrostu guza *in vivo* oraz wydłużenia czasu życia myszy bezgranicznych z glejakiem. W guzach z wyciszoną ekspresją *POSTN* obserwowano zmniejszony naciek GAMs, a także mniejszą liczbę komórek z ekspresją genów kodujących markery fenotypu M2, takich jak arginaza-1, CD163 czy Fizz-1 przy jednoczesnym wzroście liczby komórek typu M1. Dokładny mechanizm działania POSTN w glejakach nie jest do końca jasny, jednakże uważa się, że periostyna wydzielana przez glejaka poprzez wiązanie do receptorów integrynowych na powierzchni GAMs aktywuje ścieżkę sygnałową PI-3K, która związana jest z ich pobudzeniem. Użycie przeciwciała neutralizującego skierowanego przeciwko integrynom  $\alpha\beta3$  bądź krótkiego, syntetycznego peptydu zawierającego sekwencję RGD (odpowiedzialną za wiązanie się białka do tych integryn) zapobiegało aktywacji mikrogleju. Periostyna może działać także autokrynnie poprzez wiązanie się do receptorów integrynowych  $\alpha v$  na powierzchni komórek glejaka, co wspiera inwazyjność guza (Mikheev i wsp. 2015). Ponadto wykazano, że periostyna produkowana przez perycyty wspiera angiogenezę w guzie (Huizer i wsp. 2020, Bernardes i wsp. 2022). W ludzkich glejakach ekspresja *POSTN* pozytywnie koreluje ze stopniem złośliwości i niekorzystnymi prognozami dla

pacjentów, a także gęstością infiltrujących GAMs (Zhou i wsp. 2015). Ponadto analiza danych dostępnych w bazach REMBRANDT, TCGA i CGGA (ang. *Chinese Glioma Genome Atlas*) wykazała, że badanie poziomu ekspresji *POSTN* może być wykorzystane jako marker Mes-GBM, które są najbardziej agresywnymi glejakami złośliwymi (Faried i wsp. 2020).

Podsumowując, wyniki badań wskazują, że w patogenezie glejaków ważną rolę odgrywają ligandy integrzyn takie jak SPP1, POSTN i MFG-E8, które uczestniczą w polaryzacji GAMs do fenotypu wspierającego rozwój glejaka. Jednakże, mechanizmy poprzez które te białka wpływają na GAMs i modyfikują mikrośrodowisko glejaków nie są poznane.



Ryc. 4: Schemat oddziaływania glejaka z mikrośrodowiskiem. Glejak wydziela szereg czynników modulujących funkcje komórek układu odpornościowego, w tym polaryzację naciekających komórek mieloidalnych w kierunku wspierających nowotwór GAMs, hamowanie cytotoksycznej aktywności komórek NK i Tc oraz aktywację komórek o właściwościach immunosupresyjnych, takich jak MDSCs i Treg.

## 4. CEL PRACY

Glejaki złośliwe są nowotworami bardzo heterogennymi, nie tylko na poziomie molekularnym, ale również na poziomie składu komórkowego. Komórki glejaka wydzielają czynniki, które modulują odpowiedź układu odpornościowego na rozwijający się guz i prowadzą do polaryzacji komórek odpornościowych w kierunku poinwazyjnych, immunosupresyjnych komórek wspierających wzrost guza. Najliczniejszą nienowotworową populacją w GBM są komórki mieloidalne, głównie mikroglej, monocyty i makrofagi (GAMs), które w mikrośrodowisku ulegają aktywacji, wspierają angiogenezę, inwazyjność i inaktywują odpowiedź przeciwnowotworową. Wyniki badań w Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN wykazały, że osteopontyna (*Spp1*) i laktadheryna (*Mfg-E8*) są produkowane przez komórki glejaka i indukują proinwazyjną aktywację GAMs.

Celem niniejszej pracy była ocena roli osteopontyny/*Spp1* i laktadheryny/*Mfg-E8* w patogenezie glejaka złośliwego, wpływ wyciszenia ich ekspresji na nacieki i funkcje komórek mieloidalnych i limfoidalnych w mikrośrodowisku nowotworu.

Sformułowano następujące szczegółowe cele badawcze:

1. Ocena zmian transkryptomocnych w całym guzie i wyizolowanych komórkach mieloidalnych w celu określenia ich fenotypów.
2. Ocena wpływu wyciszenia osteopontyny/*Spp1* i laktadheryny/*Mfg-E8* w komórkach glejaka C6 na wzrost guza w szczurzym modelu glejaka.
3. Zbadanie wpływu wyciszenia ekspresji *Spp1* i *Mfg-E8* w komórkach glejaka C6 na mikrośrodowisko guza, zwłaszcza na funkcjonalność komórek układu odpornościowego.
4. Ocena wpływu wyciszenia *Spp1* w glejaku na wybrane populacje komórek układu odpornościowego w krwi obwodowej szczurów.
5. Wpływ przywrócenia ekspresji prawidłowej *Spp1* lub jej wariantów w komórkach glejaka pozbawionych *Spp1* na wzrost guza *in vivo*.
6. Wpływ peptydu RGD na wzrost guza, napływ oraz funkcje komórek mieloidalnych w mikrośrodowisku w szczurzym modelu glejaka *in vivo*.

## 5. MATERIAŁY I METODY

### 5.1 Komórki glejaka – charakterystyka i hodowla

W badaniach wykorzystano komórki szczurzego glejaka C6 oraz komórki mysiego glejaka 261 (GL261). Komórki C6 pochodzą z ATTC (American Type Tissue Collection, USA).

Linia komórek glejaka C6 została wyprowadzona z komórek guza mózgu, który wywołano u szczura rasy Wistar po serii ekspozycji ciężarnych samic na N,N'-nitrozo-metylomocznik (Benda i wsp. 1968, Schmidke i wsp. 1971). Komórki C6 mają prawidłowy p53, delecje w locus *p16/Cdkn2a/Ink4a* prowadzące do braku białek p16 i p19ARF. W komórkach C6 podobne geny co w glejakach u ludzi mają podwyższoną ekspresję: *Pdgf-b*, *Igf-1*, *Egfr*, i *Erb3/Her3* (Giakoumettis i wsp. 2018). Obraz histopatologiczny guza powstałego po zaimplantowaniu komórek C6 do mózgu szczura przypomina ludzkiego glejaka wielopostaciowego (Grobber i wsp. 2002). Szczegółowy opis linii komórkowej C6 dostępny jest na stronie internetowej ATCC: <http://www.atcc.org>.

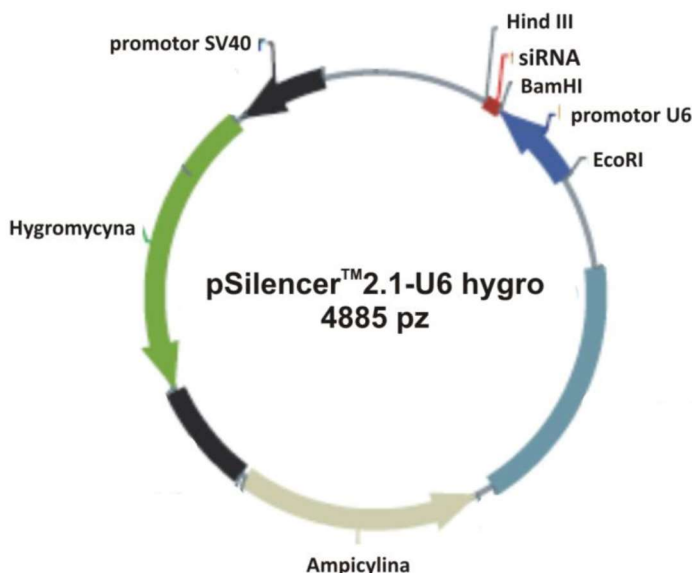
Komórki szczurzego glejaka C6 hodowano w pożywce DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Gibco) wzbogaconej w 10% surowicę cielęcą (NCS, ang. *Newborn Calf Serum*, Gibco) z dodatkiem antybiotyków penicyliny i streptomycyny (Sigma) w stężeniach odpowiednio 50 U/ml i 50 µg/ml. Hodowle prowadzono w sterylnych jednorazowych butelkach, szalkach lub płytkach zawierających 12, 24 lub 96 dołków (Corning) przeznaczonych do hodowli komórkowych. Do momentu rozpoczęcia doświadczenia komórki pasażowano co 2-4 dni, zależnie od ich gęstości. Przy pasażowaniu komórek stosowano 0,25% roztwór trypsyny z 0,02% EDTA (kwas edetynowy, Sigma). W przypadku wykonywania testów BrdU i MTT komórki wysiewano 24 godz. przed rozpoczęciem doświadczenia.

Hodowle prowadzono w inkubatorze (Heraeus) w temperaturze 37°C, w atmosferze nasyconej parą wodną i zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Morfologię komórek w trakcie hodowli obserwowano w mikroskopie świetlnym z kontrastem fazowym Olympus CK40. Bank komórek przechowywano w stanie zamrożonym w temperaturze -80°C (do bieżącego użytku) oraz w ciekłym azocie (w celu dłuższego przechowywania), w pożywce o składzie: 90% NCS / 10% DMSO (dimetylosulfotlenek) (Sigma).

## 5.2 Uzyskanie komórek linii glejaka C6 ze stabilnie wyciszoną ekspresją Mfg-E8 (shMfg-E8) oraz kontrolnych (shNeg)

Komórki C6 transfekowane konstruktem zawierającym specyficzny shRNA względem Mfg-E8 (pSilencer<sup>TM</sup>shMfg-E8) oraz komórki transfekowane konstruktem zawierającym sekwencję neutralnego shRNA (shNeg) wyprowadziły dr Aleksandra Ellert-Miklaszewska i dr Magdalena Kijewska z Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN. Kontrolny plazmid pSilencer<sup>TM</sup>shNeg pochodził z firmy Invitrogen, Life Technologies. Sekwencja neutralnego shRNA ma niską homologię do znanych sekwencji z ludzkiego, szczurzego i mysiego genomu. Dokładny opis procedury znajduje się w publikacji Ellert, Wiśniewski, Kijewska i wsp. 2016.

Używany konstrukct bazuje na plazmidzie pSilencer<sup>TM</sup> 2.1 U6-hygro (Life Technologies, Invitrogen), do którego wstawiono dwuniciowy oligonukleotyd kodujący shRNA (ang. short hairpin RNA) pod kontrolą promotora U6 dla polimerazy III. Umożliwia to wydajną ekspresję shRNA w wielu typach komórek. Ponadto w wektorze znajduje się gen oporności na ampicylinę, dzięki któremu możliwe było namnażanie plazmidu i selekcja w bakterjach oraz gen oporności na hygromycynę B umożliwiający selekcję klonów komórek eukariotycznych po transfekcji. Fragment kodujący shRNA jest włączany do wektora w miejscach cięcia enzymami restrykcyjnymi BamHI i Hind III (rycina 5).

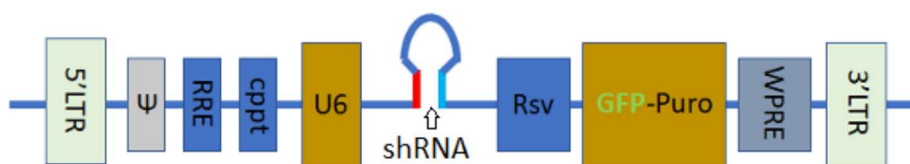


Ryc. 5. Schemat plazmidu pSilencer<sup>TM</sup> 2.1- U6 hygro. Na podstawie *pSilencer hygro kit Protocol*, Life Technologies



### 5.3 Uzyskanie komórek linii glejaka C6 ze stabilnie wyciszoną ekspresją Spp1 (shSpp1) oraz kontrolnych (shNeg)

Do wyprowadzenia komórek C6 ze stabilnie wyciszoną ekspresją osteopontyny (shSpp1) wykorzystano komercyjnie dostępny wektor lentiwirusowy pLenti-U6-shRNA-Rsv(GFP-Puro) (GenTarget), z którego usunięte zostały geny wirulencji. Wektor lentiwirusowy umożliwia wydajną transdukcję komórek eukariotycznych. Wstawka kodująca shRNA znajduje się pod kontrolą promotora U6 dla polimerazy III. Wektor zawiera także gen kodujący białko zielonej fluorescencji (GFP). Ponadto w wektorze znajduje się gen oporności na puromycynę umożliwiającą selekcję klonów komórek eukariotycznych po transdukcji (rycina 6).



Ryc. 6. Schemat wektora pLenti-U6-shSpp1-Rsv(GFP-Puro). Na podstawie pLenti-U6-shRNA-Rsv(GFP-Puro) kit (GenTarget). LTR (ang. long terminal repeat) – długie powtórzenia końcowe,  $\psi$  – sygnał pakowania do kapsydu, RRE (ang. *rev responsive element*) – miejsce przyłączania się wirusowego czynnika transkrypcyjnego, cppt – element wspomagający integrację i wydajność transdukcji, U6 – promotor, GFP+puro – geny zielonego białka fluorescencji i oporności na puromycynę, WPRE – potranskrypcyjny element regulatorowy.

Sekwencję wstawki kodującej shRNA zaprojektowano wykorzystując oprogramowanie dostępne na stronie internetowej producenta, na podstawie sekwencji docelowej skierowanej przeciwko mRNA *Spp1*. Oligonukleotyd kodujący shRNA miał sekwencję nici sensownej: 5'-AGC TAG TCC TAG ACC CTA A-3'. Kontrolny wektor pLenti-U6-shNeg-Rsv(GFP-Puro) miał sekwencję nici sensownej: 5'GTCTCCACGCGCAGTACATTT-3' i pochodził z firmy GenTarget. Sekwencja shRNA kodowana przez ten wektor ma niską homologię do znanych sekwencji z ludzkiego, szczurzego i mysiego genomu. Transdukcję komórek C6 i wektorem lentiwirusowym i selekcję klonów puromycyną w stężeniu 2  $\mu$ g/ml przeprowadzono we współpracy z dr Anną Gieryng z Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN

według protokołu producenta wektora. Wydajność transdukcji została zmierzona poprzez ocenę poziomu białka GFP przy użyciu cytometru przepływowego. Wydajność wyciszenia ekspresji *Spp1* na poziomie mRNA została potwierdzona metodą ilościowego PCR (qPCR), a także na poziomie białka metodą ELISA. W celu zbadania wpływu wyciszenia *Spp1* na żywotność i proliferację komórek wykonano testy MTT i BrdU

## **5.4 Testy komórkowe**

### **5.4.1 Oznaczanie proliferacji komórek – test inkorporacji BrdU**

Komórki C6 wysiewano na płytkę 24-dołkową i po 24 godz. oznaczano ich proliferację za pomocą zestawu Cell Proliferation ELISA BrdU (Roche Diagnostics). Komórki inkubowano przez 2 godz. z roztworem zawierającym BrdU (bromodeoksyurydynę), która jako analog nukleotydu wbudowuje się w nowo powstającą nić DNA. Następnie komórki utrwalano w etanolu i inkubowano 1,5 godz. z przeciwciałem rozpoznającym BrdU, sprzężonym z peroksydazą chrzanową (anty-BrdU-POD, Roche). Peroksydaza w wyniku reakcji enzymatycznej przekształcała dodany substrat w barwny produkt, którego ilość jest proporcjonalna do ilości włączonego BrdU w DNA proliferujących komórek. Następnie dodawano 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, co umożliwiało fotometryczną detekcję barwnego produktu. Pomiaru dokonywano przy długości fali 450 nm przy użyciu czytnika Multiscan EX. Z otrzymanych danych obliczano udział komórek proliferujących w całkowitej populacji komórek z wyciszoną ekspresją *Mfg-E8*, *Spp1* lub komórek shNeg, przyjmując absorbancję mierzoną w wyjściowych komórkach C6 za 1.

### **5.4.2 Ocena żywotności komórek – test metabolizmu MTT**

Komórki wysiewano na płytkę 24-dołkową i po 24 godz. do pożywki dodawano MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu, Sigma) w stężeniu końcowym 0,5 mg/ml. Po wniknięciu do komórek MTT jest redukowany przez dehydrogenazy łańcucha oddechowego do nierozpuszczalnego w środowisku wodnym formazanu. Ilość wytrąconego związku jest proporcjonalna do liczby żywych komórek. Po 4 godz. inkubacji z MTT w 37°C do dołków dodawano po 100 µl buforu lizującego zawierającego 20% SDS i 50% DMF (N,N-dimetyloformamid) o pH 4,7 i inkubowano przez noc w celu rozpuszczenia fioletowych kryształów formazanu (Hansen i wsp. 1989). Absorbancję mierzono przy długości fali 570 nm, używając

czytnika Multiscan EX (Thermo LabSystems). Przyjęto absorbancję lizatu komórek kontrolnych za 100%. Z otrzymanych danych obliczano procent żywych komórek.

### **5.4.3 Pomiar stężenia Spp1 metodą ELISA**

Stężenie Spp1 w nadsączu znad wyjściowych komórek glejaka C6, komórek shNeg i komórek shSpp1 zmierzono metodą ELISA (ang. *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) przy użyciu komercyjnego zestawu Mouse/Rat Osteopontin (OPN) Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc). Wyjściowe komórki C6, komórki z wyciszoną ekspresją osteopontyny (shSpp1) oraz komórki z kontrolnym shRNA (shNeg) wysiewano w gęstości  $7 \times 10^4$ /ml. Pożywkę hodowlaną znad komórek zbierano po 24 godz. i wirowano z prędkością 300 x g w celu usunięcia resztek komórek, a następnie dodawano fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF, ang. *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) będący inhibitorem proteaz w stężeniu 1 mM. Pożywkę rozcieńczano pięciokrotnie w odczynniku Assay Diluent, a następnie wykonywano pomiar stężenia osteopontyny zgodnie z protokołem producenta. Odczytu dokonano za pomocą czytnika Multiscan EX (Thermo LabSystems) przy długości fali 540 nm. Stężenie osteopontyny wyliczano z równania wyznaczonego dla krzywej standardowej, sporządzonej na podstawie referencyjnego roztworu białka dostarczonego przez producenta zestawu.

## **5.5 Analiza poziomu ekspresji genów**

### **5.5.1 Pozyskiwanie RNA z komórek**

Komórki poddawano lizie w 400  $\mu$ l buforu lizującego (Lysis Buffer; Roche). Dalsza procedura wykonywana była zgodnie z protokołem dostarczonym w zestawie przez producenta (High Pure RNA Isolation Kit; Roche). Wyizolowany, zaadsorbowany na złożu kolumnienki RNA eluowano 50  $\mu$ l buforu elucyjnego (Elution Buffer; Roche). Czystość i stężenie wyizolowanego RNA w próbkach oceniano spektrofotometrycznie aparatem NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) mierząc absorbancję przy długości fali 260 nm i 280 nm.

### **5.5.2 Pozyskiwanie RNA z tkanek**

Homogenizator przed każdym użyciem płukany był przez 15 min w 0,1M roztworze NaOH w wodzie z dodatkiem pirowęglaanu dietylu (DEPC), następnie 5 min w 0,2% SDS (dodecylosiarczan sodu) w wodzie z dodatkiem DEPC i 3 x 5 min

w wodzie destylowanej z dodatkiem DEPC. Między próbkami urządzenie było płukane 5 min w 0,2% SDS w wodzie z dodatkiem DEPC i 3 x 5 min w wodzie destylowanej z dodatkiem DEPC.

Tkanekę umieszczano w odczynniku TRI Reagent (Sigma), homogenizowano, po czym inkubowano 5 min. w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 0,2 ml chloroformu, wytrząsano i inkubowano 15 min. Po inkubacji wirowano 15 min. przy 12000 g w 4°C. Zebrano górną, wodną fazę zawierającą RNA, dodano równą objętość 2-propanolu, inkubowano 15 min. w temperaturze pokojowej i wirowano 10 min. przy 12000 g w 4°C. Osad płukano 75% etanolem. Po ponownym odwirowaniu osad zawieszano w 50 µl wody i mierzono stężenie wyizolowanego RNA. RNA wyizolowane z pólki ze zdrowych zwierząt oraz z pólki od zwierząt z glejakiem było dodatkowo oczyszczane z użyciem High Pure RNA Isolation Kit (Roche). Ilość i jakość RNA była ustalana za pomocą elektroforezy kapilarnej w urządzeniu Bioanalyzer 2100 z użyciem zestawu Agilent 6000 RNA Nano Kit (Agilent Technologies).

### **5.5.3 Synteza cDNA**

cDNA syntetyzowano na matrycy mRNA z wykorzystaniem starterów oligo(dT)15 (Promega lub Oligo.pl), które hybrydują do sekwencji poli(A) znajdujących się na 3'-końcu cząsteczek większości mRNA. Zastosowanie tych starterów zapewnia selektywną amplifikację sekwencji mRNA z pominięciem pozostałych typów RNA. Roztwór, w skład którego wchodzi: 1 µg RNA, 1 µl roztworu dNTP (każdy w stężeniu 10 mM, Promega), 1 µl roztworu oligo(dT)15 (stężenie końcowe 25 µg/ml) oraz woda (do 10 µl), inkubowano przez 10 min. w 70°C, po czym schładzano do temperatury 4°C. Po dodaniu 2 µl 10x stężonego buforu wchodzącego w skład zestawu do odwrotnej transkrypcji (Sigma-Aldrich) oraz 1 µl odwrotnej transkryptazy (200 U, M-MLV Reverse Transcriptase, Sigma-Aldrich) i wody (do końcowej objętości 20 µl), próbki inkubowano przez 50 min. w 37°C, a następnie 10 min. w 80°C i 5 min. w 4°C.

### **5.5.4 Hybrydyzacja do mikromacierzy**

Analizę transkryptomoczną RNA wyizolowanego z tkanek wykonano z użyciem 100 ng całkowitego RNA. Amplifikacja całogenomowa była przeprowadzona z użyciem GeneAtlas WT Expression Kit zgodnie z instrukcją producenta GeneAtlas

Personal Microarray System (Affymetrix). Pofragmentowane i wyznakowane cDNA było hybrydyzowane do mikromacierzy Rat Gene 2.1 ST Array Strip (Affymetrix). Hybrydyzację do mikromacierzy przeprowadzono we współpracy z dr Michałem Klossem z Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN.

### **5.5.5 Analiza bioinformatyczna profili ekspresji genów**

Przetwarzanie wstępne zostało wykonane w środowisku R/Bioconductor z wykorzystaniem funkcji rma pakietu oligo z opcją core (raportowanie ekspresji dla transkryptów). Mapowanie zestawów sond do transkryptów i genów wykonano wykorzystując funkcję getNatAffx. Dla każdego genu obliczono uśredniony profil ekspresji na podstawie zestawów sond mapujących się unikalnie do danego genu. Przeprowadzono test t-Studenta z poprawką Welch'a oraz wizualizację danych w postaci map ciepła (ang. *heatmaps*) w środowisku Python z wykorzystaniem funkcji bibliotek matplotlib i scipy. Dane przedstawione na mapach ciepła były scentrowane na średniej wartości z próbek kontrolnych, czyli przedstawiają zmianę ekspresji względem kontroli. Przy porównaniu profilu ekspresji genów szczurzego glejaka i podtypów ludzkich GBM wykorzystano dane transkryptomiczne (RNA seq) z próbek ludzkich glejaków oraz prawidłowego mózgu dostępne w bazie TCGA. Przyporządkowanie do konkretnego podtypu GBM następowało w oparciu o sygnaturę 840 genów w teście Kolmogorov-Smirnoffa. Geny szczurze mapowano do ich ludzkich ortologów z wykorzystaniem wyszukiwarki Ensembl (wersja 87). Otrzymana lista ortologów zawierała 660 z 840 genów będących sygnaturą konkretnych podtypów molekularnych ludzkich GBM. Do porównania glejaka C6 z ludzkimi subtypami wykorzystano współczynnik korelacji Spearmana między krotnością zmiany (glejak/kontrola) dla 660 genów. Zastosowana metodyka analiz bioinformatycznych została szczegółowo opisana w Gieryng i wsp. 2017. Analizy bioinformatyczne przeprowadzono we współpracy z dr Jakubem Mieczkowskim z Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN.

### **5.5.6 PCR w czasie rzeczywistym**

Reakcję prowadzono w 20 µl roztworu zawierającego: 1 µl roztworu cDNA, 10 µl SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl mieszaniny starterów (stężenie końcowe 500 nM) i 8 µl wody UltraPure (Invitrogen). Jako wewnętrzną kontrolę ilości cDNA w reakcji użyto starterów do amplifikacji szczurzego rRNA 18S

(stężenie końcowe 500 nM). Startery zaprojektowano w oparciu o bazę sekwencji nukleotydowych Ensembl przy użyciu programu Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). Sekwencje użytych starterów użytych do amplifikacji cDNA w czasie rzeczywistym przedstawia tabela 1.

Wykonano dwa powtórzenia techniczne na jeden punkt doświadczalny. Do powielania cząsteczek cDNA stosowano termocykler do analizy w czasie rzeczywistym 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), używając następującego profilu termicznego: 50°C przez 2 min., 95°C przez 10 min. i 40 cykli o profilu: 95°C przez 15 s, 60°C przez 1 min. Po zakończeniu reakcji uzyskane wartości CT (ang. *threshold cycle*), będące odzwierciedleniem numeru cyklu, w którym ilość produktu przekraczała wartość graniczną, przeliczano na krotność zmiany, stosując wzór:  $\text{krotność zmiany} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ . Wzór  $\Delta\Delta\text{CT}$  wyraża różnicę między wartością CT badanej próbki a CT genu referencyjnego i CT próbki kontrolnej.

Tab. 1. Sekwencja starterów użytych do amplifikacji cDNA w czasie rzeczywistym

Gen	Sekwencje starterów
<i>18s RNA</i>	F: 5' AACGAACGAGACTCTGGCATG 3' R: 5' CGGACATCTAAGGGCATCACA 3'
<i>Spp1</i>	F: 5' TTGTTTCTCAGTTCAGTGGATACATG 3' R: 5' TCAGTGGTGTCTG CATGAAAC 3'
<i>Mfg-E8</i>	F: 5' CGTCCGGTGACTTCTGTGACT 3' R: 5' ATCGTGGAAGCAAGGGTTT 3'

## 5.6 Implantacja komórek C6 do prążkowień mózgu szczura

Doświadczenia z implantacją komórek szczurzego glejaka C6 przeprowadzono na 3-miesięcznych samcach szczurów ze szczepu Wistar o ciężarze ciała ok. 250-300 g, pochodzących z hodowli konwencjonalnej Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Zwierzęta odbywały 7-dniową kwarantannę w Zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w celu aklimatyzacji. Zarówno przed, jak i podczas doświadczenia, szczury przebywały w klatkach mieszczących do 5 osobników, w pomieszczeniach klimatyzowanych o temperaturze powietrza 22 +/-2°C i wilgotności 55%. Rytm dobowy 12/12 regulowany był automatycznymi zegarami. Badania na zwierzętach

wykonywano zgodnie z ogólnymi zasadami sztuki medycyny weterynaryjnej i etyki eksperymentatora. Poszczególne etapy doświadczeń przeprowadzono ściśle według procedur zaaprobowanych przez Lokalną Komisję Etyczną – uchwały nr 1065/ 2009, 111/ 2010 i 4/2015.

Do implantacji przygotowywano zawiesinę  $10^6$  komórek w 50  $\mu$ l DMEM z klonów komórek C6: shNeg, shMfg-E8 lub shSpp1. Komórki przechowywano na lodzie do 3 godz. Zwierzę usypiano w komorze w atmosferze izofluranu, następnie umieszczano w aparacie stereotaktycznym, w którym głowa zwierzęcia zostaje unieruchomiona. Na nos szczura nakładano maskę, podłączoną do aparatu do narkozy wziewnej 2% izofluranu przy ciśnieniu tlenu 1,5 atm. Zwierzętom golono głowy, następnie skórę dezynfekowano 70% etanolem. Gałki oczne zabezpieczano przed wysychaniem żelem Carbomerum (Vidisic). Skórę głowy rozcinano skalpelem i oczyszczano kości czaszki przy użyciu 3% wody utlenionej. Gdy uwidaczniały się szwy, identyfikowano i odczytywano koordynaty punktu Bregmy. Ramię aparatu stereotaktycznego naprowadzano na miejsce wyznaczone przez następujące koordynaty prążkowania: AP (anterior/posterior) = +1,6 mm, L (lateral) = -2 mm. W czaszce borowano otwór za pomocą mikrosilnika protetycznego (Marathon-N7), o średnicy nieco większej niż średnica igły strzykawki. Za pomocą strzykawki (Hamilton syringe, 10  $\mu$ l) wprowadzano 2,5  $\mu$ l zawiesiny komórek w pożywce DMEM (50 000 komórek) bądź 2,5  $\mu$ l pożywki DMEM (w przypadku operacji pozorowanej) w tempie 0,5  $\mu$ l/1 min do odczytanej wartości koordynaty DV (dorsal/ventral)= -6 mm. Igłę wycofywano z szybkością 1 mm/1 min., aby zapobiec zasysaniu komórek. Strzykawkę przepłukiwano kilkakrotnie w 70% roztworze alkoholu etylowego, a następnie w wodzie destylowanej. Ranę zszywano, smarowano żelem Lignocainum Jelfa zawierającą 20 mg/g lidokainy wykazującej miejscowe działanie znieczulające i obserwowano wybudzanie zwierzęcia po kilku minutach od ustania narkozy. Przez cały okres doświadczenia szczury były pod stałą kontrolą eksperymentatora.

### **5.7 Pobranie i przygotowanie tkanek do izolacji RNA**

Mózgi zwierząt izolowano po 21 dniach od implantacji komórek glejaka C6 bądź od operacji pozorowanej. Zwierzętom podawano dootrzewnowo śmiertelną dawkę pentotalu (1 mg/kg masy ciała), następnie po ustaniu funkcji życiowych dekapitowano i izolowano mózgi. Przy użyciu skalpela wycinano półkule mózgu

z glejakiem bądź po operacji pozorowanej, które umieszczano natychmiast w ciekłym azocie do głębokiego zamrożenia tkanki. Tkanki przechowywano w temperaturze -80°C do czasu izolacji RNA.

### **5.8 Pobranie i przygotowanie materiału do barwień immunohistochemicznych**

Mózgi szczurów po implantacji komórek glejaka izolowano 14 dnia po operacji. Zwierzętom podawano dootrzewnowo letalną dawkę pentotalu (1 mg/kg masy ciała), następnie szczury poddawane były perfuzji transkardialnej. Przez lewą komorę serca do aorty wprowadzano kaniulę, po czym uruchamiano pompę perystaltyczną, tłoczącą zimny PBS. Nacinano prawy przedsionek, umożliwiając wypływ krwi i PBS. Po podaniu ok. 250 ml PBS, gdy nie obserwowano już wypływającej krwi, podawano 400 ml zimnego 4% paraformaldehydu PFA w PBS. Po zakończeniu perfuzji szczury dekapitowano i izolowano mózgi, które umieszczano na 24 godz. w 4% PFA w 4°C. Utrwalone mózgi umieszczano w 30% roztworze sacharozy, w celu zabezpieczenia tkanki przed pękaniem w trakcie zamrażania, do momentu, gdy opadały na dno probówki. Następnie mózgi umieszczano w pojemnikach wypełnionych odczynnikami Tissue freezing medium (Jung) i zamrażano trzymając na mieszaninie suchego lodu i izopentanu. Po zamrożeniu mózgi przechowywano w -80°C.

Mózgi krojono na skrawki 12  $\mu\text{m}$  przy użyciu kriostatu (Microm HM 560) i zbierano bezpośrednio na polilizynowane szkiełka podstawowe (Thermo scientific). Szkiełka z naniesionymi skrawkami przechowywano w -80°C.

### **5.9 Wyznaczanie objętości guzów**

Do wyliczenia wielkości guzów wykorzystywano skrawki o grubości 12  $\mu\text{m}$ . Skrawki barwiono kwaśnym błękitem toluidyny (1% błękit toluidyny, 20% etanol, 1% kwas octowy) przez 1 min. następnie płukano w wodzie i w PBS. Preparaty odwadniano w szeregu alkoholi (70%, 90%, 100%) i w ksylenie i prześwietlano w balsamie kanadyjskim. Zdjęcia preparatów wykonywano przy użyciu mikroskopu Leica DM4000B. Powierzchnie guzów zarysowywano ręcznie wykorzystując oprogramowanie Leica Application Suite dołączone do mikroskopu Leica DM4000B, które wyliczało pola powierzchni obrysowanych guzów na każdym skrawku. Na szkiełka do wyliczenia objętości guzów zbierano co 5 skrawek, dlatego odległość między kolejnymi skrawkami o znanym polu powierzchni guza wynosiła 60  $\mu\text{m}$ . Do



wyznaczenia objętości guza wykorzystano następujący wzór, zaproponowany przez Cavalieri (Gong i wsp. 2004):

$$V [\text{mm}^3] = 0,06 \times \sum_{i=1}^{n-1} P_i + P_n \times 0,012$$

V – objętość guza w  $\text{mm}^3$

0,06 – odległość między kolejnymi skrawkami w mm

$P_i$  – pole powierzchni i- tego skrawka w  $\text{mm}^2$

$P_n$  – pole powierzchni ostatniego skrawka w  $\text{mm}^2$

0,012 – grubość ostatniego skrawka w mm

## 5.10 Barwienia immunohistochemiczne

Szkiełka umieszczano w temperaturze pokojowej min. 2 godz. przed rozpoczęciem procedury barwienia. Za pomocą patyczka delikatnie usuwano odczynnik Tissue freezing medium wokół skrawków i każdy skrawek osobno obrysowywano markerem hydrofobowym, który umożliwia nakroplenie niewielkiej ilości płynu na preparat. Następnie szkiełka umieszczano w roztworze PBS i odpłukiwano pozostałości odczynnika do zatapiania 3x przez 5 min. Tak przygotowane preparaty poddawano procedurze barwienia, której przebieg zależał od używanych przeciwciał pierwszorzędowych.

### 5.10.1 Ocena liczby GAMs infiltrujących guzy oraz ekspresji IL-1 $\beta$ w guzie

Oceny liczby GAMs infiltrujących guzy dokonano na podstawie barwień immunohistochemicznych z użyciem przeciwciała anty-Iba-1 (ang. *ionized calcium binding adaptor molecule 1*), rozpoznającego antygen specyficzny dla komórek mikrogleju oraz naciekających z obwodu makrofagów i monocytów. Ocenę poziomu ekspresji prozapalnej cytokiny interleukiny 1 $\beta$  w guzie wykonano z zastosowaniem przeciwciała anty-IL1 $\beta$ . Aktywność endogennej peroksydazy blokowano poprzez umieszczenie szkiełek w roztworze 10% metanolu i 0,5% nadtlenu wodoru w PBS na 30 min w temperaturze pokojowej. Po blokowaniu preparaty płukano krótko ultra czystą wodą destylowaną i 3 razy przez 5 min w PBS, po czym przeprowadzono blokowanie miejsc nieswoistego wiązania przeciwciał w roztworze blokującym zawierającym 10% surowicę kozią + 0,3% TritonX 100 w PBS (w przypadku preparatów przeznaczonych do barwienia przeciwciałem anty-Iba-1) bądź 10%

surowicę końską + 0,1% TritonX 100 w PBS (w przypadku preparatów przeznaczonych do barwienia przeciwciałem anti-il1 $\beta$ ) przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Skrawki następnie inkubowano przez noc w 4°C w wilgotnej komorze w roztworze przeciwciała pierwszorzędowego rozcieńczonego w roztworze blokującym.

Preparaty płukano trzykrotnie przez 10 min w PBS, a następnie inkubowano przez 2 godz. w temperaturze pokojowej z biotynylowanym przeciwciałem drugorzędowym (Vector Laboratories Inc.) rozcieńczonym 1:1000 w 3% roztworze surowicy z 0,1% Tritonem X100. W celu zwiększenia czułości i wydajności reakcji wykorzystano ekstrawidynę (rozcieńczoną 1:200 w PBS, Sigma). Białko to wykazuje wysokie powinowactwo do biotyny i wzmacnia sygnał na końcu reakcji. Preparaty inkubowano z ekstrawidyną sprzężoną z peroksydazą chrzanową w roztworze blokującym przez 1 godz. Badane białko uwidaczniano poprzez podanie substratu peroksydazy – 3,3'-diaminobenzzydiny (DAB, Sigma) zgodnie z protokołem producenta. Powstały produkt charakteryzował się orzechowym zabarwieniem. Następnie reakcję hamowano poprzez krótkie odpłukanie w ultraczystej wodzie destylowanej i preparaty odwadniano w szeregu alkoholi (70%, 90%, 100%) i w ksylene oraz zamykano w mieszaninie utrwalającej (HistoFluid). Skrawki inkubowane bez przeciwciał pierwszorzędowych służyły jako kontrole negatywne.

Tab. 2. Zastosowane przeciwciała i ich rozcieńczenia.

Antygen rozpoznawany przez przeciwciało	Producent	Rozcieńczenie przeciwciała I rzędowego	Roztwór blokujący	Przeciwciało II rzędowe	Rozcieńczenie przeciwciała II rzędowego
Iba-1	Wako	1:1000	10% surowica kozia + 0,3% TritonX 100 w PBS	biotynylowane anty-królicze IgG w 3% koziej surowicy z 0,1% Tritonem X100	1:300
Il-1 $\beta$	R&D Systems	1:80	10% surowica końska + 0,1% TritonX 100 w PBS	biotynylowane anty-kozie IgG w 3% koziej surowicy z 0,1% Tritonem X100	1:300

### **5.10.2 Identyfikacja komórek z wybranymi markerami związanych z fenotypem pronowotworowym, prozapalnym oraz angiogenezą**

W celu identyfikacji komórek produkujących określone białka zastosowano specyficzne przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe (tabela 3). Po zakończeniu barwienia przeciwciałami II rzędowymi wykonywano barwienie jąder komórkowych odczynnikami DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol, Sigma) w stężeniu 1:1000 w PBS. Preparaty zamykano w preparacie wodnym do utrwalania flouorescencji (Fluorescent Mounting Medium, Dako) i analizowano przy użyciu mikroskopu Leica DM4000B.

Do oceny ekspresji arginazy-1 w GAMs oraz jednoczesnej detekcji komórek z ekspresją Arg-1 i Trem2 w guzie preparaty pokrywano 1% roztworem SDS w PBS w celu odsłonięcia antygenu i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min, po czym usuwano roztwór SDS i trzykrotnie płukano skrawki w PBS przez 7 min. Następnie przeprowadzono blokowanie miejsc nieswoistego wiązania przeciwciał w roztworze blokującym 10% surowicy oślej w PBS przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Skrawki inkubowano w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko Iba-1 i Arg-1 bądź Trem2 i Arg-1 przez noc w 4°C w wilgotnej komorze. Kolejnego dnia preparaty płukano trzykrotnie przez 10 min w roztworze PBS, a następnie inkubowano przez 2 godz. w ciemności z roztworem przeciwciał II-rzędowych w temperaturze pokojowej.

W podobny sposób wykonano barwienia umożliwiające ocenę ekspresji czynnika von Willebranda (w celu uwidocznienia gęstości naczyń krwionośnych w guzie), markerów CD163 i Trem2 komórkach Iba-1<sup>+</sup> oraz napływu limfocytów T cytotoksycznych (CD8<sup>+</sup>) do guza. Blokowanie miejsc nieswoistego wiązania przeciwciał prowadzono przez 1 godz. w temperaturze pokojowej w roztworze blokującym o składzie 10% surowica ośla i 0,1% TritonX 100 w PBS w przypadku barwień na obecność limfocytów CD8<sup>+</sup> oraz ocenę ekspresji CD163 i Trem2 w komórkach Iba-1<sup>+</sup>. W przypadku barwień na ocenę ekspresji czynnika von Willebranda (vWF) roztwór blokujący zawierał 10% surowicę ośłą i 0,5% TritonX 100 w PBS. Preparaty inkubowano w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko Iba-1 i CD163, Iba-1 i Trem2, vWF bądź CD8 przez noc w wilgotnej komorze. Kolejnego dnia preparaty płukano trzykrotnie przez 10 min w roztworze PBS i inkubowano z roztworami przeciwciał II-rzędowych przez 2 godz. w temperaturze pokojowej.

Tab. 3. Warunki inkubacji preparatów tkankowych z odpowiednimi roztworami.

Antygen rozpoznawany przez przeciwciało	Producent	Rozcieńczenie przeciwciała I rzędowego	Przeciwciało II rzędowe	Rozcieńczenie przeciwciała II rzędowego
Iba-1 #	Dako	1:1000	Anty-królicze IgG sprzężone z Alexa Fluor 488	1:1000 w 3% surowicy + 0,1% TritonX 100 w PBS
Arg-1	Santa Cruz	1:100	Anty-kozie IgG sprzężone z Alexa Fluor 555	1:1000 w 3% surowicy oślej + 0,1% TritonX 100 w PBS
CD163	Novus Biologicas	1:100	Anty-mysie IgG sprzężone z Alexa Fluor 555	1:1000 w 3% surowicy oślej + 0,1% TritonX 100 w PBS
Iba-1 ##	Novus Biologicas	1:1000	Anty-kozie IgG sprzężone z Alexa Fluor 488	1:1000 w 3% surowicy + 0,1% TritonX 100 w PBS
iNos	Abcam	1:150	Anty-królicze IgG sprzężone z Alexa Fluor 555	1:1000 w 3% surowicy oślej + 0,1% TritonX 100 w PBS
Trem2	Bioss	1:1000	Anty-królicze IgG sprzężone z Alexa Fluor 555	1:1000 w 3% surowicy oślej + 0,1% TritonX 100 w PBS
CD3	Abcam	1:100	Anty-królicze IgG sprzężone z Alexa Fluor 555	1:1000 w 3% surowicy oślej + 0,1% TritonX 100 w PBS
CD8	Biorad	1:100	Anty-mysie IgG sprzężone z Alexa Fluor 555	1:1000 w 3% surowicy oślej + 0,1% TritonX 100 w PBS
vWF	Abcam	1:1000	Anty-królicze IgG sprzężone z Alexa Fluor 555	1:1000 w 3% surowicy oślej + 0,1% TritonX 100 w PBS

# – używane do kolokalizacji z Arg-1 i CD163

## – używane do kolokalizacji z iNos i Trem2

Przy ocenie ekspresji iNos w komórkach Iba1<sup>+</sup> oraz napływu limfocytów CD3<sup>+</sup> do guza, w celu odsłonięcia antygeny preparaty umieszczano w buforze Antigen Retrieval Solution (Dako) o pH 6 o temperaturze 65°C, a następnie gotowano w temperaturze 95°C przez 20 min. Preparaty schładzano do temperatury pokojowej w ultraczystej wodzie destylowanej przez 20 min. Następnie przeprowadzono blokowanie miejsc nieswoistego wiązania przeciwciał w roztworze blokującym zawierającym 10% surowicę osłą i 0,1% TritonX 100 w PBS przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Skrawki inkubowano przez noc w 4°C w wilgotnej komorze w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych. Następnie preparaty płukano trzykrotnie przez 10 min w roztworze PBS i inkubowano z roztworami przeciwciał II-rzędowych przez 2 godz. w temperaturze pokojowej.

#### **5.11 Sortowanie komórek CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>niski</sup> (mikrogleju) z glejaków C6**

Populację komórek CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>niski</sup> izolowano z półkul mózgow z glejakiem C6 14 dnia po implantacji komórek C6 bądź z mózgow prawidłowych. Zwierzętom podawano dootrzewnowo letalną dawkę pentotalu (1 mg/kg masy ciała), następnie szczury poddawane były perfuzji transkardialnej. Przez lewą komorę serca do aorty wprowadzano kaniulę, po czym uruchamiano pompę perystaltyczną, tłoczącą zimny PBS. Nacinano prawy przedsiónek, umożliwiając wypływ krwi i PBS. Po podaniu ok. 250 ml PBS, gdy nie obserwowano już wypływającej krwi, izolowano półkule z glejakiem i umieszczano w pożywce HBSS (ang. *Hanks' balanced salt solution*, Gibco) bez jonów wapnia i magnezu. Tkankę rozdrabniano mechanicznie na szalce za pomocą skalpela, a następnie dodawano bufor z Enzymem I dołączony do zestawu MACS Neural Tissue Dissociation Kits (Miltenyi Biotec) i inkubowano z rotowaniem (13 obr/min) w 37°C przez 10 min. Do otrzymanej zawiesiny dodawano mieszaninę Enzymu II i dysocjowano za pomocą szklanych pipet pasteurowskich o wygładzonych końcówkach do czasu otrzymania jednorodnej zawiesiny komórek. Inkubowano próbki w 37°C przez 10 min na rotatorze. Próbki przesączały przez sączonek o średnicy porów 70 µm (Syringe-Falcon, BD Biosciences) i zawieszano w 10 ml pożywki HBSS zawierającej jony wapnia i magnezu. Próbki przesączały przez sączonek o średnicy porów 30 µm (Syringe-Falcon, BD Biosciences) i wirowano przy obrotach 300 g przez 10 min w temperaturze pokojowej. Mielinę usuwano stosując metodę wirowania w gradiencie stężeń Percollu przy obrotach 950 g przez 20 min w 4°C. Supernatant odrzucano, a osad komórek zawieszano w buforze do

barwienia dołączonym do zestawu. Komórki liczone wykorzystując aparat NucleoCounter (ChemoMetec) stosując dołączone do urządzenia odczynniki według zaleceń producenta.

Próbki inkubowano przez 30 min w 37°C z kulkami magnetycznymi opłaszczonymi przeciwciałem CD11b (Miltenyi Biotec) w celu izolacji z zawiesiny komórek mikrogleju i makrofagów (CD11b<sup>+</sup>). Następnie, aby rozróżnić populacje mikrogleju od makrofagów, komórki znakowano przez 30 min w 4°C przeciwciałami anty-CD11b-FITC i anty-CD45-PE (1:100, BD Pharmingen). Umożliwiało to późniejszy sort komórek CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>niski</sup> (mikroglej) i CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>wysoki</sup> (makrofagi) przy pomocy urządzenia komórek FACS Aria III. Część zawiesiny komórek znakowano przeciwciałami będącymi kontrolą izotopową: anty-IgG2bκ-PE oraz anty-IgG2bκ-FITC, a część pozostawiono bez znakowania. Po zakończonej inkubacji zawiesinę wirowano przy obrotach 200 g przez 5 min w temperaturze pokojowej, a osad zawieszano w 0,5 ml buforu. Kolumnę (MS Column, Miltenyi Biotec) umieszczano w polu magnetycznym magnesu (MiniMACS Separator, MiltenyiBiotec) i przemywano 0,5 ml buforu. Następnie na kolumnę nanoszono zawiesinę komórek. Frakcję negatywną zebrano w celu sprawdzenia wydajności procesu separacji. Niezwiązane ze złożem komórki przemywano trzykrotnie buforem. Frakcję pozytywną (komórki CD11b<sup>+</sup>) zbierano po usunięciu kolumny z pola magnetycznego przemywając ją 2-krotnie 2 ml buforu, po czym zawiesinę wirowano przy obrotach 200 g przez 3 min w temperaturze pokojowej. Następnie komórki mikrogleju (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>niski</sup>) wysortowano za pomocą sortera komórek FACS Aria III. Sort przeprowadzono we współpracy z dr Anną Gieryng.

## **5.12 Oznaczanie populacji komórek układu odpornościowego w krwi obwodowej szczurów w glejakiem**

Krew obwodową szczurów z glejakiem shSpp1 i glejakiem shNeg pobierano do probówek zawierających heparynę w ilości 50 j/ 1ml krwi, która zapobiega krzepnięciu krwi. Ostrożnie mieszano wykonując probówką koliste ruchy i przesączało przez sącdek. Następnie z każdej próbki krwi przenoszono po 100 µl do probówek dedykowanych do użytku w urządzeniu FACSCalibur (Beckton Dickinson) zawierających odpowiednie przeciwciała:

1. anty-CD11b-APC (1:100, BD Bioscience) i anty-Gr1 (1:100, BD Bioscience)
2. anty-CD8-PerCP (1:50, Biolegend) i anty-CD4-FITC (15:1000, Biolegend)

3. anty-CD3-FITC (1:50, Biolegend)
4. próba kontrolna nieznakowana (bez przeciwciał)

Aby usunąć niespecyficzną fluorescencję tła wykonano kontrolę izotypową wybarwiając każdą próbkę IgG tej samej klasy i podklasy sprzężonymi z tymi samymi fluorochromami co używane przeciwciała. Krew barwiono przez 15 min w temperaturze 4°C, Następnie przeprowadzano lizę erytrocytów dodając do każdej próbki po 1 ml buforu do lizy erytrocytów (Sigma-Aldrich). Próbki inkubowano 10 min w temperaturze pokojowej, a następnie dwukrotnie dodawano 2 ml PBS i wirowano przez 10 min, 1200 rpm w 4°C. Supernatant odrzucano, a osad komórek zawieszano w 300 µl FACS Buffer (Invitrogen) i analizowano za pomocą cytometru FACSCalibur (Beckton Dickinson) z wykorzystaniem oprogramowania Cell Quest (BD Biosciences). Wszystkie etapy przeprowadzono utrzymując próbki w ciemności.

### **5.13 Przygotowanie ekstraktów białkowych z tkanek**

Mózgi zwierząt izolowano po 14 dniach od implantacji komórek shNeg bądź shSpp1. Jako kontrolę wykorzystano półkule bez guza. Zwierzętom podawano dootrzewnowo pentotal (1 mg/kg masy ciała), dekapitowano i izolowano mózgi. Przy użyciu skalpela wycinano fragment tkanki, który umieszczano natychmiast w ciekłym azocie. Następnie tkankę homogenizowano w roztworze do izolacji białek o składzie 50 mM KCl, 50 mM PIPES, 10 mM EGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% TritonX-100, koktajl inhibitorów proteaz (1:100, Sigma-Aldrich) i 100 mM PMSF przy użyciu homogenizatora ręcznego. Uzyskane homogenaty inkubowano w -20°C przez 20 min, a następnie przez 20 min na lodzie. Po inkubacji próbki wirowano z prędkością 12000x g przez 20 min w 4°C. Supernatanty zawierające ekstrakty białkowe przenoszono do nowych probówek i przechowywano w -80°C,

### **5.14 Oznaczanie zawartości białka w ekstraktach białkowych metodą Bradford**

Zawartość białka oznaczano na płytkach 96-dołkowych w rozcieńczonych 2000-krotnie ultraczystą wodą destylowaną ekstraktach białkowych. W celu uzyskania krzywej wzorcowej przygotowano roztwory surowiczej albuminy bydlęcej (BSA ang. *bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich) zawierające odpowiednio 0, 0,2, 0,6, 1 i 1,4 µg białka w 100 µl wody. Nanoszono po 100 µl rozcieńczonych

próbek lub roztworów wzorcowych w dwóch powtórzeniach technicznych, a następnie dodawano po 100  $\mu$ l odczynnika Bradford (Sigma-Aldrich). Płytkę niezwłocznie umieszczano w czytniku Elisa Multiscan EX (Thermo Lifesystems), po czym wytrząsano przez 1 min i mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm. Następnie sporządzano krzywą wzorcową, a z uzyskanego równania zależności liniowej pomiędzy zmierzoną absorbancją a stężeniem białka obliczano stężenie białka w ekstraktach białkowych.

#### **5.15 Oznaczanie aktywności arginazy-1 w ekstraktach białkowych z pólkul z guzem shNeg, guzem shSpp1 oraz w półkuli kontralateralnej**

Aktywność Arginazy-1 wyrażana jest ilością uwalnianej ornityny podczas hydrolizy argininy. Ekstrakty białkowe rozcieńczano dziesięciokrotnie w ultraczystej wodzie destylowanej. Następnie przeprowadzano aktywację enzymu w obecności jonów manganu ( $Mn^{2+}$ ) będących kofaktorem Arg-1 dodając po 25  $\mu$ l 10 mM  $MnCl_2$  do 50  $\mu$ l rozcieńczonych ekstraktów. Próbkę wortexowano i inkubowano przez 20 min w temp. 55°C, po czym schładzano do temperatury pokojowej. Reakcję enzymatyczną przeprowadzano w mieszaninie zawierającej 25  $\mu$ l 0,1M buforu węglanowego o pH 9,8 (0,2M  $Na_2CO_3$  i 0,2M  $NaHCO_3$ ) i L-argininę (w postaci 0,1M chlorowodoru L-argininy pH 9,5) inkubując próbki przez 30 min w temperaturze 37°C. Następnie przeprowadzano reakcję barwną: dodawano 750  $\mu$ l 99,5% kwasu octowego i 25  $\mu$ l odczynnika ninhydrynowego (zawierającego 2,5 g ninhydryny w mieszaninie 40 ml 6M kwasu ortofosforowego i 60 ml 99,5% kwasu octowego), próbki wortexowano i przenoszono do łaźni wodnej (100°C). Próbkę inkubowano przez 60 min, po czym schładzano do temperatury pokojowej. W reakcji barwnej aminy pierwszorzędowe reagując z ninhydryną tworzą zasadę Schiffa (iminę), która w wyniku wieloetapowej reakcji rozpada się do 2-amino-3-hydroksy-1H-inden-1-onu. Powstała pochodna reaguje z kolejną cząsteczką ninhydryny, tworząc kolejną zasadę Schiffa, tzw. purpurę Ruhemanna, o barwie fioletowoniebieskiej, którą oznaczano spektrofotometrycznie w badanych próbach w czytniku Elisa Multiscan EX (Thermo Lifesystems) przy długości fali 515 nm wobec próby zerowej odczynnikowej (którą przygotowano i procesowano jak próby badane z pominięciem ekstraktu białkowego). Otrzymane wartości przeliczano następnie na  $\mu$ mol ornityny/ $\mu$ g białka. Pomiaru dokonywano równolegle w próbkach, w których pominięto etap aktywacji enzymu oraz próbie zerowej enzymatycznej (w której



dodano L-argininę na etapie reakcji barwnej zamiast reakcji enzymatycznej). Jako standardu użyto próbki, do której na etapie reakcji enzymatycznej dodano 25  $\mu$ l L-ornityny (w postaci 1mM chlorowodoru L-ornityny zaw. 0,02% azydek sodu).

### **5.16 Przygotowanie konstruktów kodujących prawidłową lub zmodyfikowaną *Spp1***

Aby ocenić znaczenie fragmentów i motywów *Spp1* w interakcji z mikrośrodowiskiem wprowadzono określone konstrukty *Spp1* do komórek pozbawionych *Spp1*. Odpowiednie konstrukty przygotowano na drodze mutagenyzy ukierunkowanej. Konstrukty zaprojektowano w taki sposób, aby powstające mRNA *Spp1* było niewrażliwe na działanie shRNA *Spp1*. Zaprojektowano oligonukleotydy wprowadzające punktową mutację o następujących sekwencjach:

Spp\_mut\_R:CTTCCTTACTCTTTGGATCGAGTACTAGTTTGTCTCATGGCTGTG  
Spp\_mut\_F:CCATGAGGACAACTAGTACTCGATCCAAGAGTAAGGAAGATGA  
TAG.

Następnie w reakcji wydłużania starterów (ang. *Primer-extension reaction*) namnożono wektor pEGFP-N1 (Addgene), w który wklonowano cDNA prawidłowej *Spp1* (pSpp1a) lub cDNA *Spp1* z mutacją w miejscu cięcia przez trombinę (*Spp1* RSK->RAH, zwane dalej mutRSK) lub z mutacją w sekwencji kodującej motyw RGD odpowiedzialny za wiązanie integrzyn (*Spp1* RGD->RGE, zwane dalej mutRGD). Do namnożenia użyto polimerazy Phusion (New England Biolabs) w termocyklerze Eppendorf z zastosowaniem programu PCR rekomendowanego przez producenta. W celu usunięcia DNA służącego za matrycę, produkt reakcji PCR trawiono enzymem restrykcyjnym DpnI, a następnie transformowano do bakterii kompetentnych XL1-Blue *E.coli* (Agilent) według protokołu producenta. Zastosowanie tego systemu umożliwia selekcję rekombinowanych plazmidów na podstawie niebieskiego zabarwienia kolonii.

Dzięki zastosowaniu mutagenyzy ukierunkowanej uzyskano cDNA *Spp1* niewrażliwej na shRNA i zawierającej nowe miejsce restrykcyjne dla enzymu SpeI. Równoczesne cięcie enzymami SpeI (Thermo Scientific) i EcoRI (Thermo Scientific) pozwoliło na wydajną preselekcję klonów przed sekwencjonowaniem. Wariant *Spp1* z delecją regionu kodującego C-koniec białka (zwanego dalej  $\Delta$ C) miał usunięte miejsce rozpoznawane przez shRNA.

Komórki glejaka pozbawione Spp1 transfekowano poszczególnymi konstrukcjami z użyciem odczynnika do transfekcji Viromer RED (Lypocalyx, Germany) zgodnie z zaleceniami producenta. Aby ocenić efektywność transfekcji komórki glejaka plazmidem pEGFP kodującym zielone białko fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescent protein*). Konstrukty, którymi transfekowano komórki C6 z wyciszoną ekspresją osteopontyny (shSpp1) i przejściową transfekcją wykonano we współpracy z dr Karoliną Stępnia. Poziom ekspresji egzogennej *Spp1* oznaczono metodą ilościowego PCR (qPCR) w 24 godziny po transfekcji.

### **5.17 Barwienie komórek glejaka stransfekowanych plazmidami kodującymi różne warianty Spp1**

Opracowano metodę barwienia komórek barwnikiem fluorescencyjnym, aby obrazować powstające guzy. 24 godziny po transfekcji  $10^6$  komórek wybarwiono 100  $\mu$ l 0,1 mM roztworu znacznika CellVue Burgundy Fluorescent Cell Labeling Kit (LICOR Biosciences), zgodnie z zaleceniami producenta. Barwnik ten umożliwił ocenę wielkości guza mierzoną powierzchnią emitowanego sygnału fluorescencji przy wzbudzeniu długością fali 670 nm. Następnie komórki implantowano do prądkowia mózgu szczura. Po 14 dniach zwierzęta uśmiercano i przeprowadzano perfuzję transkardialną zimnym roztworem PBS, Następnie izolowano mózgi i obrazowano je w urządzeniu In-Vivo Xtreme (Bruker) wykorzystując oprogramowanie Bruker Molecular Imaging (BMI) zgodnie z zaleceniami producenta urządzenia. Obrazowanie wykonano we współpracy z dr Anną Gieryng.

### **5.18 Ocena wpływu peptydu RGD na wzrost guza *in vivo***

Doświadczenie przeprowadzono z wykorzystaniem komórek glejaka C6 transdukowanych wektorem pLenti-U6-Luc-Rsv(GFP-Puro) (zwanymi dalej C6<sup>GFP+LUC+</sup>). Po transdukcji komórki wykazywały ekspresję białka zielonej fluorescencji (GFP) oraz lucyferazy. Aby zwiększyć czystość populacji, sortowano komórki GFP<sup>+</sup> przed implantacją.

Komórki odklejano 0,25% roztworem trypsyny z 0,02% EDTA, dwukrotnie przepłukiwano PBS w 4°C i przenoszono do sterylnej probówki dedykowanej do użytku z sorterem komórkowym BD FACSAria. Sort sterylny komórek GFP<sup>+</sup> i GFP<sup>-</sup> przeprowadzono we współpracy z dr Łukaszem Bugajskim z Pracowni Cytometrii

IBD PAN. Wysortowane komórki rozsiano do butelek z pożywką z dodatkiem puromycyny i po 7 dniach dokonywano pomiaru aktywności lucyferazy.

Pomiar aktywności lucyferazy przeprowadzano w komórkach C6 wyjściowych i transdukowanych, przed sortowaniem oraz po sortowaniu w otrzymanych frakcjach GFP<sup>+</sup> i GFP<sup>-</sup>. Komórki wysiewano na szalkach 24-dółkowych w liczbie 8x10<sup>4</sup> na dółek. Aktywność enzymu mierzono następnego dnia z wykorzystaniem zestawu Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega) według zaleceń producenta.

#### **5.18.1 Implantacja komórek C6<sup>GFP+LUC+</sup> z peptydem TQRGDIF lub z peptydem kontrolnym (DQIGFRT) do mózgu szczura**

W doświadczeniu wykorzystano dwa krótkie, syntetyczne peptydy o sekwencjach TQRGDIF (kompetetywny inhibitor blokujący receptory  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$ ) i DQIGFRT (peptyd kontrolny, ang. *scrambled*) (GenScript). Peptydy rozpuszczono w 100% roztworze DMSO do końcowego stężenia 100 mM i przechowywano w temperaturze -80°C. W dniu implantacji peptydy rozcieńczano w DMEM do końcowego stężenia 2,5 mM. Implantowano z 4x10<sup>5</sup> komórek C6<sup>GFP+LUC+</sup> w 20  $\mu$ l DMEM z 5  $\mu$ l peptydu (końcowe stężenie 500  $\mu$ M).

#### **5.18.2 Przyżyciowe obrazowanie guzów u zwierząt**

Wielkość guzów oceniano 14 dnia po implantacji z wykorzystaniem urządzenia do przyżyciowego obrazowania In-Vivo Xtreme (Bruker) zgodnie z instrukcją producenta. Przy obrazowaniu guzów wykorzystano fakt, że ulegająca stabilnej ekspresji w komórkach C6<sup>GFP+LUC+</sup> lucyferaza katalizuje reakcję utleniania lucyferyny, czemu towarzyszy emisja światła (zjawisko bioluminescencji). Roztwór lucyferyny (Synchem UG & CoKG) o stężeniu 15 mg/ml przygotowywano w jałowym roztworze PBS, a następnie filtrowano przez filtr strzykawkowy. Bezpośrednio przed obrazowaniem zwierzętom podawano dootrzewnowo lucyferynę w ilości 150 mg/kg masy ciała. Obrazowanie wykonano wraz z dr Anną Gieryng.

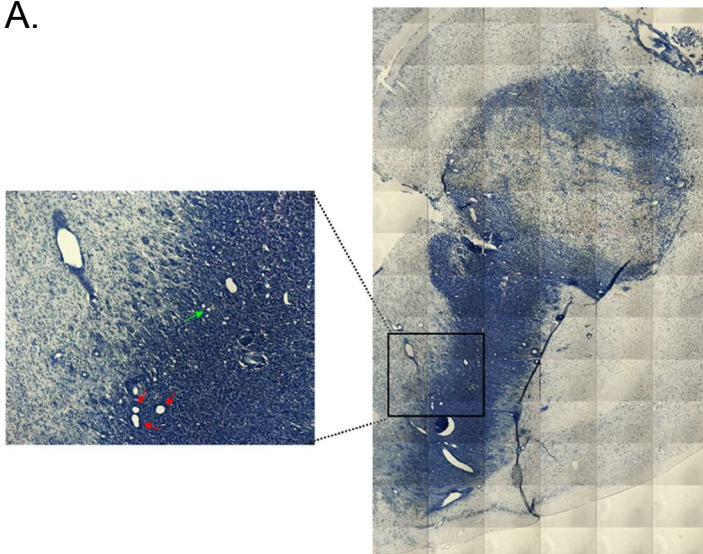
## 6. WYNIKI

### 6.1 Charakterystyka szczurzego glejaka C6

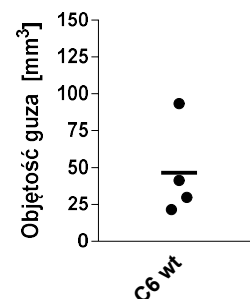
#### 6.1.1 Dynamika wzrostu guza oraz obraz histologiczny szczurzego glejaka C6

Do badań *in vivo* wykorzystano model syngeniczny polegający na implantacji komórek glejaka C6 do prążkowiec szczurów szczepu Wistar z wykorzystaniem aparatu stereotaktycznego. Wielkość guza oceniano po 14 dniach od implantacji. W celu uwidocznienia guza w tkance, preparaty barwiono kwaśnym błękitem toluidyny, a następnie przeprowadzono analizę mikroskopową i ocenę powierzchni guza. Zdjęcie reprezentatywnego przekroju guza C6 przedstawiono na rycinie 7A. W 14. dniu po implantacji komórki C6 tworzyły o średniej objętości 46,46 mm<sup>3</sup> (rycina 7B). Guzy te charakteryzują się bogatym unaczynieniem, dyfuzyjnym wzrostem i występowaniem obszarów martwicy. Histologiczny obraz guzów powstałych z komórek C6 przypomina ludzkie glejaki wielopostaciowe (Nagano i wsp. 1993; Zhu i wsp. 2014).

A.



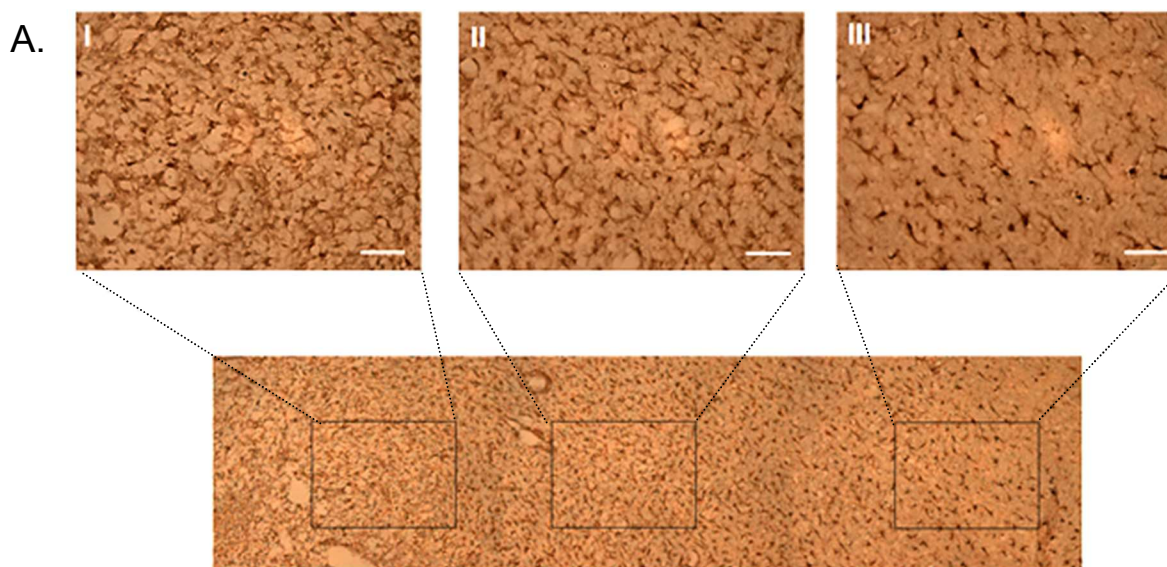
B.

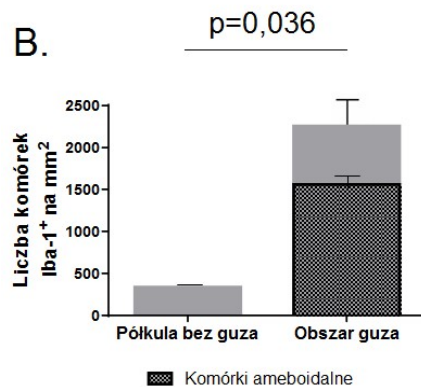


Ryc. 7. Implantacja komórek C6 do prążkowiec szczura prowadzi do wytworzenia bogato unaczynionych guzów o naciekającym charakterze. A. Reprezentatywne zdjęcie przekroju mózgu z glejakiem C6 wybarwionego kwaśnym błękitem toluidyny. W guzach obserwowano bogate unaczynienie (oznaczone strzałkami) oraz ogniska martwicy (jasne zabarwienie wewnątrz guza). B. Wykres przedstawia objętość guzów u indywidualnych osobników (n=4). Pozioma kreska przedstawia średnią objętość guzów w grupie.

### 6.1.2 Ilościowa i morfologiczna ocena komórek mieloidalnych Iba-1<sup>+</sup> infiltrujących glejaki C6

Barwienie komórek dostępnymi przeciwciałami nie pozwala na odróżnienie poszczególnych subpopulacji komórek mieloidalnych, dlatego do oceny liczby GAMS w szczyrzym glejaku C6 wykorzystano przeciwciało rozpoznające antygen Iba-1. Na rycinie 8 A przedstawiono panoramiczne zdjęcie pokazujące centrum guza (zdjęcie I), obrzeża guza (zdjęcie II) oraz obszaru poza guzem (zdjęcie III). Dla zwiększenia przejrzystości obrazu przedstawiono zdjęcie bez wybarwionych jąder komórkowych. Obszar guza cechuje silna akumulacja komórek Iba-1<sup>+</sup>. W centrum guza obserwowano liczne GAMS o kształcie ameboidalnym: zwiększonym ciecie komórki i obkurczonych rozgałęzieniach. Komórki znajdujące się na obrzeżu były mniej liczne, również nosiły znamiona aktywacji, jednak część z nich stanowiły komórki nieameboidalne, o nieco mniejszym ciecie komórki niż komórki Iba-1<sup>+</sup> w centrum guza, z nielicznymi wypustkami. Komórki poza obszarem guza morfologicznie były najbardziej zbliżone do komórek Iba-1<sup>+</sup> występujących w półkuli mózgu bez guza. Liczba komórek Iba-1<sup>+</sup> naciekających guzy C6 wynosiła  $2256 \pm 737$  komórek/mm<sup>2</sup> (rycina 8B)

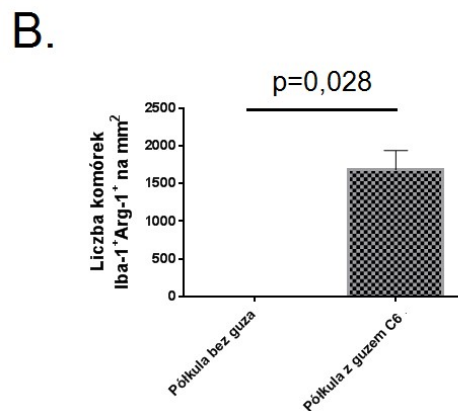
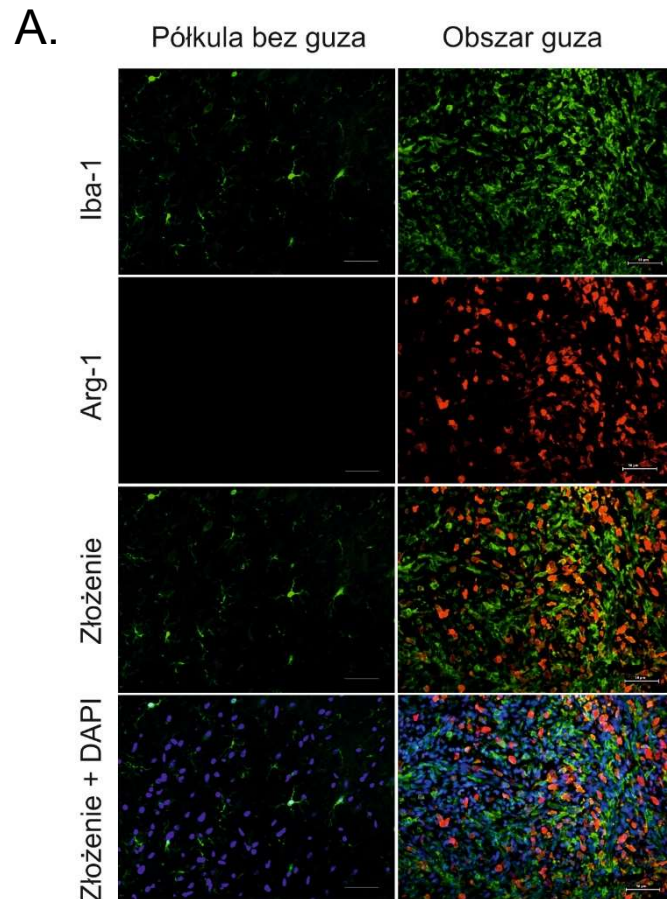




Ryc. 8. Glejaki powstające z komórek C6 są silnie infiltrowane przez Iba-1<sup>+</sup> komórki mieloidalne Iba-1<sup>+</sup>. A. Panoramiczne zdjęcie pokazujące naciek GAMs w różnych obszarach: centrum guza (górny panel, na zdjęciu I), obrzeża guza (na zdjęciu II) oraz obszaru poza guzem (na zdjęciu III). GAMs wykrywano z użyciem przeciwciała anti-Iba-1 oraz odczynnika DAB. Skala odpowiada 50  $\mu$ m. B. Wykres przedstawia wyniki ilościowej analizy komórek Iba-1<sup>+</sup> infiltrujących glejaki C6. Komórki zliczano z 5 losowo wybranych obszarów w centrum guza/zwierzę (n=4). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek  $\pm$  SEM. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

### 6.1.3 Ilościowa ocena komórek mieloidalnych o cechach fenotypu wspierającego nowotwór w glejakach C6

Wyniki licznych wyników badań, w tym również prowadzonych w Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN, pokazują, że glejak wydziela czynniki odpowiedzialne za przeprogramowanie i aktywację komórek mikrogleju i makrofagów w guzie (Hussain i wsp. 2006, Sliwa i wsp. 2007, Gabrusiewicz i wsp. 2011). Historycznie, nawiązując do terminologii opracowanej dla makrofagów obwodowych, nazwano ten fenotyp M2 (*M2-like*). Jednym z najbardziej uznanych markerów fenotypu M2 jest ekspresja arginazy-1 (Arg-1) (Biswas i wsp. 2006; Qian i Pollard, 2010). Przeprowadzono podwójne barwienie immunohistochemiczne preparatów tkankowych glejaka C6 wykrywające komórki Iba-1<sup>+</sup> z jednoczesną ekspresją arginazy-1 (rycina 9). Wykazano, że glejaki C6 charakteryzowały się obecnością dużej liczby komórek podwójnie pozytywnych (rycina 9B) ( $1683 \pm 147$  komórek/mm<sup>2</sup>). Świadczy to o immunosupresyjnych, pronowotworowych właściwościach GAMs infiltrujących glejaki C6. Komórek Arg-1<sup>+</sup> nie wykrywano w półkuli kontralateralnej (bez guza) (rycina 9A).



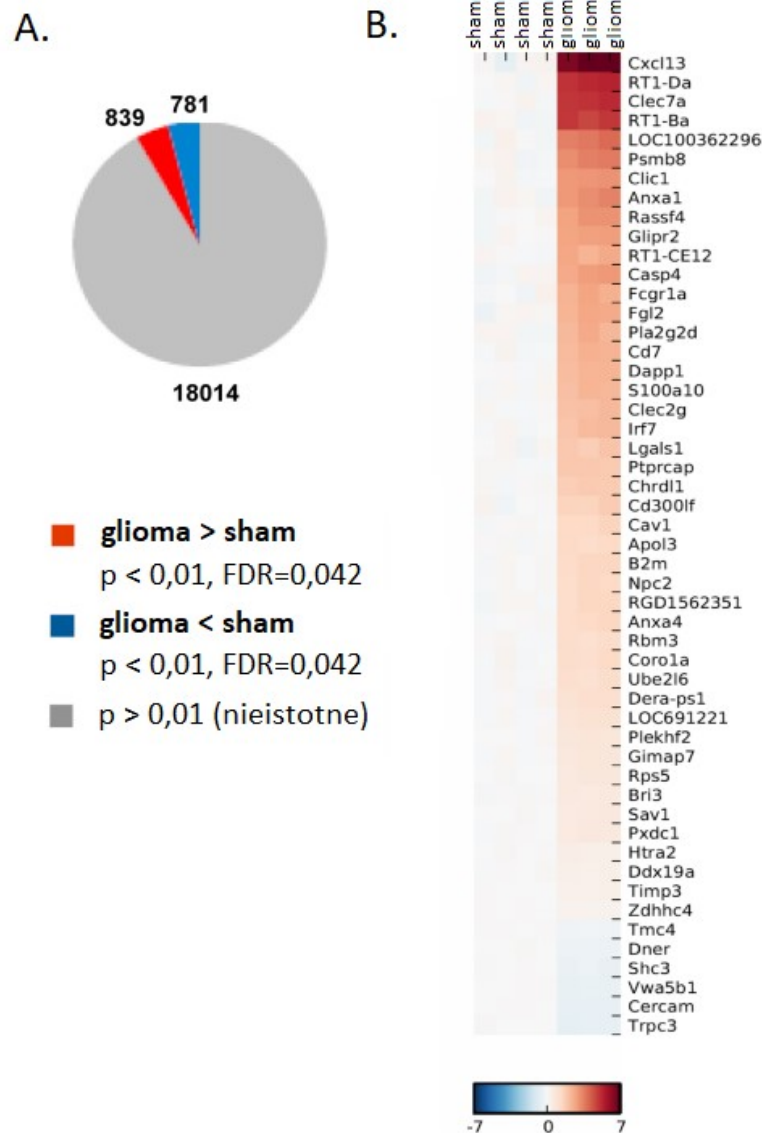
Ryc. 9. Komórki mieloidalne Iba-1<sup>+</sup> naciekające glejaki C6 wykazują cechy komórek z fenotypem wspierającym rozwój nowotworu A. Reprezentatywne zdjęcie preparatów wybarwionych przeciwciałami anti-Iba-1 i anti-Arg-1 oraz specyficznymi gatunkowo przeciwciałami drugorzędowymi (sprzężonymi odpowiednio z fluoroforem AlexaFluor 488 w celu uwidocznienia GAMs oraz AlexaFluor 555 w celu jednoczesnej detekcji komórek z ekspresją arginazy-1). Preparaty wybarwiono również DAPI w celu uwidocznienia jąder komórkowych. Skala odpowiada 50 μm. B. Wykres przedstawia wyniki analizy ilościowej komórek Iba-1<sup>+</sup> wykazujących ekspresję arginazy-1. Komórki zliczano w 5 losowo wybranych

obszarach guzów (n=4/grupę). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek  $\pm$  SEM. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

#### **6.1.4 Charakterystyka globalnej odpowiedzi transkrypcyjnej w pólkulach z glejakiem C6**

W celu zbadania zmian transkrypcyjnych zachodzących w mózgu szczurów z glejakiem przeprowadzono analizę transkryptomoczną RNA wyizolowanego z pólkul mózgow szczurów 14 dni po implantacji komórek C6 lub poddanych operacji pozorowanej (ang. *sham operated*). Wykorzystano w tym celu mikromacierze Affymetrix. By zidentyfikować geny, których ekspresja ulega zmianie w pólkulach z glejakiem poziom istotności ( $\alpha$ ) w teście t przyjęto jako  $p < 0,01$ , co odpowiada wartości FDR (ang. *False discovery rate*)  $< 0,042$ . Zidentyfikowano 1620 genów istotnie różniących się ekspresją w pólkuli z glejakiem w porównaniu do zwierząt kontrolnych, z czego 781 genów miało istotnie obniżoną ekspresję, a 839 podwyższoną (Rycina 10A). Listę 50 najsilniej zmienionych genów przedstawiono na rycinie 10B. Analizę wzbogacenia procesów biologicznych, w których uczestniczą te geny (GO, ang. *Gene Ontology enrichment*) wykonano na genach, których ekspresja ulegała przynajmniej dwukrotnej zmianie w stosunku do kontroli. Były to głównie geny kodujące białka związane z odpowiedzią odpornościową (w tym charakterystyczne dla GAMs), procesami metabolicznymi, śmiercią oraz podziałem komórek. Z kolei najbardziej obniżona była ekspresja genów związanych z procesami układu nerwowego i przekazywaniem synaptycznym. Widoczna jest zatem silna infiltracja mikrośrodowiska glejaka przez komórki układu odpornościowego, zwłaszcza przez aktywowane GAMs, wysoka aktywność metaboliczna i proliferacyjna nowotworu i śmierć neuronów.





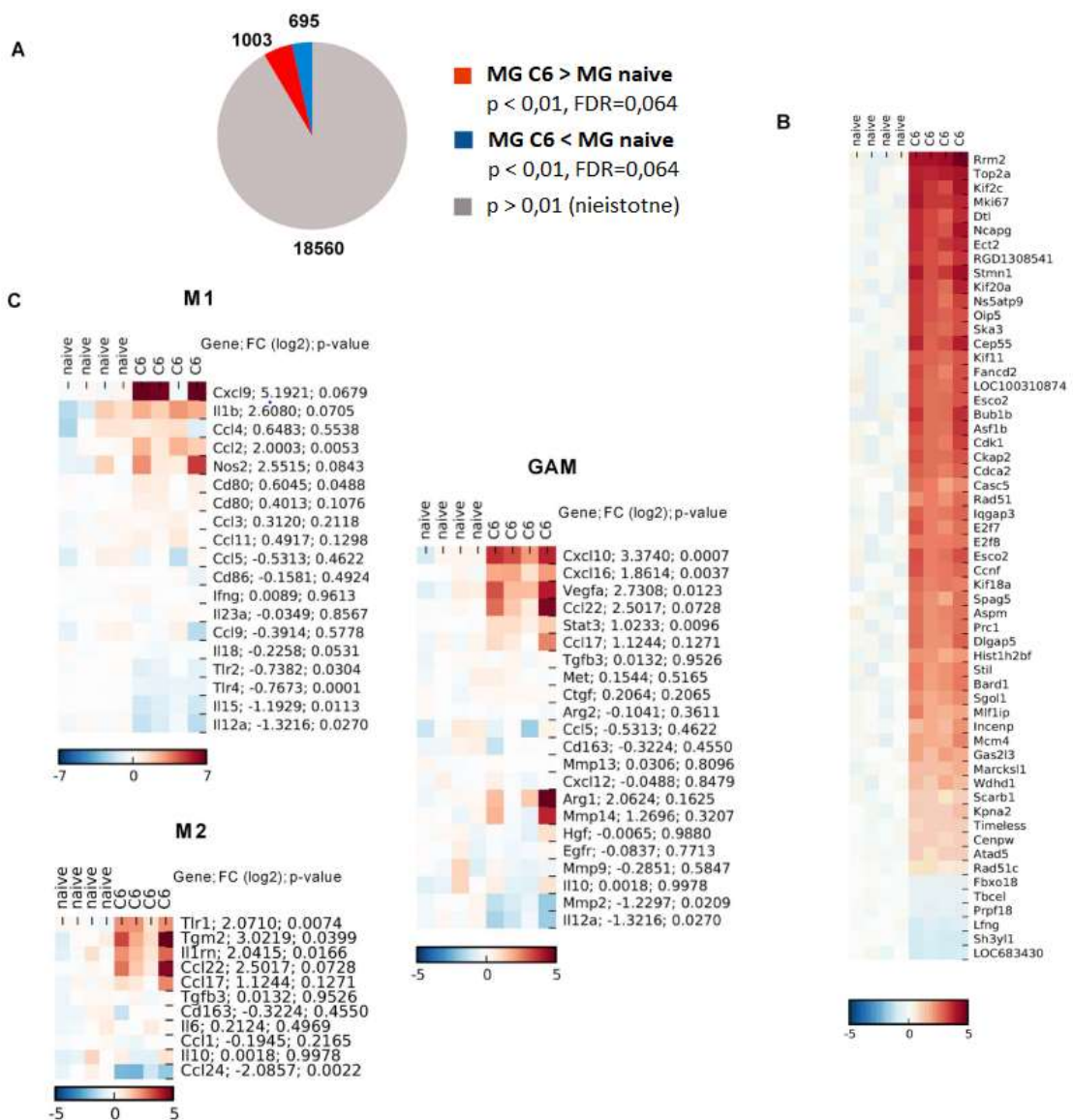
Ryc. 10. Profil ekspresji genów w mózgu szczura z zaimplantowanym glejakiem C6. A. Analizę transkrypcyjną wykonano z wykorzystaniem mikromacierzy Affymetrix. Wykres kołowy przedstawia liczbę genów, których ekspresja ulega istotnym zmianom w mózgu z glejakiem C6 w stosunku do liczby genów, których ekspresja nie zmienia się istotnie (oznaczone kolorem szarym). Ekspresja 781 z 19634 genów była niższa w mózgu z glejakiem niż w kontroli (oznaczone kolorem niebieskim), zaś 839 ulegało zwiększonej ekspresji (kolor czerwony). B. Mapa ciepła (ang. *heatmap*) przedstawia relatywne zmiany w ekspresji genów w mózgu z glejakiem i kontrolnych. Każda z kolumn przedstawia profil ekspresji wybranych genów dla jednego osobnika (n=4 dla mózgu kontrolnych, n=3 dla mózgu z glejakiem). Poziom ekspresji genów przedstawiono w skali kolorów (kolor czerwony oznacza wyższą, a niebieski niższą ekspresję genu). Dane przedstawione na

mapie ciepła są scentrowane na średniej wartości z próbek kontrolnych – przedstawiają zmianę ekspresji względem kontroli. Krotność zmiany zaprezentowano w skali log2.

### **6.1.5 Analiza profilu ekspresji genów w mikrogleju (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>niski</sup>) izolowanego z mózgów kontrolnych lub z glejakiem C6**

W celu określenia poziomu ekspresji genów w mikrogleju wysortowano komórki CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>niski</sup> z glejaków C6 oraz z prawidłowych mózgów szczura (*naive*) i przeprowadzono analizę transkryptomów. Zidentyfikowano geny o zmienionej ekspresji przyjmując poziom istotności ( $\alpha$ ) dla testu t jako  $p < 0,01$ , co odpowiada wartości  $FDR < 0,062$ . W mikrogleju izolowanym z glejaków zidentyfikowano 1698 genów istotnie różniących się ekspresją w porównaniu do mikrogleju z mózgów prawidłowych, z czego 695 genów miało istotnie obniżoną ekspresję, a 1003 podwyższoną (Rycina 11A). Listę 50 genów, które w mikrogleju pod wpływem glejaka uległy najsilniejszym zmianom w porównaniu do mikrogleju z mózgów prawidłowych przedstawiono na rycinie 11B. Analizę GO wykonano na wszystkich genach, których ekspresja ulegała przynajmniej dwukrotnej zmianie w stosunku do kontroli. Analiza funkcjonalna wykazała, że w mikrogleju z glejaka silnej indukcji ulegały geny związane z procesami biosyntezy, translacją, mitozą, procesami metabolicznymi i odpowiedzią immunologiczną. Z kolei najbardziej obniżona była ekspresja genów związanych z przekazywaniem sygnału między komórkami, transdukcją sygnałów od receptorów na powierzchni komórki i receptorów sprzężonych z białkiem G, endocytozą oraz regulacją poziomu neuroprzekaźników. Aby dokładnie określić funkcjonalny fenotyp mikrogleju infiltrującego glejaki, przeprowadzono analizę ekspresji genów charakterystycznych dla aktywacji prozapalnej (M1) i immunosupresyjnej (M2) (ryc. 11C, lewy panel) oraz genów opisywanych w literaturze jako charakterystyczne dla GAMs (Szulzewsky i wsp. 2015) (ryc. 11C, prawy panel). W mikrogleju sortowanym z glejaków obserwowano istotnie obniżoną ekspresję genów związanych z aktywacją prozapalną, takich jak *Tlr2*, *Tlr4* (kodujące receptory typu PRR) oraz *Il-18*, *Il-12a*, *Il-15* (kodujące cytokiny prozapalne) przy jednoczesnym wzroście ekspresji genów związanych z pronowotworowym fenotypem M2: *Tgm2*, *Il1rn*, *Cxcl10*, *Cxcl16*, *Ccl2*, *Ccl17*, *Ccl22*, *Vegfa*, *Stat3*, *Arg1* i *Mmp14* w porównaniu do mózgów prawidłowych. Ekspresja genów *Cxcl9*, *Nos2* i *IL1 $\beta$* , związanych z aktywacją zapalną była podwyższona, jednak nie był to wynik statystycznie istotny. Otrzymane wyniki

wskazują, że mikroglej infiltrujący glejaki wykazuje głównie ekspresję genów związanych z odpowiedzią przeciwzapalną i utrzymaniem fenotypu immunosupresyjnego, angiogenezą, modelowaniem macierzy zewnątrzkomórkowej i chemotaksją komórek układu odpornościowego. W mikrogleju z glejaków spada także ekspresja mediatorów stanu zapalnego i immunomodulatorów. Wskazuje to na istotną rolę tych komórek w kształtowaniu immunosupresyjnego i proinwazyjnego środowiska w guzie.

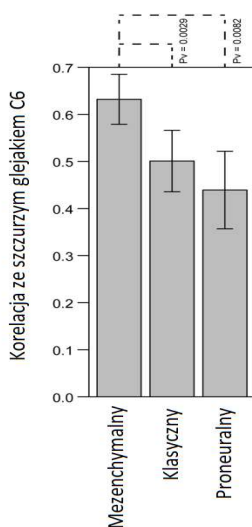


Ryc. 11. Ocena zmian ekspresji genów w mikrogleju izolowanym z glejaków C6 względem mikrogleju z prawidłowego mózgu wykonana z wykorzystaniem mikromacierzy Affymetrix. A. Wykres kołowy przedstawia liczbę genów, których ekspresja ulega istotnym zmianom w mikrogleju izolowanego z glejaków C6 względem mikrogleju izolowanego z prawidłowego

mózgu w stosunku do liczby genów, których ekspresja nie zmienia się istotnie (oznaczone kolorem szarym). Ekspresja 695 z 20258 przeanalizowanych genów była istotnie niższa w mikrogleju izolowanym z glejaka niż w mikrogleju z prawidłowego mózgu (oznaczone kolorem niebieskim), zaś 1003 ulegało zwiększonej ekspresji (oznaczone kolorem czerwonym). B, C. Mapy ciepła przedstawiają poziom ekspresji genów w mikrogleju izolowanym z glejaka (n=3) w porównaniu mikrogleju z prawidłowego mózgu szczura (MG naive) (n=4). Każda z kolumn przedstawia profil ekspresji wybranych genów u jednego osobnika. Poziom ekspresji genów przedstawiono w skali kolorów (kolor czerwony oznacza wyższą, a niebieski niższą ekspresję genu). Dane scentrowano na średniej wartości z próbek kontrolnych – przedstawiają zmianę ekspresji względem kontroli. Krotność zmiany zaprezentowano w skali log2.

### 6.1.6 Porównanie profili ekspresji genów glejaka C6 do sygnatur charakterystycznych dla podtypów ludzkich GBM

Na poziomie histopatologicznym szczurzy glejak C6 wykazuje istotne podobieństwa do ludzkich GBM (wysoki indeks proliferacyjny, bogate unaczynienie, dyfuzyjny wzrost i występowanie obszarów martwicy), Przeanalizowano dane transkryptomiczne aby ocenić, czy szczurzy glejak wykazuje podobieństwo transkryptomiczne do podtypów GBM. Ekspresję wybranych genów w glejaku C6 porównano do danych transkryptomicznych (RNA seq) z próbek ludzkich glejaków oraz prawidłowego mózgu dostępnych w bazie TCGA. W wykonanej analizie szczurzy glejak C6 wykazywał najwyższe podobieństwo do Mes-GBM (ryc. 12).

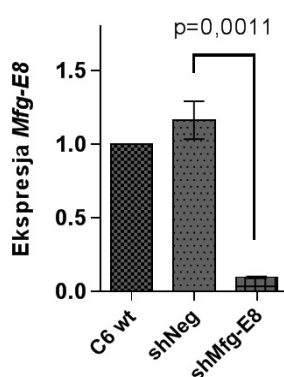


Ryc. 12. Porównanie ekspresji genów w szczurzym glejaku C6 i molekularnych podtypach ludzkich GBM. Na wykresie przedstawiono średnie współczynniki korelacji  $\pm$  SD. Wartości p wyliczono za pomocą testu Manna Whitneya.

## 6.2 Ocena roli laktadheryny (*Mfg-E8*) we wzroście guza i modulowaniu TME w szczurzym glejaku C6

### 6.2.1 Ocena wyciszenia ekspresji *Mfg-E8* w kontrolnych i pozbawionych *Mfg-E8* komórkach glejaka C6

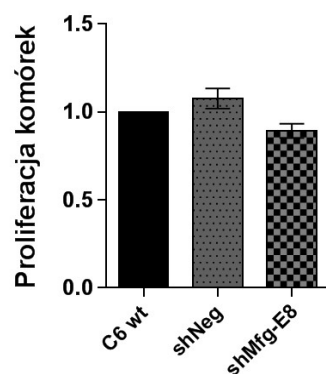
Wyciszono ekspresję laktadheryny (kodowanej przez gen *Mfg-E8*) w komórkach glejaka C6 transfekując je konstrukcjami zawierającymi specyficzny shRNA (pSilencer<sup>TM</sup>sh*Mfg-E8*). Kontrolę stanowiły komórki glejaka C6 transfekowane w podobnych warunkach konstruktem zawierającym neutralny shRNA (pSilencer<sup>TM</sup>shNeg). W wybranych klonach komórek C6 opornych na Hygromycynę B stosowaną w stężeniu 0,5 mg/ml sprawdzono poziom wyciszenia ekspresji *Mfg-E8* metodą ilościowego PCR (qPCR, ang. *quantitative PCR*) (Ryc. 13).



Ryc. 13. Poziom mRNA *Mfg-E8* w klonach komórek C6 wyjściowych oraz stabilnie transfekowanych shNeg lub shMfg-E8 oznaczono metodą qPCR. Poziom mRNA *Mfg-E8* w komórkach C6 przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono wartości będące średnią ± SD z analizy ekspresji przeprowadzonej na komórkach z trzech niezależnych pasażi. Wartości p wyliczone za pomocą testu t-studenta.

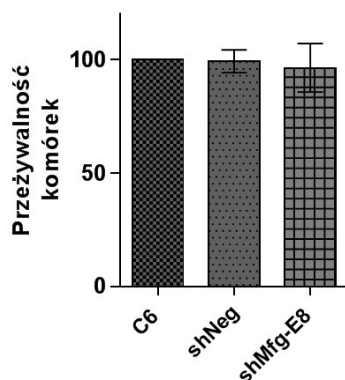
### 6.2.2 Wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* nie wpływa na proliferację i żywotność komórek glejaka C6

Aby zweryfikować, czy wyciszenie ekspresji laktadheryny może wpływać na wzrost glejaka, zbadano wpływ wyciszenia *Mfg-E8* na proliferację komórek C6. Proliferację komórek C6 oraz klonów C6 shMfg-E8 i shNeg zbadano wykorzystując test inkorporacji bromodeoksyurydyny (BrdU) do DNA. Wykazano, że wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* w komórkach glejaka C6 nie wpływa na proliferację tych komórek (rycina 14). Relatywne wartości określające proliferację komórek klonów odniesione do komórek C6 wynosiły odpowiednio  $1,077 \pm 0,056$  dla komórek shNeg i  $0,892 \pm 0,04$  dla komórek shMfg-E8.



Ryc. 14. Ocena wpływu wyciszenia ekspresji laktadheryny na proliferację komórek C6 oraz klonów shNeg i shMfg-E8. Proliferację komórek oceniano za pomocą testu inkorporacji bromodeoksyurydyny (BrdU) po 48 godzin od wysiania komórek. Na wykresie przedstawiono wartości średnie z 3 doświadczeń  $\pm$  SD. Istotność statystyczną obliczono wykorzystując test t-studenta.

W celu zbadania wpływu wyciszenia ekspresji *Mfg-E8* na przeżywalność komórek glejaka C6 wykonywano test metabolizmu MTT. Ilość formazanu uwolnionego przez żywe komórki na drodze reakcji enzymatycznej mierzono spektrofotometrycznie. Wartości uzyskane w przypadku komórek shNeg i shMfg-E8 relatywizowano do wartości oznaczonej dla wyjściowych komórek C6. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w żywotności komórek C6, shNeg i shMfg-E8 po 48 godzinach inkubacji (rycina 15). Relatywne wartości żywotności odniesione do komórek C6 wynosiły odpowiednio  $99,15 \pm 5,01$  w przypadku komórek shNeg i  $96,34 \pm 10,76$  w przypadku komórek shMfg-E8.



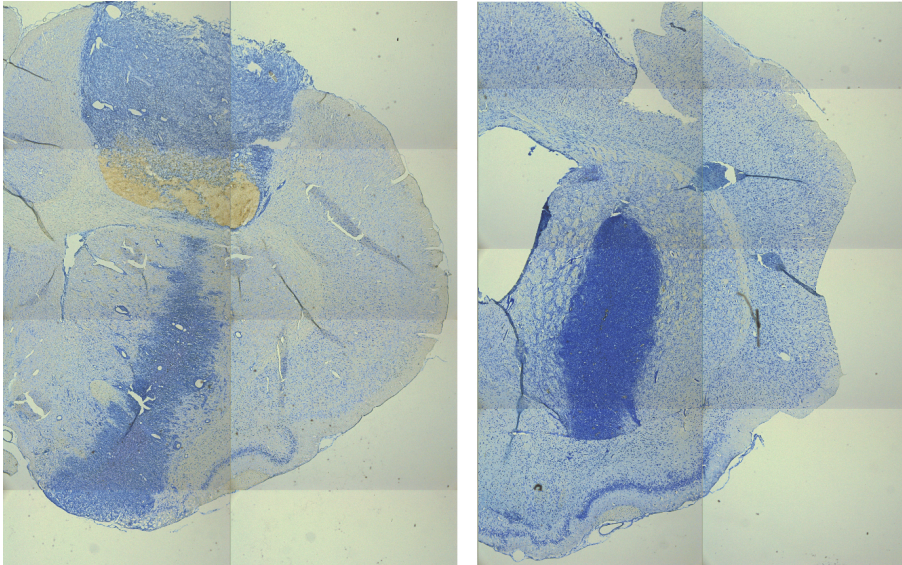
Ryc. 15. Wpływ wyciszenia ekspresji laktadheryny na żywotność komórek C6 shNeg i shMfg-E8. Liczbę żywych komórek oceniano testem metabolizmu MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu) po 48 godzin od wysiania komórek. Wyniki absorbancji uzyskane dla poszczególnych klonów relatywizowano do komórek C6. Na

wykresie przedstawiono średnie  $\pm$  SD z 3 doświadczeń. Istotność statystyczną obliczono wykorzystując test t-studenta.

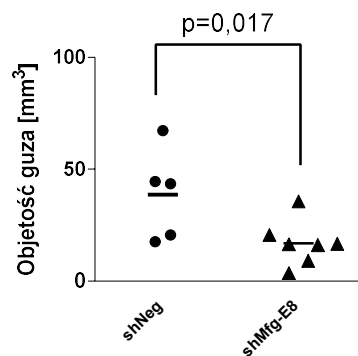
### **6.2.3 Wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* hamuje wzrost guza *in vivo***

Do zbadania roli *Mfg-E8* w rozwoju guza *in vivo* wykorzystano syngeniczny z komórkami C6 szczep szczurów Wistar. Komórki C6 shNeg lub sh*Mfg-E8* implantowano do prążkowiec mózgu szczura. Objętość guzów oceniano po 14 dniach od implantacji. W celu wizualizacji guzów, preparaty tkankowe barwiono kwaśnym błękitem toluidyny, a następnie przeprowadzano analizę mikroskopową. Objętość guzów wyliczono metodą Cavalieri (Gong i wsp. 2004). Zdjęcia reprezentatywnych przekrojów guzów shNeg i sh*Mfg-E8* przedstawiono na rycinie 16A. Komórki shNeg tworzyły guzy o średniej objętości  $38,67 \pm 9,07 \text{ mm}^3$ , podczas gdy komórki sh*Mfg-E8* tworzyły guzy o średniej objętości  $16,89 \pm 3,79 \text{ mm}^3$  (rycina 16B). Wykazano, że wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* w komórkach szczurzego glejaka C6 prowadzi do znamienego statystycznie zahamowania wzrostu guza (rycina 16B). Wyniki te wskazują na ważną rolę *Mfg-E8* produkowanej przez komórki glejaka w rozwoju guzów *in vivo*.

A.



B.



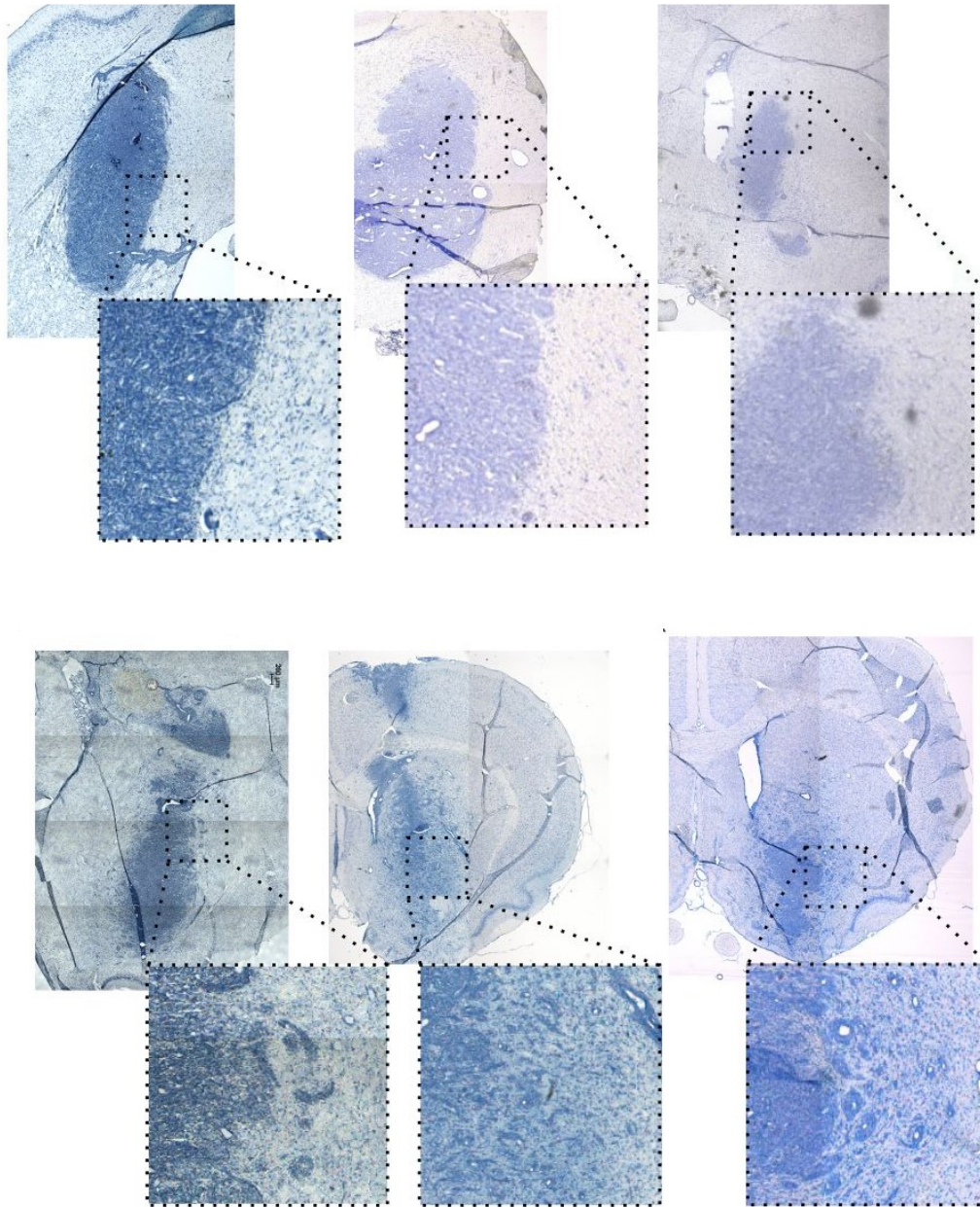
Ryc. 16. Wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* w komórkach glejaka C6 prowadzi do ograniczenia wzrostu guza. A. Reprezentatywne zdjęcia przekrojów mózgow barwionych kwaśnym błękitem toluidyny. Widoczna jest mniejsza powierzchnia guzów powstałych z komórek shMfg-E8. B. Wykres przedstawiający ilościową analizę objętości guzów u poszczególnych osobników. Pozioma kreska obrazuje średnią objętość guza w danej grupie zwierząt (n=5/shNeg i n=7/shMfg-E8). Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

#### 6.2.4 Wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* hamuje migrację komórek glejaka *in vivo*

W celu określenia, czy wyciszenie ekspresji laktadheryny może wpływać na zdolność komórek glejaka do migracji, a przez to ograniczać dyfuzyjny wzrost guza, przeanalizowano obszar znajdujący się granicy guza i tkanki nie noszącej znamion nowotworu. Oceny dokonało niezależnie dwóch eksperymentatorów. Jak pokazano na rycinie 17, guzy wytworzone przez komórki shNeg charakteryzowały się dyfuzyjnym wzrostem (brak wyraźniej granicy między guzem a zdrową tkanką) i silnie infiltrowały parenchymę mózgu (widoczne skupiska komórek nowotworowych poza guzem). W przypadku glejaków shMfg-E8 obserwowano znaczne ograniczenie



nacieku guza na zdrową tkankę. Otrzymane wyniki wskazują, że Mfg-E8 jest białkiem zaangażowanym w zdolność komórek glejaka do migracji.



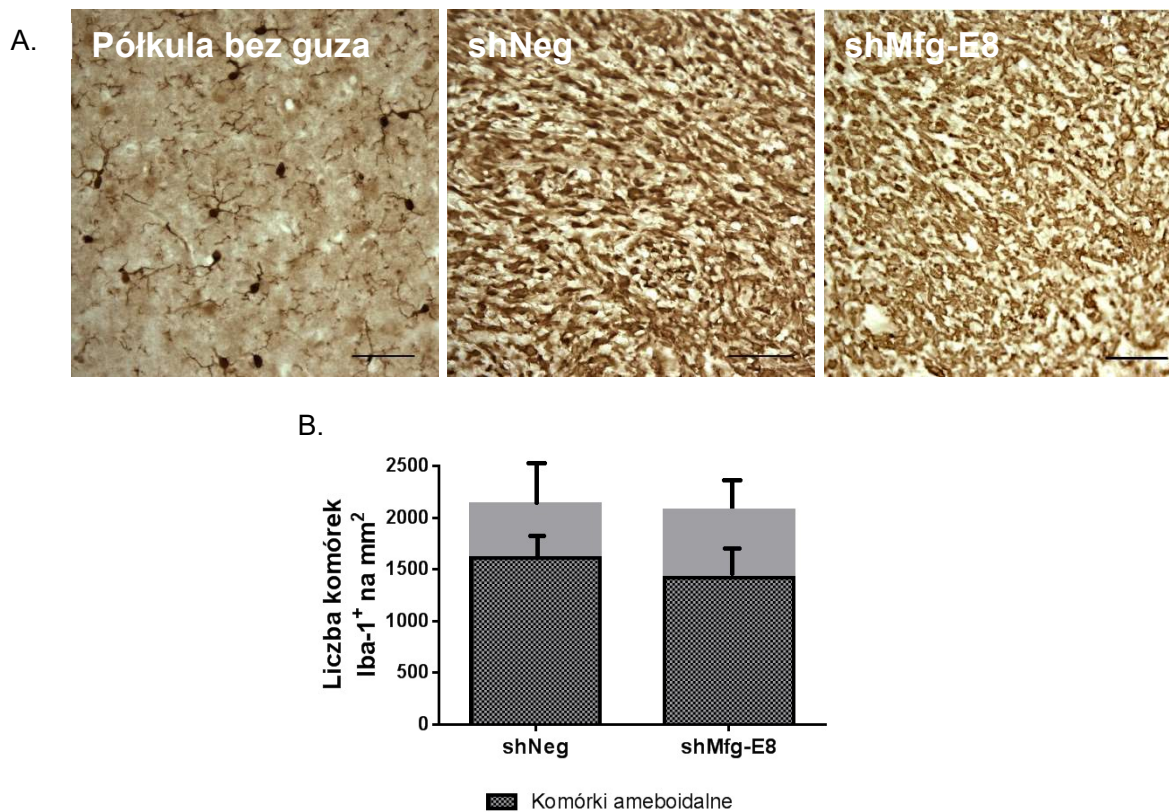
Ryc. 17. Wyciszenie ekspresji Mfg-E8 w komórkach glejaka C6 wpływa na zdolność komórek glejaka do migracji. Reprezentatywne zdjęcia przekrojów mózgow barwionych kwaśnym błękitem toluidyny w 14 dniu po implantacji komórek shNeg i shMfg-E8. Widoczny jest obszar guza oraz tkanka bez widocznych zmian nowotworowych. W przypadku guzów shMfg-E8, w obrębie tkanki w bezpośrednim sąsiedztwie guza, nie obserwowano licznych skupisk komórek nowotworowych, które świadczyłyby o naciekającym charakterze nowotworu.

### **6.2.5 Ilościowa i morfologiczna ocena Iba-1<sup>+</sup> komórek mieloidalnych naciekających guzy kontrolne i z wyciszoną ekspresją *Mfg-E8***

Aby określić, czy produkowana przez komórki glejaka *Mfg-E8* może być czynnikiem chemotaktycznym dla GAMs, zbadano wpływ wyciszenia *Mfg-E8* w komórkach glejaka na liczbę komórek Iba-1<sup>+</sup> napływających do guza. Wykonano barwienie z przeciwciałem rozpoznającym Iba-1 na preparatach z guzów shNeg i sh*Mfg-E8*. Zaobserwowano, że zarówno w glejakach shNeg, jak i sh*Mfg-E8*, obszar guza charakteryzował się silną, jednorodną akumulacją komórek Iba-1<sup>+</sup>, w przeciwieństwie do półkuli bez zaimplantowanego guza (ryc. 18A). Liczba komórek Iba-1<sup>+</sup> naciekających guzy shNeg ( $2165 \pm 462,2$  komórek/mm<sup>2</sup>) i sh*Mfg-E8* ( $2073 \pm 328,8$  komórek/mm<sup>2</sup>) nie różniła się znacząco.

Komórki Iba-1<sup>+</sup> znajdujące się w półkuli kontralateralnej miały morfologię typową dla mikrogleju spoczynkowego. W guzach shNeg obserwowano liczne komórki o kształcie ameboidalnym – znacznie zwiększonym cieple komórki i obkurczonych wypustkach. Komórki o podobnej morfologii wykrywano w guzach sh*Mfg-E8* (Ryc. 18A). Przeprowadzona analiza ilościowa nie wykazała istotnych różnic w liczbie komórek ameboidalnych infiltrujących guzy shNeg ( $1609 \pm 226,1$ ) i sh*Mfg-E8* ( $1420 \pm 308,6$ ) (Ryc. 18B).

Otrzymane wyniki wskazują, że *Mfg-E8* nie jest białkiem zaangażowanym w chemotaksję GAMs do guza i nie wpływa znacząco na morfologię tych komórek.

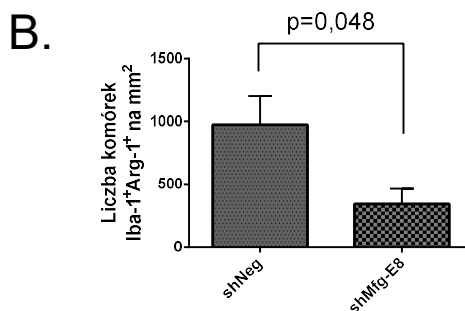
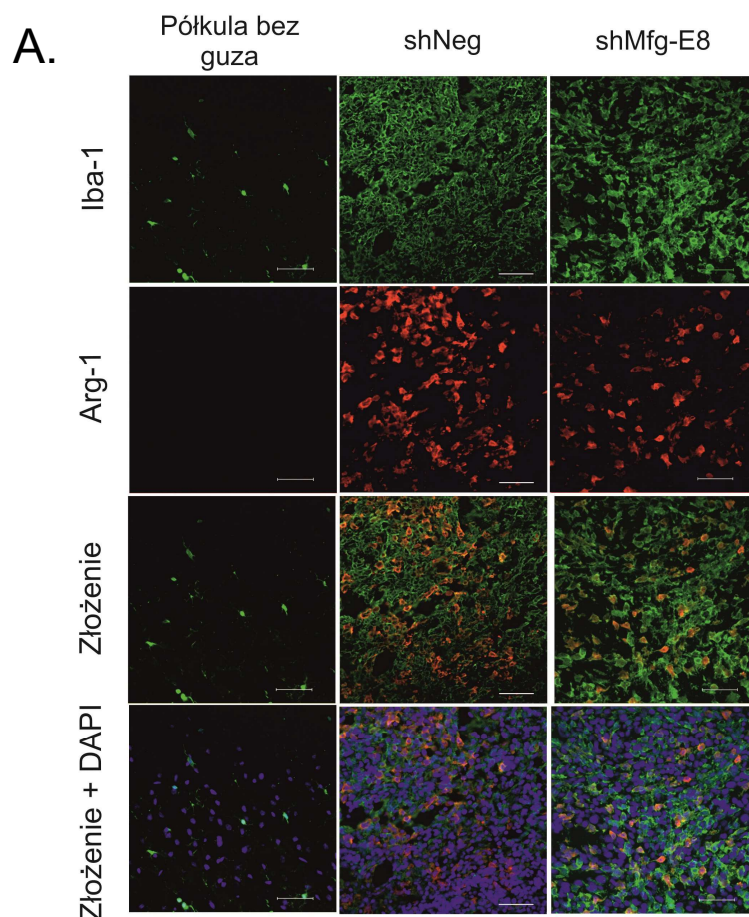


Ryc. 18. Wyciszenie ekspresji Mfg-E8 nie wpływa na akumulację i morfologię infiltrujących guza komórek mieloidalnych. A. Reprezentatywne zdjęcia preparatów shNeg i shMfg-E8 wybarwionych przeciwciałem anti-Iba-1. Na górnym panelu przedstawiono zdjęcie półkuli kontralateralnej (bez guza), na dolnym zdjęcie fragmentu guza. Skala odpowiada 50  $\mu$ m. B. Na wykresie przedstawiono wyniki ilościowej i jakościowej analizy komórek Iba-1<sup>+</sup> w półkuli bez guza oraz infiltrujących guzy shNeg i shMfg-E8. Komórki Iba-1<sup>+</sup> i ameboidalne komórki Iba-1<sup>+</sup> policzono w 5 losowo wybranych polach/zwierzę (n=4/shNeg i n=6/shMfg-E8). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek  $\pm$  SEM. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

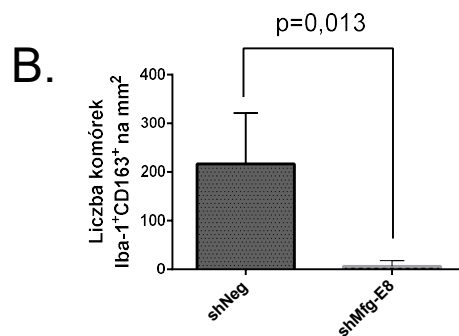
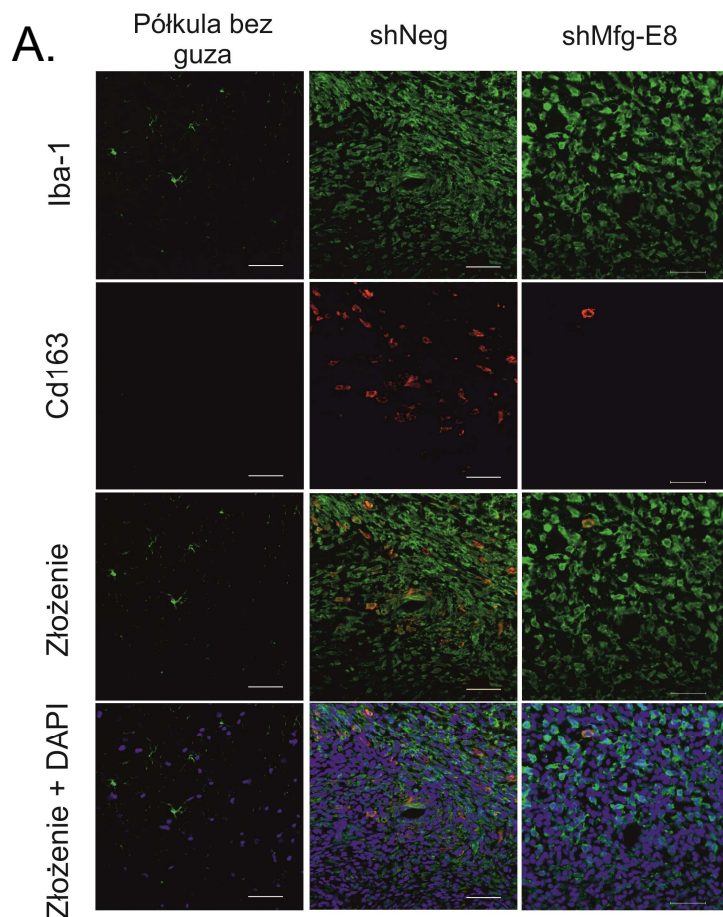
### 6.2.6 Wyciszenia ekspresji *Mfg-E8* w komórkach glejaka wpływa na polaryzację GAMs

W celu zweryfikowania, czy produkowana przez komórki glejaka Mfg-E8 może być czynnikiem zaangażowanym w polaryzację monocytów, mikrogleju i makrofagów w kierunku komórek wspierających rozwój nowotworu *in vivo*, wykonano barwienia immunohistochemiczne na preparatach tkankowych z guzów shNeg i shMfg-E8. Zbadano obecność komórek Iba-1<sup>+</sup> z ekspresją arginazy-1 bądź białka CD163. Ekspresja Arg-1 jest podwyższona w makrofagach infiltrujących nowotwory różnego typu, w tym glejaki (Biswas i wsp. 2006; Qian i Pollard, 2010; Medrek i wsp. 2012;

Prośniak i wsp. 2013, Walentynowicz i wsp. 2018, Kaminska i wsp. 2021). Jak pokazano na rycinach 19A i 20A, guzy shNeg charakteryzowały się silną akumulacją komórek Iba-1<sup>+</sup>Arg-1<sup>+</sup> ( $973,7 \pm 230$  komórek/mm<sup>2</sup>) oraz obecnością licznych komórek Iba-1<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> ( $216,7 \pm 104,4$  komórek/mm<sup>2</sup>). Komórek tych nie wykrywano w półkuli kontralateralnej. Jednocześnie wykazano, że wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* w komórkach glejaka prowadzi do znamiennego statystycznie spadku liczby GAMS wykazujących ekspresję markerów fenotypu pronowotworowego, odpowiednio  $344,4 \pm 124,2$  komórek Iba-1<sup>+</sup>Arg-1<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> ( $p=0,048$ ) i  $6,57 \pm 4,09$  komórek Iba-1<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> ( $p=0,013$ ) (rycina 19B i 20B). Otrzymane wyniki wskazują, że *Mfg-E8* jest białkiem zaangażowanym w indukcję pronowotworowej aktywacji komórek mieloidalnych naciekających glejaki.



Ryc. 19. Wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* prowadzi do spadku liczby komórek mieloidalnych z ekspresją arginazy-1 w guzie. A. Reprezentatywne zdjęcia preparatów guzów shNeg i shMfg-E8 oraz półkuli kontralateralnej. Preparaty wybarwiono przeciwciałami anti-Iba-1 w celu wizualizacji komórek mieloidalnych oraz anti-Arg-1 w celu określenia funkcjonalnego fenotypu tych komórek. Dalszej detekcji dokonywano z użyciem przeciwciał II-rzędowych sprzężonych odpowiednio z fluoroforem AlexaFluor 488 i AlexaFluor 555. Te same preparaty wybarwiono również DAPI w celu wizualizacji jąder komórkowych. Skala odpowiada 50  $\mu\text{m}$ . B. Analiza ilościowa komórek Iba-1<sup>+</sup>Arg-1<sup>+</sup>. Zliczano komórki w 5 losowo wybranych obszarach guza (n=5/shNeg i n=7/shMfg-E8). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek/mm<sup>2</sup>  $\pm$  SEM. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

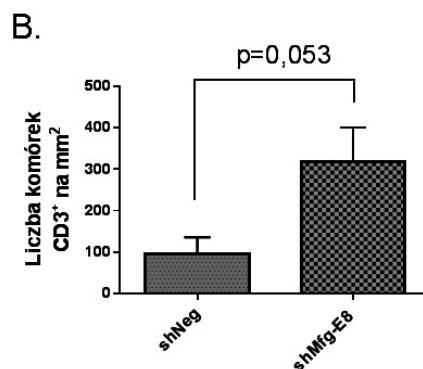
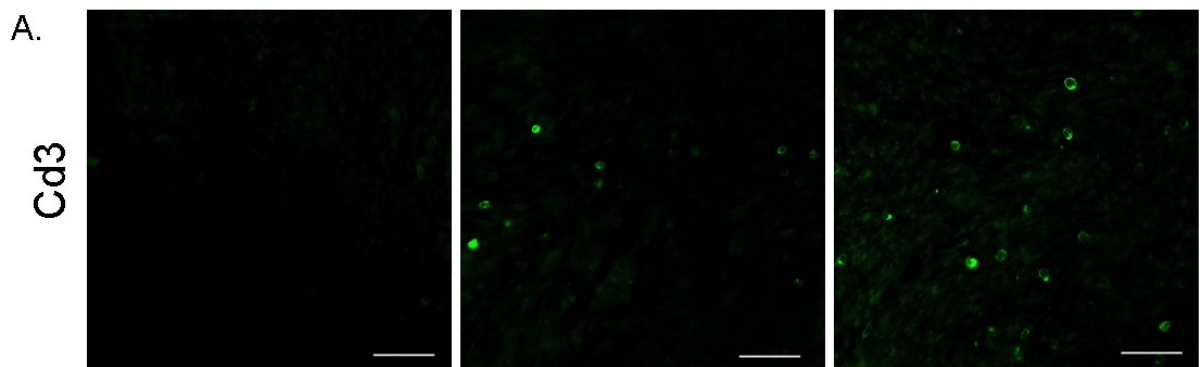


Ryc. 20. Spadek liczby komórek mieloidalnych z ekspresją CD163 w guzach shMfg-E8. A. Reprezentatywne zdjęcia preparatów guzów shNeg i shMfg-E8 oraz półkuli kontralateralnej. Preparaty wybarwiono przeciwciałami anti-Iba-1 w celu wizualizacji mikrogleju oraz napływających z obwodu dojrzewających monocytów i makrofagów oraz anti-CD163 w celu określenia funkcjonalnego fenotypu tych komórek. Dalszej detekcji dokonywano z użyciem przeciwciał II-rzędowych sprzężonych odpowiednio z fluoroforem AlexaFluor 488 i AlexaFluor 555. Preparaty wybarwiono również DAPI w celu wizualizacji jąder komórkowych. Skala odpowiada 50  $\mu\text{m}$ . B. Analiza ilościowa komórek mieloidalnych ekspresyjujących CD163. Zliczano komórki Iba-1<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> w 5 losowo wybranych obszarach

guza (n=7/grupę). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek/mm<sup>2</sup> ± SEM. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

### 6.2.7 Wyciszenie *Mfg-E8* w komórkach glejaka indukuje napływ limfocytów (CD3<sup>+</sup>) do guza

Dane literaturowe wskazują, że poziom infiltracji ludzkich glejaków złośliwych przez limfocyty T (CD3<sup>+</sup>) pozytywnie koreluje z dłuższą przeżywalnością pacjentów, mimo istnienia ogólnego stanu immunosupresji w guzie (Kmieciak i wsp. 2013). Aby zweryfikować, czy *Mfg-E8* wpływa na napływ limfocytów T do guza, wykonano barwienia immunohistochemiczne wykrywające CD3, główny marker limfocytów T, na preparatach tkankowych z guzów shNeg i sh*Mfg-E8*. Obecność komórek CD3<sup>+</sup> wykrywano zarówno w guzach shNeg, jak i sh*Mfg-E8* (ryc. 21A). Liczba limfocytów T infiltrujących guzy shNeg wynosiła 96,45 ± 39,78 komórek/mm<sup>2</sup>. W przypadku guzów sh*Mfg-E8* stwierdzono tendencję wzrostu liczby komórek CD3<sup>+</sup> w stosunku do guzów kontrolnych (p=0,053).



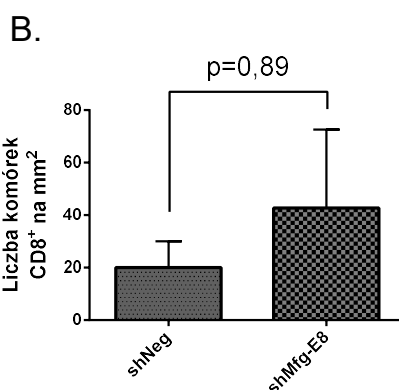
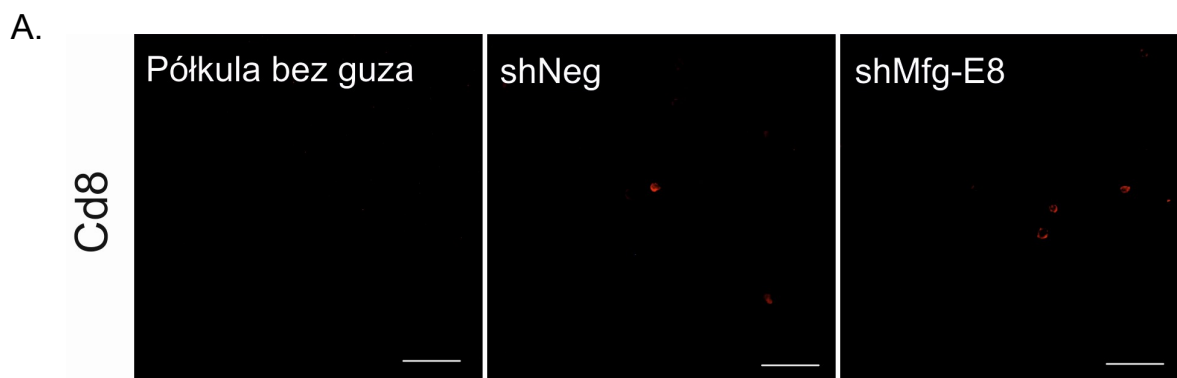
Ryc. 21. Wzrost liczby komórek CD3<sup>+</sup> (limfocytów T) w guzach sh*Mfg-E8*. A. Reprezentatywne zdjęcia preparatów guzów shNeg i sh*Mfg-E8* oraz półkuli kontralateralnej. Preparaty wybarwiono przeciwciałem anti-CD3 w celu wizualizacji limfocytów T w tkance. Dalszej detekcji dokonywano z użyciem przeciwciała II-rzędowego

sprzężonego z fluoroforem AlexaFluor 488. Skala odpowiada 50  $\mu\text{m}$ . B. Analiza ilościowa komórek CD3<sup>+</sup> infiltrujących guzy shNeg i shMfg-E8. Zliczano komórki CD3<sup>+</sup> w 3 losowo wybranych obszarach guza (n=7/shNeg i n=6/shMfg-E8). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek/mm<sup>2</sup>  $\pm$  SEM. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

### **6.2.8 Wyciszenia *Mfg-E8* w komórkach glejaka nie wpływa na napływ komórek CD8<sup>+</sup> do guza**

Dane literaturowe wskazują, że w ludzkich glejakach złośliwych poziom infiltracji przez komórki CD8<sup>+</sup> koreluje z dłuższą przeżywalnością pacjentów (Kmieciak i wsp. 2013). Glikoproteina powierzchniowa CD8 występuje przede wszystkim na limfocytach T cytotoksycznych, ale także na komórkach denrytycznych i komórkach NK. Rolą CD8 jest wiązanie cząsteczek MHC klasy I, co stabilizuje kontakt pomiędzy komórką efektorową, np. limfocytom T cytotoksycznym a komórką docelową i wspomaga aktywację komórki efektorowej. Aby zweryfikować, czy modulacja poziomu laktadheryny wpłynie na napływ komórek CD8<sup>+</sup> do guza, wykonano barwienia immunohistochemiczne na obecność komórek CD8<sup>+</sup> w preparatach tkankowych z guzów shNeg i shMfg-E8. W półkuli kontralateralnej wykrywano pojedyncze komórki CD8-pozytywne. Nieco zwiększony napływ tych komórek obserwowano zarówno w guzach shNeg, jak i shMfg-E8 (ryc. 22A). Nie wykazano znaczących różnic w liczbie komórek CD8<sup>+</sup> naciekających guzy shNeg (20,07  $\pm$  10,04 komórek/mm<sup>2</sup>) i shMfg-E8 (42,73  $\pm$  29,89 komórek/mm<sup>2</sup>) (ryc. 22B).



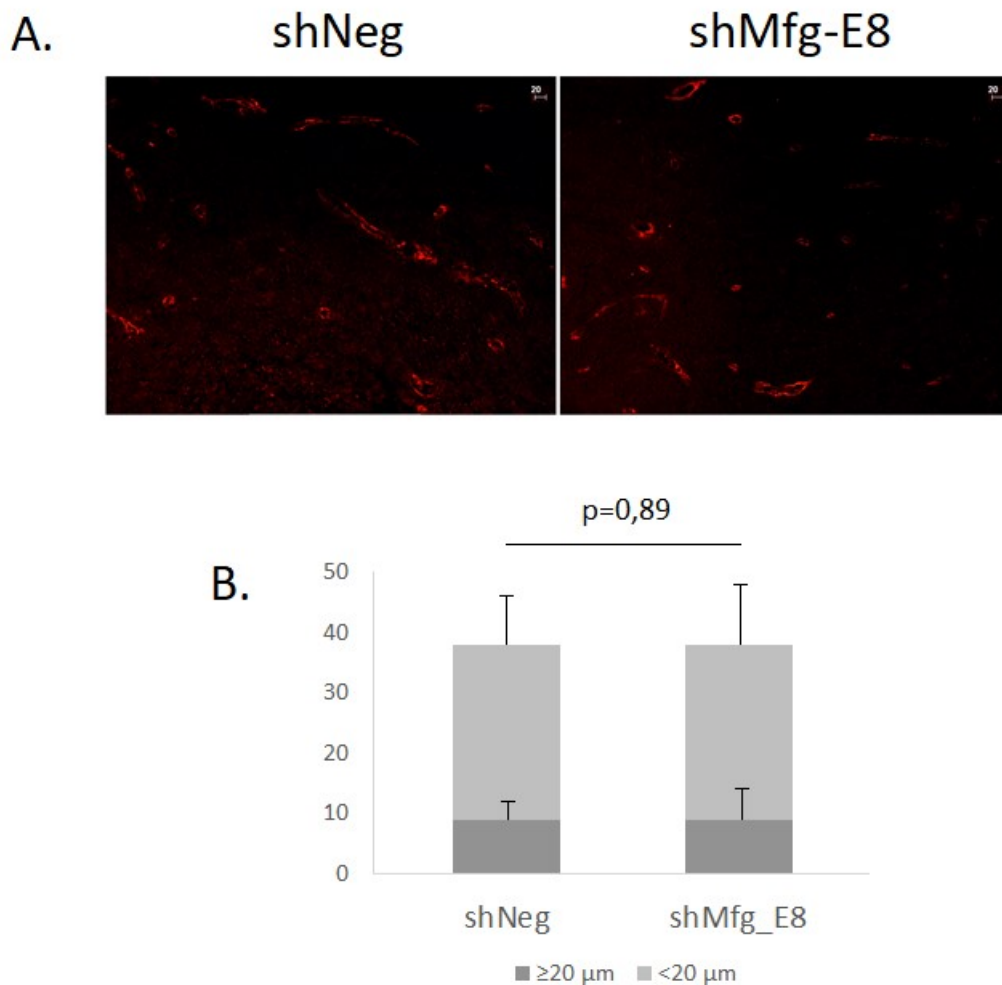


Ryc. 22. Modulacja ekspresji *Mfg-E8* w glejakiach nie wpływa na liczbę komórek CD8<sup>+</sup> naciekających guzy. A. Reprezentatywne zdjęcia preparatów guzów shNeg i shMfg-E8 oraz półkuli kontralateralnej wybarwionych przeciwciałem anti-CD8. Dalszej detekcji dokonywano z użyciem przeciwciała II-rzędowego sprzężonego z fluoroforem AlexaFluor 555. Skala odpowiada 50  $\mu$ m. B. Na wykresie przedstawiono wyniki analizy liczby komórek CD8<sup>+</sup> w półkuli bez guza oraz infiltrujących guzy shNeg i shMfg-E8. Komórki policzono w 5 losowo wybranych polach (n=5/shNeg oraz n=6/shMfg-E8). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek  $\pm$  SEM. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

### 6.2.9 Wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* w komórkach glejaka nie wpływa na powstawanie nowych naczyń krwionośnych w guzie

Proces powstawania nowych naczyń krwionośnych (neowaskularyzacja) w guzie jest niezbędny do wzrostu i progresji nowotworu. W celu określenia, czy wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* w komórkach glejaka wpływa na gęstość naczyń krwionośnych w guzach, wykonano barwienie immunohistochemiczne na obecność czynnika von Willebranda (vWF, ang. *von Willebrand factor*). Białko to występuje na komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych. Analiza wyników oceny mikroskopowej preparatów guzów shNeg i shMfg-E8 nie wykazała istotnych różnic

w liczbie naczyń krwionośnych o przekroju powyżej 20  $\mu\text{m}$ , jak również mniejszych naczyń (w tym naczyń włosowatych), o przekroju mniejszym niż 20  $\mu\text{m}$  (rycina 23A). Liczba naczyń krwionośnych na 1  $\text{mm}^2$  w guzach shNeg wynosiła  $9 \pm 3,89$  w przypadku naczyń  $\geq 20 \mu\text{m}$  i  $28,97 \pm 8,67$  w przypadku naczyń  $< 20 \mu\text{m}$ . W guzach shMfg-E8 gęstość naczyń krwionośnych wynosiła odpowiednio  $8,95 \pm 4,6 / \text{mm}^2$  w przypadku naczyń  $\geq 20 \mu\text{m}$  i  $28,95 \pm 10,44 / \text{mm}^2$  w przypadku naczyń  $< 20 \mu\text{m}$  (rycina 23B).



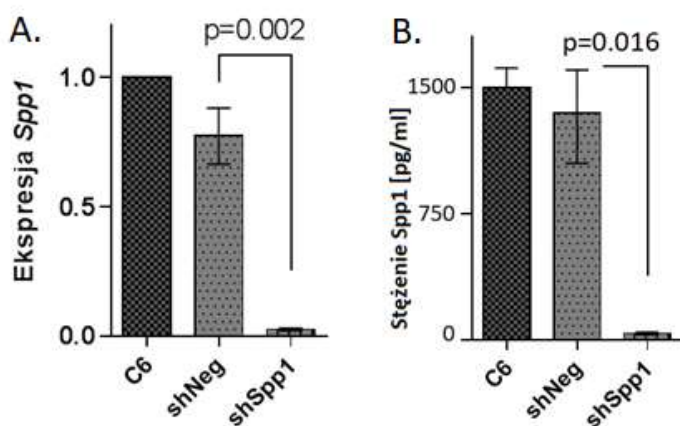
Ryc. 23. Wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* w glejaku C6 nie wpływa na gęstość naczyń krwionośnych w guzie. A. Reprezentatywne zdjęcie preparatów guzów shNeg i shMfg-E8 barwionych przeciwciałem rozpoznającym czynnik von Willebranda oraz przeciwciałem II-rzędowym sprzężonym z fluoroforem AlexaFluor 555. Skala odpowiada 20  $\mu\text{m}$ . B. Wyniki ilościowej analizy liczby naczyń krwionośnych w guzach. Policzono naczynia o przekroju  $\geq 20 \mu\text{m}$  oraz  $< 20 \mu\text{m}$  w 5 losowo wybranych obszarach guza ( $n=5/\text{grupe}$ ). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek/ $\text{mm}^2 \pm \text{SD}$ . Wartość  $p$  wyliczono za pomocą testu U Manna Whitney.

### 6.3 Ocena roli osteopontyny (*Spp1*) we wzroście guza i modulowaniu mikrośrodowiska nowotworu w szczurzym modelu glejaka

#### 6.3.1 Ocena poziomu ekspresji *Spp1* w klonach komórek glejaka C6

Komórki glejaka C6 transdukowano wektorem pLenti-U6-shRNA-Rsv(GFP-Puro) niosącym kontrolne shRNA (pLenti-U6-shNeg-Rsv(GFP-Puro)) bądź shRNA specyficzne do *Spp1* (pLenti-U6-sh*Spp1*-Rsv(GFP-Puro)). Sortowano pojedyncze komórki GFP-pozytywne, hodowano 48 godzin z puromycyną w stężeniu 2 µg/ml, a następnie identyfikowano komórki odporne na puromycynę. W wybranych klonach komórek C6 opornych na Puromycynę sprawdzono stopień wyciszenia ekspresji *Spp1* metodą ilościowego PCR (qPCR). Ekspresję *Spp1* w komórkach C6 przyjęto jako 1. Poziom ekspresji w komórkach shNeg wynosił  $0,773 \pm 0,108$  i nie różnił się istotnie od poziomu *Spp1* w wyjściowych komórkach C6. W przypadku komórek sh*Spp1* względna ekspresja *Spp1* była na poziomie  $0,023 \pm 0,004$  (rycina 24A).

Aby zweryfikować poziom wyciszenia *Spp1* na poziomie białka, zmierzono stężenie *Spp1* w pożywce znad komórek glejaka sh*Spp1*, shNeg i wyjściowych komórek C6 za pomocą testu ELISA. Stężenie *Spp1* w pożywce znad komórek C6 wynosiło 1495,57 pg/ml i nie różniło się istotnie od stężenia *Spp1* w pożywce znad komórek shNeg, które wynosiło 1316,84 pg/ml. Wykazano jednocześnie ponad 50-krotny spadek stężenia osteopontyny w pożywce znad komórek sh*Spp1*, które wynosiło 26,33 pg/ml w stosunku do komórek shNeg (rycina 24B)

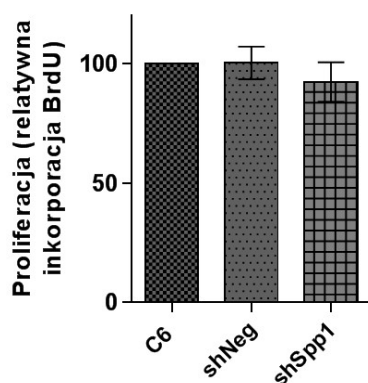


Ryc. 24. A. Ocena stopnia wyciszenia ekspresji *Spp1* w klonach komórek glejaka C6. Względna ekspresję *Spp1* mRNA oznaczono metodą ilościowego PCR. Poziom *Spp1* mRNA w komórkach C6 przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono wartości będące średnią z analizy ekspresji przeprowadzonej na komórkach z 3 niezależnych pasażów komórek ± SD.

Wartości p wyliczono za pomocą testu t-studenta. B. Stężenie Spp1 w pożywce hodowlanej znad komórek shNeg, shSpp1 i wyjściowych komórek C6 oceniono metodą ELISA. Na wykresie przedstawiono wartości będące średnią z analizy poziomu Spp1 w pożywce przeprowadzonej na komórkach z 3 niezależnych pasaży  $\pm$  SD. Wartości p wyliczono za pomocą testu t-studenta.

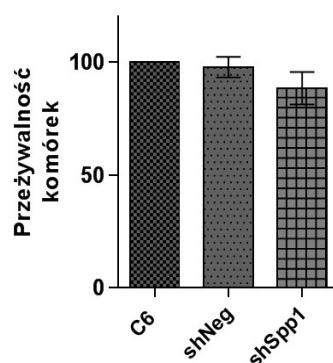
### 6.3.2 Wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka C6 nie wpływa na ich proliferację i żywotność

Aby ocenić, czy wyciszenie ekspresji *Spp1* wpływa na proliferację komórek wykonano test inkorporacji bromodeoksyurydyny (BrdU) do DNA. Wykazano, że wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka C6 nie wpływa na proliferację tych komórek (rycina 25). Relatywne wartości określające stopień proliferacji odniesione do wyjściowych komórek C6 wynosiły odpowiednio  $100,2 \pm 6,8$  w przypadku komórek shNeg i  $92,24 \pm 8,216$  w przypadku komórek shSpp1.



Ryc. 25. Ocena proliferacji komórek C6 shNeg i shSpp1. Proliferację komórek oceniano testem inkorporacji bromodeoksyurydyny (BrdU) 48 godzin po wysianiu komórek. Na wykresie przedstawiono wartości średnie  $\pm$  SD z 4 doświadczeń.

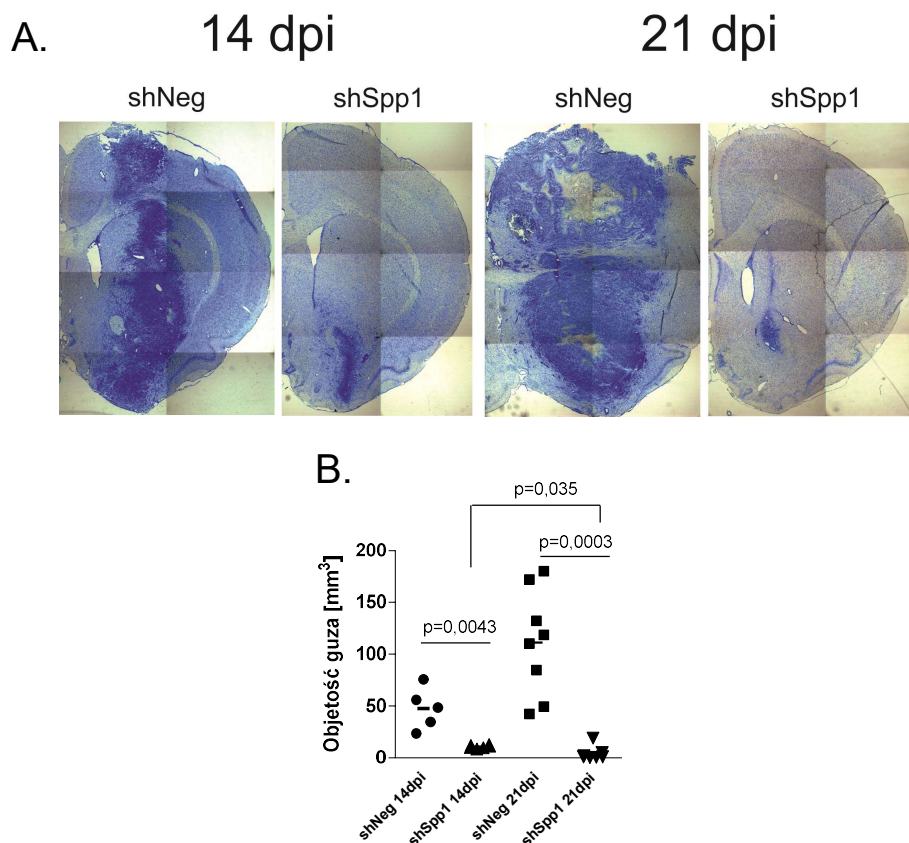
W celu zbadania wpływu wyciszenia ekspresji *Spp1* na przeżywalność komórek glejaka C6 wykonywano test metabolizmu MTT. Wartości uzyskane dla komórek shNeg i shSpp1 relatywizowano do wartości uzyskanej dla wyjściowych komórek C6, których żywotność przyjęto jako 100%. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w żywotności komórek C6, shNeg i shSpp1 po 48 godzinach inkubacji (rycina 26). Relatywne wartości żywotności odniesione do komórek C6 wynosiły odpowiednio  $97,68 \pm 4,5$  % dla komórek shNeg i  $88,33 \pm 7,19$  % dla komórek shSpp1.



Ryc. 26. Wyciszenie ekspresji *Spp1* nie wpływa na żywotność komórek C6 shNeg i shSpp1. Liczbę żywych komórek oceniano za pomocą testu metabolizmu MTT w 48 godzin po wysianiu komórek. Wyniki absorbancji relatywizowano do komórek C6 (przedstawione jako 100%). Na wykresie przedstawiono wartości średnie  $\pm$  SD z 3 doświadczeń.

### 6.3.3 Wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka C6 hamuje wzrost guza *in vivo*

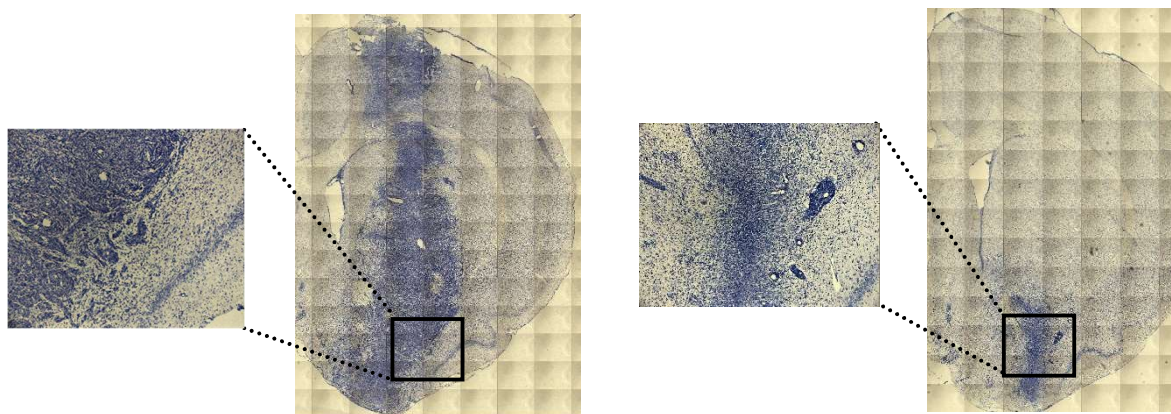
Komórki C6 shNeg lub shSpp1 implantowano do prążkowiec mózgu szczurów i po 14 lub 21 dniach od implantacji oceniano objętość guzów jak opisano wcześniej. Zdjęcia reprezentatywnych przekrojów guzów shNeg i shSpp1 w 14 i 21 dniu po implantacji przedstawiono na rycinie 27. Implantacja komórek shNeg do prążkowiec prowadziła do wykształcenia się guzów o średniej objętości  $47,63 \pm 8,97 \text{ mm}^3$  po 14 dniach od podania komórek. Komórki shSpp1 tworzyły guzy o średniej objętości  $10,71 \pm 0,605 \text{ mm}^3$ . Średnia objętość guzów wytworzonych z komórek shNeg po 21 dniach od implantacji wynosiła  $111,2 \pm 18,04 \text{ mm}^3$ , zaś guzów shSpp1  $4,01 \pm 2,57 \text{ mm}^3$  (wartości średnie  $\pm$  SEM) (rycina 27B). Wyniki te pokazują, że wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach szczurzego glejaka C6 prowadzi do znamienego statystycznie zahamowania wzrostu guza. W przypadku guzów shSpp1 nie obserwowano wzrostu guza między 14 a 21 dniem od implantacji jak w przypadku guzów shNeg, a wręcz statystycznie istotne zmniejszenie objętości guzów z  $10,71 \pm 0,605 \text{ mm}^3$  do  $4,01 \pm 2,57 \text{ mm}^3$ . Wyniki te wskazują na kluczową rolę *Spp1* produkowanej przez komórki glejaka w rozwoju guzów *in vivo*.



Ryc. 27. Wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka C6 prowadzi do zahamowania wzrostu guza *in vivo*. A. Reprezentatywne zdjęcia przekrojów mózgow barwionych kwaśnym błękitem toluidyny w 14 i 21 dniu po implantacji komórek shNeg i shSpp1. Widoczna jest mniejsza powierzchnia guzów (ciemnoniebieskie zabarwienie) powstałych z komórek shSpp1. B. Wykres przedstawiający objętości guzów w 14 i 21 dniu po implantacji u poszczególnych osobników. Pozioma kreska obrazuje średnią objętość guza w danej grupie zwierząt (n=5-8). Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

### 6.3.4 Wyciszenie ekspresji *Spp1* nie wpływa na migrację komórek glejaka *in vivo*

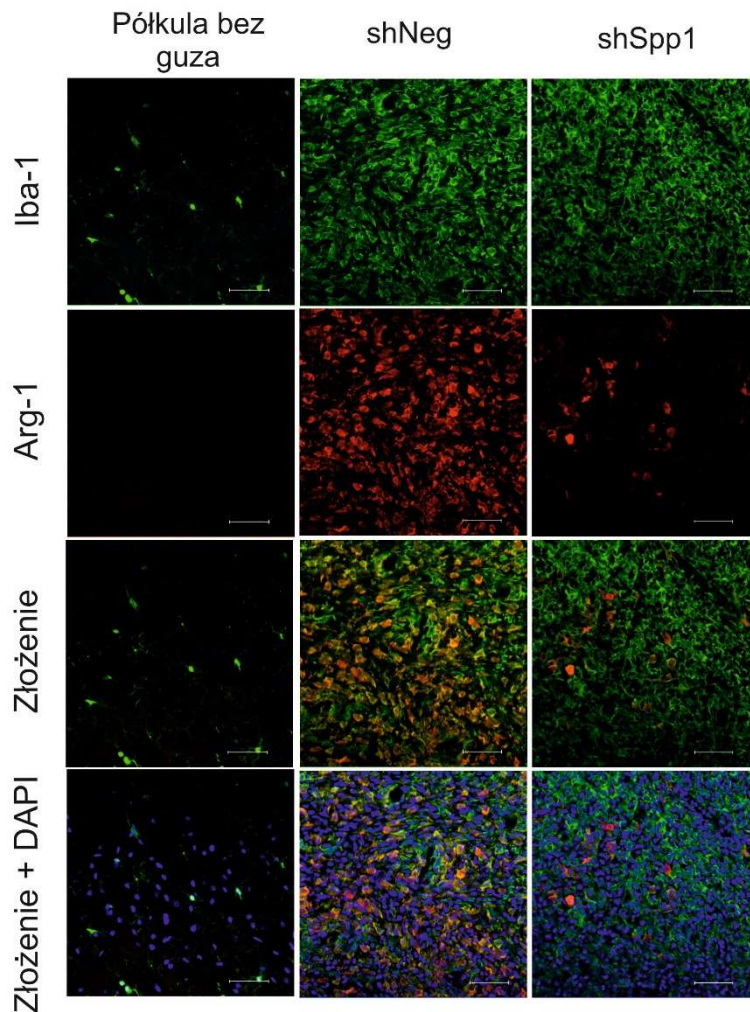
W celu określenia, czy wyciszenie ekspresji *Spp1* wpływa na zdolność komórek glejaka do migracji przeanalizowano obszar znajdujący się styku guza i tkanki nie noszącej znamion nowotworu. Oceny dokonało niezależnie dwóch eksperymentatorów. Zaobserwowano, że guzy shNeg i shSpp1, mimo znacznych różnic w wielkości, w podobnym stopniu naciekają parenchymę mózgu (rycina 28). Otrzymane wyniki sugerują, że *Spp1* nie jest białkiem zaangażowanym w zdolność komórek glejaka do migracji.



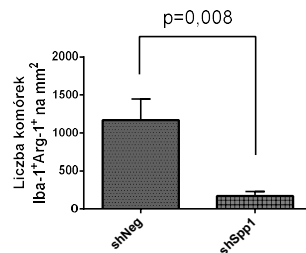
Ryc. 28. Wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka C6 nie wpływa na zdolność komórek glejaka do migracji *in vivo*. Reprezentatywne zdjęcia przekrojów mózgow barwionych kwaśnym błękitem toluidyny w 14 dniu po implantacji komórek shNeg i shSpp1. Zarówno w przypadku guzów shNeg, jak i shSpp1, w bezpośrednim sąsiedztwie guza obserwowano skupiska komórek nowotworowych, co świadczy o naciekającym charakterze nowotworu.

### 6.3.5 Wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka wpływa na polaryzację GAMs

W celu zweryfikowania, czy produkowana przez komórki glejaka *Spp1* jest czynnikiem zaangażowanym w pronowotworową polaryzację GAMs *in vivo*, wykonano barwienia immunohistochemiczne na preparatach tkankowych z guzów shNeg i shSpp1 na obecność komórek Iba-1<sup>+</sup> z ekspresją arginazy-1 bądź białka CD163. Jak pokazano na rycinach 29A i 30A, stwierdzono silną akumulację komórek Iba-1<sup>+</sup>Arg-1<sup>+</sup> ( $1169 \pm 279,5$  komórek/mm<sup>2</sup>) oraz obecność licznych komórek Iba-1<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> ( $316,5 \pm 114,1$  komórek/mm<sup>2</sup>) (wartości średnie  $\pm$  SEM) w guzach shNeg. Komórek tych nie wykrywano w półkuli kontralateralnej. Jednocześnie wykazano, że wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka prowadzi do znamiennego statystycznie spadku liczby komórek mieloidalnych z ekspresją markerów fenotypu pronowotworowego. Liczba komórek Iba-1<sup>+</sup>Arg-1<sup>+</sup> naciekających guzy shSpp1 wynosiła  $170,7 \pm 59,3$  komórek/mm<sup>2</sup> ( $p=0,008$ ). W guzach tych nie wykryto komórek Iba-1<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> ( $p=0,033$ ) (rycina 29B i 30B). Otrzymane wyniki wskazują, że *Spp1* jest białkiem zaangażowanym w indukcję wspierającej nowotwór aktywacji komórek mieloidalnych naciekających glejaki.

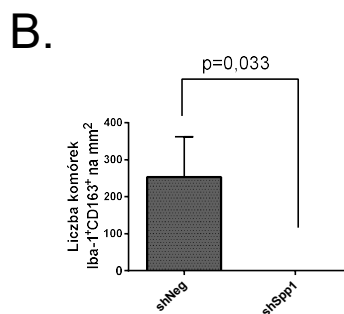
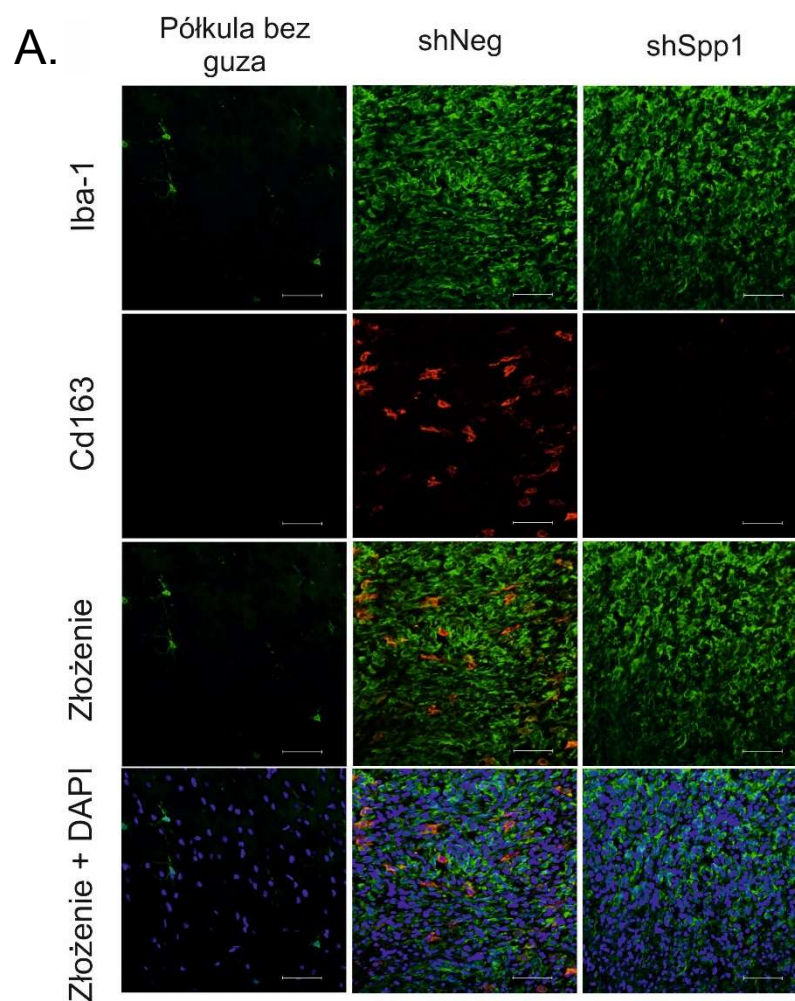


B.



Ryc. 29. Wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka C6 prowadzi do spadku liczby komórek mieloidalnych z ekspresją arginazy-1. A. Reprezentatywne zdjęcia preparatów guzów shNeg i shSpp1 oraz półkuli kontralateralnej. Preparaty wybarwiono przeciwciałami anti-Iba-1 w celu wizualizacji GAMS oraz anti-Arg-1 w celu określenia funkcjonalnego fenotypu tych komórek. Dalszej detekcji dokonywano z użyciem przeciwciał II-rzędowych sprzężonych odpowiednio z fluoroforem AlexaFluor 488 i AlexaFluor 555. Te same preparaty wybarwiono również DAPI by uwidocznili jądra komórkowe. Skala odpowiada 50  $\mu\text{m}$ . B. Analiza ilościowa komórek mieloidalnych z ekspresją arginazy-1. Zliczano komórki Iba-1<sup>+</sup> Arg-1<sup>+</sup> w 5 losowo wybranych obszarach guza ( $n=5/\text{grupę}$ ). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek/ $\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$ . Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitney.

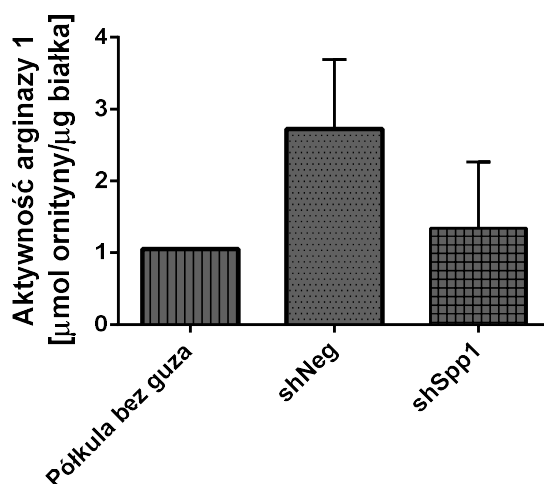




Ryc. 30. Spadek liczby komórek mieloidalnych z ekspresją CD163 w glejakiach z wyciszoną ekspresją *Spp1*. A. Reprezentatywne zdjęcia preparatów guzów shNeg i shSpp1 oraz półkuli bez guza. Przeprowadzono podwójne barwienie przeciwciałami rozpoznającymi Iba-1 i CD163 oraz przeciwciałami II-rzędowymi sprzężonymi odpowiednio z fluoroforem AlexaFluor 488 i AlexaFluor 555. Barwienie DAPI uwidocznienie jądra komórkowe. Skala odpowiada 50  $\mu$ m. B. Analiza ilościowa komórek Iba-1<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>. Zliczano komórki w 5 losowo wybranych obszarach guza (n=5/grupę). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek/mm<sup>2</sup>  $\pm$  SEM. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

### 6.3.6 Wpływ wyciszenia *Spp1* na aktywność arginazy-1 w półkulach z guzem

Przedstawione wyniki wskazują na spadek liczby komórek z ekspresją Arg-1. W celu zbadania, czy wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka wpływa na metabolizm L-argininy w guzie, dokonano pomiaru aktywności Arg-1 po 14 dniach od implantacji w ekstraktach białkowych z półkul z guzem shNeg, guzem shSpp1 oraz w półkuli kontralateralnej (rycina 31). Ilość ornityny uwalnianej podczas hydrolizy argininy na drodze reakcji enzymatycznej mierzono spektrofotometrycznie, wykorzystując fakt, że ornityna tworzy barwny kompleks z ninhydriną. Aktywność Arg-1 w lizatach półkuli kontralateralnej wynosiła 1,051  $\mu\text{mol}$  ornityny/ $\mu\text{g}$  białka. W lizatach z półkul z glejakiem shNeg obserwowano wzrost aktywności tego enzymu ( $2,724 \pm 0,965$   $\mu\text{mol}$  ornityny/ $\mu\text{g}$  białka). W guzach shSpp1 stwierdzono trend spadku aktywności arginazy-1 w stosunku do guzów shNeg ( $1,341 \pm 0,925$   $\mu\text{mol}$  ornityny/ $\mu\text{g}$  białka), wynik jednak nie był statystycznie istotny ( $p=0,061$ ).

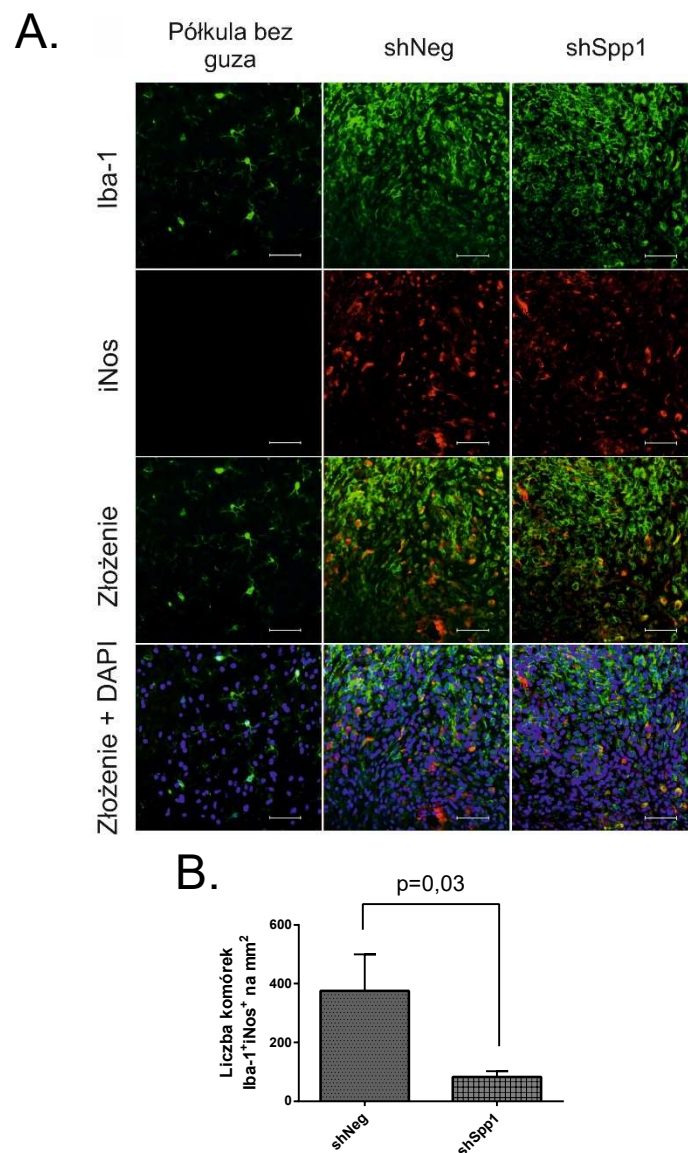


Ryc. 31. Wpływ wyciszenia ekspresji *Spp1* na aktywność arginazy-1 w guzie. Ilość powstającej ornityny tworzącej barwny kompleks z ninhydriną mierzono kolorymetrycznie w ekstraktach z półkul guzem oraz w półkuli bez guza i odnoszono uzyskane wartości do zawartości białka w badanej próbce ( $n=3$ /grupę). Wynik przedstawia średnią aktywność Arg-1  $\pm$  SEM. Wartości  $p$  wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

### 6.3.7 Wyciszenie *Spp1* w komórkach glejaka wpływa na produkcję indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNos) przez GAMs

Arginina jest wykorzystywana przez syntazę tlenu azotu (NOS) do produkcji tlenu azotu w czasie reakcji zapalnej. Zwiększona aktywność arginazy-1 negatywnie reguluje enzymatyczną aktywność indukowalnej syntazy tlenu azotu

(iNOS) poprzez zmniejszenie dostępności L-argininy (Fultang i wsp. 2016). iNOS jest też silnie indukowany w trakcie klasycznej odpowiedzi zapalnej. Wykonano barwienia immunohistochemiczne na preparatach z guzów shNeg i shSpp1 na obecność komórek Iba-1<sup>+</sup> z ekspresją iNos (rycina 32A). Wykazano, że wyciszenie ekspresji *Spp1* prowadzi do znamiennego statystycznie spadku liczby komórek Iba-1<sup>+</sup>iNos<sup>+</sup> w guzie, z  $375,9 \pm 124,3$  komórek/mm<sup>2</sup> w przypadku guzów shNeg do  $82,79 \pm 19,02$  komórek/mm<sup>2</sup> w przypadku guzów shSpp1 (rycina 32B). Komórek iNos<sup>+</sup> nie wykrywano w półkuli kontralateralnej. Otrzymane wyniki wskazują, że zahamowanie ekspresji *Spp1* zmienia funkcję komórek mieloidalnych naciekających guzy.

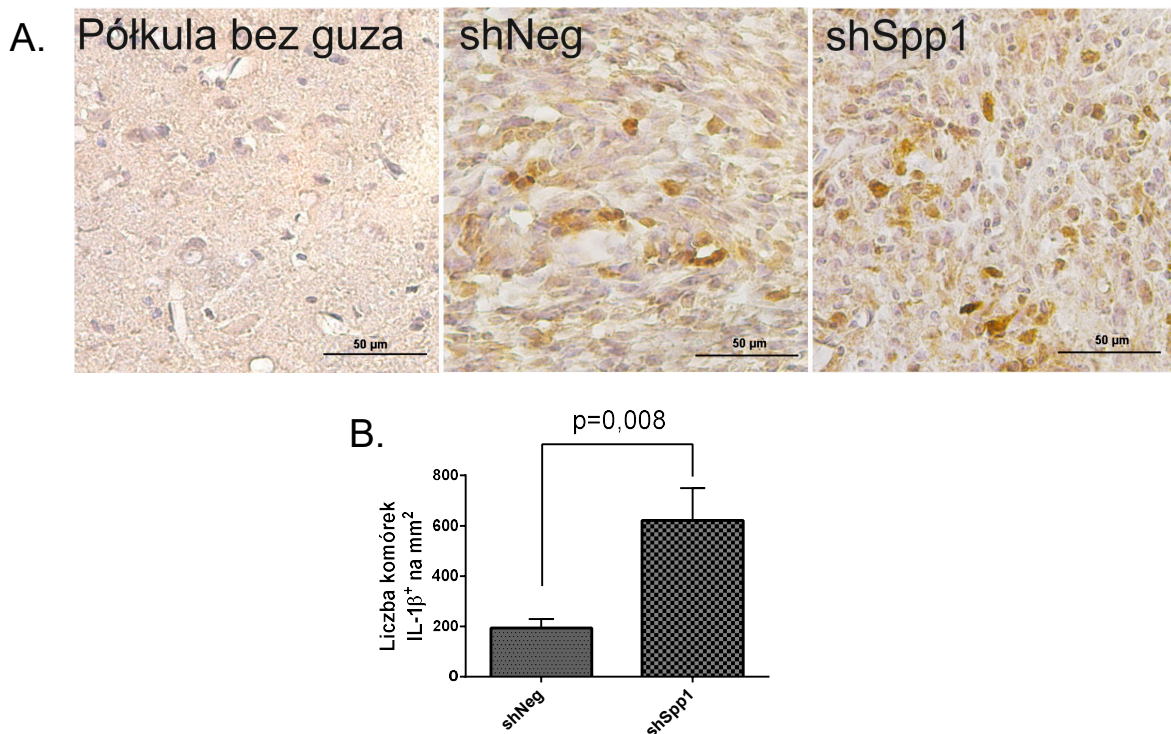


Ryc. 32. Ocena występowania komórek mieloidalnych produkujących iNos w glejakach shNeg i shSpp1. A. Reprezentatywne zdjęcia preparatów guzów shNeg i shSpp1 oraz półkuli bez guza. Preparaty wybarwiono przeciwciałami anti-Iba-1 oraz anti-iNos oraz

przeciwciałami II-rzędowymi sprzężonymi odpowiednio z AlexaFluor 488 i AlexaFluor 555. Barwienie DAPI uwidocznilo jądra komórkowe. Skala odpowiada 50  $\mu\text{m}$ . B. Na wykresie przedstawiono wyniki zliczenia komórek Iba-1<sup>+</sup>iNos<sup>+</sup> w półkuli bez guza oraz infiltrujących guzy shNeg i shSpp1 w 5 losowo wybranych obszarach guza (n=5/grupę). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek  $\pm$  SEM. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

### 6.3.8 Wyciszenie *Spp1* w komórkach glejaka zwiększa ekspresję interleukiny 1 $\beta$ w guzie

Zbadano, czy wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka wpływa na ekspresję Interleukiny 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) w TME wykonując barwienie immunohistochemiczne na obecność komórek z ekspresją IL-1 $\beta$  w preparatach guzów shSpp1 i shNeg. Komórki IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> wykrywano w guzach shNeg (Ryc. 33A), a ich liczba wzrastała w guzach shSpp1 (621,4  $\pm$  128,5 komórek/mm<sup>2</sup>, podczas gdy liczba komórek w guzach shNeg wynosiła 194,0  $\pm$  34,95 komórek/mm<sup>2</sup>) (ryc. 33B). Otrzymane wyniki wskazują, że zahamowanie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka prowadzi do wzrostu ekspresji prozapalnej cytokiny IL-1 $\beta$  w guzie.



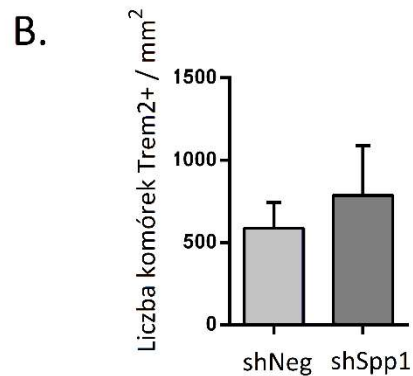
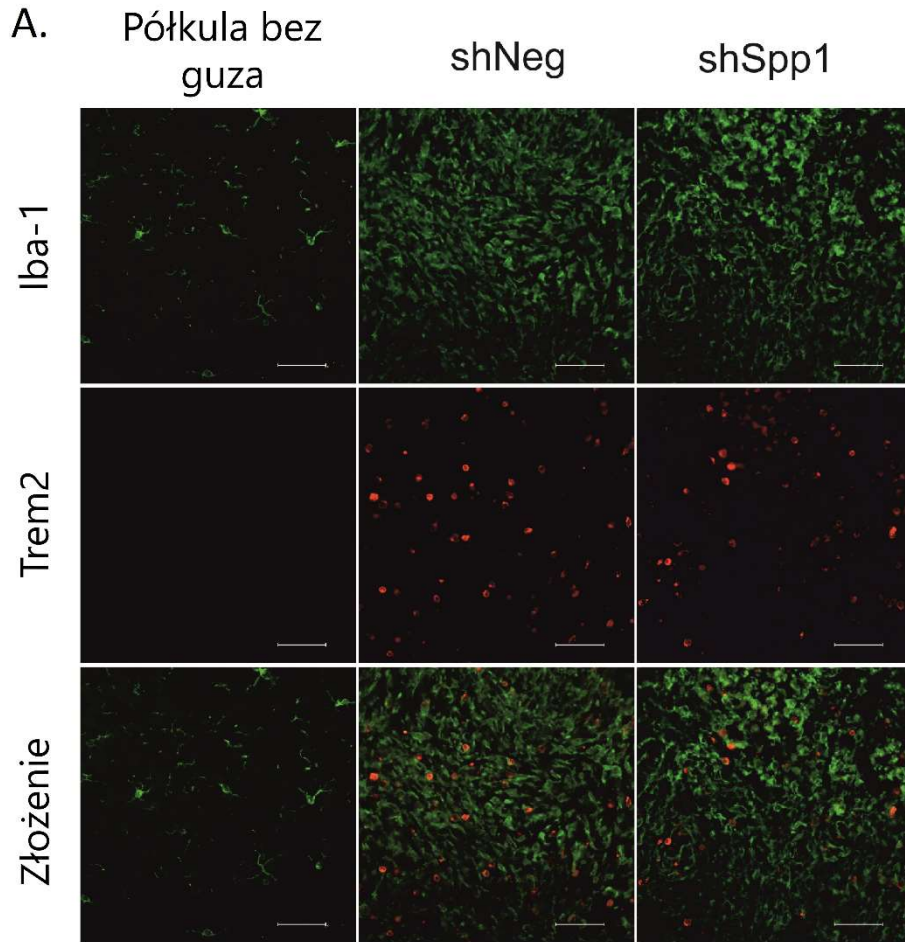
Ryc. 33. Podwyższona ekspresja prozapalnej interleukiny 1 $\beta$  w glejakach shSpp1. A. Reprezentatywne zdjęcia preparatów guzów shNeg i shSpp1 oraz półkuli kontralateralnej.

Preparaty wybarwiono przeciwciałami anti-IL $\beta$  sprzężonym z peroksydazą chrzanową. Dalszej detekcji dokonywano z użyciem odczynnika DAB. Skala odpowiada 50  $\mu$ m. B. Na wykresie przedstawiono wyniki ilościowej analizy komórek IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> infiltrujących guzy shNeg i shSpp1 zliczone w 5 losowo wybranych obszarach guza (n=5/grupę). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek  $\pm$  SEM. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

### **6.3.9 Wyciszenie *Spp1* w komórkach glejaka nie wpływa na ekspresję Trem2 w GAMs**

Trem2 jest białkiem obecnym na powierzchni różnych komórek mieloidalnych (De Kleer i wsp. 2014), w mózgu natomiast ulega ekspresji wyłącznie w komórkach mikrogleju (Gratuze i wsp. 2019). Podczas odpowiedzi odpornościowej TREM2 uczestniczy w aktywacji ścieżki sygnałowej PI3K/AKT/mTOR, co prowadzi do ekspresji czynników transkrypcyjnych AP1, NF- $\kappa$ B, i NFAT oraz czynników przeciwzapalnych, takich jak galektyna 1 (GAL1), galektyna 3 (GAL3), antagonist receptor interleukiny 1 (IL1RN, ang. *Interleukin 1 receptor antagonist*) i progranulina (Deczkowska i wsp. 2020). Wyniki badań wskazują, że aktywacja TREM2 prowadzi do uruchomienia odpowiedzi przeciwzapalnej i zwiększonej fagocytozy, jednak część doniesień wskazuje na rolę tego białka w indukcji prozapalnego fenotypu (Yang i wsp. 2020, Deczkowska i wsp. 2020).

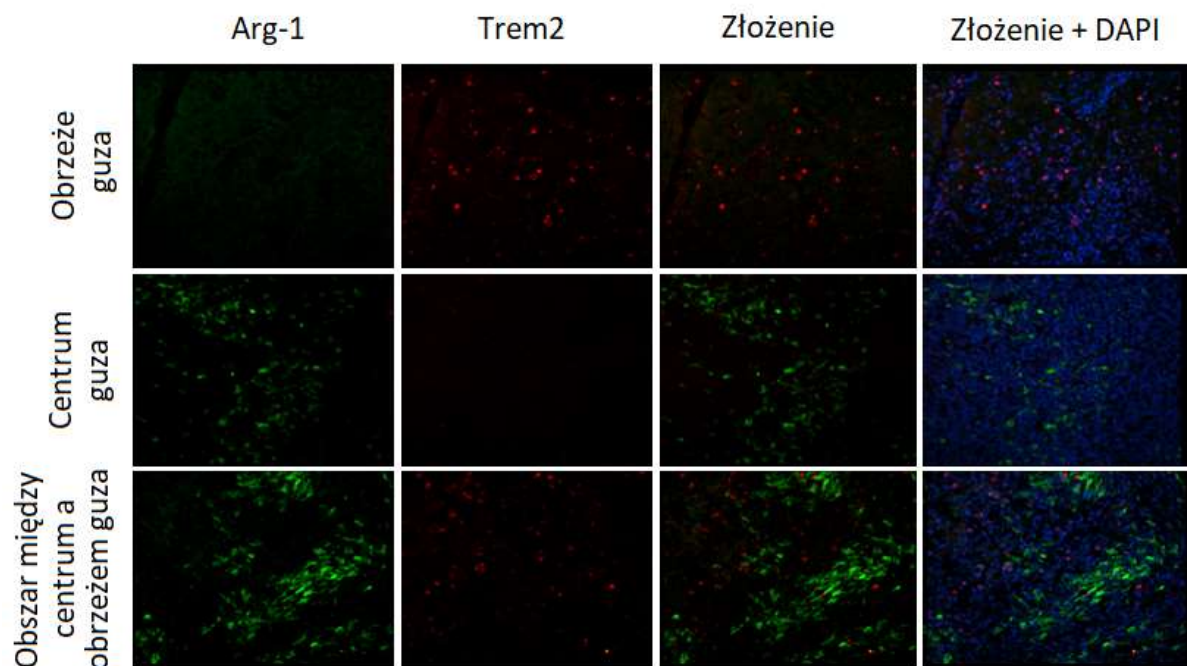
Wykonano barwienia immunohistochemiczne na preparatach z guzów shNeg i shSpp1 na obecność komórek podwójnie pozytywnych Iba-1<sup>+</sup>Trem2<sup>+</sup> (ryc. 34A). W półkuli kontralateralnej nie wykrywano komórek z ekspresją Trem2. Zwiększony napływ tych komórek obserwowano zarówno w guzach shNeg, jak i shSpp1 (ryc. 34A). Nie stwierdzono różnic w liczbie komórek Iba-1<sup>+</sup>Trem2<sup>+</sup> naciekających guzy shNeg (572,3  $\pm$  190,6 komórek/mm<sup>2</sup>) i shSpp1 (720,1  $\pm$  240,5 komórek/mm<sup>2</sup>) (ryc. 34B).



Ryc. 34. Liczba Trem2<sup>+</sup> GAMs w glejakach shNeg i shSpp1. A. Reprezentatywne zdjęcia preparatów guzów shNeg i shSpp1 oraz półkuli bez guza wybarwionych przeciwciałami anti-Iba-1 i anti-Trem2 i przeciwciałami II-rzędowymi sprzężonymi z AlexaFluor 488 i AlexaFluor 555. Skala odpowiada 50  $\mu$ m. B. Na wykresie przedstawiono wyniki zliczania komórek Iba-1<sup>+</sup>Trem2<sup>+</sup> w półkuli bez guza oraz infiltrujących guzy shNeg i shSpp1 w 5 losowo wybranych obszarach guza (n=5/grupę). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek  $\pm$  SD. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

### 6.3.10 Ocena nacieku komórek z ekspresją Trem2 i Arignazy-1 w różnych obszarach guza

Wykonano barwienia podwójne z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko Arg-1 i Trem2 na preparatach z guzów shNeg i przeanalizowano występowanie komórek z ekspresją tych markerów w różnych obszarach guza. Na górnym panelu ryciny 35A przedstawiono zdjęcia z obrzeża guza, na środkowym z centrum guza, a na dolnym obszarze pomiędzy centrum guza a obrzeżem. Na obrzeżu guza zaobserwowano liczne komórki Trem2<sup>+</sup>, których obecności praktycznie nie wykrywano w centrum guza. W centrum guza stwierdzono silną akumulację komórek Arg-1<sup>+</sup> i brak komórek Trem2<sup>+</sup>. W rejonie pomiędzy centrum guza a jego obrzeżem występowały zarówno komórki Arg-1<sup>+</sup>, jak i Trem2<sup>+</sup>, jednak nie wykrywano komórek podwójnie pozytywnych. Świadczy to o obecności odrębnych populacji komórek mieloidalnych w guzie i sugeruje różnice fenotypowe albo odmienne pochodzenie komórek mieloidalnych.

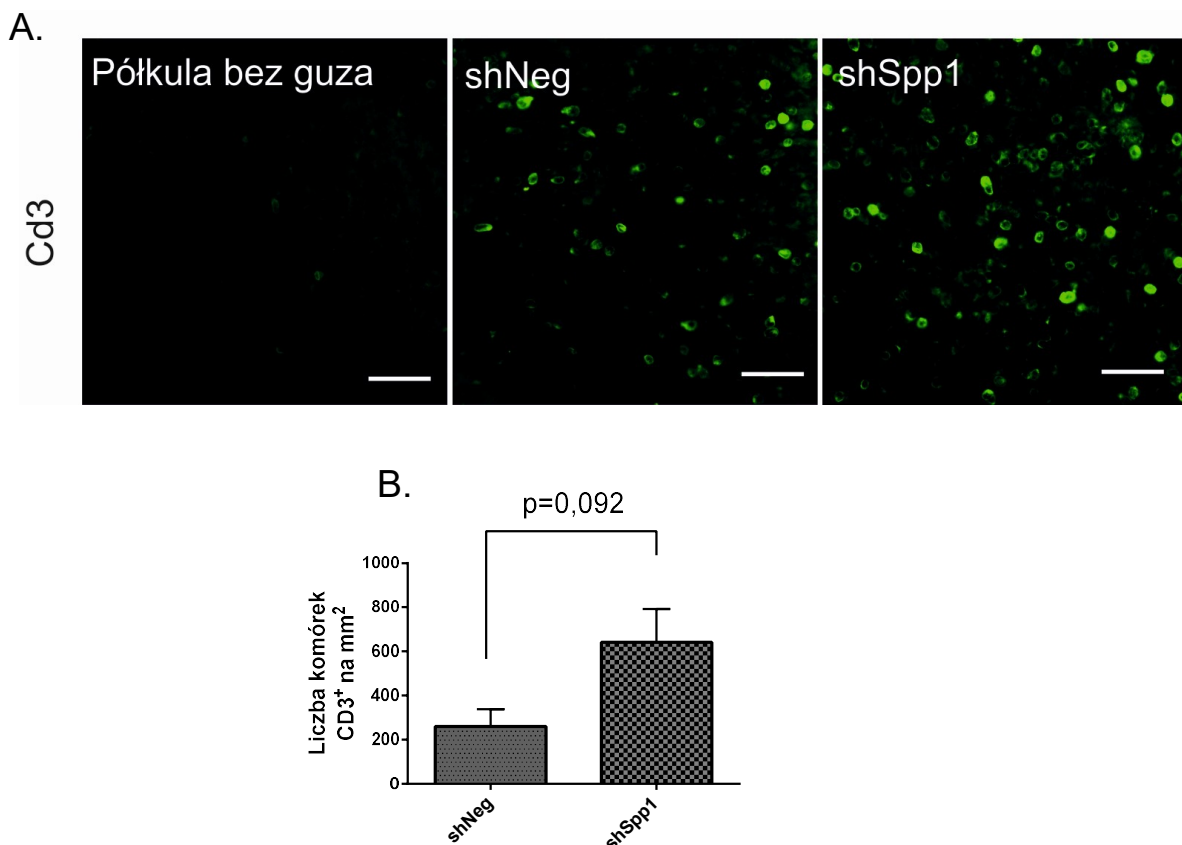


Ryc. 35. Ocena nacieku komórek Trem2<sup>+</sup> i Arg-1<sup>+</sup> glejaków shNeg. Na rycinie przedstawiono zdjęcia z obrzeża guza (górný panel), centrum guza (środkowy panel) oraz obszaru między centrum a obrzeżem (dolny panel). Preparaty wybarwiono przeciwciałami anti-Arg-1 i anti-Trem2 oraz przeciwciałami II-rzędowymi sprzężonymi z AlexaFluor 488 i AlexaFluor 555.

Jądra wybarwiono DAPI. Skala odpowiada 50  $\mu\text{m}$ . Analizę przeprowadzano na 5 losowo wybranych polach w poszczególnych obszarach guza/zwierzę (n=3/grupę).

### 6.3.11 Wyciszenie *Spp1* w komórkach glejaka nie wpływa na napływ limfocytów ( $\text{CD3}^+$ ) do guza

Wykonano barwienia immunohistochemiczne na obecność CD3, głównego markera limfocytów T, na preparatach tkankowych z guzów shNeg i shSpp1. W półkuli kontralateralnej wykrywano pojedyncze komórki  $\text{CD3}^+$ . Zwiększony napływ komórek  $\text{CD3}^+$  wykrywano zarówno w guzach shNeg, jak i shSpp1 (ryc. 36A). Liczba limfocytów T infiltrujących guzy shNeg wynosiła  $260,5 \pm 78,6$  komórek/ $\text{mm}^2$ , a w guzach shSpp1  $641,2 \pm 151,5$  komórek/ $\text{mm}^2$ ). Mimo widocznej tendencji zwiększenia liczby komórek  $\text{CD3}^+$  w glejakach shSpp1, nie był to jednak wynik statystycznie istotny ( $p=0,092$ ).



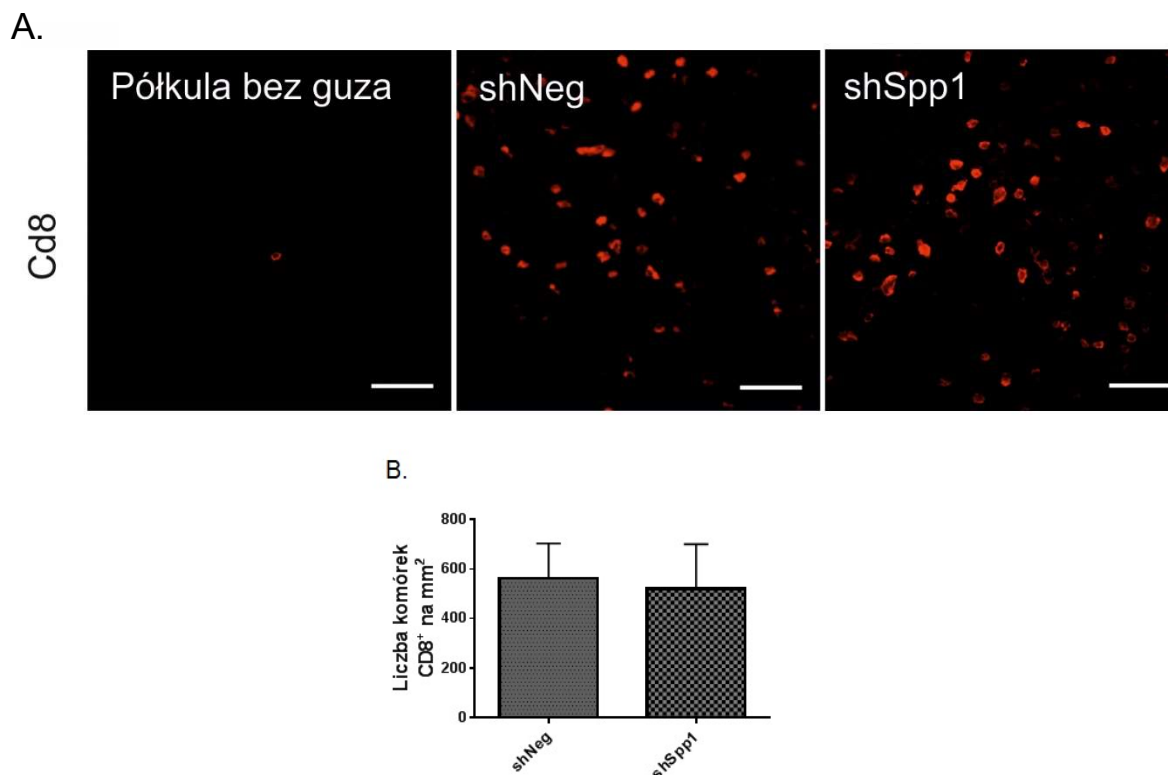
Ryc. 36. Wpływ wyciszenia ekspresji *Spp1* na liczbę infiltrujących guzy limfocytów T. A. Reprezentatywne zdjęcia preparatów guzów shNeg i shSpp1 oraz półkuli kontralateralnej. Preparaty wybarwiono przeciwciałem anti-CD3 i przeciwciałem II-rzędowym sprzężonym



z AlexaFluor 488. Skala odpowiada 50  $\mu\text{m}$ . B. Na wykresie przedstawiono wyniki zliczenia komórek  $\text{CD3}^+$  infiltrujących guzy shNeg i shSpp1 w 5 losowo wybranych obszarach guza ( $n=5/\text{grupę}$ ). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek  $\pm$  SEM. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

### 6.3.12 Wyciszenie *Spp1* w komórkach glejaka nie wpływa na napływ komórek $\text{CD8}^+$ do guza

Wykonano barwienia immunohistochemiczne na obecność komórek  $\text{CD8}^+$  (populacja to obejmuje głównie limfocyty T cytotoksyczne) w preparatach z guzów shNeg i shSpp1. W półkuli kontralateralnej wykrywano pojedyncze komórki  $\text{CD8}^+$ . Zwiększony napływ tych komórek obserwowano zarówno w guzach shNeg, jak i shSpp1 (ryc. 37). Nie wykazano różnic w liczbie komórek  $\text{CD8}^+$  naciekających guzy shNeg ( $562,3 \pm 140,6$  komórek/ $\text{mm}^2$ ) i shSpp1 ( $520,1 \pm 180,5$  komórek/ $\text{mm}^2$ ) (ryc. 37B).



Ryc. 37. Wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka nie wpływa na napływ komórek  $\text{CD8}^+$ . A. Reprezentatywne zdjęcia preparatów guzów shNeg i shSpp1 oraz półkuli kontralateralnej wybarwionych przeciwciałem anti- $\text{CD8}$  i przeciwciałem II-rzędowym sprzężonym z AlexaFluor 555. Skala odpowiada 50  $\mu\text{m}$ . B. Na wykresie przedstawiono wyniki zliczenia komórek  $\text{CD8}^+$  w półkuli bez guza oraz infiltrujących guzy shNeg i shSpp1

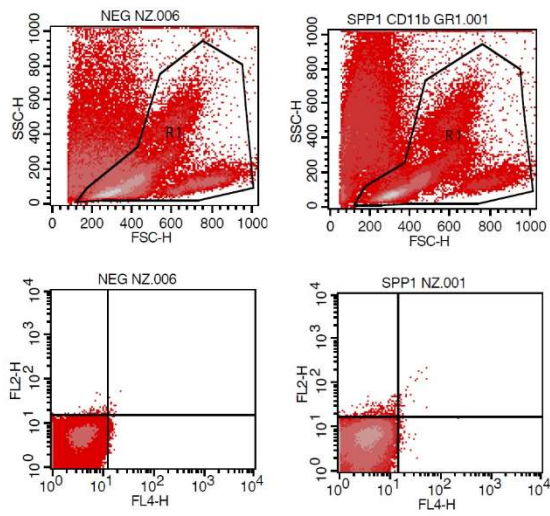
w 5 losowo wybranych polach/zwierzę (shNeg n=4, shSpp1 n=5). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek  $\pm$  SEM. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

### **6.3.13 Wpływ wyciszenia *Spp1* w komórkach glejaka na obecność subpopulacji komórek układu odpornościowego w krwi obwodowej szczurów z guzem**

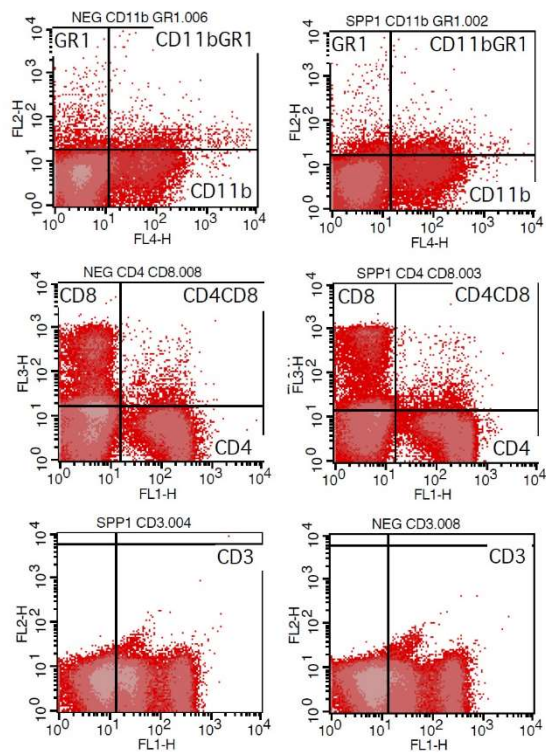
Zbadano jaki wpływ ma wycieszenie ekspresji *Spp1* w glejaku na profil komórek układu odpornościowego w krwi obwodowej. Wykonano barwienia pozwalające określić liczbę limfocytów T (CD3<sup>+</sup>), limfocytów T pomocniczych (CD4<sup>+</sup>), populacji CD8<sup>+</sup> (w skład której wchodzi głównie limfocyty T cytotoksyczne, a także komórki denrytyczne i NK), komórek mieloidalnych i neutrofilii (CD11b<sup>+</sup>) oraz mieloidalnych komórek supresorowych (MDSCs, CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>) w osoczu szczurów z glejakiem shNeg bądź shSpp1. Odsetek poszczególnych subpopulacji oceniono za pomocą cytometrii przepływową w 14 dniu po implantacji.

Odsetek komórek CD11b<sup>+</sup> wzrastał blisko dwukrotnie we krwi obwodowej szczurów z glejakiem shSpp1 ( $15,28 \pm 1,687$  %) w stosunku do krwi zwierząt z glejakiem shNeg ( $7,96 \pm 2,161$ ) ( $p=0,057$ ). MDSCs (CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>) stanowiły  $1,688 \pm 0,313$  % komórek u zwierząt z glejakiem shNeg i  $2,465 \pm 0,789$  % u zwierząt shSpp1. Nie stwierdzono istotnych różnic w odsetkach komórek CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> i CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>. Procent limfocytów T (CD3<sup>+</sup>) we krwi obwodowej zwierząt wynosił odpowiednio  $26,01 \pm 5,956$  u zwierząt z glejakiem shNeg i  $33,10 \pm 1,541$  u zwierząt z glejakiem shSpp1. Populacja limfocytów T pomocniczych (CD4<sup>+</sup>) stanowiła  $21,22 \pm 4,898$  % komórek krwi u szczurów z glejakiem shNeg i  $27,22 \pm 4,291$  % komórek u szczurów z glejakiem shSpp1. W krwi obwodowej szczurów z glejakiem shNeg komórki CD8<sup>+</sup> stanowiły  $13,01 \pm 1,122$  % komórek, a w glejaku shSpp1 komórki te stanowiły  $14,09 \pm 1,037$  % (ryc. 38).

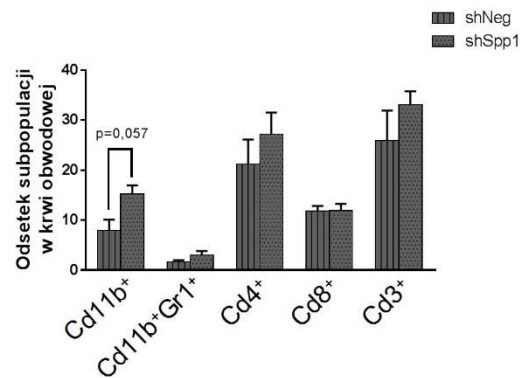
A.



B.



C.



Ryc. 38. Wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka nie wpływa istotnie na subpopulacje komórek układu odpornościowego w krwi obwodowej szczurów. A. Strategia bramkowania w cytometrii przepływowej. Wykres kropkowy ("dot-plot") z analizy cytometrycznej niebarwionych komórek krwi szczura z glejakiem shNeg (lewy panel) i shSpp1 (prawy panel). W górnym panelu przedstawiono wykresy kropkowe wielkości (FSC) i ziarnistości (SSC) analizowanych komórek. W bramce R1 znalazły się komórki poddawane dalszym analizom. Na dolnym panelu przedstawiono reprezentatywny wykres kropkowy wybranej kontroli izotypowej do testowanych przeciwciał. B. Wyznaczanie odsetka populacji limfocytów T (CD3<sup>+</sup>), limfocytów T pomocniczych (CD4<sup>+</sup>), CD8<sup>+</sup> (głównie limfocyty T cytotoksyczne, także komórki denrytyczne i NK), komórek mieloidalnych i neutrofilii (CD11b<sup>+</sup>) oraz mieloidalnych komórek supresorowych (MDSCs, CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>) w osoczu szczurów z glejakiem shNeg (lewy panel) i shSpp1 (prawy panel). Przedstawiono reprezentatywne wykresy kropkowe dla poszczególnych barwień. C. Wykres przedstawiający wyniki analizy odsetków poszczególnych subpopulacji we krwi obwodowej zwierząt z glejakiem shNeg (n=4) i shSpp1 (n=3). Wynik przedstawia średnią liczbę komórek ± SEM. Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

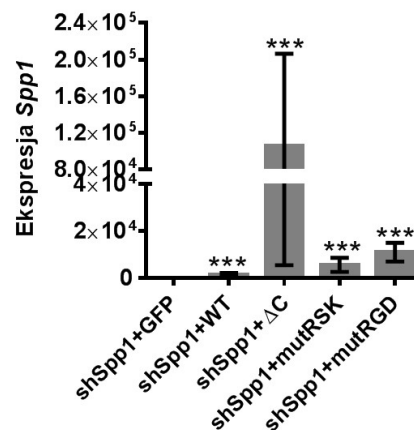
#### **6.4 Wpływ przywrócenia ekspresji prawidłowej *Spp1* lub jej wariantów w komórkach shSpp1 na wzrost guza *in vivo***

Różne rejony *Spp1* mogą oddziaływać z różnymi białkami i pełnić różne funkcje. Badania przeprowadzone w Pracowni Neurobiologii Molekularnej wykazały, że w aktywacji mikrogleju kluczowe jest oddziaływanie przez motyw RGD *Spp1* (Ellert, Wiśniewski, Kijewska i wsp. 2016). Inne badania wskazują na istotny udział proteolitycznego cięcia *Spp1* przez trombinę w obrębie sekwencji <sup>168</sup>RSKSKKFRR<sup>176</sup> w regulacji migracji komórek dendrytycznych (Shao i wsp. 2014). Z kolei oddziaływanie osteopontyny z CD44 przez region C-końcowy *Spp1* wpływało na właściwości komórek macierzystych glejaka (Kijewska i wsp. 2017) W celu sprawdzenia, czy przywrócenie ekspresji *Spp1* w komórkach z wyciszoną ekspresją *Spp1* wpłynie na wzrost guza *in vivo*, przeprowadzono doświadczenie typu *rescue*. Komórki pozbawione *Spp1* (shSpp1) transfekowano plazmidami kodującymi różne warianty tego genu:

1. prawidłową, pełną formę *Spp1* (shSpp1 + WT),
2. *Spp1* z delecją regionu kodującego C-koniec białka (shSpp1 + ΔC),

3. Spp1 z mutacją wprowadzającą zmianę w miejscu cięcia przez trombinę (shSpp1 + mutRSK),
4. Spp1 z mutacją punktową w sekwencji kodującej motyw RGD odpowiedzialny za wiązanie integrzyn (shSpp1 + mutRGD). Mutacja ta prowadzi do zamiany kwasu asparaginowego na kwas glutaminowy (RGD → RGE).

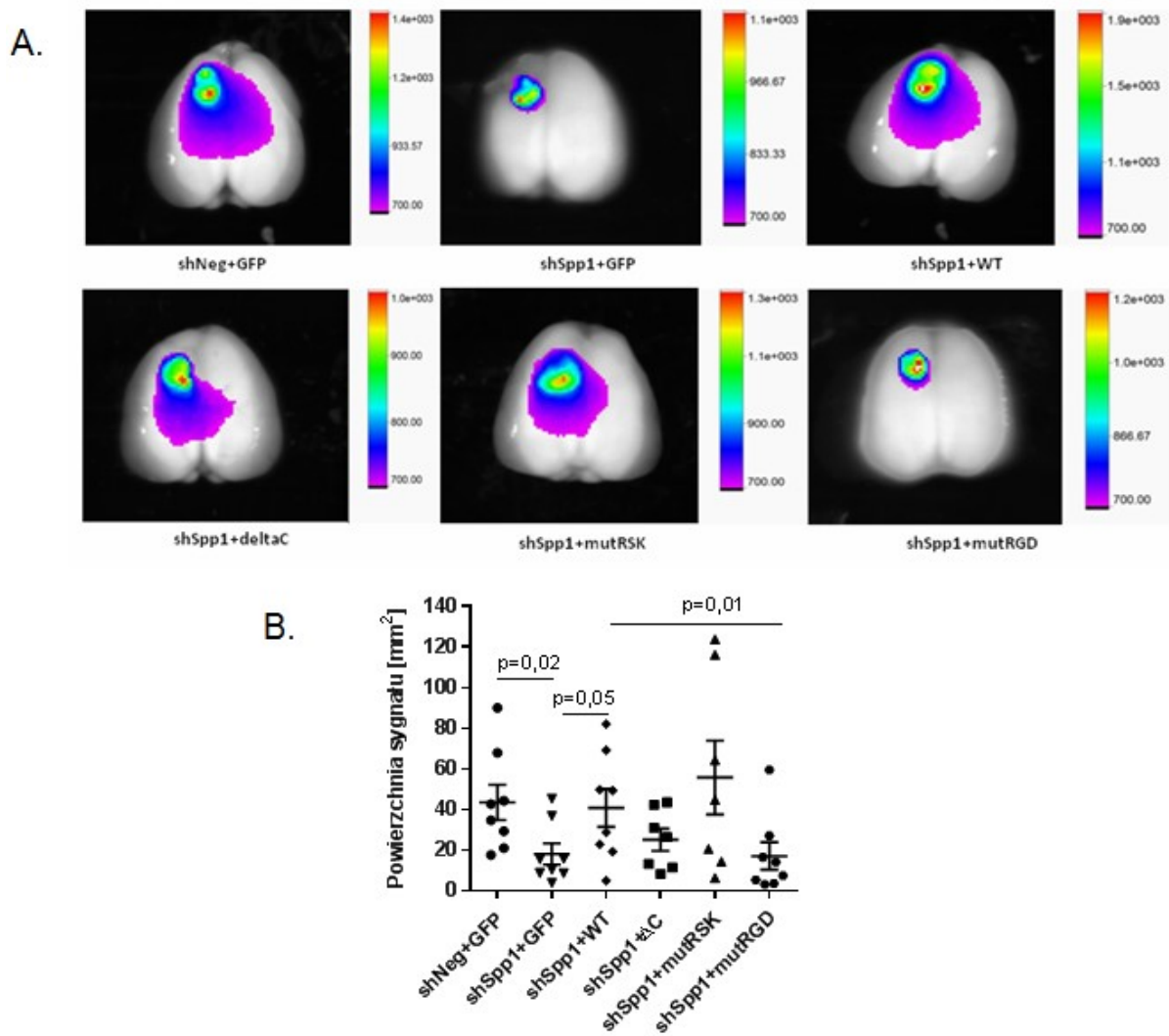
W sekwencjach konstruktów wprowadzono mutacje punktowe uniemożliwiające wiązanie shRNA obecnego w komórkach shSpp1. Jako kontrolę transfekcji, komórki C6 shNeg i shSpp1 transfekowano plazmidem kodującym GFP. Poziom ekspresji egzogennej *Spp1* we wszystkich wariantach doświadczenia oznaczono metodą ilościowego PCR (qPCR) w 24 godziny od transfekcji (rycina 39). Stwierdzono istotny statystycznie wzrost ekspresji *Spp1* ( $p < 0.001$ ) po transfekcji wszystkimi wariantami w stosunku do ekspresji *Spp1* w komórkach shSpp1 transfekowanych plazmidem kodującym GFP.



Ryc. 39. Wzrost ekspresji *Spp1* w komórkach C6 shSpp1 po transfekcji plazmidami kodującymi różne warianty *Spp1*. Komórki transfekowano plazmidem kodującym GFP (shSpp1 + GFP) lub konstrukcjami zawierającymi prawidłową *Spp1* lub jej warianty: ΔC, mutRSK, mutRGD. Relatywną ekspresję mRNA osteopontyny oznaczono metodą ilościowego PCR. Poziom mRNA *Spp1* w komórkach shSpp1 + GFP przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono wartości średnie ± SD z 3 niezależnych doświadczeń. Wartość p wyliczono za pomocą testu t- studenta

W 24 godziny po transfekcji, komórki C6 wybarwiano znacznikiem fluorescencyjnym CellVue® Burgundy (sprawdzono wcześniej, że nie wpływa to na żywotność komórek) i implantowano do prążkowania mózgu szczura. Wielkość guza

oceniano po dysekcji mózgu w 14 dniu od implantacji mierząc powierzchnię emitowanego sygnału za pomocą urządzenia do obrazowania In-Vivo Xtreme (Bruker). Reprezentatywne zdjęcia mózgow przedstawiono na rycinie 40. Guzy shSpp1 + GFP były istotnie mniejsze (średnio  $18,2 \pm 5,238 \text{ mm}^2$ ), niż w przypadku komórek shNeg + GFP ( $43,51 \pm 8,678 \text{ mm}^2$ ). Komórki shSpp1 + wtSpp1 wytwarzały guzy zbliżone wielkością do guzów shNeg + GFP ( $40,85 \pm 9,327 \text{ mm}^2$ ). Glejaki shSpp1 + mutRGD były mniejsze niż guzy shNeg + GFP i guzy shSpp1 + WT. Guzy shSpp1 + mutRGD były zbliżone do guzów shSpp1 + GFP ( $17,15 \pm 6,7 \text{ mm}^2$ ). Guzy shSpp1 + mutRSK i shSpp1 +  $\Delta C$  miały wielkość odpowiednio  $55,77 \pm 18,14 \text{ mm}^2$  i  $25,22 \pm 5,51 \text{ mm}^2$  (ryc. 40B) i nie różniły się istotnie od guzów shNeg + GFP. Otrzymane wyniki wskazują na kluczową rolę motywu RGD Spp1 we wzroście guza *in vivo*.



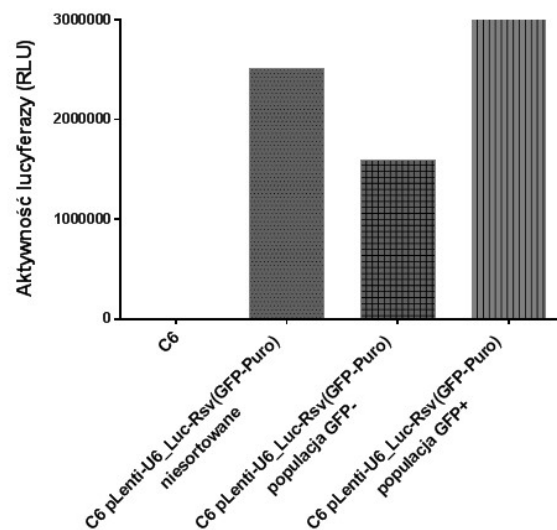
Ryc. 40. Analiza wpływu różnych form Spp1 na wzrost guza *in vivo* A. Komórki pozbawione Spp1 były transfekowane konstrukcjami z GFP, prawidłową Spp1 lub jej wariantami,

hodowane przez 48 godzin, a następnie barwione znacznikiem fluorescencyjnym CellVue® Burgundy i implantowane do prądkowia szczurów. Reprezentatywne zdjęcia mózgow wykonane po 14 dniach od implantacji znakowanych fluorescencyjnie różnych komórek glejaka. Widoczna jest mniejsza powierzchnia sygnału fluorescencji guzów shSpp1 + GFP i shSpp1 + mutRGD. Guzy shSpp1 + wtSpp1, shSpp1 + mutRSK) i shSpp1 +  $\Delta$ C miały zbliżoną powierzchnię sygnału, co guzy shNeg. B. Wykres przedstawiający wielkość guzów (mierzoną powierzchnią emitowanego sygnału fluorescencji) w 14 dniu po implantacji dla poszczególnych osobników. Pozioma kreska obrazuje średnią objętość guza w danej grupie zwierząt (n=8). Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya

## **6.5 Wpływ peptydu RGD na wzrost guza i modulowanie TME w szczurzych glejakach *in vivo***

### **6.5.1 Podanie peptydu RGD z komórkami glejaka nie wpływa na wzrost guza *in vivo***

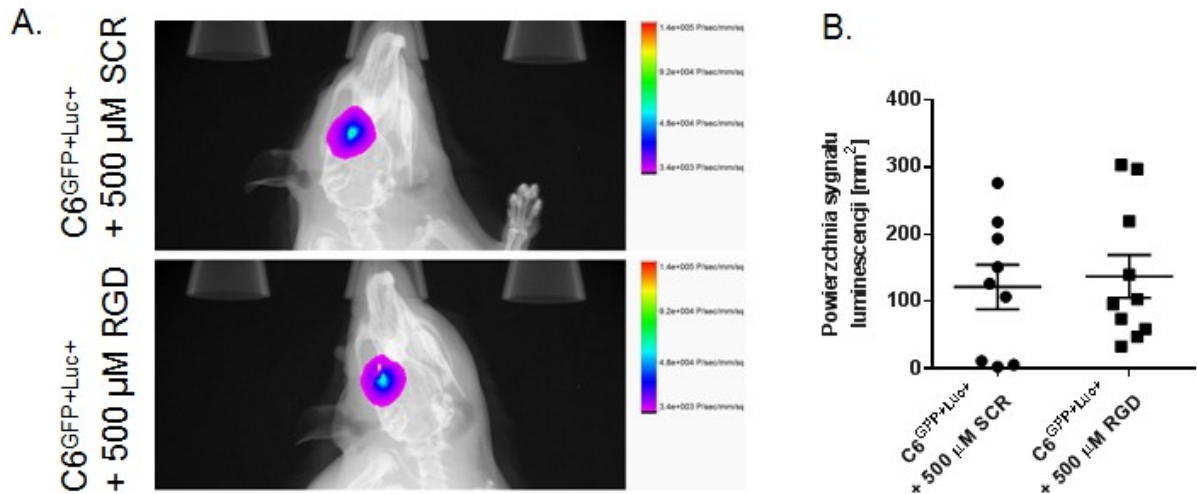
W opisanym powyżej doświadczeniu wykazano, że motyw RGD Spp1 jest kluczowy dla rozwoju guza *in vivo*. Wcześniej w Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN pokazano, że zablokowanie interakcji Spp1-integryny przez krótki syntetyczny peptyd TQRGDIF zawierający w swojej sekwencji motyw RGD hamuje interakcje glejak-mikroglej we współhodowli (Ellert, Wiśniewski, Kijewska i wsp. 2016). Wykonano zatem doświadczenie, w którym wraz z komórkami glejaka C6 podawano peptyd TQRGDIF w stężeniu 500  $\mu$ M. Komórki glejaka C6 były transdukowane wektorem pLenti-U6-Luc-Rsv(GFP-Puro), co umożliwiło przyżyciową obserwację wzrostu guza u zwierząt po podaniu dootrzewnowo lucyferyny, substratu dla lucyferazy. W celu uzyskania populacji cechującej się możliwie wysoką aktywnością lucyferazy, po rozmrożeniu komórek, sortowano populację GFP-pozytywną. Aktywność lucyferazy mierzono za pomocą zestawu Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega) w komórkach przed sortowaniem oraz w populacjach GFP<sup>+</sup> i GFP<sup>-</sup> (rycina 41).



Ryc. 41. Aktywność lucyferazy w komórkach transdukowanych wektorem lentiwirusowym pLenti-U6-Luc-Rsv(GFP-Puro) po sortowaniu frakcji GFP<sup>+</sup>. Aktywność mierzono w relatywnych jednostkach światła (RLU, ang. *Relative Light Units*) w komórkach niesortowanych, frakcji GFP-pozytywnej i GFP-negatywnej po podaniu substratu. Jako kontrolę aktywność zmierzono także w wyjściowych komórkach C6. Pomiaru dokonano w dwóch powtórzeniach technicznych. Wynik przedstawia średnią aktywność mierzoną w RLU.

Komórki C6<sup>GFP+LUC+</sup> implantowano następnie do prądkowia mózgu szczurów Wistar wraz z peptydem RGD (TQ**R**GDIF) bądź peptydem kontrolnym SCR (ang. *scrambled*) o sekwencji aminokwasowej DQIGFRT w stężeniu 500 μM. Wielkość guzów oceniano 14 dnia po implantacji za pomocą urządzenia do obrazowania In-Vivo Xtreme (Bruker) po podaniu lucyferyny. Reprezentatywne zdjęcia mózgów przedstawiono na rycinie 42. Podawanie peptydu RGD lub kontrolnego SCR z komórkami C6 nie wpływało na wielkość powstających guzów (mierzonych jako powierzchnia sygnału luminescencji).

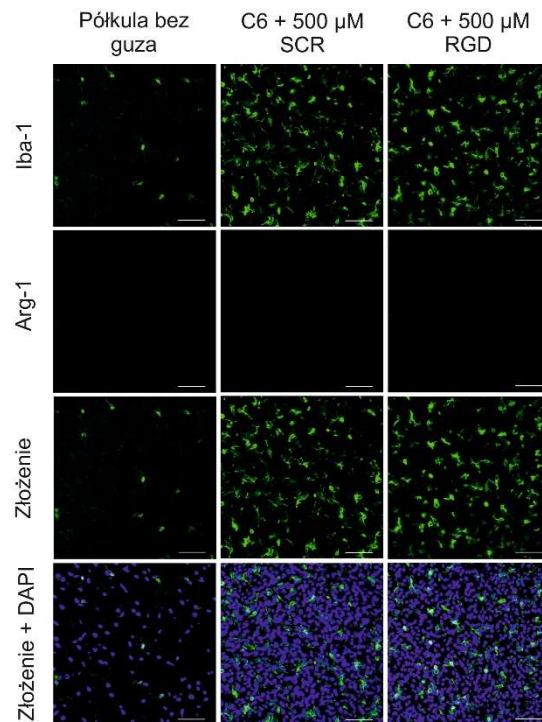




Ryc 42. Podanie peptydu RGD lub peptydu kontrolnego (SCR) wraz z komórkami glejaka nie wpływa na wielkość glejaka. A. Reprezentatywne zdjęcia mózgów wykonane po 14 dniach od implantacji komórek glejaka C6 z ekspresją lucyferazy po podaniu lucyferyny 5 minut przed obrazowaniem. Widoczna jest podobna powierzchnia sygnału luminescencji u zwierząt, którym podano peptyd RGD bądź SCR. B. Wykres przedstawiający wielkość guzów (mierzona powierzchnią emitowanego sygnału luminescencji) u poszczególnych osobników w 14 dniu po implantacji. Pozioma kreska obrazuje średnią objętość guza w danej grupie zwierząt (n=9/SCR i n=10/RGD). Wartość p wyliczono za pomocą testu U Manna Whitneya.

### 6.1.1 Peptyd RGD nie wpływa na napływ GAMs do guza oraz funkcjonalny fenotyp tych komórek

W celu określenia, czy podanie peptydu RGD wpływa na napływ komórek mieloidalnych do guza oraz funkcjonalny fenotyp tych komórek, wykonano barwienia immunohistochemiczne na obecność komórek Iba-1<sup>+</sup>Arg-1<sup>+</sup> na preparatach z guzów zwierząt, które otrzymały 500 μM peptyd RGD lub 500 μM peptyd SCR. Jak pokazano na rycinie 43, guzy rosnące po podaniu peptydów RGD lub SCR charakteryzowały się podobną akumulacją komórek mieloidalnych (Iba-1<sup>+</sup>). Wśród komórek Iba-1<sup>+</sup> obserwowano liczne komórki nieameboidalne. Zarówno po podaniu peptydu RGD, jak i kontrolnego peptydu SCR nie obserwowano zmian w liczbie komórek Iba-1<sup>+</sup>Arg-1<sup>+</sup>.



Ryc. 43. Podanie peptydu RGD wraz z komórkami glejaka nie wpływa na napływ komórek mieloidalnych do guza oraz polaryzację tych komórek. Reprezentatywne zdjęcia preparatów guzów zwierząt, którym podano peptyd SCR bądź RGD w stężeniu 500  $\mu$ M oraz półkuli kontralateralnej. Preparaty wybarwiono przeciwciałami anti-Iba-1 i anti-Arg-1 oraz przeciwciałami II-rzędowymi sprzężonymi odpowiednio z AlexaFluor 488 i AlexaFluor 555. Barwienie DAPI uwidocznilo jądra komórkowe. Skala odpowiada 50  $\mu$ m.

## 7. DYSKUSJA

### 7.1 Glejak C6 jest wiarygodnym modelem zwierzęcym w badaniach nad patobiologią GBM

Glejaki złośliwe są silnie infiltrowane przez komórki układu odpornościowego, zarówno te rezydujące w mózgu, jak i migrujące z obwodu przez nieszczelną barierę krew-mózg. Mimo to odpowiedź przeciwnowotworowa nie jest efektywna (Warth i wsp. 2007, Sarkaria i wsp. 2018). Naciekające komórki układu odpornościowego zamiast aktywnie eliminować komórki nowotworowe, tworzą środowisko wspierające progresję nowotworu, między innymi poprzez regulację wzrostu guza, jego unaczynienia, inwazyjności oraz odpowiedzi na leczenie. Silny naciek i aktywacja wielu typów komórek w guzie są spowodowane białkami wydzielanymi przez komórki glejaka, których identyfikacja ma fundamentalne znaczenie w zrozumieniu biologii glejaków złośliwych i znalezieniu nowych celów terapeutycznych.

W badaniach nad biologią glejaków istotne jest dobranie odpowiedniego modelu badawczego, który możliwie dobrze przypominałby ludzkie GBM. Guzy śródczaszkowe u zwierząt doświadczalnych uzyskuje się poprzez wszczepienie komórek glejaka do parenchymy mózgu, zwykle prążkowie. W tym celu wykorzystywane są komórki linii ludzkich glejaków, takie jak U251 i U87, mysiego glejaka GL261 oraz komórki szczurzych glejaków: 9L/LacZ, F98, RG2, CNS-1 i C6. Badania *in vivo* z wykorzystaniem ludzkich komórek (ksenografty) wymagają jednak użycia gryzoni z deficytem układu odpornościowego, co stanowi pewne ograniczenie, zwłaszcza w kontekście badań uwzględniających udział mikrośrodowiska w patogenezie nowotworu.

W niniejszej rozprawie w badaniach nad wzrostem glejaka *in vivo* wykorzystano model, w którym komórki glejaka C6 wszczepiano do prążkowie szczurów szczepu Wistar, syngenicznego z tymi komórkami. Obraz histologiczny rozwijającego się guza przypomina ludzkie GBM: komórki C6 tworzą bogato unaczynione guzy o dyfuzyjnym wzroście, infiltrujące parenchymę mózgu, z licznymi ogniskami nekrozy (Gieryng i wsp. 2017, Giakoumettis i wsp. 2018). Również w obrazowaniu z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego oraz angiografii glejak C6 wykazuje podobieństwo do ludzkich glejaków złośliwych (Doblas i wsp. 2010). Jednak aby szczegółowo określić użyteczność glejaka C6 jako modelu badawczego dla ludzkich GBM, kluczowa jest charakterystyka nienowotworowego środowiska

guza oraz określenie podobieństw nie tylko na poziomie histologicznym, ale i molekularnym.

Dane literaturowe wskazują, że zmiany ekspresji genów w komórkach C6 w porównaniu do prawidłowych szczurzych astrocytów są zbliżone do zmian obserwowanych w ludzkich guzach złośliwych w odniesieniu do zdrowej tkanki. Pod względem molekularnym komórki C6 charakteryzuje mutacja w *p16/Cdkn2a/Ink4a*, brak ekspresji *p16* i *p19ARF* oraz prawidłowy *p53* (Barth i wsp. 2009). Ponadto komórki C6 cechuje zwiększona ekspresja genów *Pdgfr $\beta$* , *Igf-1*, *Egfr* i *Erb3/Her3*, obserwowana często także w ludzkich glejakiach (Heimberger i wsp. 2005, Barth i wsp. 2009, Giakoumettis i wsp. 2018). Podobnie jak komórki nowotworowe w ludzkich glejakiach, komórki C6 wykazują także zwiększoną aktywność ścieżki Ras, jednak w odróżnieniu od większości ludzkich guzów charakteryzuje je zwiększona ekspresja białka Rb (Sibenaller i wsp. 2005, Giakoumettis i wsp. 2018). W komórkach C6 nie obserwuje się natomiast mutacji w *Idh1/2*, których występowanie u pacjentów jest istotnym parametrem diagnostycznym i stanowi korzystny czynnik prognostyczny (Fu i wsp. 2011). Należy podkreślić jednak, że porównania te są uproszczone i dotyczą ekspresji genów w ustalonej linii komórkowej w odniesieniu do profilu ekspresji w heterogennej tkance guza, która zawiera nie tylko komórki nowotworowe, ale i liczne komórki nienowotworowe, takie jak GAMs, granulocyty, MDSCs i limfocyty T (Gieryng i wsp. 2017, Hambardzumyan i wsp. 2015) oraz fragmenty prawidłowej tkanki. Aby bardziej precyzyjnie określić stopień podobieństwa szczurzego modelu glejaka do ludzkich GBM przeanalizowano globalne zmiany ekspresji genów w półkulach mózgu szczura z glejakiem C6 oraz porównano je do sygnatur charakterystycznych dla podtypów ludzkich GBM: proneuralnego, mezenchymalnego i klasycznego. Wykazano największe podobieństwo profili transkryptomicznych szczurzego glejaka C6 do profili podtypu Mes-GBM.

Molekularnie Mes-GBM związany jest z mutacjami genów *NF1*, *TP53*, *INK4a/ARF* i wysoką ekspresją białek zaangażowanych w tworzenie naczyń krwionośnych. Spośród zidentyfikowanych w ramach projektu TCGA podtypów glejaka, Mes-GBM charakteryzuje się największą inwazyjnością, aktywnością proliferacyjną i unaczynieniem (Kim i wsp. 2021). W podtypie tym zaobserwowano także występowanie najliczniejszych ognisk nekrotycznych oraz hipoksji (Kim i wsp. 2021), a także największą agresywność i oporność na standardowe terapie

przeciwnowotworowe (Verhaak i wsp. 2010). Mes-GBM cechuje większa wrażliwość na działanie inhibitorów szlaków przekąźnictwa z udziałem białek Ras, PI3K oraz inhibitorów angiogenezy. Wśród molekularnych podtypów GBM, Mes-GBM wykazuje najsilniejszy naciek komórek układu odpornościowego, zwłaszcza komórek mieloidalnych (GAMs), w porównaniu do podtypów proneuralnego i klasycznego (Behnan i wsp. 2019, Kaffes i wsp. 2019, Kaminska i wsp. 2021). Wyniki analizy globalnej ekspresji genów w glejaku C6 wskazują, że w porównaniu z prawidłowym mózgiem najbardziej obniżona była ekspresja genów związanych z funkcjonowaniem układu nerwowego, przekazywaniem sygnału i przekąźnictwem synaptycznym. Odzwierciedla to śmierć komórek nerwowych w półkuli z guzem. Z kolei najsilniejszy wzrost ekspresji obejmował geny kodujące białka związane z odpowiedzią odpornościową (w tym charakterystyczne dla komórek mieloidalnych naciekających glejaki), procesami metabolicznymi, śmiercią oraz podziałem komórek.

Wyniki analizy danych transkryptomicznych z próbek ludzkich glejaków wykazały, że poziom ekspresji genów związanych z aktywacją GAMs pozytywnie koreluje z krótszym czasem przeżycia pacjentów (Engler i wsp. 2012). Akumulacja komórek mieloidalnych w ludzkich GBM wykrywana za pomocą immunohistochemii, a także obecność sygnatury transkrypcyjnej GAMs w danych z sekwencjonowania RNA stanowią niekorzystne czynniki prognostyczne (Hung i wsp. 2016). Zmiany poziomu ekspresji wspomnianych grup genów zidentyfikowano także w badanych glejakach C6 i świadczą one o silnej infiltracji mikrośrodowiska glejaka C6 przez aktywowane GAMs, wysokiej aktywności metabolicznej i proliferacyjnej nowotworu oraz towarzyszącej ekspansji nowotworu śmierci neuronów, która zachodzi na drodze ekscytotoksyczności wywołanej przez wysokie stężenia glutamianu (de Groot i wsp. 2011). Uzyskane wyniki wskazują na istotne podobieństwo glejaka C6 do ludzkiego Mes-GBM na poziomie molekularnym.

Podobnie jak w ludzkich glejakach złośliwych (w szczególności Mes-GBM), które charakteryzują się silną infiltracją przez komórki mieloidalne (Ma i wsp. 2021), w histologicznej analizie glejaka C6 zaobserwowano naciek licznych komórek z ekspresją markera Iba-1. W centrum guza komórki Iba-1<sup>+</sup> były w większości ameboidalne i charakteryzowały się powiększonym ciałem komórki i zanikiem wypustek. Taka morfologia komórek świadczy o ich silnej aktywacji (Hambardzumyan i wsp. 2016; Ellert-Miklaszewska, Wisniewski, Kijewska i wsp. 2016). W większości komórek Iba-1<sup>+</sup> w guzach wykrywano ekspresję arginazy-1, co

wskazuje na ich immunosupresyjny, pronowotworowy charakter. Komórki na obrzeżu guza również wykazywały znamiona aktywacji, jednak słabsze niż komórki w centrum guza. W ludzkich glejakach złośliwych GAMs są jedną z najliczniejszych populacji nienowotworowych komórek w mikrośrodowisku i stanowią do 30% masy (Sliwa i wsp. 2007, Markovic i wsp. 2009, Zhai i wsp. 2011, Gabrusiewicz i wsp. 2011). Podobnie jak w glejaku C6, liczne GAMs o ameboidalnym kształcie wykrywano w glejakach ludzkich o III i IV stopniu złośliwości WHO (Graeber i wsp. 2002).

Najnowsze dane z analiz scRNAseq i CITEseq z mysich glejaków GL261 (Ochocka, Segit i wsp. 2021, Ochocka i wsp. 2023) oraz próbek od pacjentów dostarczyły informacji o zróżnicowanym fenotypie różnych populacji komórek mieloidalnych w glejakach (Ochocka i wsp. 2021). W ludzkich GBM próby określenia funkcjonalnych fenotypów komórek mieloidalnych przyniosły dość niejednoznaczne rezultaty: wskazywano zarówno na ich pronowotworowy, immunosupresyjny charakter (Mieczkowski i wsp. 2015), jak i jednoczesne występowanie populacji o fenotypie zarówno immunosupresyjnym, jak i prozapalnym (Szulzewsky i wsp. 2016). Niektóre doniesienia opisywały także infiltrację GBM przez komórki mieloidalne wykazujące cechy fenotypu M0 (Gabrusiewicz i wsp. 2016). Niemniej jednak, badacze są zgodni, że mimo silnej infiltracji guza przez komórki mieloidalne, GAMs nie są zdolne do wydajnej inicjacji odpowiedzi przeciwnowotworowej.

W niniejszej rozprawie przeprowadzono profilowanie ekspresji genów w mikrogleju (komórkach o fenotypie CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>niski</sup>) izolowanym z glejaka C6. Analiza bioinformatyczna wykazała, że komórki te charakteryzują się wzrostem poziomu ekspresji genów typowych dla fenotypu immunosupresyjnego i wspierającego nowotwór oraz spadkiem ekspresji genów odpowiedzi prozapalnej, a także zmianami ekspresji genów związanych z kluczowymi procesami komórkowymi.

Wśród genów, których ekspresja ulegała najsilniejszej indukcji w stosunku do kontroli wyróżnić można geny związane aktywacją z przeciwzapalną, takie jak *Tgm2*, *Il1rn*, *Cxcl10*, *Cxcl16*, *Ccl2*, *Ccl17*, *Ccl22*, *Vegfa*, *Stat3*, *Arg1* i *Mmp14*. Funkcjonalnie TGM2 jest enzymem związanym z wieloma biologicznymi procesami, uczestniczy między innymi w tworzeniu wiązań krzyżowych między białkami, fagocytozie komórek apoptotycznych i stabilizacji macierzy zewnątrzkomórkowej. Wzrost poziomu TGM2 obserwowano po stymulacji makrofagów interleukiną 4, co

w warunkach doświadczalnych symuluje aktywację typu M2 (Martinez i wsp. 2013, Martinez i Gordon, 2014, Keillor i wsp. 2015). Chemokina CXCL10 stymuluje migrację wielu typów komórek układu odpornościowego na drodze oddziaływania ze swoim receptorem CXCR3 (Groom i wsp. 2010). Z kolei CXCL16 jest ligandem dla receptora CXCR6 o udokumentowanym udziale w regulacji inwazyjności i procesu przerzutowania (Deng i wsp. 2010). CCL2 i CCL22 to chemokiny indukujące chemotaksję odpowiednio monocytów z krwi obwodowej poprzez oddziaływanie z receptorem CCR2 i limfocytów T regulatorowych z ekspresją receptora CCR4 (Jordan i wsp. 2008), zaś CCL17 i CCL22 stymulują migrację limfocytów T regulatorowych i Th2 poprzez oddziaływanie z receptorem CCR4 na ich powierzchni (Yoshie i wsp. 2015). Z kolei wysoki poziom metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej ułatwia komórkom glejaka migrację oraz wspiera proces angiogenezy (Giakoumettis i wsp. 2018).

W mikrogleju sortowanym z glejaków C6 zaobserwowano także istotnie obniżoną ekspresję genów związanych z aktywacją prozapalną (typu M1), takich jak *Tlr2*, *Tlr4*, *Il18*, *Il12a*, *Il15*, *CD80*, *Ccl24*, co związane jest z hamowaniem odpowiedzi przeciwnowotworowej gospodarza. Należące do rodziny receptorów Toll-podobnych białka TLR2 i TLR4 zaangażowane są w inicjację wrodzonej odpowiedzi układu odpornościowego, a ich pobudzenie prowadzi do wytworzenia cytokin prozapalnych. Interleukiny IL-12 i IL-23 to prozapalne cytokiny produkowane przez wiele typów komórek, między innymi makrofagi i komórki dendrytyczne (Teng i wsp. 2015). IL-12 jest mediatorem różnicowania limfocytów T CD4<sup>+</sup> w kierunku komórek Th1 i w badaniach przedklinicznych nad ludzkimi glejakami złośliwymi wspierała przeciwnowotworową odpowiedź układu odpornościowego skierowaną przeciw transformowanym komórkom i miała efekt antyangiogeny (Santini i wsp. 2011, Patel i wsp. 2016), z kolei IL-23 zaangażowana jest w utrzymanie wysokiego poziomu subpopulacji limfocytów Th17 (Langrish i wsp. 2004). Pochodna interleukiny IL-15 (kompleks IL-15N72D:IL-15R $\alpha$ Su-Fc), zarówno stosowana w monoterapii, jak i w połączeniu z przeciwciałem blokującym PD-1, znacząco wzmacniała odpowiedź przeciwnowotworową w mysim modelu glejaka GL261-luc, co prowadziło do remisji guza i zwiększenia przeżywalności zwierząt (Mathios i wsp. 2016). Interleukiny 12, 15 i 18 wykazują więc działanie przeciwnowotworowe, a ich ograniczona ekspresja w komórkach mikrogleju infiltrujących glejaka może być jedną z przyczyn utrzymania immunosupresyjnego fenotypu tych komórek, które – choć w niewielkim stopniu są

zdolne do zainicjowania odpowiedzi wrodzonej – nie są w stanie wydajnie uruchomić funkcji przeciwnowotworowych. Natomiast ekspresja licznych cytokin i chemokin, które wpływają na angiogenezę, modulację macierzy zewnątrzkomórkowej i chemotaksję różnych komórek układu odpornościowego, prowadzi do akumulacji między innymi komórek mieloidalnych w guzie i wytworzenia stanu lokalnej immunosupresji (Gieryng i wsp. 2017, Carroll i wsp. 2008, Mathios i wsp. 2016).

Ponadto, wśród genów o najsilniej zwiększonej ekspresji w mikrogleju naciekającym glejaki, wyróżnić można geny tworzące sygnaturę regulacji cyklu komórkowego i modulacji angiogenezy. Gen *Rrm2* koduje reduktazę rybonukleotydową M2 (RRM2), która uczestniczy w syntezie deoksyrybonukleotydów redukując difosforany nukleozydów do difosforanów deoksyrybonukleotydów. Zapewnia to wierność replikacji oraz procesów naprawy DNA (Gieryng i wsp. 2017, D'Angiolella i wsp. 2013). Wysoki poziom RRM2 towarzyszy zwiększonej replikacji DNA i koreluje z gorszymi prognozami u pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym, rakiem piersi i rakiem prostaty (Lee i wsp. 2014, Putluri i wsp. 2014). Gen *Top2a* koduje topoizomerazę II $\alpha$ . Wykazano, że w ludzkich glejakach białko TOP2A zaangażowane jest w regulację apoptozy oraz odpowiedź nowotworu na radioterapię (Ma i wsp. 2013). Z kolei *Kif2c*, *Kif11* i *KIF20a* kodują białka motoryczne zaangażowane w mitozę i mejozę, a wzrost ich ekspresji w mikrogleju związany jest ze zwiększoną aktywnością proliferacyjną oraz ruchliwością tych komórek (Wordeman i wsp. 2010, Rath i wsp. 2012). Zaobserwowano także wzrost ekspresji statminy 1 (*Stmn1*), białka które poprzez destabilizując mikrotubul reguluje stabilność cytoszkieletu komórkowego. Wykazano, że STMN1 zaangażowana jest w proliferację komórek glejaka U251 oraz wzrost guza *in vivo* (Wang i wsp. 2011). Wzmożoną ekspresję Statminy 1 obserwowano między innymi u chorych cierpiących na zespół mielodysplastyczny czy w komórkach ostrej białaczki (Machado-Neto i wsp. 2014). Z kolei białka E2F7/8 to represory transkrypcji, których rola w aktywacji mikrogleju nie jest do końca jasna. Wykazano jednak, że hamują one ekspresję genów związanych z cyklem komórkowym i punktem kontrolnym fazy S (Di Stefano i wsp. 2003, Logan i wsp. 2005, Westendorp i wsp. 2012). Co więcej E2F7/8 wraz z czynnikiem transkrypcyjnym indukowanym przez hipoksję (HIF1) stymulują aktywność promotora czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego A (VEGFA) (Weijts i wsp. 2012), co może przekładać się na udział



mikrogleju w procesie tworzenia naczyń krwionośnych w guzie (Brandenburg i wsp. 2016).

Podsumowując, wykazano silny naciek komórek mieloidalnych o charakterze immunosupresyjnym, specyficzny profil ekspresji genów w glejaku C6 i mikrogleju izolowanym z guza, co świadczy o podobieństwie TME glejaka C6 do ludzkich GBM i wskazują na podobny mechanizmy ucieczki spod nadzoru układu odpornościowego gospodarza. Cechy te czynią z glejaka C6 dobry model do badań przedklinicznych nad mezenchymalnym GBM.

## **7.2 Laktadheryna i osteopontyna jako czynniki kształtujące mikrośrodowisko glejaków**

Wcześniejsze badania prowadzone w Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN oparte o analizy proteomiczne z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej i spektrometrii mas połączone z testami funkcjonalnymi doprowadziły do zidentyfikowania osteopontyny (Spp1) i laktadheryny (Mfg-E8). Białka te są wydzielane przez komórki glejaka i zaangażowane w aktywację mikrogleju w kierunku komórek wspierających wzrost guza (Ellert-Miklaszewska, Wisniewski, Kijewska i wsp. 2016). Poziom ekspresji genów kodujących oba białka był istotnie wyższy w komórkach C6 w porównaniu do prawidłowych astrocytów. Spp1 i Mfg-E8 są białkami sygnałowymi działającymi przez receptory integrynowe. Receptory te obecne są na powierzchni komórek różnego typu, między innymi komórek układu odpornościowego.

### **7.2.1 Udział Mfg-E8 w regulacji proliferacji i przeżywalności komórek glejaka**

Liczne doniesienia wskazują na udział MFG-E8 w patogenezie nowotworów różnego typu. Efekty biologiczne wywołane przez MFG-E8 związane są z jej działaniem jako białko adhezyjne bądź jako białko sygnałowe, które poprzez oddziaływanie z receptorami określonego typu uruchamia daną ścieżkę sygnałową w komórce. W obu przypadkach MFG-E8 może wspierać przeżywalność, proliferację, modulować funkcję układu odpornościowego i angiogenezę (Durán-Jara i wsp. 2022).

W celu wyjaśnienia wpływu produkowanej przez komórki glejaka laktadheryny na wzrost guza *in vivo* wykorzystano komórki C6 ze stabilnie wyciszoną ekspresją *Mfg-E8* (shMfg-E8). Wykazano, że wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* prowadzi do

statystycznie istotnego ograniczenia wzrostu guza w stosunku do guzów kontrolnych (shNeg). Zahamowanie wzrostu glejaka może wynikać z autokrynnego działania Mfg-E8 na komórki glejaka bądź też z działania parakrynnego, czyli na sąsiadujące komórki innego rodzaju obecne w mikrośrodowisku.

MFG-E8 poprzez oddziaływanie motywu RGD z receptorami integrynowymi  $\beta 3$  aktywuje szlak sygnałowy PI3K/AKT, który reguluje wiele kluczowych procesów komórki, takich jak proliferacja, przeżywalność czy inwazyjność (Kamal i wsp. 2016). Dane literaturowe wskazują, że wpływ MFG-E8 na proliferację i przeżywalności zależy od typu komórek oraz warunków patofizjologicznych i większość doniesień wskazuje na jej istotny udział w obu tych procesach. Laktadheryna może regulować proliferację komórek w warunkach patologicznych, między innymi w czasie sepsy, podostrej fazy udaru mózgu czy w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych (Miksa i wsp. 2006, Boddaert i wsp. 2007, Choi i wsp. 2020). Wyciszenie ekspresji MFG-E8 moduluje ekspresję czynników transkrypcyjnych na drodze zależnej od szlaku mTOR, co prowadzi do zahamowania proliferacji komórek nabłonka gruczołu piersiowego oraz wzrostu poziomu białka CDK5R2 (ang. *cyclin-dependent kinase 5 activator protein*), co prowadzi do zahamowania ich proliferacji i przeżywalności przy jednoczesnym braku indukcji apoptozy (Verma i wsp. 2021). Obniżenie poziomu Mfg-E8 wpływało na aktywację białek Zp4 i Stat3/5, które regulują proliferację komórek, co niezbędne jest między innymi w czasie procesu inwolucji gruczołów mlecznych (Verma i wsp. 2021, Li i wsp. 2023). W ludzkich komórkach raka jajnika MFG-E8 wspierała proliferację poprzez regulację cyklu komórkowego na drodze aktywacji ścieżki p-Akt/cykлина D1/CDK4 oraz poprzez aktywację ścieżek sygnałowych zależnych od białek Akt/mTOR/p70 (Li i wsp. 2023). Z kolei w unieśmiertelnionych komórkach nabłonka 4T1 wyciszenie ekspresji *MFG-E8* hamowało ekspresję cyklin D1/D3 i N-kadheryny niezależnie od aktywacji receptorów integrynowych (Carrascosa i wsp. 2012). Wyciszenie ekspresji *MFG-E8* w komórkach raka okrężnicy HT-29 indukowało ich apoptozę poprzez hamowanie ekspresji Bcl-2 i indukcję ekspresji Bax, co wskazuje na istotny wpływ laktadheryny na przeżywalność tych komórek, mniejszy zaś na ich proliferację (Zhao i wsp. 2012). U myszy pozbawionych *Mfg-E8*, zarówno w spontanicznym, jak i indukowanym modelu raka okrężnicy, obserwowano zahamowanie wzrostu guzów, zaś zastosowanie siRNA skierowanego przeciwko integrynom  $\alpha v$  w badaniach *in vitro* ograniczyło proliferację komórek raka jelita grubego CT26 uprzednio stymulowanych

rekombinowaną Mfg-E8, co wskazuje, że białko to kontroluje wzrost i proliferację komórek raka jelita grubego na drodze interakcji z integrzynami  $\alpha v$  (Kusunoki i wsp. 2015). Zahamowanie ekspresji Mfg-E8 w komórkach raka jelita grubego poprzez podanie koptyzyny hamowało wzrost guza *in vivo*, zmniejszało zdolność komórek do adhezji oraz zwiększało ich zdolność do przerzutowania (Cao i wsp. 2018). Jednakże koptyzyna hamowała także ekspresję MMP-2 i MMP-9 na drodze zależnej od przekaźnictwa PI3K/AKT oraz hamowała przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT, ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition*). Z kolei w komórkach naczyńniakomęsaka wyciszenie ekspresji *MFG-E8* stymulowało migrację komórek, bez wpływu na ich proliferację (Fujiwara i wsp. 2019). Występowanie tak różnych efektów na docelowe komórki może wynikać z biologicznych różnic zastosowanych typów komórek.

W przedstawionej rozprawie przeprowadzono szereg testów funkcjonalnych *in vitro*, aby określić, czy wpływ Mfg-E8 na wzrost guza wynika z autokrynnego wpływu białka. Wykazano, że produkcja tego białka nie jest kluczowa do utrzymania podstawowej żywotności komórek glejaka, a wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* w komórkach C6 nie wpływa na ich aktywność proliferacyjną. Wyniki te pozwoliły na sformułowanie hipotezy, że obserwowana różnica w wielkości guzów wynika z ograniczenia wpływu wydzielanej przez glejaka Mfg-E8 na TME, czyli jest związana z parakrynnym działaniem tego białka na mikrośrodowisko, migrację czy inwazyjność.

### **7.2.2 Wpływ Mfg-E8 na inwazyjność glejaka.**

Zdolność komórek glejaka do migracji w parenchymie mózgu przekłada się na wysoką agresywność nowotworu i ograniczoną skuteczność chirurgicznej resekcji. Komórki C6 po implantacji do mózgowia migrują i infiltrują korę mózgową przylegając do błony podstawnej śródbłonna, co przypomina migrację komórek glejaków złośliwych u ludzi (Giakoumettis i wsp. 2018). Wyniki otrzymane w niniejszej rozprawie wskazują, że Mfg-E8 wpływa na zdolność komórek glejaka do migracji – wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* znacząco ograniczało dyfuzyjny wzrost guza oraz naciek komórek nowotworowych w zdrowej tkance. Efekty te może tłumaczyć potencjalny wpływ Mfg-E8 na proces trawienia macierzy zewnątrzkomórkowej, jak i wpływ na przejście epitelialno-mezenchymalne.

Przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT) przyczynia się do agresywności wielu nowotworów, gdyż w trakcie tego procesu komórki tracą polaryzację i kontakt z innymi komórkami, a ich cytoszkielet ulega przebudowie, co ułatwia ruch komórek i naciek na sąsiednie tkanki (Kalluri i wsp. 2009). W procesie migracji i przyjmowania inwazyjnego fenotypu kluczową rolę odgrywają też wydzielane przez komórki zależne od cynku enzymy proteolityczne, czyli metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs), takie jak kolagenazy (np. MMP-1), żelatynazy (np. MMP-2, MMP-9), stromielizyny (MMP-3, MMP-10), matrilizyny (np. MMP-7), metaloproteinazy błonowe i inne (Visse i wsp. 2003). Enzymy te mają zdolność do degradowania zarówno błony podstawnej, jak i składników. ECM, a poziom ich aktywności ściśle koreluje ze zdolnością glejaka do naciekania okolicznej tkanki. W komórkach C6 aktywność proteolityczna enzymu MT1-MMP obecnego na błonie cytoplazmatycznej prowadzi do degradacji mieliny w OUN, co umożliwia komórkom glejaka rozprzestrzenianie się w istocie białej (Giakoumettis i wsp. 2018). Inne białka zaangażowane w inwazyjność i zdolność komórek C6 do adhezji to antygen powierzchniowy CD9 obecny między innymi na powierzchni osłonki mielinowej oraz białko ICAM (ang. the *intercellular adhesion molecule*) (Dietrich i wsp. 2000, Kawashima i wsp. 2002).

Jednym ze szlaków sygnałowych, których wysoka aktywność ma kluczowe znaczenie dla migracji i inwazyjności komórek nowotworowych jest ścieżka PI3K/AKT (Faes i wsp. 2015). Uruchomienie tego szlaku zachodzi w odpowiedzi na wiele sygnałów zewnątrzkomórkowych, między innymi na drodze aktywacji receptorów integrynowych  $\alpha V\beta 3$  (Jia i wsp. 2017). Wyniki licznych badań wskazują, że MMPs i EMT mogą być indukowane uruchomieniem ścieżki sygnałowej PI3K/AKT (Zeng i wsp. 2016, Ren i wsp. 2016, Zhao i wsp. 2017). Wykazano, że MFG-E8 działając jako ligand receptorów  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha V\beta 5$  jest kluczowym aktywatorem szlaku PI3K/AKT w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, raka okrężnicy i czerniaka (Jinushi i wsp. 2008, Silvestre i wsp. 2005, Zhao i wsp. 2017). Wzmożona ekspresja MFG-E8 w komórkach raka wątrobowokomórkowego wspierała migrację i inwazyjność komórek w sposób zależny od ścieżki PI3K/Akt, zaś jej wyciszenie bądź zastosowanie przeciwciała neutralizującego hamowały te procesy. Ponadto zastosowanie syntetycznego peptydu zawierającego motyw RGD, który działa kompetytywnie z MFG-E8 jako ligand receptorów integrynowych hamowało fosforylację białka Akt (Ko i wsp. 2020). Wyciszenie ekspresji MFG-E8 w komórkach

raka jelita grubego obniżało poziom fosforylacji białka Akt i znacząco zahamowało zdolność komórek do migracji i ich inwazyjność, a dodanie rekombinowanej ludzkiej laktadheryny wywoływało odwrotny efekt. Ponadto wcześniejsze traktowanie komórek inhibitorem szlaku PI3K/AKT (LY294002) bardzo znacząco hamowało wywoływaną przez MFG-E8 ich migrację i inwazyjność. Potwierdza to udział Mfg-E8 i ścieżki sygnałowej PI3K/AKT w indukowaniu migracji, inwazyjności i EMT (Zhao i wsp. 2017). Wyciszenie ekspresji MFG-E8 w komórkach potrójnie negatywnego raka piersi znacząco hamowało inwazyjność i migrację komórek, którym towarzyszyło zahamowanie ekspresji MMP-2 i MMP-9 oraz białek związanych z EMT, takich jak N-kadheryna i wimentyna (będącej markerem mezenchymalnym). Jednocześnie obserwowano wzrost markera epitelialnego, E-kadheryny (Yang i wsp. 2019b). Zastosowanie przeciwciała blokującego Mfg-E8 wpływało na adhezję, migrację i przeżywalność komórek raka piersi i jajnika (Tibaldi i wsp. 2013). Wyciszenie ekspresji *MFG-E8* w komórkach raka piersi hamowało wzrost guza i jego agresywność między innymi poprzez hamowanie N-kadheryn (Carrascosa i wsp. 2012), zaś w liniach komórkowych raka piersi poziom laktadheryny korelował z ekspresją markerów EMT i wpływał na modulację migracji i inwazyjności (Xu i wsp. 2018). W unieśmiertelnionych komórkach nabłonka gruczołu piersiowego ekspresja MFG-E8 indukowała ekspresję cyklin D1/D3 i N-kadheryny, co świadczy o wpływie tego białka na EMT oraz proliferację. Wprowadzenie mutacji w MFG-E8, która uniemożliwia białku wiązanie się do receptorów integrynowych znosiło ten efekt tylko częściowo, co wskazuje, że funkcja MFG-E8 zależy tylko w pewnym stopniu od aktywacji integryn (Carrascosa i wsp. 2012). Warto także nadmienić, że Mfg-E8 indukuje EMT także poprzez aktywację ścieżki Akt/Twist i szlaku GSK3 $\beta$ / $\beta$ -katenina (Bai i wsp. 2021).

### **7.2.3 Mfg-E8 jako immunomodulator mikrośrodowiska guza**

Mfg-E8 może oddziaływać z receptorami  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$  obecnymi na powierzchni komórek różnego typu (w tym komórek układu odpornościowego) i aktywować ścieżki sygnałowe zależne od białek Akt i Twist, które mogą wywoływać stan immunosupresji. Dlatego też w niniejszej rozprawie zweryfikowano hipotezę o udziale Mfg-E8 w kształtowaniu odpowiedzi układu odpornościowego w glejakach. Wykazano, że wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* w komórkach glejaka C6 nie wpływa na stopień infiltracji guzów przez GAMs (komórki Iba-1<sup>+</sup>), ale prowadzi do istotnego

spadku liczby komórek GAMs o fenotypie Arg-1<sup>+</sup> i CD163<sup>+</sup> w porównaniu do guzów kontrolnych.

Liczne dane doświadczalne wskazują na istotną rolę laktadheryny jako białka hamującego odpowiedź układu odpornościowego. Immunomodulacyjne właściwości MFG-E8 obserwowano między innymi w czerniaku (Zhao i wsp. 2014), nowotworach jamy ustnej (Okamoto i wsp. 2019), raku przełyku (Kanemura i wsp. 2018) czy gruczolakomięśaku (AS, ang. *Adenosarcoma*) (Fujiwara i wsp. 2021). W mysim modelu czerniaka po wyciszeniu ekspresji *Mfg-E8* obserwowano zahamowanie wzrostu guza, któremu towarzyszył spadek liczby infiltrujących limfocytów Treg i unaczynienia guza (Zhao i wsp. 2014). Wyniki badań mysiego czerniaka potwierdzają wspierający udział Mfg-E8 w tworzeniu immunosupresyjnego środowiska oraz wskazują na komórki macierzyste nowotworu jako główne źródło Mfg-E8 w guzie i populację zwiększającą napływ makrofagów i polaryzację TAMs w kierunku komórek immunosupresyjnych (M2) (Yamada i wsp. 2016). Z kolei Jinushi i wsp. (2007) wykazali, że do ekspresji Mfg-E8 w komórkach prezentujących antygen w mikrośrodowisku i wykształcenia tolerancji immunologicznej, także na drodze zależnej od limfocytów Treg, niezbędny jest czynnik GM-CSF. W efekcie zwiększenia wydzielania Mfg-E8 zwiększona była fagocytoza komórek apoptotycznych, czemu towarzyszyła produkcja czynnika TGF- $\beta$  i cytokiny CCL22 wspierających utrzymanie immunosupresyjnych Treg. W guzach powstałych z implantowanych komórek czerniaka transfekowanych Mfg-E8 obserwowano napływ immunosupresyjnych TAMs i limfocytów Treg oraz zahamowanie cytotoksycznej aktywności komórek NK, limfocytów Tc (CD8<sup>+</sup>) i limfocytów Th1 (Jinushi i wsp. 2008). Wykazano, że w raku prostaty MFG-E8 indukuje TAMs w sposób zależny od aktywacji ścieżki SOCS3/STAT3 (Soki i wsp. 2014), wspierając akumulację TAMs o fenotypie M2 i Treg oraz hamując napływ limfocytów Tc (CD8<sup>+</sup>). Zastosowanie przeciwciała skierowanego przeciw MFG-E8 istotnie zahamowało wzrost guza i liczbę makrofagów naciekających gruczolakomięśaka. Co więcej, podanie przeciwciała neutralizującego skierowanego przeciw Mfg-E8 prowadziło do ograniczenia wzrostu guza oraz spadku liczby infiltrujących TAMs (Fujiwara i wsp. 2021). W raku pęcherza Mfg-E8 wspierała rozwój guza poprzez indukcję tolerancji immunologicznej z udziałem makrofagów i zwiększony napływ Treg (Sugano i wsp. 2011). W raku kolczystokomórkowym przełyku nie zaobserwowano związku pomiędzy poziomem MFG-E8, ocenianym metodą immunohistochemiczną w próbkach operacyjnych,

a całkowitą liczbą infiltrujących TAMs oraz liczbą komórek CD163<sup>+</sup> (Kenamura i wsp. 2018).

Dane dotyczące immunomodulacyjnych właściwości Mfg-E8 w glejakiach są nieliczne. Wu i wsp (2020) wykazali, że wyciszenie ekspresji *Mfg-E8* w komórkach mysiego glejaka GL261 hamuje napływ i polaryzację mikrogleju w kierunku immunosupresyjnego fenotypu, a także proliferację komórek glejaka i wzrost guza *in vivo*, co związane jest z ograniczeniem aktywności ścieżek sygnałowych integryna  $\beta$ 3/Stat3/cykлина D1 i Fak/Akt/Erk. Wzmocniona ekspresja *Mfg-E8* bądź dodanie rekombinowanego białka prowadziło do wzrostu liczby GAMs z ekspresją markerów fenotypu M2, co spowodowane jest aktywacją receptorów  $\beta$ 3 i ścieżek sygnałowych związanych ze Stat3. Zastosowanie inhibitora Stat3 (Stattic) bądź wyciszenie ekspresji Itgb3 (receptora  $\beta$ 3) odwracało efekt wywołany przez Mfg-E8 na ekspresję markerów M2 w mikrogleju, co wskazuje na kluczową rolę ścieżki STAT3 w indukowanej przez MFG-E8 polaryzacji komórek mieloidalnych i współtworzenia immunosupresyjnego mikrośrodowiska guza (Wu i wsp. 2020). Badania przeprowadzone w Pracowni Neurobiologii Molekularnej przez dr Ellert-Miklaszewską wskazują także, że Mfg-E8 ma istotny wpływ na regulację w komórkach glejaka i komórkach mikrogleju ścieżek sygnałowych zależnych od TGF $\beta$  i fosforylację białek z rodziny SMAD, które pełnią istotną rolę w modulacji odpowiedzi układu odpornościowego (nieopublikowane).

W niniejszej rozprawie zweryfikowano hipotezę o wpływie Mfg-E8 na nacieki komórek limfoidalnych w glejaku C6. Nie zaobserwowano różnic w poziomie infiltracji limfocytów Tc w glejakiach kontrolnych i z wyciszoną ekspresją *Mfg-E8*. Zaobserwowano natomiast wyraźną tendencję wzrostu liczby komórek CD3<sup>+</sup> w guzach z wyciszoną ekspresją *Mfg-E8* (p=0,053).

Liczne doniesienia wskazują na rolę Mfg-E8 w kształtowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej z udziałem różnych subpopulacji limfocytów T. Wykazano, że zastosowanie przeciwciała blokującego Mfg-E8 w połączeniu z lekami indukującymi apoptozę w modelach raka okrężnicy, czerniaka i chłoniaka u myszy miało działanie przeciwnowotworowe i prowadziło do wydajnej prezentacji antygeny przez komórki dendrytyczne, aktywacji limfocytów Tc (CD8<sup>+</sup>) i supresji limfocytów Treg (Jinushi i wsp. 2009). Należy przy tym zaznaczyć, że nie całkowita liczba komórek CD8<sup>+</sup> i FoxP3<sup>+</sup>, ale niższy stosunek limfocytów Tc do Treg, jest lepszym wskaźnikiem stopnia immunosupresji w guzie (Kenamura i wsp. 2018), a badania przeprowadzone

przez Jinushiego i wsp. (2009) wskazują na kluczowy wpływ ekspresji Mfg-E8 na równowagę pomiędzy populacją limfocytów T CD8<sup>+</sup> i Treg. Kenemura i współautorzy (2018) zaobserwowali, że u pacjentów z rakiem przełyku poddanych terapii neoadjuwantowej wysoki poziom ekspresji MFG-E8 korelował z niższym stosunkiem Tc/Treg i gorszą przeżywalnością tych pacjentów. MFG-E8 działa jako mediator fagocytozy komórek apoptotycznych i hamuje odpowiedź układu odpornościowego, więc efekty immunomodulacyjne są wyraźniejsze gdy po podaniu chemioterapii indukowana jest intensywna apoptoza. Zbadanie nacieku Treg do TME w glejakach pozbawionych MFG-E8 pozwoliłoby poznać jej rolę w modulacji mikrośrodowiska nowotworu. Niestety przez ograniczenia techniczne nie udało się przeprowadzić takiej analizy w ramach niniejszej rozprawy ani określić, czy w guzach z wyciszoną ekspresją *Mfg-E8* stosunek populacji Tc/Treg uległ zmianie, ale ten kierunek badań wydaje się być obiecujący,

#### **7.2.4 Udział Mfg-E8 w regulacji angiogenezy w glejakach**

W progresji glejaka istotną rolę odgrywa stopień jego unaczynienia. Wraz ze wzrostem guza zwiększa się zapotrzebowanie na tlen i składniki odżywcze, a brak tlenu w centrum powiększającego się guza jest czynnikiem stymulującym angiogenezę. Badania Silvestre i wsp. (2005) wykazały, że produkowana przez komórki naczyń krwionośnych Mfg-E8 jest kluczowym białkiem zaangażowanym we wzrost naczyń krwionośnych w sposób zależny od oddziaływania z receptorami  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha V\beta 5$  i czynnika VEGF. Komórki glejaka C6 są istotnym źródłem VEGF (Li i wsp. 2014, Yang i wsp. 2011), co potencjalnie umożliwiłoby Mfg-E8 silne proangiogenne działanie w glejaku C6. W niniejszej rozprawie zweryfikowano hipotezę o udziale Mfg-E8 w tym procesie. Wykorzystując przeciwciało rozpoznające czynnik von Willebranda wybarwiono i policzono naczynia o przekroju  $\geq 20 \mu m$  i  $< 20 \mu m$  w guzach shNeg i shMfg-E8. Wykazano, że wyciszenie ekspresji laktadheryny nie wpłynęło istotnie na liczbę oraz wielkość naczyń w guzie.

Udział laktadheryny w angiogenezie zależnej od czynnika VEGF jest dobrze udokumentowany. Wiązanie Mfg-E8 do receptorów  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha V\beta 5$  na komórkach śródbłonna naczyń prowadzi do fosforylacji białka Akt i uruchomienia ścieżek sygnałowych wspierających proliferację. Jednocześnie VEGF wpływa także na wzrost ekspresji  $\alpha V\beta 3$  i  $\alpha V\beta 5$  na komórkach naczyń, nasilając w ten sposób efekt działania VEGF na proces angiogenezy (Neutzner i wsp. 2007). Badania



z wykorzystaniem przeciwciała neutralizującego skierowanego przeciwko receptorowi czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGFR2) wykazały, że nie zaburza ono zależnej od laktadheryny fosforylacji białka Akt, co sugeruje, że w przypadku braku VEGF wiązanie MFG-E8 do receptorów  $\alpha\beta 3$  lub  $\alpha\beta 5$  jest wystarczające do indukcji fosforylacji AKT i w konsekwencji neoangiogenezy (Silvestre i wsp. 2005). Zarówno w próbkach ludzkich guzów, jak i w mysim modelu czerniaka zwiększoną ekspresję laktadheryny obserwowano w bliskiej okolicy naczyń krwionośnych, co może sugerować udział MFG-E8 w waskularyzacji guzów (Yamada i wsp. 2016). Z kolei deplecja Mfg-E8 w gruczolakomięśaku zahamowała tworzenie struktur naczyńopodobnych (Fujiwara i wsp. 2018). W raku wątrobowokomórkowym wzmożona ekspresja *MFG-E8* prowadziła do znaczącego wzrostu liczby komórek śródbłonna ( $CD31^+$ ) w porównaniu do kontroli, co wskazuje na udział tego białka w formowaniu nowych naczyń krwionośnych (Ko i wsp. 2020).

Niektóre doniesienia wskazują na brak udziału Mfg-E8 w tworzeniu nowych naczyń w guzach, np. w raku pęcherza (Sugano i wsp. 2011. Zhao i wsp. 2017). W niniejszej rozprawie nie stwierdzono różnic w tworzeniu nowych naczyń w guzach shMfg-E8 i może być to spowodowane obecnością innych niż VEGF proangiogennych czynników, które mogą promować tworzenie się naczyń krwionośnych nawet w przypadku nieobecności MFG-E8 w mikrośrodowisku. Udział laktadheryny we wspieraniu wzrostu guza może zależeć od typu nowotworu. Warto również podkreślić, że działanie proangiogenne MFG-E8 nie jest wyłącznie działaniem bezpośrednim na receptory obecne na komórkach śródbłonna, ale i pośrednim, czyli poprzez modulację funkcji TAMs. Komórki o fenotypie immunosupresyjnym aktywnie wspierają tworzenie naczyń w guzie, między innymi poprzez wydzielanie proangiogennych cytokin, takich jak VEGF, TGF- $\beta$ , IL-8 i FGF-2, a także enzymów degradujących ECM: MMP-2, MMP-7, MMP-9 i MMP-12.

### **7.3 Rola wydzielanej przez glejaka osteopontyny/Spp1 we wzroście i modulacji mikrośrodowiska guza**

#### **7.3.1 Wpływ Spp1 na wzrost guza i inwazyjność**

Wyniki badań opisanych w niniejszej rozprawie jednoznacznie wskazują, że wyciszenie ekspresji Spp1 w komórkach glejaka hamuje wzrost glejaka. Aby określić, czy ograniczenie wzrostu guzów shSpp1 wynika z autokrynnego czy parakrynnego działania Spp1, wykonano szereg testów funkcjonalnych, które wykazały, że

produkcja *Spp1* nie jest kluczowa do podtrzymania żywotności i proliferacji komórek C6.

Uzyskane wyniki wskazują, że ekspresja *Spp1* w komórkach glejaka C6 nie promuje wzrostu guza w sposób autokryny, ale poprzez wzajemne oddziaływania z mikrośrodowiskiem guza. Co ciekawe guzy *shSpp1* ulegały zmniejszeniu między 14 a 21 dniem po implantacji, co świadczy o aktywnym usuwaniu komórek nowotworowych i wskazuje na inicjację wydajnej odpowiedzi przeciwnowotworowej gospodarza.

Wpływ *Spp1* na proliferację i wzrost komórek nowotworowych zależy od rodzaju nowotworu. Wykazano, że *SPP1* indukuje podziały komórek ludzkiego raka płuc, wątroby, gruczolaka jelita grubego i jajnika, a także wspiera ich migrację (Zeng i wsp. 2022, Wu i wsp. 2021). Podobną tendencję obserwowano także w raku żołądka (Gong i wsp. 2008), raku wątrobokomórkowym (Wu i wsp. 2022), drobnokomórkowym raku płuc (Liu i wsp. 2019, Kariya i wsp. 2022) i raku jelita grubego (Huang i wsp. 2017), gdzie wzrost proliferacji wynikał z zahamowania autofagii i apoptozy komórek nowotworowych. W komórkach raka piersi (Reufsteck i wsp. 2012) i raka podstawnokomórkowego przełyku (Ito i wsp. 2006) wyciszenie ekspresji *SPP1* nie miało wpływu na proliferację, a w komórkach raka macicy na ich żywotność (Du i wsp. 2009).

W komórkach glejaka U87MG i U251 wyciszenie ekspresji *SPP1* prowadziło do spadku ich podstawowej proliferacji (Lamour i wsp. 2010) i żywotności (Jan i wsp. 2010). W niniejszej rozprawie stwierdzono brak wpływu wyciszenia ekspresji *Spp1* na podstawową żywotność i proliferację komórek glejaka C6, zatem zahamowanie wzrostu guza po wyciszeniu *Spp1* nie wynikało z różnic w proliferacji komórek *shSpp1* i *shNeg*, a z braku wzajemnego oddziaływania glejaka i komórek mieloidalnych.

*SPP1* wspiera wydzielanie i aktywację MMPs oraz sekrecję aktywatora urokinazy plazminogenu (uPA) w komórkach nowotworowych (co prowadzi do degradacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej) zwiększając inwazyjność komórek (Kariya i wsp. 2022, Napoli i wsp. 2020, Chen i wsp. 2011). Wysoki poziom *SPP1* u pacjentów z rakiem nerki (Pitarresi i wsp. 2021), czerniakiem (Napoli i wsp. 2020, Kiss i wsp. 2021) i rakiem wątrobokomórkowym (Wu i wsp. 2022) zwiększał migrację komórek nowotworowych. W komórkach raka szyjki macicy *SPP1* indukowała ekspresję furyny – białka aktywującego MMP-2 i MMP-9 oraz zwiększała zdolność

komórek do migracji (Kumar i wsp. 2010). W komórkach raka prostaty wyciszenie ekspresji SPP1 prowadziło do zahamowania ekspresji MMP-2 oraz MMP-9, co ograniczało migrację i inwazyjność komórek (Liu i wsp. 2010).

Liczne dane literaturowe potwierdzają rolę SPP1 w modulacji inwazyjności glejaka. Wyciszenie ekspresji *SPP1* w komórkach ludzkiego glejaka U87 prowadziło do zahamowania wzrostu guza *in vivo* oraz hamowało migrację i ruchliwość komórek *in vitro* (Lamour i wsp. 2010, Friedmann-Morvinski i wsp. 2016; Jan i wsp. 2010). Wyciszenie ekspresji *SPP1* w komórkach ludzkiego glejaka U87 prowadziło do spadku poziomu MMP2 i inwazyjności komórek *in vitro* i tworzenia mniejszych guzów *in vivo* (Jan i wsp. 2010). Wzmożona ekspresja *SPP1* w komórkach glejaka o niskiej inwazyjności zwiększała poziom MMP2, co prowadziło do wzrostu inwazyjności *in vitro* poprzez ścieżkę sygnałową PI-3K/AKT/NF- $\kappa$ B aktywowaną za pośrednictwem receptora  $\alpha\beta$ 3. Zablokowanie aktywacji tej ścieżki spowodowało spadek fosforylacji Akt, zahamowanie translokacji NF- $\kappa$ B, co prowadziło do obniżenia ekspresji i aktywności MMP2 i MMP9 (Yan i wsp. 2010). Yamaguchi i współautorzy (2013) wykazali, że poziom SPP1, która uległa proteolitycznemu cięciu przez trombinę, jest istotnie podwyższony u pacjentów z GBM i może być czynnikiem odpowiedzialnym za inwazyjność guza.

W niniejszej nie stwierdzono jednak różnic w naciekaniu parenchymy mózgu przez komórki glejaka w guzach kontrolnych (shNeg) i w guzach tworzonych przez komórki z wyciszoną ekspresją *Spp1* (sh*Spp1*). Oznacza to, że choć w wielu układach badawczych udokumentowano rolę *Spp1* w indukcji inwazyjności komórek nowotworowych, to w glejaku C6 nie jest ona kluczowym białkiem zaangażowanym w ten proces, a pronowotworowe działanie *Spp1* opiera się na innym mechanizmie.

### **7.3.2 Rola *Spp1* w kształtowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej**

Badania przeprowadzone przez dr Magdalenę Kijewską z Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN wskazywały, że wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka nie wpływa na akumulację GAMs w guzie, ale komórki Iba-1<sup>+</sup> infiltrujące glejaki z obniżoną ekspresją *Spp1* miały odmienną, bardziej rozgałęzioną morfologię niż komórki w guzach kontrolnych (shNeg) (Ellert, Wiśniewski, Kijewska i wsp. 2016). Wyniki te sugerowały zmiany w fenotypie komórek mieloidalnych naciekających glejaki pozbawione *Spp1*.

W niniejszej rozprawie przeprowadzono szereg testów mających na celu szczegółowe określenie roli *Spp1* w modulacji funkcji komórek układu odpornościowego i kształtowaniu odpowiedzi przeciwnowotworowej w glejaku, ze szczególnym uwzględnieniem GAMs. Ponieważ nie były dostępne możliwości badania transkryptomów pojedynczych komórek, skupiono się na analizie immunocytochemicznej z wykorzystaniem markerów fenotypu przeciw- i prozapalnego. Wykazano, że wyciszenie ekspresji *Spp1* w komórkach glejaka prowadzi do istotnego zahamowania liczby komórek mieloidalnych w ekspresją *Arg-1*, *CD163* oraz *iNos*. Zaobserwowano także wyraźny trend spadku aktywności Arginazy-1 w ekstraktach białkowych z pólkul z guzem ( $p=0,06$ ) po wyciszeniu *Spp1*. Brak istotności statystycznej może być konsekwencją badania aktywności enzymu w całej półkuli z guzem.

Zarówno *CD163*, jak i *Arg-1* są uznanymi markerami immunosupresyjnej aktywacji komórek mieloidalnych, a wspierające nowotwór działanie tych komórek, między innymi na drodze hamowania odpowiedzi układu odpornościowego, zwiększania migracji i inwazyjności komórek nowotworowych oraz angiogenezy w guzie jest dobrze udokumentowane w różnych nowotworach (Vidyarthi i wsp. 2019, Mai i wsp. 2021). Wykazano, że *CD163<sup>+</sup>* GAMs wydzielają duże ilości plejotropiny (PTN), która oddziałuje z receptorem PTPRZ1 na powierzchni GSCs, co wspiera wzrost guza (Ma i wsp. 2021). Prośniak i wsp. (2013) pokazali, że poziom ekspresji *CD163* koreluje ze stopniem złośliwości glejaków, a Annovazzi i wsp. (2017), że stopień infiltracji przez komórki *CD163<sup>+</sup>* jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym u pacjentów z GBM, podczas gdy wyraźny był trend lepszych rokowań w przypadku pacjentów z niższym poziomem *ARG-1* (Lisi i wsp. 2017). Podwyższoną ekspresję *Arg-1* wykrywano w populacji *CD11b<sup>+</sup>* wyizolowanej z mysich glejaków GL261 (Gabusiewicz i wsp. 2011). Ekspresja *iNos* w komórkach *Iba1<sup>+</sup>* może wskazywać na prozapalną aktywację tych komórek. Choć wiele doniesień wskazuje na przeciwnowotworowe działanie komórek mieloidalnych aktywowanych prozapalnie, to towarzyszący nowotworom stan zapalny może także wpływać na rozwój i progresję choroby (Pan i wsp. 2020). Wydzielane wówczas cytokiny i czynniki wzrostu wspierają proliferację komórek; ponadto obecność w mikrośrodkowisku tlenku azotu sprzyja powstawaniu wtórnych uszkodzeń DNA (Boutillier i wsp. 2021). Istnieją także doniesienia wskazujące, że aktywowany prozapalnie mikroglej wspiera progresję glejaków złośliwych (Hailong i wsp. 2021).

Wydaje się zatem, że oba rodzaje aktywacji GAMs mogą być niekorzystnym czynnikiem w rozwoju GBM, jeśli aktywacja ta nie podlega ścisłej kontroli. Wyniki badań z wykorzystaniem transkryptomiki pojedynczych komórek wyjaśniają to zjawisko. Wśród komórek CD11b<sup>+</sup> w glejakach GL261 wykrywano aktywowane prozapalnie, świeżo naciekające monocyty, z sygnaturą interferonową, które dopiero w guzie traciły fenotyp prozapalny i przekształcały się dojrzałe immunosupresyjne makrofagi. Wykrywano także pochodzące z monocytów komórki dendrytyczne, które pozostawały niedojrzałe i niefunkcjonalne (Ochocka i wsp. 2023).

W niniejszej rozprawie wykazano, że wyciszenie ekspresji *Spp1* prowadzi do ogólnego zahamowania aktywacji komórek mieloidalnych – zarówno ścieżki prozapalnej, jak i związanej z immunosupresją. Spadek ekspresji markerów stanu M1 i M2 może wskazywać na przynajmniej częściowy powrót GAMs do stanu przypominającego nadzorujące komórki mieloidalne. Jest to również spójne z obserwacją dr M. Kijewskiej, która zauważyła zmianę morfologii komórek Iba-1<sup>+</sup> z ameboidalnej (świadczącej o silnej aktywacji) na bardziej rozgałęzioną (przypominającą mikroglej nadzorujący). Uzyskane wyniki wskazują, że możliwe jest ukierunkowane „wyłączenie” aktywności GAMs w guzie i *Spp1* wydaje się być obiecującym celem terapeutycznym. Warto nadmienić, że choć w guzach sh*Spp1* zaobserwowano różnice w produkcji wielu kanonicznych markerów charakterystycznych dla aktywowanych GAMs, to poziom białka Trem2, które uważane jest za marker komórek aktywowanych przeciwzapalnie, pozostawał bez zmian. Brak różnic w liczbie komórek Iba1<sup>+</sup>Trem2<sup>+</sup> po wyciszeniu *Spp1* świadczy o heterogenności komórek mieloidalnych naciekających glejaki i może wskazywać na silniejszy wpływ wyciszenia *Spp1* na wybrane populacje GAMs, przypuszczalnie na monocyty napływające z obwodu, niż na rezydujący mikroglej.

Co ciekawe, odnotowano wzrost liczby komórek produkujących prozapalną cytokinę IL-1 $\beta$  w guzach sh*Spp1*. Wpływ IL-1 $\beta$  na rozwój glejaka może być dwojaki – zahamowanie jej produkcji metodami inżynierii genetycznej prowadziło do ograniczenia napływu limfocytów do guza oraz zahamowania aktywacji ścieżek sygnałowych zależnych od interferonu, czego skutkiem była ucieczka guza spod nadzoru układu odpornościowego. Z kolei farmakologiczne hamowanie tej cytokiny zmniejszało napływ komórek mieloidalnych do guza i zwiększało przeżywalność myszy (Chen i wsp. 2022). Wykazano także jej wpływ na szczelność bariery krew-mózg (poprzez wpływ na ekspresję genów odpowiadających za plastyczność

naczyń), co prowadzi do zwiększenia nacieku limfoidalnego i mieloidalnego z obwodu do guza (Al-Kharboosh i wsp. 2020). Należy jednak pamiętać, że IL-1 $\beta$  może być produkowana nie tylko przez GAMs, ale też inne komórki układu odpornościowego naciekające guza, takie jak komórki dendrytyczne, limfocyty B, neutrofile, komórki NK, a nawet komórki glejaka. Identyfikacja populacji komórek odpowiadających za obserwowany wzrost produkcji IL-1 $\beta$  wymagałaby dalszych badań.

Choć nie wykazano wpływu wyciszenia *Spp1* na akumulację komórek Iba1<sup>+</sup> w guzie, to we krwi obwodowej szczurów z glejakiem shSpp1 obserwowano blisko dwukrotny wzrost odsetka komórek CD11b<sup>+</sup> w stosunku do krwi zwierząt z glejakiem shNeg (p=0,057). Choć może to świadczyć o mobilizacji układu odpornościowego gospodarza i inicjacji odpowiedzi przeciwnowotworowej, nie określono typu aktywacji tych komórek. Guo i wsp. (2020) wykazali, że liczba prozapalnie aktywowanych monocytów w krwi obwodowej pacjentów z GBM była mniejsza w porównaniu do zdrowych kontroli, co świadczyło o gorszych właściwościach przeciwnowotworowych komórek krążących w krwi. Z kolei liczba monocytów z ekspresją markerów charakterystycznych dla fenotypu M2 była większa u pacjentów z glejakami, co wskazuje, że więcej komórek o właściwościach immunosupresyjnych mogło być rekrutowanych do guza i wspierać tam jego progresję.

### **7.3.2.1 Heterogenność komórek mieloidalnych naciekających glejaki**

Początkowo uważano, że naciek mieloidalny towarzyszący glejakom złośliwym wynika z obecności immunosupresyjnych komórek mieloidalnych (o fenotypie M2). Późniejsza analiza transkryptomów komórek CD11b<sup>+</sup> izolowanych z ludzkich GBM i szczurzego glejaka C6 wykazała ekspresję genów charakterystycznych zarówno fenotypu pronowotworowego, jak i przeciwnowotworowego (Szulzewsky i wsp. 2015, Szulzewsky i wsp. 2016, Gieryng i wsp. 2017, Lisi i wsp. 2017). W naszych badaniach sortując komórki CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup> koncentrowaliśmy się na mikrogleju i uzyskane wyniki wskazywały bardziej jednoznacznie na fenotyp immunosupresyjny i proliferację komórek. Opisana w niniejszej rozprawie obecność GAMs z ekspresją zarówno markerów pro-, jak i przeciwzapalnych jest zatem spójna z opublikowanymi później wynikami innych badaczy.

Wyniki ostatnich badań w modelach zwierzęcych glejaków z wykorzystaniem multiomiki pojedynczych komórek i z myszy transgenicznych, które umożliwiają prześledzenie rozwoju linii komórek wskazują, że GAMs stanowią heterogenną populację, która w zależności od pochodzenia nie tylko zasiedla inne obszary guza, ale także charakteryzuje się ekspresją różnych markerów, a różne grupy komórek pełnią inną rolę w progresji nowotworu (Bowman i wsp. 2016, Müller i wsp. 2017, Darmanis i wsp. 2017, Venteicher i wsp. 2017). Obserwuje się także heterogenność na poziomie pojedynczych komórek, w których może zachodzić koekspresja markerów charakterystycznych dla fenotypu M1 i M2, a także wysoka plastyczność umożliwiająca molekularne „przełączanie” między fenotypami (Orecchioni i wsp. 2019). Wysoki stopień heterogenności komórek mieloidalnych w glejakach potwierdzają także najnowsze wyniki wykorzystujące scRNA-seq i CITE-seq (Xiao i wsp. 2022). W zależności m.in. od stadium nowotworu czy umiejscowienia komórek w guzie wykryto inny stosunek mikrogleju do napływających z obwodu monocytów i makrofagów, jak również różny wzór ekspresji markerów odpowiedzi prozapalnej i hamującej aktywność układu odpornościowego. Wykazano między innymi, że dominującą populacją GAMs we początkowych stadiach rozwoju guzów stanowi rezydujący mikroglej, jednak z czasem większość GAMs stanowią komórki mieloidalne napływające z obwodu, które lokalizują się głównie w centrum guza, zwłaszcza obszarach charakteryzujących się wysokim poziomem hipoksji. Jest to zjawisko w szczególności obserwowane po wznowie, skorelowane z wysokim poziomem agresywności guza (Pombo Antunes i wsp. 2021, Ma i wsp. 2021). Badania przeprowadzone przez Chena i współautorów (2017) również potwierdziły, że mikroglej jako pierwszy napływa do guza i jest zlokalizowany głównie na obrzeżu glejaka, podczas gdy pochodzące ze szpiku kostnego makrofagi/monocyty są rekrutowane do guza nieco później i znajdują się głównie w przestrzeni okołonaczyniowej i centrum guza.

Choć poziom infiltracji glejaków o niższym i wyższym stopniu złośliwości przez mikroglej nie różni się znacząco, to liczba naciekających makrofagów jest istotnie wyższa w GBM w porównaniu do guzów łagodnych. Badania Brandenburga i współautorów (2017) wykazały, że wpływ mikrośrodowiska na polaryzację mikrogleju ( $CD11b^+CD45^{\text{niski}}$ ) jest dużo mniejszy niż na populację makrofagów ( $CD11b^+CD45^{\text{wysoki}}$ ). Autorzy postulowali, że makrofagi w TME stanowią bardziej heterogenną populację, wśród której występują zarówno komórki aktywowane

prozapalnie, jak i dużo liczniejsze komórki o fenotypie pronowotworowym, które odpowiadają za wywołanie stanu lokalnej i globalnej immunosupresji w glejakach złośliwych (Brandenburg i wsp. 2017, Vidyarthi i wsp. 2019). Również wyniki Ma i wsp. (2021) wskazują, że typ aktywacji GAMs jest ściśle powiązany z regionem ich występowania w guzie. W centrum guza wśród komórek mieloidalnych zaobserwowali się zarówno populację o fenotypie prozapalnym, jak i komórek charakteryzujących wysoką aktywnością szlaku sygnałowego PD-1/PD-1L, który odpowiada za osłabienie odpowiedzi układu odpornościowego i promowanie tolerancji immunologicznej. Z kolei GAMs występujące na obrzeżu guza wykazywały głównie właściwości immunosupresyjne z wysoką aktywnością ścieżki zależnej od NF-κB (Ma i wsp. 2021).

Przedstawiona w niniejszej rozprawie analiza występowania komórek z ekspresją dwóch białek uznawanych za markery immunosupresji (Arg-1 i Trem-2) wykazała, że w guzach kontrolnych komórki Trem2<sup>+</sup> lokalizowały się głównie na jego obrzeżu, z kolei liczba komórek z ekspresją Arg-1 na obrzeżu była niższa niż w centrum guza. Wykazano także, że oba markery nie ko-lokalizują, co świadczy o tym, że ulegają ekspresji w odrębnych populacjach komórek, potencjalnie o innym pochodzeniu. Wskazują na to również najnowsze badania z wykorzystaniem techniki scRNAseq przeprowadzone w Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN, które wykazały, że mikroglej (Tmem119<sup>+</sup>) znajdujący jest głównie na obrzeżu guza, podczas gdy pochodzące ze szpiku monocyty/makrofagi lokalizują się głównie w centrum guza (Ochocka, Segit i wsp. 2021), co może odpowiadać zidentyfikowanym tu populacjom Arg-1<sup>+</sup> i Trem2<sup>+</sup>.

### **7.3.2.2    Udział Spp1 w regulacji nacieku wybranych populacji limfocytów w glejaku**

Zaobserwowana w glejakach shSpp1 modulacja aktywacji komórek mieloidalnych, jak również zwiększony napływ komórek IL-1β<sup>+</sup> wskazują, że doszło do zmian w mikrośrodowisku. Liczne doniesienia wskazują, że większość GAMs w TME wydziela niewielkie ilości czynników kostymulujących oraz dużo cytokin przeciwzapalnych, co osłabia odpowiedź limfocytów T w GBM oraz indukuje napływ limfocytów Treg (Zhao i wsp. 2016, Pan i wsp. 2020, Lin i wsp. 2023). Indukcja immunosupresyjnego fenotypu GAMs hamuje migrację limfocytów T efektorowych, ich proliferację i wydają odpowiedź przeciwnowotworową (Dumas i wsp. 2020).



GAMs mogą także bezpośrednio hamować proliferację limfocytów Tc (CD8<sup>+</sup>) poprzez wpływ na metabolizm L-argininy (przez arginazę-1 i iNOS) oraz produkcję reaktywnych form tlenu i azotu (Pan i wsp. 2020). Limfocyty Treg mogą z kolei hamować wydzielanie IFN- $\gamma$  przez limfocyty Tc, a co za tym idzie ograniczać hamujące działanie tej cytokiny na GAMs i wpływać na utrzymanie populacji immunosupresyjnie aktywowanych komórek mieloidalnych w guzie (Pan i wsp. 2020). Z kolei IL-1 $\beta$  może – samodzielnie lub z innymi cytokinami – działać bezpośrednio na komórki CD4<sup>+</sup> oraz CD8<sup>+</sup>, co wpływa na różnicowanie limfocytów T. W badaniach na myszach *Spp1*<sup>-/-</sup> zaobserwowano zwiększoną przeciwnowotworową aktywność komórek CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> w krwi, guzie i śledzionie. Efekt ten może być wywołany bezpośrednio przez GAMs (poprzez wpływ na proliferację i właściwości efektorowe limfocytów) lub pośrednio, poprzez modulację funkcji limfocytów Treg (Wei i wsp. 2019).

W niniejszej rozprawie nie stwierdzono jednak wpływu zahamowania produkcji *Spp1* w glejaku na modulowanie nacieku limfoidalnego – wyciszenie *Spp1* nie wpłynęło istotnie na akumulację komórek CD3<sup>+</sup> (limfocyty T) i CD8<sup>+</sup> (głównie limfocyty Tc, ale także DC i NK) w guzie. Mogło to być spowodowane tym, że komórki z shRNA (także kontrolne shNeg) mają podwyższoną ekspresję interferonów. Uzyskane w Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN wyniki pokazały wzrost czynników aktywacji limfocytów T i produkcji przez nie interferonu  $\gamma$  w sortowanych z guzów sh*Spp1* efektorowych limfocytach T (niepublikowane).

Choć liczne doniesienia wskazują na pozytywną korelację między poziomem infiltracji przez limfocyty Tc a długością życia pacjentów z GBM, to wykazano, że komórki CD8<sup>+</sup> izolowane z ludzkich glejaków złośliwych nie miały ekspresji cząsteczki CD25, co świadczy o braku ich aktywacji (Heimberger i wsp. 2008, Alexiou i wsp. 2013, Gieryng i wsp. 2017). Możliwe jest zatem, że w glejakach sh*Spp1* zmniejsza się udział GAMs w tworzeniu środowiska immunosupresyjnego, co sprawia, że choć nie zmienia się ogólna liczba limfocytów Tc, to przywrócona zostaje ich aktywność i właściwości cytotoksyczne. Ważnym kierunkiem wydaje się zbadanie wpływu wyciszenia *Spp1* na nacieki i funkcje limfocytów Treg, co z powodów technicznych ograniczeń nie było możliwe w niniejszej rozprawie.

### 7.3.3 Wpływu różnych form Spp1 na wzrost guza *in vivo*

Spp1 ma złożoną strukturę i złożony sposób ekspresji różnych izoform (Kijewska i wsp. 2017). W budowie Spp1 można wyróżnić trzy funkcjonalne domeny: motyw RGD wiążący się do integrzyn, miejsce cięcia przez trombinę (Arg168/Ser169) i C-koniec wiążący receptor CD44 (Yamaguchi i wsp. 2013). Plejotropowe działanie Spp1 wynika z faktu, że różne rejony Spp1 mogą oddziaływać z wieloma różnymi białkami i pełnić tym samym odmienne funkcje, a określenie kluczowych dla rozwoju nowotworów regionów Spp1 ma fundamentalne znaczenie w zrozumieniu biologii glejaków.

Badania przeprowadzone w Pracowni Neurobiologii Molekularnej IBD PAN wykazały, że Spp1 produkowana przez prawidłowe fibroblasty indukuje odpowiedź zapalną, ale w komórkach glejaka białko ulega proteolitycznemu cięciu przez trombinę, MMP-3 i MMP-7, co prowadzi do powstania krótkiego, N-końcowego fragmentu Spp1. Fragment ten wydzielany jest poza komórkę i w TME może potencjalnie oddziaływać z różnymi komórkami, w tym GAMs, aktywując je bez indukcji stanu zapalnego (Ellert-Miklaszewska, Wisniewski, Kijewska i wsp. 2016). Shao i wsp. (2014) wykazali także istotny udział proteolitycznego cięcia Spp1 przez trombinę w obrębie sekwencji <sup>168</sup>RSKSKKFRR<sup>176</sup> w regulacji migracji komórek dendrytycznych. Obecność krótkiego, N-końcowego fragmentu Spp1 wykrywano w czterech liniach komórkowych ludzkich GBM i w ludzkich glejakach złośliwych, ale nie w prawidłowych astrocytach (Yamaguchi i wsp. 2013, Ellert-Miklaszewska, Wisniewski, Kijewska i wsp. 2016). Wykazano, że tak procesowana Spp1 silniej indukuje migrację i oporność na apoptozę komórek nowotworowych (Yamaguchi i wsp. 2013). Komórki glejaka z wyciszoną endogenną ekspresją *Spp1* i jednoczesną nadekspresją *Spp1* z punktową mutacją w miejscu cięcia przez trombinę (RSK→RAH) miały zahamowaną produkcję N-końcowego, krótkiego fragmentu białka oraz ograniczoną zdolność do indukcji genów M2 w mikrogleju (Ellert-Miklaszewska, Wisniewski, Kijewska i wsp. 2016). Potranslacyjna obróbka Spp1 przez trombinę i MMPs prowadzi do powstania nie tylko N-końcowego fragmentu, ale także do uwolnienia C-końcowych krótkich fragmentów o właściwościach chemotaktycznych, które mogą oddziaływać z innymi integrzynami (Yamaguchi i wsp. 2013, Shao i wsp. 2014).

Innym przypuszczalnym mechanizmem zahamowania wzrostu guzów shSpp1 jest oddziaływanie Spp1 z CD44 poprzez C-koniec białka. Receptory CD44 są

obecne na powierzchni komórek różnego typu i zaangażowane są w przekazywanie sygnałów od innych komórek lub ECM. Wiązanie Spp1 do receptorów CD44 może tym samym indukować migrację komórek. Ponadto C-koniec Spp1 ma zdolność do wiązania izoform v6 i v7 receptora CD44 w sposób niezależny od motywu RGD. Wpływa to na właściwości komórek macierzystych glejaka, a w niszach okołonaczyniowych wzmacnia macierzyste właściwości GSCs i wspiera wzrost guza (Kijewska i wsp. 2017, Pietras i wsp. 2014). Nie wykazano wpływu C-końcowego fragmentu Spp1 na aktywację GAMs – białko pozbawione tego rejonu wykazywało podobne działanie na mikroglej *in vitro*, co pełna forma białka (Ellert, Wiśniewski, Kijewska i wsp. 2016).

Pronowotworowe działanie Spp1 może także opierać się na interakcji białka z receptorami integrynowymi poprzez motyw RGD. Badania przeprowadzone w Pracowni Neurobiologii Molekularnej wykazały, że oddziaływanie przez motyw RGD jest kluczowe w aktywacji mikrogleju. Wprowadzenie punktowej mutacji w tym obszarze (RGD → RGE) białka produkowanego w fibroblastach zahamowało indukcję genów związanych ze stanem zapalnym, zmiany morfologiczne w mikrogleju oraz jego zdolności fagocytarne, ale nie miało wpływu na ekspresję genów związanych z odpowiedzią przeciwzapalną. Świadczy to o tym, że Spp1 produkowana przez komórki nienowotworowe indukuje głównie odpowiedź prozapalną w komórkach mieloidalnych (Ellert, Wiśniewski, Kijewska i wsp. 2016). W komórkach mikrogleju traktowanych pożywką z nad komórek glejaka (GCM, ang. *glioma conditioned medium*) obserwowano fosforylację kinazy FAK będącej mediatorem ścieżek sygnałowych zależnych od integryn. Zablokowanie receptorów integrynowych na powierzchni mikrogleju peptydem RGD (działającym jako kompetetywny inhibitor) zahamowało fosforylację zarówno kinazy FAK, jak i kinaz poniżej w ścieżce sygnałowej: Akt i ERK oraz indukcję ekspresji genów M2 w mikrogleju (Ellert, Wiśniewski, Kijewska i wsp. 2016). Komórki glejaka produkują zatem białka będące ligandami receptorów integrynowych i wykorzystują sygnały aktywujące mikroglej, niejako przeprojektowując je na swoją korzyść, tak, aby wywołać sprzyjający rozwojowi nowotworu stan immunosupresji w guzie.

W niniejszej rozprawie przeprowadzono doświadczenie typu *rescue* mające na celu sprawdzenie, czy przywrócenie ekspresji *Spp1* w komórkach z wyciszoną ekspresją *Spp1* wpłynie na wzrost guza *in vivo*. Ekspresja wtSpp1 w komórkach ze stabilnie wyciszoną ekspresją endogennej *Spp1* przywracała zdolność do wzrostu

guza. Ponadto wprowadzono konstrukty umożliwiające ekspresję różnych wariantów Spp1: z delecją regionu kodującego C-koniec białka (shSpp1 +  $\Delta$ C), z mutacją wprowadzającą zmianę w miejscu cięcia przez trombinę (shSpp1 + mutRSK) oraz mutacją punktową w sekwencji kodującej motyw RGD (shSpp1 + mutRGD $\rightarrow$ RGE). Ekspresja wariantu Spp1 z punktową mutacją w motywie RGD w komórkach pozbawionych Spp1, ale nie wariantu z mutacją w miejscu cięcia przez trombinę bądź z delecją C-końca białka, hamowała wzrost guza *in vivo* podobnie jak w guzach pozbawionych Spp1. Oznacza to, że choć funkcje biologiczne regulowane przez pozostałe regiony białka są bardzo istotne w wielu aspektach rozwoju nowotworu (takich jak adhezja, migracja czy oddziaływanie z GSCs), to w badanym modelu kluczową rolę we wzroście guza *in vivo* odgrywa motyw RGD Spp1 i jego oddziaływanie z docelowymi receptorami integrynowymi.

Jest to spójne z obserwacjami Zhou i wsp. (2015), którzy wykazali, że periostyna (POSTN) wydzielana przez komórki glejaka jest jednym z kluczowych białek zaangażowanym w immunosupresyjną aktywację GAMs w glejakach, a także rekrutację komórek mieloidalnych do guza. Wyciszenie ekspresji *POSTN* prowadziło do zahamowania migracji komórek mieloidalnych, wzrostu ekspresji genów M1 i spadku ekspresji genów M2, a zablokowanie wiązania białka do receptorów integrynowych z użyciem peptydu RGD bądź przeciwciała neutralizującego skierowanego przeciwko integrynom  $\alpha\beta 3$  hamowało aktywację mikrogleju. Wykazanie kluczowej roli Spp1, Mfg-E8, a także Postn ujawniło nowe cele terapeutyczne w GBM i nowe strategie celujące w interakcje glejaka z mikroglejem.

Działanie Spp1 jest plejotropowe i Spp1 wydzielana przez nienowotworowe komórki gospodarza ma inne znaczenie. Podwyższony poziom Spp1 obserwowano między innymi w GAMs, neutrofilach, MDSCs (Atai i wsp. 2011, Sangaletti i wsp. 2014, Szulzewsky i wsp. 2018, Wei i wsp. 2019). a także astrocytach, zwłaszcza w okolicach nisz okołonaczyniowych (Katz i wsp. 2012). Wysoką ekspresję *Spp1* w GAMs wykryto w mysim glejaku wywoływanym genetycznie i wykazującym profil ekspresji genów zbliżony do proneuralnego GBM (Szulzewsky i wsp. 2015). Wykazano także, że GAMs zarówno z ludzkich GBM, jak i z mysich glejaków wykazywały ekspresję pozakomórkowej formy SPP1 (Szulzewsky i wsp. 2018). Chen i wsp. (2018) pokazali, że myszy pozbawione Spp1 w TME wykształcały większe guzy, a wydzielana przez GAMs Spp1 miała działanie proangiogenne oraz pozytywnie wpływała na przeżywalność komórek glejaka. Dane dotyczące

przeżywalności zwierząt pozbawionych Spp1 z glejakiem nie są jednak jednoznaczne. Badania Wei i współautorów (2019) wykazały, że myszy Spp1<sup>-/-</sup>, którym zaimplantowano komórki glejaka GL261 żyły istotnie dłużej niż myszy kontrolne, którym zaimplantowano te komórki. Ponadto ich guzy wykazywały znacznie słabszą infiltrację przez GAMs o fenotypie pronowotworowym niż guzy myszy kontrolnych, a także silniejszy naciek limfocytów T o właściwościach przeciwnowotworowych (CD8<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>) w śledzionie, krwi i guzie. Z kolei Szulzewsky i wsp. (2018) nie obserwowali różnic w długości życia myszy pozbawionych Spp1 i kontrolnych po zaimplantowaniu komórek GL261. Wskazuje to kluczową rolę Spp1 w biologii glejaków złośliwych i zwraca uwagę na konieczność wielokierunkowego myślenia o Spp1 jako celu terapeutycznym.

#### 7.3.4 Wpływ peptydu RGD na napływ i aktywację GAMs

W niniejszej rozprawie zidentyfikowano motyw RGD Spp1 jako kluczowy dla wzrostu guza *in vivo*. Przeprowadzono doświadczenie, w którym komórki glejaka implantowano wraz z peptydem „RGD”, o sekwencji TQ**RGD**IF bądź peptydem kontrolnym (ang. *scrambled*). Peptydy zawierające motyw RGD działają jako kompetytywne inhibitory, które blokują receptory  $\alpha\beta3/\beta5$  i  $\alpha5\beta1$  obecne na powierzchni wielu komórek i tym samym ograniczają działanie ligandów integrzyn (w tym Mfg-E8 i Spp1). Peptyd użyty w doświadczeniu w badaniach *in vitro* blokował ścieżki sygnałowe w mikrogleju stymulowanym GCM, hamował zmiany morfologiczne (ameboidalną transformację) oraz indukcję ekspresji genów charakterystycznych dla fenotypu M2 (Ellert-Miklaszewska, Wisniewski, Kijewska i wsp. 2016).

Jednakże podanie peptydu RGD wraz z komórkami glejaka C6 nie miało wpływu na napływ komórek mieloidalnych do guza oraz funkcjonalny fenotyp tych komórek, a także na wielkość guza. Glejaki rosnące po podaniu peptydów RGD lub SCR charakteryzowały się podobnym naciekiem komórek mieloidalnych (Iba-1<sup>+</sup>). Co ciekawe stwierdzono słabszą akumulację GAMs po podaniu obu peptydów niż w kontrolnych glejakach (bez podania peptydu), komórki te nosiły też dużo słabsze znamiona aktywacji. Po podaniu peptydu nie obserwowano komórek Arg1<sup>+</sup> w guzie, co wskazuje na zahamowanie immunosupresyjnej aktywacji GAMs. Możliwe jest, że peptyd SCR był nieoptymalny lub zmiany wywoływane przez peptyd RGD nie były wystarczająco silne lub trwale, aby zahamować wzrost guza. Nie porównano

wielkości guzów kontrolnych (bez peptydu) i tych wykształconych po podaniu peptydu SCR, nie mamy zatem pewności, czy sam peptyd SCR wpływał istotnie na wzrost guzów *in vivo*. Możliwe, że przetestowanie peptydu kontrolnego o innej sekwencji, modyfikacja stężeń peptydów lub sposobu podania przyniosłaby bardziej jednoznaczne odpowiedzi na pytania o skuteczność inhibicji oddziaływań ligandów integryn z ich receptorami *in vivo*.

Pierwsze badania z użyciem peptydu zawierającego motyw RGD w nowotworach wykazały, że poprzez blokowanie integryn hamuje on inwazyjność komórek nowotworowych *in vitro*, przerzutowanie u myszy oraz angiogenezę (Danen i wsp. 2013, Ellert-Miklaszewska i wsp. 2020, Sani i wsp. 2021). Wprowadzono pewne modyfikacje w jego strukturze, mające na celu zwiększenie jego stabilności i antagonistycznego działania. Cylengityd (ang. *Cilengitide*), cykliczny peptyd zawierający motyw RGD, w badaniach przedklinicznych nad glejakami indukował śmierć zarówno komórek śródbłonna naczyń, jak i komórek nowotworowych, a podany myszom z glejakiem zmniejszał wzrost guza (Yamada i wsp. 2006). Efektywność cylengitydu (przy jednoczesnej niskiej toksyczności) obserwowano u pacjentów z GBM w badaniach klinicznych fazy I/IIa, zarówno po podaniu samodzielnym, jak i w połączeniu z radio- i chemioterapią (Kurozumi i wsp. 2012). Te obiecujące obserwacje nie przełożyły się jednak na poprawę rokowań dla pacjentów – w III fazie randomizowanych badań na dużej (powyżej 500 osób) grupie pacjentów podanie cylengitydu wraz z terapiami będącymi „złotym standardem” w leczeniu GBM nie zwiększyło przeżywalności pacjentów z nowozdiagnozowanym GBM z metylacją promotora *MGMT* (na podstawie <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00689221>).

Podobne rezultaty otrzymano po zastosowaniu Voloksimabu oraz MINT1526A: przeciwciał skierowanych przeciwko integrynom  $\alpha 5\beta 1$  (Weekes i wsp. 2018, Bell-McGuinn i wsp. 2011). Przymuszczalnie niska skuteczność peptydów RGD wynika z krótkiego okresu półtrwania tych cząsteczek oraz ich szybkiego usuwania przez organizm pacjenta. Choć bariera krew-mózg w GBM ulega rozszczelnieniu, to w dalszym ciągu może stanowić pewną fizyczną barierę dla penetracji peptydu do układu nerwowego, co utrudniałoby osiągnięcie i utrzymanie terapeutycznego stężenia leku w guzie (Tucci i wsp. 2014, Ellert-Miklaszewska i wsp. 2020). Brak istotnego efektu terapeutycznego zmniejszył atrakcyjność hamowania ścieżek sygnałowych zależnych od integryn jako celu terapeutycznego, jednak obiecujący

wydaje się powrót do tej koncepcji przy wykorzystaniu nanotechnologii – zamknięcie cylengitydu w nanokapsułkach złożonych z heparyny i poloksameru powodowało bardziej wydajne przekraczanie leku przez barierę krew-mózg i zwiększoną jego akumulację w guzie w szczurzym modelu glejaka (Zhao i wsp. 2016). Obiecujące wydają się też badania nad małowcząsteczkowym lekiem GLPG0187, który może blokować bardzo szerokie spektrum integryn i wykazuje skuteczność w badaniach przedklinicznych (Ellert-Miklaszewska i wsp. 2020). W dalszym ciągu prowadzone są też badania nad zaprojektowaniem nowych cząsteczek będących antagonistami integryn, które będą mogły pokonać wspomniane ograniczenia i wykażą większą biologiczną skuteczność.

## 8. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Glejaki złośliwe to agresywne nowotwory mózgu, które charakteryzuje wysoka heterogenność genetyczna i składu komórkowego, gdyż zawierają liczne komórki mieloidalne (GAMs). Komórki te pod wpływem czynników wydzielanych przez glejaki ulegają aktywacji i przekształcają się w komórki wspierające wzrost i inwazyjność guza oraz powodujące immunosupresję. **Celem pracy była weryfikacja hipotezy o udziale wydzielanych przez glejaka białek Mfg-E8 i Spp1 w regulacji wzrostu guza, w szczególności w modulacji mikrośrodowiska glejaków złośliwych i odpowiedzi komórek układu odpornościowego.** W prowadzonych badaniach wykorzystano komórki glejaka C6, które tworzą guzy u szczurów syngenicznych. Przeprowadzono szereg badań histologicznych i molekularnych, aby zbadać, jak zmienia się mikrośrodowisko glejaka jeśli w komórkach zostanie wyciszona ekspresja jednego z białek. Określono także molekularny mechanizm, poprzez który białka te wpływają na fenotyp komórek układu odpornościowego w mikrośrodowisku i blokują odpowiedź przeciwnowotworową.

Wyniki przedstawione w rozprawie pozwalają na wysunięcie następujących wniosków:

1. Glejaki C6 histologicznie i molekularnie przypominają podtyp Mes-GBM ludzkich glejaków złośliwych i charakteryzują się akumulacją komórek mieloidalnych o fenotypie immunosupresyjnym.
2. Wyciszenie ekspresji *Spp1* lub *Mfg-E8* hamuje wzrost szczurzego glejaka C6 *in vivo*, pomimo braku bezpośredniego wpływu na proliferację i żywotność tych komórek.
3. Glejaki pozbawione Mfg-E8 wykazują zmniejszoną migrację w mózgu, co świadczy o istotnej roli Mfg-E8 we wspieraniu migracji komórek glejaka.
4. Brak wydzielanych przez glejaka Spp1 i Mfg-E8 nie hamuje akumulacji GAMs w guzie, ale blokuje indukcję wspierającego nowotwór, immunosupresyjnego fenotypu. W przypadku glejaków pozbawionych Spp1 obserwowano podwyższoną ekspresję prozapalnej interleukiny 1 $\beta$ , co może świadczyć o przywróceniu odpowiedzi komórek układu odpornościowego. Nie stwierdzono istotnego wpływu wyciszenia Spp1



na naciek limfoidalny, choć w guzach pozbawionych Mfg-E8 zwiększał się odsetek komórek CD3<sup>+</sup> w guzie.

5. Przywrócenie ekspresji *Spp1* w komórkach shSpp1, ale nie wariantu z mutacją zmieniającą motyw RDG, przywracało wzrost guza, co potwierdza kluczową rolę przekąźnictwa Spp1-integriny we wzroście glejaka.

## 9. LISTA PUBLIKACJI Z UDZIAŁEM AUTORA

- Gieryng A, **Pszczolkowska D**, Bocian K, Dabrowski M, Rajan WD, Kloss M, Mieczkowski J, Kaminska B. Immune microenvironment of experimental rat C6 gliomas resembles human glioblastomas. *Sci Rep.* 2017 Dec 14;7(1):17556.
- Gieryng A, **Pszczolkowska D**, Walentynowicz KA, Rajan WD, Kaminska B. Immune microenvironment of gliomas. *Lab Invest.* 2017 May;97(5):498-518.
- Ellert-Miklaszewska A, Wisniewski P, Kijewska M, Gajdanowicz P, **Pszczolkowska D**, Przanowski P, Dabrowski M, Maleszewska M, Kaminska B. Tumour-processed osteopontin and lactadherin drive the protumorigenic reprogramming of microglia and glioma progression. *Oncogene.* 2016 Dec 15;35(50):6366-6377.
- Mieczkowski J, Kocyk M, Nauman P, Gabrusiewicz K, Sielska M, Przanowski P, Maleszewska M, Rajan WD, **Pszczolkowska D**, Tykocki T, Grajkowska W, Kotulska K, Roszkowski M, Kostkiewicz B, Kaminska B. Down-regulation of IKK $\beta$  expression in glioma-infiltrating microglia/macrophages is associated with defective inflammatory/immune gene responses in glioblastoma. *Oncotarget.* 2015 Oct 20;6(32):33077-90.

## 10. PIŚMIENICTWO

1. Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, Liaw L. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol Chem*. 2001 Jul 27;276(30):28261-7.
2. Ait-Oufella H, Kinugawa K, Zoll J, Simon T, Boddaert J, Heeneman S, Blanc-Brude O, Barateau V, Potteaux S, Merval R, Esposito B, Teissier E, Daemen MJ, Lesèche G, Boulanger C, Tedgui A, Mallat Z. Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice. *Circulation*. 2007 Apr 24;115(16):2168-77.
3. Alcantara Llaguno SR, Parada LF. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. *Br J Cancer*. 2016 Dec 6;115(12):1445-1450.
4. Alcantara Llaguno SR, Wang Z, Sun D, Chen J, Xu J, Kim E, Hatanpaa KJ, Raisanen JM, Burns DK, Johnson JE, Parada LF. Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. *Cancer Cell*. 2015 Oct 12;28(4):429-440.
5. Alexandru O, Horescu C, Sevastre AS, Cioc CE, Baloi C, Oprita A, Dricu A. Receptor tyrosine kinase targeting in glioblastoma: performance, limitations and future approaches. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2020;24(1):55-66.
6. Alexiou GA, Vartholomatos G, Karamoutsios A, Batistatou A, Kyritsis AP, Voulgaris S. Circulating progenitor cells: a comparison of patients with glioblastoma or meningioma. *Acta Neurol Belg*. 2013 Mar;113(1):7-11.
7. Al-Kharboosh R, ReFaey K, Lara-Velazquez M, Grewal SS, Imitola J, Quiñones-Hinojosa A. Inflammatory Mediators in Glioma Microenvironment Play a Dual Role in Gliomagenesis and Mesenchymal Stem Cell Homing: Implication for Cellular Therapy. *Mayo Clin Proc Innov Qual Outcomes*. 2020 Aug 5;4(4):443-459. doi: 10.1016/j.mayocpiqo.2020.04.006. eCollection 2020 Aug
8. Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, Carbone DP, Gabrilovich DI. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol*. 2001 Jan 1;166(1):678-89.

9. Amoozgar Z, Kloepper J, Ren J, Tay RE, Kazer SW, Kiner E, Krishnan S, Posada JM, Ghosh M, Mamessier E, Wong C, Ferraro GB, Batista A, Wang N, Badeaux M, Roberge S, Xu L, Huang P, Shalek AK, Fukumura D, Kim HJ, Jain RK. Targeting Treg cells with GITR activation alleviates resistance to immunotherapy in murine glioblastomas. *Nat Commun.* 2021 May 11;12(1):2582.
10. Andersen MH, Graversen H, Fedosov SN, Petersen TE, Rasmussen JT. Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. *Biochemistry.* 2000 May 23;39(20):6200-6.
11. Andersson J, Tran DQ, Pesu M, Davidson TS, Ramsey H, O'Shea JJ, Shevach EM. CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- $\beta$ -dependent manner. *J Exp Med.* 2008 Sep 1;205(9):1975-81.
12. Annovazzi L, Mellai M, Bovio E, Mazzetti S, Pollo B, Schiffer D. Microglia immunophenotyping in gliomas. *Oncol Lett.* 2018 Jan;15(1):998-1006.
13. Arnold TD, Lizama CO, Cautivo KM, Santander N, Lin L, Qiu H, Huang EJ, Liu C, Mukoyama YS, Reichardt LF, Zovein AC, Sheppard D. Impaired  $\alpha$ V $\beta$ 8 and TGF $\beta$  signaling lead to microglial dysmaturation and neuromotor dysfunction. *J Exp Med.* 2019 Apr 1;216(4):900-915.
14. Arrieta O, Garcia E, Guevara P, Garcia-Navarrete R, Ondarza R, Rembao D, Sotelo J. Hepatocyte growth factor is associated with poor prognosis of malignant gliomas and is a predictor for recurrence of meningioma. *Cancer.* 2002 Jun 15;94(12):3210-8.
15. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell mediated) immunity. *Science* 2000; 287: 860-864.
16. Atai NA, Bansal M, Lo C, Bosman J, Tigchelaar W, Bosch KS, Jonker A, De Witt Hamer PC, Troost D, McCulloch CA, Everts V, Van Noorden CJF, Sodek J. Osteopontin is up-regulated and associated with neutrophil and macrophage infiltration in glioblastoma. *Immunology.* 2011 Jan;132(1):39-48.
17. Babcock AA, Kuziel WA, Rivest S, Owens T. Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J Neurosci.* 2003 Aug 27;23(21):7922-30.

18. Badie B, Bartley B, Schartner J. Differential expression of MHC class II and B7 costimulatory molecules by microglia in rodent gliomas. *J Neuroimmunol.* 2002 Dec;133(1-2):39-45.
19. Badie B, Schartner J, Prabakaran S, Paul J, Vorpahl J. Expression of Fas ligand by microglia: possible role in glioma immune evasion. *J Neuroimmunol.* 2001 Nov 1;120(1-2):19-24.
20. Badie B, Schartner JM. Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas. *Neurosurgery.* 2000 Apr;46(4):957-61; discussion 961-2.
21. Bai J, Zhang W, Hang K, Zhao G, Zhong H, Zhou C, Xu J, Zhang W, Chen E, Wu J, Liu L, Xue D MFG-E8, A Novel Target of Promoting Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Preprint from Research Square, 21 Sep 2021 (<https://doi.org/10.1096/fj.202201417RRR>)
22. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2005; 15: 102–111.
23. Balzar M, Briaire-de Bruijn IH, Rees-Bakker HA, Prins FA, Helfrich W, de Leij L, Riethmuller G, Alberti S, Warnaar SO, Fleuren GJ, Litvinov SV. Epidermal growth factor-like repeats mediate lateral and reciprocal interactions of Ep-CAM molecules in homophilic adhesions. *Mol Cell Biol.* 2001; 21:2570–80
24. Bandopadhyay M, Bulbule A, Butti R, Chakraborty G, Ghorpade P, Ghosh P, Gorain M, Kale S, Kumar D, Kumar S, Totakura KV, Roy G, Sharma P, Shetti D, Soundararajan G, Thorat D, Tomar D, Nalukurthi R, Raja R, Mishra R, Yadav AS, Kundu GC. Osteopontin as a therapeutic target for cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2014 Aug;18(8):883-95.
25. Bao S, Ouyang G, Bai X, Huang Z, Ma C, Liu M, Shao R, Anderson RM, Rich JN, Wang XF. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell.* 2004 Apr;5(4):329-39.
26. Baril P, Gangeswaran R, Mahon PC, Caulee K, Kocher HM, Harada T, Zhu M, Kalthoff H, Crnogorac-Jurcevic T, Lemoine NR. Periostin promotes invasiveness and resistance of pancreatic cancer cells to hypoxia-induced cell death: role of the beta4 integrin and the PI3k pathway. *Oncogene.* 2007 Mar 29;26(14):2082-94.

27. Barry ST, Ludbrook SB, Murrison E, Horgan CM A regulated interaction between alpha5beta1 integrin and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 764-769
28. Barth RF, Kaur B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol.* 2009 Sep;94(3):299-312.
29. Bayless, K.J., Davis, G.E. (2001). Identification of dual alpha 4beta1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. *J Biol Chem* 276, 13483-13489.
30. Behnan J., Finocchiaro G., Hanna G. The landscape of the mesenchymal signature in brain tumours. *Brain.* 2019;142:847–866.
31. Bell-McGuinn KM, Matthews CM, Ho SN, Barve M, Gilbert L, Penson RT, Lengyel E, Palaparthi R, Gilder K, Vassos A, McAuliffe W, Weymer S, Barton J, Schilder RJ. A phase II, single-arm study of the anti- $\alpha 5\beta 1$  integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer. *Gynecol Oncol.* 2011 May 1;121(2):273-9.
32. Ben-Baruch A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin Cancer Biol.* 2006 Feb;16(1):38-52.
33. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science.* 1968 Jul 26;161(3839):370-1.
34. Bernardes SS, Pinto MCX, Amorim JH, Azevedo VAC, Resende RR, Mintz A, Birbrair A. Glioma Pericytes Promote Angiogenesis by Producing Periostin. *Cell Mol Neurobiol.* 2022 Apr;42(3):557-564.
35. Bertrand JY, Giroux S, Cumano A, Godin I. Hematopoietic stem cell development during mouse embryogenesis. *Methods Mol Med.* 2005;105:273-88.
36. Bettinger I, Thanos S, Paulus W. Microglia promote glioma migration. *Acta Neuropathol.* 2002 Apr;103(4):351-5.
37. Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Galon J: The prognostic impact of anti-cancer immune response: a novel classification of cancer patients. *Semin Immunopathol* 2011; 33: 335-40.

38. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, Vincenzo B, Pasqualini F, Vago L, Nebuloni M, Mantovani A, Sica A. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):2112-22.
39. Blank T, Prinz M. Microglia as modulators of cognition and neuropsychiatric disorders. *Glia*. 2013 Jan;61(1):62-70.
40. Bloch O, Han SJ, Cha S, Sun MZ, Aghi MK, McDermott MW, Berger MS, Parsa AT. Impact of extent of resection for recurrent glioblastoma on overall survival: clinical article. *J Neurosurg*. 2012 Dec;117(6):1032-8.
41. Boddaert J., Kinugawa K., Lambert J.C., Boukhtouche F., Zoll J., Merval R., Blanc-Brude O., Mann D., Berr C., Vilar J., et al. Evidence of a role for lactadherin in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol*. 2007;170:921–929. doi: 10.2353/ajpath.2007.060664.
42. Boehm U1, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:749-95.
43. Bonanomi D, Chivatakarn O, Bai G, Abdesselem H, Lettieri K, Marquardt T, Pierchala BA, Pfaff SL. Ret is a multifunctional coreceptor that integrates diffusible- and contact-axon guidance signals. *Cell*. 2012 Feb 3;148(3):568-82.
44. Boutilier AJ, Elsawa SF. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 29;22(13):6995.
45. Bowman RL, Klemm F, Akkari L, Pyonteck SM, Sevenich L, Quail DF, Dhara S, Simpson K, Gardner EE, Iacobuzio-Donahue CA, Brennan CW, Tabar V, Gutin PH, Joyce JA. Macrophage ontogeny underlies differences in tumorspecific education in brain malignancies. *Cell Rep*. 17, 2445–2459 (2016)
46. Brandenburg S, Müller A, Turkowski K, Radev YT, Rot S, Schmidt C, Bungert AD, Acker G, Schorr A, Hippe A, Miller K, Heppner FL, Homey B, Vajkoczy P. Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. *Acta Neuropathol*. 2016 Mar;131(3):365-78.

47. Brandenburg S, Turkowski K, Mueller A, Radev YT, Seidlitz S, Vajkoczy P. Myeloid cells expressing high level of CD45 are associated with a distinct activated phenotype in glioma. *Immunol Res.* 2017 Jun;65(3):757-768.
48. Brennan C. Genomic profiles of glioma. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011 Jun;11(3):291-7.
49. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, Fanek Z, Liu L, Chen Z, Rothstein JD, Ransohoff RM, Gygi SP, Antel JP, Weiner HL. Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci.* 2014 Jan;17(1):131-43.
50. Buttgereit A, Lelios I, Yu X, Vrohling M, Krakoski NR, Gautier EL, Nishinakamura R, Becher B, Greter M. Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function. *Nat Immunol.* 2016 Dec;17(12):1397-1406.
51. Cao Q, Hong S, Li Y, Chen H, Shen Y, Shao K, Lu M, Dai H, Ma S, Dai G. Coptisine suppresses tumor growth and progression by down-regulating MFG-E8 in colorectal cancer. *RSC Adv.* 2018, 8, 30937–30945
52. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, Ley TJ. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* 2007 Oct;27(4):635-46.
53. Carrascosa C, Obula RG, Missiaglia E, Lehr HA, Delorenzi M, Frattini M, Rüegg C, Mariotti A. MFG-E8/lactadherin regulates cyclins D1/D3 expression and enhances the tumorigenic potential of mammary epithelial cells. *Oncogene.* 2012 Mar 22;31(12):1521-32.
54. Carroll HP, Paunović V, Gadina M. Signalling, inflammation and arthritis: Crossed signals: The role of interleukin-15 and -18 in autoimmunity. *Rheumatology.* 2008;47:1269–1277.
55. Castelli MG, Chiabrando C, Fanelli R, Martelli L, Butti G, Gaetani P, Paoletti P. Prostaglandin and thromboxane synthesis by human intracranial tumors. *Cancer Res.* 1989 Mar 15;49(6):1505-8.
56. Chang AL, Miska J, Wainwright DA, Dey M, Rivetta CV, Yu D, Kanojia D, Pituch KC, Qiao J, Pytel P, Han Y, Wu M, Zhang L, Horbinski CM, Ahmed AU, Lesniak MS. CCL2 Produced by the Glioma Microenvironment Is



- Essential for the Recruitment of Regulatory T Cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells *Cancer Res.* 2016 Oct 1;76(19):5671-5682.
57. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia.* 2011 Aug;59(8):1169-80.
58. Chen CJ, Chen JH, Chen SY, Liao SL, Raung SL. Upregulation of RANTES gene expression in neuroglia by Japanese encephalitis virus infection. *J Virol.* 2004 Nov;78(22):12107-19.
59. Chen J, Hou C, Zheng Z, Lin H, Lv G, Zhou D. Identification of Secreted Phosphoprotein 1 (SPP1) as a Prognostic Factor in Lower-Grade Gliomas. *World Neurosurg.* 2019 Oct;130:e775-e785.
60. Chen P., Zhao D., Li J., Liang X., Li J., Chang A., Henry V.K., Lan Z., Spring D.J., Rao G. Wang YA, DePinho RA. Symbiotic Macrophage-Glioma Cell Interactions Reveal Synthetic Lethality in PTEN-Null Glioma. *Cancer Cell.* 2019;35:868–884.e6.
61. Chen RX, Xia YH, Xue TC, Zhang H, Ye SL. Down-regulation of osteopontin inhibits metastasis of hepatocellular carcinoma cells via a mechanism involving MMP-2 and uPA. *Oncol Rep.* 2011 Mar;25(3):803-8.
62. Chen Z, Feng X, Herting CJ, Garcia VA, Nie K, Pong WW, Rasmussen R, Dwivedi B, Seby S, Wolf SA, Gutmann DH, Hambardzumyan D. Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Res.* 2017 May 1;77(9):2266-2278.
63. Chen Z, Giotti B, Kaluzova M, Herting CJ, Pinero G, Vallcorba MP, Cristea S, Ross JL, Ackley J, Maximov V, Szulzewsky F, Marquez-Roper M, Angione A, Nichols N, Tsankova N, Michor F, = Shayakhmetov DM, Gutmann DH, Tsankov AM, Hambardzumyan D. A paracrine circuit of IL-1 $\beta$ /IL-1R1 between myeloid and tumor cells drives glioblastoma progression. *bioRxiv - Cancer Biology* Pub Date: 2022-04-05 , DOI:10.1101/2022.04.03.486888
64. Choi JI, Kang HY, Han C, Woo DH, Kim JH, Park DH. Milk Fat Globule-Epidermal Growth Factor VIII Ameliorates Brain Injury in the Subacute Phase of Cerebral Ischemia in an Animal Model. *J Korean Neurosurg Soc.* 2020 Mar;63(2):163-170.
65. Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Aug;1796(1):11-8.

66. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011 Jan;32(1):19-25
67. Cooper C, Jones HG, Weller RO, Walker V. Production of prostaglandins and thromboxane by isolated cells from intracranial tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1984 Jun;47(6):579-84.
68. Cornejo M, Nambi D, Walheim C, Somerville M, Walker J, Kim L, Ollison L, Diamante G, Vyawahare S, de Bellard ME. Effect of NRG1, GDNF, EGF and NGF in the migration of a Schwann cell precursor line. *Neurochem Res.* 2010 Oct;35(10):1643-51.
69. Danen EHJ. Integrin Signaling as a Cancer Drug Target. *ISRN Cell Biol.* 2013;2013:14.
70. D'Angiolella V, Esencay M, Pagano M. A cyclin without cyclin-dependent kinases: Cyclin F controls genome stability through ubiquitin-mediated proteolysis. *Trends in Cell Biology.* 2013;23:135–140.
71. Darmanis S, Sloan SA, Croote D, Mignardi M, Chernikova S, Samghababi P, Zhang Y, Neff N, Kowarsky M, Caneda C, Li G, Chang SD, Connolly ID, Li y, Barres BA, Hayden Gephart M , Quake SR. Single-cell RNA-seq analysis of infiltrating neoplastic cells at the migrating front of human glioblastoma. *Cell Rep.* 21, 1399–1410 (2017).
72. Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, Nagata S, Rumbaut RE, Thiagarajan P. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood.* 2009 Feb 5;113(6):1332-9.
73. Dasgupta SK, Thiagarajan P. The role of lactadherin in the phagocytosis of phosphatidylserine-expressing sickle red blood cells by macrophages. *Haematologica.* 2005 Sep;90(9):1267-8.
74. Daubon T, Hemadou A, Romero Garmendia I, Saleh M. Glioblastoma Immune Landscape and the Potential of New Immunotherapies. *Front Immunol.* 2020 Oct 14;11:585616.
75. Deczkowska A, Weiner A, Amit I. The Physiology, Pathology, and Potential Therapeutic Applications of the TREM2 Signaling Pathway. *Cell.* 2020 Jun 11;181(6):1207-1217.
76. de Groot J, Sontheimer H. Glutamate and the biology of gliomas. *Glia.* 2011 Aug;59(8):1181-9.

77. De Kleer I, Willems F, Lambrecht B, Goriely S. Ontogeny of myeloid cells. *Front Immunol*. 2014 Sep 3;5:423.
78. Deng L, Chen N, Li Y, Zheng H, Lei Q. CXCR6/CXCL16 functions as a regulator in metastasis and progression of cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1806(1):42-9.
79. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest*. 2001 May;107(9):1055-61.
80. Deonarain MP, Kousparou CA, Epenetos AA. Antibodies targeting cancer stem cells: a new paradigm in immunotherapy? *MAbs*. 2009 Jan-Feb;1(1):12-25.
81. de Vlaeminck Y, González-Rascón A, Goyvaerts C, Breckpot K. Cancer-Associated Myeloid Regulatory Cells. *Front Immunol*. 2016 Mar 29;7:113.
82. Dick AD, Ford AL, Forrester JV, Sedgwick JD. Flow cytometric identification of a minority population of MHC class II positive cells in the normal rat retina distinct from CD45<sup>low</sup>CD11b/c<sup>+</sup>CD4<sup>low</sup> parenchymal microglia. *Br J Ophthalmol*. 1995 Sep;79(9):834-40.
83. Dietrich JB, Zaepfel M, Kuchler-Bopp S. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in C6 glioma cells is up-regulated by thyroid hormone. *Neuroreport*. 2000;11:2855–2860.
84. Di Stefano L, Jensen MR, Helin K. E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J*. 2003;22:6289–6298.
85. Doblaz S, He T, Saunders D, Pearson J, Hoyle J, Smith N, Lerner M, Towner RA. Glioma morphology and tumor-induced vascular alterations revealed in seven rodent glioma models by in vivo magnetic resonance imaging and angiography. *J Magn Reson Imaging*. 2010 Aug;32(2):267-75.
86. Du XL, Jiang T, Sheng XG, Gao R, Li QS. Inhibition of osteopontin suppresses in vitro and in vivo angiogenesis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2009 Dec;115(3):371-6.
87. Dudanova I, Gatto G, Klein R. GDNF acts as a chemoattractant to support ephrinA-induced repulsion of limb motor axons. *Curr Biol*. 2010 Dec 7;20(23):2150-6.

88. Dumas AA, Pomella N, Rosser G, Guglielmi L, Vinel C, Millner TO, Rees J, Aley N, Sheer D, Wei J, Marisetty A, Heimberger AB, Bowman RL, Brandner S, Joyce JA, Marino S. Microglia promote glioblastoma via mTOR-mediated immunosuppression of the tumour microenvironment. *EMBO J.* 2020 Aug 3;39(15):e103790.
89. Dunn IF, Heese O, Black PM. Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs. *J Neurooncol.* 2000 Oct-Nov;50(1-2):121-37.
90. El Kasmi KC, Qualls JE, Pesce JT, Smith AM, Thompson RW, Henaot-Tamayo M, Basaraba RJ, König T, Schleicher U, Koo MS, Kaplan G, Fitzgerald KA, Tuomanen EI, Orme IM, Kanneganti TD, Bogdan C, Wynn TA, Murray PJ. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol.* 2008 Dec;9(12):1399-406.
91. Ellert-Miklaszewska A, Poleszak K, Pasierbinska M, Kaminska B. Integrin Signaling in Glioma Pathogenesis: From Biology to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 30;21(3):888.
92. Ellert-Miklaszewska A, Wisniewski P, Kijewska M, Gajdanowicz P, Pszczolkowska D, Przanowski P, Dabrowski M, Maleszewska M, Kaminska B. Tumour-processed osteopontin and lactadherin drive the protumorigenic reprogramming of microglia and glioma progression. *Oncogene* 2016 Dec 15;35(50):6366-6377.
93. Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol.* 1998 Sep;64(3):275-90.
94. Engler JR, Robinson AE, Smirnov I, Hodgson JG, Berger MS, Gupta N, James CD, Molinaro A, Phillips JJ. Increased microglia/macrophage gene expression in a subset of adult and pediatric astrocytomas. *PLoS One.* 2012;7(8):e43339.
95. Ensslin MA, Shur BD. The EGF repeat and discoidin domain protein, SED1/MFG-E8, is required for mammary gland branching morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 20;104(8):2715-20.
96. Erreni M, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer. *Cancer Microenviron.* 2011 Aug;4(2):141-54.

97. Esencay M, Newcomb EW, Zagzag D. HGF upregulates CXCR4 expression in gliomas via NF-kappaB: implications for glioma cell migration. *J Neurooncol.* 2010 Aug;99(1):33-40.
98. Faes S, Dormond O. PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 21138–21152
99. Fairweather D, Cihakova D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J Autoimmun.* 2009 Nov-Dec;33(3-4):222-30
100. Faried A, Hermanto Y, Tjahjono FP, Valentino A, Arifin MZ. Identification of Periostin as a Potential Biomarker in Gliomas by Database Mining. *World Neurosurg.* 2020 Mar;135:e137-e163.
101. Fecci PE, Mitchell DA, Whitesides JF, Xie W, Friedman AH, Archer GE, Herndon JE 2nd, Bigner DD, Dranoff G, Sampson JH. Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res.* 2006 Mar 15;66(6):3294-302.
102. Fens M, Mastrobattista E, de Graaff AM, Flesch FM, Ultee A, Rasmussen JT, Molema G, Storm G, Schiffelers RM. Angiogenic endothelium shows lactadherin-dependent phagocytosis of aged erythrocytes and apoptotic cells. *Blood.* 2008 May 1;111(9):4542-50.
103. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin.* 2007 Nov;25(4):867-90, vii.
104. Flügel A, Labeur MS, Grasbon-Frodl EM, Kreutzberg GW, Graeber MB. Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells. *Int J Dev Neurosci.* 1999 Aug-Oct;17(5-6):547-56.
105. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):330-6  
Frei K, Nohava K, Malipiero UV, Schwerdel C, Fontana A. Production of macrophage colony-stimulating factor by astrocytes and brain macrophages. *J Neuroimmunol.* 1992 Oct;40(2-3):189-95.
106. Franzén A and Heinegård D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J.* 1985 Dec 15;232(3):715-24.
107. Fricke I, Gabrilovich DI. Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison. *Immunol Invest.* 2006;35(3-4):459-83.

108. Friedmann-Morvinski D, Bhargava V, Gupta S, Verma IM, Subramaniam S. Identification of therapeutic targets for glioblastoma by network analysis. *Oncogene*. 2016 Feb 4;35(5):608-20.
109. Fu Y, Huang R, Zheng Y, Zhang Z, Liang A. Glioma-derived mutations in isocitrate dehydrogenase 2 beneficial to traditional chemotherapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;410:218–223.
110. Fu W, Wang W, Li H, Jiao Y, Huo R, Yan Z, Wang J, Wang S, Wang J, Chen D, Cao Y, Zhao J. Single-Cell Atlas Reveals Complexity of the Immunosuppressive Microenvironment of Initial and Recurrent Glioblastoma. *Front Immunol*. 2020 May 7;11:835.
111. Fujita M, Scheurer ME, Decker SA, McDonald HA, Kohanbash G, Kastenhuber ER, Kato H, Bondy ML, Ohlfest JR, Okada H. Role of type 1 IFNs in antiglioma immunosurveillance – using mouse studies to guide examination of novel prognostic markers in humans. *Clin Cancer Res*. 2010 Jul 1;16(13):3409-19.
112. Fujiwara C, Motegi SI, Ohira A, Yamaguchi S, Sekiguchi A, Yasuda M, Nakamura H, Makiguchi T, Yokoo S, Hoshina D, Abe R, Takahashi K, Ishikawa O. The significance of tumor cells-derived MFG-E8 in tumor growth of angiosarcoma. *J Dermatol Sci*. 2019 Oct;96(1):18-25. doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.08.005. Epub 2019 Aug 16.
113. Fujiwara T, Healey J, Ogura K, Yoshida A, Kondo H, Hata T, Kure M, Tazawa H, Nakata E, Kunisada T, Fujiwara T, Ozaki T. Role of Tumor-Associated Macrophages in Sarcomas. *Cancers (Basel)*. 2021 Mar 3;13(5):1086.
114. Fultang L, Vardon A, De Santo C, Mussai F. Molecular basis and current strategies of therapeutic arginine depletion for cancer. *Int J Cancer*. 2016 Aug 1;139(3):501-9.
115. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*. 2007 Nov 1;21(21):2683-710.
116. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009 Mar;9(3):162-74.

117. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012 Mar 22;12(4):253-68.
118. Gabrusiewicz K, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M, Sielska M, Frankowska M, Kaminska B. Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas. *PLoS One*. 2011;6(8):e23902.
119. Gabrusiewicz K, Hossain MB, Cortes-Santiago N, Fan X, Kaminska B, Marini FC, Fueyo J, Gomez-Manzano C. Macrophage Ablation Reduces M2-Like Populations and Jeopardizes Tumor Growth in a MAFIA-Based Glioma Model. *Neoplasia*. 2015 Apr;17(4):374-84.
120. Gabrusiewicz K, Rodriguez B, Wei J, Hashimoto Y, Healy LM, Maiti SN, Thomas G, Zhou S, Wang Q, Elakkad A, Liebelt BD, Yaghi NK, Ezhilarasan R, Huang N, Weinberg JS, Prabhu SS, Rao G, Sawaya R, Langford LA, Bruner JM, Fuller GN, Bar-Or A, Li W, Colen RR, Curran MA, Bhat KP, Antel JP, Cooper LJ, Sulman EP, Heimberger AB. Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype. *JCI Insight*. 2016;1(2):e85841
121. Gao C, Guo H, Wei J, Mi Z, Wai P, Kuo PC. S-nitrosylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B regulates osteopontin transcription in endotoxin-stimulated murine macrophages. *J Biol Chem*. 2017 Feb 24;292(8):3542.
122. Gao YY, Tao T, Wu D, Zhuang Z, Lu Y, Wu LY, Liu GJ, Zhou J, Zhang D, Wang H, Dai W, Li W, Hang CH. MFG-E8 attenuates inflammation in subarachnoid hemorrhage by driving microglial M2 polarization. *Exp Neurol*. 2021 Feb;336:113532.
123. Gratuze M, Leyns CEG, Holtzman DM. New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2018 Dec 20;13(1):66.
124. Gravallesse EM. Osteopontin a bridge between bone and the immune system. *J Clin Invest* 2003; 112: 147-149
125. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit

- natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med.* 2005 Oct 17;202(8):1075-85.
126. Ghosh A, Chaudhuri S. Microglial action in glioma: a boon turns bane. *Immunol Lett.* 2010 Jun 15;131(1):3-9.
127. Giakoumettis D, Kritis A, Foroglou N. C6 cell line: the gold standard in glioma research. *Hippokratia.* 2018 Jul-Sep;22(3):105-112.
128. Gielen PR, Schulte BM, Kers-Rebel ED, Verrijp K, Petersen-Baltussen HM, ter Laan M, Wesseling P, Adema GJ. Increase in both CD14-positive and CD15-positive myeloid-derived suppressor cell subpopulations in the blood of patients with glioma but predominance of CD15-positive myeloid-derived suppressor cells in glioma tissue. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 74, 390–400 (2015).
129. Gieryng A, Pszczolkowska D, Bocian K, Dabrowski M, Rajan WD, Kloss M, Mieczkowski J, Kaminska B. Immune microenvironment of experimental rat C6 gliomas resembles human glioblastomas. *Sci. Rep.* 7, 17556 (2017)
130. Gil-Guerrero L, Dotor J, Huibregtse IL, Casares N, López-Vázquez AB, Rudilla F, Riezu-Boj JI, López-Sagaseta J, Hermida J, Van Deventer S, Bezunartea J, Llopiz D, Sarobe P, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ. In vitro and in vivo down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF-beta1. *J Immunol.* 2008 Jul 1;181(1):126-35.
131. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 2010 Nov 5;330(6005):841-5
132. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, Berman T, Joyce JA. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 2010 Feb 1;24(3):241-55.
133. Gold LI. The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog.* 1999;10(4):303-60.
134. Goldmann T, Wieghofer P, Jordão MJ, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, Amann L, Staszewski O, Kierdorf K, Krueger M, Locatelli G, Hochgerner H, Zeiser R, Epelman S, Geissmann F, Priller J, Rossi FM, Bechmann I, Kerschensteiner M, Linnarsson S, Jung S, Prinz M. Origin, fate and dynamics



- of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol.* 2016 Jul;17(7):797-805.
135. Gong M, Lu Z, Fang G, Bi J, Xue X. A small interfering RNA targeting osteopontin as gastric cancer therapeutics. *Cancer Lett.* 2008 Dec 8;272(1):148-59.
136. Gong QY, Eldridge PR, Brodbelt AR, García-Fiñana M, Zaman A, Jones B, Roberts N. Quantification of tumour response to radiotherapy. *Br J Radiol.* 2004 May;77(917):405-13.
137. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jan;3(1):23-35.
138. Graeber MB, Scheithauer BW, Kreutzberg GW. Microglia in brain tumors. *Glia.* 2002 Nov;40(2):252-9.
139. Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, Nayak L, Moss PA. The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol.* 2005 Jun;140(3):540-6.
140. Grobden B, De Deyn PP, Slegers H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res.* 2002 Dec;310(3):257-70.
141. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Experimental Cell Research.* 2011;317:620–631.
142. Guchhait P, Dasgupta SK, Le A, Yellapragada S, López JA, Thiagarajan P. Lactadherin mediates sickle cell adhesion to vascular endothelial cells in flowing blood. *Haematologica.* 2007 Sep;92(9):1266-7.
143. Guo Y, Hong W, Zhang P, Han D, Fang Y, Tu J, Wei W. Abnormal polarization of macrophage-like cells in the peripheral blood of patients with glioma. *Oncol Lett.* 2020 Jul;20(1):947-954. doi: 10.3892/ol.2020.11602. Epub 2020 May 13. PMID: 32566024
144. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis.* 2004 Aug;25(8):1543-9.
145. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H, The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci.* 2016 Jan;19(1):20-7.

146. Hamilton TA. Molecular basis of macrophage activation: from gene expression to phenotypic diversity. Burke B, Lewis CE, editors, 2002. *The Macrophage*. Oxford: Oxford University Press. pp. 73–102.
147. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*. 2002 May 9;417(6885):182-7.
148. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. 2007 Nov;10(11):1387-94.
149. Harada Y, Kazama S, Morikawa T, Sonoda H, Ishi H, Emoto S, Murono K, Kaneko M, Sasaki K, Shuno Y, Nishikawa T, Tanaka T, Kawai K, Hata K, Nozawa H, Ushiku T, Tahara H, Ishihara S. Clinical significance of CD8 + and FoxP3 + tumor-infiltrating lymphocytes and MFG-E8 expression in lower rectal cancer with preoperative chemoradiotherapy *Mol Clin Oncol*. 2021 May;14(5):87.
150. Harney AS, Arwert EN, Entenberg D, Wang Y, Guo P, Qian BZ, Oktay MH, Pollard JW, Jones JG, Condeelis JS. Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2hi Macrophage-Derived VEGFA. *Cancer Discov*. 2015 Sep;5(9):932-43.
151. Heimberger AB, Abou-Ghazal M, Reina-Ortiz C, Yang DS, Sun W, Qiao W, Hiraoka N, Fuller GN. Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug 15;14(16):5166-72.
152. Heimberger AB, Suki D, Yang D, Shi W, Aldape K. The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med*. 2005 Oct 19;3:38.
153. Henry A, Nokin MJ, Leroi N, Lallemand F, Lambert J, Goffart N, Roncarati P, Bianchi E, Peixoto P, Blomme A, Turtoi A, Peulen O, Habraken Y, Scholtes F, Martinive P, Delvenne P, Rogister B, Castronovo V, Bellahcène A. New role of osteopontin in DNA repair and impact on human glioblastoma radiosensitivity. *Oncotarget*. 2016 Sep 27;7(39):63708-63721.
154. Hestdal K, Ruscetti FW, Ihle JN, Jacobsen SE, Dubois CM, Kopp WC, Longo DL, Keller JR. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol*. 1991 Jul 1;147(1):22-8.

155. Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang LC, Means TK, El Khoury J. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci*. 2013 Dec;16(12):1896-905.
156. Hinojosa AE, Garcia-Bueno B, Leza JC, Madrigal JL. CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation. *J Neuroinflammation*. 2011 Jul 5;8:77.
157. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Krüger C, Manns MP, Greten TF, Korangy F. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology*. 2008 Jul;135(1):234-43.
158. Holland EC. Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6;97(12):6242-4.
159. Hong TM, Teng LJ, Shun CT, Peng MC, Tsai JC. Induced interleukin-8 expression in gliomas by tumor-associated macrophages. *J Neurooncol*. 2009 Jul;93(3):289-301.
160. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory t cell development by the transcription factor foxp3. *Science New York, NY* 2003;299:1057-1061
161. Hu F, Dzaye O, Hahn A, Yu Y, Scavetta RJ, Dittmar G, Kaczmarek AK, Dunning KR, Ricciardelli C, Rinnenthal JL, Heppner FL, Lehnardt S, Synowitz M, Wolf SA, Kettenmann H. Glioma-derived versican promotes tumor expansion via glioma-associated microglial/macrophages Toll-like receptor 2 signaling. *Neuro Oncol*. 2015 Feb;17(2):200-10.
162. Huang RH, Quan YJ, Chen JH, Wang TF, Xu M, Ye M, Yuan H, Zhang CJ, Liu XJ, Min ZJ. Osteopontin Promotes Cell Migration and Invasion, and Inhibits Apoptosis and Autophagy in Colorectal Cancer by activating the p38 MAPK Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(5):1851-1864.
163. Huizer K, Zhu C, Chirifi I, Krist B, Zorgman D, van der Weiden M, van den Bosch TPP, Dumas J, Cheng C, Kros JM, Mustafa DA. Periostin Is Expressed by Pericytes and Is Crucial for Angiogenesis in Glioma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2020 Aug 1;79(8):863-872. doi: 10.1093/jnen/nlaa067.PMID: 32647861.
164. Hung NA, Eiholzer RA, Kirs S, Zhou J, Ward-Hartstonge K, Wiles AK, Frampton CM, Taha A, Royds JA, Slatter TL. Telomere profiles and tumor-

- associated macrophages with different immune signatures affect prognosis in glioblastoma. *Mod Pathol*. 2016 Mar;29(3):212-26.
165. Hur EM, Youssef S, Haws ME, Zhang SY, Sobel RA, Steinman L. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nat Immunol*. 2007 Jan;8(1):74-83.
166. Hussain SF, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger AB. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro Oncol*. 2006 Jul;8(3):261-79.
167. Iglesia MD, Parker JS, Hoadley KA, Serody JS, Perou CM, Vincent BG. Genomic Analysis of Immune Cell Infiltrates Across 11 Tumor Types. *J Natl Cancer Inst*. 2016 Jun 22;108(11):djw144.
168. Ilkanizadeh S, Lau J, Huang M, Foster DJ, Wong R, Frantz A, Wang S, Weiss WA, Persson AI. Glial progenitors as targets for transformation in glioma. *Adv Cancer Res*. 2014;121:1-65.
169. Ito T, Hashimoto Y, Tanaka E, Kan T, Tsunoda S, Sato F, Higashiyama M, Okumura T, Shimada Y. An inducible short-hairpin RNA vector against osteopontin reduces metastatic potential of human esophageal squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 15;12(4):1308-16.
170. Ito K, Kon S, Nakayama D, Kurotaki Y, Saito M, Kanayama C, Kimura H, Diao J, Morimoto Y, Matsui T, Uede T. The differential amino acid requirement within osteopontin in alpha4 and alpha9 integrin-mediated cell binding and migration. *Matrix Biol*. 2009 Jan;28(1):11-9. .
171. Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A, Antel JP. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol*. 2005 Oct 1;175(7):4320-30.
172. Jacobs JF, Idema AJ, Bol KF, Grotenhuis JA, de Vries IJ, Wesseling P, Adema GJ. Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors. *J Neuroimmunol*. 2010 Aug 25;225(1-2):195-9.
173. Jan HJ, Lee CC, Shih YL, Hueng DY, Ma HI, Lai JH, Wei HW, Lee HM. Osteopontin regulates human glioma cell invasiveness and tumor growth in mice. *Neuro Oncol*. 2010 Jan;12(1):58-70.

174. Jia D, Zhu Q, Liu H. Osteoprotegerin disruption attenuates HySu-induced pulmonary hypertension through integrin  $\alpha V\beta 3$ /Fak/Akt pathway suppression. *Circ Cardiovasc Genet* 2017; 10(1): e001591.
175. Jinushi M, Nakazaki Y, Carrasco DR. Milk fat globule EGF-8 promotes melanoma progression through coordinated Akt and twist signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2008; 68: 8889–8898.
176. Jinushi M, Nakazaki Y, Dougan M, Carrasco DR, Mihm M, Dranoff G. MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro- and antiinflammatory activities of GM-CSF. *J Clin Invest*. 2007 Jul;117(7):1902-13.
177. Jinushi M, Sato M, Kanamoto A, Itoh A, Nagai S, Koyasu S, Dranoff G, Tahara H. Milk fat globule epidermal growth factor-8 blockade triggers tumor destruction through coordinated cell-autonomous and immune-mediated mechanisms. *J Exp Med*. 2009;206:1317–1326.
178. Jordan JT, Sun W, Hussain SF, DeAngulo G, Prabhu SS, Heimberger AB. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2008 Jan;57(1):123-31.
179. Kaffes I, Szulzewsky F, Chen Z, Herting CJ, Gabanic B, Velázquez Vega JE, Shelton J, Switchenko JM, Ross JL, McSwain LF, Huse JT, Westermarck B, Nelander S, Forsberg-Nilsson K, Uhrbom L, Maturi NP, Cimino PJ, Holland EC, Kettenmann H, Brennan CW, Brat DJ, Hambardzumyan D. Human Mesenchymal glioblastomas are characterized by an increased immune cell presence compared to Proneural and Classical tumors. *Oncoimmunology*. 2019 Aug 22;8(11):e1655360.
180. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420–1428.
181. Kamal A, Lakshma Nayak V, Nagesh N, Vishnuvardhan MV, Subba Reddy NV. Benzo[b]furan derivatives induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human breast cancer cells. *Bioorg Chem*. 2016 Jun;66:124-31.
182. Kamińska A, Enguita FJ, Stępień EŁ. Lactadherin: An unappreciated haemostasis regulator and potential therapeutic agent. *Vascul Pharmacol*. 2018 Feb;101:21-28.

183. Kaminska B, Ochocka N, Segit P. Single-Cell Omics in Dissecting Immune Microenvironment of Malignant Gliomas-Challenges and Perspectives. *Cells*. 2021 Aug 31;10(9):2264.
184. Kanemura T, Miyata H, Makino T, Tanaka K, Sugimura K, Hamada-Uematsu M, Mizote Y, Uchida H, Miyazaki Y, Takahashi T, et al. Immunoregulatory influence of abundant MFG-E8 expression by esophageal cancer treated with chemotherapy. *Cancer Sci*. 2018;109:3393–3402.
185. Kariya Y, Kariya Y. Osteopontin in Cancer: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Int. J. Transl. Med*. 2022, 2, 419–447
186. Katz AM, Amankulor NM, Pitter K, Helmy K, Squatrito M, Holland Astrocyte-specific expression patterns associated with the PDGF-induced glioma microenvironment. *EC.PLoS One*. 2012;7(2):e32453.
187. Kanemura T, Miyata H, Makino T, Tanaka K, Sugimura K, Hamada-Uematsu M, Mizote Y, Uchida H, Miyazaki Y, Takahashi T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Wada H, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Tahara H. Immunoregulatory influence of abundant MFG-E8 expression by esophageal cancer treated with chemotherapy. *Cancer Sci*. 2018 Nov;109(11):3393-3402.
188. Kawashima M, Doh-ura K, Mekada E, Fukui M, Iwaki T. CD9 expression in solid non-neuroepithelial tumors and infiltrative astrocytic tumors. *J Histochem Cytochem*. 2002;50:1195–1203.
189. Keillor JW, Apperley KYP, Akbar A. Inhibitors of tissue transglutaminase. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015;36:32–40
190. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Hölscher C, Müller DN, Luckow B, Brouwer T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci*. 2013 Mar;16(3):273-80.
191. Kilic U, Kilic E, Matter CM, Bassetti CL, Hermann DM: TLR-4 deficiency protects against focal cerebral ischemia and axotomy-induced neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, 2008, 31, 33–40
192. Kim Y, Varn FS, Park SH, Yoon BW, Park HR, Lee C, Verhaak RGW, Paek SH. Perspective of mesenchymal transformation in glioblastoma. *Acta*

- Neuropathol Commun. 2021 Mar 24;9(1):50. doi: 10.1186/s40478-021-01151-4.
193. Kirk EA, Sagawa ZK, McDonald TO, O'Brien KD, Heinecke JW. Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue [corrected]. *Diabetes*. 2008 May;57(5):1254-61.
  194. Kiss T, Jámbor K, Koroknai V, Szász I, Bárdos H, Mokánszki A, Ádány R, Balázs M. Silencing Osteopontin Expression Inhibits Proliferation, Invasion and Induce Altered Protein Expression in Melanoma Cells. *Pathol Oncol Res*. 2021 Mar 5;27:581395.
  195. Kjellman C, Olofsson SP, Hansson O, Von Schantz T, Lindvall M, Nilsson I, Salford LG, Sjögren HO, Widegren B. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int J Cancer*. 2000 May 20;89(3):251-8.
  196. Klimp AH, Hollema H, Kempinga C, van der Zee AG, de Vries EG, Daemen T. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. *Cancer Res*. 2001 Oct 1;61(19):7305-9.
  197. Kmiecik J, Poli A, Brons NH, Waha A, Eide GE, Enger PØ, Zimmer J, Chekenya M. Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *J Neuroimmunol*. 2013 Nov 15;264(1-2):71-83.
  198. Ko DS, Kim SH, Park JY, Lee G, Kim HJ, Kim G, Chi KY, Kim I, Lee J, Won KY, Han J, Son J, Woo DH, Han C, Kim JH. Milk Fat Globule-EGF Factor 8 Contributes to Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020 Feb 10;12(2):403.
  199. Kohata T, Ito S, Masuda T, Furuta T, Nakada M, Ohtsuki SJ. Laminin Subunit Alpha-4 and Osteopontin Are Glioblastoma-Selective Secreted Proteins That Are Increased in the Cerebrospinal Fluid of Glioblastoma Patients. *J Proteome Res*. 2020 Aug 7;19(8):3542-3553.
  200. Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, Resau JH, Vande Woude GF. Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res*. 1997 Dec 1;57(23):5391-8.

201. Kopeć-Szłęzak J. Grasicja jako mikrośrodowisko dojrzewania limfocytów T. *Onkol Pol* 2003; 6: 167-171. 76
202. Kordek R. Gwiaździaki – klasyfikacja histokliniczna i molekularna. *Polski Przegląd Neurologiczny*, 2010; 6 (Ssupl.A): 11–12
203. Kostianovsky AM, Maier LM, Anderson RC, Bruce JN, Anderson DE. Astrocytic regulation of human monocytic/microglial activation. *J Immunol*. 2008 Oct 15;181(8):5425-32.
204. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*. 2005 Dec;6(12):1219-27.
205. Krishna Y, Acha-Sagredo A, Sabat-Pośpiech D, Kipling N, Clarke K, Figueiredo CR, Kalirai H, Coupland SE. Transcriptome Profiling Reveals New Insights into the Immune Microenvironment and Upregulation of Novel Biomarkers in Metastatic Uveal Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 30;12(10):2832.
206. Ku MC, Wolf SA, Respondek D, Matyash V, Pohlmann A, Waiczies S, Waiczies H, Niendorf T, Synowitz M, Glass R, Kettenmann H. GDNF mediates glioblastoma-induced microglia attraction but not astrogliosis. *Acta Neuropathol*. 2013 Apr;125(4):609-20.
207. Kumar V, Behera R, Lohite K, Karnik S, Kundu GC. p38 kinase is crucial for osteopontin-induced furin expression that supports cervical cancer progression. *Cancer Res*. 2010 Dec 15;70(24):10381-91.
208. Kunkel P, Müller S, Schirmacher P, Stavrou D, Fillbrandt R, Westphal M, Lamszus K. Expression and localization of scatter factor/hepatocyte growth factor in human astrocytomas. *Neuro Oncol*. 2001 Apr;3(2):82-8.
209. Kurozumi K, Ichikawa T, Onishi M, Fujii K, Date I. Cilengitide treatment for malignant glioma: current status and future direction. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2012;52(8):539-47.
210. Kusunoki R, Ishihara S, Tada Y, Oka A, Sonoyama H, Fukuba N, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, et al. Role of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in colonic inflammation and carcinogenesis. *J Gastroenterol*. 2015;50:862–875.



211. Lahmar Q, Keirsse J, Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van Ginderachter JA. Tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jan;1865(1):23-34.
212. Lamagna C, Aurrand-Lions M, Imhof BA. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2006 Oct;80(4):705-13
213. Lamour V, Henry A, Kroonen J, Nokin MJ, von Marschall Z, Fisher LW, Chau TL, Chariot S, Sanson M, Delattre JY, Turtoi A, Peulen O, Rogister B, Castronovo V, Bellahcène A. Targeting osteopontin suppresses glioblastoma stem-like cell character and tumorigenicity in vivo. *Int J Cancer*. 2015 Sep 1;137(5):1047-57.
214. Lamour V, Le Mercier M, Lefranc F, Hagedorn M, Javerzat S, Bikfalvi A, Kiss R, Castronovo V, Bellahcene A. Selective osteopontin knockdown exerts anti-tumoral activity in a human glioblastoma model. *Int J Cancer*. 2010 Apr 15;126(8):1797-1805.
215. Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2004 Dec;202:96-105.
216. Lapchak PA, Jiao S, Collins F, Miller PJ. Glial cell line-derived neurotrophic factor: distribution and pharmacology in the rat following a bolus intraventricular injection. *Brain Res*. 1997 Jan 30;747(1):92-102.
217. Laterra J, Rosen E, Nam M, Ranganathan S, Fielding K, Johnston P. Scatter factor/hepatocyte growth factor expression enhances human glioblastoma tumorigenicity and growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jun 27;235(3):743-7.
218. Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 1992;48(2):405-15.
219. Leber TM, Balkwill FR. Regulation of monocyte MMP-9 production by TNF-alpha and a tumour-derived soluble factor (MMPSF). *Br J Cancer*. 1998 Sep;78(6):724-32.
220. Lee B, Ha SY, Song DH, Lee HW, Cho SY, Park CK. High expression of ribonucleotide reductase subunit M2 correlates with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Gut Liver*. 2014 Nov;8(6):662-8.

221. Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*, 2010, 58, 253–263.
222. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):605-12.
223. Lewis CE, Har Dolblas ney AS, Pollard JW. The Multifaceted Role of Perivascular Macrophages in Tumors. *Cancer Cell*. 2016 Jul 11;30(1):18-25.
224. Li N, Wang Y, Liu L, Wang P, Wu X. Effects of MFG-E8 expression on the biological characteristics of ovarian cancer cells via the AKT/mTOR/S6K signalling pathway. *J Obstet Gynaecol*. 2023 Dec;43(1):2151354.
225. Li Q, Qiao G, Ma J, Li Y. Downregulation of VEGF expression attenuates malignant biological behavior of C6 glioma stem cells. *Int J Oncol*. 2014 May;44(5):1581-8.
226. Li Y, Guo S, Zhao K, Conrad C, Driescher C, Rothbart V, Schlomann U, Guerreiro H, Bopp MH, König A, Carl B, Pagenstecher A, Nimsky C, Bartsch JW. ADAM8 affects glioblastoma progression by regulating osteopontin-mediated angiogenesis. *Biol Chem*. 2020 Sep 11;402(2):195-206.
227. Li Z, Liu X, Guo R, Wang P. CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> type 1 regulatory T cells in glioblastoma multiforme suppress T cell responses through multiple pathways and are regulated by tumor-associated macrophages. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Dec;81(Pt A):1-9.
228. Liang Y, Bollen AW, Gupta N. CC chemokine receptor-2A is frequently overexpressed in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2008 Jan;86(2):153-63.
229. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol*. 2005 Oct 1;175(7):4180-3.
230. Lin C, Wang N, Xu C. Glioma-associated microglia/macrophages (GAMs) in glioblastoma: Immune function in the tumor microenvironment and implications for immunotherapy. *Front Immunol*. 2023 Mar 9;14:1123853.
231. Lin L, Huai Q, Huang M, Furie B, Furie BC. Crystal structure of the bovine lactadherin C2 domain, a membrane binding motif, shows similarity to the C2 domains of factor V and factor VIII. *J Mol Biol*. 2007 Aug 17;371(3):717-24.
232. Lisi L, Ciotti GM, Braun D, Kalinin S, Currò D, Dello Russo C, Coli A, Mangiola A, Anile C, Feinstein DL, Navarra P. Expression of iNOS, CD163

- and ARG-1 taken as M1 and M2 markers of microglial polarization in human glioblastoma and the surrounding normal parenchyma. *Neurosci Lett*. 2017 Apr 3;645:106-112.
233. Liu H, Chen A, Guo F, Yuan L. A short-hairpin RNA targeting osteopontin downregulates MMP-2 and MMP-9 expressions in prostate cancer PC-3 cells. *Cancer Lett*. 2010 Sep 1;295(1):27-37.
234. Liu H, Sun Y, Zhang Q, Jin W, Gordon RE, Zhang Y, Wang J, Sun C, Wang ZJ, Qi X, Zhang J, Huang B, Gui Q, Yuan H, Chen L, Ma X, Fang C, Liu YQ, Yu X, Feng S. Pro-inflammatory and proliferative microglia drive progression of glioblastoma. *Cell Rep*. 2021 Sep 14;36(11):109718.
235. Liu H, Wei S, Zhang L, Yuan C, Duan Y, Wang Q. Secreted Phosphoprotein 1 Promotes the Development of Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting Autophagy and Apoptosis. *Pathol Oncol Res*. 2019 Oct;25(4):1487-1495.
236. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1701-11.
237. Lobov IB, Rao S, Carroll TJ, Vallance JE, Ito M, Ondr JK, Kurup S, Glass DA, Patel MS, Shu W, Morrissey EE, McMahon AP, Karsenty G, Lang RA. WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature*. 2005 Sep 15;437(7057):417-21.
238. Logan N, Graham A, Zhao X, Fisher R, Maiti B, Leone G, La Thangue NB. E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene*. 2005 Jul 21;24(31):5000-4.
239. Lohr J1, Ratliff T, Huppertz A, Ge Y, Dictus C, Ahmadi R, Grau S, Hiraoka N, Eckstein V, Ecker RC, Korff T, von Deimling A, Unterberg A, Beckhove P, Herold-Mende C. Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived TGF- $\beta$ . *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 1;17(13):4296-308.
240. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007 Aug;114(2):97-109.

241. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016 Jun;131(6):803-20.
242. Lowther DE, Goods BA, Lucca LE, Lerner BA, Raddassi K, van Dijk D, Hernandez AL, Duan X, Gunel M, Coric V, Krishnaswamy S, Love JC, Hafler DA. PD-1 marks dysfunctional regulatory T cells in malignant gliomas. *JCI Insight.* 2016 Apr 21;1(5):e85935.
243. Lu DY, Leung YM, Cheung CW, Chen YR, Wong KL. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces cell migration and matrix metalloproteinase-13 expression in glioma cell. *Biochem Pharmacol.* 2010 Oct 15;80(8):1201-9.
244. Ma H, Rao L, Wang HL, Mao ZW, Lei RH, Yang ZY, Qing H, Deng YL. Transcriptome analysis of glioma cells for the dynamic response to  $\gamma$ -irradiation and dual regulation of apoptosis genes: a new insight into radiotherapy for glioblastomas. *Cell Death Dis.* 2013 Oct 31;4(10):e895.
245. Ma J, Chen CC, Li M. Macrophages/Microglia in the Glioblastoma Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2021 May 28;22(11):5775.
246. Macedo-Ribeiro S, Bode W, Huber R, Quinn-Allen MA, Kim SW, Ortel TL, Bourenkov GP, Bartunik HD, Stubbs MT, Kane WH, Fuentes-Prior P. Crystal structures of the membrane-binding C2 domain of human coagulation factor V. *Nature.* 1999; 402:434–9
247. Machado-Neto JA, de Melo Campos P, Favaro P, Lazarini M, Lorand-Metze I, Costa FF, Olalla Saad ST, Traina F. Stathmin 1 is involved in the highly proliferative phenotype of high-risk myelodysplastic syndromes and acute leukemia cells. *Leuk Res.* 2014 Feb;38(2):251-7.
248. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:323-50.
249. Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, Huelsken J. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature.* 2011 Dec 7;481(7379):85-9.
250. Mantovani A, Allavena P, Sozzani S, Vecchi A, Locati M, Sica A. Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin Cancer Biol.* 2004b Jun;14(3):155-60.

251. Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol.* 2006 Dec;6(12):907-18.
252. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004a Dec;25(12):677-86
253. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2010; 22: 231-237
254. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002 Nov;23(11):549-55.
255. Marea AO, Jneid H, Palacios IF, Rosenfield K, MacRae CA, Fitzgerald DJ. Growth arrest specific gene (GAS) 6 modulates platelet thrombus formation and vascular wall homeostasis and represents an attractive drug target. *Curr Pharm Des.* 2007;13(26):2656-61
256. Markovic DS, Glass R, Synowitz M, Rooijen Nv, Kettenmann H. Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005 Sep;64(9):754-62.
257. Markovic DS, Vinnakota K, Chirasani S, Synowitz M, Raguette H, Stock K, Sliwa M, Lehmann S, Kälin R, van Rooijen N, Holmbeck K, Heppner FL, Kiwit J, Matyash V, Lehnardt S, Kaminska B, Glass R, Kettenmann H. Gliomas induce and exploit microglial MT1-MMP expression for tumor expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jul 28;106(30):12530-5.
258. Martin SJ Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 2008; 15: 243-250
259. Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, Thomas B, Fabbri M, Crawshaw A, Ho LP, Ten Hacken NH, Cobos Jiménez V, Kootstra NA, Hamann J, Greaves DR, Locati M, Mantovani A, Gordon S. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood.* 2013 Feb 28;121(9):e57-69.
260. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new

- molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006 Nov 15;177(10):7303-11.
261. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014 Mar 3;6:13.
262. Marvel D., Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment : expect the unexpected. *J. Clin. Investig.* 125, 3356–3364 (2015).
263. Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Prinz M. Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Rep.* 2020 Feb 4;30(5):1271-1281.
264. Mathios D, Park CK, Marcus WD, Alter S, Rhode PR, Jeng EK, Wong HC, Pardoll DM, Lim M. Therapeutic administration of IL-15 superagonist complex ALT-803 leads to long-term survival and durable antitumor immune response in a murine glioblastoma model. *Int J Cancer.* 2016 Jan 1;138(1):187-94.
265. Matusan-Ilijas K, Behrem S, Jonjic N, Zarkovic K, Lucin K. Osteopontin expression correlates with angiogenesis and survival in malignant astrocytoma. *Pathol Oncol Res.* 2008 Sep;14(3):293-8
266. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin – a molecule for all seasons *QJM.* 2002 Jan;95(1):3-13.
267. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Monocyte chemotactic protein-3. *Eur Cytokine Netw.* 2001 Oct-Dec;12(4):554-60.
268. Michaylira CZ, Wong GS, Miller CG, Gutierrez CM, Nakagawa H, Hammond R, Klein-Szanto AJ, Lee JS, Kim SB, Herlyn M, Diehl JA, Gimotty P, Rustgi AK. Periostin, a cell adhesion molecule, facilitates invasion in the tumor microenvironment and annotates a novel tumor-invasive signature in esophageal cancer. *Cancer Res.* 2010 Jul 1;70(13):5281-92.
269. Mieczkowski J, Kocyk M, Nauman P, Gabrusiewicz K, Sielska M, Przanowski P, Maleszewska M, Rajan WD, Pszczolkowska D, Tykocki T, Grajkowska W, Kotulska K, Roszkowski M, Kostkiewicz B, Kaminska B. Down-regulation of IKK $\beta$  expression in glioma-infiltrating microglia/macrophages is associated with defective inflammatory/immune gene responses in glioblastoma. *Oncotarget.* 2015 Oct 20;6(32):33077-90.
270. Mikheev AM, Mikheeva SA, Trister AD, Tokita MJ, Emerson SN, Parada CA, Born DE, Carnemolla B, Frankel S, Kim DH, Oxford RG, Kosai Y, Tozer-Fink KR, Manning TC, Silber JR, Rostomily RC. Periostin is a novel therapeutic

- target that predicts and regulates glioma malignancy. *Neuro Oncol.* 2015 Mar;17(3):372-82.
271. Miksa M., Wu R., Dong W., Das P., Yang D., Wang P. Dendritic cell-derived exosomes containing milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII attenuate proinflammatory responses in sepsis. *Shock.* 2006;25:586–593. doi: 10.1097/01.shk.0000209533.22941.d0.
272. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6166-73.
273. Mirnikjoo B, Balasubramanian K, Schroit AJ. Suicidal membrane repair regulates phosphatidylserine externalization during apoptosis. *J Biol Chem.* 2009 Aug 21;284(34):22512-6
274. Mitsuhashi M, Liu J, Cao S, Shi X, Ma X. Regulation of interleukin-12 gene expression and its anti-tumor activities by prostaglandin E2 derived from mammary carcinomas. *J Leukoc Biol.* 2004 Aug;76(2):322-32
275. Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 Oct;6(10):764-75.
276. Morra L, Rechsteiner M, Casagrande S, Duc Luu V, Santimaria R, Diener PA, Sulser T, Kristiansen G, Schraml P, Moch H, Soltermann A. Relevance of periostin splice variants in renal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2011 Sep;179(3):1513-21.
277. Motegi S., Leitner W.W., Lu M., Tada Y., Sárdy M., Wu C., Chavakis T., Udey M.C. Pericyte-derived MFG-E8 regulates pathologic angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2024–2034.
278. Movahedi K, Guilliams M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood.* 2008 Apr 15;111(8):4233-44.
279. Mrdjen D, Pavlovic A, Hartmann FJ, Schreiner B, Utz SG, Leung BP, Lelios I, Heppner FL, Kipnis J, Merkler D, Greter M, Becher B. High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease. *Immunity.* 2018 Feb 20;48(2):380-395.e6.

280. Müller A, Brandenburg S, Turkowski K, Müller S, Vajkoczy P. Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells. *Int. J. Cancer*. 2015;137:278–288.
281. Müller S, Kohanbash G, Liu SJ, Alvarado B, Carrera D, Bhaduri A, Watchmaker PB, Yagnik G, Di Lullo E, Malatesta M, Amankulor NM, Kriegstein AR, Lim DA, Aghi M, Okada H, Diaz A. Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in their tumor microenvironment. *Genome Biol* 18, 234 (2017)
282. Munder M1, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4<sup>+</sup> T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol*. 1998 Jun 1;160(11):5347-54.
283. Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol*. 2011a Apr;89(4):557-63.
284. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011b Oct 14;11(11):723-37.
285. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):14-20.
286. Nagano N, Sasaki H, Aoyagi M, Hirakawa K. Invasion of experimental rat brain tumor: early morphological changes following microinjection of C6 glioma cells. *Acta Neuropathol*. 1993;86(2):117-25.
287. Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2010; 36: 321–331
288. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 2001 Sep 3;194(5):629-44.



289. Napoli S, Scuderi C, Gattuso G, Bella VD, Candido S, Basile MS, Libra M, Falzone L. Functional Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Melanoma. *Cells*. 2020 May 7;9(5):1151.
290. Nau GJ, Guilfoile P, Chupp GL, Berman JS, Kim SJ, Kornfeld H, Young RA. A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6414-9.
291. Neutzner M, Lopez T, Feng X, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Udey MC. MFG-E8/lactadherin promotes tumor growth in an angiogenesis-dependent transgenic mouse model of multistage carcinogenesis. *Cancer Res*. 2007 Jul 15;67(14):6777-85.
292. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005 May 27;308(5726):1314-8.
293. Nishie A, Ono M, Shono T, Fukushi J, Otsubo M, Onoue H, Ito Y, Inamura T, Ikezaki K, Fukui M, Iwaki T, Kuwano M. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res*. 1999 May;5(5):1107-13.
294. Nucera S, Biziato D, De Palma M. The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration. *Int J Dev Biol*. 2011;55(4-5):495-503.
295. Oba J, Moroi Y, Nakahara T, Abe T, Hagihara A, Furue M. Expression of milk fat globule epidermal growth factor-VIII may be an indicator of poor prognosis in malignant melanoma. *Br J Dermatol*. 2011;165:506–512.
296. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007 Jan 15;13(2 Pt 2):721s-726s.
297. Ochocka N, Kaminska B. Microglia Diversity in Healthy and Diseased Brain: Insights from Single-Cell Omics. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 16;22(6):3027.
298. Ochocka N, Segit P, Walentynowicz KA, Wojnicki K, Cyranowski S, Swatler J, Mieczkowski J, Kaminska B. Single-cell RNA sequencing reveals functional heterogeneity of glioma-associated brain macrophages. *Nat Commun*. 2021 Feb 19;12(1):1151.

299. Ogura K, Nara K, Watanabe Y, Kohno K, Tai T, Sanai Y. Cloning and expression of cDNA for Oacetylation of GD3 ganglioside. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996; 225:932–8.
300. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol*. 2005 Jan;109(1):93-108.
301. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*. 2007 May;170(5):1445-53.
302. Ojalvo LS, Whittaker CA, Condeelis JS, Pollard JW. Gene expression analysis of macrophages that facilitate tumor invasion supports a role for Wnt-signaling in mediating their activity in primary mammary tumors. *J Immunol*. 2010 Jan 15;184(2):702-12.
303. Okada H, Kohanbash G, Zhu X, Kastenhuber ER, Hoji A, Ueda R, Fujita M. Immunotherapeutic approaches for glioma. *Crit Rev Immunol*. 2009;29(1):1-42.
304. Okada M, Saio M, Kito Y, Ohe N, Yano H, Yoshimura S, Iwama T, Takami T. Tumor-associated macrophage/microglia infiltration in human gliomas is correlated with MCP-3, but not MCP-1. *Int J Oncol*. 2009 Jun;34(6):1621-7.
305. Okamoto A, Sakakura K, Takahashi H, Motegi SI, Kaira K, Yokobori-Kuwabara Y, Ishikawa O, Chikamatsu K. Immunological and Clinicopathological Significance of MFG-E8 Expression in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2020 Apr;26(2):1263-1268.
306. Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell#binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Dec;83(23):8819-23..
307. Ooishi T, Nadano D, Matsuda T, Oshima K. Extracellular vesicle-mediated MFG-E8 localization in the extracellular matrix is required for its integrin-dependent function in mouse mammary epithelial cells. *Genes Cells*. 2017 Oct;22(10):885-899.
308. O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, Berman JS. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol*. 1999 Jan 15;162(2):1024-31.

309. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol.* 2019 May 24;10:1084.
310. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011; 11: 85-97
311. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem.* 2008 Jan;54(1):24-38.
312. Paoletti P, Chiabrando C, Gaetani P, Castelli MG, Butti G, Martelli L, Rolli M. Prostaglandins in human brain tumors. *J Neurosurg Sci.* 1989 Jan-Mar;33(1):65-9.
313. Patarca R, Freeman GJ, Singh RP, Wei FY, Durfee T, Blattner F, Regnier DC, Kozak CA, Mock BA, Morse HC Structural and functional studies of the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene. Definition of a novel T cell-dependent response associated with genetic resistance to bacterial infection. *J Exp Med* (1989) 170 (1): 145–161.
314. Patarca R, Saavedra RA, Cantor H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol.* 1993;13(3-4):225-46.
315. Patel DM, Foreman PM, Nabors LB, Riley KO, Gillespie GY, Markert JM. Design of a Phase I Clinical Trial to Evaluate M032, a Genetically Engineered HSV-1 Expressing IL-12, in Patients with Recurrent/Progressive Glioblastoma Multiforme, Anaplastic Astrocytoma, or Gliosarcoma. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2016 Jun;27(2):69-78.
316. Penfield W. Microglia and the Process of Phagocytosis in Gliomas. *Am J Pathol.* 1925 Jan;1(1):77-90.15.
317. Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience.* 1985 Jun;15(2):313-26.
318. 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.: Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 2006; 9: 157–173;

319. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, Shevach EM. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med*. 2002 Jul 15;196(2):237-46.
320. Pietras A, Hansford LM, Johnsson AS, Bridges E, Sjölund J, Gisselsson D, Rehn M, Beckman S, Noguera R, Navarro S, Cammenga J, Fredlund E, Kaplan DR, Pålman S. HIF-2alpha maintains an undifferentiated state in neural crest-like human neuroblastoma tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Sep 29;106(39):16805-10.
321. Pietras A, Katz AM, Ekström EJ, Wee B, Halliday JJ, Pitter KL, Werbeck JL, Amankulor NM, Huse JT, Holland EC. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell*. 2014 Mar 6;14(3):357-69.
322. Pitarresi JR, Norgard RJ, Chiarella AM, Suzuki K, Bakir B, Sahu V, Li J, Zhao J, Marchand B, Wengyn MD, Hsieh A, Kim IK, Zhang A, Sellin K, Lee V, Takano S, Miyahara Y, Ohtsuka M, Maitra A, Notta F, Kremer R, Stanger BZ, Rustgi AK. PTHrP Drives Pancreatic Cancer Growth and Metastasis and Reveals a New Therapeutic Vulnerability. *Cancer Discov*. 2021 Jul;11(7):1774-1791.
323. Platten M, Kretz A, Naumann U, Aulwurm S, Egashira K, Isenmann S, Weller M. Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Ann Neurol*. 2003 Sep;54(3):388-92.
324. Platten M, Wick W, Weller M. Malignant glioma biology: role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc Res Tech*. 2001 Feb 15;52(4):401-10.
325. Polat B, Wohlleben G, Kosmala R, Lisowski D, Mantel F, Lewitzki V, Löhr M, Blum R, Herud P, Flentje M, Monoranu CM. Differences in stem cell marker and osteopontin expression in primary and recurrent glioblastoma. *Cancer Cell Int*. 2022 Feb 19;22(1):87.
326. Pombo Antunes AR, Scheyltjens I, Lodi F, Messiaen J, Antoranz A, Duerinck J, Kancheva D, Martens L, De Vlamincck K, Van Hove H, Kjølner Hansen SS, Bosisio FM, Van der Borgh K, De Vleeschouwer S, Sciot R, Bouwens L, Verfaillie M, Vandamme N, Vandenbroucke RE, De Wever O, Saeys Y, Guillems M, Gysemans C, Neyns B, De Smet F, Lambrechts D, Van

- Ginderachter JA, Movahedi K. Single-cell profiling of myeloid cells in glioblastoma across species and disease stage reveals macrophage competition and specialization. *Nat Neurosci.* 2021 Apr;24(4):595-610.
327. Prat E, Baron P, Meda L, Scarpini E, Galimberti D, Ardolino G, Catania A, Scarlato G. The human astrocytoma cell line U373MG produces monocyte chemotactic protein (MCP)-1 upon stimulation with beta-amyloid protein. *Neurosci Lett.* 2000 Apr 14;283(3):177-80.
328. Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature.* 1999; 402:439–42.
329. Preusser M, de Ribaupierre S, Wohrer A, Erridge SC, Hegi M, Weller M, Stupp R. Current concepts and management of glioblastoma. *Ann. Neurol.* 2011, 70, 9-12;
330. Prince CW, Oosawa T, Butler WT, Tomana M, Bhowm AS, Bhowm M, Schrohenloher RE. Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Biol Chem.* 1987 Feb 25;262(6):2900-7.
331. Prośniak M, Harshyne LA, Andrews DW, Kenyon LC, Bedelbaeva K, Apanasovich TV, Heber-Katz E, Curtis MT, Cotzia P, Hooper DC. Glioma grade is associated with the accumulation and activity of cells bearing M2 monocyte markers. *Clin Cancer Res.* 2013 Jul 15;19(14):3776-86.
332. Putluri N, Maity S, Kommagani R, Creighton CJ, Putluri V, Chen F, Nanda S, Bhowmik SK, Terunuma A, Dorsey T, Nardone A, Fu X, Shaw C, Sarkar TR, Schiff R, Lydon JP, O'Malley BW, Ambs S, Das GM, Michailidis G, Sreekumar A. Pathway-centric integrative analysis identifies RRM2 as a prognostic marker in breast cancer associated with poor survival and tamoxifen resistance. *Neoplasia.* 2014 May;16(5):390-402.
333. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010 Apr 2;141(1):39-51
334. Ratajczak-Wielgomas K, Dziegiel P. The role of periostin in neoplastic processes. *Folia Histochem Cytobiol.* 2015;53(2):120-32
335. Rath O, Kozielski F. Kinesins and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012 Jul 24;12(8):527-39.

336. Raychaudhuri B, Rayman P, Ireland J, Ko J, Rini B, Borden EC, Garcia J, Vogelbaum MA, Finke J. Myeloid-derived suppressor cell accumulation and function in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2011 Jun;13(6):591-9.
337. Reardon DA, Brandes AA, Omuro A, Mulholland P, Lim M, Wick A, Baehring J, Ahluwalia MS, Roth P, Bähr O, Phuphanich S, Sepulveda JM, De Souza P, Sahebjam S, Carleton M, Tatsuoka K, Taitt C, Zvirtes R, Sampson J, Weller M. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2020 Jul 1;6(7):1003-1010.
338. Ren H, Wang Z, Zhang S. IL-17A promotes the migration and invasiveness of colorectal cancer cells through NF- $\kappa$ B-mediated MMP expression. *Oncol Res* 2016; 23: 249–256.
339. Reufsteck C, Lifshitz-Shovali R, Zepp M, Bäuerle T, Kübler D, Golomb G, Berger MR. Silencing of skeletal metastasis-associated genes impairs migration of breast cancer cells and reduces osteolytic bone lesions. *Clin Exp Metastasis.* 2012 Jun;29(5):441-56.
340. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, Gilbert J, Ochoa AC. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med.* 2005 Oct 3;202(7):931-9.
341. Rolle CE, Sengupta S, Lesniak MS. Mechanisms of immune evasion by gliomas. *Adv Exp Med Biol.* 2012;746:53-76.
342. Rollo EE, Laskin DL, Denhardt ST. Osteopontin inhibits nitric oxide production and cytotoxicity by activated RAW264.7 macrophages. *J Leukoc Biol.* 1996 Sep;60(3):397-404.
343. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Ann Rev Immunol* 1994; 12: 227-257.
344. Rosińska S, Gavard J. Tumor Vessels Fuel the Fire in Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2021
345. Rossi ML, Jones NR, Candy E, Nicoll JA, Compton JS, Hughes JT, Esiri MM, Moss TH, Cruz-Sanchez FF, Coakham HB. The mononuclear cell infiltrate compared with survival in high-grade astrocytomas. *Acta Neuropathol.* 1989;78(2):189-93.

346. Sacks D, Baxter B, Campbell BCV, Carpenter JS, Cognard C, Dippel D, Eesa M, Fischer U, Hausegger K, Hirsch JA, Shazam Hussain M, Jansen O, Jayaraman MV, Khalessi AA, Kluck BW, Lavine S, Meyers PM, Ramee S, Rüfenacht DA, Schirmer CM, Vorwerk D. (From the American Association of Neurological Surgeons (AANS), American Society of Neuroradiology (ASNR), Cardiovascular and Interventional Radiology Society of Europe (CIRSE), Canadian Interventional Radiology Association (CIRA), Congress of Neurological Surgeons (CNS), European Society of Minimally Invasive Neurological Therapy (ESMINT), European Society of Neuroradiology (ESNR), European Stroke Organization (ESO), Society for Cardiovascular Angiography and Interventions (SCAI), Society of Interventional Radiology (SIR), Society of NeuroInterventional Surgery (SNIS), and World Stroke Organization (WSO), ) Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke. *Int J Stroke*. 2018 Aug;13(6):612-632.
347. Saitoh Y, Kuratsu J, Takeshima H, Yamamoto S, Ushio Y. Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy. *Lab Invest* 1995 Jan;72(1):55-63.
348. Sani S, Messe M, Fuchs Q, Pierrelvecin M, Laquerriere P, Entz-Werle N, Reita D, Etienne-Selloum N, Bruban V, Choulier L, Martin S, Dontenwill M. Biological Relevance of RGD-Integrin Subtype-Specific Ligands in Cancer. *Chembiochem*. 2021 Apr 6;22(7):1151-1160.
349. Sangaletti S, Tripodo C, Sandri S, Torselli I, Vitali C, Ratti C, Botti L, Burocchi A, Porcasi R, Tomirotti A, Colombo MP, Chiodoni C. Osteopontin shapes immunosuppression in the metastatic niche. *Cancer Res*. 2014 Sep 1;74(17):4706-19.
350. Santini SM, Lapenta C, Donati S, Spadaro F, Belardelli F, Ferrantini M. Interferon- $\alpha$ -conditioned human monocytes combine a Th1-orienting attitude with the induction of autologous Th17 responses: role of IL-23 and IL-12. *PLoS One*. 2011 Feb 28;6(2):e17364.
351. Sarkaria JN, Hu LS, Parney IF, Pafundi DH, Brinkmann DH, Laack NN, Giannini C, Burns TC, Kizilbash SH, Laramy JK, Swanson KR, Kaufmann TJ, Brown PD, Agar NYR, Galanis E, Buckner JC, Elmquist WF. Is the blood-

- brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro Oncol.* 2018 Jan 22;20(2):184-191.
352. Shao Z, Morser J, Leung LL. Thrombin cleavage of osteopontin disrupts a pro-chemotactic sequence for dendritic cells, which is compensated by the release of its pro-chemotactic C-terminal fragment. *J Biol Chem* 2014; 289: 27146–27158.
353. Schartner JM, Hagar AR, Van Handel M, Zhang L, Nadkarni N, Badie B. Impaired capacity for upregulation of MHC class II in tumor-associated microglia. *Glia.* 2005 Sep;51(4):279-85.
354. Scherer HJ. Structural development in gliomas. *Am. J. Cancer,* 34 (1938), pp. 333–351
355. Schmidek HH, Nielsen SL, Schiller AL, Messer J. Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitrosomethylurea. *J Neurosurg.* 1971 Mar;34(3):335-40.
356. Schmidt AM, Lu W, Sindhava VJ, Huang Y, Burkhardt JK, Yang E, Riese MJ, Maltzman JS, Jordan MS, Kambayashi T. Regulatory T cells require TCR signaling for their suppressive function. *J Immunol.* 2015 May 1;194(9):4362-70.
357. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 2001 Jun 15;61(12):4756-60.
358. Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dorries R, Butcher GW, ter Meulen V: Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1991; 88, 7438–7442.
359. Serini G, Napione L, Arese M, Bussolino F. Besides adhesion: new perspectives of integrin functions in angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 2008 May 1;78(2):213-22.
360. Shao C, Novakovic VA, Head JF, Seaton BA, Gilbert GE. Crystal structure of lactadherin C2 domain at 1.7Å resolution with mutational and computational analyses of its membrane-binding motif. *J Biol Chem.* 2008 Mar 14;283(11):7230-41



361. Shao Z, Morser J, Leung LL. Thrombin cleavage of osteopontin disrupts a pro-chemotactic sequence for dendritic cells, which is compensated by the release of its pro-chemotactic C-terminal fragment. *J Biol Chem*. 2014 Sep 26;289(39):27146-27158
362. Shen SH, Woroniecka K, Barbour AB, Fecci PE, Sanchez-Perez L, Sampson JH. CAR T cells and checkpoint inhibition for the treatment of glioblastoma. *Expert Opin Biol Ther*. 2020 Jun;20(6):579-591.
363. Shevach EM, Davidson TS, Huter EN, Dipaolo RA, Andersson J. Role of TGF-Beta in the induction of Foxp3 expression and T regulatory cell function. *J Clin Immunol*. 2008 Nov;28(6):640-6.
364. Shi J, Heegaard CW, Rasmussen JT, Gilbert GE. Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 17;1667(1):82-90.
365. Shi J, Shi Y, Waehrens LN, Rasmussen JT, Heegaard CW, Gilbert GE. Lactadherin detects early phosphatidylserine exposure on immortalized leukemia cells undergoing programmed cell death. *Cytometry A*. 2006 Dec 1;69(12):1193-201.
366. Shir A, Levitzki A, Wagner E, Orgis M: Nucleic acid-based therapeutics for glioblastoma. *Anticancer Agents Med. Chem.*, In: *Medicinal Chemistry*, 2011, 6, 563-570
367. Sibenaller ZA, Etame AB, Ali MM, Barua M, Braun TA, Casavant TL, Ryken TC. Genetic characterization of commonly used glioma cell lines in the rat animal model system. *Neurosurg Focus*. 2005 Oct 15;19(4):E1.
368. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006 Apr;42(6):717-27.
369. Silvestre JS, Théry C, Hamard G, Boddart J, Aguilar B, Delcayre A, Houbron C, Tamarat R, Blanc-Brude O, Heeneman S, Clergue M, Duriez M, Merval R, Lévy B, Tedgui A, Amigorena S, Mallat Z. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med*. 2005;11:499–506.
370. Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, Hainzl A, Schatz S, Qi Y, Schlecht A, Weiss JM, Wlaschek M, Sunderkötter C, Scharffetter-Kochanek K. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage

- population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J Clin Invest.* 2011 Mar;121(3):985-97.
371. Singh RP, Patarca R, Schwartz J, Singh P, Cantor H. Definition of a specific interaction between the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) protein and murine macrophages in vitro and its effect upon macrophages in vivo. *J Exp Med.* 1990 Jun 1;171(6):1931-42.
372. Sippel TR, White J, Nag K, Tsvankin V, Klaassen M, Kleinschmidt-DeMasters BK, Waziri A. Neutrophil degranulation and immunosuppression in patients with GBM: restoration of cellular immune function by targeting arginase I. *Clin Cancer Res.* 2011 Nov 15;17(22):6992-7002
373. Sliwa M, Markovic D, Gabrusiewicz K, Synowitz M, Glass R, Zawadzka M, Wesolowska A, Kettenmann H, Kaminska B. The invasion promoting effect of microglia on glioblastoma cells is inhibited by cyclosporin A. *Brain.* 2007 Feb;130(Pt 2):476-89.
374. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol.* 2006; 90():1-50.
375. Soki FN, Koh AJ, Jones JD, Kim YW, Dai J, Keller ET, Pienta KJ, Atabai K, Roca H, McCauley LK. Polarization of prostate cancer-associated macrophages is induced by milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8)-mediated efferocytosis. *J Biol Chem.* 2014;289:24560–24572.
376. Sreeranthreddy P, Srinivasan H, Kumar DM, Nijaguna MB, Sridevi S, Vrinda M, Arivazhagan A, Balasubramaniam A, Hegde AS, Chandramouli BA, Santosh V, Rao MRS, Kondaiah P, Somasundaram K. Identification of potential serum biomarkers of glioblastoma: serum osteopontin levels correlate with poor prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Jun;19(6):1409-22.
377. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* 2010 Jan 1;70(1):68-77
378. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 1992 Jul 1;176(1):287-92.

379. Streit WJ. Cellular immune response in brain tumors. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994 Apr;20(2):205-6.
380. Stubbs JD, Lekutis C, Singer KL, Bui A, Yuzuki D, Srinivasan U, Parry G. cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Nov;87(21):8417-21.
381. Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PM, Grabenbauer GG, Ochsenein AF, Simon M, Dietrich PY, Pietsch T, Hicking C, Tonn JC, Diserens AC, Pica A, Hermisson M, Krueger S, Picard M, Weller M. Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2010 Jun 1;28(16):2712-8.
382. Stupp R, B cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences rada M, van den Bent MJ, Tonn JC, Pentheroudakis G; ESMO Guidelines Working Group. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014 Sep;25 Suppl 3:iii93-101.
383. Su M, Laskowski L, Hoffman RS. Hyperthermia and Severe Rhabdomyolysis From Synthetic Cannabinoids. *Am J Emerg Med.* 2016 Aug;34(8):1690.
384. Sugano G, Bernard-Pierrot I, Laé M, Battail C, Allory Y, Stransky N, Krumeich S, Lepage ML, Maille P, Donnadieu MH, Abbou CC, Benhamou S, Leuret T, Sastre-Garau X, Amigorena S, Radvanyi F, Théry C. Milk fat globule--epidermal growth factor--factor VIII (MFGE8)/lactadherin promotes bladder tumor development. *Oncogene.* 2011 Feb 10;30(6):642-53.
385. Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T. Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J Immunol.* 1993 Aug 15;151(4):2150-8.
386. Swallow CJ, Murray MP, Guillem JG. Metastatic colorectal cancer cells induce matrix metalloproteinase release by human monocytes. *Clin Exp Metastasis.* 1996 Jan;14(1):3-11.

387. Szatmári T, Lumniczky K, Desaknai S, Trajchevski S, Higvegi EJ, Hamada H, Safrany G. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci.* 2006 97 (6): 546–554.
388. Szulzewsky F, Pelz A, Feng X, Synowitz M, Markovic D, Langmann T6, Holtman IR, Wang X, Eggen BJL, Boddeke HWGM, Hambardzumyan D, Wolf SA, Kettenmann H Glioma-associated microglia/macrophages display an expression profile different from M1 and M2 polarization and highly express Gpnmb and Spp1. *PLoS One* 2015 Feb 6;10(2):e0116644
389. Szulzewsky F, Arora S, Witte L, Ulas T, Markovic D, Schultze JL , Holland EC, Synowitz M, Wolf SA, Kettenmann H Human glioblastoma-associated microglia/monocytes express a distinct RNA profile compared to human control and murine samples. *Glia.* 2016 Aug;64(8):1416-36.
390. Szulzewsky F, Schwendinger N, Güneykaya D, Cimino PJ, Hambardzumyan D, Synowitz M, Holland EC, Kettenmann H. Loss of host-derived osteopontin creates a glioblastoma-promoting microenvironment. *Neuro Oncol.* 2018 Feb 19;20(3):355-366.
391. Tabatabai G, Stupp R, van den Bent MJ, Hegi ME, Tonn JC, Wick W, Weller M. Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective. *Acta Neuropathol.* 2010 Nov;120(5):585-92.
392. Takami S, Nishikawa H, Minami M, Nishiyori A, Sato M, Akaike A, Satoh M. Induction of macrophage inflammatory protein MIP-1alpha mRNA on glial cells after focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci Lett.* 1997 May 23;227(3):173-6.
393. Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J.* 1993 Aug 15;294 ( Pt 1):271-8.
394. Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res.* 2017 Jan;27(1):109-118.
395. Teng MW, Bowman EP, McElwee JJ, Smyth MJ, Casanova JL, Cooper AM, Cua DJ. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med.* 2015 Jul;21(7):719-29.
396. Tibaldi L, Leyman S, Nicolas A, Notebaert S, Dewulf M, Ngo TH, Zuany-Amorim C, Amzallag N, Bernard-Pierrot I, Sastre-Garau X, Théry C. New blocking antibodies impede adhesion, migration and survival of ovarian

- cancer cells, highlighting MFGE8 as a potential therapeutic target of human ovarian carcinoma. *PLoS One*. 2013 Aug 16;8(8):e72708.
397. Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 19446-19451
398. Toy H, Yavas O, Eren O, Genc M, Yavas C. Correlation between osteopontin protein expression and histological grade of astrocytomas. *Pathol Oncol Res*. 2009 Jun;15(2):203-7.
399. Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature*. 1996 Jul 4;382(6586):80-3.
400. Tremblay MÈ, Lowery RL, Majewska AK. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol*. 2010 Nov 2;8(11):e1000527
401. Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol*. 1996 Apr;59(4):505-11
402. Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson AS, Sieber BA, Grigoriou M, Kilkenny C, Salazar-Gruesso E, Pachnis V, Arumäe U. Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature*. 1996 Jun 27;381(6585):785-9.
403. Tsai WC, Lee HS, Lin CK, Chen A, Nieh S, Ma, HI. The association of osteopontin and LMX1A expression with World Health Organization grade in meningiomas and gliomas. *Histopathology*. 2012 Nov;61(5):844-56.
404. Tucci M, Stucci S, Silvestris F. Does cilengitide deserve another chance? *Lancet Oncol*. 2014 Dec;15(13):e584-e585.
405. Tu H, Zhou Z, Liang Q, Li Z, Li D, Qing J, Wang H, Zhang L. CXCR4 and SDF-1 production are stimulated by hepatocyte growth factor and promote glioma cell invasion. *Onkologie*. 2009 Jun;32(6):331-6.
406. Uchiyama A, Yamada K, Ogino S, Yokoyama Y, Takeuchi Y, Udey MC, Ishikawa O, Motegi S. MFG-E8 regulates angiogenesis in cutaneous wound healing. *Am J Pathol*. 2014 Jul;184(7):1981-90.

407. Unsicker K. GDNF: a cytokine at the interface of TGF-betas and neurotrophins. *Cell Tissue Res.* 1996 Nov;286(2):175-8.
408. Urbanavičiūtė R, Skauminas K, Skiriutė D. The Evaluation of AREG, MMP-2, CHI3L1, GFAP, and OPN Serum Combined Value in Astrocytic Glioma Patients' Diagnosis and Prognosis. *Brain Sci.* 2020 Nov 19;10(11):872.
409. Utispan K, Sonongbua J, Thuwajit P, Chau-In S, Pairojkul C, Wongkham S, Thuwajit C. Periostin activates integrin  $\alpha 5\beta 1$  through a PI3K/AKT-dependent pathway in invasion of cholangiocarcinoma. *Int J Oncol.* 2012 Sep;41(3):1110-8
410. Van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology.* 2006;211(6-8):487-501.
411. Van Hove H, Martens L, Scheyltjens I, De Vlaminck K, Pombo Antunes AR, De Prijck S, Vandamme N, De Schepper S, Van Isterdael G, Scott CL, Aerts J, Berx G, Boeckxstaens GE, Vandenbroucke RE, Vereecke L, Moechars D, Guilliams M, Van Ginderachter JA, Saeys Y, Movahedi K. A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment. *Nat Neurosci.* 2019 Jun;22(6):1021-1035.
412. Veglia F, Sanseviero E, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol.* 2021 Aug;21(8):485-498.
413. Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, Pucci F, Scielzo C, Zonari E, Mazzieri R, Doglioni C, Naldini L. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood.* 2007 Jun 15;109(12):5276-85.
414. Venteicher AS, Tirosh I, Hebert C, Yizhak K, Neftel C, Filbin MG, Hovestadt V, Escalante LE, Shaw ML, Rodman C, Gillespie SM, Dionne D, Luo CC, Ravichandran H, Mylvaganam R, Mount C, Onozato ML, Nahed BV, Wakimoto H, Curry WT, Iafrate AJ, Rivera MN, Frosch MP, Golub TR, Brastianos PK, Getz G, Patel AP, Monje M, Cahill DP, Rozenblatt-Rosen O, Louis DN, Bernstein BE, Regev A, Suvà ML. Decoupling genetics, lineages,

- and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq. *Science*. 2017 Mar 31;355(6332):eaai8478.
415. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E., Wang V., Qi Y., Wilkerson M.D., Miller C.R., 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.; Cancer Genome Atlas Research Network.: Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 2010; 17: 98–110
416. Verma AK, Ali SA, Singh P, Kumar S, Mohanty AK. Transcriptional Repression of MFG-E8 Causes Disturbance in the Homeostasis of Cell Cycle Through DOCK/ZP4/STAT Signaling in Buffalo Mammary Epithelial Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Apr 1;9:568660.
417. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff TH. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4560-5.
418. Vidyarthi A, Agnihotri T, Khan N, Singh S, Tewari MK, Radotra BD, Chatterjee D, Agrewala JN. Predominance of M2 macrophages in gliomas leads to the suppression of local and systemic immunity. *Cancer Immunol Immunother*. 2019 Dec;68(12):1995-2004.
419. Vigneswaran K, Neill S, Hadjipanayis CG. Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification. *Ann Transl Med*. 2015 May;3(7):95.
420. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827–839
421. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2005 Apr;6(4):338-44.
422. Waehrens LN, Heegaard CW, Gilbert GE, Rasmussen JT. Bovine lactadherin as a calcium-independent imaging agent of phosphatidylserine

- expressed on the surface of apoptotic HeLa cells. *J Histochem Cytochem* . 2009 Oct;57(10):907-14.
423. Wainwright DA, Dey M, Chang A, Lesniak MS. Targeting Tregs in Malignant Brain Cancer: Overcoming IDO. *Front Immunol*. 2013 May 15;4:116.
424. Wainwright DA, Dey M, Chang A, Lesniak MS. Targeting Tregs in Malignant Brain Cancer: Overcoming IDO. *Front Immunol*. 2013 May 15;4:116.
425. Walentynowicz KA, Ochocka N, Pasierbinska M, Wojnicki K, Stepniak K, Mieczkowski J, Ciechomska IA, Kaminska B. In Search for Reliable Markers of Glioma-Induced Polarization of Microglia. *Front Immunol*. 2018 Jun 15;9:1329.
426. Wan G1, Too HP. A specific isoform of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha 1 regulates RhoA expression and glioma cell migration. *J Neurochem*. 2010 Nov;115(3):759-70.
427. Wan YY, Flavell RA. Tgf-beta and regulatory t cell in immunity and autoimmunity. *Journal of clinical immunology* 2008;28:647-659
428. Wang C, Chen Y, Wang Y, Liu X, Liu Y, Li Y, Chen H, Fan C, Wu D, Yang J. Inhibition of COX-2, mPGES-1 and CYP4A by isoliquiritigenin blocks the angiogenic Akt signaling in glioma through ceRNA effect of miR-194-5p and lncRNA NEAT1. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019
429. Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, deCarvalho AC, Lyu S, Li P, Li Y, Barthel F, Cho HJ, Lin YH, Satani N, Martinez-Ledesma E, Zheng S, Chang E, Sauvé CG, Olar A, Lan ZD, Finocchiaro G, Phillips JJ, Berger MS, Gabrusiewicz KR, Wang G, Eskilsson E, Hu J, Mikkelsen T, DePinho RA, Muller F, Heimberger AB, Sulman EP, Nam DH, Verhaak RGW. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell*. 2017 Jul 10;32(1):42-56.e6.
430. Wang R, Wang Z, Yang J, Liu X, Wang L, Guo X, Zeng F, Wu M, Li G. LRRC4 inhibits the proliferation of human glioma cells by modulating the expression of STMN1 and microtubule polymerization. *J Cell Biochem*. 2011 Dec;112(12):3621-9.
431. Wang Y, Jiang T. Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management. *Cancer Lett*. 2013 May 1;331(2):139-46.



432. Wang Z, Zhang C, Liu X, Wang Z, Sun L, Li G, Liang J, Hu H, Liu Y, Zhang W, Jiang T. Molecular and clinical characterization of PD-L1 expression at transcriptional level via 976 samples of brain glioma. *Oncoimmunology*. 2016 Jun 16;5(11):e1196310.
433. Warth A, Simon P, Capper D, Goeppert B, Tabatabai G, Herzog H, Dietz K, Stubenvoll F, Ajaaj R, Becker R, Weller M, Meyermann R, Wolburg H, Mittelbronn M. Expression pattern of the water channel aquaporin-4 in human gliomas is associated with blood-brain barrier disturbance but not with patient survival. *J Neurosci Res*. 2007 May 1;85(6):1336-46. doi: 10.1002/jnr.21224.
434. Waziri A, Killory B, Ogden AT 3rd, Canoll P, Anderson RC, Kent SC, Anderson DE, Bruce JN Preferential in situ CD4+CD56+ T cell activation and expansion within human glioblastoma. *J Immunol*. 2008 Jun 1; 180(11):7673-80.
435. Weber GF, Zawaideh S, Hikita S, Kumar VA, Cantor H, Ashkar S. Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. *J Leukoc Biol*. 2002 Oct;72(4):752-61.
436. Weekes CD, Rosen LS, Capasso A, Wong KM, Ye W, Anderson M, McCall B, Fredrickson J, Wakshull E, Eppler S, Shon-Nguyen Q, Desai R, Huseni M, Hegde PS, Pourmohamad T, Rhee I, Bessudo A. Phase I study of the anti- $\alpha 5\beta 1$  monoclonal antibody MINT1526A with or without bevacizumab in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018 Aug;82(2):339-351.
437. Wei J, Marisetty A, Schrand B, Gabrusiewicz K, Hashimoto Y, Ott M, Grami Z, Kong LY, Ling X, Caruso H, Zhou S, Wang YA, Fuller GN, Huse J, Gilboa E, Kang N, Huang X, Verhaak R, Li S, Heimberger AB. Osteopontin mediates glioblastoma-associated macrophage infiltration and is a potential therapeutic target. *J Clin Invest*. 2019 Jan 2;129(1):137-149.
438. Wei Q, Singh O, Ekinci C, Gill J, Li M, Mamatjan Y, Karimi S, Bunda S, Mansouri S, Aldape K, Zadeh G. TNF $\alpha$  secreted by glioma associated macrophages promotes endothelial activation and resistance against anti-angiogenic therapy. *Acta Neuropathol Commun*. 2021
439. Weijts BG, Bakker WJ, Cornelissen PW, Liang KH, Schaftenaar FH, Westendorp B, de Wolf CA, Paciejewska M, Scheele CL, Kent L, Leone G,

- Schulte-Merker S, de Bruin A. E2F7 and E2F8 promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1. *EMBO J.* 2012 Oct 3;31(19):3871-84.
440. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008 Jul 31;359(5):492-507.
441. Wesolowska A, Kwiatkowska A, Slomnicki L, Dembinski M, Master A, Sliwa M, Franciszewicz K, Chouaib S, Kaminska B. Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion--an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor. *Oncogene.* 2008 Feb 7;27(7):918-30
442. Westendorp B, Mokry M, Groot Koerkamp MJ, Holstege FC, Cuppen E, de Bruin A. E2F7 represses a network of oscillating cell cycle genes to control S-phase progression. *Nucleic Acids Res.* 2012 Apr;40(8):3511-23.
443. Westphal M, Lamszus K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2011; 12: 495–508
444. Wierzba-Bobrowicz T, Kuchna I, Matyja E. Reaction of microglial cells in human astrocytomas (preliminary report). *Folia Neuropathol.* 1994;32(4):251-2.
445. Wierzba-Bobrowicz T, Lewandowska E, Kosno-Kruszewska E. Morphologic analysis of microglia in astrocytomas. *Neurol Neurochir Pol.* 1997 Jan-Feb;31(1):51-62.
446. Wiesenhofer B, Stockhammer G, Kostron H, Maier H, Hinterhuber H, Humpel C. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptor (GFR-alpha 1) are strongly expressed in human gliomas. *Acta Neuropathol.* 2000 Feb;99(2):131-7.
447. Wisniewski P, Ellert-Miklaszewska A, Kwiatkowska A, Kaminska B. Non-apoptotic Fas signaling regulates invasiveness of glioma cells and modulates MMP-2 activity via NFkappaB-TIMP-2 pathway. *Cell Signal.* 2010 Feb;22(2):212-20.
448. Wojtukiewicz MZ, Mysliwiec M, Matuszewska E, Sulkowski S, Zimnoch L, Politynska B, Wojtukiewicz AM, Tucker SC, Honn KV. Heterogeneous Expression of Proangiogenic and Coagulation Proteins in Gliomas of

- Different Histopathological Grade. *Pathol Oncol Res.* 2021 Mar 31;27:605017.
449. Wondergem R, Ecay TW, Mahieu F, Owsianik G, Nilius B. HGF/SF and menthol increase human glioblastoma cell calcium and migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Jul 18;372(1):210-5.
450. Wordeman L. How Kinesin Motor Proteins Drive Mitotic Spindle Function: Lessons from Molecular Assays. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2010;21:260–268. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.01.018
451. Wu A, Wei J, Kong LY, Wang Y, Priebe W, Qiao W, Sawaya R, Heimberger AB. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol.* 2010 Nov;12(11):1113-25.
452. Wu J, Yang H, Cheng J, Zhang L, Ke Y, Zhu Y, Wang C, Zhang X, Zhen X, Zheng LT. Knockdown of milk-fat globule EGF factor-8 suppresses glioma progression in GL261 glioma cells by repressing microglial M2 polarization. *J Cell Physiol.* 2020 Nov;235(11):8679-8690.
453. Wu Q, Li L, Miao C, Hasnat M, Sun L, Jiang Z, Zhang L. Osteopontin promotes hepatocellular carcinoma progression through inducing JAK2/STAT3/NOX1-mediated ROS production. *Cell Death Dis.* 2022 Apr 13;13(4):341.
454. Wu W, Yang H, Wang Z, Zhang Z, Lu X, Yang W, Xu X, Jiang Y, Li Y, Fan X, Shao Q. A Noncanonical Hedgehog Signaling Exerts a Tumor-Promoting Effect on Pancreatic Cancer Cells Via Induction of Osteopontin Expression. *Cancer Biother Radiopharm.* 2021 Dec 31.
455. Xiao Y, Wang Z, Zhao M, Deng Y, Yang M, Su G, et al. Single-cell transcriptomics revealed subtype-specific tumor immune microenvironments in human glioblastomas. *Front Immunol* (2022) 13:914236.
456. Xu X, Zhang A, Zhu Y, He W, Di W, Fang Y, Shi X. MFG-E8 reverses microglial-induced neurotoxic astrocyte (A1) via NF- $\kappa$ B and PI3K-Akt pathways. *J Cell Physiol.* 2018 Jan;234(1):904-914.
457. Yamada K, Uchiyama A, Uehara A, Perera B, Ogino S, Yokoyama Y, Takeuchi Y, Udey MC, Ishikawa O, Motegi S. MFG-E8 Drives Melanoma Growth by Stimulating Mesenchymal Stromal Cell-Induced Angiogenesis and M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Cancer Res.* 2016 Jul 15;76(14):4283-92.

458. Yamada S, Bu XY, Khankaldyyan V, Gonzales-Gomez I, McComb JG, Laug WE. Effect of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) on glioblastoma growth in nude mice. *Neurosurgery*. 2006 Dec;59(6):1304-12; discussion 1312.
459. Yamaguchi T, Sakaguchi S. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin Cancer Biol*. 2006 Apr;16(2):115-23.
460. Yamaguchi Y, Shao Z, Sharif S, Du XY, Myles T, Merchant M, Harsh G, Glantz M., Recht L, Morser J, Leung LL Thrombin-cleaved fragments of osteopontin are overexpressed in malignant glial tumors and provide a molecular niche with survival advantage. *J Biol Chem* 2013 Feb 1;288(5):3097-111
461. Yan W, Qian C, Zhao P, Zhang J, Shi L, Qian J, Liu N, Fu Z, Kang C, Pu P, You Y. Expression pattern of osteopontin splice variants and its functions on cell apoptosis and invasion in glioma cells. *Neuro Oncol*. 2010 Aug;12(8):765-75.
462. Yang J, Fu Z, Zhang X, Xiong M, Meng L, Zhang Z. TREM2 ectodomain and its soluble form in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2020 Jul 7;17(1):204.
463. Yang L, Huang J, Ren X, Gorska AE, Chytil A, Aakre M, Carbone DP, Matrisian LM, Richmond A, Lin PC, Moses HL. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell*. 2008 Jan;13(1):23-35
464. Yang L, Lin Z, Huang Q, Lin J, Chen Z, Zhou L, Zhang P. Effect of vascular endothelial growth factor on remodeling of C6 glioma tissue in vivo. *J Neurooncol*. 2011 May;103(1):33-41.
465. (a) Yang W, Warrington NM, Taylor SJ, Whitmire P, Carrasco E, Singleton KW, Wu N, Lathia JD, Berens ME, Kim AH, Barnholtz-Sloan JS, Swanson KR, Luo J, Rubin JB. Sex differences in GBM revealed by analysis of patient imaging, transcriptome, and survival data. *Sci Transl Med*. 2019 Jan 2;11(473):eaao5253.
466. (b) Yang Y, Li J, Song Q, Zhu K, Yu X, Tian Y, Zhang J. Reduction in milk fat globule-EGF factor 8 inhibits triple-negative breast cancer cell viability and migration. *Oncol Lett*. 2019 Mar;17(3):3457-3465.

467. Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schneider H, Higashiyama S, Saitoh Y, Yamakido Y, Taooka Y, Sheppard D. The integrin alpha(9)beta(1) binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J Biol Chem* 1999 Dec 17;274(51):36328-34
468. Yoshie O, Matsushima K. CCR4 and its ligands: from bench to bedside. *Int Immunol*. 2015 Jan;27(1):11-20.
469. Youn JI, Gabrilovich DI. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol*. 2010 Nov;40(11):2969-75.
470. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2008 Oct 15;181(8):5791-802.
471. Yu JS, Lee PK, Ehtesham M, Samoto K, Black KL, Wheeler CJ Intratumoral T cell subset ratios and Fas ligand expression on brain tumor endothelium. *J Neurooncol*. 2003 Aug-Sep; 64(1-2):55-61.
472. Yu XQ, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Giachelli CM, Atkins RC, Johnson RJ, Lan HY. A functional role for osteopontin in experimental crescentic glomerulonephritis in the rat. *Proc Assoc Am Physicians*. Jan-Feb 1998;110(1):50-64.
473. Zammaron BF, Chen WJ: Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci* 2011; 7: 651-8
474. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, McDermott D, Quiceno D, Youmans A, O'Neill A, Mier J, Ochoa AC. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res*. 2005 Apr 15;65(8):3044-8.
475. Zeng P, Zhang X, Xiang T, Ling Z, Lin C, Diao H. Secreted phosphoprotein 1 as a potential prognostic and immunotherapy biomarker in multiple human cancers *Bioengineered*. 2022 Feb;13(2):3221-3239.
476. Zeng Y, Yao X, Chen L. Sphingosine-1-phosphate induced epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma via an MMP-7/syndecan-1/TGF- $\beta$  autocrine loop. *Oncotarget* 2016; 7(39): 63324–63337.
477. Zhai H, Heppner FL, Tsirka SE. Microglia/macrophages promote glioma progression. *Glia*. 2011 Mar;59(3):472-85

478. Zhang L, Alizadeh D, Van Handel M, Kortylewski M, Yu H, Badie B. Stat3 inhibition activates tumor macrophages and abrogates glioma growth in mice. *Glia*. 2009 Oct;57(13):1458-67
479. Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*. 2006 May 15;107(10):3925-32.
480. Zhao JY, Ma XL, Li ZM, Deng R, Wang SM, Shen GB, Zhang J, Wang FT, Zhang BL, Wei YQ. Down-regulation of MFG-E8 by RNA interference combined with doxorubicin triggers melanoma destruction. *Clin Exp Med*. 2015 May;15(2):127-35.
481. Zhao M, Xu H, Liang F, He J, Zhang J. Association of osteopontin expression with the prognosis of glioma patient: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2015 Jan;36(1):429-36.
482. Zhao Q, Xu L, Sun X, Zhang K, Shen H, Tian Y, Sun F, Li Y. MFG-E8 overexpression promotes colorectal cancer progression via AKT/MMPs signalling. *Tumour Biol*. 2017;39(1010428317707881)
483. Zhao QJ, Yu YB, Zuo XL, Dong YY, Li YQ. Milk fat globule-epidermal growth factor 8 is decreased in intestinal epithelium of ulcerative colitis patients and thereby causes increased apoptosis and impaired wound healing. *Mol Med*. 2012 May 9;18(1):497-506.
484. Zhao YZ, Lin Q, Wong HL, Shen XT, Yang W, Xu HL, Mao KL, Tian FR, Yang JJ, Xu J, Xiao J, Lu CT. Glioma-targeted therapy using Cilengitide nanoparticles combined with UTMD enhanced delivery. *J Control Release*. 2016 Feb 28;224:112-125
485. Zheng W, Li R, Pan H, He D, Xu R, Guo TB, Guo Y, Zhang JZ. Role of osteopontin in induction of monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1beta through the NF-kappaB and MAPK pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009 Jul;60(7):1957-65.
486. Zhou F. Expression of multiple granzymes by cytotoxic T lymphocyte implies that they activate diverse apoptotic pathways in target cells. *Int Rev Immunol* 2010; 29: 38-55
487. Zhou W, Ke SQ, Huang Z, Flavahan W, Fang X, Paul J, Wu L, Sloan AE, McLendon RE, Li X, Rich JN, Bao S. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol*. 2015 Feb;17(2):170-82.

488. Zhu B, Suzuki K, Goldberg HA, Rittling SR, Denhardt DT, McCulloch CA, Sodek J. Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors: evidence of a role for an intracellular form of osteopontin. *J Cell Physiol.* 2004 Jan;198(1):155-67.
489. Zhu X, Fujita M, Snyder LA, Okada H. Systemic delivery of neutralizing antibody targeting CCL2 for glioma therapy. *J Neurooncol.* 2011 Aug;104(1):83-92.
490. Zhu Z, Khan MA, Weiler M, Blaes J, Jestaedt L, Geibert M, Zou P, Gronych J, Bernhardt O, Korshunov A, Bugner V, Lichter P, Radlwimmer B, Heiland S, Bendszus M, Wick W, Liu HK. Targeting self-renewal in high-grade brain tumors leads to loss of brain tumor stem cells and prolonged survival. *Cell Stem Cell.* 2014 Aug 7;15(2):185-98.
491. Zöllner T, Schneider A, Kleimeyer C, Masuda T, Potru PS, Pfeifer D, Blank T, Prinz M, Spittau B. Silencing of TGFbeta signalling in microglia results in impaired homeostasis. *Nat Commun.* 2018 Oct 1;9(1):4011.
492. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2006 Apr;6(4):295-307.

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140545-MFGE8>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00689221>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02017717>